

# Optimierung der Produktion eines toxischen Fusionsproteins mit rekombinanten Bakterien

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:  
Jahrbuch 2005 der Braunschweigischen  
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.93-98



J. Cramer Verlag, Braunschweig

## Optimierung der Produktion eines toxischen Fusionsproteins mit rekombinanten Bakterien\*

KARL SCHÜGERL

Arnumer Kirchstraße 31, D-30966 Hemmingen

Die Produktion von Proteinen mit rekombinanten Mikroorganismen ist Stand der Technik. Die hohe Konzentration des Protein-Produktes belastet die Mikroorganismen. Um diese Belastung los zu werden, kann das Bakterium die Proteinfaltung ändern und es so unlöslich machen (Bildung von inclusion body) oder durch Proteasen abbauen. Besonders schwierig ist die Produktion von Proteinen, die für die Zelle toxisch sind.

Wie vermeidet man, dass das Produkt die Zelle tötet?

Diese Frage wird am Beispiel der Produktion eines Fusionsproteins mit rekombinantem *Escherichia coli* JM109 diskutiert.

Das Fusionsprotein enthält Restriktionsendonuclease EcoRI. Die Untersuchung und Verbesserung dieses Enzyms mit Protein design war ein Forschungsgebiet des Arbeitskreises von Herrn Maas.

In Kooperation mit diesem Arbeitskreis haben wir die prozesstechnischen Aspekte der Bildung von Restriktionsendonuclease untersucht.

### Das biologische System

Das Produkt ist ein Fusionsprotein von Staphylococcus Protein A und EcoRI, bezeichnet durch SPA::EcoRI.

EcoRI ist ein Enzym, Restriktionendonuclease, das die DNA abbaut. Dieses Enzym wird bei der Gentechnik verwendet. Auch die zelleigene DNA wird abgebaut, wenn sie nicht geschützt wird.

Der Vorteil des Fusionsproteins ist die höhere Stabilität des Produktes (Schutz vor Abbau von EcoRI durch Proteasen).

---

\* Vortrag gehalten am 11.11.2005 in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft.

Der verwendete Wildtyp von *Escherichia coli* JM109 trägt ein Episom den lac-Repressor, der die Repression von  $P_{Lac}$  ermöglicht. Für die Verwendung von Plasmiden mit  $P_L$ - oder  $P_R$ -Promotoren muss diesem Stamm jedoch das Repressorgen *cI857* durch zusätzliches Plasmid beigefügt werden.

Zur Produktion des Fusionsproteins werden geeignete Plasmide in die Zelle eingeschleust. Man benötigt ein Produktionsplasmid, das das Fusionsprotein SPA::EcoRI codiert. Hier wurde das *Produktionsplasmid pMTC48* verwendet. Das Gen für das Fusionsprotein steht unter der Transcriptionskontrolle der beiden unabhängig voneinander wirksamen Promotoren  $P_R$  und  $P_{LacUV5}$ . Die Transcription des Produktgens erfolgt durch chemische Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) über den  $P_{LacUV5}$ -Promotor oder durch thermische Induktion mit Temperaturerhöhung über den  $P_R$ -Promotor.

Das *Repressionsplasmid pCI857* vermittelt dem Wirtstamm das konstitutiv exprimierte, temperatursensitive CI857 Repressorprotein. Es hat den Marker der Resistenz gegen Kanamycin. Das Gen steht unter Kontrolle des autoregulativen Promotors  $P_M$ . Auch das Plasmid pRK248cI überexprimiert das CI857 Repressorprotein. Das Plasmid trägt das Resistenzgen gegen Tetracyclin.

Das *Schutzplasmid pEcorR4* verhindert den Abbau der zelleigenen DNA. Das Plasmid codiert die DNA-Methylase der Restrictionendonuclease EcoRI. Das Enzym DNA-Methylase methyliert die EcoRI-Schnittstelle im Bakteriumgenom konstitutiv und schützt die Zelle vor dem Abbau durch das Fusionsprotein mit EcoRI-Aktivität. Das Plasmid trägt das Resistenzgen gegen Chloramphenicol. In Abwesenheit des Schutzplasmids kann kein Produkt nachgewiesen werden.

