

Glykosylierung von rekombinanten Proteinen in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*

Dipl.-Biol. Juliane Richter, Dr. Stephanie Geier, Prof. Dr. Rainer Buchholz
Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Einleitung

Die Glykosylierung von Proteinen eukaryontischer Organismen hat großen Einfluss z. B. auf Stabilität, Faltung und Funktion des Proteins im Organismus. Diese post-translationale Addition von mehreren Saccharidmonomeren bis zu Oligosaccharidstrukturen an Proteine wird in den meisten eukaryontischen Zellen beobachtet und erfolgt in Prokaryonten nur in stark reduzierter Komplexität, sodass die Produktion von biopharmazeutischen Proteinen für die Anwendung als Human-Therapeutika in eukaryontischen Expressionssystemen, z. B. Insekten- und Säugerzelllinien angestrebt wird, die human-identische bzw. human-ähnliche Modifikationen durchführen.

Am Beispiel des Modellproteins Luciferase soll die Glykosylierung in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* und deren Potential als Expressionssystem für therapeutische Proteine untersucht werden. Das an die *codon usage* von *C. reinhardtii* angepasste Gen für Luciferase (Fuhrmann *et al.*, 2004) weist zwei Consensus-Sequenzen für N-Glykosylierungen auf und ist daher für solche Experimente besonders geeignet. So kann einerseits die erfolgreiche Expression des Gens über die Aktivität des kodierten Enzyms und die damit verbundene Emission von messbarem Licht (Lumineszenz) nachgewiesen werden. Zum anderen können anhand des Luciferase-Proteins die noch unbekannt Glykosylierungsstrukturen in *C. reinhardtii* untersucht werden. Durch eine Exportsequenz am Luciferase-Gen kann das Protein von den Zellen in das Medium abgegeben und so die Aufreinigung des Proteins aus dem Medienüberstand erleichtert werden.

Ergebnisse

Das eingesetzte Luciferase-Gen basiert auf der DNA-Sequenz der Seefeder *Renilla reniformis*, ist analog zu den *C. reinhardtii*-eigenen Genen in einer Exon-Intron-Struktur aufgebaut und wird durch den konstitutiven Tandempromoter HSP70A/RbcS2 angesteuert (Abbildung 1; Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009).

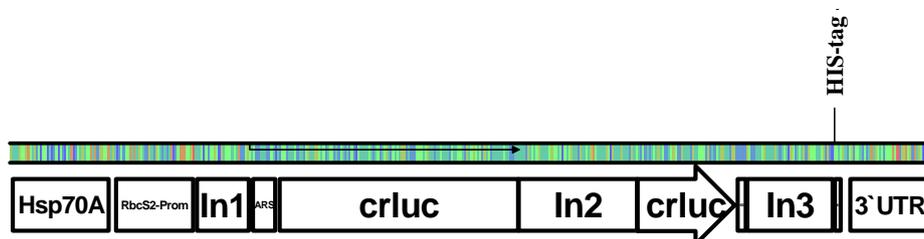


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Genkonstrukts für Luciferase (crLuc) aus dem Plasmid pAES15 (Eichler-Stahlberg *et al.* 2009). Die Promotoren des *heatshock* Proteins (Hsp70A) und der RuBisCo (RbcS2-Prom) bilden den Tandempromotor. Für eine verstärkte Expression wurden die drei Introns der RuBisCo Untereinheit (In 1-3) integriert. Mittels der Exportsequenz ARS2 nach Intron 1 kann das Protein aus der Zelle in das Medium abgegeben werden. Ein C-terminaler *his-tag* soll die Detektion des Proteins mittels anti-*his-tag*-Antikörpern sowie die Aufreinigung des Proteins mittel Nickel-Affinitätschromatographie ermöglichen.

Zwischen Promotor und Gen wurde ein Sequenzabschnitt des Arylsulfatase-Gens (ARS2) eingefügt, was später den Export des Proteins aus der Zelle ermöglichen soll (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Am 3'-Ende der 3'UTR des Luciferase-Genes (crLuc) befindet sich die Sequenz für einen C-terminalen *his-tag*. Das Plasmid zur Expression mit dem beschriebenen Genkonstrukt crLuc wurde von der inzwischen aufgelösten Arbeitsgruppe des *Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik* (KFB) in Regensburg übernommen. Die bereits von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Arbeiten zur Optimierung der Genexpression wurden 2009 veröffentlicht (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009).

