

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER



Janna-Eleni Muus

**Herstellung eines Produktionsstammes zur
optimierten Expression von rekombinanten
Proteinen aus *Plasmodium falciparum* in
*Tetrahymena thermophila***

-2010-

Biologie

**Herstellung eines Produktionsstammes zur optimierten
Expression von rekombinanten Proteinen aus
Plasmodium falciparum in *Tetrahymena thermophila***

-2010-

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von
Janna-Eleni Muus
aus Hannover**

-2010-

Dekan: Prof. Dr. C. Klämbt
Erster Gutachter: Prof. Dr. E. Liebau
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Lüersen
Tag der mündlichen Prüfung: ...28.07.2010.....
Tag der Promotion: 22.10.2010.....

für die, die an mich geglaubt haben

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
DANKSAGUNG	X
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Plattformen zur Produktion rekombinanter Wirkstoffe.....	1
1.2 <i>Tetrahymena thermophila</i>	5
1.2.1 Genetische Besonderheiten von <i>Tetrahymena thermophila</i>	7
1.3 Biotechnologisches Potenzial von <i>T. thermophila</i>	10
1.4 <i>Tetrahymena thermophila</i> als heterologes Expressionssystem für die Herstellung potenzieller Malaria Vakzine	12
1.5 Malaria	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit:	24
2. MATERIAL	25
2.1 Organismen	25
2.1.1 Eingesetzte <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Stämme.....	25
2.1.2 Eingesetzte <i>Tetrahymena thermophila</i> Stämme	25
2.2 Eingesetzte <i>primer</i>	25
2.3 Eingesetzte Vektoren	26
2.3.1 In dieser Arbeit hergestellte Plasmidkonstrukte	27
2.4 Herkunft der verwendeten Chemikalien.....	29
2.5 Herkunft der verwendeten Antibiotika.....	31
2.6 Herkunft der verwendeten Enzyme	31
2.7 Medien für <i>E. coli</i>	31
2.8 Medien für <i>T. thermophila</i>	32
2.9 Puffer und Lösungen.....	34
2.10 Stammlösungen	36
2.11 Herkunft der verwendeten Antikörper	37
2.12 Herkunft der verwendeten Marker	38
2.12.1 Protein-Größenstandards	38
2.12.2 DNA-Größenstandards.....	38
2.13 Herkunft der verwendeten Kits	39
2.14 Herkunft der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	39
2.15 Herkunft der verwendeten Geräte	39

2.15.1 Zentrifugen.....	40
2.15.2 Datenbanken und Computerprogramme	40
3. METHODEN	42
3.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien und Ciliaten	42
3.1.1 Stammhaltung von <i>Escherichia coli</i>	42
3.1.2 Stammhaltung von <i>Tetrahymena thermophila</i>	42
3.1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	43
3.1.4 Kultivierung von <i>T. thermophila</i>	43
3.2 Bestimmung der Zelldichte bei <i>T. thermophila</i>	43
3.3 Transformation von Bakterien und Ciliaten.....	44
3.3.1 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	44
3.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation.....	44
3.3.3 Die <i>biolistic transformation</i> von <i>T. thermophila</i>	44
3.4 Selektion der <i>T. thermophila</i> Transformanten.....	47
3.5 Klonierung von DNA.....	47
3.5.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	47
3.5.2 Reinigung von DNA mit dem Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices.....	48
3.5.3 Isolierung der Gesamt-DNA aus <i>T. thermophila</i>	48
3.5.4 Plasmid-Isolierung mit dem FastPlasmid® Mini Kit.....	48
3.5.5 Midi und Maxi-Präparation mit dem HiSpeed™ Plasmid Kit	48
3.5.6 Restriktion	49
3.5.7 Ligation	49
3.5.8 Rekombination mittels Cre-Rekombinase (Crelox-Verfahren)	49
3.6 Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>T. thermophila</i>	49
3.7 PCR-Methoden	50
3.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	50
3.7.2 RT-PCR	50
3.8 Sequenzierung von DNA.....	50
3.9 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	51
3.10 Elektrophorese und Färbung von Proteinen	51
3.10.1 Aufbereitung des Probenmaterials	51
3.10.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
3.10.3 Western Blot Analyse	52
3.10.4 Wiederholte Detektion von Western Blots (<i>Stripping</i>)	53
3.11 Quantifizierung von rekombinant exprimierten Proteinen aus <i>T. thermophila</i>	53
3.12 Enzym-Tests	54
3.12.1 Isocitratdehydrogenase-Test	54

3.12.2	BAPNA-Assay	55
3.12.3	Azocasein-Test	55
3.12.4	Enzymtest für die β -Hexosaminidase	56
3.12.5	Enzymtest für Saure Phosphatase	57
3.13	Fermentation.....	57
3.14	Sicherheitsbestimmungen	59
4.	ERGEBNISSE	60
4.1	Herstellung von Vektoren zur rekombinanten Produktion <i>plasmodialer</i> Antigene mittels <i>Tetrahymena thermophila</i>	60
4.1.1	Design und Klonierung der MSP-1 und Var2CSA Expressionskassetten	60
4.1.2	Konzept der Expressionsvektoren	63
4.1.3	Molekulare Verifizierung der <i>T. thermophila</i> Transformanten	64
4.1.4	Expression der auf MSP-1 und Var2CSA basierenden Antigene mittels <i>T. thermophila</i>	66
4.2	Konstruktion eines Protease- <i>knock-out</i> Vektors	71
4.2.1	Molekulare Verifizierung der konstruierten Protease- <i>knock-out</i> Stämme Ttp22X-BBM.....	73
4.2.2	Analyse der Sekretion von Proteasen.....	74
4.2.3	Analyse der Aktivitäten anderer extrazellulärer Enzyme	77
4.2.4	Analyse der BBM-Expression des neu konstruierten Protease- <i>knock-out</i> -Stammes	79
4.2.5	Wachstumsanalyse	81
4.3	Optimierung der Kultivierungsprozesse für den Produktionsstamm Ttp22X-BBM5	83
4.3.1	Auswahl des optimalen Nährmediums.....	83
4.3.2	Ermittlung der optimalen Kultivierungsdauer und Regulation der Genexpression	84
4.3.3	Inhibierung der extrazellulär auftretenden Proteaseaktivität	85
5.	DISKUSSION	91
5.1	Entwicklung der Malaria Antigen Konstrukte	91
5.2	Produktion von Malaria Antigenen mithilfe des <i>Tetrahymena thermophila</i> Expressionssystems	98
5.2.1	Konstruktion und Anwendung eines Protease- <i>knock-out</i> Vektors zur Verbesserung der Ausbeute an extrazellulären rekombinanten Malaria Antigenen.....	102
5.3	Optimale Paramterauswahl zur Kultivierung des Produktionsstammes Ttp22X-BBM5	108

6.	AUSBLICK.....	113
7.	ZUSAMMENFASSUNG	116
8.	LITERATURVERZEICHNIS	117
9.	ANHANG	129
9.1	Systematische Einordnung von <i>Tetrahymena thermophila</i> und <i>Plasmodium falciparum</i> nach Westheide und Rieger 1996.....	129
9.2	Phylogenetische Verwandtschaft von <i>Plasmodium</i> und <i>Tetrahymena</i>	129
9.3	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	130
9.4	Grafische Darstellung der Plasmidkarten	131
9.5	Tabellen	135
9.6	BBM-Zielgenesequenz.....	138
9.7	Cystein-Protease Sequenz (22kD) aus <i>T. thermophila</i>	140

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: <i>Tetrahymena thermophila</i> (Rasterelektronenmikroskopaufnahme).....	6
Abb. 2: Konjugation von <i>T. thermophila</i>	9
Abb. 3: Glykosylierungsmuster verschiedener Expressionssysteme.....	11
Abb. 4: Vakzinkandidaten Antigene	17
Abb. 5: Schematische Darstellung eines Merozoiten und der Invasion in den Erythrozyten	18
Abb. 6: Schematische Darstellung des Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1)	20
Abb.7: Schematische Darstellung der var-Gen Domänen und ihre bekannten Interaktionen	22
Abb. 8: Schematische Darstellung der <i>duffy binding like</i> Domänen des Var2CSA.....	22
Abb. 9: Detektions-Reagenzien	37
Abb. 10: Schematischer Ablauf der <i>biolistic transformation</i> und Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems	47
Abb. 11: Darstellung des Sixfors®-Multi-Fermentersystems.....	57
Abb. 12: Multivalente auf MSP-1Block2 basierende Konstrukte	61
Abb. 13: Konstruktion der Var2CSA basierenden Expressionskassetten.....	63
Abb. 14: Molekulare Verifizierung der generierten <i>T. thermophila</i> Transformanten.....	65
Abb. 15: Expressionsanalysen der auf MSP-1Block2 basierenden Transformanten.....	67
Abb. 16: Repräsentative Quantifizierung für die analysierten Stämme TtpAX-BB, TtpKOIX-BB, TtpAX-BBM und TtpKOIX-BBM.	68
Abb. 17: Expressionsanalysen der auf Var2CSA basierenden Transformanten.....	69
Abb. 18: Repräsentative Darstellung einer quantitativen Western Blot Analyse für die analysierten Stämme TtpAX-DBL2, TtpKOIX-DBL2, TtpAX-DBL3 und TtpKOIX-DBL3.....	70
Abb. 19: Region der ausgewählten Cystein-Protease und die Bereiche der eingesetzten primer	71
Abb. 20: Protease- <i>knock-out</i> Vektor	72
Abb. 21: Hybridisierungsbereich spezifischer primer mit der Wildtyp-cDNA der 22kD-Protease.....	73
Abb. 22: Darstellung der molekularen Verifizierung der konstruierten Protease- <i>knock-out</i> Stämme Ttp22X-BBM 5 und 6 und des <i>T. thermophila</i> Wildtyps 1868.4	74
Abb. 23: Beispiel für einen repräsentativen BAPNA-Test	75
Abb. 24: Darstellung eines repräsentativen Azocasein-Tests	77
Abb. 25: Darstellung eines repräsentativen auf Para-Nitrophenol basierenden Enzymtests zur Bestimmung der extrazellulären Beta-Hexosaminidase-Aktivität.....	78
Abb. 26: Darstellung eines repräsentativen auf Para-Nitrophenol basierenden Enzymtests zur Bestimmung der extrazellulären Saure-Phosphatase-Aktivität	78
Abb. 27. Western Blot Analyse des zellfreien Kulturüberstandes.....	80

Abb. 28: Repräsentativer ICDH-Test zur Bestimmung des Ausmaßes an Zellyse während der Gewinnung des Überstandes.....	81
Abb. 29: Wachstumskinetik für Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM.....	82
Abb. 30: Repräsentative Analyse verschiedener Kulturmedien.....	83
Abb. 31: Darstellung einer Western Blot Quantifizierung des Stammes Ttp22X-BBM5 nach Kultivierung in unterschiedlichen Medien	84
Abb. 32: Repräsentativer Immunoblot des Protease- <i>knock-out</i> Stammes zur Analyse der optimalen Kultivierungsdauer und Regulation der Genexpression	85
Abb. 33: Beispiel eines Immunoblots des Protease- <i>knock-out</i> Stammes Ttp22X-BBM5 zur Analyse der Effizienz weiterer Proteaseinhibitoren im Vergleich zu E-64.....	86
Abb. 34: Repräsentativer Immunoblot zum Austesten der optimal einzusetzenden E-64 Konzentration	87
Abb.35: Dreifachbestimmung einer im fed-batch-Verfahren aufgenommenen Wachstumskinetik des Ttp22X-BBM5	88
Abb. 36: Beispiel einer Western Blot Quantifizierung für Ttp22X-BBM5 nach einer <i>batch</i> - und einer <i>fed-batch</i> -Fermentation.....	90
Abb. 37: Phylogenetischer Stammbaum.....	129
Abb. 38: Lebenszyklus von <i>Plasmodium spp.</i>	130
Abb. 39: Genetische Karten der konstruierten Klonierungsvektoren pDL-BB und pDL-BBM sowie der episomalen Vektoren pAX-BB, pAX-BBM und der integrativen Vektoren pKOIX-BB, pKOIX-BBM.....	132
Abb. 40: Genetische Karten der konstruierten Klonierungsvektoren pDL-DBL2 und pDL-DBL3 sowie der episomalen Vektoren pAX-DBL2, pAX-DBL3 und der integrativen Vektoren pKOIX-DBL2, pKOIX-DBL3	133
Abb. 41: Genetische Karten der konstruierten Protease- <i>knock-out</i> Vektoren p22X und p22X-BBM	134

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: BBM-spezifische, monoklonale Primärantikörper	37
Tabelle 2.2: Monoklonaler Primärantikörper zur Detektion des V5-tags der DBL-Domänen	38
Tabelle 2.3: Polyklonale, DBL-spezifische Primärantikörper	38
Tabelle 2.4: Eingesetzte Zweitantikörper	38
Tabelle 9.1: Zellzahlen zur Wachstumskinetik von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM	135
Tabelle 9.2: Extrazelluläre Proteaseaktivität(U/l) von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM ermittelt durch einen BAPNA-Test.....	135
Tabelle 9.3: Extrazelluläre Proteaseaktivität (%) von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM ermittelt durch einen Azocasein-Test.....	136
Tabelle 9.4: Saure-Phosphatase-Aktivität (U/l) von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM	136
Tabelle 9.5: Beta-Hexosaminidase-Aktivität (U/l) von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM....	136
Tabelle 9.6: Relative ICDH-Aktivität (%) von Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM	137
Tabelle 9.7: Zellzahlen zur <i>fed-batch</i> -Fermentation des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5.....	137

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	→ Abbildung	min	→ Minuten
<i>AmpR</i>	→ Ampicillinresistenzgen	ml	→ Milliliter
APS	→ Ammoniumperoxidsulfat	mM	→ Millimol
Aqua dest.	→ Aqua destillata	mRNA	→ messenger RNA
BAPNA	→ Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid	MSP	→ <i>Merozoite Surface Protein</i>
bp	→ Basenpaare	<i>MTT₁</i>	→ Metallothionein-Gen 1
BB	→ Block1-Block2	MVI	→ <i>Malaria Vaccine Initiative</i>
BBM	→ Block1-Block2-MSP1 ₁₉	neo2	→ Paromomycinresistenzkassette
<i>BTU₂</i>	→ Beta-Tubulin-Gen 2	µg	→ Mikrogramm
bzw.	→ beziehungsweise	µl	→ Mikroliter
BSA	→ <i>Bovine Serum Albumin</i>	NC	→ Nitrocellulose
cDNA	→ complementary DNA	NIH	→ <i>National Institutes of Health</i>
CIDR	→ <i>Cysteine-rich Inter Domain</i>	nm	→ Nanometer
<i>CmR</i>	→ Chloramphenicolresistenzgen	o. ä.	→ oder ähnlich(es)
°C	→ Grad Celsius	o. g.	→ oben genannt
CDM	→ Chemisch definiertes Medium	PAGE	→ Polyacrylamidgelelektrophorese
CSA	→ Chondroitinsulfat A	PBS	→ <i>Phosphat Buffered Saline</i>
CSP	→ Circumsporozoit Protein	PCR	→ Polymerasekettenreaktion
DBL	→ <i>Duffy Binding Like</i>	PfEMP	→ <i>Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein</i>
DHFR	→ Dihydrofolatreduktase	pH	→ Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
DNA	→ Desoxyribonukleinsäure	pO ₂	→ Sauerstoffpartialdruck
DNase	→ Desoxyribonuklease	rDNA-ori	→ aus einem rDNA Mini-Chromosom stammender Replikationsursprung für <i>Tetrahymena thermophila</i>
dNTP	→ 2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat	RNA	→ Ribonukleinsäure
DTT	→ 1,4-Dithiothreitol	rpm	→ <i>rounds per minute</i>
DMSO	→ Dimethylsulfoxid	RT	→ Raumtemperatur
E-64	→ L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino)butane	RT-PCR	→ ReverseTranskriptions PCR
EGF	→ <i>epidermal growth factor</i>	<i>sacB</i>	→ Levansucrasegen
ER	→ Endoplasmatisches Reticulum	SDS	→ Natriumdodecylsulfat
g	→ Gramm	s. o.	→ siehe oben
<i>g</i>	→ Erdbeschleunigung	SP	→ Signalpeptid
ggf.	→ gegebenenfalls	SPP	→ <i>Supplemented Proteose Pepton</i>
Glc	→ Glukose	TCA	→ Trichloressigsäure
GlcNAc	→ N-Acetylglukosamin	TEMED	→ Tetramethyldiamin
GOI	→ <i>gene of interest</i>	Tris	→ Trihydroxymethylaminomethan
GPI	→ Glykosylphosphatidylinositol	TS	→ Thymidylat-Synthase
GRAS	→ <i>Generally regarded as safe</i>	U	→ Enzymeinheit (Units)
h	→ Stunde	u. a.	→ unter anderem
<i>H4-1</i>	→ Histon-Gen 4-1	UTR	→ Untranslatierte Region
HRP	→ <i>Horse Raddish Peroxydase</i>	UV	→ Ultraviolett
ICDH	→ Isocitratdehydrogenase	Ü	→ Überstand
ICAM	→ <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>	ü.N.	→ über Nacht
IES	→ <i>Internally eliminated sequences</i>	V	→ Volt
Ig	→ Immunglobulin	Vdf.	→ Verdünnungsfaktor
KAHRP	→ <i>Knob Associated Histidin-rich Protein</i>	vgl.	→ vergleiche
<i>KanR</i>	→ Kanamycinresistenzgen	v/v	→ Volumen pro Volumen
kb	→ Kilobasen	WHO	→ <i>World Health Organisation</i>
kD	→ Kilodalton	w/v	→ Masse pro Volumen
l	→ Liter	Z	→ Zellen
LB	→ Luria-Bertani-Medium	z. B.	→ zum Beispiel
M	→ Mol		
mA	→ Milliampere		
Mb	→ Megabasen		
mg	→ Milligramm		

Symbole für Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich besonders bei Frau Prof. Dr. Eva Liebau für die Übernahme der Begutachtung und Betreuung dieser Arbeit und die stets freundlichen und hilfreichen Besprechungen, die zu jeder Zeit möglich waren.

Herrn Prof. Dr. Kai Lüersen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank geht an den Vorstand der Cilian AG, Dr. Marcus Hartmann und Remco Brand, für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die Möglichkeit die Laboreinrichtungen des biotechnologischen Unternehmens Cilian AG nutzen zu können, sowie für ihre Unterstützung und Diskussionen bezüglich des Projekts.

Außerdem gilt mein Dank unseren Kooperationspartnern der Universität von Edinburgh und der Universität von Kopenhagen, insbesondere Prof. Dr. David Cavanagh und Dr. Graeme Cowan sowie Prof. Dr. Thor Theander und seiner Arbeitsgruppe, ohne die das Projekt nicht möglich gewesen wäre. In diesem Zusammenhang bedanke ich mich ebenfalls bei der Europäischen Kommission, welche die Finanzierung des Projekts ermöglichte.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an Dr. Ulrike Bockau, für ihre nie endende Hilfsbereitschaft, die wunderbare wissenschaftliche Betreuung, die aufbauenden Worte, wenn es im Labor oder zuhause mal nicht lief und dafür, dass es privat und beruflich nie langweilig wurde.

Weiterhin möchte ich mich bei allen weiteren Projektleitern der Cilian AG bedanken. Insbesondere bei Dr. Ingo Aldag für die schnelle Hilfe bezüglich aller Computerfragen aber auch für die Unterstützung durch seinen wissenschaftlichen Sachverstand. Dr. Jenny Apelt danke ich ebenfalls für ihre wissenschaftliche Unterstützung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit. Auch Christine Sachse gilt mein besonderer Dank für ihre wissenschaftlichen Anregungen, aber vor allem für ihre private Unterstützung und Motivation nicht aufzugeben. Des Weiteren gilt mein

Dank dem Rüdi, der immer für eine außerordentliche Atmosphäre im Büro gesorgt hat.

Ferner bedanke ich mich bei dem restlichen Team der Cilian AG, vor allem bei Katja Brinkert, die es immer wieder schaffte aus einer eintönigen Transformation eine herrliche Geschichte zu zaubern, bei Sandra Neumann, Kathrin Schildmann und Jasmin Schmidt für ihre großartige Hilfe im Labor und ihr Verständnis für gestresste Doktoranden, sowie bei Jan Rossdorf, vor allem für seine fachliche Unterstützung bei der Fermentation.

Ein weiterer Dank geht natürlich an all meine Freunde, wie Yvonne Zirra, Kathrin Erlebach, Angela Spiegel, Theresa Oehler, Achim Gildehaus und viele mehr, ohne deren moralische und psychische Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre. Vor allem möchte ich mich hierbei bei Nina Bergmann bedanken, für ihre kritische Korrektur meiner Arbeit, aber auch für die entspannenden und lustigen Wochenenden, die mich immer wieder aufgebaut haben. Auch Yvonne Flerlage gilt ein besonderer Dank, da sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand, nicht nur wenn es um Formatierungsfragen ging.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die einfach immer an mich geglaubt und mir die nötige Kraft zum Durchhalten gegeben haben.

Ein besonderes Dankeschön geht nicht zuletzt an Arne Gels, der mit seiner Liebe und seinem Verständnis auch in den anstrengendsten Zeiten immer für mich da war.

1. Einleitung

1.1 Plattformen zur Produktion rekombinanter Wirkstoffe

Die Bereitstellung von rekombinanten Proteinen für die Wissenschaft und Industrie, aber auch für die medizinische Diagnostik und Therapie, stellt ein zentrales Anliegen der Biotechnologie dar. Die möglichen Verwendungen rekombinanter Proteine sind breit gefächert und reichen von der Nutzung industrieller Enzyme bis hin zum Einsatz pharmazeutisch relevanter Proteine wie Antikörper oder Impfstoffe. Aufgrund modernster Verfahren ist es heutzutage möglich, eine Vielzahl der für den Markt interessanten Arzneimittel rekombinant zu produzieren. Derzeit sind nach Recherchen des Verbandes der forschenden Pharma-Unternehmen (Stand: 04.03.2010) mindestens 138 Arzneimittel in Deutschland zugelassen, darunter 15 Impfstoffe, die gentechnisch hergestellt werden. Das entspricht etwa vier Prozent aller zugelassenen Wirkstoffe, dabei beträgt der Anteil an rekombinanten Arzneimitteln an Neuzulassungen jährlich ungefähr 20%.

Verschiedene heterologe Produktionsplattformen stehen der Herstellung von Biopharmazeutika zur Verfügung. Dabei kommen prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme zum Einsatz. Die Wahl der Produktionsplattform richtet sich u. a. nach wirtschaftlichen Faktoren, wie der patentrechtlichen Situation und dem Applikationsbereich, der die gewünschte Proteinqualität und -quantität bestimmt. Weiterhin spielt die biologisch sichere Herstellung der heterologen Proteine bei der Auswahl des passenden Expressionssystems eine große Rolle. Eine Vielzahl von Expressionsplattformen und Vektorsystemen wurde etabliert und optimiert, die eine effiziente Produktion verschiedener rekombinanter Therapeutika und auch verschiedener prophylaktischer Vakzine ermöglichen (Jordan, E. *et al.*, 2009; Georgiou, G. & Segatori, L. 2005). Die besondere Bedeutung heterologer Expressionssysteme entstand bereits vor mehr als 25 Jahren, als erstmals ein rekombinant produziertes Protein, das in *Escherichia coli* (*E. coli*) hergestellte Humaninsulin, von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA zugelassen wurde (Goeddel, D.V. *et al.*, 1979; Dingermann, T. & Zündorf, I. 1999).

Prokaryotische Produktionsplattformen, wie z. B. *E. coli*, *Bacillus*- oder *Streptomyces*-Spezies, repräsentieren Expressionssysteme, die genetisch leicht zu manipulieren und einfach zu kultivieren sind. *E. coli* gehört gegenwärtig zu den am besten genetisch, biochemisch und prozesstechnisch charakterisierten Bakterien, die

sich gut zur Gewinnung von einfachen Proteinen und Peptiden eignen. Wesentliche Nachteile des Systems sind jedoch eine mangelnde Sekretion heterologer Proteine ins Medium und die daraus resultierende Aggregation der rekombinanten Proteine als unlösliche und biologisch inaktive *inclusion bodies* im intrazellulären oder periplasmatischen Raum. Zur Gewinnung des Proteins werden somit aufwendige Renaturierungs- und Reinigungsschritte erforderlich (Zhang, T. *et al.*, 2009; Vincentelli, R. *et al.*, 2004; Makrides, S.C. 1996). Ein weiterer Grund für die Bildung von *inclusion bodies* ist die inkorrekte oder unvollständige Faltung und posttranslationale Modifikation eukaryotischer Proteine. Da eine inkorrekte Faltung oder ein Fehlen dieser Modifikationen jedoch die Wirksamkeit des pharmazeutischen, rekombinanten Proteins beeinflussen kann, ergibt sich ggf. die Notwendigkeit, zusätzlich heterologe Chaperone zu exprimieren (Stevens, J.M. *et al.*, 2003). Die Grenzen dieser Strategie sind jedoch durch mangelnde Kenntnisse der Chaperone und ihrer Interaktionen, insbesondere in heterologen Systemen, bedingt. Aus diesen Gründen sind häufig große Ausbeuteverluste sowie ein nicht unerheblicher Zeit- und Kostenaufwand hinzunehmen. Zur Begegnung dieser Probleme versucht man Methoden zu entwickeln, die eine effektivere Transkription, Translation und eine verbesserte Stabilität der rekombinanten Proteine ermöglichen (de Marco, A. 2009; Balbas, P. 2001). Wulfig *et al.* konnten beispielsweise proteasedefiziente *E. coli* Stämme generieren, mit denen die periplasmatische Proteolyse verringert und somit eine Erhöhung der Ausbeute an rekombinant produzierten Proteinen erzielt werden konnte (Wulfig, C. *et al.*, 1997). Neben einer heterologen Genexpression in Prokaryoten wird die Produktion rekombinanter Biopharmazeutika, besonders die Herstellung von Impfstoffen, in eukaryotischen Expressionssystemen wie Hefen, Insektenzellen und Mammaliazellen immer attraktiver.

Wie prokaryotische Systeme eignen sich auch Hefen für die einfache Überwachung und Validierung des Herstellungsprozesses. Sie haben den Vorteil kurzer Generationszeiten und geringer Nährstoffansprüche sowie der posttranslationalen Modifikation des eukaryotischen Faltungs- und Sekretionsapparats, wie die Ausbildung von Disulfidbrücken, N- und O-Glykosylierungen. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) war die erste konventionelle Hefe, die als Produktionsplattform für rekombinante Arzneimittel genutzt wurde. Neben

S. cerevisiae stellt inzwischen auch die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* einen genetisch gut charakterisierten Organismus dar. Es bestehen umfangreiche Erfahrungen bei der Kultivierung der Hefen in Fermentern unterschiedlichster Größe. Weiterhin können Erträge rekombinanter Proteine bis in den g/l-Bereich erzielt werden. So konnte beispielsweise die Produktion von 12g/l des Vakzinkandidaten Tetanus-Toxin-Fragment C durch *Pichia pastoris* in Standard Bioreaktoren realisiert werden (Clare, J. *et al.*, 1998). Das Expressionssystem, mit dessen Hilfe die Mehrzahl der gegenwärtig in Deutschland zugelassenen, gentechnisch hergestellten Impfstoffe produziert werden, stellen jedoch rekombinante *S. cerevisiae* Zellen dar. Unter den Vakzinen befinden sich z. B. der HPV-Impfstoff zur Prävention von Infektionen durch das humane Pappiloma Virus oder unterschiedliche Kombinationsimpfstoffe gegen Diphtherie, Tetanus, Keuchhusten, Polio und Hepatitis B. Auch der vielversprechende Malaria Vakzin Kandidat RTS,S/AS (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München) wird unter Einsatz der rekombinanten Bäckerhefe hergestellt (Waitumbi, J.N. *et al.*, 2009; Stoute, J.A. *et al.*, 1997). Generell ist die pharmakologische Verwendung verschiedener rekombinanter Proteine aus Hefen jedoch aufgrund des vom Mammalia-Muster abweichenden Glykosylierungstyps und der produzierten Hyperglykosylierungen begrenzt. Der in *S. cerevisiae* auftretende High-Mannose-Typ der Glykosylierung kann eine unerwünschte Immunreaktion *in vivo* bewirken, aber auch eine kurze Halbwertszeit des Proteins bedingen, was das Produkt weniger effizient macht (Gerngross, T.U. 2004). Ein weiterer Nachteil des Hefesystems sind die durch Überexpression teilweise entstehenden inkorrekt prozessierten Proteine (Cregg, J. M. & Higgins, D. R. 1995). Die richtige Faltung der Proteine und die biologische Funktionalität sind daher oft stark beeinträchtigt. Ein weiterer Grund für die verringerte Verbreitung dieser Systeme sind erhöhte Produktionskosten, die u. a. durch bereits vorliegende Patentierungen entstehen können.

Ein weiteres Beispiel für die Produktion eines gentechnisch generierten Vakzins stellt das eukaryotische Baculovirus-Insektenzellen-System dar. Mithilfe der Insektenzellen wird, wie auch unter Verwendung rekombinanter Hefezellen, ein Vakzin zur Prävention der HPV-Infektion produziert. Aufgrund der generell guten Proteinausbeute ($\geq 300\text{mg/l}$, George, H. *et al.*, 1997) ist das Baculovirus-Insektenzellen-System ebenfalls eine attraktive und durch die Wirtsspezifität des

Baculovirus eine sichere Produktionsplattform (Kost, T.A. *et al.*, 2002). Die durchgeführten posttranslationalen Modifikationen ähneln denen der Mammalia-Produkte, das Glykosylierungsmuster erreicht allerdings längst nicht die Komplexität des Mammalia-Systems (Tomiya, N. *et al.*, 2004). Als nachteilig erweist sich bei diesem System auch das schwer durchzuführende *scale-up*, da die Insektenzellen einen sehr hohen Sauerstoffbedarf haben und äußerst empfindlich gegenüber Scherkräften sind. Deswegen und aufgrund der patentrechtlichen Situation findet die Baculovirus-Expression derzeit hauptsächlich in der Forschung Verwendung. Ein weiteres Problem in diesem System ist die durch die Baculoviren entstehende Zelllyse, welche eine erhebliche Ausschüttung von proteolytischen Enzymen in das Kulturmedium mit sich bringt. Um den genannten Problemen entgegen wirken zu können, versuchen Wissenschaftler auch hier Zelllinien und Virenstämme zu entwickeln, welche für Proteasen defizient oder genetisch so verändert sind, dass sie in ihrem Glykosylierungsmuster dem Mammalia-Expressionssystem angeglichen werden (Berger, I. *et al.*, 2004; Jarvis, D.L. *et al.*, 2003).

Wenn es um die hohe Qualität der rekombinanten Wirkstoffe geht, und somit um eine annähernd korrekte posttranslationale Modifikation des rekombinanten Proteins, haben sich vor allem CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) sowie BHK-Zellen (*Baby Hamster Kidney*) in der Vergangenheit bewährt. Die CHO-Säugerzelllinie z. B. weist neben einer guten Ausbeute (z. B. 4,7g/l humane, rekombinante IgG-Antikörper) eine hohe Authentizität des Proteins auf (Wurm, F. M. 2004). Die teilweise nicht humanidenten Glykosylierungen der rekombinanten Proteine können jedoch bei pharmazeutischer Verwendung Immunogenität bedingen. Über die höchste Authentizität der rekombinanten Wirkstoffe verfügen daher humane Zelllinien, wie z. B. die Per.C6™ Zellen, welche auf menschlichen Netzhautzellen beruhen (Jones, D. *et al.*, 2003). Ein anderes Beispiel ist die auf Amniozyten basierende CAP-Zelllinie der Firma CEVEC, die ebenfalls erfolgreich zur Produktion von Biopharmazeutika eingesetzt wird. Diese Mammalia-Expressionssysteme erfordern im Vergleich zu mikrobiologischen Systemen eine Haltung in Langzeit-Kultursystemen in großen Maßstäben. Weiterhin bedingt dies eine erhebliche Zeitspanne, in der die Fertigungseinrichtungen etabliert werden müssen, was technisch sehr aufwendig ist und ein hohes Investitionskapital voraussetzt. Zudem entstehen durch die Gefahr der Kontamination des rekombinanten Wirkstoffs, z. B. durch humanpathogene Viren,

Bakterien oder Prionen und der damit verbundenen hohen Auflagen seitens der Behörden zur Wahrung der biologischen Sicherheit, zusätzliche Produktionskosten.

Gegenwärtig werden ca. 34% der in Deutschland zugelassenen, gentechnischen Medikamente mithilfe von CHO-Zellen und 32% mittels *E. coli* hergestellt. Ungefähr 17% der rekombinanten Wirkstoffe, von denen ca. die Hälfte Vakzine darstellen, werden durch die Hefe *S. cerevisiae* produziert (Verband der forschenden Pharma-Unternehmen, 2010).

Die Behandlung und die Prävention zahlreicher Erkrankungen erfordern hierbei etablierte und stetig neu entwickelte rekombinante Pharmazeutika. Um diesen Anforderungen gerecht werden zu können, müssen fortwährend neue Expressionssysteme entwickelt und bereits bestehende optimiert werden. Daher besteht der dringende Bedarf für eine zukünftige Weiterentwicklung und Optimierung der niederen, eukaryotischen Wirtssysteme zur effizienten und kostengünstigen heterologen Expression komplexer, rekombinanter Zielproteine. Eine Kostenreduzierung und Kapazitätserhöhung für die Produktion von Biopharmazeutika würde eine breite Anwendung in der Prophylaxe, Diagnostik und Therapie für das Gesundheitssystem tragbar machen. Neben bakteriellen oder auf Hefen basierenden Expressionssystemen konnten auch Ciliaten durch die Entwicklung des innovativen *Tetrahymena*-Expressionssystems in der Vergangenheit biotechnologische Bedeutung gewinnen.

1.2 *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila (*T. thermophila*) wird als ca. 30-60µm großer Organismus nach Westheide und Rieger (1996) den holotrichen Ciliaten zugeordnet (systematische Gliederung für *T. thermophila* siehe Anhang). Es handelt sich hierbei um einen Unterstamm der Alveolaten, welche den einzelligen Eukaryoten und somit den Protozoen zuzuordnen sind. Als hochdifferenzierter, freischwimmender Organismus ist *T. thermophila* überwiegend in nährstoffreichen Süßwasserhabitaten wie Bächen, Flüssen, Seen aber auch Teichen und Tümpeln zu finden. Seine charakteristische, allseitige Bewimperung (holotriche Ciliatur) dient vor allem der Fortbewegung (Mehlhorn, H. & Ruthmann, A. 1992). Weitere bezeichnende Merkmale sind der zur Nahrungsaufnahme dienende Oralapparat, auch Cytostom genannt, und der zur Exkretion dienende Cytoprokt. Der Cytostom liegt im vorderen

Viertel der Zelle und definiert seine ventrale Seite. Aufgrund der Ausbildung und Entwicklung des Mundapparates gehört die Gattung *Tetrahymena* genau wie das Pantoffeltierchen *Paramecium* zu der Klasse der Oligohymenophorea. Der Cytostom zeichnet sich durch vier spezialisierte Cilienreihen aus. Hierbei ist das Mundfeld in eine aus zwei Cilienreihen bestehende parorale Membran aufgeteilt, der drei Membranellen mit jeweils drei weiteren Reihen Cilien gegenüberstehen. Mikroskopisch betrachtet stellen diese Cilienreihen vier kleine Häutchen dar, durch die *Tetrahymena* seinen Namen bekam (Levine *et al.*, 1980).

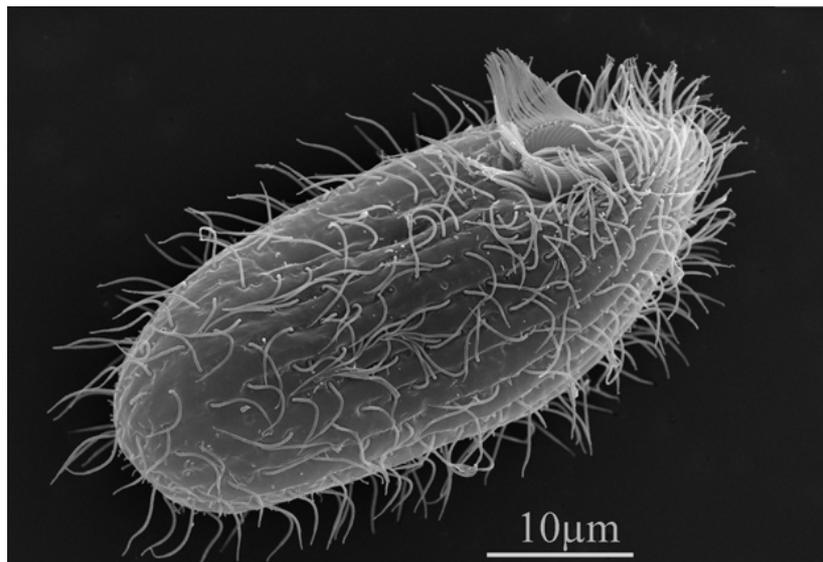


Abb. 1: *Tetrahymena thermophila* (Rasterelektronenmikroskopaufnahme)

Mit freundlicher Genehmigung von Aswati Subramanian, Miami University, Oxford, Ohio, USA

Der heterotrophe Organismus weist alle typischen Zellstrukturen wie Mitochondrien, endoplasmatisches Reticulum (ER), Lysosomen, Dictyosomen, Peroxisomen und Ribosomen auf. Darüber hinaus beinhaltet *T. thermophila* kortikale Alveolen, Phagosomen, eine kontraktile Vakuole und sekretorische Granula, auch Mucozysten genannt. Der Zellkortex des Organismus ist semirigide und wird durch Mikrotubuli Bündel sowie Intermediärfilamente ausgebildet. Typisch für *Tetrahymena* ist ebenfalls, dass die Kernapparatur aus zwei strukturell und funktionell verschiedenen Kompartimenten besteht. Diese Eigenschaft wird auch als Kerndimorphismus bezeichnet und trennt die Keimbahn des Mikronukleus von den Somafunktionen des Makronukleus. Die sexuelle Fortpflanzung der Zelle geschieht durch Konjugation, während die Zellreproduktion mittels Querteilung verläuft (Mehlhorn, H. & Ruthmann, A. 1992).

1.2.1 Genetische Besonderheiten von *Tetrahymena thermophila*

Das gleichzeitige Vorliegen von zwei Zellkernen, Mikro- und Makronukleus, zählt zu den auffälligsten genetischen Besonderheiten der Ciliaten. Einige Erscheinungsformen, wie z. B. *Paramecium*, verfügen über mehrere Mikro- oder Makronuklei, *T. thermophila* besitzt jedoch jeweils nur einen von beiden Zellkernen. Der diploide Mikronukleus weist die genetischen Informationen für die sexuelle Vermehrung auf und stellt somit die Keimbahn dar. Seine Hauptaufgabe besteht darin, die DNA zu speichern, die zur Ausbildung neuer Zellkerne im Verlauf einer Konjugation nötig ist (Turkewitz, A.P. *et al.*, 2002). Dieser Kern ist während des vegetativen Wachstums transkriptionsinaktiv und teilt sich mitotisch. Sein Genom beinhaltet fünf metazentrische Chromosomen mit insgesamt 120Mb und umfasst 27.500 putative offene Leserahmen (Turkewitz, A.P. *et al.*, 2002; Collins, K. & Gorovsky, M.A. 2005). Der somatische Makronukleus entsteht während der Konjugation aus einem mitotisch entstandenen Produkt des auf dem Mikronukleus basierenden Zygotenkerns. Chromosomenbrüche, gekoppelt an die Anfügung neuer Telomere, fragmentieren die fünf großen Chromosomen des Mikronukleus ortsspezifisch in schätzungsweise 250 makronukleäre Chromosomen, die anschließend mehrfach amplifiziert werden und aufgrund des fehlenden mitotischen Spindelapparats auch als ARP (*autonomously replicating pieces*) bezeichnet werden (Wong, L. *et al.*, 2000). Die Entwicklung des somatischen Nukleus beinhaltet die Neuordnung der DNA, in welcher 15-20Mb (~15%) der von der Keimbahn bezogenen DNA eliminiert werden (Chalker, D.L. 2008; Yokoyama, R.W. & Yao, M.C. 1982; Yao, M.C. *et al.*, 1990). Die ca. 6000 exzidierten Regionen (*internally eliminated sequences* (IES)) bestehen größtenteils aus repetitiven Sequenzen. Die Eliminierung dieser keimbahnbegrenzten Sequenzen erfolgt über eine RNA *interference* (RNAi) verwandte Maschinerie (Chalker, D.L. 2008). Der reife Makronukleus enthält schließlich etwa 45 Kopien seiner autonom replizierenden Einheiten. Das rDNA Chromosom, welches die aus dem Mikronukleus stammenden 5,8S, 17S und 26S ribosomalen RNA Gene beinhaltet, liegt in Form eines *inverted repeats* in ungefähr 9000 haploiden Kopien vor. Das sich im Makronukleus entwickelnde Minichromosom hat eine Größe von 21kb (Eisen, J.A. *et al.*, 2006, Kapler, G.M. & Blackburn, E.H. 1994; Gall, J.G. 1974). Während der vegetativen Vermehrung ist der sich amitotisch teilende Makronukleus transkriptionsaktiv und bestimmt den Phänotyp der Zelle (Collins, K. & Gorovsky, M.A. 2005). Der gesamte Zellmetabolismus wird daher von

dem polyploiden, somatischen Kern gesteuert. Aufgrund fehlender Strukturen wie der mitotischen Spindel oder den Kinetochoren wird bei der amitotischen Teilung lediglich ungefähr die Hälfte der Makronukleus-DNA an jeden Tochter-Makronukleus weitergegeben. Eine Konsequenz aus der amitotischen Teilung des Makronukleus und der daraus resultierenden ungleichmäßigen Verteilung multipler, heterozygoter Allele auf die Tochterzellen ist die phänotypische Segregation (*allelic assortment*) (Sonneborn, T.M. 1974). Mit der Zeit können bei diesem „Sortier“-Phänomen Zellen mit ursprünglich heterozygoten Zellkernen einen homozygoten Makronukleus generieren, in dem nur das eine oder nur das andere Allel homozygot vorliegt. Während weiterer vegetativer Wachstumsphasen bleibt diese Ausdifferenzierung stabil. Zellen, die einen solchen Status erreicht haben, werden als Aussortierer bezeichnet (Turkewitz, A.P. *et al.*, 2002). Durch diesen Prozess können auch rezessive Allele vollständig exprimiert werden. Es ermöglicht ebenfalls einem einzigen mutierten Allel, die 45 Wildtyp-Allele des Makronukleus zu ersetzen.

Tetrahymena reproduziert sich asexuell, solange sich die Zellen in reichhaltigem Medium befinden. Auch wenn der Ciliat im Grunde genommen bezüglich seines vegetativen Wachstums unsterblich ist, altert er mit zunehmender Anzahl an Teilungen. Das Altern bezieht sich hierbei auf die Abnahme der Fruchtbarkeit. Diese resultiert aus einer reduzierten Fähigkeit zur Konjugation und aus der Zunahme der fehlgeschlagenen Vollendung einer Konjugation. Die sexuelle Reproduktion mittels Konjugation wird durch einen Nährstoffmangel ausgelöst und ereignet sich nur zwischen komplementären Paarungstypen, von denen sieben verschiedene exprimiert werden können. Der entsprechende Paarungstyp wird während der sexuellen Neuentwicklung des Makronukleus festgelegt und bleibt in der Zelle und in seinen asexuellen Nachkommen stabil (Orias, E. 1981). Bezüglich der Keimbahn besteht der Lebenszyklus aus einem Wechsel von haploiden und diploiden Phasen. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Schritte der Konjugation verdeutlicht.

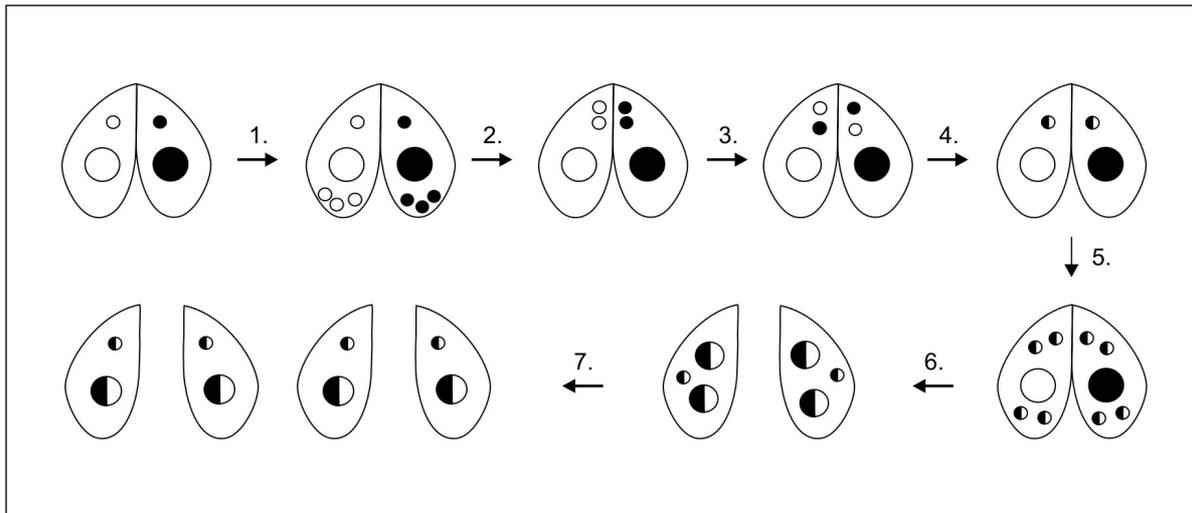


Abb. 2: Konjugation von *T. thermophila* (nach Bockau, U. 2006)

Die sexuelle Reorganisation des genetischen Materials beginnt mit zwei aufeinanderfolgenden meiotischen Teilungen des Mikronukleus (1.). Drei der entstandenen haploiden Kerne wandern zum posterioren Ende der Zelle und lösen sich auf. Nach einer postmeiotischen Mitose des vierten Kerns entstehen genetisch identische, haploide Kerne, der stationäre Kern und der Wanderkern (2.). Es kommt zum Austausch der generierten Wanderkerne (3.) und zu deren Fusion mit den verbliebenen stationären Kernen (4.). Hierbei entsteht der Zygotenkern (Synkaryon), welcher sich zweimal mitotisch teilt und vier diploide Produkte erzeugt (5.). Einer der nun posterior gelegenen Kerne wird zum neuen diploiden Mikronukleus, während der andere degeneriert. Die übrigen Kerne erzeugen die neuen Makronukleusanlagen, was auch als „Makronukleäre Entwicklung I“ bezeichnet wird (Martindale, D.W. *et al.*, 1982) (6.). Als „Makronukleäre Entwicklung II“ bezeichnet, nehmen Mikronukleus und Makronuklei ihre Position nahe dem Zellzentrum ein. Die Konjugationspartner trennen sich und der alte Makronukleus kondensiert durch Apoptose (Mpoke, S. & Wolfe, J. 1996). Durch eine postzygotische Zellteilung der Exkonjuganten werden vier Zellen (Karyoniden) produziert. Jedes genomisch identische Karyonid erhält einen unabhängig differenzierten Makronukleus und eine mitotische Kopie des funktionellen Mikronukleus (7.).

Ein weiteres besonderes Merkmal von *Tetrahymena* ist der hohe AT-Gehalt des Genoms. Der berechnete Anteil liegt für beide Nuklei im Durchschnitt bei 76%. Die Exons weisen hierbei einen AT-Gehalt von ~54% auf, während für die Introns ein höherer AT-Gehalt von über 85% ermittelt wurde (Prescott, D.M. 1994; Csank, C. *et al.*, 1990). Zusätzlich verfügt *Tetrahymena* über eine spezifische Kodonpräferenz. Als Stopp-Kodon der sequenzierten *Tetrahymena* Gene wird ausschließlich UGA genutzt, während die anderen beiden gebräuchlichen Stopp-Kodone UAA und UAG zusammen mit den üblichen kanonischen Triplets CAA und CAG in *Tetrahymena* für die Aminosäure Glutamin kodieren (Eisen, J.A. *et al.*, 2006). Studien des sequenzierten Makronukleusgenoms ergaben zudem, dass in *Tetrahymena* das Stopp-Kodon UGA in manchen Genen die Aminosäure Selenocystein kodiert. Das macht *T. thermophila* zum ersten bekannten Organismus, der alle 64 Kodone nuklearer Gene in Aminosäuren translatiert (Eisen, J.A. *et al.*, 2006).

Darüber hinaus findet man bei *Tetrahymena* bei stark exprimierten Genen meistens ein Cytosin und bei weniger stark exprimierten oder regulierten Genen ein Thymin an der dritten Position der Kodone (*wobble-base*), was darauf hindeutet, dass im Allgemeinen eher Pyrimidine an dieser Stelle eingesetzt werden. Die Translationsinitiationsstelle AAAAAAATGG unterscheidet sich deutlich von der GC-reichen Kozak's Sequenz GCCRCCATGG der Säugersysteme (Wuitschick, J.D. & Karrer, K.M. 1999; Kozak, M. 1978).

1.3 Biotechnologisches Potenzial von *T. thermophila*

T. thermophila hat als Modellorganismus bereits in der Grundlagenforschung, in der biotechnologischen Anwendung und als heterologes Expressionssystem zur Produktion rekombinanter Proteine große Relevanz erlangt. Die Bekanntheit des Organismus liegt vor allem seiner weiten Verbreitung und seiner einfachen Kultivierbarkeit im Labormaßstab zugrunde. Einige fundamentale biologische Prozesse, wie z. B. der Aufbau und die Biogenese der Cilien, die Funktion des Dynein-Motors und die Funktion der Histon Acetyltransferase A bei der Transkriptionsregulation, die Telomere und Telomerasen sowie katalytisch aktive RNAs konnten in *T. thermophila* das erste Mal untersucht werden (Pennock, D.G. *et al.*, 1988; Medizin-Nobelpreis 2009 für Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider und Jack W. Szostak; Brownell, J.E. *et al.*, 1996; Chemie-Nobelpreis an Cech, T.R. und Altman, S. 1989).