Die Kombination der Plasmide pMTC48, pRK248cI und pEcorR4 ergab die höchste Produktivität.

Zu der Produktion des Fusionsproteins muss man das Bakterium hochzüchten.

Folgende Kultivierungsmedien wurden verwendet: Minimal-Medium (mit chemisch definierten Komponenten) und Komplex-Medium (mit Hefeextrakt oder Casein als Proteinanteil). Der Wildtyp von *E. coli* JM109 wächst nicht im Minimal-Medium. Der plasmidhaltige Stamm wächst sowohl in Minimal-Medium als auch im Komplex-Medium. Der Wildstamm wächst jedoch schneller in Komplex-Medium als der rekombinante Stamm, da die Plasmide die Zellen belasten.

Genexpression und Produktbildung sind nur im Komplex-Medium möglich.

### Satzkultivierung

Man startet mit hoher Konzentration des Substrates (Glucose), um hohes Wachstum zu erreichen. Wegen der hohen anfänglichen Substratkonzentration ist die

Konzentration der Nebenprodukte Acetat und Pyruvat sehr hoch, was zur Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und der Produktbildung führt. Daher hat diese Produktionsweise erhebliche Nachteile.

Die Genexpression mit  $P_R$ -Promotor wird durch die Erhöhung der Temperatur von 30°C eingeleitet. Die optimale Temperatur für die Genexpression und Produktbildung ist 38°C. Trotzdem wird 40°C verwendet, da bei dieser Temperatur die Genexpression schneller abläuft.

Die chemische Induktion des  $P_{lacUV5}$ -Promotors erfolgt durch Zudosierung von IPTG. Die optimale Konzentration von IPTG hängt von der Größe des Mediumvolumens ab. Je größer das Mediumvolumen, um so höher ist die optimale IPTG-Konzentration. Wegen des hohen Preises des Induktors ist dies ein schwerwiegender Nachteil der chemischen Induktion.

Nach der Induktion der Genexpression nimmt die Kopiezahl der Plasmide stark ab.

Ein Vergleich der beiden Expressionssysteme in kleinen Reaktoren ergibt für die Temperaturinduktion fünffach höhere Expression als für die chemische Induktion. Dies entspricht dem Promotorstärkenverhältnis  $P_R$  zu  $P_{LacUV5}$ . Der Zeitpunkt der Einleitung der Induktion beeinflusst die Produktmenge. Der optimale Zeitpunkt für die Induktion ist das Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

Da während der Genexpression der Zellstoffwechsel stark ansteigt, ist es notwendig die Konzentrationen des Substrates und des Sauerstoff zu erhöhen. Daher wird bei Induktion proteinhaltiges Substrat dem Reaktor zugeführt und die Rührerdrehzahl erhöht.

In großen Reaktoren ist die Temperaturinduktion ineffizient, da in ihnen keine schnelle Temperaturerhöhung möglich ist. Zu geringe Steigung der Temperatur führt zur ineffektiven Induktion. Die Erhöhung der Temperatur der Reaktorwand führt zur Schädigung der Zellen.

### Kontinuierliche Kultivierung

Eine spezielle kontinuierliche Kultivierungsmethode, die Chemostat-Kultivierung, wurde gewählt, da sie eine selbststabilisierende stationäre Arbeitsweise ist, bei der das Substrat voll verstoffwechselt wird. Es herrscht ständig Substratlimitierung vor.

Die Aufenthaltszeit oder Verweilzeit der Zellen  $\tau$  im Reaktor wird durch die Flussrate des Mediums  $F$  durch den Reaktor und durch das Volumen des Mediums  $V$  vorgegeben: Die Definitionen der Aufenthaltszeit  $\tau$  und der Verdünnungs-

rate  $D$  sind:  $\tau(h) = V F^{-1}$  und  $D (h^{-1}) = F V^{-1}$ . Die Verdünnungsrate  $D (h^{-1})$  und die spezifische Wachstumsrate  $\mu (h^{-1})$  sind in Chemostaten gleich. Die Definition der spezifischen Wachstumsrate lautet:

$$\mu = \left( \frac{dX}{dt} \right) \frac{1}{X}$$

wobei  $X$  = Zellmassenkonzentration ist.