In *C. reinhardtii* soll die Anwesenheit des Expressionskonstrukts über die Komplementierung einer im ausgewählten Stamm vorliegenden Arginin-Auxotrophie sichergestellt werden. Das Expressionsplasmid mit *his-tag* versehenem Luciferase-Gen wurde daher über Cre-lox-Sequenzen mit dem Selektionsplasmid (Arg7.8 für die Supplementierung einer Arginin-Auxotropie) nach Heitzer und Zschoernig (2008) fusioniert und in die Alge transformiert. Die ursprünglich zur Transformation des Luciferase-Gens ausgewählten Arginin-auxotrophen Stämme cc1618 und cc3404 erreichten jedoch selbst in supplementierendem Vollmedium nur 20 % der Zelldichten von prototrophen Stämmen. Daher wurde im weiteren Verlauf des Projekts das Expressionsplasmid mit einem Selektionsplasmid, das das Gen *aph7* (Resistenz gegenüber Hygromycin; Heitzer und Zschoernig, 2007) enthält, fusioniert und für die Transformation in die Stämme cc400 und SAG83.81 verwendet. In diesen Fällen wurden Transformanten entsprechend auf Hygromycin-haltigem Medium selektioniert. Die Transformation der linearisierten DNA-Sequenzen in das Kerngenom von *C. reinhardtii* wurde mittels Glaskügelchen-Methode nach Kindle (Kindle, 1990) durchgeführt. Die erfolgreiche Integration in das Kerngenom wurde mittels PCR und nachfolgendem Nachweis auf Luciferase-Aktivität mittels Biolumineszenz-Assay nachgewiesen.

Aufgrund der Exportsequenz der Arylsulfatase liegt bei der Expression des crLuc-Gens das Enzym Luciferase sowohl in den Zellen als auch im Kulturüberstand vor. Die Aktivität des Enzyms kann anhand der Umsetzung des Substrats Coelenterazin zu Coelenteramid bzw. der bei Produktbildung freigesetzten Lumineszenz nachgewiesen werden. Zu Beginn des Projektes wurde ein Assay-Kit von Promega verwendet, das für Verwendung mit tierischen Zellen optimiert ist. Die Verwendung dieses Kits zur Quantifizierung der Luciferase in *C. reinhardtii* implizierte jedoch verschiedene Herausforderungen, da vermutlich Bestandteile der mitgelieferten Pufferlösung den linearen Zusammenhang zwischen Lumineszenz und vorliegender Konzentration der in *C. reinhardtii* produzierten Luciferase stören. Da der Hersteller die genauen Bestandteile der Pufferlösungen und für den Kit notwendigen Komponenten nicht bekannt gibt, sollte zunächst im weiteren Verlauf die Quantifizierung der Luciferase mittels Reinsubstrat Coelenterazin (Fa. PJK) und Puffer mit bekannter Zusammensetzung nach Shao und Bock (Shao und Bock, 2008) durchgeführt werden. Aufgrund zahlreicher weiterer inhibitorischer Einflüsse von im Medium enthaltenen zweiwertigen Ionen, Substrat und gebildetem Produkt war jedoch auch mit dieser Methodik eine exakte Quantifizierung der Enzymaktivität nicht realisierbar. Der direkte Vergleich der Proteinaktivitäten der Luciferase aus *C. reinhardtii* mit einer in *E. coli* exprimierten Luciferase bekannter Konzentration (Fa. PJK) konnte aufgrund unterschiedlicher pH-Optima der beiden Enzyme und unterschiedlicher Pufferbedingungen ebenfalls nicht zur Quantifizierung herangezogen werden.

Von je 48 unter verstärktem Selektionsdruck gewachsenen Mutanten der Stämme cc400 und SAG83.81 wurden je 24 mittels PCR analysiert. 16 positiv getestete Klone des Stammes cc400 und 18 positive Mutanten des Stammes SAG83.81 wurden im direkten Vergleich bei identischen Bedingungen hinsichtlich der Luciferase-Aktivität analysiert (Abbildung 2). Anhand der maximalen

Lumineszenz-Intensitäten (*relative luminescence units*, r.l.u.) wurden die Expressionsraten beurteilt. Der Klon cc400 crLuc16 wurde aufgrund höherer maximaler Zelldichten sowie hohen Expressionsraten für crLuc für die weiteren Untersuchungen bezüglich der Ausschleusung des Luciferase-Proteins und dessen Glykosylierung ausgewählt (Abbildung 2).

