

**Maßnahmen zur Verbesserung
der Produktion von
rekombinanten Proteinen und
Plasmid-DNS**

Habilitationsschrift

Technische Fakultät

AG Fermentationstechnik

1999

Dr. techn. Dipl.-Ing. Karl Hans Friehs

gratiarum actio

Ich möchte mit meinem Dank bei **James E. Bailey** beginnen. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, sowohl meinen wissenschaftlichen aber auch persönlichen Horizont im schönen Kalifornien zu erweitern. Leider kann Ihn dieser Dank nicht mehr direkt erreichen. Aber wer weiß schon, welche Modelle unserer Wirklichkeit entsprechen und ob nicht irgendein Zustand von *Jay* existiert, den dieser Dank erreicht.

Während meines Aufenthalts am CALTECH in Pasadena hatte ich das Vergnügen **Astrid** und **Thomas Scheper** kennenzulernen, mit denen mich seit dem eine „dicke Freundschaft“ verbindet. Das erste was sie mir beibrachten war die Erkenntnis, dass der Dialekt der Hannoveraner das Hochdeutsch ist. Beide hatten auf mein Leben großen Einfluss: u.a. weil ich durch Thomas an das Institut für Technische Chemie (das TCI) nach Hannover gekommen bin und weil ich durch sie meine Frau **Andrea** kennengelernt habe.

Für die Möglichkeit weiter in die unendlichen Weiten der Biotechnologie einzudringen, zu forschen und zu lehren bin ich **Karl Schügerl**, dem ehemaligen Leiter des TCI, sehr dankbar. Er hat mir den Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe „Bioprozeßtechnik gentechnisch veränderter Mikroorganismen“ am TCI ermöglicht. In meiner TCI-Arbeitsgruppe sind von fleißigen Mitarbeitern einige der Arbeiten durchgeführt worden, die im experimentellen Teil Berücksichtigung fanden. Sie sind im Vorwort aufgeführt und Ihnen gilt ebenso mein Dank.

Ein großer Teil meines Dankes gebührt **Erwin Flaschel**. Als Inhaber des Lehrstuhls für Fermentationstechnik hat er mir unter anderem die Gelegenheit gegeben an der Entwicklung der AG Fermentationstechnik mitzuwirken, eigenständig aber nie einsam Forschungsprojekte zu planen und zu betreuen, einen Studiengang für Molekulare Biotechnologie mit aufzubauen und einen Blick zu den Höhen der Mathematik und in die Abgründe der deutschen Rechtschreibung zu werfen. Dabei konnte ich immer auf sein kollegiales offenes Ohr und auf seine freundschaftliche Unterstützung bauen. Nicht zuletzt hat er mir die Chance geboten, die vorliegende Arbeit zu verfassen.

Der gesamten AG Fermentationstechnik, deren Zusammensetzung sich im Laufe der Jahre natürlich ständig ändert, schulde ich Dank für das hervorragende Arbeitsklima. Alle Mitarbeiter, durch deren Arbeiten wissenschaftliche Erkenntnisse möglich waren, die in diese Arbeit einfließen, werden ebenfalls im Vorwort erwähnt und auch Ihnen gilt mein

Dank. Speziell bedanken will ich mich beim „harten Kern“ der AG: Raumflotten-Chefingenieur **Thomas Schäffer**, Herr der Gene **Eberhard „Ebson“ Wünsch** und Chef-Labormanagerin **Kirsten Lanfermann**, besonders dafür, dass sie das Labor und die Rechner am Laufen halten.

Helmut Schwab, vom Institut für Biotechnologie der TU Graz danke ich für seine langjährige Freundschaft und seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten. Aber vor allem danke ich ihm dafür, mich auf den Geschmack gebracht zu haben, Gentechnik und Biotechnologie zu verbinden.

Nichts wäre jedoch gelungen ohne meiner Frau **Andrea**, meiner Schwester **Helene** und Schwager **Heinrich** und meinen Eltern **Johanna** und **Albert** sowie meinen norddeutschen Schwiegereltern **Waltraud** und **Fredi**, sowie meinen Freunden **Korl**, **Sam**, **Bernd** und **Uli**.

Vorwort

Die vorliegende Arbeit besteht aus Teilen meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten am *California Institute of Technology* in Pasadena, USA, am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover und am Lehrstuhl für Fermentationstechnik der Universität Bielefeld und versucht diese in einen größeren Zusammenhang zu stellen.

Sie umfaßt neben einer kurzen Einführung, in der es um Begriffsdefinitionen und Ziele geht, und einer ebenso kurzen Schlußbetrachtung, die einen Vergleich von Expressionssystemen und einen kurzen Blick in die Zukunft enthält, einen theoretischen Teil und einen experimentellen Teil.

Die theoretischen Grundlagen beginnen im ersten Kapitel mit einem Abriß der Gentechnik als Methodensammlung zur Optimierung von Mikroorganismen. In fünf weiteren Kapiteln werden Maßnahmen beschrieben, mit denen bestimmte Optimierungsziele der Stammentwicklung erreicht werden können. Diese fünf Kapitel folgen dem theoretischen Ablauf der Produktion von rekombinanten Proteinen. Beginnend mit Betrachtungen der DNS-Ebene, folgt die Ebene der Transkription/Translation, die Protein-Ebene und die Frage nach der Lokalisierung rekombinanter Produkte. Das letzte Kapitel behandelt Aspekte der Aufarbeitung.

Die Einteilung des experimentellen Teils erfolgt zwar in Anlehnung an die Gliederung des theoretischen Teils, sie wird jedoch durch spezifische Schwerpunkte der durchgeführten Forschung geprägt. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse werden dargestellt und diskutiert. Dabei nehmen Fragen der DNS-Ebene, die sich vor allem auf Plasmide beziehen, eine wichtige Rolle ein und umfassen die ersten drei Kapitel. Experimente auf der Ebene der Transkription/Translation auf dem Gebiet regulierbarer Promotoren beinhaltet Kapitel vier. Die beiden sich anschließenden Kapitel umfassen Experimente zu Fragen der Lokalisierung und Aufarbeitung rekombinanter Proteine. Die Entsorgung von rekombinanter und nicht rekombinanter Biomasse ist Thema des letzten experimentellen Kapitels.

Die meisten der präsentierten Daten wurden unter Verwendung von *Escherichia coli* gewonnen, einige mit zwei anderen GRAM-negativen Bakterien, *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutrophus*) und *Klebsiella planticola*. Die Studien zur Verwertung von mikrobieller Biomasse wurde neben *Escherichia coli* mit dem GRAM-positiven Bakterium *Bacillus licheniformis* durchgeführt.

Die allgemeinen Probleme von genetischer Stabilität, Genexpression und Aufarbeitung rekombinanter Produkte und die daraus abgeleiteten Maßnahmen zur Verbesserung der Produktion von Plasmid-DNS und rekombinanten Proteinen lassen sich im Prinzip auch auf andere Organismen übertragen und mögliche Antworten auf Fragen der Optimierung würden sicher ähnlich ausfallen, wie bei *Escherichia coli*.

Die dargestellten experimentellen Arbeiten beruhen zum Teil auf Diplomarbeiten und Doktorarbeiten, die von mir am Institut für Technische Chemie (TCI) der Universität Hannover und am Lehrstuhl für Fermentationstechnik (LFT) der Universität Bielefeld betreut wurden. Das sind die Diplomarbeiten von **Fariba Eghtessadi** (TCI), **Dieter Hartmann** (LFT), **Kirstin Hebenbrock** (TCI), **Ole Menssing** (LFT), **Joe Max Risse** (LFT), **Frank Schierl** (LFT), **Torsten Schmidt** (LFT), **Martina Schriefer** (TCI), **Miriam Stephan** (LFT), **Carsten Stiegelmeier** (TCI) und **Carsten Voss** (LFT) sowie die Doktorarbeiten von **Christian Edler** (TCI), **Hans Maschke** (TCI), **Ralf Neitzel** (LFT), **Ludger Poppenborg** (LFT), **Torsten Schmidt** (LFT), **Carsten Stiegelmeier** (LFT) und **Justine Wittler** (LFT). Das Kapitel 3.5 zur Sekretion von rekombinanten Plasmiden enthält u.a. Ergebnisse aus der Zusammenarbeit mit **Dr. Gerd Miksch**, vormals Akademie der Wissenschaften Leipzig, jetzt LFT.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINFÜHRUNG	5
1.1	REKOMBINANTE PROTEINE	9
1.2	PLASMID-DNS	11
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	14
2.1	GENTECHNISCHE METHODEN IM ÜBERBLICK	14
2.1.1	<i>Vektoren für E. coli</i>	15
2.1.2	<i>Genquellen</i>	18
2.1.3	<i>Übertragungsmechanismen für Plasmidvektoren</i>	20
2.1.4	<i>Selektion und Analyse von Klonen</i>	21
2.2	MAßNAHMEN AUF EBENE DER DNS	22
2.2.1	<i>Gendosis und Plasmidkopienzahl</i>	22
2.2.1.1	Bestimmung der Plasmidkopienzahl	23
2.2.1.2	Veränderung der Plasmidkopienzahl	26
2.2.2	<i>Strukturelle Stabilität</i>	28
2.2.3	<i>Segregative Stabilität (Plasmidstabilität)</i>	30
2.2.3.1	Analytik der Plasmidstabilität	30
2.2.3.2	Erhöhung der Plasmidstabilität	30
2.3	MAßNAHMEN AUF DER EBENE DER TRANSKRIPTION UND TRANSLATION	38
2.3.1	<i>Promotoren: Stärke und Regulation sowie Terminatoren</i>	39
2.3.1.1	Promotorstärke	39
2.3.1.2	Regulation von Promotoren	41
2.3.1.3	Artspezifität und Kompatibilität von Promotoren	45
2.3.1.4	Promotoren für die Fermentationstechnik	46
2.3.1.5	Terminatoren	50
2.3.2	<i>Boten-RNS (mRNS) und ribosomale Bindungsstelle</i>	50
2.3.2.1	Stabilität der mRNS	50
2.3.2.2	Ribosomale Bindungsstellen (RBS)	52
2.3.3	<i>Start-Codon, Stop-Codon, Codon-Präferenz und Leserahmen</i>	53
2.3.3.1	Start-Codon und Stop-Codon	53
2.3.3.2	Codon-Präferenz	53
2.3.3.3	Leserahmen	54
2.4	MAßNAHMEN AUF EBENE DER PROTEINE	55
2.4.1	<i>Proteolyse und ihre Reduzierung</i>	56
2.4.1.1	Reduzierung der Proteolyse durch Beeinflussung der Proteasenaktivität	57
2.4.1.1	Reduzierung der Proteolyse durch Änderungen am rekombinanten Protein	58
2.4.1.2	Reduzierung der Proteolyse während der Aufarbeitung	59
2.4.2	<i>Proteinfaltung</i>	59
2.4.2.1	Verbesserung der In-vivo-Faltung von Proteinen	61

2.4.2.2	Proteinaggregate (Inclusion Bodies, IB).....	62
2.4.3	<i>Posttranslationale Modifikation</i>	64
2.4.4	<i>Produktheterogenität</i>	64
2.5	MAßNAHMEN ZUR LOKALISIERUNG REKOMBINANTER PRODUKTE.....	65
2.5.1	<i>Lokalisierung rekombinanter Proteine in Escherichia coli</i>	67
2.5.2	<i>Sekretionstypen in GRAM-negativen Bakterien</i>	68
2.5.3	<i>Maßnahmen für den Transport rekombinanter Proteine in das Periplasma von E. coli</i>	74
2.5.3.1	Maßnahmen über die Signalsequenz.....	74
2.5.3.2	Co-Expression von Sec-Proteinen.....	76
2.5.3.3	Beeinflussung der Faltung im Periplasma.....	76
2.5.4	<i>Verankerung von rekombinanten Proteinen an der äußern Membran</i>	77
2.5.5	<i>Maßnahmen zur Sekretion bzw. zum Export rekombinanter Proteine in das Medium von E. coli</i>	77
2.5.5.1	Sekretion bzw. Freisetzung der Proteine aus dem Periplasma.....	77
2.5.5.2	Direkter Export aus dem Cytoplasma über geeignete Sekretionspfade.....	79
2.5.5.3	Spontaner (ungeklärter) Export.....	80
2.6	MAßNAHMEN ZUR VERBESSERUNG DER AUFARBEITUNG.....	80
2.6.1	<i>Maßnahmen zur Zellernte und zum Zellaufschluß</i>	81
2.6.1.1	Änderungen der Flokkulationseigenschaften.....	81
2.6.1.2	Maßnahmen beim Zellaufschluß von <i>E. coli</i>	82
2.6.2	<i>Isolierung und Reinigung rekombinanter Proteine</i>	83
2.6.2.1	Selektive Fällung.....	83
2.6.2.2	Extraktion in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen.....	84
2.6.2.3	Chromatographie.....	85
2.6.2.4	Spezielle Affinitätsverfahren.....	87
2.6.2.5	Spaltung von Fusionsproteinen.....	88
2.6.3	<i>Qualitätssicherung und Entsorgung von rekombinanten Abfällen</i>	89
3	EXPERIMENTE UND DISKUSSION	92
3.1	PLASMIDKOPIENZAHLE: BESTIMMUNG UND BEEINFLUSSUNG.....	92
3.1.1	<i>Quantifizierung von Plasmid-DNS</i>	93
3.1.2	<i>Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Agarosegelelektrophorese</i>	96
3.1.2.1	Direkte Densitometrie von Agarosegelen.....	98
3.1.2.2	Densitometrie der Fotonegative von Agarosegelen.....	98
3.1.2.3	Einflüsse bei der Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Agarosegelelektrophorese.....	98
3.1.3	<i>Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Kapillarelektrophorese</i>	100
3.1.3.1	Kapillarelektrophorese von Plasmid-DNS.....	101
3.1.3.2	Plasmidquantifizierung mit Kapillarelektrophorese u. YOYO.....	102
3.1.3.3	Vergleich von Plasmidisolierungsmethoden.....	103
3.1.3.4	Optimierung der DNS-Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese.....	105
3.1.4	<i>Erhöhung der Plasmidkopienzahl durch Runaway-replication</i>	106
3.1.4.1	Das "runaway-replication" System <i>E. coli</i> JM103 pOU130.....	106

3.1.4.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> JM103 pOU130 und Induktion der Plasmidreplikation	107
3.2	STRUKTURELLE UND SEGREGATIVE PLASMIDSTABILITÄT	108
3.2.1	<i>Strukturelle Instabilität beim Plasmid pJMC40</i>	108
3.2.2	<i>Segregative Plasmidstabilität und ihre Bestimmung in der Praxis</i>	110
3.2.3	<i>Segregative Stabilisierung von Plasmiden über Selektionsdruck</i>	111
3.2.4	<i>Segregative Stabilisierung über eine spezielle genetische Funktion (par)</i>	114
3.2.5	<i>Segregative Plasmidstabilität durch hohe Kopienzahl und in einem Mehrplasmid-System</i>	115
3.2.6	<i>Einfluß des Mediums auf die segregative Plasmidstabilität</i>	118
3.3	PLASMIDFORMEN: BEDEUTUNG UND ANALYTIK	119
3.3.1	<i>Plasmidqualität und Qualitätskontrolle</i>	120
3.3.2	<i>Identifizierung von Plasmidformen mittels Elektronenmikroskopie</i>	121
3.3.3	<i>Zuordnung von Plasmidformen zu Banden in Agarosegelen</i>	123
3.3.4	<i>Zuordnung von Plasmidformen zu Signalen der Kapillargelelektrophorese</i>	126
3.3.4.1	Trennung von Plasmidformen	127
3.3.4.2	Zuordnung von Elektropherogrammsignalen zu Plasmidformen	128
3.3.4.3	Vergleich der Mobilitäten von pUC19 in Kapillargelelektrophorese und AGE	131
3.3.5	<i>Quantifizierung von Plasmidformen</i>	132
3.3.6	<i>Verunreinigungen durch Nukleinsäuren</i>	134
3.4	PROMOTOREN	136
3.4.1	<i>Promotorstärke</i>	136
3.4.2	<i>Induktion von Promotoren</i>	139
3.4.2.1	Induktion des lac-Promotors	139
3.4.2.2	Sauerstoffabhängige Promotoren vgb und nirB	141
3.4.3	<i>Basale Transkription</i>	145
3.4.3.1	Experimente zur kontrollierten Expression der Protease La (lon)	145
3.4.3.2	Basale Transkription beim vgb-Promotor	150
3.4.3.3	Reduktion der basalen Transkription beim nirB-Promotor	152
3.5	LOKALISIERUNG REKOMBINANTER PRODUKTE	154
3.5.1	<i>Klonierung und Lokalisierung der Levanase aus B. subtilis in A. eutrophus</i>	155
3.5.2	<i>Co-Expression von Sec-Proteinen</i>	165
3.5.3	<i>Entwicklung und Einsatz eines E. coli-Sekretionssystems</i>	170
3.5.3.1	Wirkungsweise des Bacteriocin-Release -Protein bei der Sekretion von Colicinen	170
3.5.3.2	Sekretion heterologer Proteine durch Bacteriocin-Release-Protein	172
3.5.3.3	Expression des kil-Gens unter Stationärphase-Promotoren	173
3.5.3.4	Sekretion einer β -Glucanase durch <i>E. coli</i> bei Anzucht im Bioreaktor	175
3.5.4	<i>Entwicklung von Sekretionsstämmen von Klebsiella planticola</i>	180
3.5.4.1	Produktivität und Sekretion in <i>K. planticola</i> (Rf) mit und ohne Sekretionsfunktion	182
3.5.4.2	Fermentation von <i>K. planticola</i> (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc mit Zufütterung	185
3.6	VERBESSERUNG DER AUFARBEITUNG DURCH FUSIONSPROTEINE	187
3.6.1	<i>Affinitätschromatographie mit SpA als Fusionskomplement</i>	189
3.6.2	<i>Konstruktion eines Hisactophilin-GFP Fusionsproteins</i>	190

3.7	ENTSORGUNG UND VERWERTUNG VON MIKROORGANISMEN	196
3.7.1	<i>Entsorgung von rekombinanten E. coli</i>	196
3.7.1.1	Inaktivierung durch Desinfektionsmittel	197
3.7.1.2	Inaktivierung durch Ethanol	199
3.7.1.3	Inaktivierung durch NaOH	200
3.7.1.4	Thermische Inaktivierung	201
3.7.2	<i>Verwertung von mikrobieller Biomasse</i>	203
3.7.2.1	Herstellung und Verwertung von Extrakten aus <i>E. coli</i> -Biomasse	204
3.7.2.2	Herstellung und Verwertung von Extrakten aus <i>Bacillus licheniformis</i> -Biomasse	208
4	SCHLUßBETRACHTUNG	215
5	LITERATURVERZEICHNIS	220
6	ABKÜRZUNGEN & SYMBOLE	266

1 Einführung

Die Herstellung von Produkten durch die Fermentationstechnik ruht auf drei Säulen, die in Abbildung 1-1 zu sehen sind.

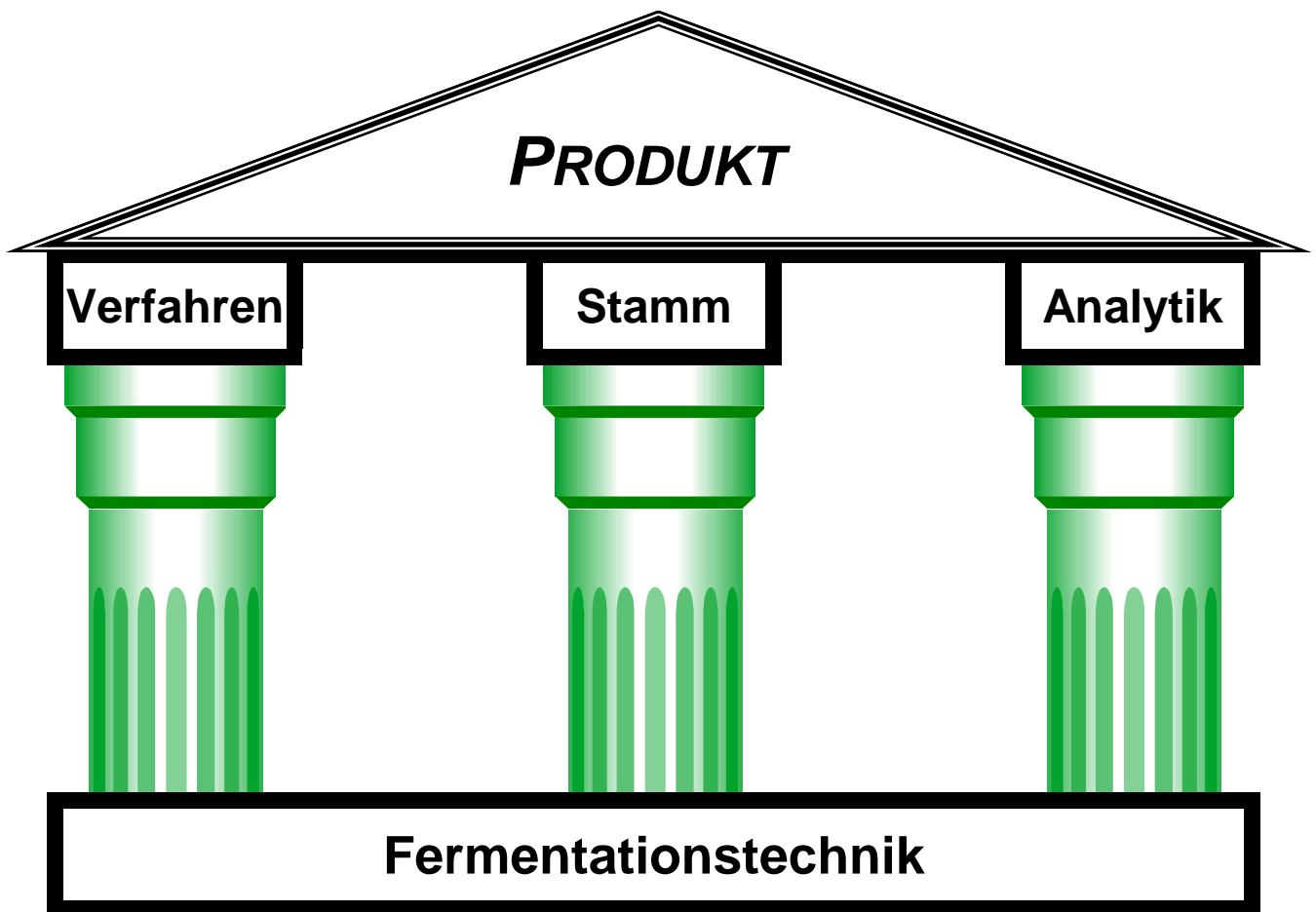


Abbildung 1.1-1: Die drei Säulen der Fermentationstechnik

Das Verfahren entsteht aus Forschung und Entwicklung der fermentationstechnischen Verfahrenstechnik und reicht von der Vorbereitung der Medien, über die Konstruktion von Bioreaktoren bis hin zur Aufreinigung fermentationstechnischer Produkte. Die zweite Säule ergibt sich aus dem verwendeten Biokatalysator. In der Fermentationstechnik sind dies Stämme von Mikroorganismen. Als dritte Säule kann die Analytik angesehen werden, mit den Schwerpunkten Prozeßanalytik, Analytik der Stammeigenschaften und

Produktanalytik. Daraus ergeben sich für die Erarbeitung neuer und für die Optimierung etablierter fermentationstechnischer Prozesse drei prinzipielle Ansätze: die verfahrenstechnische Seite, der Mikroorganismus und die Analytik.

Die Optimierung des Biokatalysators wird in der Fermentationstechnik als Stammentwicklung bezeichnet. Seit Menschen Biotechnologie betreiben und seitdem sie wissen, daß Mikroorganismen daran beteiligt sind, wurde versucht, neue Stämme mit neuen StoffwechsellLeistungen zu isolieren und bewährte Organismen in ihrer Leistung zu steigern. Betrachtet man die Geschichte der Stammentwicklung in der Biotechnologie, so erscheint es sinnvoll diese in eine Prä-Gentechnik Ära und in eine Ära der Gentechnik einzuteilen. Bevor AVERY, CHARGAFF und SANGER und deren Kollegen durch ihre Arbeiten die Grundlagen für die Gentechnik geschaffen hatten, wurden Stämme durch Zuchtwahl, aber vor allem durch Mutation und Selektion optimiert.

1944 konnten AVERY und Kollegen zeigen, daß die DNS die Trägerin der Erbinformation ist [AVERY *et al.*, 1944]. CHARGAFF und Kollegen fanden die Grundlagen für die Basenpaarung. Sie zeigten, daß Adenin und Thymin einerseits, sowie Guanin und Cytosin andererseits jeweils in gleichen Mengen in der DNS vorkommen, unabhängig aus welchem Organismus die DNS isoliert wird [CHARGAFF *et al.*, 1951]. SANGER hatte durch die Sequenzierung von Proteinen die damalige Theorie über den Proteinaufbau, zum Einsturz gebracht [SANGER & TUPPY, 1951] und der grundlegenden Idee, daß Gene Proteine kodieren, den Weg geebnet. Dies eröffnete überhaupt erst die Möglichkeit über einen genetischen Code nachzudenken [JUDSON, 1993]. Diese und weitere bahnbrechende Entdeckungen waren die Voraussetzung, daß COHEN und seine Mitarbeiter 1973 das erste Mal in der Geschichte genetisches Material artübergreifend und reproduzierbar übertragen konnten [COHEN *et al.*, 1972]. Damit begann die Gentechnik und ihre stürmische Entwicklung.

Rekombination bezeichnete die Gesamtheit aller natürlichen Prozesse des Austausches von genetischem Material und damit verbundener Neukombination von Chromosomen, Genen bzw. Genabschnitten, die z.B. bei der Meiose oder bei Mutationen auftreten können. Das daraus abgeleitete Wort *rekombinant* hat jedoch eine zusätzliche Bedeutung bekommen. *Rekombinante DNS* ist mittels Gentechnik *in vitro* veränderte DNS. *Rekombinante Proteine* sind das Ergebnis gentechnischer Veränderungen von Mikroorganismen und Zellen höherer Organismen. Verständlicherweise werden gentechnisch veränderte Organismen als *rekombinante Organismen* bezeichnet, und deren Produkte in Folge als *rekombinante Produkte*. Mittlerweile gibt es auch den Ausdruck *rekombinantes Kapital*, also Kapital das in Unternehmen investiert wird, die

mehr oder weniger etwas mit Gentechnik zu tun haben.

Was sind rekombinante Produkte? Die Antwort für die Fermentationstechnik könnte lauten: Rekombinante Produkte, sind Produkte aus rekombinanten Mikroorganismen. Bezogen auf das Produkt selbst kann dies bedeuten, daß ein bekanntes Produkt von einem rekombinanten Organismus identisch hergestellt wird. Es können aber auch Produkte sein, die sich von natürlich vorkommenden Substanzen nur wenig unterscheiden. Als dritte Produktklasse bietet die Gentechnik die Möglichkeit, völlig neue Substanzen zu planen und herzustellen. Grundlegend kann zwischen rekombinanten Proteinen und Nicht-Protein-Produkten unterschieden werden. Es gibt auch die Möglichkeit des indirekten rekombinanten Produkts. Hierbei wird die Produktion eines Produkts durch Gentechnik verbessert, das Produkt selbst ist völlig unverändert. Tabelle 1-1 gibt einen schematischen Überblick über rekombinante Produkte in der Fermentationstechnik.

Tabelle 1-1: Rekombinante Produkte der Fermentationstechnik

Produkt	Typ	Beispiel	Referenz
Proteine	identisch	Insulin aus <i>E. coli</i>	HELLEBUST <i>et al.</i> , 1999
	verändert	Thermoresistente Enzyme durch Protein-Engineering Aufarbeitung: Affinität-Metallchelatchromatographie mittels His ₆ - Fusionspartner	ARNOLD, 1998 NORDSTROM <i>et al.</i> , 1999
	neu	Gerichtete Evolution,	KUCHNER & ARNOLD, 1997
Nicht-Proteine	identisch	Polyhydroxybuttersäure produziert von <i>E. coli</i> nach Übertragung der Synthesegene Zucker aus transgenen Zuckerrüben	FIDLER & DENNIS, 1992 HALL <i>et al.</i> , 1996
	verändert	Polyhydroxyalkanoate verschiedener Länge	KLINKE <i>et al.</i> , 1999
	neu	Polyketide durch <i>Geneshuffling</i> beteiligter Enzyme <i>Metabolic Engineering</i>	HUTCHINSON, 1999 RYAN <i>et al.</i> , 1999
Verfahrensverbesserung	indirekt	Interner verbesserter Sauerstofftransport durch Hämoglobin-Expression erleichtert Begasung	NILSSON <i>et al.</i> , 1999

Dabei bedeutet

- ❖ identisch: identisch mit der natürlich vorkommenden Substanz
- ❖ verändert: von einer natürlich vorkommenden Substanz abgeleitet
- ❖ neu: bisher in der Natur nicht vorgekommen bzw. entdeckt.

Die Schwierigkeiten rekombinante Produkte im Alltag zu definieren zeigt sich an der Kennzeichnungsverordnung für gentechnisch hergestellte Lebensmittel. Sind Lebensmittel, die mit rekombinanten Enzymen hergestellt wurden (z.B. Käse), selbst rekombinant ?

Kennzeichnungspflichtig sind Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, die gentechnisch veränderte Organismen enthalten oder aus solchen bestehen (z.B. transgene Tomaten, Joghurt mit rekombinanten Lebkulturen) und solche, die aus gentechnisch veränderten Organismen hergestellt wurden, diese jedoch nicht enthalten (z. B. Püree aus transgenen Tomaten, Öl aus transgenem Raps). Nach dieser Verordnung ist der Nachweis einer gentechnischen Veränderung im jeweiligen Lebensmittel das entscheidende Kriterium für eine Kennzeichnung [BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 1998].

Nur wenn in einem Produkt mit anerkannten wissenschaftlichen Methoden nachgewiesen werden kann, daß es Bestandteile aus einem gentechnisch veränderten Organismen enthält, ist der jeweilige Hersteller oder Importeur verpflichtet, darauf hinzuweisen. Nur wenn eine gentechnische Anwendung im Endprodukt stoffliche Relikte hinterläßt, muß gekennzeichnet werden. In vielen Fällen sind diese jedoch nicht mehr vorhanden, da sie im Verlauf von Verarbeitungs- oder Herstellungsverfahren vollständig abgebaut werden [BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 1998].

Prinzipiell sind zwei unterschiedliche Nachweisstrategien von stofflichen Spuren möglich. Über die DNS wird ein bestimmtes Bruchstück aus der Erbsubstanz nachgewiesen, das eindeutig einem rekombinanten Organismus zugeordnet werden kann. Beim Protein wird jenes Eiweiß nachgewiesen, das infolge des übertragenen Gens in einem rekombinanten Organismus neu gebildet wird.

In der Praxis sind bisher Nachweise auf DNS-Ebene möglich. In Deutschland wurden geeignete Standardverfahren zum Nachweis von Soja, Mais, Kartoffeln, Mikroorganismen in Joghurt und Rohwurst bereits amtlich anerkannt. Die Entwicklung von Routinemethoden zum Nachweis auf der Proteinebene dauert an [BUNDESMINISTERIUM

FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN, 1998].

Neben der akademischen bzw. gesetzlichen Einteilung von rekombinanten Produkten können diese auch nach Wert und Menge eingeteilt werden, wie dies in der Tabelle 1-2 dargestellt ist. Die Reaktorgröße ergibt sich aus der Produktionsmenge.

Tabelle 1-2: Einteilung rekombinanter Produkte [HENSING *et al.*, 1995]

Klasse	Jährliche Produktion	Preis pro kg [\$]	Reaktorgröße
Bulk (en gros)	100 – 10.000 t	1-100	> 50 m ³
Spezialitäten	1 - 100 t	> 100	1 – 50 m ³
Medizinische Produkte	1 - 1000 kg	> 1000	0,1 – 5 m ³

1.1 Rekombinante Proteine

Diese Überlegungen machen es verständlich, das besonders medizinische Produkte das Ziel von rekombinanten Fermentationen sind. Tabelle 1-3 dokumentiert das ökonomische Potential von zur Zeit zugelassenen rekombinanten Proteinen für die medizinische Anwendung.

Tabelle 1-3: Rekombinante medizinischer Protein

Protein	Wirkung Anwendung	Anbieter	Weltweite Umsätze 1997 in Mio. US\$	Weltweite Umsätze 1998 in Mio. US\$
Erythropoietin	vermehrte Erythrozytenproduktion	Amgen	1161	1380
G-CSF	gesteigerte Granulozytenbildung	Amgen	1056	1120
Erythropoietin	vermehrte Erythrozytenproduktion	Ortho Biotech	1000	1000
Insulin	Diabetes	Eli Lilly	936	959
α -Interferon	anti-Tumor-Aktivität	Schering-Plough	598	
Hüllproteinfragment des Hepatitis-B-Virus	Impfstoff	SmithKline Beecham	584	
Interferon β -1b	Multiple Sklerose	Schering AG	383	400
Glucocerebrosidase	Morbus Gaucher	Genzyme	333	411
Faktor VIII	Hämophilietherapie	BAYER AG	326	
Follitropin alpha	Ovulationsstimulation	Ares Serono	116	243,8
Gewebeplasminogenaktivator	Therapie von Herzinfarkten	Genentech	261	213

Protein	Wirkung Anwendung	Anbieter	Weltweite Umsätze 1997 in Mio. US\$	Weltweite Umsätze 1998 in Mio. US\$
Somatropin	Therapie bei verzögertem Körperwachstum	Eli Lilly	260	268
GBIIb/IIIa-Antikörper	Thromboseinhibition	Eli Lilly /Centocor	254	365,4
Interferon beta-1a	Multiple Sklerose	Biogen	240	394,9
Somatotropin	Therapie bei verzögertem Körperwachstum	Genentech	224	214
humanisierter Antikörper	Leukämie, Lymphome	Genentech /Roche		162,6
humane DNAse	Mukoviszidose	Genentech	92	93,8
Interleukin	Krebstherapie	Chiron	71	93
GM-CSF	verstärktes Leukozytenwachstum	Immunex	53	63,8
humanes Wachstumshormon	Kleinwuchs	Saizen	38,8	88,2
Interferon-β-1a	Multiple Sklerose	Ares Serono	19	44

Stand August 1999, Quelle: Informations Sekretariat Biotechnologie, DECHEMA, Frankfurt a. Main, www.dechema.de

Auf dem Gebiet der Spezialitäten werden ebenfalls eine Reihe von rekombinanten Proteinen, vornehmlich Enzyme produziert. Tabelle 1-4 ist eine Zusammenstellung von Enzymen der Lebensmittelindustrie.

Tabelle 1-4: Enzyme der Lebensmittelindustrie

Enzym	Anwendung	Anteil rekombinanter Präparate
Acetolactat-Decarboxylase	Baut Diacetyl ab	Nur rekombinante, in Deutschland auf Grund des Reinheitsgebots nicht erlaubt
Amylase	Stärkeindustrie	3 von mehreren
Cellulase	Futterzusatz	2 von 5
Chymosin	Käseherstellung	Vorwiegend rekombinant
Galactosidase	Futterzusatz	Vorwiegend rekombinant
Glucanase	Brauereien	2 von 9, in Deutschland auf Grund des Reinheitsgebots nicht erlaubt
Glucose-Isomerase	Fructoseherstellung	Überwiegend rekombinant
Glucoseoxydase	Glucoseabbau bei Mayonnaiseherstellung	1 von 3

Enzym	Anwendung	Anteil rekombinanter Präparate
Hemicellulase	Stärkeindustrie	1 von 4
Invertase	Zuckerindustrie	Zur Zeit keines
Katalase	Milchindustrie	1 von 3
Lipase	Backhilfen, Fettsäurenmodifikation	5 von 14
Pektinase	Fruchtsaftklärung	Zur Zeit keines am Markt
Phytase	Futterzusatz	Überwiegend rekombinant
Protease	Backzusatz, Fleischindustrie	5 von 15
Pullulanase	Stärkeindustrie	2 von 5
Xylanase	Backmischungen, Fruchtsaftgewinnung	6 von 14

Stand: März 1999, Quelle: www.transgen.de

Rekombinante Massenprodukte sind kaum zu finden. Dies ist am Beispiel von Polyhydroxybuttersäure (PHB) anschaulich zu erklären. PHB ist ein Thermoplast mit ähnlichen Eigenschaften wie Polypropylen. Aber PHB ist biologisch abbaubar. Ein Ersatz von Polypropylen durch PHB wäre ökologisch wünschenswert. Trotz der Klonierung des Synthesepfades in *Escherichia coli* und entsprechenden Fermentationsverfahren, kann PHB nicht unter 4 US-Dollar pro kg produziert werden. Polypropylen kostet zur Zeit knapp 1 US-Dollar pro kg. PHB hat daher erst eine Chance, wenn der Ölpreis drastisch steigt, die Kosten für die fermentative Herstellung auf 25-20 % der derzeitigen Kosten gedrückt werden können oder wenn es in Zukunft als Inhaltsstoff von leicht in großen Mengen anbaubaren transgenen Pflanzen erzeugt werden kann.

1.2 Plasmid-DNS

Plasmid-DNS ist ein rekombinantes Produkt und wird von verschiedenen Unternehmen angeboten. Dazu gehören Standardplasmide wie pBR322 oder pUC18/19 und eine Reihe von Plasmiden mit spezifischen Eigenschaften zur Expression und Aufarbeitung von Plasmiden. Die Preise für Standardplasmide bewegen sich zwischen 200 und 400 DM für 100 µg DNS. Spezialplasmide kosten über 400 DM pro 10 µg DNS. Der Preis ergibt sich aus den hohen Entwicklungskosten und der geringen Menge DNS, die ausreicht, um Plasmide zu transformieren und anschließend in gewünschten Mengen zu isolieren.

Plasmide in der Gentherapie und für die genetischen Impfung

Eine große ökonomische Zukunft für Plasmid-DNS liegt in der Gentherapie und genetischen Impfung. Dabei kann das Einbringen von neuen Genen in einen Menschen prinzipiell auf zwei Arten erfolgen. Bei der einen Methode werden dem menschlichen Körper Zellen von Organen oder Geweben entnommen und im Labor angezchtet. Nach gentechnischer Veränderung werden die Zellen zurück in den Körper implantiert. Diese *in-vitro* Methode erlaubt die zielgenaue Änderung von Zellen, ist jedoch sehr aufwendig und damit teuer. Deshalb werden *In-vivo* Methoden entwickelt und eingesetzt, die es erlauben, DNS direkt in den Körper einzubringen.

In jedem Fall wird die DNS mit Hilfe von Vektoren übertragen. Viele Vektoren beruhen auf Viren. Viren haben zwar eine hohe Transfereffizienz, bringen jedoch auch immunologische und pathologische Probleme mit sich. Daher wird immer mehr versucht nackte DNS zu übertragen. Für diese Methode sind Plasmide als Vektoren hervorragend geeignet. Auf grund der geringeren Effizienz sind jedoch relativ große Mengen an Plasmid-DNS (Milligramm) notwendig. Deshalb werden Verfahren entwickelt, um Plasmid-DNS in großen Mengen und entsprechender Qualität zu produzieren [YEW *et al.*, 1997].

Die Plasmidformenverteilung innerhalb einer Plasmidpräparation spielte bei der kommerziellen Nutzung von plasmidhaltigen Systemen lange keine Rolle. Plasmide wurden hauptsächlich für den Einsatz als Klonierungsvektoren oder Ausgangsmaterial für Größenstandards hergestellt und verkauft. Die verschiedenen Formen werden bei gentechnischen Arbeiten durch Restriktionsenzyme alle in lineare DNS umgewandelt. Erst seit dem Einsatz von Plasmiden in der Gentherapie [WELLS *et al.*, 1998; ANDERSON, 1998] und genetischen Impfung [JIANG *et al.*, 1998; DERTZBUGH, 1998] sind Plasmide ein zukunftsträchtiges biotechnologisch-pharmazeutisches Produkt mit hohem Marktpotential.

Bei der humanen Gentherapie wird DNS in den menschlichen Körper eingebracht. Die DNS gelangt dann in Zellen und soll dort ihre Wirkung entfalten. Aus ethischen Gründen darf dies nur in somatischen Zellen geschehen, d.h. nur die somatische Gentherapie ist gesetzlich erlaubt. Neu eingebrachte DNS, d.h. Gene, sollen fehlerhafte Gene kompensieren, neue erwünschte oder fehlende genetische Eigenschaften ermöglichen oder unerwünschte Gene ausschalten.

Eine weitere interessante Möglichkeit der Wirkung von transferierter DNS ist die Induktion des Immunsystem, also die genetische Impfung. Die minimalste Anforderung an einen

Impfstoff besteht darin, daß er ein Antigen des betreffenden Mikroorganismus oder Virus enthält, gegen den geimpft werden soll. Dies wird üblicherweise dadurch erzielt, daß abgeschwächte oder abgetötete Krankheitserreger oder deren Bestandteile verabreicht werden. Dies birgt nach wie vor eine Reihe von Risiken wie etwa Revertanten oder allergische Reaktionen mit sich [MIMS *et al.*, 1993]. Bei der genetischen Impfung mit Plasmiden werden Gene von geeigneten Antigenen mit Hilfe von Plasmiden in den Menschen transferiert. Nach Expression dieser Gene entsteht die Immunantwort und somit der Impfschutz. Die herkömmlichen Risiken entfallen. Genetische Impfung ist viel sicherer als herkömmliche Methoden der Immunisierung. Ihre Effektivität kann durch Auswahl geeigneter Antigen-Gene gezielt gesteuert werden. Die Haltbarkeit von DNS gegenüber herkömmlichen Impfstoffen ist einfacher zu gewährleisten und zeitlich unproblematischer und die Kosten können bei entsprechenden Produktionsverfahren sogar erheblich niedriger ausfallen. All diese Vorteile sind auch besonders für Entwicklungs- und Schwellenländer von großem Interesse [HASSETT & WHITTON, 1996].

Beide Anwendungen benötigen jedoch große Mengen an Plasmid-DNS. Daher muß die Plasmidproduktion vom Mikrogramm-Maßstab in den Gramm- bzw. Kilogramm-Maßstab verlagert werden. Das ökonomische Potential wird klar, wenn Preise von 500 bis 700 US-Dollar pro mg Plasmid-DNS (Nucleic Acid Purifications, Huntsville, AL 35801, USA) angegeben werden.

Die Anzucht von *Escherichia coli* als Plasmidproduzent ist in großen Reaktoren möglich. Die Schwerpunkte der Forschung liegen allgemein bei der Erhöhung der Produktivität, der praktisch ungelösten Probleme in großem Maßstab (ab 1 m³) Plasmide aus Zelllysaten zu isolieren und zu reinigen und in einer ausgereiften Analytik der Verfahren und der Produkte.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit werden eine Reihe von Maßnahmen aufgezeigt, die zur Erhöhung der Produktivität der Gewinnung von Plasmid-DNS aus Fermentationen von *Escherichia coli* führen. Ein weiterer Schwerpunkt der vorgestellten Untersuchungen liegt in der Entwicklung einer zuverlässigen Plasmidanalytik mittels Kapillargelelektrophorese.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden nach einem kurzen Überblick über die wichtigsten gentechnischen Methoden, Maßnahmen vorgestellt mit denen die Produktivität von gentechnisch veränderten Mikroorganismen, hauptsächlich am Beispiel von *Escherichia coli*, verbessert werden kann. Einerseits kann mit Hilfe der Gentechnik z. B. die Expression von rekombinanten Proteinen ermöglicht und optimiert werden. Andererseits können durch diese Maßnahmen Auswirkungen auftreten, die zu Problemen führen können. Diese können, wenn sie nicht erkannt und zumindest minimiert werden, Einbußen in der Produktivität bewirken.

Aus einer molekularbiologischen Sichtweise ergeben sich eine Reihe von Faktoren, die die Expression, aber auch die Aufarbeitung von rekombinanten Produkten beeinflussen. Aus jahrelanger praktischer Erfahrung hat es sich nützlich erwiesen, diese Faktoren und die sich dadurch ergebenden Maßnahmen, verschiedenen Betrachtungsebenen zu zuordnen. Diese sind die DNS-Ebene, die Transkriptions-Translations-Ebene, die Protein-Ebene, die Ebene der Lokalisierung rekombinanter Produkte und die Ebene der Aufarbeitung. Entsprechend sind die folgenden Kapitel strukturiert.

2.1 Gentechnische Methoden im Überblick

Die Konstruktion von gentechnisch veränderten Organismen, bei der neue Gene auf einen Organismus übertragen werden, kann in einige wenige Schritte eingeteilt werden.

1. Bereitstellung der zu übertragenden Gene.
2. Transfer dieser Gene.
3. Selektion der Zellen bzw. Organismen, die die neuen Gene beinhalten.

In den meisten Fällen geschieht der Transfer der Gene mit Hilfe einer ebenfalls aus DNS bestehenden Genfähre, die im allgemeinen als Vektor bezeichnet wird. Für jeden gentechnisch zu verändernden Organismus, d.h. zukünftigen Wirt für neue Gene, muß ein entsprechender Vektor mit geeigneten Transfermethoden entwickelt werden. Deswegen spricht man von Wirt-Vektor-Systemen. Für viele Organismen wurden bereits entsprechende Wirt-Vektor-Systeme entwickelt. Dabei spielen Systeme von *E. coli* eine zentrale Rolle.

E. coli ist der genetisch am besten untersuchte Organismus und es stehen mittlerweile einer Reihe von Vektoren zur Verfügung, die eine einfache Übertragung von Genen erlauben. Daher spielt in vielen Fällen *E. coli* die Rolle eines Zwischenwirtes für Gene. Neue Gene werden auf *E. coli* übertragen, verändert und vermehrt. Mit den so gewonnenen Genen können nun Organismen, für die weniger effektive Vektoren und Selektionsmethoden zur Verfügung stehen, verändert werden. In der Praxis werden alle Gene, die für einen Gentransfer bestimmt sind, zuerst in *E. coli* kloniert.

Neben dem großen Vorteil einer ausgereiften gentechnischen Methodensammlung [SCHWAB, 1993] besitzt *E. coli* Eigenschaften, die es erlauben diesen Organismus relativ einfach und schnell in großen Mengen anzuzüchten. Daher ist *E. coli* für die Fermentationstechnik als Expressionssystem für eine Reihe von rekombinanten Produkten hervorragend geeignet und industriell im Einsatz.

2.1.1 Vektoren für *E. coli*

Für das Expressionssystem *E. coli* wurde auf der Basis von Plasmiden eine Reihe von Vektoren für verschiedene Aufgaben entwickelt. Dazu gehören Klonierungsvektoren, Expressionsvektoren, „Schaukelvektoren“ und Testvektoren.

Klonierungsvektoren

Klonierungsvektoren zeichnen sich dadurch aus, daß sie eine sehr hohe Transferfrequenz aufweisen. Dies bedeutet, daß ein hoher Anteil der Vektoren, die bei einem Transferexperiment eingesetzt werden, auch tatsächlich in die Zellen gelangt. Sie dienen zur Erstellung von Genbibliotheken. Genome von verschiedenen Organismen werden in kleine Stücke zerlegt und in Klonierungsvektoren eingebaut. Nach Selektion erhält man eine Population von vielen Klonen, die die verschiedenen Teile des Genoms beinhalten. Diese Klone können nun zur Vermehrung und Analyse der Genomfragmente herangezogen werden. Durch Sequenzierung der verschiedenen Genomfragmente kann die Gesamtsequenz eines Genoms ermittelt werden. Aufgrund der sehr hohen Transferfrequenz werden besonders Vektoren auf Basis von Bakteriophagen verwendet [ALTENBUCHNER, 1993]. Eine besondere Rolle bei den Klonierungsvektoren spielt eine möglichst einfache Selektion der rekombinanten Klone [KAST *et al.*, 1994] sowie die Möglichkeit große DNS-Fragmente einzubauen [LEONARDO & SEDIVY, 1990].

Expressionsvektoren

Expressionsvektoren werden eingesetzt, um Strukturgene in die entsprechenden Proteine

zu übersetzen. Für die Produktion von rekombinanten Proteinen werden Vektoren entwickelt, die eine hohe Expression erlauben (Überexpression). Dazu muß der Vektor eine Reihe von geeigneten Regulationsgenen aufweisen. Hinzu kommen Genabschnitte, die einen einfachen Einbau von Fremdgenen ermöglichen, sowie Gene die für die Aufrechterhaltung der Produktivität während der Fermentation wichtig sind. Als Beispiel sei hier die Weitergabe der Vektoren auf die Tochterzellen erwähnt. Spezielle Expressionsvektoren erlauben es, rekombinante Proteine mit zusätzlichen Eigenschaften für z. B. eine einfachere Aufarbeitung auszustatten. Eine Zusammenfassung der grundlegenden Eigenschaften von Klonierungs- und Expressionsvektoren zeigt Tabelle 2.1-1.

Tabelle 2.1-1: Wichtige Eigenschaften von Vektoren

<p>Replikationsfähigkeit</p> <p>Für die Replikation benötigt der Vektor bestimmte DNS-Sequenzen, genannt <i>ori</i> (<i>Origin of replication</i>) Wenn diese Sequenzen vom Wirt nicht in ihrer Funktion erkannt werden, werden Vektoren in den Zellen nicht vermehrt [SAKAI & KOMANO, 1996].</p>
<p>Einbausequenzen für Gene</p> <p>Der Einbau von neuen Genen in Vektoren erfolgt über Schnittstellen für ein Restriktionsenzym. Moderne Vektoren verfügen über eine Vielzahl von dicht aneinander und sich überlappenden Einzelschnittstellen, die eine breite Auswahl an Restriktionsenzymen erlauben [THOMSON & PARROTT, 1998]. Diese Region wird als <i>Multiple Cloning Site</i> (MCS) bezeichnet.</p>
<p>Selektionsgene</p> <p>Diese Gene dienen zur einfachen Auffindung von Klonen, die zumindest den Vektor enthalten. Sehr oft handelt es sich dabei um eine Antibiotikaresistenz [ANDREWS & LESLEY, 1999].</p>
<p>Regulationsgene</p> <p>Vor allem für die Überexpression von rekombinanten Proteinen sind Gene, die die Transkription und Expression steuern, essentiell [SAWERS & JARSCH, 1996].</p>
<p>Fusionsgene</p> <p>Zielproteine können mit anderen Proteinen oder Peptiden fusioniert werden, um neue Eigenschaften zu bewirken. Solche neue Eigenschaften können z. B. die Aufarbeitung von rekombinanten Proteinen erheblich erleichtern [NILSSON <i>et al.</i>, 1997].</p>

Schaukelvektoren

Der englische Ausdruck *shuttle vector* kann mit dem deutschen Begriff Schaukelvektor übersetzt werden. Dabei geht es um Vektoren, die in verschiedene Organismenarten hin

transferiert werden können. Dies bedeutet, sie sind in beiden Arten replikationsfähig. Da *E. coli* als Zwischenwirt für praktisch alle Gene dient, wurden vor allem Schaukelvektoren entwickelt, die sowohl in *E. coli* als auch in anderen Arten replikationsfähig sind. Dadurch ist es möglich, die genetischen Arbeiten im System *E. coli* durchzuführen und die veränderten Gene auf den Endwirt zu übertragen ohne diese Gene in einen neuen Vektor umklonieren zu müssen. Eine spezielle Art von Schaukelvektoren wird als *broad host range*-Vektoren bezeichnet [PAGRATIS & REVEL, 1993]. Dabei handelt es sich um Vektoren, die zwischen mehreren Arten transferiert werden können. Die Übertragungsmechanismen sind in der Natur zu finden und bilden die Grundlage für den horizontalen Gentransfer. Die Artenvielfalt von *E. coli*-Schaukelvektoren zeigt Tabelle 2.1-2.

Tabelle 2.1-2 Organismen mit Schaukelvektoren für *E. coli*

Organismus	Spezies	Referenz
Bakterien	<i>Xanthomonas campestris</i>	LIN & TSENG, 1997
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	NAKAYAMA <i>et al.</i> , 1992
Hefen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ENGELKE, 1995
Höhere Pilze	<i>Aspergillus spp.</i>	TURNER, 1994
Pflanzen	allgemein	KAWASAKI & IBARAKI, 1998
Zellkulturen	Insektenzellen	PFEIFER, 1998

Testvektoren

Testvektoren dienen dem Auffinden von regulatorischen Sequenzen. Diese Vektoren enthalten Gene für sogenannte Reporterproteine, deren Expression einfach nachgewiesen werden kann. Für die Suche von z. B. Promotoren befindet sich auf den Testvektoren das Gen für das Reporterprotein ohne Promotor [TANGNEY *et al.*, 1999]. Verschiedene Genfragmente werden vor diesem Gen eingebaut. In Klonen, die das Reporterprotein exprimieren, enthalten die eingebauten Genfragmente Sequenzen, die in dem jeweiligen Organismus und unter den speziellen Kultivierungsbedingungen die Funktion eines Promotors haben. Eine Liste wichtiger Reporterproteine findet sich in Tabelle 2.1-3.

Tabelle 2.1-3: Reporterproteine

Protein/Gen	Nachweis	Referenz
β -Galactosidase (<i>lacZ</i>)	Farbreaktion durch enzymatische Aktivität	OBST <i>et al.</i> , 1995
Alkalische Phosphatase (<i>phoA</i>)	Farbreaktion durch enzymatische Aktivität	ALAM & COOK, 1990
Catechol-3,4-dioxygenase (<i>xyIE</i>)	Farbreaktion durch enzymatische Aktivität	SHINDO <i>et al.</i> , 1995
Chloramphenicol Acyltransferase (<i>cmIR</i>)	Antibiotikaresistenz	KRAUSZ & GRAW, 1996
Grün Fluoreszierendes Protein (<i>gfp</i>)	Fluoreszenz ohne Co-Faktoren	FORTINEAU <i>et al.</i> , 1997
Luciferase (<i>lux</i>)	Lumineszenz, Co-Faktor ATP notwendig	MANEN <i>et al.</i> , 1997

2.1.2 Genquellen

Der erste Schritt bei der gentechnischen Veränderung eines Organismus auf der Basis eines bestehenden Wirt-Vektor-Systems ist die Bereitstellung der DNS, sowohl der zu übertragenden Gene, als auch des Vektors.

Als Genquellen können die Genome jedes Organismus z. B. eines Schimmelpilzes [CAROLL, 1993] herangezogen werden. Nach Isolierung von genomischer DNS mit entsprechenden Methoden [RICHARDS *et al.*, 1999] wird die DNS mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen, einfach als Restriktionsenzyme (RE) bezeichnet, in reproduzierbare DNS-Fragmente zerlegt [JELTSCH *et al.*, 1996]. Diese Fragmente können in geeignete Schnittstellen [OMORI *et al.*, 1994] von Restriktionsenzymen im Vektor eingebaut werden, wobei die Verknüpfung mit Hilfe des Enzyms Ligase erfolgt [ODELL *et al.*, 1996].

Bei der Übertragung von eukaryontischen Strukturgenen auf Prokaryonten gibt es das Problem der Introns, das sind nicht kodierende Genabschnitte, die in den Strukturgenen liegen und die erst im Laufe mRNA-Prozessierung entfernt werden. Dieses Problem wird dadurch beseitigt, daß mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der reifen mRNA sogenannte cDNS (*complementary*) synthetisiert wird, die dann als intron-freies Strukturgen in einen Vektor eingebaut werden kann [HANNIG & MAKRIDES, 1998]. Eukaryontische reife mRNA kann aufgrund ihres Poly-A-Schwanzes leicht über trägegebundene Poly-T-Oligonukleotide isoliert werden.

Es besteht die Möglichkeit Gene vollständig oder teilweise synthetisch herzustellen [ENGELS & UHLMANN, 1988]. Dies ermöglicht es völlig neue Proteinstrukturen am Reißbrett zu entwerfen, die entsprechende Aminosäuresequenz in die Basensequenz zu übersetzen und die neu synthetisierten Gene auf einen Organismus zu übertragen. Diese unter dem englischen Begriff *Protein Engineering* [NIXON *et al.*, 1998] zusammengefaßte Methode ist jedoch aufgrund der schwierigen Vorhersage von biologischen Aktivitäten auf Basis der Aminosäuresequenz noch sehr von Versuch und Irrtum gekennzeichnet.

Mit der Erfindung der Polymerasekettenreaktion (PCR), einem Meilenstein der Gentechnik, ist es möglich aus theoretisch einem einzigen DNS-Molekül so viele Kopien herzustellen, daß die Menge für alle gentechnischen Methoden ausreicht [WHITE, 1996]. Zusätzlich ist es möglich durch Synthese von entsprechenden Startoligonukleotiden, sogenannten *Primern*, beliebige Sequenzen, wie z. B. gewünschte Schnittstellen für spezielle Restriktionsenzyme oder vielversprechende Fusionsanteile für Proteine, in bestehende DNS-Moleküle einzubauen und so z. B. Vektoren zu optimieren [REIKOFSKI & TAO, 1992].

Die meisten Expressionsvektoren von *E. coli* basieren auf Plasmiden. Daher spielt die Isolierung von Plasmid-DNS eine zentrale Rolle. Alle Methoden umfassen einen Zellaufschluß, die Abtrennung der Zelltrümmer, Proteine und vor allem der chromosomalen DNS von der Plasmid-DNS sowie die Reinigung der Plasmid-DNS inklusive der Beseitigung von RNS.

Plasmidisolierung

Die klassische Methode nach BIRNBOIM und DOLY [BIRNBOIM & DOLY, 1979] wurde mittlerweile sehr oft in den Labors verändert und nach folgenden Kriterien optimiert:

- Menge an Zellen (Mini-, Midi- und Maxi-Ansätze)
- Ausbeute und Reinheit an Plasmid-DNS
- Zeitaufwand
- Art und Anzahl der Isolierungsschritte
- Apparativer Aufwand
- Kosten.

Grundsätzlich kann unterschieden werden zwischen schnellen Plasmidisolierungen aus wenig Zellen (Mini-Präparationen) wie etwa einer einzelnen Kolonie, für z. B. eine

schnelle Analyse [ROHDE, 1995] und aufwendigeren Isolierungen für größere Plasmidmengen und verschiedenen Reinheitsgraden.

Mittlerweile wurden Methoden entwickelt, die es erlauben Plasmid-DNS in weniger als 2 Minuten zu isolieren [TARCZYNSKI *et al.*, 1994]. Eine Reihe von kommerziell erhältlichen, aus dem Englischen als *Kit* bezeichneten, Plasmidisolierungssystemen, umfassen fertige Pufferlösungen für die Zellyse und eine Matrix zur Isolierung der Plasmid-DNS. Die RNS wird dabei durch Zugabe von RNAsen abgebaut [ATTAL *et al.*, 1990]. Ein Verfahren verzichtet sogar auf die Ernte der Zellen, verwendet direkt die Kulturbrühe [CORMACK & SOMSSICH, 1997] und ist dadurch besonders schnell.

Für die Isolierung von größeren und hochreinen Mengen von Plasmid-DNS wurde lange Zeit Dichtegradientenzentrifugation mit Cäsiumchlorid verwendet [HILDEMANN & MULLER, 1997]. Diese apparativ aufwendige (Ultrazentrifuge), zeit- und kostenintensive Methode wurde mittlerweile praktisch vollständig von Methoden abgelöst, bei denen Plasmid-DNS an einen Träger gebunden und nach Reinigung eluiert wird [PRAZERES *et al.*, 1998, FERREIRA *et al.*, 1997].

Seit der Entdeckung, daß Plasmid-DNS als Vektor für die somatische Gentherapie eingesetzt werden kann [SCHORR *et al.*, 1995], werden Verfahren entwickelt, die die Isolierung von Plasmid-DNS im Gramm-Maßstab erlauben [PRAZERES *et al.*, 1999].

2.1.3 Übertragungsmechanismen für Plasmidvektoren

Nach der Verknüpfung des Vektors mit der Ziel-DNS wird das entstandene Hybrid auf den Wirt übertragen. Im Falle des Wirt-Vektor-Systems *E. coli* /Plasmide stehen vor allem zwei Methoden zur Verfügung, die Transformation und die Konjugation.

Transformation

Die Transformation ist die einfachste Methode Gene mittels Plasmid-DNS zu übertragen und ist neben *E. coli* für eine Anzahl weiterer Mikroorganismen entwickelt worden [POPE & KENT, 1996, YAMADA *et al.*, 1998]. Im Prinzip werden dabei Zellen mit Plasmid-DNS in einem Puffersystem vermischt und durch einen Energieimpuls, wie z. B. eine kurze Temperaturerhöhung, die Plasmid-DNS in die Zellen eingeschleust. Die Zellen müssen dabei in einem speziellen Zustand sein, der als Kompetenz bezeichnet wird. Die Herstellung von kompetenten Zellen ist somit eine weit verbreitete Beschäftigung in molekularbiologischen Labors und gehört zu den gentechnischen Standardprotokollen [HENGEN, 1996]. Die Kompetenz von Zellen entscheidet über die

Transformationshäufigkeit bei gegebener Plasmidkonzentration. Als Maß dient z. B. die Anzahl der Kolonien (Kolonien Formende Einheiten, KFE) von transformierten Zellen, die mit 1 µg Plasmid-DNS des Plasmides pUC19 erhalten werden. Sehr gut kompetente Zellen aus dem Labor kommen auf 10^5 bis 10^6 KFE pro µg pUC19-DNS. Kommerziell erhältliche kompetente Zellen, d.h. superkompetente Zellen, werden z. B. mit garantierten 10^6 bis 10^7 KFE pro µg pUC19-DNS, je nach *E. coli*-Stamm, angeboten (CLONTECH Laboratories GmbH, Heidelberg). Bei Verwendung von Elektroporatoren, bei denen der Transfer durch einen kurzen (10 µs) elektrischen Impuls hoher Feldstärke ausgelöst wird, kann die Transformationshäufigkeit um 1 bis 2 Zehnerpotenzen gesteigert werden [HO & MITTAL, 1997].

Konjugation

Die Konjugation ist ein natürlicher mikrobielle gattungs- und artüberschreitender Transfermechanismus [THOMPSON *et al.*, 1999]. Dabei werden Plasmide, die über die notwendigen Genabschnitte verfügen, über eine Plasmabrücke von einer Zelle auf eine andere übertragen. Die dafür notwendigen Gene umfassen die in trans-Stellung möglichen Transferegene (*tra*) und die obligat cis-ständigen Mobilisationsgene (*mob*) [KATZEN *et al.*, 1999]. Aus Sicherheitsgründen werden in der Gentechnik *tra*-negative Plasmide verwendet, die mit Hilfe von Helferplasmiden auf denen *tra*-Gene kodieren, übertragen werden. Über entsprechende Selektion und aufgrund von Inkompatibilitäten, können Klone isoliert werden, die nur das *tra*-negative Plasmid beinhalten und frei von Helferplasmiden sind. Da diese Methode eine, verglichen mit der Transformation, nur geringe Übertragungshäufigkeit aufweist, wird sie hauptsächlich bei Organismen verwendet, für die es noch nicht gelungen ist, effiziente Transformationsvektoren bzw. -Bedingungen zu entwickeln [GOODMAN *et al.*, 1993].

2.1.4 Selektion und Analyse von Klonen

Ein zentrales Problem der Gentechnik ist die Selektion von Klonen. Vektoren auf Plasmidbasis verfügen über entsprechende Gene, die eine Selektion auf plasmidhaltige Zellen erlauben. Am häufigsten handelt es sich hierbei um Gene, die die Ausbildung einer Resistenz gegenüber Antibiotika ermöglichen. Wichtige Resistenzen gibt es gegen die Antibiotika Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin und Chloramphenicol.

Die Selektion auf eingebaute Gene erfolgt optimalerweise phänotypisch für das Genprodukt bzw. eine Aktivität des Genproduktes. Eine Analyse der Klone auf DNS-Ebene kann auf verschiedenen Stufen durchgeführt werden. Am einfachsten ist eine

Restriktionsanalyse, bei der neben der standardmäßigen Agarose- und Polyacrylamidgelelektrophorese [EPSTEIN *et al.*, 1997, JORDAN, 1999] auch die Kapillargelelektrophorese eingesetzt werden kann [LIU & KUHR, 1999].

Mit Hilfe von speziell markierten Gensonden und Hybridisierungsmethoden ist der Nachweis spezieller Gene möglich [THOMPSON & GILLESPIE, 1990]. Die genaue Charakterisierung von DNS und somit auch von gentechnisch veränderten Plasmiden erfolgt über Sequenzierung, die durch Automatisierung und apparative Entwicklung mittlerweile zur Routine geworden ist [LARIO *et al.*, 1997].

2.2 Maßnahmen auf Ebene der DNS

Auf der DNS-Ebene spielt die Gendosis eine wichtige Rolle. Darunter versteht man die Anzahl der Gene, die in einer Zelle für die Expression zur Verfügung stehen. Ein zweiter Aspekt liegt in der Stabilität der rekombinanten Gene. Dabei wird zwischen der strukturellen und der segregativen Stabilität unterschieden. Die strukturelle Stabilität bezeichnet die identische Basenabfolge in den DNS-Strängen bei Vermehrung und wird durch Deletionen, Insertionen und Punktmutationen gestört. Die Weitergabe der Plasmide auf die Tochterzellen wird als segregative Stabilität bezeichnet. Der in der Literatur weit verbreitete Begriff „Plasmidstabilität“ bezieht sich meistens auf diese segregative Stabilität.

2.2.1 Gendosis und Plasmidkopienzahl

Betrachtet man Expressionssysteme mit Plasmiden als Vektoren so ist die Höhe der Gendosis einerseits abhängig von der Anzahl der Expressionsgene auf einem Plasmid, andererseits von der Anzahl der Plasmide pro Zelle. Gene können in einer oder mehreren Kopien in das Chromosom integriert werden. Vor allem bei Expressionssystemen von *E. coli* spielen Integrationen in das Chromosom kaum eine Rolle.

In den meisten Fällen liegt das zu exprimierende Gen als einzelne Kopie auf einem Plasmid vor und die Gendosis ist nur von der Plasmidkopienzahl abhängig. Eine spezielle Erhöhung der Gendosis ergibt sich aus der Bildung von multimeren Konkateren, also zwei oder mehr Kopien eines Plasmids in einem ringförmigen Molekül.

Unterschieden werden sogenannte *low-copy* Plasmide mit einer Kopienzahl zwischen 1 - 12, *medium-copy* Plasmide mit Kopien von 15 - 20 pro Zelle und *high-copy* Plasmide,

die 20 - 700 Plasmide pro Zelle erreichen können [MAYER *et al.*, 1995]. Diese Unterschiede ergeben sich aus den verschiedenen Replikationsmechanismen bzw. den entsprechenden Genen des Replikationsursprungs (*ori*). So führt die *ori*-Sequenz des Plasmids P15A zur Ausprägung des *low-copy* Typs, jene vom Plasmid pBR322 zum *medium-copy* Typ und eine einfache Punktmutation im Gen für die RNS I der Replikationskontrolle bei pBR322 zum *high-copy* Typ [BOROS *et al.*, 1984]. Durch andere Mutationen sind weitere Erhöhungen der Kopienzahl möglich [MÜLLER *et al.*, 1995]. Die Erkenntnisse der Plasmidreplikation haben zu einer Reihe von Modellen geführt, die versuchen, die Faktoren der Plasmidkopienzahl und ihre Funktionen zu beschreiben [KUO & KIESLING, 1996].

Die Plasmidkopienzahl hat Einfluß auf das Wachstum und die Kultivierung von plasmidhaltigen Zellen und umgekehrt haben die Wachstumsbedingungen Einfluß auf die Plasmidkopienzahl. So stellt die Aufrechterhaltung der Kopienzahl eine metabolische Belastung der Zellen dar und kann die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich verringern [MASON & BAILEY, 1989, LEE & LEE, 1996]. Umgekehrt hat die Wachstumsgeschwindigkeit einen Einfluß auf die Kopienzahl, die bei sinkender Wachstumsgeschwindigkeit steigen kann [KRAMER *et al.*, 1994].

Für die Produktion von rekombinanten Proteinen werden bevorzugt Plasmide mit hoher Kopienzahl verwendet, da von der einfachen Regel ausgegangen wird: viele Genkopien führen zu einer hohen Expression [FRENCH & WARD, 1996]. Dies trifft in vielen Fällen zu. Es gibt jedoch eindeutige Limitierungen, d.h. wo bei einer weiteren Erhöhung der Kopienzahl keine Erhöhung der Expression erfolgt [NACKEN *et al.*, 1996]. Dies kann z. B. daran liegen, daß die Transkriptions- bzw. Translationskapazitäten der Zellen erschöpft sein können [KIM & RYU, 1991].

Auch Plasmide mit geringer Kopienzahl werden als Vektoren eingesetzt. So sind Säugergene in Vektoren mit kleiner Kopienzahl u. U. stabiler [LA FONTAINE *et al.*, 1998]. Für die Expression von Proteinen, die toxisch für den Wirt sind, können *low-copy* Plasmide besser geeignet sein [MÜLLER *et al.*, 1996].

2.2.1.1 Bestimmung der Plasmidkopienzahl

In der Literatur findet man verschiedene Definitionen für die Plasmidkopienzahl. Die beiden gebräuchlichsten Definitionen sind: Plasmidkopien pro Zelle [LEIPOLD *et al.*, 1994] bzw. Plasmidkopien pro Chromosom [KIEWIT *et al.*, 1993]. Darüber hinaus findet man noch Mengenangaben wie z. B. fmol Plasmid pro mg Zelltrockengewicht [SCHENDEL *et al.*, 1989], sehr häufig relative Angaben in Bezug auf ein Vergleichsplasmid wie z. B.

x-fache Kopienzahl bezogen auf ein Wildtypplasmid [AUSTIN & EICHBORN, 1992] und als Produktausbeute mg Plasmid-DNS pro g Zelltrockengewicht [SCHMIDT *et al.*, 1996]. Einen schematischer Überblick der Methoden zur Plasmidkopienzahlbestimmung zeigt Abbildung 2.2-1.

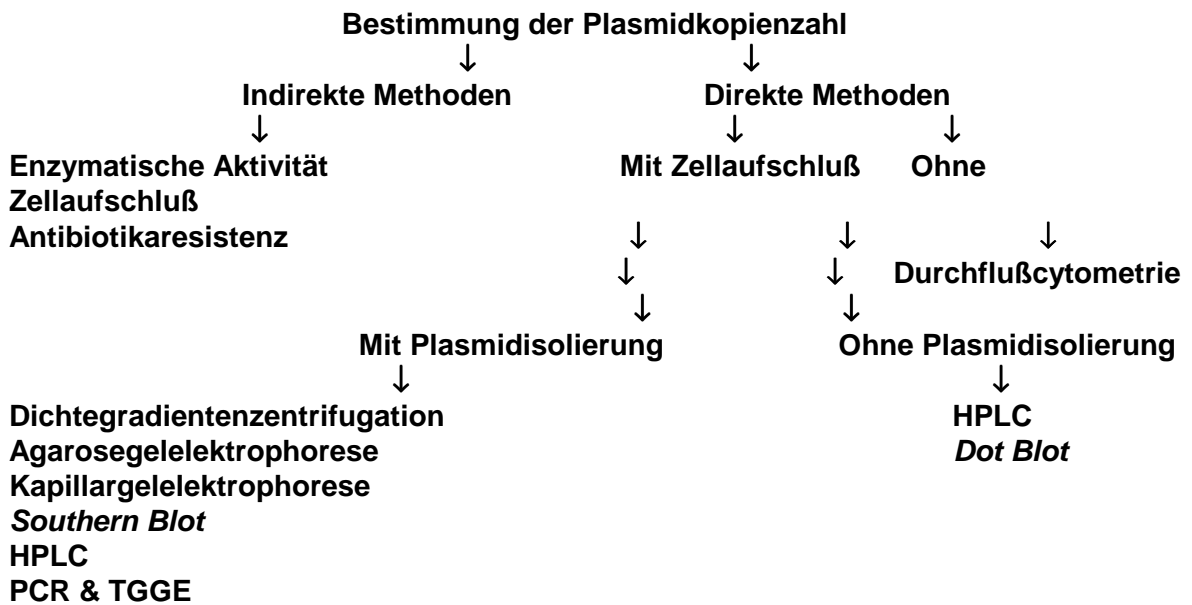


Abbildung 2.2-1: Methodenübersicht zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl

HPLC: Hochleistungs-Flüssigchromatographie, *Southern Blot*, *Dot Blot*:

Hybridisierungsverfahren, TGGE: Temperaturgradient Gelelektrophorese.

Es gibt verschiedene Methoden die Plasmidkopienzahl zu bestimmen, die sich in indirekte und direkte Methoden einteilen lassen. Bei den indirekten Methoden werden nicht die Plasmide als solche, sondern Genprodukte quantifiziert. Die bekannteste Methode ist die Messung der Aktivität der plasmidkodierte β -Lactamase [MILLER & COHEN, 1993]. Dabei wird davon ausgegangen, daß die Enzymaktivität direkt proportional zur Plasmidkopienzahl ist. Da die Expression des Enzyms und die Enzymaktivität jedoch von vielen anderen Faktoren, die nichts mit der Kopienzahl zu tun haben, beeinflusst werden können, sind diese Methoden nur mit Einschränkungen zu gebrauchen [BETENBAUGH *et al.*, 1987]. Ein ähnliches System wurde mit Luziferase als Reporterprotein beschrieben [CORONADO *et al.*, 1994].

Bei den direkten Methoden wird die Plasmidmenge nach einem Zellaufschluß bestimmt. Bei der *Dot-blot* Methode wird auf eine Trennung der Plasmid DNS von der chromosomalen DNS und der RNS verzichtet und das ganze Lysat auf eine Membran

aufgebracht und die Nukleinsäuren fixiert. Die Plasmidmenge wird dann meist mittels radioaktiv markierter Gensonden bestimmt [HINNEBUSCH & BARBOUR, 1992]. Oft jedoch erfolgt nach dem Zellaufschluß eine Isolierung bzw. eine Trennung der Plasmide von der chromosomalen DNS. Dies kann über HPLC [COPPELLA *et al.*, 1987], Dichtegradientenzentrifugation [WEAVER *et al.*, 1993] oder Gelelektrophorese [PROJAN *et al.*, 1983] sowie gepulste Gelelektrophorese [WARD *et al.*, 1993] erfolgen. Je nach Methode wird die Plasmidmenge anschließend quantifiziert. So etwa durch UV-Absorption bei der HPLC oder durch die Messung der Radioaktivität bei den Methoden mit Dichtegradientenzentrifugation. Dies setzt voraus, daß bei der Replikation der Plasmide Radionukleotide für den Einbau vorgelegt werden. Die Quantifizierung der Plasmide nach einer Gelelektrophorese kann durch Transfer und Fixierung der Nukleinsäuren auf eine Membran (*Southern-blot*) und markierten Gensonden erfolgen [OLSSON *et al.*, 1993]. Eine Kombination von PCR und Temperaturgradient- Gelelektrophorese (TGGE) kann zur Bestimmung der Kopienzahl verwendet werden [KANG *et al.*, 1991]. Dabei wird eine bestimmte Menge eines Standards, der bis auf eine Base homolog zu einer Sequenz auf dem Plasmid ist, zur Probe mit isolierter Plasmid-DNS gegeben und anschließend eine PCR Amplifikation durchgeführt. Danach wird eine markierte Sonde zugegeben, die mit den amplifizierten Plasmidsequenzen Homoduplexe und mit der amplifizierten Standardsequenz Heteroduplexe ausbildet. Diese können mittels TGGE getrennt und über die Markierung die Banden quantitativ bestimmt werden. Die relativen Bandenintensitäten bezogen auf die eingesetzte Menge des Standards ergibt die Kopienzahl in der Probe, die dann auf Kopienzahl pro Zelle umgerechnet werden kann.

Eine sehr oft beschriebene Methode umfaßt die Färbung mit Ethidiumbromid, anschließendes Fotografieren des Gels und die quantitative Auswertung der Gelbanden auf dem Fotonegativ mittels diverser Densitometer [WRIGLEY-JONES *et al.*, 1992, LEIPOLD *et al.*, 1994]. Obwohl diese Methode sehr verbreitet ist, sind hier die Ergebnisse nur mit Einschränkungen aussagekräftig - wie später im experimentellen Teil gezeigt wird. So kann hier festgestellt werden, daß viele bekannte Methoden zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl arbeits-, sicherheitstechnisch und zeitlich sehr aufwendig und mit großen Fehlermöglichkeiten behaftet sind. Bei vielen Publikationen fehlen Angaben, ob die Plasmidstabilität bestimmt wurde. Da es sich bei der Bestimmung von Plasmidkopienzahlen immer um Durchschnittswerte handelt, würde eine geringe Plasmidstabilität die durchschnittliche Kopienzahl stark senken und die Werte für die plasmidhaltigen Zellen erheblich verfälschen. Für die Bestimmung der Verteilung von verschiedenen Plasmidkopienzahlen innerhalb einer Population wurde die Durchflußcytometrie verwendet [FOUCHET *et al.*, 1994].

Die Kopienzahl ist bei der Fermentation von rekombinanten *E. coli*-Stämmen ein wichtiges Qualitätskriterium [KANG *et al.*, 1991]. Von großem Vorteil wäre es die Plasmidkopienzahl während einer Kultivierung mit einer akzeptablen Zeitverzögerung im Bereich von 30 min zu bestimmen. Alle Methoden, die Agarosegelelektrophorese oder ähnlich lange dauernde Verfahren verwenden, sind dazu ungeeignet. Ansätze für derartige schnelle Verfahren liegen z. B. in der Fluoreszenzspektroskopie nach Plasmidisolierung und Färbung mit dem Farbstoff Hoechst-33258 [ARGYROPOULOS & SAVA, 1997]. Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird die Entwicklung einer Methode beschrieben, die die prozeßbegleitende Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Kapillargelelektrophorese und laserinduzierter Fluoreszenzdetektion erlaubt [SCHMIDT *et al.*, 1996]. Eine ähnliche Methode wurde für UV-Detektion entwickelt [BREUER *et al.*, 1998]

2.2.1.2 Veränderung der Plasmidkopienzahl

Da eine höhere Plasmidkopienzahl zu einer höheren Produktivität rekombinanter Systeme führen kann, gibt es viele Ansätze die Plasmidkopienzahl zu erhöhen.

Jede Änderung der Plasmidkopienzahl steht im Zusammenhang mit der Replikation eines Plasmids. Für die Replikation benötigt das Plasmid Sequenzen, die auf dem Plasmid kodieren (cis-Elemente) etwa die *ori*-Sequenz (*Origin of replication*) oder die *ter*-Sequenz (Terminus), sowie Gene, die auch auf dem Chromosom lokalisiert sein können (trans-Elemente) und für Proteine kodieren. Viele Plasmide enthalten zumindest das Gen für ein Protein, das die Initiation der Replikation steuert. Die in der Fermentationstechnik verwendeten Vektoren für *E. coli* besitzen alle Sequenzen und Gene für die Replikation von natürlichen Plasmiden wie ColE1, pSC101, R6K und F-Faktor. Diese Plasmide haben unterschiedliche Replikationsmechanismen und Regulationen [SCHUMANN, 1990]. Daher können Änderungen der Plasmidkopienzahl nicht allgemein gesehen werden. Es kann jedoch grob unterschieden werden zwischen Mutationen in den Replikationsgenen, externen Einflüssen sowie induzierbare Erhöhung der Plasmidkopienzahl in sogenannten *runaway-replication* Plasmiden.

Mutationen

Änderungen im Gen *cop* oder seiner Regulation (aus pSC101) kann zur Erhöhung der Plasmidkopienzahl führen. Wenn das durch *cop* kodierte Replikationsinitiationsprotein RepA durch eine Punktmutation in seiner Bindungsfähigkeit an die DNS verändert wird, steigt die Plasmidkopienzahl [XIA *et al.*, 1993]. Mutationen in *cop1* können zu einer Plasmidamplifikation führen [PANAYOTATOS, 1998]. Aber auch Mutationen in den Genen der Replikationsinitiation bei Plasmiden von *Streptococcus pneumoniae* [ACEBO *et al.*,

1996] oder *Corynebacterium glutamicum* [NESVERA *et al.*, 1997] haben den selben Effekt. Beim Plasmid RK2 konnten Mutationen im Initiationsproteingen *trfA* als Ursache für die Erhöhung der Plasmidkopienzahl erkannt werden [FANG *et al.*, 1994].

Andere Angriffsziele für Mutationen liegen in den Sequenzen für die an der Replikation und ihrer Regulation beteiligten Ribonukleinsäuren RNS I [MOSER & CAMPBELL, 1983] bzw. RNS II [LIN-CHAO *et al.*, 1992]. Mutationen in trans-Elementen im Chromosom führen wie im Falle von *relA* in Stämmen von *E. coli* CP79 und CP143 zu einer Amplifikation von pBR322 [HOFMANN, 1990]. Umgekehrt ist es natürlich möglich, daß Mutationen oder Deletionen zu einer Erniedrigung der Plasmidkopienzahl führen können [PHILLIPS, 1999].

Externe Faktoren

Zu den externen Faktoren, die die Kopienzahl erhöhen können, gehören Limitierungen im Medium. Dies können Limitierungen am Aminosäureangebot [WROBEL & WEGRZYN, 1997], in der Phosphatmenge [HORN *et al.*, 1990] oder am Eisenionenangebot [ANGELOV & IVANOV, 1989] sein. Es ist zu vermuten, daß dabei ähnliche Phänomene auftreten wie bei der Amplifikation mit Chloramphenicol [CLEWELL, 1972]. Die Zellen verlangsamen das Wachstum, zum Teil wird die Proteinbiosynthese, speziell die Elongation der Translation, eingestellt (Chloramphenicol, Aminosäurelimitierung). Dies führt zu einem Abbruch der *oriC*-abhängigen DNS-Replikation während die Plasmidproduktion aufgrund einer anderen *ori*-Sequenz weiterläuft.

Eine Erhöhung der Plasmidkopienzahl wurde bei Überexpression eines plasmidkodierten Gens beobachtet. Durch die Überexpression nach Induktion mit IPTG wurde die Translation anderer Gene stark behindert, was zu einem Wachstumsstopp und einem Abbruch der Replikation des *E. coli*-Chromosoms führt [RINAS, 1996]. Dieser Effekt ist den bei Zugabe von Chloramphenicol gefundenen Effekten sehr ähnlich und führte zu einer 6-fachen Erhöhung der Plasmidkopienzahl [TEICH *et al.*, 1998].

Einen anderen Einfluß hat Ethanol auf die Plasmidkopienzahl. Es wird vermutet, daß eine Änderung der Zellmembran durch Ethanol die DNS-Replikation beeinflusst, da diese bei der Replikation an die Membran gebunden wird [BASU & PODDAR, 1994]. Interessanterweise führt dies zu einer Erhöhung der Plasmidkopienzahl [BASU & PODDAR, 1997]. Es wurde berichtet, daß die Zusammensetzung der Medien zu höheren Kopienzahlen führen kann [WAN & GOODRICK, 1996], wie etwa der Einsatz bestimmter Aminosäuren [NEUBAUER *et al.*, 1990].

***Runaway-replication* Plasmide**

Sogenannte *runaway-replication* Plasmide dienen dazu, Wachstumsnachteile aufgrund einer hohen Plasmidkopienzahl auszugleichen. Sie liegen unter nicht induzierten Bedingungen in geringer Kopienzahl (meist 1 Kopie pro Zelle) vor und können durch Induktion bestimmter Replikationsgene auf eine Kopienzahl von bis zu 800 Kopien und mehr pro Zelle vermehrt werden [NORDSTRÖM & UHLIN, 1992, TOGNA *et al.*, 1993].

Bei vielen dieser Plasmide wird die Amplifikation durch Erhöhung der Temperatur induziert. Dabei stehen die Replikationsgene unter der Kontrolle eines temperaturinduzierbaren Promotors (λ_{PL}) [LARSEN *et al.*, 1984]. Durch den temperatursensitiven *cI857*-kodierte Repressor wird die Expression des positiv wirkenden Replikationsfaktors RepA verhindert. Steigt die Temperatur auf 42 °C, so wird der Repressor irreversibel denaturiert, RepA exprimiert und dadurch die Plasmidreplikation dereguliert und die Kopienzahl auf über 1000 pro Zelle erhöht [LEIPOLD *et al.*, 1994]. Auf dieser Basis werden weiterhin Vektoren entwickelt [GÖTTING *et al.*, 1998]. Andere Möglichkeiten der Erhöhung der Plasmidkopienzahl sind die Induktion mit IPTG und einem synthetischen Promotor für die RNS I / RNS II –Region [BACHVAROV *et al.*, 1990], die Co-Transkription von Strukturgenen rekombinanter Proteine und Replikationsinitiationselementen unter der Kontrolle eines *trp*-Promotors [CHEW & TACON, 1990], das Durchlesen von Genen bedingt durch den starken *tac*-Promotor [TOGNA *et al.*, 1993] und die Induktion der Amplifikation durch die C-Quelle bei Verwendung eines entsprechenden Promotors [COMPAGNO *et al.*, 1993]. Die Produktion vieler Plasmidkopien durch *runaway-replication* kann tödlich für die Zelle sein und zu Einbußen in der Produktivität führen. Eine neue Art von *runaway-replication* Vektoren, bei denen die Replikation der Plasmide genau kontrolliert werden kann, soll die letalen Effekte verhindern [BURIAN & KAY, 1998].

Mit Vektoren, deren Kopienzahl gezielt gesteuert werden kann, ist es möglich, in der Produktionsphase durch die Induktion der Amplifikation die Gendosis zu erhöhen und somit meist die Produktivität eines plasmidkodierten rekombinanten Proteins oder der Plasmid-DNS zu steigern.

2.2.2 Strukturelle Stabilität

Eine niedrige strukturelle Stabilität, d.h. relativ häufig vorkommende Änderungen in der Abfolge der Basensequenz aufgrund von Insertionen, Deletionen oder Punktmutationen, können zu hohen Verlusten bzw. zu starken Produktinhomogenitäten bei der Herstellung

rekombinanter Proteine oder Plasmide führen. Die Ursachen für derartige Instabilitäten sind mannigfaltig [SUMMERS, 1993].

Die Einwirkung von mutagenen Agenzien oder freier Sauerstoffradikale kann zu Änderungen in der Basensequenz führen. Fehler der DNS-Polymerase und ungenügende Reparaturmechanismen sind weitere Ursachen für Mutationen. Aber auch natürliche Rekombinationsvorgänge zwischen chromosomaler und Plasmid-DNS können zu signifikanten Modifikationen führen [CHENG & LOEB, 1997]. Manchmal ist keine andere Ursache erkennbar, wie z. B. Genexpression [KAPRÁLEK & JEČEM, 1992, CORDES *et al.*, 1996]. Auch Insertionselemente können in Plasmiden zu strukturellen Instabilitäten führen [CHAWLA & DASGUPTA, 1999]. Schaukelvektoren sind prinzipiell anfälliger für Instabilitäten [GAUDREAU *et al.*, 1992].

Die Analytik von Insertionen und Deletionen ist relativ einfach und kann durch Gelelektrophorese grob abgeschätzt werden. Genauere Analysen erlaubt die Verwendung von Massenspektroskopie [HUNG *et al.*, 1999]. Die Erfassung von Punktmutationen ist hingegen schon schwieriger. Neue Methoden verwenden Glasfaser-DNS Sensoren, die über Hybridisierungsreaktionen Veränderungen anzeigen [HEALEY *et al.*, 1997].

Mit Hilfe der Amplifikation durch PCR und anschließender Gelelektrophorese lassen sich Punktmutationen in bekannten Genabschnitten nachweisen [PROCKOP *et al.*, 1999]. Mit der Temperaturgradienten Gelelektrophorese lassen sich DNS-Fragmente trennen, die sich in nur einer Base unterscheiden. Dabei geht es um die Ausbildung verschiedener Schmelztemperaturen von DNS-Fragmenten bei Basenunterschieden [WARTELL *et al.*, 1998]. Auch 2-D-Elektrophorese wurde eingesetzt [VIJG, 1995]. Als geeignete und zuverlässige Methode hat sich der Einsatz der Kapillarelektrophorese erwiesen [RIGHETTI & GELFI, 1997, MITCHELSON *et al.*, 1997]. Unbekannte Sequenzen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden, werden mit definierten Sequenzen vermischt. Diese sind mit einem anderen Farbstoff markiert. Unter denaturierenden Bedingungen lagern sich die unbekanntes an die definierten Sequenzen an. Die verschiedenen Punktmutationsvarianten erscheinen nun als individuelle Signale. Der Einsatz verschiedener definierter Sequenzen erlaubt die gleichzeitige Bestimmung von Punktmutationen in verschiedenen Regionen langer DNS-Fragmente [KHRAPKO *et al.*, 1998].

Die Möglichkeiten, die strukturelle Stabilität zu erhöhen, liegen in der Vermeidung der vorher beschriebenen Ursachen. Die Hauptmöglichkeit strukturelle Stabilität zu erhöhen

liegt jedoch in der Wahl von Stämmen, deren natürliche Rekombinationsfähigkeit weitgehend ausgeschaltet wurde. Die meisten Stämme von *E. coli*, die in der Fermentationstechnik eingesetzt werden, sind derartige Mutanten.

2.2.3 Segregative Stabilität (Plasmidstabilität)

Die Nutzung von plasmidbasierten Expressionssystemen kann durch eine niedrige segregative Stabilität, meist einfach als Plasmidstabilität bezeichnet, stark beeinträchtigt werden [OLLIS, 1982]. Deshalb gibt es sehr viele Ansätze Ursachen und Auswirkungen der Plasmidstabilität zu untersuchen und Maßnahmen zu finden, die die Plasmidstabilität erhöhen.

Vor allem der Replikationsmechanismus hat entscheidenden Einfluß auf die Plasmidstabilität [SHARMA, 1993] und es gibt eine Reihe von Modellen, die es erlauben sollen, Plasmidstabilitäten zu berechnen [DUNN *et al.*, 1995, BHATTACHARYA & ROY, 1996, LÖSER & RAY, 1996, SATISH *et al.*, 1998].

2.2.3.1 Analytik der Plasmidstabilität

Die grundlegende Technik zur Bestimmung der Plasmidstabilität ist nach wie vor die zeit- und personalintensive Methode der parallelen Plattierung auf selektiven und nicht selektiven Agarplatten [WEBER & SAN, 1989]. Durchflußcytometrie basierend auf einem Reporterprotein (β -Galactosidase) stellt eine schnellere Möglichkeit zur Bestimmung der Plasmidstabilität dar [MIAO *et al.*, 1993]. Die Verwendung von GFP als Reporterprotein zusammen mit Zellsortierapparaten führt zu Daten über die Plasmidstabilität innerhalb einer Population [VOGEL *et al.*, 1998].

2.2.3.2 Erhöhung der Plasmidstabilität

Die Plasmidstabilität ist maßgeblich an der Produktivität eines plasmidbasierten Expressionssystems beteiligt. Da plasmidfreie Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber plasmidhaltigen Zellen besitzen, kann eine geringe Plasmidstabilität das Überwachsen einer Kultur mit plasmidfreien oder plasmidarmen Zellen bedeuten, was zu erheblichen Verlusten bei der Produktion von rekombinanten Proteinen und Plasmid-DNS führen kann [LEE & LEE, 1994].

Es gibt eine Reihe von Maßnahmen zur Erhöhung der Plasmidstabilität, die auf verschiedenen Wirkungen beruhen und in folgende Typen eingeteilt werden können:

- ❖ Selektion durch Resistenz gegen toxische Substanzen im Medium

- ❖ Selektion durch Komplementierung einer chromosomalen Mutation
- ❖ Postsegregative Tötung plasmidfreier Zellen
- ❖ Aktive Plasmidverteilung
- ❖ Statistische Weitergabe über Plasmidkopienzahl
- ❖ Angleichung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten durch zellinterne Faktoren
- ❖ Einflüsse durch Kultivierungsparameter
- ❖ Einflüsse durch die Prozeßführung
- ❖ Trennung von plasmidhaltigen und plasmidfreien Zellen
- ❖ Integration in das Chromosom

Selektion durch Resistenz gegen toxische Substanzen im Medium

Die einfachste Möglichkeit die Plasmidstabilität zu erhöhen ist die Zugabe von Antibiotika in das Wachstumsmedium, für das entsprechenden Resistenzgene auf dem Plasmid vorhanden sind [LEE & KIM, 1996].

Diese Methode ist vor allem im Labor Standard wird aber bei industriellem Einsatz von Expressionssystemen aufgrund der Kosten für die Antibiotika und der Abreicherungsproblematik (Antibiotika müssen bis unter die Nachweisgrenze entfernt werden) praktisch nicht verwendet. Vor allem für den gentherapeutischen Einsatz von Plasmiden werden Plasmide bevorzugt, die keine Antibiotikaresistenzgene beinhalten [MORSEY, 1996]. Zusätzlich könnten beim Einsatz in Tieren Allergien auftreten [MORSEY, 1999].

Für die Produktion von Plasmiden, die selbst keine Gene für eine Antibiotikaresistenz besitzen, die aber mit Hilfe einer chromosomal kodierten Kanamycinresistenz stabilisiert werden, wurde das System der Repressortitration entwickelt [WILLIAMS *et al.*, 1998]. Dabei steht das Kanamycinresistenzgen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Der *lac*-Repressor kodiert ebenfalls auf dem Chromosom. Der Stamm kann in Kanamycinmedien nicht wachsen, da die Resistenz reprimiert ist. Wird ein *high-copy*

Plasmid, auf dem der *lac*-Promotor kodiert, in die Zellen transferiert, so reichen die *lac*-Repressor Moleküle nicht mehr aus die zusätzlichen Bindungsstellen zu besetzen und das Resistenzgen wird exprimiert. Nur plasmidhaltige Zellen wachsen auf Kanamycinmedium.

Selektion durch Komplementierung einer chromosomalen Mutation

Für den industriellen Einsatz wurden Systeme entwickelt, bei denen der Stamm durch eine chromosomale Mutation eine lebensnotwendige Substanz oder Protein nicht mehr produzieren kann und das fehlende Gen für die Produktion dieser Substanz auf dem Plasmid kodiert.

Dabei kann unterschieden werden zwischen Mutationen, die durch Zugabe der Substanz in das Medium das Wachstum dennoch erlauben, und Mutationen, die über eine Mediumssupplementierung phänotypisch nicht unterdrückt werden können.

Durch die Wahl eines entsprechenden Mediums, das diese Substanz nicht enthält, kann im ersteren Fall die Plasmidstabilität erhöht werden. Dazu gehören die plasmidbasierte Komplementierung einer chromosomalen Mutation der Aspartat-semialdehyddehydrogenase (*asd*) [NAKAYAMA *et al.*, 1988] im System *Salmonella typhimurium* bzw. einer Mutation der D-Alanin-racemase in *Bacillus subtilis* [BREY *et al.*, 1995].

Auch essentielle Gene für die Tryptophansynthese auf dem Plasmid sind eine solche Möglichkeit die Plasmidstabilität zu erhöhen [MATSUI *et al.*, 1990, SKODA & IMANAKA, 1990], ebenso Gene für die Synthese von Threonin [NUDEL *et al.*, 1989].

Bei einem anderen System wird die Adenylsuccinat Synthetase, die die Synthese von Adenylsuccinat aus Inosinmonophosphat katalysiert und essentiell für die Adeninsynthese ist, durch das Plasmid bereitgestellt [BREY *et al.*, 1995]. Zugabe von Adenin würde auch plasmidfreien Zellen das Wachstum ermöglichen.

Einige Systeme können jedoch über das Medium nicht komplementiert werden und sind fermentationstechnisch zu bevorzugen, weil sie den Einsatz komplexer Medien erlauben. Beim ValS-System fehlt dem Stamm die chromosomale Valyl-tRNS Synthetase, die für die Verknüpfung der Aminosäure Valin mit der entsprechenden Transfer-RNS notwendig ist. Das Gen für dieses Enzym liegt auf einem Vektor [SKOGMAN & NILSSON, 1984]. Alle entstehenden plasmidfreien Zellen sind durch die fehlende Synthetase in ihrer Proteinbiosynthese stark beeinträchtigt und sterben. Auch das Gen *ssb* kodiert für ein essentielles Protein, das *single strand binding* Protein, welches bei der DNS-Replikation

benötigt wird [PORTER *et al.*, 1990]. Ein anderes System beruht auf der Ausschaltung von Genen, die an der Synthese des Murein-Sacculus beteiligt sind. Dabei handelt es sich um Enzyme, die für die Ausbildung der Murein-Tetrapeptide verantwortlich sind. Die entsprechenden Gene (*murD*, *murE*, *murF*) werden am Plasmid zur Verfügung gestellt [MORSEY, 1996]. Die Enzyme sind intrazelluläre, nicht diffusionsfähige Proteine und nicht toxisch.

In allen Systemen wird ein essentielles Gen auf dem Chromosom ausgeschaltet und dieses Gen auf dem Plasmid wieder zur Verfügung gestellt. Revertanten, d.h. Mutanten, bei denen das essentielle Gen chromosomal wieder funktionstüchtig wird, verlieren diese Plasmidstabilisierung. Dies kann relativ häufig eintreten und ist somit ein ernstes Problem dieser Systeme.

Postsegregative Tötung

Spezielle Systeme, die bei einigen natürlich vorkommenden Plasmiden gefunden werden, beruhen auf zellinternen Mechanismen, durch die plasmidfreie Zellen abgetötet werden. Dies wird als postsegregative Tötung bezeichnet. Derartige Funktionen wurden auf verschiedenen natürlich vorkommenden Plasmiden wie F, R1 P1 und RP4(RK2) gefunden [GERDES *et al.*, 1997]. Der Mechanismus beruht auf zwei Komponenten: ein chromosomal stabil verankertes Toxin und ein plasmidkodiertes Antidot, das die letale Funktion des Toxins unterbindet.

Zur Zeit sind zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben. In einem Mechanismus ist das Antidot ein Protein, ein echtes Antitoxin [JENSEN & GERDES, 1995]. Dies findet sich z. B. im Plasmid R1. In dem anderen System ist das Antidot eine Antisense-RNS. Diese als *hok/sok*-Mechanismus bezeichnete Stabilisierungsmethode umfaßt u.a. zwei wichtige Gene: *hok* (host killing) und *sok* (suppression of killing). Das *hok*-Gen kodiert für das toxische Hok Protein mit einer Größe von 52 Aminosäuren. Das *sok*-Gen kodiert für eine Antisense-RNS die zur mRNA des *hok*-Gens komplementär ist und inhibiert dadurch dessen Translation. Die Expression der *hok*-RNS wird durch einen schwachen konstitutiven Promotor reguliert und die mRNA ist sehr stabil. Die *sok*-Antisense-RNS wird durch einen starken konstitutiven Promotor exprimiert, hat selbst jedoch nur eine geringe Halbwertszeit. Dies bedeutet, daß sobald die Zelle kein Plasmid mehr besitzt, die Antisense-RNS rasch abgebaut und die *hok*-mRNA schnell translatiert wird. Dadurch werden die Zellen durch das Hok-Protein abgetötet [GERDES *et al.*, 1997]. Tabelle 2.2-1 faßt die postsegregativen Tötungsmechanismen zusammen.

Tabelle 2.2-1: Postsegregative Tötungsmechanismen verschiedener Plasmide bzw. Phagen

Plasmid / Phage	Gen(e)	Toxin	Antidot	Referenz
F-Faktor	<i>ccd</i>	CcdB	Protein CcdA	JENSEN <i>et al.</i> , 1995
RP4 (RK2)	<i>parDE</i>	ParE	Protein ParD	JENSEN <i>et al.</i> , 1995
R1, R100	<i>parD (pem)</i>	PemK	Protein PemI	JENSEN & GERDES, 1995
R1, R100	<i>par B (hok/sok = kis/kid)</i>	Hok	Anti-sense <i>sok</i> RNS	GERDES <i>et al.</i> , 1997, EASTER <i>et al.</i> , 1997
P1	<i>phd/doc</i>	Doc	Anti-sense <i>phd</i> RNS	LEHNHERR <i>et al.</i> , 1993
R483	<i>pnd</i>	-	Anti-sense RNS	PECOTA <i>et al.</i> , 1997

Aktive Plasmidverteilung

Auch Plasmidgröße und Multimerbildung haben Einflüsse auf die Plasmidstabilität. Untersuchungen zur Plasmidstabilität in *B. subtilis* haben gezeigt, daß mit zunehmender Größe des Plasmids seine segregative Stabilität abnimmt [WOJCIK, 1993]. Multimerisierung von Plasmiden ist bekannt als Ursache für segregative Instabilität [SUMMERS & SHERATT, 1984, KIM & SHULER, 1991]. Um die Stabilität zu erhöhen, kann ein Gen eingebracht werden, das Multimere in Monomere umwandelt. Dies wird z. B. über das *res-tnpR*-System des Transposons Tn100 erzielt [BELLANI *et al.*, 1997]. Auch das Plasmid RP4 verfügt über ein Enzym, Resolvase, das Multimere monomerisiert [GERLITZ *et al.*, 1990]. Das Gen für die Resolvase wird als *parA* bezeichnet. Das Enzym kann zur gezielten Entfernung von DNS-Fragmenten, die zwischen spezifischen Sequenzen liegen, verwendet werden [KRISTENSEN *et al.*, 1995]. Auf der Wirkung einer Gyrase, einem Enzym, das die Ausbildung von superspiralisierten Formen eines Plasmids bewirkt, beruht die Stabilisierung durch die *par*-Region des Plasmids pSC101 [KIM & KANG, 1996]. Durch die spezielle Form können membrangebundene, an der Weitergabe der Plasmide an die Tochterzellen beteiligten Proteine mit der Plasmid-DNS wechselwirken.

Bestimmte Genregionen, als *par*-Regionen (partitioning) bezeichnet, sind für die gerichtete Weitergabe der Plasmide an die Tochterzellen verantwortlich. Beim Plasmid P1 werden die Plasmide über eine spezifische Sequenz (*parS*) an bestimmte Stellen der Membran angeheftet. Die dazu notwendigen Proteine werden durch die Gene der *par*-Region kodiert. Das Protein, kodiert durch *parB*, verbindet sich dabei mit der DNS und dient wahrscheinlich der Exponierung der Bindungsstelle *parS* [HAYES & AUSTIN, 1994].

Das Plasmid RP4 besitzt neben den auf postsegregativer Tötung beruhenden

Stabilisierungsgenen *parDE* ein zusätzliches System *parCBA* [EASTER *et al.*, 1998] das in verschiedenen GRAM-negativen Bakterien Plasmide stabilisieren kann [EBERL *et al.*, 1994]. Wie oben erwähnt kodiert *parA* für eine Resolvase [GERLITZ *et al.*, 1990]. Die entsprechende *res*-Region liegt innerhalb einer 100 Bp-Region zwischen den beiden Promotoren von *parDE* und *parCBA*. Das Gen *parB* kodiert für eine Nuklease [GROHMANN *et al.*, 1997]. Die Funktion von *parC* ist noch ungeklärt.

Das Plasmid R1 verfügt über zwei *par*-Regionen *parA* und *parB*. Die Region *parB* stabilisiert das Plasmid über postsegregative Tötung mittels des *hok/sok*-Mechanismus. Die Region *parA* besteht aus den Genabschnitten *parM*, *parR* und *parC*. Das ParM-Protein ist eine ATPase, die mit dem ParR-Protein wechselwirkt, welches an die centromerähnliche cis-aktive *parC*-Region gebunden ist [JENSEN & GERDES, 1997]. Die Sequenz *parC* liegt vor den *parM*- und *parR*-Regionen. Es wird vermutet, daß dieser Vorgang die paarweise Anordnung der Replikationsregionen bei der Plasmidreplikation bewirkt, wodurch eine regulierte Weitergabe je eines Plasmids an eine Tochterzelle erfolgt [JENSEN *et al.*, 1998]. Plasmid P1 verfügt über ein ähnliches System, das *sop*-Operon. Eine Übersicht der aktiven Plasmidverteilungssysteme gibt Tabelle 2.2-2..