Die maximal mögliche Verdünnungsrate ist durch die maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit  $\mu_{\max}$  begrenzt. Bei kontinuierlicher Arbeitsweise lässt sich eine hohe Substratkonzentration im Medium vermeiden, die zur Bildung von Nebenprodukten führt und die Ausbeute reduziert.

Die einstufige kontinuierliche Kultivierung hat den Nachteil, dass das Wachstum und die Genexpression in demselben Reaktor gleichzeitig erfolgen, obwohl sie sehr unterschiedliche Bedingungen erfordern: Daher eignet sich die einstufige kontinuierliche Kultivierung nicht zur Produktion des Fusionsproteins SPA::EcoRI.

### **Zweistufige Chemostat-Kultivierung**

Hier werden das Wachstum und die Produktbildung in getrennten Reaktoren durchgeführt. In der ersten Chemostat-Stufe erfolgt das Wachstum und in der zweiten Stufe die Induktion der Genexpression. Um das Wachstum des Wildstammes in der ersten Stufe zu verhindern, wird Minimal-Medium verwendet. Dadurch wird die Konkurrenz mit den plasmidfreien Zellen ausgeschaltet.

Die optimale Temperatur des Wachstums ist 30°C. Die Aufenthaltszeit der Zellen in der ersten Stufe wurde so gewählt, dass die Plasmidverluste gering sind.

In der zweiten Stufe wird die Induktion der Genexpression bei erhöhter Proteinkonzentration bei einer Temperatur von 40°C oder in Anwesenheit von IPTG vorgenommen. Die Genexpression bedeutet eine starke Belastung der Zellen. Als Folge verlieren Zellen einen Teil der Plasmide und die Zellen sterben ab..

### **Mechanistisches mathematisches Modell für Satzkultivierung**

Aus den Gleichungen der Bildungsgeschwindigkeiten der Zellmasse, der Plasmide, der Enzyme, des Produktes und der Nebenprodukte wird die Stoffbilanz für diese Komponente aufgestellt. Nach der Identifikation der Modellparameter aufgrund der gemessenen Daten werden die Änderungen der Konzentrationen der Schlüsselkomponente als Funktion der Prozessvariablen ermittelt. Mit dem Modell lassen sie die Änderungen der Konzentrationen der Zell-

masse, des Substrates, der Nebenprodukte und der Plasmide in Satzkultur bis zur Genexpression gut beschreiben. Der Nachteil dieses Modells ist, dass es die Induktion der Genexpression nicht beschreiben kann. Dazu wurde ein genetisch strukturiertes Modell entwickelt.

### **Genetisch strukturiertes mathematisches Modell für Satzkultivierung**

Als erstes wurde die Kinetik der Transformation und Transcription der Gene, die in die Plasmide geklont wurden, ermittelt. Die Expression des  $\text{spa}::\text{ecoRI}$  Gens und  $\text{cI}$ -Gens werden durch den  $\lambda$  CI Repressor kontrolliert. Das  $\text{spa}::\text{ecoRI}$  Gen wird durch den  $\lambda P_R$ -Promotor und das  $\text{cI}$ -Gen durch den  $\lambda P_L$ -Promotor kontrolliert. Bei hohen Temperaturen wird der Repressor CI 857 inaktiviert, die Repression wird aufgehoben und die Transcription des  $\text{spa}::\text{ecoRI}$  Gens kann erfolgen.