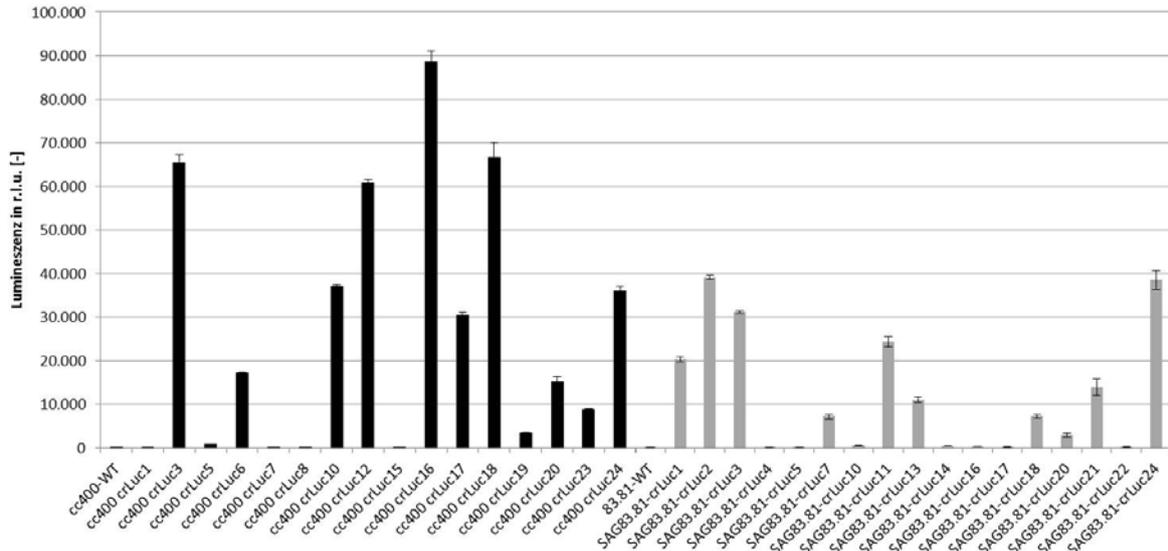


Abbildung 2: Luciferase-Aktivität (Lumineszenz in r.l.u.; Mittelwert aus Dreifachbestimmungen) von Kulturüberständen verschiedener crLuc-Mutanten der *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme cc400 (schwarz) und SAG83.81 (grau), bei denen die Integration des crLuc-Gens in das Kerngenom mit PCR nachgewiesen werden konnte (Substrat Coelenterazin, Fa. PJK).

Um als Plattform zur Produktion rekombinanter Proteinen zu bestehen, ist neben der human-ähnlichen Glykosylierungsstruktur vor allem die in der Alge produzierte Proteinmenge ausschlaggebend. Die exakte Quantifizierung der produzierten Proteinmenge ist somit sowohl für den wirtschaftlichen Aspekt als auch zur Überprüfung der Effizienz der einzelnen Aufreinigungsschritte relevant.

Zur Quantifizierung des Proteins sowie zur exakten Bestimmung des Molekulargewichtes sollte das Enzym über den C-terminalen his-tag immunologisch mittels Western Blot und ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) analysiert werden. Die Proben wurden zunächst aus dem Kulturüberstand entnommen, da der Proteinexport mittels ARS2-Sequenz laut Literatur bis zu 70 % beträgt und somit das Protein hauptsächlich im Kulturüberstand vorliegen sollte (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Außerdem ist die Gewinnung des Proteins aus dem Medium aufgrund der geringeren Kosten des *downstream*-Prozesses im Vergleich zur Proteingewinnung aus den Produktionszellen für eine zukünftige kommerzielle Proteinproduktion von besonderem Interesse.