Tabelle 2.2-2: Aktive Plasmidverteilungssysteme

Plasmid	<i>par</i> -Operon	Genprodukt/Funktion	Referenz
RP4	<i>parCBA</i>	ParA: Resolvase ParB: Nuklease ParC: ungeklärt	EASTER <i>et al.</i> , 1997
R1	<i>parA</i>	ParM: ATPase ParR: Bindungsprotein <i>parC</i> : Bindungsregion	JENSEN & GERDES, 1995
P1	<i>par</i>	ParA: ATPase ParB: Bindungsprotein <i>parS</i> : Bindungsregion	DAVIS <i>et al.</i> , 1992
F-Faktor	<i>sop</i>	SopA: ATPase SopB: Bindungsprotein <i>sopC</i> : Bindungsregion	MOTALLEBI <i>et al.</i> , 1990

Statistische Weitergabe über Plasmidkopienzahl

Bei der zufälligen Weitergabe der Plasmide auf die Tochterzellen ist die Kopienzahl ausschlaggebend. Je höher die Kopienzahl, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, daß

zumindest ein Plasmid auf die Tochterzelle übertragen wird. Einfache Modelle gehen davon aus, daß ab Plasmidkopienzahlen von 50 und mehr pro Zelle eine 100% Stabilität gegeben ist [BENTLEY & KOMPALA, 1989].

Angleichung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten durch zellinterne Faktoren

Ein interessantes System erhöht die Plasmidstabilität dadurch, daß plasmidfreie Zellen einen Wachstumsnachteil durch zusätzliche Expression erleiden. Dabei wird das chromosomale Gen für die Ausbildung von Pili unter die Kontrolle des *tac*-Promotors gestellt. Am Plasmid kodiert der entsprechende Repressor. Bei Plasmidverlust, und somit Verlust der Repressorproduktion, wird die Ausbildung der Pili induziert und die plasmidfreien Zellen wachsen dadurch langsamer als die plasmidhaltigen [OGDEN *et al.*, 1992] und können die plasmidhaltige Population nicht überwachsen.

Zu den internen Faktoren, die die Plasmidstabilität über die Wachstumsgeschwindigkeit beeinflussen, gehört die Expression plasmidkodierter Gene. Eine Überproduktion plasmidkodierter rekombinanter Proteine beeinträchtigt die Plasmidstabilität durch Erniedrigung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit [GLICK, 1995, CHORCHERO & VILLAVERDE, 1998]. Auch der Erhaltungstoffwechsel kann durch eine Überproduktion erhöht werden und zu Instabilitäten führen [BHATTACHARYA & DUBEY, 1995]. Daher ist es sinnvoll durch Verwendung von induzierbaren Promotoren die Produktion von rekombinanten Proteinen in eine Wachstumsphase ohne Expression der rekombinanten Gene und eine Produktionsphase für die Überexpression zu teilen [MIAO & KOMPALA, 1989].

Einflüsse durch Kultivierungsparameter

Auch Kultivierungsbedingungen können die Plasmidstabilität beeinflussen. So wurde bei *Streptomyces lividans* eine Erniedrigung der Plasmidstabilität bei Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks gefunden [WRIGLEY-JONES *et al.*, 1993]. Ein ähnlicher Einfluß wurde auch bei *E. coli* festgestellt, zudem noch Auswirkungen von pH-Wert und Phosphatkonzentration [RYAN *et al.*, 1989]. Erniedrigung der Kultivierungstemperatur zeigte negativen Einfluß auf die Plasmidstabilität [GUPTA *et al.*, 1995], was eigentlich verwundert, da durch diese Maßnahme der Unterschied in den Wachstumsgeschwindigkeiten von plasmidhaltigen und plasmidfreien Zellen eigentlich reduziert werden sollte.

Medien zeigen unterschiedliche Einflüsse. Definierte Glucosemedien führten zu höherer

Stabilität als komplexe Glucose-limitierte Medien [O'KENNEDY, 1995]. Minimalmedien bewirkten höhere Stabilitäten als solche mit Aminosäurezugabe [SHU & SHULER, 1992]. Das Verhältnis von Kohlenstoff- zu Stickstoffquelle senkte die Plasmidstabilität bei steigenden Kohlenstoffanteil [HUANG *et al.*, 1994]. Die Verwendung von Antischaummitteln, ein wichtiger Faktor bei industriellen Prozessen, zeigte keinen Einfluß auf die Plasmidstabilität [KOCH *et al.*, 1995]. Die Qualität des Inokkulum kann die Plasmidstabilität entscheidend bestimmen [HOFMANN *et al.*, 1991].

Einflüsse durch die Prozeßführung

Kontinuierliche Verfahren eignen sich einerseits für die Untersuchung von Plasmidstabilitäten und Einflußfaktoren [HELLMUTH, 1994] andererseits dienen sie auch zur Selektion von hochstabilen Plasmiden, ohne die Ursachen hierfür genauer zu kennen [VYAS *et al.*, 1994]. Durch Fütterungszyklen konnte die Plasmidstabilität erhöht werden [PATNAIK, 1994]. Auch zyklische Änderungen der Raumgeschwindigkeit führten in kontinuierlichen Kulturen zu einer Erhöhung der Plasmidstabilität [STEPHENS *et al.*, 1992].

Besonders erwähnenswert ist der Einfluß der Immobilisierung von Zellen auf die Plasmidstabilität. Eine Erhöhung der Plasmidstabilität durch Immobilisierung konnte in *E. coli* [BARBOTIN, 1994], *Bacillus subtilis* [CRAYNEST *et al.*, 1996] und *Corynebacterium acetoacidophilum* [MUKHERJEE *et al.*, 1996] beobachtet werden.

Trennung von plasmidhaltigen und plasmidfreien Zellen

Eine etwas exotisch anmutende Erhöhung der Plasmidstabilität liegt in der Trennung von plasmidhaltigen und plasmidfreien Zellen durch Flokkulation. Dabei werden Zellen, die das Plasmid pORN108, das für die Überproduktion von Pili und somit für die verstärkte Flokkulation kodiert, tragen, in einem integrierten Abscheider von plasmidfreien Zellen getrennt [HENRY *et al.*, 1990] und diese aus der Kultur entfernt.

Integration in das Chromosom

Eine andere Möglichkeit für die Weitergabe der rekombinanten Gene auf die Tochterzellen ist deren Integration in das Chromosom. Für diesen Zweck wurden eine Reihe von Vektoren für *E. coli* [PEREDELCHUK & BENNETT, 1997] aber auch andere Bakterien wie *Rhizobium meliloti* [ELO *et al.*, 1998] entwickelt. Dabei spielt es eine große Rolle ob die Integration zufällig in das Chromosom geschieht und dadurch negative Auswirkungen haben kann oder gezielt in einem bestimmten Genort erfolgt. Das Plasmid pBRINT, ein pBR322 Abkömmling, wurde z. B. so konstruiert, daß die Insertion in das

Chromosom im *lacZ* Gen des *E. coli*-Chromosoms stattfindet. Über die bewährte Reaktion der β -Galactosidase mit x-gal erfolgt eine einfache Selektion. Durch PCR können Inserte schnell nachgewiesen werden [BALBAS *et al.*, 1993]. Auch die sogenannte *attachment-site* des Phagen λ , seine Integrationsstelle in das *E. coli*-Chromosom, kann zur gezielten Insertion von rekombinanter DNS benutzt werden [DIEDERICH *et al.*, 1992]. Die strukturelle Stabilität der Konstrukte muß für jeden rekombinanten Stamm unter den spezifischen Wachstumsbedingungen überprüft werden. Ein Nachteil der Integrationsmethode liegt darin, daß meist nur eine Genkopie integriert wird bzw. mehrfache Kopien hohe strukturelle Instabilitäten aufweisen. Durch diese niedrige Gendosis ist die Produktivität solcher System oft niedriger als plasmidbasierte Expressionssysteme.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Gendosis in Form der Plasmidkopienzahl sowie strukturelle und segregative Plasmidstabilitäten zu den wichtigsten Faktoren für ein Expressionssystem mit hoher Produktivität zählen. Daher müssen bei der Entwicklung und Optimierung von Expressionssystemen diese Faktoren speziell berücksichtigt werden. Dies gilt nicht nur für *E. coli* sondern prinzipiell für alle Expressionssysteme auf Plasmidbasis.

2.3 Maßnahmen auf der Ebene der Transkription und Translation

Die meisten rekombinanten Produkte sind Proteine oder Stoffwechselleistungen von Proteinen. Daher finden sich in der Proteinbiosynthese eine Reihe von Ansatzpunkten, die es ermöglichen, die Produktivität von Expressionssystemen zu erhöhen. Die Erforschung der molekularen Abläufe der Transkription und Translation erlaubt es die Proteinbiosynthese zu beeinflussen und zu optimieren bzw. Probleme, die sich durch die Überexpression von rekombinanten Proteinen ergeben, zu minimieren.

Hier sollen die wichtigsten Aspekte umrissen, sowie auftauchende Probleme und Optimierungsmöglichkeiten beschrieben werden. Dabei ist besonders zu beachten, daß Verbesserungsstrategien immer ganzheitlich gesehen werden sollten. Eine Maßnahme zur Optimierung kann durchaus zu Problemen in einem anderen Schritt der Proteinbiosynthese führen, wie z. B. die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten durch verstärkte Proteinbiosynthese, die im Kapitel 2.3 gezeigt wird.

Die Maßnahmen, die hier beschrieben werden, umfassen das wichtige Gebiet der Promotoren und Terminatoren auf der Ebene der Transkription sowie einige Aspekte der Translation wie z. B. den Aspekt der Stabilität der mRNS, die ribosomale Bindungsstelle oder die Codon-Präferenz.

2.3.1 Promotoren: Stärke und Regulation sowie Terminatoren

Es wird geschätzt, daß Prokaryonten ca. 2000 Gene besitzen. Damit eine effiziente Nutzung dieser Gene erfolgen kann, muß ihre Expression reguliert werden. Der erste Schritt in der Transkription ist die Synthese der mRNS durch die RNS-Polymerase. Die Anlagerung der RNS-Polymerase erfolgt am Promotor. Die Entscheidung ob die mRNS synthetisiert wird erfolgt über die Regulation. Ein besonderer Aspekt bei der Verwendung gentechnisch veränderter Mikroorganismen ergibt sich aus der Artspezifität und Kompatibilität von Promotoren, d.h. dem Erkennen artfremder Promotoren durch ein bestimmtes Expressionssystem.

2.3.1.1 Promotorstärke

Promotoren umfassen einen ca. 100 Bp langen DNS-Abschnitt. Die in dieser Region enthaltene Minimalsequenz, die die korrekte Initiation der Transkription ermöglicht, besteht in Prokaryonten aus mindestens zwei spezifischen Regionen: die PRIBNOW-SCHALLER-Box oder auch Minus 10-Region genannt sowie die Minus 35-Box. Die PRIBNOW-SCHALLER-Box, die der eukaryontischen TATA-Box entspricht, liegt ungefähr 10 Bp vor der Initiationsstelle der Transkription. Sie ist an der Bindung der RNS-Polymerase beteiligt. Es wurden über 100 Promotoren untersucht und es konnte eine Consensus-Sequenz abgeleitet werden: $T_{89}A_{81}T_{50}A_{65}A_{65}T_{100}$ [IBELGAUFTS, 1993]. Die Indices beziehen sich auf die Häufigkeit der jeweiligen Base in bisher untersuchten Promotoren. Die Minus-35-Box liegt ca. 15-18 Bp von der PRIBNOW-SCHALLER-Box entfernt stromaufwärts. Die für diese Region ermittelte Consensus-Sequenz ist $T_{85}T_{83}G_{81}A_{61}C_{69}A_{52}$ [IBELGAUFTS, 1993]. Der Abstand zwischen der Minus 10-Region und der Minus 35-Box scheint die Stärke des Promotors zu beeinflussen [JENSEN & HAMMER, 1998a, JENSEN & HAMMER, 1998b].

Je höher die Affinität der RNS-Polymerase zu der Promotorsequenz auf der DNS ist, desto stärker ist der Promotor. Bei starken Promotoren lagert sich die RNS-Polymerase öfters an als bei schwachen Promotoren und es wird mehr mRNS gebildet. Die Dosis an Translationsvorlage ist dadurch höher.

Die Affinität der RNS-Polymerase wird über die σ -Faktoren bestimmt, die bereits eine

gewisse Regulation der Genexpression bewirken. Die Initiation der Transkription erfolgt durch die Bindung der σ -Faktoren an die anderen Untereinheiten der Polymerase. Verschiedene Klassen von Promotoren werden aufgrund verschiedener σ -Faktoren selektiv erkannt. Dadurch kann ein ganzes Set von Genen gemeinsam reguliert werden. Die σ -Faktoren werden nach ihrer Größe unterschieden. Der 70 kD große σ -Faktor, kurz σ -Faktor 70 genannt, ist für die Transkription vieler Enzyme des Grundstoffwechsels verantwortlich. Der σ -Faktor 32 ist für die Streßantwort zuständig, während σ -Faktor 54 beim Stickstoffmetabolismus gefunden wurde [MATTES, 1993]. Dies bedeutet, daß die Stärke der Promotoren vom zuständigen σ -Faktor und von der Basensequenz des Promotors abhängen.

Bei der Optimierung von Expressionssystemen ist ein Ziel oft die Verwendung von starken Promotoren. Dies bedeutet für etwaige Maßnahmen, daß sowohl die Struktur der σ -Faktoren verändert werden kann, als auch versucht wird, die Promotorsequenz bezüglich ihrer Affinität zu verbessern. Wichtig ist dabei eine Vergleichsmöglichkeit der Stärke zu etablieren.

Die Stärke von Promotoren kann definiert werden als Anzahl der initiierten Transkriptionen pro Minute pro Promotor pro freier RNS-Polymerasekonzentration [ZHANG & BREMER, 1995]. Die Bestimmung der Promotorstärke auf Basis dieser Definition erfordert die quantitative Analyse der jeweiligen Bezugsgrößen. Da diese Bezugsgrößen von sehr verschiedenen Faktoren abhängen, wie etwa der Stabilität der mRNA, dem verwendeten Stamm, der Plasmidstabilität und –kopienzahl, die selbst wiederum sehr vielen Einflüssen unterworfen sein können, ist eine Bestimmung der Promotorstärke nicht einfach.

Eine andere Methode besteht im Vergleich der Expression eines Reporterproteins unter möglichst identischen Bedingungen, wie z. B. der β -Lactamase [DEUSCHLE *et al.*, 1986, RECKNAGEL *et al.*, 1993]. Aufgrund verschiedener Untersuchungen wurde für einige Promotoren eine Rangordnung ihrer Stärke erstellt mit der Stärke des *bla*-Promotors als relative Einheit (siehe Tabelle 2.3-1).

Tabelle 2.3-1: Relative Promotorstärken [DEUSCHLE *et al.*, 1986]

Promotor	Rel. Stärke [P_{bla}]
<i>T7_{A1}</i>	76
<i>T5_{D/E20}</i>	56
$\lambda_{PL}, \lambda_{PR}$	37
<i>tac</i>	17
<i>lac</i>	6
<i>lacUV5</i>	4
<i>con</i>	4
<i>bla</i>	1

Der Promotor *A1* des Phagen T7 ist 76-fach stärker als der *bla*-Promotor, gefolgt vom Promotor des Phagen T5. Die starken λ_{PL} - und λ_{PR} -Promotoren sind fast 40-fach stärker als der *bla*-Promotor. Der *tac*-Promotor erreicht knapp die 20-fache Stärke. Die beiden *lac*-Promotoren *lac* und *lacUV5* sind vergleichsweise schwach. Interessanterweise ist der *con*-Promotor, der auf den Consensus-Sequenzen beruht, ein schwacher Promotor.

2.3.1.2 Regulation von Promotoren

Bei der, von den σ -Faktoren unabhängigen Regulation von Promotoren, unterscheidet man prinzipiell konstitutive und fakultative Promotoren. Konstitutive Promotoren ermöglichen eine ständige Expression der von ihnen kontrollierten Gene und dienen zur Synthese jener Proteine, die zur Aufrechterhaltung des lebenswichtigen Stoffwechsels der Zellen und zur Gesamtregulation der Abläufe in den Zellen notwendig sind. Die konstitutiv gebildeten Enzyme werden meist durch Isosterie oder Allosterie und kaum auf der Expressionsebene reguliert.

Die fakultativen Promotoren lassen sich grob in induzierbare und reprimierbare Promotoren einteilen. Bei den induzierbaren Promotoren wird oft durch Zugabe eines Induktors die Genexpression eingeschaltet. Dies ist z. B. bei Enzymen des Katabolismus sinnvoll. Reprimierbare Promotoren beenden die Expression bei einer bestimmten Konzentration eines entsprechenden Moleküls und finden sich bei Enzymen des Anabolismus. Der Begriff Promotor beschreibt oft eine DNS-Sequenz die genaugenommen aus zwei Abschnitten besteht, dem eigentlichen Promotor als Anlagerungspunkt der RNS-Polymerase und einem Abschnitt der als Operator bezeichnet wird. Der Operator wechselwirkt mit dem Regulationskomplex, der wie später noch gezeigt wird, sehr unterschiedlich sein kann.

Sowohl induzierbare als auch reprimierbare Promotoren können ein- oder ausgeschaltet vorliegen. Der Unterschied besteht nur darin ob das Einschalten oder das Ausschalten ausgelöst wird. Der Vorgang der Regulation hängt von der Konzentration der aktivierenden Substanz bzw. der Intensität des auslösenden Zustands, sowie der Affinität der Regulationskomplexe zum Operator ab. Dies kann dazu führen, daß fakultative Promotoren im eigentlich abgeschalteten Zustand, eine mehr oder weniger geringe Expression bewirken. Dies wird als basale Transkription oder Leckrate bezeichnet. Promotoren mit hoher Leckrate führen unter nicht induzierenden Bedingungen zu einer signifikanten Expression.

Der am besten untersuchte Promotor ist der *lac*-Promotor des β -Galactosidaseoperons. Dieses Operon besteht aus drei Strukturgenen (*lacZ*, *lacY*, *lacA*), die für die Verwertung von Lactose benötigt werden, dem Strukturgen für das Repressorpeptid (*lacI*) sowie den Sequenzen des eigentlichen Promotors und Operators. Im ausgeschalteten Zustand bindet der konstitutiv gebildete *lac*-Repressor an die Operatorregion und verhindert dadurch weitgehend die Transkription. Einige wenige Moleküle der β -Galactosidase werden jedoch gebildet. Wird Lactose in das Medium gegeben, so wird sie von der gering vorhandenen β -Galactosidase in Allolactose umgewandelt. Diese verbindet sich mit dem Repressorpeptid, das nun nicht mehr an den Operator binden kann und die Transkription der drei Strukturgene freigibt. Lactose wird verwertet bis die Konzentration so weit gesunken ist, daß praktisch keine Allolactose mehr gebildet wird und der freie Repressor wieder an den Operator bindet [LACHMUND, 1998].

Neben dieser Regulation über das Angebot einer Kohlenstoffquelle ist es für die Zelle nützlich zwischen leicht und weniger leicht nutzbaren Substraten zu unterscheiden. Dies geschieht in einigen Fällen, so auch beim *lac*-Operon, durch Katabolitrepression in Anwesenheit von Glucose. Glucose reguliert über eine noch nicht ganz aufgeklärte Regulationskaskade die Konzentration von cyclischem AMP (cAMP). Bei niedriger Glucosekonzentration ist die cAMP-Konzentration relativ hoch. Das bewirkt, daß cAMP sich mit zwei Molekülen des CAP-Proteins (*Catabolite Activator Protein*) zu einem Aktivator der Genexpression verbindet. Nur wenn sich dieser Aktivatorcomplex an die entsprechende Stelle vor dem *lac*-Promotor anlagert, erfolgt die Transkription der *lac*-Gene.

Als Beispiel für einen über Repression regulierten Promotor sei hier der *trp*-Promotor des Tryptophan-Operons kurz erläutert. Die Synthese der aromatischen Aminosäuren ist energie- und bausteinintensiv, weshalb sich eine schnelle Antwort der Zelle auf eine ausreichende Konzentration von Tryptophan im Laufe der Evolution gebildet hat. Eine rasche Anpassung erfolgt über die allosterische Hemmung eines zentralen Enzyms des *trp*-Operons, der Anthranilat-Synthetase. Auf der genetischen Ebene wird unterschieden zwischen der Repression durch einen Repressorkomplex und der Attenuation.

Das *trp*-Operon besteht aus 5 Strukturgenen (*trp A – E*) für die Bildung von 3 Enzymen, dem Strukturgen für das Repressorpeptid, *trpR*, sowie den regulatorischen Sequenzen P (Promotor), O (Operator) und L (Leaderpeptid). Bei geringer Tryptophankonzentration kann kein aktiver Repressor gebildet werden und die Synthese der 3 Enzyme wird durchgeführt. Bei genügend hoher Konzentration an Tryptophan verbinden sich das

Repressorpeptid und Tryptophan zu einem aktiven Repressorkomplex, der sich nun an den Operator anlagert und die Transkription des *trp*-Operons verhindert.

Die Attenuation, die dritte Möglichkeit der Regulation der Tryptophansynthese, bezeichnet die physiologische Kontrolle der Termination einer Transkription. Die als Leaderpeptid bezeichnete Regulationssequenz wird bei der Transkription als erstes transkribiert und wie in Prokaryonten üblich sofort translatiert. Die RNS-Polymerase befindet sich in einer Art Warteposition. Die entstehende mRNA enthält 2 Anticodons für die Anlagerung der Tryptophan-tRNA. Ist genügend Tryptophan vorhanden, und somit genügend Tryptophan-tRNA, so kann das Ribosom über die Anticodons lesen und bewirkt dadurch eine spezifische Schleifenbildung der DNS. Diese Schleifenbildung bewirkt nun ihrerseits die Ablösung der RNS-Polymerase, d.h. die Termination der Transkription. Ist jedoch nur wenig Tryptophan-tRNA in der Zelle vorhanden, verbleibt das Ribosom in einer anderen Position und löst dadurch eine völlig andere Schlaufenbildung der DNS aus, die nun die weitere Transkription erlaubt. Die Tryptophancodons in der Leaderpeptidsequenz sind somit eine direkte Sonde für die Tryptophankonzentration. Derartige Leaderpeptide wurden für die Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Leucin, Threonin und Isoleucin gefunden, die entsprechend die Synthese dieser Aminosäuren zusätzlich regulieren [LACHMUND, 1998].

Angesichts der vermuteten 2000 Gene gibt es viele regulierte Promotoren in *E. coli*. Einen Überblick von einigen bekannten Promotoren und Induktionsmethoden zeigt Tabelle 2.3-2.

Tabelle 2.3-2 Regulation von Promotoren in *E. coli*

Regulation durch	Promotor (Induktor)	Referenz
ohne (konstitutiv)	<i>deo</i>	FISCHER, 1997, JENSEN & HAMMER, 1998a, JENSEN & HAMMER, 1998b
Zugabe von IPTG bzw. Lactose	<i>lac</i> <i>lacUV5</i> <i>tac</i> <i>rac</i> <i>trc</i> T7 T3, T5 P1 P2F <i>lpp-lac</i> <i>mac</i>	WONG <i>et al.</i> , 1997 GOMBERT & KILIKIAN, 1998 DYKXHOORN <i>et al.</i> , 1996 PISTILLO & VISHAWANATHA, 1990 VELTEROP <i>et al.</i> , 1995 LIN & HSU, 1997 HANNIG & MAKRIDES, 1998 IVANOV <i>et al.</i> , 1999 CHRISTIE, 1999 LU <i>et al.</i> , 1993 VIDAL-INGIGLIARDI & RAIBAUD, 1985

Regulation durch	Promotor (Induktor)	Referenz
Zugabe anderer Induktoren	<i>trp</i> (IAA) <i>cst</i> (Tetracyclin) T4 (Phage T4) n.b. ⁺ (Metallionen) <i>recA</i> (Naldixinsäure) <i>xapA</i> (Xanthosin) <i>mgl</i> (Glucose) <i>ara</i> (Arabinose)	KOH <i>et al.</i> , 1998 SKERRA, 1994 NOGUCHI & TAKAHASHI, 1991a O'HALLORAN, 1993 HANNIG & MAKRIDES, 1998 WEICKERT <i>et al.</i> , 1996 DEATH & FERENCI, 1994 DE LENCASTRE & DE SANOGUEIRA, 1998
Temperaturerhöhung	λ λ -Tandem <i>lac</i>	CHEN & CHANG, 1999 LOVE <i>et al.</i> , 1996 YABUTA <i>et al.</i> , 1995
Temperaturerniedrigung	<i>csp</i>	INOUE <i>et al.</i> , 1998
Sauerstofflimitierung	<i>vgb</i> (<i>vhb</i>) <i>nirB</i> <i>nifA</i> Mn-SOD <i>nar</i> <i>pfl</i> <i>bud</i> (+Acetat im Medium)	DIKSHIT <i>et al.</i> , 1990 OXER <i>et al.</i> , 1991 HUALA <i>et al.</i> , 1990 GAO <i>et al.</i> , 1996 LEE <i>et al.</i> , 1996, HAN <i>et al.</i> , 1998 SAWERS 1993 BOECK <i>et al.</i> , 1996
Limitierung	<i>trp</i> (Tryptophan) <i>phoA</i> (PO ₄) <i>ugp</i> (PO ₄) <i>gln</i> (N-Quelle) <i>bio</i> (Biotin)	SOMERVILLE, 1988 CRAIG <i>et al.</i> , 1991 SU <i>et al.</i> , 1990 SCHROECKH <i>et al.</i> , 1996 CHANG & SHIUAN, 1997
Änderungen im Medium	<i>cad</i> (pH) λ_{PL} (pH) Redox <i>proU</i> (Osmotischer Druck, NaCl-Konzentr.)	CHOU <i>et al.</i> , 1995 POINDEXTER <i>et al.</i> , 1991 UNDEN <i>et al.</i> , 1990 GOWRINSHANKAR <i>et al.</i> , 1997, HERBST <i>et al.</i> , 1994
Übergang in die stationäre Phase	<i>fic</i> <i>bol</i> <i>cst</i> <i>ssp</i>	HIRATSU <i>et al.</i> , 1995 MIKSCH & DOBROLOWSKI, 1995 BLUM <i>et al.</i> , 1990 WILLIAMS & FLICKINGER, 1990
hydrostatischen Druck	n.b. ⁺ <i>lac</i> bzw. <i>tac</i>	KATO & HORIKOSHI, 1996 SATO <i>et al.</i> , 1995
elektrischen Impuls	n.b. ⁺	TSUCHIYA <i>et al.</i> , 1993
Streß	<i>lon</i> , <i>fabA</i> ; <i>katG</i> , <i>lac</i> , <i>uspA</i> ,	BEN-ISRAEL <i>et al.</i> , 1998

n.b.⁺ = nicht benannt in zitierter Literatur

Die aufgelisteten Promotoren funktionieren in *E. coli*, stammen jedoch nicht alle aus *E. coli*. Eine Vielzahl weiterer regulierbarer Promotoren finden sich in anderen Organismen wie etwa der mit Cu²⁺-Ionen induzierbare Promotor CUP1 in Hefen [WARD *et al.*, 1994]. Interessant sind Promotoren, die sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten funktionieren [MENSA-WILMOT, 1999, LEWIN *et al.*, 1998].

2.3.1.3 Artspezifität und Kompatibilität von Promotoren

Bei der Suche nach neuen Eigenschaften z. B. Enzymen mit speziellen Aktivitäten, kann Spender-DNS in unbekannte Fragmente zerlegt werden, die anschließend in einen geeigneten Vektor eingebaut werden. Dabei kommt es vor, daß Gene unter der Kontrolle ihres ursprünglichen Promotors bleiben. Ob diese Gene im Wirt exprimiert werden, hängt davon ab, ob die Transkriptionsmaschinerie den fremden Promotor nutzen kann.

Expression der Levanase aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*

Beim Versuch Gene für saccharolytische Enzyme zu isolieren wurde das Gen für das Enzym Levanase aus *Bacillus subtilis* unter der Kontrolle des levanaseeigenen Promotors in *E. coli* kloniert [FRIEHS *et al.*, 1986].

Chromosomale DNS von *B. subtilis* wurde in DNS-Fragmente zerlegt und in das Plasmid pBR322 eingebaut. Nach Transformation und Selektion wurden drei Klone mit saccharolytischer Aktivität gefunden.

Es war bekannt, daß *B. subtilis* über mindestens drei Enzyme verfügt die Saccharose hydrolysieren können: eine Sucrase, eine Levansucrase und eine Levanase [LEPESANT *et al.*, 1972, LEPESANT *et al.*, 1974, KUNST *et al.*, 1977]. Es konnte gezeigt werden, daß alle drei Klone die Levanase exprimierten [FRIEHS *et al.*, 1986]. Dies bedeutete, daß der Promotor der Levanase aus *B. subtilis*, einem GRAM-positiven Bakterium, im GRAM-negativen *E. coli* erkannt und genutzt wurde. Abbildung 2.3-1 zeigt die Basensequenz, in der der Levanasepromotor lokalisiert sein kann [SCHÖRGENDORFER *et al.*, 1987].

```

gcaacgtgttgccattgCTGCAGCAGTCTTTTCATATATAAATCATTCCGGATAACAGTGAAACAGAGGA
                Minus 35-Box                PRIBNOW-SCHALLER-Box

GAATTGCCAGAAACGGACCAGCTTGCGCAGAGTCTCTTTTGAAAGTGTTCAAACATGA

AGAGAGGAGCGAAGGAACAAATG
    RBS                Start Levanase
  
```

Abbildung 2.3-1: Promotorregion der Levanase aus *B. subtilis*

Kleinbuchstaben: Anteil des Vektors pBR322, Großbuchstaben: Anteil *B. subtilis*.
Mögliche Promotorregionen: Minus 35-Box und PRIBNOW-SCHALLER-Box. RBS:
Bindungsstelle für die ribosomale RNS

Die ribosomale Bindungsstelle RBS, auch SHINE-DALGARNO-Box genannt, ist jener Abschnitt auf der DNS, der zur ribosomalen RNS, die am Aufbau des Translationskomplexes mitwirkt, komplementär ist. Die Consensus-Sequenz der RBS für *E. coli* mRNA ist TAAGGAGGT. Sie variiert in ihrer Länge zwischen 3 und 9 Basen und

befindet sich meist in einem Abstand von 3-11 (auch mehr) Basen vom Translationsstart [IBELGAUFTS, 1993]. Für das Levanasegen wurde im Abstand von 11 Basen die Sequenz AGAGAGGAG gefunden, die sich als RBS sehr gut eignen könnte [SCHÖRGENDORFER, 1987, SCHÖRGENDORFER, 1995].

Bei der Suche nach einer geeigneten Promotorsequenz konnte eine geeignete Minus-35-Box (Consensus: TTGACA) und PRIBNOW-SCHALLER-Box (Consensus: TATAAT) gefunden werden. Dabei liegt die Minus-35-Box zum Teil auf dem pBR322-Anteil. Auffallend ist jedoch, daß die Promotorregion deutlich weiter von der RBS entfernt ist als sonst üblich in Bakterien. Die gefundenen Regionen beziehen sich auf die bekannte σ -70-Polymerase. Es kann jedoch eine andere, vielleicht unbekanntere Polymerase, die Expression der Levanase in *E. coli* bewirkt haben.

Die drei gefundenen saccharolytischen Klone unterschieden sich in der Größe des klonierten *B. subtilis*-Fragments [FRIEHS *et al.*, 1986]. Alle drei Fragmente begannen jedoch mit der selben Sequenz, wobei der pBR322-Anteil immer die Minus-35-Box ergänzte. Vielleicht war diese Ergänzung für eine erfolgreiche Expression in *E. coli* notwendig. Bei der Umklonierung des kleinsten Fragmentes in einen pUC-Vektor wurde die Minus-35-Box durch das Basentriplett TTG des Vektors ergänzt.

Da nur eines von drei möglichen saccharolytischen Enzymen gefunden wurde, kann geschlossen werden, daß Kompatibilität von Promotoren nicht unbedingt nur artspezifisch sondern promotorspezifisch sein kann. Wenn Promotoren eines Bakteriums A in einem Bakterium B erkannt werden, so bedeutet dies möglicherweise nicht, das alle Promotoren von A in B erkannt werden.

2.3.1.4 Promotoren für die Fermentationstechnik

Um als potentielle Expressionspromotoren in Frage zu kommen, müssen Promotoren bestimmte Kriterien, die sich aus dem Expressionssystem und der Prozeßstrategie ergeben, erfüllen. Zu diesen Kriterien gehören die Regulierbarkeit, die Promotorstärke, die Art der Induktion bei regulierbaren Promotoren und die basale Transkription (Leckrate).

Regulierbarkeit

Die erste grundlegende Frage bei der Auswahl eines Promotors für die Fermentationstechnik ist ob die Expression regulierbar oder konstitutiv erfolgen soll.

Prinzipiell ist davon auszugehen, dass eine konstitutive Expression den Organismus belastet. Dies führt zu einer Erniedrigung der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit und in Folge u.a. zu einer Abnahme der Plasmidstabilität besonders unter nicht selektiven Bedingungen. Die Anhäufung von Produkt kann zur Reduktion der Produktbildungsgeschwindigkeit führen. Der Einsatz von regulierbaren Promotoren, die es erlauben die Fermentation in zwei Stufen durchzuführen, wird bevorzugt. In der ersten Stufe werden die Organismen zu hohen Zelldichten angezüchtet und in der zweiten Stufe erfolgt die Produktion, also Überexpression des Produkts z. B. eines rekombinanten Proteins. Daher ist der Einsatz von konstitutiven Promotoren von Fall zu Fall abzuwägen.

Wird das Genprodukt für den Stoffwechsel also für die Anzucht der Zellen benötigt, so ist eine konstitutive Expression wünschenswert. Dies gilt z. B. für Organismen bei denen der Katabolismus gentechnisch optimiert wurde. Dies wäre z. B. der Fall, wenn dem Organismus ein Gen für ein katabolisches Enzym eingebaut wurde, das es den Zellen ermöglicht, auf einem deutlich preiswerteren Substrat zu wachsen. Die Konstruktion konstitutiver Promotoren spielt bei der gezielten Änderung von Stoffwechselfvorgängen (*Metabolic Engineering*) eine wichtige Rolle [JENSEN & HAMMER, 1998a, JENSEN & HAMMER 1998b].

Eine andere Ausnahme wäre, wenn die Produktivität mit konstitutivem Promotor deutlich höher läge. Konstitutive Expression bedeutet ja, daß das Produkt von Beginn der Fermentation an gebildet wird. Beim Einsatz regulierbarer Promotoren wird in der Zeit der Anzuchtphase kein Produkt gebildet. Es ist möglich, daß die Gesamtmenge an Produkt über die gesamte Fermentationszeit betrachtet bei konstitutiver Expression höher ist. Dies muß jedoch für jeden speziellen Fall untersucht werden.

Eine Kombination beider Möglichkeiten liegt in der Anwendung von Promotoren mit hoher basaler Transkription. Dies würde bedeuten, daß während der Anzuchtstufe bereits eine mehr oder weniger große Menge an Produkt gebildet und in der Produktionsphase, nach durchgeführter Induktion, eine deutliche Steigerung der Expression erfolgen würde.

Promotorstärke

Prinzipiell werden starke Promotoren verwendet, um eine hohe Überexpression zu ermöglichen. Dies sollte zu Mengen an rekombinanten Protein führen, die 10-30 % des Gesamtproteins der Biomasse ausmachen. Schwache Promotoren werden verwendet, wenn damit unerwünschte Auswirkungen wie z. B. die Bildung von Proteinaggregaten verhindert werden kann. Bei der Produktion von Substanzen, die für den Wirt toxisch

sind, können schwache Promotoren eine Produktion überhaupt erst ermöglichen.

Art der Induktion

Die Induktion sollte schnell und einfach erfolgen, das Induktionsmittel, sei es eine Substanz oder eine physikalische Änderung der Bedingungen (Temperaturänderung), sollte preiswert und ungiftig sein und möglichst zu keinen zusätzlichen Nebenprodukten führen. Eine schnelle Induktion minimiert die negativen Auswirkungen der Expression bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit, Produktbildungsgeschwindigkeit und der Plasmidstabilität und ist somit prinzipiell wünschenswert. Eine schnelle Induktion und somit Produktion kann helfen, Verluste durch Proteasen zu minimieren. So kann die Zugabe eines Induktionsmittels relativ schnell erfolgen, die Induktion einer Kultur mit einem Volumen von von 100 oder 1000 m³ durch Erhöhung der Temperatur würde bedeutend langsamer erfolgen. Die Kosten der Induktion spielen in der Fermentation eine wichtige Rolle. Ein Induktionsmittel kann im Labormaßstab vernachlässigbare Kosten verursachen, jedoch im Produktionsmaßstab zu großen ökonomischen Lasten führen. Das Induktionsmittel sollte der Anwendung des Produktes gemäß ungiftig sein. So dürfen bei der Produktion von humanen rekombinanten Pharmazeutika, die sicherlich den höchsten Qualitätsstandards genügen müssen, nur für den Menschen völlig ungiftige Induktionsmittel verwendet werden, da sonst der Nachweis der völligen Entfernung des Mittels aus dem Produkt erbracht werden müßte, was die Kosten enorm steigern würde. Die Induktion sollte zu keinen zusätzlichen Nebenprodukten durch die Induktion anderer Promotoren führen. Um das Beispiel der Temperaturerhöhung hier wieder anzuführen: eine Temperaturerhöhung kann zur Produktion von einer Reihe sogenannter Streßproteine führen, die die Aufreinigung beeinflussen können und zu signifikanten Verlusten durch verstärkte Proteolyse führen [HOCKNEY, 1994]. Zu den bekanntesten mittels Temperaturerhöhung induzierbaren Promotoren gehören die starken λ_{PL} - und λ_{PR} -Promotoren. Ihre Induktion beruht auf der irreversiblen Denaturierung des mutierten λ -Repressors CI857 [DENHARDT & COLASANTI, 1987, SCHMIDT *et al.*, 1999c]. Auf Promotoren, die auf den Sauerstoffpartialdruck reagieren, wird im experimentellen Teil genauer eingegangen.

Promotoren mit *lac*-Operator

Es gibt sehr viele Promotoren, die über den *lac*-Operator reguliert werden. Dazu gehören die beiden *lac*-Promotoren *lac* und *lacUV5*. Der *lacUV5*-Promotor zeichnet sich dadurch aus, daß er nicht durch cAMP beeinflusst wird. Auch wenn Glucose im Medium vorliegt kann dieser Promotor über den *lac*-Operator reguliert werden. Bei den Promotoren *tac*,

mac, *rac*, *trc*, und *lpp-lac* handelt es sich um Hybridpromotoren. Dabei wurde die Sequenz, die für die Anlagerung der RNS-Polymerase verantwortlich ist, z. B. aus den Promotoren *trp* oder *malE* verwendet und mit dem *lac*-Operator verknüpft. Dadurch ist es möglich bei gleicher Regulierbarkeit weitaus stärkere Promotoren als *lac*-Promotoren zu erhalten. Die Regulation des *lac*-Operators erfolgt über den *lac*-Repressor, der über das Gen *lacI* exprimiert wird. Bei starken Hybridpromotoren führt dies zu einer hohen basalen Transkription. Für eine bessere Regulation wurde das Gen *lacI* mutiert zu *lacI^q*, das zu einer Überexpression des *lac*-Repressors führt. Induziert werden Promotoren auf Basis des *lac*-Operators durch Zugabe von IPTG. Diese Substanz ist jedoch toxisch [DONOVAN *et al.*, 1996]. In der Fermentationstechnik ist es besser durch Zugabe von Lactose zu induzieren [DONOVAN *et al.*, 1996, GOMBERT & KILIKIAN, 1998]. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung eines temperatursensitiven Repressors LacI^{ts} [MAKRIDES & KUNG, 1995].

Die Induktion des starken T7-Promotors mittels IPTG erfolgt über eine Regulationskaskade [STUDIER & MOFFAIT, 1986, STUDIER *et al.*, 1990]. Für die Transkription, startend am T7-Promotor, ist eine spezielle T7-RNS-Polymerase notwendig. Diese kodiert am Chromosom entsprechend gentechnisch veränderter Stämme, wie etwa *E. coli* BL21(DE3) und steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Bei Zugabe von IPTG wird zuerst die T7-RNS-Polymerase synthetisiert, die dann die Transkription am T7-Promotor bewirkt. Durch entsprechende *lacI^q* Genkopien zeigt dieses System praktisch keine basale Transkription [TABOR & RICHARDSON, 1985]. Auch das T7-System ist über Lactose [LIN & HSU, 1997] bzw. Temperaturerhöhung [GUPTA *et al.*, 1999] induzierbar.

Basale Transkription (Leckrate)

Die meisten regulierbaren Promotoren führen zu einer basalen Transkription, d.h. einer Transkription ohne Induktion. Dies kann durchaus wichtig sein, wie am Beispiel des *lac*-Operon beschrieben wurde. Die basale Transkription der *lacZ*- und *lacY*-Gene ist notwendig, damit aus der Lactose der eigentliche Induktor Allolactose gebildet werden kann. Für die Fermentationstechnik ist die Höhe der basalen Transkription wichtig z. B. bei der Produktion wirtstoxischer Proteine, etwa Restriktionsendonukleasen. Hier muß die Leckrate möglichst gering gehalten werden, um die Anzucht der Zellen nicht zu gefährden. Basale Transkription wird dann zu einem Problem, wenn sie die Vorteile der Induktion bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit aufheben würde.

Dies bedeutet, daß bei der Verwendung von starken Promotoren eventuell eine Erhöhung

der Gendosis für das Repressorpeptid von Vorteil sein kann. Dies ist z. B. bei starken Promotoren mit *lac*-Operator wie z. B. dem *tac*-Promotor der Fall, wo eine Mutation im *lacI*-Gen, die als *lacI^f* bezeichnet wird, zu einer Überexpression des Repressors führt. Bei der Verwendung von regulierbaren Promotoren muß immer berücksichtigt werden, ob eine Optimierung der Repressorproduktion notwendig ist. Entsprechende gentechnische Maßnahmen müssen dann durchgeführt werden.

2.3.1.5 Terminatoren

Die Transkription in Prokaryonten wird beendet, sobald die RNS-Polymerase die Sequenz erreicht, die als Terminator bezeichnet wird [PLATT, 1986]. Entsprechend den Promotoren, gibt es Terminatoren, die bei der Konstruktion von Expressionsvektoren verwendet werden, wie etwa der *trpA*-Terminator [STENGELN *et al.*, 1994]. Jedoch werden bedeutend weniger unterschiedliche Terminatoren als Promotoren verwendet, da es um eine möglichst effiziente Termination der Transkription geht und nicht um verschiedene Regulationsstrategien [RICHARDSON, 1993]. Um dies zu bewirken, können Terminatoren z. B. als Tandem hintereinander geschaltet werden [MARKARYAN *et al.*, 1991]. Ein starker oft genutzter Terminator ist *rrnB* des Phagen T1 [HWANG *et al.*, 1990, ATTANASIO *et al.*, 1991]. Um sicher zu gehen, daß ein Promotor nur über die entsprechende Regulation induziert wird, werden Terminatoren vor dem Promotor plaziert und verhindern dadurch eine unbeabsichtigte Transkription [KUHSTOSS & NAGARAJA 1992]. Allgemein gilt, daß starke Promotoren starke Terminatoren benötigen. Durch Antiterminatorproteine kann die Funktion der Terminatoren beeinflusst werden [MATTES, 1993].

2.3.2 Boten-RNS (mRNS) und ribosomale Bindungsstelle

Die mRNS ist das erste Produkt der Genexpression und somit ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Expression rekombinanter Produkte. Dabei spielen zwei Faktoren eine Rolle: die Stabilität der mRNS und die Bindungsstelle der Ribosomen.

2.3.2.1 Stabilität der mRNS

Die Menge an translatierbarer mRNS hat einen direkten Einfluß auf die Gesamtproduktivität eines Expressionssystems. Die Anzahl der jeweiligen mRNS-Moleküle ist abhängig von der Transkription, wie im vorherigen Kapitel beschrieben und von der Geschwindigkeit, mit der die mRNS abgebaut wird [COBURN & MACKIE, 1999].

Um die Stabilität einer mRNS zu untersuchen, muß diese quantitativ analytisch erfaßt werden. Eine geeignete Methode ist die additive Reverse-Transkriptions-PCR

[REYES-ENGEL *et al.*, 1996], die multiplexe PCR [DOSTAL *et al.*, 1994, WONG *et al.*, 1994] und die kompetitive multiplexe PCR [APOSTOLAKOS *et al.*, 1993].

Entscheidend für die Stabilität der mRNA ist die Ausbildung von sogenannten Haarnadelstrukturen an ihren Enden. Dadurch wird die mRNA gegen Angriffe von RNAsen geschützt [BRAWERMAN, 1990]. Dies kann sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende erfolgen [MERTENS *et al.*, 1996, EMORY *et al.*, 1992]. Am Abbau der mRNA sollen mindestens 6 verschiedene Enzyme beteiligt sein. Diese bilden einen Komplex, der als Degradosom bezeichnet wird [COBURN & MACKIE, 1999].

Andere Untersuchungen haben gezeigt, daß regulatorische Proteine durch Anlagerung an die mRNA deren Halbwertszeit erhöhen können und damit eine weitere Ebene in der Genregulation darstellen [CARR, 1994]. Der Abbau der mRNA kann durch Änderungen in der Wachstumsgeschwindigkeit beeinflusst werden [GEORGELLIS *et al.*, 1992], wie im Falle der *ompA*-mRNA. Dabei wird nach einer Mediumsänderung, was zu sehr geringen Wachstumsgeschwindigkeiten führte, der beschleunigte Abbau der *ompA*-mRNA durch zusätzliche Expression von RNAsen bewirkt.

Untersuchungen über den Zusammenhang von Länge der mRNA und Stabilität haben gezeigt, daß hier keine eindeutigen Abhängigkeiten bestehen [KUSHNER, 1996]. Die Halbwertszeit von mRNA in *E. coli* liegt zwischen 40 s und 20 min [KUSHNER, 1996].

Durch die Kontrolle der Halbwertszeit [MCCARTHY *et al.*, 1988], aber auch durch Ausbildung von Sekundärstrukturen, die die Translation beeinflussen können, wird die Expression von Proteinen auf der Ebene der mRNA kontrolliert [DE SMITT & VAN DUIN, 1990].

Erhöhung der mRNA Stabilität

Um sicher zu gehen, daß die Überexpression eines rekombinanten Proteins nicht durch eine geringe Stabilität der mRNA beeinträchtigt wird, wurden gentechnische Änderungen durchgeführt, um die Halbwertszeit der mRNA zu erhöhen.

Durch Insertion eines fremden Strukturgens (*cat*) in Phagen T4 Sequenzen wurde die Halbwertszeit der mRNA des dadurch entstandenen Hybrides gegenüber der mRNA des unveränderten *cat*-Gens verdoppelt. Die Menge der durch *cat* kodierten Chloramphenicol Acetyltransferase stieg um das 5- bis 8-fache [CHAN *et al.*, 1988]. Dies bedeutet, daß durch Verdopplung der Verfügbarkeit der mRNA für die Translation, die Produktion des kodierenden Proteins, nicht nur verdoppelt sondern mindestens verfünffacht wurde. Auch

in einem anderen Fall wurde eine mRNA durch Fusion mit T4-Sequenzen stabilisiert [DUVOISIN *et al.*, 1986].

Durch klassische Mutation mit Nitrosoguanidinderivaten wurde die Halbwertszeit einer Isoamylase-mRNA von 3 min auf 22 min erhöht. Die Isoamylaseaktivität stieg um mehr als das zehnfache [FUJITA *et al.*, 1990].

Eine gezielte Änderung der DNS-Sequenz durch Insertion einer spezifischen Sequenz zwischen dem Transkriptionsstart und dem Translationsstart ist durch ein neues Vektorsystem möglich. Dadurch werden am 5'-Ende Haarnadelstrukturen gebildet und die Halbwertszeit der so veränderten mRNA verdreifacht [CARRIER & KEASLING, 1999], was zu deutlich höherer Proteinexpression führte [CARRIER *et al.*, 1998]. Auch Änderungen am 3'-Ende können zu Stabilisierungen führen [ANDREWS *et al.*, 1998, SCHWARTZ *et al.*, 1998].

Eine andere Möglichkeit die Halbwertszeit von mRNA zu erhöhen, besteht in der Verwendung von RNase defizienten Stämmen [DONOVAN & KUSHNER, 1986], die jedoch schwierig in der Anzucht sind. Eine weitere Methode zur Verlängerung der Halbwertszeit der mRNA nutzt das Genprodukt von *ams* (*altered mRNA stability*). Stämme, die eine temperatursensitive *ams1*-Mutante aufweisen, zeigen höher Stabilität der mRNA [CLAVERIE-MARTIN *et al.*, 1991]. Es wurde beobachtet, daß die Zugabe von Antibiotika, die die Translation stoppen, die Halbwertszeit von mRNA erhöht [LOPEZ *et al.*, 1998].

2.3.2.2 Ribosomale Bindungsstellen (RBS)

Die Translation der mRNA, der zweite Schritt in der Proteinbiosynthese, beginnt mit der Bindung der Ribosomen an spezifische Bindungsstellen auf der mRNA. Schwache Bindungsstellen führen zu einer geringen Expression. Dies kann durch Änderungen der RBS optimiert werden [SCHMUCKER *et al.*, 1989]. So konnte durch Erhöhung des A- bzw. T-Anteils an Nukleotiden neben der RBS, die Expression von Rinderwachstumshormon in *E. coli* signifikant erhöht werden [OLSEN *et al.*, 1989]. Der Abstand der RBS vom Start-Codon der Translation beeinflußt ebenfalls die Häufigkeit der Initiation der Translation [SUREK *et al.*, 1991]. So wurde durch eine Vergrößerung des Abstands der RBS vom Start-Codon die Expression von Penicillinacylase verbessert [CHOU *et al.*, 1999]. Multimere des Dinukleotids CA stromabwärts des Start-Codons erhöhten die Bindung an die RBS [MARTIN-FARMER & JANSSEN, 1999]. Wie für Promotoren gilt auch bei der RBS, daß artfremde RBS kompatibel sein oder ausgetauscht werden muß, sonst kann die Expression z. B. einer rekombinanten Cellulosesynthetase in *E. coli*. um die Hälfte geringer ausfallen als im Spenderstamm *Acetobacter xylinum* [NAKAI *et al.*, 1998].

Empfohlen wird eine starke RBS (UAAGGAGG) und eine optimale Länge von 9 A-reichen Nukleotiden zwischen der RBS und dem Start-Codon [SWARTZ, 1996]

2.3.3 Start-Codon, Stop-Codon, Codon-Präferenz und Leserahmen

2.3.3.1 Start-Codon und Stop-Codon

Die Translation der Basentriplets (Codons) der mRNA beginnt am Start-Codon, daß in vielen Fällen AUG ist. Daher hat die Verfügbarkeit der entsprechenden tRNA und der Methionyl-tRNA-f-Met -Formyltransferase entsprechenden Einfluß auf den Start der Translation [SCHMITT *et al.*, 1996].

Wie im Fall der Transkription benötigt auch die Translation eine effiziente Terminationssequenz. Von den 64 möglichen Codons des genetischen Codes kodieren drei, nämlich UAG (*Amber*), UAA (*Ochre*) und UGA (*Opal*), nicht für eine Aminosäure. Tauchen diese Sequenzen beim Ablesen der mRNA auf, so wird die Translation beendet. Daher werden diese drei Codons als Stop-Codons bezeichnet. Bei der Konstruktion von Expressionsvektoren, werden entsprechende Stop-Codons eingebaut wie z. B. beim Plasmid pUC12-STOP [BRÖKER & AMANN, 1986]. Dieser Vektor enthält das Stop-Codon UAA in allen drei Leserahmen.

2.3.3.2 Codon-Präferenz

Die 20 Aminosäuren, aus denen Proteine bestehen, werden durch 61 Codons verschlüsselt. Einige Aminosäuren werden durch mehrere Codons kodiert, wie z. B. Leucin durch 6 Codons, andere nur durch ein Codon, etwa Methionin und Tryptophan. Codons, die für die gleiche Aminosäure kodieren, werden in den einzelnen Spezies unterschiedlich häufig verwendet. Die Organismen haben spezielle Präferenzen bei der Verwendung von Codons. Diese Codon-Präferenz kann innerhalb eines Organismus unterschiedlich sein und beeinflusst dadurch die Expression. Gene, die stark exprimierte Proteine kodieren, bestehen aus bevorzugten Codons. Gene, die weniger niedrig exprimiert werden sollen, haben Codons, die der Organismus schlechter nutzen kann [ERNST, 1988]. Eine Möglichkeit in der Differenzierung der Codon-Präferenz liegt in der Verfügbarkeit der entsprechenden tRNA.

In *E. coli* werden drei Klassen von Proteingenen unterschieden. Gene der Klasse I sind in den meisten metabolischen Prozessen involviert. Die Klasse II umfaßt Gene, die stark und kontinuierlich in der exponentiellen Phase exprimiert werden. Klasse III sind Gene des horizontalen Gentransfers. In Klasse III ist die Verteilung der Codons relativ

gleichmäßig, d.h. alle verschiedenen Codons einer Aminosäure haben mindestens einen Anteil von 10% an den möglichen spezifischen Codons. In den Klassen I und II sind jedoch deutliche Präferenzen erkennbar. So in der Klasse I bei der Aminosäure Leucin, die zu 53% durch CTG und nur zu 3% durch CTA kodiert wird. Noch extremer fällt die Verteilung in Klasse II ebenfalls bei der Aminosäure Leucin aus: 77% durch CTG und 1% durch CTA [HÉNAUT & DANCHIN, 1996].

Bei der Herstellung eukaryontischer Proteine in *E. coli* sollte die Codon-Präferenz berücksichtigt werden. Falls das zu exprimierende Gen viele Codons enthält, für die *E. coli* nur eine geringe Präferenz zeigt, kann die Produktivität deutlich niedriger ausfallen, als vom System erwartet werden kann. Dies hat z. B. dazu geführt, daß für die Produktion

von Humaninsulin in *E. coli* das Insulingen synthetisch hergestellt und nicht die cDNS verwendet wurde. Dabei wurden jene Codons verwendet, wie sie in *E. coli* hauptsächlich vorkommen [GOEDDEL *et al.*, 1979]. Energetisch durch ihre Länge in der Translation aufwendige Gene zeigen eine hohe Codon Präferenz um die Translationseffizienz zu maximieren [MORIYAMA & POWELL, 1998]. Um negative Effekte durch die Codon-Präferenz in *E. coli* zu minimieren, gibt es u.a. zwei Möglichkeiten: die Basen in den zu exprimierenden Genen so auszutauschen, daß möglichst bevorzugte Codons bei gleichbleibender Aminosäuresequenz entstehen. Die andere Möglichkeit besteht im Einfügen zusätzlicher Gene, damit mehr an fehlender tRNS transkribiert wird, etwa für tRNS^{Arg} [HANNIG & MAKRIDES, 1998].

Die verwendeten Codons beeinflussen die Stabilität der mRNS. Zur Analyse von Codon-Präferenzen und Aminosäuremustern wurden eine entsprechende Software entwickelt [MCINERNEY, 1998] und eine Datenbank aufgebaut, die Codon-Präferenzen von einer Vielzahl von Organismen enthält [NAKAMURA *et al.*, 1998].

Bei der Herstellung von DNS-Vaccinen in *E. coli* werden nicht die Codon-Präferenzen von *E. coli* herangezogen, sondern jene des Zielorganismus. Dadurch konnte bei der Impfung mit Codon-optimierter DNS von Mäusen eine deutlich höhere Immunantwort erhalten werden [ANDRE *et al.*, 1998]. Dieses Ergebnis ist für jegliche Gentherapie oder genetischer Vaccinierung von großer Bedeutung. Bei der Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wird der Codon-Präferenz ein eher moderater Einfluß auf die Produktion zugeordnet [SWARTZ, 1996].

2.3.3.3 Leserahmen

Bei einer gegebenen DNS-Sequenz gibt es drei Möglichkeiten die Sequenz in einem

Triplett-Raster zu lesen. Diese drei Leserahmen repräsentieren völlig unterschiedliche Proteine. Um das gewünschte Protein zu erhalten, muß sichergestellt sein, daß die Translation im richtigen Leserahmen beginnt. Dies bedeutet, daß das Start-Codon im Leserahmen mit dem Protein liegen muß. Bei einigen Vektorentwicklungen wird oft ein Set von drei Vektoren konstruiert, die es erlauben ein gewünschtes Gen in allen drei möglichen Leserahmen zu exprimieren oder es werden spezielle Ligationsmethoden entwickelt wie für den Vektor pGEX-5X [BAR-PELED & RAIKHEL, 1998] oder ein Vektor der in allen drei Leserahmen die Ligation mit *blunt ends* erlaubt [SETH *et al.*, 1989].

2.4 Maßnahmen auf Ebene der Proteine

Bei der fermentationsstechnischen Produktion von rekombinanten Proteinen oder bei der Nutzung von Stoffwechselleistungen durch rekombinante Proteine, sind nach der Proteinbiosynthese zwei Faktoren entscheidend: der Verlust an rekombinanten Protein, z. B. durch Proteolyse und der Anteil an biologisch aktivem Protein.

Die Menge eines Proteins wird durch dessen Stabilität beeinflusst. Dies bedeutet in erster Linie, wie schnell und wieviel des erzeugten Proteins wird durch Proteasen abgebaut. Durch Proteolyse können enorme Verluste entstehen, ja die Produktion eines rekombinanten Proteins kann unmöglich werden, wie im klassischen Fall der Produktion von Somatostatin, bei dem zum ersten mal ein synthetisches Gen verwendet wurde [ITAKURA *et al.*, 1977]. Somatostatin besteht aus wenigen Aminosäuren und konnte erst als Fusionsprotein mit β -Galactosidase isoliert werden, da es als kleines Peptid proteolytisch nach seiner Synthese sofort abgebaut wurde.

Was nützen die größten Mengen an rekombinanten Proteinn wenn der Anteil an biologisch aktivem Protein gering ist! Dies wird durch eine korrekte Faltung und durch die Bildung von Proteinaggregaten beeinflusst. Ein weiterer wichtiger Faktor sind die posttranslationalen Modifikationen. Falsch gefaltete Proteine zeigen meist niedrige oder gar keine biologische Aktivität. Posttranslationale Modifikationen, allen voran die Glykosilierung, kann für die biologische Aktivität essentiell sein. Da *E. coli* keine Glykosilierungen durchführen kann, sind diesem Organismus entsprechende Grenzen als Expressionssystem gesetzt. Irrtümer bei der Translation, die dem Einbau von falschen Aminosäure zur Folge haben, oder Abbrüche in der Elongation der Translation, führen zu nicht homogenen rekombinant Proteinen. Die Möglichkeit der Produktheterogenität ist vor allem bei pharmazeutischen Proteinen ein wichtiger Aspekt.

2.4.1 Proteolyse und ihre Reduzierung

Die Hydrolyse von Peptidbindungen ist eine zentrale metabolische Aktivität in Zellen. In *E. coli* finden sich mindestens 40 Enzyme mit proteolytischer Aktivität, die verschieden lokalisiert sind [MILLER, 1996, GOTTESMAN, 1996]. Mindestens 20 Proteasen befinden sich im Cytoplasma. Mehrere Proteasen sind an oder in die innerer Membran gebunden und sind u.a. Signalpeptidasen. Proteasen befinden sich auch im Periplasma. Eine Zusammenstellung einiger Proteasen in *E. coli* zeigt die Tabelle 2.4-1 [ENFORS, 1992, MILLER, 1996, GOTTESMAN & MAURIZI, 1992, GOTTESMAN, 1996].

Tabelle 2.4-1 Proteasen in *E. coli*

Lokalisierung in der Zelle	<i>E. coli</i> Proteasen
Cytoplasma	HtrA (Do, DegP), Re, Fa, So, Lon (La), Ci, RecA, Clp (Ti), Protease II, In
Innere Membran	Signalpeptidase I, Signalpeptidase II, Protease IV (SppA), Protease V
Periplasma	Ml, Prc (Re, Tsp), Pi (Protease III)
Äußere Membran	Protease V, Protease VI, OmpT (Protease VII)

Proteasen erfüllen in *E. coli* und allen anderen Organismen eine Reihe von wichtigen Aufgaben:

- ❖ Spaltung von Prä-Proteinen zur Aktivierung des Proteins im Zuge von posttranslationalen Modifikationen.
- ❖ Abspaltung von Signalsequenzen beim Durchgang eines Proteins durch eine Membran.
- ❖ Abbau von Proteinen im Rahmen der Stoffwechselregulation, um die Wirkung dieser Proteine zu inaktivieren.
- ❖ Abbau von abnormalen bzw. fehlerhaften Proteinen.

Kein Protein ist letztendlich resistent gegen Proteasen. Stabile Proteine in den Zellen haben Halbwertszeiten, die in der Größenordnung von mehreren Stunden liegen. Der rasche Abbau mancher Proteine ist Teil der Gesamtregulation der Zelle. Auch abnormale Proteine werden rasch abgebaut. Es scheint nun so, daß einige rekombinante Proteine von der Zelle wie abnormale Proteine behandelt werden und damit einem raschen Abbau unterliegen können, was zu entsprechend hohen Verlusten führen kann.

Beim Abbau von abnormalen Proteinen und somit auch rekombinanten Proteinen ist besonders die Protease Lon beteiligt. Dieses Enzym erfüllt in *E. coli* wichtige Aufgaben. Zum einen baut es eine Klasse von Proteinen ab, die als instabile Proteine produziert werden und hauptsächlich Regulationsfunktionen erfüllen [GOTTESMAN & MAURIZI, 1992], zum anderen ist Lon für den Abbau fehlerhafter oder eben abnormaler Proteine verantwortlich [GOTTESMAN, 1996]. Lon gehört zu den sogenannten Streßproteine, d. h. ein Proteine dessen Expression durch Streß induziert wird. Löst die Produktion rekombinanter Proteine Streß in den Zellen aus, wird die Synthese von Lon um ein mehrfaches erhöht. Dies führt zu einem entsprechenden Verlust an rekombinanten Protein aufgrund verstärkter Proteolyse durch Lon. Die Aufgabe abnormale und rekombinante Proteine im Periplasma abzubauen, erfüllt die Protease DegP [PARK *et al.*, 1999]. Sie wird dabei von der Protease OmpT unterstützt [BANEYX & GEORGIU, 1990]. Alle anderen proteolytisch aktiven Enzyme in *E. coli* spielen beim Abbau von rekombinanten Proteinen, eine untergeordnete Rolle, zumindest bevor die Zellen aufgeschlossen und freigesetzte Proteasen aktiv werden.

Maßnahmen zur Reduzierung des proteolytischen Abbaus rekombinanter Proteine sind einerseits Eingriffe, auch gentechnische, in die Aktivität der Proteasen, andererseits Veränderungen des rekombinanten Proteins selbst, um seine Halbwertszeit zu erhöhen. Auch die Art der Aufarbeitung kann einen großen Einfluß auf die Ausbeute an Protein haben.

1.1.1.1 Reduzierung der Proteolyse durch Beeinflussung der Proteasenaktivität

Eine Möglichkeit die Aktivität der Proteasen in *E. coli* zu reduzieren, ist die Erzeugung von protease-negativen Mutanten, also Mutanten, die keine Proteasen mehr bilden können. Echte proteasefreie Zellen können nicht existieren, da Proteasen an vielen essentiellen Stoffwechselaktivitäten beteiligt sind. Daher versteht man unter protease-negativen Mutanten, entweder Mutanten bei denen die Produktion von extrazellulären Proteasen ausgeschaltet wurde, wie bei einigen GRAM-positiven Mikroorganismen [WITTCHEM & MEINHARDT, 1995], oder Mutanten, bei denen die Produktion von speziellen intrazelluläre Proteasen unterbunden wird, wie im Falle von *E. coli*.

Daher ist es naheliegend Mutanten zu erzeugen, bei denen die Protease Lon nicht gebildet wird. Dabei kann es jedoch zu Problemen kommen. Die Protease Lon ist an der Regulation verschiedener Zellfunktionen beteiligt. Dazu gehört u.a. die Zellteilung. Lon-negative Stämme zeigen oftmals eine stark mucoide Morphologie sowie ein schlechteres Wachstum [FRIEHS & BAILEY, 1988]. Normalerweise kontrolliert Lon das

Protein SulA, das an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist. Durch zusätzliche Mutationen in eben jenem Protein lassen sich Stämme erzeugen, die auch ohne Protease Lon ein akzeptables Wachstum zeigen, die jedoch aufgrund der mucoiden Morphologie fermentationstechnische Probleme aufweisen [CHOI & LEE, 1997]. Der Abbau von rekombinanten Proteinen in Lon-negativen Stämmen ist nicht gleich Null, aber doch erheblich reduziert. Weniger problematisch sind DegP- bzw. OmpT-negative Stämme von *E. coli*. Solche Stämme wachsen ausreichend gut und können zur Hochzell-dichtefermentation verwendet werden [PARK *et al.*, 1999]. Interessant sind Stämme, bei denen mehrere Proteasen und einige Streßproteine ausgeschaltet wurden [GEORGIU & BANEYX, 1996]. Sie zeigen eine hohe Viabilität auch bei Überexpression.

Mutationen in einem Gen für ein Protein ohne proteolytische Aktivität können zur Reduzierung der Proteolyse führen. Anscheinend ist der proteolytische Abbau durch Lon bei manchen rekombinanten Proteinen an das Protein DnaK gekoppelt. Es wird vermutet, daß DnaK abnormale Proteine für Lon markiert [SHERMAN & GOLDBERG, 1992]. Andererseits kann die fehlende Kopplung eines rekombinanten Proteins an ein Faltungsprotein (Chaperon) zum schnelleren Abbau führen [SONEZAKI *et al.*, 1994].

Die Co-Expression von Proteaseinhibitoren kann ebenfalls zur Reduktion der proteolytischen Aktivität führen. Dies wurde durch das Gen *pin* für die Produktion eines labilen Proteins gezeigt [NOGUCHI & TAKAHASHI, 1991b]. Ähnliche Resultate können durch Expression von Antisense-RNS erzielt werden [YAMADA, 1989].

Da die Protease Lon ein sogenanntes Streßprotein ist, kann über diesen Aspekt versucht werden, die Proteolyse zu beeinflussen. So führte z. B. eine Mutation im σ -Faktor der Translation bei Streß zu einer Reduzierung der Proteolyse [ANDERS *et al.*, 1991]. Fermentationstechnische Maßnahmen, die die Auslösung von Streß in *E. coli* verhindern, sind ebenfalls adäquate Mittel zur Reduzierung der Proteolyse. Dies gilt bei Vermeidung von Substratlimitierungen [YANG & ENFORS, 1996] und optimaler Temperatur [KOSINSKI & BAILEY, 1991]. Andere beobachtete Einflüsse, wie etwa die Erhöhung der Ionenkonzentration durch Zugabe von Salz in das Medium, können ihren Ursachen nach noch nicht erklärt werden [JESPERS *et al.*, 1991].

2.4.1.1 *Reduzierung der Proteolyse durch Änderungen am rekombinanten Protein*

Wie schon am Beispiel Somatostatin gezeigt, kann ein Protein, das normalerweise stark der Proteolyse unterliegt, durch Fusion an einen geeigneten Partner, wie etwa der β -Galactosidase, proteolytisch stabilisiert werden. Viele andere Partner wurden

beschrieben [MURBY *et al.*, 1996]. Da die Halbwertszeit eines Proteins von den Aminosäuren am N-Terminus beeinflusst wird [BACHMAIR *et al.*, 1986] konnte durch Fusion mit speziellen Polypeptiden eine Erhöhung der Stabilität erreicht werden [STENGELIN *et al.*, 1994].

Die Lokalisierung des rekombinanten Proteins spielt bei der Proteolyse eine wichtige Rolle. Gelingt es durch Änderungen am Protein dieses in das Periplasma zu transportieren, so wird das Protein vor dem Angriff der cytoplasmatischen Proteasen, u.a. Lon, geschützt [BANEYX *et al.*, 1991]. Bei Verwendung von periplasmatisch protease-defizienten Stämmen, kann dann die Proteolyse im Periplasma weitgehend unterbunden werden [MEERMAN & GEORGIU, 1994].

Eine weitere Möglichkeit die Proteolyse zu reduzieren besteht darin, ein rekombinantes Protein als Proteinaggregat zu produzieren. Diese als *Inclusion Bodies* bezeichneten, im Cytoplasma ungelöst vorliegenden Aggregate sind gegen Proteasen weitgehend geschützt. Die Bildung von Proteinaggregaten kann u. U. durch z. B. Erhöhung der Temperatur [SCHEIN, 1989] oder durch Mutation in Chaperongenomen [GOLOUBINOFF *et al.*, 1989] begünstigt werden.

2.4.1.2 Reduzierung der Proteolyse während der Aufarbeitung

Nach dem Zellaufschluß kann es vorkommen, daß Proteine, die in der intakten Zelle proteolytisch stabil waren, nun durch Proteasen angegriffen werden [KÖHLER *et al.*, 1989]. Durch Reduzierung der Temperatur auf 4 °C wird dieser Effekt reduziert. Andere Möglichkeiten bestehen in der Zugabe von Proteasehemmern [MINTZ, 1993] oder Zugabe von Chelatbildnern, die die für aktive Proteasen notwendigen Metallionen binden [QUILES *et al.*, 1991]. Eine schnelle Überproduktion des rekombinanten Proteins mittels geeigneter Überexpressionssysteme mit anschließender sofortiger Isolierung wäre eine weitere Möglichkeit die proteolytischen Verluste zu reduzieren. Kontinuierliche Extraktion des Proteins in z. B. wässrigen Zwei-Phasen-Systemen zur raschen Abtrennung des Proteins von Zelltrümmern kann dies bewerkstelligen [VEIDE *et al.*, 1984].

2.4.2 Proteinfaltung

Entscheidend für die biologische Aktivität eines Proteins ist seine korrekte Faltung. Daher ist es nicht verwunderlich, wenn immer komplexere Faltungsmechanismen gefunden werden. Dabei wurden Proteine entdeckt, die die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen bzw. katalysieren. Solche Faltungsproteine werden als Chaperone bzw. Foldasen bezeichnet.

Die Aminosäuresequenz eines Proteins bestimmt seine Faltung. Seit langem versucht man Regeln zu finden, die die Sekundär- und Tertiärstruktur berechenbar machen [CHOU & FASMAN, 1978]. Dennoch ist es bis jetzt nicht möglich, bei gegebener Sequenz die räumliche Struktur eines Proteins vorauszusagen [MOULT, 1996]. Man hatte angenommen, daß die räumliche Anordnung eines Proteins dem Zustand der niedrigsten freien Energie entspricht und Proteine durch zufälliges Ausprobieren, die richtige Faltung erlangen. Doch es wurde schnell klar, daß ein solcher Faltungsvorgang immense Zeit erfordern würde, die die Zelle offensichtlich nicht aufwendet [LEVINTHAL, 1969]. Tatsächlich falten sich Proteine *in-vitro* in wenigen Sekunden. Wenn sich Proteine nicht nach dem Zufallsprinzip falten, muß es eine Art Soffwechselweg für die Faltung mit entsprechender Kinetik geben und es ist möglich, daß die korrekte Faltung eines Proteins nicht unbedingt die stabilste Faltung darstellt [CREIGHTON, 1992]. Die Erforschung der Faltungskinetik ist ein schwieriges Unterfangen, da Zwischenstadien der Proteine bei der Faltung kaum oder gar nicht isoliert und betrachtet werden können [CREIGHTON *et al.*, 1996].

In-vivo Proteinfaltung ist ein energieabhängiger Prozeß, der durch zwei Klassen von Faltungsmodulatoren beeinflusst wird. Molekulare Chaperone wie die Systeme DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES unterdrücken Faltungsreaktionen, die nicht den richtigen Pfad beschreiten und erleichtern dadurch die richtige Faltung. Dabei werden die Proteine in ATP-abhängigen Zyklen an die Faltungssysteme gebunden und korrekte Faltungszwischenstufen freigesetzt [JEFFREY *et al.*, 1997]. Faltungsenzyme wiederum beschleunigen die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Faltung, um instabile Zwischenformen möglichst schnell in die stabile korrekte Form zu bringen [JEFFREY *et al.*, 1997]. Dazu gehören die Isomerisierung von Peptid-Prolin-Bindungen durch Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-Isomerasen oder die Bildung und der Umbau von Disulfidbrücken mittels Disulfid-Oxidoreduktasen.

Ein Modell des Mechanismus des Systems DnaK-DnaJ-GrpE umfaßt verschiedene Schritte [MARTIN & HARTL, 1997]. DnaJ bindet an das ungefaltete Protein und ermöglicht dadurch die Bindung an DnaK. Dabei wird ATP in ADP umgewandelt und das Protein fest an den DnaJ-DnaK-Komplex gebunden. GrpE setzt nun ADP von diesem Komplex frei, wodurch die Konformation und somit Bindung beeinflusst wird. Bindet nun ATP wieder an DnaK, so wird DnaK und GrpE freigesetzt und das Protein wird frei gegeben. Wichtig ist hier hervorzuheben, daß in diesem System das Protein im ungefalteten Zustand verbleibt. In diesem ungefalteten, aber durch das System stabilen Zustand, kann es nun einem anderen System oder der Proteolyse zugeführt werden. Ein weiterer Zyklus im

DnaK-DnaJ-GrpE-System ist möglich. Die korrekte Faltung wird dadurch begünstigt, daß die Faltungskinetik beeinflußt wird.

Einen anderen Mechanismus zeigt das System GroEL-GroES. Die beiden an diesem System beteiligten Chaperone sind sehr große zylindrische Proteine. Hier werden ungefaltete Proteine an den GroEL-GroES-Komplex gebunden und unter Verbrauch von ATP in die gefaltete Struktur überführt. Dabei kann diese korrekte Faltung im Inneren der Chaperon-Zylinder erfolgen [MARTIN & HARTL, 1997].

Weitere Systeme sind in Eukaryonten bekannt [GILBERT, 1994].

2.4.2.1 Verbesserung der *In-vivo*-Faltung von Proteinen

Zur Verbesserung der *In-vivo*-Faltung sind u.a. drei Ansätze möglich: die Fermentationstechnik, der Austausch von Aminosäuren bzw. Fusionen und Änderungen der intrazellulären Konzentration an Faltungsmodulatoren [THOMAS *et al.*, 1997].

Aus *in-vitro* Experimenten ist bekannt, daß bei der Rückfaltung denaturierter Proteine eine niedrige Konzentration eine korrekte Faltung begünstigt. Diese Erkenntnis führte dazu, die Fermentationstechnik so zu verändern, daß die intrazelluläre Konzentration an rekombinanten Protein moderat ausfällt. Dies kann dadurch geschehen, daß die Überexpression nicht voll induziert wird.

Die Senkung der Wachstumstemperatur, kann zu einem höheren Anteil an korrekt gefaltetem Protein führen. Bei der Produktion von 5-Lipoxygenase aus Kartoffeln in *Escherichia coli* wurde zuerst bei 37 °C kultiviert. Vor der Induktion der Genexpression (IPTG-Zugabe) wurde die Temperatur auf 16 °C (!) gesenkt, wodurch die Bildung von Proteinaggregaten verhindert wurde [CHEN *et al.*, 1998]. Diese Maßnahmen reduzieren jedoch die Produktivität und können die korrekte Faltung nicht garantieren. Auch der pH-Wert und die Zusammensetzung des Mediums, sowie Begasung und Stammwahl können signifikanten Einfluß auf die Faltung nehmen. Durch Erhöhung des osmotischen Druckes, z. B. durch Zugabe von Polyolen, werden osmotisch relevante Schutzmoleküle vermehrt produziert, die ebenfalls einen stabilisierenden Einfluß auf die korrekte Faltung haben können [BLACKWELL & HORGAN, 1991]. Ein Grundsatz bei der Produktion von rekombinanten Proteinen gilt auch hier: Für jedes Protein muß die Produktion letztendlich individuell optimiert werden.

Änderungen in der Aminosäuresequenz können dramatische Einflüsse auf die Faltung haben [THOMAS *et al.*, 1997]. Bei Interferon- γ und Interleukin-1 β konnte dies gezeigt

werden. Um nun diese Erkenntnis für andere Proteine anzuwenden, ist die vorherige Bestimmung der Struktur und möglichst des Faltungsvorgangs notwendig. Auch muß bedacht werden, daß jede Änderung in der Aminosäuresequenz einer Mutation gleich kommt und dies vor allem für therapeutische Proteine ein echter Nachteil sein kann. Hinzu kommt wiederum die Schwierigkeit Proteinstrukturen vorherzusagen.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Fusion des Zielproteins mit einem Faltungsvermittlungspartner. Dazu gehören die kommerziell angebotenen Systeme Thioredoxin (Invitrogen), Gluthation-S-Transferase (Pharmacia), *Staphylococcus aureus*-Protein A (Pharmacia) und das Maltose-Bindeprotein (New England Biolabs). Dabei geht es vorrangig um die Aufrechterhaltung der Löslichkeit der Proteine, d.h. der Vermeidung der Bildung von Proteinaggregaten. Auch hier gilt jedoch: Abhängig vom Zielprotein können die Fusionen noch schwerer löslich ausfallen als das nicht fusionierte Protein.

Die am besten charakterisierten Faltungsmodulatoren im Cytoplasma von *E. coli* sind die bereits beschriebenen Systeme DnaK-DnaJ-GrpE und GroEL-GroES. Beide Systeme gehören zu den sogenannten Hitzeschock-Proteinen und sind normalerweise in geringen Konzentrationen vorhanden. Daher war es naheliegend einige dieser Chaperone gleichzeitig mit dem Zielprotein zu exprimieren, d.h. ein Co-Expressionssystem zu konstruieren. Tabelle 2.4-2 enthält einige Beispiele für eine höhere Ausbeute an korrekt gefalteten Zielprotein durch Co-Expression von Chaperonen bzw. Vektoren zur Co-Expression. In der Literatur werden weitere Beispiele diskutiert [THOMAS *et al.*, 1997, GEORGIU & VALAX, 1996].

Tabelle 2.4-2: Co-Expression von Chaperonen

Zielprotein	Co-exprimierte Chaperone	Referenz
Tumornekrosis Faktor α (human)	GroEL-GroES	JEONG <i>et al.</i> , 1997
Verschiedene Proteine, Vektoren zur Co-Expression	DnaK-DnaJ-GrpE	CASTANIE <i>et al.</i> , 1997
Verschiedene Proteine, Vektoren zur Co-Expression	GroEL-GroES	CASTANIE <i>et al.</i> , 1997
Wachstumshormon (human)	DnaK	BLUM <i>et al.</i> , 1992
Dihydrofolatreduktase (<i>S. aureus</i>)	GroEL	DALE <i>et al.</i> , 1994

2.4.2.2 Proteinaggregate (Inclusion Bodies, IB)

Eine Besonderheit bei der Produktion von rekombinanten Proteinen ist die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, bekannt unter der englischen Bezeichnung *Inclusion*

Bodies.

Die Bildung von *Inclusion Bodies* korreliert wahrscheinlich nicht mit molekularen Proteineigenschaften wie Länge der Kette, Aufteilung in Untereinheiten oder Hydrophobizität [LILIE *et al.*, 1998]. Proteine mit Disulfidbrücken hingegen neigen im Cytoplasma zur Aggregation aufgrund des dort herrschenden reduzierenden Milieus [OLIVER, 1996].

Einfluß auf die Bildung von *Inclusion Bodies* kann die Konzentration des Proteins haben. Überexpression von Proteinen, auch arteigenen, kann zu *Inclusion Bodies* führen. Es gibt jedoch Beispiele von Überexpression, bei denen das Protein löslich bleibt [KIEFHABER *et al.*, 1991].

Bezogen auf die Produktivität können *Inclusion Bodies* ein Nachteil oder ein Vorteil sein. Der Nachteil besteht darin, daß *Inclusion Bodies* biologisch nicht aktiv sind. Sie müssen nach ihrer Isolierung durch drastische Methoden denaturiert und anschließend in der korrekten Faltung renaturiert werden. Dies kann zu großen Verlusten und zu signifikanten Heterogenitäten im Produkt führen. Deshalb versucht man die Bildung von *Inclusion Bodies* eher zu vermeiden.

Einen Vorteil haben *Inclusion Bodies* z. B. dann, wenn das Zielprotein anfällig für Proteolyse ist. *Inclusion Bodies* werden durch Proteasen kaum angegriffen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Aufarbeitung. Durch ihren denaturierten Zustand können *Inclusion Bodies* bei höheren Temperaturen und mit viel höherer Scherstreßbelastung isoliert werden. Sie sind durch Zentrifugation sowohl von den Zelltrümmern als auch vom Cytoplasma leicht zu trennen. Diese Vorteile können, wenn eine gute Methode für die Renaturierung entwickelt wurde, die Nachteile überwiegen. Wie immer muß dies von Protein zu Protein und Expressionssystem zu Expressionssystem individuell untersucht und optimiert werden.

Die Maßnahmen, mit denen Bildung von *Inclusion Bodies* beeinflusst werden können, entsprechen den Maßnahmen zur Verbesserung der *In-vivo*-Faltung von Proteinen. Diese wurden bereits beschrieben. Zu ergänzen wäre hier die Tatsache, daß der Stamm die Bildung von *Inclusion Bodies* ebenfalls beeinflussen kann [HOCKNEY, 1994].

Die Renaturierung von *Inclusion Bodies* ist ein eigenständiges Forschungsgebiet. Unzählige Veröffentlichungen befassen sich mit der Optimierung dieses Vorgangs. Die *Inclusion Bodies* müssen nach ihrer Isolierung aufgelöst werden. Dies gelingt z. B. durch Einsatz von chaotropen Agenzien wie Harnstoff in hohen Konzentrationen. Nach der

Lösung liegen die Proteine ungefaltet vor. Aufwendige Verfahren sind notwendig um diese ungefalteten Proteine in die biologisch aktive, d.h. korrekt gefaltete Struktur zu überführen. Verschiedene Maßnahmen können hier zu deutlichen Steigerungen am Anteil korrekt gefalteter Proteine führen. Es können hier z. B. die bereits beschriebenen Chaperone *in-vitro* eingesetzt werden, wie z. B. Zugabe von GroEL in das Faltungsmedium [THOMAS *et al.*, 1997]. Da die Proteine genügend Raum für ihre Faltung brauchen, speziell wenn Disulfidbrücken gebildet werden müssen, werden die gelösten Proteine vor der Rückfaltung stark verdünnt. Dies kann dann z. B. dazu führen, daß der Produktionsreaktor für rekombinantes Insulin ein Volumen von 35 m³ aufweist, der Rückfaltungskessel jedoch 73 m³ an Volumen umfaßt [PETRIDES *et al.*, 1995].

2.4.3 Posttranslationale Modifikation

Einige Proteine müssen zum Erlangen ihrer biologischen Aktivität modifiziert werden. Diese sogenannten posttranslationalen Modifikationen umfassen eine Anzahl von Mechanismen. Dazu gehören die Abtrennung von Signal- oder Prä-Sequenzen oder die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung durch Kinasen bzw. Phosphatasen. Eine besonders wichtige posttranslationale Modifikation ist die Glykosilierung, d.h. die kovalente Bindung von Zuckermolekülen an das Protein. Es werden verschiedene Arten von Glykosilierungen unterschieden, wie etwa der Mannose-Typ oder der komplexe Typ. Bei Glykoproteinen höherer Eukaryonten wird der komplexe Typ gefunden [JARVIS *et al.*, 1998]. Einige therapeutisch interessante, rekombinant herstellbare Proteine, wie etwa Erythropoietin, müssen glykosiliert werden, damit sie biologisch aktiv sind. Diese Proteine können in *E. coli* nicht produziert werden, da *E. coli* nicht glykosilieren kann. Für diese Proteine wurden die bedeutend teureren Verfahren zur Kultivierung von Säugerzellen entwickelt [WRIGHT & MORRISON, 1997]. Anders liegt der Fall bei Antikörpern. Zur Produktion vollständiger Antikörper werden Zellkulturen benötigt, da vollständige Antikörper glykosiliert sind. Werden jedoch die variablen Domänen z. B. für die Entwicklung von Diagnoseverfahren benötigt, können diese, da nicht glykosiliert, auch von *E. coli* produziert werden [PLÜCKTHUN, 1991, DOOLEY *et al.*, 1998].

2.4.4 Produktheterogenität

Ein anderer Aspekt bei der Frage nach der biologischen Aktivität sind Proteine mit fehlerhafter Aminosäuresequenz. Solche Fehler können bei der Translation immer wieder auftreten und führen zu einer mehr oder weniger großen Heterogenität des rekombinanten Produkts [SANTOS & TUIE, 1993]. Aber nicht nur Translationsirrtümer, auch Fehler bei der Faltung und den posttranslationalen Modifikationen können zu

falschen Proteinen führen [JENKINS, 1996]. Vor allem bei der Produktion von therapeutischen rekombinanten Proteinen können solche Translationsfehler zu Problemen führen, da hier eine besonders hohe Homogenität gefordert ist [ROSENBERG & HOLLIDAY, 1993]. Stämme mit hoher Translationsgenauigkeit, entsprechende Codon-Präferenz und optimalen Bedingungen für die *In-vivo*- bzw. *In-vitro*-Faltung von Proteinen können den heterogenen Anteil auf akzeptable Maße reduzieren [KURLAND & GALLANT, 1996]. Der Einbau falscher Aminosäuren bzw. der vorzeitige Abbruch der Elongation von Proteinketten [BALBAS & BOLIVAR, 1990], beides verursacht durch Substratlimitierungen bei Hochzellichtefermentationen, können durch optimierte Zufütterungsstrategien verhindert werden.

Ein spezieller Fall unkorrekter Aminosäuresequenz ist der Methioninrest am N-Terminus. Rekombinante Proteine, die in *E. coli* produziert werden, enthalten aufgrund des bakteriellen Translationsmechanismus, meist ein Methionin am N-Terminus. Dies bedeutet, daß in Fällen eukaryontischer Proteine die Authentizität des N-Terminus nicht gegeben ist, was für therapeutische Proteine ein Problem darstellen kann. Ein zusätzliches Methionin kann zu falschen Faltungen führen oder nach Oxidation bei hohem pH-Wert und aeroben Bedingungen immunologische Reaktionen auslösen. Wenn das rekombinante Protein in das Periplasma transportiert wird, wird das unerwünschte Methionin zusammen mit der Signalsequenz abgespalten. Dies gilt auch für Proteine, die über einen N-terminalen Fusionspartner, z. B. für die anschließende erleichterte Aufarbeitung verfügen, der im Laufe der Reinigung abgespalten wird (siehe Kapitel 2.6). In den Fällen jedoch, in denen ein authentischer N-Terminus gefordert wird, muß das Methionin gezielt entfernt werden. Dies kann enzymatisch durch Verwendung einer Methionin-Aminopeptidase erfolgen [BEN-BASSAT *et al.*, 1987].

2.5 Maßnahmen zur Lokalisierung rekombinanter Produkte

Die Lokalisierung rekombinanter Produkte in bzw. außerhalb der Zelle hat großen Einfluß auf die Produktivität und Kosten des Herstellungsverfahrens. Am deutlichsten wird dies bei der Aufarbeitung von Produkten. Prinzipiell können die Produkte in der Zelle akkumulieren oder in das Medium ausgeschieden werden. Liegen die Produkte in der Zelle vor, so müssen diese aufgebrochen werden. Bei Zellaufschlüssen werden die gesamten Zellinhaltsstoffe freigesetzt, die die Isolierung und Reinigung des Zielproduktes

erheblich erschweren und somit verteuern können. Daher ist es in der Fermentationstechnik ein allgemeines Ziel Produkte im Medium in möglichst hohen Konzentrationen zu akkumulieren. Die folgenden Betrachtungen werden für rekombinante Proteine durchgeführt, da Proteine ökonomisch gesehen zur Zeit die wichtigsten rekombinanten Produkte darstellen. Die Überlegungen zur Erleichterung der Aufarbeitung von Produkten gelten grundsätzlich auch für andere Produkte wie z. B. Primär- (Ethanol) oder Sekundärmetabolite (Penicillin), die mit rekombinanten Organismen hergestellt werden können.

In der Biotechnologie werden verschiedene Expressionssysteme zur Sekretion von rekombinanten Proteinen verwendet. Für die Produktion korrekt glykosilierter Proteine werden Zellkulturen eingesetzt, die die rekombinanten Proteine auf dem normalen Weg sekretieren. Zellkulturen haben sehr geringe Wachstumsraten, sind anfällig gegenüber Kontaminationen und meistens finanziell sehr aufwendig. Sie werden dann eingesetzt, wenn für das Produkt ein entsprechend hoher Preis am Markt erzielt werden kann [FUSSENEGGER *et al.*, 1999].

Hefen oder Schimmelpilze werden seit langem in der Fermentationstechnik eingesetzt und können rekombinante Proteine sekretieren. Neben den, verglichen mit Bakterien, ebenfalls deutlich geringeren Wachstumsraten, können bei diesen Systemen jedoch Probleme auftreten, wie etwa die Proteasenbildung bei *Aspergillus niger* [VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997] oder geringe oder gar keine Expression, wie von *Saccharomyces cerevisiae* bekannt ist [MENDOZA-VEGA *et al.*, 1994]. Hefen zeigen neben genetischen Instabilitäten weitere Nachteile durch lange Induktions- und Wachstumszeiten [ELDIN *et al.*, 1997]. Auch treten Schwierigkeiten auf, wenn ein guter Sekretionsstamm vom Schüttelkolben in den industriellen Maßstab übertragen werden soll [HENSING *et al.*, 1995]. Neben geringerer Wachstumsgeschwindigkeit zeigen Schimmelpilze niedrigere Produktivitäten [PEBERDY, 1994]. Es soll hier jedoch nicht verschwiegen werden, daß es einige vielversprechende Ansätze gibt, besonders Hefen als starke, leicht im großen Maßstab anzüchtbare, sekretorische Expressionssysteme zu etablieren [SUDBERY, 1996].

Bakterielle Expressionssysteme zeichnen sich durch eine hohe Wachstumsgeschwindigkeit, niedrige Nährstoffansprüche und hohe Kapazitäten der Proteinsynthese aus. Sekretorische GRAM-positive Expressionssysteme wie z. B. *Bacillus licheniformis*, sind die Voraussetzung für eine ökonomische Produktion von Enzymen für z. B. die Waschmittelindustrie [ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998]. Daher wären GRAM-positive Bakterien bestens geeignet rekombinante Proteine herzustellen und zu

sekretieren. Durch extra- und intrazelluläre Proteasen kommt es jedoch zu hohen Verlusten [FREUDL, 1992] und gentechnische Veränderungen können sehr instabil sein [NICAUD *et al.*, 1986]. Heterologe rekombinante Proteine zeigen in *Bacilli* außerdem bei weitem keine so hohe Sekretionskompetenz, wie die natürlich sekretierten Proteine. Falsche Faltungen führen zu niedrigen Anteilen an biologisch aktiven Produkten, speziell bei Proteinen mit Disulfidbrücken [BRAUN *et al.*, 1999]. Auch hier gilt jedoch, daß mit zunehmender Kenntnis über *Bacillus* signifikante Verbesserungen zu erwarten sind. Das Genom von *Bacillus subtilis* liegt vollständig sequenziert vor [KUNST *et al.*, 1997] und wird zur Erforschung der Sekretionsengpässe genutzt. Zur Herstellung von natürlicherweise sekretierten rekombinanten industriellen Enzymen werden Expressionssysteme des jeweiligen Organismus bzw. nahe Verwandte eingesetzt.

Escherichia coli verfügt, wie anschließend dargestellt wird, über verschiedene Sekretionspfade, die mehr oder weniger für die Sekretion von rekombinanten Proteinen genutzt werden können.

Da die erfolgreiche Sekretion von rekombinanten Proteinen sehr mit den individuellen Eigenschaften jedes Proteins verknüpft ist, werden sich die verschiedenen Sekretionssysteme von Zellkulturen, Pilzen, Hefen und verschiedenen Bakterien, in Zukunft nebeneinander etablieren und jedes für sich für spezifische Expressionen als geeignete Methode der Wahl zur Verfügung stehen [QUAX, 1997].

2.5.1 Lokalisierung rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein GRAM-negatives Bakterium. Dies bedeutet, daß für die Lokalisierung von rekombinanten Proteinen verschiedene Kompartimente in Frage kommen. Das Cytoplasma wird von der inneren Membran umschlossen. Das sich daran anschließende Periplasma ist der Raum zwischen der inneren Membran und der äußeren Membran. Im Periplasma befindet sich der Murein-Sacculus. Auf die äußere Membran folgt das die Zelle umgebende Medium, das hier ebenfalls als Kompartiment bezeichnet werden soll. Die für die Produktion von rekombinanten Proteinen wichtigen Kompartimente sind somit das Cytoplasma, das Periplasma und das Medium. Das Periplasma enthält 4–8 % des Gesamtzellproteins [HOLLAND *et al.*, 1990], umfaßt jedoch 30-40% des Zellvolumens [OLIVER, 1996].

Je nachdem in welchem Kompartiment von *E. coli* sich rekombinante Proteine befinden, gibt es bezüglich der Produktion biologisch aktiver Proteine Vor- und Nachteile. Diese werden in der Tabelle 2.5-1 zusammengefaßt.

Tabelle 2.5-1: Vor- und Nachteile verschiedener Kompartimente in *E. coli*

Kompartiment	Vorteile	Nachteile
Cytoplasma	Bildung von <i>Inclusion Bodies</i> Leichtere Isolierung Schutz vor Proteasen Expression wirtstoxischer Proteine möglich Höhere Proteinausbeute möglich Einfachere Konstruktion von Expressionsplasmiden Geringe Volumina aufzuarbeiten	Bildung von <i>Inclusion Bodies</i> Geringere Ausbeute an biologisch aktiven Protein Höhere Kosten Schlechte Bildung von Disulfidbrücken Methionin am N-Terminus Proteolyse Reinigung sehr aufwendig
Periplasma	Reinigung einfach bei optimalen Aufschluß des Periplasma Proteolyse geringer Authentischer N-Terminus Verbesserte Faltung Gute Bedingungen für Disulfidbrücken	Bildung von <i>Inclusion Bodies</i> möglich Transport funktioniert nicht generell
Medium	Reinigung sehr einfach Geringste Proteolyse Verbesserte Faltung Authentischer N-Terminus	Große Volumina aufzuarbeiten Sekretion funktioniert nicht generell Proteine u. U. instabil in stark belüfteten Kultivierungen

2.5.2 Sekretionstypen in GRAM-negativen Bakterien

Die Sekretion von Proteinen ist ein universaler zellulärer Prozeß. Der Transport eines Proteins durch eine Membran kann cotranslational oder posttranslational erfolgen. In Eukaryonten erfolgt der erste Transport in das *Endoplasmatische Reticulum* cotranslational durch einen erstaunlich einfachen Prozeß. Die Signalsequenz des entstehenden Proteins wird durch Proteine, sogenannte *signal recognition particles* (SRP), erkannt, die die Signalsequenz markieren. Der eigentliche Transport wird anschließend durch zwei membranständige Proteine Sec61p und TRAM ermöglicht [JUNGNICKEL *et al.*, 1994]. In Prokaryonten finden sich hauptsächlich posttranslationale Sekretionswege.

In der Literatur werden verschiedene Sekretionspfade in GRAM-negativen Bakterien beschrieben, die in Sekretionstypen eingeteilt werden. Manche Autoren unterscheiden bis

zu 6 verschiedene Typen [BLIGHT *et al.*, 1994]. Die Unterscheidung der Typen erfolgt hauptsächlich darin, ob das Protein zuerst in das Periplasma transportiert und dann von da aus in das Medium sekretiert wird, oder ob das Protein direkt aus dem Cytoplasma in das Medium ausgeschleust wird.

Sekretionstyp I

Beim Sekretionspfad vom Typ I wird das Protein direkt vom Cytoplasma in das Medium ausgeschleust. Es ist noch nicht ganz klar welche Form das Protein bei dieser 1-Schritt-Sekretion inne hat. Es wird jedoch vermutet, daß das Protein in einer ungefalteten Zwischenstruktur translociert wird [SANKVIST & BAGDASARIAN, 1996].

In *Escherichia coli* wird das Protein Hämolyisin (*hlyA*) mittels eines Sekretionspfades dieses Typs in das Medium exportiert. Die essentielle Gene für diesen Export sind *hlyB*, *hlyD* und *tolC* [BLIGHT & HOLLAND, 1994]. Das Protein HlyB ist auf der Cytoplasmaseite der inneren Membran lokalisiert und gehört zur Familie der bakteriellen ABC-Transporterproteine (*ATPase-binding-casette*) [WANDERSMAN, 1998]. Dieses Protein erkennt die C-terminale Signalsequenz von Hämolyisin und öffnet quasi die innere Membran für das Protein. Diese Sequenz wird beim Export nicht abgetrennt, wie üblicherweise N-terminale Signalsequenzen. HlyD überbrückt das Periplasma und bildet einen Exportkanal zwischen der inneren und äußeren Membran. TolC ist ein Membranprotein. Es ist in der äußeren Membran verankert und bildet das Exporttor für Hämolyisin. Für den Export des Hämolyisin benötigt die Zelle drei Proteine. Hämolyisin ist ein Toxin. Den *E. coli* Stämmen K12 und B, die die Ausgangsstämme für Expressionsstämme in der Gentechnik und Fermentationstechnik sind, wurde dieses Sekretionssystem entfernt.

Auch bei anderen Mikroorganismen wurden Mechanismen gefunden die dem Hly-System in *E. coli* ähnlich sind [BLIGHT & HOLLAND, 1994]. Diese funktionieren zum Teil in *E. coli* und sind somit Kandidaten für die Entwicklung eines Sekretionssystems.

Sekretionstyp II

Dieser Sekretionspfad wird als der generelle Sekretionspfad (*general secretion pathway*, GSP) bezeichnet. Die zu sekretierenden Proteine werden mit einer amino-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Diese Signalsequenz wird von den Transportkomponenten erkannt und das Protein ungefaltete in das Periplasma transportiert. Danach wird das

Protein im Periplasma gefaltet und im gefalteten Zustand in das Medium sekretiert.

Am Transport in das Periplasma sind eine Reihe von Proteinen, die als Sec-Proteine bezeichnet werden, beteiligt. Dies sind SecA (PrID), SecB, SecD, SecE (PrIG), SecF, SecG und SecY (PrIA) [PUGSLEY, 1993, MURPHY & BECKWITH, 1997, DANESE & SILHAVY, 1998]. Der erste Schritt beim Transport eines Proteins in das Periplasma ist die Stabilisierung einer transportkompatiblen Konformation. Dazu lagert sich SecB an die Signalsequenz an und stabilisiert, vergleichbar mit einem Chaperon-System wie etwa dem DnaK-DnaJ-GrpE System, das ungefaltete Protein. Dieser SecB-Protein Komplex wechselwirkt mit SecA, das nun die Anlagerung des Komplexes an die Transportorte der inneren Membran, die durch SecE, secG und SecY gebildet werden, ermöglicht. SecA ist für den Transport essentiell und liefert durch seine ATPase-Aktivität die notwendige Energie. SecD, ein Membranprotein, das stark in das Periplasma hineinreicht, ist vermutlich an den Prozessen direkt nach dem Transport beteiligt. Wird SecD blockiert kann es vorkommen, daß rekombinante Proteine nicht vollständig transportiert oder inkorrekt gefaltet werden [MURPHY & BECKWITH, 1997]. Die Signalsequenzen werden durch Signalpeptidasen, von denen in *E. coli* mindestens zwei bekannt sind (Lep & LspA), an der periplasmatischen Seite der inneren Membran abgespaltet. Einen Überblick über Proteine, die am Transport in das Periplasma beteiligt sind, gibt Tabelle 2.5-2.

Tabelle 2.5-2: Am Transport in das Periplasma beteiligte Proteine

Protein	Ort	Funktion	Essentiell
Lep	Membranaußenseite, integriert	Signalpeptidase	ja
Lsp	Membranaußenseite, integriert	Signalpeptidase	ja
SecA	Cytoplasma und Membraninnenseite	Bindung an die Membran, Energieübertragung	ja
SecE	Membraninnenseite, integriert	Beteiligt am Sekretionsort / -kanal	ja
SecY	Membraninnenseite, integriert	Beteiligt am Sekretionsort / -kanal	ja
SecB	Cytoplasma	Stabilisierung ungefalteter Proteine	nein
SecD	Membraninnenseite, integriert, ragt ins Periplasma	Beteiligt an der Ablösung des Proteins	nein
SecF	Membraninnenseite, integriert, ragt ins Periplasma	Beteiligt am Sekretionsort / -kanal	nein
SecG	Membraninnenseite, integriert	Beteiligt am Sekretionsort / -kanal	nein

Unabhängig von SecB können Proteine direkt mit SecA wechselwirken. Dies gilt für Proteine, deren Faltungsvorgang relativ langsam verläuft und die somit in einer transportkompatiblen Konformation verbleiben. Dies wird durch direkte Interaktion des entstehenden Proteins mit den Transportorten der inneren Membran erreicht [MURPHY & BECKWITH, 1997]. Sec-unabhängiger Transport kann mittels *signal recognition particle* cotranslational erfolgen [FILLOUX *et al.*, 1998].

Nach dem Transport in das Periplasma erfolgt die Faltung der Proteine [WÜLFING & PLÜCKTHUN, 1994a]. Dies kann spontan und unabhängig geschehen. Es wurden jedoch im Periplasma spezifische Faltungsenzyme gefunden. Chaperone kontrollieren, wie im Cytoplasma, Protein-Protein Wechselwirkungen, während Faltungsenzyme Faltungsvorgänge katalysieren. Das Periplasma von *E. coli* ist oxidierend und begünstigt dadurch die Bildung von Disulfidbrücken. Die korrekte Bildung der Disulfidbrücken wird durch das Protein DsbA, einer Disulfid-Oxidoreduktase, katalysiert. DsbA wird dabei reduziert und von DsbB reaktiviert. Ein anderes Enzym, die Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-Isomerase, katalysiert die *cis-trans* Isomerisierung von Aminosäuren-Prolin Peptidbindungen [LIU & WALSH, 1990]. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakter der Peptidbindung kann das benachbarte Carbonylatom bzw. Wasserstoffatom der beteiligten Aminogruppe entweder *cis* oder *trans* zueinander stehen. Bei fast allen Peptidbindungen stehen sie in *trans*-Stellung. Die Ausnahmen ergeben sich bei Peptidbindungen des Prolins mit anderen Aminosäuren. Aufgrund der besonderen Struktur von Prolin können beide Stellungen eingenommen werden. Da die Interconversion von *cis/trans* ein relativ langsamer Vorgang ist, kann es hier zu Fehlern in der Faltung kommen. Die Isomerase katalysiert wahrscheinlich die richtige Konformation und es ist nicht verwunderlich, daß eine derartige Isomerase in allen bis jetzt untersuchten Organismen gefunden wurde.