Ein großes wirtschaftliches Potenzial des Ciliaten liegt u. a. in der Fähigkeit Milch zu veredeln, indem unter Einsatz *Tetrahymena*-spezifischer Enzyme Cholesterin zu Provitamin D3 umgewandelt wird (Valcarce, G. *et al.*, 2001; Gentili, H.G. *et al.*, 2007). Ein weiterer biotechnologischer Nutzen liegt in der Herstellung extrazellulärer Wertstoffe, bei denen es sich hauptsächlich um saure Hydrolasen handelt. Saure Hydrolasen sind lysosomale Enzyme und dienen bei *Tetrahymena* im Allgemeinen der intrazellulären Verdauung des endozytotisch aufgenommenen Materials (Dingle, J.T. & Dean, R.T., 1984). Die hydrolytischen Enzyme sind jedoch bei *T. thermophila* auch im Kulturüberstand zu finden, sodass eine Funktion bei der extrazellulären Verdauung postuliert wurde (Tiedtke, A. & Rasmussen, L. 1988; Florin-Christensen, M. *et al.*, 1989). Die Cilian AG hat auf Basis dieser Enzyme ein eigenes patentiertes Produkt, die Ciliaten Enzym Präparation (CEP) mit dem Markennamen Cilase[®] entwickelt, welche große Mengen endogener Lipasen und Proteasen beinhaltet und

daher als oraler Wirkstoff zur Behandlung von exokriner Pankreas Insuffizienz beim Menschen eingesetzt werden soll. Das extrazelluläre Auftreten der sauren Hydrolasen in großen Mengen, beschreibt die Fähigkeit des Stammes Proteine zu sekretieren. Das Aufweisen eines leistungsfähigen Sekretionsapparates stellt bei der biotechnologischen Produktion endogener und rekombinanter Proteine einen großen Vorteil dar, da eine einfache und kostengünstige Produktaufreinigung gewährleistet wird. Als eukaryotischer Organismus ist *T. thermophila* in der Lage sekretorische Proteine posttranslational zu modifizieren. Mit seinen biantennären, mannosereichen *N*-Glykanen weist *Tetrahymena* ein Glykosylierungsmuster auf, das einfache Modifikationen wie die Addition weiterer Zuckerstrukturen erlaubt. Dies ist bezüglich der Produktion heterolog exprimierter Proteine, die möglicherweise als Pharmazeutika ihre Anwendung finden sollen, von großer Bedeutung. Die Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierungen können einen wichtigen Einfluss auf die korrekte Form, die Löslichkeit, die Stabilität und somit die Funktionalität komplexer, rekombinanter Proteine haben (Jenkins, N. & Curling, E.M. 1994; Nettleship, J.E. *et al.*, 2010). Die folgende Abbildung stellt das Glykosylierungsmuster von *Tetrahymena* im Vergleich zu Hefe- bzw. Mammalia-Zellen dar.

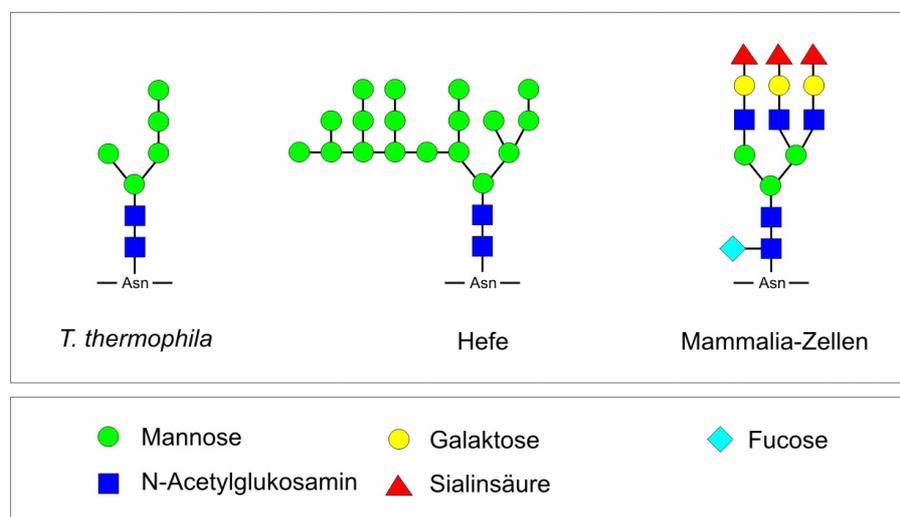


Abb. 3: Glykosylierungsmuster verschiedener Expressionssysteme

Die Seitenketten bei *T. thermophila* und höheren Eukaryoten sind mit <20 Zuckerresten relativ klein, während die Glykosylierungsstrukturen von Hefen häufig längere Mannose-Ketten mit >50 Zuckerresten aufweisen (Hyperglykosylierung).

Aufgrund der inzwischen gesteigerten Kenntnisse über *Tetrahymena* und den überlegenen biotechnologischen Eigenschaften des Organismus bietet sich die Nutzung des Ciliaten-Expressionssystems für die Herstellung von Biopharmazeutika an. Erste Erfolge auf dem Gebiet der heterologen Expression in *T. thermophila*

wurden unter anderem durch die Expression des Oberflächen-I-Antigens (*immobilization antigen*) des fischpathogenen Ciliaten *Ichthyophthirius multifiliis* (*I. mutifiliis*) erzielt. Die transgenen *Tetrahymena*-Zellen stellen dabei, durch ihre Fähigkeit die GPI-verankerten parasitären Oberflächenproteine auf ihrer Zellmembran zu exprimieren, einen effektiven Trägerstoff zur Vakzination von Süßwasserfischen gegen die Infektion durch *I. multifiliis* dar (Gaertig, J. *et al.*, 1999). Weiterhin war es 2003 der Cilian AG möglich, mittels *Tetrahymena* ein aktives, homogen glykosyliertes, menschliches Protein, die humane DNase I, zu exprimieren und zu sekretieren (Weide, T. *et al.*, 2006). Neben der humanen Wirkstoffproduktion ist *Tetrahymena thermophila* aufgrund der phylogenetischen Nähe zu dem parasitären Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* für die Herstellung von Malaria-Vakzinkandidaten besonders attraktiv.

1.4 *Tetrahymena thermophila* als heterologes Expressionssystem für die Herstellung potenzieller Malaria Vakzine

Vakzine umfassen in der Biopharmazeutik eine große Gruppe rekombinanter Wirkstoffe. Impfungen gehören zu den wirksamsten und wichtigsten therapeutischen und vorbeugenden Gesundheitsmaßnahmen, die vor Infektionskrankheiten und ihren schwerwiegenden Folgen schützen. An die Entwicklung von Vakzinen werden höchste Ansprüche gestellt, weshalb die Auswahl eines adäquaten Expressionssystems von hoher Bedeutung ist. Der Parasit *Plasmodium falciparum* ist jedes Jahr für 500 Millionen Malariaerkrankungen verantwortlich. Neben einer entstehenden Blutarmut können sich unbehandelt folgenschwere Symptome mit meist tödlichen Komplikationen entwickeln. Hierbei werden wichtige Organe, wie das Nervensystem, Nieren, Leber und Lunge geschädigt. Trotz aller wissenschaftlichen Fortschritte ist es bisher nicht gelungen, einen geeigneten Malaria-Impfstoff herzustellen. Somit besteht der dringende Bedarf, ein effizientes Malaria-Vakzin zu entwickeln. Einige grundlegende Attribute qualifizieren den Organismus *Tetrahymena thermophila* speziell für eine Verwendung als heterologes Expressionssystem zur Entwicklung rekombinanter Impfstoffe, in besonderem Maße zur Herstellung von Antigenen, die auf dem Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* basieren. Wie bereits erwähnt besteht durch die Nutzung von *Tetrahymena* zur Produktion von Antigenen aus *Plasmodium* der große Vorteil einer

nahen Verwandtschaft. Die daraus resultierende parasitenähnliche Biosynthese ermöglicht eine effiziente und kostengünstige Expression der komplexen und posttranslational modifizierten Malaria-Vakzinkandidaten (Turkewitz, A.P. *et al.*, 2002). Ciliaten und Sporozoitien gehören derselben phylogenetischen Gruppe an. Beide sind einzellige Eukaryoten, die zum Stamm der Alveolaten gehören. Sie sind auf eine einzige Zelle reduzierte, komplex organisierte Mikroorganismen und beinhalten ähnliche Membrankompartimente, insbesondere das Alveolaten-spezifische Membran-System. Die Zellmembranoberfläche von *Tetrahymena* ist fast vollständig bedeckt mit GPI-verankerten Ser H Oberflächenproteinen (immunodominantes Glykoprotein), was den verschiedenen GPI-verankerten Oberflächenproteinen der *Plasmodium* Arten entspricht (z. B. auch *Apical Membrane Antigen 1* ((AMA1) (Peterson, D.S. *et al.*, 2002; Gerber, C.A. *et al.*, 2002; Smith, D.L. *et al.*, 1992). Weiterhin ergaben Genomanalysen, dass beide Organismen ein signifikant ähnliches Set an enzymatischen Proteinen besitzen, wie z. B. die Mitglieder der Cathepsin L-ähnlichen Cystein Proteasen. Zusätzliche gemeinsame Merkmale sind sich wiederholende Proteinmotive und die Präsenz von Multigenfamilien (Simon, M.C. & Schmidt, H.J. 2007). Im Gegensatz zu *Plasmodium* ist *Tetrahymena* jedoch ein apathogener, nicht parasitär lebender Organismus, sodass durch die Anwendung des Ciliaten-Expressionssystems eine biologisch sichere Malaria-Vakzinproduktion gewährleistet werden kann (Wheatley, D.N. *et al.*, 1994). Ciliaten werden als GRAS (*generally recognised as safe*) Organismen bezeichnet, da trotz ihrer jahrelangen Nutzung in vielen unterschiedlichen Forschungsfeldern keine Hinweise gefunden werden konnten, dass sie humanpathogene Viren, Endoparasiten oder potenzielle onkogenetische DNA Sequenzen beinhalten. Die Durchführung eines Genomprojekts führte inzwischen zu einer vollständigen Sequenzierung des *Tetrahymena thermophila* Genoms (Stover, N.A. *et al.*, 2006; Eisen, J.A. *et al.*, 2006; Brunk, C.F. *et al.*, 2003), welche in der Datenbank zur Verfügung steht (www.ciliate.org/genomedata.shtml), sodass der Ciliat den am besten untersuchten Protozoen darstellt. Beide Gattungen, *Tetrahymena* und *Plasmodium*, bestehen aus einem äußerst AT-reichen Genom (~79%), in dem ebenfalls eine vergleichbare Kodonpräferenz des genetischen Codes besteht (Wuitschik, J.D. & Karrer, K.M. 2000; Gardner, M.J. *et al.*, 2002). Die Anpassung der Kodone eines Transgens an den für die Proteinproduktion ausgewählten Organismus hat in der Regel einen großen Einfluss auf die

Proteinausbeute. Die Effizienz der Gensynthese wird durch die Maßnahme gesteigert seltene Kodone auszuschliessen und alle verschiedenen Kodone mit der gleichen Häufigkeit wie im gewünschten Organismus zu verwenden. Bei dem Einsatz des Ciliaten-Expressionssystems ist jedoch eine kostenintensive Optimierung der Kodone zur effizienten Expression von Malaria Antigenen mittels *Tetrahymena* aufgrund der phylogenetischen Nähe nicht zwingend notwendig. Die originären Gensequenzen können durch etablierte und optimierte Transformationstechniken in den Ciliaten eingebracht werden (Gaertig, J. *et al.*, 1994; Cassidy-Hanley, D. 1997). Die Transformationsmethode des *biolistic bombardments* erlaubt hierbei neben der Transformation des Makronukleus bei konjugierenden und vegetativen Kulturen auch die Transformation des Mikronukleus konjugierender Zellen. Die Entwicklung von Co-Transformationsprozessen ermöglicht zudem die Ciliaten-basierte Produktion vielversprechender kombinatorischer Malaria-Vakzine. Hierbei können verschiedene, an den hohen AT-Gehalt des Ciliaten angepasste Vektoren, die entsprechende Selektions- bzw. Auxotrophiemarker tragen, zum Einsatz kommen (Weide, T. *et al.*, 2007; Herrmann, L. *et al.*, 2006 (a)). In diesem Zusammenhang kann je nach Zielvorgabe zwischen episomalen Plasmiden, unter deren Nutzen erste Expressionsanalysen bereits zwei bis drei Wochen nach der Transformation möglich sind, und integrativen Vektoren unterschieden werden, die durch ihre Integration ins Wirtsgenom die Stabilität der Transgene gewährleisten. Zur vereinfachten Nutzung dieser AT-reichen Vektoren wurde die zeitsparende Methode des Crelox-Verfahrens an die Ciliaten-Technologie angepasst, in dem die Klonierung der Expressionskassetten durch ein spezifisches Rekombinase-System erleichtert wird (Weide, T. *et al.*, 2007). Die entwickelten Vektor-kodierten Expressionskassetten, welche die Expression eines beliebigen Zielgens ermöglichen, sind modular aufgebaut. Neben unterschiedlich starken, induzierbaren Promotoren, die die Proteinexpression regulieren, stehen verschiedene Signal- und Präpropeptide zur Verfügung (Weide, T. *et al.*, 2006, Weide, T. *et al.*, 2007). So können rekombinante Proteine ins Cytosol, an die Zelloberfläche oder ins extrazelluläre Medium geleitet werden. Durch die Etablierung starker Promotoren, wie z. B. der cadmiuminduzierbaren ~900bp *upstream*-Sequenz des *Tetrahymena* eigenen Metallothionein-Gens 1 (MTT₁), ist die Möglichkeit für eine effiziente Expression von Malaria-Antigenen gegeben (Shang, Y. *et al.*, 2002; Dondero, F. 2004; Boldrin, F. *et al.*, 2008). Ein weiterer Vorteil zur rekombinanten Malaria-Vakzinproduktion sind

die bereits gut etablierten Kultivierungsmethoden für *T. thermophila*. Neben einer hohen Zellteilungsrate und einer relativ kurzen, mit Hefezellen vergleichbaren Generationszeit (2-3h) zeichnet sich der Ciliat durch die Möglichkeit aus, auf einfachem, axenischem und kostengünstigem Medium zu wachsen. *T. thermophila* Stämme können in einer *batch*-, *fed-batch*- oder mittels der kontinuierlichen Fermentation kultiviert werden. Für biotechnologische Produktionsprozesse hat sich hierbei die Betriebsweise mit einer Zufütterung von Nährstoffen als besonders vorteilhaft erwiesen (*fed-batch*-/kontinuierliche Fermentation). Durch das sogenannte *feeding* können Wachstums- und Produktionsphasen gegenüber einer reinen *batch*-Betriebsweise verbessert werden. Bezüglich des kontinuierlichen Verfahrens erreichten die Kulturen in einer Hochzelldichte-Fermentation bis zu 2×10^7 Zellen/ml. Die standardmäßige Bioreaktor-Infrastruktur, die für Mikroorganismen wie Hefen oder *E. coli* benutzt wird, kann dabei auf simple Art und Weise an die Bedingungen für eine Kultivierung von *T. thermophila* angepasst werden (Wheatley, D.N. *et al.*, 1994; Kiy, T & Tiedtke, A. 1992; Kiy, T & Tiedtke, A. 1991).

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Ciliaten die Fähigkeit aufweisen *plasmodiale* Antigene zu exprimieren. So konnte das Circumsporozoit Protein 1 (CSP-1) erfolgreich auf der Oberfläche des Ciliaten hergestellt und über einen GPI-Anker verankert werden (Peterson, D.S. *et al.*, 2002). Die Cilian AG war weiterhin in der Lage die 19kD große C-terminale Domäne des Merozoiten Oberflächenprotein 1 (MSP-1) in *Tetrahymena* zu exprimieren (Weide, T. *et al.*, 2007).

1.5 Malaria

Malaria ist eine von der weiblichen *Anopheles*-Mücke übertragene, potenziell tödliche, parasitäre Infektionskrankheit, die durch einen Erreger der Gattung *Plasmodium* übertragen wird. Mindestens 500 Millionen Menschen in 109 Ländern in Afrika, Asien und Lateinamerika sind jährlich von der Krankheit betroffen (*World Health Organisation, Roll Back Malaria (WHO, RBM) Global Malaria Action Plan*, 2008). Annähernd eine Million Patienten sterben jedes Jahr an der parasitären Infektion. Die Erkrankung tötet hauptsächlich Kinder unter fünf Jahren aus Afrika südlich der Sahara. Malaria in der Schwangerschaft führt zu einer erhöhten Sterberate der Mütter sowie der neugeborenen Kinder, die zumeist aufgrund ihres zu geringen Geburtsgewichts nicht überlebensfähig sind (Desai, M. *et al.*, 2007). Von

den über 100 verschiedenen Plasmodienarten gibt es vier, die humanpathogen sind. Sie lösen verschiedene Symptome aus und variieren in ihrer Intensität und Dauer. *Plasmodium falciparum*, der Verursacher der Malaria tropica, ist hierbei der tödlichste der vier Malaria Parasiten (WHO, Fact sheet No.94, 2007). Die Gattung *Plasmodium* gehört als Sporozoit zum Unterstamm der sogenannten *Apikomplexa* und somit wie *Tetrahymena* dem Stamm der Alveolaten an. Das Genom von *P. falciparum* ist vollständig sequenziert und steht in der Datenbank zur Verfügung (Florens, L. *et al.*, 2002; Gardner, M.J. *et al.*, 2002). Bislang konnte kein geeigneter Impfstoff gegen Malaria entwickelt werden, da die Biologie und der Lebenszyklus des Parasiten sehr komplex und die Antigene hoch polymorph sind. Hierbei findet die geschlechtliche Entwicklung in dem weiblichen Mosquito der Gattung *Anopheles* und die ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen statt. Die Vermehrung im Menschen umfasst das Sporozoitenstadium, das Leberstadium und das Blutstadium. Eine schematische Übersicht des *plasmodialen* Lebenszyklus ist im Anhang zu finden (siehe 9.3). All diese komplexen Entwicklungsstadien bedingen einen Wechsel des parasitären Expressionsmusters und resultieren in einer signifikanten Änderung der produzierten Oberflächenproteine (Greenwood, B. 2002). Zudem verfügt *P. falciparum* über eine hohe genetische Vielfalt (Smith, T. *et al.*, 1999; Snounou, G. *et al.*, 1999). Die variablen Oberflächenproteine stellen die Hauptziele der rekombinanten Vakzinproduktion dar. Mindestens 40 erfolgsversprechende Malaria Antigene wurden bisher identifiziert (Sharma, S. & Pathak, S. 2008; *Malaria Vaccine Initiative* (PATH, MVI). Allen voran steht der vor Kurzem für die klinische Phase III zugelassene, auf dem CSP-1 basierende, Vakzinkandidat RTS, S/AS02 der Firma GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München (PATH, MVI); (Bojang, K.A. 2006; Moorthy, V.S. & Ballou, W.R. 2009; Vekemans, J. *et al.*, 2009). Die folgende Abbildung (Abb. 4) stellt stadienspezifische Oberflächenantigene dar, die als potenzielle Malaria-Vakzinkandidaten gelten.

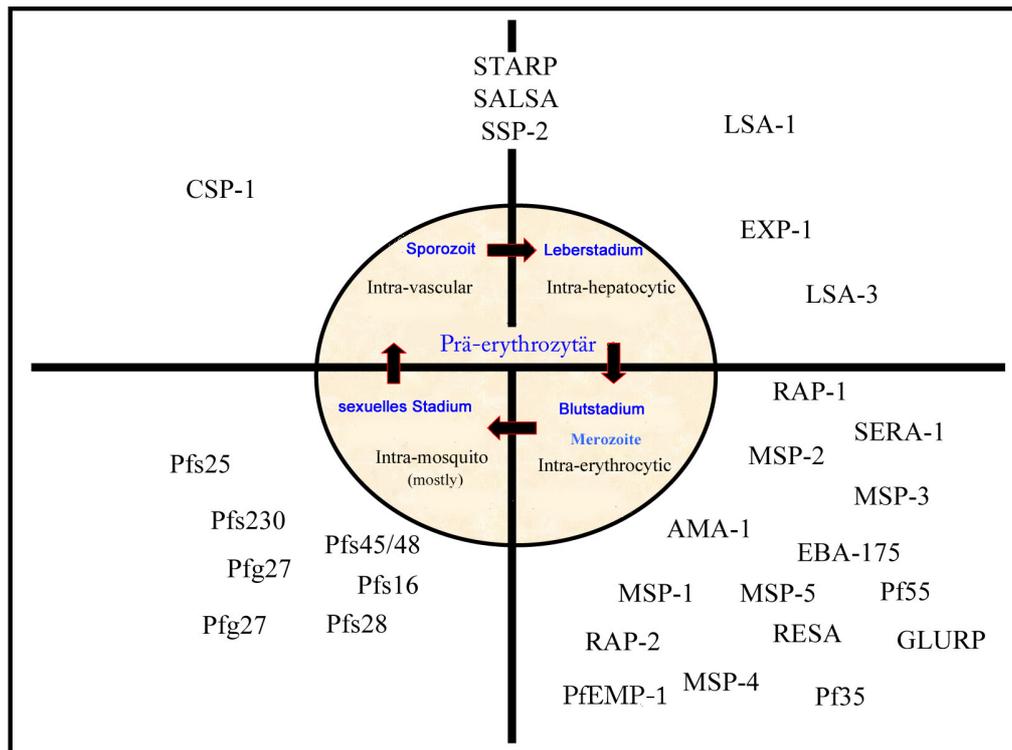


Abb. 4: Vakzinkandidaten Antigene (modifiziert nach PATH, MVI <http://www.malariavaccine.org>)

Die Abbildung stellt einige der Malaria-Vakzinkandidaten dar. Verschiedene antigene Ziele auf der Parasitenoberfläche werden zu unterschiedlichen Phasen des *plasmodialen* Lebenszyklus exprimiert. Zusätzlich unterscheidet die genetische Diversität innerhalb der verschiedenen *Plasmodium* Stämme einige der Antigene in ihrer Immunogenität.

Vakzinkandidaten des sexuellen Stadiums werden als sogenannte Übertragungsblockierende Vakzine bezeichnet, da sie die Entwicklung im Mosquito unterbinden sollen. Vertreter dieser Art sind u. a. Pfs25 und Pfs28 (Duffy, P. & Kaslow, D.C. 1997). Antigene des prä-erythrozytären Stadiums hingegen, wie z. B. CSP-1, können als Anti-Infektions-Vakzin agieren, da sie direkt gegen die Sporoziten wirken und somit eine Infektion verhindern können. Neben den potenziellen prä-erythrozytären Impfstoffen kommt den Vakzinen der asexuellen Blutphase, die auch als *Anti-morbidity* oder *Anti-mortality* Vakzine bezeichnet werden, eine besondere Bedeutung zu, da sie nicht nur Menschen vor einer Infektion schützen, sondern auch den Schweregrad der Symptome sowie die Sterbewahrscheinlichkeit infizierter Personen reduzieren können. Zu den potenzialreichen Vakzinkandidaten des parasitären Blutstadiums gehören auch das *Merozoite Surface Protein 1* (MSP-1) (Zakeri, S. *et al.*, 2005; Takala, S.L. *et al.*, 2006; Cavanagh, D.R. *et al.*, 1998) und das *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1* (PfEMP1) (Smith, J.D. *et al.*, 1995). Erkenntnisse über die natürlich erworbene Immunität gegen Malaria weisen darauf hin, dass der erlangte Schutz aus einem hohen Antikörpertiter gegen multiple Antigene resultiert. Das zukünftige Testen kombinatorischer Blutphasen-

Vakzine, welche ähnliche Antikörpertiter gegen unterschiedliche Antigene auslösen könnten, ist daher sinnvoll (Osier, F.H. *et al.*, 2008).

Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1)

Während des parasitären Blutstadiums dringen die *plasmodialen* Merozoiten in die Erythrozyten des Wirtes ein. Diese Invasion in die roten Blutkörperchen ist ein komplexer Prozess, der verschiedene multiple Rezeptor-Liganden-Interaktionen voraussetzt. Unterschiedliche Antigene sind hierbei involviert. Bei den Antigenen, die auf der Merozoitenoberfläche exprimiert werden, wird von einer Beteiligung an der Erkennung der Merozoiten und an der Erythrozytenbindung ausgegangen (Perlmann, P. & Troye-Blomberg, M. 2002). Durch Rezeptor-Liganden-Interaktionen positioniert sich der Merozoit an der Oberfläche der roten Blutzelle und bildet eine Kontaktstelle zur Blutzellmembran. Ist die Invasion vollzogen, schließt sich die Mündung hinter dem Parasiten und die ehemalige Kontaktstelle wird Teil der parasitären Vakuolenmembran (Clyde, D.F. *et al.*, 1973). Abb. 5 gibt einen kurzen Überblick über die Merozoiteninvasion in die Blutzelle.

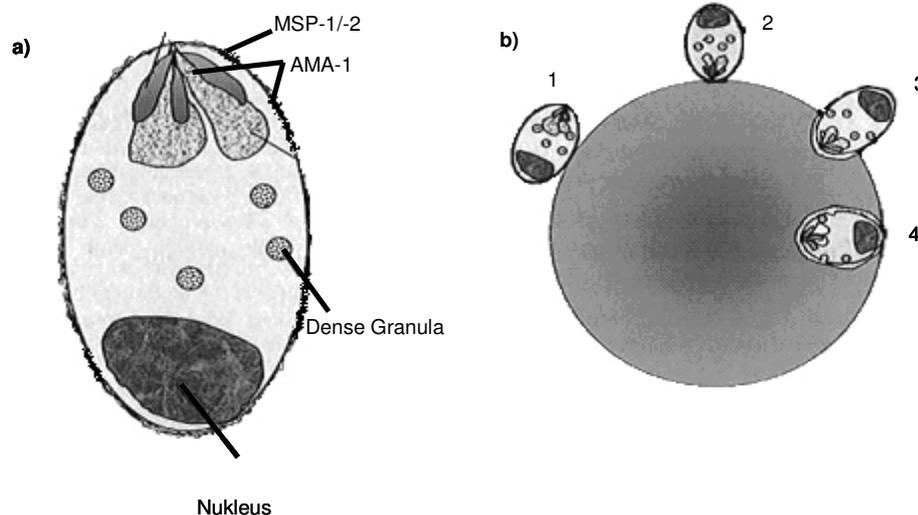


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Merozoiten und der Invasion in den Erythrozyten

(Modifiziert nach Malaria Immunology, P. Perlmann und M. Troye-Blomberg, 2002)

a) Schematische Darstellung eines Merozoiten und einiger an der Invasion beteiligten Oberflächenproteine b) Übersicht der Merozoiten-Invasion in den Erythrozyten

(1) Anlagerung des Merozoiten an die Erythrozytenoberfläche

(2) Merozoitenreorientierung und Herstellung der Kontaktstelle

(3) Frühe Phase der Invasion

(4) Merozoit innerhalb der parasitären Vakuole nach vollständiger Invasion

MSP-1, ein integrales Membranprotein, welches über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Oberfläche des Merozoiten gebunden ist, ist das am meisten charakterisierte Antigen des asexuellen Blutstadiums. Das Protein wird als ~200kD Vorläufer-Polypeptid synthetisiert und anschließend durch zwei aufeinanderfolgende, proteolytische Prozessierungen fragmentiert. Zunächst wird das Vorläuferprotein in ein N-terminales (83kD), zwei zentrale (30kD und 38kD) und in ein C-terminales (42kD) Fragment gespalten. Das C-terminale Fragment wird hierbei über einen GPI-Anker an die Membran gebunden, während die anderen Fragmente durch nicht-kovalente Bindungen mit dem 42kD-Fragment assoziiert bleiben. Kurz vor der Invasion in den Erythrozyten, wird der 42kD C-terminale Abschnitt schließlich in ein 33kD und ein 19kD Fragment geteilt (Patarroyo, M.E. *et al.*, 1988; Blackman, M.J. *et al.*, 1993; Brown, A.E. *et al.*, 1994). Während MSP-1₃₃ in Assoziation mit dem restlichen Komplex abgelöst wird, betritt MSP-1₁₉, welches aus zwei EGF-ähnlichen (*epidermal growth factor*) Domänen zusammengesetzt ist, membrangebunden den Erythrozyten (Bojang, K.A. *et al.*, 2001). Dass MSP-1 eine wichtige Rolle bei der Invasion spielt, zeigte die Erkenntnis, dass eine Unterbindung des zweiten Prozessierungsschrittes von MSP-1 zu einer Hemmung der Invasion des Parasiten in die Erythrozyten führte (Bojang, K.A. *et al.*, 2001). Obwohl die meisten Ziel-Epitope für inhibitorische Antikörper im MSP-1₁₉ Fragment lokalisiert und von der nativen Konformation der EGF-ähnlichen Motive abhängig sind, können auch Antikörper eine Hemmung der Merozoiten Invasion auslösen, die gegen andere Regionen des Antigens gerichtet sind, wie z. B. gegen die polymorphe Region des N-Terminus (Alonso, P.L. *et al.*, 1994; Alonso, P.L. *et al.*, 1996)

Weitere Studien ergaben, dass MSP-1₁₉ unter entfernt verwandten *Plasmodium* Arten funktionell hoch konserviert ist, die N-terminale Block2-Region des MSP-1 stellt jedoch beispielhaft die Diversität eines pathogenen Antigens dar (Bojang, K.A. *et al.*, 1998; Conway, D.J. *et al.*, 2000; Tanabe, K. *et al.*, 1987). Trotz dieses hohen Polymorphismus fallen alle Block2-Allele in eine der drei Allelfamilien des *msp-1* Gens: K1, Mad20 und RO33. Hierbei zeigen zwei Serotypen des MSP-1Block2, K1 und Mad20, im Gegensatz zu dem dritten, relativ konservierten RO33, eine besonders hohe Varianz (Tetteh, K.K.A. 2005). Antikörper gegen den Block1 und gegen Block2 konnten statistisch signifikant mit einem reduzierten Malariarisiko assoziiert werden (Conway, D.J. *et al.*, 2000; Chappel, J.A. & Holder, A.A. 1993;

Cavanagh, D. & McBride, J. 1997). Da bereits ein synthetisches, rekombinant hergestelltes Antigen mit einer breiten Reaktivität auf eines der drei Block2-Typen (K1) in diversen parasitären Isolaten entsprechende Immunantworten auslöste, wäre die Entwicklung eines Konstrukts basierend auf MSP-1 Block2 als potenziellen Vakzinkandidaten vielversprechend (Tetteh, K.K.A. *et al.*, 2005).

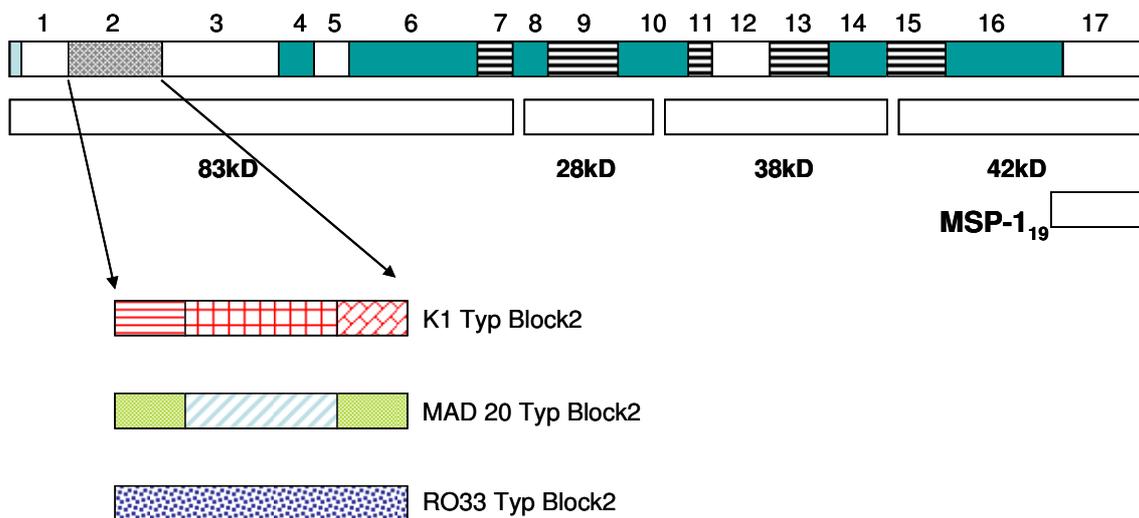


Abb. 6: Schematische Darstellung des *Merozoite Surface Protein 1* (MSP-1)

(nach Graeme Cowan, Universität von Edinburgh) MSP-1 ist aus 17 Blöcken aufgebaut. Block1 ist ein konservierter Bereich, deren 19 aminoterminalen Aminosäuren als Signalpeptidsequenz erkannt werden. Block3 und Block17 sind ebenfalls konservierte Regionen während Block4-16 eher den typischen Dimorphismus des MSP-1 aufweisen. Block2 stellt durch seine drei Serotypen (K1, MAD20 und RO33) eine stark polymorphe Region dar.

Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1)

Die Pathophysiologie von *P. falciparum* beruht vor allem auf der Fähigkeit des Parasiten am Endothel von Kapillaren und postkapillaren Venolen verschiedener Organe zu adhären (Luse, S.A. & Miller, L.H. 1971; MacPherson, G.G. *et al.*, 1985). Diese Sequestration der reifen Trophozoiten und Schizonten des parasitären Blutstadiums findet u. a. im Gehirn und der Plazenta statt. Auf diese Weise verbirgt der Parasit sich vor dem Immunsystem und umgeht der Aussortierung durch die Milz und es kommt zu der Entwicklung von cerebraler und maternaler Malaria. Malaria in der Schwangerschaft ist mit einer massiven Zerstörung der plazentalen Erythrozyten verbunden. Aus diesem Grund treten schwerwiegende Symptome, wie maternale Blutarmut, zu geringe Geburtsgewichte der Neugeborenen, Frühgeburten und Kindstod auf (Brabin, B.J. 1983). Am schlimmsten betroffen sind hierbei Frauen endemischer Gebiete, die zum ersten oder zweiten Mal schwanger sind. Dieses Erkenntnis deutet daraufhin, dass mit steigender Anzahl an Schwangerschaften eine

schützende Immunität erlangt wird. Für die Zytoadhäsion an die Zell- oder Gefäßoberfläche sind Antigene des Parasiten verantwortlich. Das PfEMP1, welches durch die *var*-Genfamilie kodiert wird, spielt bei der Zytoadhärenz als vermittelnder Ligand eine Rolle. Es ist eines der am besten charakterisierten *plasmodialen* Adhärenzproteine. Das Antigen wird im späten Trophozitenstadium synthetisiert und an die Membranoberfläche des infizierten Erythrozyten transportiert. Hier integriert sich PfEMP1 in der Region, die als knopfartige Wölbung der Erythrozytenmembran ausgebildet wird. Der Parasit wird daraufhin einerseits durch die Adhärenz der infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen geschützt, gleichzeitig präsentieren jedoch die auf der Blutzellmembran vorliegenden Antigene den Erreger dem Immunsystem. Aus diesem Grund exprimiert *P. falciparum* sequenziell diverse PfEMP1-Antigene. Jeder Parasit kodiert für ungefähr 60 *var*-Gene (Pasternak, N.D. & Dzikowski, R. 2009), von denen jeweils nur ein *var*-Gen auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert wird. Das sogenannte *gene-switching*, in dem ein neues *var*-Gen exprimiert wird, geschieht mit einer ungefähren Häufigkeit von 2% (Roberts, D.J. *et al.*, 1992). Strukturell wird das polymorphe *var*-Gen durch zwei Exone kodiert, die zum einen für die variable, extrazelluläre Domäne sowie die membranumfassende Region (5'Exon) und zum anderen für die relativ konservierte intrazelluläre Domäne und das C-terminale saure Segment *acidic terminal sequence* (ATS) kodieren (3'Exon) (Su, X.Z. *et al.*, 1995; Trelka, D.P. *et al.*, 2000; Taraschi, T.F. *et al.*, 2003, Kriek, N. *et al.*, 2003; Waller, K.L. *et al.*, 1999; Voigt, S. *et al.*, 2000). In der extrazellulären Region der *var*-Gene befinden sich zwei Typen von Domänen. Zum einen die *cysteine-rich inter-domain region* (CIDR), die ein cysteinereiches Motiv beinhaltet (Noya, O. *et al.*, 1994) und zum anderen die *duffy binding like* (DBL) Domänen, die zu den Duffy-Antigenen bindenden Proteinen von *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* Homologien aufweisen. PfEMP1 wird mit einem Molekulargewicht von 200-400kD exprimiert. Die Kopfstruktur ist konserviert und besteht aus einer α -DBL Domäne und einer α -CIDR Domäne. Die darauf folgenden Domänen können in ihrer Anzahl und Reihenfolge variieren.

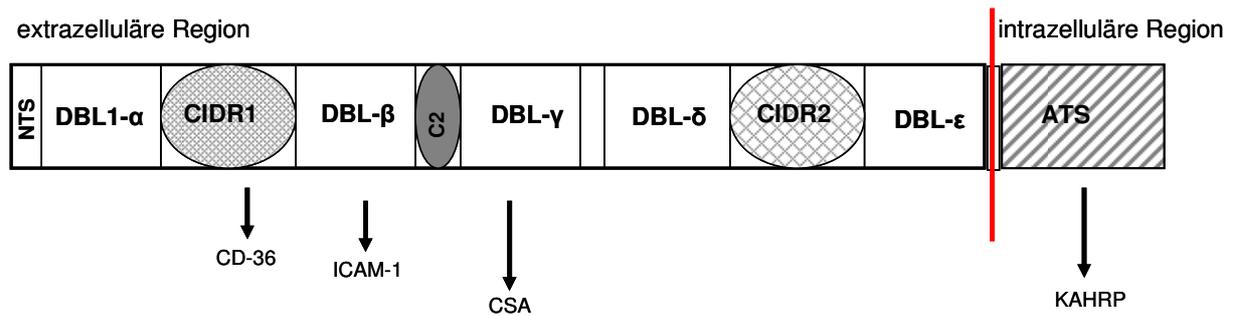


Abb.7: Schematische Darstellung der var-Gen Domänen und ihre bekannten Interaktionen

(Modifiziert nach Malaria Immunology, P. Perlmann und M. Troye-Blomberg, 2002)
 Die variable, extrazelluläre Domäne besteht aus 2-7 DBL-Domänen und 1-2 CIDR-Domänen. Zusätzliche Regionen sind das N-terminale Segment (NTS) und das C-terminale saure Segment (ATS), vor dem eine kurze membranumfassende Region liegt. Typ, Anzahl und Position der DBL und CIDR Gruppen können variieren. Die Domänen interagieren mit unterschiedlichen Proteinen (*Intracellular Adhesion Molecule* (ICAM-1), Chondroitinsulfat A (CSA), *Knob Associated Histidin-rich Protein* (KAHRP)).

Das schnelle Umschalten des PfEMP1 erlaubt dem Parasiten sich Veränderungen anzupassen. Ein Beispiel hierfür ist die Schwangerschaft, in der die Plazenta durch infizierte Erythrozyten mit einem speziellen Adhäsions-Phänotyp parasitiert wird. Die nachgewiesenen *P. falciparum* Stämme exprimieren eine veränderte Version des PfEMP1 (Var2CSA), bei der es zum Affinitätswechsel von einem der Hauptrezeptoren CD-36 zu Chondroitinsulfat A (CSA) kommt (Salanti, A. *et al.*, 2003; Beeson, J.G. *et al.*, 2001; Reeder, J.C. *et al.*, 1999; Scherf, A. *et al.*, 2001).

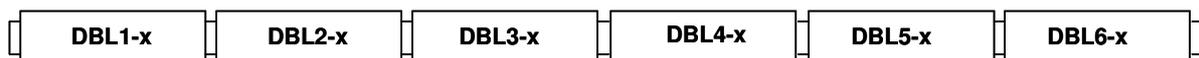


Abb. 8: Schematische Darstellung der duffy binding like Domänen des Var2CSA

Das Var2CSA besteht extrazellulär aus sechs DBL-Domänen und hat eine ungefähre Größe von 350kD

Var2CSA ist das einzige PfEMP1, welches in allen bekannten Parasiten Genomen vorkommt und dessen Gen relativ konserviert ist. Der extrazelluläre Part des Proteins besteht aus sechs verschiedenen *duffy binding like* (DBL)-Domänen (siehe Abb. 8) und einer großen, 337 Aminosäuren umfassenden Inter-Domäne (ID2). Die C-terminale Region des Var2CSA wird im Zytoplasma vermutet. Jüngste Studien ergaben, dass vermutlich die gesamte extrazelluläre Region des Var2CSA durch seine organisierte Strukturierung für eine spezifische und hoch-affine Bindung an CSA benötigt wird (Srivastava, A. *et al.*, 2010). Es gibt bisher jedoch keine genauen Erkenntnisse über die eigentlichen Binderegionen. Durch Immunisierungsstudien in Mäusen mit rekombinanten DBL-Domänen des Var2CSA konnten bereits Antikörper

produziert werden, die fähig waren eine Bindung an CSA und somit die Sequestration an die Endothelzellen der Plazenta zu verhindern (Salanti, A. *et al.*, 2003 und 2004; Costa, F.T. *et al.*, 2003). Infolge der hohen Bindungsspezifität könnte ein entsprechender Ansatz bestimmte DBL-Domänen als Vakzinkandidaten zu produzieren erfolgsversprechend sein.

1.6 Zielsetzung der Arbeit:

- Entwicklung von rekombinanten *Tetrahymena thermophila* Stämmen zur Produktion von Malaria-Vakzinkandidaten aus *Plasmodium falciparum*, basierend auf MSP-1Block2 und Var2CSA
- Analyse der Expressionskapazität der generierten Produktionsstämme
- Optimierung des Produktionsprozesses durch die Entwicklung eines proteaserestringierten Produktionsstammes zur effektiven Expression und Sekretion von BBM basierend auf MSP-1Block2
- Charakterisierung des ausgewählten Produktionsstammes bezüglich seiner Proteaseaktivität sowie seiner Sekretions- und Wachstumseigenschaften
- Definition optimaler Fermentationsbedingungen und Produktion des Vakzinkandidaten BBM basierend auf MSP-1Block2 im Labormaßstab

2. Material

2.1 Organismen

2.1.1 Eingesetzte *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

ElectroMax™ DH10B™ Cells (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Genotyp: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 endA*
1 *ara* D139Δ(*ara,leu*)7697 *galU galKλ-rpsL nupG*

2.1.2 Eingesetzte *Tetrahymena thermophila* Stämme

T. thermophila B 1868/4 Genotyp: Wildtyp; Paarungstyp: IV

T. thermophila B 1868/7 Genotyp: Wildtyp; Paarungstyp: VII

T. thermophila B 2086/1 Genotyp: Wildtyp; Paarungstyp: II

Die *T. thermophila* Stämme B 1868/4 und B 1868/7 wurden bei ATCC (*American Type Culture Collection*), Manassas, VA, USA bezogen, während der Stamm B 2086/1 freundlicherweise von P. J. Bruns (1998) zur Verfügung gestellt wurden.

2.2 Eingesetzte primer

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden bei der Invitrogen GmbH, Karlsruhe, bezogen und in Aqua dest. auf eine Ausgangskonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Die forward-primer wurden mit "F" (*forward*), die Gegen-primer mit "R" (*reverse*) bezeichnet. Einige Oligonukleotide enthalten Restriktionsstellen, welche durch Kleinbuchstaben markiert wurden.

primer zur Sequenzierung des MTT₁-Promotorbereichs

MTT_seq1_F 5'-CTTAAAATATATTGTATCG-3' 19bp

MTT_seq2_F 5'-CACGATTTATGCAATGATCC-3' 20bp

primer zur Sequenzierung und Amplifizierung von Bereichen der neu konstruierten auf MSP-1Block2 und Var2CSA basierenden Antigen-Sequenzen

DBL2_Seq_F 5'-TTGGACAGCAATGAAACATGGTG-3' 23bp

DBL3_Seq_F 5'-GGATAAAAGTTATGGTGGGAAGGAG-3' 24bp

BBM_Seq_F	5'-AAGGATGGTGCTAATACTCAAGTC-3'	24bp
V5_Seq_R	5'-GAGGAGAGGGTTAGGGATAGGC-3'	22bp
CMR_R	5'-GAGTGGCAGGGCGGGGCG-3'	18bp
Kas42_8R	5'-ATAGTAGTATATTAACACG-3'	19bp

primer zur Klonierung der 22kD Protease Integrations-Flanken

22kD_5'FA	5'-AATTCACcgcgTGGATTTAATATAGCTGGTGTAAG-3'	38bp
22kD_5'RA	5'-GAAACTCggtacctGTATCTTTCG-3'	5bp
22kD_3'F	5'-AACActcgagTTTTATCATCCTGTGGC-3'	27bp
22kD_3'R	5'-TCTTTAggtaccTCATCTTATTAG-3'	24bp

Primer zur Amplifizierung von Bereichen der Beta-Hexosaminidase bzw. der Cystein- Protease (22kD) aus *T. thermophila* mittels cDNA

UB hex aa1 F	5'-ATGCAAAAGATACTTTTAATTACTTTC-3'	27bp
UB hex aa110 R	5'-TATATTTTAGGAATGTTGTAATC-3'	23bp
cDNA_22kD_F2	5'-TTACCAAGTTCATGGATATGACCCC-3'	25bp
cDNA_22kD_R1	5'-CCTTGCACTTGCCGTCTCTAGCAG-3'	24bp

Primer zur Amplifizierung von Bereichen der Cystein-Protease (22kD) aus *T. thermophila* mittels genomischer DNA

p22X_intF3	5'-GGGTTATTGTCTCATGAGCGG-3'	21bp
p22X_intR3	5'-TAATTTGCTCTGCTGTCATACC-3'	22bp
p22X_intF5	5'-GATTGTAACAATTTTTTTGAGAC-3'	23bp
p22X_intR5	5'-GATTTTGATGCTTCAATAAGGTTG-3'	24bp

2.3 Eingesetzte Vektoren

Die jeweiligen Plasmidkarten der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren sind im Anhang aufgeführt (9.4).

pDL-325 Cilian AG, Münster (Weide, T. *et al.*, 2007)
 Der Ursprungsvektor hierfür war pCR4TOPO_ohne AMP. pDL-325 beinhaltet zwei loxP-Rekombinationsstellen aus dem Creator™Cloning & Expression System (Clontech). Die Expressionskassette besteht aus dem MTT₁-Promotor

(Metallothionein-Gen 1 aus *T. thermophila*), dem *bsdR* (Blasticidin-resistenzgen aus pCBM-BSD-Vektor) und dem BTU₂-Terminator (Beta Tubulin Gen 2 aus *T. thermophila*). Weiterhin trägt das Plasmid das Levansucrase-Gen aus *Bacillus subtilis* (*sacB*), sowie ein Chloramphenicolresistenzgen (*CmR*) aus dem pDNR-LIB-Vektor (Clontech) und ein Kanamycinresistenzgen (*KanR*) aus dem pCR4TOPO-Vektor zur Selektion in *E. coli*.

pKOIX Cilian AG, Münster (Weide, T. *et al.*, 2007)
Dieser Vektor ist ein Ampicillinresistenzgen (*AmpR*) und einen *f1-origin of replication* beinhaltendes pBluescript-Derivat zur Integration von Expressionskassetten in das Gen der Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase (DHFR-TS) von *T. thermophila*. Es enthält eine von DHFR-TS-Integrationsflanken eingerahmte Paromomycin-resistenzkassette (*neo2*) zur Selektion in *T. thermophila* und beinhaltet eine loxP-Rekombinationsstelle aus dem Creator™ Cloning & Expression System (Clontech).

pAX Cilian AG, Münster (Weide, T. *et al.*, 2007)
Ursprungsvektor: pH4T2 (s. o.). Der Vektor beinhaltet neben dem Ampicillinresistenzgen (*AmpR*) und dem pUC19 *origin of replication* für die Amplifikation und Selektion in *E. coli*, sowie dem tandemrepetitiven rDNA-Replikationsursprung und der Paromomycinresistenzkassette (*neo2*) für die Replikation und Selektion in *T. thermophila*, eine loxP-Rekombinationsstelle aus dem Creator™ Cloning & Expression System (Clontech).

2.3.1 In dieser Arbeit hergestellte Plasmidkonstrukte

p22X Cilian AG, Münster
Ursprungsvektor: pKOIX (s. o.). p22X beinhaltet neben einem Ampicillinresistenzgen (*AmpR*) und dem *f1-ori* für die Amplifikation und Selektion in *E. coli* eine loxP-Rekombinationsstelle aus dem Creator™ Cloning & Expression System (Clontech). Zur Integration von Expressionskassetten ins Genom von *T. thermophila* enthält der Vektor eine 5´ und eine 3´ untranslatierte Region (UTR) sowie einen

translatierten Bereich des Gens für die 22kD-Protease aus *Tetrahymena thermophila*.

Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit generierten Vektoren basieren auf den von der Cilian AG zur Verfügung gestellten Ausgangsvektoren pDL-325, pAX und pKOIX sowie dem für diese Arbeit konstruierten p22X.

pDL-BB Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator.

pDL-BBM Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz, MSP₁₉-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator.

pDL-DBL2 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL2-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.

pDL-DBL3 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL3-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.

pAX-BB Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator

pAX-BBM Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz, MSP₁₉-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator.

pAX-DBL2 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL2-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.

pAX-DBL3 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL3-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.

- pKOIX-BB Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator
- pKOIX-BBM Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz, MSP₁₋₁₉-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator.
- pKOIX-DBL2 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL2-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.
- pKOIX-DBL3 Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, Var2-DBL3-Sequenz aus *Plasmodium falciparum*, V5-tag, His6-tag, BTU₂-Terminator.
- p22X-BBM Insert: MTT₁-Promotor, MSP-1-Signalpeptid, kodonoptimierte Block1-Block2-Sequenz, MSP₁₋₁₉-Sequenz des MSP-1 aus *Plasmodium falciparum*, BTU₂-Terminator.

2.4 Herkunft der verwendeten Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Antipain	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Azocasein	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
β-NADP	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Chymostatin	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Citronensäure-Monohydrat	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
complete [®]	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen

dNTP Mix (10mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
E-64	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Entschäumer (Silfar®)	Wacker Chemie AG, Nünchritz
Ferrous-Sulphate/Chelate-Solution	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg
Isocitronensäure	ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt
Leupeptin	Pepta Nova GmbH, Sandhausen
Luminol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Magermilch-Pulver	Nordmilch eG, Bremen
Mercaptoethanol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Mangan(II)-sulfat-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Na-p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Natriumazid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcarbonat	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
p-Cumarsäure	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Papain	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Pepton aus Casein	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Pepton aus Soja	OrganoTechnie, La Courneuve, Frankreich
Pepton aus Fleisch S1	OrganoTechnie, La Courneuve, Frankreich
Pepton aus Weizen	OrganoTechnie, La Courneuve, Frankreich
p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosamin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Proteose Pepton	BD, Biosciences, San Jose, CA, USA
SuperSignal West Pico	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Thymidin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Triethanolamin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf

Triton X-100 Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH,
Schnelldorf

Tween®20 Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Alle weiteren hauptsächlich verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf oder Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe im analytischen Reinheitsgrad bezogen und sind nicht gesondert aufgeführt.

2.5 Herkunft der verwendeten Antibiotika

Ampicillin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Chloramphenicol	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kanamycin	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Paromomycinsulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Penicillin G	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Streptomycinsulfat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf

2.6 Herkunft der verwendeten Enzyme

Herkulase® Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, Kanada
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Cre-Rekombinase	Merck, Darmstadt oder New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Isocitratdehydrogenase	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
RNAse A	Qiagen GmbH, Hilden
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden

2.7 Medien für *E. coli*

LB-Medium	10g/l Pepton 5g/l Hefeextrakt 5g/l NaCl in Aqua dest., pH 7,5
-----------	--

LB-Agar-Platten 15g/l Agar
 in LB-Medium

SOC-Medium Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.8 Medien für *T. thermophila*

Magermilch-Medium 20g/l Magermilchpulver
 5g/l Hefeextrakt
 1ml/l Ferrous-Sulphate/Chelate Solution
 10g/l Glukosemonohydrat
 in Aqua dest., pH 7,0

Die Glukose wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

PP-Medium (1%) 10g/l Proteose Pepton
 in Aqua dest.