Neben dem äußerst sensitiven Nachweis im Luciferase-Assay sollte die Quantifizierung des Proteins Luciferase im Medienüberstand mittels ELISA durchgeführt werden. Für diesen Nachweis wurden Antikörper eingesetzt, die den C-terminalen his-tag des Enzyms erkennen. Da die durchgeführten ELISA-Messungen mit anti-his-tag-Antikörpern jedoch falsch-positive Signale für den zur Kontrolle mitgeführten Wildtypstamm cc400 zeigten, wurde die spezifische Bindung verschiedener anti-his-tag-Antikörper (Fa. eBioscience, Fa. Qiagen, Fa. Roche, Fa. Carl Roth) am his-tag des Zielprotein Luciferase im Western Blot überprüft. Aufgrund der geringen Proteinkonzentration im Medienüberstand (Abbildung 3 B) wurden zusätzlich auch die Proteine aus der Zellbiomasse für weitere Versuche herangezogen. Sämtliche getesteten anti-his-tag-Antikörper wiesen jedoch für die

Luciferase im Kulturüberstand sowie Zellpellet keine eindeutigen Ergebnisse auf. Da die Detektion von unerwarteten, unspezifischen Banden mit den anti-*his-tag*-Antikörper bei Proteinen aus dem Wildtyp auch auf Kontaminationen des Wildtyps mit mutierten Zellen zurückzuführen sein könnte, wurden spezifische anti-*Renilla* Luciferase-Antikörper zum Nachweis der Luciferase im Kulturüberstand und in den Zellen eingesetzt (Abbildung 3 A). Sowohl in den Zellen der Mutante cc400 crLuc16 als auch des Wildtyps cc400 konnten im Western Blot unter Verwendung der anti-*Renilla* Luciferase-Antikörper die gleichen Banden (15 kDa, 33 kDa und 50 kDa) angefärbt werden (Abbildung 3 A). Das erwartete Molekulargewicht der Luciferase liegt bei 33-37 kDa (Loening *et al.* 2007) und korrespondiert gut mit der mittleren Bande bei ca. 33 kDa.

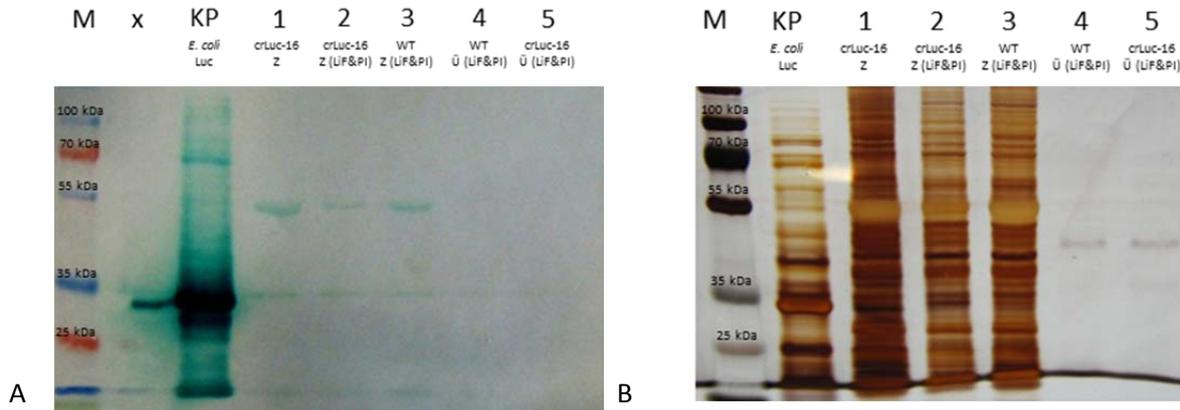


Abbildung 3: Western Blot mit anti-*Renilla* Luciferase-Antikörpern (A) und dazu gehöriges mit Silber-gefärbtes SDS-PAGE (B) von Proben aus lysierten Zellen (Z) sowie Überstand (Ü) einer Luciferase-Mutante cc400 crLuc16. Die Proben auf Spur 2-5 wurden mit Lithiumfluorid (LiF) und Proteaseinhibitor (PI) behandelt. Neben dem Größenmarker (M) wurde als Kontrollprotein in *E. coli* exprimierte Luciferase (Fa. PJK) aufgetragen (in Spur x sind Marker und Kontrollprotein eingelaufen). Das erwartete Molekulargewicht der Luciferase liegt bei 33-37 kDa (Loening *et al.* 2007).