Universelle Chaperone wurden im Periplasma bis jetzt nicht gefunden. Es gibt aber spezielle Chaperone für bestimmte Proteine. So wird vermutet, daß das Protein Skp ein Chaperon für die Omp-Proteinfamilie (*Outer Membrane Protein*) ist [DANESE & SILHAVY, 1998]. Für eine Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde ein anders spezifisches Chaperon, genannt LipB, gefunden [GERRITSE *et al.*, 1998].

Der nächste Schritt bei der Sekretion von Proteinen nach Typ II ist der Durchgang des gefalteten Proteins durch die äußere Membran in das Medium. In *Escherichia coli* stellt die äußere Membran für Proteine eine fast unüberwindliche Barriere dar. Es sind jedoch Ausnahmen bekannt, vor allem bei Überexpression des rekombinanten Proteins [RIETHDORF *et al.*, 1990]. Wie später gezeigt wird, können Maßnahmen ergriffen werden,

die es erlauben rekombinante Proteine aus dem Periplasma in das Medium freizusetzen. Eine der Möglichkeiten besteht in der Übertragung eines Sekretionstyp II eines anderen Organismus auf *E. coli*. So ein Sekretionspfad wäre das Pullulanase-System von *Klebsiella* [TAKIZAWA *et al.*, 1991, POSSOT *et al.*, 1997]. Der zweite Schritt im Typ II Sekretionspfad wird als *main terminal branch* (MTB) des *general secretory pathway* (GSP) bezeichnet.

Pseudomonas aeruginosa verfügt über ein MTB-System, genannt Xcp-System, an dem bis jetzt 12 Komponenten identifiziert wurden, XcpA und XcpP-XcpZ. XcpA ist eine Peptidase; XcpR bindet ATP. Die anderen Proteine der Xcp-Familie sind in der Membran lokalisiert und mehr oder weniger essentiell an der Bildung des Sekretionskanals beteiligt. Es wird ein weiteres Protein postuliert, eventuell ein periplasmatisches Chaperon, daß das gefaltete Protein der Sekretionsmaschinerie zuführt [FILLOUX *et al.*, 1998]. Folgende MTB-Systeme wurden bisher gefunden [RUSSEL, 1998]:

Klebsiella oxytoca (*pul*),

Pseudomonas aeruginosa (*xcp*),

Erwinia chrysanthemi bzw. *carotovora* (*out*),

Xanthomonas campestris (*xps*),

Aeromonas hydrophila (*exe*) und

Vibrio cholerae (*eps*).

Ein zweites Typ II System (*sps*), notwendig für die Positionierung des S-Layer auf der Zelloberfläche in *A. hydrophila*, ähnelt genetisch mehr den *X. campestris* als den *A. hydrophila* Genen. Eine große Überraschung war die Entdeckung eines kompletten Sets von Genen eines MTB-Systems in *Escherichia coli*, die offensichtlich unter Laborbedingungen ausgeschaltet sind [PUGSLEY & FRANČETIC, 1998]. Es ist zu erwarten, daß sowohl der Mechanismus dieses Systems als auch seine Induktion bald aufgeklärt sein werden und dann zur Konstruktion eines neuen Sekretions-Expressionssystems genutzt werden können.

Es wurde ein von Sec-Proteinen unabhängiger Mechanismus gefunden, der jedoch für die Integration von Proteinen in die innere Membran genutzt wird und für die Sekretion von rekombinanten Proteinen (noch) keine Rolle spielt [VON HEIJNE, 1994].

Sekretionstyp III

Proteine, die diesen Sekretionspfad nutzen, werden direkt aus dem bakteriellen

Cytoplasma in das Cytosol eukaryontischer Zellen injiziert und lösen dort pathogene Mechanismen aus [GALAN & COLLMER, 1999]. Typ III Sekretionssysteme werden durch bakteriellen Kontakt mit der eukaryontischen Zelloberfläche aktiviert und übertragen artspezifisch eine Reihe von unterschiedlichen Proteinen, die für die Ausbildung des jeweiligen pathogenen Phänotyps verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu sind die 15 bis 20 membranassoziierten Proteine, die den Typ III Apparat bilden, hoch konserviert [HUECK, 1998]. Die Gene finden sich in Clustern was auf einen horizontalen Gentransfer während der Evolution schließen läßt. Strukturell konservierte Chaperone spielen eine wichtige Rolle beim Typ III. Die Expression der Komponenten des Typ III Sekretionssystems wird gemeinsam durch die Stimulierung durch die eukaryontische Zelle reguliert [HUECK, 1998].

Typ III Sekretionssysteme finden sich in den tierpathogenen Bakterien *Yersinia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, enteropathogenes *Escherichia coli* und *Chlamydia* spp. sowie in den pflanzenpathogenen Bakterien *Pseudomonas syringae*, *Erwinia* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* und *Rhizobium* spp. [HUECK, 1998].

Sekretionstyp IV

Der erste Schritt, der Transport durch die innere Membran, nutzt die Sec-Komponenten des Typ II Sekretionssystems. Das Protein bleibt jedoch in einer Konformation, die zum Unterschied zum Typ II nicht der endgültigen Struktur entspricht. Proteine, die den Typ IV nutzen, haben am C-Terminus eine Sequenz, die es dem Protein erlaubt, ohne zusätzliche Exportproteine durch die äußere Membran zu gehen. Das Protein bleibt zuerst an der Zelloberfläche verankert und löst sich dann vom C-Terminus ins Medium [CHINA & GOFFAUX, 1999].

Eine Serinprotease von *Serratia marcescens* [OHNISHI & HORINOUCI, 1996] und eine IgA-Protease von *Neisseria gonorrhoeae* nutzen einen Typ IV Pfad. Der C-Terminus der Pre-IgA-Protease integriert in die Membran und translociert dabei den N-Terminus an die Zelloberfläche. Durch einen autoproteolytischen Prozeß spaltet sich die nun korrekt gefaltete IgA-Protease ab und gelangt ins Medium [BLIGHT *et al.*, 1994]. Weitere Typ IV Transportersysteme wurden gefunden und werden untersucht [BURNS, 1999].

Sekretionstyp V

Der Mechanismus des Sekretionstyp V wird z. B. von *E. coli* P-pilin genutzt. Die Ausbildung von Pilis erfolgt in zwei Schritten mit einem gefalteten Protein im Periplasma.

Mindestens drei Proteine inklusive PapC werden, für die Sekretion benötigt. Über diesen Pfad ist noch wenig bekannt.

Sekretionstyp VI

Die Sekretion von Phagenpartikeln ist mengenmäßig das effizienteste Proteinsekretionssystem in Bakterien. *Escherichia coli* sekretiert z. B. 10% seines Gesamtzellproteins an M13 Hüllprotein. Die Strukturen, die diese Sekretion ermöglichen, kodieren auf der Phagen-DNS. Der letzte Schritt beinhaltet die Ausbildung großer Poren wie z. B. beim Phagen F1 [KAZMIERCZAK *et al.*, 1994]. Das System erlaubt es, rekombinante Proteine auf der Zelloberfläche zu präsentieren [MARCIANO *et al.*, 1999].

Die Gene aller Sekretionstypen von I-VI von verschiedenen Mikroorganismen wurden auf *Escherichia coli* übertragen. Daraus ergaben sich Möglichkeiten rekombinante Proteine einerseits in das Periplasma zu transportieren und anschließend in das Medium zu sekretieren, aber auch direkt aus dem Cytoplasma in das Medium zu exportieren. Einige rekombinante Proteine werden von *E. coli* sekretiert, ohne dass die Ursachen geklärt sind. In den nächsten Abschnitten dieses Kapitels wird diskutiert, welche Maßnahmen ergriffen werden können, um rekombinante Proteine verstärkt im Periplasma zu akkumulieren, dann zu sekretieren bzw. zu exportieren. Das rekombinante Protein kann verändert werden z. B. durch Fusion an eine Signalsequenz, natürliche Sekretionspfade in *Escherichia coli* können verstärkt werden und Sekretionskomponenten anderer Organismen können auf *E. coli* übertragen werden.

2.5.3 Maßnahmen für den Transport rekombinanter Proteine in das Periplasma von *E. coli*

Alle zweistufigen Sekretionspfade sind dafür geeignet, Proteine im Periplasma zu akkumulieren. Der erste Schritt des Typ II Sekretionspfades ist der wichtigste. Die dafür notwendigen Voraussetzungen für einen erfolgreichen Transport in das Periplasma sind eine Signalsequenz am N-Terminus des Proteins, ein funktionierendes Sec-Protein-Ensemble, die prinzipielle Transportkompatibilität des Zielproteins und entsprechende Komponenten für eine korrekte Faltung im Periplasma. Eine Überexpression von rekombinanten Proteinen und deren Akkumulation im Periplasma kann zum spontanen Aufbrechen der äußeren Membran und zum Zelltod führen [SWARTZ, 1996].

2.5.3.1 Maßnahmen über die Signalsequenz

Untersuchungen haben gezeigt, daß es allgemeine Charakteristika von Signalsequenzen

gibt. Je nach Art der 20-40 beteiligten Aminosäuren [OLIVER, 1987], haben die verschiedenen Abschnitte der Signalsequenz verschiedene Eigenschaften und Aufgaben. Das Aminoende (in *E. coli* 5-6 Aminosäuren) ist positiv geladen und erhöht die Transporteffizienz. Die daran anschließende Kernsequenz (in *E. coli* ca. 12 Aminosäuren) hat α -helicale Struktur, ist unpolar und hydrophob. Danach folgt die Spaltregion, an der die Signalsequenz durch Signalpeptidasen vom Protein getrennt wird. Sie ist in *E. coli* idealerweise 6 Aminosäurereste lang, wobei in den Positionen -1 und -3 Aminosäuren mit kurzen Seitenketten (Alanin, Glycin, Serin in Position -1) zu finden sind. Obwohl Signalsequenzen verschiedener Organismen in ihrer Aminosäureabfolge kaum Homologien aufweisen, sind die Eigenschaften der Abschnitte universell und dies erlaubt einen Austausch von eukaryontischen und prokaryontischen Signalsequenzen bei der Konstruktion von Sekretionsvektoren [IZARD & KENDALL, 1994].

Sehr viele verschiedene Signalsequenzen, arteigene sowie artfremde, wurden in *E. coli* eingesetzt um homologe und heterologe Proteine zu exprimieren und in das Periplasma zu transportieren. Die Signalsequenzen aller im Periplasma vorkommender Proteine sind prinzipiell geeignet als Fusionspartner eingesetzt zu werden. Dazu gehören Bindungsproteine für Aminosäuren, Ionen, Peptide, Zucker und andere Moleküle sowie eine Reihe von Enzymen wie die bekannte alkalische Phosphatase. Eine Zusammenstellung dieser Proteine und Enzyme ist in der Literatur zu finden [OLIVER, 1996]. Einige wichtige Signalsequenzen sind in Tabelle 2.5-3 zu finden.

Tabelle 2.5-3: Signalsequenzen

Signalsequenz	Ursprung	Referenz
Bgl	β -Glucanase, <i>Bacillus amyloloquefaciens</i>	MIKSCH <i>et al.</i> , 1997a
Bla	β -Lactamase, <i>E. coli</i>	FUJIMORI, 1992
LamB	Maltoporin der äußeren Membran, <i>E. coli</i>	CLEMENT <i>et al.</i> , 1992
Lpp	Lipoprotein der äußeren Membran, <i>E. coli</i>	VLASUK <i>et al.</i> , 1983
MalE	Maltose-Bindeprotein, <i>E. coli</i>	BLODEL & BEDOUELLE, 1990
PelB	Pectatlyase, <i>Erwinia carotovora</i>	ROBINSON <i>et al.</i> , 1998
PhoA	Alkalische Phosphatase, <i>E. coli</i>	MONTEILHET, 1993
SP1, SP3	Synthetisch	BERGES <i>et al.</i> , 1996
SpA	<i>Staphylococcus</i> Protein A	KANG & YONN, 1999
StII	Hitzestabiles Enterotoxin II, <i>E. coli</i>	ZHU <i>et al.</i> , 1996
StII Mutanten	Mutante Hitzestabiles Enterotoxin II	SIMMONS & YANSURA 1998
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i> , <i>E. coli</i>	HSIUNG <i>et al.</i> , 1989

Es ist nicht möglich allgemeine Regeln aufzustellen, die dazu führen jedes Protein mit Singalsequenz zu transportieren. Interleukin-2 wird in das Periplasma transportiert, wenn es die Singalsequenz eines spezifischen Lipase aufweist. Mit OmpA oder PhoA akkumuliert es im Cytoplasma [HALFMANN *et al.*, 1993]. Dies bedeutet, daß eine Signalsequenz allein nicht ausreicht, um ein rekombinantes Protein in das Periplasma zu transportieren. Grundlegend entscheidend ist eine transportkompatible Konformation des Proteins. Bestimmte Strukturen des rekombinanten Proteins können seinen Transport prinzipiell verhindern [LEE *et al.*, 1989, CHEAH *et al.*, 1994]. Proteine, die natürlicherweise sekretiert werden, haben eine größere Chance in *Escherichia coli* ebenfalls sekretiert zu werden [SCHWAB, 1988, HOCKNEY, 1994]. Überexpression ist nicht automatisch günstig für die Sekretion. Vielmehr gibt es einen optimalen Bereich der Expression, der maximale Sekretion ermöglicht [SIMMONS & YANSURA, 1996].

Auf Basis verschiedener Signalsequenzen wurden und werden Sekretionsvektoren entwickelt, die sich alle dadurch auszeichnen, daß sie Fusionen mit der Signalsequenz im richtigen Leserahmen ermöglichen, so etwa das Plasmid pIN-III-ompA [DAS, 1990] oder Vektoren auf *pefB*-Basis [ROBINSON *et al.*, 1998].

Signalsequenzen können die Proteolyse begünstigen [GENTZ *et al.*, 1988]. Proteolyse kann verstärkt werden, wenn akkumulierende Vorstufen die Produktion von Streßproteinen auslösen [WILD *et al.*, 1993]. Eine Überexpression von Signalpeptidasen kann eine Limitierung bei der Ablösung der Signalsequenz verhindern [KADOKURA *et al.*, 1995, MAKRIDES, 1996].

2.5.3.2 *Co-Expression von Sec-Proteinen*

Transport von heterologen Proteinen ist kaum 100% und in einigen Fällen können nicht transportierte Proteine mit Signalsequenzen im Cytoplasma akkumulieren. Die Co-Expression von Sec-Proteinen kann dies beeinflussen. Im Falle des humanen Interleukin-6, das mit einer OmpA-Signalsequenz fusioniert war, konnte durch die Co-Expression von SecE und SecY der Transport um fast das zehnfache gesteigert werden [PEREZ-PEREZ *et al.*, 1994]. Die Co-Expression von SecB führte zu deutlichen Steigerung des Transports humaner Cytokine, die mit synthetischen Signalsequenzen (SP1 und SP3) ausgestattet waren [BERGÈS *et al.*, 1996]. Eine reduzierte Expression des rekombinanten Proteins, entlastet die Exportmaschinerie. Eine Überexpression der Sec-Proteine kann den Transport in das Periplasma steigern.

2.5.3.3 *Beeinflussung der Faltung im Periplasma*

Die Überexpression von Faltungskatalysatoren Dsb und der Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-

Isomerase, können zu höheren Ausbeuten an korrekt gefaltetem Protein führen. Die Co-Expression von DsbA bei niedrigen Temperaturen führte zu einer Steigerung der korrekt gefalteten TCR-Fragmente (*T-cell-receptor*) [WÜLFING & PLÜCKTHUN, 1994b]. Die Firma Novagen vertreibt Vektoren, die eine Fusion an Dsb erlauben und dadurch die richtige Faltung unterstützen [SONE *et al.*, 1997].

Die Co-Expression der Peptidyl-prolyl-*cis-trans*- Isomerase begünstigte die korrekte Faltung der Pectatlyase C [HUMPHREYS *et al.*, 1995] bzw. des Inhibitors für das Trypsin aus Rinderpankreas [OSTERMEIER *et al.*, 1996]. Falls es periplasmatische Chaperone gibt, werden es keine ATP-abhängigen sein, da im Periplasma üblicherweise kein ATP vorkommt [OLIVER, 1996].

Die Bildung von *Inclusion Bodies* im Periplasma von *E. coli* ist ungewöhnlich, wurde aber beobachtet, z. B. bei der Überexpression von β -Lactamase [BOWDEN *et al.*, 1991].

2.5.4 Verankerung von rekombinanten Proteinen an der äußern Membran

Die Verankerung von rekombinanten Proteinen an der Außenseite der äußeren Membran [DUNN, 1996, GEORGIU *et al.*, 1997], auch als *Phage Display* bekannt, kann für spezielle Anwendungen, wie z. B. als Impfstoff für Malaria [TURPEN *et al.*, 1995] oder spezifische Ganz-Zell-Biokatalysatoren, verwendet werden [HOCKNEY, 1994]. Für die eigentliche Produktion von rekombinanten Proteinen ist diese Methode ungeeignet, da die Isolierung von membrangebundenen Proteinen noch schwieriger und aufwendiger ist, als die von cytoplasmatischen Proteinen. Auch hier kann durch Co-Expression entsprechender Faltungskatalysatoren eine Verbesserung der Methode erfolgen [BOTHMANN & PLÜCKTHUN, 1998].

2.5.5 Maßnahmen zur Sekretion bzw. zum Export rekombinanter Proteine in das Medium von *E. coli*

Um Proteine, die in *Escherichia coli* exprimiert werden, in das Medium auszuschleußen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Dazu gehören die Sekretion bzw. Freisetzung der Proteine aus dem Periplasma, der direkte Export aus dem Cytoplasma über geeignete Sekretionspfade und spontaner Export. Wobei spontan bedeutet, daß die Sekretionsmechanismen der verschiedenen spontan sekretierten Proteine ungeklärt ist und durchaus unterschiedlich sein kann.

2.5.5.1 Sekretion bzw. Freisetzung der Proteine aus dem Periplasma

Wie bereits beschrieben, besitzt *Escherichia coli* keinen nutzbaren

Transportmechanismus, um periplasmatische Proteine in das Medium zu exportieren. Mögliche Gene werden in *E. coli* unter den bekannten Anzuchtbedingungen nicht exprimiert. Viele homologe und heterologe Proteine wurden in *E. coli* durch entsprechende Maßnahmen wie Fusion mit einer Signalsequenz oder Co-Expression von Sec-Proteinen erfolgreich in das Periplasma transportiert. Für die Sekretion bzw. die Freisetzung der Proteine in das Medium wurden eine Reihe von Verfahren entwickelt. Bei all diesen Verfahren soll das Zielprotein spezifisch und vollständig aus dem Periplasma freigesetzt werden, ohne daß es dabei zu Verunreinigungen durch cytoplasmatische Proteine und andere Zellinhaltsstoffe kommt.

Eine Reihe von Verfahren stehen zur mehr oder minder schonenden Öffnung des Periplasmas zur Verfügung. Das sie jedoch meist mit der Abtrennung der Zellen vom Medium verbunden sind, finden sich diese Verfahren im Kapitel 2.6.

Die Methoden, die hier beschrieben werden, ermöglichen die Sekretion der rekombinanten Proteine während der Fermentation. Dazu gehören die Nutzung der zweiten Stufe eines Sekretionspfades vom Typ II aus einem anderen Organismus sowie die Induktion von Kanälen oder Poren in der äußeren Membran.

Ein vielversprechendes Typ II Sekretionssystem, das erfolgreich auf *E. coli* übertragen wurde, ist das Pullulanase-System aus *Klebsiella*. Pullulanase, ein Lipoprotein, wird mit einer Signalsequenz synthetisiert, die von der Lipoprotein Signalpeptidase Lsp abgespalten wird [PUGSLEY *et al.*, 1990a]. Werden die Gene für Pullulanase (*pulA*) und die 14 spezifischen *pul*-Sekretionsgene [PUGSLEY & FRANČETIC, 1998] in *E. coli* exprimiert, so wird das Enzym an die Zelloberfläche sekretiert und langsam ins Medium abgegeben [PUGSLEY *et al.*, 1990b]. β -Lactamase, ein normalerweise periplasmatisches Enzym, konnte durch Fusion an Pullulanase in das Medium sekretiert werden [KORNACKER *et al.*, 1990].

Steht kein MTB-Weg, d.h. keine zweite Stufe eines Sekretionstyp II zur Verfügung, kann versucht werden, durch andere Maßnahmen die äußere Membran durchlässig zu machen. Eine Methode ist die Herstellung von Mutanten, die Fehler in der äußeren Membran aufweisen. Diese sogenannten *Leaky*-Mutanten weisen Mutationen in verschiedenen Genen auf: *ebvA* [YOUNG & SILVER, 1991], *lpp* [STRACU & BECKWITH, 1988], *lky(=tolB)* [WEIGAND & ROTHFIELD, 1976] sowie *tolA/tolB* [WEBSTER, 1991]. Diese Mutationen führen zu großen Problemen bei der Anzucht der Zellen und sind für einen technischen Prozeß praktisch ungeeignet. Außerdem werden während der gesamten Fermentation periplasmatische Proteine in das Medium freigesetzt.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Co-Expression membrandestabilisierender Proteine [BATY *et al.*, 1987]. Durch Co-Expression dieser Proteine bekommt die äußere Membran Löcher bzw. Poren, durch die periplasmatisch akkumulierte Proteine freigesetzt werden. Die Freisetzung erfolgt unspezifisch, kann aber in Abhängigkeit der Funktion der membrandestabilisierenden Proteine Begrenzungen aufgrund der Größe oder der räumlichen Struktur aufweisen. Dazu gehört die Co-Expression des *Bacteriocin-Release-Protein* [VAN DER WAL *et al.*, 1995], die Co-Expression des Kil-Proteins von ColE1 [KATO *et al.*, 1987, STEIDLER *et al.*, 1994, MIKSCH *et al.*, 1997a, MIKSCH *et al.*, 1997b], die Co-Expression von CloDF13 [VAN DER WAL *et al.*, 1998], die Co-Expression des PAS-Faktors aus *Vibrio* [TOKUGAWA *et al.*, 1994] oder die Co-Expression eines Lysegens eines Phagen [DABORA & COONEY, 1990]. Alle diese Systeme haben ein Problem: die basale Transkription durch undichte Promotoren, die zur Lyse der Zellen während der Kultivierung führen kann. Eine Möglichkeit zur nicht letalen Co-Expression des Kil-Proteins und eine genauere Beschreibung seiner Wirkung findet sich im Kapitel 3.5.3.2.

Eine besondere Methode zur Freisetzung periplasmatischer Proteine besteht in der Verwendung von Mutanten ohne Zellwand [GUMPERT *et al.*, 1996]. Diese als L-Form bezeichneten Stämme sind Protoplasten, die in ihrer zellwandfreien Form kultivierbar sind [GUMPERT & HOISCHEN, 1998]. Über 20 rekombinante Proteine, ausgestattet mit eigenen oder heterologen Signalsequenzen, wurden nach Expression in *E. coli* in das Medium abgegeben. Die Anzucht erfolgt in komplexen Medien und die Zellen sind verständlicherweise empfindlicher als Zellen normaler Stämme. Sie können aber relativ problemlos im Fermenter angezüchtet werden. Eine Maßstabserweiterung zu industriellen Verfahren dürfte jedoch schwierig sein [GUMPERT & HOISCHEN, 1998].

2.5.5.2 Direkter Export aus dem Cytoplasma über geeignete Sekretionspfade

Hämolysin (Sekretionstyp I) wird über eine C-terminale Sequenz exportiert [KRONAKIS *et al.*, 1989]. Es lag nahe, durch Fusionen von Proteinen mit diesem C-Terminus, deren Export zu versuchen. Zu den erfolgreichen exportierten rekombinanten Proteinen zählen [BLIGHT & HOLLAND, 1994]: OmpF, β -Lactamase, Chloramphenicol-Acetyltransferase (verkürzt), PhoA, LacZ (verkürzt) und die Dehydrofolatreduktase aus *E. coli*, Prochymosin, IgA-V_H, IgA-V_L aus Säugetieren und Toxine aus verschiedenen Bakterien. Interessant ist im Falle der Dehydrofolatreduktase, daß erst der Austausch der Aminosäure Isoleucin an der Position 155 gegen Lysin den Export ermöglichte [BLIGHT & HOLLAND, 1994]. Ein eindeutiger Hinweis, daß bei diesem Exportsystem die Aminosäureabfolge und somit Strukturen der Zielproteine, grundlegende Einflüsse

ausüben. Laut SPRENG und Koautoren finden sich über 400 Beispiele erfolgreicher Sekretion von Fusionsproteinen in der Literatur [SPRENG *et al.*, 1999]. HlyB spielt im Hämolyisin-System eine wichtige Rolle. Durch seine Co-Expression können Engpässe beim Export reduziert werden [SPRENG *et al.*, 1999].

Sobald es gelingt, die Sekretionspfade vom Typ III gezielt zu induzieren, könnten Exportsysteme mittels dieses Mechanismus entwickelt werden [CHINA & GOFFAUX, 1999]. Die Austauschbarkeit der Systeme zwischen verschiedenen Arten und ihr prinzipielles Potential als Sekretionssystem zeigt z. B. die Sekretion von Avr-Proteinen von *Pseudomonas syringae* mit Hilfe des Typ III Sekretionspfades Hrp aus *Erwinia chrysanthemi* in *Escherichia coli* [HAM *et al.*, 1998].

2.5.5.3 Spontaner (ungeklärter) Export

Eine C-terminale Fusion an *Staphylococcus* Protein A (SpA) [MACKMAN *et al.*, 1987] kann zum spontanen Export führen [UHLEN *et al.*, 1992, UHLEN & MOKS, 1990]. Ungeklärte Sekretion nach erfolgreichem Transport in das Periplasma zeigten Proteinase Ak 1 von *Bacillus* [PEEK *et al.*, 1993] und RNase aus Rind [SCHEIN *et al.*, 1992]. Überexpression kann ebenso zu spontaner Sekretion führen [KERN & CEGLOWSKI, 1995].

Einige Proteine, wie z. B. natürlich sekretierte Proteine GRAM-positiver Bakterien, werden spontan sekretiert [NICAUD *et al.*, 1986] oder durch Fusion an die PhoA-Signalsequenz [WEISS & ORFANOUDAKIS, 1994].

In diesem Kapitel wurde beschrieben, welche Möglichkeiten es gibt, *Escherichia coli* als Sekretionssystem zu nutzen. Für einen industriellen Einsatz muß aber erst noch ein robustes, kontrollierbares System entwickelt werden. Die prinzipiellen Möglichkeiten, die hier beschrieben wurden, sind eine gute Basis, um so ein System zu konstruieren.

2.6 Maßnahmen zur Verbesserung der Aufarbeitung

Die Aufarbeitung umfaßt die Abtrennung der Zellen vom Medium, Aufschluß der Zellen bzw. Zellkompartimente, falls das gewünschte Produkt sich in der Zelle befindet, Isolierung der Produkte und Reinigung, entsprechend den Anforderungen. Der letzte Schritt, der hier aber nicht näher behandelt werden soll, ist die Überführung des Produktes in die Form, in der es auf den Markt kommt.

Aufarbeitung, vor allem bei therapeutischen Produkten, kann sehr teuer sein. Bei der Produktion von rekombinantem humanidentischen Insulin durch *Escherichia coli* mittels

der Proinsulinmethode, bei der das Proinsulin als Proteinaggregat anfällt, betragen die Aufarbeitungskosten 95% der Herstellungskosten [PETRIDES *et al.*, 1995]. Daraus ist klar ersichtlich, daß Maßnahmen zur Verbesserung der Aufarbeitung wichtig für die Kostensenkung sind. Hier soll beschrieben werden, wie mit Hilfe der Gentechnik, gezielte Eingriffe zur Verbesserung der Aufarbeitung durchgeführt werden können. Die Ziele dieser Eingriffe sind:

- ❖ Reduzierung der Aufarbeitungsschritte,
- ❖ Vereinfachung und Beschleunigung der Verfahren und
- ❖ Erhöhung der Ausbeute an biologisch aktivem Produkt in jedem Aufarbeitungsschritt.

Die Aufarbeitung von rekombinanten Produkten, ist natürlich eng mit der Art des Produktes verknüpft. So gibt es sicherlich große Unterschiede, ob Plasmide in großen Mengen hergestellt werden sollen oder rekombinante Proteine. Die folgenden Kapitel zu Isolierung und Reinigung beziehen sich auf rekombinante Proteine. Überlegungen und Optimierungsansätze lassen sich für andere Produkte entsprechend ableiten. Abschließend wird die Qualitätssicherung und Entsorgung von rekombinanten Abfällen diskutiert.

2.6.1 Maßnahmen zur Zellernte und zum Zellaufschluß

Die Ernte von Zellen erfolgt in der Biotechnologie hauptsächlich durch Zentrifugation oder Filtration. Ein drittes Verfahren, die Verteilung in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen, steht an der Schwelle zur industriellen Nutzung. Der Preis der notwendigen Stoffe, wie etwa des Dextrans und das noch für eine großtechnische Verfahrensentwicklung ungenügende Verständnis der Mechanismen dieser Systeme verhindern zur Zeit den industriellen Einsatz [WALSH & HEADON, 1994].

2.6.1.1 Änderungen der Flokkulationseigenschaften

Die Effizienz von Filtration und Zentrifugation wird stark von der Tendenz der Zellen zu Flokkulation beeinflusst. Seit längerem wird an den Flokkulationseigenschaften von *Saccharomyces cerevisiae* gearbeitet, da dies in der Bierindustrie eine wichtige Rolle spielt. Für die Transkription der Flokkulationsgene *FLO1* in *S. cerevisiae*, wurden Regulationsmechanismen entwickelt [TEUNISSEN *et al.*, 1995]. Auch für *E. coli* gibt es derartige Ansätze. Ein Verfahren beruht auf der Kontrolle der Gene, die für die Ausbildung von Typ I Pili verantwortlich sind [OGDEN & TAYLOR, 1991]. Ein andere Ansatz überexprimiert das Maltose-Bindeprotein an der Zelloberfläche und fügt danach Stärke

dem Medium hinzu [FERENCI & LEE, 1991].

2.6.1.2 Maßnahmen beim Zellaufschluß von *E. coli*

Bei *E. coli* wird zwischen Gesamtzellaufschluß und Aufschluß des Periplasmas unterschieden. Für den Gesamtzellaufschluß werden einschlägige Methoden wie Kugelmühlen, Hochdruckhomogenisatoren oder Zugabe von entsprechenden Chemikalien angewandt. Der Aufschluß des Periplasmas unter Bedingungen, die einerseits vollständigen Zugang zum Periplasma ermöglichen, andererseits Verunreinigungen durch cytoplasmatische Proteine weitestgehend ausschließen, ist eine nach wie vor mit Kompromissen behafteter Vorgang. In Tabelle 2.6-1 sind einige bekannte Methoden zur Freisetzung periplasmatischer Proteine zusammengestellt.

Tabelle 2.6-1: Methoden zum Aufschluß des Periplasma von *E. coli*

Methodenklasse	Agens / Methode	Referenz
Biochemisch	Lysozym	PIERCE <i>et al.</i> , 1997
Biochemisch / Chemisch	Lysozym-EDTA-Saccharose	FRENCH <i>et al.</i> , 1996
Chemisch	Harnstoff	FALCONER <i>et al.</i> , 1997
	Triton X100 – Guanidin	NAGLAK & WANG, 1990
	EDTA	RYAN & PARULEKAR, 1991
	Chloroform	AMES <i>et al.</i> , 1984
	Glycin	ARIGA <i>et al.</i> , 1989, YU, 1991
	Tris-KCl Tris-EDTA Saccharose-Tris-EDTA	BEACHAM, 1979
Physikalisch	Elektrische Spannungsimpulse	MARTIN <i>et al.</i> , 1997
	Osmotischer Schock	BEACHAM, 1979
	Frier-/Tau-Technik	JOHNSON & HECHT, 1994
	Hitzebehandlung	TSUCHIDO <i>et al.</i> , 1985

Die Zugabe von unterstützenden Agenzien führt immer zu einer weiteren Belastung der Aufbereitung, da der zugegebene Stoff u. U. während der Reinigung völlig entfernt werden muß.

Eine Möglichkeit den Zellaufschluß gentechnisch zu verbessern, besteht in der gezielten Induktion von Lysegenen z. B. des Lysegens E des Phagen ϕ X174 [RONCHEL *et al.*, 1998]. Nach Beendigung der Expression oder nach Ernte der Zellen kann das Lysegen über einen regulierbaren Promotor expremiert werden und führt zur vollständiger Lyse der Zellen. Das Problem liegt hier, wie bei den bereits erwähnten membrandestabilisierenden

Proteinen, in der basalen Transkription durch den Promotor. Ist der Promotor nicht während der gesamten Fermentation absolut dicht, kann es zu erheblichen Wachstumseinbußen kommen.

2.6.2 Isolierung und Reinigung rekombinanter Proteine

Unabhängig von den eingesetzten Methoden zur Anreicherung, Isolierung und Reinigung von Proteinen werden immer die physikalisch-chemisch-biochemischen Eigenschaften der Proteine die Effizienz der Methoden bestimmen. Maßnahmen zur Verbesserung oder Neuentwicklung von Aufarbeitungsverfahren von rekombinanten Proteinen haben oft zum Ziel diese Eigenschaften zu verändern. Dies kann durch Eingriffe in die Aminosäuresequenz erfolgen, was immer die Gefahr mit sich bringt, die produktrelevanten Eigenschaften zu ändern, was vor allem bei rekombinanten Pharmazeutika ein großes Problem darstellt. Eine andere Methode beruht auf der Fusion des Zielproteins mit einem Partnerpeptid, das für die Änderung der Eigenschaften verantwortlich ist. Durch den gezielten Einbau von spezifischen Schnitt- bzw. Bruchstellen zwischen dem Protein und dem Partner, kann nach erfolgter Reinigung der Partner wieder abgespaltet werden. Das Hauptproblem, das bei solchen Fusionen auftaucht, ist die Möglichkeit der inkorrekten Faltung und damit verbundene Verluste in der biologischen Aktivität. Trotzdem sind die Planung und Konstruktion von Fusionsproteinen die wichtigsten Maßnahmen zur Verbesserung der Aufarbeitung rekombinanter Proteine.

Zu den gängigen Verfahren der Proteinreinigung zählen Fällung, Extraktion in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen und das weite Gebiet der Chromatographie. Diese werden im Folgenden vorgestellt und durch einen Abschnitt über spezielle Affinitätsverfahren sowie den wichtigen Punkt der Spaltung von Fusionsproteinen ergänzt.

2.6.2.1 Selektive Fällung

Fällung ist ein oft eingesetztes Verfahren, um Proteine anzureichern und zu isolieren. Die Methode beruht auf Zugabe von Salzen (Aussalzverfahren), organischen Lösungsmitteln oder hochmolekularen Polymeren sowie der Einstellung bestimmter pH-Werte. Die Bildung des Proteinpräzipitats hängt entsprechend von den jeweiligen Eigenschaften des Proteins ab, so z. B. der Löslichkeit oder des isoelektrischen Punkts. Diese Eigenschaften lassen sich verändern. Das Ziel ist eine selektive Fällung, d.h. ein Verfahren, bei dem nur das Zielprotein aggregiert und somit leicht vom Rest getrennt werden kann [NIEDERAUER & GLATZ, 1992].

Proteine, die gentechnisch mit einem Polyhistidin am N- oder C-Terminus ausgestattet

sind, können über Metallchelate-Proteinfällung isoliert werden. Galactose-Dehydrogenase wurde am N-Terminus mit 5 Histidinresten versehen und mit über Chelate gebundene Zn^{2+} -Ionen selektiv gefällt [LILIUS *et al.*, 1991]. Nach dem gleichen Prinzip wurden Lactat-Dehydrogenase und β -Glucuronidase, ausgestattet mit Polyhistidinresten mittels Zn^{2+} -Ionen, immobilisiert durch Ethyl-glycol-bis-(β -aminoethyl)-Tetraessigsäure (EGTA), gefällt. Im Falle der Lactat-Dehydrogenase wurden 83% des Enzyms gefällt. *Staphylococcus aureus* Protein A (SpA), ebenfalls mit Histidinresten versehen, wurde hingegen nicht gefällt [CARLSON *et al.*, 1996].

Statt eines Fusionsproteins kann ein Affinitätsligand an ein Polymer kovalent gebunden werden, das nach Affinitätswechselwirkung mit dem Zielprotein mit diesem präzipitiert. Dieses Verfahren wurde mit Biotin als Ligand an Polyacrylamiden getestet [MORRIS *et al.*, 1993]. Das so isolierte Protein Avidin betrug 1% des Gesamtproteins in der Lösung und wurde zu 73% selektiv gefällt.

Statt Histidin kann Asparaginsäure verwendet werden, wobei die Wechselwirkung von Asparaginsäure (Asp) mit Polyethylenimin genutzt wird. β -Galactosidase wurde mit 11 Asp-Resten verknüpft. Die Präzipitation aus dem Zellysat wurde durch DNS erschwert. Nach Zugabe von DNAsen konnte β -Galactosidase-Asp selektiv aus einem Gemisch mit unveränderter β -Galactosidase gefällt werden [PARKER *et al.*, 1990].

2.6.2.2 Extraktion in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen

Die Extraktion von Proteinen in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Proteinen in entsprechenden Flüssigphasen. Bei hohem Verteilungskoeffizienten kann damit eine hervorragende Anreicherung des Proteins und die Trennung von z. B. Zellfragmenten nach Zellaufschluß erreicht werden. Das wässrige Milieu schont die Proteine. Durch gezielte Maßnahmen kann der Verteilungskoeffizient verändert werden.

Punktmutationen, die positiv geladene Lysinreste gegen negativ geladene Glutaminsäurereste austauschten, führten zu einer Änderung des Verteilungskoeffizienten von Phage T4 Lysozym in Dextran/PEG-Systemen [LUTHER & GLATZ, 1994]. Die Änderungen waren jedoch geringer, als nach dem Modell erwartet worden war. Deutliche Verbesserungen des Verteilungskoeffizienten konnten bei β -Galactosidase durch Fusion mit SpA erzielt werden. In einem PEG 4000/Kaliumphosphat-System konnte der Verteilungskoeffizient auf das 5-fache gesteigert werden [KÖHLER *et al.*, 1991a]. Noch deutlichere Erhöhungen des

Verteilungskoeffizienten wurden bei dem Protein ZZ, einem Dimeren der IgG-bindenden Domäne von SpA, erreicht. Das Modelprotein ZZ zeigt im PEG 4000/Kaliumphosphat – System einen Verteilungskoeffizienten von 1,6. Durch Fusion mit dem Tetrapeptid Ala-Trp-Trp-Pro wurde der Verteilungskoeffizient auf 11,6 erhöht. Wurden 3 dieser Tetrapeptide angefügt, stieg der Verteilungskoeffizient sogar auf 96 [KÖHLER *et al.*, 1991b]. Peptide mit 2-6 Trp-Resten oder 1 Trp plus 1-3 Lys- oder Asp-Resten ermöglichen die gezielte Veränderung des Verteilungskoeffizienten in beide Richtungen in einem Dextran/Thermopolymer–System [BERGGREN *et al.*, 1999]. Von großem Interesse sind Systeme, bei denen in einer Phase sich ein Chelator für Metallionen befindet. Dadurch ist es möglich den Verteilungskoeffizienten enorm zu erhöhen, da das Zielprotein über z. B. Histidinreste an durch den Chelator immobilisierte Me^{2+} -Ionen bindet [GUINN, 1999].

Reverse Micellen sind interessante Verfahren für die Proteinreinigung. Wichtig ist, daß das zu reinigende Protein eine hohe Affinität zur micellaren Phase aufweist. Diese Affinität wurde für Cytochrom-b5 aus Ratten verändert. Durch Austausch der Glutaminsäurereste an den Positionen 44, 56 und 92 gegen Lysin wurde das Protein stärker in die micellare Phase eines Wasser/AOT–Systems gedrückt [PIRES *et al.*, 1994].

2.6.2.3 Chromatographie

Die zur Zeit wohl wichtigste Verfahrensklasse für die Reinigung von rekombinanten Proteinen ist die Chromatographie. Hier hat es beeindruckende Entwicklungen gegeben. Vor allem für den Labormaßstab sind eine Reihe von Gesamtsystemen kommerziell erhältlich [NILSSON *et al.*, 1997].

Prinzipiell können alle chromatographischen Verfahren wie Ionenaustausch- oder hydrophobe Interaktions-Chromatographie verwendet werden. Besondere Bedeutung haben jedoch Affinitäts- und Pseudoaffinitäts–Chromatographie. Diese Verfahren erlauben eine hohe Selektivität bei gleichzeitiger Flexibilität. Gesamtsysteme bestehen aus einem Expressionsstamm von *E. coli*, einem Expressions-Fusions-Vektor, einem Spaltungsenzym und der Trägermatrix mit gebundenem bzw. immobilisierten Affinitätsliganden. Der Vektor erlaubt die Klonierung eines Zielproteins im Leserahmen mit einem Affinitätsfusionspartner, der die Wechselwirkung mit dem Affinitätsliganden herstellen soll. Zwischen Zielprotein und Fusionspartner befindet sich ein Schnittstelle für eine Endoprotease um den Fusionspartner nach Reinigung abzuspalten. Einige kommerzielle Systeme sind in Tabelle 2.6-2 zusammengestellt.

Tabelle 2.6-2: Kommerzielle Systeme für die Affinitäts- und Pseudoaffinitäts-Chromatographie

Fusionspartner	Ligand	Spaltung	Referenz / Anbieter
FLAG – Peptid	FLAG-Antikörper	Enterokinase	KNAPPIK & PLÜCKTHUN, 1994/ Kodak
GST (Glutathion S-Transferase)	Glutathion	Thrombin	SHEIBANI, 1999/ Pharmacia Biotech
His ₆ -Tag (Polyhistidin)	Me ²⁺ -Chelator	Carboxy-peptidase A	DOBELI & HOCHULI, 1989/ Novagen, QIAGEN
MBP (Maltose Binde Protein)	Stärke	Faktor Xa Enterokinase Genenase I ⁺	SRINIVASAN & BELL, 1998/ New England Biolabs
PinPoint ⁺⁺ (Biotinyliert)	Avidin	Faktor Xa	SAMOLS <i>et al.</i> , 1988/ Promega
Protein A	IgG	CNBr (Bromcyan)	SACCARDO <i>et al.</i> , 1993/ Pharmacia Biotech
Z (IgG-bindendes Domänen-derivat von Protein A)	IgG	Subtilisin	HAMMARBERG <i>et al.</i> , 1989/ Pharmacia Biotech
β-Galactosidase	APTG-Agarose ⁺⁺ +	Faktor Xa	MARKMEYER <i>et al.</i> , 1990/ Roche (Boehringer)
CBD (<i>Cellulose Binding Domain</i>)	Cellulose	Enterokinase Faktor Xa	ONG <i>et al.</i> , 1989/ Novagen
IMPACT ⁺⁺⁺⁺ (<i>Chitin Binding Domain</i>)	Chitin	Autokatalytisch bei 4°C und DTT	CHONG <i>et al.</i> , 1997/ New England Biolabs

⁺ Genenase I ist ein Derivat von Subtilisin

⁺⁺ PinPoint ist eine 13kDa Untereinheit einer Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii*, die in *E. coli* biotinyliert wird.

⁺⁺⁺ APTG = Amino-phenyl-β-D-thiogalactopyranosid [STEERS & CUATRECASAS, 1974]

⁺⁺⁺⁺ IMPACT = *Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*

Eine Vielzahl weiterer Fusionspartner und entsprechende Affinitätsliganden finden sich in der Literatur [FLASCHEL & FRIEHS, 1993, LABROU & CLONIS, 1994]. Die Entwicklung von

derartigen Reinigungsverfahren wird vor allem in Hinsicht auf ihre ökonomische Verwendbarkeit für Proteine im großen Maßstab weitergeführt. Einfache, leicht zu entfernende Fusionspartner, die an preiswerten Liganden auf einfach handhabbaren preiswerten Matrices binden, sind das Ziel derartiger Bemühungen. Ein wichtiger Punkt dabei ist die Selektivität. Je höher die Selektivität eines Fusionspartners an seinen Liganden ist, desto eher ist es möglich das Fusionsprotein in einem Schritt aus einem Zellaufschluß in bereits hoch reiner Form zu isolieren. Daher ist z. B. His₆ als Fusionspartner nicht ideal. His₆ erfüllt zwar einige der ökonomischen Bestrebungen, die Selektivität ist jedoch nicht optimal. An Metallchelatsäulen binden eine Reihe von anderen Proteinen ohne His₆-Partner. Hier sind anderer Partner von Interesse. Hisactophilin nutzt die selben Liganden wie His₆, aber bindet viel stärker. Dadurch können Hisactophilin-Fusionsproteine in einem Schritt sehr rein isoliert werden. Ein experimenteller Vergleich von Hisactophilin und His₆ findet sich in Kapitel 3.6.2.1.

Eine weitere interessante Anwendung ist die Verwendung von zwei verschiedenen Fusionspartnern am N-Terminus bzw. C-Terminus. Dadurch ist es möglich Produktheterogenitäten, die durch unvollständige Translation oder durch Proteolyse während der Produktion und dem Zellaufschluß entstehen, zu entfernen.

Die Ausgangssituation ist ein Gemisch von erwünschtem Fusionsprotein, das beide Fusionspartnern FP1 und FP2 enthält, mit Fragmenten von Zielproteinen, die einen der beiden Fusionspartner enthalten, sowie u. U. Fragmente ohne Fusionspartner. Zuerst wird das Gemisch auf eine Säule aufgebracht, die eine Matrix enthält, an der der Ligand für den FP1 gebunden ist. Alle Fusionsproteine, die intaktes FP1 enthalten, werden an die Säule gebunden. Alle anderen Proteine und alle Fusionsfragmente die nur FP2 oder inkorrektes FP1 enthalten, werden ausgewaschen. Danach werden die gebundenen Proteine eluiert und auf eine zweite Säule aufgebracht, die nun eine Matrix enthält, an der der Ligand für FP2 gebunden ist. Da nur das intakte Fusionsprotein, das sowohl FP1 und FP2 enthält, noch binden kann, werden alle Fusionsfragmente, die nur FP1 enthalten und im ersten Schritt gebunden wurden, beim Waschen entfernt. Danach kann das Fusionsprotein eluiert und beide Fusionspartner entsprechend abgespalten werden [HAMMARBERG *et al.*, 1989].

2.6.2.4 Spezielle Affinitätsverfahren

Die Aufarbeitung sekretierter bzw. exportierter Proteine gebunden an SpA aus der gesamten Fermenterbrühe konnte mit Hilfe von Wirbelbettreaktoren erreicht werden [HANSSON *et al.*, 1994]. Dieser Ansatz von integrierter Aufarbeitung ist ein Beispiel dafür,

daß mit der Kombination von Sekretion und Affinitätsfusionspartner die Produktion rekombinanter Proteine erheblich vereinfacht werden kann.

Neben der Affinitätschromatographie, der selektiven Präzipitation und der Affinitäts-gestützten Extraktion in wässrigen Zwei-Phasen-Systemen, sind Membran-Affinitäts-Filtration und Affinitäts-Querstrom-Ultrafiltration zwei weitere Methoden, die das Potential haben, zu Verfahren in großen industriellen Maßstäben entwickelt zu werden [LABROU & CLONIS, 1994]. Affinitätsmembrane haben den Liganden kovalent gebunden. Eine Abtrennung von Feststoffen ist nicht notwendig. Dadurch ist es möglich in einem Schritt die Trennung der festen (z. B. Zellen) von der flüssigen Phase durchzuführen und gleichzeitig das Produkt zu binden. Damit ist das Membranverfahren der Affinitätschromatographie, die ja auf feststofffreie Lösungen angewiesen ist, überlegen.

Bei der Affinitäts-Querstrom-Ultrafiltration gelangen die Begleitstoffe und das Zielprotein durch die Poren des Filters, nicht jedoch der Ligand. Zuerst wird der Zielprotein-Ligand-Komplex aufgrund seiner Größe zurückgehalten. Anschließend wird das Zielprotein eluiert und kann nun durch die Poren gewonnen werden. Der Ligand, der nicht durch die Poren paßt, kann nun regeneriert und wieder verwendet werden.

Beide Membranverfahren zeichnen sich durch hohe Flußgeschwindigkeiten aus und eignen sich daher große Volumen aufzuarbeiten.

2.6.2.5 Spaltung von Fusionsproteinen

Die Erkennungssequenzen der in Tabelle 2.6-2 aufgelisteten Spaltungsagenzien bzw. -enzyme sind in Tabelle 2.6-3 zu finden.

Tabelle 2.6-3: Spaltungsagenzien und Erkennungssequenz für Fusionsproteine

Spaltungsagens	Erkennungssequenz	Referenz
CNBr (Bromcyan)	Met ↓	HÜSKEN <i>et al.</i> , 1990
Genenase I	Pro-Gly-Ala-Ala-His ↓Tyr	CARTER <i>et al.</i> , 1989
Carboxypeptidase A	Poly His ↓	LILIUS <i>et al.</i> , 1991
Enterokinase	Asp-Asp-Asp-Lys ↓	PRICKETT <i>et al.</i> , 1989
Faktor X _a	Ile-Glu-Gly-Arg ↓	MCPHERSON <i>et al.</i> , 1992
Subtilisin	Ala-Ala-His-Tyr ↓	CARTER <i>et al.</i> , 1989
Thrombin	Arg-Gly-Pro-Arg ↓	HAKES & DIXON, 1985

Weitere Spaltungsenzyme und –agentien und deren Spaltungssequenzen finden sich in der Literatur [FLASCHEL & FRIEHS, 1993].

Eine interessante Möglichkeit das Spaltungsenzym und den abgespaltenen Fusionspartner zu entfernen, bietet eine Methode, bei der das Enzym den gleichen Fusionspartner trägt wie das Zielprotein [GRÄSLUND *et al.*, 1997]. In einem ersten Schritt wird das Fusionsprotein mit einer entsprechenden Säule gereinigt und danach eluiert. Nun wird das Spaltungsenzym hinzu gegeben. Das Enzym spaltet den Fusionspartner vom Zielprotein ab. Die Lösung wird nun über die gleiche Säule geschickt. Der abgespaltene Fusionspartner und das Spaltungsenzym, das an den gleichen Partner fusioniert ist, werden gebunden. Das reine Zielprotein geht durch die Säule hindurch.

2.6.3 Qualitätssicherung und Entsorgung von rekombinanten Abfällen

Besonders für rekombinante Proteine, die für die humane Therapie eingesetzt werden, gelten hohe Qualitätsstandards. Daher müssen eine Reihe von Maßnahmen getroffen werden, die die Qualität sichern. Dazu gehört der Nachweis, daß die Konzentration von Verunreinigungen unter der Nachweisgrenze oder innerhalb bestimmter Toleranzen liegt. Besonders gefährliche Verunreinigungen müssen mehrere Schritte nach Erreichen der Nachweisgrenze entfernt werden. Tabelle 2.6-4 zeigt mögliche Verunreinigungen und ihre Wirkungen [WALSH & HEADON, 1994].

Tabelle 2.6-4: Verunreinigungen in rekombinanten Proteinformulierungen und deren Auswirkungen

Verunreinigung	Auswirkung
Mikroorganismen	Mikrobielle Infektion, Sepsis
Viruspartikel	Virusinfektion
Pyrogene Substanzen	Fieber, Schock
DNS	Immunologische Reaktionen, unerwünschte Transkriptionen
Fremdproteine	Immunologische Reaktionen, unerwünschte biologische Reaktionen

Für die Produktion von therapeutischen rekombinanten Proteinen oder anderen Produkten, wie Plasmid-DNS, wurden von den Behörden, wie der EU-Kommission oder der FDA, entsprechend strenge Regelungen erlassen, um diese Verunreinigungen zu beseitigen bzw. zu verhindern. Bei rekombinanten Produkten kommen zusätzliche

Faktoren zum Tragen, wie z. B. genetische Instabilität und daraus resultierende Produktheterogenität. Diese Faktoren müssen speziell berücksichtigt werden [BERTHOLD & WALTER, 1994]. Diese Regeln, als GMP (*Good Manufacturing Practices*) bekannt, dienen dazu bereits bei der Produktentwicklung, spätestens für die klinische Prüfung der Phase III, qualitätsgesicherte Produkte zu verwenden. Die spätere Produktion verlangt nach diesen Regeln ein umfassendes Qualitätsmanagement mit sehr ausführlicher Dokumentation [GLENNON, 1997].

Ein anderer besonderer Aspekt, der bei der Verwendung von rekombinanten Organismen zur Erzeugung von rekombinanten Produkten auftritt, ist die Entsorgung des biologischen Abfalls, speziell der Biomasse. Dies wird in Deutschland durch das Gentechnikgesetz und die Gentechniksicherheitsverordnung bzw. durch die entsprechenden EU-Richtlinien geregelt. Organismen der Sicherheitsstufe 1 können bezüglich ihres rekombinanten Status wie anderes ungefährliche Material entsorgt werden, was meistens die Überführung in eine Kläranlage bedeutet. Das es dazu Alternativen gibt, zeigt Kapitel 3.7.2.

Damit ist der theoretische Teil dieser Arbeit beendet. Zusammenfassend sind die wichtigen Faktoren bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in Tabelle 2.6-5 dargestellt. Im nun folgenden experimentellen Teil werden einige theoretisch dargestellte Maßnahmen in der praktischen Umsetzung beschrieben und diskutiert. Die Gliederung des experimentellen Teils folgt in Anlehnung an den theoretischen Teil.

Tabelle 2.6-5: Wichtige Faktoren bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli*

Ebene	Faktor
DNS	Gendosis Strukturelle Plasmidstabilität Segregative Plasmidstabilität
Transkription	Promotorstärke Promotorregulation Basale Transkription Terminatoren
Translation	Leserahmen Ribosomale Bindungsstelle Codon-Präferenz Stop-Codon Start-Codon Stabilität mRNA
Protein	Proteolyse Biologische Aktivität Faltung Chaperone Posttranslationale Modifikation Bildung von <i>Inclusion Bodies</i>
Lokalisierung	Transport in das Periplasma Sekretion in das Medium Export in das Medium Sec-Proteine
Aufarbeitung	Zellernte Zelllyse Fusionsproteine Affinitätschromatographie Entsorgung

3 Experimente und Diskussion

Die Gliederung des Kapitels *Experimente und Diskussion* ist angelehnt an die Gliederung des Kapitels über *Theoretische Grundlagen*. Zuerst werden Ergebnisse zu Experimenten der DNS-Ebene dargestellt. Dazu gehören die Plasmidkopienzahl, die strukturelle und segregative Plasmidstabilität sowie Plasmidformen. Das darauf folgende Kapitel befaßt sich mit dem Thema Promotoren, das der Transkription/Translations-Ebene zuzurechnen ist. Dazu gehören Daten zur Promotorstärke, zu induzierbare Promotoren sowie zur basalen Transkription. Im Kapitel Lokalisierung rekombinanter Produkte werden zuerst Experimente vorgestellt, die sich mit der Erweiterung des Substratspektrums von *A. eutrophus* befassen. Daran anschließend wird die Entwicklung von Sekretionssystemen von *E. coli* und *Klebsiella planticola* gezeigt. Mit verschiedenen Möglichkeiten der Verbesserung der Aufarbeitung von rekombinanten Proteinen beschäftigt sich das darauf folgende Kapitel. Dazu gehören die Affinitätschromatographie und die Verwendung von Hisactophilin als Fusionskomplement. Das letzte Kapitel beschäftigt sich mit der Entsorgung und Verwertung von bakterieller Biomasse. Dabei geht es um die Inaktivierung von Plasmiden und um die Produktion verwertbarer Extrakte aus Biomasse.

3.1 Plasmidkopienzahl: Bestimmung und Beeinflussung

Wie im Theorieteil dargestellt, spielt die Plasmidkopienzahl beim Einsatz rekombinanter Mikroorganismen eine entscheidenden Rolle. Deshalb ist es von großem Interesse über analytische Methoden zu verfügen, die es erlauben eine schnelle, quantitative Bestimmung der Plasmidkopienzahl durchzuführen. Außerdem ist es nützlich die Faktoren, die sich auf die Kopienzahl auswirken, zu kennen und diese gezielt zu nutzen.

In der Literatur findet man als Einheiten der Plasmidkopienzahl: Plasmide pro Zelle [LEIPOLD *et al.*, 1994], Plasmide pro Chromosom [KIEWIT *et al.*, 1993] und μg Plasmid-DNS pro mg Zelltrockengewicht (ZTG) [SCHENDEL *et al.*, 1989]. Wegen möglicher Schwankungen der chromosomalen DNS während des Zellzyklus erscheinen die Angaben " $\mu\text{g mg}^{-1}$ " (ZTG) und "Plasmide pro Zelle" als geeignet.

3.1.1 Quantifizierung von Plasmid-DNS

Um Plasmidkopienzahlen bestimmen zu können, muß Plasmid-DNS quantifiziert werden. Für die Bestimmung der DNS-Menge in Plasmidlösungen gibt es verschiedene Methoden. Drei sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3.1-1: Methoden zur Quantifizierung von Plasmid-DNS

Methode	Probleme	Referenz
Bestimmung der Absorption bei 260 nm	Verunreinigungen von RNS und Proteinen können zu erheblichen Fehlern führen. Chromosomale DNS wird nicht unterschieden, sehr schnell.	[VOß 1997, VOß <i>et al.</i> , 1998]
Bestimmung der Fluoreszenzemmission	Chromosomale DNS wird nicht unterschieden, Fluoreszenz nicht quantitativ.	[RYE & GLAZER, 1995]
Bestimmung der Ribose	Aufwendig; chromosomale DNS wird nicht unterschieden. Fehler durch Hydrolyse und Reaktion.	[DISCHE, 1955]

Am meisten genutzt, da am schnellsten, ist die Messung der Absorption bei 260 nm. Da Verunreinigungen mit Proteinen die Messung verfälschen, wird die Absorption auch bei 280 nm gemessen und der Quotient 260 nm/280 nm gebildet. Liegt der Quotient im Bereich von 1,6 -1,8, so geht man von einer hohen Reinheit aus [SAMBROOK *et al.*, 1989]. Verunreinigungen mit RNS heben den Effekt von Proteinen wieder auf, d. h. DNS mit Proteinen und RNS verunreinigt erscheint nach dieser Methode als sauber. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß neben den Verunreinigungen mit chromosomaler DNS, RNS und Proteinen, noch andere Faktoren die Messung beeinflussen [VOß *et al.*, 1998]. Einige Faktoren, die die Quantifizierung von DNS durch Messung der Absorption bei 260 nm beeinflussen können, sind in der Tabelle 3.1-2 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1-2: Einfluß verschiedener Faktoren auf die Quantifizierung von DNS mittels Messung der Absorption bei 260 nm

Faktor	Auswirkung
Chromosomale DNS	erheblich, tatsächliche Plasmid-DNS-Menge geringer als gemessen
RNS	erheblich, DNS-Menge tatsächlich geringer als gemessen
Proteine	eher gering, DNS-Menge tatsächlich höher als gemessen
RNS / Proteine	Effekte können sich aufheben, DNS-Menge tatsächlich geringer als gemessen
pH	gering, höhere Absorption bei höherem pH
Plasmidform	gering, linear geringere Absorption
Fragmentgröße	signifikant nur bei Größenunterschieden von 2 -3 Zehnerpotenzen

Für eine quantitative Bestimmung der Plasmid-DNS zur Erstellung eines Kalibrierstandards ist die UV-Methode ungeeignet. Daher wurde eine Methode auf der Basis der vollständigen Hydrolyse von DNS mit anschließender Bestimmung des Phosphats entwickelt [Voß *et al.*, 1998] und wird im folgenden Kapitel beschrieben.

Genauere Quantifizierung von DNS über Phosphatbestimmung

Die Quantifizierung von DNS über Phosphatbestimmung erfolgt durch die Hydrolyse der DNS. Dabei wird pro Desoxynukleotid ein anorganisches Phosphat freigesetzt, das anschließend bestimmt werden kann. Unter Berücksichtigung des Phosphatanteils der Nukleotide kann anschließend die DNS-Konzentration berechnet werden.

Um DNS über Phosphat zu bestimmen muß diese vollständig hydrolysiert sein. Dazu wurden DNS-Proben mit Salzsäure behandelt und das frei werdende anorganische Phosphat photometrisch bestimmt. In einem Phosphattest von SIGMA (Steinheim) werden Ammoniumphosphomolybdat-Komplexe gebildet, die bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden.

DNS besteht aus 4 Bausteinen auf Basis von Desoxyadenosin-5'-phosphat, Desoxyguanosin-5'-phosphat, Desoxycytidin-5'-phosphat und Desoxythymidin-5'-phosphat. Jeder Baustein setzt bei der Hydrolyse ein Phosphat frei. Ist der Anteil der

verschiedenen Bausteine in einer DNS bekannt, z. B. über die Basensequenz, so kann aus der Phosphatkonzentration die DNS-Menge genau bestimmt werden.

Die Molmassen der Bausteine und die Abweichungen von der durchschnittlichen Molmasse sind in Tabelle 3.1-3 zusammengefasst.

Tabelle 3.1-3: Molmassen der DNS-Bausteine

DNS-Baustein mit Base:	Molmasse	Abweichung vom Durchschnitt in %
Adenin	312	1,4
Cytidin	288	-6,4
Guanin	328	6,6
Thymidin	303	-1,5
Durchschnitt	308	0

Ist von einem DNS-Molekül seine Basensequenz bekannt, so kann die durchschnittliche Molmasse \bar{M} eines DNS-Bausteins dieses Moleküls berechnet werden nach der Gleichung 3-1:

$$\bar{M}_{DNS-Baustein} = \frac{M_{Adeninbaustein} \cdot a + M_{Guaninbaustein} \cdot b + M_{Cytidinbaustein} \cdot c + M_{Thymidinbaustein} \cdot d}{a + b + c + d}$$

Gleichung 3-1: Durchschnittliche Nukleotidmolmasse von DNS-Molekülen mit bekannter Basensequenz

M= Molmasse des jeweiligen Bausteins
 a, b, c, d = Anzahl der jeweiligen Bausteine in einem bestimmten DNS-Molekül.

Nach Bestimmung des Phosphatgehalts durch Hydrolyse, Nachweisreaktion und Messung der Absorption bei 340 nm kann die DNS-Konzentration wie folgt berechnet werden:

$$C_{DNA} = \frac{A_{340}}{\epsilon_{PO_4}} \cdot \frac{\bar{M}_{DNS_Baustein}}{M_{PO_4}} \quad [ng \mu L^{-1}]$$

Gleichung 3-2: Berechnung der DNS-Konzentration

ϵ = spezifischer Extinktionskoeffizient Phosphat, M_{PO_4} = Molmasse Phosphat

Sind die Anteile der jeweiligen Bausteine in der DNS nicht bekannt, so wird statt der durchschnittlichen Molmasse \bar{M} der bekannten DNS, die durchschnittliche Molmasse der vier DNS-Bausteine, nämlich $M = 308$ verwendet. Wenn die DNS nur aus Guanidinnukleotiden, den Nukleotiden mit der größten Molmasse, bestehen würde, wäre die Abweichung durch die Verwendung der Durchschnittsmolmasse rund 6 %. Das selbe gilt für das leichteste Nukleotid, das Adenosinnukleotid.

Das Problem bei dieser Quantifizierung liegt neben den möglichen Fehlern bei der Phosphatbestimmung, in der quantitativen Hydrolyse. Nur wenn alle Phosphate freigesetzt wurden, kann die DNS-Konzentration bestimmt werden.

Deshalb wurden Experimente mit einem Gemisch aus Desoxynukleotiden durchgeführt. Dazu wurden je 50 μL eines äquivalenten Gemischs aller 4 Nukleotide in verschiedenen Verdünnungen mit 20 μL 30 % Salzsäure versetzt und 4 h bei 85 °C inkubiert. Nach dem Kühlen auf Eis wurden 20 μL der Proben mit 1 mL Phosphatreagenz (SIGMA, Steinheim) gemischt, die Absorption bei 340 nm bestimmt und die Phosphatkonzentration berechnet. Sie stimmte mit der theoretisch erwarteten überein.

Um auszuschließen, daß die Konformation von Plasmiden auf die Hydrolyse einen Einfluß hat, wurden unbehandelte und mit EcoRI (Boehringer, Mannheim) linearisierte Plasmid-DNS von pUC21 der Hydrolyse unterworfen. Es konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Um den Einfluß von verunreinigenden Proteinen auf die Phosphatbestimmung zu erfassen, wurden Proben mit verschiedenen Mengen Rinderserumalbumin versetzt und hydrolysiert. Bei der anschließenden Phosphatbestimmung konnte kein Einfluß festgestellt werden.

Verunreinigungen mit RNS führen erwartungsgemäß sehr wohl zu Fehlmessungen, da auch RNS hydrolysiert wird. Proben des Plasmids pUC21 (1000 ng μL^{-1} , laut Messung mit UV-Licht) wurden mit RNS (700 ng μL^{-1}) verunreinigt. Dabei wurden je nach Mischungsverhältnis über 40 % Abweichungen vom theoretischen Wert gefunden.

3.1.2 Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Agarosegelelektrophorese

Bei der klassischen Bestimmung der Kopienzahl werden die Plasmide isoliert und mittels Agarosegelelektrophorese von chromosomaler DNS und RNS getrennt. Anschließend werden die DNS-Banden mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und die Intensität

gemessen. Diese Messung kann sehr aufwendig sein und die Quantifizierung ist mit signifikanten Fehlern behaftet. Diese Methode wird im folgenden beschrieben und diskutiert [SCHRIEFER, 1989].

Der Stamm *E. coli* JM103 mit dem Plasmid pUC12 wurde als Testsystem verwendet. Es wurden Schüttelkultivierungen (150 mL im 500 mL Schikanenkolben) in LB-Medium bei 30°C durchgeführt. Die Zellzahl betrug ca. 6×10^9 und wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Plasmid-DNS wurde mit der alkalischen SDS-Methode [SAMBROCK *et al.*, 1989] isoliert und für die verschiedenen Experimente in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5) bei 4°C gelagert.

Agarosegele können zur Trennung von Nukleinsäuren eingesetzt werden. DNS besitzt eine negative Gesamtladung und wandert im elektrischen Feld daher zur Anode. Die Geschwindigkeit der Moleküle im Gel hängt u.a. von ihrer Ladung, ihrer Form und der Gelkonzentration ab. Lineare doppelsträngige DNS-Fragmente werden dabei nach ihrer Molmasse getrennt. Je nach Verteilung der Fragmentgröße werden bei kleineren Fragmenten Gele mit höherer Agarosekonzentration verwendet. Unter einer Fragmentgröße von 70 Bp sind Polyacrylamidgele besser geeignet [MARTIN, 1996].

Bei den folgenden Experimenten wurden 0,9 % (w/v) Agarosegele und TPE-Puffer (0,8M Tris-Phosphat, 0,08M EDTA, pH 8,0) verwendet. Die DNS-Proben wurden mit einer Stopplösung vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Stopplösung bestand aus Harnstoff (4M), Saccharose (50 %, w/v), EDTA (5 mM) und Bromphenolblau (0,02 %, w/v). Der Harnstoff dient zur Denaturierung von Restriktionsenzymen (RE), Bromphenolblau zeigt die Lauffront an und die Saccharose erhöht die Dichte der Probenlösungen, so daß diese in die Geltaschen sinken. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 4 Vcm^{-1} für ca. 4 h durchgeführt.

Die DNS wurde mittels Ethidiumbromid gefärbt, das bei einer Anregung mit UV-Licht, Licht von 590 nm emittiert. Der verwendete Transilluminator arbeitete bei 254 nm. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer Polaroid 600 Sofortbildkamera fotografiert. Beim hochempfindlichen Polaroidfilm 667 betrug die Belichtungszeit 4,5 min. Diese wurde bei der Herstellung von Negativen mit Polaroidfilmen 665 auf 25 min erhöht. Fotos von Gelen können zur groben Abschätzung der DNS-Mengen genutzt werden, sind jedoch für eine quantitative Bestimmung ungeeignet. Geeigneter ist Densitometrie von Negativen. Der Polaroidfilm 665 hat einen Empfindlichkeitsgrad von 20 DIN. Dies hat die Konsequenz, daß die Belichtung relativ lange erfolgen muß und führt zur Zerstörung des Fluoreszenzfarbstoffs. Daher wurden die Gele mit einer Mamiya C3 6x6 Kamera mit

Schwarzweißfilm ILFORD HP5 (ILFORD, Mobberley, England) fotografiert und die Negative analysiert. Die Belichtungszeit lag zwischen 7 und 11 min.

Zur Quantifizierung der DNS in den Banden wurde ein Densitometer (TLC Scanner II, Camag) verwendet an dem ein Integrator (SP 4270, Spectra Physics) angeschlossen war. Die Transmission bei 450 nm wurde gemessen.

3.1.2.1 *Direkte Densitometrie von Agarosegelen*

Die direkte Bestimmung der DNS-Menge in den Banden durch Densitometrie des Agarosegels [PROJAN *et al.*, 1983] war mit der oben beschriebenen Ausrüstung nicht möglich. Das 3 mm dicke Gel bewirkte ein so großes Hintergrundrauschen, daß DNS-Banden vom Densitometer nicht erkannt wurden. Dünnere Gele hingegen sind in der Handhabung sehr schwierig. Deshalb wurden die Negative der fotografierten Gele vermessen.

3.1.2.2 *Densitometrie der Fotonegative von Agarosegelen*

Auf den Meßtisch im Densitometer wurde eine Milchglasscheibe gelegt und darauf das Negativ positioniert. Danach wurden die einzelnen Banden vermessen. Die Quantifizierung erfolgte über Vergleich der Integratorwerte der unbekannt Banden mit den Werten des Standards. Der Standard war der Molmassenstandard λ HindIII bestehend aus einer bekannten Menge λ -DNS, die mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten worden war.

3.1.2.3 *Einflüsse bei der Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Agarosegelelektrophorese*

Um zu untersuchen ob die Färbbedingungen der Agarosegele einen Einfluß auf die Kopienzahlbestimmung haben, wurden zwei Färbemethoden miteinander verglichen. Dazu wurde pUC12-DNS aufgetragen und das Gel nach Elektrophorese in zwei Hälften geteilt. Jede Hälfte enthielt auch den Standard. Bei einer Färbemethode wurde eine Hälfte des Gels 10 min bei 60°C in 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach zweimal mit H₂O 10 min lang bei 60°C entfärbt. Die andere Hälfte des Gels wurde bei 30°C für 30 min gefärbt und 60 min ebenfalls bei 30°C entfärbt. Beim kurzen Entfärben wird das Ethidiumbromid aus der Gelmatrix entfernt, bleibt jedoch in der DNS interkaliert. Danach wurden die Gelhälften gemeinsam fotografiert und das Negativ gescannt. Dabei konnte gezeigt werden, daß zumindest bei den gewählten Bedingungen kein Einfluß der Färbemethode auf die Plasmidkopienzahl zu sehen war. Die Kopienzahl

lag in beiden Fällen bei 17-18 Kopien pro Zelle. Da die erste Färbemethode bedeutend schneller ist, wurde diese für die folgenden Experimente gewählt.

Weitere Untersuchungen betrafen fotografische und densitometrische Einflüsse. Die Verwendung des Polaroidfilms 665 zeigte, daß die Hintergrundschwärzung einzelner Chargen und sogar innerhalb eines Negativs so stark variierte, daß große Verfälschungen bis zur Unbrauchbarkeit der Negative zu beobachten waren. Daher wurde auf das Filmmaterial ILFORD HP5 (ILFORD, Mobberley, England) gewechselt. Durch die Verwendung einer Milchglasscheibe konnte das Hintergrundrauschen deutlich erniedrigt werden.

Die Belichtungszeit spielte insofern eine Rolle, da die Schwärzung des Films mit der Belichtungszeit nur in einem bestimmten Zeitbereich verknüpft ist. Bei Belichtungszeiten, die über diesem Bereich liegen, ist die Schwärzung immer maximal und nicht mehr von der DNS-Menge abhängig. Die Belichtungszeiten hatten keinen Einfluß, wenn der Schwärzungsgrad sowohl der Plasmid-DNS Bande als auch der Standardbande sich im logarithmischen Abhängigkeitsbereich befanden. Die optimale Einstellung des Densitometers konnte durch Änderung der Spaltbreite und Spaltlänge erreicht werden.

Auch die Standardbande, die für die Auswertung verwendet wird, hat einen Einfluß auf die Bestimmung der Kopienzahl. Wenn λ -DNS mit dem Restriktionsenzym HindIII geschnitten wird, entstehen 8 Fragmente unterschiedlicher Größe von 23,130 bis 0,125 kBp. Bei Einsatz einer bekannten Menge an λ -DNS kann der Anteil an DNS in jeder Fragmentbande berechnet werden. Es stellte sich die Frage, ob die Wahl der Fragmentbande, die für die Quantifizierung benutzt wird, das Ergebnis beeinflusst. Daher wurden Plasmidbanden densitometrisch vermessen und mit verschiedenen Banden quantifiziert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.1-4.

Tabelle 3.1-4: Einfluß der Wahl der Standardbande im Agarosegel auf die Plasmidkopienzahl

Standardbande	Plasmidkopienzahl Gel1	Plasmidkopienzahl Gel2
23130 Bp	19,4	17,0
9416 Bp	19,8	17,8
6557 Bp	20	19,0
4361 Bp	21,8	21,8

Die Plasmidkopienzahl ist scheinbar um so höher, desto kleiner die Molmasse des Standards ist. Es sind Abweichungen von bis zu 20 % möglich. Daher wurden für vergleichende Berechnungen von Plasmidbanden die Standardbande des 23,130 kBp-Fragmentes benutzt, da die Intensität dieser Bande denen der Plasmidbanden entsprach.

Plasmide können in unterschiedlichen Formen vorkommen. Jeder dieser Formen bildet eigene Banden in einem Gel. Es müßten also alle Banden quantifiziert und zusammengezählt werden um die Plasmidkopienzahl zu bestimmen. Durch den Einsatz von Einzelschnitt-Restriktionsenzymen werden alle Formen in die lineare Form überführt, die einer einzigen Bande entspricht. Diese Bande kann dann mit einer ebenfalls linearen Standardbande quantifiziert werden. Es erscheint sinnvoll als Standardbande eine Bande zu nehmen, deren Molmasse der Molmasse des zu quantifizierenden DNS-Fragmentes entspricht.

Bei den meisten Methoden zur Bestimmung der Kopienzahl werden die Plasmide zuerst isoliert. Es kann davon ausgegangen werden, daß diese Isolierung nicht quantitativ erfolgt. Es wurde daher versucht mit Hilfe der Methode nach Eckhardt [ECKHARDT, 1978] eine genauere Bestimmung der Kopienzahl zu erreichen. Bei dieser Methode werden die Zellen direkt im Gel lysiert. Dabei traten allerdings ungleichmäßige, oft verschmierte Banden auf, die nicht einfach zu quantifizieren waren. Zusätzlich gab es immer die Möglichkeit einer unvollständigen Lyse der Zellen. Wurden wenig Zellen aufgetragen um die Lyse zu begünstigen, wurden die Plasmidbanden sehr schwach. Der Fehler beträgt 20 % und mehr. Daher ist diese Methode keine wirkliche Alternative.

Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Agarosegelelektrophorese und Densitometrie eines Fotonegativs der Gele ist zeitlich und methodisch aufwendig und wird von einer Reihe von Faktoren beeinflusst, die genaue Aussagen nur mit Schwankungen bis zu 30 % und mehr ermöglichen. Für die Verwendung der Plasmidkopienzahl als prozeßanalytischen Parameter ist diese Methode völlig ungeeignet.

Es kann immer nur eine Mindestkopienzahl ermittelt werden. Unter Berücksichtigung einer heterogenen Verteilung der Plasmide in den Zellen einer Population, entsprechen die erhalten Kopienzahlen einem durchschnittlichen Mindestwert in einer Zellpopulation.

3.1.3 Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels Kapillarelektrophorese

Wegen der unbefriedigenden Ergebnisse der Bestimmung der Plasmidkopienzahl mittels

Agarosegelelektrophorese und der Wichtigkeit der Plasmidkopienzahl wurde versucht, eine genauere und schneller Methode zu entwickeln [HEBENBROCK *et al.*, 1991; SCHMIDT *et al.*, 1996].

Es sollte ein Verfahren entwickelt werden, bei dem die Plasmidkopienzahl mit Hilfe der Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines laserinduzierten Fluoreszenzdetektors schnell bestimmt werden kann. Könnte diese Bestimmung innerhalb von 30 min, der üblichen Verdopplungszeit von *E. coli*, erfolgen, so läßt sich die Plasmidkopienzahl als Prozeßleitparameter bei Fermentationen von rekombinanten *E. coli* verwenden.

3.1.3.1 Kapillarelektrophorese von Plasmid-DNS

Für die Entwicklung der Methode wurde das Kapillarelektrophorese-Gerät P/ACE 2050 der Firma Beckman (Fullerton, USA) mit einem laserinduzierten Fluoreszenzdetektor (LIF) und eine Lösung des Plasmids pUC18 von bekannter Konzentration verwendet. Dabei haben verschiedene Einflußgrößen unterschiedliche Auswirkungen auf die Kapillarelektrophorese von DNS [SCHMIDT *et al.*, 1996], die in Tabelle 3.1-5 zusammengefaßt sind.

Tabelle 3.1-5: Einflußgrößen bei der Kapillarelektrophorese von DNS

Einflußgröße	Auswirkung
Feldstärke	Je höher, desto schneller. Aber geringere Auflösung und unschärfere Signale möglich. Temperaturproblem.
Temperatur	Hohe Temperaturen führen zu Unschärfen und geringerer Auflösung. Deshalb muß die Kapillare gekühlt werden.
Kapillarlänge	Längere Kapillaren führen zu besserer Trennschärfe, aber auch zu längerer Dauer.
Kapillarart	Beeinflußt den endosmotischen Fluß. Daher werden Kapillaren innen beschichtet.
Polymerzusatz	Nur mit Polymerzusätzen lassen sich große Moleküle mit gleicher oder ähnlicher Ladungsdichte trennen.
Puffer	Die Ionenkonzentration beeinflusst die Feldstärke. Der pH-Wert beeinflusst die Ladungsdichte der zu trennenden Moleküle. Ist ein Molekül bei einem bestimmten pH ungeladen (isoelektrischer Punkt) so wird es nur mit dem endosmotischen Fluß bewegt.
Farbstoff und Färbebedingungen	Es muß genügend Farbstoff vorhanden sein, um alle Moleküle gleichmäßig zu färben. Die Färbebedingungen sind entsprechend zu wählen.

Als interchalierende Farbstoffe wurden "EnhanCE" (Beckman, Fullerton, USA), der

dimere Oxazol-Gelb-Farbstoff YOYO (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) und eine Kombination von Ethidiumbromid und dem monomeren Oxazol-Gelb-Farbstoff YO-PRO (Molecular Probes Inc., Eugene, USA) verwendet. In vielen Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen ermittelt. Eine wichtige Tatsache ist, daß eine ordentliche Trennung nur in Puffern mit Polymerzusatz, z. B. Hydroxypropylmethylcellulose, (HPMC-100, SIGMA, 2 % wäßrige Lösung: Viskosität = 100 cP) möglich ist. Dabei hat die Polymerkonzentration einen deutlichen Einfluß auf die Migrationszeit der DNS und somit auf die Dauer der Elektrophorese wie Abbildung 3.1-1 zeigt.

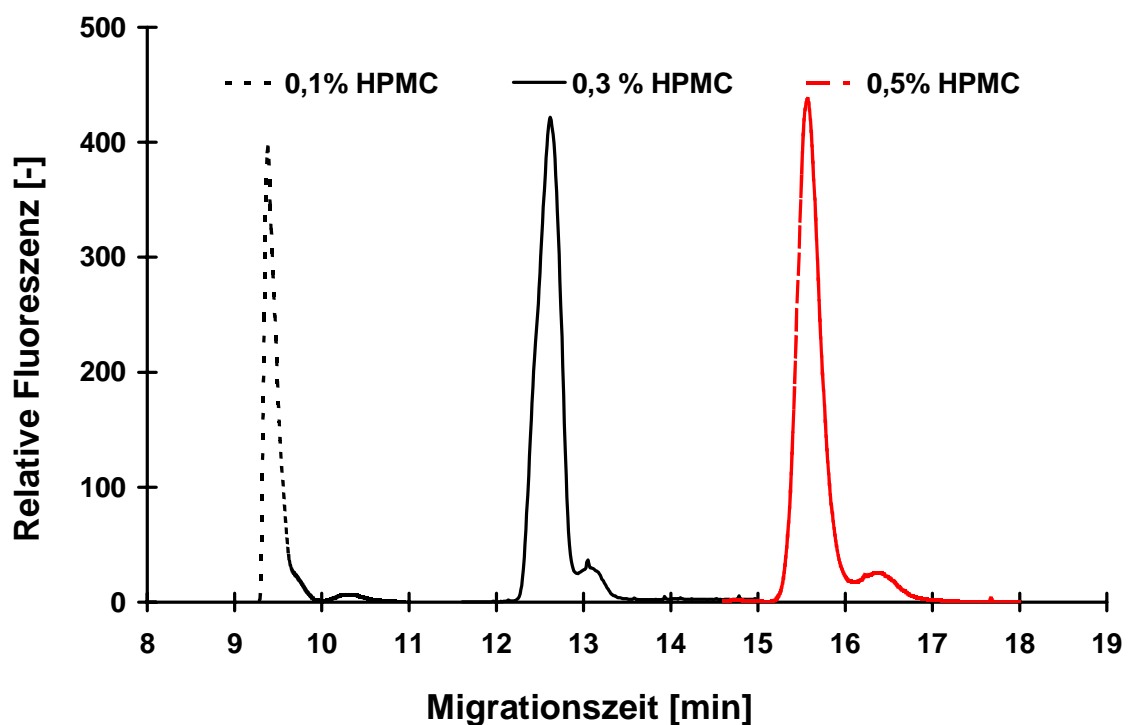


Abbildung 3.1-1: Elektropherogramme von Plasmid-DNS

Die Bedingungen für die Bestimmung von ungeschnittener pUC18 Plasmid-DNS waren wie folgt: je $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ DNS bei unterschiedlicher HPMC-Konzentration. Elektrophoresepuffer: 67 nM YOYO in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,4), Kapillare: DB-17 (J.W.Scientific, USA, 37 cm, 100 μm ID), 5 Sekunden hydrodynamische Injektion, Elektrophorese bei 200 V cm^{-1} und $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.3.2 Plasmidquantifizierung mit Kapillarelektrophorese u. YOYO

Bei der Quantifizierung von Substanzen mittels der Kapillarelektrophorese ist zu beachten, daß die den verschiedenen Signalen zugehörigen Stoffe unterschiedlich schnell am Detektorfenster vorbeiziehen. Stoffe mit niedrigen Migrationszeiten wandern schneller und führen daher zu schmalen Signalen als Stoffe mit höheren Migrationszeiten. Für eine Quantifizierung muß daher die Signalfäche durch die

Migrationszeit geteilt werden. Der so berechnete Wert hat die Einheit „a.u.“ (*arbitrary unit*).

Mit 0,1 % HPMC im Elektrophoresepuffer wurde im gesamten detektierbaren Bereich von $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ bis $2,05 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ eine lineare Abhängigkeit des Signalfächen/Zeitverhältnisses von der Plasmidkonzentration erhalten. Dies zeigt Abbildung 3.1-2.

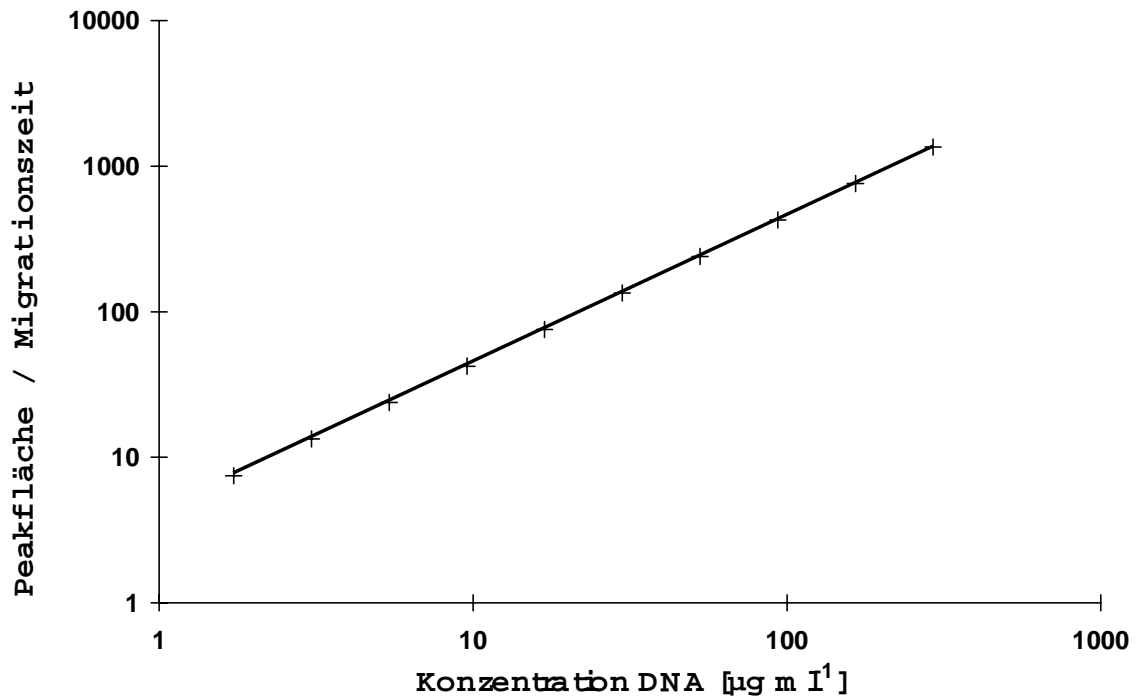


Abbildung 3.1-2: Kalibriergerade zur Bestimmung der Plasmidkonzentration

Es wurden verschiedene Verdünnungsstufen von ungeschnittener pUC18-Plasmid-DNS verwendet. $5 \mu\text{L}$ der DNS-Proben wurden in $45 \mu\text{L}$ TBE-Puffer, der $0,23 \mu\text{M}$ YOYO enthält, gegeben. Weitere Angaben: Elektrophoresepuffer: 67 nM YOYO in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,4), Kapillare: DB-17 (J.W.Scientific, USA, 37 cm , $100 \mu\text{m}$ ID), 5 Sekunden hydrodynamische Injektion, Elektrophorese bei 200 V cm^{-1} und $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Mit diesen Ergebnissen war es möglich in reinen Plasmidlösungen die DNS-Konzentration schnell zu bestimmen. Für die Verwendung der Plasmidkopienzahl als Prozeßleitparameter muß das Plasmid schnell isoliert werden und die erhaltene Probe muß für die Kapillarelektrophorese geeignet sein. Daher wurden eine Reihe von verschiedenen Plasmidisolierungsmethoden auf ihre Schnelligkeit und Tauglichkeit überprüft.

3.1.3.3 Vergleich von Plasmidisolierungsmethoden

In Tabelle 3.1-6 sind einige Methoden zur Plasmidisolierung aufgelistet, die bei diesen Arbeiten benutzt wurden.

Tabelle 3.1-6: Verwendete Plasmidisolierungsmethoden

Name	Methode	Hersteller/Referenz
Miniprep	Ionenaustauscher	QIAGEN (Hilden)
Spinprep	Silicagelmembran	QIAGEN (Hilden)
INSTA-MINIPREP	Zwei-Flüssigphasen	5Prime→3Prime (Eugene, USA)
CTAB	Klassische Lyse	[DEL SAL <i>et al.</i> , 1988]

Dabei konnte gezeigt werden, daß einerseits die Plasmidausbeuten sehr verschieden sein können (siehe Abbildung 3.1-3), was sicherlich ein Grundproblem der Plasmidkopienzahlbestimmung darstellt. Andererseits konnte ein Verfahren entwickelt werden, daß es ermöglicht Proben, die mit der sehr schnellen (im besten Fall 2 min) INSTA-MINI-PREP Methode gewonnen wurden, mittels Kapillarelektrophorese zu quantifizieren.

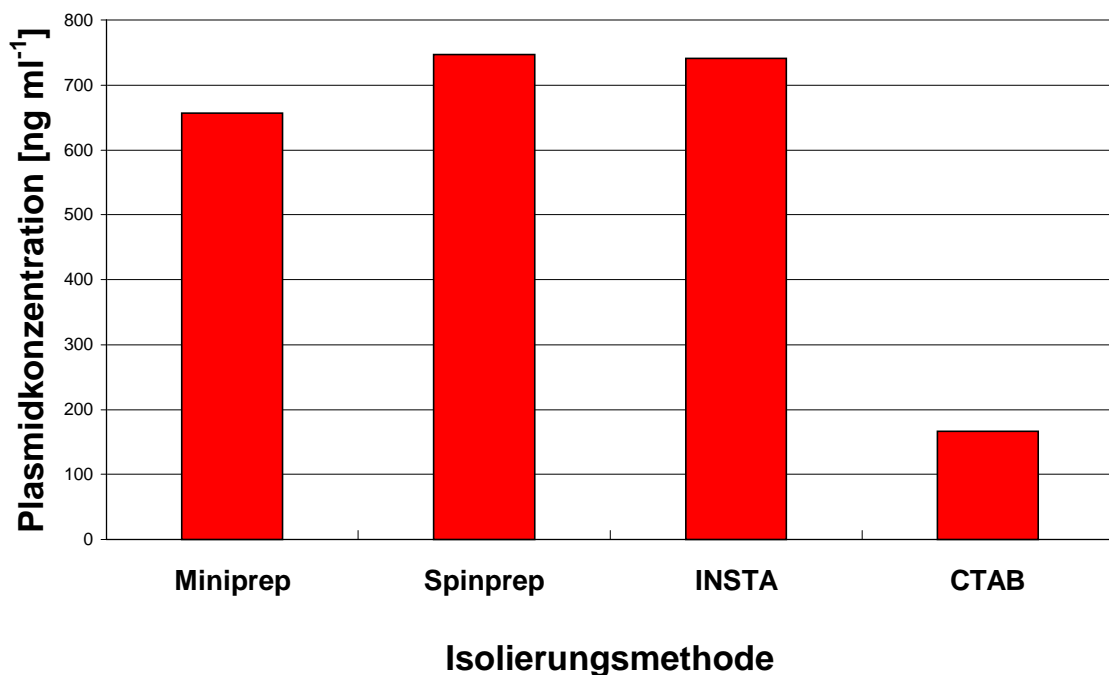


Abbildung 3.1-3: Vergleich von Isolierungsmethoden für Plasmide

Isolierung von pUC18 Plasmid-DNS aus je 1 mL einer Übernachtskultur mit verschiedenen Isolierungsmethoden. Die Plasmidprobe wurde ungeschnitten und 1: 20 verdünnt in die Kapillare injiziert; 80 nM YO-PRO und 1,27 µM Ethidiumbromid im TBE-Elektrophoresepuffer; 0,3 % HPMC; Kapillare: DB-17 (37 cm, 100 µm ID, J.W.Scientific, USA), 5 Sekunden hydrodynamische Injektion, Elektrophorese bei 200 V cm⁻¹ und 30°C.

3.1.3.4 Optimierung der DNS-Quantifizierung mittels Kapillargelelektrophorese

Es ist möglich, daß die verschiedenen Plasmidformen die Quantifizierung beeinflussen. Für eine exakte Bestimmung der Plasmidmenge wurde die Plasmid-DNS daher in eine einheitliche lineare Form überführt.

Die zu quantifizierende Plasmid-DNA wurde vor der Analyse durch Restriktionsverdau mit dem Enzym EcoRI ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, Boehringer Mannheim) linearisiert. Dazu wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß $2 \mu\text{L}$ Plasmid-DNA, $2 \mu\text{L}$ Restriktionsenzym und $1 \mu\text{L}$ für das Restriktionsenzym spezifisches Pufferkonzentrat (Boehringer Mannheim) mit autoklaviertem Wasser (bidest.) auf $10 \mu\text{L}$ aufgefüllt und in einem Blockthermostaten bei 37°C für 1-2 min inkubiert. Anschließend wurde mit $90 \mu\text{L}$ TE-Puffer verdünnt und das Enzym durch 5 minütige Inkubation bei 65°C im Wasserbad denaturiert.

Für die kapillargelelektrophoretische DNS-Quantifizierung wurden $5 \mu\text{L}$ dieser Probe mit $45 \mu\text{L}$ einer wässrigen $28,8 \text{ nM}$ YOYO-Lösung versetzt und anschließend 2 s in die 37 cm lange DB-17-Kapillare injiziert. Als Elektrophoresepuffer diente eine Lösung von 0,1 % Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC-100, Sigma, 2 % wässrige Lösung: Viskosität = 100 cP) in TBE-Puffer mit 67 nM YOYO ($1 \mu\text{L}$ Farbstoff zu 15 mL TBE-HPMC-Puffer). Die Analyse erfolgte bei einer Feldstärke von 300 V cm^{-1} , so daß die Signale nach ca. 6 min Migrationszeit erhalten wurden.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte aus dem Signalfläche-Zeit-Quotienten mit Hilfe einer Kalibriergeraden, die an jedem Meßtag neu erstellt wurde, um entsprechende Meßfehler möglichst gering zu halten. Dazu wurden linearisierte pBR322-Kalibrierstandards der Konzentrationen $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $800 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$, $160 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ und $32 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ verwendet, die 2-3 mal analysiert wurden. Trotz des zusätzlichen Zeitaufwands für die Linearisierung ist die Bestimmung der Plasmidmenge innerhalb von 30 min möglich.

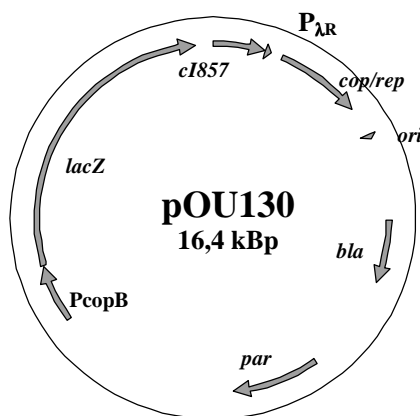
Mit den entwickelten Methoden aus der Kombination der schnellen Plasmidisolierung mit der schnellen Quantifizierung der Plasmid-DNS mittels Kapillarelektrophorese kann die durchschnittlichen Plasmidkopienzahl pro Zelle innerhalb von 30 min bestimmt werden. Es ist möglich die Plasmidkopienzahl als Prozeßleitparameter zu verwenden und relative Änderungen einer durchschnittlichen Mindestzahl an Kopien pro Zelle einer Population zu beobachten

3.1.4 Erhöhung der Plasmidkopienzahl durch *Runaway-replication*

Die Gendosis und somit die Plasmidkopienzahl spielen eine wichtige Rolle bezüglich der Produktivität rekombinanter Mikroorganismen. Da jedoch eine hohe Plasmidkopienzahl immer eine zusätzliche Belastung für die Zelle darstellt, wäre es von Vorteil, die Plasmidkopienzahl beeinflussen zu können. Eine kleine Plasmidkopienzahl während der Wachstumsphase, am besten nur ein Plasmid pro Zelle und eine hohe Plasmidkopienzahl in der Produktionsphase würden ideale Bedingungen darstellen. Dies kann mit sogenannten *runaway-replication* Plasmiden erreicht werden. Durch Induktion kann die Kopienzahl dieser Plasmide um den Faktor 100 bis 1000 erhöht werden.

3.1.4.1 Das "runaway-replication" System *E. coli* JM103 pOU130

Die Plasmide der pOU-Familie sind Abkömmlinge des Plasmids R1, einem *low-copy* Plasmid [LARSEN *et al.*, 1984]. Sie besitzen die Ampicillinresistenz als Marker und einige das *lacZ*-Gen bzw. *lac*-Operon für die Expression der β -Galactosidase [EDLER *et al.*, 1989]. Die Genkarte von pOU130 ist in Abbildung 3.1-4 zu sehen.



- cI857:** Temperatursensitiver λ -Repressor
- P_{AR}:** Temperaturinduzierbarer λ -Promotor
- cop/rep:** Regulationsgene Kopienzahl
- ori:** Replikationsursprung
- bla:** β -Lactamase (Ampicillinresistenz)
- par:** Partitionierungsregion
- lacZ:** β -Galactosidase
- P_{copB}:** Konstitutiver Regulationspromotor

Abbildung 3.1-4: Genkarte des Plasmids pOU130

Durch Temperaturerhöhung wird der CI857 Repressor denaturiert und es kommt zu einer Überexpression der Regulationsgene *cop* und *rep*. Dadurch erhöht sich die Kopienzahl. Die Partitionierungsregion *par* dient der segregativen Plasmidstabilität. Als möglichen Indikator für die Überexpression und Kopienzahl kann die Aktivität der durch *P_{copB}* konstitutiv exprimierten β -Galactosidase dienen. Dabei ist jedoch zu beachten, daß diese Aktivität von vielen Faktoren abhängt und somit nur ein grobes Maß für die Expression bzw. Gendosis sein kann.

3.1.4.2 Kultivierung von *E. coli* JM103 pOU130 und Induktion der Plasmidreplikation

Es liegt nahe, daß bei einer späten Induktion der Plasmidreplikation bereits viel vom Substrat verbraucht ist und somit für die Erhöhung der Kopienzahl nicht genügend Substrat vorhanden bleibt. Um dies zu untersuchen wurde *E. coli* JM103 pOU130 im 1,3 L Rührkesselreaktor (Biostat M, B.BRAUN, Melsungen) im LB-Medium bei 37°C angezüchtet. Bei einem Experiment wurde gleichzeitig mit der Induktion Lactose stufenweise zugegeben (insgesamt 10 g). Dies führte nicht nur zu einer Erhöhung der Biomasse, sondern auch zu einer Erhöhung der Plasmide pro Zelle [FRIEHS & SCHÜGERL., 1989], wie Abbildung 3.1-5 zeigt.

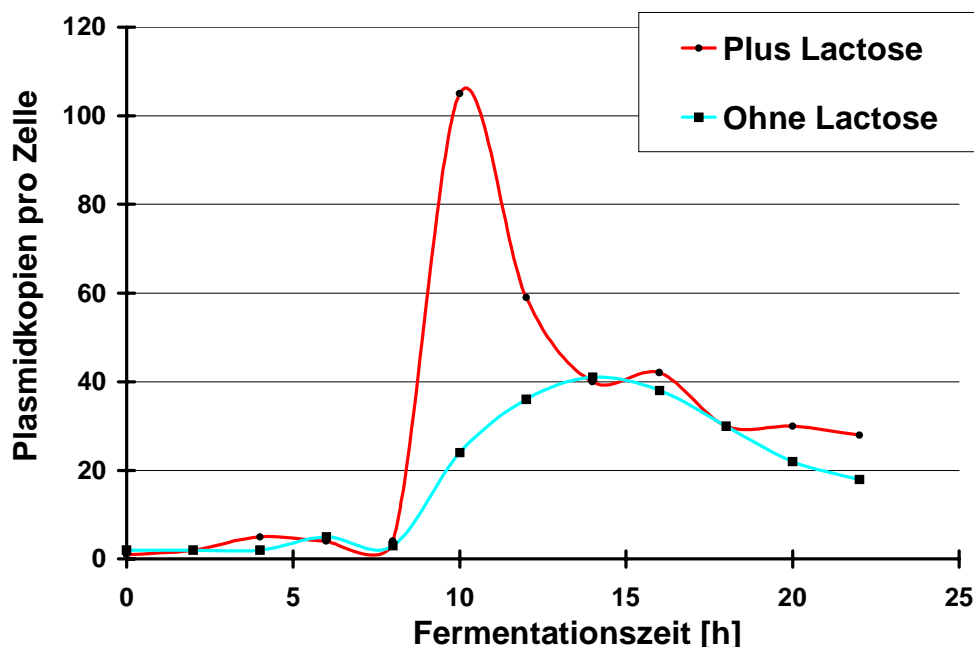


Abbildung 3.1-5: Verlauf der Plasmidkopienzahl bei der Kultivierungen von *E. coli* JM103 pOU130

E. coli JM103 pOU130 im 1,3 L Rührkesselreaktor in LB Medium angezüchtet. Bei Induktion (Temperaturerhöhung von 37°C auf 42°C nach 8 h) erfolgte keine/eine Zugabe von Lactose.

Nach 8 h Fermentationszeit wurde die Temperatur von 37°C auf 42°C erhöht. Dies führte zu einem Anstieg der Plasmidkopienzahl. Wurde gleichzeitig mit der Zufütterung von Lactose begonnen, so stieg die Plasmidkopienzahl deutlich höher an. Die Bestimmung der Plasmidkopienzahl wurde mit der Methode wie unter 3.1.2 beschrieben durchgeführt.

Runaway-replication-Plasmide eignen sich gut für die Erhöhung der Plasmidkopienzahl während der Produktionsphase. Um diesen Effekt jedoch richtig nutzen zu können, ist für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Substrat zu sorgen. Hier bieten sich Zufütterungsverfahren an. Da bei einer Temperaturerhöhung eine Änderung des

physiologischen Zustands erfolgt, ist die Verwendung anderer Promotoren für die Replikationssteigerung zu erwägen.

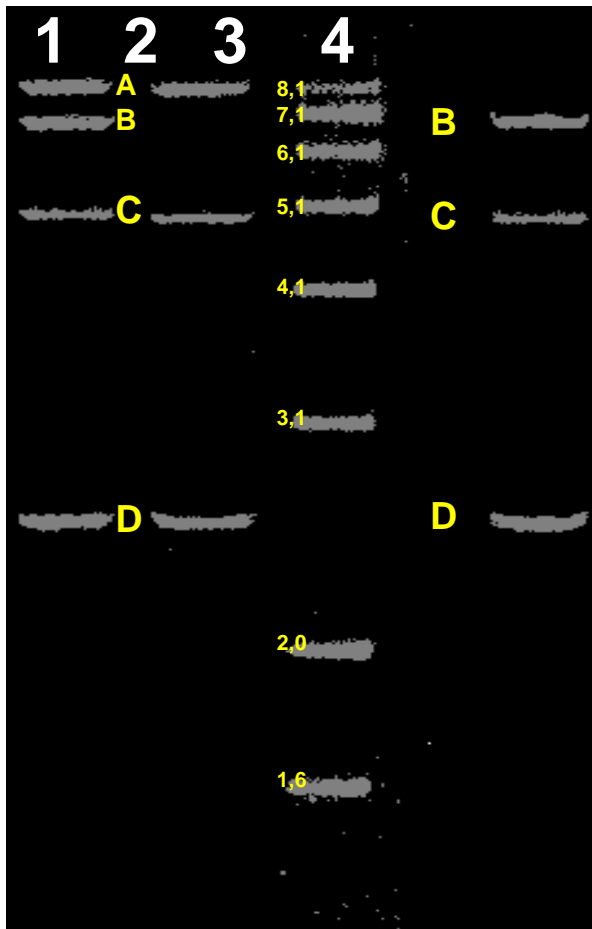
3.2 Strukturelle und segregative Plasmidstabilität

Neben der Plasmidkopienzahl ist die Plasmidstabilität ein weitere wichtige Einflußgröße, die die Produktivität eines bakteriellen Expressionssystems erheblich beeinflussen kann. Dabei wird zwischen der strukturellen und der segregativen Plasmidstabilität unterschieden. Die strukturelle Stabilität bezieht sich auf die Basensequenz eines Plasmides, die sich durch unvorhersehbare Mutationen, Deletionen und Insertionen signifikant ändern kann. Bei der segregativen Plasmidstabilität handelt es sich um die Weitergabe der Plasmide auf die Tochterzellen und die Wahrscheinlichkeit, daß plasmidfreie Zellen in einer Population entstehen.