SPP-Medium 5g/l Proteose Pepton
 5g/l Hefeextrakt
 1ml/l Ferrous-Sulphate/Chelate Solution (100x)
 2g/l Glukosemonohydrat
 in Aqua dest.

Die Glukose wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

Pepton-Medium Varianten

(SSP/ SWP/ SMP): 5g/l Soja-/ Weizen- oder Fleisch-Pepton
 5g/l Hefeextrakt
 1ml/l Ferrous-Sulphate/Chelate Solution (100x)
 2g/l Glukosemonohydrat
 in Aqua dest.

Die Glukose wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

CD-Medium (Hellenbroich, D. *et al.*, 1999)

Aminosäurelösung (40x):

- 27,87g/l Arginin
- 3,63g/l Histidin Monochlorid
- 13,10g/l Isoleucin
- 13,12g/l Leucin
- 14,01g/l Lysin Monochlorid
- 7,76g/l Methionin
- 13,22g/l Phenylalanin
- 5,46g/l Serin
- 19,06g/l Threonin
- 4,08g/l Tryptophan
- 9,37g/l Valin
- 7,13g/l Alanin
- 2,66g/l Asparaginsäure
- 5,89g/l Glutaminsäure
- 1,50g/l Glycin
- 5,91g/l Asparagin x 2 H₂O
- 9,20g/l Prolin
- 2,00g/l Glutamin in Aqua dest.

Glukose-Lösung (1x) 11,00g/l Glukosemonohydrat

Nukleosidlösung (1x):

- 0,14g/l Guanosin (bei ~pH 2 lösen)
- 0,13g/l Adenosin (bei ~pH 2 lösen)
- 0,12g/l Cytidin
- 0,12g/l Uridin in Aqua dest.

Salzlösung (40x):

- 19,88g/l K₂HPO₄
- 25,00g/l KH₂PO₄
- 50,00g/l MgSO₄ x 7 H₂O
- 65,00g/l Trisodiumcitrat x 2 H₂O
- 1,00g/l CaCl₂ in Aqua dest.

Spurenelementlösung (1.000x)

- 0,50g/l FeCl₃ x 6 H₂O
- 0,08g/l MnSO₄ x H₂O

0,025g/l Co(NO₃)₂ · 6 H₂O
0,225g/l ZnSO₄ · 7 H₂O
0,015g/l CuSO₄ · 5 H₂O
0,005g/l (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4 H₂O in Aqua dest.

Tyrosinlösung (1x): 0,14g/l Tyrosin in Aqua dest. bei 60°C lösen

Vitaminlösung (2.000x): 0,05g/l Natrium Riboflavin Phosphat x 2 H₂O
0,05g/l Thiamin Hydrochlorid
0,01g/l Pyridoxal Hydrochlorid
0,01g/l 5-Formyl Tetrahydrofolat Calciumsalz
0,09g/l Nicotinsäure
0,08g/l D-Pantothensäure
0,01g/l DL-6,8-thiotic acid; in Ethanol p. A. lösen
dann in Aqua dest.

Das Medium wurde nach der Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,0-7,2 sterilfiltriert.

2.9 Puffer und Lösungen

Blotpuffer I 300mM Tris
20% (v/v) Methanol p. A.
in Aqua dest.

Blotpuffer II 25mM Tris
20% (v/v) Methanol p. A.
in Aqua dest.

Blotpuffer III 25mM Tris
40mM 6-Amino-n-Hexansäure
20% (v/v) Methanol p. A.
in Aqua dest.

Blockpuffer 10% (w/v) Magermilch-Pulver in PBS-T
oder 5% (w/v) BSA in PBS-T

Dryls-Solution (Cole, E.S. & Bruns, P.J. 1992)

1,5mM Natriumcitrat

1mM NaH₂PO₄

1mM Na₂HPO₄

1,5mM CaCl₂

in Aqua dest.

Die CaCl₂-Lösung wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Medium steril hinzugegeben.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 2,7mM KCl

1,5mM KH₂PO₄

137mM NaCl

8mM Na₂HPO₄

in Aqua dest.

PBS-T 0,05% (v/v) Tween[®]20 in PBS

RIPA-Puffer 10mM Tris/HCl, pH 7,2

150mM NaCl

5mM EDTA

1x complete[®] oder 2,5µg/ml (7µM) E-64

(Proteaseinhibitor)

Sammelgel-Puffer (4x) 0,5M Tris-HCl, pH 6,8

in Aqua dest.

SDS-Elektrophoresepuffer 25mM Tris-HCl, pH 8,6

192mM Glycin

0,1% (w/v) SDS

in Aqua dest.

SDS-Probenpuffer (4x) 200mM Tris-HCl, pH 6,8

16% (w/v) SDS

48% (v/v) Glycerin

	ggf. 8% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,04% Serva Blau G in Aqua dest.
TAE-Puffer (50x), pH 8,9	40mM Tris 0,114% (v/v) Essigsäure p. A. 1mM EDTA in Aqua dest.
Trenngel-Puffer (4x)	1,5M Tris/HCl, pH 8,8 in Aqua dest.
<i>Stripping</i> -Puffer	68,5mM Tris/HCL, pH 6,7 100mM β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS in Aqua dest.
2.10 Stammlösungen	
Ampicillin-Stammlösung	100mg/ml Ampicillin in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 100 μ g/ml
Cadmiumchlorid-Stammlösung	5mg/ml Cadmiumchlorid in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 5-40 μ g/ml
Chloramphenicol-Stammlösung	30mg/ml Chloramphenicol in 100% Ethanol Arbeitskonzentration: 30 μ g/ml
Kanamycin-Stammlösung	75mg/ml Kanamycin in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 75 μ g/ml
Paromomycin-Stammlösung	130mg/ml Paromomycinsulfat in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 150-400 μ g/ml
Penicillin/ Streptomycin-Stammlösung	2,5mg/ml Penicillin in Aqua dest. 2,5mg/ml Streptomycin in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 250 μ g/ml
Thymidin-Stammlösung	10mg/ml Thymidin in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 10 μ g/ml

E-64-Stammlösung	2,5mg/ml in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 1-30µg/ml (2,8-84µM)
Antipain-Stammlösung	10mg/ml in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 50µg/ml (80µM)
Chymostatin-Stammlösung	10mM in DMSO Arbeitskonzentration: 60-600µg/ml (10-100µM)
Leupeptin-Stammlösung	10mg/ml in Aqua dest. Arbeitskonzentration: 50µg/ml (120µM)

2.11 Herkunft der verwendeten Antikörper

Die folgenden monoklonalen Erstantikörper wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Jana McBride aus dem *Institute of Immunology & Infection Research* der Universität Edinburgh zur Verfügung gestellt:

Antikörper	Verdünnung	Funktion
31.2	1:5000	Monoklonaler Maus-Primärantikörper, erkennt das lineare Epitop aus dem RO33-Typ des Block2
12.2	1:2000	Monoklonaler Maus-Primärantikörper, erkennt das lineare Epitop aus dem K1-Typ des Block2
12.8	1:2000	Monoklonaler Maus-Primärantikörper, erkennt das 1. EGF-ähnliche Motiv des MSP-1 ₁₉ , bedingt die Existenz von Disulfidbrücken
12.10	1:2000	Monoklonaler Maus-Primärantikörper, erkennt das 2. EGF-ähnliche Motiv des MSP-1 ₁₉ , bedingt die Existenz von Disulfidbrücken

Tabelle 2.1: BBM-spezifische, monoklonale Primärantikörper

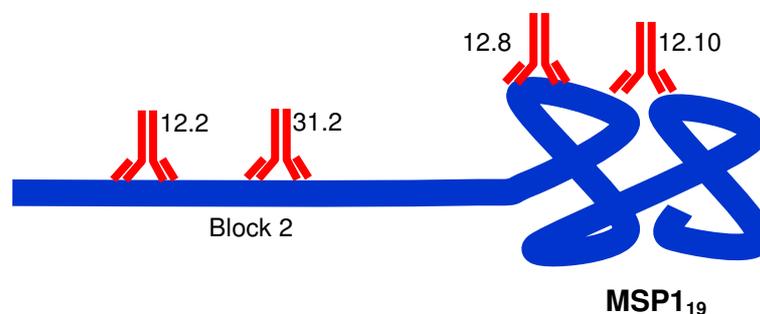


Abb. 9: Detektions-Reagenzien

Zu sehen sind die verschiedenen Erkennungsstellen (Epitope) der monoklonalen Erstantikörper, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden und die freundlicherweise von Prof. Dr. Jana McBride aus dem *Institute of Immunology & Infection Research* der Universität in Edinburgh zur Verfügung gestellt wurden. (Abb. mit freundlicher Genehmigung von Graeme Cowan, Universität von Edinburgh)

Weiterhin wurden freundlicherweise von Prof. Dr. David Cavanagh aus dem *Institute of Immunology & Infection Research* der Universität Edinburgh die gereinigten und rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine BBM und BB zur Verfügung gestellt.

Antikörper	Verdünnung	Funktion	Herkunft
HRP-Anti-V5	1:5000	Monoklonaler Maus-Primärantikörper gegen das V5-tag der DBL-Domänen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2.2: Monoklonaler Primärantikörper zur Detektion des V5-tags der DBL-Domänen

Die rekombinant im Baculovirus-System hergestellten und gereinigten Proteine Var2-DBL2 und Var2-DBL3 (beide Proteine verfügen N-terminal über einen V5- und einen His6-tag) sowie folgende polyklonale Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Thor G. Theander aus dem *Centre for Medical Parasitology* der Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellt:

Antikörper	Verdünnung	Funktion
Rabbit AS-36	1:1000	Polyklonales anti-Var2-DBL2 Antiserum
Rabbit AS-37	1:000	Polyklonales anti-Var2-DBL3 Antiserum

Tabelle 2.3: Polyklonale, DBL-spezifische Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Funktion	Herkunft
Goat Anti-Maus IgG	1:1000	Peroxidase konjugierter Zweitantikörper	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf
Goat Anti Rabbit IgG	1:1000	Peroxidase konjugierter Zweitantikörper	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Schnelldorf

Tabelle 2.4: Eingesetzte Zweitantikörper

2.12 Herkunft der verwendeten Marker

2.12.1 Protein-Größenstandards

PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.12.2 DNA-Größenstandards

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder plus Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.13 Herkunft der verwendeten Kits

DNeasy blood and tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
FastPlasmid [®] Mini Kit	5prime GmbH, Hamburg
HiSpeed [™] Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
HiSpeed [™] Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
MinElute [™] Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNAeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RervtAid [™] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

2.14 Herkunft der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Berstscheiben (900psi)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biomax-5K-NMWL-Membranfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Whatman-Papier	Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Goldpartikel S550d (550nm)	Seashell Technology, Kalifornien
Makroträger	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schüll Bioscience GmbH, Dassel
Röntgenfilm, Fuji Super RX	BW Plus Röntgen, Kamp-Lintford
Stoppgitter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-Glycin-Gele (12%)	Anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
Zellkultur-Platten (24 Kalotten) TPP [®]	Renner GmbH, Dannstadt
Zellkultur-Platten (96 Kalotten) TPP [®]	Renner GmbH, Dannstadt
Zellkultur-Flaschen (60ml) TPP [®]	Renner GmbH, Dannstadt
Zellkultur-Flaschen (690ml) TPP [®]	Renner GmbH, Dannstadt

Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von der Omnilab Laborzentrum GmbH & Co KG, Bremen, Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe bezogen.

2.15 Herkunft der verwendeten Geräte

Binokular	SZX-ILLD 200	(9)
Blot-Apparatur	Maxi Semi Dry Blotter	(5)
Chemilumineszenz Detektionssystem	Diana III	(10)

Elektroporator (für <i>E. coli</i>)	Electroporator 2510	(6)
Fermenter (0,5l)	Sixfors [®] -Multi-Fermenter	(7)
Geldokumentationsanlage	AIDA	(10)
Gelelektrophorese-Apparatur	Agagel-Mini	(2)
Goldkanone	Biolistic [®] PDS1000/Helium	(3)
Inkubationsschüttler	Innova 4230	(8)
Inkubationsschüttler	Multitron AJ	(7)
Konzentrator	Concentrator 5301	(6)
Mikroskop	CK 40	(9)
PCR-Gerät	mastercycler [®] gradient/personal	(6)
Photometer	PowerWaveX Select plate reader	(4)
Spektralphotometer	Libra S12	(11)
Thermomixer	Comfort	(6)
Ultraschallbad	Sonorex	(1)
Vertikal-Elektrophoresekammer	Mini	(5)
UV-Transilluminator	IDA (Image Documentation and Analysis)	(10)

Herstellernachweis:

(1) Bandelin electronic GmbH & Co KG, Berlin; (2) Biometra GmbH i. L., Göttingen; (3) Bio-Rad Laboratories GmbH, München; (4) Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont, USA; (5) Carl-Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe; (6) Eppendorf AG, Hamburg; (7) Infors GmbH, Bottmingen; Schweiz (8) New Brunswick Scientific Co, Nürtingen, (9) Olympus Deutschland GmbH, Hamburg; (10) Raytest GmbH, Straubenhardt; (11) Biochrom, Cambridge, UK

2.15.1 Zentrifugen

Zentrifuge, 5810R mit Swing-bucket-Rotor A-4-62	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, 5415D mit Standardrotor F45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, 5417R mit Standardrotor F45-30-11	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Sorvall Evolution RC	Thermo, Waltham, USA

2.15.2 Datenbanken und Computerprogramme

Datenbanken

- Tetrahymena Genom Datenbank (TGD): <http://www.ciliate.org>
- The institute for Genomic Research: <http://www.tigr.org>
- PubMed des *National Centers of Biotechnology Information* (NCBI):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Computerprogramme zur Auswertung von Sequenzierungsanalysen

- Clone manager suite, Version 6.00

Computerprogramm zur Datenerfassung, -kontrolle und -archivierung von fermentierten Zell-Kulturen

- IRIS V 5.0 (32-bit software)

Computerprogramm zur Erstellung des Literaturverzeichnisses

- Reference Manager Professional Edition Version 11

Computerprogramme zum Konvertieren der Abbildungen und Erstellen von Schaubildern

- Adobe Photoshop elements 6
- CorelDraw, Version 10.427; 2000 Corel Corporation
- MS office 2002

Computerprogramm zur Tabellenkalkulation und Textverarbeitung

- MS office 2002

Herkunft der DNA Sequenzen

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Beta Tubulin 2 (BTU ₂)	Accession#: L01416 (Gaertig, J. <i>et al.</i> , 1993)
Histon-Promotor (H4-1)	Accession#: X00417 (Bannon, G.A. <i>et al.</i> , 1984)
Metallothionein Gen 1 (MTT ₁)	Accession#: AY061892 (Shang, Y. <i>et al.</i> , 2002)
Beta-Hexosaminidase Gen 1	Accession#: AJ508396 (Baumert, U. 1999)
Cystein-Protease (22kD)	Sequenz siehe Anhang

P. falciparum 3D7(PfEMP1): Accession#: PFL0030c (Gardner, M.J. *et al.*, 2002)

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Thor Theander aus dem
Centre for Medical Parasitology der Universität Kopenhagen

BB/BBM Sequenz siehe Anhang

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. David Cavanagh aus dem
Institute of Immunology & Infection Research der Universität Edinburgh

3. Methoden

3.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien und Ciliaten

3.1.1 Stammhaltung von *Escherichia coli*

Zur Stammhaltung von *E. coli*-Kulturen wurden Vereinzelausstriche auf LB-Agar-Platten bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert. Für plasmidtragende Stämme wurden selektive Bedingungen gewählt. Weiterhin wurden zur dauerhaften Stammhaltung 500µl gut gewachsene *E. coli*-Kulturen mit 500µl 50% (v/v) Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert.

3.1.2 Stammhaltung von *Tetrahymena thermophila*

Dauerkultivierung als Standkultur

Die Dauerkultivierung von *T. thermophila*-Wildtypen und -Transformanten als Standkultur erfolgte in autoklavierten Reagenzgläsern mit 10ml Aqua dest. und einer Kichererbse. Die Reagenzgläser wurden mit wenigen Mikrolitern einer SPP-Standkultur beimpft und bei RT inkubiert. Das Überimpfen der Dauerkulturen erfolgte viertel- bis halbjährlich.

Dauerkultivierung als Gefrierkultur

T. thermophila Kulturen wurden bis zur logarithmischen Phase in einem Fernbachkolben in 100ml SPP-Medium bei 30°C und 80rpm angezogen und anschließend bei RT und 1100 x *g* in 50ml Zentrifugenröhrchen geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal in 10mM Tris/HCl pH 7,4 gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in Tris-Puffer gelöst (200.000 Zellen/ml) und in einer 100ml Fernbach-Schüttelkultur für zwei bis drei Tage bei 30°C und 80rpm inkubiert. Die präparierten Zellen wurden geerntet (RT, 1100 x *g*), das Zellpellet in 1ml Tris aufgenommen und mit 4ml 10% (v/v) DMSO vermengt. Jeweils 0,3ml der Zell-Suspension wurden auf Kryoröhrchen (TPP[®], 89020) verteilt und 30min bei RT sowie 30min bei 0°C inkubiert. Weiterhin erfolgte eine Inkubation der Kryo-Kulturen bei -80°C. Nach 24h wurden die Kulturen in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Nach dem Wiederauftauen mussten die Kulturen zunächst zwei- bis dreimal auf SPP-Medium übersetzt werden, bevor sie für das Animpfen von Massenkulturen eingesetzt werden konnten.

3.1.3 Kultivierung von *E. coli*

Als Inokulum für eine Anzucht von *E. coli* in Submerskultur dienten Einzelkolonien von Agar-Platten. Die Kultivierung von LB-Kulturen kleinerer Volumina (10ml) erfolgte in 15ml Zentrifugenröhrchen, Kulturen größerer Volumina (50 bzw. 150ml) wurden in 250ml Vierschikanekolben angezogen. Die Inkubation der Zellen fand bei 180rpm und 37°C in einem Inkubationsschüttler statt. Weiterhin sind für Plasmid tragende Stämme selektive Bedingungen eingestellt worden. Zur Zellernte wurden die Zellen 30min bei 4.000 x *g* oder 3min bei 16.000 x *g* abzentrifugiert.

3.1.4 Kultivierung von *T. thermophila*

Für die Kultivierung in Vorkulturen wurden 1-5ml Medium aus *T. thermophila* Standkulturen steril in 24-well-Zellkulturplatten oder in Zellkulturfläschchen (5-10ml) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 80rpm als Schüttelkultur. Das Medium der Transformanten enthielt 400µg/ml Paromomycin und zur Proteinexpression 5µg/ml Cadmiumchlorid. Zur Unterbindung von bakteriellen Kontaminationen wurden Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 250µg/ml hinzugegeben. Transformanten, die ein integratives Transgen enthielten, wurden mit dem Ziel der phänotypischen Segregation in SPP-Medium mit steigenden Mengen ($\leq 400\mu\text{g/ml}$) Paromomycin kultiviert. Außerdem wurde Thymidin (10µg/ml) dem Medium zugesetzt. Nach 3-4 Wochen wurden die Transformanten auf CDM überführt und erstmals auf die Funktionalität ihres auxotrophen Markers überprüft.

3.2 Bestimmung der Zelldichte bei *T. thermophila*

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mittels einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Die Zellsuspension wurde mit 0,5% (v/v) Glutardialdehyd verdünnt und in die Kammer pipettiert. Pro Kammerfüllung wurden vier Großquadrate ausgezählt. Folgende Formel diente zur Bestimmung des Zelltiters:

$$\text{Zelltiter (Zellen/ml)} = (M/64) \times 8 \times \text{Vdf.} \times 10.000$$

M steht für den Mittelwert aus den vier Großquadraten der oberen und der unteren Kammer, Vdf. für den Verdünnungsfaktor. Um Doppelzählungen zu vermeiden, wurden Zellen, welche sich auf der linken sowie unteren Begrenzungslinie eines Großquadrates befanden, nicht mitgezählt.

3.3 Transformation von Bakterien und Ciliaten

3.3.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation mittels Elektroporation wurden zur Erzielung einer geringen Leitfähigkeit Bakteriensuspensionen hergestellt, die wenige Salze enthielten. 5ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie von *E. coli* (DH10B™) beimpft und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Die Kultur wurde in 1l Medium verdünnt (4 x 250ml LB-Medium plus je 500µl Zellsuspension) und bis zu einer OD₅₅₀=0,6 herangezogen. Um das Wachstum der Bakterien zu stoppen, wurde der Kolben 20min auf Eis gekühlt, dann die Zellen 30min bei 4000 x g, 4°C (Sorvall Zentrifuge) abzentrifugiert und die Pellets in je 500ml eiskaltem Aqua dest. gewaschen. Das Pellet wurde in 40ml 10% (v/v) Glycerin aufgenommen und erneut sedimentiert. Anschließend wurden die Bakterien in 2ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und in 40µl Aliquots auf -80°C vorgekühlte Reaktionsgefäße verteilt. Die Lagerung der Bakteriensuspensionen erfolgte bei -80°C.

3.3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Bei der Transformation elektrokompenter Zellen kam der Eppendorf Elektroporator 2510 zur Anwendung. Es wurden elektrokompente *E. coli* Zellen (3.3.1) eingesetzt. Ein Aliquot der Bakteriensuspension (20-40µl) wurde mit 10-20µl aufgereinigter DNA versetzt und in eine eisgekühlte Küvette (1mm Spaltbreite, Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1800V. Die Regeneration der Zellen wurde in 500ml SOC-Medium für 1h bei 37°C und 450rpm vorgenommen. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die Ansätze in Aliquots (20-500µl) auf Selektivnährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

3.3.3 Die *biolistic transformation* von *T. thermophila*

Es wurden konjugierende *T. thermophila* Kulturen zur Transformation eingesetzt. Zur Transformation episomaler und integrativer Vektoren kam die Methode der *biolistic transformation* zum Einsatz. *Biolistic* beschreibt die Worte *biological ballistics*. Bei diesem Prozess wird die Plasmid-DNA auf spezifische Mikroträger (Goldpartikel) geladen, durch komprimiertes Gas beschleunigt und somit in die Zellen geschossen. In dieser Arbeit wurde die Methode der Makronukleus-Transformation gewählt. Diese Methode ermöglicht neben der Transformation von Makronuklei in konjugierende auch die in vegetative Kulturen. Makronuklei können am besten zum

Zeitpunkt der Makronukleusanlagen (10-12h nach Paarungsbeginn) transformiert werden (Cassidy-Hanley, D. *et al.*, 1997).

Konjugation und Vorbereitung der Zellen

Um eine Konjugation einzuleiten, müssen die Zellen zunächst eine Hungerphase durchlaufen. Hierzu wurden logarithmische *T. thermophila* Kulturen zweier unterschiedlicher Paarungstypen bei RT und 1100 x *g* geerntet, in Dryls-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (RT, 1100 x *g*, 3min). Die Zellzahl der jeweils in 50ml Dryls-Puffer aufgenommenen Zellen wurde ermittelt und anschließend in 100ml Dryls-Puffer auf eine Gesamtzellzahl von 200.000 Zellen/ml (je 100.000 Zellen/ml pro Konjugationspartner) eingestellt. Die entstandene Mischkultur wurde für etwa 20h bei 30°C inkubiert und zur Vermeidung einer vorzeitigen Konjugation bei 180rpm geschüttelt. 10h nach Konjugationsbeginn wurden die Zellen bei einer Rate von 60-90% zur Transformation eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wurden 50ml der konjugierenden Zellen je Transformationsvorgang abzentrifugiert (1100 x *g*, 2min, und RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in 800-1000µl Dryls-Puffer aufgenommen. Das resuspendierte Zellpellet wurde kurz vor der Transformation auf einem sterilen, mit Dryls-Puffer befeuchtetem Filterpapier verteilt und in die Mitte einer sterilen Petrischale platziert.

Vorbereitung der Gold-Partikel und der DNA

Zur Transformation von *T. thermophila* wurde die Vektor-DNA mittels einer Plasmid-Maxi- oder Midi-Präparation isoliert und auf eine Konzentration von ~1µg/µl eingestellt. Die Präparation der Goldpartikel erfolgte gemäß eines Protokolls der Seashell Technology. Die DNadel™ Goldpartikel (S550d) lagen in *binding buffer* gelöst in einer Startkonzentration von 50mg/ml vor. Sie wurden zunächst in dem mitgelieferten *binding buffer* auf eine finale Konzentration von 30mg/ml verdünnt und die Plasmid-DNA wurde in einem Verhältnis von 2-5µg pro mg Gold dazugegeben. Nach kurzem Durchmischen erfolgte die Zugabe des Präzipitationspuffers in einem gleichwertigen Volumen und die Lösung wurde erneut kurz durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 3min bei RT wurde die Probe für 10sec (9300 x *g*) abzentrifugiert, um die DNA-umhüllten Partikel zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 500µl eiskaltem Ethanol (100%) gewaschen. Nach kurzem Durchmischen erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt

(RT, 10sec, 9300 x *g*), nach dem der Überstand verworfen und das Pellet abschließend in 20µl 100% Ethanol resuspendiert wurde. Um die Goldpartikel effizient zu lösen, erfolgte hierfür ein Sonografieschritt über 1-2min. Die DNA-beladenen Goldpartikel wurden anschließend in die Mitte eines vorbereiteten Makroträgers pipettiert. Die Trocknung des Trägers erfolgte im Anschluss auf CaCl₂ liegendem Filterpapier.

Transformation

Die Transformation erfolgte mit dem PDS-1000/He Biolistic® Particle Delivery System, welches Helium-Druck zur Beschleunigung der Goldpartikel nutzt. Zur Vorbereitung der Transformation wurde unter Benutzung steriler Pinzetten eine Berstscheibe (totaler Druck: 900psi) in die entsprechende Haltevorrichtung (Berstscheiben-Halter) gelegt und diese in dem Gerät verschraubt. Anschließend wurde ein Stoppgitter auf eine Halterung der Makroträger-Plattform gelegt und der trockene Makroträger mit der DNA-beladenen Seite zum Stoppgitter weisend darüber befestigt. Die Plattform wurde in dem Gerät direkt unterhalb des Berstscheiben-Halters platziert. Kurz vor dem Schuss wurde die geöffnete Petrischale mit den präparierten Zellen unterhalb der Makroträger-Plattform in die Mitte einer Ziel-Plattform gestellt und die Kammertür geschlossen. Bei einem Vakuum-Druck von ~27 *inches of mercury* (Hg) wurde die Kammer gesichert und der Auslöser gedrückt gehalten, bis die Berstscheibe zerriss. Nach dem Belüften wurden die transformierten Zellen verschlossen entnommen und sofort in Proteose Pepton Medium (PP 1%) bei 30°C über Nacht regeneriert (1x 100ml, Fernbachkolben- und 1x 80ml Zellkulturflaschen-Standkultur). Die Selektion der Transformanten erfolgte, wie unter 3.4 beschrieben.

In Abb. 10 wurde der Partikelbeschuss schematisch zusammengefasst.

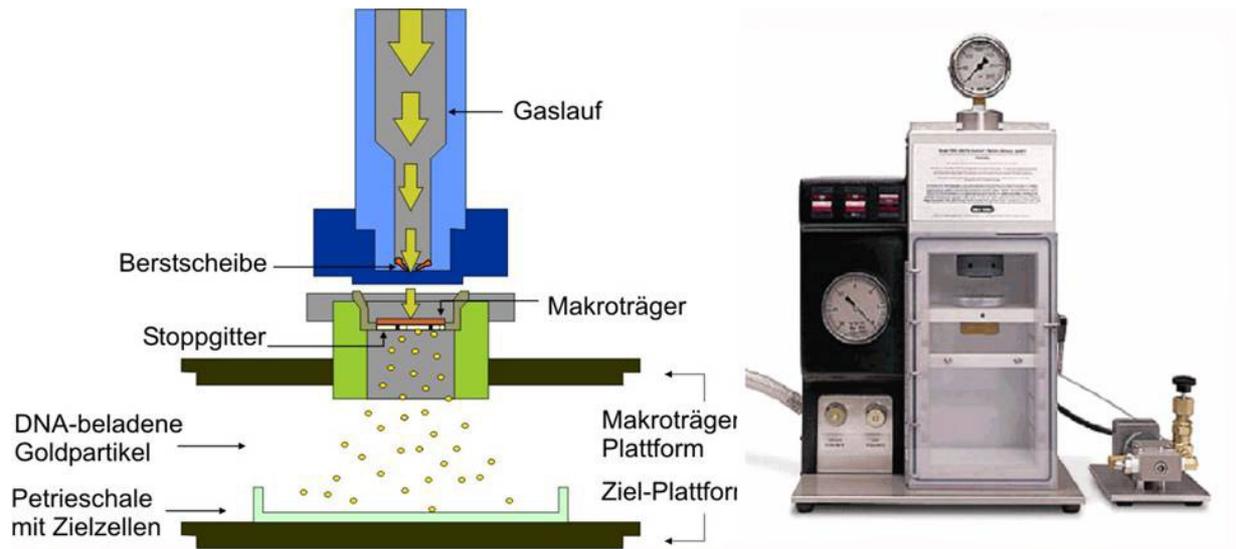


Abb. 10: Schematischer Ablauf der *biolistic transformation* und Darstellung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems

Bei einem Helium-Druck von ~900psi zerreißt die Berstscheibe und der Makroträger mit den DNA-beladenen Goldpartikeln wird beschleunigt. Durch das Stoppgitter wird der Makroträger zurückgehalten, die Goldpartikel fliegen weiter Richtung Zielzellen, um diese dort zu penetrieren und zu transformieren.

3.4 Selektion der *T. thermophila* Transformanten

Zur Selektion der positiven Transformanten wurde den regenerierten Kulturen Paromomycin (150-175µg/ml) hinzugegeben. Die Zellen wurden zur Erleichterung der Identifizierung von Transformanten auf eine 96-Well-Zellkultur-Platte sowie auf eine 24-Well-Zellkultur-Platte verteilt und nach drei bis vier Tagen lichtmikroskopisch untersucht. Wachsende Kulturen deuteten auf eine Antibiotikumresistenz und somit auf eine erfolgreiche Transformation hin. Die putativen Transformanten wurden in Magermilch-Medium, welches 300µg/ml Paromomycin enthielt, überführt. Nach weiteren drei bis vier Tagen wurden die Kulturen erneut auf selektierendes Magermilch-Medium (400µg/ml Paromomycin) übersetzt. Die Stammkulturhaltung der Zellen erfolgte in SPP-Medium mit 400µg/ml Paromomycin.

3.5 Klonierung von DNA

3.5.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mittels des MinElute™ Gel Extraction Kits aufgereinigt. Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in ein steriles 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Die nachfolgende DNA-Extraktion erfolgte, wie in der Anleitung des Herstellers

beschrieben. Die DNA wurde mit 10-30µl sterilem Aqua dest. eluiert und bei –20°C gelagert.

3.5.2 Reinigung von DNA mit dem Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices

PCR-Produkte, Ligationsansätze oder DNA-Restriktionen konnten mittels der Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices von Salzen oder Oligonukleotiden befreit werden. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die erhaltene DNA-Lösung (20µl) konnte bei –20°C gelagert werden.

3.5.3 Isolierung der Gesamt-DNA aus *T. thermophila*

Zur Isolierung von Gesamt-DNA aus spät-logarithmischen *T. thermophila* Kulturen wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit genutzt. Die Präparation der durch eine Zentrifugation (3min, 1100 x g, 10°C) geernteten SPP-Kultur erfolgte nach der Anleitung des Herstellers (DNeasy Protocol for Animal Blood, cultured cells). Es wurde neben der Proteinase K ebenfalls RNase A hinzugefügt. Die gewonnene DNA wurde bei –20°C gelagert oder sofort weiter verarbeitet.

3.5.4 Plasmid-Isolierung mit dem FastPlasmid® Mini Kit

Die analytische Plasmidpräparation in kleinem Maßstab erfolgte mithilfe des FastPlasmid® Mini Kits. 5ml antibiotikumhaltiges LB-Medium wurden mit Bakterien einer Einzelkolonie von einer Transformationsplatte versetzt und über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Etwa 1,5ml der Kultur wurden geerntet und das Zellpellet nach Anleitung des Herstellers bearbeitet. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei 4°C oder -20°C gelagert.

3.5.5 Midi und Maxi-Präparation mit dem HiSpeed™ Plasmid Kit

Midi- sowie Maxi-Präparationen wurden mit dem HiSpeed™ Plasmid Kit durchgeführt. Das Protokoll basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse und einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie. Für Midi-Präparationen wurden 50ml, für Maxi-Präparationen 150ml einer *E. coli* Übernachtskultur verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte, wie im Handbuch des Herstellers beschrieben. Die isolierte DNA wurde bei 4°C oder -20°C gelagert.

3.5.6 Restriktion

Die Spaltung von DNA-Molekülen erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsendonukleasen unter der Verwendung des mitgelieferten Restriktionspuffers. Je nach Enzym entstanden DNA-Fragmente mit glatten Enden (*blunt ends*) oder mit 5'- sowie 3'-überstehenden Einzelstrangenden (*sticky ends*). Die Ansätze wurden ca. 1h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch überprüft.

3.5.7 Ligation

Zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase (5U/μl) unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers eingesetzt. Zur effizienten Ligation sollte die Insert-DNA im Überschuss eingesetzt werden. Die Ligation wurde in einem Gesamtvolumen von 20μl wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C oder 1h bei 37°C.

3.5.8 Rekombination mittels Cre-Rekombinase (Crelox-Verfahren)

Das Crelox-Verfahren ermöglichte den Transfer von der sich in dem Zwischenvektor befindenden Reportergen-kassette in die ausgesuchten Ausgangsvektoren (z.B. pAX oder pKOIX). Der Transfer erfolgte durch homologe Rekombination an spezifischen Rekombinationsstellen (*lox-sites*) (Weide, T. *et al.*, 2007). Der über Rekombination vermittelte Transfer wurde durch das Enzym Cre-Rekombinase mit dem dazugehörigen Puffer katalysiert. Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler 25min bei 25°C, 10min bei 70°C und im Anschluss bei 4°C gelagert. An die Aufreinigung der Reaktionsgemische schloss sich eine Transformation in *E. coli* an. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf speziellen LB-Nährböden, die neben Ampicillin und Chloramphenicol auch 7% Sucrose beinhalten.

3.6 Isolierung der Gesamt-RNA aus *T. thermophila*

Die Isolierung von Gesamt-RNA geschah aus *Tetrahymena* Kulturen der spät-logarithmischen Wachstumsphase mittels des RNAasy™ Plus Mini Kits. Zunächst erfolgte die Ernte von 3-5Mio Zellen durch Zentrifugation (3min, 1100 x g, 20°C). Daraufhin wurde das Pellet einmal in Dryls-Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert (3min, 1100 x g, 20°C), im mitgelieferten RLT-Plus Puffer resuspendiert und die RNA nach Herstellerangaben präpariert. Die Konzentration der RNA wurde mithilfe der photometrischen Bestimmung der Absorption bei 260nm berechnet.

Folgende Formel kam dabei zum Einsatz:

$$\frac{OD_{260} \times 25 \times V_{df.} \times 1}{1000\mu l} = x \mu g/\mu l$$

3.7 PCR-Methoden

3.7.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Fragmenten definierter Länge und Sequenz aus heterogenen Nukleinsäuregemischen (Ibelgaufts, H., 1993). Die PCR erfolgte in der Regel in einem Mastercycler personal. Alle verwendeten Programme gestalteten sich nach einem ähnlichen Grundaufbau.

<u>PCR-Programm:</u>		<u>Pipettierschema:</u>	
1) 95 °C	3 min	<i>template</i> -DNA (0,1 µg/µl)	1 µl
2) 95 °C	1 min	Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
3) variable Temperatur	1 min	dNTP-Gemisch (10 mM)	1 µl
<u>4) 65 °C variabel</u>	<u>1-2 min, 39x</u>	<i>primer</i> 1 (1 µg/µl)	1 µl
5) 65 °C	5-8 min	<i>primer</i> 2 (1 µg/µl)	1 µl
6) 4 °C	∞	Polymerase	1-2 U
		Aqua dest.	ad 50 µ

3.7.2 RT-PCR

Zur Herstellung von cDNA nach einer vollzogenen RNA-Isolierung wurden 1µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die RT-PCR erfolgte nach dem Protokoll von Fermentas mittels des RervtAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit unter der Verwendung des oligo(dT)-*primers* zur reversen Transkriptase von unspezifischer mRNA.

3.8 Sequenzierung von DNA

Sequenzanalytische Untersuchungen von Plasmid-Präparationen wurden von MWG, Ebersberg, Deutschland ausgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm Clone manager suite (siehe 2.15.2) herangezogen.

3.9 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde in einer mit TAE-Puffer gefüllten Horizontal-Apparatur durchgeführt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Konzentration von 1-2% (w/v) in TAE-Puffer gewählt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (6x Loading Dye Solution; MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Gellauf erfolgte bei Feldstärken von 3-10V/cm. Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde das Gel für ~1min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10µg/ml in TAE-Puffer) inkubiert, mit TAE-Puffer gewaschen und anschließend auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302nm fotografisch dokumentiert.

3.10 Elektrophorese und Färbung von Proteinen

3.10.1 Aufbereitung des Probenmaterials

Die Zellzahl einer logarithmisch oder stationär gewachsenen Kultur von *T. thermophila* wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Kammer ermittelt (siehe 3.2). Anschließend wurden 1-10ml der Kultur bei 10°C und 1500 x g geerntet. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation konnten etwa 75% des Überstands abgenommen, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und sofort bei -20°C eingefroren werden. Der restliche Überstand wurde nach einer weiteren Zentrifugation entfernt und das Zellpellet mit Berücksichtigung der einzustellenden Zellzahl in RIPA-Puffer gelöst. Die Suspension wurde dann in einem Ultraschallbad 10-15min homogenisiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Nach der Aufnahme des zu testenden Überstandes und der gelösten Zellpellets in Probenpuffer und einer anschließenden Inkubation von 3min bei 100°C konnte eine Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot stattfinden.

3.10.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (Laemmli, U.K. 1970). Die Elektrophorese wurde in einer Vertikal-Gelelektrophorese-Apparatur mit den notwendigen Puffersystemen unter Nutzung von 12% Tris-Glycin-Gelen mit 10 bis 15 Taschen durchgeführt. Diese wurden entweder bei der Anamed Gelelektrophorese GmbH, Darmstadt, bezogen

oder selbst angefertigt. Die Trenngele hatten eine Dimension von 84 x 50 x 1,5mm und besaßen eine Endkonzentration von 0,375M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,1% SDS. Das 5%ige Sammelgel hatte eine Endkonzentration von 0,125M Tris-HCl (pH 6,8) und 0,1% SDS. Die Laufstrecke für die Proben durch das Sammelgel betrug 1cm. Zum Gießen der 12%igen Trenn- bzw. 5%igen Sammelgele wurde folgendes Protokoll befolgt:

<u>12%iges Trenngel (25 ml Ansatz)</u>		<u>5%iges Sammelgel (12 ml Ansatz)</u>	
8,2ml	Wasser	6,74ml	Wasser
6,3ml	1,5M Tris (pH 8,8)	3ml	0,5M Tris (pH 6,8)
10ml	Acrylamid-Stammlösung	2ml	Acrylamid-Stammlösung
250µl	10% SDS	120µl	10% SDS
250µl	10% APS	120µl	10% APS
10µl	TEMED	20µl	TEMED

Die Agentien APS und TEMED wurden unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugesetzt, da sie die chemische Polymerisation der Gelmatrix einleiten.

Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte bei 150V für etwa 2h. Zur Abschätzung der Molekülgrößen wurde ein Protein-Größenstandard (siehe 2.12.1) auf das Gel aufgetragen.

3.10.3 Western Blot Analyse

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proben wurden nach dem von Kyshe und Anderson, 1984 beschriebenen *semidry*-Elektroblottingverfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) transferiert (Kyshe, L. & Anderson, J. 1984). Vorbereitend wurden sechs Blotting-Papiere in Blot-Puffer I, drei Blotting-Papiere sowie die NC-Membran in Blot-Puffer II und drei Blotting-Papiere in Blot-Puffer III äquilibriert. Die Bestandteile wurden auf die Anodenfläche des Semi-Dry-Blotters in der Reihenfolge der Puffer aufeinandergelegt und das SDS-Polyacrylamid-Gel so zwischen die Membran und die mit Puffer III getränkten Papiere platziert, dass es zur Kathode wies. Der Blot wurde bei konstanter Stromstärke (1mA/cm² Gelfläche) für 1-2h durchgeführt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder für 1h bei RT in Blocking-Lösung (siehe 2.9) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Der Erstantikörper wurde in der entsprechenden Arbeitsverdünnung auf die NC-Membran gegeben und 1h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Es

folgten drei bis vier Waschschr tte für ~10min in PBS-T, bevor der entsprechende Zweitantikörper aufgegeben wurde (1h, RT, leichtes Schütteln). Nach weiteren Waschschr tten in PBS-T für je ~10min bei RT erfolgte die Detektion. Hierzu wurden die Substratlösungen aus dem Kit Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und nach einer Inkubation von einer Minute in eine Folie eingeschweißt. Die Expositionszeit der Membran auf dem Röntgenfilm betrug 0,5-60min. Für die Detektion in dem Chemilumineszenz-Gerät "Diana III" wurde ein Chemilumineszenz-Substrat aus:

250mM Luminol in DMSO
90mM p-Cumarsäure in DMSO
1M Tris/HCl (pH 8,5)
35%iges H₂O₂
ad 20ml Aqua dest.

auf der Membran gleichm Big verteilt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Kamerasystem analysiert.

3.10.4 Wiederholte Detektion von Western Blots (*stripping*)

Bei manchen Experimenten bietet es sich an, eine bereits detektierte Membran auf ein weiteres Protein oder erneut auf dasselbe Protein mithilfe anderer Antiseren zu untersuchen. Hierzu müssen die bereits gebundenen Antikörper von der Membran gewaschen werden. Dieses sogenannte *stripping* erfolgte durch mehrfaches Waschen mit *Stripping*-Puffer (siehe 2.9) und anschließendem  quilibrieren in PBS-T. Die Membran konnte so erneut geblockt und weiter verarbeitet werden.

3.11 Quantifizierung von rekombinant exprimierten Proteinen aus *T. thermophila*

Ein Verfahren zur Mengenbestimmung rekombinanter Proteine im Zellpellet oder aus dem extrazellulären Kulturmedium ist die Quantifizierung im Anschluss an eine durchgeführte SDS-PAGE und eine Western Blot Analyse. Mittels einer Videodokumentationsanlage (CCD-Kamerasystem) wird hierbei das Chemilumineszenzsignal des zu detektierenden Proteins ausgewertet. Für den Überstand oder für das vorbereitete Zellpellet einer induzierten Zellkultur wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt und zur Erstellung einer Eichgeraden wurde das zu

bestimmende Protein in gereinigter Form und in unterschiedlichen Konzentrationen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die nach der Western Blot Analyse folgende Detektierung durch entsprechende Antikörper und mithilfe des CCD-Kamerasystems Diana III wurde anhand der AIDA Image Analyser Software ausgewertet (siehe 2.15.2).

3.12 Enzym-Tests

3.12.1 Isocitratdehydrogenase-Test

Intrazelluläre Enzyme können durch Zellschädigung oder Zellyse in das externe Medium gelangen. Das Enzym Isocitratdehydrogenase (ICDH) kommt in den Mitochondrien vor und weist eine hohe cytosolische Aktivität und Stabilität auf. Die ICDH stellt ein Markerenzym für eine eventuelle Zellschädigung der Kulturen dar. Der enzymatische UV-Test wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt (Biochemika, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim). Zur Bestimmung der Aktivität der ICDH wurden 200µl ICDH-Puffer mit 50µl Probe in den Kalotten einer 96-Well-Mikrotiterplatte versetzt (Tiedtke, A. *et al.*, 1988). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl NADP/MnSO₄-Lösung gestartet. Die Extinktion der Ansätze wurde in einem Mikrotiterplatten-Reader (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Vermont, USA) bei einer Wellenlänge von 399nm bestimmt. Für zehn Minuten wurde alle 30sec ein Messpunkt aufgezeichnet. Die ICDH-Aktivität wurde als Anteil der ICDH-Aktivität des zellfreien Überstands zu der gesamten ICDH-Aktivität im Zellysate bestimmt.

ICDH-Puffer:

0,1M	Triethanolamin-hydrochlorid
4,6mM	Isocitronensäure
25mM	Natriumcarbonat
51,3mM	Natriumchlorid
in Aqua dest., pH 7,5	

NADP/MnSO₄-Lösung:

9,1mM	β-NADP
0,124M	MnSO ₄ (Mangansulfat)
in Aqua dest.	

3.12.2 BAPNA-Assay

BAPNA (Benzoyl-Arginin-p-Nitroanilid) ist aufgrund seines ausgeprägt basischen Argininrests ein spezifisches Substrat für trypsin-ähnliche Proteaseaktivitäten, aber auch für Cystein-Proteasen wie z. B. Papain, das vorwiegend Peptidbindungen spaltet, an denen basische Aminosäuren beteiligt sind (Lysin, Arginin, Histidin). Der BAPNA-Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität beruht auf der Freisetzung einer chromogenen Gruppe aus dem Peptid-Analogon N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitranilid-hydrochlorid (BAPNA) (Murrice, C. 1986). Der Test wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden 50 μ l der Probe mit TED-Puffer auf 250 μ l aufgefüllt bzw. 250 μ l der Papain-Lösung (Papain aus *Carica papaya*) eingesetzt. Die Präinkubation erfolgte für 5min bei 28°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l Substratlösung gestartet. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 410nm, die Reaktionstemperatur betrug 28°C, wobei 60min lang, alle 3min eine Messung durchgeführt wurde. Im Rahmen der Auswertung wurde die Steigung der Enzymkinetik nach Abzug des Leerwertes (50 μ l Probe + 200 μ l TED + 10 μ l DMSO) auf die bekannte Aktivität des Papains bezogen. Jede Probe wurde in einer 3-fachen Bestimmung vermessen.

TED-Puffer:

200mM	Tris/HCl	pH 7,5
1mM	1,4-Dithiothreitol (DTT)	

Papain-Lösung:

1mg/ml Papain in TED

Substratlösung:

20mg/ml N α -Benzoyl-DL-arginin-4-nitranilid-hydrochlorid in DMSO

3.12.3 Azocasein-Test

Der Azocasein-Test ist ein unspezifischer Enzymtest, mit dem praktisch alle Proteaseaktivitäten erfasst werden. Hierbei spaltet die Protease aus dem Substrat nicht nur Aminosäuren und Peptide, sondern auch die Azogruppe ab. Die abgespalteten Azokomponenten sind in Trichloressigsäure (TCA) löslich und können photometrisch gemessen werden. Der Test wurde nach Murrice, 1986 durchgeführt. Dazu wurden 600 μ l einer Azocasein-Test-Lösung mit 200 μ l Substratlösung (2,5%ig Azocasein in Azocasein-Test-Lösung) und 200 μ l Probe

gemischt und für 60min bei 28 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 120µl 50%iger, 4 °C kalter TCA gestoppt und 5min auf Eis inkubiert. Nach 4min Zentrifugation bei 16.000 x g wurde die Extinktion des Überstandes bei 340nm mittels eines Photometers bestimmt. Als Leerwert wurde eine Probe verwendet, die statt der Probenlösung destilliertes Wasser enthielt.

Azocasein-Test-Lösung:

250mM	Saccharose
100mM	Kaliumchlorid
50mM	Tris/HCl; pH 7,4
1mM	Magnesiumchlorid
5mM	Mercaptoethanol

3.12.4 Enzymtest für die β-Hexosaminidase

Zum Test auf β-Hexosaminidase-Aktivität wurden 20µl Probe mit 50µl Substratlösung in 96-Well-Mikrotiterplatten gemischt und für 30min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200µl Stopppuffer abgebrochen und die Extinktion der Wells bei 405nm bestimmt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die Extinktion des Leerwertes (20µl Probe + 50µl Puffer p1) von der Extinktion der Probe abgezogen. Jede Probe wurde in einer 3-fachen Bestimmung vermessen.

Substrat:

p-Nitrophenyl N-Acetyl-β-D-Glucosaminid

Puffer p1:

0,1M Citrat, pH 4,6

0,04% Na-Azid

0,2% BSA

Substratlösung:

10mM p-Nitrophenyl-Substrat in Puffer p1

Stopppuffer:

0,4M Glycin/NaOH, pH 10,4

3.12.5 Enzymtest für Saure Phosphatase

Es wurden 20µl Probe mit 50µl Substratlösung in 96-Well-Mikrotiterplatten gemischt und für 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200µl Stopppuffer abgebrochen und die Extinktion der Wells bei 405nm bestimmt. Zur Berechnung der Enzymaktivität wurde die Extinktion des Leerwertes (20µl Probe + 50µl Puffer p1) von der Extinktion der Probe abgezogen. Jede Probe wurde in einer 3-fachen Bestimmung vermessen.

Substrat:

Phosphorsäure-mono-(4-nitrophenylester) Dinatriumsalz Hexahydrat

Puffer p1:

0,1M Citrat, pH 4,6

0,04% Na-Azid

0,2% BSA

Substratlösung:

10mM p-Nitrophenyl-Substrat in Puffer p1

Stopppuffer:

0,4M Glycin/NaOH, pH 10,4

3.13 Fermentation

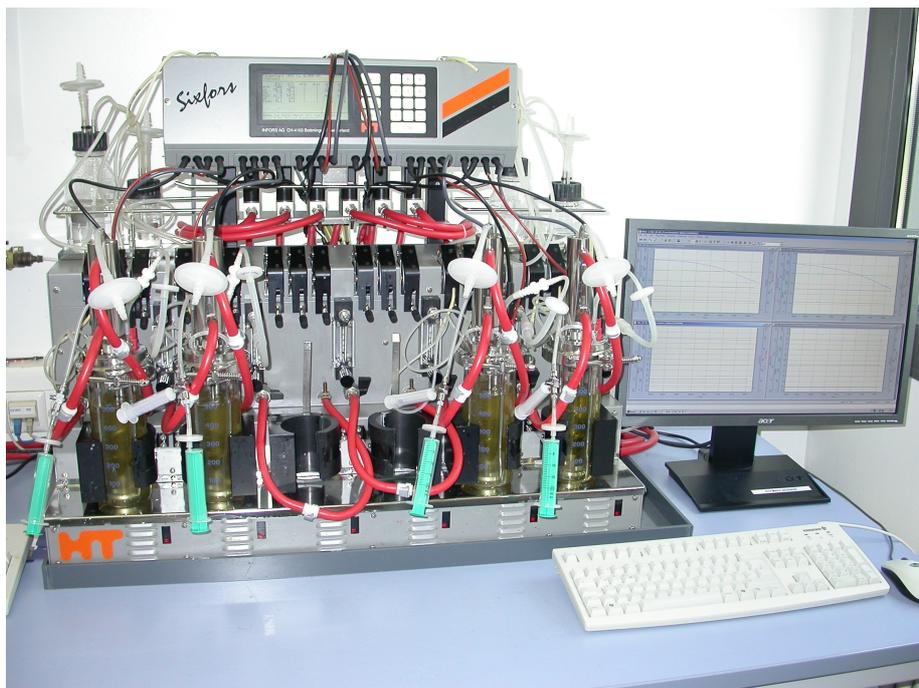


Abb. 11: Darstellung des Sixfors®-Multi-Fermentersystems

Vier von sechs individuellen Mini-Fermentern sind befüllt und angeschlossen.