Zuerst wurden die Transcriptions- und Translations-Syntheseraten der Plasmide und die Bindung des CI-Repressors an die Operatoren  $O_L$  und  $O_R$  bei 30°C entwickelt. Bei einer Temperatur von 40°C wird der Repressor CI 854 nach einer Reaktion erster Ordnung inaktiviert. Aus diesen Abhängigkeiten werden die kinetischen Gleichungen der Bildung des Fusionsproteins und der Methylase bei 30°C abgeleitet. Das Expressionsniveau von Methylase ist immer höher als das von  $\text{SPA}::\text{EcoRI}$ . Bei 30°C bleibt der Wirt lebensfähig, weil seine DNA im gesamten Zeitbereich durch Methylase geschützt wird. Bei 40°C übersteigt die Aktivität von  $\text{SPA}::\text{EcoRI}$  weit die Aktivität von Methylase. Als Folge wird die Induktion der Expression des  $\text{spa}::\text{ecoRI}$ -Gens den Wirt durch die unkontrollierte Spaltung seiner DNA töten. Bei kurzen Verdoppelungszeiten  $T$  übernimmt das Enzym Methylase die Kontrolle. Bei noch kürzeren Verdoppelungszeiten nimmt die Konzentration des Repressorproteins zu und als Folge kann das Repressorprotein auch bei 40°C nicht vollständig deaktiviert werden. Daher wird der Repressor im Medium angereichert. Bei sehr hohen Verdünnungsraten schützt daher Methylase die DNA des Wirtes vom Fusionsproteins auch bei 40°C.

### **Übertragung dieser Ergebnisse auf die zweistufige Anlage**

Die Beziehungen zwischen der Verdoppelungszeit  $T$ , der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$ , der Verdünnungsrate  $D$  und der Aufenthalt der Zellen  $\tau$  im Reaktor sind:  $T = \ln 2 / \mu = \ln 2 / D = \ln 2 \cdot \tau$

Da in der zweiten Stufe kein Wachstum stattfindet, spielt nur die Zeitdauer der Genexpression eine Rolle. Die Verweilzeit  $\tau$  der Mikroorganismen in der zwei-

ten Stufe muss zur Genexpression ausreichen. Wegen des extrem schnellen Temperaturanstiegs beim Übergang aus der ersten in die zweite Stufe ist die Genexpression sehr schnell und sehr effektiv. Bei sehr hohen Verdünnungsraten in der zweiten Stufe schützt Methylase die DNA des Wirtes vor dem EcoRI auch bei 40°C. Daher brauchen wir in der zweiten Stufe nur einen sehr kurzen Aufenthalt der Zellen.

Nach der Induktion der Genexpression verlassen die Zellen sofort die zweite Stufe und ihre Temperatur wird reduziert. Damit werden die Verluste der Plasmide und der Abbau des Fusionsproteins vermindert.

Das Volumen der zweiten Stufe muss kleiner sein als das Volumen der ersten Stufe. Dadurch sollen in der zweiten Stufe sehr kurze Verweilzeiten erreicht werden und es soll verhindert werden, dass die Zellen während der Genexpression getötet werden. Die Aufenthaltszeit muss jedoch so groß sein, dass die Genexpression voll entfalten kann.

Die Induktion der Genexpression durch Temperaturerhöhung lässt sich in einer zweistufigen Anlage auch nach Maßstabvergrößerung mit hohem Wirkungsgrad durchführen, da die Zellen bei ihrem Wechsel aus der ersten in die zweiten Stufe einen schnellen Temperaturanstieg durchlaufen.

### **Ergebnisse in Satz- und kontinuierlichen Kulturen**

Durch geeignete Prozessführung wurden sowohl im Satzbetrieb als auch in kontinuierlicher Kultur sehr hohe Aktivitäten erreicht.

In der Satzkultur wurden spezifische Aktivitäten von 40.000-50.000 U/mg (Zellmasse) und auf die Produktbildungszeiten bezogenen Produktivitäten von 22.000-25.000 U/mg h erreicht.

In zweistufiger kontinuierlicher Kultur wurden Aktivitäten von 103.000 U/ml, spezifische Aktivitäten von 35.000U/mg (Zellmasse) und Produktivitäten von 225.000 U/mg h erzielt.

Da bei der Satzkultivierung mindestens die Hälfte der Zeit zum Entleeren, Reinigen und Neufüllen des Reaktors sowie zur Sterilisation des Mediums und Hochzüchten der Bakterien benötigt wird, muss die auf die Produktbildungszeit bezogene Produktivität auf die Hälfte reduziert werden. Daher ist die zweistufige kontinuierliche Kultivierung wirtschaftlicher als die Satzkultivierung. Des Weiteren bleibt der hohe Wirkungsgrad der Genexpression durch Temperaturerhöhung auch nach Maßstabvergrößerung in zweistufiger kontinuierlicher Kultur erhalten.