Da das Ergebnis des Western Blots möglicherweise auf eine Kontamination des Wildtyps mit Mutanten zurückzuführen sein könnte, wurden nachfolgend alle am Lehrstuhl verfügbaren *C. reinhardtii*-Stämme mittels anti-*Renilla* Luciferase-Antikörper im Western Blot bezüglich unspezifischer Bindungen getestet. Alle untersuchten Wildtyp-Proben zeigten Bandenmuster analog zu Abbildung 3 A (Spur 3 bzw. 4), sodass die vom anti-*Renilla* Luciferase-Antikörper erkannten Aminosäuresequenzabschnitte des Luciferase-Proteins offensichtlich natürlicherweise im Algenproteom vorkommen. Aufgrund dieser unspezifischen Erkennung von Peptidsequenzen auch bei Wildtypstämmen war der eindeutige Nachweis des Luciferase-Proteins im Western Blot oder mittels ELISA nicht möglich.

Laut Literaturangaben beträgt bei *C. reinhardtii* der Export von im Kerngenom codierten Proteinen in den Kulturüberstand bis zu 1 µg/mL (Eichler-Stahlberg *et al.*, 2009). Um die Proteinmenge im Medienüberstand zu erhöhen und somit den Nachweis zu erleichtern, wurden verschiedene Methoden zur Aufkonzentrierung des Proteins untersucht. Über einen Filtrationsansatz sollten zunächst möglichst viele störende Moleküle anhand des Molekulargewichts mittels Ultrafiltration über Pellicon-Membrankartuschen (*molecular weight cut off* 10 kDa und 300 kDa; Fa. Millipore) abgetrennt und das 33-37 kDa große Luciferase-Protein anschließend aufkonzentriert werden. Die resultierende geringe Proteinwiederfindung konnte anhand von Tests mit Rinderserumalbumin (BSA) nachvollzogen werden, bei denen der Proteinverlust an der Filtrationsmembran mit 70 % ermittelt wurde. Da sich die benutzen Filterkartuschen offensichtlich nicht für diese Anwendung eignen, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, das Luciferase-Protein mittels Ammoniumsulfat

auszufallen. Die Proteinkonzentration im Medienüberstand ist jedoch so gering, dass die Fällungsgrenze von 1 mg/mL Protein (Rehm, 2006) nicht erreicht werden konnte. Neben der Proteinaufkonzentrierung wurde die Stabilisierung der isolierten Proteinmengen mittels Proteaseinhibitoren sowie die Reduzierung der Proteinbindung an die Zellmembranen mittels Lithiumfluorid untersucht. Mit beiden Zusätzen konnte im Luciferase-Assay eine Erhöhung des Lumineszenz-Signals erreicht werden, eine eine signifikante Steigerung der Proteinmenge im Western Blot mit anti-*Renilla* Luciferase-Antikörpern war jedoch nicht erkennbar (Abbildung 3 A, Spur 1-3).

Die im Rahmen des Projektes vorgesehene exakte Bestimmung der ausgeschleusten Enzymkonzentration konnte aufgrund der oben bereits dargelegten Schwierigkeiten bei der Quantifizierung mittels Messung der Lumineszenz bis dato nicht vorgenommen werden. Aus dem Lumineszenzsignal im Assay sind jedoch Rückschlüsse bezüglich der Enzymmenge möglich. Ein erhöhtes Lumineszenzsignal resultiert demnach aus einer höheren Luciferase-Konzentration. Dies ermöglicht die relative Bestimmung der ausgeschleusten im Vergleich zu der in den Zellen verbleibenden Luciferase-Konzentration. Bei der Bestimmung dieses Verhältnisses über den Kultivierungsverlauf zeigte sich jedoch eine Abhängigkeit der ausgeschleusten Proteinmenge von den Wachstumsbedingungen (z. B. Nährstoff- und Lichtverfügbarkeit), welche während der einzelnen Wachstumsphasen deutlich variierten. So wird in den ersten 20 h der exponentiellen Wachstumsphase zunächst mehr Protein ausgeschleust, als in den Zellen verbleibt (Abbildung 4 & 5). Im weiteren Verlauf der exponentiellen Phase bzw. linearen Wachstumsphase, in der aufgrund der Zellabschattung Lichtlimitierung eintritt, verbleibt mehr Protein in der Zelle (bis ca. 100, Abbildung 4 & 5). Mit Einsetzen der Retardationsphase steigt der Proteinexport ab einer Prozesszeit von 120 h an bis bei 136 h sowohl die maximale Menge an Protein produziert als auch ausgeschleust wird, was durch den eintretenden Sulfatmangel und der damit verbundenen Ausschleusung von Proteinen durch die Arylsulfatase-Exportsequenz bedingt sein kann. Die Produktausbeute ist allerdings in dieser Phase nicht stabil und variiert erheblich innerhalb von 20-30 Stunden (136-160 h, Abbildung 5). Mit der stationären Phase nimmt ab 167 h die Menge des produzierten Proteins signifikant ab.