Die Fermentation ausgewählter *T. thermophila* Kulturen erfolgte mittels eines Sixfors[®]-Multi-Fermentersystems, welches mit einem Volumen von 200-500ml operiert. Hierbei greift das System auf sechs individuell kontrollierbare Mini-Fermenter zurück, die in ihrem Temperaturngleichgewicht und ihrer Begasungsrate separat eingestellt werden können. Weiterhin ist eine kontinuierliche Erfassung und Kontrolle der pH- sowie der pO₂-Werte möglich.

Der Sixfors[®] arbeitet unter dem digitalen U-DDC-System (*Usual Direct Digital Control* = Kontrolle über einen zentralen Mikroprozessor), welches eine unabhängige parallele Kontrolle aller wichtigen Prozessparameter erlaubt. Die Datenerfassung und Analysierung erfolgt hierbei mithilfe der IRIS V 5.0 Software.

Die einzusetzenden Sixfors[®]-Reaktoren wurden, soweit bereits möglich, durch notwendige Montageschritte vorbereitet. Zur Kalibrierung der pH-Elektroden wurde zu Beginn ein Kalibrierungspuffer mit pH 7,0 und im Anschluss ein Kalibrierungspuffer mit pH 4,0 verwendet. Die Einstellung fand direkt am Gerät statt. Nach anschließendem Abspülen mit Aqua dest. wurden die pH- sowie die pO₂-Elektroden in den zugehörigen Fermenterkolben eingesetzt und zusammen mit den zur späteren pH-Wert-Kontrolle notwendigen Lösungen sowie 500ml SPP-Medium autoklaviert. Dem Nährmedium wurde zuvor 250µl Entschäumer (Silfar[®] SE-4) pro 500ml (0,05%) hinzugegeben und enthielt zunächst keine Glukose. Nach separatem Autoklavieren wurde eine 20%ige Glukoselösung sowie pro Reaktor 500µl Penicillin/Streptomycin zum Schutz vor Bakterienbewuchs und ggf. 2ml Paromomycin (400µg/ml) zur Stabilisierung der zu exprimierenden Zielgene kurz vor der Inokulation steril hinzugefügt. Auf die Sterilisierung folgend war noch ein Montageschritt zum Anschluss an das Bioreaktorsystem notwendig. Nach dem Anschließen der Kühlvorrichtung erfolgte direkt vor Beginn der Fermentation die Kalibrierung der pO₂-Sonden. Um den 100%-Wert festzusetzen wurde das SPP-Medium bei 500rpm und 0,1l/min Begasung im Reaktor gerührt. Dieser Vorgang führte zunächst zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration. Nach einiger Zeit blieb die Konzentration konstant. Dieser Wert wurde als 100%-Sauerstoffsättigung definiert. Der Sauerstoffgehalt des Nährmediums hängt von der Rührerdrehzahl ab. Bei Absenkung der Sauerstoffsättigung unter 20% wird der O₂-Eintrag durch Steigerung der Rührergeschwindigkeit automatisch erhöht. Die Fermentation erfolgte mit einem Starttiter von 20.000-30.000 Zellen/ml und fand bei einer Temperatur von

30°C statt, die über Temperatursensoren konstant gehalten wurde. Der pH-Wert wurde während der Kultivierung über die pH-Sonden kontrolliert und konnte bei Bedarf über die Zufuhr von 20% Essigsäure oder 1M NaOH-Lösung korrigiert werden. Zu Beginn lag der pH-Wert bei 7,0.

Um das Zellwachstum über die gesamte Kultivierungsdauer protokollieren zu können, wurden in Abständen von ~2-4h Proben entnommen und der Zelltiter bestimmt. Nach einiger Zeit des Zell-Wachstums (~24-48h) und ca. 4h vor der Induktion der Genexpression konnte eine zusätzliche *feeding* vorgenommen werden, bei dem den Zellen erneut SPP-Medium in konzentrierter Form in einem Volumen von ca. 30ml zugefügt wurde. Die Induktion mittels Cadmiumchlorid zur Expression des gewünschten Proteins erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase oder beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase.

Nach Beenden des Fermentationsprozesses wurde aus der verbliebenen Zellkultur der zellfreie Überstand gewonnen. Dies erfolgte durch vier aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte in einer Sorvall Evolution RC Zentrifuge (10°C, 1500 x g, 8min). Abschließend wurden die gewonnenen Überstände aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

3.14 Sicherheitsbestimmungen

Die gentechnischen Arbeiten wurden gemäß dem „Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik“ (Gentechnikgesetz, GenTG) vom 16.12.1993 unter Beachtung der in §7 Abs. 1 GenTG formulierten Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Die Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8 Abs. 1 und § 11 des Gentechnikgesetzes.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung von Vektoren zur rekombinanten Produktion *plasmodialer* Antigene mittels *Tetrahymena thermophila*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besteht die dringende Notwendigkeit zur Entwicklung eines erfolgreichen Vakzins gegen Malaria. Um diesem Ziel näherzukommen, beschäftigt sich diese Arbeit mit einer innovativen Expressionsplattform basierend auf dem frei lebenden Ciliaten *Tetrahymena thermophila* (*T. thermophila*) als bisher ungenutzte Methode zur Produktion vielversprechender Antigene aus dem Blutstadium des Malaria Erregers *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Zur Expression dieser auf MSP-1 (*Merozoite Surface Protein 1*) Block2 und auf PfEMP1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*) Var2CSA basierenden Proteine wurden zunächst geeignete Klonierungs- und Expressionsvektoren konstruiert und rekombinante *T. thermophila* Stämme generiert.

4.1.1 Design und Klonierung der MSP-1 und Var2CSA Expressionskassetten

Zur Ermöglichung einer effektiven Produktion der Malaria Antigene MSP-1Block2 und Var2CSA wurde ein Vektor gewählt, welcher neben den für die Amplifikation und Selektion in *E. coli* essenziellen Eigenschaften eine für die heterologe Proteinproduktion in *T. thermophila* modulare Expressionskassette enthält. Diese beinhaltet einen starken, mit Cadmium induzierbaren Promotor des *Tetrahymena* eigenen Metallothionein-Gens 1 (MTT₁), einen aus *Tetrahymena* stammenden Terminator des Betatubulin-Gens 2 (BTU₂) und zwecks gewünschter Sekretion der Antigene in den Zellkulturüberstand das Signalpeptid des MSP-1 aus *P. falciparum*. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pDL-325 (7366bp) und wurde von der Cilian AG zur Verfügung gestellt (siehe 2.3; Weide, T. *et al.*, 2007).

Über eine *EcoRV* und *BglII* Restriktion wurden die unterschiedlichen Transgene *downstream* des Signalpeptids in den Vektor integriert. Hierbei reflektierten die entstandenen Expressionskassetten die verschiedenen Zielsetzungen bei der Vakzinkandidatenproduktion: Auf der einen Seite wurde ein Konstrukt auf der Grundlage des N-terminalen Bereichs des hoch polymorphen ~200kD Vorstufen-Proteins des Hauptantigenkomplexes der Merozoitenoberfläche (MSP-1Block2) generiert und auf der anderen Seite ist ein Konstrukt entwickelt worden, welches zur Produktion verschiedener Domänen der Var2CSA Variante des variablen PfEMP1

eingesetzt werden kann. Die kodierende Block2-Sequenz des an der Invasion von Erythrozyten beteiligte MSP-1 weist einen sehr hohen Polymorphismus auf und es kann zwischen drei Allelfamilien (K1, Mad20 und RO33) unterschieden werden (Tanabe, K. *et al.*, 1987). K1 und Mad20 zeigen im Gegensatz zu dem relativ konserviertem Serotyp RO33 eine besonders hohe Sequenzdiversität. Zur Generierung des MSP-1 basierenden Vakzins wurde ein multiallelisches Hybridkonstrukt entworfen, welches alle bekannten Sequenzdiversitäten innerhalb der Block2-Serotypen (K1, Mad20, RO33) abdeckt.

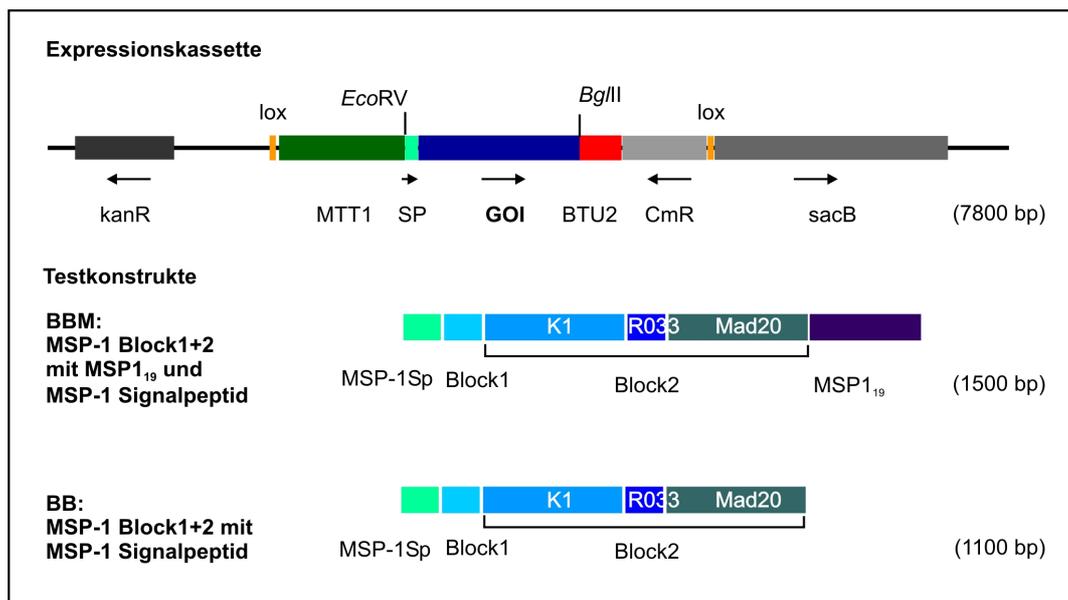


Abb. 12: Multivalente auf MSP-1Block2 basierende Konstrukte

Die Abbildung stellt die Expressionskassette für die beiden multiallelischen Hybridkonstrukte BBM und BB dar. MTT₁ steht hierbei für den Metallothionein Promotor, SP für das MSP-1-Signalpeptid, GOI bezeichnet das *gene of interest*, kanR und CmR stehen für die *E. coli* Selektionsmarker durch das Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzgen und sacB bezeichnet einen weiteren *E. coli* Selektionsmarker, das Levansucrasegen. Das Testkonstrukt BBM umfasst ~1500bp, während das Testkonstrukt BB ~1100bp beinhaltet. Die abgebildete Expressionskassette umfasst insgesamt ca. 7800bp.

Die hierzu nötigen Zielensequenzen wurden im Rahmen einer EU-geförderten Forschungskoooperation von Prof. Dr. David Cavanagh der Universität von Edinburgh entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die synthetische Sequenz der Zielprodukte ist im Anhang dargestellt (siehe 9.6). Der offene Leserahmen, der eine Tandemanordnung der durchschnittlich im Block2 benutzten Tripeptide unterschiedlicher K1 und Mad20-Typen sowie die nicht polymorphe Block2-Sequenz des RO33 beinhaltet, wurde synthetisch hergestellt und an die Kodonpräferenz für hoch exprimierte Gene in *T. thermophila* angepasst. Weiterhin wurden alle potenziellen N-Glykosylierungsstellen im Block2 eliminiert und zusätzlich zur

Verbesserung der immunogenen Aktivität Sequenzen angefügt, die bereits bekannte humane T-Zell Epitope benachbarter Regionen beinhalteten (John, C.C. *et al.*, 2004; O'Donnell, R. *et al.*, 2001, Arnot, D.E. *et al.*, 2008). Hierbei handelte es sich zunächst um die Sequenz von Block1, welche dem multiallelischen Hybrid-Block2 N-terminal angefügt wurde (Block1-Block2 (BB)). Bei einem zweiten Konstrukt wurde darüber hinaus die BB-Sequenz C-terminal über eine kurze *spacer*-Region mit der MSP-1₁₉ Peptidsequenz fusioniert, welches in dieser Arbeit mit Block1-Block2-MSP-1₁₉ (BBM) bezeichnet wird. Auf diese Weise bestand die Möglichkeit, zwei unterschiedliche MSP-1-Varianten zu analysieren.

Da es aufgrund der Größe von Var2CSA mit über 350kD nur schwer möglich ist, das vollständige Protein zu exprimieren, sollten zur Produktion eines Var2CSA basierenden Malaria Antigens die verschiedenen Bereiche, d. h. verschiedene DBL-Domänen kloniert und auf ihre Funktionalität überprüft werden. Somit wurde in dieser Arbeit eine variable Expressionskassette, die die Expression verschiedener Domänen erlaubt, hergestellt. Hierbei wurde das Ziel verfolgt, verschiedene Domänen zu identifizieren, die die Natur insoweit imitieren, dass sie die Produktion von Antikörpern bewirken, welche eine Adhäsion an CSA und somit eine schwangerschaftsassoziierte Malaria inhibieren. Die Auswahl der entsprechenden Antigene erfolgte hierbei im Rahmen der EU-geförderten Kooperation durch Prof. Dr. Thor Theander der Universität von Kopenhagen, der auch die Zielgenesequenzen freundlicherweise zur Verfügung stellte. Durch das Einfügen geeigneter Restriktionsschnittstellen ist die Möglichkeit gegeben, die verschiedenen DBL-Domänen auszutauschen. N-terminal wurde dem Konstrukt ein V5-*tag* und zusätzlich ein His₆-*tag* angefügt, um den Nachweis über die Expression der Antigene und eine Proteinaufreinigung zu gewährleisten. In dieser Arbeit wurden für die Klonierungen die Sequenzen der Var2CSA DBL2- und DBL3-Domänen verwendet.

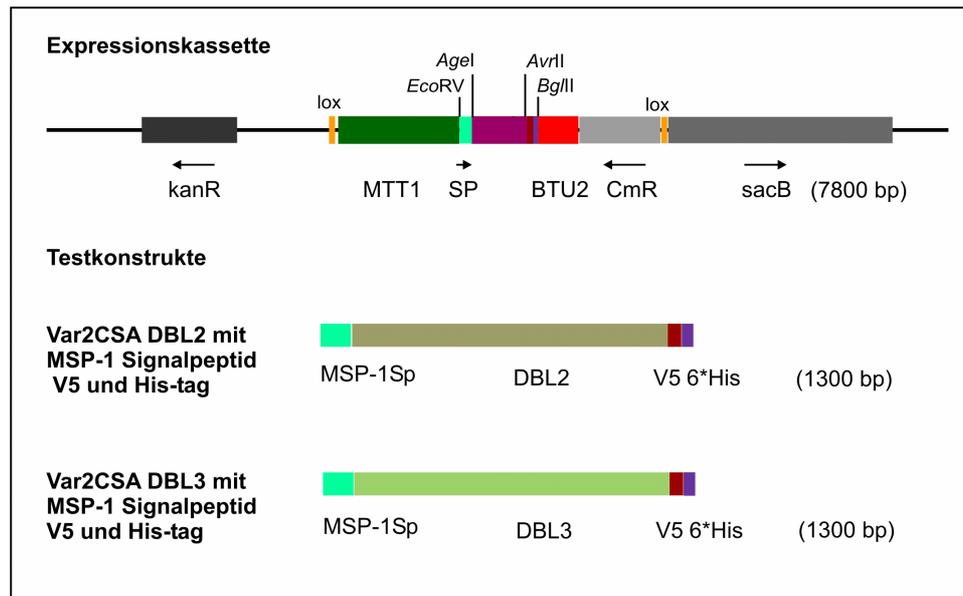


Abb. 13: Konstruktion der Var2CSA basierenden Expressionskassetten

Die Abbildung stellt die Expressionskassette für die auf Var2CSA basierenden DBL-Domänen DBL2 und DBL3 dar. MTT₁ steht hierbei für den Metallothionein Promotor, SP für das MSP-1-Signalpeptid, kanR und CmR bezeichnen die *E. coli* Selektionsmarker durch das Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Resistenzgen und sacB steht für einen weiteren *E. coli* Selektionsmarker, das Levansucrasegen. Die Restriktionsschnittstellen Agel und AvrII bieten die Möglichkeit, die gewünschte DBL-Domäne auszutauschen. Die Testkonstrukte DBL2 und DBL3 umfassen ~1300bp. Die abgebildete Expressionskassette umfasst insgesamt ca. 7800bp.

Nach erfolgreicher Klonierung der multiallelischen Hybrid Block2 und der Var2CSA Antigene in den Vektor pDL-325 lagen die Vektoren pDL-BBM, pDL-BB, pDL-DBL2 und pDL-DBL3 vor (siehe 2.3 und 9.4). Die entsprechenden Expressionskassetten wurden mittels einer Cre-abhängigen Rekombinase-Technik (siehe 3.5.8) in einen episomalen und einen integrativen *T. thermophila* Expressionsvektor übertragen, welche von Weide *et al.* 2007 entwickelt wurden (Weide, T. *et al.*; 2007).

4.1.2 Konzept der Expressionsvektoren

Durch die Cre-spezifische Rekombination entstanden die episomalen Expressionsvektoren pAX-BB, pAX-BBM, pAX-DBL2 und pAX-DBL3 sowie die integrativen Vektoren pKOIX-BB, pKOIX-BBM, pKOIX-DBL2 und pKOIX-DBL3. Beide Ausgangsvektoren (pAX und pKOIX) sind zur näheren Erläuterung neben den konstruierten Expressionsvektoren im Material- und Methodenteil (siehe 2.3) aufgeführt. Nach einer vollzogenen sequenzanalytischen Untersuchung durch die Firma MWG, Ebersberg zur Bestätigung der korrekten Integration der Zielgenkassetten in die Expressionsvektoren, wurden diese durch das Verfahren des *biolistic bombardments* in den Makronukleus von *T. thermophila* transformiert (siehe 3.3.3). Anschließend wurden die durch eine Selektion auf die plasmidkodierende

Paromomycinresistenz entstandenen Transformanten lichtmikroskopisch identifiziert. Die Transformanten, die auf Grundlage des episomalen Expressionsvektors pAX entstanden waren, konnten unter aufrechterhaltenem Selektionsdruck nach zwei bis drei Wochen charakterisiert werden. Für Transformanten, die basierend auf dem integrativen Vektor produziert wurden, erfolgte die Charakterisierung nach sechs bis acht Wochen. Im Zuge der Transformation wurden die Expressionskassetten der integrativen Vektoren in den Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase-Lokus (DHFR-TS) des Ciliaten inseriert. Zur Ermöglichung einer effektiven Expression der Zielgene mussten zunächst mittels der phänotypischen Segregation (*allelic assortment*) alle 45 Wildtyp Kopien des DHFR-TS-Gens durch die Expressionskassetten ersetzt werden. Nach diesem Prozess zeigten die sogenannten Aussortierer die Integration der Expressionskassetten und damit die eingebrachte Deletion des DHFR-TS-Gens über eine Thymidin-Auxotrophie. Ein Wachstumsassay der putativen *T. thermophila* Transformanten auf chemisch definiertem Medium (CDM) ohne Thymidin wies die auxotrophen Klone aus. Die stabilen und Thymidin auxotrophen Klone konnten nachfolgend ohne Selektionsdruck in Anwesenheit von Thymidin kultiviert werden. Sowohl alle Thymidin auxotrophen Klone als auch alle erfolgreich episomal transformierten Stämme wurden durch Einsatz einer PCR molekular verifiziert. Der Nachweis über die Expression der klonierten Antigene erfolgte mittels Western Blot Analysen.

4.1.3 Molekulare Verifizierung der *T. thermophila* Transformanten

Kulturen, die durch die Antibiotikumselektion und gegebenenfalls durch ihre erworbene Auxotrophie ermittelt werden konnten, wurden zu einer molekularbiologischen Analyse herangezogen. Hierfür wurde die Gesamt-DNA repräsentativer Transformanten sowie eines *T. thermophila* Wildtypstammes (1868.4) isoliert (siehe 3.5.3) und mittels PCR auf das Vorliegen der korrekten Expressionskassetten überprüft. Die Amplifizierung eines Bereiches des in *T. thermophila* endogen vorliegenden Beta-Hexosaminidase-Gens für alle isolierten DNA-Proben diente dem Nachweis der korrekten Gesamt-DNA-Präparation. Repräsentative Beispiele für diese PCR-Analysen sind in Abbildung 14 dargestellt.

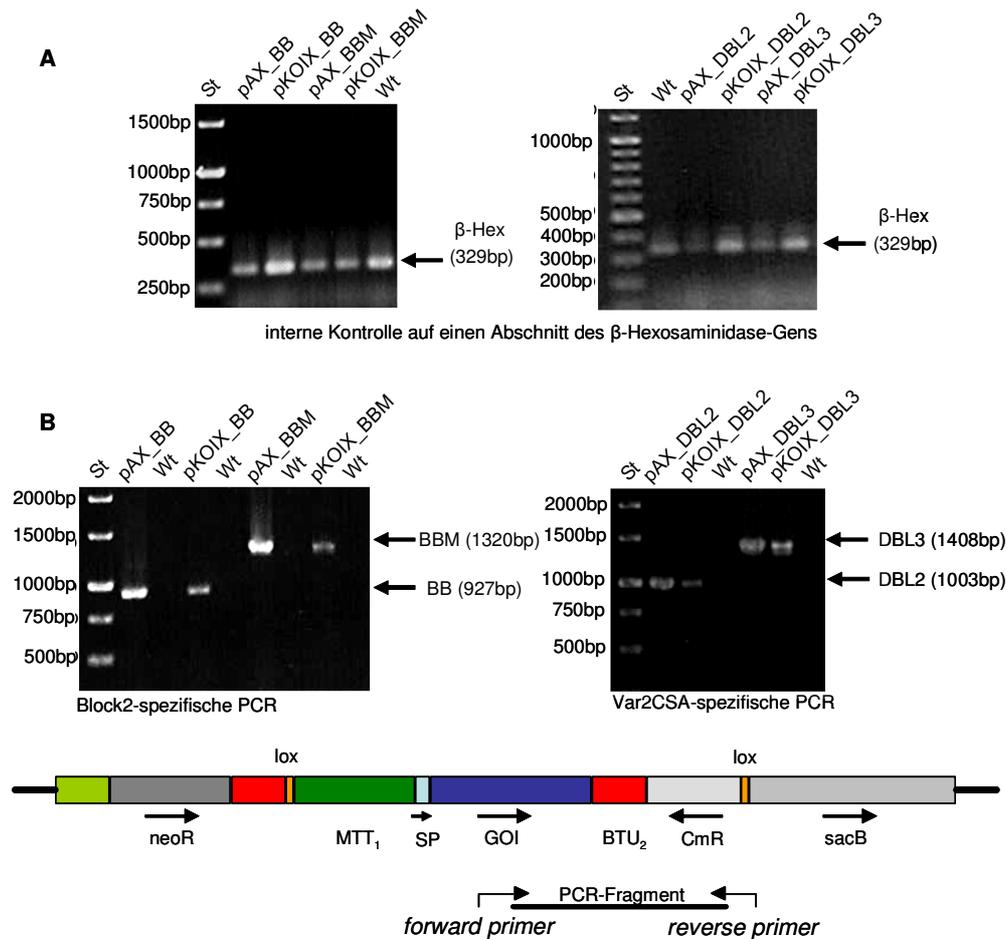


Abb. 14: Molekulare Verifizierung der generierten *T. thermophila* Transformanten

Die Abbildung präsentiert die Agarosegelelektrophorese der PCR-Analysen der durchgeführten DNA-Präparationen. **A** stellt hierbei eine interne Kontrolle der Präparation durch die Amplifikation eines Bereiches der *Tetrahymena* eigenen Beta-Hexosaminidase (329bp) dar, während **B** die Block2 (927bp/1320bp) bzw. Var2CSA (1003bp/1408bp) spezifische PCR zur Überprüfung der Expressionskassette zeigt. „St“ bezeichnet hierbei den Standard (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder plus bzw. GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und „Wt“ die Analyse der Wildtyp DNA. Zusätzlich ist der Aufbau der allgemeinen Expressionskassette dargestellt, mit dem der Ort der Hybridisierung der Block2 bzw. Var2CSA spezifischen *primer* verdeutlicht wird. MTT₁ bezeichnet hierbei den Metallothionein-Promotor, SP das MSP-1-Signalpeptid, GOI steht für das *gene of interest* und BTU₂ bezeichnet den Beta-Tubulin-Terminator. Die Paromomycin-resistenzkassette wird mit neoR abgekürzt, das Chloramphenicolresistenzgen mit CmR und sacB steht für das Levansucrasegen.

Wie in der Darstellung zu erkennen ist, konnte mit der unspezifischen Kontrolle auf die durchgeführte DNA-Präparation der entsprechende Abschnitt des Beta-Hexosaminidase-Gens in korrekter Größe (329bp) amplifiziert werden. Nach Auftrennung der PCR-Fragmente in einem 1% Agarosegel konnten die verschiedenen Bereiche der Expressionsvektoren nachgewiesen werden. Hierbei entstanden unter Verwendung des *forward primers* BBM_Seq_F und des *reverse primers* CMR_R für die BBM-Konstrukte Banden einer Größe von 1320bp und für die BB-Konstrukte Banden einer Größe von 927bp.

Für die DBL-Konstrukte wurde derselbe *reverse primer* eingesetzt, dabei kamen die zielgenspezifischen *forward primer* DBL2_Seq_F und DBL3_Seq_F zum Einsatz. Hierbei ergaben sich Amplifikate von 1003bp für die episomalen und integrativen DBL2-Konstrukte sowie Amplifikate von 1408bp für die episomalen und integrativen DBL3-Konstrukte.

Bei der Negativkontrolle, für die die isolierte Gesamt-DNA eines Wildtyps (Wt) eingesetzt wurde, konnte bezüglich des spezifischen Nachweises wie erwartet keine Bande detektiert werden.

4.1.4 Expression der auf MSP-1 und Var2CSA basierenden Antigene mittels *T. thermophila*

Um die rekombinanten *T. thermophila* Stämme bezüglich der Expression der entsprechenden Malaria Antigene zu analysieren, wurden transformierte und molekularbiologisch verifizierte *Tetrahymena* Klone unter Selektionsdruck (400µg/ml Paromomycin) 72h kultiviert. Aus diesen Kulturen wurde eine Hauptkultur mit definierter Zellzahl (100.000 Zellen/10ml) inokuliert. Nach 24h Wachstum erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von Cadmiumchlorid (5µg/ml) (Bockau, U. 2006) und nach weiteren 24h die Kulturernte. Hierbei wurden sowohl die Zellpellets als auch die zellfreien Überstände gewonnen. Als Negativkontrolle wurden parallel auch Kulturen mitgeführt, bei denen keine Induktion der Proteinexpression vorgenommen wurde.

Die vorbereiteten Proben (siehe 3.1.4), bei denen für die auf MSP-1Block2 basierenden Klone aufgrund der Spezifität der zu verwendenden Antikörper (12.8 und 12.10, siehe 2.11) kein Probenpuffer mit reduzierenden Agenzien verwendet werden durfte, wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und nachfolgend im Western Blot mit dem 12.2 Antikörper analysiert. In Abb. 15 ist ein repräsentativer Immunoblot der MSP-1 Expressionsanalysen dargestellt.

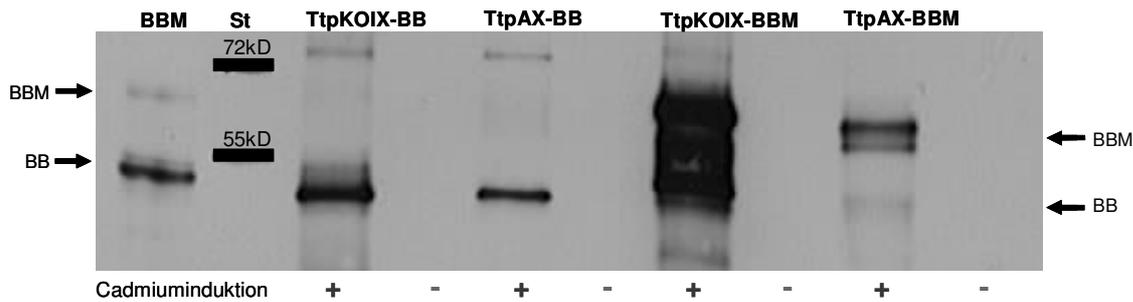


Abb. 15: Expressionsanalysen der auf MSP-1Block2 basierenden Transformanten

Es wurden für die SDS-PAGE ca. 2500 Zellen der Stämme TtpKOIX-BB, TtpAX-BB, TtpKOIX-BBM und TtpAX-BBM pro Bahn aufgetragen. „+“ bezeichnet hierbei die Induktion der Proteinexpression mittels Cadmiumchlorid, „-“ entspricht der gleichen Kultur ohne Induktion der Proteinexpression. Zellpellets von Kulturen mit integriertem Vektor (pKOIX-BB/BBM) und episomalen Vektoren (pAX-BB/BBM) wurden analysiert. Hierbei konnten BB-spezifische Banden bei ~50kD und BBM-spezifische Banden bei 65-70kD detektiert werden. Die nicht induzierten Kontrollen zeigten keine Banden. Es wurde der monoklonale Erstantikörper 12.2. in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. „St“ zeigt den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH) an. 5ng BB + BBM, rekombinant aus *E. coli* gewonnen (BBM), wurden als Referenz aufgetragen.

Es ist zu erkennen, dass die entsprechenden Antigene (BB und BBM) durch die rekombinanten *T. thermophila* Stämme, welche mit episomalen sowie integrativen Expressionsvektoren transformiert worden waren, intrazellulär erfolgreich exprimiert wurden. Die exprimierten Proteine auf der Grundlage von MSP-1 konnten durch den monoklonalen und gegen Block2 gerichteten Antikörper (12.2) detektiert werden. Während das für BB berechnete Molekulargewicht inklusive des MSP-1-Signalpeptids bei 31kD liegt, zeigten sich die entsprechenden Banden des Proteins aus *T. thermophila* in einer Höhe von ungefähr 50kD. Das theoretische Molekulargewicht von BBM mit Signalpeptid liegt bei 48,3kD, das rekombinante Produkt aus *T. thermophila* zeigte sich jedoch etwas höher bei 60-70kD. Darüber hinaus waren auf dem Immunoblot z. T. weitere Banden besonders bei <60kD, aber auch bei >72kD zu erkennen. Diese Banden können durch Proteinabbau oder durch die Bildung von Proteindimeren entstanden sein. Besonders die Analyse des komplexeren Konstrukts BBM ergab deutliche Banden bei ~50kD. Es ist daher davon auszugehen, dass die generelle Produktivität der BBM-Expressionsstämme höher lag, als die ermittelte BBM-Ausbeute nach der Protein-Fragmentierung aufzeigte. In den Kulturen, deren Proteinexpression nicht induziert wurde, konnten keine rekombinanten Malaria Antigene nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im zellfreien Kulturüberstand der BB-produzierenden *T. thermophila* Stämme TtpAX-BB und TtpKOIX-BB ebenfalls Antigen detektiert werden konnte. Die produzierten Mengen waren jedoch nicht quantifizierbar (Ergebnisse nicht gezeigt).

Anhand von Western Blot Quantifizierungen der intrazellulär vorliegenden Antigene basierend auf einer densitometrischen Messung mittels des CCD-Kamerasystems (siehe 3.11) wurden die Expressionsstärken der *Tetrahymena* Klone bestimmt und in Abb. 16 dargestellt. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen wurden mindestens drei Mal wiederholt.

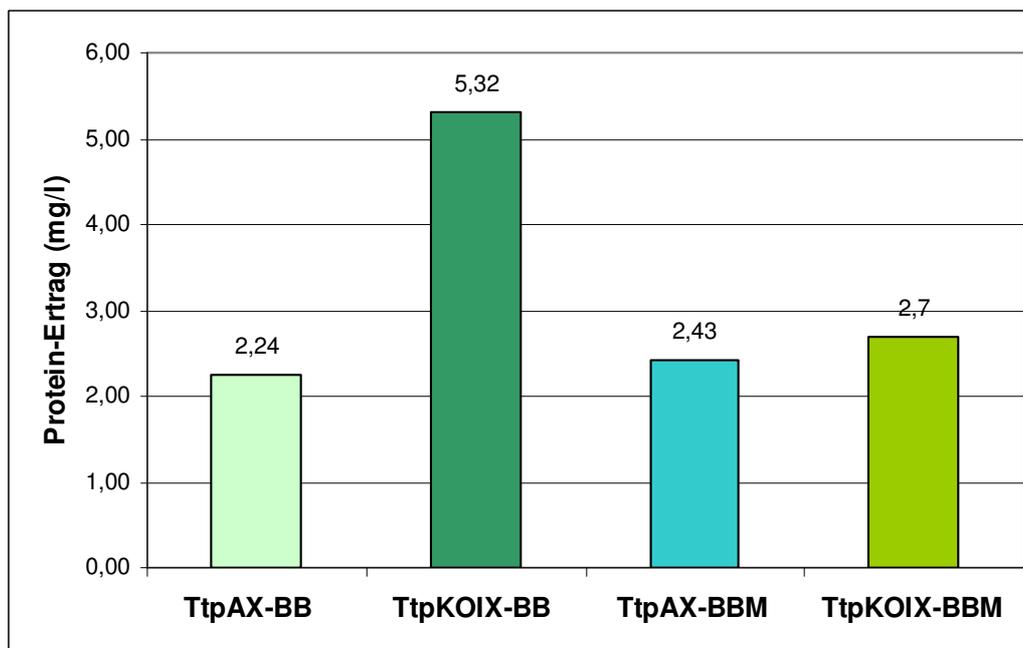


Abb. 16: Repräsentative Quantifizierung für die analysierten Stämme TtpAX-BB, TtpKOIX-BB, TtpAX-BBM und TtpKOIX-BBM.

Das Balkendiagramm zeigt die unterschiedlichen Produktionsstämme auf der X-Achse sowie die Ausbeute an intrazellulärem BB (TtpAX-BB und TtpKOIX-BB) bzw. BBM (TtpAX-BBM und TtpKOIX-BBM) in Milligramm pro Liter (mg/l) auf der Y-Achse. Die Auswertung erfolgte anhand einer Western Blot Analyse mit anschließender densitometrischer Messung mittels eines CCD-Kamerasystems und der AIDA Image Analyser Software.

Für die Quantifizierung wurden 2500-10.000 Zellen pro Bahn auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Für die Eichgerade erfolgte der Einsatz der Positivkontrolle BB (siehe 2.11) in einer Konzentrationsreihe von 50, 100 und 150ng sowie der zweiten Positivkontrolle BBM (siehe 2.11) in einer Konzentrationsreihe von 10, 15, 25 und 30ng. Nach anschließendem Transfer der Proteine vom Gel auf die NC-Membran mittels *semidryblot* erfolgte die Detektion der Proteine mithilfe des monoklonalen 12.2 Antikörpers. Wie die Abbildung 16 zeigt, führte der Einsatz von episomalen und integrativen Vektoren zur Transformation der Zellen zu ähnlichen Expressionsstärken, bei denen die Stämme mit integrierten Transgenen geringfügig höhere Ausbeuten aufwiesen. Es konnten hierbei für pAX-BB 2,24mg/l und für

pKOIX-BB 5,32mg/l sowie für pAX-BBM 2,43mg/l und für pKOIX-BBM 2,7mg/l ermittelt werden.

Die zur Expressionsanalyse durchgeführte Kultivierung der *Tetrahymena* Klone, die mit den episomalen Vektoren pAX-var2-DBL2 bzw. pAX-var2-DBL3 sowie mit den integrativen Vektoren pKOIX-var2-DBL2 bzw. pKOIX-var2-DBL3 transformiert wurden, erfolgte analog zu der Kultivierung der auf MSP-1Block2 basierenden *Tetrahymena* Stämmen. Zur Detektion der DBL2 und DBL3 basierenden Antigene konnte aufgrund des angefügten V5-tags ein monoklonaler V5-Antikörper (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eingesetzt werden. Die Westernblotanalyse ergab Banden auf einer Höhe von ~50kD (siehe Abb.17), was den errechneten Molekulargewichten von 47,5kD für DBL2 inklusive des MSP-1-Signalpeptids und 50,5kD für DBL3 mit Signalpeptid entspricht.

Zusätzliche Signale bei einem Molekulargewicht von ca. 40kD und 90kD wurden bei der Analyse des TtpAX-DBL2 Stammes detektiert. Sie können für die Bildung von Dimeren sprechen oder mit Proteinabbau begründet werden. Die nicht induzierten Negativ-Kontrollen zeigten wie erwartet keine Banden.

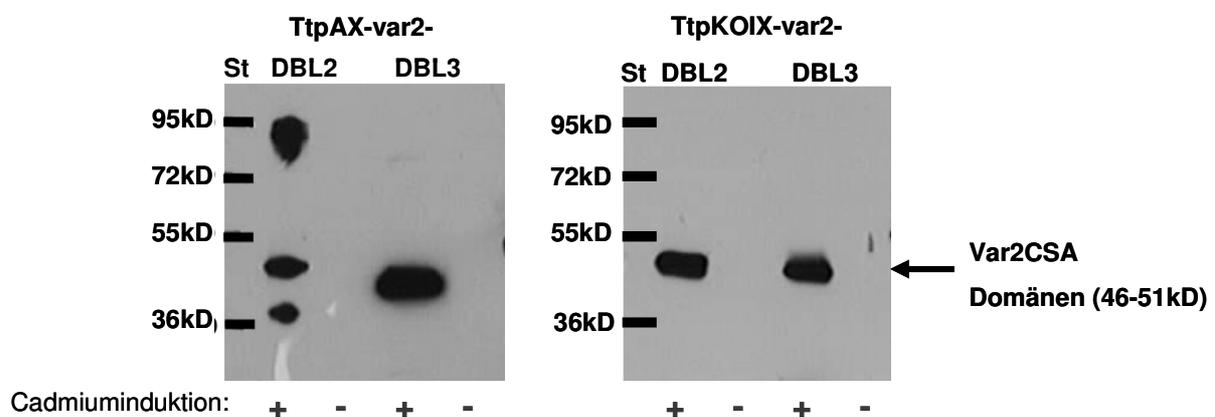


Abb. 17: Expressionsanalysen der auf Var2CSA basierenden Transformanten

Die Abbildung zeigt die Western Blot Analyse der mit episomalen und integrativen DBL2 und DBL3-Vektoren transformierten Stämme TtpAX-var2-DBL2 bzw. TtpAX-var2-DBL3 sowie TtpKOIX-var2-DBL2 und TtpKOIX-var2-DBL3. Es wurden für die SDS-PAGE 10.000 Zellen pro Bahn aufgetragen. „+“ bezeichnet hierbei die Induktion der Proteinexpression mittels Cadmiumchlorid, „-“ entspricht der gleichen Kultur ohne Induktion der Proteinexpression. Die Banden, die der DBL2- und der DBL3-Domäne des Var2CSA entsprechen, wurden bei ~50kD detektiert. In den nicht induzierten Kontrollen konnten keine Banden nachgewiesen werden. Als Erstantikörper wurde der monoklonale V5-Antikörper (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. „St“ zeigt den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH) an.

Eine Detektion von extrazellulär vorliegenden DBL-Proteinen war in keinen der mit den verschiedenen Stämmen durchgeführten Expressionsanalysen möglich.

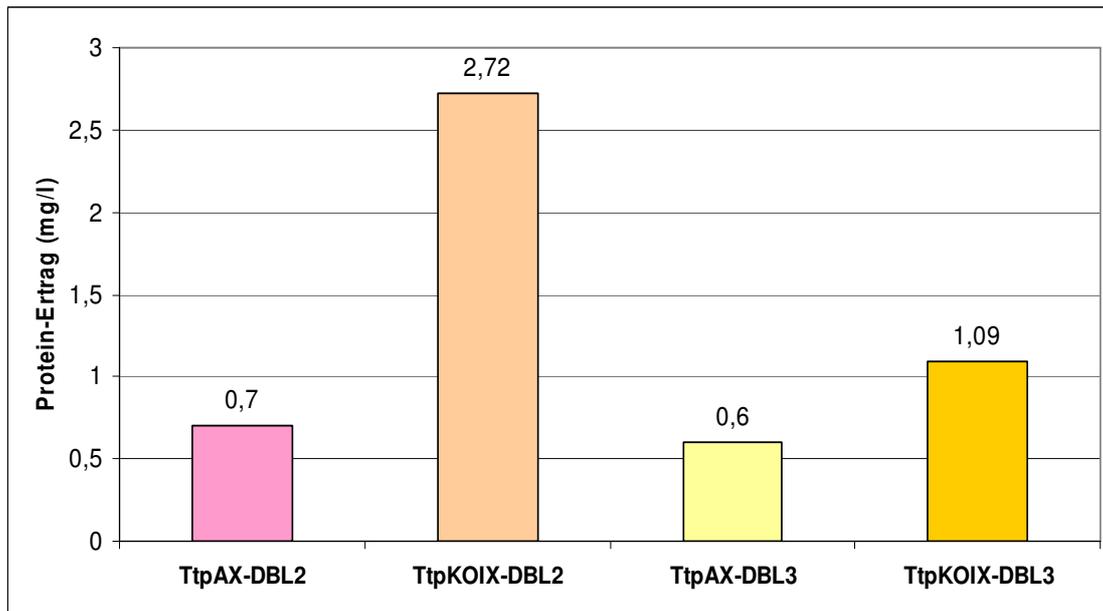


Abb. 18: Repräsentative Darstellung einer quantitativen Western Blot Analyse für die analysierten Stämme TtpAX-DBL2, TtpKOIX-DBL2, TtpAX-DBL3 und TtpKOIX-DBL3

Das Balkendiagramm zeigt die unterschiedlichen Produktionsstämme auf der X-Achse sowie den Protein-Ertrag an DBL2 (TtpAX-DBL2 und TtpKOIX-DBL2) bzw. DBL3 (TtpAX-DBL3 und TtpKOIX-DBL3) in Milligramm pro Liter (mg/l) auf der Y-Achse. Die Auswertung erfolgte anhand einer Western Blot Analyse mit anschließender densitometrischer Messung mittels eines CCD-Kamerasystems und der AIDA Image Analyser Software.

Für die Quantifizierungen wurde aus den wie zuvor beschrieben kultivierten *Tetrahymena* Stämmen TtpAX-DBL2 und TtpAX-DBL3 für ein SDS-Gel eine Verdünnungsreihe aus 10.000 bis 60.000 Zellen pro Bahn aufgetragen und aus TtpKOIX-DBL2 sowie aus TtpKOIX-DBL3 eine Verdünnungsreihe von 2500 bis 10.000 Zellen pro Bahn. Für die Eichgerade erfolgte der Einsatz von DBL2 und DBL3 rekombinant aus dem Baculovirus-Insektenzellen-System (siehe 2.11) in einer Konzentrationsreihe von 15, 30 und 60ng (DBL2) sowie von 5, 10 und 15ng (DBL3). Nach erfolgtem *semidryblot* wurden die Proteine mittels des monoklonalen Anti-V5-Antikörpers detektiert und anhand einer densitometrischen Messung mittels des CCD-Kamerasystems und entsprechender Software ausgewertet. Die dargestellte Western Blot Quantifizierungen der intrazellulär produzierten Antigene ergab für den Stamm TtpAX-DBL2 einen Wert von 0,7mg/l, für TtpKOIX-DBL2 einen Wert von 2,72mg/l sowie für TtpAX-DBL3 einen Wert von 0,6mg/l und für TtpKOIX-DBL3 einen Wert von 1,09mg/l. Das Balkendiagramm der Abb. 18 stellt die Ergebnisse dar.

4.2 Konstruktion eines Protease-*knock-out* Vektors

Eine hohe extrazelluläre Proteaseaktivität kann Grund für einen wesentlichen Ausbeuteverlust des rekombinant exprimierten und in den Überstand sezernierten Proteins sein (Kuroda, K. *et al.*, 2007; Wu, X.C. *et al.*, 1991; Takimura, Y. *et al.*, 1997). Daher wurde, um eine Erhöhung der Ausbeute an extrazellulärem Antigen zu erreichen, im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiger Protease-*knock-out* Vektor konstruiert. Es handelt sich hierbei um einen integrativen *T. thermophila* Expressionsvektor, durch dessen Einsatz die Deletion einer spezifischen Cystein-Protease mit der Integration einer beliebigen Expressionskassette kombiniert werden kann. Hierfür wurden die flankierenden Bereiche einer *T. thermophila* eigenen, extrazellulär vorliegenden, Cystein-Protease mit einem Molekulargewicht von 22kD amplifiziert. Die generierten Integrationsflanken umfassten hierbei 1267bp der 5'UTR sowie 195bp des kodierenden Bereichs (5'-Integrationsflanke) und 1298bp der 3'UTR und 175bp des kodierenden Bereichs (3'-Integrationsflanke) der Protease (siehe Abb. 19). Durch die Wahl entsprechender *primer* wurden die Schnittstellen *XhoI* und *Acc65I* in die 5'-Flanke sowie *SacII* und *BamHI* in die 3'-Flanke integriert (siehe Abbildung 20). Durch eine Zwei-Schritt-Klonierung konnten so die Integrationsflanken des herkömmlichen integrativen *T. thermophila* Expressionsvektors pKOIX durch die Flanken der 22kD-Protease ersetzt werden. Anhand eines Cre-abhängigen Rekombinationsverfahrens konnte anschließend eine Malaria-Antigen-Expressionskassette in den Vektor eingefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beispielhaft die Expressionskassette des Malaria-Vakzinkandidaten BBM verwendet.

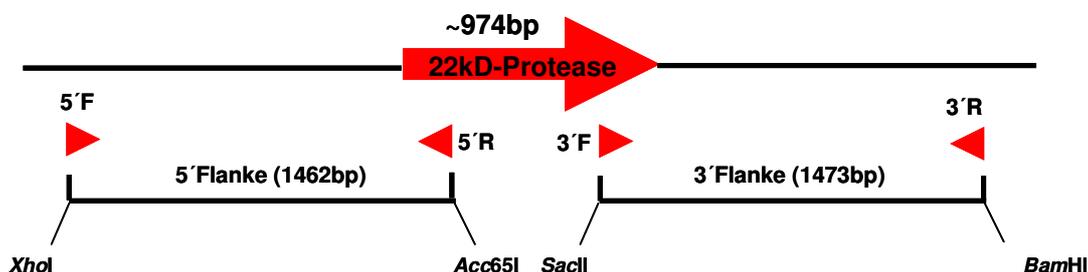


Abb. 19: Region der ausgewählten Cystein-Protease und die Bereiche der eingesetzten *primer*

Die Illustration zeigt den Lokus einer *Tetrahymena* eigenen Cystein-Protease (22kD). Durch die Auswahl der *primer* wurden 1462bp bzw. 1473bp umfassende Flanken generiert, die die Integration der Vektorsequenz in das *Tetrahymena* Genom über homologe Rekombination ermöglichen. „F“ bezeichnet hierbei die *forward primer*, während „R“ die *reverse primer* darstellt.

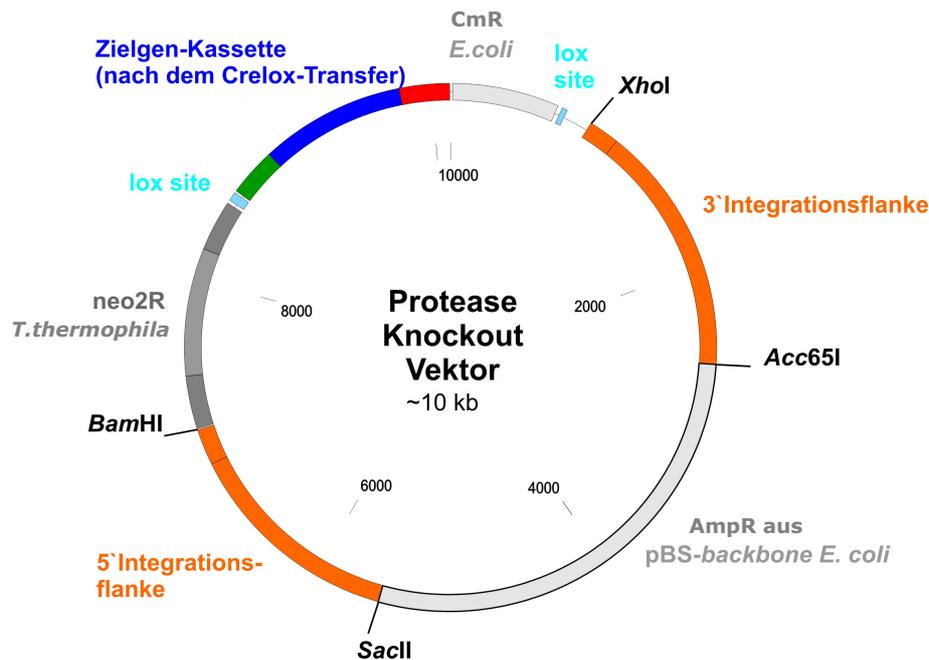


Abb. 20: Protease-knock-out Vektor

Die Abbildung stellt die Vektorkarte des Protease-knock-out Vektors nach dem Transfer der Zielgenkassette über die *lox*-sites dar. Neben den zur Klonierung der Integrationsflanken notwendigen Schnittstellen ist die zur Selektion in *Tetrahymena* benötigte Paromomycinresistenzkassette (*neo2R*) aufgeführt. Das backbone des ~10kb großen Vektors stammt von einem pBluescript-Vektor (pBS-backbone) und trägt ein Ampicillinresistenzgen (*AmpR*). Ein zweiter Selektionsmarker für die Amplifikation in *E. coli* ist das Chloramphenicolresistenzgen (*CmR*).

Der fertige Protease-knock-out Vektor ist in Abb. 20 dargestellt: Das Plasmid trägt zur Amplifikation in *E. coli* einen vom pBluescript-Vektor stammenden *f1-origin of replication* und eine Ampicillinresistenzkassette zur Selektion in *E. coli* sowie eine Paromomycinresistenzkassette (*neo2R*), welche der Selektion in *T. thermophila* dient. Die *neo2R* wird von den Protease-Integrationsflanken eingerahmt. Weiterhin befindet sich eine Cre-Erkennungsstelle (*lox-site*) *upstream* der 3' Integrationsflanke und somit *downstream* der *neo2*-Resistenzkassette (siehe 2.3 und 9.4). Das Einfügen einer Expressionskassette erfolgt an dieser Stelle richtungsspezifisch durch den Cre-Rekombinase vermittelten Transfer. Integriert der Vektor nach durchgeführter Transformation in die genomische DNA von *Tetrahymena*, wird ein 604bp umfassender Bereich der für das Cystein-Protease-Gen kodierenden Sequenz durch die Expressions- und Resistenzkassette des p22X-Vektors ersetzt (siehe 9.7).

Nach dem Transfer der BBM-Expressionskassette in den Protease-knock-out Vektor, der im Folgenden als p22X-BBM bezeichnet wird, wurden konjugierende *Tetrahymena* Wildtypzellen mit dem finalen Vektor unter Anwendung des *biolistic bombardments* transformiert. Anschließend wurden die Transformanten mit

steigendem Selektionsdruck zur Erzielung einer phänotypischen Segregation kultiviert.