3.2.1 Strukturelle Instabilität beim Plasmid pJMC40

Wie im theoretischen Teil dargestellt wurde, können strukturelle Instabilitäten in Plasmiden in verschiedenen Formen auftreten. Befinden sich diese Änderungen in wichtigen Abschnitten für die Replikation des Plasmids oder in den zu exprimierenden Genen für ein Produkt, kann dies zu erheblichen Einbußen in der Produktivität führen. Aber auch bei der Konstruktion oder bei der Überprüfung von Expressionsplasmiden kann es durch strukturelle Instabilitäten zu erheblichen Irritationen kommen. Dies wird im folgenden Beispiel dargestellt.

Das Plasmid pJMC40 sollte bei der Konstruktion eines neuen Plasmids verwendet werden (siehe Kap. 3.4.3.1). Zu den ersten Arbeiten gehörte die Transformation des Plasmids und dessen Überprüfung mittels Restriktionsanalyse [FRIEHS & BAILEY, 1989]. Das Plasmid, ein Geschenk von A. MARKOVITZ (University of Chicago), wurde in *E. coli* HB101 transformiert [MANIATIS *et al.*, 1982] und nach der Methode von BIRNBOIM & DOLY isoliert [BIRNBOIM & DOLY, 1979]. Aliquots wurden mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und zusammen mit einem Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Ergebnis der Elektrophorese ist in Abbildung 3.2-1 in Spur 1 zu sehen.



Gelelektrophorese:

0,9 % Agarose
60mA
Tris-Acetat-EDTA-Puffer

50-faches Konzentrat TAE-Puffer:

242 g L⁻¹ Tris
57,1 mL L⁻¹ Eisessig
16,8 g L⁻¹ EDTA
pH 8,0

Restriktionsansätze:

EcoRI (Pharmacia, USA) nach der vom Hersteller empfohlenen Methode.

Molmassenstandard:

1 *kb-ladder* von BRL, USA.

Abbildung 3.2-1: Restriktionsanalyse der Plasmide pJMC40 und pJMC40ins

Analyse der ersten Plasmidisolierung

Spur 1: EcoRI-Schnitt von Plasmid-DNS aus der ersten Plasmidisolierung von pJMC40 mit einer zusätzlichen Bande bei 8 kBp.

Spur 2: EcoRI-Schnitt von pJMC40 mit dem richtigen Bandenmuster.

Spur 3: Molekulargewichtsstandard 1 *kb-ladder* von BRL.

Spur 4: EcoRI-Schnitt von Plasmid-DNS pJMC40ins mit der Bande bei 8 kBp.

Die Größe der Fragmente in den einzelnen Banden wurden graphisch bestimmt. Es sollten Fragmenten von 2,5 kBp, 4,9 kBp und 6,7 kBp entstehen, die auch gefunden wurden. Zusätzlich wurde jedoch ein Fragment von 8 kBp gefunden. Dies paßte nicht in das erwartete Resultat. Es konnte auch nicht ein partieller Schnitt als Erklärung dienen, da jede mögliche Kombination der theoretischen Fragmente kein 8,0 kBp Fragment liefern konnte. Erst die neuerliche Transformation des isolierten Plasmids, diesmal in *E. coli* DH5 α , erbrachte Klarheit. Wurden Plasmide aus verschiedenen Transformanten isoliert und mittels EcoRI-Schnitt analysiert, wurde entweder das ursprünglich erwartete Bandenmuster des Plasmids pJMC40 von 2,5 - 4,9 - 6,7 kBp gefunden (Spur 2) oder es ergab sich ein Bandenmuster von 2,5 - 4,9 - 8,0 kBp (Spur 4). Tatsächlich handelte es sich bei der ersten Isolierung also um ein Gemisch von 2 Plasmiden. Eine strukturelle

Instabilität von pJMC40 in Form einer 1,3 kBp großen Insertion hatte sich ereignet und zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Die Ursachen sind nicht eindeutig feststellbar. Vielleicht liegen sie bei Rekombinationsvorgängen zwischen dem Chromosom von *E. coli* und chromosomaler DNS auf dem Plasmid, obwohl *E. coli* HB101 *rec*-negativ ist. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 3.2-2 beide Restriktionskarten zu sehen.

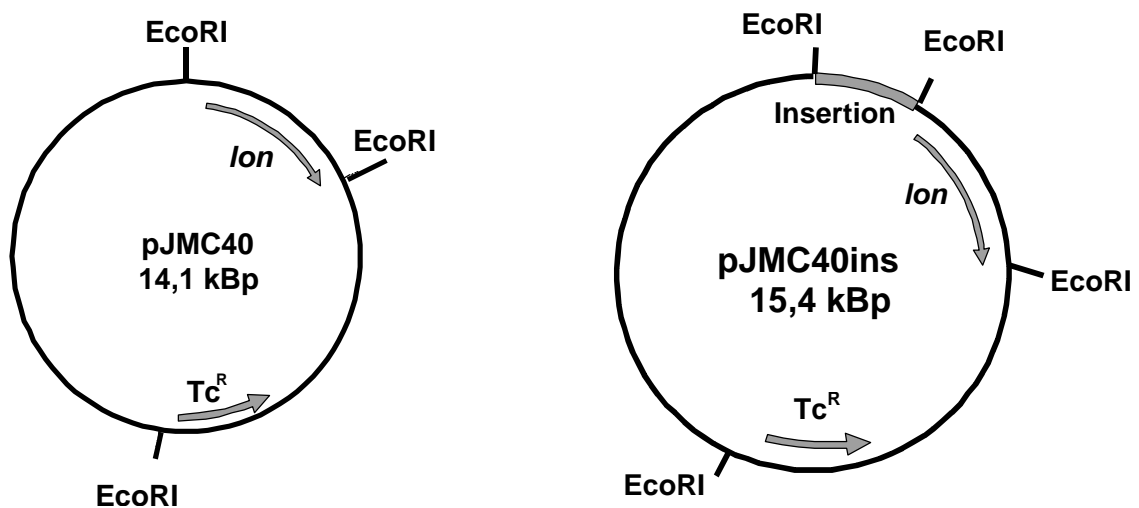


Abbildung 3.2-2: Restriktionskarten pJMC40 und pJMC40ins

EcoRI: Schnittstelle für Restriktionsenzym

lon: lon-Gen

Tc^R: Tetracyclinresistenz

Das Plasmid pJMC40 ist 14,1 kBp groß. Es hat 3 Schnittstellen für das RE EcoRI. Ein Schnitt mit diesem Enzym führt zu 3 Fragmenten der Größen 2,5, 4,9 und 6,7 kBp. Das Plasmid pJMC40ins ist 15,4 kBp groß. Es hat 3 Schnittstellen für das RE EcoRI. Ein Schnitt mit diesem Enzym führt zu 3 Fragmenten der Größen 2,5, 4,9 und 8,0 kBp [FRIEHS & BAILEY, 1989]

3.2.2 Segregative Plasmidstabilität und ihre Bestimmung in der Praxis

Die Weitergabe der Plasmide an die Tochterzellen ist für eine hohe Produktivität außerordentlich wichtig. Wenn daher von Plasmidstabilität gesprochen wird, ist meistens die segregative Plasmidstabilität gemeint. Bereits bei einer nur gering verminderten Plasmidstabilität ist die Zunahme an plasmidfreien Zellen bei längerer Fermentationsdauer, wie es z. B. bei Zufütterungsverfahren üblich ist, so groß, daß es zu deutlichen Verlusten in der Produktivität kommen kann. Bei der Konstruktion und der Verwendung von plasmidabhängigen Expressionssystemen müssen diese Systeme auf ihre Stabilität hin untersucht werden und nötigenfalls geeignete Stabilisierungsmaßnahmen ergriffen werden. Im theoretischen Teil dieser Arbeit wurde auf Ursachen der Plasmidstabilität so wie auf Möglichkeiten der Stabilisierung eingegangen.

Zur Bestimmung der Plasmidstabilität wurde die zu untersuchende Kultur in einer 1:10 Verdünnungsreihe soweit mit Medium vermischt, daß bei der anschließenden Ausplattierung auf Nähragarplatten mit einer Kolonienzahl zwischen 10 und 100 zu rechnen war. Danach wurden jeweils 3 Verdünnungsstufen (z. B. 10^{-5} bis 10^{-7}) sowohl auf selektionsdruckfreien als auch selektiven Platten (z. B. Zugabe von Antibiotika) ausgestrichen. Nach entsprechender Bebrütungsdauer wurden die Platten ausgezählt und miteinander verglichen. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien auf den Selektionsplatten geteilt durch die Anzahl der Kolonien auf den selektionsfreien Platten der selben Verdünnung mal hundert ergab die Plasmidstabilität in Prozent. Daraus ist ersichtlich, daß die Bestimmung der Plasmidstabilität sehr aufwendig ist, lange dauert und eine große Fehlerbreite hat. Es sind parallele Plattierungen notwendig. In der Literatur wird bei vielen Arbeiten die Plasmidstabilität gar nicht berücksichtigt. Daher sind Angaben über Expressionsstärken und Produktivität in solchen Fällen mit äußerster Vorsicht zu handhaben. Auch findet man öfters bei Arbeiten, die die Plasmidstabilität beschreiben, selten genaue Angaben, wie die Plasmidstabilität bestimmt wurde. Dann sind höchstens Tendenzen ableitbar.

3.2.3 Segregative Stabilisierung von Plasmiden über Selektionsdruck

Für die Selektion von Transformanten werden hauptsächlich die phänotypischen Ausprägungen von Markergenen verwendet. Oft sind solche Marker Gene für die Bildung von Resistenzen gegen Antibiotika. Derartige Antibiotikaresistenzen eignen sich auch für die Erhöhung der Plasmidstabilität. Dabei wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum beigefügt. Dies kann nur in der Anzuchtphase der Vorkultur aber auch in allen folgenden maßstabvergrößerten Stufen bis hin zur Hauptkultur geschehen. Dabei sind einige Faktoren zu bedenken, wie etwa daß Antibiotika teuer sind und daß sie u.U. im anschließenden Aufarbeitungsprozeß nachweisbar entfernt werden müssen.

Stabilisierung von Plasmiden durch Zugabe von Ampicillin

Aufgrund der historischen Entwicklung bakterieller Vektoren enthalten viele, auch viele kommerzielle Vektoren, das Gen für die β -Lactamase. Dieses Gen, *bla*, ermöglicht den vektorhaltigen Zellen die Ausprägung der Resistenz gegen Ampicillin und anderen Penicillinabkömmlingen. Eine Erhöhung der Plasmidstabilität durch Zugabe von Ampicillin in das Kultivierungsmedium ist jedoch nur zum Teil möglich [STIEGELMEIER, 1995]. Die β -Lactamase wird bei *E. coli* ins Periplasma exportiert und gelangt teilweise sogar ins Medium [GEORGIU *et al.*, 1988]. Sie zersetzt dort das vorliegende oder zugeführte Ampicillin. Um diesen Einfluß genauer zu erfassen, wurden Proben einer Fermentation

von *E. coli* MM294 pAA182 untersucht.

Bildung von β -Lactamase in Fermentationsmedien

Zur Bestimmung der β -Lactamase in Fermentationsmedien wurden Proben zentrifugiert und 20-100 μ L des Überstands in 900-980 μ L β -Lactamasereagenz gegeben. Dieses bestand aus 20 mM Tris pH 8,0 und 37 μ M PADAC (Calbiochem, Bad Soden), welches als Substrat für die β -Lactamase diente. Bei seiner Umsetzung erfolgt eine Farbänderung von violett nach gelb. Diese Änderung der Absorption bei 570 nm wird gemessen.

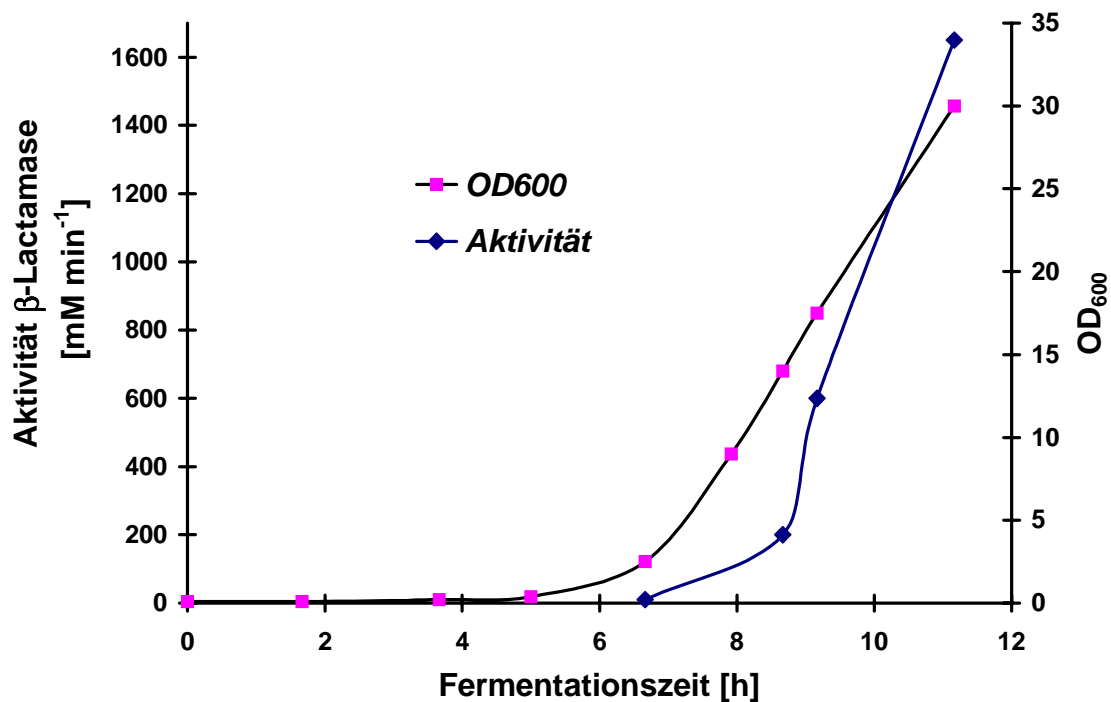


Abbildung 3.2-3: Bildung von β -Lactamase während einer Fermentation

E. coli MM294 pAA182 wurde in TB-Medium angezüchtet. Das Plasmid pAA182 verfügt neben anderen Genen auch über *bla*, das für die β -Lactamase kodiert [BELL *et al.*, 1990a]. Die Aktivität der β -Lactamase wurde wie oben beschrieben bestimmt.

Im Laufe der Fermentation wurde β -Lactamase in das Medium abgegeben. Dabei wurden so hohe Konzentrationen erreicht, daß im untersuchten Fall bei einer $\text{OD}_{600} \approx 17$ Ampicillin in einer Konzentration von $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ binnen einer Minute zersetzt wurde. Dies bedeutet, daß vorgelegtes aber auch neu zugegebenes Ampicillin rasch zersetzt würde und somit der Selektionsdruck zur Stabilisierung eines Plasmides nicht mehr gegeben war. Ampicillin hatte am Anfang der Fermentation, d. h. in der lag-Phase und am Beginn der exponentiellen Phase noch eine stabilisierende Wirkung, später nicht mehr. Befindet sich in der Vorkultur β -Lactamase, so ist der anfängliche Selektionsdruck praktisch nicht vorhanden. Nur wenn die Vorkultur vor der Inokulation gewaschen wird, kann dieser

Effekt vermieden werden [STIEGELMEIER, 1995].

Stabilisierung durch Ampicillin im Chemostaten

Anders stellt sich das Problem der Zersetzung von Ampicillin durch sekretierte β -Lactamase bei kontinuierlicher Kultivierung. Durch stetige Zugabe von Ampicillin im Zulauf und gleichzeitiges Abführen von β -Lactamase im Ablauf sollte ein gewisser Selektionsdruck aufrecht erhalten werden können. Das Ergebnis eines entsprechenden Experiments zeigt Abbildung 3.2-4.

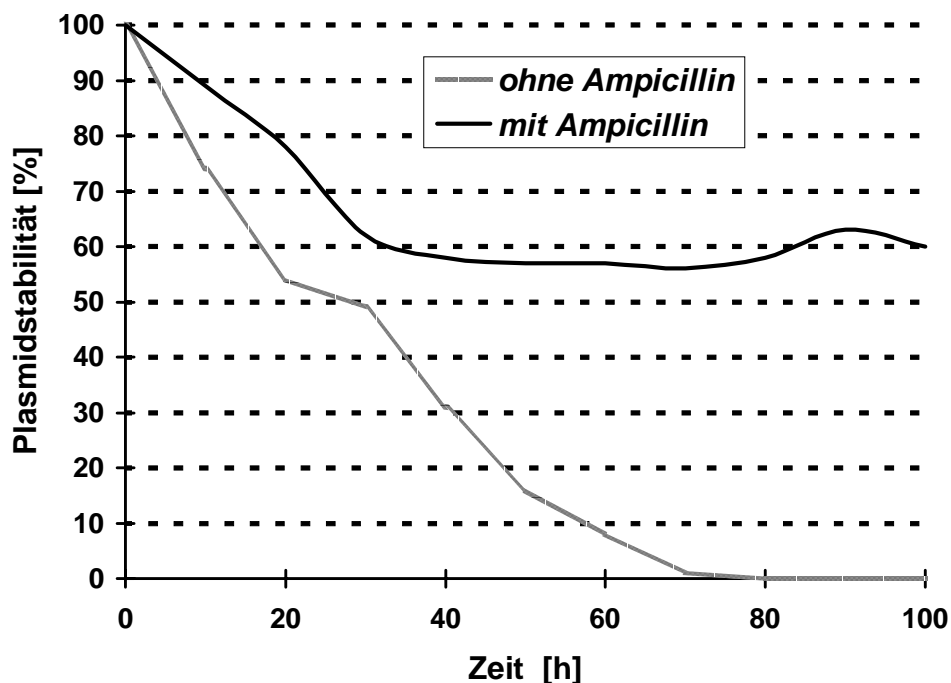


Abbildung 3.2-4: Plasmidstabilität bei kontinuierlicher Fermentation und Zugabe von Ampicillin

Verlauf der Plasmidstabilität einer kontinuierlichen Kultur von *E. coli* JM103 pOU79 in Medium mit Ampicillin (M9) und ohne Ampicillin (LB), $D = 0,25$. Das Plasmid pOU79 ist gleich aufgebaut wie pOU130, enthält jedoch keine *par*-Region. Das Plasmid pOU130 ist in Abbildung 3.1-4 beschrieben.

Nach 60 h Fermentation war die Plasmidstabilität beim System *E. coli* JM103 pOU79 in LB-Medium ohne Ampicillin auf Null gesunken. In M9-Medium mit $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in der Vorlage und im Zulauf pendelte sich die Plasmidstabilität bei ca. 60 % ein [EDLER *et al.*, 1989; FRIEHS & SCHÜGERL, 1990]. Dieses Experiment zeigte, daß durch kontinuierliche Zugabe von Ampicillin und Abführung sekretierter β -Lactamase im Chemostaten der Selektionsdruck zumindest teilweise aufrecht erhalten werden kann.

3.2.4 Segregative Stabilisierung über eine spezielle genetische Funktion (*par*)

Neben der Stabilisierung von Plasmiden über einen Selektionsdruck wird vor allem versucht durch bestimmte genetisch kodierte Funktionen eine Stabilisierung zu ermöglichen. Dazu gehört das *par*-System (*partitioning*), bei dem einer Reihe von genetischen Elementen die sichere Weitergabe von Plasmiden auf die Tochterzelle steuert.

Vergleich der Plasmidstabilität eines Plasmides mit und ohne *par*-Region

Als Versuchssysteme wurden jeweils *E. coli* K12 JM103 mit den Plasmiden pOU130 oder pOU79 verwendet. Das Plasmid pOU130 ist in Abbildung 3.1-4 beschrieben. Das Plasmid pOU79 (11,83 kBp) ist gleich aufgebaut wie pOU130 (16,4 kBp), enthält jedoch keine *par*-Region.

Die Versuche wurden in einem Bioreaktor der Firma Bioengineering (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit einem Arbeitsvolumen von 1,5 L durchgeführt. Als Medium wurde LB verwendet. Die Raumgeschwindigkeit *D* (auch als Verdünnungsrate bezeichnet) betrug $0,25 \text{ h}^{-1}$. Die Vorkulturen enthielten LB-Medium mit 100 mg L^{-1} Ampicillin. Der Reaktor wurde jeweils mit 75 mL Vorkultur beimpft. Während der Kultivierung wurden Proben gezogen und wie unter 3.3.2.1 beschrieben die Plasmidstabilität bestimmt. Abbildung 3.2-5 zeigt das Ergebnis.

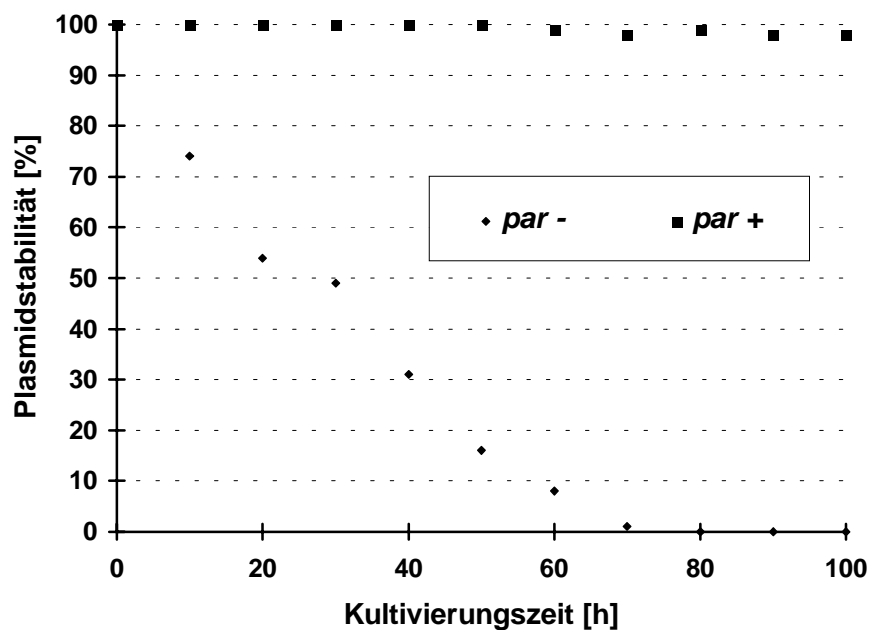


Abbildung 3.2-5: Vergleich der Plasmidstabilität bei kontinuierlicher Kultivierung

Verlauf der Plasmidstabilität einer kontinuierlichen Kultur von *E. coli* JM103 pOU130 (*par*+) und *E. coli* JM130 pOU79 (*par*-). Medium: LB, $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$.

Nach 60 h war die Plasmidstabilität beim System *E. coli* JM130 pOU79 auf ca. 0,1 gesunken. Beim System *E. coli* JM103 pOU130 konnte noch nach 100 h Kultivierungszeit eine Plasmidstabilität von 98 - 99 % gefunden werden [EDLER *et al.*, 1989; FRIEHS & SCHÜGERL, 1990]. Diese Experimente zeigen deutlich, daß mit der *par*-Region eine überaus effiziente Stabilisierung der segregativen Plasmidstabilität erfolgen kann.

3.2.5 Segregative Plasmidstabilität durch hohe Kopienzahl und in einem Mehrplasmid-System

Die Plasmidkopienzahl kann einen wichtigen Einfluß auf die Plasmidstabilität haben. Je höher die Plasmidkopienzahl ist, desto wahrscheinlicher ist es, zumindest statistisch betrachtet, daß eine Kopie auf jede Tochterzelle bei der Teilung weitergegeben wird.

Eine besondere Situation für die Plasmidstabilität ergibt sich bei Organismen, die verschiedene Plasmide enthalten. Üblicherweise wird versucht, alle notwendigen Informationen eines Expressionssystems auf ein Plasmid zu konzentrieren. Es kann jedoch vorkommen, daß im Laufe der Entwicklung eines Systems mehrere unterschiedliche Plasmide gleichzeitig im Organismus ihre Funktion zu erfüllen haben. Ein solches System wird im folgenden beschrieben [MASCHKE *et al.*, 1989, MASCHKE *et al.*, 1990].

Zum Einsatz kam der Stamm *E. coli* JM103 mit den drei Plasmiden pRK248, pEcoR4 und pMTC48. Der Stamm *E. coli* JM103 enthielt im Gegensatz zum Stamm *E. coli* TGE900 im Chromosom kein Gen für den temperatursensitiven λ -Repressor CI857. Die relevanten Eigenschaften dieser Plasmide sind in Tabelle 3.2-1 zusammengestellt.

Tabelle 3.2-1: Eigenschaften der Plasmide im verwendeten Mehrfach- Plasmid-System

Plasmid	Größe [Bp]	Kopienzahl	Selektionsmarker	Expression von
pMTC48	4860	80 - 100	Ampicillinresistenz	Restriktionsenzym EcoRI als SpA-Fusion
pEcoR4	6000	20 - 30	Chloramphenicolresistenz	EcoRI-Methylase
pRK248	9200	5 - 10	Tetracyclinresistenz	λ -Repressor

Das Plasmid pMTC48 enthielt das Gen für die Restriktionsendonuklease EcoRI als Fusion mit dem *Staphylococcus* Protein A (SpA). Das Gen stand unter der Kontrolle des

durch eine Temperaturerhöhung induzierbaren Promotors λP_L . Eine Überexpression dieses Enzyms führte zum Tod der Zellen. Um die Zellen vor der Wirkung von EcoRI zu schützen, befand sich das Plasmid pEcoR4 zusätzlich in der Zelle. Dieses Plasmid enthielt das Gen für eine Methylase, die genau die Schnittstellen für EcoRI methyliert und somit die DNS vor dem Angriff von EcoRI schützen kann. Dieser Schutz reichte jedoch nicht aus. Der induzierbare Promotor λP_L brauchte zur Repression den λ -Repressor CI857. Daher wurde das Plasmid pRK248 in den Stamm eingeführt, das u.a. für den λ -Repressor kodierte. Durch diese beiden zusätzlichen Plasmide war es möglich mit dem beschriebenen System das Restriktionsenzym EcoRI zu überexprimieren. Theoretisch war für die segregative Plasmidstabilität dieses Systems die Zugabe der Antibiotika Ampicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin notwendig.

Als erstes wurde untersucht, wie sich die Plasmidstabilität der einzelnen Plasmide verhält, wenn dem Medium kein Antibiotikum zugegeben wird. Dazu wurde der Stamm in einem Bioreaktor Biostat D (B.BRAUN, Melsungen) in 1,5 L M9-Minimalmedium im kontinuierlichen Verfahren bei einer Raumgeschwindigkeit von $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ und 3 g L^{-1} Glucose in M9-Medium im Zulauf kultiviert. Die Fermentationszeit betrug 120 h und entsprach ca. 24 Generationszeiten. Den Verlauf der Stabilitäten der einzelnen Plasmide zeigt Abbildung 3.2-6.

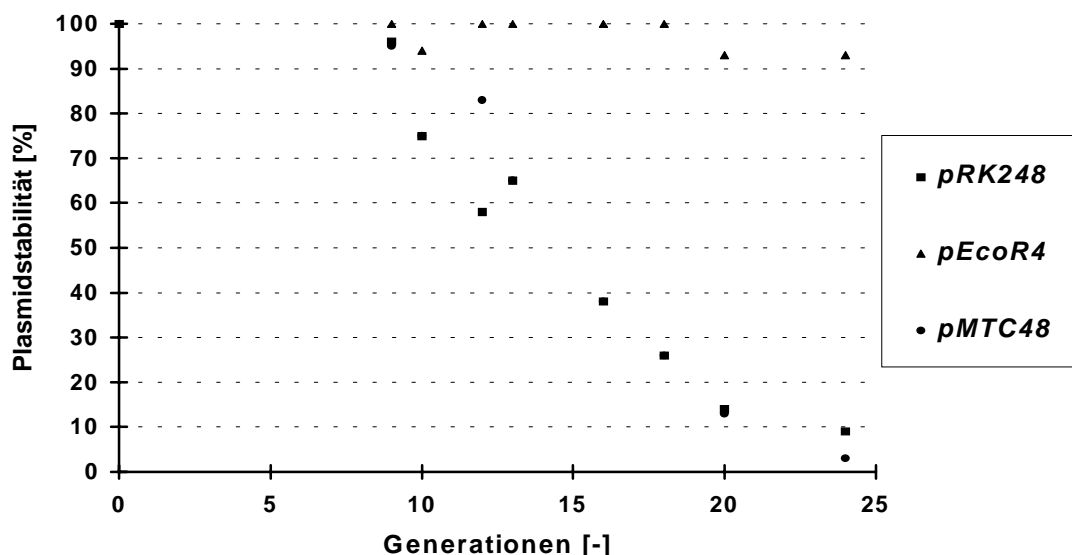


Abbildung 3.2-6: Verlauf der Plasmidstabilität in einem Mehrfach- Plasmid-System ohne Selektionsdruck

Der Stamm *E. coli* JM103 enthielt die Plasmide pRK248, pEcoR4 und pMTC48. Die Anzucht erfolgte kontinuierlich bei $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ und 3 g L^{-1} Glucose in M9-Medium im Zulauf. Die Fermentationszeit betrug 120 h und entsprach ca. 24 Generationszeiten.

Das Plasmid pEcoR4 blieb über die gesamte Fermentationszeit stabil. Die Ursache lag wahrscheinlich in der hohen Kopienzahl (20-30) und bestätigt die Annahme, daß hohe Kopienzahlen die Plasmidstabilität begünstigen. Das Plasmid pMTC48 hatte eine höhere Plasmidkopienzahl (80-100) als pEcoR4, aber eine geringere Plasmidstabilität. Nach 24 Generationen enthielten nur noch ca. 10 % der Zellen das Plasmid. Dieser Widerspruch ist erklärbar, wenn die Stabilität von pRK248 betrachtet wird. Dieses Plasmid hatte eine Kopienzahl von 5-10 und dadurch auch eine geringe Plasmidstabilität. Sobald jedoch Zellen dieses Plasmid verloren gingen, wurde kein λ -Repressor produziert und die Zellen exprimierten die Restriktionsendonuklease EcoRI als SpA-Fusion. Dies war für die Zellen toxisch. Es entstand ein negativer Selektionsdruck und alle Zellen ohne pRK248 aber mit pMTC48 starben. Die Plasmidstabilität von pMTC48 war daher direkt an die Stabilität von pRK248 gekoppelt. Um dies zu zeigen, mußte es möglich sein pMTC48 indirekt zu stabilisieren, wenn pRK248 durch Zugabe von Tetracyclin, wofür es ein Resistenzgen besaß, stabilisiert wurde. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt Abbildung 3.2-7.

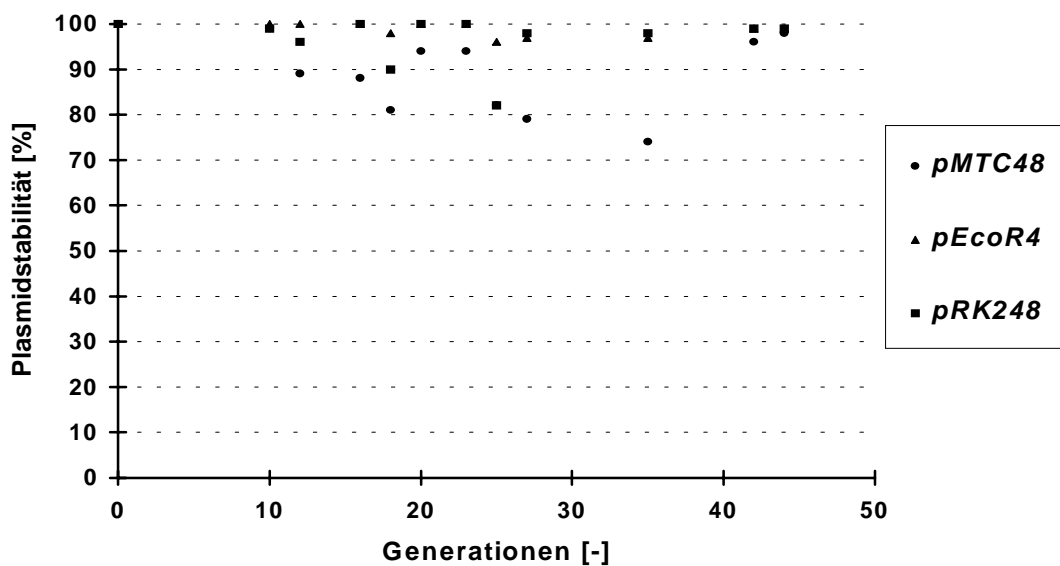


Abbildung 3.2-7: Verlauf der Plasmidstabilität in einem Mehrfach- Plasmid-System mit Selektionsdruck

Der Stamm *E. coli* JM103 enthielt die Plasmide pRK248, pEcoR4 und pMTC48. Die Anzucht erfolgte kontinuierlich bei $D=0,3 \text{ h}^{-1}$ und 3 g L^{-1} Glucose in M9-Medium im Zulauf. Das Medium enthielt 10 mg L^{-1} Tetracyclin. Die Fermentationszeit betrug ca. 220 h und entsprach in etwa 44 Generationszeiten.

Das Plasmid pEcoR4 blieb wiederum über die ganze Kultivierung stabil. Durch die Zugabe von Tetracyclin in das Medium wurde das Plasmid pRK248 mit der geringen Plasmidkopienzahl stabilisiert. Dadurch entstand kein negativer Selektionsdruck für pMTC48 da durch den λ -Repressor auf pRK248 keine Expression der Restriktionsaktivität auf pMTC48 entstehen konnte. Dies ermöglichte dem Plasmid pMTC48 sich über seine

hohe Kopienzahl zu stabilisieren. Dadurch war es möglich das gesamte System durch Zugabe nur eines Antibiotikums statt der theoretisch notwendigen drei Antibiotika, segregativ stabil zu halten.

3.2.6 Einfluß des Mediums auf die segregative Plasmidstabilität

Ein Einfluß des Mediums auf die Plasmidstabilität ist dann gegeben, wenn sich das Medium signifikant auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit auswirkt. Das Ergebnis eines entsprechenden Experiments zeigt Abbildung 3.2-8.

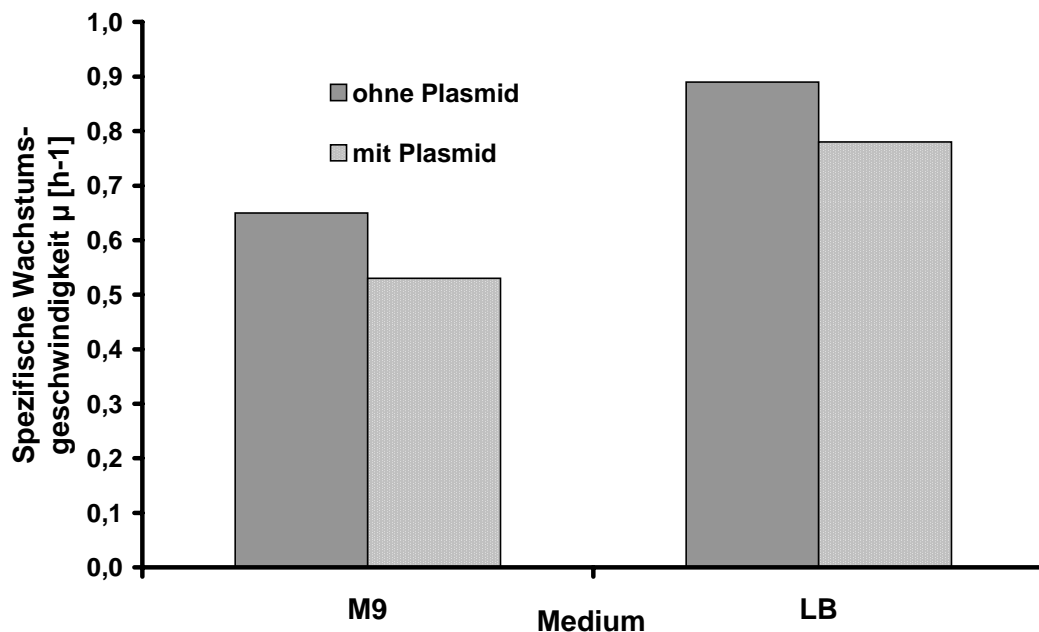


Abbildung 3.2-8: Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit vom Medium

Der Stamm *E. coli* TG900 mit und ohne Plasmid pEcoR4 wurde in M9- und LB-Medium angezchtet und die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt.

In beiden Medien sank die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit μ , wenn das Plasmid pECoR4 in der Zelle vorlag. Jedoch ist zu erkennen, daß die Abnahme im Falle des LB Mediums geringer ist, als bei Verwendung von M9-Minimalmedium. Beim LB-Medium sank μ auf 88 % des Ausgangswerts, während beim M9-Medium μ auf 82 % sank. Dies bedeutet, daß plasmidfreie Zellen im M9-Medium einen höheren Wachstumsvorteil genossen als im LB-Medium und damit die Plasmidstabilität im M9-Medium geringer war.

Segregative Plasmidstabilität kann auf verschiedene Art und Weise verbessert werden. Die

Verwendung entsprechender genetischer Elemente führt zwar zu hohen Stabilitäten aber auch zu sehr großen Plasmiden, was die strukturelle Instabilität begünstigen kann. Selektionsdruck durch Zugabe von Antibiotika macht nur Sinn, wenn die resistenzbewirkenden Enzyme nicht in das Medium ausgeschieden werden und den Selektionsdruck schnell zunichte machen. Einen gewissen Einfluß kann sicherlich durch die Wahl des Stammes, des Mediums und des Kultivierungsverfahrens erreicht werden. Ein wichtiges Problem bei der Optimierung der Stabilität liegt in der aufwendigen und zeitintensiven Analytik. Die schnelle Bestimmung der Plasmidkopienzahl kann zwar zu Hinweise für die segregativen Stabilität führen, jedoch keine eindeutigen Aussagen über die Heterogenität einer Population treffen.

3.3 Plasmidformen: Bedeutung und Analytik

Plasmide können in sehr verschiedenen Formen auftreten. Grundsätzlich kennt man sowohl lineare als auch ringförmige Plasmide. Lineare Plasmide wurden in vielen Bakterienarten wie *Borrelia*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Nocardia* sowie *Rhodococcus* [HINNEBUSCH & TILLY, 1993] und in Pilzen und höheren Pflanzen [MEINHARDT *et al.*, 1990] gefunden. Die meisten Plasmide, die in *E. coli* entdeckt wurden, bestehen aus ringförmiger doppelsträngiger DNS. Plasmide können durch das Enzym DNS-Gyrase, eine Topoisomerase-II, zu einer superspiralisiert Form verdrillt werden [REECE & MAXWELL, 1991], die in Anlehnung an die englischsprachige Fachliteratur als "supercoiled circular covalently closed" oder einfach abgekürzt als "ccc-Form" bezeichnet wird. In den meisten Fällen ist die Verdrillung entgegengesetzt zur Richtung der DNS-Helix und wird daher als negative Superspiralisierung bezeichnet [TRAVERS, 1993]. Diese Superspiralisierung wird durch die Topoisomerase-I aufgehoben [LUTTINGER, 1995], so daß ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der superspiralisierten Form und der entspannten Form in der Zelle vorliegt. Da die Superspiralisierung sicherlich einen Einfluß auf die Replikation und Transkription hat, spielt sie bei der Regulation der gesamten Zellmaschinerie eine Rolle. Durch den Bruch eines Stranges der DNS wird die ccc-Form entspannt (relaxed) und geht in die sogenannte "open circle", abgekürzt oc-Form, über. Bei Brüchen in beiden Strängen wird das Plasmid linearisiert, vorausgesetzt beide Brüche liegen an der selben Stelle. Bei der Verwendung von Restriktionsenzymen, für welche das Plasmid Einzelschnittstellen aufweist, werden ebenfalls lineare Plasmide erzeugt.

Neben diesen verschiedenen monomeren Plasmidformen können auch entsprechende multimere Formen auftreten. Dabei unterscheidet man zwischen Konkatemere und

Katenane. Konkatemere sind echte Oligomere, d. h. sie bilden ein ringförmiges Molekül, indem die gesamte Sequenz mehrfach wiederholt vorliegen kann. Bei Katenanen [Christen, 1970], von manchen Autoren auch als Konkatenate bezeichnet [MARTIN, 1996], sind die einzelnen Monomere wie die Glieder einer Kette miteinander verbunden [BELGAUFTS, 1993].

Die wichtigsten multimeren Formen sind Plasmiddimere. Dimere Katenane können bei der Plasmidreplikation entstehen. Konkatemere können ebenfalls bei der Replikation entstehen, bilden sich aber wahrscheinlich hauptsächlich postreplikativ durch homologe Rekombination [SUMMERS *et al.*, 1993]. Die Ausbildung von Oligomeren ist plasmidspezifisch. Es gibt Hinweise, daß es zu einem höheren Anteil an Oligomeren kommt, desto größer das zusätzlich eingebaute DNS-Fragment in einem Plasmid ist [SUMMERS *et al.*, 1993]. Auch Oligomere können als superspiralisierte ccc-Formen oder oc-Formen vorkommen. Bei Behandlung mit Einzelschnitt-Restriktionsenzymen zerfallen sie in lineare Monomere.

Eine Plasmidprobe kann sehr viele unterschiedliche Plasmidformen enthalten. Einige können aufgrund der sehr niedrigen Konzentration kaum oder gar nicht isoliert und bestimmt werden. Bei einer Analytik der Plasmidformen kann es deshalb nur darum gehen, den Anteil der Hauptformen zu bestimmen. Diese Hauptformen umfassen die ccc-, oc und lineare Form des Monomers und falls mengenmäßig relevant, die ccc- und oc-Form des Dimers. Alle weiteren Formen spielen praktisch keine Rolle und werden hier vernachlässigt. Wenn im folgenden von Plasmidformen gesprochen wird so handelt es sich daher um die eben beschriebenen Hauptformen.

3.3.1 Plasmidqualität und Qualitätskontrolle

Ein entscheidender Faktor für die Qualität von Plasmid-DNS ist die Plasmidformenverteilung, also die Plasmidhomogenität. Diese ist zunächst deshalb wichtig, weil bei Therapeutika die Produkthomogenität eine grundlegende Qualitätsanforderung darstellt. Entsprechende Richtlinien für die Herstellung und Verwendung von Plasmid-DNS werden durch die Weltgesundheitsorganisation in Zusammenarbeit mit staatlichen Stellen (Bundesgesundheitsamt, Food and Drug Administration), diversen Anwendern dieser neuen Therapieform und den Herstellern (z. B. der QIAGEN GmbH) erarbeitet. Ein allgemein vorausgesetzter Richtwert ist ein Mindestgehalt von 90 % superspiralisierter ccc-Form in gereinigter Plasmid-DNS. Deshalb ist die Bestimmung der Plasmidformenverteilung ein spezielles analytisches Problem sowohl bei der fermentativen Herstellung von therapeutisch einsetzbaren

Plasmidfraktionen als auch bei der Qualitätskontrolle formulierter, darauf basierender Medikamente.

Die analytische Bestimmung der Verteilung der Plasmidformen einer isolierten Plasmidmenge beginnt mit der Trennung der einzelnen Formen. Anschließend werden die einzelnen Fraktionen, Banden oder Signale den jeweiligen Formen zugeordnet. Danach müssen sie quantifiziert bzw. mengenmäßig zueinander in Relation gebracht werden. Eine qualitative Aussage über die Plasmidformenverteilung kann über Elektronenmikroskopie erzielt werden. Die klassische Bestimmung der Formenverteilung erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese. Neue Entwicklungen verwenden Kapillargelelektrophorese. Diese Methoden werden im folgenden beschrieben.

3.3.2 Identifizierung von Plasmidformen mittels Elektronenmikroskopie

Für diese Experimente wurde das Plasmid pCMV-S2S [MICHEL *et al.*, 1995] mit einer 5,7 kbp) aus dem Stamm *E. coli* DH5 α isoliert. Dieses Plasmid kann als Vektor bei der genetischen Impfung eingesetzt werden [DAVIS *et al.*, 1994]. Abbildung 3.3-1 zeigt Ausschnitte von Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) der verwendeten pCMV-S2S-Plasmidprobe. Vier verschiedene Formen ließen sich hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Konformation unterscheiden. Einige Moleküle waren stark verdrillt, was auf die Anwesenheit von ccc-Formen zurückzuführen war. Aber auch unverdrillte oc-Formen konnten identifiziert werden. Diese können durch Bestrahlung von ccc-Formen mittels UV-Licht entstehen [SIES *et al.*, 1996]. Besonders bei den oc-Formen konnten Monomere und Dimere deutlich unterschieden werden [SCHMIDT *et al.*, 1999a].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plasmidproben wurden von der Abteilung *Biomedizinische Strukturforschung* des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt und dokumentiert. Vor der Präparation wurden die Proben mit TE-Puffer bis zu einer DNS-Konzentration von 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ verdünnt. Der Präparationsansatz bestehend aus 6 μL TE-Puffer, 3 μL 500 mM MgCl_2 -Lösung, 4 μL verdünnter Probe und 47 μL H_2O wurde auf Glimmer gegeben und 60 s adsorbiert. Anschließend wurde dieser zweimal je 30s in Wasser gewaschen, 60 s in 2 % Uranylacetat-Lösung inkubiert und erneut zweimal je 30 s mit Wasser gewaschen. Nach Absaugen des Wassers wurde das Präparat luftgetrocknet und anschließend durch Rotationsbedampfung mit Pt/C kontrastiert.

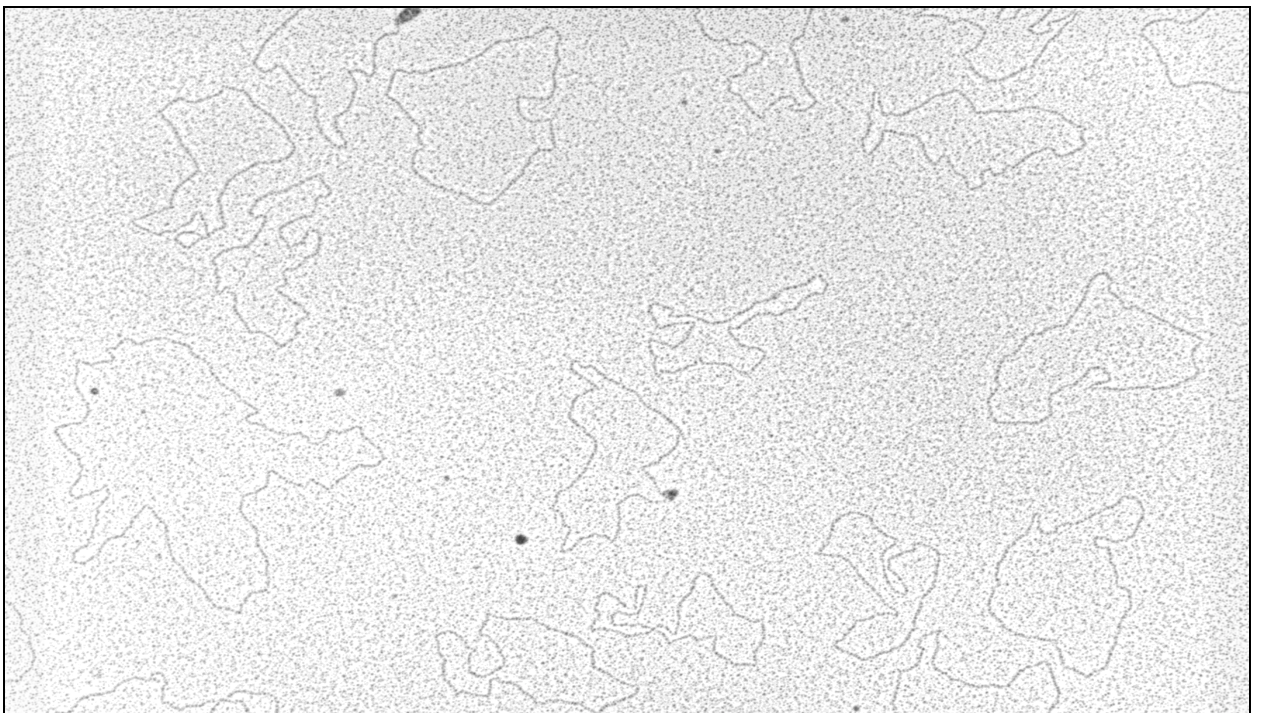
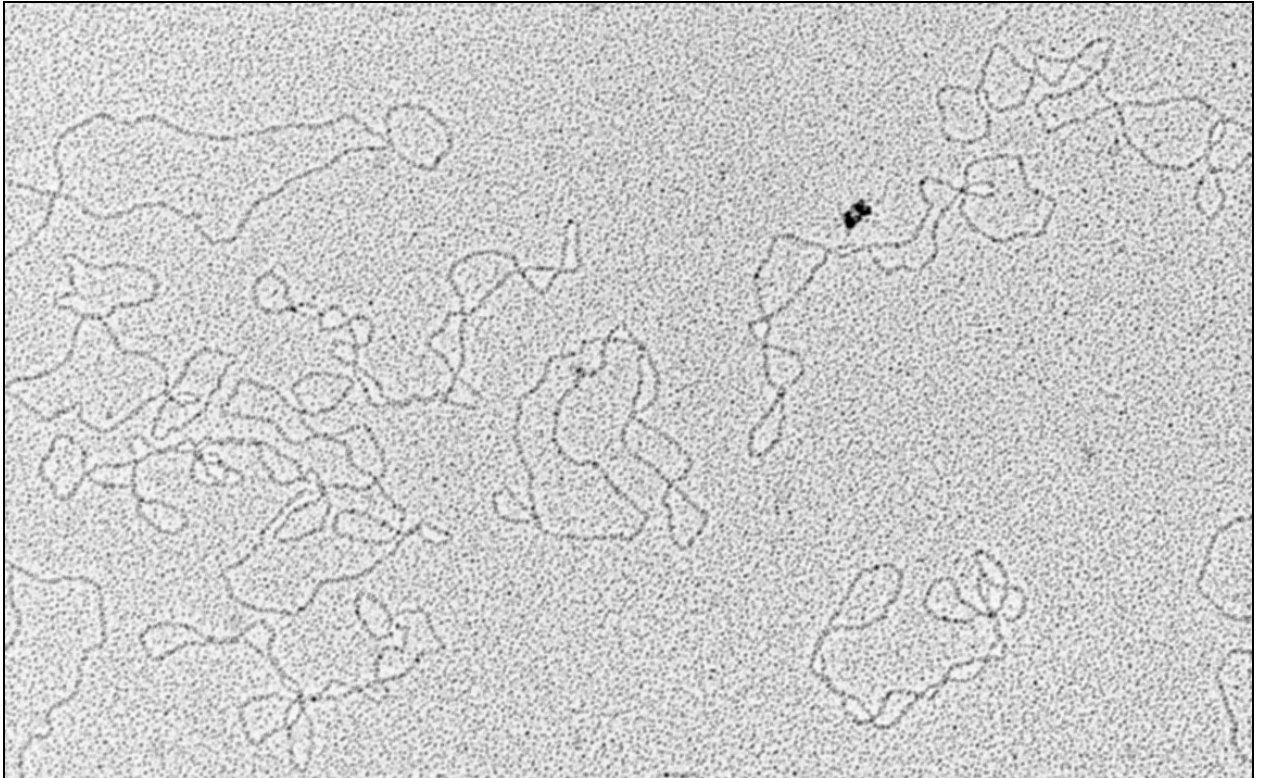


Abbildung 3.3-1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von pCMV-S2S Plasmid-DNS.

Oben: unbehandelte Plasmid-DNS
Unten: Plasmid-DNS nach Bestrahlung mit UV-Licht
Präparations- und Aufnahmebedingungen im Text

Betrachtet man die elektronenmikroskopische Aufnahme der unbehandelten Plasmid-DNS so sind vier verschiedene Formen zu erkennen. Dabei ähneln zwei Formen, die sich in ihrer Größe unterscheiden, einem Knäuel und entsprechen den superspiralisierten ccc-Formen des Monomers bzw. des Dimers. Die anderen beiden Formen entsprechen den jeweiligen entspannten Plasmiden in oc-Form. Noch deutlicher sind die entspiralisierten Formen in der Aufnahme der mit UV-Licht (254 nm, 15W, Bestrahlungszeit 30-45 min) behandelten Probe zu erkennen. Hier wird besonders deutlich, daß sowohl Monomere als auch Konkatemer - Dimere vorhanden sind. Somit konnten in der Probe folgende vier Formen identifiziert werden: ccc-Monomer, oc-Monomer, ccc-Dimer und oc-Dimer. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen eignen sich jedoch nicht für eine Quantifizierung der Proben.

3.3.3 Zuordnung von Plasmidformen zu Banden in Agarosegelen

Bei dieser Methode werden die einzelnen Plasmidformen im Agarosegel getrennt und den jeweiligen Plasmidbanden zugeordnet. Diese Zuordnung ist nicht immer einfach. Oftmals kann hierbei auf die Fachliteratur zurückgegriffen werden. Dabei ist jedoch Vorsicht angebracht, da in einigen Veröffentlichungen die Schlußfolgerungen bezüglich der Plasmidformen nicht immer logisch nachvollziehbar sind.

Für diese Experimente wurde das Plasmid pUC19 verwendet, ein bekannter und weit verbreiteter Vektor, der mit 2686 Bp deutlich kleiner ist als pCMV-S2S mit 5,7 kBp. Der Nachweis von Dimeren sollte auf andere Art und Weise erfolgen, als mittels Elektronenmikroskopie. Das Plasmid wurde in ausreichenden Mengen aus dem Stamm *E. coli* DH5 α (Maxiprep, QIAGEN, Hilden) isoliert. Ein Teil des Plasmids wurde mit UV-Licht bestrahlt. Dazu wurde die DNS-Lösung (0,5 gL⁻¹) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für 5 bis 45 min einem Licht von 254 nm und einer Leistung von 15 W im Abstand von 15 cm ausgesetzt. Ein anderer Teil der pUC19-Plasmid-DNS wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRI* vollständig bzw. partiell linearisiert. Die partielle Linearisierung diente zum Nachweis von Dimeren. Aliquots der isolierten Plasmide wurden mit verschiedenen Mengen des Restriktionsenzym *EcoRI* behandelt und die Reaktion mittels Temperaturerhöhung gestoppt. Wenn nicht genügend Enzym für einen vollständigen Schnitt eingesetzt wurde, konnten Dimere nur einmal geschnitten werden und es sollten lineare Dimere entstehen. Das Ergebnis der anschließenden Agarosegelelektrophorese der verschiedenen Ansätze ist in Abbildung 3.3-2 zu sehen.

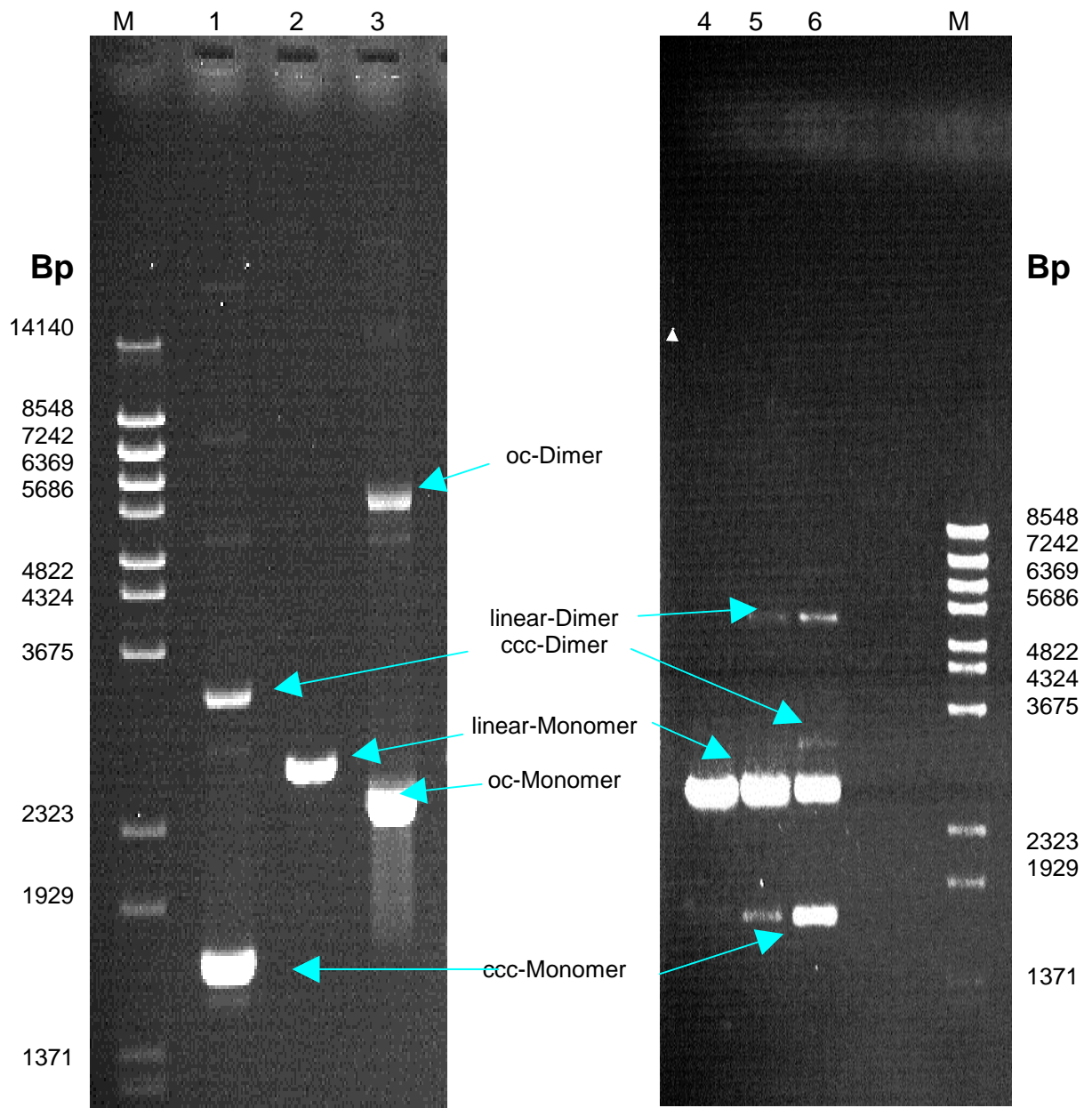


Abbildung 3.3-2: Agarosegelelektrophorese von pUC19

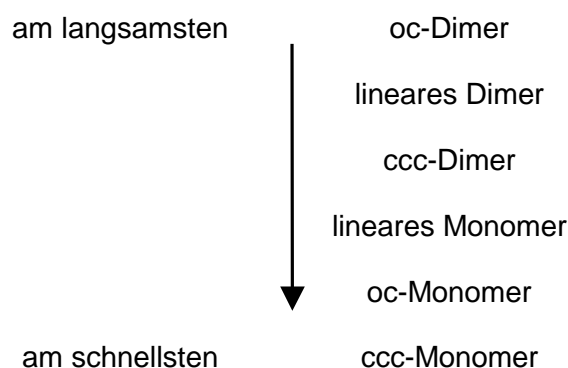
Spur M: λ -BstE II-Größenstandard
 Spur 1: unbehandelte DNS
 Spur 2: linearisierte DNS
 Spur 3: UV-bestrahlte DNS

Spur 4: 1 U EcoRI, partielle Restriktion
 Spur 5: 0,1 U EcoRI, partielle Restriktion
 Spur 6: 0,01 U EcoRI, partielle Restriktion
 Spur M: λ -BstE II-Größenstandard

Von jeder Probe wurde ca. 500 ng DNS aufgetragen. Beide 1,0 %-Gele wurden erst nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die Spuren M enthielten jeweils den λ -BstE II-Größenstandard. In der Abbildung 3.3-2 sind den verschiedenen Banden die entsprechende Formen zugeordnet. Diese Zuordnung erfolgte aufgrund folgender Überlegungen. Spur 1 (unbehandelte DNS)

enthielt 2 Hauptbanden. Die unterste Bande wurde der monomere ccc-Form zugeordnet, da sie die Bande mit der größten Mobilität war [SUMMERS, 1997] und diese Form üblicherweise auch den Hauptanteil bei Plasmidisolierungen bildet. Dies wurde durch Spur 2 und 3 bestätigt. Beide Spuren konnten aufgrund der Linearisierung bzw. UV-Behandlung diese Bande nicht mehr enthalten, was zutraf. Die zweite langsamer laufende Bande in Spur 1 konnte die monomere oc-Form darstellen. Dies war jedoch nicht der Fall, da sie bei UV-Behandlung, die ja die ccc-Form in die oc-Form überführt, nicht stärker wurde, sondern ganz verschwand. Daher lag die Vermutung nahe, daß es sich bei dieser Bande um die dimere ccc-Form handelte. Die Existenz des Dimers in der Probe konnte durch partielle Schnitte gezeigt werden. Die Spuren 4, 5, und 6 zeigten das Bandenmuster nach der Behandlung der Probe mit abnehmender Konzentration an Restriktionsenzym EcoRI. Der Ansatz für Spur 4 enthielt genug EcoRI um alle Formen zu linearisieren. In Spur 5 waren noch Reste der monomeren ccc-Form zu erkennen sowie eine zusätzliche Bande zwischen den Größenmarkerbanden 4,8 kBp und 5,7 kBp. Spur 6, mit dem geringsten Einsatz von EcoRI, enthielt noch deutliche Mengen der monomeren ccc-Form sowie Reste der dimeren ccc-Form. Die zusätzliche Bande aus Spur 5 war hier noch deutlicher zu erkennen. Die Größe (Bp) des Fragments dieser Bande wurde graphisch durch logarithmische Auftragung der Basenpaare der Standardbanden gegen die Laufstrecke ermittelt. Das Fragment hatte eine Größe von 5,4 kBp, was genau der doppelten Größe von pUC19 entspricht. Es handelte sich hier eindeutig um das lineare Dimer, das mit zunehmender Konzentration von EcoRI in das lineare Monomer überführt wurde. Spur 2 und Spur 4 enthielt nur die Bande des linearen Monomers. Aufgrund der Überladung der Bande mit DNS wanderte sie schneller und entspricht daher scheinbar einem Fragment mit etwas geringerer Größe als pUC19. Nachdem so die Existenz eines Dimers gezeigt worden war, konnte der oberen Bande in Spur 3 die oc-Form des Dimers zugeordnet werden, die durch UV-Bestrahlung des ccc-Dimers entstand. Damit ergab sich für die verschiedenen Formen von pUC19 in einem 1,0 % Agarosegel mit Färbung nach der Elektrophorese folgende Mobilität:



Beim Plasmid pCMV-S2S zeigte das oc-Monomer eine geringere Mobilität als das lineare Monomer [SCHMIDT, 1996]. Es gibt verschiedene Einflüsse auf die Wanderungsgeschwindigkeit wie etwa die Plasmidgröße oder die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bereits vor der Elektrophorese zu den Proben [JOHNSON *et al.*, 1977, SERWER *et al.*, 1984, GARNER *et al.*, 1992]. Eine bestimmte Reihenfolge der Plasmidformen im Agarosegel kann daher nicht verallgemeinert werden. Mit der hier aufgezeigten Methode von UV-Bestrahlung und partieller Restriktion lassen sich jedoch die einzelnen dominanten Plasmidformen beliebiger Plasmide den jeweiligen Banden in Agarosegelen zuordnen, vorausgesetzt die Banden der einzelnen Formen lassen sich unter den gewählten Bedingungen trennen.

3.3.4 Zuordnung von Plasmidformen zu Signalen der Kapillargelelektrophorese

Zur Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Plasmidformen mittels Kapillargelelektrophorese (CGE) wurde das System P/ACE 2050 der Firma Beckman Instruments (Fullerton, USA) mit einem Argonionen Laser verwendet. Für die Detektion wird die DNS mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen behandelt, die nach Anregung durch den Laser bei 488 nm Fluoreszenzlicht aussenden, dessen 520 nm-Anteil gemessen wird.

Für die Methodenentwicklung wurde das Plasmid pUC19 verwendet. Es wurde der Stamm *E. coli* DH5 α pUC19 in LB-Medium mit Ampicillin angezüchtet und die Plasmid-DNS mittels Isolierungswerkzeuge der Firma QIAGEN (Hilden) gewonnen. Danach mußten die Formen mittels Kapillargelelektrophorese getrennt und den Signalen zugeordnet werden. Dafür wurde ein Teil der Probe mit Hilfe des RE EcoRI linearisiert und ein weiterer Teil der Probe mit UV-Licht bestrahlt. Für die UV-Bestrahlung wurde die DNS-Lösung (0,5 g L⁻¹) in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für 5 bis 45 min einem Licht von 254 nm und einer Leistung von 15 W im Abstand von 15 cm ausgesetzt. Aus der Agarosegelelektrophorese war bekannt, daß die Trennung und Zuordnung von mindestens 5 Formen, nämlich ccc-, oc- und lineares Monomer sowie ccc- und oc-Dimer, gefordert war. Es gibt eine Reihe von Variablen, die die Trenneigenschaften einer Kapillargelelektrophorese-Methode beeinflussen können. Dazu gehören die Grundvariablen Temperatur, Spannung, Pufferzusammensetzung und Konzentration aber auch Eigenschaften, die das Polymer betreffen, das die Trennmatrix ausbildet. Als erstes wurde die Trennung der Formen bei verschiedenen Konzentrationen eines Polymers untersucht.

3.3.4.1 Trennung von Plasmidformen

Die Art und Konzentration eines Polymers beeinflusst die Viskosität der Lösung und somit die Trenneigenschaften. Neben anderen Polymeren wurde Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) verwendet, dessen Viskosität in einer 2 % wässrigen Lösung bei 25°C 4000 cP betrug. Das Polymer wurde bei verschiedenen Konzentrationen auf seine Trennleistung untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.3-3.

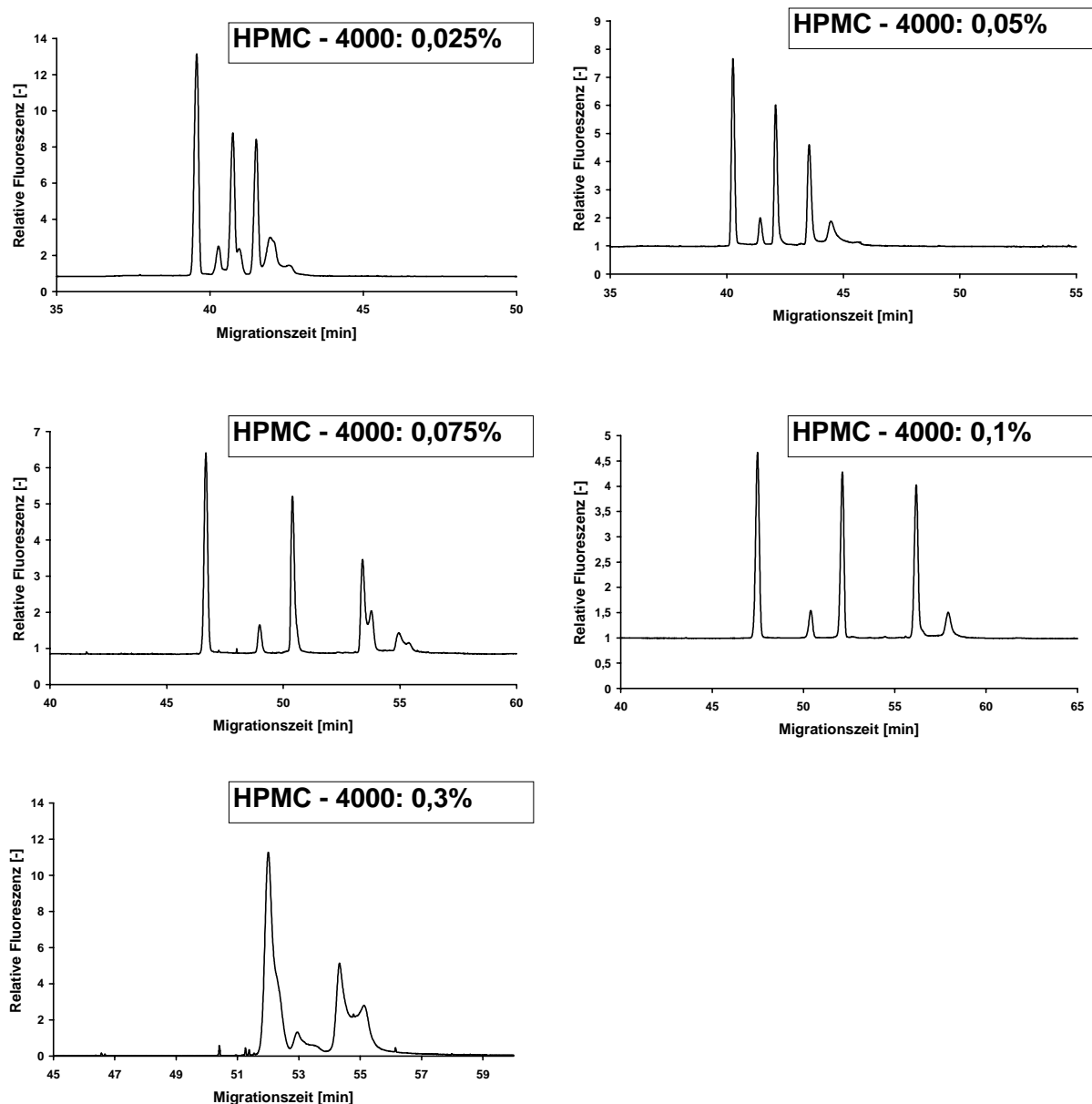


Abbildung 3.3-3 Kapillargelelektrophorese-Elektropherogramme (EPG) von pUC19- bei verschiedenen Polymerkonzentrationen

Die DNS enthielt eine Mischung aus unbehandelter, UV-behandelter und linearisierter Probe. 100 ng DNS wurden mit 45 μ L 1,44 μ M YOYO (YOYO:DNS-Bp 1:5) vorbehandelt. Weitere Parameter: 67 nM YOYO-TBE-Elektrophoresepuffer, 57 cm DB-17-Kapillare; 30 °C; 75 V cm^{-1} ; 1 s hydrodynamische Injektion der Probe, 1 s Injektion des Elektrophoresepuffers. Polymer: HPMC-4000.

Bei Polymerkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,25 % konnten die 5 Formen gut

voneinander getrennt werden. In einer 57 cm langen Kapillare und einer Feldstärke von 75 Vcm^{-1} liegt die Analysenzeit bei ca. einer Stunde. Wie später zu sehen ist, konnte durch Verkürzung der Kapillare und Erhöhung der Spannung diese Zeit auf 30 min verkürzt werden.

3.3.4.2 Zuordnung von Elektropherogrammsignalen zu Plasmidformen

Bei der Zuordnung von Signalen in Elektropherogrammen (EPG) konnte nicht davon ausgegangen werden, daß hier die selbe Mobilität der Formen und somit Reihenfolge der Trennung vorlag, wie im Agarosegel. Dies bedeutete, daß auch hier den einzelnen Signalen durch Kombination von verschiedenen behandelten Plasmidproben die jeweiligen Plasmidformen zugeordnet wurden [SCHMIDT *et al.*, 1999b].

Hinweise auf die Trennung von Plasmidformen finden sich auch in der Literatur [NACKERDIEN *et al.*, 1996, COURTNEY *et al.*, 1995, HAMMOND *et al.*, 1997]. NACKERDIEN und Co-Autoren benutzten bei der Bestimmung der relativen Mobilitäten der verschiedenen Formen die Migrationszeiten. Dies führte jedoch zu falschen Ergebnissen, da Migrationszeiten nicht wie Retentionszeiten in der GC molekülspezifische Konstanten darstellen. Bereits geringe Veränderungen in den Bedingungen, wie z. B. Mischen verschiedener Formen, haben einen signifikanten Einfluß. COURTNEY und Co-Autoren verwenden zur Bestimmung der Konzentration die Peakflächen der Elektropherogramme. Dies führt zu falschen Ergebnissen wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben wurde, da die Moleküle in der Kapillarelektrophorese mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten am Detektorfenster vorbeiwandern. Daher muß die Signalfläche durch die Migrationszeit geteilt werden, um Korrelationen mit der Konzentration zu erhalten. HAMMOND und Co-Autoren verallgemeinern ihre Ergebnisse für alle Plasmide. Es muß jedoch für jedes Plasmid die optimalen Bedingungen bestimmt werden. Dann können Routineanalysen für jegliche Proben dieses Plasmid durchgeführt werden.

Die hier beschriebene Methode der Zuordnung der Signale in Elektropherogrammen beruht darauf, den Anteil von bestimmten Plasmidformen in den Proben gezielt zu erhöhen, um durch Unterschiede der Signalhöhe bzw. -stärke vor und nach der Erhöhung, diesen Signalen die jeweilige Form zuzuordnen. In den unbehandelten Formen lagen hauptsächlich die ccc-Formen vor. Um eine Probe zu erhalten, die hauptsächlich oc-Formen enthielt, wurde Plasmid-DNS mit UV-Licht bestrahlt, d. h. es wurde die Probe verwendet, die bereits bei der Agarosegelelektrophorese zum Einsatz gekommen war (3.4.5). Eine Probe, die nur lineares Monomer enthält, wurde durch Behandlung der Plasmid-DNS mit dem Restriktionsenzym EcoRI erhalten. Um eine Probe mit linearem

Dimer zu erhalten, hätte es einer relativ aufwendigen präparativen Isolierung dieser Form aus Agarosegelen bedurft. Eleganter erschien es, statt eines linearen Dimers von pUC19, die lineare Form eines annähernd doppelt so großen Plasmids zu verwenden, das durch einfache Restriktion leicht hergestellt werden konnte. Naheliegend fiel die Wahl auf das Plasmid pCMV-S2S, von dem elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht worden waren. Dieses Plasmid ist mit 5,7 kBp ein wenig größer als ein pUC19-Dimer mit 5,4 kBp. Unvermischte und verschieden kombinierte Plasmidproben wurden mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese analysiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.3-4.

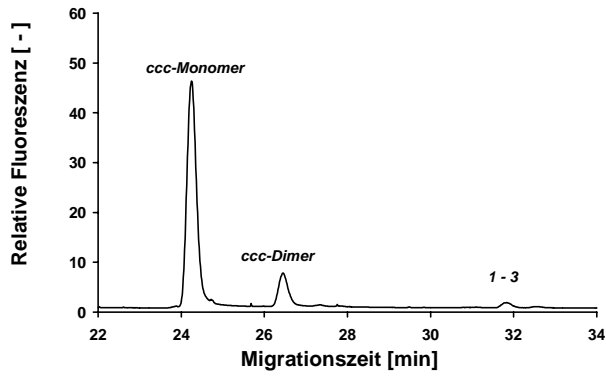
Im Folgenden wird Abbildung 3.3-4 beschrieben und diskutiert. Die Plasmid-DNS (50-200 ng) wurde mit 45 μL 1,44 μM YOYO (YOYO:DNS-Bp 1:5 für 100 ng DNS) vorbehandelt. Der TBE-Elektrophoresepuffer mit 0,1 % HPMC-4000 enthielt 67 nM des Fluoreszenzfarbstoffes YOYO. Eine beschichtete DB-17-Kapillare von 37 cm Länge wurde bei 30°C und 100 V cm^{-1} verwendet. Die Probenaufgabe erfolgte durch 1 s hydrodynamische Injektion mit anschließender 1 s Injektion des Elektrophoresepuffers.

Bei der Betrachtung der Elektropherogramme (EPG) und ihrer Interpretation wird vom Ergebnis der Agarosegelelektrophorese ausgegangen. Unbehandelte Plasmidproben enthalten größtenteils ccc-Formen, UV-bestrahlte Plasmidproben enthalten kaum ccc-Formen, sondern hauptsächlich oc-Formen.

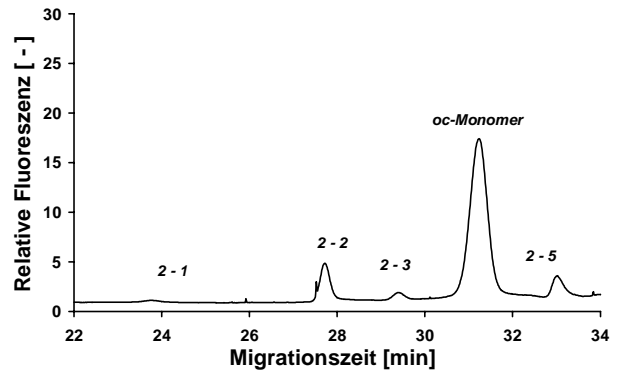
Im EPG 1 (unbehandelt) waren drei Signale erkennbar. Aus der Agarosegelelektrophorese war bekannt, daß die Hauptmenge der monomeren ccc-Form zugeordnet werden konnte, bzw. daß die mengenmäßig zweite Form die dimere ccc-Form war. Diese beiden Formen wurden den mengenmäßig entsprechenden Signalen zugeordnet. Das dritte Signal im Elektropherogramm 1, bezeichnet als 1-3, blieb ohne Zuordnung einer Plasmidform.

Im EPG 2 (UV-behandelt) waren fünf Signale zu erkennen. Da aus der Untersuchung mittels Agarosegelelektrophorese bekannt war, daß der Hauptanteil der monomeren oc-Form entsprach, konnte dem Hauptsignal die monomere oc-Form zugeordnet werden. Die Vermutung lag nahe, daß das Signal 2-1 Reste der ccc-Monomer-Form präsentierte. Die anderen drei noch unbenannten Signale sollten den linearen Formen und der oc-Form des Dimers entsprechen.

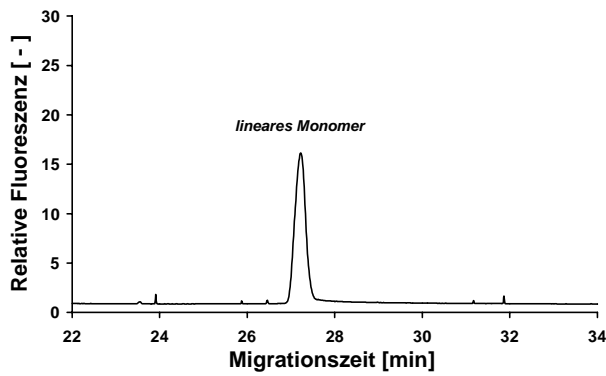
EPG 3 (linearisiert) enthielt nur ein Signal, das dem linearen Monomeren entsprach.



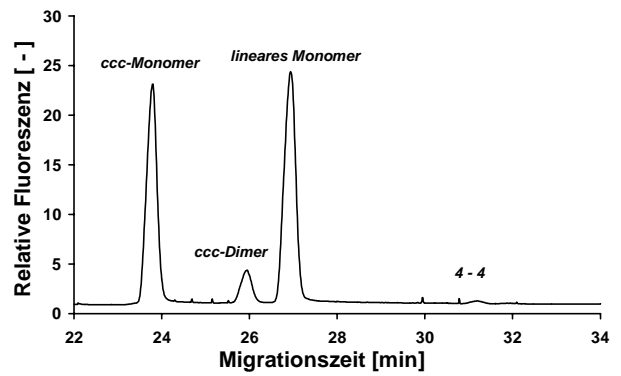
EPG 1 unbehandelt



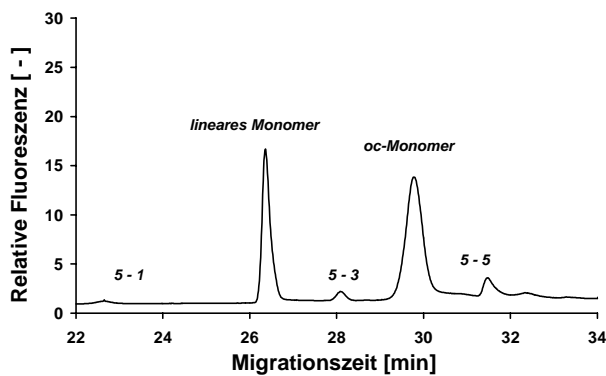
EPG 2 UV-bestrahlt



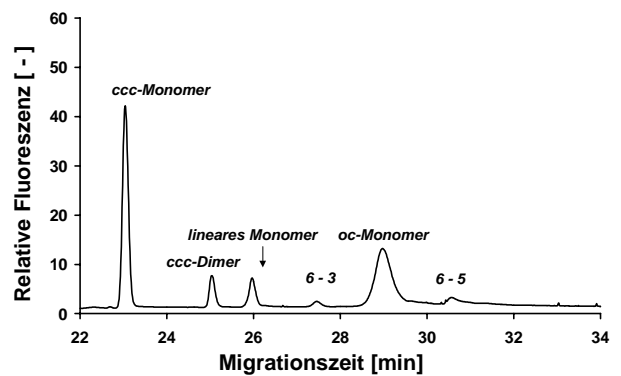
EPG 3 linearisiert



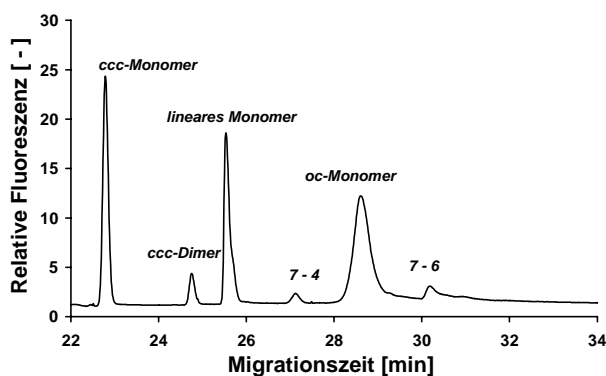
EPG 4 unbehandelt & linearisiert



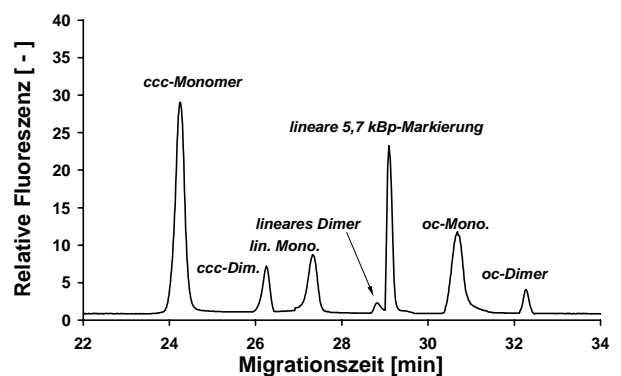
EPG 5 UV-bestrahlt & linearisiert



EPG 6 unbehandelt & UV-bestrahlt



EPG 7 unbehandelt & UV-bestrahlt & linearisiert



EPG 8 unbehandelt & UV-bestrahlt & lineare 5,7 kBp-Markierung (pCMV-S2S)

Abbildung 3.3-4 Kapillargelelektrophorese-Elektropherogramme (EPG) unterschiedlich behandelter pUC19-Proben und deren Gemische.
Erklärung im Text.

EPG 4, bei dem eine Mischung aus unbehandelter und linearisierter DNS untersucht worden war, zeigte vier Signale. Im Vergleich zu EPG 1 (unbehandelt) war hier ein zusätzliches großes Signal erkennbar, das nur zu der linearen Form gehören konnte. Diesem zusätzlichen Signal wurde das lineare Monomer zugeordnet. Die beiden Signale davor entsprachen den beiden ccc-Formen. Das Signal 4-4 konnte analog dem Signal 1-3 noch keiner Plasmidform eindeutig zugeordnet werden. Hier wurde auch deutlich, daß die beiden ccc-Formen eine höhere Mobilität aufwiesen, als das lineare Monomer.

Eine Mischung aus UV-bestrahlter und linearisierter DNS wurde für EPG 5 analysiert. Dieses Elektropherogramm hatte wie EPG 2 fünf Signale: 5-1, 5-2, 5-3, 5-4 und 5-2. Es hatte kein zusätzliches Signal. Dies zeigte, daß ein noch nicht zugeordnetes Signal in EPG 2 der linearen Form entsprechen muß. Durch Vergleich von EPG 5 und EPG 2 konnte das Signal der linearen Form des Monomeren identifiziert werden. Dies bedeutet, daß Signal 2-2 in EPG 2 ebenfalls der linearen Form entspricht. Deutlich war auch zu erkennen, daß das lineare Signal vor allen anderen Signalen der UV-behandelten DNS erschien.

EPG 6, eine Mischung aus unbehandelter und UV-bestrahlter DNS sollte alle Hauptformen zeigen. Die Signale für das ccc- und oc-Monomer konnte durch Vergleich mit EPG 1 und EPG 2 sofort zugeordnet werden. Nach Vergleich mit EPG 4 konnten der ccc-Form des Dimers und des linearen Monomers Signale zugeordnet werden. Die Signale 6-3 und 6-5 blieben unklar.

EPG 7 (unbehandelte, lineare und UV-bestrahlt DNS) bestätigte die Zuordnung des linearen Monomers in EPG 6.

EPG 8 war eine Mischung aus unbehandelter und UV-bestrahlter DNS, analog EPG 6 enthielt jedoch zusätzlich eine 5,7 kbp lineare Markierung (pCMV-S2S). Ein Vergleich von EPG 8 und EPG 6 zeigt deutlich, daß die zusätzliche Markierung knapp hinter dem analogen 6-3 Signal erscheint. Dies ließ den Schluß zu, daß das Signal 6-3 dem linearen Dimer entsprach und daß das Signal 6-5 der dimeren oc-Form zugeordnet werden konnte.

3.3.4.3 *Vergleich der Mobilitäten von pUC19 in Kapillargelelektrophorese und AGE*

Ein Vergleich der Mobilitäten von pUC19 im Agarosegel und in der Kapillargelelektrophorese (Abbildung 3.3-5) zeigt, daß in beiden Fällen die ccc-Form des Monomers die höchste Mobilität aufwies und daß die oc-Form des Dimers am langsamsten wandert. Bei den anderen Formen kam es zu Verschiebungen in der

Mobilität. Die gefundenen Mobilitäten der einzelnen Formen, sowohl in der Agarosegelelektrophorese als auch in der Kapillargelelektrophorese sind von den jeweiligen Bedingungen abhängig.

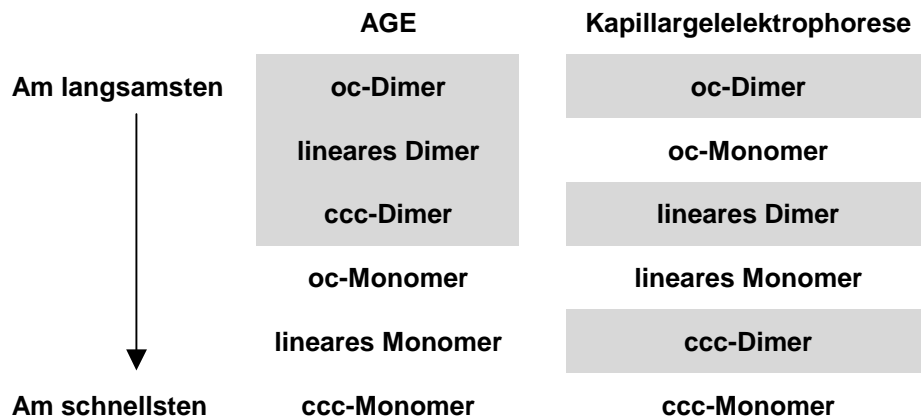


Abbildung 3.3-5: Vergleich der Mobilitäten von pUC19 in AGE und Kapillargelelektrophorese

Unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen wandern bei der Agarosegelelektrophorese alle monomeren Formen schneller als die dimeren Formen, die Mobilitäten waren eher durch die Größe bestimmt. In der Kapillargelelektrophorese wandern die ccc-Formen schneller als die linearen Formen und die wiederum schneller als die oc-Formen. Hier wurde die Mobilität stärker von der Form bestimmt. Dies gilt für pUC19 unter den beschriebenen Bedingungen und kann nicht verallgemeinert werden.

3.3.5 Quantifizierung von Plasmidformen

Für die Qualitätsprüfung einer Plasmidcharge ist das prozentuale Verhältnis von ccc-Formen zu anderen, vorwiegend oc-Formen, ausschlaggebend. Die Quantifizierung von DNS-Banden in Agarosegelen bzw. Signalen in Elektropherogrammen, wurde bereits in Kapitel 3.1.2 bzw. 3.1.4 beschrieben. Bezüglich der Quantifizierung der Plasmidformen war von Interesse, ob sich die DNS-Konzentration in einer Plasmidprobe auf die Anteile der Formen auswirkt. Um dies zu überprüfen wurde eine Probe des Plasmids pCMV-S2S unterschiedlich verdünnt und die Formen mittels Kapillargelelektrophorese getrennt sowie mittels der Signale quantifiziert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.3-6.

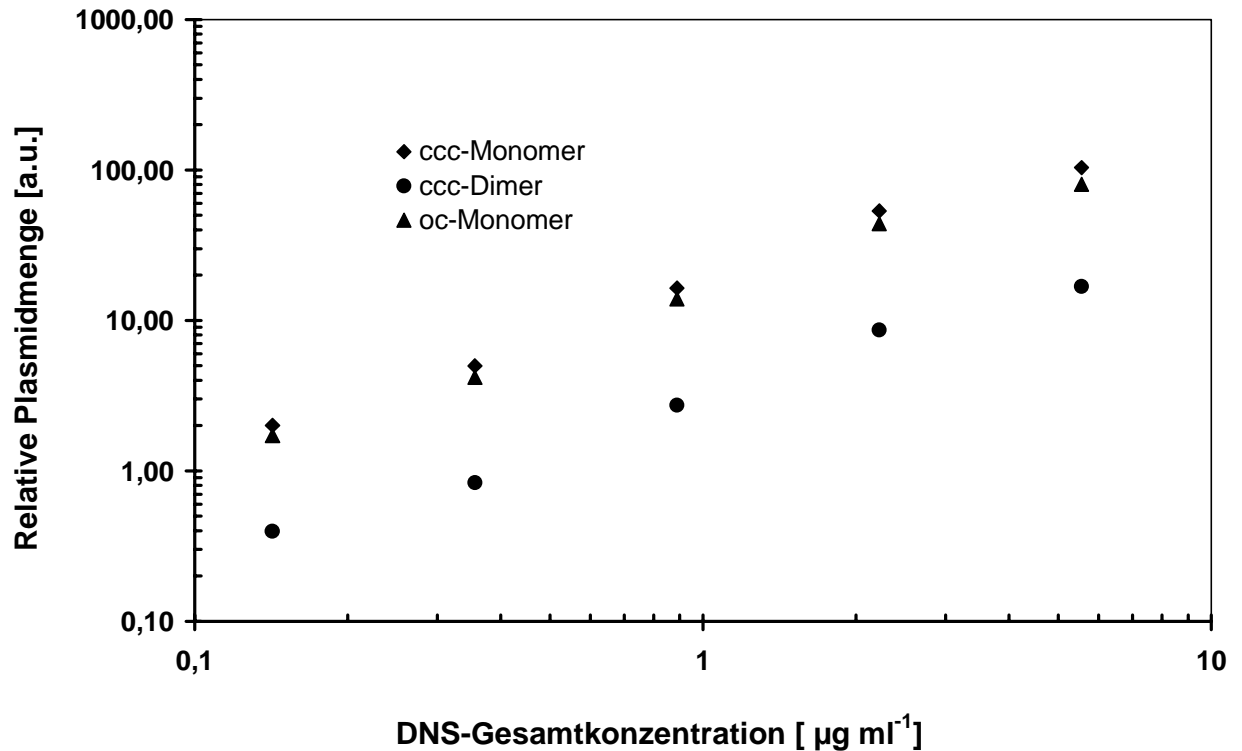


Abbildung 3.3-6: Quantifizierung von Plasmidformen

Verwendet wurde das Plasmid pCMV-S2S. Die Plasmid-DNS wurde mit 1,44 µM YOYO vorbehandelt. Der TBE-Elektrophoresepuffer enthielt 76 nM YOYO und 0,1 % HPMC-4000. Die Elektrophorese erfolgte in einer 47 cm langen beschichteten DB-17-Kapillare bei 30°C und 100 V cm⁻¹. Die Probeninjektion erfolgte für 1 s hydrodynamisch mit anschließender hydrodynamischer Injektion (1 s) von Elektrophoresepuffer. Die Einheit a.u. bezeichnet „arbitrary units“, willkürliche Einheiten, und steht für den Quotienten aus Signalfäche durch Migrationszeit.

Die Quantifizierung von Plasmidformen ist über einen breiten Bereich nicht von der Gesamt-DNS-Konzentration abhängig. Alle Formen können in diesem Bereich unabhängig von einander quantifiziert werden. Bei höheren Konzentrationen ergeben sich geringe Abweichungen. Bei kleinerer Konzentration sind Formen mit geringerem Anteil nicht mehr nachweisbar.

Das Verhältnis der Mengen der Formen ist Abbildung 3.3-7 dargestellt.

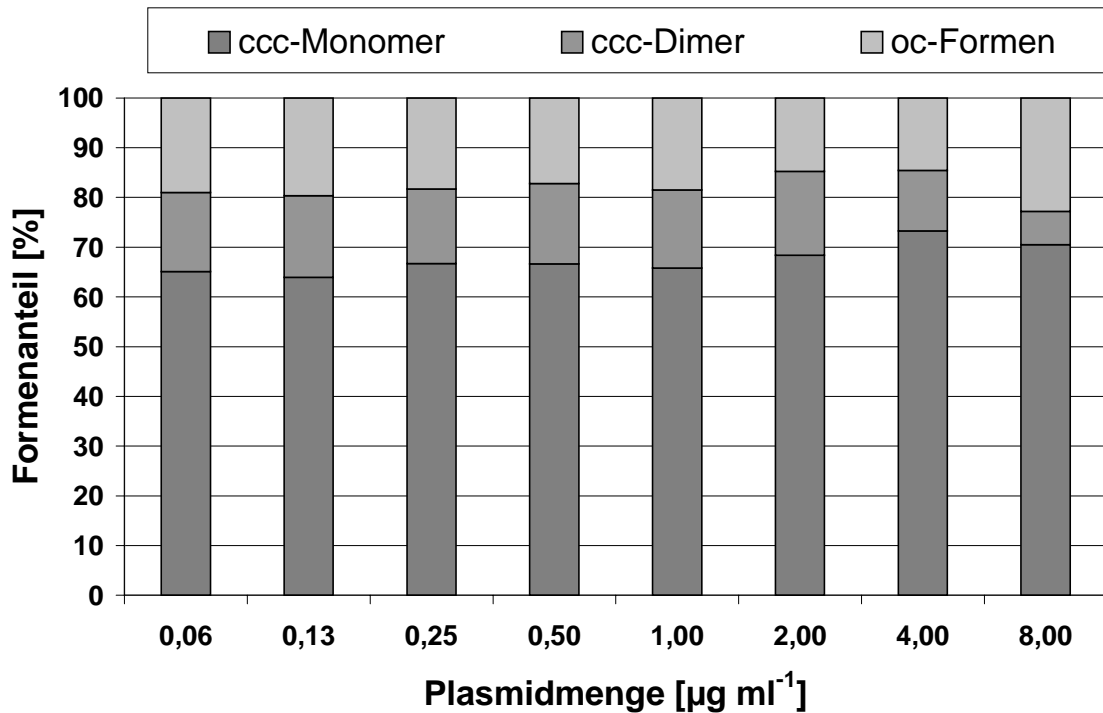


Abbildung 3.3-7: Plasmidformenverteilung in Abhängigkeit der Plasmidmenge

Die Werte wurden aus den Ergebnissen der vorheriger Abbildung ermittelt.

Innerhalb eines Konzentrationsbereichs von ca. $0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$ bis $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ herrschte ein annähernd konstantes Verhältnis. Innerhalb dieses Bereichs wären Qualitätskontrollen unabhängig von der DNS-Konzentration. Mit steigender Konzentration nimmt der Anteil an ccc-Form scheinbar zu. Dies kann einen realen Hintergrund haben, wenn angenommen wird, daß durch die Verdünnung ccc-Form in oc-Form übergeht.

3.3.6 Verunreinigungen durch Nukleinsäuren

RNS und genomische DNS (gDNS) können Plasmidproben verunreinigen. Es sollte untersucht werden, ob derartige Verunreinigungen mittels Kapillargelelektrophorese erfaßt werden könnten. Dazu wurde pUC19 ohne Zugabe von RNAsen isoliert, was zu signifikanten Anteilen von RNS in den Proben führte. Proben von pUC19 wurde genomische DNS zugesetzt. Diese Proben wurden wie vorher beschrieben mittels Kapillargelelektrophorese analysiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.3-8.

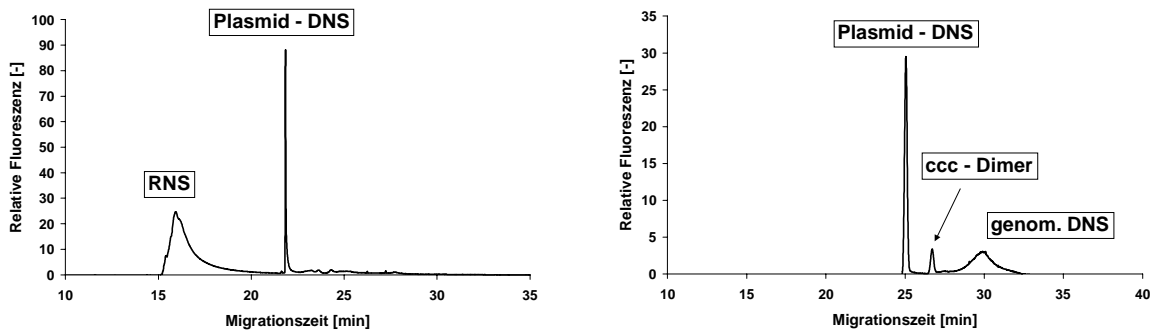


Abbildung 3.3-8: Elektropherogramme von pUC19-DNS, die mit RNS bzw. gDNS verunreinigt war.

Die DNS (ca. 200 ng) wurde mit 1,44 μM YOYO vorbehandelt; 67 nM YOYO-TBE-Elektrophoresepuffer mit 0,1 % HPMC-4000, 37 cm DB-17-Kapillare; 30°C; 100 V cm^{-1} ; 1 s hydrodynamische Injektion der Probe, 1 s Injektion des Elektrophoresepuffers.

Beide Verunreinigungen waren deutlich erkennbar. Die Breite der Signale ließ darauf schließen, daß es sich bei den RNS- und gDNS-Verunreinigungen nicht um homogene Substanzen handelte, sondern um eine große Palette unterschiedlich großer RNS bzw. gDNS-Bruchstücke. Für das ccc-Monomer bzw. -Dimer der Plasmid-DNS wurden scharfe Signale erhalten. Die Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen RNS-Moleküle war deutlich größer als die der verschiedenen Plasmidformen. Die genomische DNS wanderte langsamer als die anderen Formen, was aber auch von der Größe der Bruchstücke abhängt. Bei den üblichen Isolierungsverfahren für Plasmid-DNS sind mit keinen Auswirkungen beider Verunreinigungen auf die quantitative Bestimmung von Plasmid-DNS mittels Kapillargelelektrophorese zu rechnen. Dieses konnte auch von VOß (1997) für linearisierte Plasmid-DNS bestätigt werden.

Mit den hier beschriebenen Methoden ist es möglich für isolierte Plasmid-DNS den jeweiligen Anteil der Hauptformen quantitativ zu bestimmen. Dies ist besonders als Qualitätskriterium der Homogenität von genetischen Medikamenten auf Plasmidbasis von großem Interesse. Für jedes Plasmid müssen diese Untersuchungen durchgeführt werden, können jedoch dann für das jeweilige Plasmid automatisiert und somit für industrielle Qualitätskontrolle eingesetzt werden.

Im Gegensatz zur Agarosegelelektrophorese kann die Analyse mittel Kapillargelelektrophorese automatisch erfolgen. Die Analysenzeit beträgt bei der Kapillargelelektrophorese maximal 40 min. Eine brauchbare Trennung mittels AGE bedarf 1 – 4 h. Der lineare Konzentrationsbereich bei der Kapillargelelektrophorese liegt zwischen 0,06 und 2,00 mg L^{-1} und bei der AGE deutlich darüber, nämlich 12-200 mg L^{-1} . Die

Wanderungsreihenfolge bleibt bei der Kapillargelelektrophorese im großen und ganzen gleich, während sie bei der AGE beträchtlich von den Bedingungen abhängt. Die Kapillargelelektrophorese weist eine sehr gute Korrelation zur Kalibriergeraden auf. Bei der AGE ist der Aufwand der Quantifizierung unter Umständen sehr groß, wie im Kapitel über die Bestimmung der Plasmidkopienzahl beschrieben wurde. Die Kapillargelelektrophorese weist meist scharfe Signale auf, während die Banden in der AGE immer eine gewisse Unschärfe besitzen. Der große Nachteil der Kapillargelelektrophorese, daß keine Proben parallel gemessen werden können, wird in Zukunft mit neuen Geräten (Geräte für 96 Parallelproben und mehr sind in Entwicklung) kein Problem mehr darstellen.

3.4 Promotoren

Promotoren sind die Voraussetzung für jede Genexpression und somit ein wichtiger Teil der Konstruktion von rekombinanten Mikroorganismen und der Optimierung von Expressionssystemen. Sie verfügen über eine Reihe von Eigenschaften, die für die Fermentationstechnik relevant sind, wie es auch im theoretischen Teil dieser Arbeit beschrieben wurde. Einen Überblick über diese Eigenschaften bietet Tabelle 3.4-1.

3.4.1 Promotorstärke

Die Promotorstärke hat einen großen Einfluß auf die Produktivität von Expressionssystemen. Eine hohe Affinität der RNS-Polymerase zum Promotor ist Voraussetzung für die Überexpression von Proteinen. Ein starker Promotor führt jedoch nicht zwangsläufig auch zu einer Überexpression wie das nachfolgende Experiment zeigt.

Tabelle 3.4-1: Eigenschaften von Promotoren

Eigenschaft	Bedeutung
Kompatibilität	Das Erkennen des Promotors durch die Zellmaschinerie des Wirtes ist die grundlegende Voraussetzung und beeinflusst alle weiteren Eigenschaften. Viele Expressionsvektoren besitzen für den Wirt besonders geeignete, zum Teil gentechnisch optimierte Promotoren. Wichtig ist die Kompatibilität wenn ein fremdes Gen mittels seines eigenen Promotors in einem Organismus exprimiert werden soll.
Stärke	Die Promotorstärke entscheidet wie häufig das von dem Promotor kontrollierte Gen transkribiert wird und ist ein Maß für die Affinität der RNS-Polymerase zur DNS. Für eine Überexpression werden starke Promotoren bevorzugt. Bei Problemen der Überexpression, wie Toxizität oder Bildung von biologisch inaktiven Proteinaggregaten, werden schwache Promotoren bevorzugt.
Induktion	Promotoren sind entweder konstitutiv oder induzierbar. Konstitutive Promotoren sind permanent aktiv. Induzierbare Promotoren müssen durch ein Induktorsignal aktiviert werden, etwa die Zugabe von bestimmten Substanzen. Aber auch Änderungen in den Kultivierungsbedingungen können eine Induktion auslösen. Der Vorteil der Induktion liegt in der Trennung von Wachstum und Produktion. Dadurch ist es möglich Zellen ohne zusätzliche Belastung anzuzüchten und nach Erreichung einer gewünschten Biomasse die Produktion des Zielproteins zu starten.
Basale Transkription	Induzierbare Promotoren werden im nicht induzierten Zustand reprimiert. Die Repression eines Promotors ist meist von zusätzlichen Genen und deren Expression abhängig. Ein Promotor ist nur dann vollständig reprimiert (still) wenn die entsprechenden Repressionsmechanismen aktiv sind. Der Grad der Repression kann sich daher stark ändern. So kann bei der Verwendung artfremder induzierbarer Promotoren konstitutive Expression auftreten.