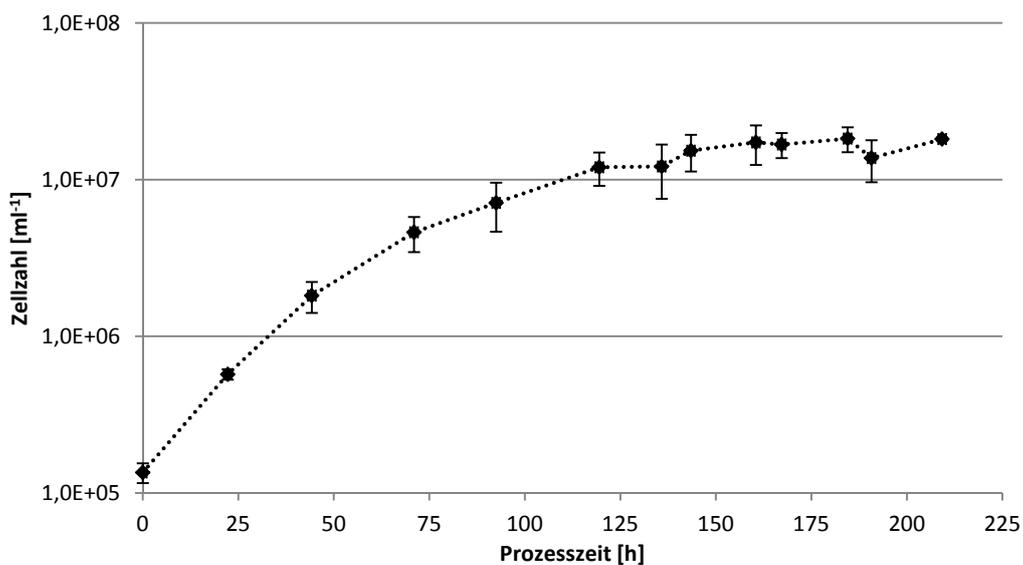


Abbildung 4: Wachstumskurve der Mutante cc400 crLuc16 (HSM-Medium, 25°C, 100 rpm, 40-50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

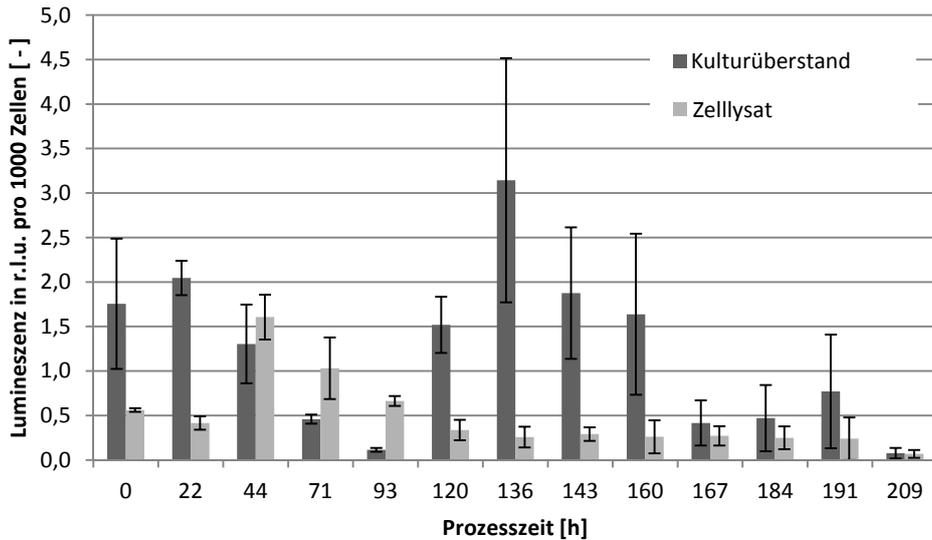


Abbildung 5: Vergleich der Luciferase-Aktivität (Lumineszenz in r.l.u.) der Mutante cc400 crLuc16 von Zellysate sowie dem Kulturüberstand in Abhängigkeit des Wachstums über 209 h.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wachstumsphasen einen enormen Einfluss auf die Expression und Luciferase-Aktivität sowie auf die Ausschleusung des Proteins haben, und stellen eine entscheidende Grundlage bezüglich des geeigneten Erntezeitpunkt rekombinanter Proteine sowie für die spätere Verwendung von *C. reinhardtii* als alternatives Proteinproduktionssystem dar.