4.2.1 Molekulare Verifizierung der konstruierten Protease-*knock-out* Stämme Ttp22X-BBM

Um einen Nachweis über das korrekte Vorliegen der Expressionskassette zu bringen, und darüber, dass sämtliche Wildtyp-Allele durch den Prozess der phänotypischen Segregation durch die disruptierte Kopie der ausgesuchten Cystein-Protease ersetzt worden sind, wurde neben einer genomischen DNA-Isolierung eine RNA-Isolierung mit anschließender cDNA-Synthese durchgeführt. Hierbei diente ein *T. thermophila* Wildtyp (1868.4.) für den zu untersuchenden Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM als Referenzstamm. Die Stämme wurden für die Analysen in SPP-Medium kultiviert und als stationäre Kulturen geerntet. Die gewonnenen Zellpellets wurden zur DNA- bzw. zur RNA-Isolierung eingesetzt. Die auf Grundlage von spezifischen *primern* (siehe 2.2) durchgeführte PCR zum Nachweis der eingebrachten Expressionskassette auf genomischer DNA-Ebene bestätigte die korrekte Integration der Vektor-spezifischen 3'- sowie 5'-Flanke des Zielgens in die Proteasesequenz (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die präparierte mRNA wurde zur cDNA-Synthese mittels oligo(dT)-*primer* eingesetzt. Zur Analyse der gewonnenen cDNA wurde ein kurzer Abschnitt des kodierenden Bereichs der deletierten Cystein-Protease mit spezifischen *primern* amplifiziert (401bp). Eine Anlagerung der entsprechenden *primer* war somit an die cDNA des Wildtyps, nicht aber an die cDNA der proteaserestringierten Transformanten zu erwarten. Als Kontrolle der korrekt durchgeführten cDNA-Präparation erfolgte die Amplifikation eines Bereiches des endogenen Beta-Hexosaminidase-Gens (329bp).

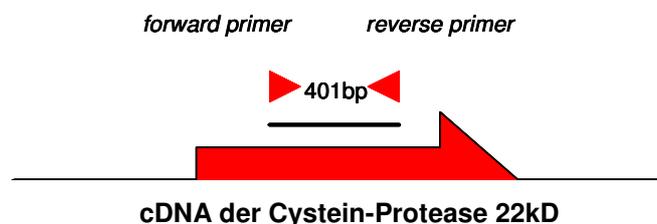


Abb. 21: Hybridisierungsbereich spezifischer *primer* mit der Wildtyp-cDNA der 22kD-Protease
Die eingesetzten *forward* (cDNA_22kD_F2) und *reverse primer* (cDNA_22kD_R1) hybridisieren bei 253bp bzw. bei 654bp innerhalb der 22kD-Protease-cDNA. Bei Vorliegen des intakten offenen Leserahmens wird ein Abschnitt der Größe 401bp amplifiziert.

Unter Verwendung des spezifischen *primer*-Paares (cDNA_22kD_F2 und cDNA_22kD_R1), welches innerhalb des 22kD Protease-Gens hybridisiert, konnte die Deletion der entsprechenden Sequenz im Genom der Protease-*knock-out* Transformanten anhand der PCR-Analyse bestätigt werden. Bei der anschließenden Agarosegelelektrophorese ergab die Analyse der Stämme 5 und 6 keine Banden. Bei dem Wildtyp konnte der proteasespezifische Bereich amplifiziert werden (401bp). In Abb. 22 ist das Ergebnis dargestellt.

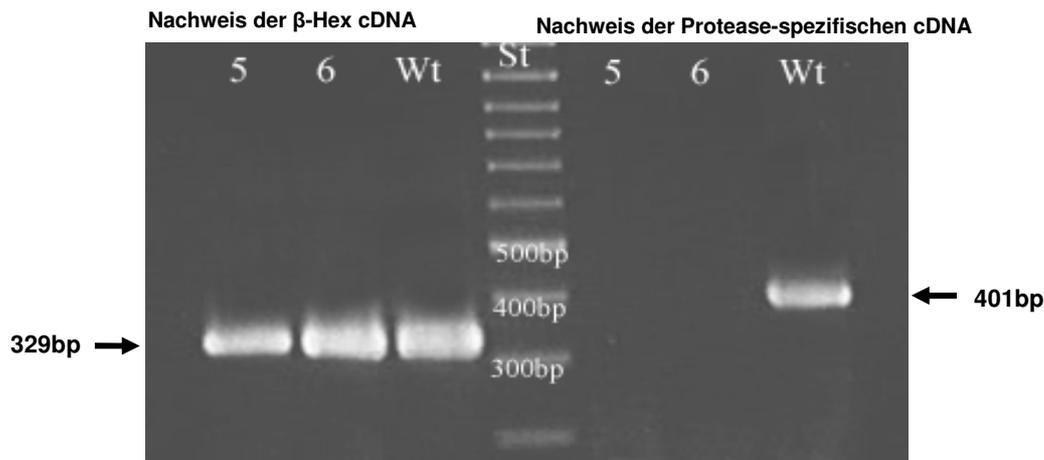


Abb. 22: Darstellung der molekularen Verifizierung der konstruierten Protease-*knock-out* Stämme Ttp22X-BBM 5 und 6 und des *T. thermophila* Wildtyps 1868.4

Links sind zur Qualitätsüberprüfung der cDNA-Präparation die Banden der PCR zum Nachweis der Beta-Hexosaminidase cDNA (β -Hex) dargestellt, rechts sind die Banden der spezifischen Amplifikation eines Bereiches der 22kD-Protease cDNA abgebildet. Durch die unspezifische Kontrolle aller getesteten Stämme wurden Banden der korrekten Größe von ~329bp amplifiziert. Die proteaserestringierten Transformanten 5 und 6 zeigten nach spezifischer PCR wie erwartet keine Banden. Für den Wildtyp (Wt) konnte eine Bande der korrekten Größe von 401bp nachgewiesen werden, welche einem Abschnitt der Cystein-Protease entspricht. „St“ bezeichnet den Standard (100bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot).

4.2.2 Analyse der Sekretion von Proteasen

Um zu ermitteln, ob die Deletion des Gens der ausgewählten Cystein-Protease zu einer Verringerung der extrazellulären Proteaseaktivität geführt hatte, wurde für den generierten Protease-*knock-out* Stamm (Ttp22X-A-BBM5) und für einen vergleichbaren Transformanten ohne die entsprechende Deletion (TtpKOIX-BBM) die extrazelluläre Proteaseaktivität bestimmt. Bei den durchgeführten Enzym-Tests handelte es sich zum einen um einen BAPNA-Test und zum anderen um einen Azocasein-Test (beide nach Murrice, C. 1986). Bei dem sogenannten BAPNA-Test wirkt N_{α} -Benzoyl-DL-arginin-4-nitranilid-hydrochlorid (BAPNA) als ein synthetisches Substrat, dessen Abbau durch extrazelluläre Proteasen photometrisch bestimmt werden kann (siehe 3.12.2). Bei einem Azocasein-Test wird durch eine

kolorimetrische Quantifizierung die generelle extrazelluläre proteolytische Aktivität bestimmt. Hierbei wird der Abbau des Azocaseins durch die vorhandenen extrazellulären Proteasen photometrisch nachgewiesen (siehe 3.12.3). Zur Durchführung dieser Enzym-Assays wurden Ttp22X-BBM5 sowie im Vergleich der Wildtyp-Transformant TtpKOIX-BBM unter Standardbedingungen kultiviert. Die Anzucht erfolgte in *Supplemented Proteose Peptone Medium* (SPP) unter Selektionsdruck (400µg/ml Paromomycin) und die Induktion der Proteinproduktion erfolgte nach 24h Wachstum mit Cadmiumchlorid (5µg/ml). Der Cystein-Proteaseinhibitor E-64 (Pepta Nova GmbH, Sandhausen) wurde hierbei in einer parallel durchgeführten Kultivierung in einer Konzentration von 30µg/ml eingesetzt, um vorhandene extrazelluläre Proteasen zu deaktivieren. Die Zugabe von E-64 erfolgte zum Zeitpunkt der Cadmiuminduktion. Zur Messung der extrazellulären Proteaseaktivität wurden den Kulturen Aliquots entnommen und zellfreier Überstand gewonnen. Die Probenentnahme fand ab einer Wachstumszeit von 20h (4h vor Induktion) bis hin zu 72h (48h nach Induktion) statt.

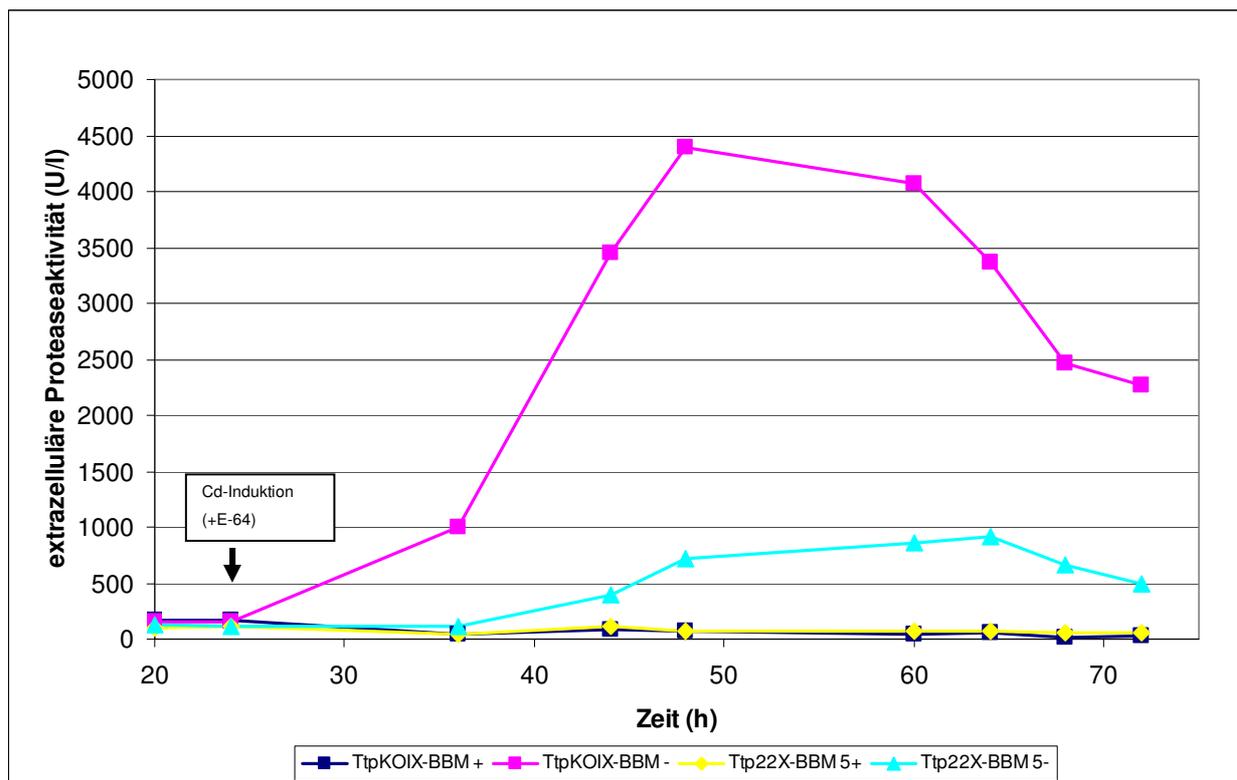


Abb. 23: Beispiel für einen repräsentativen BAPNA-Test

Die verschiedenen Stämme (TtpKOIX-BBM-/+ und Ttp22X-BBM5-/+) sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Auf der X-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgeführt, auf der Y-Achse die extrazelluläre Proteaseaktivität in Units pro Liter (U/l). Die Cadmiuminduktion (5µg/ml) erfolgte zeitgleich mit der Zugabe von E-64 (30µg/ml) zu den Kontrollstämmen (TtpKOIX-BBM+ und Ttp22X-A-BBM5+) 24h nach Inokulation. Die Stämme TtpKOIX-BBM- und Ttp22X-BBM5- erhielten kein E-64 zusätzlich zur Induktion.

Wie man in Abb. 23 erkennen kann, zeigt das Diagramm des exemplarischen BAPNA-Tests die Kinetik der extrazellulären Proteaseaktivität der analysierten Stämme. Betrachtet man die Proteaseaktivität der vergleichbaren Kulturen nach Zusatz von E-64 (30µg/ml), ist festzustellen, dass der Einsatz des Proteaseinhibitors die Proteaseaktivität beider Stämme erwartungsgemäß stark reduzierte. Ttp22X-BBM5+ zeigte eine extrazelluläre Proteaseaktivität von maximal 108U/l nach 44h Wachstum. Die Enzymaktivität des TtpKOIX-BBM+ lag mit seinem Maximalwert nach 44h Wachstum bei 81U/l.

Die gemessene Proteaseaktivität des Protease-*knock-out* Stammes Ttp22X-BBM5 lag bei einer Kultivierung ohne Proteaseinhibitor im Gegensatz zu der des TtpKOIX-BBM deutlich niedriger. Während der Protease-*knock-out* Transformant mit anfänglichen 126U/l Proteaseaktivität annähernd dem Wildtyp-Transformanten und den Kontrollstämmen entsprach, zeigte sich bereits ab dem Zeitpunkt der Induktion ein unterschiedlicher Verlauf der Aktivitäten. Der Anstieg der proteolytischen Aktivität des Protease-*knock-out* Stammes Ttp22X-BBM5 begann etwa 12h nach Induktion (36h Wachstum) und erlangte nach 64h Wachstum mit 922U/l seinen Höhepunkt. Im Gegensatz hierzu stieg die extrazelluläre Proteaseaktivität des TtpKOIX-BBM bereits ab Zeitpunkt der Induktion und erlangte nach 48h Wachstum mit 4401U/l sein Maximum. Anschließend kam es zu einer leichten Reduktion der Aktivität (2271U/l; 72h).

Die Werte des Azocasein-Tests bestätigen die Ergebnisse des BAPNA-Tests. Bei einem Vergleich der extrazellulären Proteaseaktivitäten der verschiedenen *T. thermophila* Stämme ist zu erkennen, dass der Protease-*knock-out* Transformant Ttp22X-BBM5 mit maximal 60% extrazellulärer Proteaseaktivität etwas mehr als die Hälfte der proteolytischen Aktivität des Wildtyp-Transformanten TtpKOIX-BBM aufwies. Während innerhalb der ersten 36h Wachstum bereits ein Anstieg der extrazellulären Proteaseaktivität des TtpKOIX-BBM von 17% auf 61% zu erkennen war und nach 64h die maximale Proteaseaktivität (100%) erreicht wurde, stieg die proteolytische Aktivität des Ttp22X-BBM5 bezogen auf den Wildtyp-Transformanten erst nach 60h Wachstum von 28% auf 60% an. Stark reduzierte Proteaseaktivitäten von 7% bis maximal 22% und 28% konnten bei den Stämmen nachgewiesen werden, die den Proteaseinhibitor E-64 zugesetzt bekamen.

In Abb. 24 werden die Ergebnisse in einem repräsentativen Diagramm zusammenfassend dargestellt.

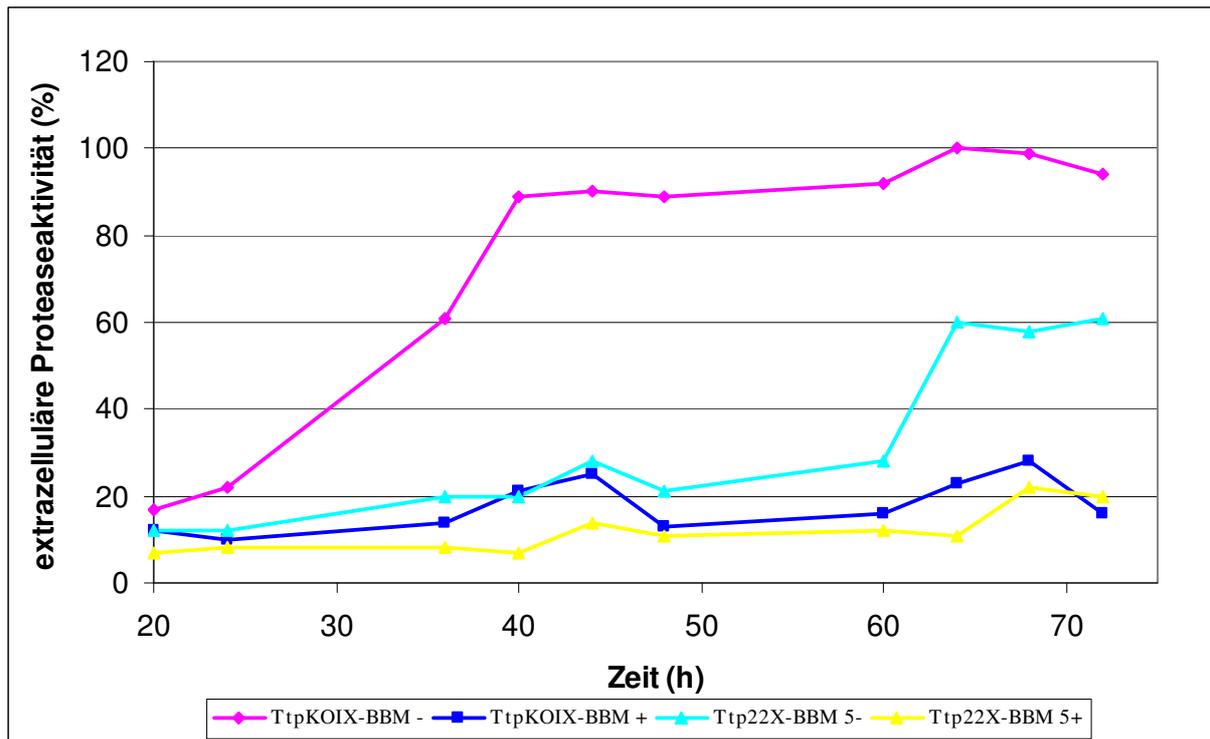


Abb. 24: Darstellung eines repräsentativen Azocasein-Tests

Die extrazelluläre Proteaseaktivität der Kulturen TtpKOIX-BBM+, TtpKOIX-BBM- und Ttp22X-BBM5+ sowie Ttp22X-BBM5- sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. Auf der X-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgeführt, auf der Y-Achse die extrazelluläre Proteaseaktivität in Prozent (%). Nach 24h Wachstum erfolgte die Induktion mit Cadmiumchlorid (5µg/ml) sowie für die Kontrollstämme (+) die Zugabe von E-64 (30µg/ml).

4.2.3 Analyse der Aktivitäten anderer extrazellulärer Enzyme

Um eine gesicherte Aussage darüber treffen zu können, ob die reduzierte Proteaseaktivität des neu entwickelten Stammes Ttp22X-BBM5 nicht auf einem generellen Verlust der Sekretionsfähigkeit von hydrolytischen Enzymen basierte, wurde neben den extrazellulären Proteaseaktivitäten auch ein Nachweis von weiteren hydrolytischen Enzymen erbracht. Zu diesem Zweck wurde zellfreier Überstand der vier *T. thermophila* Kulturen in Para-Nitrophenol basierenden Tests eingesetzt, durch die die Aktivität der Beta-Hexosaminidase sowie der Sauren Phosphatase analysiert werden sollte. Die zwei hydrolytischen Enzyme liegen bei *Tetrahymena* sowohl in den Lysosomen als auch extrazellulär vor. Hierbei wurden adäquate Chromogene zu den Proben gegeben, diese bei 30°C inkubiert und die Reaktion nach 30min Inkubation durch die Zugabe einer Stopplösung beendet. Die Produktbildung des p-Nitrophenols durch die Substratumsetzung der Sauren Phosphatase bzw. der Beta-Hexosaminidase wurde bei 405nm photometrisch nachgewiesen (siehe 3.12.4).

In den Abbildungen 25 und 26 sind die ermittelten Ergebnisse dargestellt.

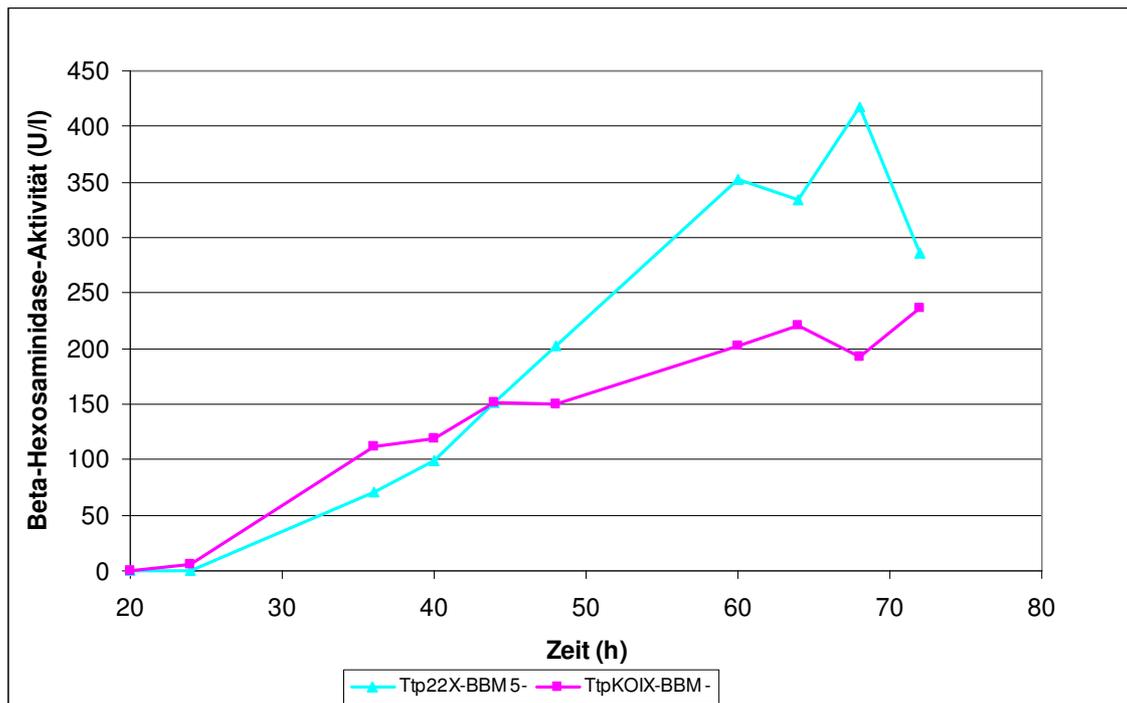


Abb. 25: Darstellung eines repräsentativen auf Para-Nitrophenol basierenden Enzymtests zur Bestimmung der extrazellulären Beta-Hexosaminidase-Aktivität.

Dargestellt ist die β -Hexosaminidase-Aktivität der verschiedenen Stämme TtpKOIX-BBM- und Ttp22X-BBM5- in unterschiedlichen Farben. Auf der X-Achse der Abbildung ist die Zeit in Stunden (h) und auf der Y-Achse die Beta-Hexosaminidase Aktivität in Units pro Liter (U/l) aufgetragen.

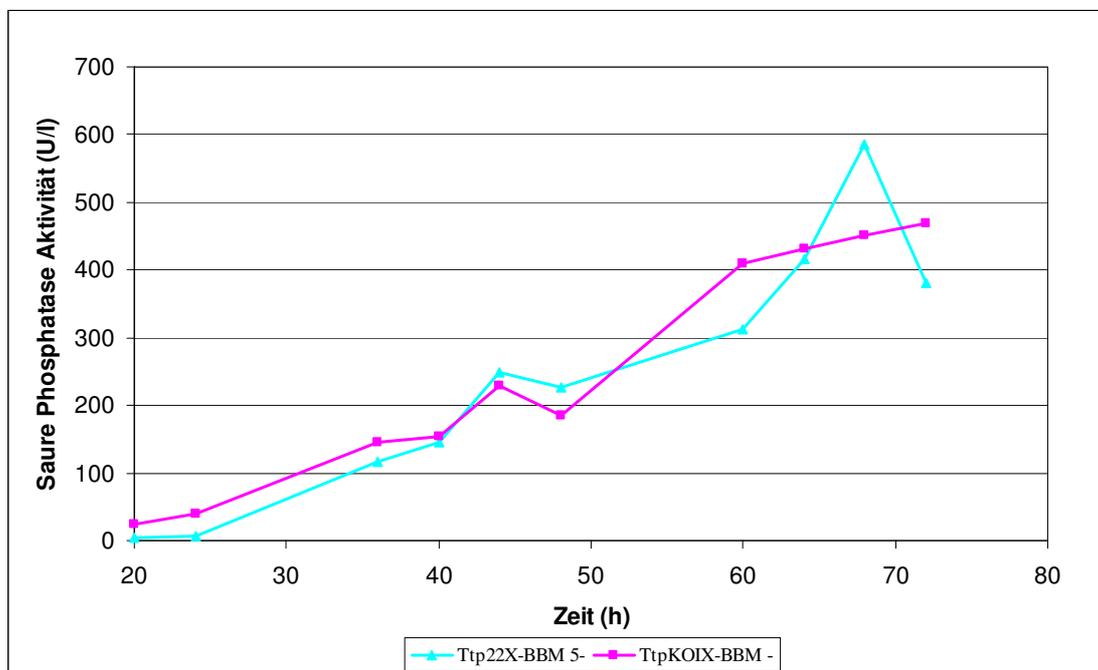


Abb. 26: Darstellung eines repräsentativen auf Para-Nitrophenol basierenden Enzymtests zur Bestimmung der extrazellulären Saure-Phosphatase-Aktivität

Dargestellt ist die Saure-Phosphatase-Aktivität der verschiedenen Stämme TtpKOIX-BBM- und Ttp22X-BBM5- in unterschiedlichen Farben. Auf der X-Achse der Abbildung ist die Zeit in Stunden (h) und auf der Y-Achse die Saure-Phosphatase-Aktivität in Units pro Liter (U/l) aufgetragen.

Abb. 25 veranschaulicht hierbei die Aktivität der extrazellulären Beta-Hexosaminidase, während Abb. 26 die extrazelluläre Saure-Phosphatase-Aktivität präsentiert. Wie die Darstellungen zeigen, konnte die Aktivität der extrazellulären, hydrolytischen Enzyme beider Stämme nachgewiesen werden. Nach einem Anstieg der Beta-Hexosaminidase-Aktivität, sowohl für TtpKOIX-BBM als auch Ttp22X-BBM, konnte für den Protease-*knock-out* Stamm eine maximale Enzymaktivität von 417U/l gemessen werden. Der Wildtyp-Transformant zeigte eine maximale Beta-Hexosaminidase-Enzymaktivität von 237U/l.

Auch bei der Aktivität der Sauren Phosphatase konnten für beide Stämme vergleichbare Werte gemessen werden. Für den Protease-*knock-out* Stamm sowie für den Wildtyp-Transformant war während der Kultivierung ein Anstieg der Enzymaktivität zu erkennen. Sie stieg hierbei für Ttp22X-BBM5 nach 68h auf einen maximalen Wert von 587U/l und für den Wildtyp-Transformant TtpKOIX-BBM nach 72h Wachstum auf einen maximalen Wert von 470U/l an.

4.2.4 Analyse der BBM-Expression des neu konstruierten Protease-*knock-out* Stammes

Mittels SDS-PAGE und Western Blot Analysen wurde das Vorliegen des rekombinanten Proteins BBM im zellfreien Kulturüberstand von Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu TtpKOIX-BBM überprüft (Abb. 27). Die Kultivierung der *Tetrahymena* Zellkulturen fand für insgesamt 72h bei 30 °C in SPP Medium statt. Die Induktion der Proteinexpression wurde nach 24h Wachstum mit Cadmiumchlorid (5µg/ml) durchgeführt. Zeitgleich erfolgte die Zugabe des Proteaseinhibitors E-64 (30µg/ml) zu den parallel kultivierten Zellen. Während der Anzucht wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten zellfreier Überstand der verschiedenen Stämme gewonnen. Die zeitlich differierenden Proben wurden anschließend analysiert.

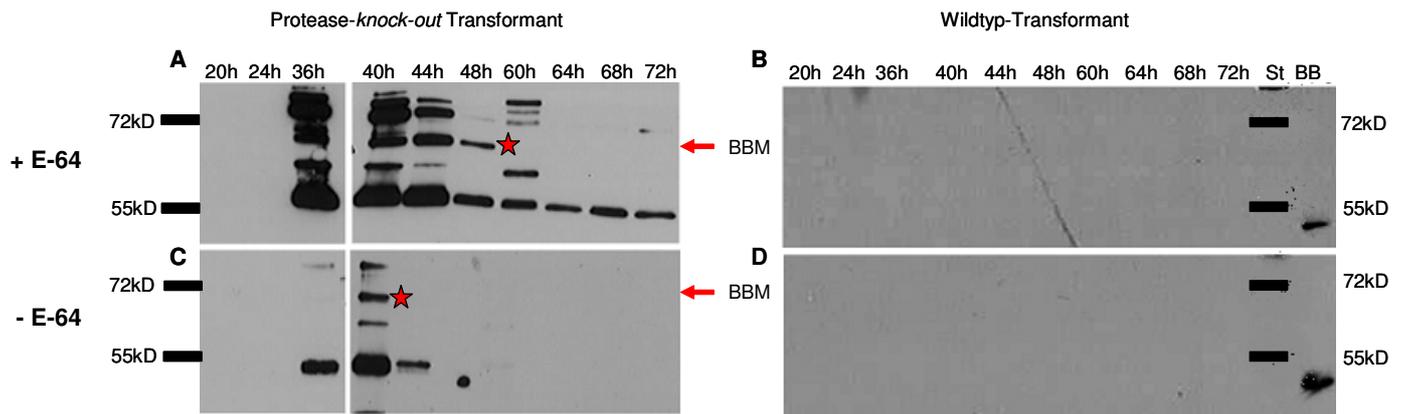


Abb. 27. Western Blot Analyse des zellfreien Kulturüberstandes

A: & B: einer Protease-*knock-out*-Transformanten Kultivierung (Ttp22X-BBM5) und einer Wildtyp-Transformanten Kultivierung (TtpKOIX-BBM) mit E-64 (30µg/ml).
C: & D: einer Protease-*knock-out*-Transformanten Kultivierung (Ttp22X-BBM5) und einer Wildtyp-Transformanten Kultivierung (TtpKOIX-BBM) ohne E-64.
 24h nach Inokulation der Kulturen fanden die Induktion mit Cadmium (5µg/ml) (Cd) und ggf. die Zugabe von E-64 (30µg/ml) statt (+E-64). Es wurde Überstand, normiert auf 10.000 Zellen pro Bahn, aufgetragen. 3µg BB rekombinant aus *E. coli* (BB) wurden als Referenz verwendet. Der monoklonale, Block2-spezifische Erstantikörper 31.2 wurde in einer 1:5000 Verdünnung verwendet. „St“ bezeichnet den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH).

Im Gegensatz zu dem Wildtyp-Transformanten TtpKOIX-BBM war die Detektion eines BBM-spezifischen Signals bei ~70kD im zellfreien Überstand von Ttp22X-BBM5 Kulturen 36h nach Inokulation (12h nach Induktion der Proteinexpression) möglich. Zusätzliche Banden in einer Höhe von ~60kD oder ~50kD verdeutlichen das Vorliegen von Protein-Fragmentierungen. Signale, die in einer Höhe von über 72kD detektiert wurden, können Di- oder Trimere des Proteins darstellen. Weiterhin konnten bei den Kulturen, den der Cystein-Proteaseinhibitor E-64 zugesetzt wurde, deutlich stärkere Banden nachgewiesen werden. Anhand von Western Blot Analysen konnte im Überstand von TtpKOIX-BBM Kulturen trotz Zugabe des Cystein-Proteaseinhibitors kein extrazelluläres BBM nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem detektierten rekombinanten BBM des Protease restringierten Stammes um die sekretierte Form des Proteins oder um intrazelluläres Protein, welches durch Zellyse in den Überstand gelangt ist, handelte, wurden die entsprechenden Überstände auf das Vorliegen des intrazellulären Enzyms Isocitratdehydrogenase (ICDH) analysiert (siehe 3.12.1). Hierbei diente das Verhältnis der ICDH-Aktivität von zellfreiem Überstand gegenüber dem Zellysat als Maß für eine Zellyse. Liegen die gemessenen Werte der relativen ICDH-Aktivität um

10%, kann in der Regel von einer schonenden Gewinnung des Überstandes gesprochen werden, in der keine oder nur eine geringfügige Zellyse stattgefunden hat.

In Abb. 28 sind beispielhaft die Ergebnisse einer ICDH-Messung der zellfreien Überstände der verschiedenen *T. thermophila* Kulturen grafisch dargestellt. Die gemessenen Werte des Ttp22X-BBM5 Überstands lagen zu allen Erntezeitpunkten der 72h umfassenden Kultivierung ohne Zugabe von E-64 in einem Bereich von 4-12% ICDH-Aktivität. Mit Zusatz des Proteaseinhibitors lagen sie in einem Bereich von 2-14%. Für die Überstände des Wildtyp-Transformanten TtpKOIX-BBM ergaben sich ähnliche Werte, die in einem Bereich von 0-5% ohne E-64 und 2-10% ICDH-Aktivität unter Zugabe des Inhibitors lagen.

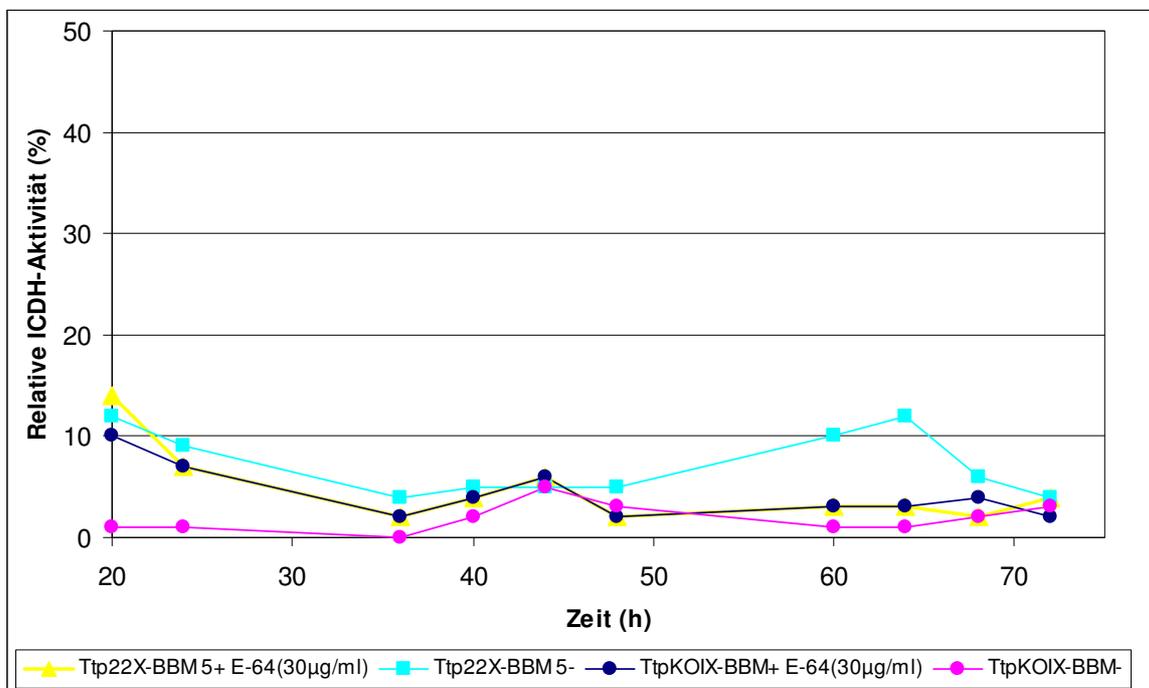


Abb. 28: Repräsentativer ICDH-Test zur Bestimmung des Ausmaßes an Zellyse während der Gewinnung des Überstandes

Dargestellt ist die ICDH-Aktivität der Stämme TtpKOIX-BBM+, TtpKOIX-BBM-, Ttp22X-BBM5+ und Ttp22X-BBM5- in unterschiedlichen Farben. Die X-Achse stellt die Erntezeitpunkte in Stunden dar (h), die Y-Achse die relative ICDH-Aktivität der gewonnenen zellfreien Überstände in Prozent (%). „+“ bezeichnet die Stämme, die eine Zugabe von E-64 erhielten und „-“ die Stämme, die kein E-64 zur Kultivierung zugefügt bekamen.

4.2.5 Wachstumsanalyse

Als potenzieller Produktionsstamm wurde für Ttp22X-BBM5 eine Wachstumskinetik erstellt, um auszuschließen, dass der Transformant durch seine genetische Veränderung oder durch die Zugabe des Proteaseinhibitors E-64 in seinen

Wachstumseigenschaften eingeschränkt ist. Die Wachstumskinetik des proteaserestringierten Stammes wurde hierbei der Kinetik des vergleichbaren, in seiner Proteaseaktivität uneingeschränkten Stammes TtpKOIX-BBM gegenübergestellt. Für die Anzucht wurde ein Volumen von 300ml SPP in Fernbachkolben gewählt. Die Kultivierung fand bei 30 °C und 80rpm über 72h statt. 24h nach der Inokulation wurde die Proteinexpression mittels Cadmiumchlorid (5µg/ml) induziert. Zum selben Zeitpunkt erfolgte die Zugabe des Proteaseinhibitors E-64 (30µg/ml) zu den parallel kultivierten Anzuchten. Abbildung 29 präsentiert das Wachstum der Kulturen beispielhaft in einer logarithmischen Darstellung.

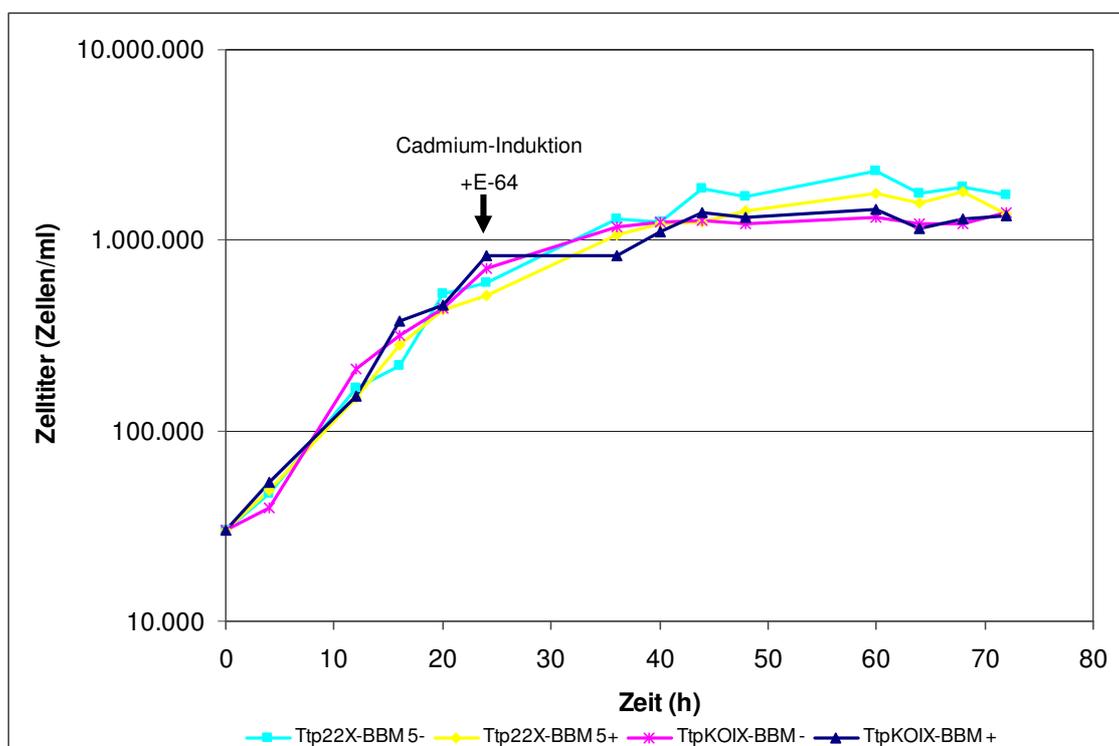


Abb. 29: Wachstumskinetik für Ttp22X-BBM5 und TtpKOIX-BBM

Dargestellt ist die Wachstumskinetik der verschiedenen Stämme TtpKOIX-BBM und Ttp22X-BBM5 in unterschiedlichen Farben. Auf der X-Achse ist die Kultivierungsdauer in Stunden (h) angegeben, auf der Y-Achse ist der Zelltitel in Zellen pro Milliliter dargestellt (Zellen/ml). „+“ bezeichnet hierbei die Stämme, die E-64 zur Kultivierung zugesetzt bekamen, während „-“ die Stämme bezeichnet, die ohne die Zugabe des Proteaseinhibitors kultiviert wurden.

Wie deutlich in Abbildung 29 zu erkennen ist, sind die Kulturen schnell zu hohen Zelldichten herangewachsen. Nach 24h war die logarithmische Wachstumsphase bereits nahezu abgeschlossen und der Übergang in die stationäre Phase erfolgte. Bis zum Ende der Kultivierungsdauer verblieben die Zellen in der stationären Wachstumsphase und konnten nach 72h immer noch als vital bezeichnet werden. Die Ttp22X-BBM5 Kultur, die ohne E-64 kultiviert wurde, erreichte hierbei nach 60h

Wachstum einen maximalen Zelltiters von 2,3 Mio Zellen/ml. Die vergleichbare Kultivierung des Ttp22X-BBM5+ mit E-64-Zusatz hatte nach 68h ihre höchste Zelldichte von 1,8 Mio Zellen/ml. Der Wildtyp-Transformant, der ohne die Zugabe von E-64 kultiviert wurde, TtpKOIX-BBM-, bzw. der mit E-64 kultiviert wurde, TtpKOIX-BBM+, hatten nach 60h Wachstum ihren höchsten Zelltiters von 1,3 Mio Zellen/ml bzw. 1,5 Mio Zellen/ml erreicht. Es wurde deutlich, dass eine Zugabe des Proteaseinhibitors E-64 zum Kulturmedium keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Kulturen hatte und dass das Wachstum des Protease-*knock-out* Stammes im Vergleich zu dem des Wildtyp-Transformanten TtpKOIX-BBM nicht beeinträchtigt wurde (siehe Tabelle: 9.1).

4.3 Optimierung der Kultivierungsprozesse für den Produktionsstamm Ttp22X-BBM5

Mit dem Ziel, die extrazelluläre Ausbeute an rekombinantem BBM zu erhöhen, wurde der Kultivierungsprozess für den Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM5 optimiert.

4.3.1 Auswahl des optimalen Nährmediums

Um die rekombinante BBM-Produktion des neuartigen Protease-*knock-out* Stammes zu verbessern, wurden unterschiedliche Medien für die Anzucht getestet. Hierbei wurden auf verschiedenen Peptonen basierende Medien mit einem Magermilchmedium (MMM) verglichen. Bei den verschiedenen Pepton-basierenden Medien kamen Soja- (SSP), Proteose- (SPP), Fleisch- (SMP) und Weizen-Pepton (SWP) in der Kultivierung zum Einsatz (siehe 2.8). Die Anzucht wurde wie unter 4.1.4 bereits beschrieben durchgeführt.

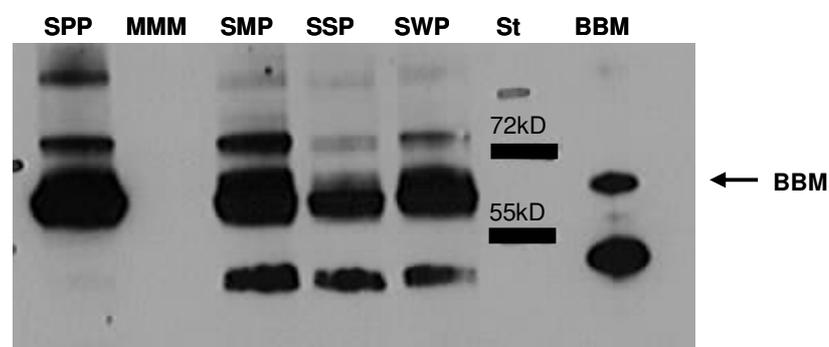


Abb. 30: Repräsentative Analyse verschiedener Kulturmedien

Die Abbildung zeigt eine exemplarische Western Blot Analyse des Ttp22X-BBM5 nach Kultivierung in unterschiedlichen Medien. 5ng BB + BBM rekombinant aus *E.coli* (BBM) wurden als Referenz aufgetragen. „St“ zeigt den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH) an.

Wie in Abb. 30 beispielhaft dargestellt, konnten auch in mehreren Experimenten nur geringfügige Unterschiede bei der Verwendung verschiedener Pepton-Medien festgestellt werden. Lediglich nach einer Kultivierung in MMM konnten keine BBM-spezifischen Banden detektiert werden. Nachfolgende Quantifizierungen mittels Western Blot Analyse mit einer anschließenden densitometrischen Bestimmung der Bandenintensität, die in Abb. 31 anhand eines repräsentativen Beispiels dargestellt sind, bestätigten diese Ergebnisse.

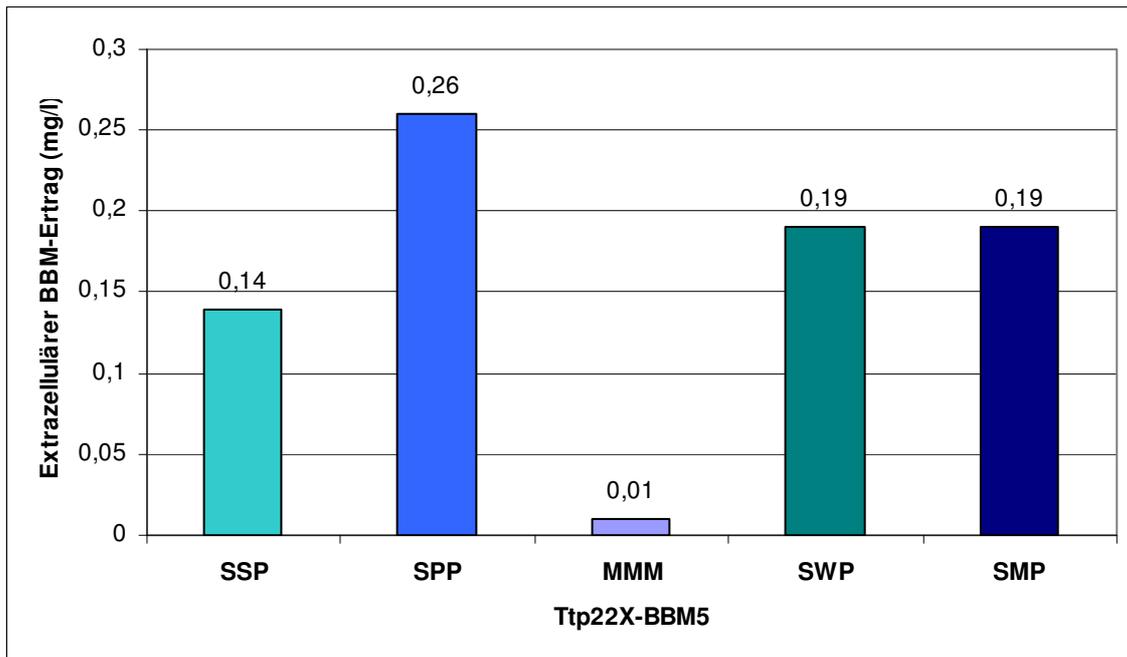


Abb. 31: Darstellung einer Western Blot Quantifizierung des Stammes Ttp22X-BBM5 nach Kultivierung in unterschiedlichen Medien

Auf der X-Achse sind die gesammelten Überstände nach Kultivierung von Ttp22x-BBM5 in unterschiedlichen Medien abgebildet (SSP=Soja Pepton, SPP=Proteose Pepton, MMM=Magermilch, SWP=Weizen Pepton, SMP=Fleisch Pepton). Auf der Y-Achse ist der extrazelluläre BBM-Ertrag in Milligramm pro Liter (mg/l) angegeben. Für die SDS-PAGE wurde Überstand normiert auf 30.000 Zellen aufgetragen. Nach anschließendem Western Blot erfolgte die Detektion des Proteins BBM mittels des monoklonalen Antikörpers 12.2 in einer Verdünnung von 1:2000. Die Auswertung erfolgte anhand einer densitometrischen Messung mittels eines CCD-Kamerasystems und der AIDA Image Analyser Software.

Die Verwendung des Standard-Mediums SPP führte in allen durchgeführten Quantifizierungen zu den höchsten, extrazellulären BBM Erträgen. Daher wurde in weiteren Experimenten das bereits etablierte SPP als Kulturmedium eingesetzt.

4.3.2 Ermittlung der optimalen Kultivierungsdauer und Regulation der Genexpression

Um die BBM-Expression des Produktionsstammes und somit die Ausbeute an rekombinantem Protein weiter zu erhöhen, wurden der optimale Zeitpunkt der Cadmiuminduktion und der optimale Erntezeitpunkt ermittelt. Hierzu wurde der

Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM5 wie in früheren Untersuchungen drei Tage in SPP Medium unter Selektionsdruck (400µg/ml Paromomycin) vorkultiviert. Die hieraus angelegte Hauptkultur wurde über einen Zeitraum von 48-96h inkubiert. Die Induktion mit Cadmiumchlorid (5µg/ml) erfolgte 12h oder 24h nach Inokulation der Hauptkultur. Nach weiteren 6-48h wurden Proben entnommen und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse der Western Blot Analysen und anschließende Quantifizierungen zeigten, dass durch das Induzieren der Proteinproduktion nach 12h Wachstum und einer anschließenden Ernte, 24h nach durchgeführter Induktion, die Menge an extrazellulärem BBM gesteigert werden konnte. Der in Abb. 32 veranschaulichte Immunoblot stellt die Ergebnisse dar.

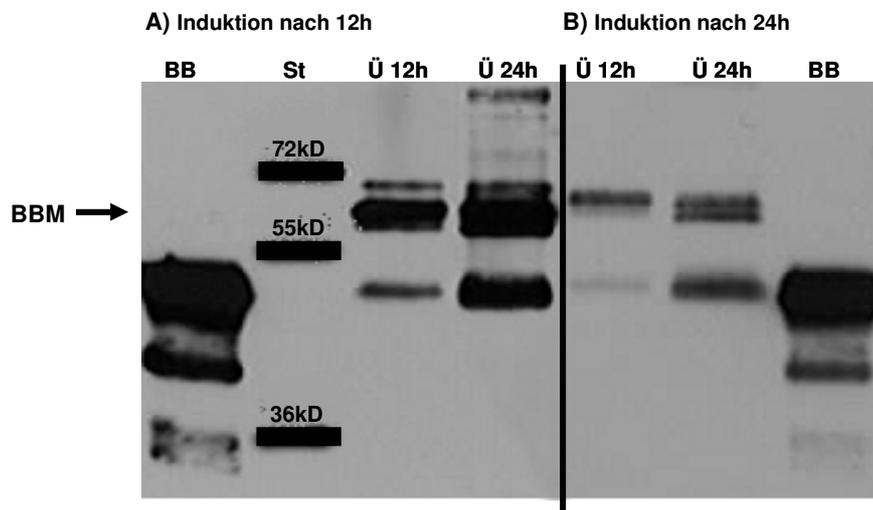


Abb. 32: Repräsentativer Immunoblot des Protease-*knock-out* Stammes zur Analyse der optimalen Kultivierungsdauer und Regulation der Genexpression

(A) Induktion der BBM-Expression nach 12h Wachstum (B) Induktion der Proteinexpression nach 24h Wachstum. 12h oder 24h auf dem Immunoblot angegeben bestimmen die Dauer der Kultivierung nach erfolgter Cadmiuminduktion. Analysiert wurden Überstände auf 10.000 Zellen normiert (Ü). Als Kontrolle diente rekombinantes BB (0,5µg) aus *E. coli* (BB). „St“ zeigt den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH) an.