Verglichen wurden die Promotoren *lacUV5*, λ_{PL} , λ_{PR} und *tac*. Es wurden Plasmide konstruiert, die das Gen für die β -Galactosidase (*lacZ*) jeweils unter der Kontrolle einer dieser Promotoren hatte. Die Plasmide wurden in *E. coli* JM109 transformiert und entsprechende Klone selektioniert. Diese wurden angezüchtet und bei gleicher Zelldichte wurde die Expression induziert. Bei den Promotoren *lacUV5* und *tac* geschah dies durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 10 mM) und bei den beiden λ -Promotoren durch Erhöhung der Temperatur auf 41°C. Nach je 1 h Induktion wurde jeweils die gleiche Menge an Biomasse geerntet, die Zellen aufgeschlossen und die Aktivität der β -Galactosidase bestimmt. Laut Literatur sind die beiden λ -Promotoren 11,2-fach stärker als der *lacUV5*-Promotor. Der *tac*-Promotor ist 5,2-fach so stark wie der *lacUV5*-Promotor, hat aber weniger als die Hälfte der Stärke der λ -Promotoren [LARSEN *et al.*, 1984, RECKNAGEL *et al.*, 1993; DEUSCHLE *et al.*, 1986, ZABEAU & STANLEY, 1982]. Entsprechend sollte auch die gemessene Enzymaktivität verteilt sein. Die Enzymaktivität wurde analog der Methode von MILLER bestimmt [MILLER, 1972]. Die theoretischen und experimentellen Aktivitäten wurden auf den *lacUV5*-Promotor bezogen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.4-1.

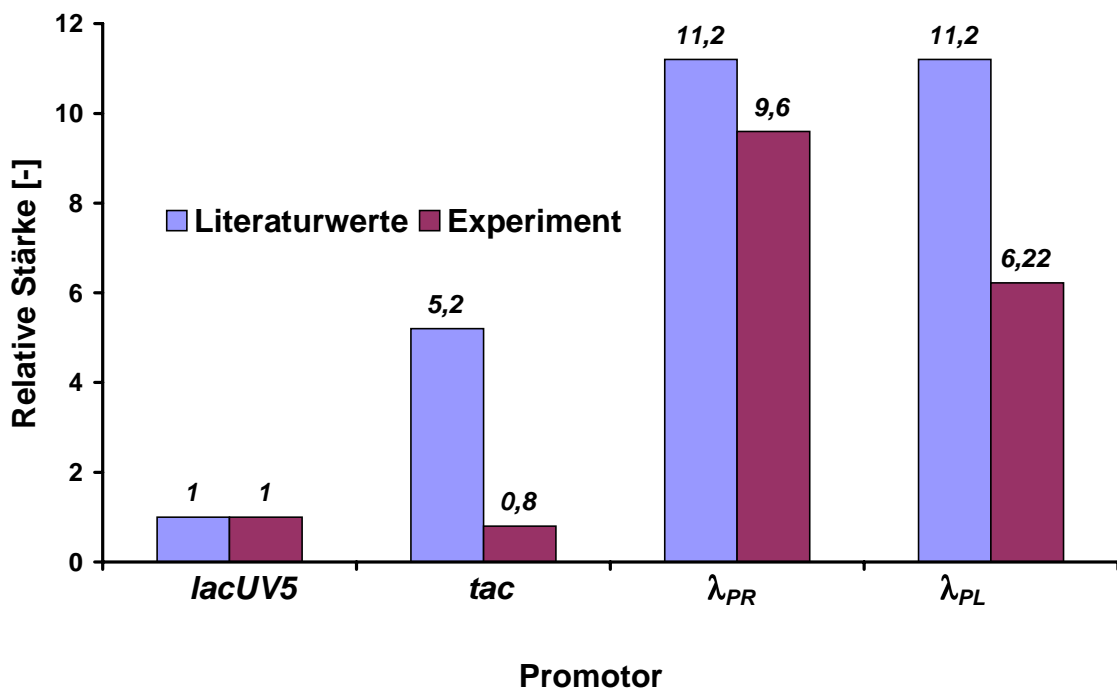


Abbildung 3.4-1: Vergleich von Literaturwerten und Experimentalwerten von Promotorstärken

Die Promotoren *lacUV5*, *tac*, λ_{PR} und λ_{PL} , wurden zur Expression der β -Galactosidase in *E. coli* benutzt. Zum Vergleich wurde die Aktivität von *lacUV5* zu 100 % gesetzt.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß Promotorstärke und Enzymaktivität als Maß der Produktivität nicht automatisch korrelieren. Die gemessene Aktivität des Systems *lacUV5* wurde als 100 % der theoretischen Aktivität gesetzt und die anderen Promotoren darauf bezogen. Die theoretischen Aktivitäten der anderen Promotoren hätten entsprechend 5,2-fach bzw. 11,2-fach höher sein müssen. Die experimentellen Daten ergeben für die λ -Promotoren jedoch niedrigere Werte als theoretisch erwartet und für den *tac*-Promotor einen deutlich niedrigeren Wert als theoretisch angenommen werden konnte. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, wie vielfältig die Einflüsse sein können, die die Ausbeute an einem biologisch aktiven Produkt, im vorliegenden Fall einer Enzymaktivität, beeinflussen. Daraus ist ersichtlich, daß Angaben über Promotorstärken in der Literatur, die auf der Messung derartiger biologischer Aktivitäten beruhen, mit sehr großen Fehlern behaftet sein können. Verlässlichere Daten können erhalten werden, wenn die Menge an mRNS, die aufgrund des Promotors gebildet wird, bestimmt wird. Für sichere Vergleiche müßte dann auch die Plasmidkopienzahl und die Plasmidstabilität sowie die Anzahl der Repressormoleküle bestimmt werden.

3.4.2 Induktion von Promotoren

Induzierbare Promotoren spielen in der Fermentationstechnik eine wichtige Rolle. Sie erlauben die Trennung von Anzucht- und Produktionsphase, was sich u.a. auf die Stabilität des Systems positiv auswirken kann. In diesem Kapitel werden Untersuchungen mit den Promotoren *lac*, *vgb* und *nirB* beschrieben. Auf Promotoren, die bei Erreichen der stationären Phase automatisch induziert werden, wird im Kapitel 3.6 eingegangen.

3.4.2.1 Induktion des *lac*-Promotors

Für Untersuchungen zur Induktion der Genexpression unter der Kontrolle des *lac*-Promotors wurde das System *E. coli* JM109 pGFP verwendet. Der Stamm *E. coli* JM109 besitzt das Gen *lac^f*, das eine hohe Expression des LacI-Repressors ermöglicht und somit den *lac*-Promotor praktisch völlig abgeschaltet läßt. Das Plasmid pGFP ist ein Hybrid aus dem Klonierungsvektor pUC19 und dem Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* [CHALFIE *et al.*, 1994]. Bei Expression entsteht ein Fusionsprotein aus einigen wenigen Aminosäuren der β -Galactosidase und dem GFP. Wird GFP mit Licht von 395 bzw. 470 nm angeregt, so emittiert es Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 509 nm. Zellen, die GFP enthalten, fluoreszieren ebenso in Abhängigkeit vom GFP-Gehalt. Damit ist es möglich die Induktion der Genexpression direkt durch Messung der Fluoreszenz zu verfolgen. Abbildung 3.4-2 zeigt die Genkarte von pGFP (CLONTECH, Palo Alto, USA).

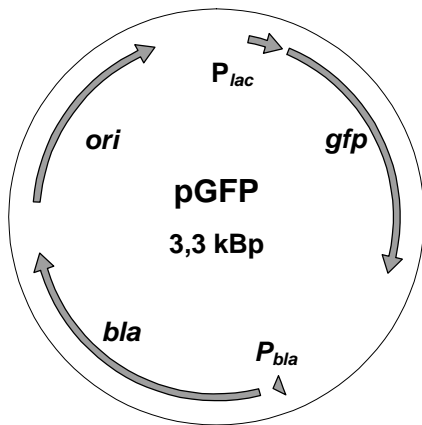


Abbildung 3.4-2: Genkarte von pGFP

Das Plasmid enthält den *ori* und die Ampicillinresistenz (*bla*) von pUC19. Das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (*gfp*) steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors von pUC19.

E. coli JM109 pGFP wurde in Schüttelkolben in LB-Medium mit 10 g L^{-1} Glucose angezüchtet. Bei einer OD_{600} von ca. 1,3 nach ungefähr 4 h wurde IPTG als Induktionsmittel zugesetzt (Endkonzentration 10 mM). Proben wurden entnommen, die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) und die Fluoreszenz bei einer Anregung von 400 nm gemessen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte in einem Hitachi L4500 Fluoreszenzspektrometer.

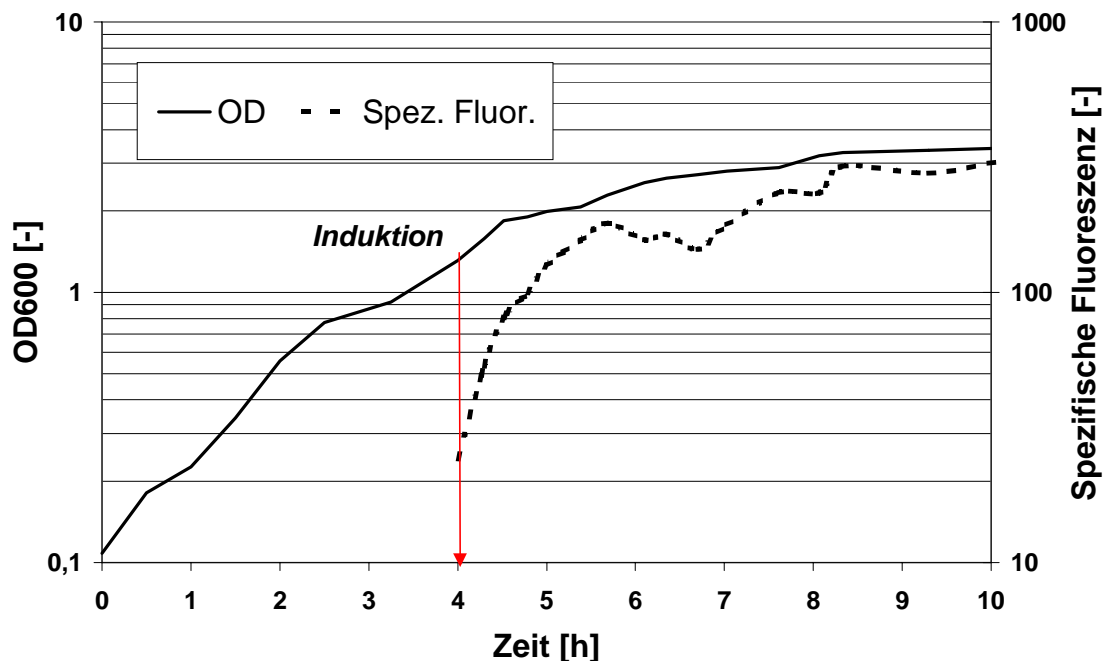


Abbildung 3.4-3: Kultivierung von *E. coli* JM109 pGFP und Induktion der Expression des Grün-Fluoreszierenden-Proteins (GFP)

Der Stamm *E. coli* JM109 pGFP wurde im Schüttelkolben in LB-Medium mit 10 g L^{-1} Glucose angezüchtet. Bei einer OD_{600} von ca. 1,3 wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die OD_{600} und die Fluoreszenz wurde gemessen. Wenn nötig wurde mit LB-Medium verdünnt. Die spezifische Fluoreszenz entspricht der gemessenen maximalen Fluoreszenz pro OD_{600} .

Nach der Induktion ist ein rascher Anstieg der spezifischen Fluoreszenz zu sehen. Die Induktion erfolgt innerhalb von 30 min. Der weitere Anstieg der spezifischen Fluoreszenz und somit der Expression von GFP war an das Wachstum gekoppelt. Nach ca. 30 min nach Induktionsbeginn, nimmt die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit ab. Die spezifische Fluoreszenz stieg zwar weiter an, der Anstieg war aber deutlich geringer als in der ersten halben Stunde. Dies bedeutet, daß die Induktion rasch erfolgt und danach die Akkumulation des GFP in den Zellen begann. Ein weiterer Anstieg der spezifischen Fluoreszenz war in der stationären Phase zu erkennen. Dies läßt vermuten, daß weiteres GFP akkumulierte. Für die Produktivität läßt sich daraus folgendes ableiten. Die Induktion der Genexpression durch lacUV5 erreicht nach 30 min bereits ein Maximum. Die Menge an rekombinanten Protein kann durch Akkumulation weiter steigen, ohne daß die Induktion erhöht wird. Für jeden Prozeß ist zu bestimmen, ob eine Ernte in der stationären Phase zu einer höheren Produktivität führt, oder ob es besser ist, wenige Stunden nach der Induktion den Prozeß zu beenden. Dabei ist immer die Zeit, die benötigt wird um den Organismus in die stationäre Phase kommen zu lassen, gegen die zusätzliche Bildung und Akkumulation von rekombinanten Protein abzuschätzen.

3.4.2.2 Sauerstoffabhängige Promotoren *vgb* und *nirB*

Die Induktion der Expression von *lac*- oder *tac*-Promotoren, also Promotoren die den *lac*-Operator enthalten, erfolgt durch Zugabe von IPTG, einer relativ teuren Substanz. Die damit verbunden hohen Kosten für die Induktion sowie der notwendige Nachweis der Unschädlichkeit der Induktionssubstanz, vor allem bei pharmazeutischen Produkten, führt zur Suche nach anderen Promotoren.

Promotoren sollen zu einer hohen Expression an biologisch aktivem Produkt führen, also eine gewisse Stärke aufweisen. Sie sollen im nicht induzierten Zustand völlig reprimiert sein. Die Induktion sollte möglichst kostengünstig sein. Eine sehr kostengünstige Möglichkeit wäre es die Expression durch Mangel an Sauerstoff zu induzieren. Einerseits würde sich der Promotor bei einer hohen Zelldichte, die meistens mit einer Unterversorgung an Sauerstoff verbunden ist, von selbst induzieren, andererseits würde die Reduktion der Begasung, was zur Induktion führt, Kosten einsparen. Im folgenden sind Experimente mit dem sauerstoffabhängigen Promotor *vgb* aus *Vitreoscilla* und *nirB* aus *E. coli* beschrieben.

Konstruktion eines *vgb*-Promotor Testsystems

Vitreoscilla besitzt Stoffwechselmechanismen, die dem Organismus bessere Überlebenschancen bei niedriger Sauerstoffversorgung ermöglichen. Sinkt der

Sauerstoffgehalt im Umgebungsmilieu stark ab so wird das Protein Hämoglobin aus *Vitreoscilla* gebildet, daß den Transport von Sauerstoff durch die Zellmembran fördert und auch am zellinternen Transport des Sauerstoffs beteiligt ist [DIKSHIT *et al.*, 1990]. Dadurch kann der Organismus den Sauerstoff besser verwerten. Die Gene für dieses Protein (*vgb*) wurden in *E. coli* unter der Kontrolle ihres natürlichen *vgb*-Promotors kloniert [DIKSHIT & WEBSTER, 1988]. Dieser Promotor sollte für die Produktion eines rekombinanten Proteins getestet werden. Als Reporterprotein wurde die β -Galactosidase gewählt.

Das Plasmid pUC8:15 enthielt das *vgb*-Operon [DIKSHIT *et al.*, 1990]. Der *vgb*-Promotor wurde in das Plasmid pBR325 [BOLIVAR, 1978] eingebaut, das über Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin, Tetracyclin und Chloramphenicol verfügt. Das entstandene Plasmid pBR:O2 hatte den *vgb*-Promotor im Resistenzgen gegen Tetracyclin vorliegen, war also gegen dieses Antibiotikum sensitiv und konnte über indirekte Selektion gefunden werden. In dieses Plasmid pBR:O2 wurde die promotorlose *lacZ*YA-Kasette aus dem Plasmid pML5 [LABES, 1989] so eingebaut, daß die Gene für die Ausbildung der Aktivität der β -Galactosidase sich unter der Kontrolle des sauerstoffregulierten *vgb*-Promotors befanden. Das entstandene Plasmid pDH1 [FRIEHS *et al.*, 1995, HARTMANN, 1994] wurde in *E. coli* JM83 [VIEIRA & MESSING, 1982] transformiert und für die folgenden Experimente verwendet.

Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des sauerstoffregulierten *vgb*-Promotors

Der Stamm *E. coli* JM83 pDH1 wurde in LB-Medium angezchtet. Nach Erreichen einer OD_{600} von knapp 2 wurde die Begasung abgeschaltet. Während der Fermentation wurden Proben gezogen und die Aktivität der β -Galactosidase bestimmt. Die Abbildung 3.4-4 zeigt das Ergebnis.

Nachdem die Begasung abgestellt wurde, erhöhte sich die spezifische Aktivität der β -Galactosidase um das 3-fache. Daraus war ersichtlich, daß sich der *vgb*-Promotor durch Erniedrigung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs induzieren läßt. Um die Abhängigkeit des Promotors von der Sauerstoffkonzentration besser zu charakterisieren, wurde die Sauerstoffkonzentration während einer Fermentation gezielt verändert wie Abbildung 3.4-5 zeigt.

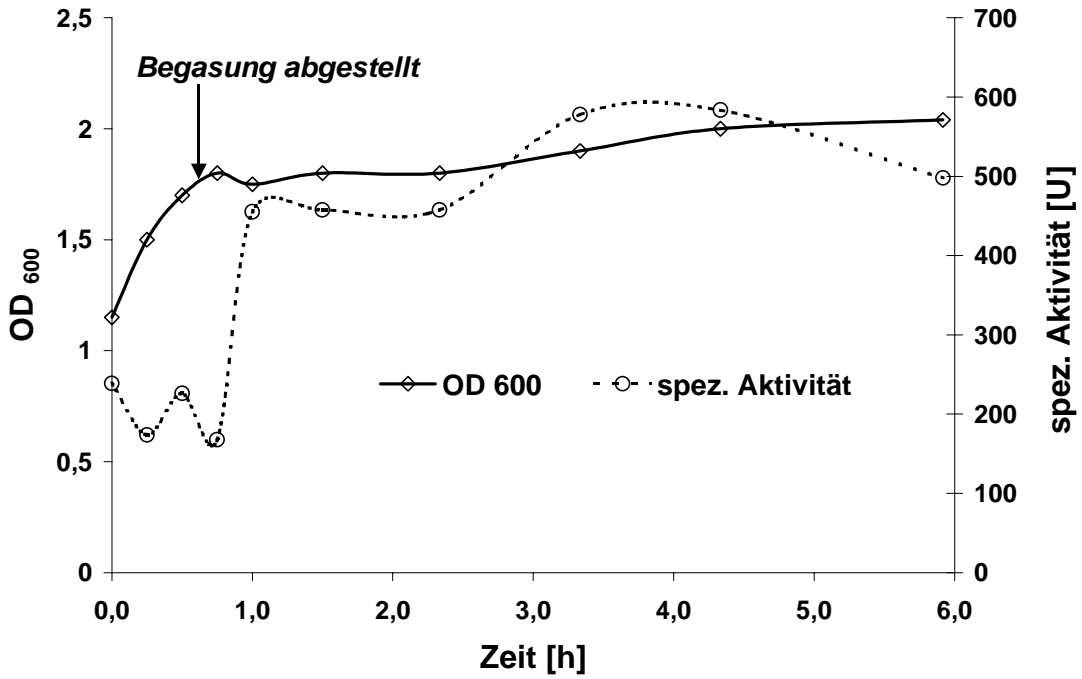


Abbildung 3.4-4: Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des sauerstoffregulierten *vgb*-Promotors

Anzucht von *E. coli* JM83 pDH1 in LB-Medium bei 37°C. Bestimmung der Enzymaktivität der β -Galactosidase nach Miller [MILLER, 1972].

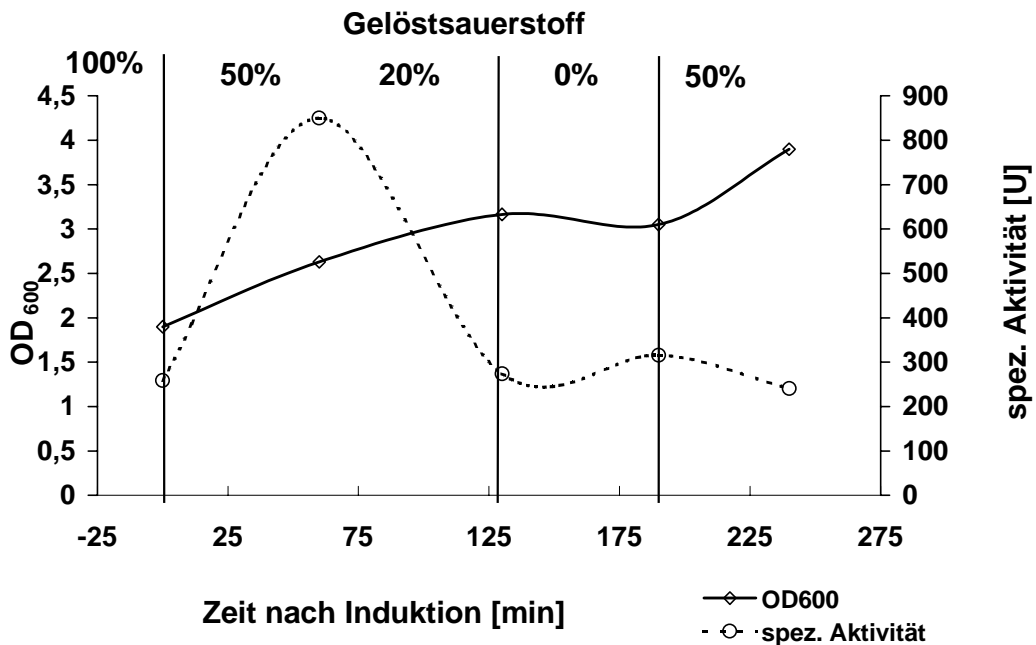


Abbildung 3.4-5: Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des sauerstoffregulierten *vgb*-Promotors bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Anzucht von *E. coli* JM83 pDH1 in LB-Medium bei 37°C. Bestimmung der Enzymaktivität der β -Galactosidase nach Miller [MILLER, 1972]. Die Sauerstoffkonzentration wurde über die Begasung und mittels Sauerstoffsonde geregelt.

Diese Beobachtungen konnten nur dahingehend erklärt werden, daß eine Änderung der Sauerstoffkonzentration massive Änderungen im Stoffwechsel von *E. coli* auslöste, die letztendlich zu einer Reduzierung der Genexpression führten. Dies bedeutet, daß eine beliebige Regelung des *vgb*-Promotors über den Sauerstoff, also ein abwechselndes Ein- und Ausschalten des Promotors nicht möglich ist, zumindest nicht in diesem Stamm und in diesen Zeitabständen. Zu sehen war außerdem, daß die Genexpression nur um das 3-fache erhöht wurde. Dies hängt auch damit zusammen, daß der *vgb*-Promotor offensichtlich auch bei Sättigung des Mediums mit Sauerstoff aktiv ist, also eine hohe basale Transkription aufweist. Aufgrund dieser beobachteten Phänomene wie basale Transkription, geringe Erhöhung der Genexpression und Irreversibilität der Induktion bzw. negative Auswirkungen der Induktionsbedingungen auf den Produktionsstamm, erscheint der *vgb*-Promotor für den Einsatz in fermentativen Prozessen nicht sinnvoll.

Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des sauerstoffregulierten *nirB*-Promotors

Steht Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht zur Verfügung kann *E. coli* auf andere Substanzen, wie z. B. Nitrat ausweichen. Dazu wird eine NADH-abhängige Nitratreduktase, genetisch kodiert durch das *nirB*-Operon, bei Sauerstoffmangel und Anwesenheit von Nitrat im Medium exprimiert [BELL *et al.*, 1990b]. Untersuchungen von OXER und Kollegen [OXER *et al.*, 1991] weisen darauf hin, daß der *nirB*-Promotor bei 0 % Sauerstoff sein Induktionsmaximum hat. Dies wäre bei einer Regelung leichter einzustellen, als eine konstante mikroaerobe Umgebung.

Zur Überprüfung der Produktion rekombinanter Proteine mittels *nirB*-Promotors wurde das Plasmid pAA182 in den Stamm *E. coli* MM294 transformiert. Das Plasmid pAA182 hat das Gen für die β -Galactosidase (*lacZ*) unter der Kontrolle des *nirB*-Promotors [BELL *et al.*, 1990b]. Nach positiver Selektion wurde *E. coli* MM294 pAA182 angezüchtet und die Aktivität der β -Galactosidase bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.4-6.

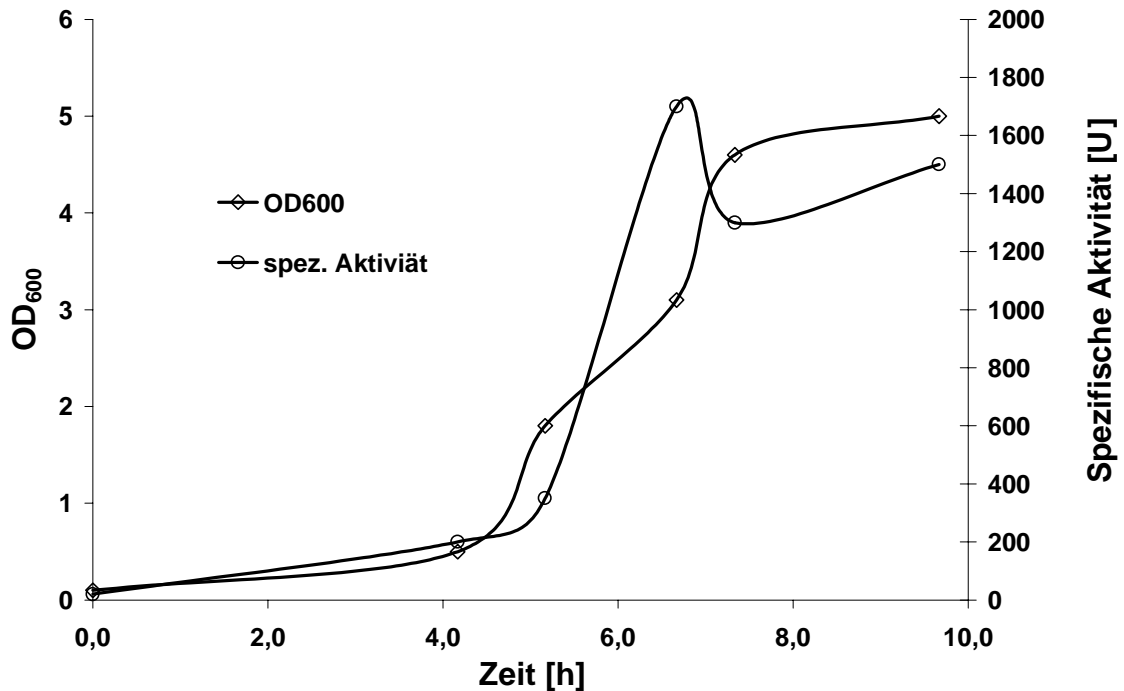


Abbildung 3.4-6: Genexpression von *lacZ* unter der Kontrolle von *nirB*

Anzucht von *E. coli* MM294 pAA182 in LB bei 37°C und Bestimmung der Aktivität der β -Galactosidase nach Miller [MILLER, 1972].

Bei konstanter Luftzufuhr sank die Sauerstoffkonzentration durch zunehmende Biomasse wodurch der Promotor induziert wurde. Die Expression der β -Galactosidase unter der Kontrolle des *nirB*-Promotors führte zu deutlich höheren spezifischen Aktivitäten als beim *vgb*-Promotor.

3.4.3 Basale Transkription

Induzierbare Promotoren weisen auch im nicht induzierten Zustand Genexpression auf. Ist diese Genexpression meßbar, wird dies als basale Transkription bezeichnet. Derartige basale Transkriptionen treten besonders dann auf, wenn kein oder nicht genügend aktiver Repressor produziert wird. Diese scheinbar konstitutive Eigenschaft von normalerweise induzierbaren Promotoren kann zu erheblichen Problemen führen, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird. Durch geeignete Maßnahmen können basale Transkriptionen aber auch minimiert werden, wie auch am Beispiel des *nirB*-Promotors gezeigt werden soll.

3.4.3.1 Experimente zur kontrollierten Expression der Protease La (*lon*)

Die Protease La in *E. coli*, kodiert über das Gen *lon*, wird für erhebliche proteolytische Verluste bei der Produktion von rekombinanten Proteinen verantwortlich gemacht [GOLDBERG, 1985]. Es gab Experimente diese Protease durch Mutationen auszuschalten. Da aber die Protease La an essentiellen physiologischen Funktionen der Zellen, wie z. B.

der Zellteilung beteiligt ist, zeigten derartige Mutanten erhebliche Wachstumsschwierigkeiten und waren für Fermentationen ungeeignet. Eine Möglichkeit diese Probleme zu umgehen lag in der Überlegung die Expression der Protease La zu steuern. Während der Anzuchtphase sollte die Protease gebildet werden, um optimales Zellwachstum zu gewährleisten. In der Produktionsphase sollte die Expression der Protease abgeschaltet werden, um den proteolytischen Abbau von rekombinanten Proteinen zu minimieren. Zu diesem Zwecke sollte das *lon*-Gen unter die Kontrolle des induzierbaren Promotors *lac* gestellt werden.

Das *lon*-Gen lag im Plasmid pJMC40 unter der Kontrolle des eigenen Promotors vor [SCHOEMAKER & MARKOVITZ, 1981]. Es sollte in das Plasmid pUC18 eingebaut werden. pJMC40 wurde in *E. coli* HB101 transformiert und das Plasmid isoliert. Die dabei aufgetretene Verwirrung durch strukturelle Instabilitäten wurde im Kapitel 3.2.1 beschrieben. Das bei der Rekombination entstandene Plasmid pJMC40ins wurde verkleinert. Das so konstruierte Plasmid pKF5 enthielt das *lon*-Operon, die Tetracyclinresistenz und den *ori* von pBR322 (siehe folgende Abbildung).

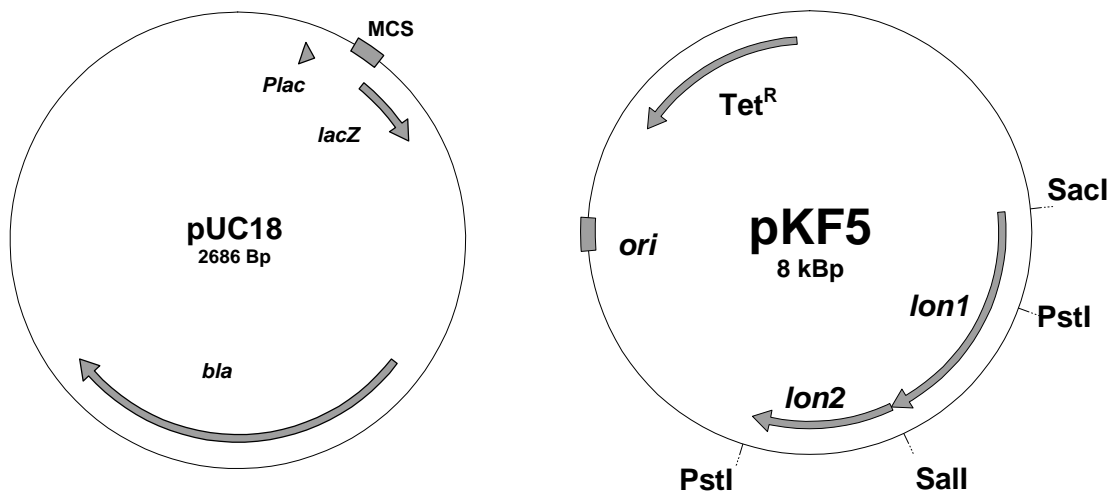


Abbildung 3.4-7: Genkarte von pUC18 und pKF5

Der Klonierungsvektor pUC18 besitzt das Gen für die Ampicillinresistenz (*bla*) sowie eine Multiple Klonierungsstelle (MCS), die es erlaubt Gene einzubauen, die dann mittels des *lac*-Promotors (*Plac*) exprimiert werden können. Stimmt der Leserahmen überein, so entsteht ein Fusionsprotein mit dem Fragment der β -Galactosidase (*lacZ*).

Das Plasmid pKF5 entstand durch die Selbstligation des 8 kBp EcoRI-Fragmentes von pJMC40ins (siehe Kapitel 3.2.1). Es besteht aus einem 3,6 kBp EcoRI-PstI-Fragment von pBR322, das die Tetracyclinresistenz (Tet^R) und den Replikationsursprung von pBR322 (*ori*) enthält sowie einem 4,4 kBp Fragment des *E. coli* Genoms, das das *lon*-Operon enthält. Das *lon*-Gen selbst besteht aus einem 2,53 kBp SacI-PstI-DNA-Abschnitt der eine Sall-Schnittstelle enthält. Dadurch wird das *lon*-Gen in zwei Fragmente, *lon1* und *lon2*, geteilt.

Es wurden geeignete Schnittstellen gesucht, um das *lon*-Gen aus pKF5 auszuschneiden und in pUC18 einzubauen. Eine *SacI*-Schnittstelle wurde direkt vor dem *lon*-Gen gefunden sowie eine *PstI* Schnittstelle am Ende des Gens. Idealerweise hätte sich beim Einbau dieses *SacI*-*PstI*-Fragmentes in das Plasmid pUC18 das *lon*-Gen im richtigen Leserahmen mit dem, durch den *lac*-Promotor kontrollierten, *lacZ*-Fragment des pUC18 befinden sollen. Eine Fusion aus 9 Aminosäuren der β -Galactosidase und der Protease La sollte entstehen. Da sich im *lon*-Gen selbst ebenfalls eine *PstI*-Schnittstelle befindet wurde die Klonierung in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wurde das 0,95 kBp große *SacI*-*PstI*-Fragment (*lon2*) in pUC18 kloniert (pUC18*lon2*) und anschließend sollte das *lon*-Gen durch die Einfügung des 1,58 kBp großen *SacI*-*SacI*-Fragmentes (*lon1*) komplementiert werden. Nach Durchführung der Restriktionsschnitte, Isolierung der entsprechenden Fragmente aus einem präparativen Agarosegel und deren Ligation wurden die Ligationsansätze für eine Transformation in *E. coli* DH5 α verwendet. Nach dem ersten Schritt wurden entsprechende Klone von *E. coli* DH5 α pUC18*lon2* isoliert und verifiziert. Nach dem zweiten Schritt wurden einige ampicillinresistente Kolonien gefunden, doch zeigte eine anschließende Restriktionsanalyse, daß kein Klon das *lon*-Gen vollständig enthielt. Nach mehreren vergeblichen, auch abgewandelten Ansätzen [FRIEHS & BAILEY, 1989] wurde mittels Restriktionsanalyse und Agarosegelelektrophorese gezeigt, daß ein Plasmid (pUC18*lon*) mit dem *lon*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors *in vitro* hergestellt wurde, wie in Abbildung 3.4-7 gezeigt und anschließend erklärt wird.

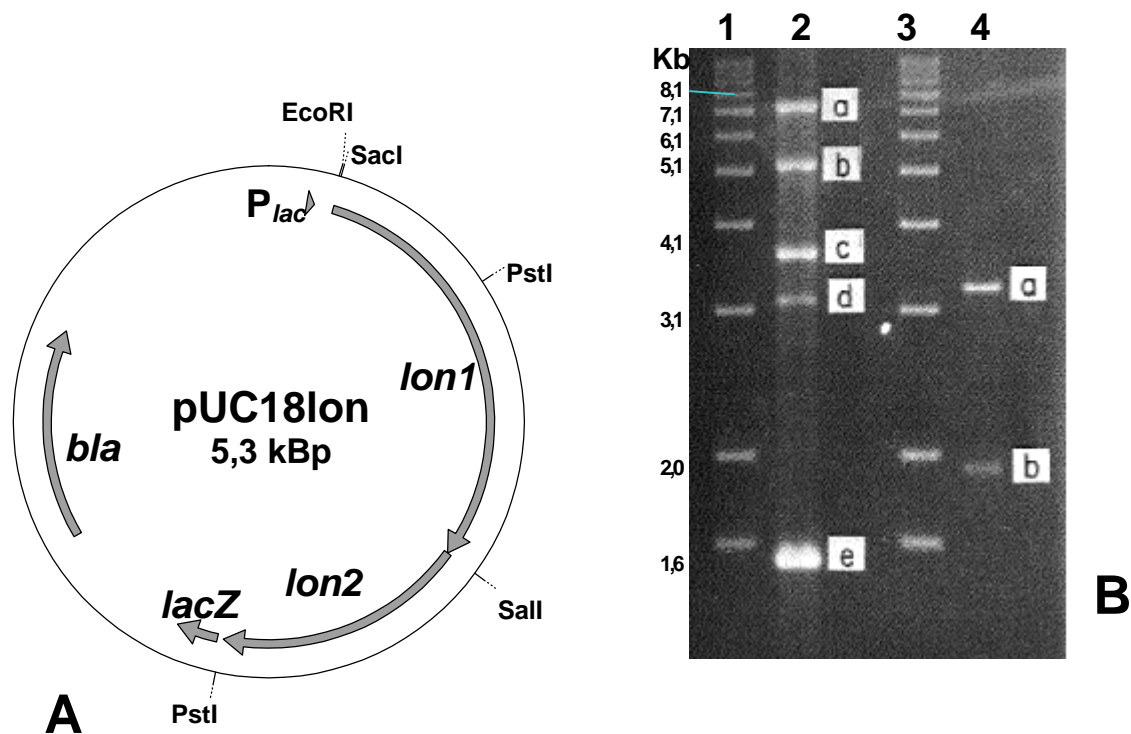


Abbildung 3.4-8: Nachweis der Konstruktion von pUC18lon durch Restriktionsanalyse von Ligationsansätzen

- A: Genkarte von pUC18lon, mit dem *lon*-Gen, bestehend aus den beiden Teilen *lon1* und *lon2*, unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI, PstI, Sall und SacI sind eingezeichnet.
- B: Agarosegelelektrophorese verschiedener Restriktionsansätze: 0,9 % Agarose, TAE-Puffer, 60 mA.
- Spur 1 Molmassenstandard: 1 kb ladder von BRL, 0,15 mg pro Spur
- Spur2: Restriktionsansatz mit Sall der präzipitierten Ligation von pUC18lon2 (3,65 kBp) und lon1-Fragment (1,58 kBp).
a: Dimer pUC18lon2 (7,3 kBp)
b: pUC18lon (gesuchtes Plasmid pUC18lon, 5,3 kBp)
c: Monomer pUC18lon2 (3,65 kBp)
d: Dimer lon1-Fragment (3,2 kBp)
e: Monomer lon1-Fragment (1,58 kBp)
- Spur 3 Molmassenstandard: 1 kb ladder von BRL, 0,15 mg pro Spur
- Spur 4 Restriktionsansatz mit PstI des religierten 5,3 kBp pUC18lon Plasmides
a: pUC18 (2,7 kBp) mit 0,58 kBp SacI-PstI-*lon*-Genfragment
b: 1,95 kBp PstI-PstI-Fragment des *lon*-Gens

Für die Konstruktion von pU18lon wurde zuerst das 0,95 kBp Sall-PstI-Fragment, das als *lon2* bezeichnet wurde, aus dem Plasmid pKF5 präparativ isoliert und in den Vektor pUC18, ebenfalls mit Sall und PstI geschnitten, eingebaut. Das so entstandene Plasmid pUC18lon2 wurde nach Transformation in *E. coli* DH5 α und Anzucht eines entsprechenden Transformanten in großen Mengen isoliert. Danach wurde pUC18lon2

mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *Sall* geschnitten und das 23 Basen große Oligonukleotid durch präparative Agarosegelelektrophorese entfernt. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurde das 1,58 kBp große *lon1* Fragment aus pKF5 ausgeschnitten und ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese präparativ gewonnen. Dieses Fragment *lon1* und der geschnittene Vektor pUC18lon2 wurden miteinander vermischt und ligiert. Der Ligationsansatz wurde alkoholisch gefällt und ein Teil der DNA mit dem Restriktionsenzym *Sall* behandelt und auf ein Agarosegel aufgetragen. Diese Restriktionsanalyse ist in Abbildung 3.4-8 B in Spur 2 dargestellt. Durch die Ligation konnten eine Reihe von verschiedenen Kombinationen entstehen. Ein dimeres pUC18lon2 mit 7,3 kBp entstand durch 2 Monomere, die über die *PstI*-Stelle miteinander verknüpft wurden. Es entspricht der Bande a in Spur 2. Das gesuchte Plasmid pUC18lon, 5,3 kBp, entstanden durch den richtigen Einbau von *lon1* in pUC18lon2 und anschließender Linearisierung an der *Sall*-Einzelschnittstelle, entspricht Bande b in Spur 2. Bande c in Spur 2 mit 3,65 kBp ist das monomere pUC18lon2. Ein dimeres *lon1*-Fragment mit 3,2 kBp ist in Bande d der Spur 2 zu sehen und Bande e bei 1,6 kBp entspricht dem monomeren *lon1*-Fragment. Die Monomeren von pUC18lon2 und *lon1* konnten gefunden werden, da sie durch den großen Überschuß an DNA nicht oder eben nur an der wieder geschnittenen *Sall*-Stelle ligiert waren. In einem präparativen Ansatz wurde Bande b, das lineare 5,3 kBp große gesuchte Plasmid pUC18lon isoliert und religiert. Zur Überprüfung wurde ein Teil des Religationsansatzes mit dem Restriktionsenzym *PstI* behandelt und ist in Spur 4 der Abbildung 3.4-8 B zu sehen. Es wurden die erwarteten Banden gefunden: Ein knapp 2 kBp großes Fragment, das dem *PstI*-*PstI*-Fragment des *lon*-Gens entspricht und das 3,3 kBp große Restplasmid bestehend aus dem pUC18-Teil und dem 0,6 kBp *SacI*-*PstI*-Fragmentes des *lon*-Gens.

Damit war die Konstruktion des Plasmides pUC18lon mit dem *lon*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors nachgewiesen worden. Mit dem Religationsansatz von pUC18lon wurde *E. coli* DH5 α transformiert. Es konnten jedoch keine Transformanten gefunden werden. Dies war sehr ungewöhnlich. Die Zugabe von IPTG zu Selektionsplatten, um die Expression von *lon* zu induzieren und die essentiellen Funktionen der Protease La in den Zellen zu gewährleisten, erbrachte ebenso keinen Erfolg.

An diesem Punkt wurde klar, daß die Ursache, warum keine Transformanten gewonnen werden konnte, in einer toxischen Funktion liegen mußte. Normalerweise wird der *lac*-Promotor durch den *lac*-Repressor eindeutig reguliert. Einig wenige Moleküle des *lac*-Repressors genügen in *E. coli*, um die Expression der Wildtyp- β -Galactosidase zu unterdrücken. Bei der Verwendung von Plasmiden mit hoher Kopienzahl, wie pUC18, sind

jedoch zu wenige *lac*-Repressormoleküle vorhanden, um die vielen *lac*-Promotoren vollständig zu reprimieren. Es kommt daher zu einer mehr oder weniger großen basalen Transkription des Promotors. Sollte eine bereits geringe zusätzliche Expression der Protease La lethal für *E. coli* sein, so konnten mit diesem System keine Transformanten gewonnen werden. Als weitere Maßnahmen wurde von LB auf M9-Minimalmedium gewechselt, um jegliche Induktion des *lac*-Promotors durch Mediumbestandteile auszuschließen und es wurde der Stamm *E. coli* JM101 [MESSING *et al.*, 1981] verwendet, der über ein episomales *lacI^q*-Gen, den *lacI*-Repressor verstärkt produziert. Auch diese Experimente führten zu keinem Stamm mit dem *lon*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors [FRIEHS & BAILEY, 1989]. Erst die Arbeiten von GOFF und GOLDBERG [GOFF & GOLDBERG, 1987] brachten Klarheit über dieses Problem. Sie hatten ebenso keine Transformanten finden können. Erst durch Co-expression des *lacI*-Gens durch ein zusätzliches kompatibles Plasmid, das zu einer enormen Überexpression des *lac*-Repressors führte, konnten Transformanten gewonnen werden, bei denen *lon* unter *P_{lac}* Kontrolle stand. Jegliche Induktion des Promotors war jedoch lethal für die Zellen. Dies bedeute, daß die Feinregulation des *lon*-Gens essentiell für die Zellen ist. Auch nur eine geringe zusätzliche Expression der Protease La ist unweigerlich tödlich für die Zellen. Die mit dem *lac*-Promotor verbundene basale Transkription machen es unmöglich ein toxisches Protein zu exprimieren, außer durch zusätzliche Überexpression des *lac*-Repressors.

3.4.3.2 Basale Transkription beim *vgb*-Promotor

Der sauerstoffregulierte Promotor *vgb* weist eine signifikante basale Transkription auf (siehe Abbildungen 3.4-4 und 3.4-5), die einen Einsatz für die Produktion von zelltoxischen Proteinen praktisch unmöglich machen und die strikte Trennung von Anzucht- und Produktionsphase unmöglich macht. Dies wird in Abbildung 3.4-9 noch einmal verdeutlicht.

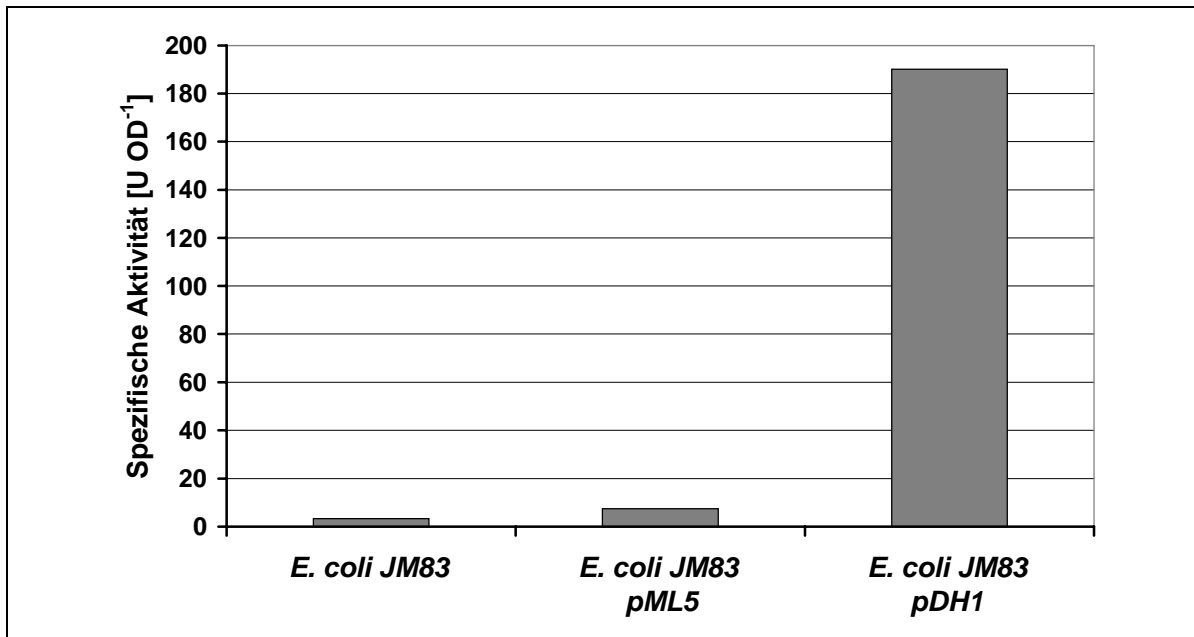


Abbildung 3.4-9: Basale Transkription des *vgb*-Promotors im Stamm *E. coli* JM83

Anzucht in LB-Medium bei 37°C im Schüttelkolben mit Begasung über Filterfritte. Ernte der Zellen in der exponentiellen Phase und Bestimmung der Aktivität der β -Galactosidase nach Miller [MILLER, 1972].

Zur Ermittlung der basalen Transkription des *vgb*-Promotors wurden Vergleichsstämme unter den gleichen Bedingungen angezchtet und die Produktion der β -Galactosidase enzymatisch bestimmt. Der Stamm *E. coli* JM83 sollte keine Enzymaktivität aufweisen, da das Gen für die β -Galactosidase durch Mutation zerstört worden war [VEIRA & MESSING, 1982]. Der Stamm *E. coli* JM83 pML5 besitzt das Plasmid pML5, auf dem eine promotorlose *lacZYA*-Kassette liegt. Durch das Fehlen eines Promotors sollte wenn überhaupt nur eine geringe Enzymaktivität gefunden werden können, die aufgrund ungesteuerter Transkription auftreten kann. Im Plasmid pDH1, ebenfalls im Stamm *E. coli* JM83, steht diese *lacZYA*-Kassette unter der Kontrolle des *vgb*-Promotors. Je nach Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte eine mehr oder weniger starke Aktivität gefunden werden. Die Anzucht aller drei Stämme erfolgte im Schüttelkolben unter starker Begasung mittels einer 0,2 μ m Filterfritte, d. h. der gelöste Sauerstoff hatte immer seinen maximalen Wert. Um ein Absinken des Sauerstoffs durch Limitierung aufgrund des Sauerstoffverbrauchs durch eine hohe Biomasse zu vermeiden, wurden die Zellen in der exponentiellen Phase geerntet und analysiert. Wie erwartet war die Aktivität bei den Stämmen *E. coli* JM83 und *E. coli* JM83 pML5 kaum oder nur sehr gering vorhanden. Dies zeigt deutlich, daß jegliche Aktivität beim Stamm *E. coli* JM83 pDH1 eindeutig dem *vgb*-Promotor zugeordnet werden kann. Dies bedeutet, daß aufgrund der hohen Aktivität, die gefunden wurde, der *vgb*-Promotor eine hohe basale Transkription besitzt.

3.4.3.3 Reduktion der basalen Transkription beim *nirB*-Promotor

Der *nirB*-Promotor wird, wie der *vgb*-Promotor über Sauerstoff reguliert. Bei dieser Regulation spielen komplexe Signalübertragungsmechanismen wichtige Rollen. Dazu gehört das Protein FNR (Fumarat Nitrat Regulator) ein Aktivator für die Transkription in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen [UNDEN & TRAGESER, 1991]. Dabei treten Fe^{2+} -Ionen als Co-Faktoren auf [NIEHAUS *et al.*, 1991, GREEN & GUEST, 1993]. Es war daher von Interesse zu untersuchen, wie sich verschiedene Konzentrationen von Fe^{2+} -Ionen auf die Expression durch den *nirB*-Promotor auswirken. Dazu wurde der Stamm *E. coli* MM294 pAA182 mit *lacZ* unter P_{nirB} -Kontrolle [BELL *et al.*, 1990b] in LB-Medium angezüchtet, das verschiedene Konzentrationen an Eisencitrat enthielt. Die basale Transkription des *nirB*-Promotors wurde über die Aktivität der β -Galactosidase bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.4-10.

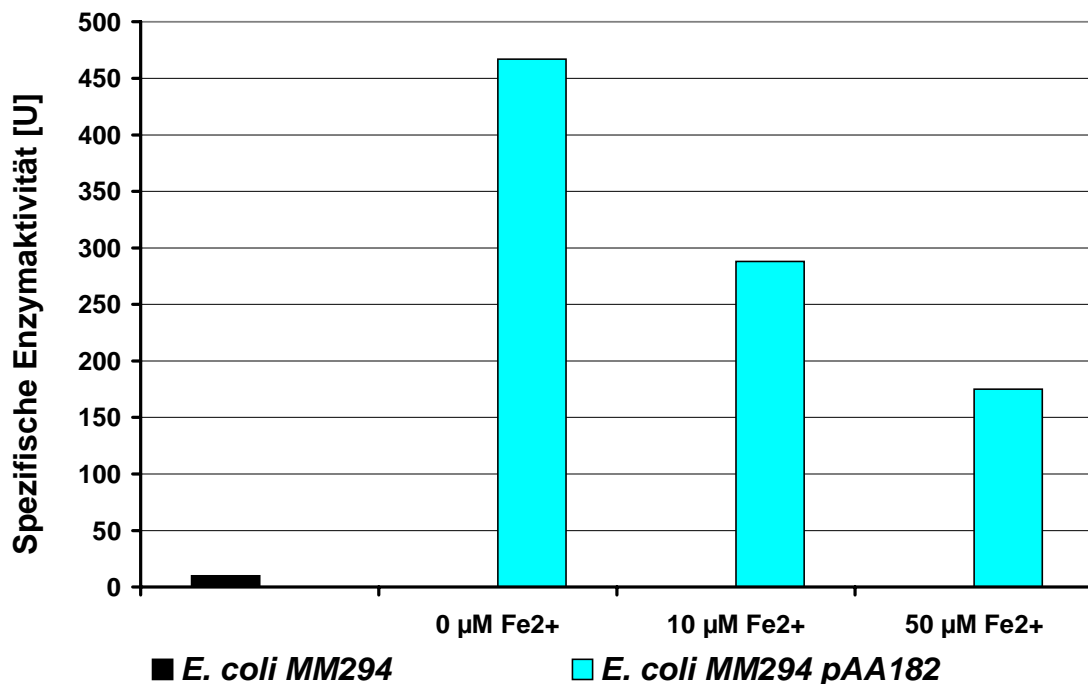


Abbildung 3.4-10: Einfluß von Fe^{2+} -Ionen auf die basale Transkription des *nirB*-Promotors.

Die Stämme *E. coli* MM294 mit und ohne dem Plasmid pAA182 wurden in LB-Medium angezüchtet. Der Stamm *E. coli* MM294 pAA182 wurde zusätzlich in LB-Medium mit 0 µm bzw. 50 µm Eisencitrat angezüchtet. Die Zugabe von Eisencitrat hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum des Stammes. Nach 4 h wurden Proben in der exponentiellen Phase gezogen und die Aktivität der β -Galactosidase enzymatisch bestimmt [MILLER, 1972].

Der plasmidfreie Stamm weist praktisch keine Aktivität auf. Jegliche Aktivität stammt vom Plasmid pAA182. Deutlich zu sehen ist der Einfluß von Fe^{2+} -Ionen auf die basale

Transkription des *nirB*-Promotors. Bei einer Eisenkonzentration von 50 µm sinkt die basale Transkription auf unter 50 %.

Ein prozeßtechnischer Vergleich von *nirB* und *vgb* liegt nahe. Beide Promotoren bieten den Vorteil, daß keine zusätzliche Induktionssubstanz zugegeben werden muß, sondern daß die Induktion über Reduzierung des Gelöstsauerstoffs erfolgt. Dies kann durch automatische Limitierung des Sauerstoffs bei einer hohen Zelldichte oder durch Abschaltung der Begasung erreicht werden. Letztere Methode würde zusätzlich Kosten der Begasung einsparen. Es gibt jedoch prozeßtechnisch signifikante Unterschiede. Der Promotor *vgb* weist eine erhebliche basale Transkription bei Sauerstoffsättigung auf. Dies gilt auch für den Promotor *nirB* [CHARLES *et al.*, 1992]. Dieser läßt sich jedoch durch Zugabe von Fe²⁺-Ionen beeinflussen. Ein weiterer relevanter Unterschied liegt in der Tatsache, daß der *vgb*-Promotor für eine optimale Induktion ein mikroaerobes Klima benötigt [KHOSLA & BAILEY, 1989], während der *nirB*-Promotor unter völlig anaeroben Bedingungen sein Optimum zeigt. Dies wird durch die unterschiedliche Funktion der Promotoren verständlich. Der *vgb*-Promotor ist Teil eines Systems, das aktiviert wird, um ein geringes Sauerstoffangebot noch nutzen zu können. Der Promotor *nirB* hingegen, der als Bestandteil des Operons der Nitratreduktase gefunden wurde [JAYARAMAN *et al.*, 1987, PEAKMAN *et al.*, 1990], tritt in Aktion, wenn kein Sauerstoff mehr zur Verfügung steht und der Organismus seinen Stoffwechsel auf einen anderen Elektronenakzeptor umstellt. Prozeßtechnisch bedeutet dies, daß der Promotor *nirB* leichter zu regulieren ist, da es einfacher ist ein konstantes anaerobes als ein konstanten mikroaerobes Klima im Reaktor aufrecht zu erhalten. Die signifikanten Unterschiede in der spezifischen Aktivität lassen auf eine höhere Promotorstärke beim *nirB*-Promotor schließen. Dies kann jedoch von anderen Faktoren sehr stark beeinflußt sein und müßte gezielt untersucht werden. Zusammenfassend läßt sich jedoch sagen, daß der *nirB*-Promotor für einen Einsatz in der Fermentationstechnik geeigneter erscheint als der *vgb*-Promotor.

Bei der Verwendung von *E. coli* – Expressionssystemen zur Produktion rekombinanter Proteine im Forschungsbereich werden Vektoren und somit Promotoren eingesetzt, die traditionell verwendet werden oder Expressionsvektoren, die von Firmen angeboten werden. Deshalb kommen nur ein paar wenige Promotoren zum Einsatz. Dazu gehören die Promotoren *lac*, *tac*, *trp*, λ und T7. Andere Vektoren spielen kaum eine Rolle. Beim fermentativ-industriellem Einsatz von Expressionssystemen wären neue, prozeßtechnisch bessere Promotoren zwar wünschenswert, finden sich aber kaum, da meist die Systeme aus der Forschung und Entwicklung zum Einsatz kommen und somit auch die

entsprechenden Promotoren. Für zukünftige Entwicklungen sind jedoch prozeßtechnisch optimierte Promotoren sicherlich von Interesse. Die wichtigen Eigenschaften solcher fermentationstechnisch relevanten Promotoren sind eine hohe Promotorstärke, geringe oder keine basale Transkription und eine einfache, billige und reversible Induktion ohne Zusatz von Induktionssubstanzen.

3.5 Lokalisierung rekombinanter Produkte

Die Lokalisierung rekombinanter Produkte beeinflusst entscheidend die Aufarbeitung. Nach erfolgter Fermentation werden die Zellen vom verbrauchten Medium getrennt, außer bei den wenigen Prozessen, bei denen die Fermentationsbrühe das Produkt darstellt (z. B. Joghurt). Befindet sich das Produkt im Medium, so muß es aus einem oft großen Volumen angereichert und isoliert werden. Befindet sich das Produkt in den Zellen, so müssen diese aufgeschlossen werden. Da die unterschiedlichen Organismen verschiedene Zellkompartimente besitzen, kann es für die Aufarbeitung auch von Bedeutung sein, in welchem Zellkompartiment sich das Produkt befindet, falls es möglich ist einzelne Kompartimente zu isolieren. Bei Gesamtaufschlüssen werden neben dem Produkt eine Vielzahl von anderen zellinternen Substanzen freigesetzt, die die spätere Reinigung erheblich erschweren können.

Bei der Entwicklung und Optimierung von Verfahren zur Isolierung und Reinigung biotechnologischer Produkte wird versucht die Anzahl der Verfahrensschritte möglichst gering zu halten bzw. zu reduzieren. Die Ausbeute der einzelnen Schritte an biologisch aktivem Produkt sollte dabei möglichst hoch sein und es sollte versucht werden die Konzentration von unerwünschten Begleitstoffen zu erniedrigen bzw. diese Stoffe ganz zu entfernen.

Verallgemeinernd kann festgestellt werden, daß die Isolierung und Reinigung von vollständig in das Medium sekretierten Produkten erheblich einfacher und somit billiger ist, als Produkte aus Zellaufschlüssen zu isolieren. Dies bedeutet, daß Produkte wie z. B. technische Enzyme wirtschaftlich nur hergestellt werden können, wenn sie sekretiert werden. Daher gibt es intensive Bemühungen gute Sekretionssysteme zu entwickeln.

Neben der großen Bedeutung der Lokalisierung der Produkte für die Aufarbeitung gibt es auch andere Faktoren, wie z. B. die richtige Faltung bei rekombinanten Proteinen, die Ausbildung und Aktivität von neuen Eigenschaften, sowie Veränderungen in den Produktivitäten, die durch die Lokalisierung beeinflusst werden können.

In diesem Kapitel werden einige Aspekte der Lokalisierung der Produkte aufgezeigt, sowie Bemühungen vorgestellt, neue, effiziente Sekretionssysteme zu entwickeln.

3.5.1 Klonierung und Lokalisierung der Levanase aus *B. subtilis* in *A. eutrophus*

Alcaligenes eutrophus H16 ist seit 1996 einer neuen Spezies zugeordnet und heißt *Ralstonia eutrophus*, wie der Auszug aus dem Katalog der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen zeigt (Abbildung 3.5-1). In der vorliegenden Arbeit wird weiterhin der alte Name verwendet.

RALSTONIA
 Status: New Genus
 Type species: *R. pickettii*
 Reference: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:625 (validation list)
 Name: *Ralstonia eutropha*
 Status: New Combination
 Reference: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:625 (validation list)
 Hazard group: 1 (German classification)
 Type strain: ATCC 17697, DSM 531, IMET 10383
 Other names: *Alcaligenes eutrophus* (Basonym)

Abbildung 3.5-1: Auszug aus dem Katalog der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen 1999

Alcaligenes eutrophus ist ein GRAM-negatives chemolithoautotrophes Bakterium. Es kann auf Basis von CO₂ als Kohlenstoff- und H₂ als Energiequelle wachsen. Als organische Kohlenstoffquelle kann *A. eutrophus* verschiedene organische Säuren und als einziges Kohlenhydrat Fructose verwerten [OEDING & SCHLEGEL *et al.*, 1973]. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen, etwa einem hohen C/N-Verhältnis, kann *A. eutrophus* sowohl bei autotrophem als auch heterotrophem Wachstum große Mengen des Reservestoffes Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) synthetisieren und speichern [STEIBÜCHEL, 1991].

PHB ist ein aliphatischer Polyester mit ähnlichen Eigenschaften wie Polypropylen [KING, 1982]. Im Gegensatz zu Polypropylen ist PHB jedoch biologisch abbaubar. PHB kann somit die Grundlage für umweltfreundliche Thermoplaste bilden. Da *A. eutrophus* bis zu 80 % seines Zelltrockengewichts PHB bilden kann, ist es als dessen Produzent von Interesse. Die fermentationstechnische Herstellung von PHB auf Basis von CO₂ als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) und H₂ als Energiequelle beinhaltet sicherheitstechnisch große Probleme. Die Anzucht auf Fructose als C-Quelle ist jedoch viel zu teuer. Daher lag es nahe durch gentechnische Eingriffe, das Substratspektrum von *A. eutrophus* so zu verändern, daß dieser Organismus preiswertere C-Quellen verwerten kann.

Die Levanase aus *B. subtilis* war in *E. coli* kloniert worden [FRIEHS *et al.*, 1986]. Für die

Übertragung der Levanase auf *A. eutrophus* wurde eine spezielle Strategie angewandt [FRIEHS & LAFFERTY, 1989]. Die Techniken der Transformation für *A. eutrophus* waren sehr ineffizient. Hingegen war es gelungen Plasmide einfach mittels Konjugation auf *A. eutrophus* zu übertragen. Für eine Konjugation benötigt ein Plasmid die *tra*-Funktion (Transfer) und die *mob*-Region (Mobilisierung). Die *tra*-Funktion ermöglicht es die Pilis für die Plasmabrücke, über die der Gentransfer erfolgen soll, auszubilden. Die *mob*-Region auf einem Plasmid bewirkt die gesteuerte Übertragung der DNS auf der die *mob*-Region kodiert. Plasmide mit *tra*-Funktion und *mob*-Region können jedoch leicht auf andere Spezies übertragen werden und bilden somit ein Sicherheitsrisiko. Es ist jedoch möglich ein Plasmid mit *mob*-Region aber ohne *tra*-Funktion zu übertragen, wenn die *tra*-Funktion durch ein Helferplasmid geliefert wird.

Zuerst wurde das Gen für die Levanase in den mobilisierbaren Vektor pMMB33 [FREY, 1983) übertragen. Dabei entstand das Plasmid pKF4 [FRIEHS & LAFFERTY, 1989]. Dieses Plasmid wurde in *E. coli* C600 transformiert. Als Helferplasmid wurde RP4 verwendet, ein Derivat des Plasmid RP4 [SIMON *et al.*, 1983]. Die Plasmide pKF4 und RP4-4 sind inkompatibel, d. h. sie können in einer Zelle zusammen nicht langfristig replizieren. Zellen, die beide Plasmide aufgenommen haben, verlieren im Lauf der Reproduktion eines der Plasmide.

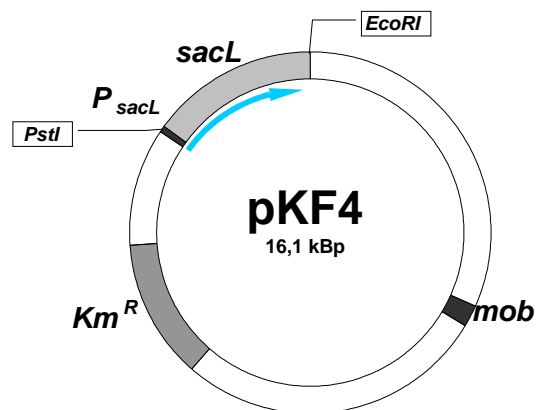


Abbildung 3.5-2: Plasmidkarte von pKF4

Km^R = Kanamycinresistenz, P_{sacL} = Promotor der Levanase,
sacL = Levanase, *mob* = Mobilisierungsregion

Nach der triparentalen Konjugation wurden einige Konjuganden gefunden, die das Plasmid pKF4 enthielten [FRIEHS, 1989].

Bei der Anzucht von *A. eutrophus* pKF4 in flüssigem H16-Medium mit Saccharose als C-Quelle mußte jedoch festgestellt werden, daß das Wachstum deutlich linear, d. h.

gehemmt war. Die Konzentration der Saccharose im Medium nahm nur langsam ab. Eine Analyse des Stammes ergab, daß keine Levanase ins Medium sekretiert wird und kaum Aktivität im Periplasma nachweisbar ist. Daraus läßt sich schließen, daß die Levanase aus *B. subtilis* praktisch nur im Cytoplasma von *A. eutrophus* vorlag. Da *A. eutrophus* wahrscheinlich auch über kein Transportsystem für Saccharose verfügt, konnte nur die Saccharose verwertet werden, die durch einfache Diffusion in die Zellen gelangte. Dies war für gutes Wachstum jedoch viel zu gering. Es lagen massive Transportlimitierungen, sowohl der Levanase ins Medium als auch der Saccharose in die Zelle, vor [FRIEHS & LAFFERTY, 1989].

Hier zeigte sich deutlich, daß die Lokalisierung des rekombinanten Produktes, für seine effektive Nutzung ungeeignet war. Für eine sinnvolle Erweiterung des Substratspektrums von *A. eutrophus* war es notwendig, diese Transportlimitierungen zu reduzieren.

Änderungen im Transport bei *A. eutrophus* durch Zugabe membranaktiver Substanzen

Es sollte nun untersucht werden, ob durch Zugabe von bestimmten membranaktiven Stoffen die oben angesprochenen Transportlimitierungen reduziert werden können und dadurch dem Stamm *A. eutrophus* pKF4 ein besseres Wachstum auf Saccharose ermöglicht würde. In einem einfachen Toxizitätstest sollte vorher die Wahl des membranaktiven Stoffes getroffen werden. Danach sollten in Schüttelkolbenversuchen unter Zugabe der ausgewählten Substanz eventuelle Änderung des Abbaus von Saccharose untersucht werden. Die Analytik umfaßte die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) als Maß für das Wachstum und die Quantifizierung von Saccharose bzw. von Glucose. Glucose entsteht bei der Spaltung der Saccharose durch die Levanase. Da *A. eutrophus* nur Fructose verwerten kann, sollte Glucose im Medium akkumulieren.

Auswahl von membranaktiven Stoffen

Zu den membranaktiven Stoffen gehören Detergenzien. Sie können kleine amphiphatische Moleküle sein, die in wäßrigen Lösungen bei niedrigen Konzentrationen als Monomere und in hohen Konzentrationen als Micellen vorliegen. Mit Membranen zusammengebracht können sich die hydrophoben Enden dieser Moleküle mit den hydrophoben Bereichen der Membranproteine arrangieren, wobei sie die Lipidmoleküle verdrängen. Die polaren Enden der Detergenzmoleküle orientieren sich nach außen zum wäßrigen Milieu. So können derartige Detergens-Protein-Komplexe Membranproteine gleichsam in Lösung bringen [SANDERMANN, 1983]. Der polare Molekülteil des Detergens kann als geladen (anionische oder kationische Detergenzien), elektrisch neutral (z. B.

Triton X-100) oder als Zwitterion (z. B. CHAPS) vorliegen.

Zur Auswahl des membranaktiven Stoffes, der bei den geplanten Experimenten eingesetzt werden sollte, wurden mit drei Substanzen Toxizitätstests durchgeführt. Es wurden die Detergenzien Triton X-100 und Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie der Chelatbildner EDTA verwendet, der durch die Komplexbildung von Ca^{++} - Ionen Einfluß auf Membranen hat. Dabei wurden zu 50 mL LB Medium die jeweiligen Substanzen in Konzentrationen von 0,1 % und 0,01 % (w/v) zugegeben und die Kulturen mit 500 μL einer Vorkultur von *A. eutrophus* H16 pKF4 beimpft. Als Vergleich diente eine Kultur ohne Zugabe einer membranaktiven Substanz. Die Kulturen wurden bei 30°C im Schüttelwasserbad bebrütet und nach 12 h die OD_{600} gemessen und miteinander verglichen. Zum Vergleich wurde die OD_{600} der reinen LB Kultur zu 100 % gesetzt. Abbildung 3.5-3 zeigt die Ergebnisse.

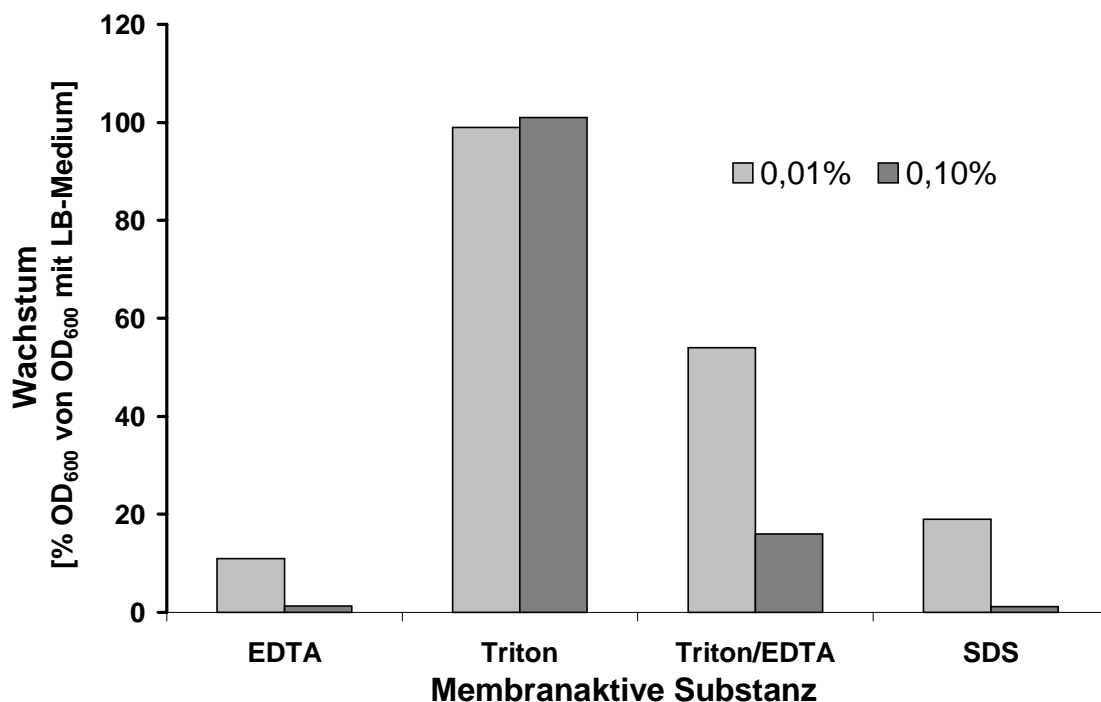


Abbildung 3.5-3: Einfluß membranaktiver Substanzen auf das Wachstum von *A. eutrophus* H16 pKF4.

Triton X-100 zeigte keinen negativen Einfluß auf das Wachstum. EDTA und SDS reduzierten schon bei der geringen Konzentration von 0,01 % das Wachstum deutlich. Interessanterweise zeigte die Kombination von Triton X-100 mit EDTA ein besseres Wachstum als EDTA allein in der selben Konzentration. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die membrandestabilisierenden Auswirkungen von EDTA, beruhend auf der Komplexbildung vor allem der Ca^{++} - Ionen, durch Eigenschaften des

Detergens Triton X-100 kompensiert werden. Nach diesen Ergebnissen wurde entschieden mit dem Detergens Triton X-100 die geplanten Experimente durchzuführen.

Einfluß von Triton X-100 auf den Abbau von Saccharose durch *A. eutrophus* H16 pKF4

In Schüttelkolben mit 200 mL LB Medium und Saccharose (5 g L^{-1}) wurde der Stamm *A. eutrophus* H16 pKF4 bei verschiedenen Konzentrationen von Triton X-100 angezüchtet und das Wachstum durch Messung der OD_{600} verfolgt. Während der Kultivierungen wurden Proben gezogen und die Konzentration von Saccharose und Glucose enzymatisch bestimmt. Die Schnelligkeit der Abnahme der Saccharose sollte ein Hinweis darauf sein, ob durch Zugabe von Triton X-100 etwaige Transportlimitierungen verringert werden können. Einen weiteren Hinweis sollte die Akkumulation von Glucose im Medium geben, da der eingesetzte Stamm Glucose nicht oder zumindest kaum verwerten kann. Es wurden Experimente ohne Zugabe von Triton X-100 und mit jeweils 0,1 %, 0,25 % und 0,5 % (w/v) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.5-4 bis 3.5-7 dargestellt.

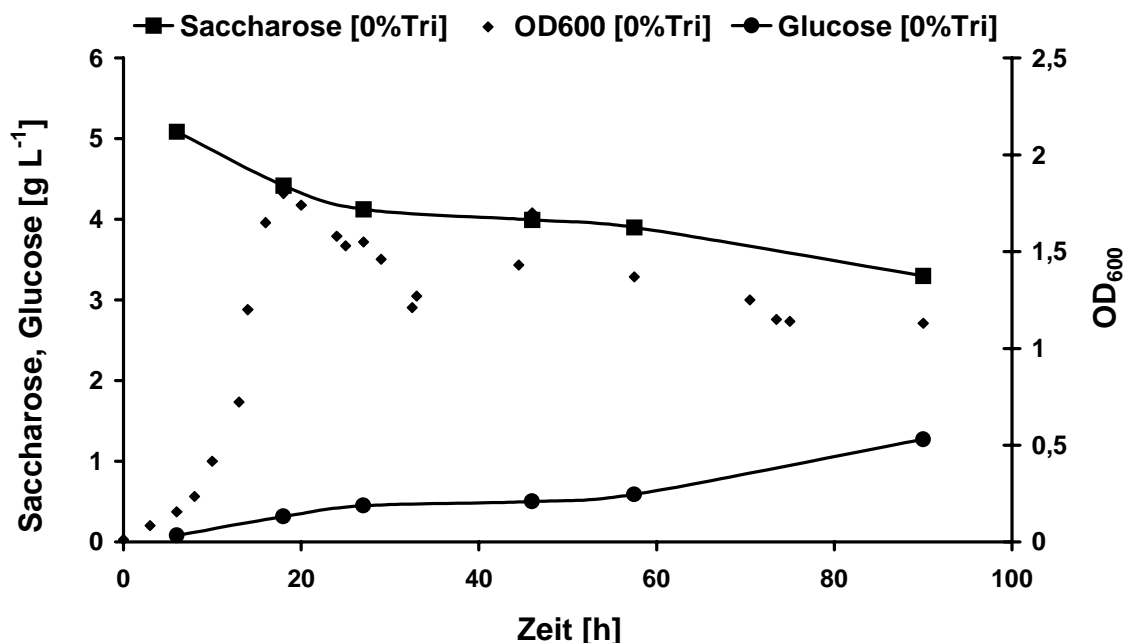


Abbildung 3.5-4: Kultivierung von *A. eutrophus* H16 pKF4 in LB-Saccharose-Medium ohne Zugabe von Triton X-100.

In den ersten 20 h zeigte sich normales Wachstum, wobei der LB-Anteil verbraucht wurde. Die maximale OD_{600} betrug 1,80. Saccharose wurde langsam verwertet. Die

geringe Akkumulation von Glucose korrespondiert mit dem geringen Saccharoseabbau.

Beim nächsten Experiment wurde dem LB-Saccharose-Medium Triton X-100 in einer Konzentration von 1 g L^{-1} (0,1 %) zugegeben.

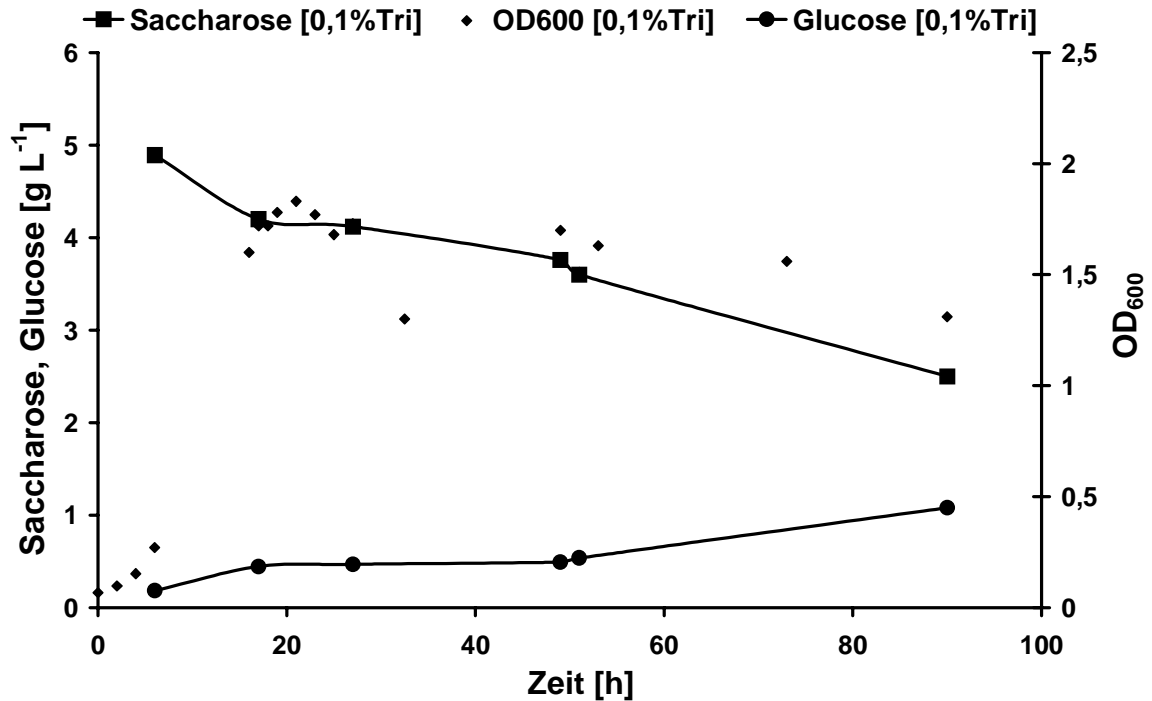


Abbildung 3.5-5: Kultivierung von *A. eutrophus* H16 pKF4 in LB-Saccharose-Medium mit 0,1 % Triton X-100.

Diese Kultivierung zeigte wie beim vorhergegangenen Experiment ein gutes Wachstum in den ersten 20 h, in denen der LB-Anteil verbraucht wurde. Die Saccharosekonzentration sank unter 3 g L^{-1} . Die Glucoseakkumulation verlief entsprechend. Danach wurde die Konzentration an Triton X-100 auf $2,5 \text{ g L}^{-1}$ erhöht.

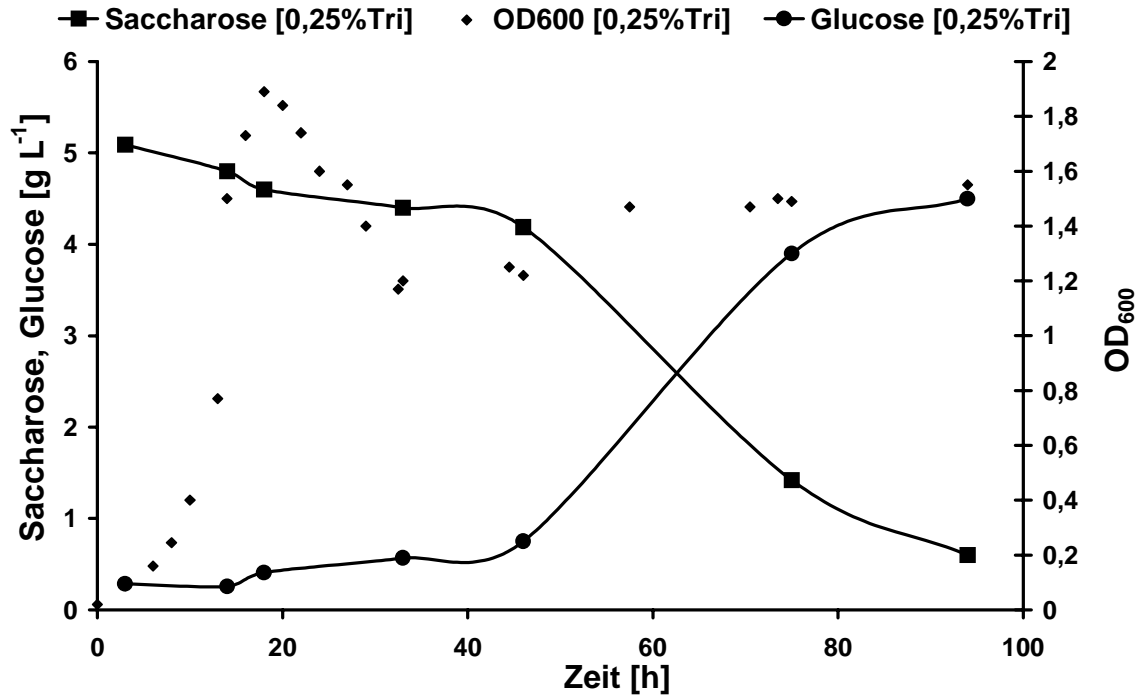


Abbildung 3.5-6: Kultivierung von *A. eutrophus* H16 pKF4 in LB-Saccharose-Medium mit 0,25 % Triton X-100.

Nach dem guten Wachstum auf LB, mit einer OD₆₀₀ von 1,98, wurde die Saccharose fast vollständig abgebaut. Glucose akkumulierte auf 1,5 g L⁻¹. Beim letzten Experiment wurden 5 g L⁻¹ Triton X-100 dem Medium zugegeben.

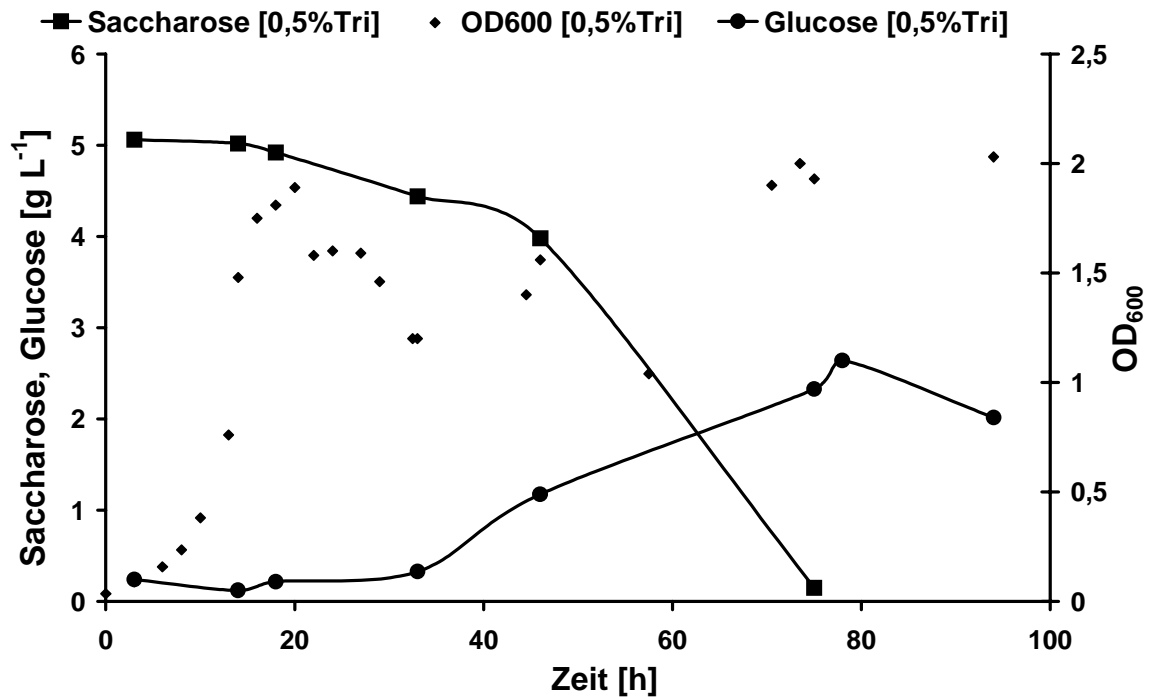


Abbildung 3.5-7: Kultivierung von *A. eutrophus* H16 pKF4 in LB-Saccharose-Medium mit 0,5 % Triton X-100.

Nach dem üblichen guten Wachstum auf LB Medium und einer OD_{600} von 1,89 stieg die Biomasse nach 60 h wieder an bis zu einer maximalen OD_{600} von 2,03. Die Saccharose wurde vollständig abgebaut. Die Abnahme der akkumulierten Glucose könnte auf eine langsame Verwertung dieser C-Quelle hindeuten.

Um den Einfluß von Triton X-100 im Medium abschätzen zu können, wurden verschiedene Auswirkungen bei den jeweiligen Konzentrationen des Detergens miteinander verglichen. Den Vergleich des Wachstums auf LB bzw. der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeiten zeigt Abbildung 3.5-8.

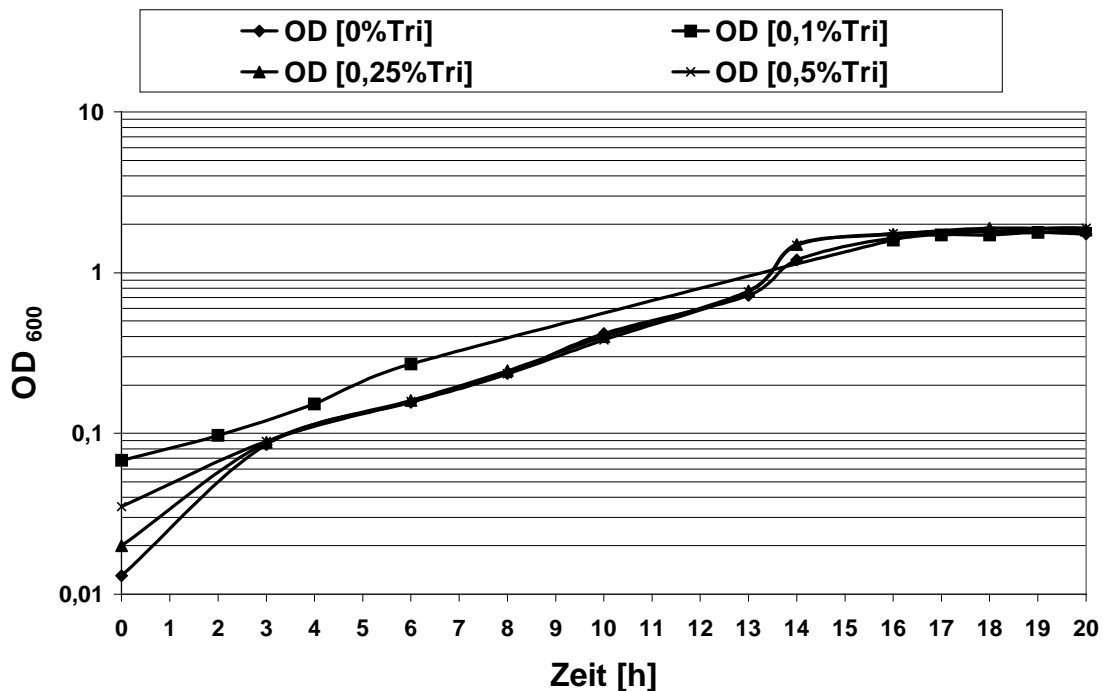


Abbildung 3.5-8: Einfluß der Triton X-100 Konzentration auf das Wachstum von *A. eutrophus* pKF4 auf LB

Es kann kein Einfluß festgestellt werden. Die Steigung der logarithmischen Auftragung der OD_{600} zeigt praktisch keinen Unterschied. Dies bedeutet, daß die Zugabe von Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 5 g L^{-1} keinen Einfluß auf die spezifische Wachstumsgeschwindigkeit von *A. eutrophus* pKF4 auf LB-Medium hat. Ein Vergleich der erreichten OD_{600} -Werte zeigt Abbildung 3.5-9.

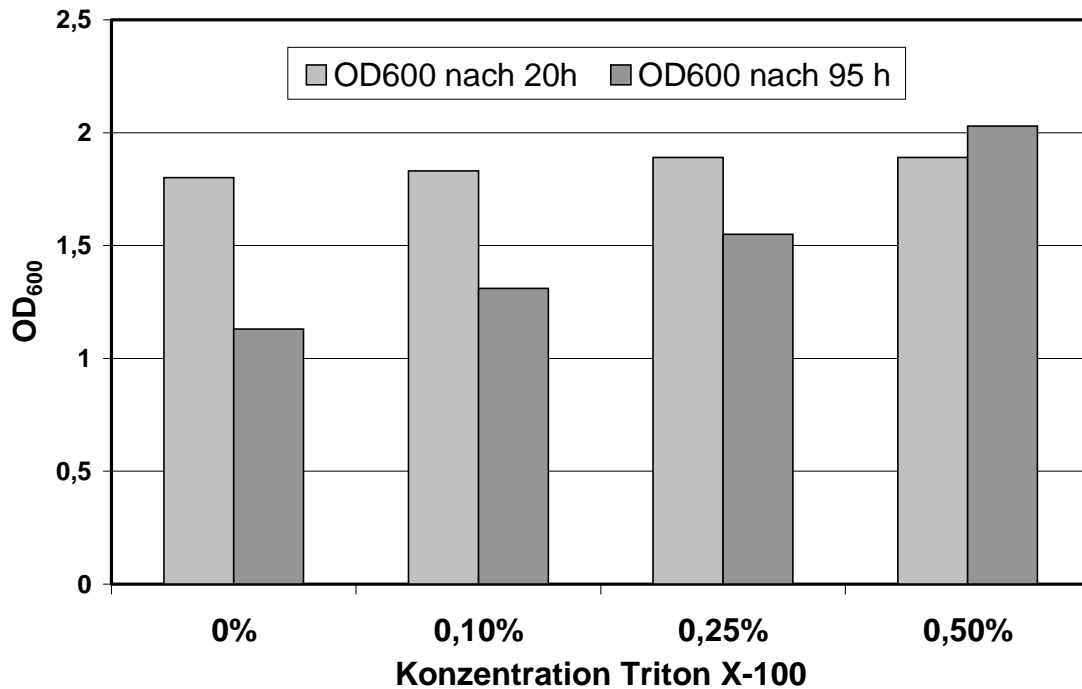


Abbildung 3.5-9: Vergleich der OD₆₀₀ nach 20 bzw. 95 h Fermentation

Nach 20 h ist die erreichte maximale optische Dichte OD₆₀₀ bei allen Triton X-100 Konzentrationen ohne signifikante Unterschiede. Die geringe Erhöhung der OD₆₀₀ mit steigender Konzentration an Triton X-100 könnte auf einen positiven Einfluß des Detergens hinweisen. Der Vergleich der spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit in der vorhergehenden Abbildung bestätigt dies jedoch nicht. Deutlich ist jedoch die Änderung der OD₆₀₀ im weiteren Verlauf der Fermentation zu erkennen. Dies läßt darauf schließen, daß die Verwertung der Saccharose zu einem Anstieg der Biomasse führt und dieser Anstieg mit steigender Konzentration von Triton X-100 zunimmt. Aus den Wachstumsverläufen ist jedoch ein weiteres Phänomen erkennbar: die Abnahme der OD₆₀₀ nach 20 h.

Nach dem Wachstum auf LB zeigten alle Kultivierungen deutliche Einbrüche der OD₆₀₀. Dafür gibt es keine zufriedenstellende Erklärung. Da *A. eutrophus* PHB speichern kann und dies sicherlich die optischen Eigenschaften der Zellen beeinflusst, könnte darin ein Grund liegen. Hier zeigt sich deutlich, daß die Messung der OD₆₀₀ eigentlich kein brauchbares analytisches Instrument zur Bestimmung des Wachstums von *A. eutrophus* darstellt. Auch eine gravimetrische Bestimmung der Biomasse wäre aufgrund des ungewissen PHB-Anteils nicht zielführend. Als Kompromiß könnte die Bestimmung der teilungsfähigen Zellen durch Ausplattierung dienen. Da die Zellen bei diesen Experimenten großem Streß durch Limitierungen ausgesetzt werden, käme es auch mit dieser Methode jedoch zu Verfälschungen.

Deutliche Unterschiede waren im Abbau der Saccharose zu sehen. Dies wird besonders anschaulich, wenn die Trendlinien, basierend auf linearer Regression, miteinander verglichen werden, wie in Abbildung 3.5-10 dargestellt wird.

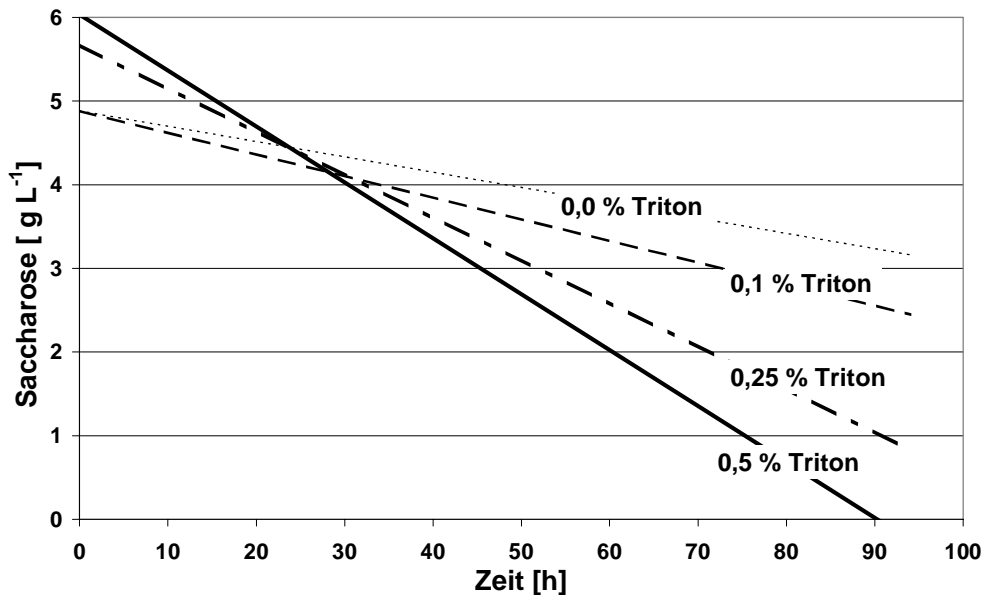


Abbildung 3.5-10: Trendlinien der Abnahme der Saccharosekonzentrationen

Die Korrelationen der Trendlinien lagen zwischen 0,96 und 0,85. Eindeutig ist zu sehen, daß die Konzentration von Triton X-100 die Abnahme der Saccharosekonzentration direkt beeinflusst. Saccharose wird bei höherer Konzentration schneller abgebaut.

Aus den Experimenten zur Verbesserung des Transports in *A. eutrophus* pKF4 kann folgendes geschlossen werden:

- ❖ Die Zugabe von Triton X-100 zum Medium verbessert den Transport der Saccharose in die Zellen. Die Saccharose kann dadurch schneller verstoffwechselt werden. Es ist aber auch möglich, daß Invertase in das Medium transportiert wird, wofür das Auftauchen von Glucose im Medium spricht.
- ❖ Die Verbesserung des Transports führt nicht zu einem signifikanten exponentiellen Wachstum mit Saccharose als C- und Energie-Quelle.
- ❖ Für einen technischen Einsatz von *A. eutrophus* zur Produktion von PHB auf Basis von Saccharose ist das System nicht geeignet.

Statt zu versuchen, das Substratspektrum eines anspruchsvollen Organismus zu verändern, kann auch versucht werden, die Produktion eines gewünschten Stoffes in einen Organismus zu verlegen der leicht, billig und schnell zu hohen Zelldichten angezüchtet werden kann.

Dies wurde im Falle von *A. eutrophus* und PHB mit *E. coli* durchgeführt [KIM *et al.*, 1996, Kalousek & Lubitz, 1995]. Eine besonders interessante Alternative für die Produktion von PHB liegt in transgenen Pflanzen [VAN DER LIJ & WITHOLD, 1995]. Eine andere Möglichkeit liegt in der gemeinsamen Kultivierung mit einem Organismus, der ein bestimmtes Substrat nutzt und dabei ein Substrat für *A. eutrophus* produziert. Dies wurde durch eine Mischkultur von *A. eutrophus* und *Lactobacillus delbrueckii* erreicht, wobei letzterer Saccharose in Lactat umwandelt, das von *A. eutrophus* genutzt werden kann [KATOH *et al.*, 1999].

3.5.2 Co-Expression von Sec-Proteinen

Bei GRAM-negativen Bakterien gibt es zwei innerzelluläre Kompartimente, da diese Mikroorganismen zwei Zellmembranen aufweisen. Innerhalb der inneren Membran befindet sich das Cytoplasma. Der Raum zwischen den beiden Membranen wird als Periplasma bezeichnet. Es kann 40 % des Zellvolumens betragen [OLIVER, 1996]. Ein interessanter Unterschied zwischen dem Cytoplasma und dem Periplasma liegt im jeweiligen Redoxzustand. Das Cytoplasma ist reduzierend, während im Periplasma ein oxidierendes Milieu herrscht [OLIVER, 1996]. Je nach Lokalisierung ist es daher möglich, bestimmte Faltungen zu unterstützen. So benötigt die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen ein oxidatives Milieu. Solche Proteine werden daher im Periplasma eher richtig gefaltet als im Cytoplasma. Dieser Effekt, zusammen mit den Vorteilen bei der Aufarbeitung, führten zu Experimenten den Transport in das Periplasma zu erhöhen.

Wie im theoretischen Teil beschrieben sind am Transport von Proteinen in das Periplasma von *E. coli* eine Reihe von Proteinen beteiligt. Diese Proteine werden als Sec-Proteine bezeichnet. Es ist durchaus möglich, daß die Konzentration an Sec-Proteinen ein limitierender Faktor beim Transport in das Periplasma darstellt. Es lag daher nahe zu versuchen, die Konzentration an Sec-Proteinen zu erhöhen, um damit den Transport ins Periplasma zu verbessern. Es sollte versucht werden ein Sec-Protein gleichzeitig mit einem rekombinanten Protein zu exprimieren.

Für diese Co-Expression wurde das Sec-Protein B, kodiert durch das Gen *secB*, gewählt. Dieses Protein ist in *E. coli* dafür verantwortlich, daß Proteine, die in das Periplasma transportiert werden sollen, sich im Cytoplasma nicht falten, also in einer transportfähigen Form bleiben [PUGSLEY, 1993].

Co-Expression von *secB* mit GAPDH bzw. KD3

Die Wirkung der Co-Expression von *secB* wurde mit zwei rekombinanten Proteinen untersucht, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus *Ricinus communis* und der dritten Domäne des L-Kininogens (KD3), einem humanen Cysteinase-Inhibitor. Die entsprechenden Plasmide und genetischen Eigenschaften sind in Abbildung 3.5-11 beschrieben.

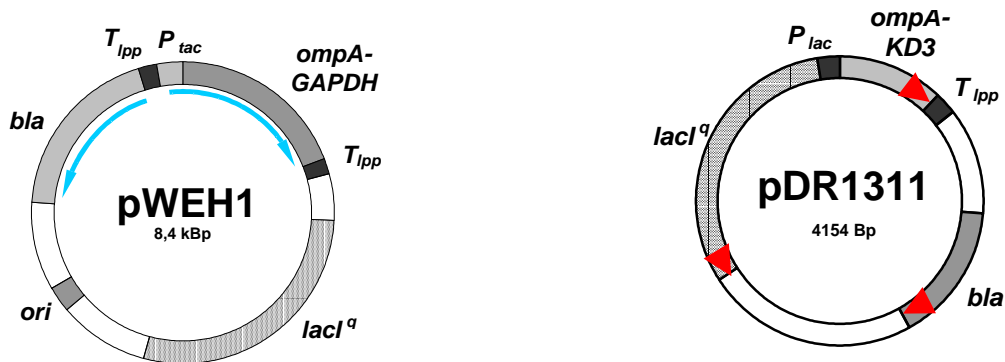


Abbildung 3.5-11: Plasmide pWEH1 und pDR1311

bla = Ampicillinresistenz, T_{lpp} = lpp-Terminator,
lacI^q = Lac-Repressor (Überexpression), P_{lac}, P_{tac} = Promotoren

Das Plasmid pWEH1 [HEKMAN *et al.*, 1990], ein Geschenk von J. MIERNYK, vom Seed Biosynthesis Research Unit, Peoria, Illinois, USA, besitzt das Gen für die GAPDH fusioniert mit der Signalsequenz des Outer-Membrane-Protein-A (*ompA*) unter der Kontrolle des *tac*-Promotors. Es basiert auf dem Plasmid pBR322 und liegt somit in der Zelle in geringer Kopienzahl von 15-20 vor [LIN-CHAO *et al.*, 1992]. Es besitzt das Resistenzgen gegen Ampicillin (*bla*), das Gen für die Überexpression des *lac*-Repressors (*lacI^q*) sowie einen starken zusätzlichen Terminator hinter der GAPDH (T_{lpp}). Die Expression der GAPDH kann durch Zugabe von IPTG induziert werden, ist jedoch aufgrund der niedrigen Kopienzahl moderat zu erwarten.

Das Plasmid pDR1311 ist ein Geschenk von E. AUERSWALD von der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik München. Es ist ein Derivat des Plasmids pASK [SKERRA *et al.*, 1991] basierend auf einem pUC-Vektor und daher in einer hohen Kopienzahl von 500-700 Kopien pro Zelle vorhanden. Das Gen für KD3 (*rKD3*) steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors und wird von einem zusätzlichen starken Terminator (T_{lpp}) flankiert. Neben dem Resistenzgen gegen Ampicillin (*bla*), besitzt dieses Plasmid ebenfalls das Gen für die Überexpression des *lac*-Repressors (*lacI^q*). Auch hier erfolgt die Expression des KD3 nach Induktion mit

IPTG.

Für die Co-expression des SecB-Proteins wurde das Plasmid pMON15906 verwendet, dessen Plasmidkarte in Abbildung 3.5-12 zu sehen ist.