Zusammenfassung und Ausblick

Das Modellprotein Luciferase konnte im Rahmen des Projektes erfolgreich in der Grünalge *C. reinhardtii* cc400 produziert und mittels Luciferase-spezifischem Lumineszenz-Assay identifiziert werden. Sowohl das Protein als auch dessen Protein-tags konnten jedoch mit verschiedenen Antikörpern und Nachweismethoden (Western Blot mit Tetramethylbenzidin (TMB) und *enhanced chemiluminescence* (ECL), ELISA; versch. Methoden zur Proteinaufkonzentrierung) nicht zweifelsfrei identifiziert werden, was auf das Plasmiddesign und die verwendeten Protein-tags zurückzuführen ist. Die im Projekt gewonnenen Ergebnisse liefern wertvolle Erkenntnisse für zukünftige Projekte, sodass für weitere Untersuchungen zur Expression von rekombinanten Proteinen in *C. reinhardtii* das Design des zugrundeliegenden Plasmids auch hinsichtlich der Verwendung und Positionierung von tags optimiert werden kann. Mittels alternativer tags, wie z. B. flag-, strep- oder HA-tag, die sowohl im Western Blot spezifisch nachgewiesen werden können als auch für die chromatographische Aufreinigung geeignet sind müssen, kann folglich die Analytik der Glykanstrukturen umgesetzt werden.

Die Glykanstrukturen der rekombinanten Luciferase konnten aufgrund der geschilderten Probleme noch nicht analysiert werden. Die Beantwortung der Fragestellung, ob die Grünalge als alternatives Expressionssystem für glykosylierte, rekombinante Proteine Einsatz finden kann, bleibt somit innerhalb des zeitlich begrenzten Rahmens des Projektes zunächst noch unbeantwortet.

Der Einsatz des Lumineszenz-Assay zum quantitativen Nachweis der produzierten Proteinmengen stellte sich aufgrund zahlreicher und wegen des Zellstoffwechsels in variablen Konzentrationen vorliegender Inhibitoren als nicht umsetzbar heraus. Die im Rahmen des Projektes vorgesehene

exakte Bestimmung der ausgeschleusten Mengen des rekombinanten Proteins Luciferase konnte daher nicht vorgenommen werden. Anhand des relativen Lumineszenz-Signals war jedoch eine deutliche Abhängigkeit der ausgeschleusten Proteinmenge von der Wachstumsphase zu verzeichnen. Dieser Zusammenhang liefert wertvolle Informationen für die spätere Prozessentwicklung bzw. Proteinernte.

Literatur

Eichler-Stahlberg, A., **2006**: *Verwendung der einzelligen Grünalge Chlamydomonas reinhardtii als Expressionssystem für Synthese und Export rekombinanter Proteine*. Dissertation

Eichler-Stahlberg, A.; Weisheit, W.; Ruecker, O.; Heitzer, M., **2009**: *Strategies to facilitate transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii*. Planta.

Fuhrmann, M.; Hausherr, A.; Ferbitz, L.; Schödl, T.; Heitzer, M.; Hegemann, P., **2004**: *Monitoring dynamic expression of nuclear genes in Chlamydomonas reinhardtii by using a synthetic luciferase reporter gene*. Plant Molecular Biology. 55. 869–881.

Heitzer, M.; Zschoerning, B., **2007**: *Construction of modular tandem expression vectors for the green alga Chlamydomonas reinhardtii using the Cre/lox-system*. BioTechniques. 43. 324–332.

Kindle, K. L., **1990**: *High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87. 1228–1232.

Loening, A. M., Fenn T. D., Gambhir S. S., **2007**. *Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from Renilla reniformis*. Journal of Molecular Biology 374(4). 1017-28

Rehm, H., **2006**: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 5. Auflage. Spektrum.

Shao, N.; Bock, R., **2008**: *A codon-optimized luciferase from Gaussia princeps facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga Chlamydomonas reinhardtii*. Current Genetics. 53. 6. 381–388.