4.3.3 Inhibierung der extrazellulär auftretenden Proteaseaktivität

Da sich gezeigt hatte, dass der Einsatz des Proteaseinhibitors E-64 einen positiven Einfluss auf die extrazellulär vorliegende Menge von exprimiertem BBM ausübte, wurden unterschiedliche Proteaseinhibitoren eingesetzt und ihre Effizienz mit der Wirksamkeit des E-64 verglichen. Hierbei kamen die Hemmstoffe Antipain, Leupeptin und Chymostatin (siehe 2.10) zum Einsatz.

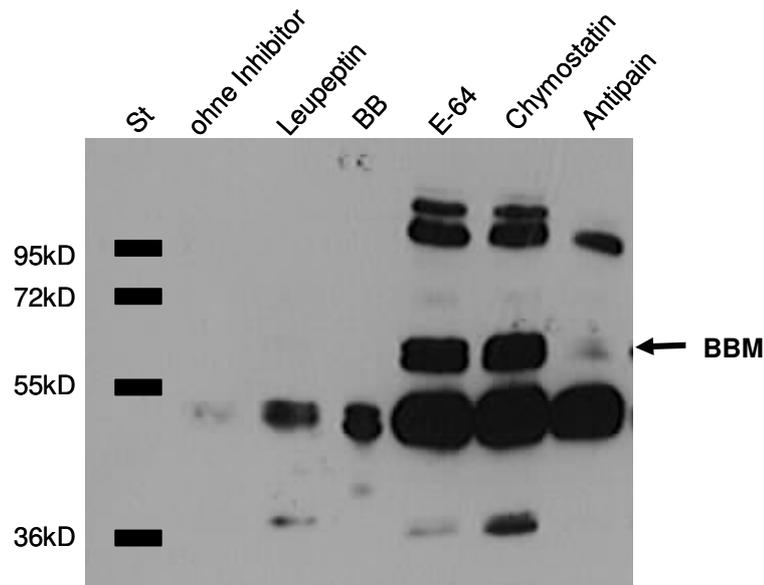


Abb. 33: Beispiel eines Immunoblots des Protease-knock-out Stammes Ttp22X-BBM5 zur Analyse der Effizienz weiterer Proteaseinhibitoren im Vergleich zu E-64

Dargestellt ist die Kultivierung des Ttp22X-BBM5 nach Zugabe unterschiedlicher Protease-Inhibitoren. „St“ zeigt den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH) an, ohne Inhibitor bezeichnet die Kultivierung des Stammes ohne Zugabe von Proteaseinhibitoren, Leupeptin steht für die Zugabe von 120 μM Leupeptin, E-64 für die Zugabe von 84 μM E-64, Chymostatin für die Zugabe von 100 μM Chymostatin und Antipain für die Zugabe von 80 μM Antipain. Als Positiv Kontrolle dienten 3 μg BB rekombinant aus *E. coli* (BB).

Wie in Abb. 33 dargestellt, konnte durch die Zugabe von Chymostatin (100 μM) eine mit der E-64-Kultivierung (84 μM = 30 μg/ml) annähernd vergleichsweise starke Steigerung und mit der Zugabe von Antipain (80 μM) einen etwas schwächeren Anstieg der extrazellulären BBM-Ausbeute detektiert werden. Leupeptin (120 μM) schien im Gegensatz zu anderen Inhibitoren keine bedeutende Erhöhung des Ertrags an im Überstand nachweisbarem BBM zu bewirken. Auch die Proteinfragmentierung des Konstruktes BBM konnte weiterhin nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Cystein spezifische Proteaseinhibitor E-64 weiterhin zur Kultivierung eingesetzt.

Darüber hinaus wurde ermittelt, ob die Konzentration des eingesetzten E-64 (30 μg/ml) für weitere Versuche reduziert werden konnte. Um die optimale Konzentration zu analysieren, wurde der generierte Produktionsstamm Ttp22X-BBM5 in SPP-Medium kultiviert und zum Zeitpunkt der Cadmiuminduktion der Proteinexpression mit unterschiedlichen Mengen an E-64 versetzt. Die untersuchte Konzentrationsbandbreite betrug hierbei 0 μg/ml bis 30 μg/ml E-64.

Wie in Abb. 34 zu erkennen ist, konnte bereits durch den Einsatz geringer Konzentrationen E-64 (1µg/ml) die Ausbeute des heterolog exprimierten Antigens BBM extrazellulär gesteigert werden.

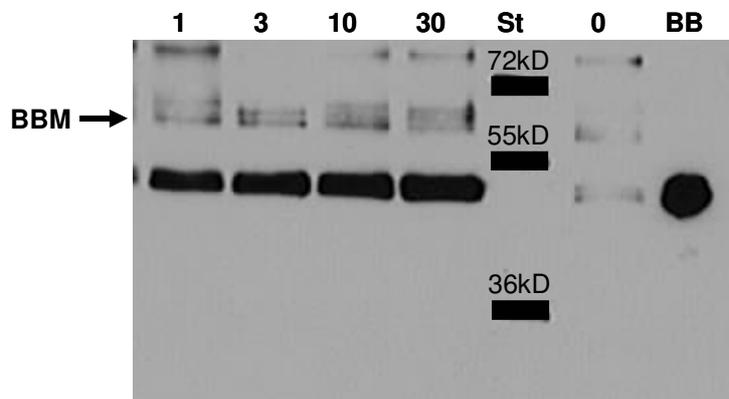


Abb. 34: Repräsentativer Immunoblot zum Austesten der optimal einzusetzenden E-64 Konzentration

Zellkulturen des Ttp22X-BBM5 wurden 0µg/ml (0), 1µg/ml (1), 3µg/ml (3), 10µg/ml (10) oder 30µg/ml (30) E-64 zeitgleich zur Induktion mittels Cadmiumchlorid (5µg/ml) hinzugegeben. Zur nachfolgenden SDS-PAGE und Western Blot Analyse wurde Überstand normiert auf 10.000 Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten 70ng rekombinantes BB aus *E. coli* (BB). „St“ steht für den Proteinstandard (PageRuler™ Plus Pre-Stained Proteinladder; MBI Fermentas GmbH).

24h nach Induktion und Zugabe des Proteaseinhibitors erfolgte die Gewinnung des zellfreien Überstandes zur Durchführung einer SDS-PAGE. Anschließende Western Blot Quantifizierungen bestätigten, dass der extrazelluläre BBM-Ertrag mit zunehmender E-64 Konzentration um eine ≥ 14 fache Steigerung erhöht wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Es bestätigte sich auch in folgenden Versuchen, dass mit der Zugabe von mehr als 10µg/ml E-64 keine bedeutende, zusätzliche Erhöhung der Proteinausbeute erreicht werden konnte. Die Kultivierung des Protease-*knock-out* Stammes Ttp22X-BBM5 in Standard SPP-Medium bei einer Temperatur von 30°C wurde daher mit einer Konzentration von 3-10µg/ml E-64 kombiniert.

Weitere Versuche zur Optimierung der BBM-Ausbeute wurden durch Fermentationen im 0,5l-Maßstab durchgeführt. Hierzu wurde ein Sixfors®-Multi-Fermenter eingesetzt, mit dem die Möglichkeit bestand, bis zu sechs unabhängige Fermenter unter definierten Bedingungen parallel zu betreiben (siehe 3.12). Für die Kultivierung wurden variierende Parameter gewählt, die neben einem *feeding* der Kultur mit zusätzlichem Nährmedium und der zur Induktion der Proteinexpression optimalen Cadmiumchloridkonzentration (5-40µg/ml) auch die Überprüfung der Notwendigkeit

einer pH-Wert-Regulation beinhalteten. Abb. 35 beschreibt die Wachstumskinetik des Ttp22X-BBM5 in einem *fed-batch*-Fermentationsbetrieb. Hierzu wurden drei unabhängige Fermenter zeitgleich unter identischen Bedingungen in Gebrauch genommen. Die Kultivierung erfolgte in SPP-Medium. Etwa vier Stunden vor der Induktion der Proteinexpression fand eine zusätzliche Fütterung durch ankonzentrierte Nährlösung (SPP-Medium) statt. Die Induktion (40µg/ml Cadmiumchlorid) sowie die Zugabe des Proteaseinhibitors E-64 (3µg/ml) erfolgte während der spät logarithmischen Wachstumsphase (24h nach Inokulation).

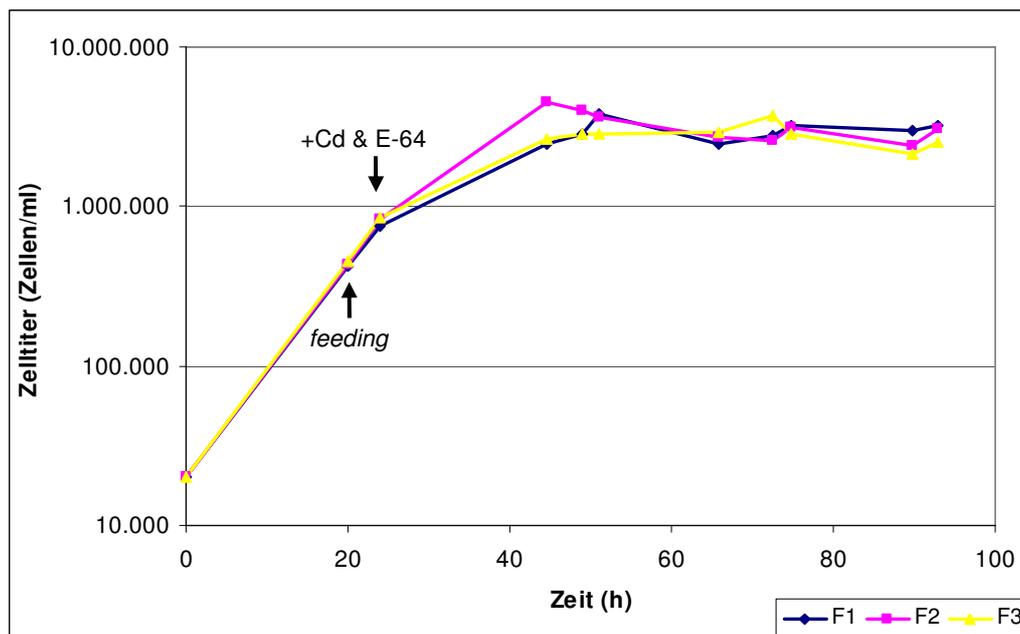


Abb.35: Dreifachbestimmung einer im *fed-batch*-Verfahren aufgenommenen Wachstumskinetik des Ttp22X-BBM5

Dargestellt sind drei Kinetiken des fermentierten Ttp22X-BBM5 (F1, F2 und F3), die unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurden. Auf der X-Achse ist die Kultivierungsdauer in Stunden (h) angegeben, auf der Y-Achse ist der Zelltiter in Zellen pro Milliliter dargestellt (Zellen/ml).

Es zeigte sich, dass der Zelltiter in allen drei Fermentationen sehr hohe Werte erreichte. Etwa 44h nach Inokulation befanden sich die Zellen mit durchschnittlich 3,5Mio Zellen/ml in der stationären Wachstumsphase. Auch nach 93h Wachstum konnten noch immer vitale Zellen beobachtet werden (Zellzahlen siehe Tabelle: 9.7).

Durch weitere Untersuchungen ergab sich, dass der Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM5 im Sixfors[®]-Multi-Fermenter mit und ohne pH-Wert-Regulierung, mit und ohne eine zusätzliche Fütterung sowie mit der Zugabe von 5-40µg/ml Cadmiumchlorid und 3-30µg/ml E-64 hohe Zelldichten erreichte, und somit in seinem Wachstum nicht beeinflusst wurde. Abbildung 36 repräsentiert die Auswertung einer

beispielhaften Western Blot Quantifizierung nach einer *batch*- bzw. einer *fed-batch*-Kultivierung des Protease-*knock-out* Stammes Ttp22X-BBM5. In diesem Versuch wurde die Kultivierung der Zellen in SPP-Medium mit Zugabe von 3µg/ml des Proteaseinhibitors E-64 durchgeführt. Die Kulturen wurden hierbei aufgrund des in das Wirtsgenom stabil integrierten Transgens ohne Selektionsdruck angezogen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte für beide Ansätze etwa 22h nach Inokulation. Während einer der Produktionsstämme für die Induktion der BBM-Expression 15µg/ml Cadmiumchlorid erhielt (*batch*-Verfahren), wurde die Proteinexpression des zweiten Stammes nach einem vorherigen *feeding* durch 40µg/ml Cadmiumchlorid induziert (*fed-batch*-Verfahren). Ein weiterer Unterschied in der diesbezüglichen Kultivierung lag in der pH-Wert-Regulierung. Während der in der *fed-batch*-Betriebsweise kultivierte Protease-*knock-out*-Stamm Ttp22X-BBM5 einer pH-Wert-Kontrolle (pH 7,0) unterlag, wurde die Regulierung des pH-Wertes für den Produktionsstamm in der *batch*-Fermentation ausgeschaltet. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass durch eine *batch*-Kultivierung ohne pH-Wert-Regulierung der extrazelluläre Ertrag an BBM im Vergleich zu einer pH-Wert-kontrollierten Fermentation höher lag. Somit stellte sich heraus, dass der Prozess der zusätzlichen Fütterung keine verbesserte BBM-Ausbeute zur Folge hatte. Eine signifikante Erhöhung der extrazellulären Proteinausbeute gegenüber der zuvor durchgeführten Kolbenanzucht konnte wider Erwarten in keiner Fermentation beobachtet werden. Die Verwendung von angereichertem SPP-Medium, welches eine erhöhte Konzentration Proteose Pepton (5x) enthielt, wirkte sich jedoch im Rahmen der Fermentation positiv auf die BBM-Ausbeute aus.

Wie in der Kolbenanzucht konnte auch bei der Analyse der Fermentationsüberstände beobachtet werden, dass das komplexe Protein BBM zu großen Teilen in seine Proteinfragmente zerfiel. Berücksichtigt man bei der Proteinmengenbestimmung den Abbau des reifen Antigens BBM zu kleineren Fragmenten, konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche BBM-Proteinproduktivität des Ttp22X-BBM5 wesentlich höher lag. Diesbezüglich konnten extrazelluläre Ausbeuten im Bereich von 1,59mg/l ermittelt werden (siehe Abb. 36).

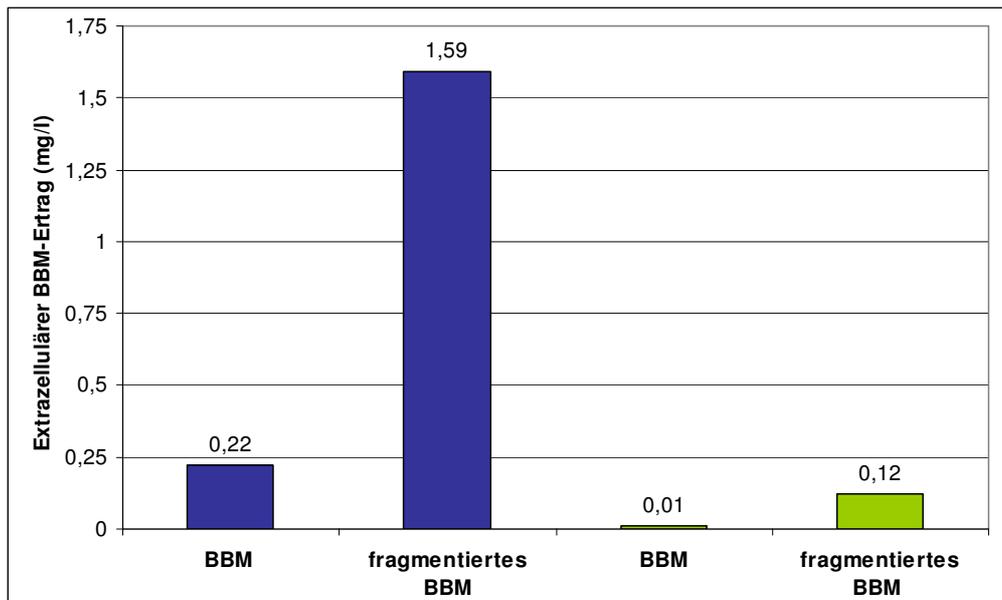


Abb. 36: Beispiel einer Western Blot Quantifizierung für Ttp22X-BBM5 nach einer *batch*- und einer *fed-batch*-Fermentation

Auf der X-Achse bildet das Balkendiagramm den Produktionsstamm Ttp22X-BBM5 ab. Auf der Y-Achse ist die Ausbeute an extrazellulärem Protein in Milligramm pro Liter (mg/l) angegeben. Die Farben blau und grün unterscheiden die beiden Fermentationsverfahren (**Blau: *batch* / Grün: *fed-batch***). Es sind jeweils die Proteinmengen des reifen BBMs im Vergleich zum Ertrag an fragmentiertem BBM dargestellt.

Zusammenfassend kann bei dem generierten Produktionsstamm Ttp22X-BBM5 von einem proteasedefizienten *Tetrahymena*-Stamm ausgegangen werden, welcher die Fähigkeit aufweist, das erwünschte Malaria Antigen BBM in quantifizierbaren Mengen zu exprimieren und in das extrazelluläre Medium zu sekretieren.

5. Diskussion

Malaria verursacht als eine parasitäre Infektion jedes Jahr 500 Millionen Erkrankungen, an denen jährlich annähernd 1 Million betroffene Menschen sterben. Aus diesem Grund besteht die dringende Notwendigkeit, einen geeigneten Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln. Einige Eigenschaften qualifizieren den Organismus *Tetrahymena thermophila* als heterologes Expressionssystem (Herrmann, L. *et al.*, 2006 (a); Weide, T. *et al.*, 2007; Orias, E. *et al.*, 2000), insbesondere zur Generierung von Proteinen aus *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*). Neben der Apathogenität des Ciliaten und den biotechnologischen Aspekten, die die Transformation und die Co-Transformationsprozesse sowie die Fermentationstechnologie betreffen, macht die enge Verwandtschaft von *Tetrahymena* und *Plasmodium* das Ciliaten-Expressionssystem besonders attraktiv. Beide Organismen zeigen neben einer ähnlichen Kodonpräferenz vergleichbare Membrankompartimente und ähnliche Sets an enzymatischen Proteinen. Weiterhin konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass *Tetrahymena* die Fähigkeit aufweist, *plasmodiale* Antigene zu exprimieren (Peterson, D.S. *et al.*, 2002; Weide, T. *et al.*, 2007).

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, die *Tetrahymena* Produktionstechnologie als innovatives Expressionssystem zur Herstellung von potenziellen Malaria Vakzinkandidaten zu nutzen.

5.1 Entwicklung der Malaria Antigen Konstrukte

Die Produktion eines sicheren und effizienten Malaria Impfstoffs ist und bleibt aufgrund der hohen Komplexität des Parasiten und des schweren Infektionsgeschehens eine wissenschaftliche Herausforderung (Gardner, M.J. *et al.*, 2002). *Plasmodium* hat im Laufe seiner Evolution eine Reihe von Mechanismen entwickelt, die ihn das humane Immunsystem erfolgreich umgehen lassen. So liegt ein Grund für die hohe Komplexität von *P. falciparum* in der weitreichenden genetischen Diversität innerhalb der Parasitenpopulation. Zusätzlich verfügt der Erreger über einen vielseitigen Lebenszyklus, der zum einen zwei verschiedene Wirte involviert und zum anderen in unterschiedliche sexuelle und asexuelle Reproduktionsphasen unterteilt ist. In jedem Stadium ändert der Parasit hierbei sein Gen-Expressionsprofil und somit die entsprechenden Oberflächenantigene, die als mögliche Impfstoffkandidaten ausgetestet werden können (Daily, J.P. *et al.*, 2007). In

Bezug auf die Medikamenten- und Impfstoffentwicklung wurden bereits 40 vielversprechende Malaria Antigene identifiziert (Sharma, S. & Pathak, S. 2008). Um das Problem des Antigenpolymorphismus zu umgehen, werden in der Forschung und Entwicklung hauptsächlich zwei Strategien verfolgt. Zum einen werden versucht alle bekannten, allelspezifischen Sequenzen eines Antigens in einem Impfstoff zu kombinieren, zum anderen konzentrieren sich die Wissenschaftler auf Epitope, die nicht oder nur gering polymorph sind. Daher wurden bereits in der Vergangenheit kombinatorische Vakzinkandidaten generiert, die unterschiedliche Malaria Antigene beinhalteten (Mazumdar, S. *et al.*, 2010; Pan, W. *et al.*, 2004; Genton, B. *et al.*, 2003). Die Gruppe um Shi *et al.* hat z. B. untersucht, ob das Merozoiten Oberflächenprotein 8 (MSP-8) die Fähigkeit aufweist, die Effizienz der auf dem Merozoiten Oberflächenprotein 1 (MSP-1) basierenden Vakzinkandidaten zu optimieren (Shi, Q. *et al.*, 2007). Weiterhin ist es das Ziel des Malaria Vakzin Programmes des *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) ein multi-antigenes, rekombinantes Vakzin gegen *Plasmodium falciparum* zu entwickeln, welches Antigene verschiedener parasitärer Stadien enthält und in der Lage ist, alle symptomatischen Erscheinungsformen der Malaria und somit eine Parasitämie zu unterbinden (Heppner, D.G. *et al.*, 2005). Insgesamt hat sich die Anzahl der potenziellen Malaria-Vakzine in klinischen Untersuchungen von 1985 bis 2006 von 0 auf 16 erhöht (*George Institute for International Health*, 2007). Trotz aller Fortschritte sind die Identifizierung neuer Ziel-Antigene und die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes weiterhin unabdingbar.

Die möglichen Malaria-Vakzinkandidaten basieren auf den unterschiedlichen Stadien des Malaria-Erregers und haben daher verschiedene Vor- und Nachteile. Gegenwärtig wird versucht, drei verschiedene Vakzin-Typen zu entwickeln: prä-erythrozytäre Vakzinkandidaten, Vakzinkandidaten des parasitären Blutstadiums und Vakzinkandidaten, die die Übertragung des Erregers blockieren (MVI, PATH 2010). Ein Vorteil bei der Entwicklung von prä-erythrozytären Vakzinkandidaten liegt in dem zu erwerbenden Schutz vor dem Ausbruch einer Malaria-Infektion kurz nach der Übertragung der Sporozoiten oder in einer Bekämpfung der Erreger in gerade befallenen Leberzellen. Da Sporozoiten dieser Phase, bevor sie in die Leberzellen eindringen, jedoch nur wenige Minuten für die Antikörper zugänglich sind, müssten diese, aus einer Immunantwort auf Sporozoiten-Antigene entstehenden Antikörper,

sehr effektiv und in einem hohen Titer zur Zeit der Infektion vorhanden sein. Vakzinkandidaten, die auf die Blockierung einer Parasiten-Übertragung abzielen, sollen den Lebenszyklus des Erregers unterbrechen. Dies soll durch bei einer Blutmahlzeit aufgenommene Antikörper, die die Fähigkeit aufweisen den Parasiten daran zu hindern in der *Anopheles* Mücke heranzureifen, vermittelt werden. Ein solcher Impfstoff würde allerdings nicht vor der Krankheit oder ihren Symptomen schützen, er würde lediglich die Ausbreitung der Infektionen durch eine verringerte Übertragungsrate der Mosquitos limitieren. Vakzinkandidaten basierend auf dem parasitären Blutstadium könnten den Erreger in seinem tödlichsten Stadium, zum Zeitpunkt der raschen Replikation innerhalb humaner Erythrozyten treffen. Diese Kandidaten sollen die Anzahl der Blutparasiten verringern und somit den Schweregrad der Krankheit reduzieren. Des Weiteren sollen sie zur Entwicklung einer natürlichen Immunität beitragen. Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Expression durch *T. thermophila* Malaria Antigen-Konstrukte hergestellt, die dem Blutstadium des Parasiten *P. falciparum* zuzuordnen sind. Eines der vornehmlichen Ziele in der Entwicklung von Vakzinen gegen das parasitäre Blutstadium von *P. falciparum* ist das Merozoiten Hauptoberflächenantigen MSP-1. Die Forschung konzentriert sich hierbei vor allem auf das MSP1₁₉-Fragment und die polymorphe Block2-Region (John, C.C. *et al.*, 2004; Tanabe, K. *et al.*, 1987; Takala, S.L. *et al.*, 2006; Tetteh, K.A. *et al.*, 2005; Cavanagh, D. *et al.*, 2004). Ein weiteres weitverbreitetes Forschungsziel ist aufgrund seiner genetischen Diversität das *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1), welches eine entscheidene Rolle bei der Sequestration der Erythrozyten und somit bei der Umgehung des menschlichen Immunsystems spielt.

In dieser Arbeit wurden aus den genannten Gründen zwei Malaria-Vakzinkandidaten gewählt, die auf diesen beiden Oberflächen-Antigenen basierten. Bei dem MSP-1 zugrunde liegenden Vakzinkandidaten handelte es sich um synthetisch hergestellte Proteine, die auf dem N-terminalen Block2 basierten. Cavanagh *et al.* postulierten bereits, dass Antikörper gegen den polymorphen N-terminalen Block2 des MSP-1 Schutz gegen die klinische Malaria auslösen konnten (Cavanagh, D. *et al.*, 2004). Auch Immunisierungsversuche mittels MSP-1 in *Saimiri* und *Aotus* Affen konnten einen partiellen Schutz gegen die Infektion durch *P. falciparum* erzielen (Etlinger, H.M. *et al.*, 1991). Siddiqui *et al.* beschrieben sogar die erfolgreiche Immunisierung

von *Aotus* Affen, bei der alle eingesetzten Tiere eine sterile Immunität entwickelten und somit weder Träger noch Ausscheider des Erregers waren (Siddiqui, W.A. *et al.*, 1987). Um dem hohen Grad der genetischen Variabilität gerecht zu werden, wurde auf zwei MSP1-Block2-Hybrid-Konstrukte (BB und BBM) zurückgegriffen, die die bekannte Diversität der Block2-Region und somit die drei Serotypen K1, RO33 und Mad20 abdeckte. Diese wurden durch Prof. Dr. David Cavanagh der Universität von Edinburgh entwickelt und mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Beide Konstrukte verfügten N-terminal zusätzlich über den konservierten Bereich des Block1, da frühere Immunogenitäts-Studien zeigten, dass Antigene rekombinant aus *E. coli*, die nur auf Block2 basierten, lediglich schwache immunogene Antworten in den Versuchstieren auslösten (unveröffentlichte Daten, Cavanagh, D., persönliche Mitteilung). Durch die Fusion des Block1 mit dem Block2 konnte jedoch eine verbesserte Immunantwort erzeugt werden. Dies lag möglicherweise an den vorliegenden T-Zell-Epitopen des Block1. Zusätzlich ist die hoch konservierte C-terminale Region des MSP-1, das MSP-1₁₉, Ziel von vielen Immunogenisierungsstudien (O'Donnell, R.A. *et al.*, 2000; O'Donnell, R.A. *et al.*, 2001). So untersuchten John *et al.* die potenziell schützende Rolle der gegen MSP-1₁₉ gerichteten Antikörper in Individuen, die der Malaria natürlich ausgesetzt waren, und fanden heraus, dass den MSP-1₁₉ spezifischen Antikörpern eine wichtige Funktion bei der Inhibierung der Erythrozyteninvasion und somit für die Immunität gegen die Blutphaseninfektion durch *P. falciparum* zu Teil wird (John, C.C. *et al.*, 2004). Diese Studien führten zu der Anregung bei einem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukt eine zusätzliche Optimierung der Immunantwort durch das Anfügen des mit einer kurzen *spacer*-Region fusionierten C-terminalen, konservierten MSP-1₁₉-Fragments vorzunehmen. Aufgrund der daraus resultierenden synthetischen Herstellung der BB- und BBM-Zielgensequenzen bot sich für die vereinfachte Handhabung eine Kodonoptimierung an, welche die *plasmodiale* DNA-Sequenz an die für *T. thermophila* ermittelte Kodonpräferenz hoch exprimierter Gene anpasste. Da im *plasmodialen* MSP-1 mit Ausnahme des GPI-Ankers keine quantitativen Glykosylierungen vorliegen (Gilson, P.R. *et al.*, 2006; Hoessli, D.C. *et al.*, 2003), wurden bezüglich der Authentizität der Proteine die für *Tetrahymena* spezifischen N-Glykosylierungsstellen im Block2 der generierten Konstrukte eliminiert. Auf das Anfügen eines *tags* zur Detektion des Proteins wurde verzichtet, da diese bei Immunisierungstudien unerwünscht sind und bereits monoklonale

Antikörper gegen BB sowie BBM in Vorarbeit generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (siehe 2.11). Durch das Zusammenfügen der unterschiedlichen, antigenen Bereiche (N-terminal Block1, multiallelischer Block2 (BB) sowie für das komplexere Konstrukt C-terminal MSP-1₁₉ (BBM)) ergab sich die Generierung zweier kombinatorischer, multiallelischer Vakzinkandidaten.

Der zweite Fokus dieser Arbeit bezog sich auf die Herstellung von Antigenen, die auf dem Oberflächenprotein Var2CSA basieren. Var2CSA kommt als veränderte Version des PfEMP1 (*Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1*) bei schwangerschaftsassoziierter Malaria als einziges Protein der PfEMP1-Familie in allen *P. falciparum* Isolaten relativ konserviert vor. Bei diesem speziellen Adhäsions-Phänotyp kommt es zum Affinitätswechsel von einem der Hauptrezeptoren CD-36 zu dem vorwiegend innerhalb der Plazenta auftretenden Rezeptor Chondroitinsulfat A (CSA) (Salanti, A. *et al.*, 2004). Die *duffy binding like* Domänen (DBL-Domänen) des Var2CSA sind Hauptbestandteil des speziellen Adhäsions-Proteins der maternalen Malaria (Salanti, A. *et al.*, 2004). Ihre Sequenz befindet sich in der extrazellulären Kopfreion der *var*-Gene. Für eine spezifische und hoch-affine Bindung von Var2CSA an Chondroitinsulfat A (CSA) wird gegenwärtig vermutet, dass die organisierte Struktur der extrazellulären Region von Var2CSA korrekt gefaltet und vollständig vorliegen muss (Srivastava, A. *et al.*, 2010). Trotzdem erscheint aufgrund der Größe von Var2CSA (~350kD) die Definierung von kleineren Regionen, die effektiv in einem Impfstoff oder einem Medikament zum Einsatz kommen können, sinnvoll. Dahlbäck *et al.* charakterisierten jedoch mithilfe vorliegender Epitope, die durch natürlich erworbene Antikörper erkannt wurden, DBL3 als eine CSA-Bindedomäne und Salanti *et al.* postulierten, dass es mit vielen verschiedenen Domänen des Var2CSA möglich ist, adhäsionsblockierende Antikörper zu induzieren (Dahlbäck, M. *et al.*, 2006; Salanti, A. *et al.*, 2010). Weiterhin präsentierte Higgins 2008 die Struktur der auf Var2CSA basierenden DBL3-Region als eine CSA-Bindedomäne und die Gruppe um Andersen *et al.* fertigten 3D-Modelle für jede der sechs Var2CSA-Domänen an, um mehr über die Strukturierung des Proteins erfahren und somit schützende Antikörper-Epitope identifizieren zu können (Higgins, M.K. 2008; Andersen, P. *et al.*, 2008). Durch Immunisierungsstudien in Mäusen mit verschiedenen rekombinanten DBL-Domänen aus Baculovirus-transfizierten Insektenzellen (DBL1, DBL3, DBL4) konnten bereits

Antikörper produziert werden, die in der Lage waren, eine Bindung an CSA zu verhindern (Salanti, A. *et al.*, 2010; Costa, F.T. *et al.*, 2003; Salanti, A. *et al.*, 2003). Die Entwicklung eines auf Var2CSA basierenden Vakzins bedingt daher die Produktion entsprechender Domänen, die die Fähigkeit aufweisen, die molekulare Konformation *in vivo* zu imitieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter dem Aspekt welche rekombinant aus *Tetrahymena* stammenden DBL-Domänen die Fähigkeit aufweisen natürlich vorkommende Domänen und ihre potenzielle Funktionalität nachzuahmen, die bereits gut erforschte DBL3-Domäne sowie die bislang weniger analysierte DBL2-Domäne produziert. Die Auswahl der entsprechenden Antigen-Regionen erfolgte durch Prof. Dr. Thor Theander der Universität Kopenhagen, dessen Arbeitsgruppe freundlicherweise die Zielgensequenzen zur Verfügung gestellt hat. Diesbezüglich kam aufgrund der verwandtschaftlichen Verhältnisse des Ciliaten *T. thermophila* zum Parasiten *P. falciparum* und ihrer vergleichbaren Kodonpräferenz sowie der daraus resultierenden möglichen Nutzung der originären Gensequenzen keine kostenintensive *Tetrahymena*-spezifische Kodonoptimierung zum Einsatz. Dies war von großem Vorteil, da die Möglichkeit zur Analyse vieler verschiedener Domänen gegeben sein sollte. Aus dem gleichen Grund wurde zusätzlich zur vereinfachten Detektierung der Proteine N-terminal ein V5-*tag* und zur vereinfachten Aufreinigung ein His₆-*tag* angefügt.

Die erfolgreiche Generierung der unterschiedlichen Expressionskassetten, die den für *T. thermophila* gegenwärtig stärksten verfügbaren Promotor (MTT₁) (Shang, Y. *et al.*, 2002; Weide, T. *et al.*, 2006), das bereits in dem Ciliaten genutzte MSP-1 Signalpeptid (Weide, T. *et al.*, 2007) sowie einen Standardterminator (BTU₂) (Gaertig, J. *et al.*, 1994) beinhalteten, fand durch die Integration der Transgene in den ausgewählten Klonierungsvektor pDL-325 statt. Der Einsatz eines induzierbaren Promotors bringt bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine den Vorteil mit sich, dass die zelleigenen Stoffwechselwege während des Kulturwachstums nicht negativ beeinflusst werden, da die Proteinexpression erst in der spät logarithmischen oder stationären Wachstumsphase induziert werden kann. Weiterhin wurden Metallothionein-Promotoren bereits erfolgreich in eukaryotischen Systemen zur regulierten Genexpression eingesetzt (Shang, Y. *et al.*, 2002; Santos, M.G. *et al.*, 2007; Weide, T. *et al.*, 2007; Kovach, M.J. *et al.*, 1992).

Das anschließende Crelox-Verfahren ermöglichte den vereinfachten Transfer der Expressionskassetten vom Klonierungsvektor pDL-325 in die Expressionsvektoren pAX und pKOIX (Weide, T. *et al.*, 2007). Nachdem die auserwählte DNA in dem Klonierungsvektor integriert wurde, war somit jede weitere Subklonierung unnötig. Dies hat bezüglich der schwierigen Klonierung von äußerst AT-reichen Sequenzen eine hohe Relevanz (Weide, T. *et al.*, 2007). Auf diese Weise war eine zeitsparende Herstellung der episomalen Plasmide pAX-BB, pAX-BBM, pAX-DBL2 und pAX-DBL3 sowie der integrativen Vektoren pKOIX-BB, pKOIX-BBM, pKOIX-DBL2 und pKOIX-DBL3 möglich. Die Auswahl der beiden Vektoren pAX und pKOIX begründete sich in ihren Unterschieden, die Vor- aber auch Nachteile mit sich brachten (Weide, T. *et al.*, 2007; Bockau, U. 2006). Auf diese Weise war im Fall des episomalen Plasmids pAX eine Expression der gewünschten Proteine unabhängig von einer Integration in das Wirtsgenom möglich. Dies bedingte zwar einen dauerhaften Selektionsdruck, um eine Ausdünnung der auf einem rDNA-Replikationsursprung basierenden Plasmide zu vermeiden, bot jedoch die Möglichkeit erste Expressionsanalysen bereits nach zwei bis drei Wochen durchzuführen. Da die *Tetrahymena* eigene rDNA im Makronukleus in ungefähr 9000 haploiden Kopien vorliegt, besteht die Annahme, dass auch der episomale Vektor pAX in einer sehr hohen Kopienzahl vorliegt (Bockau, U. 2006). Dies kann sich durch die daraus resultierende Gen-Dosis positiv auf die Genexpression auswirken (Dingermann, T. & Zündorf, I. 1999). Bei der Verwendung des großen, AT-reichen episomalen Vektors, bestand jedoch das Risiko der unerwünschten Rekombination. Zum einen konnten die vorliegenden redundanten Bereiche des 4kb umfassenden rDNA-*origin of replication* (doppelter rDNA-*ori*) ungerichtete Rekombinations-ereignisse innerhalb des Vektor-*backbones* auslösen (Bockau, U. 2006) und zum anderen die Integration variabler Mengen Vektor-DNA in die endogene rDNA des Wirtsgenoms bewirken (Gaertig, J. *et al.*, 1994). Bei dem Einsatz eines in das Wirtsgenom über homologe Rekombination integrierenden Vektors (pKOIX) ist kein wirtsspezifischer Replikationsursprung nötig, da nach der Integration die Stabilität des Transgens gewährleistet ist. Die Technik der Vektorintegration in das Genom des Wirtes wurde bereits standardmäßig in vielen etablierten Expressionssystemen wie Hefen oder Säugerzelllinien zur Produktion rekombinanter Proteine verwendet (Cereghino, J.L. & Cregg, J.M. 2000; Wurm, F.M.2004). Integrative Vektoren können neben der gerichteten Insertion homologer oder heterologer Gene in das Wirtsgenom auch

eingesetzt werden, um die Inaktivierung oder Deletion spezifischer Gene vorzunehmen. Dies geschieht z. B. um, wie in dieser Arbeit durchgeführt, Protease-*knock-out* Stämme oder wie es bei der Verwendung des pKOIX der Fall ist, auxotrophe Stämme zu kreieren (Bockau, U. 2006; Herrmann, L. *et al.*, 2006 (a)). Durch den Einsatz des pKOIX können mittels der Integration in den Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase-Lokus (DHFR-TS) und der damit einhergehenden Deletion der *Tetrahymena* eigenen, essentiellen DHFR-TS Thymidin auxotrophe Stämme entstehen. Eine solche Auxotrophie gilt auch als biologischer Sicherheitsmarker, da der gentechnisch veränderte Ciliat ohne die Zugabe von Thymidin nicht überlebensfähig ist (Paciello, L. *et al.*, 2009; Hägg, P. *et al.*, 2004). Nach einem etwa vier- bis sechswöchigen Prozess der phänotypischen Segregation waren alle Wildtyp-Allele gegen die gewünschte Expressionskassette ausgetauscht und es waren stabile *T. thermophila* Expressionsstämme entstanden, welche im großen Maßstab ohne die Zugabe von Antibiotikum, jedoch mit Zusatz von Thymidin kultiviert werden konnten. Nachdem die im Rahmen dieser Arbeit generierten *T. thermophila* Transformanten durch Antibiotikumselektion und einem Test auf eine erworbene Thymidin-Auxotrophie bezüglich der integrativen Expressionsvektoren überprüft wurden, konnte das korrekte Vorliegen der Expressionskassetten in den Stämmen auf molekularer Ebene verifiziert werden. Die hierzu durchgeführten PCR-analytischen Untersuchungen bestätigten die erfolgreiche Generierung der rekombinanten *T. thermophila* Stämme.

5.2 Produktion von Malaria Antigenen mithilfe des *Tetrahymena thermophila* Expressionssystems

In Vorarbeiten konnte bereits durch die Expression des *plasmodialen* Circumsporozoit Proteins 1 (CSP-1) und des MSP-1₁₉ gezeigt werden, dass *T. thermophila* die Fähigkeit aufweist, rekombinante Proteine aus *P. falciparum* herzustellen (Peterson, D.S. *et al.*, 2002; Weide, T. *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Fähigkeit des Ciliaten durch die erfolgreiche Expression der auf Var2CSA basierenden DBL-Domänen sowie der synthetischen, auf MSP-1Block2 basierenden Antigene BB und BBM bestätigt werden. Das durch Massenspektrometrie berechnete Molekulargewicht des kleineren MSP-1Block2 Konstrukts BB liegt bei 31kD und des größeren BBM bei 48,3kD (inklusive MSP-1-Signalpeptid mit 4,5kD). Die rekombinanten Proteine der *Tetrahymena* Stämme

wurden auf den durchgeführten Immunoblots jedoch bei einem Molekulargewicht von 50-55kD für BB und von 60-70kD für BBM detektiert. Da es sich bei dem Block2-Komplex um ein synthetisch hergestelltes, multiallelisches Konstrukt handelt, von dem angenommen wird, dass es keine Sekundärstruktur aufweist (Cavanagh, D., persönliche Mitteilung), demonstrieren BB und BBM in der SDS-Gelelektrophorese ungewöhnliche Laufeigenschaften. Des Weiteren ist die Bindung des SDS zur Überdeckung der Proteineigenladung aufgrund der vorliegenden, wenig hydrophoben Aminosäuren gegebenenfalls zu gering, was ebenfalls ein außergewöhnliches Laufverhalten erklären könnte (Tompa, P. 2002; Uversky, V.N. 2002). Das gleiche Phänomen der ungewöhnlichen Laufeigenschaft zeigten auch BB und BBM rekombinant aus *E. coli*, welche bei den Versuchen als Positivkontrollen zum Einsatz kamen. Über die zu erwartenden Banden hinaus konnten weiterhin Nebenbanden detektiert werden. Banden, die höher als 72kD detektiert wurden, weisen auf die Bildung von Dimeren oder Trimeren hin, welche möglicherweise auch aufgrund des Disulfidbrücken ausbildenden MSP-1₁₉-Fragments entstanden sind. Weiterhin zeigten sich Banden geringerer Höhe von ~50kD, die z. B. durch den Abbau des rekombinanten Proteins aufgrund endogener Proteasen entstanden sein könnten. Besonders instabil schien hierbei das rekombinante BBM zu sein, sodass bei vielen Analysen der BBM-Produktion häufig zu großen Teilen ein kleineres Abbauprodukt bei ~50kD detektiert werden konnte. Diese Eigenschaft bezog sich auch auf das verwendete BBM rekombinant aus *E. coli*, weshalb ein Nachweis konstanter Protein-Konzentrationen erschwert wurde. Unter Umständen zerfällt das heterolog exprimierte Antigen bereits intrazellulär aufgrund seiner synthetischen, ungefalteten Struktur.

Durchgeführte Western Blot Quantifizierungen gaben einen Hinweis auf die intrazellulär produzierten Mengen der gewünschten Antigene. Ein Nachteil dieser Art der Proteinmengenbestimmung lag in den relativ großen Schwankungen, die mit der Methode des Western Blots und der Instabilität des als Positivkontrolle verwendeten, in *E. coli* exprimierten BBM zu begründen ist. Eine Quantifizierung mithilfe des ELISAs (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) war im Rahmen dieser Arbeit für die rekombinanten Malaria Antigene nicht durchführbar, da die hierfür benötigte Menge an Antikörpern nicht zur Verfügung stand. Bezüglich der auf MSP-1Block2 basierenden Proteine bestand auch nicht die Möglichkeit eines Bradford-Assays, da die multiallelischen Hybridkonstrukte aufgrund der verwendeten, wenig hydrophoben

Aminosäuren nicht in der Lage waren, den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau zu binden. Da die Expressionsrate der gewünschten Proteine zu gering und der Hintergrund dadurch zu hoch war, stellte sich auch die Färbung mithilfe eines Silbergels als ungeeignet heraus. Aus diesen Gründen gab es für den Rahmen dieser Arbeit keine vergleichbare Alternative. Durch die Western Blot Quantifizierungen konnten für die *Tetrahymena* Stämme mit episomal vorliegenden Plasmiden TtpAX-BB TtpAX-BBM ~2mg/l detektiert werden. Für die Stämme, in denen die Expressionskassette ins Genom integrierte, TtpKOIX-BB und TtpKOIX-BBM, konnten Proteinmengen von ~5mg/l bzw. ~3mg/l bestimmt werden (vgl. Abb. 16). Die Werte weisen daraufhin, dass die Zielgene, die mittels der Vektoren in das *Tetrahymena*-Genom integriert wurden, zu einer leicht besseren Ausbeute führten, als die episomal vorliegenden Expressionsvektoren. Dies ist möglicherweise durch die höhere Stabilität aufgrund der Integration in das Wirtsgenom zu erklären. Weiterhin zeigte sich, dass die Proteinmenge des von TtpKOIX produzierten Antigens BB höher lag als die des Antigens BBM, was möglicherweise auf die höhere Komplexität des BBM zurückzuführen ist oder mit proteolytischer Abspaltung des MSP-1₁₉-Fragments vom BBM-Proteinkomplex begründet werden kann. Generell ist jedoch von einer vergleichbaren Expressionsstärke aller Stämme zu sprechen. Weiterführende Analysen zellfreier Kulturen ergaben, dass im Überstand der BB basierenden Transformanten ebenfalls Antigen detektiert wurde, die Menge jedoch zu gering war, um weitere Untersuchungen durchzuführen. Für die MSP-1Block2 zugrunde liegenden Stämme konnte daher keine ausreichende Sekretion der gewünschten Proteine BB und BBM nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden die sezernierten Antigene aber auch nach der Sekretion durch eine hohe extrazelluläre Proteaseaktivität abgebaut, da beide Proteine bzw. deren Proteinfragmente mithilfe von Dot-Blot Analysen im zellfreien Überstand detektiert werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Grund für den proteolytischen Abbau der potenziell sekretierten Proteine könnte die für die Proteasen ungeschützte, synthetische Struktur der auf MSP-1 basierenden Antigene sein (Tompa, P.2002; Wright, P.E. *et al.*, 1999). Da die *Tetrahymena* spezifischen Glykosylierungsstellen aufgrund fehlender Glykosylierungen von *P. falciparum* im Block2 eliminiert wurden und vermutlich keine Faltung der Proteine vorliegt, werden die Antigene den Proteasen ungeschützt präsentiert. Der Abbau rekombinanter Proteine durch vom Wirtsorganismus sezernierte Proteasen ist auch in vielen anderen

Expressionssystemen problematisch, weshalb oftmals Stämme konstruiert werden, die auf Protease-*knock-outs* basieren. So konnten Idiris *et al.* z. B. eine 30-fache Verbesserung bei der Sekretion des proteasesensitiven Proteins hGH (*human growth hormone*) durch eine multiple Gendeletion mehrerer Proteasen der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* erreichen (Idiris, A. *et al.*, 2006; Idiris, A. *et al.*, 2010). Die Analysen der auf Var2CSA basierenden *Tetrahymena* Stämme bestätigten die Produktion der PfEMP1-Domänen. Intrazellulär konnten erwartungsgemäße Banden einer Größe von ~50kD detektiert werden, was den errechneten Molekulargewichten von 47,5kD für DBL2 und 50,5kD von DBL3 entspricht. Bei den Expressionsanalysen traten nur gelegentlich Nebenbanden auf, die vermutlich aufgrund ihrer geringen Größe Abbauprodukte des vollständigen Proteins oder hinsichtlich ihrer Größe von ca. 95kD Dimere darstellten. Anschließend durchgeführte Western Blot Quantifizierungen der intrazellulär produzierten Antigene ergaben für die *T. thermophila* Expressionsstämme mit episomalem Plasmid, TtpAX-DBL2 und TtpAX-DBL3, einen Wert von ~1mg/l. Für die beiden *T. thermophila* Expressionsstämme mit integrativer Expressionskassette, TtpKOIX-DBL2 sowie TtpKOIX-DBL3, lagen die durchschnittlichen Werte der produzierten Proteinmenge bei ~3mg/l bzw. bei ~1mg/l (vgl. Abb. 17). Die Integration der konstruierten Expressionskassetten in das *Tetrahymena* Genom führte somit, wie sich auch schon bei den auf MSP-1 basierenden Antigenen zeigte, zu einer etwas höheren Ausbeute an gewünschtem Protein als das Vorliegen episomaler Expressionsvektoren.

Stellt man die Proteinerträge der auf MSP-1Block2 und der auf Var2CSA zugrunde liegenden Antigene einander gegenüber, bestätigte sich, dass eine Kodonoptimierung der eingesetzten Zielensequenzen für die DBL-Domänen nicht erforderlich war, da sich die entsprechende Proteinausbeute mit der durch die für *Tetrahymena* kodonoptimierten Antigene BB und BBM vergleichen ließ. Da die DBL-spezifischen Expressionsvektoren jedoch durch das Einfügen entsprechender Schnittstellen (*Agel*, *AvrII*, siehe Abb. 13) so konstruiert wurden, dass das Zielgen variabel ausgetauscht werden kann, ist es möglich, dass aufgrund der nahe dem Start-ATG liegenden Restriktionsstelle *Agel* die Transkription der Basenpaare und somit die Konsensussequenz der mRNA zur Initiation der Translation im Rahmen der Proteinbiosynthese negativ beeinflusst und nicht ausreichend erkannt wird. Die eigentliche Proteinprozessierung könnte daher erniedrigt sein. Da eine Detektion von extrazellulär vorliegenden, auf Var2CSA basierenden Antigenen nicht reproduzierbar

möglich war, ist davon auszugehen, dass die Antigene nicht sekretiert oder durch Proteasen abgebaut wurden. Eine eventuelle Degradation des angefügten V5-tags konnte hierbei ausgeschlossen werden, da zur Detektion der Proteine alternativ polyklonale Antikörper (AS-36 und AS-37, siehe 2.11) zum Einsatz kamen, deren Bindestellen sich auf der DBL2- bzw. DBL3-Domäne befanden (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Sekretion der rekombinanten Proteine in den extrazellulären Kulturüberstand bereitet auch in anderen Expressionssystemen, wie z. B. in Hefen, oftmals Schwierigkeiten. So wurden in Studien von Avril *et al.* nur 15 von 42 rekombinant hergestellten, auf Var2CSA basierenden Proteinen durch das Expressionssystem von *Pichia pastoris* in den Kulturüberstand sekretiert (Avril, M. *et al.*, 2009). Gegebenenfalls führt das MSP-1-Signalpeptid aus *P. falciparum* in Kombination mit anderen Genen nicht zwingend zur Sekretion durch *T. thermophila*. Möglicherweise würde hier die Verwendung eines *Tetrahymena* eigenen Signalpeptids zur gewünschten Sekretion führen. Bockau und Weide *et al.* konnten z. B. zeigen, dass das Signalpeptid der in *Tetrahymena* exprimierten und sekretierten Phospholipase A1 (spPLA₁) für eine erfolgreiche Sekretion der rekombinanten humanen DNase I eingesetzt werden konnte (Bockau, U. 2006; Weide, T. *et al.*, 2006). Unabhängig von der mangelnden Sekretion bezüglich der Produktion von auf Var2CSA basierenden in *T. thermophila* heterolog exprimierten *duffy binding like* Domänen (DBL2 und DBL3), können die gewünschten Malaria Antigene aus den Zellen isoliert und somit erfolgreich der weiterführenden Forschung zur Verfügung gestellt werden.