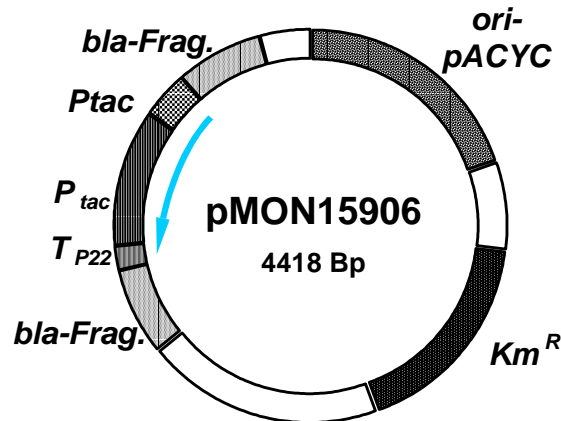


Abbildung 3.5-12: Plasmid pMON15906 mit *secB*-Gen

Das Plasmid pMON15906 ist ein Derivat von pACYC und liegt in der Zelle mit ca. 10 Kopien vor. Es ist ein Geschenk von S. LEE der Monsanto Corporation, St. Louis, Minnesota, USA. Es besitzt das Gen *aph* (Aminoglycosid-phosphotransferase), das für die Ausbildung der Resistenz gegen Kanamycin (Km^R) befähigt. Im Resistenzgen gegen Ampicillin (*bla*, β -Lactamase) sitzt die *secB*-Expressionskassette. Die Expression von *secB* wird über den *tac*-Promotor und über einen zusätzlichen Terminator, P22, kontrolliert.

Die Plasmide pWEH1 allein bzw. zusammen mit dem Plasmid pMON15906 wurden in den Stamm *E. coli* SCS1 [HANAHAH, 1983] transformiert [CHANG & MILLER, 1988] und Transformanten, *E. coli* SCS1 pWEH1 bzw. *E. coli* SCS1 pWEH1 pMON15906, die beide Plasmide enthalten, selektioniert und charakterisiert. Die Plasmide pDR1311 allein bzw. zusammen mit dem Plasmid pMON15906 wurden in den Stamm *E. coli* JM83 [VIERA & MESSING, 1982] transformiert und der Stamm *E. coli* JM83 pDR1311 bzw. *E. coli* JM83 pDR1311 pMON15906 gewonnen.

Beide Stämme mit je zwei Plasmiden sowie die entsprechenden Stämme ohne das *secB*-kodierende Plasmid pMON15906, wurden in Schüttelkolben in LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin bzw. Ampicillin und Kanamycin als Selektionsdruck angezogen und bei geeigneter optischen Dichte mit IPTG induziert. Zellen wurden geerntet und eine Zellfraktionierung [KOSHLAND & BOTSTEIN, 1980, OLIVER & BECKWITH, 1982] durchgeführt. In den jeweiligen Fraktionen des Periplasma und des Cytoplasma wurde die Aktivität der β -Lactamase als Leitenzym für das Periplasma bzw. die Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase als Leitenzym für das Cytoplasma gemessen [KHOSLA AND BAILEY, 1989].

Dabei konnte festgestellt werden, daß eine Verunreinigung der Fraktionen höchstens zu 10 % meistens unter 5 % vorlag.

Die Aktivität der GAPDH, als Maß für den Einfluß der Co-Expression, wurde über die Umsetzung von Glycerin-3-phosphat bestimmt [STEPHAN 1993]. Bei diesen Experimenten war zu beachten, daß die Aktivität der GAPDH u. U. beeinflußt werden konnte durch die Signalsequenz, die in der Cytoplasmafraktion noch am Protein hing, bzw. durch die Tatsache, daß die GAPDH aus *Ricinnus communis* ein Membranprotein ist und u. U. in den Membranen von *E. coli* stecken blieb und dort nicht gemessen werden konnte. Das bedeutet, daß die gemessenen Werte der Aktivität der GAPDH nicht die tatsächlichen Mengen an Enzym repräsentierten. Eine Aussage wie viel GAPDH vorhanden war, die nicht ins Periplasma sekretiert wurde, konnte nicht gemacht werden.

Zur Bestimmung der Menge von KD3 wurden Elektrophoresen mit SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt und nach Färbung mit Coomassie-Blau die Banden mittels eines Densitometers quantifiziert. Mit Hilfe der drei Kalibrierproteine α -Lactalbumin, Sojabohnen Trypsin-Inhibitor und Carboanhydrase wurde überprüft, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen Proteinnengen und Bandenintensität vorliegt [STEPHAN 1993]. Dies war nicht der Fall. Zur exakten Quantifizierung der Menge von KD3 wäre eine Kalibrierung mit KD3 notwendig gewesen, die nicht durchgeführt werden konnte, da kein KD3 zur Verfügung stand. Analog zur GAPDH konnten also keine Aussagen über absolute Mengen an KD3 gemacht werden.

Es war jedoch möglich relative Änderungen der GAPDH-Aktivität bzw. der KD3-Mengen im Periplasma durch die Co-Expression von *secB* zu bestimmen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-13.

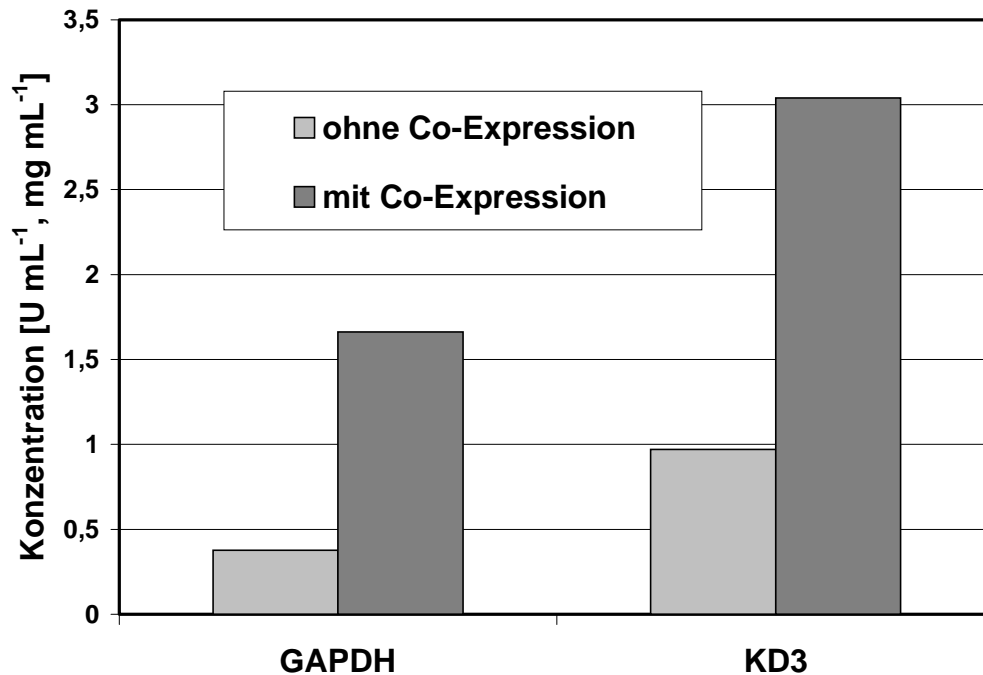


Abbildung 3.5-13: Einfluß der Co-Expression von *secB* auf die Konzentration von GAPDH bzw. KD3 im Periplasma von *E. coli*

Die Stämme *E. coli* SCS1 pWEH1, *E. coli* SCS1 pWEH1 pMON15906, *E. coli* JM83 pDR1311 und *E. coli* JM83 pDR1311 pMON15906 wurden in Schüttelkolben in LB-Medium mit den Antibiotika Ampicillin bzw. Ampicillin und Kanamycin als Selektionsdruck angezogen und bei geeigneter optischer Dichte mit IPTG induziert. Die Zellen wurden fraktioniert und die Aktivität der GAPDH bzw. die relative Menge an KD3 bestimmt.

Nach Anzucht der Zellen und Fraktionierung konnte in den Cytoplasmafraktionen keine nennenswerte Aktivität der GAPDH gefunden werden. In den Periplasmafraktionen wurden hingegen deutliche Aktivitäten gefunden. Aufgrund der vorhergehenden Überlegungen ist es jedoch unzulässig zu schließen, daß keine anderen GAPDH-Moleküle (u. U. mit Signalsequenz) außer denen im Periplasma vorhanden waren. Deutlich ist jedoch zu erkennen, daß die Aktivität im Periplasma bei Co-Expression von SecB höher ist als ohne Co-Expression. Dies kann zum einem daran liegen, daß von einer sonst gleichen Menge an GAPDH ein höherer Anteil als ohne Co-Expression von SecB ins Periplasma transportiert wurde und dort seine enzymatische Aktivität entfalten konnte. Andererseits ist es jedoch auch möglich, daß die Co-Expression von SecB die Expression oder den Anteil an biologisch aktiver GAPDH erhöht und es dadurch auch zu einer höheren Aktivität im Periplasma kam.

Ähnliche Überlegungen galten auch für KD3. Es war nicht möglich genaue KD3-Banden in den entsprechenden Spuren der Cytoplasmafraktionen im PAGE-Gel aufgrund der Vielzahl an Banden zuzuordnen. Damit waren auch absolute Quantifizierungen der periplasmatischen Anteile von KD3 nicht möglich. Da sich in den Spuren der

Periplasmafraktionen bei weitem nicht so viele Banden im PAGE-Gel befanden, konnten hier Banden dem KD3 zugeordnet und quantifiziert werden. Es zeigte sich deutlich, daß die Menge an KD3 im Periplasma bei Co-Expression von SecB höher war, als ohne Co-Expression. Es ist jedoch nicht zu unterscheiden ob der Anteil, der in das Periplasma transportiert wurde, gestiegen war oder ob die gesamte Menge an KD3 zugenommen hatte.

Es gibt deutliche Hinweise darauf, daß die Co-Expression von SecB oder anderer Sec-Proteine die Konzentration von rekombinanten Proteinen im Periplasma steigern kann. Andere Arbeiten haben gezeigt, daß dies durchaus an einer Erhöhung des Anteils der transportierten Menge liegen kann [PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 1994, BERGES *et al.*, 1996]. Das heißt, daß bei einer festen Menge an produzierten rekombinanten Proteinen durch die Co-Expression mehr ins Periplasma gelangt, ohne daß die Gesamtmenge sich ändert. In den vorliegenden Arbeiten konnte dies nicht eindeutig geklärt werden. Fermentationstechnisch entscheidend ist jedoch die Tatsache, daß sich die Konzentration im Periplasma erhöhen ließ und somit positive Auswirkungen auf die Aufarbeitung zu erwarten sind.

3.5.3 Entwicklung und Einsatz eines *E. coli*-Sekretionssystems

Die Sekretion von Proteinen ins Medium nach dem zentralen Sekretionspfad (Typ II) umfaßt zwei essentielle Schritte. Der erste ist der Transport durch die innere Membran in das Periplasma und der zweite die Sekretion ins Medium durch Überwindung der äußeren Membran bzw. der Zellwand. Es sind eine Reihe von mehr oder weniger gut geeigneten Verfahren zur Sekretion periplasmatischer Proteine aus *E. coli* bekannt, bei denen die Lebensfähigkeit der Zellen im großen und ganzen erhalten bleibt. Diese sind in Kapitel 2.5 ausführlich beschrieben.

Die folgenden Experimente beruhen auf der Nutzung des *Bacteriocin Release Proteins* (BRP). Wenn das *Bacteriocin Release Protein* aus dem Colicin- bzw. Cloacin-Operon stark exprimiert wird, kann es zu vollständiger Lyse der Zellen kommen, was für die Aufarbeitung unerwünscht ist. Mit Hilfe einer gesteuerten Expression des BRP-Gens von ColE1 (*kiI*) sollte jedoch die Sekretion periplasmatischer Proteine durch *E. coli* möglich sein.

3.5.3.1 Wirkungsweise des *Bacteriocin-Release* -Protein bei der Sekretion von Colicinen

Die meisten Bacteriocine in *E. coli* werden durch die Wirkung eines Bacteriocin-Release - Protein (BRP) in das extrazelluläre Medium sekretiert. Die Sekretion von Colicinen ist

semispezifisch und bewirkt, je nach Stärke der Expression, auch die Sekretion eines Teils der cytoplasmatischen und periplasmatischen Proteine [SUIT & LURIA, 1988]. Dieser Vorgang ist von einer Abnahme der optischen Dichte der Bakteriensuspension (Quasi-Lyse) und dem Tod der Zellen begleitet. Deshalb werden BRP auch als "Lysis-proteins" oder "Kil-proteins" bezeichnet [PUGSLEY & SCHWARTZ, 1984 ; BRAUN *et al.*, 1994].

Der Wirkungsmechanismus des BRP bei der Sekretion von Colicinen ist immer noch nicht ganz geklärt. Es wurden einige Effekte wie morphologische Veränderungen der äußeren Membran (HAKKAART, 1983) und Abspaltungen von Bestandteilen der Membran ins Medium [AONO; 1991] beschrieben. Weiterhin wurde gezeigt, daß das wichtigste Phospholipid der äußeren Membran (Phosphatidylethanolamin) durch die Phospholipase A in freie Fettsäuren und Lyso-Phospholipide abgebaut wird [PUGSLEY & SCHWARTZ, 1984; LUIRINK *et al.*, 1986; CAVARD *et al.*, 1987; SUIT & LURIA, 1988]. Es wurde auch vermutet, daß die entstehenden Lyso-Phospholipide den Membranaufbau stören und damit die Permeabilität erhöhen [CULLIS & DE KRUIJFF, 1979; WELTZIEN, 1979; MÖLLBY, 1978]. *E. coli*-Stämme mit defekter Membran-Phospholipase sind nicht in der Lage, Bacteriocin zu sekretieren, wobei die Bacteriocine im Cytoplasma akkumulieren [PUGSLEY & SCHWARTZ, 1984; LUIRINK *et al.*, 1986; CAVARD *et al.*, 1987].

Bacteriocin-Release-Proteine werden als 45-52 Aminosäuren umfassende Precursor-Polypeptide synthetisiert, durch die cytoplasmatische Membran transportiert und vorwiegend in die äußere Membran integriert [OUDEGA *et al.*, 1984; CAVARD *et al.*, 1987; LUIRINK *et al.*, 1987; LUIRINK *et al.*, 1988; PUGSLEY & COLE, 1987; HOWARD *et al.*, 1991; VAN DER WAL *et al.*, 1992; GENNITY *et al.*, 1992; HOWARD & LINDSAY, 1992]. Für die Lokalisierung in der Membran und die Funktionsfähigkeit des Kil-Peptids ist eine Lipidmodifizierung notwendig. Zur Lipidmodifizierung und zum Prozessieren der Lipoproteine durch die Signalpeptidase II [WU & TOKUNAGA, 1986; REGUE & WU, 1988] dient eine sogenannte Lipobox, die sich an der Schnittstelle des Signalpeptids befindet. Für die Translokation des BRP durch die cytoplasmatische Membran ist das Vorhandensein des Sec-Mechanismus in unterschiedlichem Maße notwendig. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Die Translokation des Kil-Peptids (ColE1) ist z. B. im Gegensatz zu anderen BRPs von SecA und SecY abhängig [CAVARD, 1992; OUDEGA *et al.*, 1993]. Die Signalpeptide von BRPs werden nach dem Prozessieren der Precursormoleküle durch die Signalpeptidase interessanterweise nicht in jedem Falle proteolytisch abgebaut. Während das Signalpeptid des ColE1-BRP instabil ist [CAVARD, 1991], werden die Signalpeptide von ColA, CloDF13 und ColE2 stabil in der cytoplasmatischen Membran angereichert [HOWARD *et al.*, 1991; VAN DER WAL

et al., 1992; CAVARD *et al.*, 1987; LUIRINK *et al.*, 1987, PUGSLEY & COLE, 1987]. Es wurde gezeigt, daß stabile Signalpeptide für Quasi-Lyse und Letalität verantwortlich sind, wobei der molekulare Mechanismus noch unklar ist [KANOH *et al.*, 1991; VAN DER WAL *et al.*, 1992]. Um die Art und Weise der Translokation der Bacteriocine zu erklären, wurde angenommen, daß die stabilen Signalpeptide gemeinsam mit den reifen BRPs und der Phospholipase Poren bilden, die durch beide Membranen hindurchgehen [LUIRINK *et al.*, 1991]. Solche Poren konnten elektronenoptisch jedoch nicht nachgewiesen werden.

3.5.3.2 Sekretion heterologer Proteine durch Bacteriocin-Release-Protein

Eine Reihe von Proteinen unterschiedlicher Herkunft und Größe konnten durch gleichzeitige Expression eines BRP in das Kulturmedium sekretiert werden. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.5-1.

Tabelle 3.5-1: Einsatz von BRPs zur Sekretion von Proteinen

Zielprotein	kDa	Signalpeptid	Referenz
Co-Expression von ColE1 (BRP aus Colicinoperon)			
α -Galactosidase	40	OmpA	VAN DER WAL <i>et al.</i> , 1995
Xylanase, <i>Aeromonas</i>	135	eigenes	KATO <i>et al.</i> , 1986
Cellulase, <i>Bacillus 1139</i>	92	eigenes	KATO <i>et al.</i> , 1986
α -Amylase, <i>Bacillus</i>	55	eigenes	BLANCHIN-ROLAND & MASSON, 1989
α -Amylase, <i>Bacillus</i>	55	eigenes	VAN DER WAL <i>et al.</i> , 1995
Cellulase, <i>Bacillus N-4</i>	58	eigenes	KATO <i>et al.</i> , 1986
Penicillinase, <i>Bacillus</i>	25	eigenes	KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1986; MURAKAMI <i>et al.</i> , 1989;
Chaperon FaeE	25	eigenes	VAN DER WAL <i>et al.</i> , 1995
Humanes Calcitonin	27	β -Lactamase	KATO <i>et al.</i> , 1989
Humane IgG Fc-Region	29	β -Lactamase	KITAI <i>et al.</i> , 1988
Humaner Tumornekrosefaktor A	17	β -Lactamase	NAKAMURA <i>et al.</i> , 1990
Humanes IgE/IgG Fc	37	β -Lactamase	NAKAMURA <i>et al.</i> , 1992
Humanes Wachstumshormon	21	β -Lactamase	KATO <i>et al.</i> , 1987 MURAKAMI <i>et al.</i> , 1989
Co-Expression von CloDF13 (BRP aus Cloacinoperon)			
Humanes Wachstumshormon	21	OmpA	HSIUNG <i>et al.</i> , 1989
β -Lactamase	29	eigenes	BLANCHIN-ROLAND & MASSON, 1989
β -Lactamase	29	eigenes	STEIDLER <i>et al.</i> , 1994
β -Lactamase	29	eigenes	VAN DER WAL <i>et al.</i> , 1995
β -Lactamase	29	eigenes	FIMME <i>et al.</i> 1998

OmpA: Outer-Membrane-Protein-A

Den Transport der zu sekretierenden Proteine durch die cytoplasmatische Membran ermöglichte in der Regel ein N-terminales Signalpeptid, oft das eigene Signalpeptid des rekombinanten Proteins. Die Sekretion ins Medium wurde in den meisten Fällen durch eine konstitutive niedrige Expression des ColE1-BRP (Kil-Peptid) vermittelt, das auf dem gleichen Plasmid lokalisiert war wie das Zielprotein. Das Hauptproblem bei der Verwendung konstitutiver Promotoren zur Expression von BRPs war der Verlust der Lebensfähigkeit der Bakterienzellen, bevor eine ausreichende Menge an Zielprotein produziert wurde. Durch die Expression des *kil*-Gens unter einem schwachen konstitutiven Promotor (Penicillinase-Promotor) war es zwar möglich, die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhalten [KATO *et al.*, 1987], die Sekretion konnte aber erst entscheidend verbessert werden, als induzierbare Promotoren eingeführt wurden. Dazu gehören der *lac*-Promotor [BLANCHIN-ROLAND & MASSON, 1989] und der starke P_L-Promotor des Phagen λ [STEIDLER *et al.*, 1994]. Außer dem *kil*-Gen von ColE1 wurde auch CloDF13 als BRP unter der Kontrolle eines IPTG-induzierten Promotors [BLANCHIN-ROLAND & MASSON, 1989] und unter der Kontrolle eines Mitomycin-C-induzierten SOS-Promotors [VAN DER WAL *et al.*, 1995] verwendet.

Um die praktische Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurden die Sekretionseigenschaften von BRPs auch in größerem Maßstab getestet, wie im *semi-large scale* [YU & SAN, 1992], im 20 L-Fermenter [STEIDLER *et al.*, 1994] und in einem Zellrückhaltesystem [YU & SAN, 1993].

Insgesamt wurde durch die bisherigen Arbeiten in der Literatur demonstriert, daß heterologe Proteine mit Molmassen von 20 bis über 100 kD mittels BRPs sekretiert werden können. Hinsichtlich der Auswahl des spezifischen BRPs ist der Verwendung des *kil*-Gens (ColE1-BRP) der Vorzug zu geben, da es im Gegensatz zu anderen BRP's ein instabiles Signalpeptid besitzt.

3.5.3.3 Expression des *kil*-Gens unter Stationärphase-Promotoren

Wie bereits erwähnt, führt eine Überexpression des *kil*-Gens zur Lyse der Zellen. Deshalb war es notwendig bei der Entwicklung eines *E. coli* –Sekretionssystems einen geeigneten Promotor zu verwenden. Unter Leitung von Dr. Miksch wurden an der Universität Leipzig die entscheidenden Vorarbeiten zur Entwicklung eines neuartigen Sekretionssystems für GRAM-negative Bakterien geleistet. Hierbei wurde das *kil*-Gen des Plasmids pColE1 erstmals unter die Kontrolle von Stationärphase-Promotoren gestellt [MIKSCH *et al.*, 1997b] was zu folgenden Vorteilen führt:

- Die Bakterienkultur kann ohne den zellschädigenden Einfluß des Kil-Peptids bis zur

maximalen Zelldichte wachsen.

- Die Expression wird automatisch bei Eintreten in die stationäre Phase induziert.
- Eine Zugabe von Induktionsreagenzien oder eine Temperaturveränderung ist nicht erforderlich.

Zunächst wurde die Funktion von zwei verschiedenen Stationärphase-Promotoren (*ficP* und *bolAp1*) bei *E. coli* und anderen GRAM-negativen Bakterien an Hand von *lacZ*-Fusionen getestet. Das Regulatorgen *bolA* ist an der Zellwandsynthese beteiligt. Einer der beiden Promotoren (*bolAp1*) ist wachstumsphasenreguliert und vom Sigmafaktor σ^S abhängig, der hauptsächlich in der stationären Phase gebildet wird und für die Expression einer ganzen Serie von Genen verantwortlich ist [LOEWEN & HENGGE-ARONIS, 1994]. Für die volle Expression werden aber weitere noch nicht bekannte Transkriptionsfaktoren benötigt. Über die Funktion des *fic*-Gens (*filamentation induced by cAMP*) ist bekannt, daß es ebenfalls an der Zellmorphologie beteiligt ist. Der Promotor des *fic*-Gens ist bis jetzt der einzige bekannte Stationärphase-Promotor, der nur von σ^S transkribiert wird und keine weiteren Transkriptionsfaktoren benötigt. Diese Promotoren sind auch in anderen GRAM-negativen Bakterien in der stationären Phase aktiv [MIKSCH & DOBROWOLSKI., 1995]. Dies zeigt, daß diese Bakterien einen funktionell analogen Sigmafaktor besitzen, der diese Promotoren erkennt. Da im Gegensatz zum *fic*-Promotor der *bolA*-Promotor in einigen anderen Bakterien erst mit Verzögerung in der stationären Phase exprimiert wird, wurde für die Expression des *kil*-Gens generell der *fic*-Promotor verwendet. Dieser ist in *E. coli* gegenüber anderen Promotoren wie z. B. dem *lac*-Promotor ein sehr schwacher Promotor. Dies ist für die Expression des *kil*-Gens vorteilhaft, da aus der Literatur bekannt ist, daß schwache Promotoren eine zu starke Schädigung der Bakterienzellen verhindern können [VAN DER WAL *et al.*, 1995].

Um zu gewährleisten, daß die Expression des *kil*-Gens ausschließlich durch Kontrolle verschiedener Stationärphase-Promotoren erfolgt, wurde ein Omega-Interposon mit Terminator zur Vermeidung eventueller fremder Promotoraktivitäten vor dem *kil*-Gen integriert. Zur Selektion diente die Kanamycinresistenz. Als Modellprotein wurde eine hybride β -Glucanase verwendet. Das Gen für die β -Glucanase, *bgl*, kodiert für 107 aminoterminalen Aminosäuren der *Bacillus amyloliquefaciens* und 107 carboxyterminalen Aminosäuren der *Bacillus macerans* β -Glucanase [BORRIS *et al.*, 1989]. Da diese Konstrukte von multiplen Restriktionsorten flankiert werden, können sie leicht herausgeschnitten und in andere Vektoren und Bakterien transferiert werden [MIKSCH *et al.*, 1997c].

3.5.3.4 Sekretion einer β -Glucanase durch *E. coli* bei Anzucht im Bioreaktor

Für die Untersuchungen wurde das System *E. coli* JM109 pLF3 [Miksch *et al.*, 1997b] verwendet. Die Plasmidkarte von pLF3 mit den relevanten Genen ist in Abbildung 3.5-14 zu sehen.

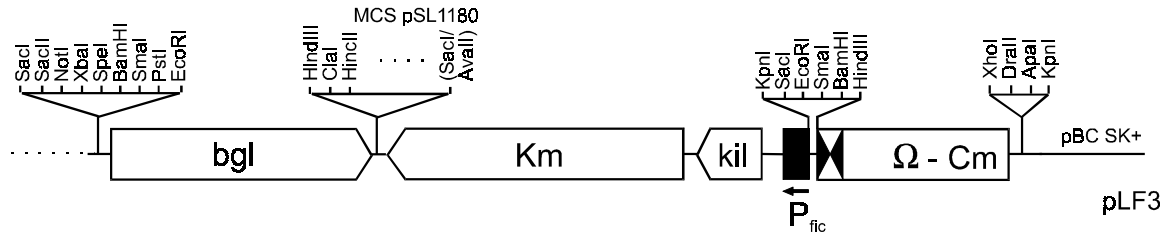


Abbildung 3.5-14: Plasmid pLF3 [Miksch *et al.*, 1997a]

Das Plasmid pLF3 beruht auf dem Vektor pBCSK+ der Firma Stratagene, der über eine Ampicillinresistenz verfügt (*bla*). Das Gen für die β -Glucanase, *bgl*, steht unter Kontrolle des eigenen Promotors. Die Sekretionskassette enthält das *kil*-Gen, das für das BRP (Bacteriocin Release Protein) kodiert, unter der Kontrolle des *fic*-Promotors, der bei Erreichen der stationären Phase automatisch induziert wird. Für die Selektion enthält die Kassette das Gen für die Resistenz gegen Kanamycin (*Km*). Um eine unkontrollierte Expression des *kil*-Gens zu verhindern, wurde vor dem *fic*-Promotor der starke Transkriptionsterminator Ω -*Cm* gesetzt.

In Schüttelkolbenversuchen war gezeigt worden, daß das *kil*-Gen beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase angeschaltet wird und die Sekretion periplasmatischer Proteine nach Erreichen der stationären Phase bewirkt [Miksch *et al.*, 1997b]. Weitere Untersuchungen sollten unter kontrollierten Bedingungen im Bioreaktor erfolgen.

Dazu wurde der Stamm *E. coli* JM109 pLF3 in einem 7 L Bioreaktor (MBR) in 5 L Medium angezüchtet. Gemessen wurde u.a. die OD_{600} , der CO_2 -Gehalt im Abgas sowie die Aktivität der β -Glucanase mittels einer modifizierten Methode nach BORRIS [BORRIS *et al.*, 1989]. Die Anzucht erfolgte im modifizierten TB-Medium (12 g L^{-1} Caseinpepton, 24 g L^{-1} Hefeextrakt, 20 g L^{-1} NaCl, 4 g L^{-1} Glycerin). Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-15.

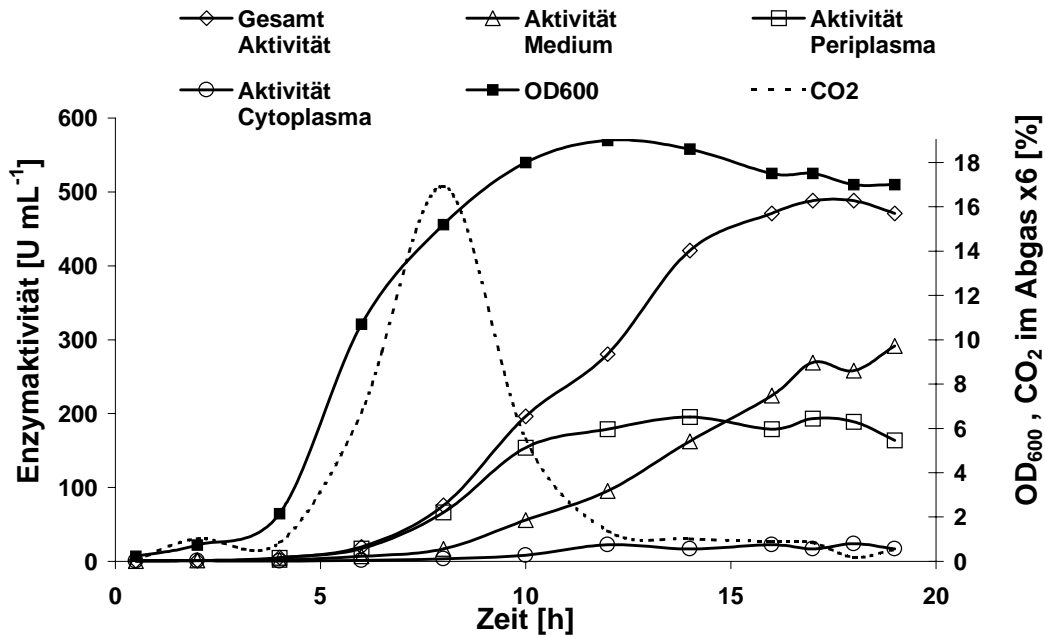


Abbildung 3.5-15: Fermentation von *E. coli* JM109 pLF3 und Sekretion von β -Glucanase

E. coli JM109 pLF3 wuchs im TB-Medium bis zu einer OD_{600} von fast 20 an. Die Regelung der Rührerdrehzahl erfolgte über den Sauerstoffpartialdruck, wobei mit einem Lufteintrag von 5 NL min^{-1} annähernd konstante 90 % Luftsättigung erreicht wurde. Der pH-Wert wurde bei 7,0, Temperatur bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und der Kesseldruck bei 0,2 bar gehalten. Die Einstellung des pH-Wertes mit 2 M NaOH sowie die Zugabe von Antischaummittel erfolgte automatisch über Schlauchpumpen. Es wurden Proben genommen und die Enzymaktivität der β -Glucanase nach Zellfraktionierung im Cytoplasma bzw. Periplasma sowie im Medium gemessen. Die Zellfraktionierung wurde mittels Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von Isocitrat-Dehydrogenase (Leitenzym Cytoplasma) und alkalischer Phosphatase (Leitenzym Periplasma) überprüft [KHOSLA AND BAILEY, 1989].

Die Zunahme der gesamten Aktivität der β -Glucanase korrelierte mit dem Wachstum. Nach Erreichen der stationären Phase, gekennzeichnet durch den rapiden Rückgang des CO_2 -Anteils im Abgas, begann die Sekretion der β -Glucanase ins Medium stark zuzunehmen. Der Anteil der Sekretion erreichte über 60 %.

Der Anteil der β -Glucanase im Cytoplasma blieb während der gesamten Fermentation sehr gering. Dies lässt darauf schließen, daß der Hauptanteil der β -Glucanase schnell durch die innere Membran in das Periplasma transportiert wurde. Der periplasmatische Anteil der β -Glucanase korrelierte anfänglich mit der Gesamtaktivität des Enzyms. Die gebildete Enzymmenge akkumulierte im Periplasma. Nach Erreichen der stationären Phase und somit dem Beginn der Sekretion war der Anstieg der Aktivität der β -Glucanase

im Periplasma verlangsamt und blieb auf einem relativ konstantem Niveau. Die β -Glucanase Aktivität im Medium nahm stetig zu. β -Glucanase wurde sekretiert und akkumulierte im Medium. Die Freisetzung der β -Glucanase verlief relativ langsam, wobei β -Glucanase ständig in das Periplasma nachgeliefert wurde. Nach etwa 17 h nahm die Gesamtaktivität nicht mehr zu, d. h. die Produktion an β -Glucanase wurde eingestellt. Die Aktivität im Medium stieg durch Sekretion der verbliebenen β -Glucanase im Periplasma weiter an, wodurch die Aktivität im Periplasma sank.

Eine Überexpression des *kil*-Gens führt üblicherweise zur Lyse der Zellen. Um die Auswirkung der Expression des *kil*-Gens unter der Kontrolle des schwachen *fic*-Promotors auf die Teilungsfähigkeit der Zellen zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Zellen abwechselnd Phasen des Wachstums und des stationären Zustands durchliefen. Ein Experiment ist in Abbildung 3.5-16 dargestellt.

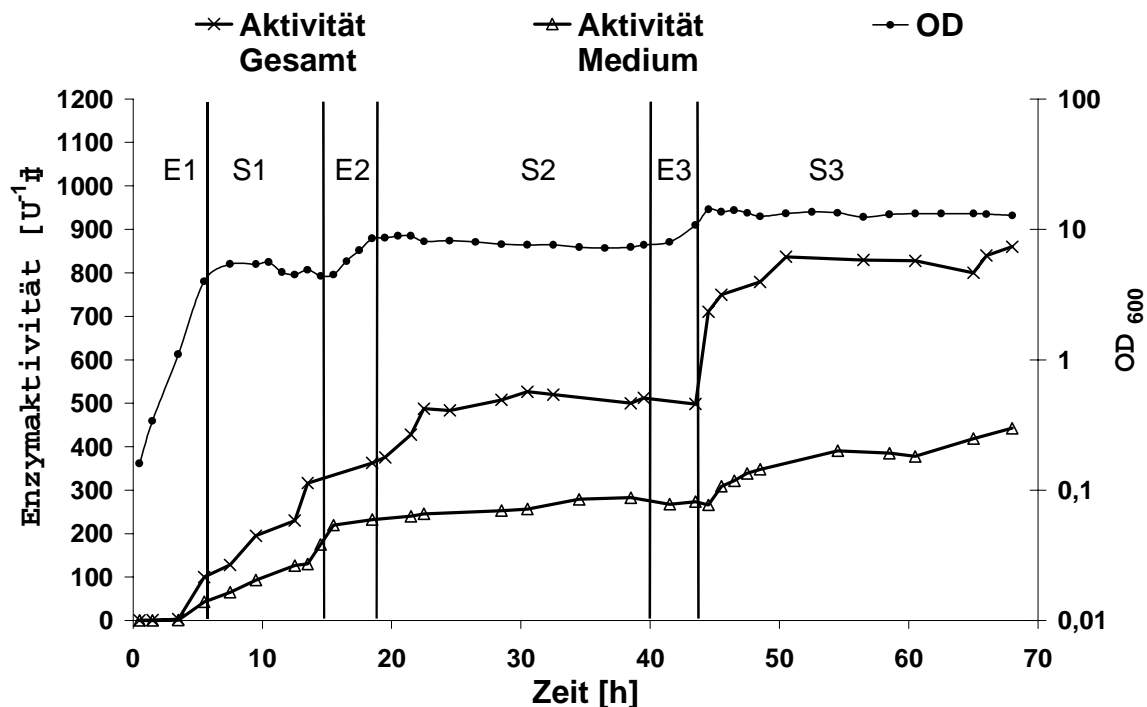


Abbildung 3.5-16: Zufütterungsverfahren mit *E. coli* JM109 pLF3

Anzuchtbedingungen im Text.

E1, E2, E3 = Exponentielle Phasen 1, 2 und 3

S1, S2, S3 = Stationäre Phasen 1, 2, und 3

Der Stamm *E. coli* JM109 pLF3 wurde in LB-Medium im 7 L-Bioreaktor angezchtet. Der Sauerstoffpartialdruck diente zur Regelung der Rührerdrehzahl bei einem konstanten Luftertrag von 5 NL min⁻¹. Der pH-Wert wurde bei 7,0 gehalten, die Temperatur bei 37 °C, der Kesseldruck bei 0,2 bar und der Sauerstoffpartialdruck blieb konstant bei 90 % Luftsättigung. Es wurden Proben genommen und die Enzymaktivität der β -Glucanase nach Zellaufschluß sowie im Medium gemessen. Die Zufütterung erfolgt mit 10-fach

konzentrierten LB-Medium (ohne NaCl).

Nach ca. 9 h exponentiellem Wachstums (E1) erreichte die Kultur die erste stationäre Phase (S1) und nach weiteren 7 h, bei denen die Zellen im stationären Zustand verblieben, wurden 660 mL Konzentrat mit $2,2 \text{ mL min}^{-1}$ zugepumpt. Rasch zeigte sich wieder exponentielles Wachstum (E2) das nach wenigen h in die zweite stationäre Phase (S2) übergang. Dort verblieben die Zellen fast 20 h, um nach einer Gesamtfermentationzeit von ca. 40 h durch Zugabe von weiteren 600 mL Konzentrat ($2,2 \text{ mL min}^{-1}$) wieder zum exponentiellen Wachstum (E3) angeregt zu werden. Auch nach der zweiten Zufütterung erreichten die Zellen das exponentielle Wachstum sehr schnell. Nach Beendigung der Zufütterung gingen die Zellen schnell in den stationären Zustand (S3) über. Dies läßt darauf schließen, daß die Zelldichte so weit angestiegen war, daß zugesetztes Konzentrat sofort verstoffwechselt wurde. Die Zellen wurden ca. 25 h in der dritten stationären Phase gehalten um die Sekretion der β -Glucanase zu beobachten.

Die Zufütterungsversuche zeigten deutlich, daß die Expression des *kil*-Gens unter der Kontrolle des *fic*-Promotors die Zellen nicht schädigt. Die Abnahme der optischen Dichte in den stationären Phasen beruht nicht auf einen Rückgang der Biomasse sondern auf einer Änderung der optischen Eigenschaften durch Verklumpung der Zellen [STEIDLER *et al.*, 1994].

Die Gesamtaktivität der β -Glucanase korrelierte in der ersten exponentiellen Phase (E1) mit dem Wachstum. Nach Erreichen der ersten stationären Phase (S1) nach ca. 8 h, nahm die Enzymaktivität weiter zu. Ein deutlicher Anstieg der Sekretion erfolgte gemeinsam mit einem deutlichen Anstieg der Gesamtaktivität erst in der späten ersten stationären Phase, was sich mit versteckter Diauxie durch LB-Medium in der frühen S1-Phase erklären ließe. Die zweite exponentielle Phase (E2) und die frühe zweite stationäre Phase (S2) zeigten deutliche Zunahme der Gesamtaktivität. Nach Erreichen der zweiten stationären Phase S2 konnte keine deutliche Steigerung der Enzymaktivität im Medium beobachtet werden. Die Gesamtaktivität nahm besonders in der dritten exponentiellen Phase (E3) signifikant zu. Mit dem Erreichen der dritten stationären Phase (bei 45 h) stieg auch die Aktivität im Medium blieb jedoch unter dem Anteil der vorherigen Experimente.

Aus diesen Experimenten wurde deutlich, daß die Expression des *kil*-Gens unter der Kontrolle des *fic*-Promotors *E. coli* dazu bringt, periplasmatische Proteine in das Medium auszuschleusen. Dabei werden die Zellen nicht geschädigt und können durch Zufütterung

von frischem Medium wieder zum exponentiellen Wachstum gebracht werden.

Für eine Erhöhung der Expression der β -Glucanase erschien es sinnvoll, das Gen für die β -Glucanase (*bgl*) unter die Kontrolle eines starken Promotors zu stellen. Dazu wurde das System *E. coli* BL21(DE3) pET-bgl-sec entwickelt. Die Karte des Plasmids pET-bgl-sec zeigt Abbildung 3.5-17.

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) besitzt das Gen für die T7-RNS-Polymerase unter der Kontrolle des *lac*-Promotors im Chromosom. Bei Zugabe von IPTG wird der Promotor induziert und die T7-RNS-Polymerase gebildet. Dadurch können Gene, die unter der Kontrolle des starken T7-Promotors stehen, exprimiert werden. Das Plasmid pET-bgl-sec basiert auf dem Vektor pET20b+ (Novagen). Dieser Vektor verfügt über den T7-Promotor gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle. Werden Gene im richtigen Leserahmen eingefügt, so kann ein Fusionsprotein entstehen, das über 6 C-terminale Histidinreste (His_6) verfügt, was eine Aufreinigung des Genprodukts über Metallchelatchromatographie ermöglicht. Dies traf für die β -Glucanase in pET-bgl-sec zu. Zusätzlich enthielt das Plasmid die Sekretionskassette von pLF3 (Abb. 3-5.14).

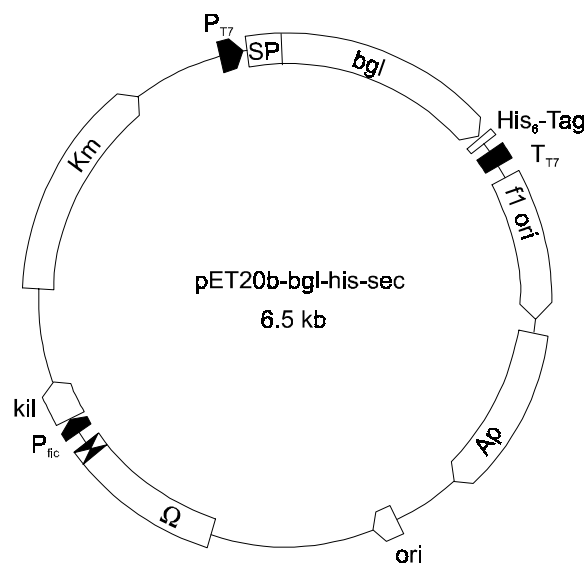


Abbildung 3.5-17: Plasmid pET-bgl-sec

Nach Transformation von pET-bgl-sec in *E. coli* BL21(DE3) wurden Klone selektioniert, die über eine hohe Aktivität an β -Glucanase verfügten. Nach Charakterisierung wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET-bgl-sec im Fermenter angezchtet und die Expression sowie Sekretion der β -Glucanase verfolgt. Ein Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-18.

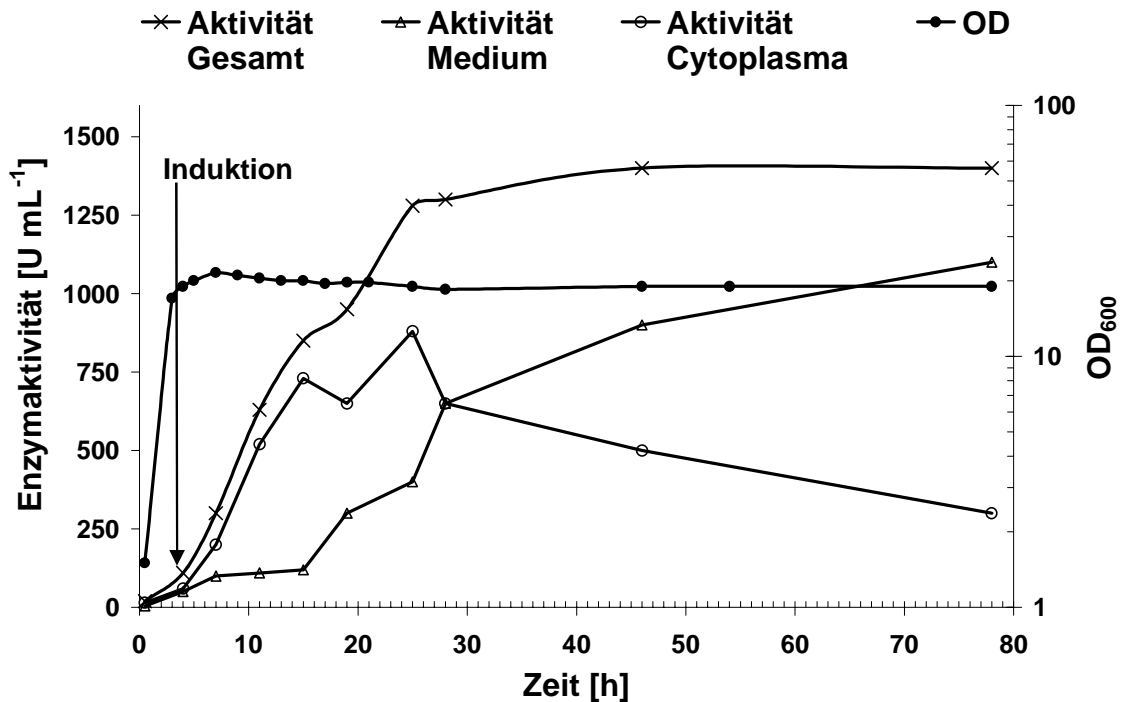


Abbildung 3.5-18: Fermentation von *E. coli* BL21(DE3) pET-bgl-sec

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pET-bgl-sec wurde in 5 L TB-(GN)-Medium angezüchtet. Die Kultivierung erfolgte bei pH=7 und einer Temperatur von 37°C. Die Luftzufuhr blieb mit 5 L min⁻¹ konstant, ebenso die Rührerdrehzahl mit 1000 upm. Bei einer OD₆₀₀ von 14 erfolgte die Induktion.

E. coli BL21(DE3) pET-bgl-sec wuchs in TB-(GN)-Medium rasch an. Bei einer OD₆₀₀ von 14 nach 3 h Fermentationszeit wurde IPTG zugegeben (Endkonzentration 1mM). Im weiteren Verlauf stieg die Aktivität der β -Glucanase rasch an. Auch im Medium konnte Aktivität nachgewiesen werden. Mit einer Verzögerung von mehreren Stunden begann die Sekretion deutlich zuzunehmen. Nach 30 h nahm die Gesamtaktivität kaum noch zu. In den verbleibenden 50 h, in denen die Fermentation beobachtet wurde, stieg die externe Aktivität kontinuierlich an, während die interne Aktivität entsprechend abnahm. Es wurde keine neue β -Glucanase gebildet, aber die β -Glucanase aus dem Periplasma wurde weiter freigesetzt. Das Ergebnis zeigte auch, daß diese β -Glucanase [BORRIS *et al.*, 1989] ein sehr stabiles Enzym war. Die Gesamtaktivität erreichte mit 1400 U mL⁻¹ deutlich höhere Werte als im Zufütterungsverfahren mit dem System *E. coli* JM109 pLF3. Der Anteil der Sekretion belief sich nach 30 h auf 50 % und erreichte knapp 80 %, aber erst nach weiteren 50 h. Durch Verbesserung der Expression konnte die Ausbeute an Enzym deutlich erhöht werden. Der Anteil an Enzym im Medium blieb in etwa gleich.

3.5.4 Entwicklung von Sekretionsstämmen von *Klebsiella planticola*

Klebsiella planticola ist wie *E. coli* ein GRAM-negatives Bakterium. Es ist vom pathologischen Standpunkt aus betrachtet völlig ungefährlich und steht in der GRAS-Liste. GRAS ist die Abkürzung für *Generally Recognized As Safe* und bezeichnet

Mikroorganismen, die als völlig harmlos eingestuft wurden [FDA, 1998]. Da *K. planticola* nur ein sehr geringes Maß an Enterotoxinen bildet, ist es als Produktionsstamm für die Produktion pharmazeutischer Proteine von Interesse. *K. planticola* besitzt wie *E. coli* kein ausgeprägtes Sekretionssystem.

Es lag daher nahe zu versuchen, die in *E. coli* erfolgreiche Sekretionsfunktion, basierend auf dem *kil*-Gen unter der Kontrolle des *fic*-Promotors auch in *K. planticola* anzuwenden. Der übliche Weg dabei wäre gewesen die Sekretionsfunktion und das zu sekretierende Protein auf einem Vektor zu plazieren und diesen in *K. planticola* einzuschleusen. Besser wäre es jedoch, einen Stamm zu konstruieren, der die Sekretionsfunktion im Chromosom enthält. Dadurch würden die Klonierungsarbeiten erleichtert werden und bereits vorhanden Vektoren, die für Proteine kodieren, könnten direkt verwendet werden.

Daher wurde versucht durch Einbau der Sekretionsfunktion in das Chromosom von *K. planticola* einen Stamm zu konstruieren, der in der stationären Phase periplasmatische Proteine in das Medium sekretiert. Einen schematischen Ablauf dieser Konstruktion zeigt Abbildung 3.5-19.

Konstruktion von Sekretionsstämmen bei *Klebsiella planticola*

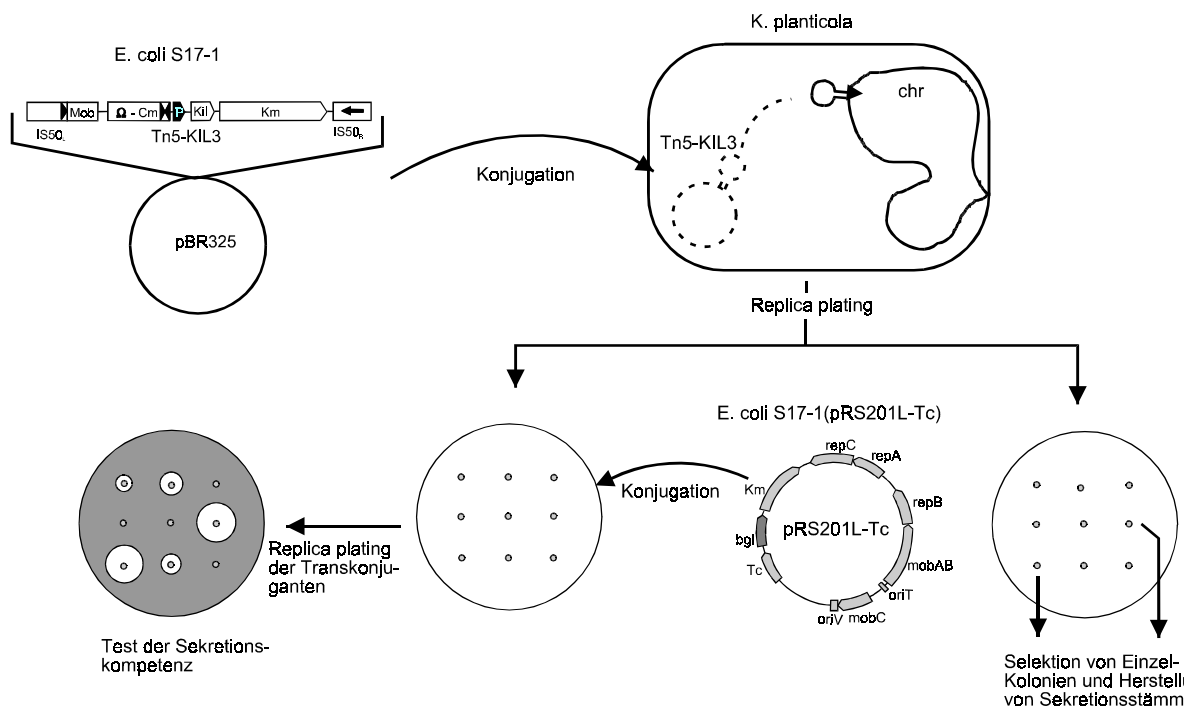


Abbildung 3.5-19: Konstruktion eines Stammes von *Klebsiella planticola* (Rf) mit Sekretionskassette im Chromosom [MIKSCH *et al.*, 1999].

Der Transfer der Sekretionskassette erfolgte durch Nutzung des Tn5-KIL3 Transposons [MIKSCH *et al.*, 1997c]. Das Transposon enthielt die *mob*-Gene. Dadurch konnte das Plasmid pBR325, das das Transposon trug, von *E. coli* S17-1 auf *K. planticola* (Rf) übertragen werden. *K. planticola* (Rf) ist eine spontane Mutante des Wildtyps *K. planticola* ATCC33531. Da pBR325 in *K. planticola* (Rf) nicht replizieren kann, konnten tetracyclinresistente Transkonjuganden nur entstehen, wenn eine Transposition in das Chromosom von *K. planticola* (Rf) erfolgt war. Auf einigen tetracyclinresistenten Transkonjuganden wurde das Plasmid pRS201L-Tc (siehe Abbildung 3.5-20) durch Mobilisierung übertragen und anschließend auf Sekretion von β -Glucanase untersucht. Dazu wurde ein Test verwendet, bei dem positive Klone Höfe in Agarplatten bildeten, die Lichenin enthielten. Vier Klone, die besonders deutliche Sekretion zeigten, wurden isoliert und weiter untersucht. Der Stamm mit der höchsten Aktivität wurde isoliert und bei den späteren Experimenten verwendet. Er erhielt die Bezeichnung *K. planticola* (Rf)-FIC3/19 pRS201L-Tc.

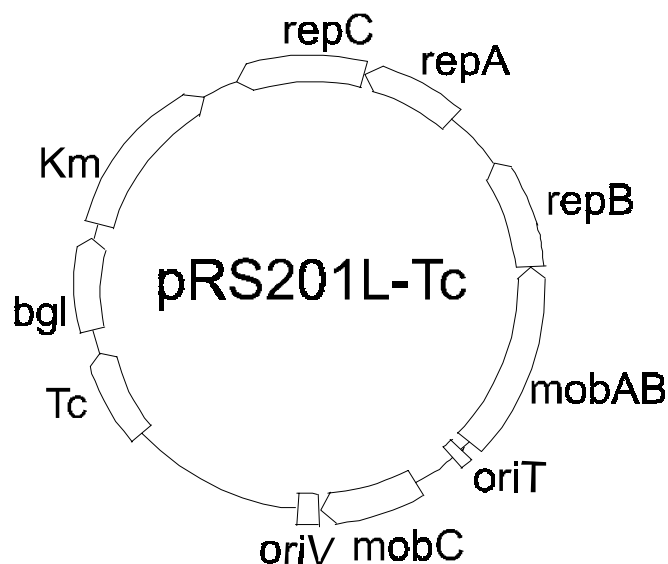


Abbildung 3.5-20: Plasmidkarte pRS201L-Tc [MIKSCH *et al.*, 1999]

Zur Konstruktion von pRS201L-Tc wurde das Plasmid pHP45 Ω -Tc mit EcoRI geschnitten und das Ω -Interposon, das das Gen für die Tetracyclinresistenz enthielt, in die EcoRI Schnittstelle des Plasmids pRS201L eingefügt [MIKSCH *et al.*, 1999].

3.5.4.1 Produktivität und Sekretion in *K. planticola* (Rf) mit und ohne Sekretionsfunktion

Der Stamm *K. planticola* (Rf)-FIC3/19 pRS201L-Tc wurde benutzt um unter definierten Kultivierungsbedingungen zu untersuchen, ob die Sekretion analog zu *E. coli* in der stationären Phase einsetzt. Dazu wurde der Stamm in M9-Medium mit Glucose als C-Quelle im Bioreaktor angezchtet. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-21.

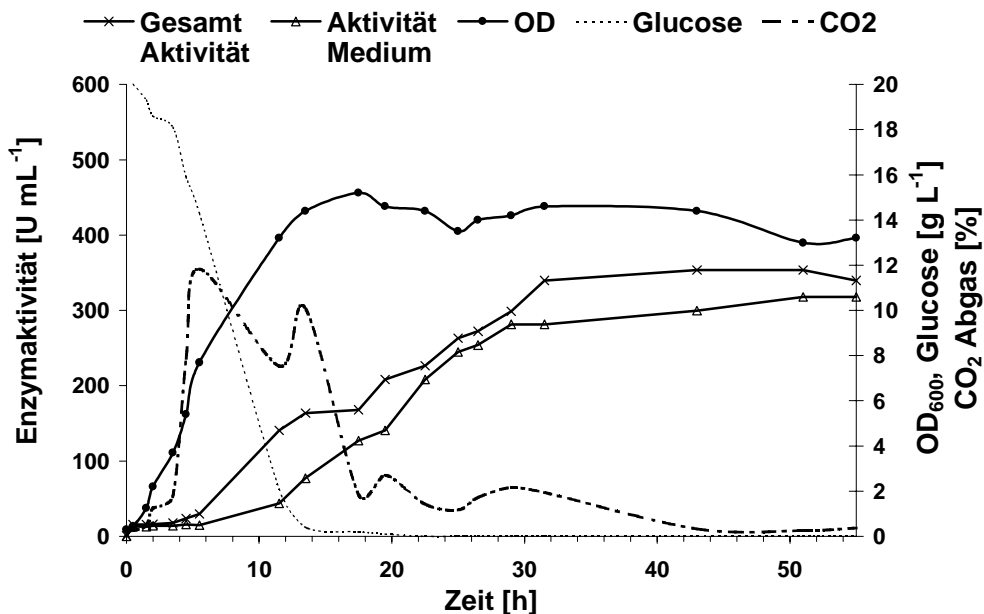


Abbildung 3.5-21: Fermentation von *Klebsiella planticola* (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc

Anzucht in 5 L M9-Minimalmedium mit 10 g L^{-1} NaCl und 20 g L^{-1} Glucose. Zur Stabilisierung des Plasmids: 10 mg L^{-1} Tetracyclin. Die Zelldichte wurde über die OD_{600} verfolgt. Die Messung des CO_2 im Abgas erfolgte *on-line*. Proben wurden gezogen und die Konzentration der Glucose enzymatisch bestimmt (SIGMA-Testkit). Die Aktivität der β -Glucanase wurde wie bei den Experimenten mit *E. coli* bestimmt. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das CO_2 Signal in der Abbildung verstärkt.

Die OD_{600} stieg zuerst exponentiell und dann linear auf einen Wert von ca. 8. Gleichzeitig stieg der Anteil an CO_2 im Abgas. Danach sank der CO_2 Anteil linear ab. Da Glucose noch nicht verbraucht war und die OD_{600} weiter anstieg, kann geschlossen werden, dass noch keine stationäre Phase erreicht worden war. Nachdem die Glucose vollständig verbraucht war, stieg der CO_2 Anteil noch einmal an, statt wie erwartet ganz abzusinken. Dies weist eindeutig auf einen diauxischen Effekt hin. Während Glucose verbraucht worden war, hatte *K. planticola* (Rf) einen Metaboliten gebildet, der nun verstoffwechselt wurde. Nach ca. 2 h fiel der CO_2 Anteil deutlich ab. Der OD_{600} stieg zwar bedeutend langsamer aber dennoch weiter an und erreichte mit 14,6 das Maximum dieser Kultivierung.

Aus dem CO_2 -Verlauf war der Beginn der stationären Phase nicht eindeutig bestimmbar. Eine verstärkte Sekretion war deutlich spätestens mit Beginn der zweiten diauxischen Stufe zu sehen. Dies kann bedeuten, dass sich die Zellen in einem Stadium befanden, bei dem ähnliche Mechanismen wie in der stationären Phase die Induktion des *fic*-Promotors bewirkten. Im weiteren Verlauf stieg die Aktivität der β -Glucanase kontinuierlich an und fast die gesamte Aktivität konnte im Medium gefunden werden. Bei *E. coli* lag der Anteil

an sekretierter Aktivität stets darunter.

Es war nun von Interesse herauszufinden, ob die Sekretion der β -Glucanase einen Einfluß auf die Produktivität hatte. Daher wurde der Stamm *K. planticola* (Rf), der keine Sekretionsfunktion enthielt, mit dem gleichen Plasmid pRS201L-Tc transformiert und daraus resultierende Transformanten selektioniert und charakterisiert. Mit einem dieser Transformanten wurde eine Fermentation unter den gleichen Bedingungen wie beim Stamm von *K. planticola* (Rf) mit Sekretionsfunktion durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-22.

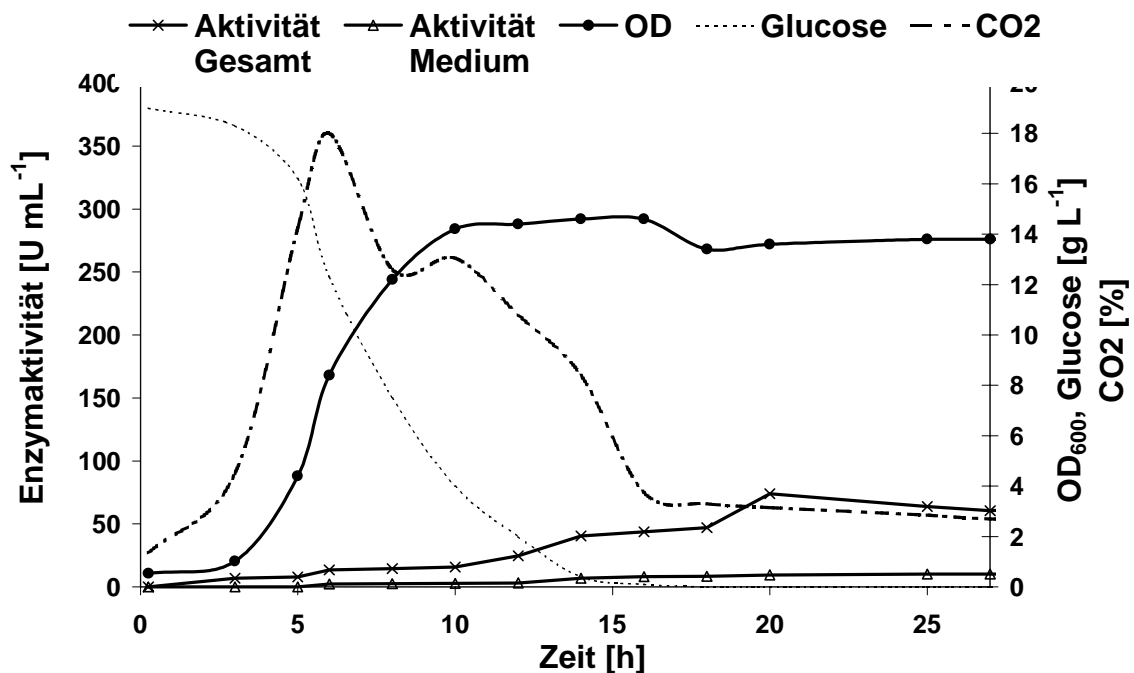


Abbildung 3.5-22: Fermentation von *Klebsiella planticola* (Rf) pRS201L-Tc

Anzuchtbedingungen analog dem vorhergehenden Experiment. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das CO₂ Signal in der Abbildung verstärkt.

Der Verlauf der optischen Dichte (OD₆₀₀) sowie der Verlauf des CO₂-Signals waren analog zum vorhergehenden Experiment mit *K. planticola* (Rf) mit Sekretionsfunktion. Wiederum waren zwei Maxima der CO₂-Kurve zu sehen, was auf den gleichen diauxischen Effekt schließen läßt. Deutliche Unterschiede gab es jedoch bei der Aktivität der β -Glucanase. Im Medium war über den gesamten Fermentationszeitraum kaum Aktivität zu finden (Maximum: ca. 10 U mL). Dies war erwartet worden, da der verwendete Stamm keine Sekretionsfunktion im Chromosom verankert hatte. Die Gesamtaktivität erreichte nie 100 U mL⁻¹. Das Maximum lag bei 75 U mL⁻¹). Damit lag die gebildete Menge an β -Glucanaseaktivität deutlich unter den Werten von 350 U mL⁻¹, die bei dem

Stamm mit Sekretionsfunktion erreicht wurden. Dieses Experiment zeigte, daß durch die Sekretion die Produktion erheblich gesteigert werden konnte. Durch die Sekretion wurde fast die 5-fache Menge an Aktivität gebildet. Es läßt sich durchaus vorstellen, daß durch die Sekretion eines rekombinanten Proteins die Expression positiv beeinflußt wird und die Akkumulation eines rekombinanten Proteins seine eigene Überexpression behindert.

3.5.4.2 Fermentation von *K. planticola* (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc mit Zufütterung

Um zu untersuchen, ob durch Zufütterung eine höhere Ausbeute an β -Glucanase erreicht werden kann, wurde der Stamm *K. planticola* (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc im Bioreaktor angezüchtet und im Laufe der Fermentation frisches Medium zugefüttert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.5-23.

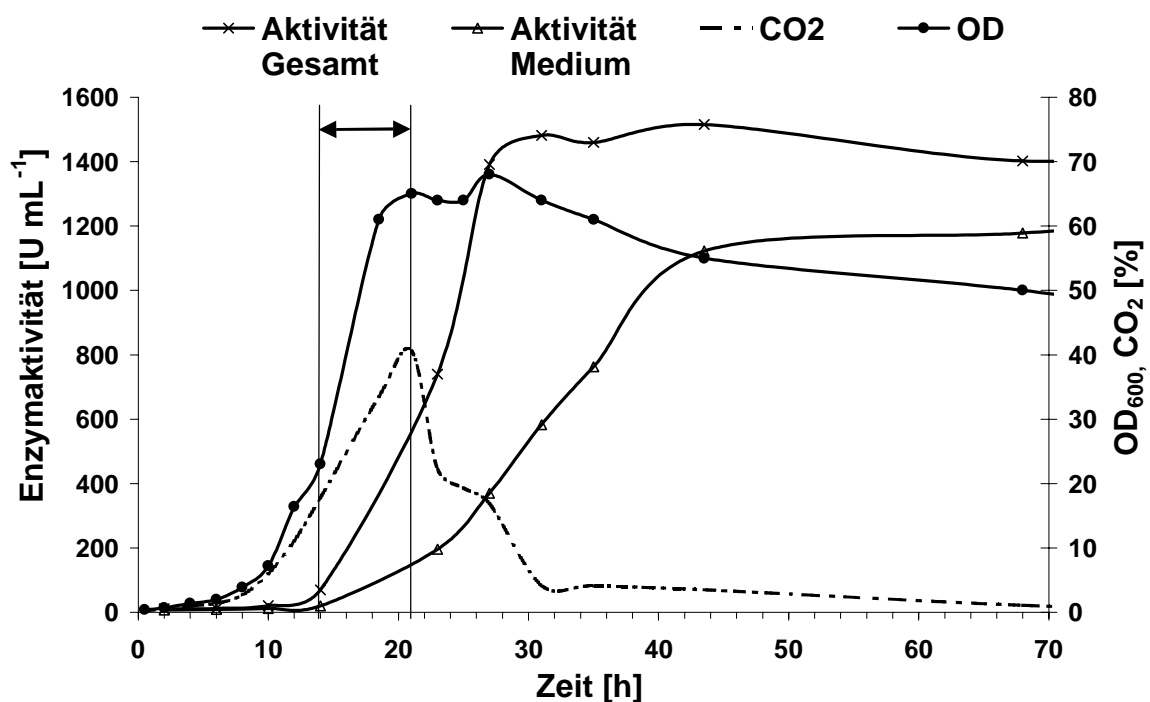


Abbildung 3.5-23: Fermentation von *Klebsiella planticola* (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc mit Zufütterung

Anzucht in 4 L supplementiertes M9-(GN)-Medium. Temperatur: 37°C, pH: 7,0, Rührerdrehzahl 2000 upm. Zufütterung von Konzentrat im Zeitraum zwischen dem Doppelpfeil. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das CO₂ Signal in der Abbildung verstärkt.

Klebsiella planticola (Rf)-KIL3/19 pRS201L-Tc wurde im Bioreaktor in 4 L eines supplementierten M9-(GN)-Mediums angezüchtet. Neben den M9-(GN)-Bestandteilen enthielt das Medium die doppelte Menge an Vitaminen und Spurenelementen. Die Zufütterung erfolgte nach 14 h Fermentationszeit und dauerte 7 h. Dabei wurde eine

Konzentratlösung (300 g L^{-1} Glucose, 20 g L^{-1} MgSO_4) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zugepumpt, um die Glucosekonzentration hoch zu halten. Die ersten beiden Stunden wurde das Konzentrat mit einer Geschwindigkeit von $14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ zugepumpt und dann mit $16 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Betrachtet man den OD_{600} -Verlauf, so ist zu erkennen, daß das exponentielle Wachstum bereits vor der Zugabe des Konzentrats bereits einknickte. Nach der Zugabe des Konzentrats wurde das exponentielle Wachstum wieder rasch erreicht aber nicht bis zum Ende der Zufütterung gehalten. Das CO_2 -Signal als Maß für Biomasse und Stoffwechselaktivität nahm kontinuierlich zu, erreichte jedoch das Maximum vor dem Ende der Zufütterung. Daraus kann geschlossen werden, daß entweder die zugesetzte Menge an Konzentrat für die vorhandene Biomasse nicht mehr ausreichte, um das exponentielle Wachstum aufrecht zu erhalten, oder daß es zu Hemmungen aufgrund von gebildeten Metaboliten gekommen war.

Nach dem Ende der Zufütterung sank der CO_2 -Anteil im Abgas rasch ab. Gleichzeitig nahm auch die OD_{600} ab. Ca. 3 h nach Beendigung der Zufütterung begann die OD_{600} wieder anzusteigen und gleichzeitig verlangsamte sich die Abnahme des CO_2 -Signals deutlich. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, die aus den vorhergehenden Experimenten gewonnen wurden. Es dürfte sich dabei um eine zweite diauxische Stufe gehandelt haben, bei der Primärmetabolite verstoffwechselt wurden.

Von besonderem Interesse ist die Produktivität und Sekretion der β -Glucanase. Auffallend ist, daß die verstärkte Produktion der β -Glucanase relativ spät begann zu einem Zeitpunkt bei dem die OD_{600} bereits einen Wert von über 7 erreicht hatte. Gleichzeitig begann auch die Sekretion einzusetzen, wenn auch deutlich langsamer als die Produktion. Nach dem Ende der zweiten diauxischen Stufe blieb die Aktivität an β -Glucanase konstant. Die Aktivität im Medium stieg weiter an, bis sie bei Fermentationszeit $t=43 \text{ h}$ 75 % der Gesamtaktivität erreichte. Danach sank die Gesamtaktivität um 100 U mL^{-1} ab, während die Aktivität im Medium weiter anstieg und 85 % erreichte.

Die erreichte Enzymaktivität von über 1500 U mL^{-1} war die höchste, die bei allen untersuchten Systemen und Verfahren von *K. planticola* und *E. coli* beobachtet wurde. Bei *E. coli* wurde mit dem System *E. coli* BL21(DE3) pET-bgl-sec eine vergleichbar hohe Aktivität von 1400 U mL^{-1} erhalten. Auch hier verlief die Sekretion in das Medium über mehr als 20 h nach dem Ende der Enzymbildung. Diese lange Dauer der Sekretion hat großen Einfluß auf die Produktivität einer Fermentation und muß in eine ökonomische

Kalkulation aufgenommen werden.

Bei der Ausbildung neuer biologischer Aktivitäten bei Mikroorganismen kann die Lokalisierung rekombinanter Funktionen entscheidend für Erfolg und Mißerfolg der industriellen Anwendung sein. Dies wurde bei der Änderung des Substratspektrums von *A. eutrophus* durch Einfügung einer saccharolytischen Aktivität deutlich. Da diese Aktivität im Cytoplasma lokalisiert war, konnte sie nicht die gewünschten Eigenschaften bewirken.

Durch Co-Expression von sekretorischen Proteinen ist es möglich den Transport in das Periplasma zu beeinflussen. Dies spielt für die Aufarbeitung sicherlich eine wichtige Rolle, kann jedoch auch entscheidend sein über die Ausbildung der biologischen Aktivität von rekombinanten Proteine, wenn die Faltung vom Redoxmilieu beeinflusst wird. Da das Periplasma über ein oxidierendes Redoxpotential gegenüber dem Cytoplasma verfügt, ist es möglich, daß speziell eukaryontische Proteine, z. B. mit Disulfidbrücken, im Periplasma eher richtig gefaltet werden. Dann wirkt sich ein erhöhter Transport ins Periplasma direkt auf die Ausbeute an biologisch aktivem rekombinanten Protein aus.

Einen besonders wichtigen Einfluß hat die Lokalisierung auf die Aufarbeitung. Produkte im Medium können leichter und somit billiger isoliert und gereinigt werden als Produkte in Zellen. Daher ist die Entwicklung von sekretorischen Systemen von *E. coli* und *K. planticola* ein lohnendes Ziel für die Fermentationstechnik. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Kombination des *kil*-Gens und des schwachen *fic*-Promotors eine Sekretionskompetenz sowohl in *E. coli* als auch *K. planticola* eingefügt werden konnte. Diese Systeme müssen bezüglich Medien und Verfahren weiter optimiert werden. Es hat sich auch der Hinweis ergeben, daß die Sekretion die Gesamtexpression eines rekombinanten Proteins vervielfachen kann. Dieser Aspekt ist besonders lohnenswert weiter genau untersucht zu werden.

3.6 Verbesserung der Aufarbeitung durch Fusionsproteine

Zur Erleichterung der Abtrennung und Reinigung von rekombinanten Proteinen bietet es sich an, gezielt bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften des Zielproteins durch Punktmutation zu verändern bzw. zu verstärken oder Affinitätswechselwirkungen mit Hilfe eines Fusionskomplements einzuführen. Die Komplementierung des Zielproteins mit einem für die Aufarbeitung geeigneten Peptid bzw. Protein am N- bzw. C-Terminus des gewünschten Produktes bietet sich besonders an, da dessen Tertiärstruktur nicht bekannt zu sein braucht und dessen Primärstruktur erhalten bleibt. Im Falle eines ortsspezifischen

Austausches von Aminosäuren sollte hingegen vorauszusehen sein, daß diese Mutationen auf der Außenhülle des Proteins stattfinden, um sich auf die Aufarbeitung auswirken zu können. Eine Änderung der Primärstruktur kann jedoch die biologische Aktivität des Produkts beeinträchtigen. Außerdem ist eine Fusion einfacher zu bewerkstelligen, als gezielte Punktmutationen einzuführen. Die meisten Beispiele aus der Literatur sind daher im Bereich der Fusionsproteine zu finden. Das Fusionskomplement sollte eine hohe Affinität für einen im Aufarbeitungsverfahren verwendeten Liganden besitzen, um das Fusionsprotein, nicht aber andere Begleitproteine, selektiv zu binden. Der Vorteil dieser Methodik liegt darin, daß im Prinzip eine allgemein einsetzbare Aufarbeitungsstrategie für eine Vielzahl verschiedener Proteine entwickelt werden kann. Der größere Aufwand an notwendiger Gentechnik dürfte durch Einsparungen bei der Prozeßentwicklung schnell kompensiert werden. Für die Verbesserung der Aufarbeitung konzipierte Fusionsproteine bestehen oft neben dem Zielprotein und einem Affinitätsträger noch aus einem Peptid zwischen Zielprotein und Affinitätsträger. Dieses enthält eine spezifische Schnittstelle, um das gewünschte Protein in nativer Form gewinnen zu können. Bei Erhalt der biologischen Aktivität des Zielproteins kann u.U. darauf verzichtet werden, den Fusionspartner abzuspalten.

Die klassische Affinitätschromatographie bedient sich der Wechselwirkung eines Zielproteins als Antigen mit einem, an einen Träger fixierten spezifischen Antikörper [NILSSON *et al.*, 1997]. Dieses Prinzip wurde mit Hilfe des Proteins A aus *Staphylococcus aureus* als Fusionskomplement und der konstanten Region (Fc) verschiedener Immunglobuline (Ig) realisiert.

Eine sehr interessante, weil einfach umzusetzende, Methode zur Verbesserung der Trennung und Reinigung von Proteinen basiert auf der Wechselwirkung von Metall-Chelat-Liganden mit der Histidinseitenkette von Proteinen. Dazu werden entweder ortsspezifisch Aminosäuren an der Oberfläche von Proteinen gegen Histidinreste ausgetauscht oder das Zielprotein endständig mit einer histidinreichen Sequenz verlängert. Räumlich benachbarte, geladene Aminosäurereste können in Abhängigkeit des Abstands zu Histidinresten die Protonierung des Histidylstickstoffs stabilisieren oder schwächen, und damit zur Erniedrigung oder Erhöhung der Affinität des betreffenden Histidinrests zum Metallchelatligenanden beitragen [PORATH *et al.*, 1975]. Hilfreich ist hierbei, daß Histidin zu den seltensten proteinogenen Aminosäuren zählt. Als Chelatligand ist am häufigsten die dreizählige Iminodiessigsäure (IDA) verwendet worden. Diese Chelatgruppe läßt sich einfach auf Träger aufbringen [PORATH & OLIN, 1983] und entsprechende chromatographische Phasen werden von verschiedenen

Firmen angeboten, z. B. QIAGEN (Hilden), CLONTECH (Palo Alto, USA) oder AFFILAND (Ans-Liege, Belgien). Als Metallionen sind hauptsächlich Cu(II), Ni(II), Zn(II) und Fe(III) eingesetzt worden. Die Gruppe Ni(II)-NTA (Nitrilotriessigsäure) scheint besonders geeignet zu sein, um Proteine mit benachbarten Histidinresten zu komplexieren [HOCHULI, 1988]. Die Komplexbildung erfolgt gewöhnlich im neutralen pH-Bereich, und die Dissoziation des Komplexes kann durch pH-Absenkung, Ammoniumionen, Imidazol, Histidin oder andere konkurrierende Komplexbildner erzwungen werden. In Bezug auf chromatographische Anwendungen ist die Methode unter dem Begriff IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) bekannt. Zur Modifizierung des Zielproteins bietet es sich an, als Fusionskomplement Peptide mit mehreren Histidinresten zu verwenden, um eine hohe Selektivität der Abtrennung zu erreichen. Bevorzugt werden dabei Peptide, die aus 6 Histidinen bestehen (His₆). Viele Firmen bieten Klonierungsvektoren an, die es erlauben Fusionen von Zielproteinen und His₆ in allen drei Leserahmen herzustellen. Dazu gehören einige pET-Vektoren von NOVAGEN ([STUDIER *et al.*, 1990]) und die pQE-Vektoren von QIAGEN (Hilden) [GREINER *et al.*, 1998].

3.6.1 Affinitätschromatographie mit SpA als Fusionskomplement

Protein A ist eine Komponente der Zellwand von *Staphylococcus aureus*. Es besteht aus fünf IgG-bindenden Domänen und einer Region, die an die Zellwand bindet [NILSSON & ABRAHAMSEN, 1990]. Die Affinität zwischen SpA und Immunglobulinen basiert auf einer Pseudoimmuninteraktion [HUSTEDT *et al.*, 1986]. Die Domäne B aus Protein A bindet bei neutralem pH an IgG und löst sich bei saurem pH von 3 bis 4 wieder ab. Die Bindung ist hoch spezifisch.

Das Gen für das Protein A war mit dem Gen für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* fusioniert worden und war auf dem Plasmid pMTC48 unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors lokalisiert [MASCHKE *et al.*, 1990]. Das Expressionssystem auf Basis von *E. coli* JM103 umfaßte neben dem Plasmid pMTC48, das Plasmid pEcoR4, das das Gen für die Methylase enthält zum Schutz der Zelle vor der *EcoRI*-Aktivität. Zur Stabilisierung enthielt das System außerdem noch das Plasmid pRK248 (siehe auch Kapitel 3.2.5). Dieser Stamm wurde in LB-Medium angezüchtet und mit IPTG induziert. Nach der Ernte wurden die Zellen chemisch-enzymatisch mit EDTA und Lysozym aufgeschlossen. Das Klarysate, das das SpA-*EcoRI*-Fusionsprotein enthielt, wurde auf eine Affinitätschromatographiesäule mit IgG als gebundenen Liganden (Träger: Divinylsulfonsäure, KEM-EN-TEC, Biotrend, Köln) aufgetragen. Nach ausgiebigen Waschen der Säule mit neutralem Puffer, wurde das gebundene Fusionsprotein mit saurem Puffer (pH=3,0) abgelöst. Die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden

gesammelt und die jeweilige Menge an Gesamtprotein bzw. *EcoRI*-Aktivität bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.6-1.

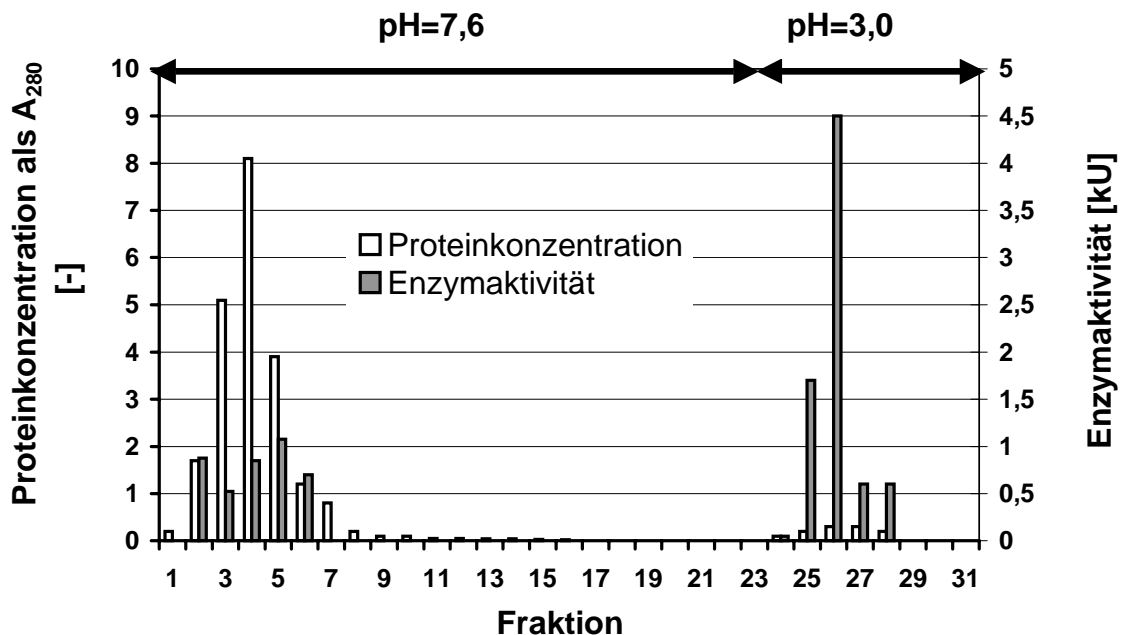


Abbildung 3.6-1: Elutionsprofil einer Affinitätschromatographie eines SpA-EcoRI-Fusionsproteins an IgG als Ligand [FRIEHS & REARDON, 1993]

Waschpuffer pH = 7,6: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20

Elutionspuffer pH = 3,0: 0,1M Glycin-HCl

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch zeitlich einheitliche Inkubation von λ -DNS mit Aliquots der Fraktionen und anschließender Agarosegelelektrophorese der Bruchstücke zur Bestimmung der vollständigen Schnitte.

Deutlich war eine klare saubere Trennung in einem Schritt erkennbar. Für die Enzymaktivität in den ersten Fraktionen wurde vermutet, daß die Bindungsaktivität der Säule zu gering war, um alles Fusionsprotein zu binden. Von den auf die Säule aufgetragenen 50.000 U *EcoRI* fanden sich ca. 50 % wieder. Der restliche Anteil wurde entweder nicht gebunden oder wahrscheinlich sowohl durch den niedrigen pH des Elutionspuffers als auch durch andere ungünstige Bedingungen, wie z. B. zu hohe Temperatur, denaturiert.

3.6.2 Konstruktion eines Hisactophilin-GFP Fusionsproteins

Das Hisactophilin aus *Dictyostelium discoideum* ist ein natives Protein aus 118 Aminosäuren davon insgesamt 31 Histidine [SCHEEL *et al.*, 1989]. Abbildung 3.6-2 zeigt die Struktur von Hisactophilin.

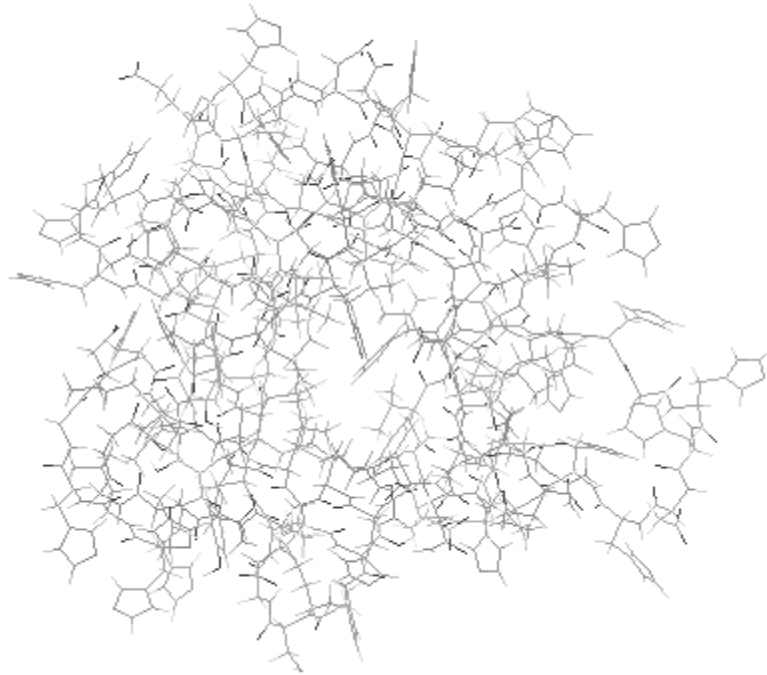


Abbildung 3.6-2: Struktur von Hisactophilin [HABAZETTL *et al.*, 1992]

Die Daten wurden der Datei Nr. 1HCD in der Brookhaven Protein Databank hinterlegt am 3. Mai 1994, entnommen (www.pdb.bnl.gov) und mit dem Programm RasWin Molecular Graphics 2.6 dargestellt.

Wie zu sehen ist, sind die Histidine auf der Oberfläche leicht zugänglich und so wurde vermutet, daß Hisactophilin eine hohe Affinität zu Metallchelaten besitzt und somit ein sehr gutes Fusionskomplement sein könnte. Um dies zu untersuchen, sollte Hisactophilin mit einem einfach detektierbaren Reporterprotein fusioniert werden und die Expression des Fusionsproteins unter der Kontrolle eines starken und induzierbaren Promotors erfolgen. Die Wahl fiel auf das grün fluoreszierende Protein, GFP, aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die Eigenfluoreszenz des GFP ermöglicht es, dessen Verbleib im Aufarbeitungsprozeß direkt zu beobachten (siehe auch Kapitel 3.4.3.1).

Für die Klonierungsstrategie zur Konstruktion eines Hisactophilin-GFP Fusionsproteins unter der Kontrolle des *tac*-Promotors wurden folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 3.6-1: Plasmide für die Konstruktion eines Hisactophilin-GFP Fusionsgens

Plasmid	Eigenschaften
pGFP	3344 Bp, GFP - Gen zwischen den Schnittstellen <i>Bam</i> HI und <i>Stu</i> I auf einem 810 Bp-Fragment, Ampicillinresistenz, Bezugsquelle: CLONTECH (Palo Alto, USA)
pGF-1	4146 Bp, promotorloses GFP-Gen, Kanamycin-/Neomycinresistenz, Bezugsquelle: CLONTECH (Palo Alto, USA)

Plasmid	Eigenschaften
pQE-41W	4031 Bp, Gen für die Dehydrofolatreduktase unter <i>lac</i> -Promotor, Ampicillinresistenz. Bezugsquelle: QIAGEN (Hilden)
pIMS5cDH516	5259, Hisactophilin-Gen unter <i>tac</i> -Promotor, Ampicillinresistenz, <i>lac</i> -Repressor <i>lacI</i> , Bezugsquelle: Prof. Gerisch und Prof. Schleicher, MPI München [SIMON <i>et al.</i> , 1988; SCHEEL <i>et al.</i> , 1989]
pJF118-EH	5314 Bp, Überexpression <i>lac</i> -Repressor <i>lacI^q</i> , Ampicillinresistenz, Bezugsquelle: Lehrstuhl für Genetik, Universität Bielefeld, Prof. PÜHLER [FÜRSTE <i>et al.</i> , 1986]

Die folgende Abbildung zeigt den Klonierungsablauf [POPPENBORG, 1996]:

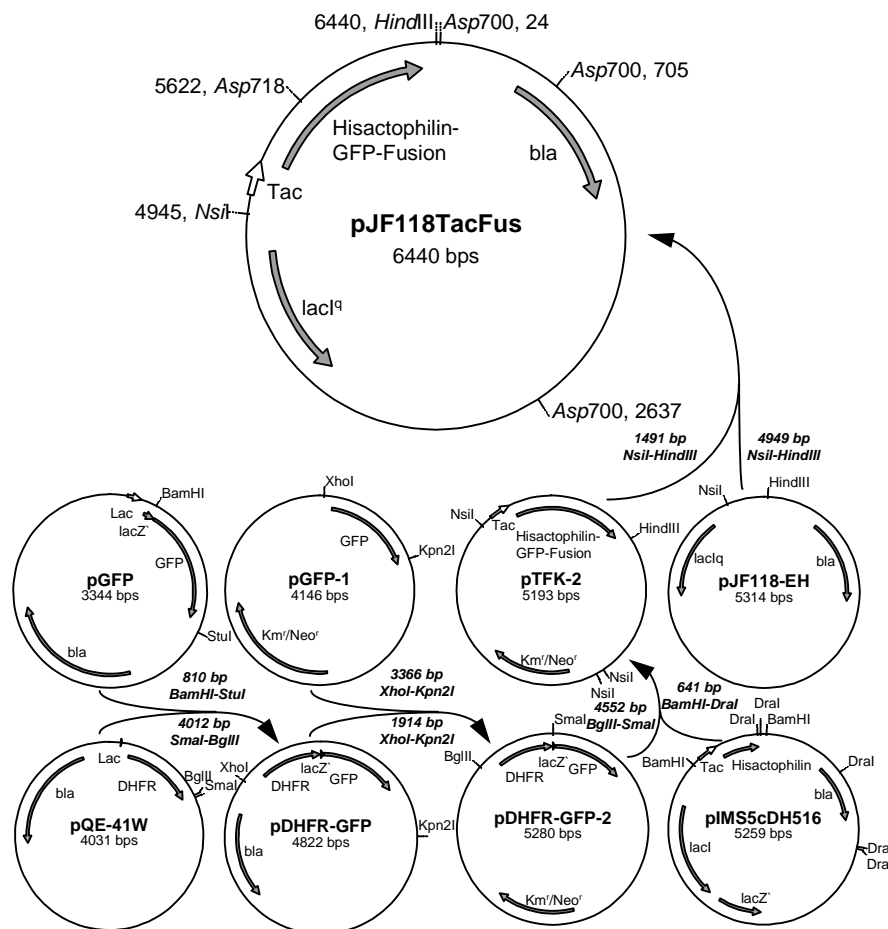


Abbildung 3.6-3: Konstruktion von pJF118TacFus mit dem Hisactophilin-GFP Fusionsgen unter P_{tac} Kontrolle.

Das so konstruierte Plasmid pJF118TacFus wurde in den Stamm *E. coli* MM294 transformiert [POPPENBORG *et al.*, 1997] und entsprechende Klone selektiert. Durch Zugabe von IPTG konnte eine starke Expression des Hisactophilin-GFP-Fusionsproteins gefunden werden.

Vergleich von His₆ und Hisactophilin als Affinitätskomplement

Die Bindungseigenschaften des Hisactophilin an Ni(II)-NTA sollten mit denen eines Histidin-6-Restes (His₆) verglichen werden. Dabei sollte das gleiche Reporterprotein GFP eingesetzt werden. Das Plasmid p6xHis-GFP von CLONTECH (Palo Alto, USA) besaß das Gen für das Fusionsprotein GFP-His₆ und ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

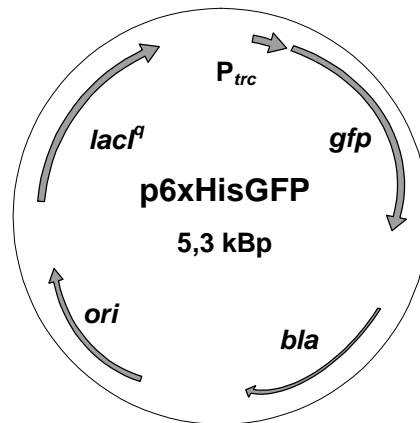


Abbildung 3.6-4: Plasmidkarte von p6xHis-GFP (CLONTECH, Palo Alto, USA)

Das 5,3 kbp große Plasmid besitzt das Gen für ein Fusionsprotein von GFP mit 6 Histidinresten am Aminoende. Es steht unter der Kontrolle des *trc*-Promotors, der mit IPTG induziert wird [AMANN & BROSIUS, 1985]. Zur Reduzierung der basalen Transkription ist das Gen für die Überexpression des *lac*-Repressors, *lacI^d*, auf dem Plasmid lokalisiert. Das Plasmid wurde in den Stamm *E. coli* MM294 transformiert.

Unter Verwendung von IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) wurde die Affinität der beiden Fusionsproteine zu verschiedenen Metallchelataffinitätsliganden überprüft und der Frage nachgegangen, inwieweit Hisactophilin als alternatives Affinitätskomplement einsetzbar ist [FLASCHEL *et al.*, 1998]. Für die Proteinaufarbeitung wurden die *E.coli*-Rohextrakte der jeweiligen Fusionsproteine eingesetzt.

Die bekanntesten Chelatbildner zur Trennung von Proteinen auf der Basis carboxymethylierter Amine sind neben der tridentären Imidodiessigsäure (IDA), die quadridentären Liganden Nitriolotriessigsäure (NTA) und Talon™ (CLONTECH, Palo Alto, USA). Ein weniger bekannter Chelatbildner ist der pentadentärer Tris(carboxymethyl)ethylendiamin-Ligand.

Die Affinitätstests erfolgten unter Verwendung verschiedener Harze (IDA-Sepharose, PDC-Agarose, Talon™ -Harz und NI-NTA-Agarose). Das Pentadentat-Chelator der Firma AFFILAND (Ans-Liege, Belgien) wurde mit unterschiedlichen Metallkationen komplexiert.

Die Elution erfolgte mittels linearen Imidazolgradienten. Die Gegenüberstellung der Affinität der beiden Proteine zu allen getesteten Systemen zeigte, daß das GFP-Hisactophilin im Vergleich zu dem GFP-His6-Fusionsprotein eine höhere Affinität besitzt [WITTLER, 1999]. Dies zeigt Tabelle 3.6-2.

Tabelle 3.6-2: Vergleich der Affinität von Hisactophilin bzw. Histidinpeptid (His₆) zu verschiedenen Liganden.

Säulenmaterial	GFP-His6	GFP-Hisactophilin
IDA-Cu ²⁺	160 mM	380 mM
NTA-Ni ²⁺	190 mM	420 mM
Talon™ -Co ²⁺	150 mM	240 mM
PDC-Cu ²⁺	100 mM	160 mM
PDC-Ni ²⁺	130 mM	220 mM
PDC-Co ²⁺	130 mM	200 mM
PDC-Zn ²⁺	keine Bindung	180 mM

Die notwendige Konzentration an Imidazol im Elutionsgradienten zur Ablösung der Fusionsproteine war bei Hisactophilin bei allen untersuchten Liganden klar höher als bei His₆. Dies zeigte deutlich, daß Hisactophilin eine viel höhere Affinität besitzt.

Bei der Verwendung von Histidin-bindenden Liganden werden nicht nur His₆-Fusionsproteine gebunden, sondern auch andere Proteine, die über ähnliche Affinitätskomplemente verfügen. Daher können bei der Aufreinigung von His₆-Fusionsproteinen andere Proteine als Verunreinigungen auftreten. Durch die stärkere Bindung von Hisactophilin-Fusionsproteinen an den Liganden, sollten diese Verunreinigungen durch Einsatz entsprechender Elutionspuffer vor dem Ablösen der Hisactophilin-Fusionsproteine von der Säule entfernt werden können.

Zur Klärung dieser Frage wurden die beiden GFP-Fusionsproteine in *E. coli* Zellen produziert und nach Zellaufschluß die Klarlysate auf Ni-NTA-Säulen aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen kontinuierlichen Imidazolgradienten. Proben verschiedener Fraktionen der Elution wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.6-5.

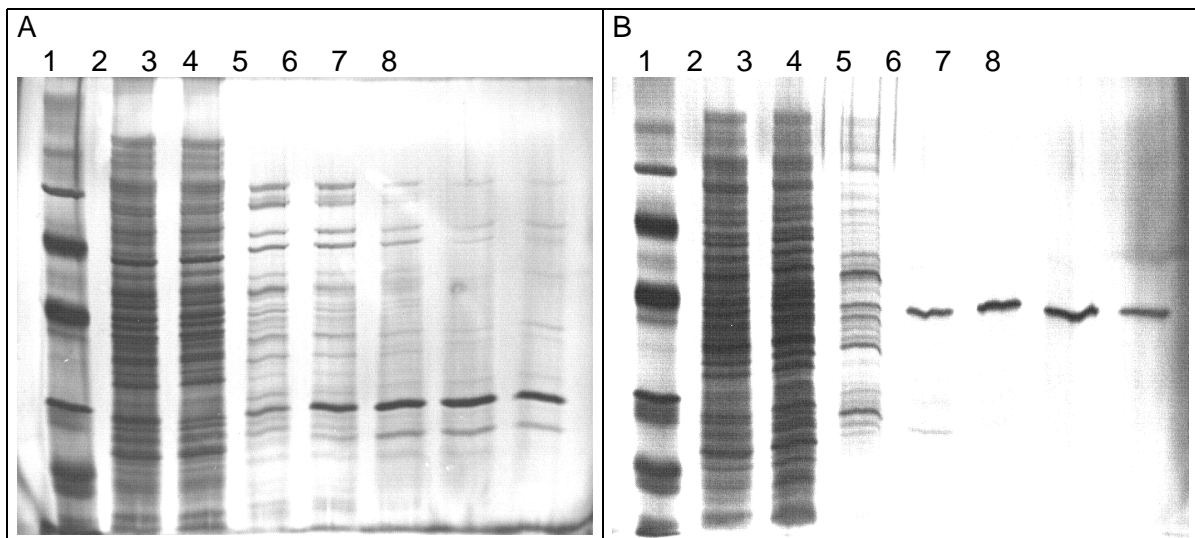


Abbildung 3.6-5: SDS-PAGE von Ni-NTA Chromatografiefraktionen von Klarlysaten GFP-His6 (A) bzw. GFP-Hisactophilin (B) enthaltend nach Elution mittels kontinuierlichen Imidazolgradienten

A

- 1: Molmassenstandard
- 2: Rohextrakt 1:40 verdünnt
- 3: Waschfraktion 1:2 verdünnt
- 4-8: Elutionsfraktionen mit steigender Imidazolkonzentration bis 70 mM.

B

- 1: Molmassenstandard
- 2: Rohextrakt 1:20 verdünnt
- 3: Waschfraktionen, vereint
- 4: Elutionsfraktionen mit steigender Imidazolkonzentration bis 70 mM.
- 5-8: Elutionsfraktionen mit steigender Imidazolkonzentration ab 150 mM.

Die Ablösung des GFP-His6-Fusionsproteins begann bereits bei 70 mM Imidazol im Puffer. Dabei wurden auch Verunreinigungen eluiert. Beim GFP-Hisactophilin-Fusionsprotein wurden bei Imidazolkonzentrationen bis 70 mM und höher nur die Verunreinigungen abgelöst. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte erst bei höheren Imidazolkonzentrationen von 150 mM und mehr und enthielt praktisch keine weiteren Proteine als Verunreinigung.

Es konnte bestätigt werden, daß Protein A aus *Staphylococcus aureus* als Fusionskomplement eingesetzt werden kann. Das notwendige Trägermaterial mit Immunglobulinen als Liganden ist für industrielle Einsätze aus ökonomischen Gründen limitiert. Die Verwendung von His₆ als Fusionskomplement und Verwendung von immobilisierten Metallionen als Liganden ist viel preiswerter, kann jedoch aufgrund der Affinität von His₆ zu diesen Liganden zu Verunreinigungen durch Proteine führen, die ebenfalls an diese Liganden binden und bei gleichen Elutionsbedingungen wie His₆-Fusionsproteine abgelöst werden. Die Verwendung von Hisactophilin als

Affinitätskomplement hingegen, führt zu sehr großer Reinheit, da die Affinität von Hisactophilin zu diesen Liganden deutlich höher war als His₆. Damit ließ sich mit Hisactophilin als Affinitätskomplement eine Hauptforderung der Aufarbeitung, nämlich die nach möglichst wenig Aufarbeitungsschritten, erfüllen.

3.7 Entsorgung und Verwertung von Mikroorganismen

Am Ende eines biotechnologischen Produktionsprozesses stehen die Produkte und der Abfall. Der biologische Abfall besteht je nach Lokalisierung der Produkte aus den ganzen Zellen oder nach Zellaufschluß aus Zellbestandteilen. Diese biologischen Abfälle müssen entsorgt werden. Dabei ergeben sich bei der Verwendung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen spezielle Anforderungen, die auf Sicherheitsaspekten beruhen. Dieses Kapitel besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil werden sicherheitsrelevante Untersuchungen zur Entsorgung von rekombinanten Mikroorganismen vorgestellt. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Verwertung von mikrobieller Biomasse, die als Abfall anfällt.

3.7.1 Entsorgung von rekombinanten *E. coli*

Bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen mit *E. coli* befinden sich im biologischen Abfall Nukleinsäuren, insbesondere Plasmide. Diese Nukleinsäuren werden bei der Entsorgung der Abfälle durch Deponierung, Ausbringung als Dünger oder Zuführung in eine Kläranlage freigesetzt. Es war nun von Interesse herauszufinden, ob diese Plasmide bei der Inaktivierung des Abfalls, die vor einer Entsorgung stets erfolgt, ihre biologische Aktivität verlieren. Es war bekannt, daß reine DNS in Frischwasserkulturen übertragen werden kann [MORRISON *et al.*, 1978]. Daher war das Ziel der Untersuchungen herauszufinden, ob nach verschiedenen Inaktivierungsmethoden Plasmid-DNS gefunden werden kann, die noch zur Transformation fähig ist.

Als Modellstamm wurde *E. coli* JM103 gewählt, ein auch industriell genutzter Organismus. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pEcoR4 transformiert. Dabei handelt es sich um ein Plasmid mit einer Kopienzahl von ca. 100 pro Zelle und einer Größe von 6 kBp. Der Organismus wurde in LB-Medium mit Chloramphenicol als Selektionsdruck (25 mg mL⁻¹) angezüchtet und mittels verschiedener Methoden inaktiviert. Diese sind in Tabelle 3.7-1 zusammengefaßt.

Tabelle 3.7-1: Methoden zur Inaktivierung von rekombinanten *E. coli*

Inaktivierungsmittel	Methode
Desinfektionsmittel	<p>1250 µL Kultur wurden mit 138 µL bzw. 13 µL 10 % Desinfektionsmittel vermischt und 6 min bei 25°C inkubiert. Folgende Desinfektionsmittel kamen zum Einsatz:</p> <p>Formaldehyd</p> <p>Ameisensäure</p> <p>Phenol</p> <p>Chloramin T (N-Chlor-4-toluolsulfonsäureamid-Natrium,)</p> <p>Zephirol® (Benzalkoniumchlorid, Bayer)</p> <p>Tego-Spray® (3,9-Triazahenicosäure-HCl in 2-Propanol, Th.Goldschmidt, Essen)</p>
Ethanol	1200 µL Kultur wurden mit 300 µL Ethanol vermischt und bei 25°C verschieden lange inkubiert.
NaOH	1500 µL Kultur wurden mit 10 M NaOH auf 1 M NaOH gebracht und nach verschiedenen Inkubationszeiten durch Zugabe von HCl auf pH 7 bis 8 eingestellt.
Hitze	Je 7 mL Kultur wurden in Glasröhrchen mit Schraubdeckel (Sovirell) gegeben und im Ölbad bei Temperaturen zwischen 112 und 142°C 0,5 bis 11 min erhitzt. 1500 µL Aliquots wurden je Meßpunkt entnommen und weiter bearbeitet.