5.2.1 Konstruktion und Anwendung eines Protease-knock-out Vektors zur Verbesserung der Ausbeute an extrazellulären rekombinanten Malaria Antigenen

Die Sekretion rekombinanter Proteine in das extrazelluläre Medium ist in der Regel vorteilhaft gegenüber cytosolischen Systemen, da sie eine Produktaufreinigung ohne den Zellaufschluss ermöglicht. Dies wirkt sich nicht nur auf ökonomische Faktoren aus und erleichtert den Prozess der Aufreinigung durch weniger kontaminierende, wirtsspezifische Proteine, sondern hat auch sicherheitsrelevante Folgen (Dingermann, T. & Zündorf, I. 1999; Weidner, M. *et al.*, 2010; Cereghino, G.P. *et al.*, 2002). Ein Ziel dieser Arbeit war die Sekretion des auf MSP-1Block2 basierenden Proteins BBM. Ein Problem stellte hierbei der Abbau des sekretierten, rekombinanten Proteins durch extrazelluläre Proteasen dar. *T. thermophila* scheidet viele Proteasen

in das umliegende Kulturmedium aus (Straus, J.W. *et al.*, 1992; Banno, Y. *et al.*, 1982; Suzuki, K.M. *et al.*, 1998; Dickie, N. & Liener, I.E. 1962). Mindestens acht Proteine konnten im Zellextrakt des Ciliaten nachgewiesen werden, die eine proteolytische Aktivität gegenüber Gelatine aufwiesen (Straus, J.W. *et al.*, 1992). Die Charakteristika der Proteasen wirken sich bei der Nutzung von *T. thermophila* als heterologes Expressionssystem ungünstig aus, da sowohl der optimale Temperaturbereich als auch das pH-Optimum im selben Bereich liegen, der auch bei der Fermentation genutzt wird (Broermann, A. 2005; Erkelenz, M. 2005). Frühere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei dem Proteasebestand von *Tetrahymena* hauptsächlich um Cystein-Proteasen handelt (Herrmann, L. *et al.*, 2006 (b); Straus, J.W. *et al.*, 1992; Murrice, C. 1986; Suzuki, K.M. *et al.*, 1997; Suzuki, K.M. *et al.*, 1998). Auch durch Erkelenz, M. 2005 konnten aus *Tetrahymena* neun Proteine isoliert werden, von denen neben einer unbekannt, eine als Serin-Protease und eine als Palmitoyl-Protein-Thioesterase, sechs als Cystein-Proteasen identifiziert wurden. Für alle in dieser Studie detektierten Proteine konnten Signalpeptide berechnet werden, was die Wahrscheinlichkeit, dass sie dem sekretorischen Apparat von *T. thermophila* zur Verfügung stehen, erhöht (Erkelenz, M. 2005). Zusätzlich wurde mithilfe einer 1D-Gelelektrophorese eine von *Tetrahymena* stark sekretierte Cystein-Protease identifiziert, die ein Molekulargewicht von 22kD aufweist (Dr. Ingo Aldag, Cilian AG, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse dienen im Rahmen dieser Arbeit als Grundlage für spezifische *knock-out*-Experimente. Um die Ausbeute an heterolog exprimierten und in den Überstand sezernierten Proteinen, wie beispielsweise BBM, zu steigern, wurde ein Expressionsvektor (p22X) konstruiert, der mittels homologer Rekombination die Gensequenz der 22kD großen *Tetrahymena* Cystein-Protease disruptierte. Da der Vektor die zum Einbringen einer Zielgenkassette mittels Cre-Rekombination notwendige *loxP-site* zwischen den Integrationsflanken aufweist, kann über das Crelox-Verfahren im Vorfeld der Transformation eine beliebige Expressionskassette integriert werden, wodurch die Disruption der Protease mit der Integration verschiedener Transgene kombiniert werden kann. Da der Erfolg einer Integration in das Wirtsgenom und dadurch der Erfolg der spezifischen Deletion häufig durch die Größe der Integrationsflanken bestimmt wird, wurden für den Protease-*knock-out* Vektor p22X Flanken mit einem Umfang von 1462bp (5'-Flanke) sowie von 1473bp (3'-Flanke) ausgewählt. Mithilfe

der *biolistic transformation* war anschließend die Integration der BBM-spezifischen Expressionskassette in das Wirtsgenom möglich.

Aufgrund des Kerndimorphismus von *T. thermophila* können sowohl der Mikronukleus als auch der Makronukleus Ziel einer genetischen Manipulation sein. In Verbindung mit klassischen Kreuzungs- und Kultivierungsmethoden ist es hierbei möglich, stabile Transformanten zu generieren. Ein Vorteil der Mikronukleus-Transformation liegt in der Aufrechterhaltung der genetischen Information auch bei anschließenden, klassischen Kreuzungsmanövern. Eine Kombination der Eigenschaften verschiedener, genetisch manipulierter *Tetrahymena* Stämme ist auf diese Weise theoretisch möglich. Studien über die DNA-Neuordnung, bei der im Zuge der Konjugation aus dem Mikronukleus der Makronukleus neu entsteht, zeigten jedoch, dass es bei diesem Prozess zu der Eliminierung von bestimmten DNA-Abschnitten kommt (Yao, M.C. *et al.*, 2003; Mochizuki, K. & Gorovsky, M.A. 2004). Im Falle einer Geninsertion in den Mikronukleus müssten Transformanten eine Konjugation durchlaufen, um eine Ausprägung der Marker zu bewirken (Hai, B. & Gorovsky, M.A. 1997). Bei der hierbei stattfindenden Neuentwicklung des Makronukleus könnte der beschriebene, für die DNA-Eliminierungsschritte mitverantwortliche RNAi-ähnliche Mechanismus zu einer Deletion der partiellen oder gesamten Integrationskassette führen. In dieser Arbeit wurde daher die Methode der Makronukleus-Transformation mit anschließender phänotypischer Segregation zur Konstruktion stabiler Expressionsstämme gewählt. Diese ermöglichte aufgrund der Größe des Makronukleus eine wesentlich effizientere Generierung von Transformanten. Ein weiterer großer Vorteil ist die sofortige Ausprägung der Marker, da der somatische Makronukleus im Gegensatz zum Mikronukleus transkriptionsaktiv ist (Cassidy-Hanley, D. *et al.*, 1997). Die nach der Transformation des Expressionsvektors p22X-BBM durchgeführte phänotypische Segregation der *Tetrahymena*-Zellen bewirkte den vollständigen Austausch der nativen Allele (22kD-Proteasegen) gegen die genetisch manipulierten Kopien (BBM-Expressionskassette). Um anschließend die Disruption der Protease und das Vorliegen der Expressionskassette bei dem neu generierten Expressionsstamm Ttp22X-BBM5 zu verifizieren, wurden die Integration des BBM-spezifischen Zielgens auf genomischer DNA-Ebene und die Vollständigkeit des *knock-outs* auf mRNA-Ebene anhand von PCR-Analysen nachgewiesen. Auf diese Weise konnte das

allelic assortment als abgeschlossen und die Generierung der Cystein-Protease-spezifischen Deletion als erfolgreich bestätigt werden.

Die Auswirkung der Deletion der Cystein-Protease bei den generierten *Tetrahymena* Transformanten Ttp22X-BBM wurde anhand durchgeführter Protease-Assays zum Nachweis der *Tetrahymena* eigenen, extrazellulären Proteasen analysiert. In diesem Zusammenhang kamen ein spezifischer sowie ein unspezifischer Test zum Einsatz. Unspezifische Protease-Enzymtests werden verwendet, um praktisch alle vorliegenden Proteaseaktivitäten zu erfassen. Man bedient sich dabei zumeist natürlicher Proteine oder Peptide wie Hämoglobin oder Casein als Substrate, die zahlreiche zugängliche Peptidbindungen unterschiedlichster Art beinhalten (Brock, F.M. et al., 1982). Zur Charakterisierung spezifischer Proteaseaktivitäten werden Substrate mit klar definierten Peptidbindungen und Aminosäureresten verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit kam daher zum einen der unspezifische Azocasein-Test und zum anderen der BAPNA-Test zum Einsatz, dessen Substrat Benzoyl-Arginin-p-Nitro-Anilid (BAPNA, ein Peptid-Analogon) durch Cystein-Proteasen wie z. B. Papain sowie durch Proteasen mit trypsin-ähnlicher Spezifität gespalten wird. Es stellte sich heraus, dass der Protease-*knock-out* Stamm im Vergleich zu dem Referenzstamm eine stark verringerte, extrazelluläre Proteaseaktivität aufweist. Während der Referenzstamm TtpKOIX-BBM in einem BAPNA-Test nach raschem Anstieg eine Proteaseaktivität von bis zu 4401U/l erreichte, konnte bei dem Protease-*knock-out*-Stamm Ttp22X-BBM5 nach einem weniger schnellen Anstieg lediglich eine extrazelluläre Proteaseaktivität von 2271U/l gemessen werden (siehe Abb.23). Der Azocasein-Test bestätigte diese Ergebnisse, da dieser zeigte, dass der Protease-*knock-out* Stamm im Vergleich zu dem Referenzstamm mit einer Reduktion um 40% nur noch etwas mehr als die Hälfte der ursprünglichen extrazellulären Proteaseaktivität aufwies (siehe Abb.24). Die Disruption der 22kD-Cystein-Proteasesequenz führte demnach zu dem erwarteten Phänotyp. Die gemessenen Werte deuteten jedoch auch daraufhin, dass extrazellulär weiterhin eine Restproteaseaktivität vorlag. Dies war zu erwarten, da lediglich eine extrazellulär vorliegende Cystein-Protease deletiert wurde, bislang jedoch mindestens sechs weitere von *Tetrahymena* sekretierte Cystein-Proteasen (CysP1-6) identifiziert werden konnten (Herrmann, L. et al. 2006 (b); Erkelenz, M. 2005). Parallel durchgeführte Enzymtests, die unter Einsatz des Cystein-Proteaseinhibitors E-64

erfolgten, zeigten einen deutlichen Rückgang der Enzymaktivität bis zur Nachweisgrenze (z. B. durch einen BAPNA-Enzymtest ermittelte extrazelluläre Proteaseaktivitäten von 41,59 U/l für Ttp22X-BBM5 bzw. 19,78U/l für TtpKOIX-BBM) und bestätigten die Annahme, dass eine Großzahl der sekretierten Proteasen der Familie der Cystein-Proteasen angehört (Straus, J.W. *et al.*, 1992; Herrmann, L. *et al.*, 2006 (b)).

Bereits in früheren Studien konnte eine *Tetrahymena*-Mutante hergestellt und charakterisiert werden, die einen Defekt in ihrem Sekretionsmechanismus aufwies und somit nicht in der Lage war, Proteasen ins extrazelluläre Kulturmedium zu sezernieren (Hünseler, P. *et al.*, 1987; Hünseler, P. *et al.*, 1988). Diese Mutante (MS-1) zeigte zwar kein verschlechtertes Wachstum auf axenischem Medium, eignete sich aber aufgrund ihrer grundsätzlichen Unfähigkeit exprimierte Zielproteine zu sekretieren auch nicht als Expressionssystem. Aus diesem Grund ergab sich die Frage, ob die im Rahmen dieser Arbeit generierte *Tetrahymena*-Mutante, Ttp22X-BBM5, eventuell neben einer verringerten Proteaseaktivität auch Einschränkungen in ihrer generellen Sekretionsfähigkeit beinhaltet. Die Durchführung auf Para-Nitrophenol basierender Tests ergab jedoch, dass die signifikant reduzierte extrazelluläre Proteaseaktivität des Protease-*knock-out* Stammes nicht auf einem grundsätzlichen Verlust der Fähigkeit hydrolytische Enzyme zu sekretieren basierte. Hierzu wurde die Aktivität der zwei sekretorischen Hydrolasen Beta-Hexosaminidase und Saure Phosphatase, die bereits in früheren Studien als in *Tetrahymena* extrazellulär auftretende Enzyme beschrieben wurden, über die Umsetzung der zur Kultur gegebenen Para-Nitrophenyl-Substrate bestimmt (Kiy, T. *et al.*, 1993; Tiedtke, A.& Rasmussen, L., 1988). Untersuchungen des zellfreien Kulturüberstandes des Referenzstammes TtpKOIX-BBM und des proteaserestringierten Expressionsstammes Ttp22X-BBM5 zeigten hierbei vergleichbare enzymatische Aktivitäten der beiden extrazellulären Hydrolasen.

Expressionsanalytische Untersuchungen des hergestellten Expressionsstammes Ttp22X-BBM5 bestätigten die Produktion von intrazellulärem und das Vorliegen von extrazellulärem BBM. Ebenfalls wurden durch den Einsatz des p22X-Protease-*knock-out* Vektors Transformanten generiert, bei denen im extrazellulären Kulturmedium kein BBM detektierbar war. Dies ließ vermuten, dass bei den entsprechenden Transformanten die Proteaseaktivität nicht ausreichend eingeschränkt war. Diese Vermutung konnte auch anhand von Protease-Assays

bestätigt werden. Die betroffenen Transformanten wiesen eine mit dem Wildtyp vergleichbare, extrazelluläre Proteaseaktivität auf (Ergebnisse nicht aufgeführt). Das Phänomen unterschiedlicher Eigenschaften parallel generierter Klone liegt auch in anderen Expressionssystemen vor. Deshalb ist es wichtig, durch die Methode des *clone screenings* die geeigneten Klone für eine Produktion zu identifizieren (Lee, C.J. *et al.*, 2009; McGrew, J.T. *et al.*, 1997). Klone, bei denen kein extrazelluläres BBM detektiert werden konnte, wurden verworfen und nicht für weitere Studien eingesetzt. Der ausgewählte Expressionsstamm Ttp22X-BBM5 wies detektierbare Mengen an BBM im Überstand auf. Die zunächst entstandene Annahme, dass es sich bei dem extrazellulär vorliegenden Protein des Ttp22X-BBM5 um ein Produkt vorangegangener Zellyse handelte, konnte mithilfe eines ICDH-Tests entkräftet werden. Das in den Mitochondrien der Zellen vorkommende Enzym Isocitratdehydrogenase (ICDH) weist eine hohe cytosolische Aktivität und Stabilität auf. Da intrazelluläre Enzyme durch Zellschädigung oder Zellyse in das externe Medium gelangen können, stellt die ICDH ein Markerenzym dar, mit dem man eine eventuelle Zellschädigung der Kulturen nachweisen kann. Die über den ICDH-Enzymtest gemessenen Werte aller überprüften Stämme lagen hierbei in einem Rahmen von 10%, was in der Regel für eine schonend vollzogene Zellernte spricht.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei Einsatz eines Proteaseinhibitors (E-64) in das Kulturmedium des Ttp22X-BBM5 die Ausbeute an extrazellulärem BBM weiter erhöht wurde (von 0,01mg/l auf bis zu 0,26mg/l). Bei dem eingesetzten Referenzstamm TtpKOIX-BBM, wie auch bei anderen Protease-*knock-out* Transformanten, konnte jedoch auch durch die Zugabe des Cystein-Proteaseinhibitors E-64 kein extrazelluläres BBM nachgewiesen werden. Die ermittelten Ergebnisse weisen daher darauf hin, dass es sich bei dem hergestellten Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM5 nicht nur um einen Expressionsstamm mit verringerter Proteaseaktivität handelt, sondern bei diesem Stamm auch die verbesserte Fähigkeit vorliegt, das erwünschte Antigen zu sekretieren.

Da auch bei anderen Expressionssystemen die extrazelluläre Proteaseaktivität häufig ein Problem darstellt, wurden z. B. für Hefen wie *Pichia pastoris* ebenfalls proteasedefiziente Stämme generiert. Diese waren allerdings in ihrem Wachstum und in ihrer Fähigkeit zur Transformation eingeschränkt (Cereghino, J. & Cregg, J.

2000). Um auszuschließen, dass bei dem ausgewählten Protease-*knock-out* Stamm Ttp22X-BBM5 aufgrund der gentechnischen Veränderung eine Einschränkung im Wachstum vorliegt, wurde eine Wachstumskinetik für Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu dem Referenzstamm TtpKOIX-BBM aufgenommen. Die Wachstumskinetik bewies durch die für den Protease-*knock-out* Stamm erreichten Zellzahlen von 2,3 Mio Zellen/ml ohne E-64 und 1,8 Mio Zellen/ml mit E-64 sowie für den Referenzstamm 1,3 Mio Zellen/ml ohne E-64 und 1,5 Mio Zellen/ml mit E-64, dass weder die genetische Anpassung durch die Disruption der Proteasesequenz noch die Zugabe des Cystein-Proteaseinhibitors E-64 einen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten hatte. Beide untersuchten Stämme zeigten vergleichbare Wachstumseigenschaften. Aus den bisherigen Ergebnissen ließ sich schließen, dass es sich bei dem proteaserestringierten Expressionsstamm Ttp22X-BBM5 um einen geeigneten Klon für die BBM-Produktion handelt.

5.3 Optimale Paramerauswahl zur Kultivierung des Produktionsstammes Ttp22X-BBM5

Da auf die Expression und auf die extrazelluläre Ausbeute an rekombinantem Protein diverse Kultivierungsbedingungen Einfluss nehmen (Holmes, W.J. *et al.*, 2009), wurden bezüglich des Expressionsstammes Ttp22X-BBM5 verschiedene Parameter, wie die Auswahl des Kultivierungsmediums, die Kultivierungsdauer und die Regulation der Genexpression sowie die Effektivität und Konzentration diverser Proteaseinhibitoren, angepasst. Hierbei stellte sich heraus, dass die ideale Kultivierung des Protease-*knock-out* Stammes Ttp22X-BBM5 in supplementiertem Proteose Pepton Medium (SPP) erfolgte. Die Kultivierungsdauer und die Regulation der Genexpression waren optimal, wenn die Zellen als stationäre Kultur nach einer Vorlaufzeit von 72h zur Hauptkultur inokuliert wurden, und die Induktion der Proteinexpression anschließend bei einer Zellzahl von ~400.000 Zellen/ml, nach etwa 12h, mittels Cadmiumchlorid erfolgte. Zu dieser Zeit befanden sich die Kulturen noch in der logarithmischen Wachstumsphase. Induzierte man die Proteinexpression in der stationären Wachstumsphase, erniedrigte sich die Produktion an rekombinantem Protein.

Der Einsatz des Cystein-Proteaseinhibitors E-64 hatte schon gezeigt, dass die Inhibierung der *Tetrahymena* eigenen Cystein-Proteasen keine Auswirkung auf das

Zellwachstum hatte, aber von Vorteil für die extrazelluläre Proteinausbeute war. Da die Mehrheit der restlichen durch den Protease-*knock-out* Stamm sekretierten Proteasen durch E-64 nachweislich inhibiert wurde, ist als Grund für die detektierte Protein-Fragmentierung ein extrazellulärer proteolytischer Abbau des BBM durch Cystein-Proteasen relativ unwahrscheinlich. Eine andere Möglichkeit wäre z. B. die proteolytische Spaltung aufgrund der *T. thermophila* eigenen Serin-Proteasen, da das C-terminal addierte MSP-1₁₉ des BBM-Konstrukts noch einen Großteil der originären Schnittstelle zur Spaltung des MSP-1₄₂ zu den Fragmenten MSP-1₁₉ und MSP-1₃₃ durch eine Serin-Protease aufwies (Blackman, M.J. *et al.*, 1993). Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass die *Plasmodium*-spezifische Proteaseschnittstelle in *Tetrahymena* ebenfalls zur Fragmentierung des Proteins führte. Aus ökonomischen Gründen und bezüglich der extrazellulären Proteinausbeute des Produktionsstammes Ttp22X-BBM5 wurden daher die Auswirkungen weiterer Hemmstoffe auf die BBM-Produktion analysiert. Hierbei kamen die Inhibitoren Antipain, Leupeptin und Chymostatin zum Einsatz, die neben einer Inhibierung von Cystein-Proteasen auch Serin-Proteasen und Trypsin-ähnliche (Antipain, Leupeptin) bzw. Chymotrypsin-ähnliche (Chymostatin) Proteasen als Zielmoleküle erkennen. Im Gegensatz zu E-64 konnte jedoch kein verbesserter Effekt auf die tatsächliche oder fragmentierte Ausbeute an rekombinantem BBM im Zellkulturüberstand erzielt werden. Eine Beteiligung der extrazellulären Proteasen an der auftretenden Fragmentierung von BBM ist daher vermutlich nicht gegeben. Da der Cystein-Proteaseinhibitor E-64 auch in anderen Analysen und Expressionssystemen schon erfolgreich zur Inhibierung von Proteasen eingesetzt wurde (Johnson, G.D. & Jiang, W. 2005; Liggieri, C. *et al.*, 2009) und zusätzlich über eine geringe Toxizität sowie über eine hohe Zellpermeabilität verfügt, stellte er eine gute Alternative zu Antipain, Leupeptin und Chymostatin dar. Zusätzlich bietet E-64 den Vorteil in Lösung relativ stabil zu bleiben und als irreversibler, starker und hoch selektiver Inhibitor zu wirken, der keinen Effekt auf die Cysteinreste anderer Enzyme zeigt (Herstellerangaben, Carl Roth, GmbH & CO KG., Karlsruhe). Die Ermittlung der optimalen E-64-Konzentration ergab, dass eine Reduzierung der ursprünglich eingesetzten Menge von 30µg/ml auf 3-10µg/ml E-64 ohne signifikanten Proteinausbeuteverlust möglich war.

Die Zelldichte und Teilungsrate der Produktionsstämme spielen für eine hohe Raum-Zeit-Ausbeute in der biotechnologischen Produktion eine große Rolle. Um die

Produktausbeuten zu erhöhen und eine konstante Produktqualität garantieren zu können, bietet sich daher die Kultivierung durch Fermentation an. Nach Optimierung der Ttp22X-BBM5 spezifischen Zellanzucht wurden daher die zuvor definierten Parameter auf eine Kultivierung im Fermenter übertragen, um das gewünschte Antigenkonstrukt BBM im ausreichenden Maße zu produzieren. Auf diese Weise ist eine anschließende Aufreinigung des Antigens möglich, was für die weiterführenden Immunogenisierungsstudien zum Test auf Antigenität Voraussetzung ist. Die durch die Fermentation gewonnene, extrazelluläre Ausbeute an BBM konnte jedoch gegenüber den zuvor durchgeführten Kolbenkultivierungen wider Erwarten nicht gesteigert werden. Der extrazelluläre BBM-Ertrag lag sogar deutlich unter den Protein-Mengen, die durch eine Kultivierung im Kolben nachgewiesen wurden (Ergebnisse nicht aufgeführt). Im Rahmen der Fermentation mussten somit wesentliche Aspekte, die eine Prozessoptimierung betrafen, neu etabliert werden. Die Fermentationstechnologie ist für *T. thermophila* generell bereits gut etabliert, was weiterführende Optimierungen der Ciliaten-spezifischen Fermentationstechnik im Rahmen dieser Arbeit vereinfachte. Eine Anpassung der Fermentationsbedingungen ist in jedem Fall stamm- und produktspezifisch (Schmidt, F.R. 2005). Verschiedene Fermentationstechniken stehen hierbei der biotechnologischen Produktion mithilfe des *Tetrahymena* Expressionssystems zur Verfügung. Bei einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren wird regelmäßig frisches Medium zugeführt und verbrauchtes Medium aus dem Reaktor entnommen. Aus diesem Grund werden hohe Zelldichten erreicht, die über einen vergleichsweise langen Zeitraum aufrechterhalten werden können. Die Nachteile dieser Art von Prozessführung liegen in einem sehr hohen apparativen und zeitlichen Aufwand. Des Weiteren sind für ein solches Fermentationsverfahren induzierbare Promotoren, wie der MTT₁-Promotor, für die kontinuierliche Expression ungeeignet. Der Einsatz eines konstitutiven Promotors zur Produktion von Proteinen wäre für diese Prozesstechnik angemessen, derzeit sind jedoch die für *Tetrahymena* verfügbaren, konstitutiven Promotoren deutlich schwächer, als die induzierbaren Promotoren. Im Rahmen dieser Arbeit war ein solches Verfahren für den proteaserestringierten Stamm Ttp22X-BBM5 daher nicht möglich. Der größte Vorteil eines diskontinuierlichen *batch*-Prozesses ohne die Zuführung frischer Nährstoffe liegt in seiner einfachen Umsetzung und konnte daher für den in dieser Arbeit generierten Protease-*knock-out* Stamm mehrfach durchgeführt werden. Die Betriebsweise kennzeichnet sich dadurch aus, dass der

Bioreaktor mehr oder weniger sich selbst überlassen wird. Aufgrund dessen kommt es zu einer stetigen Änderung der Milieubedingungen, wie z. B. dem pH-Wert. Ein Nachteil der *batch*-Fermentation ist, dass die Kapazität der Zellen zur Herstellung rekombinanter Proteine in der Regel nicht vollständig ausgeschöpft wird. Hierbei bleibt die Produktkonzentration aufgrund der geringeren Zelldichten im Allgemeinen verhältnismäßig niedrig. Für biotechnologische Produktionsprozesse hat sich daher vor allem die Betriebsweise des *fed-batch*-Verfahrens bewährt, die mit einer technisch einfach durchzuführenden Zufütterung von Nährstoffen erfolgt und neben dem *batch*-Verfahren auch für den Expressionsstamm Ttp22X-BBM5 mehrfach zur Anwendung kam. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *fed-batch*- und *batch*-Fermentationen mittels eines 0,5l Sixfors[®]-Multi-Fermenters konnten durch die Anpassung der fermentationsspezifischen Prozessparameter optimale Wachstumsbedingungen für den Produktionsstamm Ttp22X-BBM5 festgelegt werden, es ergab sich jedoch, dass ein zusätzliches *feeding* kurz vor der Induktion, entsprechend dem *fed-batch*-Verfahren, keine signifikante Verbesserung der Proteinausbeute bewirkte. Da die Zellen während der beständigen Reaktionsbedingungen nur minimalem Stress ausgesetzt sein dürfen, wurde zur schonenden Rührung im Rahmen dieser Arbeit ein Marine Impeller (Schrägblatt-Rührer) benutzt, der sich mit einer für *Tetrahymena* geeigneten Anfangsgeschwindigkeit von 500rpm drehte, um die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein unregulierter pH-Wert im Vergleich zu einem kontrollierten pH-Wert (7,0) während der Zellkultivierung zu einer Erhöhung der extrazellulären BBM-Erträge führte (siehe Abb. 36). Weiterhin stellte sich heraus, dass die Cadmiumchloridkonzentration zur Induktion der Proteinexpression im *batch*-Verfahren von 5µg/ml auf 20µg/ml und im *fed-batch*-Verfahren von 5µg/ml auf 40µg/ml erhöht werden konnte, ohne das Zellwachstum zu beeinflussen. Die Toxizität von Schwermetallen auf Protozoen und andere Zellkulturen variiert in Abhängigkeit des Alters und somit des physiologischen Stadiums der Zellen (Larsen, J. 1989). Mit zunehmender Zelldichte und abnehmender Zellteilung sinkt die Sensitivität gegenüber Cadmiumchlorid, weshalb eine Erhöhung des Induktors im Fermentersystem möglich war. Hohe Zellzahlen im Bereich von durchschnittlich 3,5 Mio Zellen pro Milliliter konnten hierbei erreicht werden. Die Zugabe von 3-10µg/ml E-64 war optimal. Weiterhin wirkte sich die Anreicherung des zur Kultivierung verwendeten SPP-Mediums mit der 5fachen

Menge an Proteose Pepton positiv auf den extrazellulären BBM-Ertrag aus. Die gewonnene extrazelluläre Ausbeute an BBM konnte somit durch die angepasste Fermentation an die Erträge der zuvor durchgeführten Kolbenkultivierungen angeglichen werden (0,22mg/l; siehe Abb. 36). Wie bereits erwähnt, wurde in nahezu allen durchgeführten Western Blot Analysen und den entsprechenden Quantifizierungen eine starke Fragmentierung des rekombinanten Antigens BBM detektiert. Es bleibt damit zu erwähnen, dass die generelle BBM-Produktivität in den meisten Analysen eigentlich höher lag, als die tatsächlich gemessene Ausbeute an reifem BBM. Abschließend konnte die insgesamt produzierte BBM-Menge mithilfe der durchgeführten Optimierungen extrazellulär auf ~1,6mg/l erhöht werden (siehe Abb.36).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Tetrahymena thermophila* die Fähigkeit aufweist, *plasmodiale* Antigene des Blutphasenstadiums zu exprimieren und zu sekretieren. Die innovative Ciliaten-Expressionsplattform eignet sich daher auch zukünftig für die Produktion von Antigenen, die als potenzielle Malaria-Vakzine zum Einsatz kommen sollen.

6. Ausblick

Tetrahymena thermophila kann als innovative Expressionsplattform zur Produktion rekombinanter Proteine ein großes Potenzial zugeschrieben werden. Die Attraktivität des Ciliaten steigt aufgrund der bewiesenen Fähigkeit Antigene herzustellen, die auf dem Malaria induzierenden Parasiten *Plasmodium falciparum* basieren. Hieraus ergeben sich die Möglichkeiten, an der dringend notwendigen Entwicklung eines effektiven Malariainpfostoffs oder der Produktion wirksamer Therapeutika gegen Malaria mitzuwirken. Die in dieser Arbeit erzielten Protein-Erträge bezüglich des auf dem Merozoiten Oberflächenprotein 1 basierenden Antigens BBM und der auf Grundlage des Var2CSA generierten DBL-Domänen, ermöglichen eine Aufreinigung der Proteine und ihren darauf folgenden Einsatz in Immunisierungsstudien mithilfe von Tiermodellen. Für den Fall, dass die rekombinanten, neuartigen Malaria-Vakzinkandidaten Immunogenität aufweisen, wären folgende Schritte für eine verbesserte Herstellung der Vakzinkandidaten möglich:

- Ermöglichung einer vereinfachten Aufreinigung der intrazellulär lokalisierten Var2CSA-Domänen durch die Generierung mucozystendefizienter Stämme
- Generierung optimierter, modularer Expressionskassetten zur Sekretion der auf Var2CSA basierenden DBL-Domänen
- Verbesserung der Expressions- und Sekretionsrate des BBM Produktionsstammes Ttp22X-BBM5
- Anpassung und Optimierung des *scale-ups* für Ttp22X-BBM5
- Herstellung einer Antigen sekretierenden Doppelmutante zur Generierung verschiedener kombinatorischer Vakzinkandidaten

Die Aufreinigung der intrazellulär lokalisierten Var2CSA-Domänen rekombinant aus *T. thermophila* ist bislang ein komplexer Prozess, welcher im Vorfeld des Zellaufschlusses zusätzliche Waschschriffe bedingt. Grund für dieses aufwendige Verfahren sind die Ciliaten-spezifischen Mucozysten. Mucozysten sind elektronendichte Vesikel, die aufgrund extrazellulärer Stimulation über exozytotische Fusion mit der Plasmamembran ihre beinhaltenden Proteine sekretieren (Haddad, A. *et al.*, 2002; Cowan, A.T. *et al.*, 2005). Die Mucozystenformation in *Tetrahymena* umfasst die Organisation der Proteine in Form von großen Kristallen, welche sich bei Freisetzung sprunghaft ausdehnen und aufgrund ihrer zähflüssigen Struktur auch als

Mucus bezeichnet werden. Dieser Mucus erschwert die Zielprotein-Aufreinigung, sodass die Mucozystenproteine bei einem Einsatz von herrkömmlichen Expressionsstämmen vor der eigentlichen Aufreinigung der rekombinanten Proteine abgetrennt werden müssen. Die Herstellung mucozystendefizienter Stämme zur Produktion Var2CSA basierender Antigene erscheint daher sinnvoll, um die Aufreinigung der gewünschten, intrazellulär vorliegenden Proteine zu erleichtern. Durch die Cilian AG konnte bereits in spezifischen Produktionsstämmen das Gen eines mucozysten essentiellen Proteins, Grl3 (*granule lattice protein*), erfolgreich deletiert und somit eine mucozystendefiziente Mutante generiert werden. Eine die Aufreinigung negativ beeinflussende Ausschüttung des Mucus wurde somit unterbunden. (Bockau, U. & Sachse, C, persönliche Mitteilung).

Eine weitere Möglichkeit die Aufreinigung der Var2CSA basierenden DBL-Domänen zu vereinfachen sowie die Expression und die Analyse vieler, verschiedener Domänen, wie z. B. der ebenfalls vielversprechenden DBL4-Domäne zu ermöglichen, wäre die Optimierung der modularen DBL-spezifischen Expressionskassette (Salanti, A. *et al.*, 2010). Dies wäre z. B. durch den Einsatz *Tetrahymena* eigener Signalpeptide denkbar, da mithilfe des Phospholipase A1 Signalpeptids (spPLA₁) aus *T. thermophila* bereits eine erfolgreiche Sekretion der rekombinanten humanen DNase I möglich war (Bockau, U. 2006; Weide, T. *et al.*, 2006). Des Weiteren wäre bezüglich der Var2CSA-spezifischen Expressionskassette eine Änderung der nahe dem Start-ATG eingefügten Schnittstelle (*Agel*) zum Austausch verschiedener DBL-Domänen denkbar, um so eine verbesserte Transkription und Translation zu gewährleisten und dadurch eine Erhöhung der Proteinausbeute zu bewirken. Eine Verbesserung der Sekretion spezifischer Proteine kann auch, wie in früheren Studien durch die Entwicklung hypersekretorischer *Tetrahymena*-Mutanten gezeigt, mittels Zufallsmutagenese erreicht werden (Hartmann, M. *et al.*, 2000). Die Methode der Zufallsmutagenese, mit einem sich anschließenden *clone screening*, könnte auch zur Verbesserung der BBM-Produktionskapazität des Stammes Ttp22X-BBM5 eingesetzt werden. Zusätzlich kann das *scale-up* bezüglich Ttp22X-BBM5 optimiert und angepasst werden, um den Ertrag des Proteins weiter zu erhöhen.

Da ein umfassender Schutz vor der parasitären Infektionskrankheit Malaria vermutlich nur durch die Immunantwort gegen eine Vielzahl von *plasmodialen* Antigenen induziert werden kann, hat sich als eine vielversprechende

Impfstoffstrategie die kombinatorische Prävention entwickelt (Osier, F.H. *et al.*, 2008). Die Generierung einer Doppelmutante, hervorgehend aus Ttp22X-BBM5 und z. B. einer Var2CSA basierenden DBL-Domäne, könnte auf diese Weise zur Expression von verschiedenen *plasmodialen* Antigenen führen und somit die Effektivität der Immunisierung erhöhen.

Mittels der hier erwähnten Optimierungen des Malaria-Antigen produzierenden *Tetrahymena*-Expressionssystems wäre eine effizientere Produktion rekombinanter Proteine basierend auf dem Blutstadium von *Plasmodium falciparum* möglich. Auf diese Weise könnten die heterolog exprimierte Malaria-Proteine weiteren Immunogenisierungs- und ggf. klinischen Studien zugänglich gemacht werden, durch die ihr Antigenitätspotenzial bestimmt werden kann.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich die innovative *Tetrahymena thermophila* Produktionstechnologie zur Expression und Sekretion *plasmodialer* Oberflächen-Antigene eingesetzt werden. Hierzu wurden Vakzinkandidaten aus dem parasitären Blutstadium von *P. falciparum* gewählt. Bei den Malaria-Antigenen handelte es sich zum einen um neuartige, multiallelische Hybridkonstrukte auf der Grundlage des Hauptoberflächenantigens des Merozoiten MSP-1 und zum anderen um Domänen, die auf dem gut charakterisierten Zytoadhärenzprotein der Trophozoiten und Gametozyten der maternalen Malaria PfEMP1/Var2CSA (DBL2 und DBL3) basieren.

Alle Malaria-Vakzinkandidaten konnten durch den Einsatz etablierter Vektorsysteme erfolgreich exprimiert werden. In einem weiteren Ansatz wurde ein neues Vektorsystem entwickelt, welches die Integration eines Transgens und eines Selektionsmarkers in die genomische DNA von *T. thermophila* mit der Disruption einer extrazellulären Protease kombinierte. Auf diese Weise konnte ein BBM-Expressionsstamm generiert werden, der quantifizierbare Mengen des gewünschten Antigens BBM in das extrazelluläre Medium sekretierte und sich durch eine deutlich eingeschränkte Proteaseaktivität sowie durch hohe Zelldichten bei einer kurzen Generationszeit auszeichnete.

Durch weiterführende Versuche konnte der Kultivierungsprozess bezüglich des Nährmediums, der Kultivierungsdauer, der Regulation der Genexpression sowie der Proteaseinhibierung für den Protease-*knock-out* Stamm in der Kolbenanzucht sowie in der 0,5l Fermentation angepasst werden. Die erzielte Konzentration an reifem BBM betrug 0,22mg/l im Kulturmedium.

8. Literaturverzeichnis

Alonso PL, Smith T, Schellenberg JR et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994;344:1175-81.

Alonso PL, Smith TA, Armstrong-Schellenberg JR et al. Duration of protection and age-dependence of the effects of the SPf66 malaria vaccine in African children exposed to intense transmission of *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis* 1996;174:367-72.

Andersen P, Nielsen MA, Resende M et al. Structural insight into epitopes in the pregnancy-associated malaria protein VAR2CSA. *PLoS Pathog* 2008;4:e42.

Annot DE, Cavanagh DR, Remarque EJ et al. Comparative testing of six antigen-based malaria vaccine candidates directed toward merozoite-stage *Plasmodium falciparum*. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1345-55.

Avril M, Hathaway MJ, Cartwright MM, Gose SO, Narum DL, Smith JD. Optimizing expression of the pregnancy malaria vaccine candidate, VAR2CSA in *Pichia pastoris*. *Malar J* 2009;8:143.

Balbas P. Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol* 2001;19:251-67.

Banno Y, Yano K, Nozawa Y. Biochemical characterization of secreted proteases during growth in *Tetrahymena pyriformis* WH-14: comparison of extracellular with intracellular proteases. *J Protozool* 1982;29:91-98.

Bannon GA, Bowen JK, Yao MC, Gorovsky MA. *Tetrahymena* H4 genes: structure, evolution and organization in macro- and micronuclei. *Nucleic Acids Res* 1984;12:1961-75.

Beeson JG, Reeder JC, Rogerson SJ, Brown GV. Parasite adhesion and immune evasion in placental malaria. *Trends Parasitol* 2001;17:331-37.

Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nat Biotechnol* 2004;22:1583-87.

Blackman MJ, Chappel JA, Shai S, Holder AA. A conserved parasite serine protease processes the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol* 1993;62:103-14.

Bockau U. *Tetrahymena thermophila*: Ein neues Expressionssystem zur Produktion humaner Proteine. Inaugural Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2006.

Bojang KA, Obaro SK, D'Alessandro U et al. An efficacy trial of the malaria vaccine SPf66 in Gambian infants--second year of follow-up. *Vaccine* 1998;16:62-67.

Bojang KA, Milligan PJ, Pinder M et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:1927-34.

Bojang KA. RTS,S/AS02A for malaria. *Expert Rev Vaccines* 2006;5:611-15.

Boldrin F, Santovito G, Formigari A et al. MTT2, a copper-inducible metallothionein gene from *Tetrahymena thermophila*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008;147:232-40.

Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ* 1983;61:1005-16.

Brock FM, Forsberg CW, Buchanan-Smith JG. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:561-69.

Broermann, A. Entwicklung eines Testsystems zur Auffindung sekretionsdefizienter Mutanten bei *Tetrahymena thermophila*. Diplomarbeit im Studiengang Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, 2005.

Brown AE, Singharaj P, Webster HK et al. Safety, immunogenicity and limited efficacy study of a recombinant Plasmodium falciparum circumsporozoite vaccine in Thai soldiers. *Vaccine* 1994;12:102-8.

Brownell JE, Zhou J, Ranalli T et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 1996;84:843-51.

Brunk CF, Lee LC, Tran AB, Li J. Complete sequence of the mitochondrial genome of Tetrahymena thermophila and comparative methods for identifying highly divergent genes. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1673-82.

Cassidy-Hanley D, Bowen J, Lee JH et al. Germline and somatic transformation of mating Tetrahymena thermophila by particle bombardment. *Genetics* 1997;146:135-47.

Cavanagh DR, McBride JS. Antigenicity of recombinant proteins derived from Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1. *Mol Biochem Parasitol* 1997;85:197-211.

Cavanagh DR, Elhassan IM, Roper C et al. A longitudinal study of type-specific antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J Immunol* 1998;161:347-59.

Cavanagh DR, Doodoo D, Hviid L et al. Antibodies to the N-terminal block 2 of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect Immun* 2004;72:6492-502.

Cech TR. RNA as an enzyme. *Biochem Int* 1989;18:7-14.

Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:329-32.

Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *FEMS Microbiol Rev* 2000;24:45-66.

Chalker DL. Dynamic nuclear reorganization during genome remodeling of Tetrahymena. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:2130-2136.

Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:303-11.

Clare J, Sreekrishna K, Romanos M. Expression of tetanus toxin fragment C. *Methods Mol Biol* 1998;103:193-208.

- Clyde DF, Most H, McCarthy VC, Vanderberg JP. Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci* 1973;266:169-77.
- Cole ES, Bruns PJ. Uniparental cytogamy: a novel method for bringing micronuclear mutations of Tetrahymena into homozygous macronuclear expression with precocious sexual maturity. *Genetics* 1992;132:1017-31.
- Collins K, Gorovsky MA. Tetrahymena thermophila. *Curr Biol* 2005;15:R317-R318.
- Conway DJ, Cavanagh DR, Tanabe K et al. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. *Nat Med* 2000;6:689-92.
- Costa FT, Fusai T, Parzy D et al. Immunization with recombinant duffy binding-like-gamma3 induces pan-reactive and adhesion-blocking antibodies against placental chondroitin sulfate A-binding Plasmodium falciparum parasites. *J Infect Dis* 2003;188:153-64.
- Cowan AT, Bowman GR, Edwards KF, Emerson JJ, Turkewitz AP. Genetic, genomic, and functional analysis of the granule lattice proteins in Tetrahymena secretory granules. *Mol Biol Cell* 2005;16:4046-60.
- Cregg, J. M. & Higgins, D. R. Production of foreign proteins in the yeast Pichia pastoris. *Can. J. Bot.* 73 (suppl1), 1995; 891-897.
- Csank C, Taylor FM, Martindale DW. Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from Tetrahymena thermophila and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1990;18:5133-41.
- Dahlback M, Rask TS, Andersen PH et al. Epitope mapping and topographic analysis of VAR2CSA DBL3X involved in P. falciparum placental sequestration. *PLoS Pathog* 2006;2:e124.
- Daily JP, Scafield D, Pochet N et al. Distinct physiological states of Plasmodium falciparum in malaria-infected patients. *Nature* 2007;450:1091-95.
- de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. *Microb Cell Fact* 2009;8:26.
- Desai M, ter Kuile FO, Nosten F et al. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* 2007;7:93-104.
- Dickie N, Liener IE. A study of the proteolytic system of Tetrahymena pyriformis W. I. Purification and partial characterization of the constituent proteinases. *Biochim Biophys Acta* 1962a;64:41-51.
- Dickie N, Liener IE. A study of the proteolytic system of tetrahymena pyriformis W. II. Substrate specificity of constituent proteinases. *Biochim Biophys Acta* 1962b;64:52-59.
- Dingle, J. T. & Dean, R. T.
Lysosomes in Biology and Pathology. 1984; Elsevier, North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Dingermann T. & Zündorf I.
Gentechnik, Biotechnik. 1999; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Dondero F, Cavaletto M, Ghezzi AR, La TA, Banni M, Viarengo A. Biochemical characterization and quantitative gene expression analysis of the multi-stress inducible metallothionein from Tetrahymena thermophila. *Protist* 2004;155:157-68.

- Duffy PE, Kaslow DC. A novel malaria protein, Pfs28, and Pfs25 are genetically linked and synergistic as falciparum malaria transmission-blocking vaccines. *Infect Immun* 1997;65:1109-13.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M et al. Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol* 2006;4:e286.
- Erkelenz M. Molekulare Charakterisierung der extrazellulären Proteasen von *Tetrahymena thermophila*. Diplomarbeit im Studiengang Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, 2005..
- Etlinger HM, Caspers P, Matile H, Schoenfeld HJ, Stueber D, Takacs B. Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 1991;59:3498-503.
- Florens L, Washburn MP, Raine JD et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002;419:520-526.
- Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Tiedtke A, Rasmussen L. New aspects of extracellular hydrolytic enzymes in lower eukaryotes. *Eur J Cell Biol* 1989;48:1-4.
- Gaertig J, Gu L, Hai B, Gorovsky MA. High frequency vector-mediated transformation and gene replacement in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res* 1994;22:5391-98.
- Gaertig J, Gao Y, Tishgarten T, Clark TG, Dickerson HW. Surface display of a parasite antigen in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Nat Biotechnol* 1999;17:462-65.
- Gall JG. Free ribosomal RNA genes in the macronucleus of *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:3078-81.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002;419:498-511.
- Gentili HG, Nosedá DG, Nani ML et al. The use of *Tetrahymena thermophila* mutant cell line for removal of cholesterol from milk. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:776-82.
- Genton B, Al-Yaman F, Betuela I et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. *Vaccine* 2003;22:30-41.
- George HJ, Marchand P, Murphy K et al. Recombinant human 92-kDa type IV collagenase/gelatinase from baculovirus-infected insect cells: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif* 1997;10:154-61.
- Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* 2005;16:538-45.
- Gerber CA, Lopez AB, Shook SJ, Doerder FP. Polymorphism and selection at the SerH immobilization antigen locus in natural populations of *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 2002;160:1469-79.
- Gerngross TU. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol* 2004;22:1409-14.

- Gilson PR, Nebl T, Vukcevic D et al. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1286-99.
- Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F et al. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:106-10.
- Greenwood B. The molecular epidemiology of malaria. *Trop Med Int Health* 2002;7:1012-21.
- Haddad A, Bowman GR, Turkewitz AP. New class of cargo protein in *Tetrahymena thermophila* dense core secretory granules. *Eukaryot Cell* 2002;1:583-93.
- Hägg P, de Pohl JW, Abdulkarim F, Isaksson LA. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2004;111:17-30.
- Hai B, Gorovsky MA. Germ-line knockout heterokaryons of an essential alpha-tubulin gene enable high-frequency gene replacement and a test of gene transfer from somatic to germ-line nuclei in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:1310-1315.
- Hartmann M, Guberman A, Florin-Christensen M, Tiedtke A. Screening for and characterization of phospholipase A1 hypersecretory mutants of *Tetrahymena thermophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;54:390-396.
- Hellenbroich D, Valley U, Ryll T et al. Cultivation of *Tetrahymena thermophila* in a 1.5-m³ airlift bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 1999;51:447-55.
- Heppner DG, Jr., Kester KE, Ockenhouse CF et al. Towards an RTS,S-based, multi-stage, multi-antigen vaccine against falciparum malaria: progress at the Walter Reed Army Institute of Research. *Vaccine* 2005;23:2243-50.
- Herrmann L, Bockau U, Tiedtke A, Hartmann MW, Weide T. The bifunctional dihydrofolate reductase thymidylate synthase of *Tetrahymena thermophila* provides a tool for molecular and biotechnology applications. *BMC Biotechnol* 2006 (a);6:21.
- Herrmann L, Erkelenz M, Aldag I, Tiedtke A, Hartmann MW. Biochemical and molecular characterisation of *Tetrahymena thermophila* extracellular cysteine proteases. *BMC Microbiol* 2006 (b);6:19.
- Higgins MK. The structure of a chondroitin sulfate-binding domain important in placental malaria. *J Biol Chem* 2008;283:21842-46.
- Hoessli DC, Poincelet M, Gupta R, Ilangumaran S, Nasir uD. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *Eur J Biochem* 2003;270:366-75.
- Holmes WJ, Darby RA, Wilks MD, Smith R, Bill RM. Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. *Microb Cell Fact* 2009;8:35.
- Hünseler P, Scheidgen-Kleyboldt G, Tiedtke A. Isolation and characterization of a mutant of *Tetrahymena thermophila* blocked in secretion of lysosomal enzymes. *J Cell Sci* 1987;88 (Pt 1):47-55.

Hünseler P, Tiedtke A, von FK. Biosynthesis of secreted beta-hexosaminidase in *Tetrahymena thermophila*. A comparison of the wild type with a secretory mutant. *Biochem J* 1988;252:837-42.

Ibelgaufts, H.

Gentechnologie von A bis Z. 1993; VCH, Weinheim, New York Basel, Cambridge.

Idiris A, Bi K, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y. Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast* 2006;23:83-99.

Idiris A, Tohda H, Sasaki M et al. Enhanced protein secretion from multiprotease-deficient fission yeast by modification of its vacuolar protein sorting pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;85:667-77.

Jarvis DL. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* 2003;310:1-7.

Jenkins N, Curling EM. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* 1994;16:354-64.

John CC, O'Donnell RA, Sumba PO et al. Evidence that invasion-inhibitory antibodies specific for the 19-kDa fragment of merozoite surface protein-1 (MSP-1 19) can play a protective role against blood-stage *Plasmodium falciparum* infection in individuals in a malaria endemic area of Africa. *J Immunol* 2004;173:666-72.

Johnson GD, Jiang W. Characterization of cathepsin L secreted by Sf21 insect cells. *Arch Biochem Biophys* 2005;444:7-14.

Jones D, Kroos N, Anema R et al. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line per.c6. *Biotechnol Prog* 2003;19:163-68.

Jordan E, Al-Halabi L, Schirrmann T, Hust M. Antibody production by the gram-positive bacterium *Bacillus megaterium*. *Methods Mol Biol* 2009;525:509-16, xiv.

Kapler GM, Blackburn EH. A weak germ-line excision mutation blocks developmentally controlled amplification of the rDNA minichromosome of *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev* 1994;8:84-95.

Kiy T, Tiedtke A. Lysosomal enzymes produced by immobilized *Tetrahymena thermophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991;35:14-18.

Kiy T, Tiedtke A. Continuous high-cell-density fermentation of the ciliated protozoon *Tetrahymena* in a perfused bioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;38:141-46.

Kiy T, Vosskuhler C, Rasmussen L, Tiedtke A. Three pools of lysosomal enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *Exp Cell Res* 1993;205:286-92.

Kost TA, Condreay JP. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol* 2002;20:173-80.

Kovach MJ, Carlson JO, Beaty BJ. A *Drosophila* metallothionein promoter is inducible in mosquito cells. *Insect Mol Biol* 1992;1:37-43.

- Kozak M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 1978;15:1109-23.
- Kriek N, Tilley L, Horrocks P et al. Characterization of the pathway for transport of the cytoadherence-mediating protein, PfEMP1, to the host cell surface in malaria parasite-infected erythrocytes. *Mol Microbiol* 2003;50:1215-27.
- Kuroda K, Kitagawa Y, Kobayashi K et al. Antibody expression in protease-deficient strains of the methylophilic yeast *Ogataea minuta*. *FEMS Yeast Res* 2007;7:1307-16.
- Kyshe L, Anderson J. Electrophoretic transfer of multiple gels. A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1984; 10, 203-209.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Larsen J. The influence of growth phase and culture conditions of *Tetrahymena* on effects of cadmium. *Toxicology* 1989;58:211-23.
- Lee CJ, Seth G, Tsukuda J, Hamilton RW. A clone screening method using mRNA levels to determine specific productivity and product quality for monoclonal antibodies. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:1107-18.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980;27:37-58.
- Liggieri C, Obregon W, Trejo S, Priolo N. Biochemical analysis of a papain-like protease isolated from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009;41:154-62.
- Luse SA, Miller LH. Plasmodium falciparum malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am J Trop Med Hyg* 1971;20:655-60.
- MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 1985;119:385-401.
- Mahanty S, Saul A, Miller LH. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. *J Exp Biol* 2003;206:3781-88.
- Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 1996;60:512-38.
- Martindale DW, Allis CD, Bruns PJ. Conjugation in *Tetrahymena thermophila*. A temporal analysis of cytological stages. *Exp Cell Res* 1982;140:227-36.
- Mazumdar S, Mukherjee P, Yazdani SS, Jain SK, Mohammed A, Chauhan VS. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP-1)-MSP-3 chimeric protein: immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. *Infect Immun* 2010;78:872-83.
- McGrew JT, Leiske D, Dell B et al. Expression of trimeric CD40 ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene* 1997;187:193-200.
- Mehlhorn H. & Ruthmann A. *Allgemeine Protozoologie*. 1992; Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

- Mochizuki K, Gorovsky MA. Small RNAs in genome rearrangement in Tetrahymena. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:181-87.
- Moorthy VS, Ballou WR. Immunological mechanisms underlying protection mediated by RTS,S: a review of the available data. *Malar J* 2009;8:312.
- Moorthy VS, Good MF, Hill AV. Malaria vaccine developments. *Lancet* 2004;363:150-156.
- Mpoke S, Wolfe J. DNA digestion and chromatin condensation during nuclear death in Tetrahymena. *Exp Cell Res* 1996;225:357-65.
- Murricane, C. Purification of a proteinase and a proteinase inhibitor from Tetrahymena pyriformis. *Int. J. Biochem* 1986; 18: 403-406
- Nettleship JE, Assenberg R, Diprose JM, Rahman-Huq N, Owens RJ. Recent advances in the production of proteins in insect and mammalian cells for structural biology. *J Struct Biol* 2010.
- Noya O, Gabaldon BY, arcon de NB et al. A population-based clinical trial with the SPf66 synthetic Plasmodium falciparum malaria vaccine in Venezuela. *J Infect Dis* 1994;170:396-402.
- O'Donnell RA, Saul A, Cowman AF, Crabb BS. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related Plasmodium species. *Nat Med* 2000;6:91-95.
- O'Donnell RA, de Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, Crabb BS. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*. 2001 Jun 18;193(12):1403-12.
- Orias E. Probable somatic DNA rearrangements in mating type determination in Tetrahymena thermophila: A review and a model. *Dev. Genet.* 2, 185-202
- Orias E, Hamilton EP, Orias JD. Tetrahymena as a laboratory organism: useful strains, cell culture, and cell line maintenance. *Methods Cell Biol* 2000;62:189-211.
- Osier FH, Fegan G, Polley SD et al. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun* 2008;76:2240-2248.
- Paciello L, de AE, Mazzoni C, Palermo V, Zueco J, Parascandola P. Performance of the auxotrophic Saccharomyces cerevisiae BY4741 as host for the production of IL-1beta in aerated fed-batch reactor: role of ACA supplementation, strain viability, and maintenance energy. *Microb Cell Fact* 2009;8:70.
- Pan W, Huang D, Zhang Q et al. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *J Immunol* 2004;172:6167-74.
- Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1463-66.
- Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 1988;332:158-61.

- Pennock DG, Thatcher T, Bowen J, Bruns PJ, Gorovsky MA. A conditional mutant having paralyzed cilia and a block in cytokinesis is rescued by cytoplasmic exchange in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 1988;120:697-705.
- Perlmann P., Troye-Blomberg M. *Malaria Immunology*. 2.Auflage 2002, Karger Verlag, Basel
- Peterson DS, Gao Y, Asokan K, Gaertig J. The circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* is expressed and localized to the cell surface in the free-living ciliate *Tetrahymena thermophila*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;122:119-26.
- Prescott DM. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol Rev* 1994;58:233-67.
- Reeder JC, Cowman AF, Davern KM et al. The adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A is mediated by *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5198-202.
- Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature* 2002;415:694-701.
- Roberts DJ, Craig AG, Berendt AR et al. Rapid switching to multiple antigenic and adhesive phenotypes in malaria. *Nature* 1992;357:689-92.
- Salanti A, Staalsoe T, Lavstsen T et al. Selective upregulation of a single distinctly structured var gene in chondroitin sulphate A-adhering *Plasmodium falciparum* involved in pregnancy-associated malaria. *Mol Microbiol* 2003;49:179-91.
- Salanti A, Dahlback M, Turner L et al. Evidence for the involvement of VAR2CSA in pregnancy-associated malaria. *J Exp Med* 2004;200:1197-203.
- Salanti A, Resende M, Ditlev SB et al. Several domains from VAR2CSA can induce *Plasmodium falciparum* adhesion-blocking antibodies. *Malar J* 2010;9:11.
- Santos MG, Jorge SA, Brillet K, Pereira CA. Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. *Cytotechnology* 2007;54:15-24.
- Scherf A, Pouvelle B, Buffet PA, Gysin J. Molecular mechanisms of *Plasmodium falciparum* placental adhesion. *Cell Microbiol* 2001;3:125-31.
- Schmidt FR. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;68:425-35.
- Shang Y, Song X, Bowen J et al. A robust inducible-repressible promoter greatly facilitates gene knockouts, conditional expression, and overexpression of homologous and heterologous genes in *Tetrahymena thermophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3734-39.
- Sharma S, Pathak S. Malaria vaccine: a current perspective. *J Vector Borne Dis* 2008;45:1-20.
- Shi Q, Lynch MM, Romero M, Burns JM, Jr. Enhanced protection against malaria by a chimeric merozoite surface protein vaccine. *Infect Immun* 2007;75:1349-58.
- Siddiqui WA, Tam LQ, Kramer KJ et al. Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:3014-18.

- Simon MC, Schmidt HJ. Antigenic variation in ciliates: antigen structure, function, expression. *J Eukaryot Microbiol* 2007;54:1-7.
- Smith DL, Berkowitz MS, Potoczak D et al. Characterization of the T, L, I, S, M and P cell surface (immobilization) antigens of *Tetrahymena thermophila*: molecular weights, isoforms, and cross-reactivity of antisera. *J Protozool* 1992;39:420-428.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG et al. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:101-10.
- Smith T, Beck HP, Kitua A et al. Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93 Suppl 1:15-20.
- Snounou G, Zhu X, Siripoon N et al. Biased distribution of *m*sp1 and *m*sp2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999;93:369-74.
- Sonneborn T.M. Handbook of Genetics: Plants, Plant viruses and Protists. King R.C. (ed.), 1974; pp. 433-467 Plenum, New York.
- Srivastava A, Gangnard S, Round A et al. Full-length extracellular region of the var2CSA variant of PfEMP1 is required for specific, high-affinity binding to CSA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4884-89.
- Stevens JM, Rao SN, Jaouen M et al. Chaperone-assisted expression, purification, and characterization of recombinant nitrile hydratase NI1 from *Comamonas testosteroni*. *Protein Expr Purif* 2003;29:70-76.
- Stoute JA, Slaoui M, Heppner DG et al. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med* 1997;336:86-91.
- Stover NA, Krieger CJ, Binkley G et al. *Tetrahymena* Genome Database (TGD): a new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D500-D503.
- Straus JW, Migaki G, Finch MT. An assessment of proteolytic enzymes in *Tetrahymena thermophila*. *J Protozool* 1992;39:655-62.
- Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 1995;82:89-100.
- Suzuki KM, Hayashi N, Hosoya N, Takahashi T, Kosaka T, Hosoya H. Secretion of tetrairin, a *Tetrahymena* cysteine protease, as a mature enzyme and its identification as a member of the cathepsin L subfamily. *Eur J Biochem* 1998;254:6-13.
- Suzuki KM, Hosoya N, Takahashi T, Kosaka T, Hosoya H. Release of a newly-identified cysteine protease, tetrairin, from *Tetrahymena* into culture medium during the cell growth. *J Biochem* 1997;121:642-47.
- Takala SL, Escalante AA, Branch OH et al. Genetic diversity in the Block 2 region of the merozoite surface protein 1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*: additional complexity and selection and convergence in fragment size polymorphism. *Infect Genet Evol* 2006;6:417-24.

- Takimura Y, Kato M, Ohta T, Yamagata H, Uda S. Secretion of human interleukin-2 in biologically active form by *Bacillus brevis* directly into culture medium. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997;61:1858-61.
- Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 1987;195:273-87.
- Taraschi TF, O'Donnell M, Martinez S et al. Generation of an erythrocyte vesicle transport system by *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Blood* 2003;102:3420-3426.
- Tetteh KK, Cavanagh DR, Corran P, Musonda R, McBride JS, Conway DJ. Extensive antigenic polymorphism within the repeat sequence of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 block 2 is incorporated in a minimal polyvalent immunogen. *Infect Immun* 2005;73:5928-35.
- Tiedtke A, Rasmussen L. Lysosomal enzymes in extracellular digestion in the unicellular eukaryote *Tetrahymena*. *J Cell Physiol* 1988;136:554-56.
- Tomiya N, Narang S, Lee YC, Betenbaugh MJ. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *Glycoconj J* 2004;21:343-60.
- Tompa P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci* 2002;27:527-33.
- Trelka DP, Schneider TG, Reeder JC, Taraschi TF. Evidence for vesicle-mediated trafficking of parasite proteins to the host cell cytosol and erythrocyte surface membrane in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol* 2000;106:131-45.
- Turkewitz AP, Orias E, Kapler G. Functional genomics: the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends Genet* 2002;18:35-40.
- Uversky VN. Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci* 2002;11:739-56.
- Valcarce G, Munoz L, Nusblat A, Nudel C, Florin-Christensen J. The improvement of milk by cultivation with ciliates. *J Dairy Sci* 2001;84:2136-43.
- Vekemans J, Leach A, Cohen J. Development of the RTS,S/AS malaria candidate vaccine. *Vaccine* 2009;27 Suppl 6:G67-G71.
- Vincentelli R, Canaan S, Campanacci V et al. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci* 2004;13:2782-92.
- Voigt S, Hanspal M, LeRoy PJ et al. The cytoadherence ligand *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) binds to the *P. falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) by electrostatic interactions. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:423-28.
- Waitumbi JN, Anyona SB, Hunja CW et al. Impact of RTS,S/AS02(A) and RTS,S/AS01(B) on genotypes of *P. falciparum* in adults participating in a malaria vaccine clinical trial. *PLoS One* 2009;4:e7849.
- Waller KL, Cooke BM, Nunomura W, Mohandas N, Coppel RL. Mapping the binding domains involved in the interaction between the *Plasmodium falciparum* knob-associated histidine-rich protein (KAHRP) and the cytoadherence ligand *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1). *J Biol Chem* 1999;274:23808-13.

- Weide T, Herrmann L, Bockau U et al. Secretion of functional human enzymes by *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnol* 2006;6:19.
- Weide T, Bockau U, Rave A, Herrmann L, Hartmann MW. A recombinase system facilitates cloning of expression cassettes in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. *BMC Microbiol* 2007;7:12.
- Weidner M, Taupp M, Hallam SJ. Expression of recombinant proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Vis Exp* 2010.
- Westheide W. und Rieger R. *Spezielle Zoologie, Teil1: Einzeller und Wirbellose Tiere*; 2. Auflage, 2007, Elsevier GmbH, München,
- Wheatley DN, Rasmussen L, Tiedtke A. *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential. *Bioessays* 1994;16:367-72.
- Wong L, Klionsky L, Wickert S, Merriam V, Orias E, Hamilton EP. Autonomously replicating macronuclear DNA pieces are the physical basis of genetic coassortment groups in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 2000;155:1119-25.
- Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* 1999;293:321-31.
- Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J Bacteriol* 1991;173:4952-58.
- Wuitschick JD, Karrer KM. Codon usage in *Tetrahymena thermophila*. *Methods Cell Biol* 2000;62:565-68.
- Wuitschick JD, Karrer KM. Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46:239-47.
- Wulfing C, Rappuoli R. Efficient production of heat-labile enterotoxin mutant proteins by overexpression of *dsbA* in a *degP*-deficient *Escherichia coli* strain. *Arch Microbiol* 1997;167:280-283.
- Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:1393-98.
- Yao MC, Fuller P, Xi X. Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense. *Science* 2003;300:1581-84.
- Yao MC, Yao CH, Monks B. The controlling sequence for site-specific chromosome breakage in *Tetrahymena*. *Cell* 1990;63:763-72.
- Yokoyama RW, Yao MC. Elimination of DNA sequences during macronuclear differentiation in *Tetrahymena thermophila*, as detected by in situ hybridization. *Chromosoma* 1982;85:11-22.
- Zakeri S, Bereczky S, Naimi P et al. Multiple genotypes of the merozoite surface proteins 1 and 2 in *Plasmodium falciparum* infections in a hypoendemic area in Iran. *Trop Med Int Health* 2005;10:1060-1064.
- Zhang T, Xu X, Shen L et al. Modeling of protein refolding from inclusion bodies. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009;41:1044-52.

9. Anhang

9.1 Systematische Einordnung von *Tetrahymena thermophila* und *Plasmodium falciparum* nach Westheide und Rieger 1996

Einzellige Eukaryota (Protista)

Stamm: Alveolata

Unterstamm: Ciliophora (Ciliata)

Klasse: Oligohymenophorea

Gattung: *Tetrahymena*

Art: *Tetrahymena thermophila*

Stamm: Alveolata

Unterstamm: Apikomplexa

Klasse: Haematozoa

Gattung: *Plasmodium*

Art: *Plasmodium falciparum*

9.2 Phylogenetische Verwandtschaft von *Plasmodium* und *Tetrahymena*

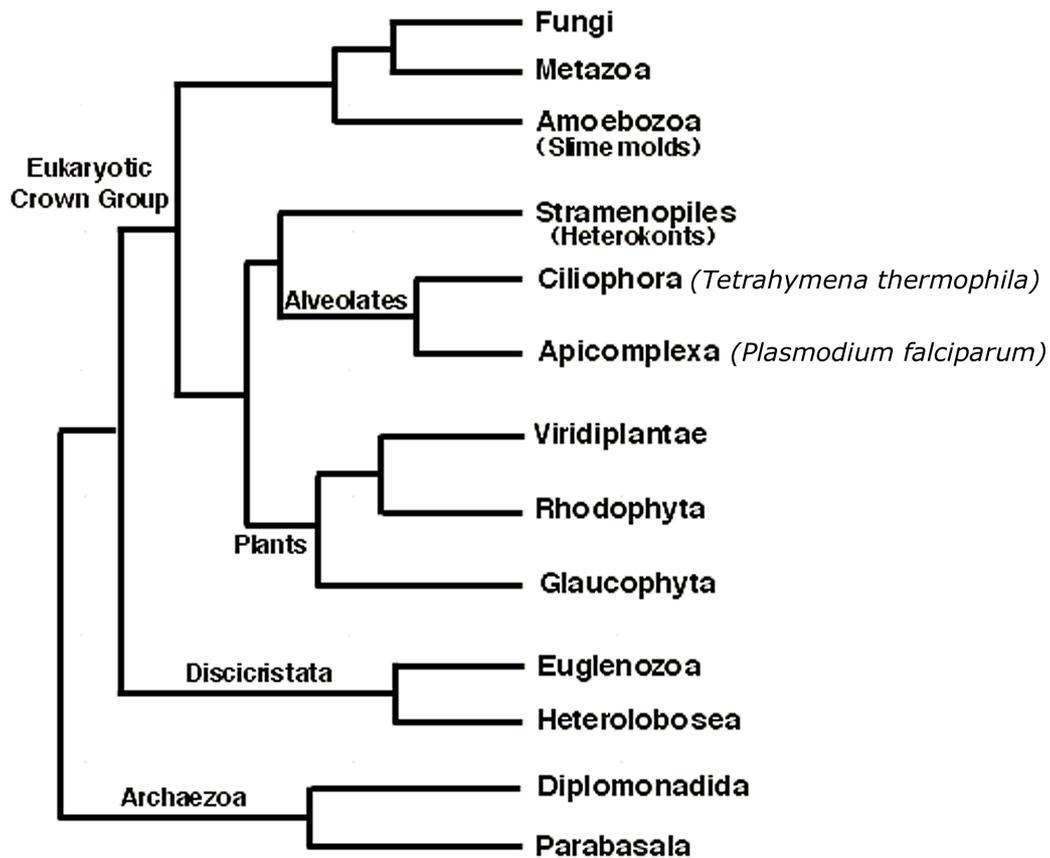


Abb. 37: Phylogenetischer Stammbaum

Modifiziert nach: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/augustin_laur/family_tree.htm

9.3 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Der Lebenszyklus von *Plasmodium* kann in vier Stadien unterteilt werden (Moorthy, VS. *et al.*, 2004; Mahanty, S. *et al.*, 2003; Richie, TL. & Saul, A., 2002).

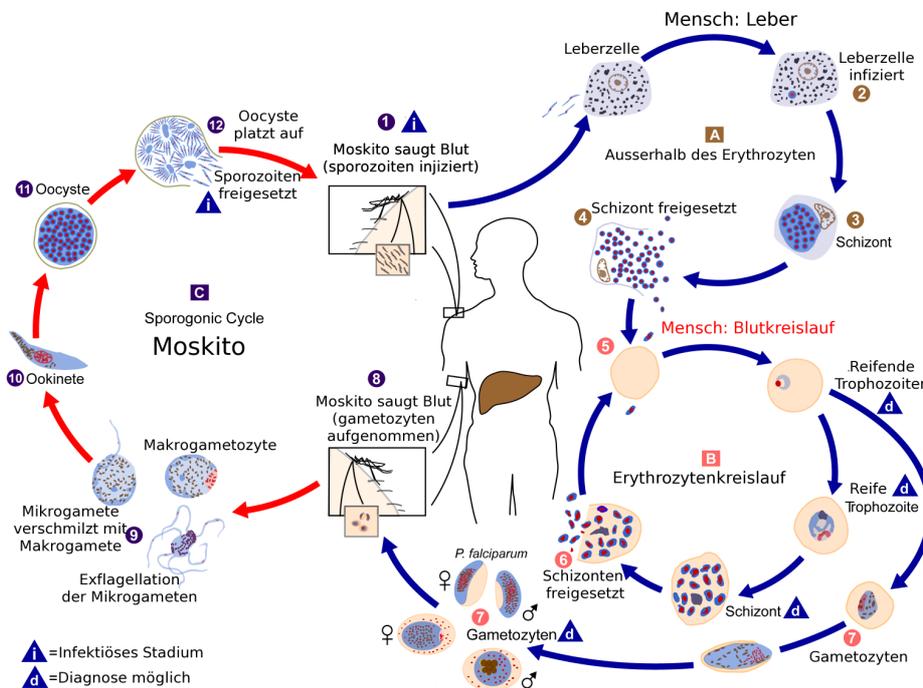


Abb. 38: Lebenszyklus von *Plasmodium spp.* (Modifiziert nach <http://phil.cdc.gov>)

I. Stadium: intravaskuläres oder Sporozoiten-Stadium (3-5min)

Infektiöse Sporozoiten, die sich im Speichelausführgang der Anophelesmücke befinden, werden durch einen Stich in den Menschen übertragen (1). Wenige Minuten später befallen sie die Hepatozyten der Leber, in der sich der Parasit in Trophozoiten verwandelt und mit einer multiplen Kernteilung beginnt (2). Als vergrößerter Leberschizont enthält er mehrere 1000 Kerne (3).

II. Stadium: intrahepatozytisches oder Leber-Stadium (1-2 Wochen)

Dieser und der vorherige Schritt werden auch als prä-erythrozytärer Schritt bezeichnet (A). Während der Leberschizogenie werden neue parasitäre Formen, die Merozoiten, entwickelt. Aus einem Leberschizonten können hierbei 40.000 Merozoiten entstehen, die aus der Leberzelle freigesetzt werden (4+5). Während der prä-erythrozytären Phase zeigt die infizierte Person keine Symptome.

III. Stadium: intraerythrozytäre oder Blut-Phase (~2 Tages-Zyklus)

Der Merozoitenzyklus beginnt mit der Invasion der roten Blutkörperchen (5). Die Merozoiten formen sich in den Erythrozyten zu jungen Trophozoiten, sogenannte Ringstadien (B). Alle zwei Tage multiplizieren sich diese, sodass die infizierten roten Blutzellen durch die entstandenen Schizonten platzen (6). Es kommt zum Fieber, Schüttelfrost und anderen Symptomen. Die Merozoiten werden ausgeschwemmt und ein neuer Zyklus beginnt, in dem weitere Erythrozyten von Merozoiten befallen werden. Bei der tropischen Malaria sind nur junge Trophozoiten im peripheren Blut zu finden, da sich alle weiter entwickelten Stadien durch Sequestration (Adhärenz der infizierten Erythrozyten an Endothelzellen) vor dem Immunsystem verstecken und somit der Eliminierung in der Milz entgehen.

IV. Stadium: intra-Mosquito oder Sexuelles-Stadium (10-14 Tage)

Mehrere Wochen nach der erythrozytären Schizogonie entwickeln sich aus den Merozoiten die ersten Mikro- und Makrogamonten (7). Diese präsentieren die infektiösen Stadien für den Endwirt, der Anophelesmücke (C). Nach Aufnahme der sexuell differenzierten Gamonten (8) entwickeln sich im Darm der Mücke die Gameten (9). Nach der Befruchtung entstehen aus der Zygote (10) Oozysten (11), die bis zu 10.000 Sporozoiten enthalten können. Durch Aufbrechen der Oozyste gelangen diese mit der Hämolymphe in die Speicheldrüse der Mücke (12). Mit der nächsten Blutmahlzeit schließt sich der Zyklus (1).

9.4 Grafische Darstellung der Plasmidkarten

Die folgenden Abbildungen stellen die unterschiedlichen Klonierungs- und Expressionsvektoren dar. In der Mitte der Plasmidkarten sind die Namen und die Größen angegeben. Ausgewählte Restriktionsendonukleasen sind an ihren Erkennungsstellen eingezeichnet. Die jeweiligen Beschriftungen werden zusätzlich in der nachfolgenden Legende erklärt.

Legende der Plasmidkarten

bps	Basenpaare
Amp ^R	Ampicillin-Resistenzgen für <i>E. coli</i>
Kan ^R	Kanamycin-Resistenzgen für <i>E. coli</i>
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenzgen für <i>E. coli</i>
bsd ^R	Blasticidin-Resistenzgen für <i>E. coli</i>
SacB	Sucrase-Gen aus <i>Bacillus subtilis</i>
<i>ori</i>	aus einem pUC-Derivat stammender Replikationsursprung für <i>E. coli</i>
f1 <i>ori</i>	aus pBluescript II SK+ stammender Replikationsursprung für <i>E. coli</i>
rDNA <i>ori</i>	aus einem rDNA-Minichromosom stammender Replikationsursprung für <i>T. thermophila</i>
pUC119	<i>Backbone</i>
Neo ^R	Paromomycin-Resistenzgen für <i>T. thermophila</i>
H4-1	Promotor des <i>H4-1</i> -Gens für <i>T. thermophila</i>
BTU2	Terminatorsequenz des <i>BTU2</i> -Gens aus <i>T. thermophila</i>
MTT1(prom)	Metallothionein-Promotor für <i>T. thermophila</i>
lox	Rekombinationsstelle für die Cre-Rekombinase vermittelte DNA-Rekombination
DHFR/ ⁺ DHFR	Flanke zur Integration in den 5' / 3'-Bereich des DHFR-TS-Gens
UTR5'/3' Region	(Untranslatierte Region) Flanke zur Integration in die 5'- <i>upstream</i> /3' <i>downstream</i> Region des DHFR-TS-Gens
22kD-Protease	Abschnitt des kodierenden Bereichs der Cystein-Protease 22kD
22kD3'Flanke	Flanke zur Integration in den 3' <i>downstream</i> Bereich des 22kD-Protease-Gens
22kD5'Flanke	Flanke zur Integration in den 5' <i>upstream</i> Bereich des 22kD-Protease-Gens
BB	Zielgen, welches das MSP-1-Signalpeptid und die synthetische, kodonoptimierte Block1- und Block2-Sequenz des MSP-1 aus <i>Plasmodium falciparum</i> beinhaltet
BBM	Zielgen, welches das MSP-1-Signalpeptid und die synthetische, kodonoptimierte Block1- und Block2- sowie MSP ₁₋₁₉ -Sequenz des MSP-1 aus <i>Plasmodium falciparum</i> beinhaltet
DBL2	Zielgen, welches das MSP-1-Signalpeptid und die var2-DBL2-Sequenz aus <i>Plasmodium falciparum</i> sowie einen V5- und einen His-tag enthält
DBL3	Zielgen, welches das MSP-1-Signalpeptid und die var2-DBL3-Sequenz aus <i>Plasmodium falciparum</i> sowie einen V5- und einen His-tag enthält

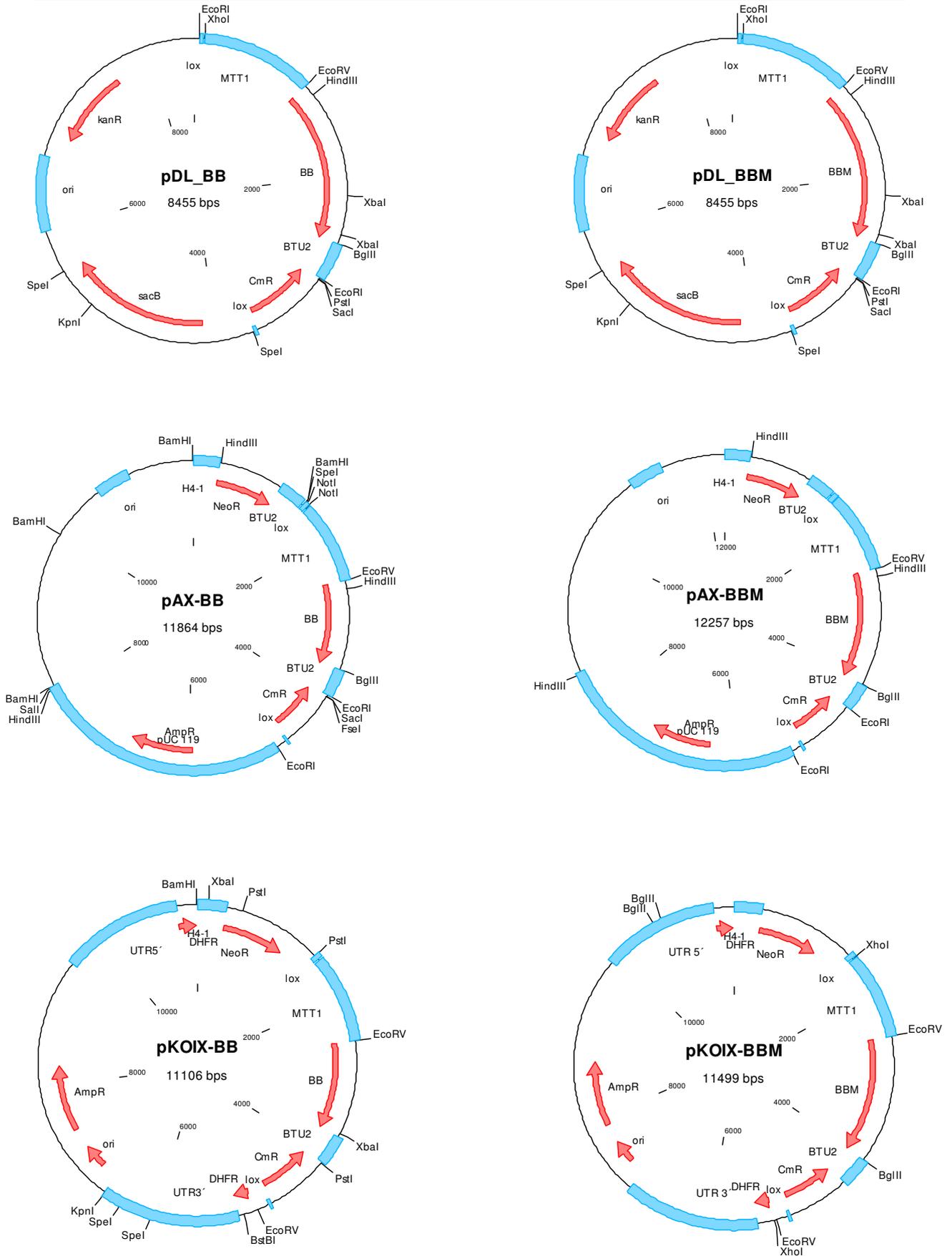


Abb. 39: Genetische Karten der konstruierten Klonierungsvektoren pDL-BB und pDL-BBM sowie der episomalen Vektoren pAX-BB, pAX-BBM und der integrativen Vektoren pKOIX-BB, pKOIX-BBM

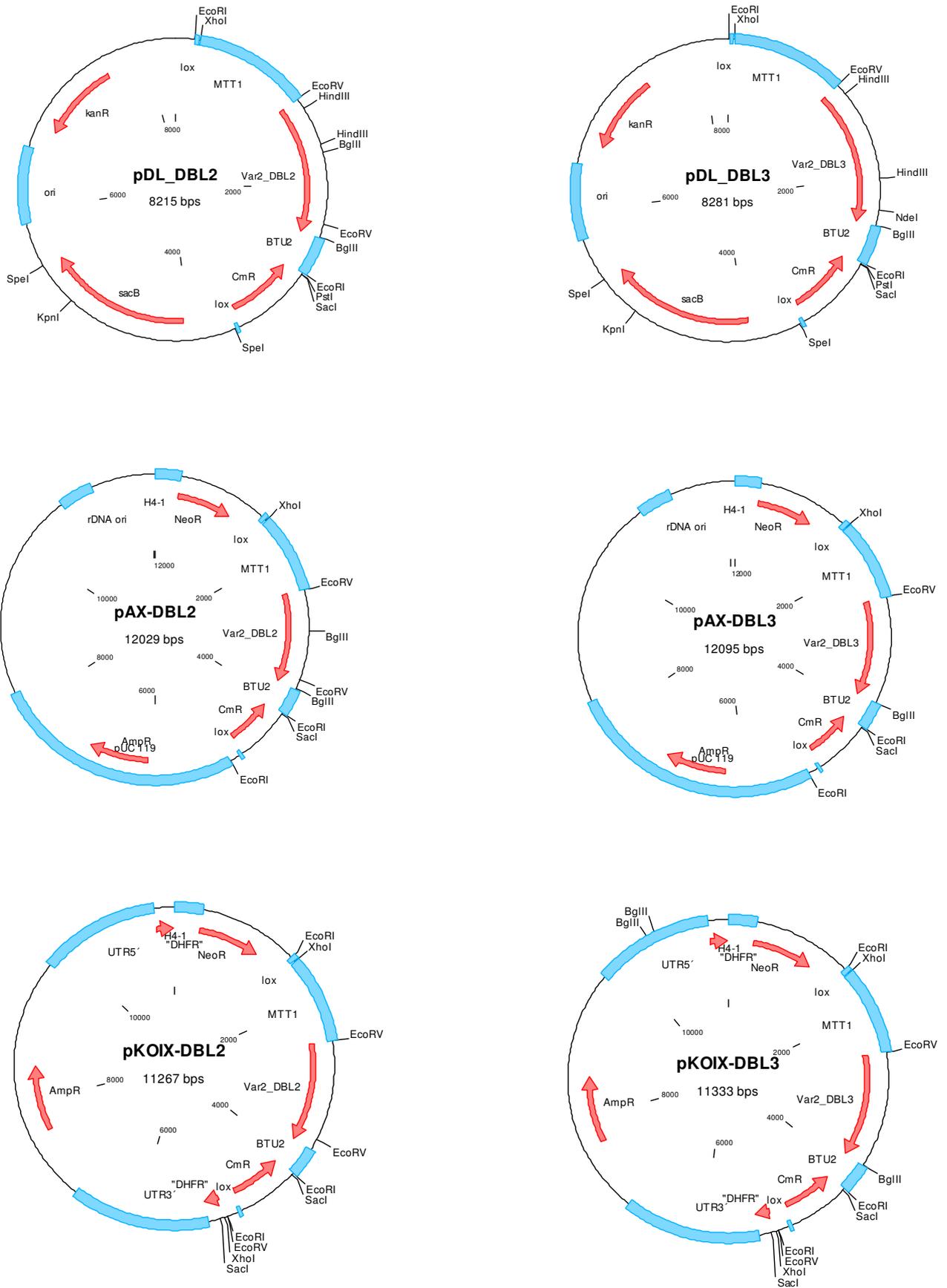


Abb. 40: Genetische Karten der konstruierten Klonierungsvektoren pDL-DBL2 und pDL-DBL3 sowie der episomalen Vektoren pAX-DBL2, pAX-DBL3 und der integrativen Vektoren pKOIX-DBL2, pKOIX-DBL3

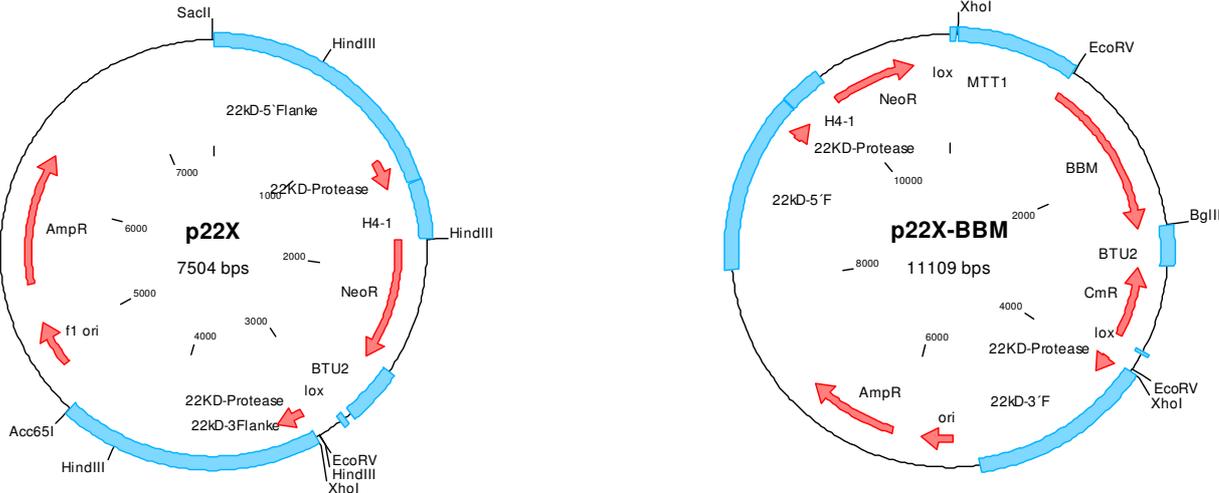


Abb. 41: Genetische Karten der konstruierten Protease-knock-out Vektoren p22X und p22X-BBM

9.5 Tabellen

Wachstumskinetik	Ttp22X-BBM5 (ohne E-64)	Ttp22X-BBM5 (+E-64)	TtpKOIX-BBM (ohne E-64)	TtpKOIX-BBM (+E-64)
Zeit (h)	Mittelwert Z/ml	Mittelwert Z/ml	Mittelwert Z/ml	Mittelwert Z/ml
0	30000	30000	30000	30000
4	46875	48438	39063	53125
12	168750	148438	209375	151563
16	218750	282813	314063	379688
20	521875	428688	439063	459375
24	603125	509375	706250	837500
36	1296875	1056250	1165625	828125
40	1253125	1221875	1256250	1106250
44	1875000	1240625	1268750	1400000
48	1693750	14125000	1231250	1325000
60	2293750	1756250	1312500	1456250
64	1768750	1575000	1218750	1156250
68	1887500	1812500	1212500	1281250
72	1712500	1368750	1393750	1356250

Tabelle 9.1: Zellzahlen zur Wachstumskinetik des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu dem Wildtyp-Transformant TtpKOIX-BBM (ohne und mit 30µg/ml E-64) (siehe Abb. 29)

	Ttp22X-BBM5+ E-64	Ttp22X-BBM5-	TtpKOIX-BBM +E-64	TtpKOIX-BBM -
Zeit (h)	Proteaseaktivität (U/l)	Proteaseaktivität (U/l)	Proteaseaktivität (U/l)	Proteaseaktivität (U/l)
20	104,89	125,68	164,51	153,99
24	113,94	110,51	164,86	153,29
36	41,59	107,89	44,12	1002,99
44	107,77	389,11	80,85	3447,57
48	66,71	719,26	73,49	4401,27
60	74,6	859,19	44,87	4071,77
64	70,5	921,75	59,4	3362,78
68	59,8	658,14	19,78	2470,3
72	55,26	490,56	24,27	2271,45

Tabelle 9.2: Extrazelluläre Proteaseaktivität (U/l) des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu TtpKOIX-BBM (ohne und mit 30µg/ml E-64) ermittelt durch einen BAPNA-Test (siehe Abb. 23)

	Ttp22X-BBM5 +E-64	Ttp22X-BBM5 –	TtpKOIX-BBM +E-64	TtpKOIX-BBM -
Zeit (h)	Proteaseaktivität (%)	Proteaseaktivität (%)	Proteaseaktivität (%)	Proteaseaktivität (%)
20	7	12	12	17
24	8	12	10	22
36	8	20	14	61
40	7	20	21	89
44	14	28	25	90
48	11	21	13	89
60	12	28	16	92
64	11	60	23	100
68	22	58	28	99
72	20	61	16	94

Tabelle 9.3: Extrazelluläre Proteaseaktivität (%) des proteasedefizienten Stammes

Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu TtpKOIX-BBM (ohne und mit 30µg/ml E-64), ermittelt durch einen Azocasein-Test (siehe Abb. 24)

	Ttp22X-BBM5-	TtpKOIX-BBM -
Zeit (h)	Saure-Phosphatase-Aktivität (U/l)	Saure-Phosphatase-Aktivität (U/l)
16	0,27	2,072
20	5,14	24,60
24	7,36	39,79
36	116,49	144,29
40	145,20	154,93
44	247,72	228,44
48	225,86	184,72
60	313,60	408,68
64	415,40	430,78
68	586,58	450,36
72	380,93	469,64

Tabelle 9.4: Saure-Phosphatase-Aktivität (U/l) des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5

im Vergleich zu TtpKOIX-BBM, ermittelt durch einen auf Para-Nitrophenol basierendem Test (siehe Abb. 26)

	Ttp22X-BBM5-	TtpKOIX-BBM -
Zeit (h)	β-Hexosaminidase-Aktivität (U/l)	β-Hexosaminidase-Aktivität (U/l)
16	0	0
20	0	0,53
24	0,35	6,11
36	70,2	111,82
40	98,78	118,24
44	151,46	151,04
48	202,39	149,96
60	351,88	202,93
64	333,62	220,23
68	417,46	192,30
72	285,93	236,50

Tabelle 9.5: Beta-Hexosaminidase-Aktivität (U/l) des proteasedefizienten Stammes

Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu TtpKOIX-BBM, ermittelt durch einen auf Para-Nitrophenol basierendem Test (siehe Abb. 25)

	Ttp22X-BBM 5+ E-64	Ttp22X-BBM 5-	TtpKOIX-BBM + E-64	TtpKOIX-BBM -
Zeit (h)	ICDH-Aktivität (%)	ICDH-Aktivität (%)	ICDH-Aktivität (%)	ICDH-Aktivität (%)
20	14	12	10	1
24	7	9	7	1
36	2	4	2	0
40	4	5	4	2
44	6	5	6	5
48	2	5	2	3
60	3	10	3	1
64	3	12	3	1
68	2	6	4	2
72	4	4	2	3

Tabelle 9.6: Relative ICDH-Aktivität (%) des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5 im Vergleich zu TtpKOIX-BBM (mit und ohne E-64), ermittelt durch einen ICDH-Test (siehe Abb.28)

<i>fed-batch</i>- Fermentation	Ttp22X-BBM5	Ttp22X-BBM5	Ttp22X-BBM5
Zeit (h)	Mittelwert Zellen/ml F1	Mittelwert Zellen/ml F2	Mittelwert Zellen/ml F3
0	20000	20000	20000
20	421000	434500	450000
24	756000	840000	859250
44,5	2493750	4543750	2631250
49	2862500	4037500	2862500
51	3812500	3612500	2825000
65,75	2487500	2725000	2950000
72,5	2762500	2562500	3737500
74,75	3237500	3125000	2825000
89,75	3000000	2400000	2150000
93	3187500	3075000	2537500

Tabelle 9.7: Zellzahlen zur *fed-batch*-Fermentation des proteasedefizienten Stammes Ttp22X-BBM5 (siehe Abb. 35)

997: TCT GTC GCT TCC GTC GCT TCT GTT GCT TCC GGT GGT TCT GGT GGA TCT GTC GCT
 S V A S V A S V A S G G S G G S V A
 1051: TCT GGT GGA TCT GGA AAC TCT AGA AGA ACT CAA CCT TCC GAT GAT TCT TCC ACT
 S G G S G N S R R T Q P S D D S S T
 1105: AAG AAG GAT ATG TTG GGT AAA CTC CTC TCT ACT GGT TTG GTT CAA AAC TTC CCT
 K K D M L G K L L S T G L V Q N F P
 1159: AAC ACT ATC ATT TCT AAA TTG ATT GAA GGA AAG TTC CAA GAT ATG CTC CAA ATT
 N T I I S K L I E G K F Q D M L Q I
 1213: TCT CAA CAC CAA TGT GTT AAG AAA CAA TGC CCT GAA AAT TCT GGT TGT TTC AGA
 S Q H Q C V K K Q C P E N S G C F R
 1267: CAC CTC GAT GAA AGA GAA GAA TGT AAA TGC CTT TTA AAC TAC AAA CAA GAA GGT
 H L D E R E E C K C L L N Y K Q E G
 1321: GAT AAA TGC GTT GAA AAT CCT CAA CCT ACT TGC AAC GAA AAT AAC GGT GGT TGT
 D K C V E N P Q P T C N E N N G G C
 1375: GAT GCT GAT GCT ACT TGC ACT GAA GAA GAT TCT GGA TCT TCT AGA AAG AAG ATT
 D A D A T C T E E D S G S S R K K I
 1429: ACT TGT GAA TGT ACT AAG CCT GAT TCT TAC CCT CTT TTC GAT GGT ATT TTC TGC
 T C E C T K P D S Y P L F D G I F C
 1483: TCC TCT TCT AAT TGA AGATCTCTTAAATTAATAATTC AAT
 S S S N *

BBM < BgII > BTU₂-Terminator

MSP-1-Signalpeptid

Block1

K1-Typ Block2

RO33-Typ Block2

MAD20-Typ Block2

Spacer zwischen BB und MSP-1₁₉

MSP-1₁₉

BgII Schnittstelle

EcoRV Schnittstelle

Mutierte potenzielle Glykosylierungsstelle

9.7 Cystein-Protease Sequenz (22kD) aus *T. thermophila*

>*T. thermophila* 5'Flanke der Cystein-Protease (22kD)

```

1.      tgattttaat atagctggtg taagtaaaat attaaattta taagaatggc aaagatttgt
61.     ttataaatat attataaagt taaagctcat aaaatcttaa agtaattcta tgtaattaaa
121.    atgtttataa aatatatatt ataattttta aatattaaaa aaacaaaatc attatttaga
181.    taaatattaa tatttattat acttatttca tagactgtaa ataaaaaaat gagaaaaaaa
241.    caaggaaaaa gcataatata tctttctgga ttcataataa taaaaaagaa aaattaattt
301.    cttgtttcta atttgatttg cgtaaattt tatcaaactg atcatcttca atctttattt
361.    agaatcgatt ctgattttta ttctctagta ctttaagaaa tttagataaa ctaaatacat
421.    aattaatcaa ttattgattg atacctgaaa ctaaaagttt tttacattta attaagaaat
481.    atattagaga tttagaaaaa tattggtaat gagaaaagat atttatttat ttttaattata
541.    attggaagaa taagaagata attgatgaaa aagatgcata catacataca agcagctttt
601.    atttgaaatt tattatgtga aagcttttca ttttaagaatt cgaatgattt atttatttat
661.    ttaattaaag tatttaattt tataaaaaag ctgaatgaat tacctttttt agtgaatatt
721.    tacagaattt gttatattta atttaatttc tgacaaatta ttggatattt agttacttta
781.    ataaatctaa attataaggc caatttataa actgggtaat ccgtagaata tttgagtata
841.    gatttggttg aacttaacca aatattaca aatcaattat taattctttt acaaaaagaac
901.    actttaacag agagtatcct gtaaattaaa agttattaac attccccact cgatcaattt
961.    cttttacact ctttaaacga aatgtttcga ttttatccat caaaattctt aattcttata
1021.   tatttttaac tattaaaata tcagattgat aattcatgcc atttgtggtg ttttaataac
1081.   aataatacgt atatcatctt gcataacttt caaagccaca aaaactaatt gatcctattt
1141.   ttatagatta ggaaactatt tcttttataat tttgtagaca tctaattatt actttaaata
1201.   ctagattatc taatacatcc tttcataaaa gattcaatta aataaattta aactaaacaa

```

>*T. thermophila* 22kD-Cystein-Protease

```

1261.   aaaaaatatg agctaaaaaa ttactgttac tcttgttgct atcgctgcta ttgccgctat
1321.   cactgctgct ggcatttact actagaacca ctaagctagc caattagaaa agtctttcaa
1381.   gagaaatacc atccttgaat aatggaacga attcaagcaa aagtttggta agaaatatgc

```

5'Flanke (1462bp)<

```

1441.   tgactaagaa ttcgaaagat acagaatcgg agttttcgct caaaatttag aagttatcaa
1501.   gaacgatcct tccttcggtg ttaccaagtt catggatag accccataag aattcgaaca
1561.   atcctactta tctctctaac tccaacaaaa cttcaatgct gaaaaggttg atggtgactt
1621.   taatggtgat attgattgga cttaaagggtg tgctgttact cctgtcaagg actaaggttc
1681.   ttgcggttct tgctgggctt tctctgctat cggagctggt gaatctgctt tgatcttgaa
1741.   cggatgaagac aagaacatca atttggctga ataagaattg gtcgactgtg ctactactcc
1801.   caagtacgaa aatgaagggt gcaacgggtg ttggatggac tctgctttcg actacattat
1861.   tgatgaaaag atctcttaaa ccaaggacta caagtacact gctagagacg gcaagtgcaa
1921.   ggatacctca tcttttgaaa agaagtctat ctctggatac aaggacattc ctcaagggtga
1981.   ctgcaagtct ctcttaaacg ctctttccta ataaccggtt gctattgcag ttgatgcttc

```

>3'Flanke der Cystein-Protease (22kD)

```

2041.   ttcttggtaa ttctacaaca agggagtgtt atcatcctgt ggcagcagac ttaatcacgg

```

2101. **tg**ttttatta **act**gggttacg **tta**acgaaac **tt**acaagggtt **aag**aactctt **ggg**gtacttc
 2161. **tt**gggggtgaa **aag**gggttca **tct**aattaaa **gtc**aggtaac **tct**tgtggtc **tct**gcaatgc
 22kD-Cystein-Protease (974bp)<
 2221. **tg**cctcttac **cct**ccttgctt **g**aaaaaaaaata **ctt**aaataat **t**aaaaaaaaat **agt**attatta
 2281. **t**ataatccat **att**aaagtct **t**tttttataa **at**cttttaaaa **a**attcattaa **a**taaaacttta
 2341. **a**aatctcaac **att**ttttaaatt **c**attaaacca **t**tttttaaatt **att**gtacctc **a**aatcgcttt
 2401. **tt**caatttaa **a**atcctattc **tt**agctttgt **att**attttttt **gat**gttttttc **t**catatctta
 2461. **cc**attagctc **ttt**gtctcaa **t**taaatctta **a**aaaatattt **aa**agtgttta **a**ataaataaa
 2521. **aaa**atttggtt **agt**tactttt **tt**acagatag **ct**gttgaaga **gt**aaaacaga **tag**aaaatta
 2581. **a**atgggtgata **agt**atttttag **ta**atagtatt **ca**attcatta **t**tttaattaga **gt**attaattt
 2641. **g**aaatggaag **att**aattttt **a**attttatta **a**attatgaat **cc**atttatta **a**acttttagat
 2701. **tg**cataaaaa **gat**tttttta **at**gtaaaaca **tag**tagaatt **a**actaactac **a**taaaaaata
 2761. **a**atagagtct **a**taagtaagt **g**ttttgaatt **att**ctatatt **t**ctagacaat **a**aattatatt
 2821. **gt**atatcaaa **t**aaataaaga **t**acattaaat **a**aaaaaaaaat **att**tatatag **t**aaattcagt
 2881. **ta**atattaag **t**taataaagt **t**ttatggagg **a**atttatttg **gt**attatgca **gat**agttaag
 2941. **ct**ctgtaaga **g**agaacacct **a**taggacctg **tt**agcattag **ag**atttagat **gt**tttgtata
 3001. **gg**acttcagc **a**ataaattct **g**caacttatg **ttt**ggaaaga **agg**tatgcct **g**aatggggtt
 3061. **a**actttttaa **agt**ataggaa **tt**gaaggagg **ct**attctaga **cg**agcaataa **gat**attaagg
 3121. **ta**atataaga **act**ttatgaa **a**agtagtagc **agg**aactagc **t**ctagctaatt **t**aaaagggta
 3181. **aaa**agtaata **g**aaaatacaa **g**ataaacttg **a**caaaaaata **ag**cttagatt **gat**caaaagt
 3241. **tg**cttgagga **ag**ctaaatat **a**attaatcaa **t**gaatagtgg **ca**aggaggaa **gat**ataagtc
 3301. **a**agattaggt **a**aaataaaac **tt**ggaattgt **t**atagcaaat **ag**atgaagaa **g**aagtgttag
 3361. **at**gaagatga **aga**agaagaa **agg**gagtatt **t**aaagctggt **a**taagaaaat **cc**agaagaag
 3421. **cg**atttaaag **a**atggccaat **a**acactttaa **a**cagctattt **tt**actattct **g**aagatgata
 3481. **aaa**agtggaa **t**attttaga **g**aagatgaaa **a**taatgagag **agt**ttggatc **t**aataagatg
 3541. **a**agaac
 3'Flanke (1473bp)<

Die **5'Flanke** des konstruierten Protease-*knock-out* Vektors (p22X) beinhaltet **1267bp** untranslatierte Region der **22kD-Protease** aus *T. thermophila* + **195bp** kodierender Bereich der Protease (1462bp).

Die **3'Flanke** des konstruierten Protease-*knock-out* Vektors (p22X) beinhaltet **1298bp** untranslatierte Region der **22kD-Protease** aus *T. thermophila* + **175bp** kodierender Bereich der Protease (1473bp).

604bp der **974bp** großen **Cystein-Protease (22kD)** können auf diese Weise deletiert werden.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

.....