50 µL der Ansätze bzw. Probenmengen wurden nach der Inaktivierung für eine Verdünnungsreihe verwendet und diese auf LB-Platten ausplattiert, um die Anzahl der überlebenden teilungsfähigen Zellen zu bestimmen. Die restlichen Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und die Plasmid – DNS isoliert [BIRNBOIM & DOLY, 1979]. Diese wurde bei Transformationsversuchen eingesetzt. Dabei wurden Zellen von *E. coli* JM103 kompetent gemacht [CHUNG & MILLER, 1988] und nach Transformation die Ansätze auf LB-Chloramphenicol-Platten ausplattiert. Je nach Effizienz der Inaktivierung sollten dadurch mehr oder weniger Transformanten gefunden werden.

3.7.1.1 Inaktivierung durch Desinfektionsmittel

Verschiedene Desinfektionsmittel wurden mit Kulturen von *E. coli* wie beschrieben

vermischt und danach die Lebendzellzahl bzw. Transformantenzahl bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.7-1 und 3.7-2.

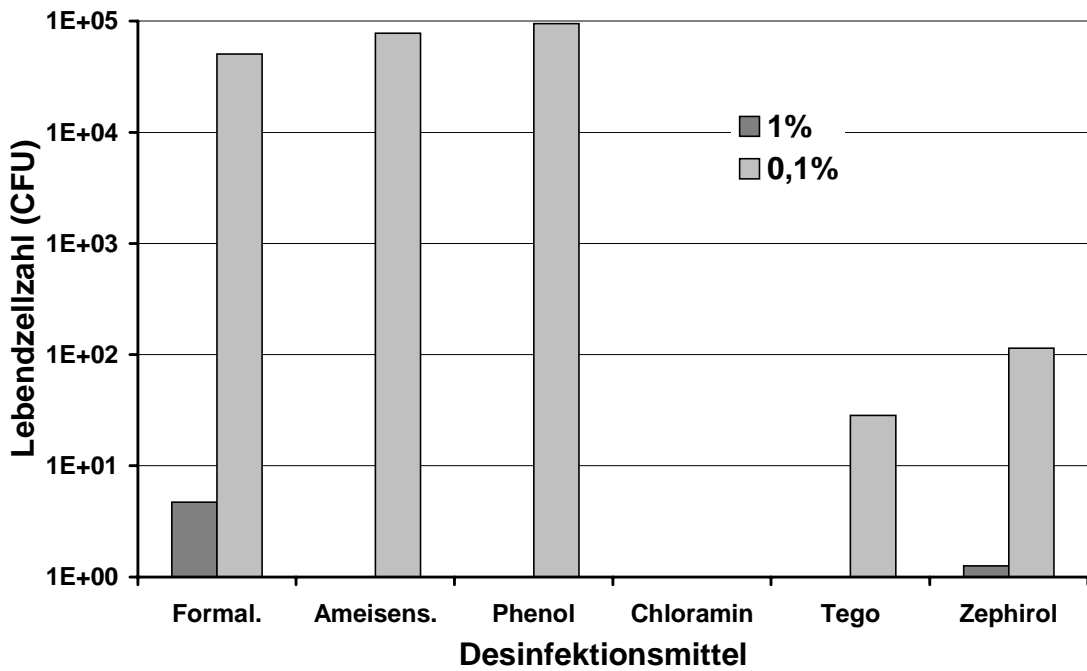


Abbildung 3.7-1: Lebendzellzahlen nach Behandlung mit Desinfektionsmitteln

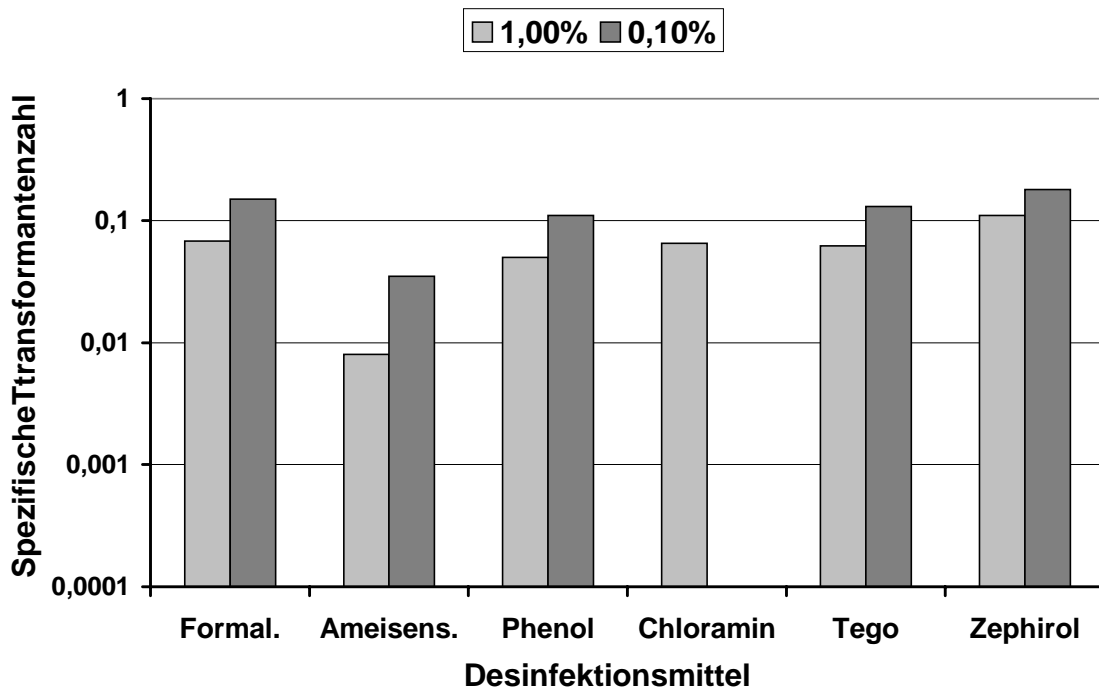


Abbildung 3.7-2: Transformantenzahlen nach Behandlung mit Desinfektionsmitteln

E. coli überlebte die Inaktivierung bei 0,1 % in Formaldehyd, Ameisensäure, Phenol, Zephirol® und Tego-Spray®. Chloramin T wurde bei dieser Konzentration nicht getestet. Bei der höheren Konzentration von 1 % konnten bei Formaldehyd und Zephirol® noch Zellen anwachsen. Sowohl bei Inkubation in 0,1 % Lösungen als auch in 1 % Lösungen konnten bei allen getesteten Desinfektionsmitteln bzw. Konzentrationen Transformanten gefunden werden, nachdem mit den behandelten Zellen eine Plasmidisolierung und eine Transformation durchgeführt worden war. Obwohl einige Desinfektionsmittel geeignet waren das Wachstum von *E. coli* zu hemmen, war keines für die Inaktivierung von Plasmid-DNS verwendbar.

3.7.1.2 Inaktivierung durch Ethanol

Ethanol wird allgemein gerne zur Desinfektion von Oberflächen verwendet. Seine Eignung als Mittel zur Inaktivierung von *Escherichia coli* zeigt Abbildung 3.7-3.

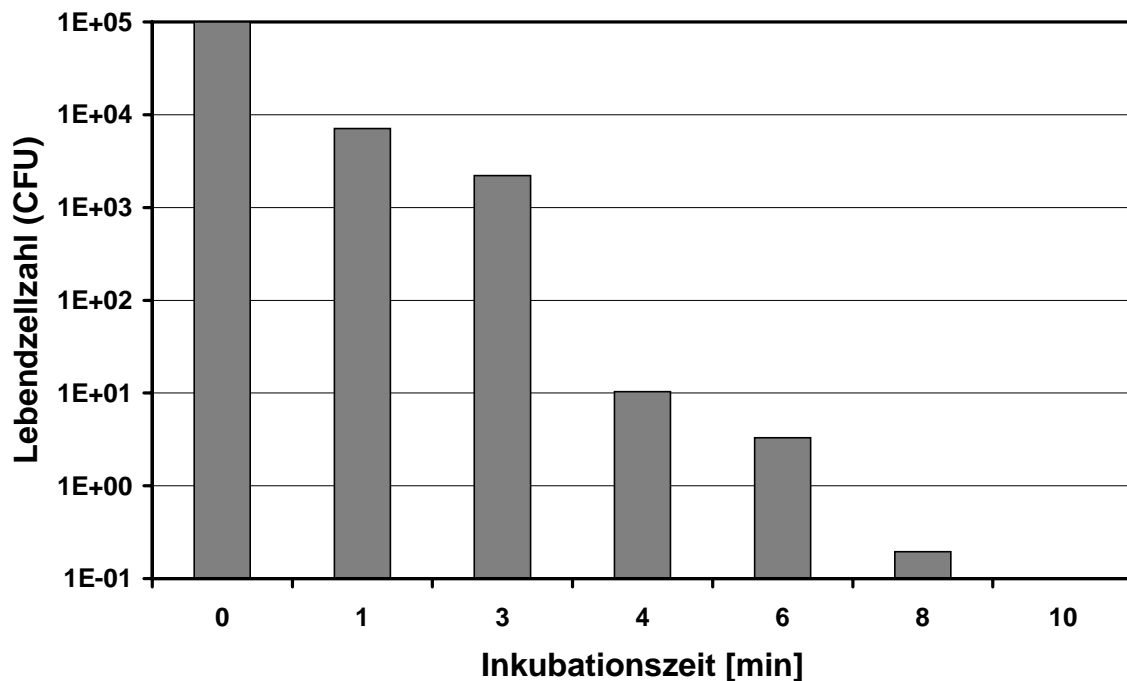


Abbildung 3.7-3: Lebendzellzahlen nach Behandlung mit Ethanol

Mit steigender Inkubationszeit sinkt die Lebendzellzahl. Bei genügend langer Inkubation (10 min) konnten keine Kolonien gefunden werden. Die Eignung von Ethanol zur Inaktivierung von Plasmid-DNS zeigt Abbildung 3.7-4.

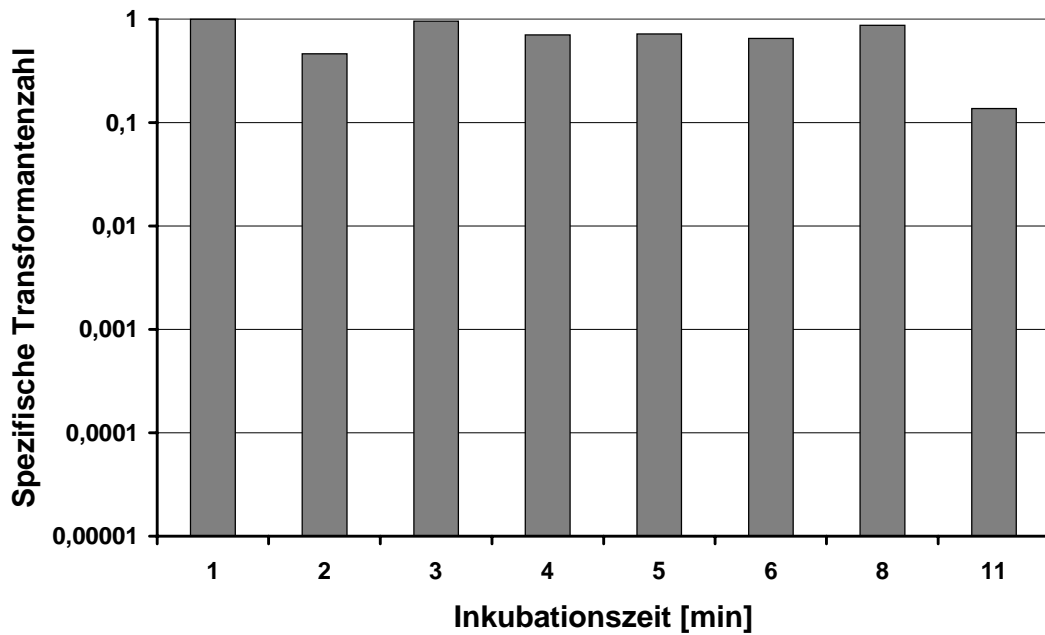


Abbildung 3.7-4: Transformantenzahlen nach Behandlung mit Ethanol

Ethanol ist zur Inaktivierung von Plasmid-DNS nicht geeignet.

3.7.1.3 Inaktivierung durch NaOH

Die Inaktivierung von Organismen durch NaOH ist eine industrielle Methode zur Abtötung von Biomasse nach Fermentationen. Für *Escherichia coli* zeigt dies Abbildung 3.7-5.

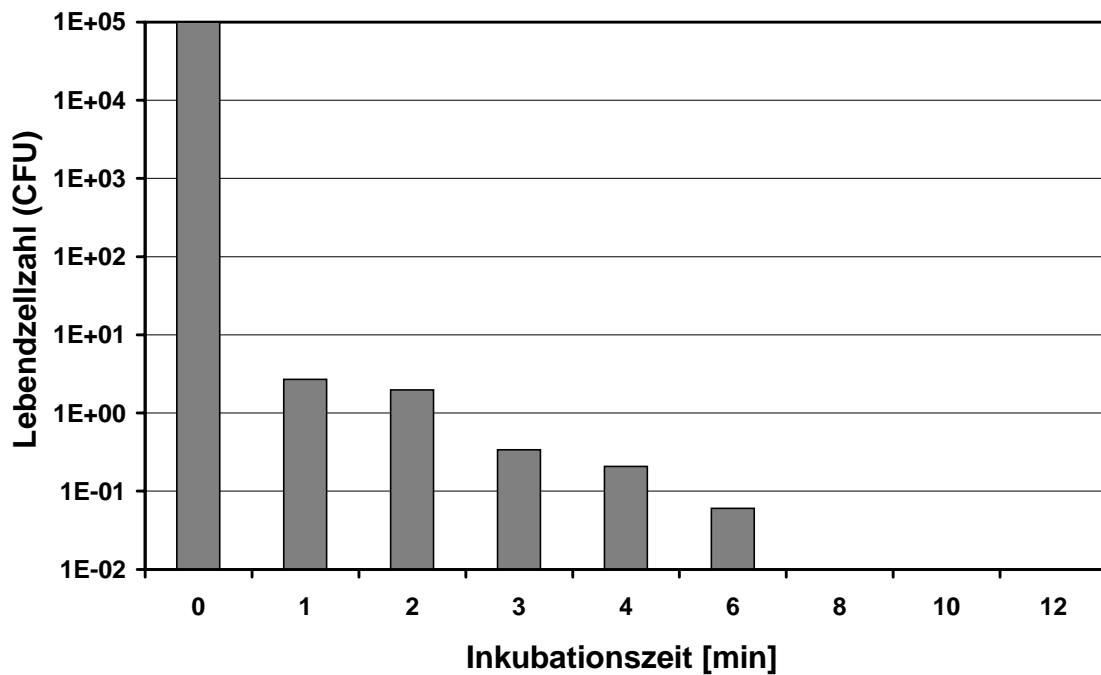


Abbildung 3.7-5: Lebendzellzahlen nach Behandlung mit NaOH

Die Eignung von NaOH zur Inaktivierung von Plasmid-DNS zeigt Abbildung 3.7-6.

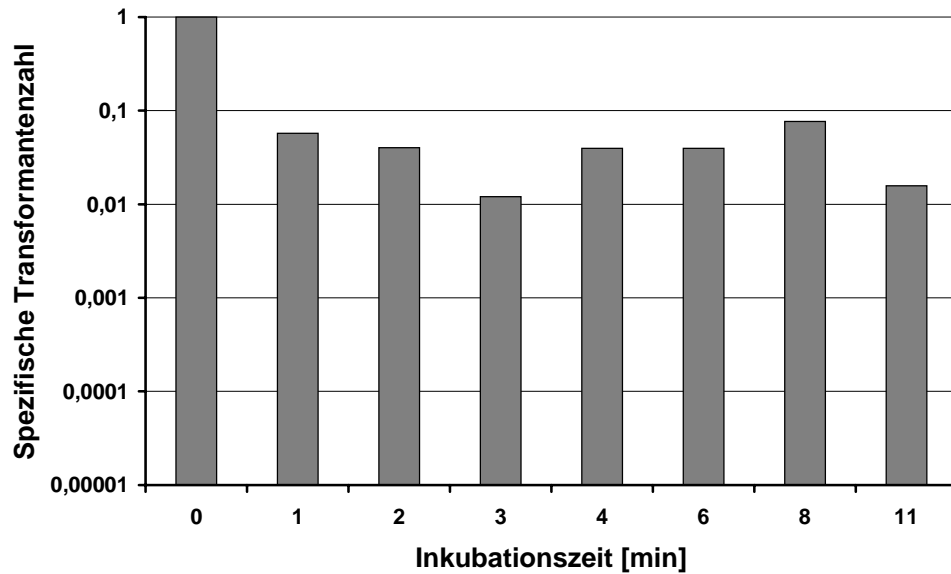


Abbildung 3.7-6: Transformantenzahlen nach Behandlung mit NaOH

Nach 6 min waren alle Zellen abgetötet. Auch nach 11 min Inkubation konnten jedoch noch Transformanten mit der isolierten Plasmid-DNS hergestellt werden. NaOH war wie EtOH ungeeignet zur Inaktivierung von Plasmid-DNS. Dies war eigentlich keine Überraschung, da beide Substanzen bei der Plasmidisolierung eingesetzt werden.

3.7.1.4 Thermische Inaktivierung

Thermische Inaktivierung ist industriell eine Kostenfrage. Einen Bioreaktor von 100 m^3 und mehr auf die klassische Sterilisationstemperatur von 121°C aufzuheizen und diese Temperatur überall für 20 min zu halten, ist energieintensiv und dauert lange. Von größerem Interesse sind daher kontinuierliche Verfahren. Dabei interessiert bei welcher Temperatur und welcher Verweilzeit die gewünschten Inaktivierungen erreicht werden können. Abbildung 3.7-7 zeigt Ergebnisse entsprechender Experimente.

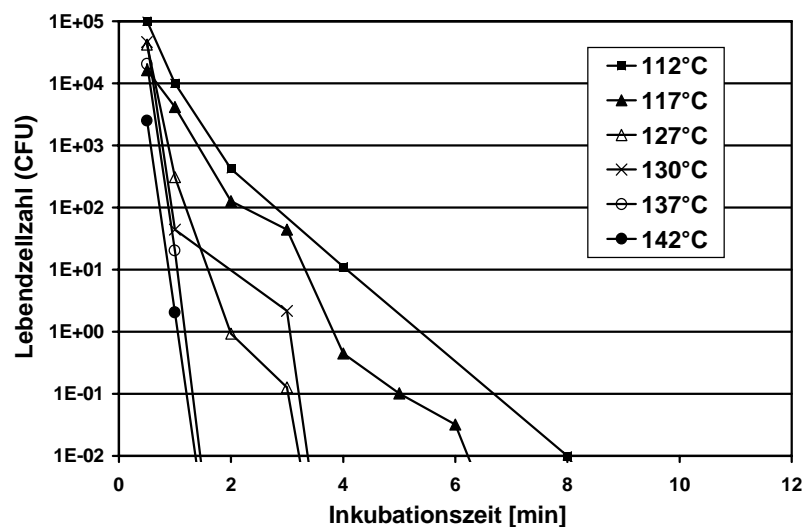


Abbildung 3.7-7: Lebendzellzahlen nach thermischer Inaktivierung

Bei sehr hohen Temperaturen von 137°C bzw. 142°C waren Verweilzeiten von weniger als 2 min notwendig, um eine vollständige Abtötung von *E. coli*-Zellen zu gewährleisten. Die notwendige Verweilzeit zur Inaktivierung Plasmiden stieg mit sinkender Temperatur an und erreichte für die niedrigste gemessene Temperatur 8 min. Abbildung 3.7-8 zeigt die Ergebnisse im einzelnen.

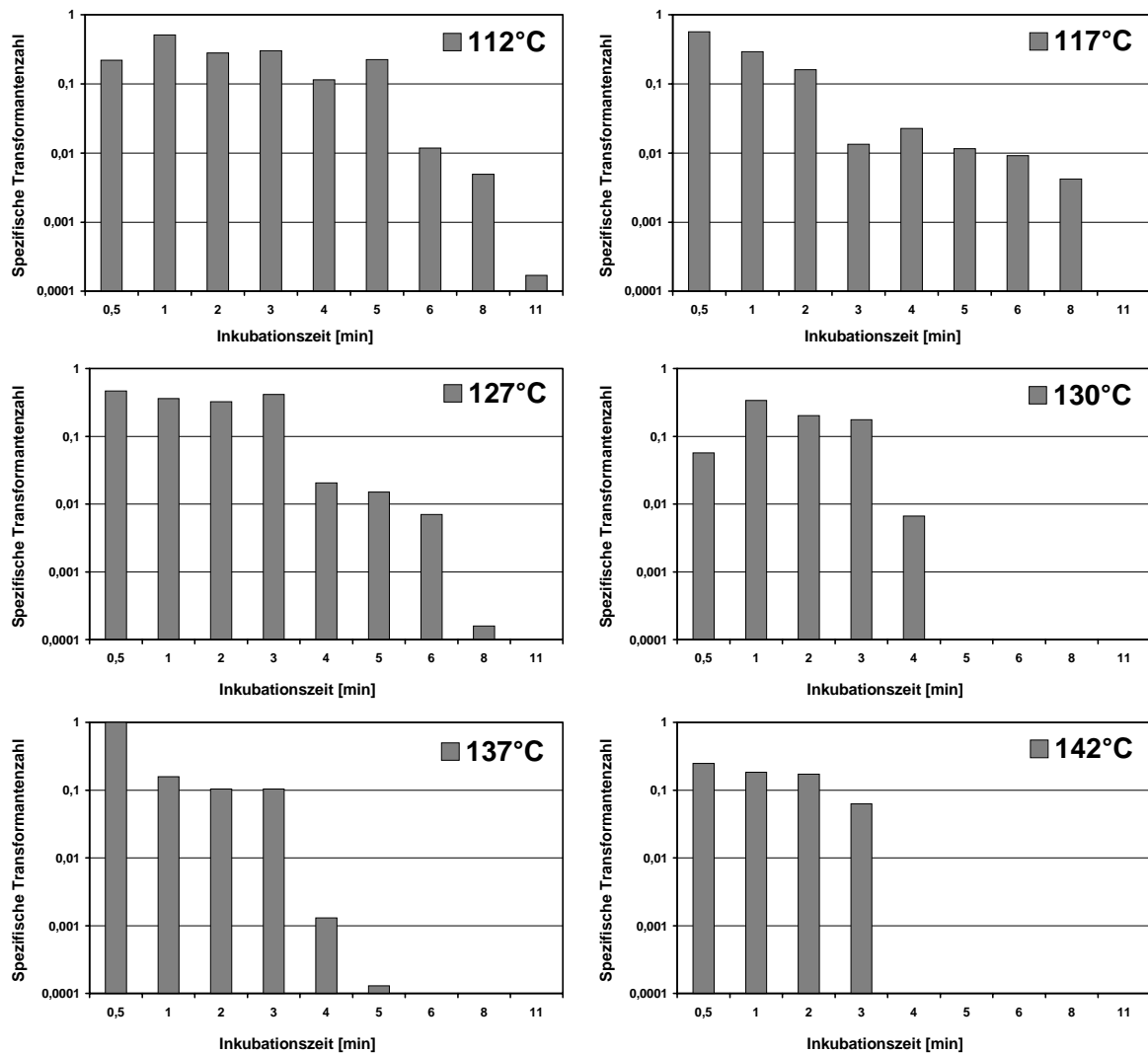


Abbildung 3.7-8: Spezifische Transformantenzahlen mittels Plasmid-DNS isoliert nach thermischer Inaktivierung

Bei allen Temperaturen konnten bei Verweilzeiten unter 3 min Transformanten gefunden werden. Bei einer Temperatur von 112 °C konnte nach 11 min noch Plasmid-DNS isoliert werden, die ihre biologische Aktivität noch besaß. Bei 117 °C konnten nach 11 min keine Transformanten gefunden werden. Bei 142 °C konnten nach 4 min keine Transformanten gefunden werden.

Die Inaktivierung eines rekombinanten *E. coli* ist dadurch definiert, daß nach dem Verfahren keine Plasmid-DNS mehr isoliert werden kann, mit der ein kompetent gemachter Stamm von *E. coli* transformiert werden kann. Die untersuchten Methoden

unter Einsatz von Desinfektionsmitteln, NaOH und EtOH zeigten bei den vorgegeben Konzentrationen und Inkubationszeiten keine ausreichende inaktivierende Wirkung. Bei allen Untersuchungen konnten Transformanten, und somit biologisch aktive Plasmid-DNS, gefunden werden.

Durch thermische Inaktivierung konnte eine vollständige Inaktivierung der Plasmid-DNS erfolgen. Bei 117°C wurden nach 11 min keine Transformanten gefunden. Bei 142°C hatte die Plasmid-DNS nach 4 min die biologische Aktivität verloren.

Deutlich zu sehen war, daß Zellen durch verschiedene Methoden abgetötet werden konnten, bei denen noch biologisch aktive Plasmid-DNS gefunden werden konnte. Auch Hitze schadet den Zellen rasch, während Plasmid-DNS relativ stabil bleibt. Es ist daher davon auszugehen, daß Verfahren, die bis jetzt industriell eingesetzt wurden, um Biomasse nach Fermentationen abzutöten, nicht geeignet sind Plasmid-DNS zu inaktivieren. Bei Hitzeverfahren müßte entweder die Temperatur oder die Verweilzeit oder beides erhöht werden.

3.7.2 Verwertung von mikrobieller Biomasse

Nur in Ausnahmefällen ist mikrobielle Biomasse das eigentliche Ziel biotechnischer Prozesse. Die anfallende Biomasse ist gewöhnlich ein notwendiges Übel, die die Produktausbeute schmälert und zusätzlich kostenträchtig entsorgt werden muß. Hersteller von (z. B.) Aminosäuren, technischen Enzymen und Antibiotika sind von dieser Problematik besonders betroffen. So wird der Biomasseanfall durch Produktion des Antibiotikums Cephalosporin C durch *Acremonium chrysogenum* auf jährlich mindestens 4000 t geschätzt [SCHLEDT *et al.*, 1995]. In wenigen Fällen klassischer biotechnischer Prozesse wird die anfallende Biomasse als Futtermittel abgegeben. Andere Hersteller haben kostspielige Infrastrukturen aufgebaut, um die Biomasse als Dünger einsetzen zu können. Beide Wege wären ökonomisch jedoch unrentabel, wenn nicht die sonst fälligen Kosten für Deponie, Kompostierung oder Klärung berücksichtigt würden.

Eine Entsorgung der Biomasse auf den erwähnten Wegen entzieht den biologischen Prozessen wertvolle Rohstoffe, zumal Biomasse natürlich alle Komponenten enthält, die zur Erzeugung von Biomasse benötigt werden. Es sollte deshalb von großem Interesse sein, Biomasse so aufbereiten zu können, daß es in den Prozeß zurückgeführt oder für andere biotechnische Prozesse nutzbar gemacht werden könnte. So darf erwartet werden, daß aufgeschlossene Biomasse andere Medienkomponenten wie z. B. Hefeextrakt, Pepton und Vitamine ersetzen kann. Um dies in der Praxis umzusetzen, sind

grundlegende Untersuchungen notwendig, da diese Prozeßstrategie in der Literatur, außer für Hefeextrakt [GODFREY, 1996], nicht beschrieben wird und auch nicht zur aktuellen industriellen Praxis zählt.

Ziel der im folgenden beschriebenen Experimente [FRIEHS *et al.*, 1998a, FRIEHS *et al.*, 1998b] war es, aus bakterieller Biomasse eine möglichst hohe Ausbeute an löslichem Extrakt zu gewinnen, um diesen als Medienbestandteil wiederverwenden zu können.

3.7.2.1 Herstellung und Verwertung von Extrakten aus *E. coli*-Biomasse

Biomasse von *E. coli* MM294 wurde im Zulaufverfahren in einem konventionellen Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 20 L durch Wachstum in LB-Medium erzeugt. Der Reaktorinhalt wurde bei einer Biomassekonzentration entsprechend einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 9 durch Mikrofiltration und anschließende Zentrifugation geerntet.

Danach erfolgte der Aufschluß der Biomasse durch Autolyse bzw. Hochdruckhomogenisation. Für die Autolyse wurde eine Feuchtmasse von 23,8 g in 150 mL eines 0,01 M Kaliumphosphatpuffers von pH 5,7 resuspendiert und im Wasserbad bei 30 bis 55 °C mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 5 K h^{-1} erwärmt. Die Zellsuspension wurde für 24 h bei 55 °C gehalten und danach während 1 h auf 70 °C erwärmt, um diese Temperatur für 15 h zu halten. Das Autolysat wurde 5 min mit 14000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand diente als *E. coli*-Extrakt und wurde unter der Kennung EE-AU geführt [FRIEHS *et al.*, 1998a].

Für den Biomasse-Aufschluß durch Hochdruckhomogenisation wurde eine Feuchtmasse von 21,8 g *E. coli* MM294 in 150 mL Kaliumphosphatpuffer suspendiert und in den Einlauftrichter des Hochdruckhomogenisators (Modell: Mini-Lab 8.30H, Rannie) gegeben. Drei Passagen bei 60 MPa wurden durchgeführt. Das Homogenisat wurde einem ähnlichen Erwärmungs- und Trennprozeß unterworfen, wie er oben für die Herstellung des Autolysats beschrieben worden ist, jedoch betrug die Haltezeit bei 55 °C nur 18 h und die Phase bei 70 °C entfiel gänzlich. Der hieraus resultierende Überstand diente als *E. coli*-Extrakt und wird unter der Kennung EE-HO geführt.

Die Überprüfung der Biomasse-Extrakte erfolgte gewöhnlich durch Kultivierung von *E. coli* MM294 in Schüttelkolben eines Fassungsvermögens von 1 L, die 3 Schikanen aufwiesen (Braun, Melsungen) und mit einem Füllgrad von 20 % betrieben wurden. Die Kulturen wurden bei 37 °C auf einem Schüttler (Modell: Certomat R, Braun, Melsungen) bei einer Frequenz von 180 min^{-1} und einer Auslenkung von 2,5 cm angezogen.

Die Medien basierten auf dem M9-Minimalmedium ohne Glucose und Ammoniumchlorid

und wurden auf pH 7,4 eingestellt. Wenn beschrieben, wurde Thiamin den autoklavierten Medien sterilfiltriert zugegeben. Das Inokulum wurde in Schüttelkolben von 0,5 L in M9-Medium angezogen und den Kultivierungen zu 5 % (v/v) zugesetzt.

Zum Vergleich mit den *E. coli*-Extrakten wurde Hefeextrakt (Gibco-BRL) verwendet, was später als HE gekennzeichnet ist.

Zur Ermittlung der Hydrolysegrade wurden Feststoffanteile bestimmt. Der Feststoffanteil der Extrakte wurde gravimetrisch gemessen. Zu diesem Zweck wurde ein definiertes Volumen bei -80 °C tiefgefroren und vor der Trockenmassebestimmung lyophilisiert. Der Stickstoffanteil wurde unabhängig nach der DUMAS-Methode gemessen (Mikroanalytisches Institut Beller, Göttingen). Der DNS-Gehalt wurde nach dem Dische-Test festgestellt [DISCHE, 1955]. Proteinbestimmungen erfolgten mit Bicinchoninsäure [SMITH *et al.*, 1985]. Biomassekonzentrationen wurden über die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) verfolgt.

Die Ausbeuten der Extrakterstellung aus *E. coli*-Biomasse sind in Tabelle 3.7-2 mit den Analysendaten zusammengestellt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Analysendaten für Hefeextrakt ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 3.7-2: Vergleich und Zusammensetzung von *E. coli*-Extrakten und Hefeextrakt

Bezeichnung	<i>E. coli</i> Extrakte		Hefeextrakt
	EE-AU	EE-HO	HE
Ausbeute / % BTM	25	39	55 [UHLING, 1991]
Feststoffgehalt / g L ⁻¹	10	14	-
DNA-Gehalt / % ETM	3,2	4,3	2,0
Proteingehalt / % ETM	23,0	21,7	23,0
Stickstoffgehalt / % ETM	10,6	11,3	11,1

Bezugsgrößen: BTM = Biotrockenmasse; ETM = Extraktrockenmasse

Die Ausbeuten der Herstellungsverfahren zeigten deutliche Unterschiede. Hefeextrakt wurde nicht selbst hergestellt, daher gab es dafür keine entsprechenden Daten bezüglich Feststoffgehalt. Der Wert für die Ausbeute stammt aus der Literatur.

Als Test der Verwendbarkeit der *E. coli*-Extrakte wurden Kultivierungen von *E. coli* in M9-Minimalmedium unter Zusatz von Hefeextrakt (HE) oder *E. coli*-Extrakt aus Autolyse (EE-

AU) bzw. Homogenisation (EE-HO) durchgeführt. In einer ersten Versuchsserie wurde M9-Minimalmedium mit einem Trockengehalt von je 5 g L^{-1} Extrakt bzw. Hefeextrakt supplementiert. Die Wachstumsverläufe sind in Abbildung 3.7-9 zusammengefaßt.

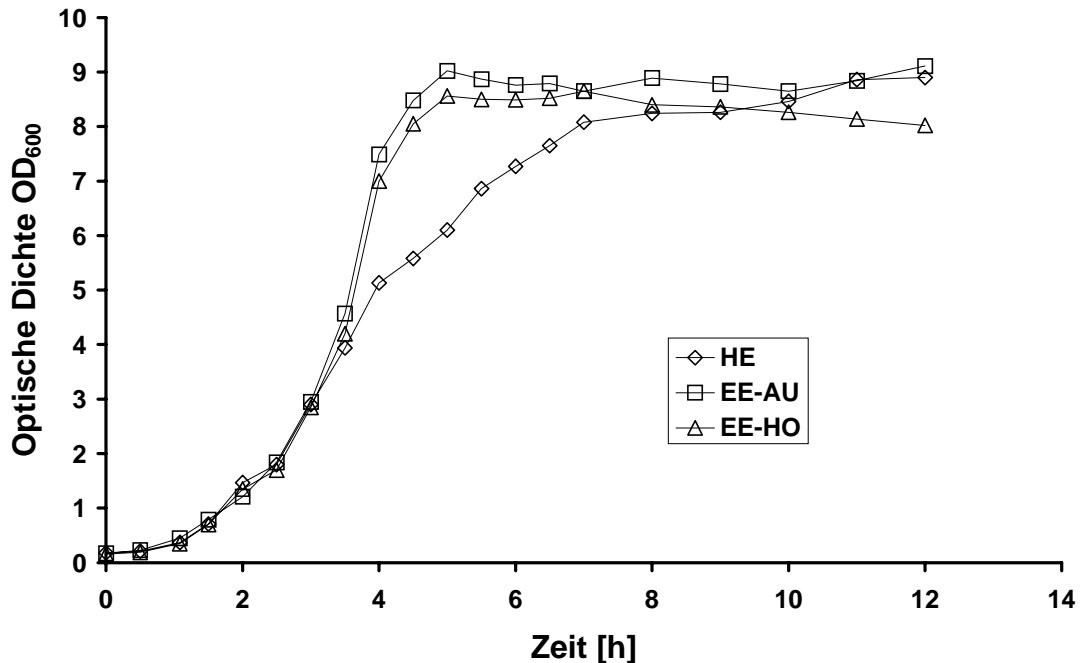


Abbildung 3.7-9: Kultivierung von *E. coli* MM294 in Medien auf der Basis des M9-Minimalmediums in Gegenwart eines Feststoffgehalts von 5 g L^{-1} verschiedener Extrakte.

Hefeextrakt (HE), *E. coli*-Extrakt aus Autolyse (EE-AU) bzw. Homogenisation (EE-HO)

Die schnellste Wachstumsgeschwindigkeit und die höchste Biomassekonzentration ergaben sich beim Einsatz des Autolysates gefolgt vom Homogenisat. Das Wachstum auf Hefeextrakt zeigte ein bimodales Verhalten mit geringer Wachstumsgeschwindigkeit im Bereich hoher Zelldichten. Zum Vergleich sei erwähnt, daß bei Wachstum auf M9-Minimalmedium nur eine optische Dichte von 2 nach 12 h erreicht wurde.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die Supplementierung mit Extrakten so vorgenommen, daß sich ein einheitlicher Stickstoffgehalt von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ in den Medien einstellte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7-10 wiedergegeben.

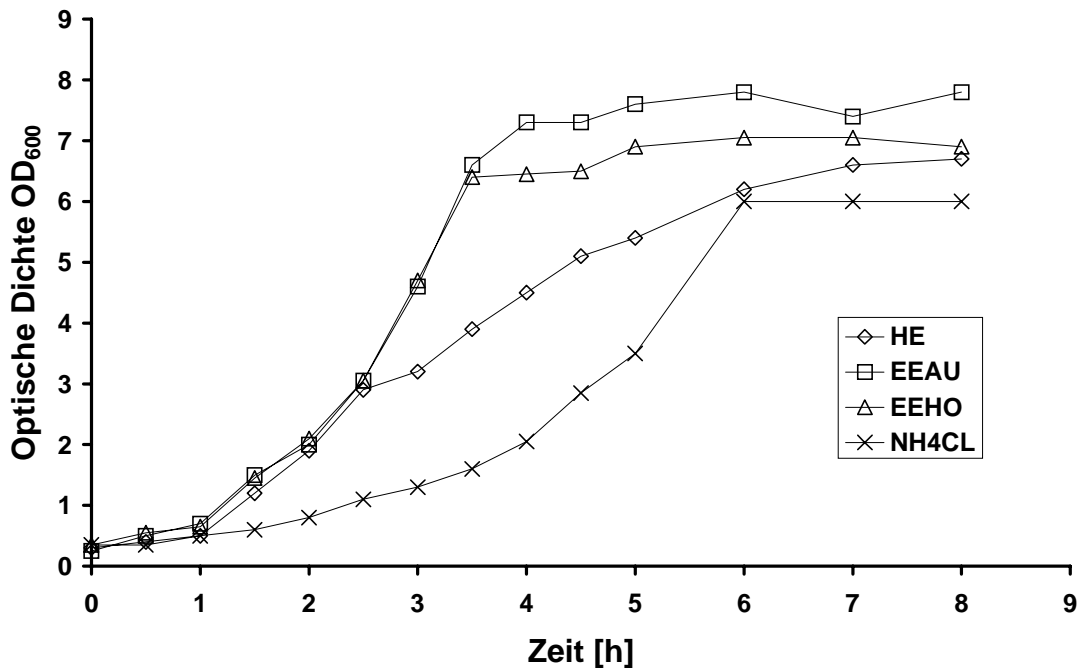


Abbildung 3.7-10: Kultivierung von *E. coli* MM294 in Medien auf der Basis des M9-Minimalmediums in Gegenwart eines Stickstoffgehalts von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ verschiedener Extrakte.

Hefeextrakt (HE), *E. coli*-Extrakt aus Autolyse (EE-AU) bzw. Homogenisation (EE-HO), Ammoniumchlorid (NH₄CL)

Zum Vergleich ist ein Wachstumsexperiment aufgeführt, in dem der Stickstoffgehalt durch Ammoniumchlorid eingestellt wurde. Der höhere Gehalt an Extrakt führte zu höheren Wachstumsgeschwindigkeiten. Es zeigte sich aber wiederum, daß die *E. coli*-Extrakte dem Hefeextrakt als Stickstoffquelle deutlich überlegen sind.

Wenn die Extrakte direkt als Medien eingesetzt werden sollten, ist zu erwarten, daß die Zusammensetzung nicht optimal sein kann. Deshalb wurde eine Versuchsserie mit dem Autolysat durchgeführt, um zu analysieren, welche Art der Supplementierung vorteilhaft sein würde. So wurde Autolysat (EE-AU) mit verschiedenen Zusätzen an Glucose, Thiamin und Spurenelementen entsprechend dem M9-Medium versehen und einem Wachstumstest mit *E. coli* MM294 unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7-11 zusammengestellt.

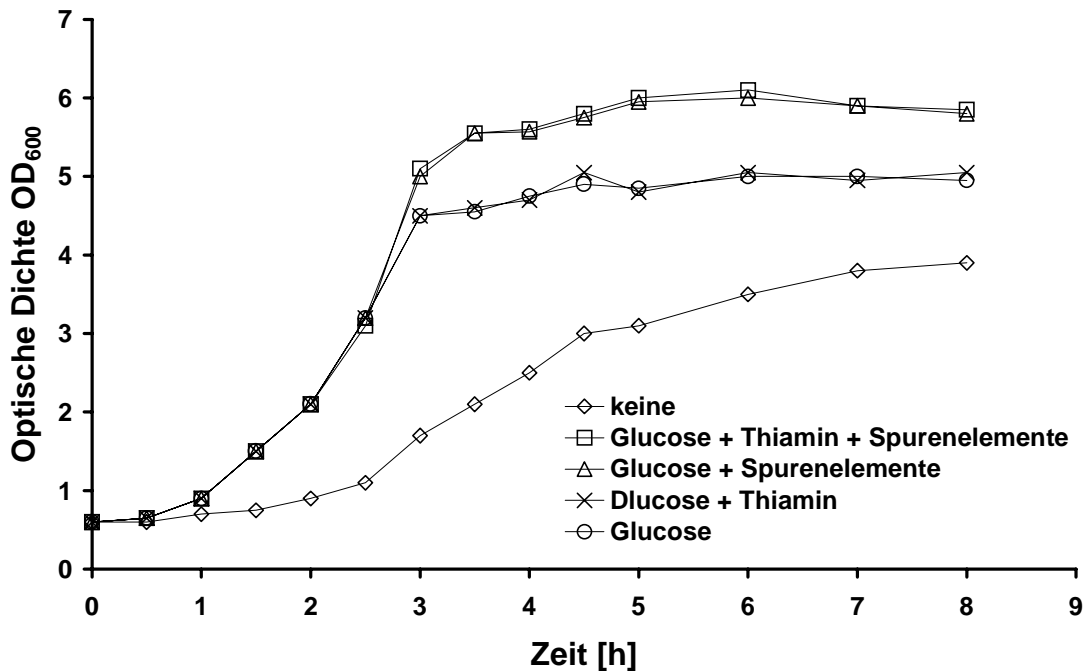


Abbildung 3.7-11: Einfluß von Zusätzen auf die Kultivierung von *E. coli* MM294 in Autolyse-Extrakt (EE-AU).

Glucose hatte erwartungsgemäß den größten Effekt, weil das C/N-Verhältnis im Extrakt ungünstig niedrig war. Eine weitere Verbesserung des Wachstums ließ sich durch Zusatz der Spurenelemente erzielen, während der Vitamingehalt des Extraktes ausreichend zu sein schien.

Es konnte gezeigt werden, daß *E. coli*-Biomasse durch einfache Verfahren in wertvolle Nährmedienbestandteile umgewandelt werden kann. Wie Vergleichsfermentationen gezeigt haben, sind *E. coli*-Extrakte einem Hefeextrakt in Bezug auf die Förderung des Bakterienwachstums überlegen. Aufgrund der sehr ähnlichen Stickstoffgehalte kann Hefeextrakt somit durch *E. coli*-Extrakte als Stickstoffquelle vollständig ersetzt werden.

Durch Autolyse wird jedoch nur ein Anteil von knapp 25 % der Biomasse in lösliche Form überführt. Durch Hochdruckhomogenisation steigt der Anteil zwar auf fast 40 %, der Aufwand ist aber sicherlich wirtschaftlich nicht zu vertreten. Um Bakterienextrakte für industrielle Prozesse attraktiver gewinnen zu können, sollte versucht werden die Autolyse zu beschleunigen und die Ausbeute zu steigern.

3.7.2.2 Herstellung und Verwertung von Extrakten aus *Bacillus licheniformis*-Biomasse

Bacillus und insbesondere *B. licheniformis* wird oft zur Produktion technischer Enzyme wie α -Amylase und alkalischer Protease verwendet. Allein für die Proteasenproduktion fallen jährlich schätzungsweise etwa 9000 t *Bacillus*-Biotrockenmasse an.

Für eine Wiederverwendung dieser Biomasse als Nährstoff in Kultivierungsmedien muß diese aufgeschlossen und von unlöslichen Bestandteilen getrennt werden. Ziel war es dabei aus der Biomasse möglichst viel löslichen Extrakt zu gewinnen und möglichst wenig Reststoff als Abfall zu hinterlassen. Für Hefe können mittels Autolyse Extraktausbeuten von 55 % nach 48 h bei Temperaturen zwischen 30 und 55°C erreicht werden [UHLING, 1991]. Am Beispiel des Gram-positiven Organismus *B. licheniformis* sollte gezeigt werden, daß sich durch einfache und kostengünstige Methoden ein Großteil dieser Biomasse in eine lösliche Form (Extrakt) überführen läßt [FRIEHS *et al.*, 1998b]. Anschließend wurden die erstellten Extrakte in gefriergetrockneter Form vergleichend mit Hefeextrakt und Casein auf ihre Eignung als Mediumskomponenten überprüft

In Anlehnung an eine Arbeit von MAO und Koautoren [MAO *et al.*, 1992] über die hohe Produktion von alkalischer Protease durch *B. licheniformis* bei Fed-Batch-Fermentation unter Benutzung eines synthetischen Medium konnte eine maximale Zelltrockenmasse (ZTM) von 6,4 g pro Liter Kulturflüssigkeit erreicht werden. Dies entsprach einer optischen Dichte (OD_{600}) von 26,0.

Zur Biomassenaufkonzentrierung wird die Kulturflüssigkeit mittels Tangentialflußfiltration auf 24,2 g ZTM pro Liter Retentat eingeeengt. Die Zellen im Retentat liegen in einer hypotonischen Umgebung vor, da die Zellmasse mittels destilliertem Wasser aus der Filtrationsanlage gespült wird.

Der Lysegrad wird jeweils unmittelbar vor, während und nach einem abgeschlossenen Lyseexperiment bestimmt. Dadurch findet Plasmolyse oder bereits eingesezte Autolyse vor erfolgter Zelllyse keine Berücksichtigung. Der Lysegrad ergibt sich aus der gravimetrischen Bestimmung der Abnahme der Zelltrockenmasse bzw. der Zunahme der Gelöststofftrockenanteile. Die Lyse erfolgt in 1 L-Schüttelkolben. Es wurde stets ein festgelegtes Lyse-Temperaturprogramm durchfahren. Die Schüttelgeschwindigkeit betrug 150 U min^{-1} bei einer Amplitude von 1,25 cm. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit 2 n NaOH. Abbildung 3.7-12 zeigt das Ergebnis.

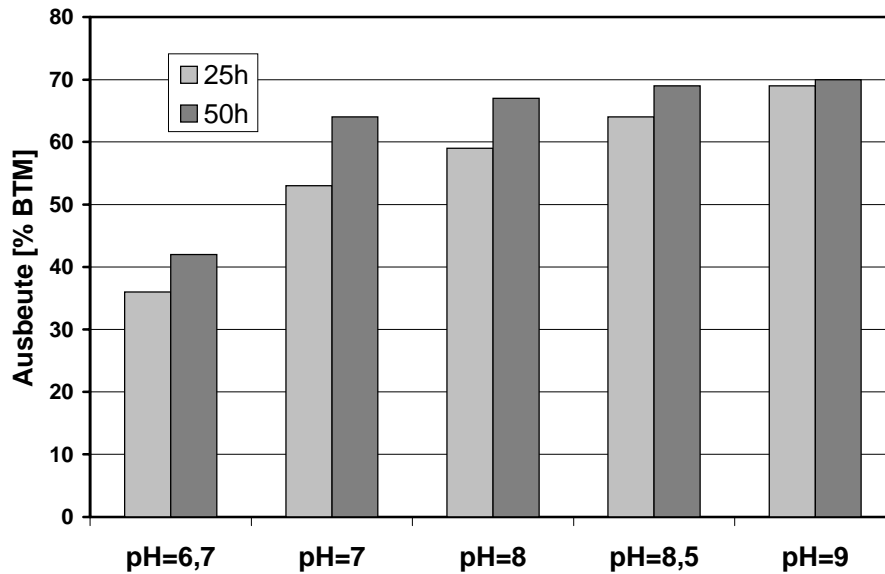


Abbildung 3.7-12: Autolyse mit Retentat aus Tangentialflußfiltration ($24,2 \text{ gL}^{-1}$ ZTM) bei Variation des Ausgangs-pH-Wertes

Temperaturprogramm: Start bei 30°C , Erhöhung 5 K h^{-1} . Nach Erreichen von 55°C wurde die Temperatur konstant gehalten.

Es zeigte sich, daß pH-Werte unter 7,0 bei der Autolyse wenig effektiv sind. Ein Lysegrad von 70 % scheint einen Grenzwert für die Autolyse darzustellen, der um so schneller erreicht wurde, je basischer das Milieu war.

Es wurde versucht durch Zugabe von Enzymen die Ausbeute an Extrakt zu erhöhen. Mit dem Zusatz von Lysozym (100000 E mg^{-1}) ließen sich die höchsten Lysegrade erreichen, wie Abbildung 3.7-13 zeigt.

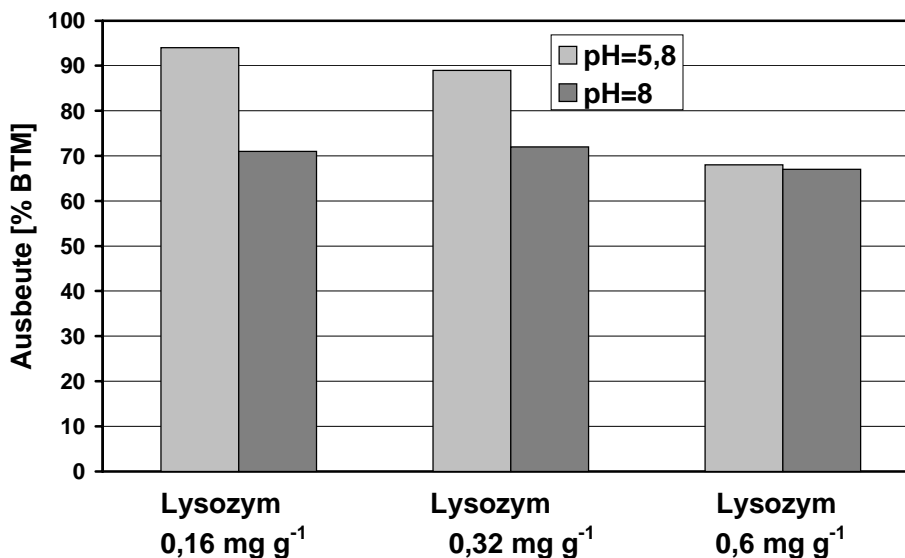


Abbildung 3.7-13: Lyseexperimente unter Zusatz von Lysozym.

Lysezeit 25 h, Temperaturprogramm: Start bei 30°C , Erhöhung 5 K h^{-1} . Nach Erreichen von 55°C wurde die Temperatur konstant gehalten.

Auch hier erwies sich ein pH-Wert größer 7,0 als am effektivsten. Die Zugabe von etwa 0,3 mg Lysozym pro g ZTM reicht aus, um Lysegrade von annähernd 90 % zu ermöglichen.

Der Zusatz von alkalischer Protease (Alcalase von Novo; $2,4 \text{ U mL}^{-1}$) zum Retentat ergab keine weitere Steigerung der Lysegrade im Vergleich zur Autolyse, jedoch erhöhte sich die Lysegeschwindigkeit. Die Abhängigkeit der Lysegeschwindigkeit sowie des Lysegrades von der Lyseart sowie der Enzymkonzentration zeigt Abbildung 3.7-14.

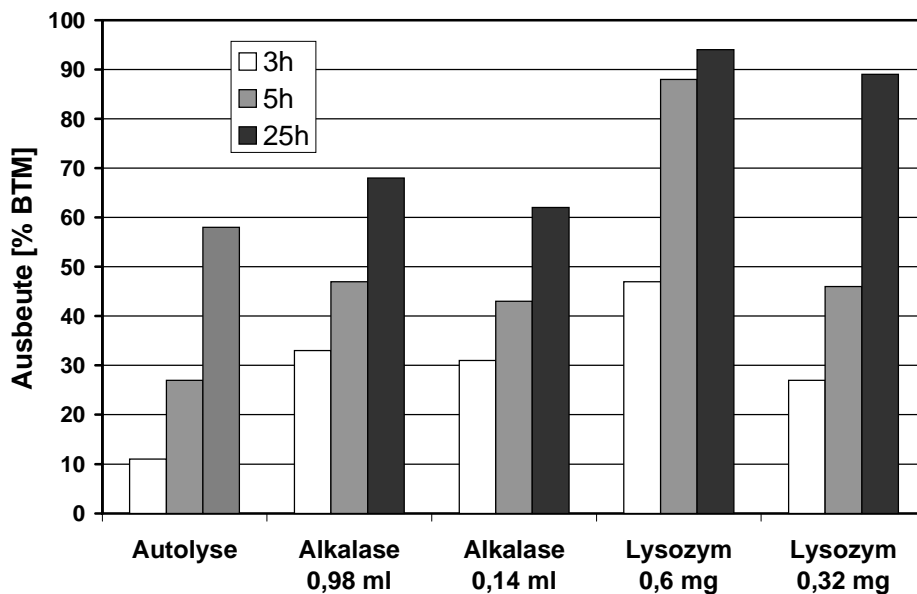


Abbildung 3.7-14: Abhängigkeit der Lysegeschwindigkeit sowie des Lysegrades von der Lyseart sowie der Enzymkonzentration

pH=8,0, Temperaturprogramm: Start bei 30°C , Erhöhung 5 K h^{-1} . Nach Erreichen von 55°C wurde die Temperatur konstant gehalten.

Durch den Einsatz von Lysozym kann der Lysegrad deutlich gesteigert werden. Ein weiterer Experiment mit $1,42 \text{ mg}$ Lysozym pro Gramm BTM führte zu einer Extraktausbeute von 97 %. Fast die gesamte Biomasse war in Extrakt umgewandelt worden. Die hohe Enzymmenge macht dieses Verfahren ökonomisch nicht sinnvoll. Wenn es jedoch gelänge Lysozym billig im technischen Maßstab herzustellen, könnte Biomasse von *B. licheniformis* und wahrscheinlich auch anderer *Bacilli* in wertvolle Nebenprodukte überführt und erhebliche Kosten bei der sonst notwendigen Entsorgung gespart werden.

Zur Überprüfung der Eignung der *B. licheniformis*-Extrakte als Bestandteile für Kultivierungsmedien wurden die zentrifugierten und gefriergetrockneten Extrakte als Medienkomponenten bei Wachstumsversuchen mit verschiedenen Organismen den Medien zugegeben. Verglichen wurden Wachstum auf LB-Medium, sowie Wachstum auf LB-Medium, wobei das Hefeextrakt (HE) bzw. das Caseinpepton (CP) mengenmäßig

durch *B. licheniformis*-Extrakt ersetzt worden war. Die Anzucht erfolgte jeweils in 0,5 L Schüttelkolben bei 37°C und 180 U min⁻¹. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.7-15 bis 3.7-18 dargestellt. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 3.7-3 zusammengefaßt.

Tabelle 3.7-3 Zusammensetzung der Medien für Wachstumsversuche mit *B. licheniformis*-Extrakt [gL⁻¹]

Medium	NaCl	Hefeextrakt	Caseinpepton	<i>B. licheniformis</i> -Extrakt*
LB	10	5	10	0
HE ersetzt	10	0	10	5
CP ersetzt	10	5	0	10

*Autolysat mit Alcalase

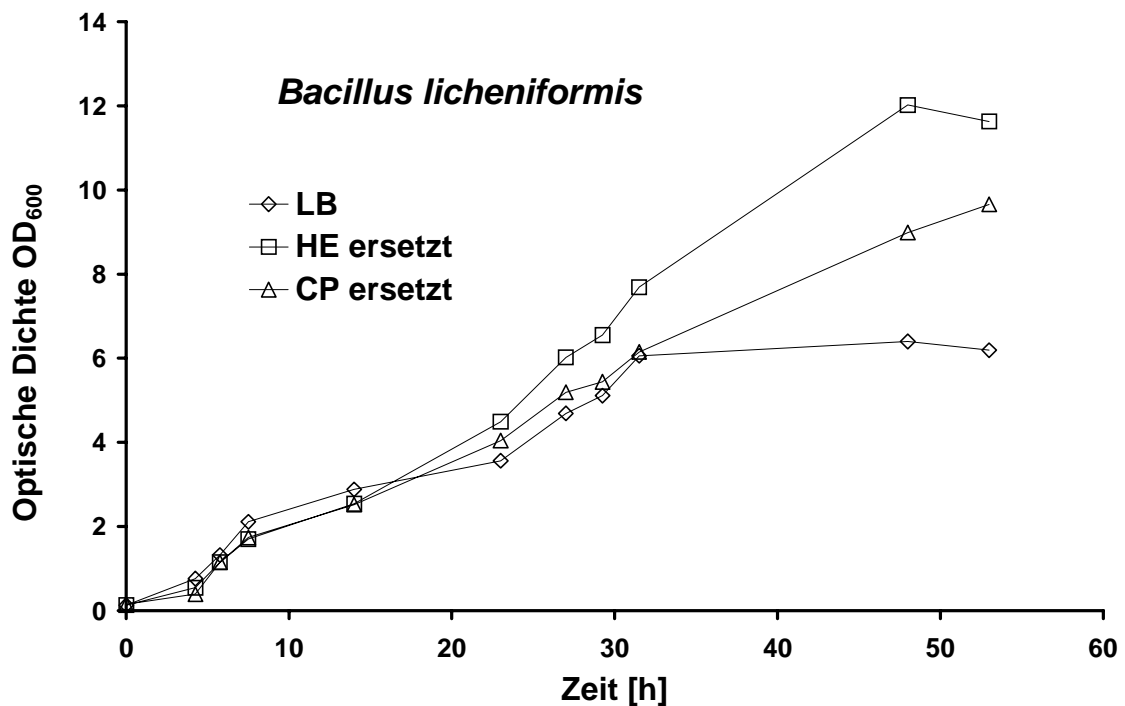


Abbildung 3.7-15: Wachstum von *Bacillus licheniformis* in Medien mit und ohne Extrakte aus *B. licheniformis*-Biomasse

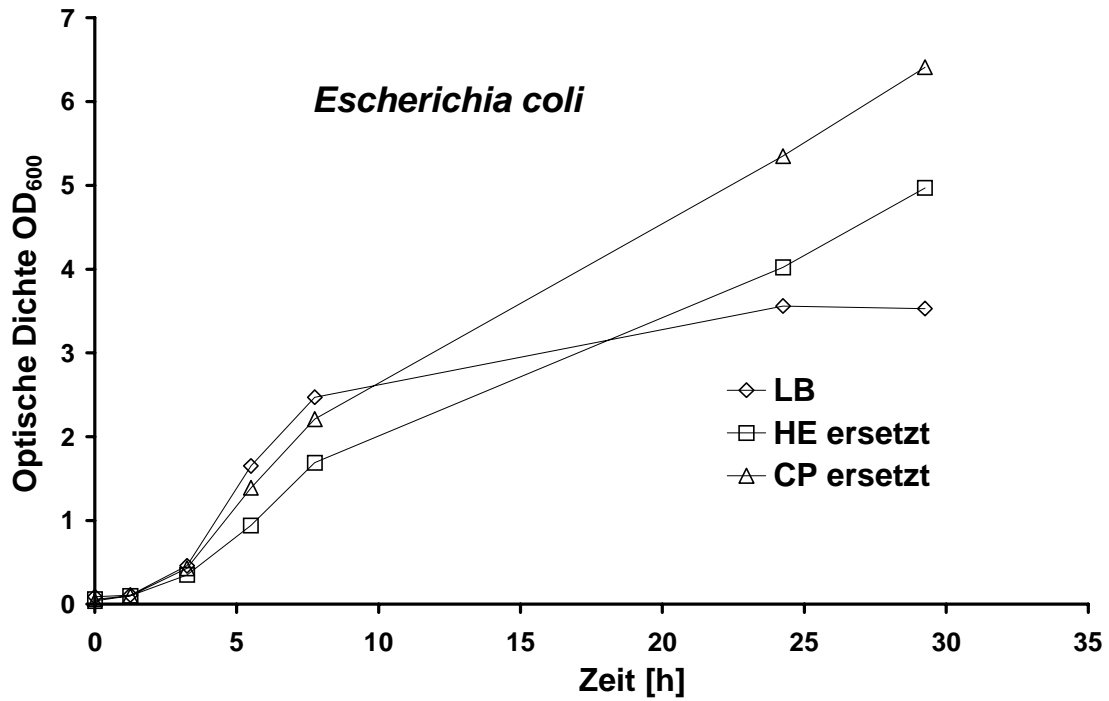


Abbildung 3.7-16: Wachstum von *Escherichia coli* in Medien mit und ohne Extrakte aus *B. licheniformis*-Biomasse

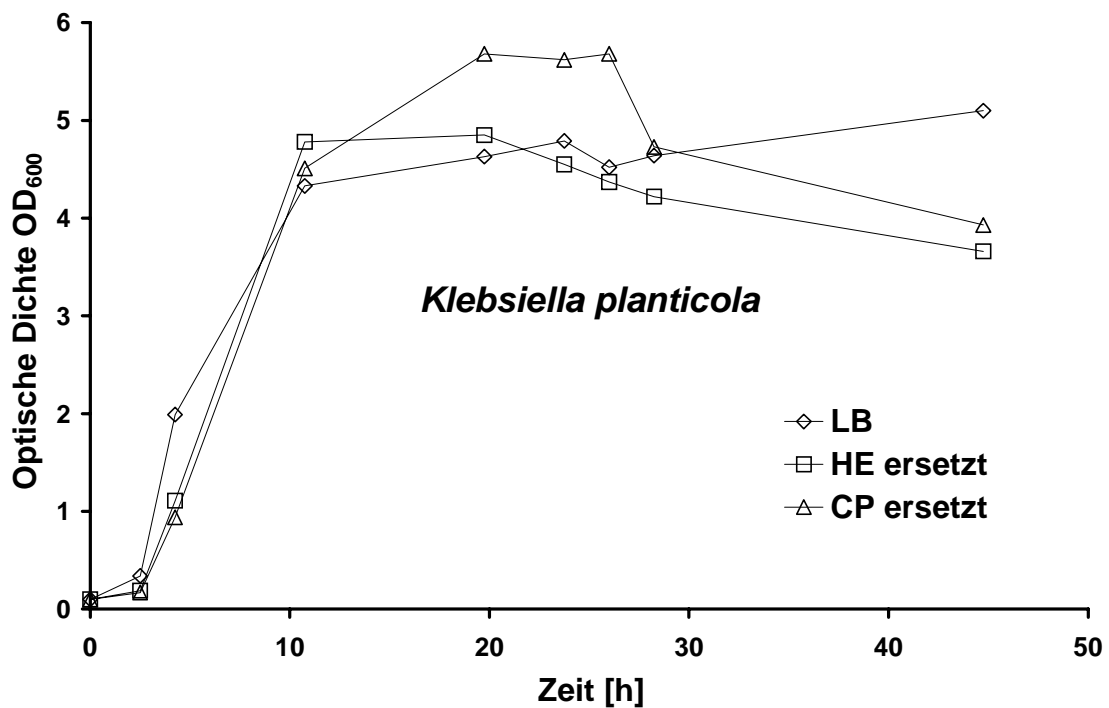


Abbildung 3.7-17: Wachstum von *Klebsiella planticola* in Medien mit und ohne Extrakte aus *B. licheniformis*-Biomasse

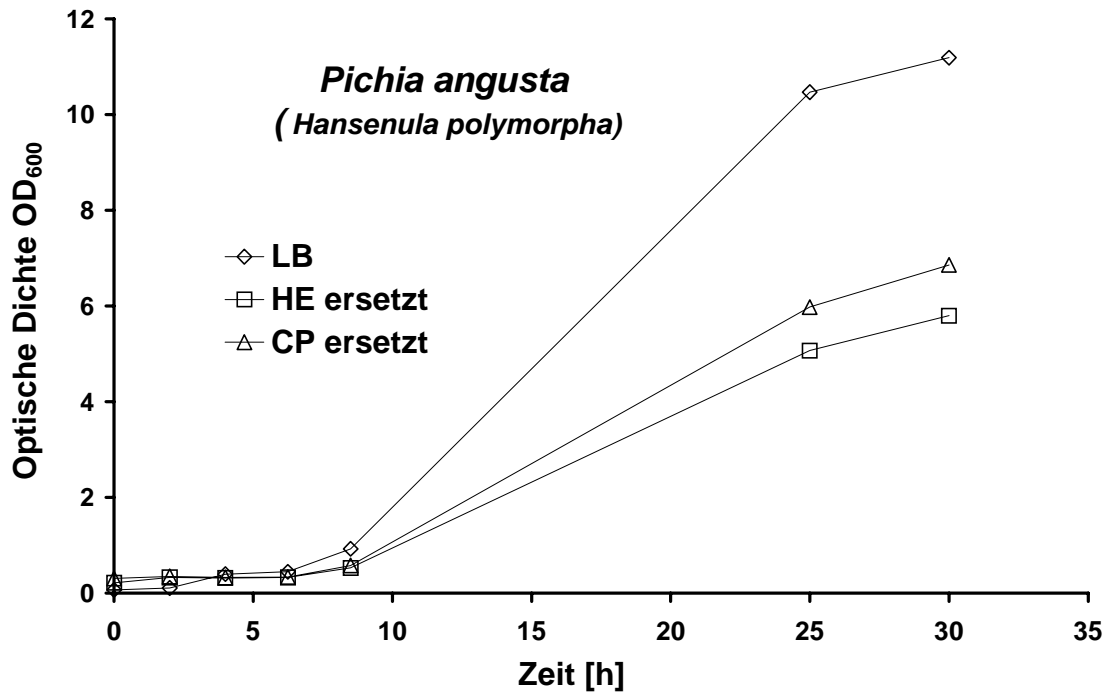


Abbildung 3.7-18: Wachstum von *Pichia angusta* in Medien mit und ohne Extrakte aus *B. licheniformis*-Biomasse

Das Wachstum von *Bacillus licheniformis* auf den verschiedenen Medien zeigte, daß sich das *Bacillus*-Extrakt als komplexe Nahrungsquelle gut eignet. Für *E. coli*, *Klebsiella* und der Hefe *Pichia* konnten ähnliche Wachstumsverläufe beobachtet werden, wobei Hefe auf dem Original-LB-Medium und *Klebsiella* und *E. coli* auf dem LB-Medium, bei dem Casein ersetzt worden war, die höchsten optischen Dichten und Zelltrockenmassen erreicht.

Es konnte gezeigt werden, daß Biomasse von *E. coli* und *Bacillus licheniformis* durch einfache technische Verfahren mehr oder weniger in Extrakte umgewandelt werden kann. Diese Extrakte können als Mediumbestandteile für die Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen eingesetzt werden. Dabei zeigen die Extrakte ähnliche Wirkungen wie das herkömmliche Hefeextrakt. Teilweise fördern sie das Wachstum stärker als Hefeextrakt.

4 Schlußbetrachtung

Rekombinante Produkte werden immer größere Bedeutung erlangen und somit auch die Verfahren, mit denen sie hergestellt werden. Die Vielfalt der Produkte wird in Zukunft weiter zunehmen. Die Auswahl eines geeigneten Produktionssystems, wird dabei eine besonders wichtige Rolle spielen. Einige Überlegungen sollen am Beispiel rekombinanter Proteine dargestellt werden.

Die grundlegende Tatsache, die bei der Produktion von rekombinanten Proteinen berücksichtigt werden muß, ist die, daß es kein universelles Expressionssystem gibt und das für jedes Protein das Expressionssystem und das gesamte Verfahren individuell entwickelt und optimiert werden muß. Es wird immer Überraschungen geben, wie z.B. das ein kleiner Fusionspartner am C-Terminus Änderungen in der Funktion der Signalsequenz am N-Terminus auslösen kann [LEDENT *et al.*, 1997], ein doch unerwartetes Ereignis. Trotzdem gibt es ein paar Regeln, die für die Auswahl des Expressionssystems gelten.

Die erste Entscheidung, die getroffen werden muß, ist die der Art des Organismus, der als Expressionssystem eingesetzt werden soll. Das hängt direkt vom Zielprotein ab. Muß das Zielprotein für seine biologische Aktivität komplex glykosiliert werden, so bleibt als Wahl nur die Zellkultur, bevorzugterweise von Säugierzellen. Soll das Protein möglichst preiswert in großen Mengen hergestellt werden, so würde ein rasch wachsender Organismus, möglichst mit Sekretionseigenschaften, den Anforderungen eher genügen. Einen Vergleich relevanter Eigenschaften verschiedener Expressionssysteme die in der Fermentations- und Zellkulturtechnik eingesetzt werden, zeigt Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Vergleich von Expressionssystemen

	<i>E. coli</i>	GRAM neg.	GRAM pos.	Hefen	Pilze	Zellkultur
t_d [h] (Verdopplungszeit)	0,3	0,3-1	0,3-1	1-2	2-12	>24
Gentechnik	sehr gut	verschieden	verschieden	gut	mäßig	gut - mäßig
Anzucht	sehr einfach	(sehr) einfach	(sehr) einfach	sehr einfach	einfach	aufwendig
Medien	preiswert	preiswert	preiswert	preiswert	preiswert	teuer
Expression	hoch	hoch	(hoch)	mittel	mittel	niedrig
Sekretion	nein	nein	ja	ja	ja	ja
Glykosilierung	nein	nein	nein	(nein)	(nein)	ja

t_d [h]: Mit der Verdopplungszeit t_d läßt sich abschätzen, wie lange es braucht, um die für eine akzeptable Produktivität erforderliche Biomasse zu produzieren. *E. coli* ist ein sehr schnell wachsender Organismus, so auch viele andere Bakterien. Hefen und Pilze brauchen bereits deutlich mehr Zeit und Zellkulturen haben eine lange Verdopplungszeit.

Gentechnik: Für die Optimierung von Expressionssystemen mittels Gentechnik ist es unerlässlich, daß die notwendigen Werkzeuge für den speziellen Organismus zur Verfügung stehen und daß der Organismus genetisch gut bekannt ist. Für *E. coli*, als eines der „Haustiere“ der Molekularbiologie, sind hervorragende gentechnische Werkzeuge nutzbar, und er ist genetisch von allen Organismen am besten erforscht. Bei anderen Bakterien ist dies sehr unterschiedlich. Bei Eukaryonten sind zwar gute Werkzeuge entwickelt worden, die Genetik ist jedoch komplizierter und Erfolge sind mehr vom Zufall abhängig.

Anzucht: Seit vielen Jahrzehnten werden Mikroorganismen angezüchtet und für einige dieser Organismen stehen bestens entwickelte Anzuchtverfahren zur Verfügung. *E. coli* läßt sich sehr einfach zu hohen Zelldichten anzüchten. Bei anderen Bakterien ist dies verschieden. Für *Bacillus* stehen z.B. ebenfalls sehr gute Verfahren zur Verfügung. Das gleiche gilt für Hefen und für einige Pilze. Auch Zellkulturen können mittlerweile zufriedenstellend angezüchtet werden, doch sind

diese Verfahren auf Grund der Scherstreßempfindlichkeit der Zellen und der Kontaminationsgefahr durch die lange Verdopplungszeit, erheblich aufwendiger.

Medien: Für alle Mikroorganismen können Verfahren mit mehr oder minder preiswerten Anzuchtmedien eingesetzt werden. Dennoch kann der Preis des Mediums entscheiden ob ein Verfahren realisiert wird oder nicht. Dies gilt besonders für Produkte, die in großen Mengen bei kleinen Verkaufserlösen hergestellt werden. Medien für Zellkulturen benötigen zum Teil sehr teure Bestandteile. Da aber der erzielbare Preis der Produkte sehr hoch ist, fallen die Medienkosten nicht so sehr ins Gewicht.

Expression: Die Expression eines rekombinanten Proteins ist natürlich sehr stark vom individuellen Protein abhängig. *Escherichia coli* gehört zu den Überexpressionssystemen, d.h. die Bakterien zeichnen sich durch eine sehr gute Expression aus. Überraschend war, daß bei einigen GRAM⁺-Bakterien die Expression an rekombinanten Proteinen deutlich geringer ausfiel, als auf Grund der Kapazitäten der Proteinbiosynthese zu erwarten war. Ähnliches gilt für Hefen und Pilze. Die Expression rekombinanter Proteine ist bei Zellkulturen im allgemeinen gering.

Sekretion: Die Sekretion spielt die entscheidende Rolle bei den Wahlmöglichkeiten der Aufarbeitungsverfahren. Sekretierte Proteine sind prinzipiell einfacher und damit meist kostengünstiger zu reinigen, als intrazelluläre Proteine. Waschmittelenzyme gibt es deshalb auf dem Markt, weil es Mikroorganismen gibt, die diese Enzyme in das Medium ausscheiden. Würden die Enzyme intrazellulär anfallen, wären Waschmittelenzyme bedeutend teurer und wahrscheinlich unrentabel. Es gibt zur Zeit kein wirklich mit der fermentativen Enzymproduktion vergleichbares Sekretionssystem für rekombinante Proteine höherer Eukaryonten.

Glykosilierung: Muß das rekombinante Protein für seine biologische Wirksamkeit (oder für die Zulassung durch die Behörden) komplex glykosiliert sein, bleibt nur die Durchführung von Zellkulturen. Hefen glykosilieren nur nach dem Mannose-Typ und Pilze glykosilieren nach anderen Mustern als Säugetiere.

Fällt die Entscheidung für ein Expressionssystem auf *Escherichia coli* so gibt es weitere wichtige Überlegungen:

Stamm: Für die Produktion von rekombinanten Proteinen sollte ein robuster Stamm gewählt werden, der für Hochzellichtefermentationen geeignet ist. Er sollte genetisch strukturell stabil sein, nur geringe Proteolyse aufweisen und wenn möglich, sekretionsfähig sein.

Vektor: Der Vektor sollte klein und segregativ stabil sein. Er sollte über eine optimale Kopienzahl verfügen und einen starken, aber genau kontrollierbaren Promotor für die Expression aufweisen.

Aufarbeitung: Für die Aufarbeitung sollte das System den Transport des rekombinanten Proteins in das Periplasma oder seine Sekretion in das Medium ermöglichen. Das Protein sollte mit einem Fusionspartner ausgestattet werden können, der eine rasche, selektive und preiswerte Reinigung erlaubt und der einfach abzuspalten ist.

In Zukunft wird die Zahl der rekombinanten Produkte weiter zunehmen. Gerichtete Evolution wird die Zeit für die Entwicklung neuer Enzyme enorm verkürzen [KUCHNER & ARNOLD, 1997]. Mit den neuen Methoden der kombinatorischen Biochemie und Molekularbiologie, zusammen mit den modernen Verfahren des *High-Throughput-Screening*, sowie der Proteom-Forschung [HOHEISEL, 1997], werden völlig neue Leitstrukturen für Wirkstoffe und Werkstoffe gefunden werden [VAN HIJFTE *et al.*, 1999].

Die Produktionsverfahren werden weiter entwickelt werden und die klassischen Ingenieursdisziplinen werden ihre Beiträge zu Optimierungen leisten. Durch *Metabolic Engineering* wird es möglich sein, den Produzenten an optimierte Verfahren anzupassen [BAILEY, 1995].

Die Methoden der Aufarbeitung werden besonders durch entsprechende Fusionspartner und Liganden-Matrix-Systeme so verbessert werden, daß rekombinante Produkte, die bisher auf Grund der Reinigungskosten nicht produziert wurden, die Schwelle zur Rentabilität überschreiten werden.

Große Umwälzungen wird es auf dem Gebiet der Produzenten geben. Einerseits werden etablierte Expressionssysteme, weiter optimiert werden, auch wenn *Escherichia coli* in

baldiger Zukunft nicht korrekt glykosilieren werden kann. Andererseits werden neue Expressionssysteme immer stärker zur Anwendung kommen, die als Spezialisten eingesetzt werden, wie etwa *Dictyostelium discoideum*. So gibt es z.B. auf dem Gebiet der transgenen Pflanzen neue Entwicklungen, die es ermöglichen, die hervorragenden Sekretionseigenschaften von Wurzeln in verfahrenstechnisch akzeptablen Prozessen zu nutzen [RASKIN, 1999]. Rekombinante Proteine aus der Milch von transgenen Säugetieren stehen kurz vor der Markteinführung. Eine der führenden Firmen, *PPL Therapeutics* (Schottland), wird voraussichtlich im Jahr 2001 α -1-Antitrypsin auf den Markt bringen. In den darauf folgenden Jahren ist die Einführung weiterer Proteine vorgesehen: Fibrinogen (2002), Faktor IX zur Hämophilietherapie (2003), Calcitonin (2003) und BSSL (*Bile Salt Stimulated Lipase*, 2004) [Fox, 1999]. Plasmide für die Gentherapie und die genetische Impfung, werden an Bedeutung zunehmen.

Was immer die Zukunft bringt, sie bleibt spannend.

5 Literaturverzeichnis

- Acebo P., Alda M.T., Espinosa M., Del Solar G. (1996) Isolation and characterization of pLS1 plasmid mutants with increased copy numbers. *FEMS Microbiol. Lett.* 140 85-91.
- Alam J., Cook J.L. (1990) Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188 245-254.
- Altenbuchner J. (1993) A new λ -RES vector with a built-in Tn1721-encoded excision system. *Gene* 123 63-68.
- Amann E., Brosius J. (1988) ATG vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 40 183-190.
- Amann E., Brosius J., Ptashne M. (1983) Vectors bearing a hybrid *trc-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25 167-178.
- Ames G.F.-L., Prody C., Kustu S. (1994) Simple, rapid and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 160 1181-1183.
- Anders J.C., Herman W.E., Lindler L.E. (1991) Heat shock sigma factor mutation results in the increased production of recombinant proteins in *Escherichia coli* hosts. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 91 Meet. 258.
- Anderson W.F. (1998) Human gene therapy. *Nature* 392 25-30.
- Andre S., Seed B., Eberle J., Schraut W., Bültmann A., Haas J. (1998) Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virology* 72 1497-1503.
- Andrews C.A., Lesley S.A. (1998) Selection strategy for site-directed mutagenesis based on altered β -lactamase specificity. *BioTechniques* 24 972-980.
- Angelov I., Ivanov I. (1989) Amplification of bacterial plasmids without blocking protein biosynthesis. *Plasmid* 22 160-162.
- Anwar A., Saleemuddin M. (1998) Alkaline proteases: A review. *Bioresource Technol.* 64 175-183.
- Aono, R. (1991) Envelope alterations of *Escherichia coli* HB101 carrying pEAP31 caused by Kil peptide and its involvement in the extracellular release of periplasmic penicillinase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biochem. J.* 275 545-553.
- Apostolakos M.J., Schuermann W.H.T., Frampton M.W., Utell M.J., Willey J.C. (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 213 277-284.
- Argyropoulos D., Savva D. (1997) A fast fluorescence method for accurate determination of plasmid copy number in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Tech.* 11 605-609.

- Ariga O., Watari T., Andoh Y., Fujishita Y., Sano Y. (1989) Release of thermophilic alpha amylase from transformed *Escherichia coli* by addition of glycine. *J. Ferment. Biotechnol.* 68 243-246.
- Arnold F.H (1998) Enzyme engineering reaches the boiling point. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 2035-2036.
- Attal J., Puissant C., Houdebine L.M. (1990) An improvement of a rapid method using QIAGEN columns to purify plasmids. *BioTechniques* 8 269-271.
- Attanasio M., Bellinello R., Chinali G. (1991) Temperature-modulated expression vectors in *E. coli* carrying mutant *rrnB* T1 transcription terminators. *Ital. J. Biochem.* 40 47A-48A.
- Austin S. J., Eichorn B.G. (1992) Random diffusion can account for *topA*-dependent suppression of partition defects in low-copy-number plasmids. *J. Bacteriol.* 174 5190-5195.
- Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococcal* types. *J. Exp. Med.* 79 137-158.
- Bachmair A., Finley D., Varshavsky A. (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234 179-186.
- Bachvarov D., Jay E., Ivanov I. (1990) Construction of a ColE1 plasmid bearing inducible high-copy-number phenotype. *Folia Microbiol.* 35 177-182.
- Bailey J.E. (1995) Chemical engineering of cellular processes. *Chem. Eng. Sci.* 50 4091-4108.
- Balbas P., Alvarado X., Bivar F., Valle F. (1993) Plasmid pBRINT: A vector for chromosomal insertion of cloned DNA. *Gene* 136 211-213.
- Balbas P., Bolivar F. (1990) Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 185 14-37.
- Baneyx F., Ayling A., Palumbo T., Thomas D., Georgiou G. (1991) Optimization of growth conditions for the production of proteolytically – sensitive proteins in the periplasmic space of *Escherichia coli* . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 14-20.
- Baneyx F., Georgiou G. (1990) *In vivo* degradation of secreted fusion proteins by the *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT. *J. Bacteriol.* 172 491-494.
- Barbotin J.N. (1994) Immobilization of recombinant bacteria. A strategy to improve plasmid stability. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 721 303-309.
- Bar-Peled M., Raikhel N.V. (1997) An efficient method for cloning in-frame fusion protein gene. *Anal. Biochem.* 250 262-264.
- Basu T., Poddar R.K. (1997) Overexpression of inducible proteins in *Escherichia coli* by treatment with ethanol. *Biochem. Mol. Biot. Int.* 41 1093-1100.
- Baty D., Lloubés R., Geli V., Lazdunski C., Howard S.P. (1987) Extracellular release of colicin is non specific. *EMBO J.* 6 2463-2468.

- Beacham I.R. (1979) Periplasmic enzymes in GRAM-negative bacteria. *Int. J. Biochem.* 10 877-883.
- Bell A., Cole J., Busby S. (1990a) Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose acetate and salts. *Biotechnol. Bioeng.* 36 1-11.
- Bell A., Cole J., Busby S. (1990b) Molecular genetic analysis of a FNR-dependent anaerobically inducible *Escherichia coli* promoter. *Mol. Microbiol.* 4 1753-1763.
- Bellani M., Nudel C., Rivas C.S. (1997) Site-specific recombination system from Tn1000 (γ - Δ) stabilizes recombinant plasmids in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 19 331-333.
- Ben-Bassat A., Bauer K., Chang S.-Y., Myambo K., Bossman A., Chang S. (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: Properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. Bacteriol.* 169 751-757.
- Ben-Israel O., Ben-Israel H., Ulitzur S. (1998) Identification and quantification of toxic chemicals by use of *Escherichia coli* carrying lux genes fused to stress promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 4346-4352.
- Bentley W.E., Kompala D.S. (1989) A novel structured kinetic modeling approach for the analysis of plasmid instability in recombinant bacterial cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 33 49-61.
- Berg B.L., Stewart V. (1990) Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 125 691-702.
- Bergès H., Joseph-Liauzun E., Fayet O. (1996) Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 55-60.
- Berggren K., Veide A., Nygren P.A., Tjerneld F. (1999) Genetic engineering of protein-peptide fusions for control of proteins partitioning in thermoseparating aqueous two-phase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 62 135-144.
- Berlyn M.K.B., Low B., Rudd K.E. (1996) Linkage map of *Escherichia coli* K-12 edition 9. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Berthold W., Walter J. (1994) Protein purification: Aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals* 22 135-150.
- Betenbaugh M.J., di Pasquantonio V.M., Dhurjati P. (1987) Growth kinetics of *Escherichia coli* containing temperature-sensitive plasmid pOU140. *Biotechnol. Bioeng.* 29 1164-1172.
- Bhattacharay S.K., Dubey, A.K. (1995) Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpression target gene. *Biotechnol. Lett.* 17 1155-1160.
- Bhattacharya P., Roy D. (1995) Estimating segregational plasmid instability in recombinant cell cultures: A generalized approach. *J. Ferment. Bioeng.* 80 520-521.

-
- Bingham R.J., Hall K.S., Slonczewski J.L. (1990) Alkine induction of a novel gene locus, *alx*, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172 2184-2186.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 1513-1523.
- Blackwell, J.R., Horgan R. (1991) A novel strategy for the production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295 10-12.
- Blanchin-Roland S., Masson J.M. (1989) Protein secretion controlled by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 2 473-480.
- Blight M.A., Chervaux C., Holland I.B. (1994) Protein secretion pathways in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5 468-474.
- Blight M.A., Holland I.B. (1994) Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends Biotechnol.* 12 450-455.
- Blondel A., Bedouelle, H. (1990) Export and purification of a cytoplasmic dimeric protein by fusion to the maltose-binding protein of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 193 325-330.
- Blum P., Kim J., Lin N., Jost J., Matin A. (1990) Use of carbon starvation promoters to express human growth hormone in post-exponential phase *E. coli*. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 90 Meet. 270.
- Blum P., Velligan M., Lin N., Matin A. (1992) DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Bio/Technology* 10 301-304.
- Boeck A., Mayer D., Schlenzog V., Candussio A. (1996) Protein expression system regulatable by acetate, pH or oxygen. *Patent EP 733704*.
- Bolivar F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. *Gene* 4 121-136.
- Boros I., Pósfai G., Venetianer P. (1984) High-copy-number derivatives of the plasmid cloning vector pBR322. *Gene* 30 257-260.
- Borris R., Olsen O., Thomsen K.K., Von Wettstein D. (1989) Hybrid *Bacillus* endo-(1-3 1-4)- β -Glucanase: Construction of recombinant genes and molecular properties of the gene product. *Carlsberg Res. Commun.* 54 41-54.
- Bothman H., Plückthun A. (1998) Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nature Biotechnol.* 16 376-380.
- Botterman J., Höfte H., Zabeau M. (1987) High-level expression of genes under control of *cro* translation initiation signals in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 6 71-81.
- Bowden G.A., Paredes A.M., Georgiou G. (1991) Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9 725-730.
- Braun P., Gerritse G., Dijn J.-M., Quax W.J. (1999) Improving protein secretion by engineering components of the bacterial translocation machinery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 376-381.
-

- Braun V., Pils H., Groß P. (1994) Colicins: Structures modes of action transfer through membranes and evolution. *Arch. Microbiol.* 161 199-206.
- Bravova G.B., Ivanova N.G., Shiskova E.A., Sukhikh O.A., Inshutina N.B., Fokina S.S., El-Registan G.I., Kozlova A.N. (1997) A method of obtaining clarified and autolyzed yeast extract. *Patent RU 2084171*.
- Brawerman G. (1990) Mechanisms of mRNA decay. *Trends Biotechnol.* 8 170-178.
- Breuer S., Marzban G., Cserjan-Puschman M., Durrschmid E., Bayer K. (1998) Off-line quantitative monitoring of plasmid copy number in bacterial fermentation by capillary electrophoresis *Electrophoresis* 19 2474-2478.
- Brey R.N., Fulginiti J.P., Anilionis A. (1995) Stable *purA* vectors and uses therefor. *US 5919663*.
- Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (1998) *Grüne Gentechnik*. Bonn.
- Burian J., Kay W.W. (1998) Replication genes and gene products from small cryptic plasmids and methods for constructing high-copy number plasmid vectors. *Patent WO 98/41636*.
- Burns D.L. (1999) Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 25-29.
- Butler J.M., McCord B.R., Jung J.M., Wilson M.R., Budowle B., Allen R.O. (1994) Quantitation of polymerase chain reaction products by capillary electrophoresis using laser fluorescence. *J. Chromat. B* 658 271-280.
- Carlsson J., Mosbach K., Bulow L. (Affinity precipitation and site-specific immobilization of proteins carrying polyhistidine tails. *Biotechnol. Bioeng.* 51 221-228.
- Carr K. (1994) Life after transcription. *Nature* 369 440-444.
- Carrier T.A., Jones K.L., Keasling J.D. (1998) mRNA stability and plasmid copy number effects on gene expression from an inducible promoter system. *Biotechnol. Bioeng.* 59 666-672.
- Carrier T.A., Keasling J.D. (1999) Library of synthetic 5' secondary structures to manipulate mRNA stability in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 15 58-64.
- Carroll W.L. (1993) Introduction to recombinant DNA technology. *Am. J. Clin. Nutr.* 58 Suppl. 249-258.
- Carter P., Nilsson B., Burnier J.P., Burdick D., Wells J.A. (1989) Engineering subtilisin BPN' for site-specific proteolysis. *Proteins* 6 240-248.
- Castanie M.P., Berges H., Oreglia J., Prere M.F., Fayet O. (1997) A set of pBR322-compatible plasmids allowing the testing of chaperone-assisted folding of proteins overexpressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 254 150-152.
- Cavard D. (1991) Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: Comparison with the colicin A lysis protein. *J. Bacteriol.* 173 191-196.
- Cavard D. (1992) Colicin A and colicin E1 lysis proteins differ in their dependence on *secA* and *secY* gene products. *FEBS Lett.* 298 84-88.

- Cavard D., Baty D., Howard S.P., Verhey H.M., Lazdunski C. (1987) Lipoprotein nature of the colicin A lysis protein: Effect of amino acid substitution at the site of modification and processing. *J. Bacteriol.* 169 2187-2194.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 802-805.
- Chan W.K.Y., Belfort G., Belfort M. (1988) Stability of group I intron RNA in *Escherichia coli* and its potential application in a novel expression vector. *Gene* 73 295-304.
- Chang C.T., Miller R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res.* 9 3580.
- Chang Y.-S., Shiuan D. (1997) Construction and characterization of a biotin-regulated gene expression system in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66 147-158.
- Chargaff E., Lipschitz R., Green C., Hodes M.E. (1951) The composition of the Deoxyribonucleic Acid of Salmon sperm. *J. Biol. Chem.* 192 223-230.
- Charles I.G., Makoff A.J., Oxer M.D., Peakman T.C., Cole J.A. (1992) Production of recombinant proteins. *Patent WO 92/15688*.
- Chawla M., DasGupta S.K. (1999) Transposition-induced structural instability of *Escherichia coli* – *mycobacteria* shuttle vectors. *Plasmid* 41 135-140.
- Cheah K.-C., Harrison S., King R., Crocker L., Wells J.R.E., Robins A. (1994) Secretion of eukaryotic growth hormones in *Escherichia coli* is influenced by the sequence of the mature proteins. *Gene* 138 9-15.
- Chen B.Y., Chang J.S. (1999) Economically feasible induction of the bacteriophage λ -Q-mutant in *Escherichia coli*. *Bioprocess. Eng.* 20 105-108.
- Cheng K.C., Loeb L.A. (1997) Genomic Stability and Instability: A working paradigm. in: Kastan B. (ed.) Genetic instability and tumorigenesis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 221 5-18.
- Chew L.C., Tacon W.C. (1990) Simultaneous regulation of plasmid replication and heterologous gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 13 47-60.
- China B., Goffaux F. (1999) Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Veterinary Res.* 30 181-202.
- Choi J.W., Lee S.Y. (1997) Enhanced expression of bovine growth hormone gene by different culture conditions in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 19 735-739.
- Chong S., Mersha F.B., Comb D.G., Scott M.E., Landry D., Vence L.M., Perler F.B., Benner J., Kucera R.B., Hirvonen C.A., Pelletier J.J., Paulus H., Xu M.Q. (1997) Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene* 192 271-281.
- Chou C.H., Aristidou A.A., Meng S.Y., Bennett G.N., San K.Y. (1995) Characterization of a pH-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 47 186-192.

- Chou C.P., Yu C.C., Tseng J.H., Lin M.I., Lin H.K. (1999) Genetic manipulation to identify limiting steps and develop strategies for high level expression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 63 263-272.
- Chou P.Y., Fasman G.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47 45-148.
- Christen H.R. (1970) *Grundlagen der organischen Chemie*. Verlag Sauerländer Aarau.
- Christie G. (1994) Gene expression system based on regulatory elements of bacteriophage P2 and satellite phage P4. *Patent US 5346830*.
- Claverie-Martin F., Diaz-Torres M.R., Yancey S.D., Kushner S.R. (1991) Analysis of the altered mRNA stability (*ams*) gene from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266 2843-2851.
- Claverie-Martin F., Magasanik B. (1991) Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 1631-1635.
- Clement J.M., Charbit A., Leclerc C., Martineau P., Muir S., O'Gallaghan D. (1992) Molecular and cellular targeting in the expression of foreign polypeptides in bacteria. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 61 143-152.
- Clewell L.C. (1972) Nature of ColE1-plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 110 667-676.
- Coburn G.A., Mackie G.A. (1999) Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: An old problem with some new twists. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62 55-108.
- Cohen S.N., Chang A.C.Y., Boyer H.W., Helling R.B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70 3240-3244.
- Compagno C., Tura A., Ranzi B.M., Alberghina L., Martegani E. (1993) Copy number modulation in an autoselection system for stable plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* 9 594-599.
- Coppella S.J., Acheson C.M., Dhurjati P. (1987) Measurement of copy number using HPLC. *Biotechnol. Bioeng.* 29 646-647.
- Corchero J.L., Villaverde A. (1998) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is traumatically, steadily, and especially influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58 625-632.
- Cordes C., Meima R., Twiest B., Kazemier B., Venema G., Van Dijk J.M. (1996) The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178 5235-5242.
- Cormack R.S., Somssich I.E. (1997) Ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction. *Elsevier Trends Journals Technical Tips Online Document S0168-9525(97)01210-9*.
- Coronado C., Vazquez M.E., Cebolla A., Palomares A.J. (1994) Use of firefly luciferase gene for plasmid copynumber determination. *Plasmid* 32 336-341.
- Courtney B.C., Williams K.C., Bing Q.A., Schlager J. (1995) Capillary gel electrophoresis

- as a method to determine ligation efficiency. *Anal. Biochem.* 228 281-286.
- Craig III S.P., Yuan L., Kintz D.A., McKerrow J.H., Wang C.C. (1991) High level expression in *Escherichia coli* of soluble, enzymatically active schistosomal hypoxanthine/guanine phosphoribosyl transferase and trypanosomal ornithine-decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 2500-2504.
- Craynest M., Mater D., Barbotin J.N., Truffaut N., Thomas D. (1996) Plasmid stability in immobilized *Bacillus subtilis* continuous cultures. *Prog. Biotechnol.* 11 452-457.
- Creighton T.E. (1992) Up the kinetic pathway. *Nature (Lond.)* 356 194-195.
- Creighton T.E., Darby N.J., Kemmink J. (1996) The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* 10 110-118.
- Cullis P.R., De Kruijff B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559 399-420.
- Dabora R.L., Cooney C.L. (1990) Intracellular Lytic Enzyme systems and their use for disruption of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 43 11-30.
- Dale G.E., Schönfeld H.J., Langen H., Stieger M. (1994) Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng.* 7 925-931.
- Danese P.N., Silhavy T.J. (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 32 59-94.
- Das A. (1990) Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: Vectors, hosts, and strategies. *Methods Enzymol.* 182 93-112.
- Davis M.A., Martin K.A., Austin S.J. (1992) Biochemical activities of the ParA partition protein of the P1 Plasmid. *Mol. Microbiol.* 6 1141-1147.
- Davis H.L., Michel M.L., Mancini M., Schleef M., Whalen R.G. (1994) Direct gene transfer in skeletal muscle: Plasmid-DNA based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 12 1503-1509.
- De Lencastre H., De Sanogueira I. (1998) L-arabinose-utilizing operon promoter. *Patent WO 98/11231*.
- De Smitt M.H., Van Duin J. (1990) Control of prokaryotic translation initiation by mRNA secondary structure. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38 1-35.
- Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C. (1988) A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16 9878.
- Deng T., Noel J.P., Tsai M.D. (1990) A novel expression vector high-level synthesis and secretion of foreign proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 93 229-234.
- Denhardt D.T., Colasanti J. (1987) A survey of vectors for regulating expression of cloned DNA in *E. coli*. in: Rodríguez R.L., Denhardt D.T. (Edts.) *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Butterworth Publishers Stoneham Boston.

- Dertzbugh M.T. (1998) Genetically engineered vaccines: An overview. *Plasmid* 39 100-113.
- Deuschle U., Kammerer W., Gentz R., Bujard H. (1986) Promoters of *Escherichia coli*: A hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures. *EMBO J.* 5 2987-2994.
- Diederich L., Rasmussen L.J., Messer W. (1992) New cloning vectors for integration into the λ attachment site *attB* of *Escherichia coli* chromosome *Plasmid* 28 14-24.
- Dikshit K.L., Webster D.A. (1988) Cloning characterization and expression of the bacterial globin gene from *Vitreoscilla* in *Escherichia coli*. *Gene* 70 377-386.
- Dikshit K.L., Dikshit R.P., Webster D.A. (1990) Study of *Vitreoscilla* globin (*vgb*) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucleic Acids Res.* 18 4149-4155.
- Dische Z. (1955) Color reactions of nucleic acid components. In: Chargaff E., Davidson J.N. (Edts.) *The Nucleic Acid (Vol. 1)* Academic Press New York.
- Dobeli H., Hochuli F. (1989) Metal chelate resins. *Patent US 4877830*.
- Donovan W.P., Kushner S.R. (1986) Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 120-124.
- Dooley H., Grant S.D., Harris W.J., Porter A.J. (1998) Stabilization of antibody fragments in adverse environments. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28 77-83.
- Dostal D.E., Rothblum K.N., Baker K. (1994) An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: Determination of renin and angiotensinogen mRNA levels in various tissues. *Anal. Biochem.* 223 239-250.
- Dunn A., Davidson A.M., Day M.J., Randerson P.F. (1995) An analysis of the instability kinetics of plasmid pHSG415 during continuous culture of *Escherichia coli*. *Microbiology* 141 63-70.
- Dunn I.S. (1996) Phage display of proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 547-553.
- Dykxhoorn D.M., St.Pierre R., Linn T. (1996) A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene* 177 133-136.
- Easter C.L., Sobecky P.A., Helinski D.R. (1997) Contribution of different segments of the *par* region to stable maintenance of the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 179 6472-6479.
- Easter C.L., Schwab H., Helinski D.R. (1998) Role of the *parCBA* operon of the broad-host-range plasmid RK2 in stable plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 180 6023-6030.
- Eberl L., Kristensen C.S., Givskov M., Grohmann E., Gerlitz M., Schwab H. (1994) Analysis of the multimer resolution system encoded by the *parCBA* operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol. Microbiol.* 12 131-141.
- Eckhardt T. (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid

- in bacteria. *Plasmid* 1 584-588.
- Edler C., Friehs K., Schügerl K. (1989) Cultivation strategies and product formation of bacteria with runaway-plasmid systems. *DECHEMA Biotechnol. Conf.* 3 A 549-552 VCH Weinheim.
- Ehrlich., S.D., Te Riele H., Petit M.A., Janniére L., Noirot P., Miechel B. (1986) DNA recombination in plasmids and the chromosome of *B. subtilis*. In: Ganesan A.J., Hoch J.A. (Edts.) *Bacillus molecular genetics and biotechnology applications*. Academic Press New York.
- Eldin P., Pauza M.E., Hieda Y., Lin G., Murtaugh M.P., Pentel P.R., Pennel C.A. (1997) High level secretion of two antibody single-chain Fv fragments by *Pichia pastoris*. *J. Immunol. Methods* 201 67-97.
- Elo P., Semy S., Kereszt A., Nagy T., Papp P., Orosz L. (1998) Integrative promoter cloning plasmid vectors for *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159 7-13.
- Elvin C.M., Thompson P.R., Argall M.E., Hendry P., Stamford N.P.J. (1990) Modified Bacteriophage-Lambda Promoter Vectors for Overproduction of Proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 87 123-126.
- Emory S.A., Bouvet P., Belasco J.G. (1992) A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 6 135-148.
- Enfors S.-O. (1992) Control of *in vivo* proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends Biotechnol.* 10 310-315.
- Engels J., Uhlmann E. (1988) Gene synthesis. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 37 73-127.
- Epstein J.L., Kozarich J.W., Bramhill D. (1997) Alternative to large acrylamide gels for DNA analysis. *BioTechniques* 22 226-229.
- Falconer R.J., O'Neill B.K., Middelberg A.P.J. (1997) Chemical treatment of *Escherichia coli*: 1. extraction of intracellular protein from uninduced cells. *Biotechnol. Bioeng.* 53 453-458.
- Fang F.C., Durland R.H., Helinski D.R. (1993) Mutations in the gene encoding the replication-initiation protein of plasmid RK2 produce elevated copy numbers of RK2 derivatives in *Escherichia coli* and distantly related bacteria. *Gene* 133 1-8.
- FDA (1998) Substances generally recognized as safe proposed rule. *Federal Register* 62 Nr. 74 18937-18964.
- Ferenci T., Lee K.S. (1991) Recovery of bacteria from growth media by starch-dependent floc formation. *Biotechnol. Bioeng.* 38 314-318.
- Ferreira G.N.M., Cabral J.M.S., Prazeres D.M.F. (1997) A comparison of gel filtration chromatographic supports for plasmid purification. *Biotechnol. Tech.* 11 417-420.
- Fidler S., Dennis D. (1992) Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 9 231-235.
- Figeys D., Arriaga E., Renborg A., Dovichi. N.J. (1994) Use of the fluorescence

- intercalating dyes POPO-3, YOYO-3 and YOYO-1 for ultrasensitive detection of double stranded DNA separated by capillary electrophoresis with hydroxypropylmethyl cellulose and non-cross linked polyacrylamide. *J. Chromat. A* 669 205-216.
- Filloux A., Michel G., Bally M. (1998) GSP-dependent protein secretion in GRAM-negative bacteria: The Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22 177-198.
- Fischer M. (1997) New DNA plasmids that encode superoxide-dismutase and include *deo* promoters. *Patent US 5593860*.
- Flaschel E., Friehs K. (1993) Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotechnol. Adv.* 11 31-77.
- Flaschel E., Poppenborg L., Neitzel R., Miksch G., Friehs K. (1998) Affinitätsverfahren zur Gewinnung rekombinanter Proteine. *BioTec* 5/6 26-29.
- Flores N., De Anda R., Guereca L., Cruz N., Antonio S., Balbas P., Bolivar F., Valle F. (1986) A new expression vector for the production of fused proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25 267-271.
- Fortineau N., Trieu-Cuot P., Poyart C., Gaillard J.L. (1997) Expression of the green fluorescent protein in various GRAM positive bacteria. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 97 Meet. 298.
- Fouchet P., Manin C., Richard H., Frelat G., Barbotin J.N. (1994) Flow cytometry studies of recombinant *Escherichia coli* in batch and continuous cultures: DNA and RNA contents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41 584-590.
- Fox S. (1999) PPL Therapeutics seeks funding for production facility. *Genet. Engin. News* 19 June 1 pp. 1, 14, 48.
- French C., Keshavarz-Moore E., Ward J.M. (1996) Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the *Escherichia coli* periplasm. *Enzyme Microbiol. Technol.* 19 332-338.
- French C., Ward J.M. (1996) Production and modification of *E. coli* transketolase for large-scale biocatalysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 799 11-18.
- Freudl R. (1992) Protein secretion in Gram-positive bacteria. *J. Biotechnol.* 23 231-240.
- Frey K. (1983) Stable cosmid vectors that enable the introduction of cloned fragments into a wide range of Gram-negative bacteria. *Gene* 24 299-308.
- Friehs K. (1991) Elektrophorese. in: Schügerl K. (Hrsg.) *Analysenmethoden in der Biotechnologie*. Vieweg Braunschweig.
- Friehs K., Bailey J.E. (1989) Unusual observations during construction of a new cloning vector providing *lon* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 9 305-316.
- Friehs K., Lafferty R.M. (1989) Cloning and expression of the levanase gene in *Alcaligenes eutrophus* H16 enables the strain to hydrolyze sucrose. *J. Biotechnol.* 10 285-292.

- Friehs K., Reardon K.F. (1993) Parameters influencing the productivity of recombinant *E. coli* cultivations. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 48 53-78.
- Friehs K., Schügerl K. (1990) Bioprocess engineering of genetically modified microorganisms. *DECHEMA Biotechnol. Conf.* 4 B 705-708 VCH Weinheim.
- Friehs K., Schörgendorfer K., Schwab H., Lafferty, R.M. (1986) Cloning and phenotypic expression in *Escherichia coli* of a *Bacillus subtilis* gene fragment coding for sucrose hydrolysis. *J. Biotechnol.* 3 333-341.
- Friehs K., Hartmann D., Stiegelmeier C., Schäffer T., Flaschel E. (1995) Prozeßtechnischer Vergleich der sauerstoffabhängigen Promotoren *nirB* und *vgb*. 13. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*. 30. Mai - 1. Juni 1995 Wiesbaden.
- Friehs K., Schierl F., Flaschel E. (1998a) Aufbereitung bakterieller Biomasse zwecks Rückführung als Mediumskomponente in Fermentationsprozessen. *Chem. Ing. Tech.* 70 435-437.
- Friehs K., Flaschel E., Risse J.M. (1998b) Verfahren zur Behandlung von Biomasse aus biologischen Prozessen und Verwertung der so entstandenen Produkte. *Patent DE 198 05 664 A 1*.
- Fujimori K., Fukuzono S., Kotomura N., Kuno N. (1992) Overproduction of biologically-active human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 1985-1990.
- Fürste J.P., Pansegrau W., Frank R., Böcker H., Scholz P., Bagdasarian M., Lanka E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* 48 119-131.
- Fussenegger M., Bailey J.E., Hauser H., Mueller P.P. (1999) Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells. *Trends Biotechnol.* 17 35-42.
- Galan J.E., Collmer A. (1999) Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284 1322-1328.
- Gao B., Flores S.C., Bose S.K., McCord J.M. (1996) A novel *Escherichia coli* vector for oxygen-inducible high level expression of foreign genes. *Gene* 176 269-272.
- Garner M.M., Chrambach A. (1992) Resolution of circular, nicked circular and linear DNA 4 kb in length by electrophoresis in polyacrylamide solutions. *Electrophoresis* 13 176-178.
- Gaudreau L.R., Le Gouill C., Dery C.V. (1992) Construction of a shuttle *lacZ*-alpha-based *Escherichia coli* – *actinomycetes* vector containing the phage JHJ-3 replicon. *Microbiol. Lett.* 99 257-260.
- Gennity J.M., Kim H., Inouye M. (1992) Structural determinants in addition to the amino-terminal sorting sequence influence membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *J. Bacteriol.* 174 2095-2101.
- Gentz R., Kuys Y., Zwieb C., Taatjes D., Taatjes H., Bannwart W., Stueber D., Ibrahimi I. (1988) Association and secretion of three chimeric polypeptides of degradation in

- Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170 2212-2220.
- Georgellis D., Arvidson S., Von Gabain A. (1992) Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J. Bacteriol.* 174 5382-5390.
- Georgiou G., Baneyx F. (1996) Bacterial host strains for producing proteolytically sensitive polypeptides. *Patent US 5508192*.
- Georgiou G., Valax P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 190-197.
- Georgiou G., Shuler M.L., Wilson D.B. (1988) Release of periplasmic enzymes and other physiological effects of β -Lactamase overproduction in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 32 741-748.
- Georgiou G., Stathopoulos C., Daugerthy P.S., Nayak A.R., Iverson B.L., Curtiss III R. (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnol.* 15 29-34.
- Gerdes K., Poulsen I.K., Thisted T., Nielsen A.K., Martinussen J., Andreasen P.H. (1990) The *hok* killer gene family in GRAM-negative bacteria. *New Biol.* 2 946-956.
- Gerdes K., Jacobsen J.S., Franch T. (1997) Plasmid stabilization by post-segregational killing. in: Setlow J.K., Hollaender A. (Edts.) *Genetic engineering: Principles and methods* 19 49-61.
- Gerlitz M., Hrabak O., Schwab H. (1990) Partitioning of broad-host-range plasmid RP4 is a complex system involving site-specific recombination. *J. Bacteriol.* 172 6194-6203.
- Gerritse G., Hommes R.W.J., Quax W.J. (1998) Development of a lipase fermentation process that uses a recombinant *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 2644-2451.
- Gilbert H.F. (1994) Protein chaperones and protein folding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5 534-539.
- Glennon B. (1997) Control system validation in multipurpose biopharmaceutical facilities. *J. Biotechnol.* 59 53-61.
- Glick B.R. (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol. Adv.* 13 247-261.
- Godfrey T. (1996) Protein modification in: Godfrey T, West S. (Edts.) *Industrial Enzymology 2nd ed.* Macmillan Press Ltd. London.
- Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose A., Kraszewski K., Itakura K., Riggs A.D. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76 106-110.
- Goetting C., Thierbach G., Pühler A., Kalinowski J. (1998) Versatile low-copy-number plasmids for temperature-inducible overexpression of bacterial genes in

- Escherichia coli*. *BioTechniques* 24 362-366.
- Goff S.A., Goldberg A.L. (1987) An increased content of protease La, the lon gene product, increases protein degradation and blocks growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262 4508-4515.
- Goldberg A.L. (1985) Role of ATP and protease La the lon gene product in protein breakdown in *Escherichia coli*. In: Leive L. (Edt.) *Microbiology* ASM Press Washington D.C.
- Goloubinoff P., Gatenby A.A., Lorimer G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 337 44-47.
- Good P.D., Engelke D.R. (1994) Yeast expression vectors using RNA-polymerase-III promoters. *Gene* 151 209-214.
- Goodman A.E., Hild E., Marshall K.C., Hermansson M. (1993) Conjugative plasmid transfer between bacteria under simulated marine oligotrophic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 1035-1040.
- Gottesman S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* 30 465-506.
- Gottesman S., Maurizi M.R. (1992) Regulation by proteolysis: Energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* 56 592-621.
- Gowrishankar J., Bhandari P., Rajkumari K. (1996) DNA expression systems inducible by osmolyte. *Patent EP792934*.
- Gräslund T., Nilsson J., Lindberg M., Uhlén M., Nygren P.-Å. (1997) Production of a thermostable DNA polymerase by site specific cleavage of a heat-eluted affinity fusion protein. *Protein Express. Purif.* 9 125-132.
- Green J., Guest R. (1993) Activation of FNR-dependent transcription by iron: An in vitro switch for FNR. *FEMS Microbiol. Lett.* 113 219-222.
- Greiner S., Krausgill S., Rausch T. (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. *PNT Physiol.* 116 733-738.
- Grohmann E., Stanzer T., Schwab H. (1997) The ParB protein encoded by the RP4 *par* region is a Ca²⁺-dependent nuclease linearizing circular DNA substrates. *Microbiology* 143 3889-3898.
- Guinn M.R. (1999) Aqueous two-phase metal affinity partitioning protein purification system. *Patent US 5907035*.
- Gumpert J., Cron H., Plapp R., Niersbach H., Hoischen C. (1996) Synthesis and secretion of recombinant penicillin G acylase in bacterial L-forms. *J. Basic Microbiol.* 36 89-98.
- Gumpert J., Hoischen C. (1998) Use of cell wall-less bacteria (L-forms) for efficient expression and secretion of heterologous gene products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 506-509.

- Gupta R., Sharma P., Vyas V.V. (1995) Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid pCPPS-31 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 41 29-37.
- Gupta J.C., Jaisani M., Pandey G., Kukherjee K.J. (1999) Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λP_L promoter. *J. Biotechnol.* 68 125-134.
- Guttman A., Cooke N. (1991) Capillary gel affinity electrophoresis of DNA fragments. *Anal. Chem.* 63 2038-2042.
- Habazettl J., Gondol D., Wiltschek R., Otlewski J., Schleicher M., Holak T.A. (1992) The structure of hisactophilin is similar to interleukin-1 beta and fibroblast growth factor. *Nature* 359 855-859.
- Hakes D.J., Dixon J.E. (1992) New vectors for high level expression of recombinant proteins in bacteria. *Anal. Biochem.* 202 293-298.
- Hakkaart M.J.J. (1983) *The bacteriocinogenic plasmid CloDF13: Molecular mechanism involved in plasmid maintenance*. Thesis University Amsterdam.
- Halfmann G., Brailly H., Bernadac A., Montero-Julian F.A., Lazdunski C., Baty D. (1993) Targeting of interleukin-2 to the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 139 2465-2473.
- Hall M.N., Gabay j., Schwartz M. (1983) Evidence for a coupling of synthesis and export of an outer membrane protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2 15-19.
- Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G.J., Rosquin I.J., Denys P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefebvre M.P., Dunwell J.M., Van Tunen A., Krens F.A. (1996) A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnol.* 14 1133-1138.
- Ham J.H., Bauer D.W., Fouts D.E., Collmer A. (1998) A cloned *Erwinia chrysanthemi* Hrp (type III protein secretion) system functions in *Escherichia coli* to deliver *Pseudomonas syringae* Avr signals to plant cells and to secrete Avr proteins in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 10206-10211.
- Hammond R.W., Oana H., Schweinfus J.J., Bonadio J., Levy R. J., Morris M.D. (1997) Capillary electrophoresis of supercoiled and linear DNA in dilute hydroxyethyl cellulose solution. *Anal. Chem.* 69 1192-1196.
- Han S.J., Chang H.N., Lee J. (1998) Fed-batch cultivation of an oxygen-dependent inducible promoter system, the *nar* promoter in *E. coli* with an inactivated *nar* operon. *Biotechnol. Bioeng.* 59 400-406.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 557-580.
- Hannig G., Makrides S.C. (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 16 54-60.
- Hansson M., Stahl S., Hjorth R., Uhlén M., Moks T. (1994) Single-step recovery of a secreted recombinant protein by expanded bed adsorption. *Bio/Technology* 12 285-288.

- Hartmann D. (1994) *Entwicklung eines Modellsystems zur prozeßtechnischen Untersuchung und Optimierung der Induktion eines über den Sauerstoffpartialdruck regulierten Promotors*. Diplomarbeit Universität Bielefeld.
- Hassett D.E., Whitton J.L. (1996) DNA immunization. *Trends Microbiol.* 4 307-312.
- Hayes F., Austin S. (1994) Topological scanning of the P1 plasmid partition site. *J. Mol. Biol.* 243 190-198.
- Healey B.G., Matson R.S., Walt D.R. (1997) Fiber optic DNA sensor array capable of detecting point mutations. *Anal. Biochem.* 251 270-279.
- Hebenbrock K., Maschke H.-E., Schügerl K., Friehs K. (1991) Plasmidanalytik mittels Kapillarelektrophorese. *BioTec* 4 35-37.
- Hebenbrock K., Williams P.M., Karger B.L. (1995) Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 16 1429-1436.
- Hekman W.E., Dennis D.T., Miernyk J.A. (1990) Secretion of *Ricinus communis* glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase by *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 4 1363-1369.
- Hellebust H., Bergseth S., Orning L. (1998) Expression of the second epidermal growth factor-like domain of human Factor-VII in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 66 203-210.
- Hellmuth K., Korz D.J., Sanders E.A., Deckwer W.D. (1994) Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. *J. Biotechnol.* 32 289-298.
- Hénaut A., Danchin A. (1996) Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Hengen P.N. (1996) Preparing ultra-competent *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* 21 75-76.
- Henry K.L., Davis R.H., Taylor A.L. (1990) Continuous recombinant bacterial fermentations utilizing selective flocculation and recycle. *Biotechnol. Prod.* 6 7-12.
- Hensing M.C.M., Rouwenhorst R.J., Heijnen J.J., Van Dijken J.P., Pronk J.T. (1995) Physiological and technological aspects for large-scale heterologous-protein production with yeast. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 67 261-279.
- Herbst B., Kneip S., Bremer E. (1994) pOSEX: Vectors for osmotically controlled and finely tuned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 151 137-142.
- Hildeman D.A., Muller D. (1997) Increased yield of plasmid DNA during removal of CsCl by ethanol precipitation. *BioTechniques* 22 878-889.
- Hinnebusch J., Barbour A.G. (1992) Linear- and circular-plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 174 5251-5257.
- Hinnebusch J., Tilly K. (1993) Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol.*

- Microbiol.* 10 917-922.
- Hiratsu K., Shinagawa H., Makino K. (1995) Mode of promoter recognition by the *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing the σ^S subunit: Identification of the recognition sequence of the *fic* promoter. *Mol. Microbiol.* 18 841-850.
- Ho S.Y., Mittal G.S. (1996) Electroporation of cell membranes: A review. *Critical. Rev. Biotechnol.* 16 349-362.
- Hochuli, E. (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J. Chromat. B* 444, 293-302.
- Hockney R.C. (1994) Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 12 456-463.
- Hofmann K.H., Neubauer P., Riethdorf S., Hecker M. (1990) Amplification of pBR322 plasmid DNA in *Escherichia coli relA* strains during batch and fed-batch fermentation. *J. Basic Microbiol.* 30 37-41.
- Hofmann K.H., Schweder T., Reinhardt U., Hecker M. (1991) Stability of plasmid pBR322 in *Escherichia coli* NF 161 (*relA*⁺) and NF 162 (*relA*) grown in a methionine limited chemostat. *Acta Biotechnol.* 11 403-406.
- Hoheisel J.D. (1997) Oligomere-chip technology. *Trends Biotechnol.* 15 465-469.
- Holland I.B., Kenny B., Steipe B., Plückthun A. (1990) Secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 182 132-143.
- Horn U., Krug M., Sawistowski J. (1990) Effect of high density cultivation on plasmid copy number in recombinant *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Lett.* 12 191-196.
- Howard, S.P., Lindsay, L. (1992) Structure/function relationships in the signal sequence of the colicin A lysis protein. In: James, R., Lazdunski, C. Pattus, F. (Edts.) *Bacteriocins, microcins and lantibiotics*. Springer Verlag Berlin.
- Howard, S.P., Cavard, D., Lazdunski, C. (1991) Phospholipase-A-independent damage caused by the colicin A lysis protein during its assembly into the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 137 81-89.
- Hsiung H.M., Cantrell A., Luirink, J., Oudega B., Veros A.J., Becker G.W. (1989) Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Bio/Technology* 7 267-271.
- Huang M., Liu S., Murray B.K., Lee M.L. (1992) High resolution separation and quantitation of ribonucleotides using CE. *Anal. Biochem.* 207 231-236.
- Huang C.T., Peretti S.W., Bryers J.D. (1994) Effects of medium carbon-to-nitrogen ratio on biofilm formation and plasmid stability. *Biotechnol. Bioeng.* 44 329-336.
- Hueck C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 379-433.
- Humphreys D.P., Weir N., Mountain A., Lund P.A. (1995) Human protein disulfide isomerase functionally complements a *dsbA* mutation and enhances the yield of

- pectate lyase C in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270 28210-28215.
- Hung K.C., Ding H., Guo B. (1999) Use of polytetrafluoroethylene as a sample support for the MALDI-TOF analysis of DNA and proteins. *Anal. Chem.* 71 518-521.
- Hüsken D., Beckers T., Engels J.W. (1990) Overexpression in *Escherichia coli* of a methionine-free designed interleukin-2 receptor (*tac* protein) based on a chemically cleavable fusion protein. *Eur. J. Biochem.* 193 387-394.
- Hustedt H., Kner K.H., Schütte H., Menge U., Papamichael N. (1986) Neue Entwicklungen in der Enzym-Aufarbeitung. *BioEngineering* 1 1-27.
- Hutchinson C.R. (1999) Microbial polyketide-synthases: More and more prolific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 3336-3338.
- Hwang L.H.S., Chen B.F., Lin H.M., Soong L.L., Jou Y.S., Chang W.C. (1990) The striking effects of spacer and terminator sequences on the synthesis of porcine growth hormone in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 12 335-340.
- Iselgaufts H. (1993) *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Weinheim.
- Iijima S., Kawai S., Mizutani S., Taniguchi M., Kobayashi T. (1987) On-off regulation of gene expression from tryptophan promoter with cross-flow filtration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 542-545.
- Inouye M., Jones P., Etchegaray J.P., Jiang W., Pollitt N.S., Goldstein J. (1998) New cold shock inducible proteins from *Escherichia coli*. *Patent US 5714575*.
- Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F., Boyer H. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene of the hormone Somatostatin. *Science* 198 1056-1063.
- Ivanov I.G., Saraffova A., Alexandrova R., AbouHaidar M.G. (1993) Expression of human alpha-1-interferon genes in vectors containing tandemly located promoters recognized by two different RNA-polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.* 108 231-236.
- Izard J.W., Kendall D.A. (1994) Signal peptides: Exquisitely designed transport promoters. *Mol. Microbiol.* 13 65-773.
- Jayaraman P.S., Peakman T.C. (1987) Location and sequence of the promoter of the gene for the NADH-dependent nitrite reductase of *Escherichia coli* and its regulation by oxygen the Fnr protein and nitrite. *J. Mol. Biol.* 196 781-788.
- Jeltsch A., Wenz C., Wende W., Selent U., Pingoud A. (1996) Engineering novel restriction endonucleases: Principles and applications. *Trends Biotechnol.* 14 235-238.
- Jenkins N. (1996) Role of physiology in the determination of protein heterogeneity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 205-209.
- Jensen P.R., Hammer K. (1998a) The sequence of spacers between the consensus sequences modulates the strength of prokaryotic promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 82-87.

- Jensen P.R., Hammer K. (1998b) Artificial promoters for metabolic optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 58 191-195.
- Jensen R.B., Gerdes K. (1995) Programmed cell death in bacteria: Proteic plasmid stabilization systems. *Mol. Microbiol.* 17 205-210.
- Jensen R.B., Gerdes K. (1997) Partitioning of plasmid R1. The ParM protein exhibits ATPase activity and interacts with the centromere-like ParR-parC complex. *J. Mol. Biol.* 269 505-513.
- Jensen R.B., Grohmann E., Schwab H., Díaz-Orejas R., Gerdes K. (1995) Comparison of *ccd* of F *parDE* of RP4 and *parD* of R1 using a novel conditional replication control system of plasmid R1. *Mol. Microbiol.* 17 211-220.
- Jensen R.B., Lurz R., Gerdes K. (1998) Mechanism of DNA segregation in prokaryotes: Replicon pairing by *parC* of plasmid R1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 8550-8555.
- Jeon W., Shin N.K., Shin H.C. (1997) Bacterial chaperones increase the production of soluble human TNF-alpha in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 19 579-582.
- Jespers L., Sonveaux E., Fastrez, Phanapoulos A., Davison J. (1991) Overexpression of the phage lambda lysozyme cloned in *Escherichia coli*: Use of a degenerative mixture of synthetic ribosome binding sites and increase of the protein stability in vitro. *Protein Eng.* 4 485-492.
- Jiang W., Baker H.J., Swango L.J., Schorr J., Self M.J., Smith B.F. (1998) Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent carmine *parvo* virus. *Vaccine* 16 601-607.
- Johnson B.H., Hecht M.H. (1994) Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Bio/Technology* 12 1357-1360.
- Johnson P.H., Grossman L.I. (1977) Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry* 16 4217-4225.
- Jordan H.J. (1999) Novel DNA molecular weight ladder. *Patent WO 99/03872*.
- Judson H.F. (1993) Frederick Sanger, Erwin Chargaff, and the metamorphosis of specificity. *Gene* 135 19-23.
- Jungnickel B., Rapoport T.A., Hartmann E. (1994) Protein translocation: Common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.* 346 73-77.
- Kadokura H., Watanabe K., Tsuneizumi K., Yoda K., Yamasaki M. (1995) Physiological and biochemical analysis of the effects of alkaline phosphatase overproduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 12 3596-3600.
- Kalousek S., Lubitz W. (1995) High-level poly(beta-hydroxybutyrate) production in recombinant *Escherichia coli* in sugar-free complex medium. *Can. J. Microbiol.* 41 216-221.
- Kang J., Immelmann A., Welters S., Henco K. (1991) Quality control in the fermentation of recombinant cells. *Biotech Forum Europe* 91/10 590-593.

- Kang Y., Yoon Y. (1999) Increasing secreted yields of recombinant pro-insulin. *Patent US 5840542*.
- Kanoh S., Masaki H., Yajima S., Ohta T., Uozumi T. (1991) Signal peptide of the colicin E2 lysis protein causes host cell death. *Agric. Biol. Chem.* 55 1607-1614.
- Kaprálek F., Ječmen, P. (1992) The structural stability of an expression plasmid bearing a heterologous cloned gene depends on whether this gene is expressed or not. *Biotechnol. Lett.* 14 251-256.
- Kast P. (1994) pKSS – a second-generation general purpose cloning vector for efficient positive selection of recombinant clones. *Gene* 138 109-114.
- Kato C., Horikoshi K. (1996) Gene expression under high pressure. *Prog. Biotechnol.* 13 59-66.
- Kato C., Kobayashi T., Kudo T., Furusato T., Murakimi Y., Tanaka T., Baba H., Oishi T., Ohtsuka E., Ikehara M., Yanagida T., Kato H., Moriyama S., Horikoshi K. (1987) Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. *Gene* 54 197-202.
- Kato C., Kobayashi T., Kudo T., Horikoshi K. (1986) Construction of an excretion vector extracellular production of *Aeromonas xylanase* and *Bacillus* cellulases by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 36 31-34.
- Katoh T., Yuguchi D., Yoshii H., Shi H., Shimizu K. (1999) Dynamics and modeling on fermentative production of poly (β -hydroxybutyric acid) from sugars via lactate by a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biotechnol.* 67 113-134.
- Katzen F., Becker A., Ielmini M.V., Oddo C.G., Ielpi L. (1999) New mobilizable vectors suitable for gene replacement in GRAM-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris pv. campestris* gum operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 278-282.
- Kawasaki S. (1998) Shuttle vector for transforming plants with large DNA fragments. *Patent AU9739226*.
- Kazmierczak B.I., Mielke D.L., Russel M., Model P. (1994) pIV, a filamentous phage protein that mediates phage export across the bacterial cell envelope, forms a multimer. *J. Mol. Biol.* 238 187-198.
- Kern I., Ceglowski P. (1995) Secretion of streptokinase fusion proteins from *Escherichia coli* cells through the hemolysin transporter. *Gene* 163 53-57.
- Khosla C., Bailey J.E. (1989) Characterization of the oxygen-dependent promoter of the *Vitreoscilla* hemoglobin gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171 5995-6004.
- Khrapko K., Collier H.A., Hanekamp J.S., Thilly W.G. (1998) Identifications of point mutations in mixtures by capillary electrophoresis hybridization. *Nucleic Acids Res.* 26 5738-5740.
- Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.-H., Buchner J. (1991) Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio/Technology* 9 825-829.

- Kiewiet R.J., Kok J.F. Seegers M.L., Venema G., Bron. S. (1993) The mode of replication is a major factor in segregational plasmid instability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 358-364.
- Kim B.G., Shuler M.L. (1991) Kinetic analysis of the effects of plasmid multimerization on segregational instability of ColE1 type plasmids in *Escherichia coli* B/r. *Biotechnol. Bioeng.* 37 1076-1086.
- Kim J.-Y., Kang H.A. (1996) Comparison of effects of the *par* locus and the *parB* locus on plasmid stability and host cell growth. *J. Ferment. Bioeng.* 82 495-497.
- Kim J.Y., Ryu D.D.Y. (1991) The effects of plasmid content, transcription efficiency and translation efficiency on the productivity of a cloned gene product in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38 1271-1279.
- King P.P. (1982) Biotechnology. An industrial review. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 32 2-8.
- Kitai K., Kudo T., Nakamura S., Masegi T., Ichikawa Y., Horikoshi K. (1988) Extracellular production of human immunoglobulin Gc region (hIgG-Fc) by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 52-56.
- Klinke S., Ren Q., Withold B., Kessler B. (1999) Production of a medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 540-548.
- Knappik A., Plückthun A. (1994) An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. *BioTechniques* 17 754-761.
- Kobayashi T., Kato C., Kudo T., Horikoshi K. (1986) Excretion of the penicillinase of an alkalophilic *Bacillus* sp. through the *Escherichia coli* outer membrane is caused by insertional activation of the *kil* gene in plasmid pMB9. *J. Bacteriol.* 166 728-732.
- Koch V., Ruffer H.-M., Schügerl K., Innertsberger E. Menzel, H., Weis J. (1995), Effects of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors. *Process Biochem.* 30, 435-446.
- Köhler K., von Bonsdorff-Lindeberg L., Enfors S.-O. (1989) Influence of disrupted biomass on the partitioning of β -galactosidase fusion to protein A. *Enzyme Microb. Technol.* 11 730-735.
- Köhler K., Veide A., Enfors S.O. (1991a) Partitioning of beta-galactosidase in PEG/potassium aqueous two-phase systems. *Enzyme Microb. Technol.* 13 204-209.
- Köhler K., Ljungquist C., Kodo A., Veide A., Nilsson A. (1991b) Engineering proteins to enhance their partition coefficients in aqueous two-phase systems. *Bio/Technology* 9 642-646.
- Koh B.T., Tan R.B.H., Yap M.G.S. (1998) Genetically structures mathematical modeling of *trp* attenuator mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 58 502-509.
- Kornacker M.G., Pugsley A.P. (1990) The normally periplasmic enzyme β -lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol. Microbiol.*

4 1101-1109.

- Koronakis V., Koronakis E., Hughes C. (1989) Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *EMBO J.* 8 595-605.
- Koshland D., Botstein D. (1980) Secretion of β -Lactamase requires the carboxyl end of the protein. *Cell* 20 749-760.
- Kosinski M.J., Bailey J.E. (1991) Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal β -galactosidase in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 18 55-68.
- Kramer W., Mattanovitch D., Elmecker G., Weik R., Luetlich C., Bayer K., Katinger H. (1994) Regulable expression systems for the optimisation of recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Prog. Biotechnol.* 9 827-830.
- Krausz E., Graw J. (1996) A new *cat* reporter gene vector designed for rapid and efficient cloning of PCR products. *Gene* 177 99-102.
- Kristensen C.S., Eberl L., Sanchez-Romero J.M., Givskov M., Molin S., De Lorenzo V. (1995) Site-specific deletion of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host range plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 177 52-58.
- Kuchner O., Arnold F.H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* 15 523-530.
- Kuhstoss S.A., Nagaraja R.R. (1992) Transcription terminator and related recombinant DNA vectors and transformants. *Patent US 5093252*.
- Kumar P.K.R., Maschke H.-E., Friehs K., Schügerl K. (1991) Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. *Trends Biotechnol.* 9 279-284.
- Kunst F., Steinmetz M., Lepesant J.-A., Dedonder R. (1977) Presence of a third sucrose hydrolyzing enzyme in *Bacillus subtilis*: Constitutive levanase synthesis by mutants of *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Biochimie* 59 287-292.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessieres P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton I.F., Danchin A., *et al.* (1998) The complete genome sequence of the GRAM-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390 249-256.
- Kuo H., Keasling J.D. (1996) A Monte Carlo simulation of plasmid replication during the bacterial division cycle. *Biotechnol. Bioeng.* 52 633-647.
- Kurland C., Gallant J. (1996) Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 489-493.
- Kushner S.R. (1996) mRNA decay. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Kuypers A.W.H.M., Willems M.W., Van der Schans M.J., Linssen P.C.M., Wessels

- H.M.C., De Bruijn C.H.M.M., Everaerts F.M., Mensink E.J.B.M. (1993) Detection of point mutations in DNA using capillary electrophoresis in a polymer network. *J. Chromat. A* 621 149-156.
- La Fontaine S., Firth S.D., Lockhart P.J., Paynter J.A., Mercer F.B. (1998) Eukaryotic expression vectors that replicate to low copy number in bacteria: Transient expression of the MENKES protein. *Plasmid* 39 245-251.
- Labes M. (1989) A new family of RSF1010-derived expression and *lac*-fusion broad-host-range vectors for GRAM-negative bacteria. *Gene* 89 37-46.
- Labrou N., Clonis Y.D. (1994) The affinity technology in downstream processing. *J. Biotechnol.* 3 95-119.
- Lachmund A. (1998) Genregulation bei Prokaryonten. in: Seyffert W. (Hrsg.) *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag Stuttgart.
- Lario A., Gonzalez A., Dorado G. (1997) Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing. *Anal. Biochem.* 247 30-33.
- Larsen J.E.L., Gerdes K., Light J., Molin S. (1984) Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* 28 45-54.
- Ledent P., Duez C., Vanhove M., Lejeune A., Fonze E., Charlier P., Rhazi-Filali F., Thamm I., Guillaume G., Samyn B., Devreese B., Van Beeumen J., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M. (1997) Unexpected influence of a C-terminal-fused His-tag on the processing of an enzyme and on the kinetic and folding parameters. *FEBS Lett.* 413 194-196.
- Lee C., Li P., Inouye H., Brickman E.R., Beckwith J. (1989) Genetic studies on the inability of β -galactosidase to be translocated across the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* 171 4609-4616.
- Lee D.C., Kim H.S. (1996) Use of methicillin and ampicillin mixture as a selective pressure in the cultivation of recombinant *E. coli*. *Biotechnol. Tech.* 10 937-940.
- Lee J., Cho M., Hong E.K., Kim K.S., Lee J. (1996) Characterization of the NAR promoter to use as an inducible promoter. *Biotechnol. Lett.* 18 129-134.
- Lee J.H., Lee K.J. (1994) Effect of growth rate and cultivation environments on cloned gene stability and the cloned gene product formation in *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* 33 195-204.
- Lee J.H., Lee K.J. (1996) Analysis of expression rate of cloned β -lactamase gene in a recombinant of *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* 52 161-165.
- Lee S. Y. (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14 98-105.
- Lehnherr H., Maguin E., Jafri S., Yarmolinsky M.B. (1993) Plasmid addiction genes of bacteriophage P1. *J. Mol. Biol.* 233 414-428.
- Leipold R.J., Krewson C.E., Dhurjati P. (1994) Mathematical model of temperature-sensitive plasmid replication. *Plasmid* 32 131-167.

- Leonardo E.D., Sedivy J.M. (1990) A new vector for cloning large eukaryotic DNA segments in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 8 841-844.
- Lepesant J.-A., Kunst F., Lepesant-Kejzlarova J., Dedonder R. (1972) Chromosomal locations of mutations affecting sucrose metabolism in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 118 135-160.
- Lepesant J.-A., Lepesant-Kejzlarova J., Pascal M., Kunst F., Billaut A., Dedonder R. (1974) Identification of the structural gene of levansucrase in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 128 213-221.
- Levinthal C. (1969) How to fold graciously. in: DeBrunner P., Tsibris J., Muneke F. (Edts.) *Mossbauer spectroscopy in biological systems*. University of Illinois Press Urbana.
- Lewin A., Jacob D., Freytag B., Appel B. (1998) Gene expression in bacteria directed by plant-specific regulatory sequences. *Transgenic Res.* 7 403-411.
- Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 497-501.
- Lilius G., Persson M., Bulow L., Mosbach K. (1991) Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached polyhistidine tails. *Eur. J. Biochem.* 198 499-504.
- Lin L.-L., Hsu W.-H. (1997) Lactose-induced expression of *Bacillus* sp. TS-23 amylase gene in *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter. *Lett. Appl. Microbiol.* 24 365-368.
- Lin N.T., Tseng Y.H. (1997) A phagemid shuttle vector based on filamentous phage phi-Lf and the *E. coli* vector pOK12 for use in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Tech.* 11 43-45.
- Lin-Chao S., Chen W.-T., Wong T.-T. (1992) High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol. Microbiol.* 6 3385-3393.
- Linz F., Degelau A., Friehs K., Egthessadi F., Scheper T. (1990) The use of Flow Cytometry for Controlling Biotech Processes. *DECHEMA Biotechnol. Conf.* 4 B 941-944 VCH Weinheim.
- Liu J., Walsh C.T. (1990) Peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase from *Escherichia coli*: A periplasmic homologue of cyclophilin that is not inhibited by cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 4028-4032.
- Liu Y., Kuhr W.G. (1999) Separation of double- and single-stranded DNA restriction fragments: Capillary electrophoresis with polymer solutions under alkaline conditions. *Anal. Chem.* 71 1668-1673.
- Lloubés R., Vita N., Bernadac A., Shire D., Leplatou P., Geli V., Frenette M., Knibiehler M., Lazdunski C., Baty D. (1993) Colicin A lysis protein promotes extracellular release of active human growth hormone accumulated in *Escherichia coli* cytoplasm. *Biochimie* 75 451-458.
- Loewen P.C., Hengge-Aronis R. (1994) The role of the sigma factor σ^{32} KatF. in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48 53-80.

- Lopez P.J., Marchand I., Yarchuk O., Dreyfus M. (1998) Translation inhibitors stabilize *Escherichia coli* mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 6067-6072.
- Löser C. (1995) Stability of the pBR322 plasmid derivative pB210 in *Escherichia coli* TG1 under non-selective and selective conditions. *Acta Biotechnol.* 15 375-380.
- Löser C., Ray P. (1996) Modeling the stability of the pBR322 plasmid derivative pBB210 in *Escherichia coli* TG1 under non-selective and selective conditions. *Acta Biotechnol.* 16 271-282.
- Love C.A., Lilley P.E., Dixon N.E., (1996) Stable high-copy-number bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 176 49-53.
- Lu J.R., Yang J., Jin Z.H. (1993) Secretion of firefly luciferase in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* 15 1111.
- Lucht J.M., Bremer E. (1991) Charakterizatiob of mutations affecting the osmoregulated *proU* promoter of *Escherichia coli* and identification of 5' sequences required for high-level expression. *J. Bacteriol.* 173 801-809.
- Luirink J., Van der Sande C., Tommassen J., Veltkamp E., De Graaf F.K., Oudega B. (1986) Effects of divalent cations and of phospholipase A activity on excretion of cloacin DF13 and lysis of host cells. *J. Gen. Microbiol.* 132 825-834.
- Luirink J., Watanabe T., Wu H.C., Stegehuis F., De Graaf F.K., Oudega B. (1987) Modification processing and subcellular localization in *Escherichia coli* of the pCloDF13 encoded bacteriocin release protein fused to the mature portion of β -Lactamase. *J. Bacteriol.* 169 2245-2250.
- Luirink J., Hayashi S., Wu H.C., Kater M.M., De Graaf F.K., Oudega B. (1988) Effect of a mutation preventing lipid modifications on the localization of the pCloDF13 encoded bacteriocin release protein BRP and on the release of cloacin DF13. *J. Bacteriol.* 170 4153-4160.
- Luirink J., Duim B., De Gier J.W.L., Oudega B. (1991) Functioning of the stable signal peptide of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein. *Mol. Microbiol.* 5 393-399.
- Lukacsovich T., Orosz A., Baliko G., Venetianer P.A. (1990) A family of expression vectors based on the *rrnB* P2promoter of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 16 49-55.
- Luli G. W., Strohl W. R. (1990) Comparison of growth acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 1004-1011.
- Luther J.R., Glatz C.E. (1994) Genetically engineered charge modifications to enhance protein separation in aqueous two-phase systems: Electrochemical partitioning. *Biotechnol. Bioeng.* 44 147-153.
- Luttinger A. (1995) The twisted life of DNA in the cell - bacterial topoisomerases. *Mol. Microbiol.* 15 601-606.
- Mackman N., Baker K., Gray L., Haigh R., Nicaud J.-M., Holland I.B. (1987) Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal

- secretion signal of haemolysin. *EMBO J.* 6 2835-2841.
- Makoff A.J., Oxer M.D. (1991) High level heterologous expression in *E. coli* using mutant forms of the *lac* promoter. *Nucleic Acids Res.* 19 2417-2421.
- Makrides S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60 512-538.
- Makrides S.C., Kung P.C. (1995) Production of recombinant T-cell antigen receptor V-region proteins. *Patent WO 95/19435*.
- Manen D., Pugeon M., Damay P. (1997) A sensitive reporter gene system using bacterial luciferase based on a series of plasmid cloning vectors compatible with derivatives of plasmid pBR322. *Gene* 186 197-200.
- Maniatis, T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning*. CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor.
- Mao, W., Pan R., Freedman D. (1992) High production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in a fed-batch fermentation using a synthetic medium. *J. Ind. Microbiol.* 11 1-6.
- Marciano D.K., Russel M., Simon S.M. (1999) An aqueous channel for filamentous phage export. *Science* 284 1516-1519.
- Markaryan A.N., Mashko S.V., Kukel L.V., Lapidus A.L., Bach A.N., Egorov A.M. (1991) Construction of expression vectors for gene fusions on the model of β -galactosidase human fibroblast β -interferon for the purpose of immunoenzyme assay. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 646 125-135.
- Markmeyer P., Ruehlmann A. (1990) The pAX plasmids: New gene-fusion vectors for sequencing, mutagenesis and expression of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 93 129-134.
- Martin R. (1996) *Elektrophorese von Nucleinsäuren* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Martin J., Hartl F.U. (1997) Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Structural Biol.* 7 41-52.
- Martin S.E.V., Bergmann K., Polard-Knight D.V. (1997) Release of intracellular material. *Patent WO 97/08293*.
- Martin-Farmer J., Janssen G.R. (1999) A downstream CA repeat sequence increases translation from leadered and unleadered mRNA in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 31 1025-1038.
- Maschke H.-E., Friehs K., Schügerl K. (1989) Special aspects of cultivation of genetically modified microorganisms: Plasmid stability and toxicity in view of the host. *DECHEMA Biotechnol. Conf.* 3 A 411-414 VCH Weinheim.
- Maschke H.-E., Hebenbrock K., Friehs K. (1990) Production of EcoRI with different expression plasmids in multi plasmid systems in *E. coli*. *DECHEMA Biotechnol. Conf.* 4 A 379-382 VCH Weinheim.

- Mason C.A., J.E Bailey. (1989) Effects of plasmid presence on growth and enzyme activity of *Escherichia coli* DH5 α . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 54-60.
- Mathies R.A., Zhu H., Clark S.M., Benson S.C., Rye H.S., Glazer A.N. (1994) High sensitivity capillary electrophoresis of dsDNA fragments using monomeric and dimeric fluorescent intercalating dyes. *Anal. Chem.* 66 1941-1948.
- Matsui T., Sato H., Sato S., Mukataka S., Takahashi J. (1990) Effects of nutritional conditions on plasmid stability and production of tryptophan-synthase by a recombinant *Escherichia coli*. *Agric. Biol. Chem.* 54 619-624.
- Mattes R. (1993) Principle of gene expression. in: Pühler A. (Edt) *Biotechnology Vol. 2 Genetic Fundamentals and Genetic Engineering, 2nd ed.* 233-256 VCH Weinheim.
- Mayer M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBluescript. *Gene* 163 41-46.
- McCarthy J.E.G., Schauder B., Ziemke P. (1988) Post-transcriptional control in *Escherichia coli*: Translation and degradation of the *atp* operon mRNA. *Gene* 72 131-139.
- McCord B.R., D.L. McClure, J.M. Jung. (1993) Capillary electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified DNA using fluorescence detection with an intercalating dye. *J. Chromat. A* 652 75-82.
- McInerney J.O. (1998) GCUA: General codon usage analysis. *Bioinformatics* 14 372-373.
- McPherson D.T., Morrow C., Minehan D.S., Wu J., Hunter E., Urry D.W. (1992) Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide, G-(VPGVG)₁₉-VPGV, from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 8 347-352.
- Meerman H.J., Georgiou G. (1994) Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology* 12 1107-1110.
- Meinhardt F., Kempken F., Kamper F., Esser., K. (1990) Linear plasmids among eukaryotes: Fundamentals and application. *Curr. Genet.* 17 89-95.
- Mendoza-Vega O., Sabatié J., Brown S.W. (1994) Industrial production of heterologous proteins by fed-batch cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 15 369-410.
- Mensa-Wilmot K.A. (1999) Expression of protein coding sequences in prokaryotic and eukaryotic cells. *Patent US 5874242*.
- Mertens N., Remaut E., Fiers W. (1996) Increased stability of phage T7g10 mRNA is mediated by either a 5'- or a 3'-terminal stem-loop structure. *Biol. Chem.* 377 811-817.
- Messing J., Crea R., Seeburg P.H. (1981) A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 9 309-321.
- Metcalf W.W., Steed P.M. Wanner B.L. (1990) Identification of phosphate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* K₁₂ by DNA sequence analysis of *psi::lacZ* (Mu d1) transcriptional fusions. *J. Bacteriol.* 172 3191-3200.

- Miao F., Kompala D.S. (1989) Analysis of two-stage recombinant bacterial fermentations using a structured kinetic model. *Ann. Biochem. Eng. Symp.* 19 Meeting 47-56.
- Miao F., Todd P., Kompala D.S. (1993) A single-cell assay on β -galactosidase in recombinant *Escherichia coli* using flow cytometry. *Biotechnol. Bioeng.* 42 708-715.
- Michel M.-L., Davis H.L., Schleef M., Mancini M., Tiollais P., Whalen R.G. (1995) DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: Aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 5307-5311.
- Miksch G., Dobrowolski P. (1995) Growth phase-dependent induction of stationary-phase promoters of *Escherichia coli* in different Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177 5374-5378.
- Miksch G., Neitzel R., Friehs K., Flaschel E. (1997a) Extracellular production of β -Glucanase by *E. coli* under different cultivation conditions in shake cultures and bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 120-126.
- Miksch G., Fiedler E., Dobrowolski P., Friehs K. (1997b) The *kil* gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growth phase dependent promoter mediates the secretion of a heterologous protein in stationary phase. *Arch. Microbiol.* 167 143-159.
- Miksch G., Fiedler E., Dobrowolski P., Flaschel E. (1997c) Controlled secretion into the culture medium of a hybrid β -Glucanase by *Acetobacter methanolicus* mediated by the *kil* gene of *Escherichia coli* located on a Tn5-derived transposon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 530-536.
- Miksch G., Neitzel R., Friehs K., Flaschel E. (1999) High level expression of a recombinant protein in *Klebsiella planticola* owing to induced secretion into the culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 627-632.
- Miller J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor.
- Miller C.A., Cohen S.N. (1993) The partition *par* locus of pSC101 is an enhancer of plasmid incompatibility. *Mol. Microbiol.* 9 695-702.
- Miller C.G. (1996) Protein degradation and proteolytic modification. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Milsson M., Kallio P.T., Bailey J.E., Bulow L., Wahlund K.G. (1999) Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in *Escherichia coli* enhances ribosome and tRNA levels: A flow field-flow fractionation study. *Biotechnol. Prog.* 15 158-163.
- Mims C.A., Playfair J.H.L., Roitt I.M., Wakelin D., Williams R.M. (1993) Vaccination in: *Medical Microbiology*. Mosby St.Louis.
- Mintz G. R. (1993) An irreversible serine protease-inhibitor. *Biopharm. Manuf.* 6 34-38.
- Mitchelson K. R., Cheng J., Kricka L.J. (1997) The use of capillary electrophoresis for point-mutation screening. *Trends Biotechnol.* 15 448-458.

- Möllby R. (1978) Bacterial phospholipases. In: Jeljaszewicz J. Wadström T. (Edts.) *Bacterial toxins and cell membranes*. Academic Press London.
- Monteilhet C., Lachacinski N., Aggerbeck L.P. (1993) Cytoplasmic and periplasmic production of human apolipoprotein-E in *Escherichia coli* using natural and bacterial signal peptide. *Gene* 125 223-228.
- Moriyama E.N., Powel J.R. (1998) Gene length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26 3188-3193.
- Morris J.E., Hoffman A.S., Fisher R.R. (1993) Affinity precipitation of proteins by polyligands. *Biotechnol. Bioeng.* 41 991-997.
- Morsey M.A. (1999) Methods for production of recombinant plasmids. *Patent US* 5922583.
- Moser D.R., Campbell J.L. (1983) Characterization and complementation of pMB1 copy number mutant: Effect of RNA I gene dosage on plasmid copy number and incompatibility. *J. Bacteriol.* 154 809-818.
- Motallebi-Veshareh M., Rouch D.A., Thomas C.M. (1990) A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Annu. Rev. Genet.* 23 37-69.
- Mott J.E., Grant R.A., Ho Y., Platt T. (1985) Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the lambda PL promoter: Strategies for overproducing transcription termination factor *rho*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 88-92.
- Moult J. (1996) The current state of the art in protein structure prediction. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 422-427.
- Mukherjee K.J., Deb J.K., Ramanchandran K.B. (1996) Studies on maintenance of vector pBK2 in *Corynebacterium acetoacidophilum* by coculture experiments in a continuous bioreactor. *Enzyme. Microb. Technol.* 18 555-560.
- Müller A.K., Rojo F., Alonso J.C. (1995) The level of the pUB110 replication initiator proteins is autoregulated, which provides an additional control for plasmid copy number. *Nucleic Acids Res.* 23 1894-1900.
- Müller J., Van Dijl J.M., Venema G., Bron S. (1996) Cloning of heterologous genes specifying detrimental proteins on pUC-derived plasmids in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 252 207-211.
- Murakami Y., Furusato T., Kato C., Habuka N., Kudo T., Horikoshi K. (1989) Construction of new excretion vectors: Two and three tandemly located promoters are active for extracellular protein production from *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30 619-623.
- Murby M, Uhlén M, Ståhl S. (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein Express. Purif.* 7 129-136.
- Murphy C.K., Beckwith J. (1996) Export to the cell envelope in *Escherichia coli*. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.

- Nacken V., Achstetter T., Degryse E. (1996) Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 175 253-260.
- Nackerdien Z., Morris S., Choquette S., Ramos B., Atha D. (1996) Analysis of laser induced plasmid DNA photolysis by capillary electrophoresis. *J. Chromat. B* 683 91-96.
- Naglak T.J., Wang H.Y. (1990) Recovery of a foreign protein from the periplasm of *Escherichia coli* by chemical permeabilisation. *Enzyme Microb. Technol.* 12 603-611.
- Nakai T., Moriya A., Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Horinouchi S., Sone Y., Mori H., Sakai F., Hayashi T. (1998) Control of expression by the cellulose synthase (*bscA*) promoter region from *Acetobacter xylinum*. *Gene* 213 93-100.
- Nakamura S., Masegi T., Kitai K., Ichikawa Y., Kudo T., Aono R., Horikoshi K. (1990) Extracellular production of human necrosis factor- α by *Escherichia coli* using a chemically-synthesized gene. *Agric. Biol. Chem.* 54 3241-3250.
- Nakamura S., Kitai K., Soma K., Ichikawa Y., Kudo T., Aono R., Horikoshi K. (1992) Extracellular production of human immunoglobulin ϵ -chain/ γ 1-chain chimeric Fc polypeptide by *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 55 349-350.
- Nakamura Y., Gojobori T., Ikemura T. (1998) Codon usage tabulated from the International DNA Sequence Database. *Nucleic Acids Res.* 26 334.
- Nakayama K., Kelly S.M., Curtiss III R. (1988) Construction of an ASD⁺ expression-cloning vector: Stable maintenance and high-level expression of clones genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Bio/Technology* 6 693-697.
- Nakayama N., Narumi I., Nakamoto S., Kihara H. (1992) A new shuttle vector for *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14 649-652.
- Nesvera J., Patek M., Hochmannova J., Abrhamova Z., Becvarova V., Jelinkova M., Vohradsky J. (1997) Plasmid pGA1 from *Corynebacterium glutamicum* codes for a gene product that positively influences plasmid copy number. *J. Bacteriol.* 179 1525-1532.
- Neubauer P., Hofmann K., Riethdorf S., Hecker M. (1990) Verfahren zur Produktion von ColE1-verwandten Plasmiden. *Acta Biotechnol.* 10 303-305.
- Nicaud J.-M., Mackman N., Holland I.B. (1986) Current status of secretion of foreign proteins by microorganisms. *J. Biotechnol.* 3 255-270.
- Niederauer M.Q., Glatz C.E. (1992) Selective precipitation. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 47 159-188.
- Niehaus F., Hantke K., Uden G. (1991) Iron content and FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 8 319-324.
- Nilsson J., Abrahamsen L. (1990) Fusions in *Staphylococcus* protein A. *Methods Enzymol.* 185 144-161.
- Nilsson J., Ståhl S., Lundeberg J., Uhlén M., Nygren P.-A. (1997) Affinityfusion strategies

- for detection purification and immobilization of recombinant proteins. *Protein Express. Purif.* 11 1-16.
- Nixon A.E., Ostermeier M., Benkovics S.J. (1998) Hybrid enzymes: Manipulating enzyme design. *Trends Biotechnol.* 16 258-264.
- Noguchi T., Takahashi H. (1991a) Utilization of trans-activated T4 *uvrY* regulatory signal for a high yield of cloned gene products. *Agric. Biol. Chem.* 55 2497-2506.
- Noguchi T., Takahashi H. (1991b) A novel expression systems for production of a labile protein in *Escherichia coli* by infection with cytosine substituting T4 phage. *Agric. Biol. Chem.* 55 2507-2513.
- Nordström K., Uhlin B.E. (1992) Runaway-replication plasmids as tools to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria. *Bio/Technology* 10 661-666.
- Nordstrom T., Senkas A., Eriksson S., Pontynen N., Nordstrom E., Lindquist C. (1999) Generation of a new protein purification matrix by loading ceramic hydroxyapatite with metal ions. *J. Biotechnol.* 69 125-133.
- Nudel B.C., Pueyo M.G., Judewicz N.D., Guilietti A.M. (1989) Stability of *Escherichia coli* strains harboring recombinant plasmids for L-threonine production. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 56 273-282.
- O'Halloran T.V. (1993) Transition metals in control of gene expression. *Science* 261 715-725.
- O'Kennedy R., Houghton C.J., Patching J.W. (1995) Effects of growth environment on recombinant plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae* grown in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 126-132.
- Obst M., Meding E.R., Vogel R.F., Hammes W.P. (1995) Two genes encoding β -galactosidase of *Lactobacillus sake*. *Microbiology* 141 3059-3066.
- Odell M., Kerr S.M., Smith G.L. (1996) Ligation of double-stranded and single-stranded (oligo(dT)) DNA by vaccinia virus DNA-ligase. *Virology* 221 120-129.
- Oeding V., Schlegel H.G. (1973) β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134 239-248.
- Ogden K.L., Davis R.H., Taylor A.L. (1992) An adjustable expression system for controlling growth rate, plasmid maintenance, and culture dynamics. *Biotechnol. Bioeng.* 40 1027-1038.
- Ogden, K.L., Taylor, A.L. (1991) Genetic control of flocculation in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 7 279-286.
- Ohnishi Y., Horinouchi S. (1996) Extracellular production of a *Serratia marcescens* serine protease in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 1551-1558.
- Oliver D.B. (1987) Periplasm and protein secretion. in: Neidhardt (Edt.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*. ASM Press Washington D.C.
- Oliver D.B. (1996) Periplasm in: Neidhardt (Edt.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular*

- and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Oliver D.B., Beckwith J. (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*. *Cell* 30 311-319.
- Oliver S.G, Ward J.M. (1985) *A Dictionary of Genetic Engineering*. Cambridge University Press.
- Olsson T., K.Ekwall, T. Rusla. (1993) The silent P mating type locus in fission yeast contains two autonomously replicating sequences. *Nucleic Acids Res.* 21 855-861.
- Omori K., Akatsuka H., Komatsubara S. (1994) Versatile *Escherichia coli* expression vectors for production of truncated proteins. *Plasmid* 31 297-299.
- Ong E., Greenwood J.M., Gilkes N.R., Kilburn D.G., Miller R.C., Warren R.A. (1989) The cellulose-binding domains of cellulases: Tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 7 239-243.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 2766-2770.
- Ostermeier M., De Sutter K., Georgiou G. (1996) Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 271 10616-10622.
- Oudega B., Ykema A., Stegehuis F., De Graaf F.K. (1984) Detection and subcellular localization of mature protein H involved in excretion of cloacin DF1 3. *FEMS Microbiol. Lett.* 22 101-108.
- Oudega B., Mol O., Van Ulsen P., Stegehuis F., Van der Wal F.J., Luirink J. (1993) *Escherichia coli* SecB SecA and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein a small lipoprotein. *J. Bacteriol.* 175 1543-1547.
- Owolabi J.B., Rosen B.P. (1990) Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid –encoded arsenical resistance operon. *J. Bacteriol.* 172 2367-2371.
- Oxer M.D., Bentley C.M., Doyle J.G., Peakman T.C., Charles I.G., Makoff A. J. (1991) High level heterologous expression in *Escherichia coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter. *Nucleic Acids Res.* 19 2889-2893.
- Pagratris N.C., Revel H.R. (1993) Broad host range, regulated expression system utilizing bacteriophage T7 RNA-polymerase and promoter. *Biotechnol. Bioeng.* 41 837-845.
- Panayotatos N. (1998) Reducing expression of selectable marker. *Patent US 5716803*.
- Park S.J., Georgious G., Lee S.Y. (1999) Secretory production of recombinant protein by a high cell density culture of a protease negative mutant *Escherichia coli* strain. *Biotechnol. Prog.* 15 164-167.
- Parker D.E., Glatz C.E., Ford C.F., Gendel S.M., Suominen I., Rougvie M.A. (1990)

- Recovery of a charged-fusion protein from cell extracts by polyelectrolyte precipitation. *Biotechnol. Bioeng.* 36 467-475.
- Patnaik P.R. (1994) Effect of feed cycling on plasmid stabilization during continuous fermentation: The case of variable plasmid loss stability. *Can. J. Chem. Eng.* 72 929-934.
- Peakman T.C., Crouzet J., Mayaux J.F., Busby S., Mohan S., Harborne N., Wootton J., Nicolson R., Cole J. (1990) Nucleotide sequence organization and structural analysis of the products of genes in the *nirB-cysG* region of the *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 191 315-323.
- Peberdy J.F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol.* 12 50-57.
- Pecota D.C., Kim C.S., Wu K., Gerdes k., Wood T. (1997) Combining the *hok/sok*, *parDE* and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 1917-1924.
- Peek K., Veitch D.P., Prescott M., Daniel R.M., MacGiver B., Bergquist P.L. (1993) Some characteristics of a proteinase from thermophilic *Bacillus* sp. expressed in *Escherichia coli*: Comparison with the native enzyme and its processing in *E. coli* and *In Vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 1168-1175.
- Peredelchuk M.Y., Bennett G.N. (1997) A method for construction of *E. coli* strains with multiple DNA insertions in the chromosome. *Gene* 187 231-238.
- Perez L., Vega J., Chuay C., Menendez A., Ubieta R., Montero M., Padron G., Silva A., Santizo C., Besada V., Herrera L. (1990) Production and characterization of human gamma interferon from *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33 429-434.
- Pérez- Pérez J., Marquez G., Barbero J.-L., Gutiérrez J. (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 12 178-180.
- Petrides D., Sapidou E., Calandranis J. (1995) Computer-aided process analysis and economic evaluation for biosynthetic human insulin production – a case study. *Biotechnol. Bioeng.* 48 529-541.
- Pfeifer T.A. (1998) Expression of heterologous proteins in stable insect cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 518-521.
- Phillips G.J. (1999) New cloning vectors with temperature-sensitive replication. *Plasmid* 41 78-81.
- Pierce J.J., Turner C., Keshavarz-Moore E., Dunnill P. (1997) Factors determining more efficient large-scale release of a periplasmic enzyme from *E. coli* using lysoyme. *J. Biotechnol.* 58 1-11.
- Pires M.J., Martel P., Baptista A., Petersen S.B., Willson R.C., Cabral J.M.S. (1994) Improving protein extraction yield in reversed micellare systems through surface charge engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 44 773-780.
- Pistillo J.M., Vishwanatha J.K. (1990) Expression of Simian virus-40 large T-antigen in *Escherichia coli* using vectors based on the regulatable *rac* promoter. *Biochem.*

- Biophys. Res. Comm.* 169 1129-1137.
- Platt T. (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Ann. Rev. Biochem.* 55 339-372.
- Plückthun A. (1990) Antibody engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/Technology* 9 545-551.
- Poindexter K., Gayle III R.B. (1991) Induction of recombinant gene expression in *Escherichia coli* using an alkaline pH shift. *Gene* 97 125-130.
- Pope B., Kent H.M. (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 24 536-537.
- Poppenborg L. (1996) *Hisactophilin als Affinitätsträger in Trennverfahren mit Metallchelate-Affinitätsliganden*. Dissertation Universität Bielefeld.
- Poppenborg L., Friehs K., Flaschel E. (1997) The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. *J. Biotechnol.* 58 79-88.
- Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography a new approach to protein fractionation. *Nature* 258 598-599.
- Porath J., Olin B. (1983) Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochem.* 22 1621-1630.
- Porter R.D., Black S., Pannuri S., Carlson A. (1990) Use of the *Escherichia coli* ssb gene to prevent bioreactor takeover by plasmidless cells. *Bio/Technology* 8 47-51.
- Possot O.M., Letellier L., Pugsley A.P. (1997) Energy requirement for pullulanase secretion by the main terminal branch of the general secretory pathway. *Mol. Microbiol.* 24 457-464.
- Prasad G., Minakshi (1997) Trends in antiviral vaccines. *Indian J. Microbiol.* 37 165-176.
- Prazeres D.M.F., Schluep T., Cooney C. (1998) Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *J. Chromat. B* 806 31-45.
- Prazeres D.M.F., Ferreira G.N.M., Monteiro G.A., Cooney C.L., Cabral J.M.S. (1999) Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: Problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol.* 17 169-174.
- Prickett K.S., Amberg D.C., Hopp T.P. (1989) A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *BioTechniques* 7 580-589.
- Prockop D.J., Rock M.J., Ganguly A. (1999) Detection of nucleic acid mutations. *Patent US 5874212*.
- Projan S.J., Carleton S., Novick R.P. (1983) Determination of plasmid copy number by fluorescence densitometry. *Plasmid* 9 182-190.
- Pugsley A.P. (1993) The complete general secretory pathway in GRAM-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57 50-108.
- Pugsley A.P., Cole S.T. (1987) An unmodified form of the ColE2 lysis protein an envelope

- lipoprotein retains reduced ability to promote colicin E2 release and lysis of producing cells. *J. Gen. Microbiol.* 133 2411-2420.
- Pugsley A.P., Francetic O. (1998) Protein secretion in *Escherichia coli* K-12: Dead or alive? *Cell. Mol. Life Sci.* 54 347-352.
- Pugsley A.P., Schwartz M. (1984) Colicin E2 release: Lysis, leakage or secretion? Possible role of a phospholipase. *EMBO J.* 3 2393-2397.
- Pugsley A.P., Chapon C., Schwartz M. (1986) Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein. *J. Bacteriol.* 166 1080-1088.
- Pugsley A.P., D'Enfert C., Reyss I., Kornacker M.G. (1990a) Genetics of extracellular protein secretion by Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 24 67-90.
- Pugsley A.P., Kornacker M.G., Ryter A. (1990b) Analysis of the subcellular locating of pullulanase produced by *Escherichia coli* carrying the *pulA* gene from *Klebsiella pneumoniae* strain UNF5023. *Mol. Microbiol.* 4 59-72.
- Pulleyblank D.E., Shure M., Tang D., Vinograd J., Vosberg H.P. (1975) Action of nicking-closing enzyme on supercoiled and non supercoiled closed circular DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 4280-4284.
- Quax W.J. (1996) Merits of secretion of heterologous proteins from industrial microorganisms. *Folia Microbiol.* 42 99-103.
- Quiles E., Perbal M.C., Egly J. (1991) Purification of proteins. Part 2: Control of proteolytic activity. *Biofutur* 98 1-11.
- Raskin, I. (1999) Use of plant roots for biochemical manufacturing. *XVI International Botanical Congress*, 1-7 August 1999, St. Louis, Missouri, U.S.A.
- Recknagel R.-D., Weller K., Köhler J.-M. (1993) A simple method to forecast good promoters of *Escherichia coli* by means of doublet frequencies. *J. Theo. Biol.* 162 75-80.
- Reece R.J., Maxwell A. (1991) DNA gyrase - structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26 335-375.
- Regue M., Wu H.C. (1988) Synthesis and export of lipoproteins in bacteria. In: Das R.C., Robbins P.W. (Edts.) *Protein transfer and organelle biogenesis*. Academic Press London.
- Reikofski J., Tao B.Y. (1992) Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Adv.* 10 535-547.
- Reinikainen P., Lähde M., Karp M., Suominen I., Markkanen P., Mäntsälä P. (1988) Phage Lambda P_L promoter controlled α -amylase expression in *Escherichia coli* during fermentations. *Biotechnol. Lett.* 10 149-154.
- Reyes-Engel A., Garcia-Villanova J., Dieguez-Lucena J.L., Fernandez-Arcas N., Ruiz-Galdon M. (1996) New approach to mRNA quantification: Additive RT-PCR-reverse transcription-polymerase chain reaction using an unmodified internal standard. *BioTechniques* 21 202-204.

- Richards G.N., Manley-Harris M. (1999) Extractive separation of biological materials. *Patent US 5882520*.
- Richardson J.P. (1993) Transcription termination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28 1-30.
- Riethdorf S., Ulrich A., Völker U., Hecker M. (1990) Excretion into the culture medium of a *Bacillus* β -Glucanase after overproduction in *Escherichia coli*. *Z. Naturforsch.* 45c 240-244.
- Righetti P.G., Gelfi C. (1997) Recent advances in capillary electrophoresis of DNA fragments and PCR products. *Biochem. Soc. Trans.* 25 267-273.
- Rinas U. (1996) Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 12 196-200.
- Robinson R.R., Liu A.Y., Horowitz H., Better M., Wall R., Lei S.-P., Wilcox G.L. (1998) Pectate lyase signal sequence. *Patent US 5846818*.
- Rohde C. (1995) Plasmid isolation from bacteria: Some fast procedures. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11 367-369.
- Ronchel M.C., Molina I., Witte A., Lubitz W., Molin S., Ramos J.L., Ramos C. (1998) Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl. environ. Microbiol.* 64 4904-4911.
- Rosenberg, R.F., Holliday R. (1993) Recombinant therapeutic proteins and translational errors. *Trends Biotechnol.* 11 498-499.
- Russel M. (1998) Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: Type II protein secretion systems. *J. Mol. Biol.* 279 485-499.
- Ryan M.J., Lotvin J.A., Strathy N., Fantini S.E. (1999) Two plasmids for cloning the biosynthetic pathways of tetracycline, chlortetracycline and their derivatives. *Patent US 5866410*.
- Ryan W., Parulekar S.J. (1991) Recombinant protein excretion in *Escherichia coli* JM103 (pUC8): Effects of plasmid content, ethylendiamintetraacetat, and phenethyl alcohol on cell membrane permeability. *Biotechnol. Bioeng.* 37 430-444.
- Ryan W., Parulekar S.J., Stark B.C. (1989) Expression of β -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes – effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* 34 345-352.
- Rye H.S., Glazer A. (1995) Interaction of dimeric intercalating dyes with single-stranded DNA. *Nucleic Acid Res.* 23 1215-1222.
- Saccardo M.B., Grazioli L., Cozzi, E., Sarmientos P, Marcucci F. (1993) Expression, in *Escherichia coli*, of a soluble human tumor necrosis factor receptor. *J. Biotechnol.* 30 367-378.
- Sakai H., Komano T. (1996) DNA replication of IncQ broad-host-range plasmids in GRAM-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 377-382.
- Sakoda H., Imanaka T. (1990) A new way for stabilizing recombinant plasmids. *J.*

- Ferment. Bioeng.* 69 75-78.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed.* CSH Laboratory Press Cold Spring Harbor.
- Sandermann H. (1983) *Membranbiochemie*. Springer Verlag Berlin.
- Sanger F., Tuppy H. (1951) The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin I and II. *Biochem. J.* 49 463-490.
- Sankvist M., Bagdasarian M. (1996) Secretion of recombinant proteins by GRAM-negative bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 505-511.
- Santos M.A.S., Tuite M.F. (1993) New insights into mRNA decoding implications for the heterologous protein synthesis. *Trends Biotechnol.* 11 500-505.
- Satish G., Kavitha S., Chindambaram M. (1998) Fuzzy estimator for plasmid-bearing microorganism. *Bioprocess Eng.* 18 343-346.
- Sato T., Kato C., Horikoshi K. (1995) Effect of high pressure on gene expression by *lac* and *tac* promoters in *Escherichia coli*. *J. Mar. Biotechnol.* 3 89-92.
- Sawers G. (1993) Specific transcriptional requirements for positive regulation of the anaerobically inducible *pfl* operon by ArcA and FNR. *Mol. Microbiol.* 10 737-747.
- Sawers G., Jarsch M. (1996) Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46 1-9.
- Scanlan D.J., Bloye S.A., Mann N.H., Hodgson D.A., Carr N.G. (1990) Construction of *lacZ* promoter probe vectors for use in *Synechococcus*: Application to the identification of CO₂-regulated promoters. *Gene* 90 43-49.
- Scheel J., Ziegelbauer K., Kupke T., Humbel B.M., Noegel A.A., Gerisch G., Schleicher M. (1989) Hisactophilin a histidine-rich actine-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 264 2832-2839.
- Schein C.H. (1989) Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* 7 1141-1149.
- Schein C.H., Boix E., Haugg M., Holliger K.P., Hemmi S., Frank G., Schwalbe H. (1992) Secretion of mammalian ribonucleases from *Escherichia coli* using the signal sequence of murine spleen ribonuclease. *Biochem. J.* 283 137-144.
- Schendel F.J., Baude E.J., Flickinger M.C. (1989) Determination of protein expression and plasmid copy number from cloned genes in *Escherichia coli* by flow injection analysis using an enzyme indicator vector. *Biotechnol. Bioeng.* 34 1023-1036.
- Schledt C., Ebert H., Benckiser G., Ottow J.C.G. (1995) Kompostierung von Pilzmycel aus der Antibiotikaproduktion nach dem Alvahum-Trommelverfahren. 13. DEHEMA Jahrestagung der Biotechnologen. 30. Mai - 1. Juni 1995 Wiesbaden.
- Schmidt T., Friehs K., Flaschel E. (1996) Rapid determination of plasmid copy number. *J. Biotechnol.* 49 219-229.
- Schmidt T., Schleaf M., Friehs K., Flaschel E. (1999a) Hochzellichtefermentation zur Gewinnung von Plasmid DNA für Gentherapie und genetische Impfung. *BIOforum*

22 174-177.

- Schmidt T., Friehs K., Schleef M., Voss C., Flaschel E. (1999b) Quantitative analysis of plasmid forms by agarose and capillary gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 274 235-240.
- Schmidt M., Babu K.R., Khanna N., Marten S., Rinas U. (1999c) Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 68 71-83.
- Schmitt E., Guillon J.M., Meinel T., Mechulam Y., Dardel F., Blanquet S. (1996) Molecular recognition governing the initiation of translation in *Escherichia coli*: A review. *Biochimie* 78 543-554.
- Schoemaker J.M., Markovitz A. (1981) Identification of the gene lon (capR) product as a 94-kilodalton polypeptide by cloning and deletion analysis. *J. Bacteriol.* 147 46-56.
- Schöngarth K., Hitzmann B., Friehs K. (1997) Ein FIA-System zur schnellen Glucosemessung bei Bioprozessen. *Chem. Ing. Tech.* 70 297-299.
- Schörgendorfer K. (1987) *Molekulare Charakterisierung des Levanase-Gens aus B. subtilis*. Dissertation TU Graz.
- Schörgendorfer K., Schwab H., Lafferty R.M. (1987) Nucleotide sequence of a cloned 2.5 kb PstI-EcoRI *Bacillus subtilis* DNA fragment coding for levanase. *Nucleic Acids Res.* 15 9606.
- Schörgendorfer, K. (1995) *Bacillus subtilis sacL* gene for levanase (EC 3.2.1.65) GenBank Accession: Y00485.
- Schorr J., Moritz P., Seddon T., Schleef M. (1995) Plasmid DNA for human gene therapy and DNA vaccines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 772 271-273.
- Schriefer M. (1989) *Bestimmung des Plasmidgehalts und der Plasmidkopienzahl bei der Kultivierung von genetisch modifizierten Mikroorganismen*. Diplomarbeit Universität Hannover.
- Schroeckh V., Kujau M., Knüpfer U., Wenderoth R., Mörbe J., Riesenberg D. (1996) Formation of recombinant proteins in *Escherichia coli* under control of a nitrogen regulated promoter at low and high cell densities. *J. Biotechnol.* 49 45-58.
- Schumann W. (1990) *Biologie bakterieller Plasmide*. Vieweg Braunschweig.
- Schwab H. (1988) Strain improvement in industrial microorganisms. in: Fiechter A. (Ed.) *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 37 129-168.
- Schwab H. (1993) Principles of genetic engineering for *Escherichia coli*. in: Pühler A. (Edt) *Biotechnology Volume 2 Genetic Fundamentals and Genetic Engineering*, 2nd ed. VCH Weinheim 373-426.
- Schwartz H.E., Ulfelder K. (1992) Capillary electrophoresis with LIF detection of PCR fragments using Thiazol Orange. *Anal. Chem.* 64 1737-1740.
- Schwartz H.E., Ulfelder K., Sunzeri F.J., Busch M.P., Brownlee R.G. (1991) Analysis of DNA restriction fragments and PCR products towards detection of the AIDS HIV-1

- virus in blood. *J. Chromat. B* 559 267-275.
- Serwer P., Allen J.A. (1984) Conformation of double-stranded DNA during agarose gel electrophoresis: Fractionation of linear and circular molecules with molecular weights between 3×10^6 and 26×10^6 . *Biochemistry* 23 922-927.
- Seth A., Thompson D., Chen S.M., Papas T.S. (1989) An important vector for the expression of proteins in all three translational reading frames. *Gene Anal. Tech.* 6 97-100.
- Shapira S.K., Chou J., Richaud F.V., Casadaban M.J. (1983) New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a *cloned* gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 25 71-82.
- Sharma U.K. (1993) Insights into plasmid biology. *Curr. Sci.* 64 283-285.
- Sheibani N. (1999) Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 29 77-90.
- Sherman M.Y., Goldberg A.L. (1992) Involvement of the chaperonin DnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 11 71-77.
- Shindo T., Ueda H., Suzuki E., Nishimura H. (1995) A catechol-3,4-dioxygenase gene as a reporter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 314-315.
- Shoham Y., Demain A.L. (1991) Kinetics of loss of a recombinant plasmid in *B. subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 37 927-935.
- Shu S., Shuler M.L. (1992) Amino acid supplementation decreases plasmid retention in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 40 1197-1202.
- Sies H., Schulz W.A., Steenken S. (1996) Adjacent guanines as preferred sites for strand breaks in plasmid DNA irradiated with 193 nm and 248 nm UV-laser light. *J. Photochem. Photobiol. B* 32 97-102.
- Simmons L.C., Yansura D.G. (1996) Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnol.* 14 629-634.
- Simmons L.C., Yansura D.G. (1998) Mutant signal sequences having reduced translational strength. *Patent US 5747662*.
- Simon M.-N., Mutzel R., Mutzel H., Véron M. (1988) Vectors for expression of truncated coding sequences in *Escherichia coli*. *Plasmid* 19 94-102.
- Simon R., Priefer U., Pühler A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1 784-791.
- Skerra A. (1994) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151 131-135.
- Skerra A., Pfitzinger I., Plückthun A. (1991) The functional expression of antibody F_V fragments in *E. coli*: Improved vectors and a generally applicable purification technique. *Bio/Technology* 9 273-278.

- Skogman S.G., Nilsson J. (1984) Temperature-dependent retention of a tryptophan-operon-bearing plasmid in *Escherichia coli*. *Gene* 31 117-122.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150 76-85.
- Sommerville R.L. (1988) The *trp* promoter of *Escherichia coli* and its exploitation in the design of efficient protein production systems. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 6 1-41.
- Sone M., Akiyama Y., Ito K. (1997) Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 272 10349-10352.
- Sonezaki S., Kondo A., Oba T., Ishii Y., Kato Y., Nakayama H. (1994) Overproduction and purification of Lon protease from *Escherichia coli* using maltose-binding protein fusion system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 313-318.
- Spreng S., Dietrich G., Goebel W., Gentschev I. (1999) the *Escherichia coli* hemolysin secretion apparatus: A potential universal antigen delivery system in GRAM-negative bacterial vaccine carriers. *Mol. Microbiol.* 31 1596-1598.
- Srinivasan U., Bell J.A. (1998) A convenient method for affinity purification of maltose binding protein fusion. *J. Biotechnol.* 62 163-167.
- Steers E. Jr., Cuatrecasas P. (1974) β -galactosidase. *Methods Enzymol.* 34 350-358.
- Steidler L., Fiers W., Remaut E. (1994) Efficient specific release of periplasmic proteins from *Escherichia coli* using temperature induction of clone *kil* gene of pMB9. *Biotechnol. Bioeng.* 44 1074-1082.
- Steinbüchel A. (1991) Polyhydroxyalkanoic acids. in: Byrom D. (Edt.) *Biomaterials: Novel materials from biological sources*. Stockton Press New York.
- Stengelin S., Habermann P., Uhlmann E., Seed B. (1994) Method for preparing fusion proteins. *Patent US 5358857*.
- Stephan M. (1993) *Coexpression von Sec- und rekombinanten Proteinen in E. coli*. Diplomarbeit Universität Bielefeld.
- Stephens M.L., Christensen C., Lyberatos G. (1992) Plasmid stabilization of an *Escherichia coli* culture through cycling. *Biotechnol. Prog.* 8 1-4.
- Stiegelmeier C. (1995) *Gewinnung schwer exprimierbarer heterologer Proteine durch Nutzung verschiedener Zellkompartimente von Escherichia coli*. Dissertation Universität Bielefeld.
- Strauch K.L., Beckwith J. (1988) An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 1576-1580.
- Studier F.W., Moffait B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of specific genes. *J. Mol. Biol.* 189 115-130.
- Studier F.W., Davanloo P., Rosenberg A.H., Moffait B.A., Dunn J.J. (1990) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Patent US*

4952496.

- Su T.-Z., Schweizer H., Oxender D.L. (1990) A novel phosphate-regulated expression vector in *Escherichia coli*. *Gene* 90 129-133.
- Sudbery P.E. (1996) The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 517-524.
- Suit J.L., Luria S.E. (1988) Expression of the kil gene of the ColE1 plasmid in *Escherichia coli* Kil- mutants causes release of periplasmic enzymes and of colicin without cell death. *J. Bacteriol.* 170 4963-4966.
- Summers D.K. (1993) Stability of genetic material in prokaryotes. *Biologicals* 21 91-93.
- Summers D.K., Sherratt D.J. (1984) Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36 1097-1103.
- Summers D.K. (1997) *The biology of plasmids*. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- Summers D.K., Beton C.W.H., Withers H.L. (1993) Multicopy plasmid instability: The dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* 8 1031-1038.
- Swartz J.R. (1996) *Escherichia coli* recombinant DNA technology. in: Neidhardt (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press Washington D.C.
- Tabor S., Richardson C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 1074-1078.
- Takizawa N., Shiro H., Hatta T., Nagao K., Kiyohara H. (1991) Extracellular production of *Klebsiella* pullulanase by *Escherichia coli* that carries the pullulanase secretion genes. *Agric. Biol. Chem.* 55 1467-1473.
- Tangney M., Mitchell W.J., Dolberg-Rasmussen M. (1999) Development of a shuttle vector for screening of strong promoter sequences. *Biotechnol. Tech.* 13 141-144.
- Tarczyński M.C., Meyer W.J., Min J.J., Wood K.A., Hellwig R.J. (1994) Two-minute miniprep method for plasmid DNA isolation. *BioTechniques* 16 514-519.
- Teich A., Lin H.Y., Andersson L., Meyer S., Neubauer P. (1998) Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J. Biotechnol.* 64 197-210.
- Teunissen A.W.R.H., Van den Berg J.A., De Steensma H.Y. (1995) Transcriptional regulation of flocculation genes in *Saccharomyces cerevisiae*. 11 435-446.
- Thomas J.G., Ayling A., Baneyx F. (1997) Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant protein from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66 197-239.
- Thompson J.D., Gillespie D. (1990) Current concepts in quantitative molecular hybridization. *Clin. Biochem.* 23 261-266.
- Thompson J.K., McConville K.J., McReynolds C., Collins M.A. (1999) Potential of

- conjugal transfer as a strategy for the introduction of recombinant genetic material into strains of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 1910-1914.
- Thomson J.M., Parrott W.A. (1998) pMECA: A cloning plasmid with 44 unique restriction sites that allows selection of recombinants based on colony size. *BioTechniques* 24 922-928.
- Togna A.P., Shuler M.L., Wilson D.B. (1993) Effects of plasmid copy number and runaway plasmid replication on overproduction and excretion of β -Lactamase from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 9 31-39.
- Tokugawa K., Ishii T., Nakamura K., Masaki H., Uozumi T. (1994) A model system for the continuous production of a heterologous protein using a novel secretion promoting factor which operates in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 37 33-37.
- Travers A.A. (1993) *DNA-Protein interaction*. Chapman and Hall London.
- Tsuchido T., Katsui N., Takeuchi A., Takano M., Shibasaki I. (1985) Destruction of the outer membrane permeability barrier of *Escherichia coli* by heat treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 298-303.
- Tsuchiya K., Miyagi W., Ano T., Shoda M. (1993) Isolation of electric pulse-induced *Escherichia coli* genes by operon fusion techniques. *Biotechnol. Tech.* 7 719-722.
- Turner G. (1994) Vectors for genetic manipulation. *Prog. Ind. Microbiol.* 29 641-660.
- Turpen T.H., Reinl S.J., Charoenvit Y., Hoffman S.L., Fallarme V., Grill L.K. (1995) Malarial epitopes expressed on the surface of recombinant tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 13 53-57.
- Uhlen M., Forsberg G., Moks T., Hartmanis M., Nilsson B. (1992) Fusion Proteins in Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3 363-369.
- Uhlen M., Moks T. (1990) Fusions to *Staphylococcal* Protein A. *Methods Enzymol.* 185 129-143.
- Uhlig H. (1991) *Enzyme arbeiten für uns*. Carl Hanser Verlag München.
- Uden G., Trageser M. (1991) Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by FNR protein. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol.* 59 65-76.
- Uden G., Trageser M., Duchene A. (1990) Effect of positive redox potentials (greater than 400 MV) on the expression of anaerobic respiratory enzymes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4 315-319.
- Van den Hombergh J.P.T.W., Van de Vodervoort P.J.I., Fraissinet-Tachet L., Visser J. (1997) *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: The problem of proteases. *Trends Biotechnol.* 15 256-263.
- Van der Leij F.R., Withold B. (1995) Strategies for the sustainable production of new biodegradable polyesters in plants: A review. *Can. J. Microbiol.* 41 Suppl1 222-238.
- Van der Wal F.J., Konigstein G., Ten Hagen C.M., Oudega B., Luirink J. (1998)

- Optimization of bacteriocin release protein (BRP)-mediated protein release by *Escherichia coli*. random mutagenesis of the pCloDF13-derived BRP gene to uncouple lethality and quasi-lysis from protein release. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 392-398.
- Van der Wal F.J., Oudega B., Kater M.M., Ten Hagen-Jongman C.M., De Graaf F.K., Luirink J. (1992) The stable BRP signal peptide causes lethality but is unable to provoke the translocation of cloacin DF13 across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6 2309-2318.
- Van der Wal F.J., Ten Hagen-Jongman C.M., Oudega B., Luirink J. (1995) Optimization of bacteriocin-release-protein-induced protein release by *Escherichia coli*: Extracellular production of the periplasmic molecular chaperone FaeE. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 459-465.
- Van Hijfte L., Marciniak G., Froloff N. (1999) Combinatorial chemistry, automation and molecular diversity: New trends in the pharmaceutical industry. *J. Chromat. B* 725 3-15.
- Veide A., Lindbäck T., Enfors S.-O. (1984) *Enzyme Microb. Technol.* 6 325-330.
- Velterop J.S., Dijkhuizen M.A., van't Hof R., Postma P.W. (1995) A versatile vector for controlled expression of genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Gene* 153 63-65.
- Vidal-Ingigliardi D., Raibaud O. (1985) The *mac* promoters: Functional hybrid promoters activated by the *malT* product and repressed by the *lacI* product. *Nucleic Acids Res.* 13 1163-1172.
- Vieira J., Messing J. (1982) The pUC plasmids an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19 259-268.
- Vijg J. (1995) Detecting individual genetic variation. *Bio/Technology* 13 137-139.
- Vogel M., Wittmann K., Endl E., Glaser G., Knüchel R., Wolf H., Niller H.H. (1998) Plasmid maintenance assay based on green fluorescent protein and FACS of mammalian cells. *BioTechniques* 24 540-544.
- Von Heijne G. (1994) *Sec*-independent protein insertion into the inner *E. coli* membrane. A phenomenon in search of an explanation. *FEBS Lett.* 346 69-72.
- Voß C. (1997) *Methoden zur DNA-Quantifizierung: Vergleich und Optimierung*. Diplomarbeit Universität Bielefeld.
- Voß C., Schmidt T., Friehs K., Flaschel E. (1998) Vergleich von Methoden zur Quantifizierung von DNA. 16. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*. 26. - 28. Mai 1998 Wiesbaden.
- Vyas V.V., Gupta S., Sharma P. (1994) Stability of a recombinant shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 16 240-246.
- Walsh G., Headon D. (1994) *Protein Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Wan N.C., Goodrick J.C. (1996) Method for increasing plasmid yield. *Patent US 5487986*.

- Wandersman C. (1998) Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res. Microbiol.* 149 163-170.
- Ward A.C., Castelli L.A., Macreadie I.G., Azad A.A. (1994) *Yeast* 10 441-449.
- Ward A.C., Hillier A.J., Davidson B.E., Powell I.B. (1993) Stability analysis of the *Lactococcus lactis* DRC1 lactose plasmid using pulsed-field gel electrophoresis. *Plasmid* 29 70-73.
- Wartell R.M., Hosseini S., Powell S., Zhu J. (1998) Detecting single base substitutions mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *J. Chromat. A* 806 169-185.
- Weaver K.E., Clewell D.B., An F. (1993) Identification characterization and nucleotide sequence of a region of *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive plasmid pAD1 capable of autonomous replication. *J. Bacteriol.* 175 1900-1909.
- Weber A.E., San K.Y. (1989) A comparison of two plating techniques to estimated plasmid stability of a prolonged chemostat culture. *Biotechnol. Tech.* 3 397-400.
- Webster R.E. (1991) The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5 1005-1011.
- Weickert M.J., Doherty D.H., Best E.A., Olins P.O. (1996) Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Curr. Opin Biotechnol.* 7 494-499.
- Weigand R.A., Rothfield L.I. (1976) Genetic and physiological classification of periplasmic-leaky mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 125 340-345.
- Weiss E., Orfanoudakis G. (1994) Application of an alkaline phosphatase fusion protein system suitable for efficient screening and production of Fab-enzyme conjugates in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 33 43-53.
- Wells D.J., McMahon J., Mitchell R., Damien E., Poole A., Wells K.E. (1998) Valuation of plasmid DNA for in vivo gene therapy: Factors affecting the number of transfected fibers. *J. Pharm. Sci.* 87 763-768.
- Weltzien H.R. (1979) Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 559 259-287.
- White T.J. (1996) The future of PCR technology: Diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnol.* 14 478-483.
- Wild J., Walter W.A., Gross C.A., Altman E. (1993) Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* 175 3992-3997.
- William S.G., Cranenburgh R.M., Weiss A.M.E., Wrighton C.J., Sherratt D.J., Hanak J.A.J. (1998) Repressor titration: A novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.* 26 2120-2124.
- Williams M.D., Flickinger M.C. (1990) The possible use of the stringent starvation protein (SSP) promoter of *Escherichia coli* in an expression system for cloned genes. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* 199 Meet. BIOT124.

- Wittchen K.D., Meinhardt F. (1995) Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSK319 by gene replacement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 871-877.
- Wittler J., Friehs K., Flaschel E. (1999) Hisactophilin als Affinitätsträger im Vergleich zu anderen Affinitätskomplementen in Trennverfahren mit Metallchelate-Affinitätsliganden. 17. *DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen*. 27. - 29. April 1999 Wiesbaden.
- Wojcik K., Wieckiewicz J., Kuczma M., Porwit-Bohr Z. (1993) Instability of hybrid plasmids in *Bacillus subtilis*. *Acta Microbiol. Pol.* 42 127-136.
- Wong H., Anderson W.D., Cheng T., Riabowol K.T. (1994) Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: The 'primer-dropping' method. *Anal. Biochem.* 223 251-258.
- Wong P., Gladny S., Keasling J.D. (1997) Mathematical model of the *lac* operon: Inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnol. Prog.* 13 132-143.
- Wrigley-Jones C.A., Richards H., Thomas C.R., Ward J.M. (1993) Stability of plasmid vector pJ303 in *Streptomyces lividans* TK24 during laboratory-scale fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 41 148-155.
- Wrigley-Jones C.A., Richards H., Thomas C.R., Ward J.M. (1992) A method for plasmid copy number determination in recombinant *Streptomyces*. *J. Microbiol. Methods* 16 69-80.
- Wrobel B., Wegrzyn G. (1997) Amplification of pSC101 replicons in *Escherichia coli* during amino acid limitation. *J. Biotechnol.* 58 205-208.
- Wu H.C., Tokunuga M. (1986) Biogenesis of lipoproteins in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125 127-157.
- Wülfing C., Plückthun A. (1994a) Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12 685-692.
- Wülfing C., Plückthun A. (1994b) Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*: Influence of folding catalysts. *J. Mol. Biol.* 242 655-669.
- Xia G., ManeD., Yu Y., Caro L. (1993) *In vivo* and *in vitro* studies of a copy number mutation of the RepA replication protein of plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* 175 4165-4175.
- Yabuta M., Onai-Miuara S., Ohsuye K. (1995) Thermo-inducible expression of a recombinant fusion protein by *Escherichia coli lac* repressor mutants. *J. Biotechnol.* 39 67-73.
- Yamada K., Wang J.C., Osawa H., Scott D.K., Granner D.K. (1998) Efficient large-scale transformation of yeast. *BioTechniques* 24 596-600.
- Yamada M. (1989) Heat shock gene suppressing recombinant vector. *Patent JP* 1228474.

- Yang S., Enfors S.-O. (1996) Process conditions affecting proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 18 7-12.
- Yasukawa K., Saito T. (1990) A new system for the expression of human interleukin-6 in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 12 419-424.
- Yew N.S., Wysokensky D.M., Wang K.X., Ziegler R.J., Marshall J., McNeilly D., Cherry M., Osburn W., Cheng S.H. (1997) Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells. *Hum. Gene Ther.* 8 575-584.
- Yim K.S., Lee S.Y., Chang N.N. (1996) Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 49 495-503.
- Young J.-Y., Flocco M.M., Mowbray S.L. (1993) Leakage of periplasmic enzymes from *envA1* strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 223 739-752.
- Yu P., Aristidou A.A., San K.S. (1991) Synergistic effect of glycine and bacteriocin release protein in the release of periplasmic protein in recombinant *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* 13 311-316.
- Yu P., San K.Y. (1992) Protein release in recombinant *Escherichia coli* using bacteriocin release protein. *Biotechnol. Prog.* 8 25-29.
- Yu P., San K.Y. (1993) Continuous production of cell-free recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 9 587-593.
- Zabeau M., Stanley K.K. (1982) Enhanced expression of Cro- β -Galactosidase fusion protein under the control of P_R promoter of bacteriophage λ . *EMBO Journal* 1 1217-1224.
- Zhang X., Bremer H. (1995) Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp. *J. Biol. Chem.* 270 1181-11189.
- Zhu Z., Zapata G., Shalaby R., Snedecor B., Chen H., Carter P. (1996) High level secretion of a humanized bispecific diabody from *Escherichia coli*. *Bio/Technology.* 14 192-196.

6 Abkürzungen & Symbole

In der vorherrschenden Nomenklatur von Genen und Proteinen werden das jeweilige Operon meist mit einer Kombination von drei Buchstaben abgekürzt. Die Schreibweise von Genen erfolgt in Kleinbuchstaben kursiv. Proteine werden nicht kursiv und der erste Buchstabe groß abgekürzt. Zur genaueren Bezeichnung des Gens wird ein Großbuchstabe oder eine Kombination von Großbuchstaben hinzugefügt, ebenso bei Proteinen. In der folgenden Liste der Abkürzungen sind die Bezeichnungen für das jeweilige Operon aufgeführt, d. h. die ersten drei Buchstaben und nur in Ausnahmen die zusätzliche genauere Bezeichnung des Gens. Die Zuordnung für *Escherichia coli* erfolgt nach BERLYN *et al.*, 1996.

Abkürzung	Bedeutung
ϵ	Spezifischer Extinktionskoeffizient
λ_{PL}	λ -Promotor P _L
λ_{PR}	λ -Promotor P _R
λ	Phage
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
μs	Mikrosekunde
ϕX174	Phage
σ -Faktor	Polymeraseuntereinheit
Ω -CM	Terminator
$^{\circ}\text{C}$	Grad CELSIUS
2-D	Zweidimensional
A	Nukleinsäurebase Adenin
a.u.	<i>arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AGE	Agarosegelelektrophorese
Ala	Alanin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
<i>ams</i>	Gen der Regulation der mRNS- Halbwertszeit

AOT	Sulfobernsteinsäure-bis-2-ethylhexylester
Ap	Ampicillinresistenz
Apal	Restriktionsenzym aus <i>Acetobacter pasteurianis</i>
<i>ara</i>	Teil des Arabinose-Operons
Asp	Asparaginsäure
Aspl	Restriktionsenzym, Isoenzym zu Tth111I aus <i>Thermus thermophilus</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Avall	Restriktionsenzym aus <i>Anabaena variabilis</i>
Avr	Repressor des Isoleucin-Operons
BamHI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Bgl	β -Glucanase
<i>bgl</i>	Gen der β -Glucanase
BgIII	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus globigii</i>
<i>bio</i>	Teil des Biotin-Operons
Bla	β -Lactamase
<i>bla</i>	Gen der β -Lactamase
<i>bol</i>	Teil des Zellteilungs-Operons
Bp	Basenpaar
BRP	Bacteriocin Release Protein
BstEII	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
BTM	Biotrockenmasse
<i>bud</i>	Teil des <i>budding</i> -Operons
C	Nukleinsäurebase Cytosin
C-	Kohlenstoff-
C/N-	Kohlenstoff-Stickstoff-
<i>cad</i>	Teil des Lysin-Operons
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
<i>cat</i>	Gen der Chloramphenicol Acetyltransferase
ccc	<i>covalently closed circular</i>
cDNS	Komplementäre DNS
CE	Kapillarelektrophorese
CFU	Colony forming units
CGE	Kapillargelelektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
Ci	Protease

<i>cl857</i>	Temperatursensitiver λ -Repressor
cis-	auf dem selben DNS-Strang lokalisiert
Clal	Restriktionsenzym aus <i>Caryophanon latum</i>
<i>clmR</i>	Gen der Chloramphenicol Acetyltransferase
CloDF13	BRP aus Cloacinoperon
Clp(Ti)	Protease
CNBr	Bromcyan
ColE1	Plasmid
<i>con</i>	Konsensus
<i>cop</i>	Gen der DNS-Replikation
CP	Caseinpepton
cP	Centi-Poise
<i>csp</i>	Teil des <i>cold shock protein</i> -Operons
<i>cst</i>	Gen eines Streßproteins (<i>starvation</i>)
CTAB	Hexadecyl-trimethylammoniumbromid
C-Terminus	Carboxy-Ende eines Proteins
CUP1	Teil eines Kupfermetabolismus-Operons
D	Raumgeschwindigkeit
dATP	Desoxyadenosin-5'-phosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-phosphat
DegP	Protease
<i>deo</i>	Teil des Deoxyribose-Operons
dGTP	Desoxyguanosin-5'-phosphat
DIN	Deutsche Industrienorm
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DnaJ	Chaperon
DnaK	Chaperon
DNS	Desoxyribonucleinsäure
Do	Protease
Drall	Restriktionsenzym aus <i>Deinococcus radiophilus</i>
Dsb	Faltungsprotein
dTTP	Desoxythymidin-5'-phosphat.
<i>ebv</i>	Teil eines Zellwand-Operons
EC JM103	Plasmid
EcoRI	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure

EE-AU	<i>Escherichia coli</i> Extrakt aus Autolyse
EE-HO	<i>Escherichia coli</i> Extrakt aus Homogenisat
EPG	Elektropherogramm
<i>eps</i>	Sekretions-Operon
EtBr	Ethidiumbromid
ETM	Extrakttrockenmasse
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
<i>exe</i>	Sekretions-Operon
Fa	Protease
<i>fab</i>	Teil des Fettsäure-Operons
FDA	Food and drug administration
F-Faktor	Plasmid
<i>fic</i>	Teil des Zellteilungs-Operons
FP1	Fusionspartner 1
FP2	Fusionspartner 2
g	Gramm
G	Nukleinsäurebase Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBIIb/IIIa	<i>human platelet glycoprotein</i>
G-CSF	<i>colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
<i>gln</i>	Teil des Glutamin-Operons
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GM-CSF	<i>colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>
GMP	Good manufacturing practice
GroEL	Chaperon
GroES	Chaperon
GrpE	Chaperon
h	Stunde
H16-Medium	Minimalmedium
HCl	Salzsäure
HE	Hefeextrakt
HincII	Restriktionsenzym aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HindIII	Restriktionsenzym aus <i>Hämophilus influenza</i>

His	Histidin
His ₆	Histidinpeptid
<i>hly</i>	Teil des Hämolyisin-Operons
<i>hok</i>	Teil eines Plasmidstabilisierungs-Operons
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
Hrp	Protein des Helicase-Operons
HtrA	Protease
IB	Inclusion Bodies
ID	Innendurchmesser
IDA	Imidodiessigsäure
IgA	Immunglobulin A
Ile	Isoleucin
In	Protease
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
<i>kat</i>	Teil des Katalase-Operons
kb	<i>kilobase</i>
kBp	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
KD3	Dritte Domäne des L-Kininogens
KFE	Kolonieformende Einheit
kg	Kilogramm
Kil	Bacteriocin Freisetzungprotein
Km ^R	Kanamycinresistenz
KpnI	Restriktionsenzym aus <i>Klebsiella pneumonia</i>
L	Liter
La	Protease
<i>lac</i>	Teil des β-Galactosidase-Operons
<i>lacI</i>	Gen des Repressors des β-Galactosidase-Operons
<i>lacI^f</i>	Mutante des Gen des Repressors des β-Galactosidase-Operons
LacI ^{ts}	Repressormutante des β-Galactosidase-Operons
<i>lacL</i>	Gen der Levanase
<i>lacZ</i>	Gen der β-Galactosidase
LamB	Maltoporin der äußeren Membran
LB	Luria-Bertani

Lep	Protein einer Sekretionsmaschinerie
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
LipB	Chaperon
<i>lky</i>	Mutation für <i>leakage of periplasmic proteins</i>
<i>lon</i>	Gen der Protease La
Lon	Protease
lpp	<i>Gen des Lipoprotein der äußeren Membran</i>
Lpp	Lipoprotein der äußeren Membran
Lsp	Protein einer Sekretionsmaschinerie
Lsp	Signalpeptidase
LTF	Lehrstuhl für Fermentationstechnik
<i>lux</i>	Gen der Luciferase
Lys	Lysin
M	Molarität
M	Molmasse
M13	Phage
m ⁻³	Kubikmeter
M9-(GN)	M9-Medium mit Glucose und NaCl
M9-Medium	Minimalmedium
mA	Milliampere
mac	<i>Hybridpromotor</i>
<i>mal</i>	Teil des Maltose-Operons
MalE	Maltose-Bindeprote
MCS	Multiple Cloning Site
Me	Metall
Met	Methionin
mg	Milligramm
<i>mgl</i>	Teil des Methylgalactosidase-Operons
MI	Protease
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
<i>mob</i>	Gen der Plasmidmobilisierung
<i>mob</i>	Gen des konjugalen Transfers
MPa	Megapascal
MPI	MAX-PLANCK- Institut

mRNS	Boten-RNS
MTB	<i>Main Terminal Branch</i> eines Sekretionspfades
<i>mur</i>	Teil des Murein-Operons
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid
<i>nar</i>	Teil des Nitratreduktase-Operons
Neo ^R	Neomycinresistenz
ng	Nanogramm
<i>nif</i>	Teil des Stickstofffixierungs-Operons
<i>nir</i>	Teil des Fumarat-Nitrat-Reduktase-Operons
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NotI	Restriktionsenzym aus <i>Nocardia otidis-caviarum</i>
NsiI	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria sicca</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoende eines Proteins
oc	<i>open circle</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
<i>omp</i>	Teil des Outer-membrane-protein-Operons
OmpT	Protease
<i>ori</i>	Replikationsursprung
<i>out</i>	Sekretions-Operon
P	Promotor
P1	Phage
P15A	Plasmid
P2F	Phage
pAA182	Plasmid
pACYC	Plasmid
PADAC	{7-(Thienyl-2-acetamido)-3-[2-(4-N,N-dimethylaminophenylazo) pyridinium-methyl]-3-cephem-4 Carbonsäure}
Par	Protein eines Plasmidpartitionierungs-Operons
<i>par</i>	Teil eines Plasmidpartitionierungs-Operon
PAS	Gen des <i>protein secretion factor</i>
pASK	Plasmid
pBCSK+	Plasmid
pBR:02	Plasmid

pBR322	Plasmid
pBR325	Plasmid
pCMV-S2S	Plasmid
PcopB	Konstitutiver Regulationspromotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDC	Pentadentat Chelator
pDH1	Plasmid
pDR1311	Plasmid
pEcoR4	Plasmid
PEG	Polyethylenglykol
PeIB	Pectatlyase
pET20b+	Plasmid
pET-bgl-sec	Plasmid
pEX-5X	Plasmid
<i>pfl</i>	Teil des Pyruvat-Formiat-Lyase-Operons
pg	Picogramm
pGF-1	Plasmid
pGFP	Plasmid
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PhoA	Alkalische Phosphatase
<i>phoA</i>	Gen der alkalischen Phosphatase
Pi	Protease
pIMS5cDH516	Plasmid
<i>pin</i>	Gen der Prophagenreplikation
pIN-III-ompA	Plasmid
pJF118-EH	Plasmid
pJMC40	Plasmid
pJMC40ins	Plasmid
pKF4	Plasmid
pKF5	Plasmid
pLF3	Plasmid
pML5	Plasmid
pMON15906	Plasmid
pMTC48	Plasmid

pORN108	Plasmid
pOU130	Plasmid
pOU71	Plasmid
pOU79	Plasmid
pQE-41W	Plasmid
Prc	Protease
pRK248	Plasmid
PrIA	Protein einer Sekretionsmaschinerie
PrID	Protein einer Sekretionsmaschinerie
PrIG	Protein einer Sekretionsmaschinerie
Pro	Prolin
<i>pro</i>	Teil des Prolin-Operons
pRS201L-Tc	Plasmid
pSC101	Plasmid
pSL1180	Plasmid
PstI	Restriktionsenzym aus <i>Providencia stuartii</i>
pUC	Plasmidfamilie
pUC12	Plasmid
pUC18	Plasmid
pUC18/19	Plasmid
pUC18:15	Plasmid
pUC18lon	Plasmid
pUC19	Plasmid
pUC21	Plasmid
<i>pul</i>	Teil des Pullulanase-Operons
pWEH1	Plasmid
R1	Plasmid
R100	Plasmid
R483	Plasmid
R6K	Plasmid
<i>rac</i>	Hybridpromotor
RBS	Ribosomale Bindungsstelle
Re	Protease
Re	Protease
RE	Restriktionsenzym
<i>rec</i>	Gen der DNS-Replikation

RecA	Protease
<i>relA</i>	Gen der Kontrolle der Plasmid-Replikation
REM	Rasterelektronenmikroskopie
<i>rep</i>	Gen der Plasmidreplikation
RepA	Protein der Plasmidreplikation
<i>res</i>	Gen der DNS-Reparatur
RK2	Plasmid
RK2	Plasmid
RNS	Ribonukleinsäure
RP4	Plasmid
<i>rrn</i>	Teil des RNS-Operons
s	Sekunde
SacI	Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces achromogenes</i>
SalI	Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces albus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sec</i>	<i>Secretion</i>
Sec61p	Membranprotein
SecA	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecB	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecD	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecE	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecF	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecG	Protein einer Sekretionsmaschinerie
SecY	Protein einer Sekretionsmaschinerie
Skp	Chaperon
Smal	Restriktionsenzym aus <i>Serratia marcescens</i>
So	Protease
sok	Teil eines Plasmidstabilisierungs-Operons
Sop	Protein eines Plasmidpartitionierungs-Operons
<i>sop</i>	Teil eines Plasmidpartitionierungs-Operons
SP1	Synthetische Signalsequenz
SP3	Synthetische Signalsequenz
SpA	<i>Staphylococcus</i> Protein A
SpeI	Restriktionsenzym aus <i>Sphaerotilus sp.</i>
SppA	Protease
sps	Sekretions-Operon

SRP	Signal Recognition Particle
<i>ssb</i>	Gen des <i>single strand binding</i> Proteins
<i>ssp</i>	Gen des <i>stringent starvation protein</i>
StII	Hitzestabiles Enterotoxin II
StuI	Restriktionsenzym aus <i>Streptomyces tubercidicus</i>
SulA	Protein der Zellteilung
T	Nukleinsäurebase Thymin
t	Tonne
t	Zeit
T1	Phage
T3	Phage
T4	Phage
T5	Phage
T7	Phage
<i>tac</i>	<i>trp-lac</i> -Hybrid
TAE-	Tris-Acetat-EDTA-
TATA-Box	Teil eines Promotors
TB	Terrific Broth
TB-(GN)	<i>Terrific Broth</i> mit Glucose und NaCl
TBE-	Tris-Borat-EDTA-
TCI	Institut für Technische Chemie
Tc ^R	Tetracyclinresistenz
t _d	Verdopplungszeit
TE-	Tris-EDTA-
<i>ter</i>	Terminus
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TGGE	Temperaturgradient- Gelelektrophorese
T _{lpp}	Terminator des <i>lpp</i> -Operons
Tn100	Transposon
<i>tnp</i>	Teil des Transposase-Operons
<i>tol</i>	Teil des Bacteriocin-Toleranz-Operons
ToIC	Membranprotein
TPE-	Tris-Phosphat-EDTA-
<i>tra</i>	Gen des konjugalen Transfers
TRAM	Membranprotein
trans	auf einem anderen DNS-Strang lokalisiert

<i>trc</i>	Hybridpromotor
<i>trfA</i>	Gen der Plasmid-Replikation
Tri	Triton X-100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure
<i>trp</i>	Teil des Tryptophan-Operons
Trp	Tryptophan
Tsp	Protease
Tyr	Tyrosin
U	Nukleinsäurebase Uracil
<i>ugp</i>	Gen des Glycerintransports
<i>usp</i>	Gen des <i>universal stress protein</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
ValS	Valyl-tRNS Synthetase
<i>vgb</i>	Gen des Hämoglobins aus <i>Vitreoscilla</i>
<i>vhb</i>	Gen des Hämoglobins aus <i>Vitreoscilla</i>
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen
www	World Wide Web, Internetadresse
<i>xapA</i>	Gen des Xanthosin-Operons
XbaI	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas badrii</i>
<i>xcp</i>	Sekretions-Operon
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
XhoI	Restriktionsenzym aus <i>Xanthomonas holicola</i>
<i>xps</i>	Sekretions-Operon
<i>xylE</i>	Gen der Catechol-3,4-dioxygenase
YO-PRO	1-(4-[3-Methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-chinolinium)-3-trimethylammonium-propan-diiodid
YOYO	1,1'-(4,4,7,7-Tetramethyl-4,7-diazadecamethylen)-bis-4-[3-methyl-2,3-dihydro-(benzo-1,3-oxazol)-2-methyliden]-chinolinium-tetraiodid
ZTG	Zelltrockengewicht
ZZ	Dimer der IgG-bindenden Domäne des SpA