

# Untersuchung der N-Glykosylierung rekombinanter Proteine aus *Chlamydomonas reinhardtii*

17599 N

Therapeutische Glykoproteine gewinnen zunehmend an Bedeutung in der Behandlung von Krankheiten. Die Herstellung dieser Proteine erfolgt zumeist teuer und aufwendig mit Säugerzelllinien. Damit werden allergische Reaktionen unterdrückt und die Wirksamkeit der Proteine gewährleistet, die durch posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen signifikant beeinflusst werden kann. Mit alternativen Expressionssystemen können Produktionskosten verringert und höhere Ausbeuten erzielt werden.

Die inzwischen gut charakterisierte einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* scheint ein vielversprechendes System zur Expression von Proteinen zu sein. Die Glykosylierungsstrukturen rekombinanter Proteine aus der Alge sind allerdings bislang noch unbekannt, obwohl sie für die Einschätzung der Eignung der Alge als Expressionssystem zwingend erforderlich sind. Daher sollten in diesem Projekt die Glykanstrukturen des rekombinant in der Alge hergestellten Proteins Erythropoetin charakterisiert werden.

Um eine möglichst effiziente Proteinexpression zu erreichen, wurden verschiedene Genkonstrukte (mit und ohne Ausschleussequenz sowie 3' *untranslated region*) entworfen. Außerdem wurden verschiedene Protein-*tags* (His, Flag, HA-*tag*) für eine vereinfachte Proteindetektion und -aufreinigung eingesetzt und verschiedene Algenstämme (cc400, cc503, UVM4) bezüglich ihrer Proteinproduktion getestet. Die Genkonstrukte wurden in das Kerngenom der Alge transformiert. Transformanten, die das Fremdgen nachweislich ins Genom integriert haben, wurden für den immunologischen Proteinnachweis im Western Blot eingesetzt, eine Erythropoetin-spezifische Bande konnte allerdings in keinem Fall nachgewiesen werden. Auch Genkonstrukte mit Protein-*tags* in dreifacher Kopienzahl waren nicht erfolgreich.

Da für die Gewinnung des Proteins eine gut produzierende Transformante unabdingbar ist, wurde auf die deutlich leichter nachweisbare humane  $\beta$ -Glucuronidase als Testprotein ausgewichen, um Optimierungsexperimente durchführen zu können. Neben dem immunologischen ist bei diesem auch ein besonders sensitiver fluorometrischer Aktivitätsnachweis (Nachweisgrenze 20 pg) möglich, mit dem tatsächlich für zahlreiche Transformanten Proteinproduktion nachgewiesen werden konnten. Eine besonders gut produzierende Transformante wurde ausgewählt, um Optimierungsversuche zur Kultivierung durchzuführen. So konnte durch eine Medienvariation und zusätzlicher Begasung mit Kohlenstoffdioxid eine 350 fache Produktionssteigerung des  $\beta$ -Glucuronidase-Proteins erzielt werden. Trotz dieser deutlich optimierten Kultivierungsbedingungen konnte allerdings auch in den  $\beta$ -Glucuronidase-Transformanten noch keine Proteinbande im Western Blot nachgewiesen werden.

Offenbar werden beide eingesetzten Proteine (Erythropoetin und  $\beta$ -Glucuronidase) zumindest in den bisher untersuchten Transformanten nur sehr schwach synthetisiert, so dass weitergehende Experimente erforderlich sind. Aufgrund der nachgewiesenen Proteinaktivität wurde aber eine Transformante dennoch zur Proteinproduktion unter optimierten Bedingungen in den *photobioreactor screening modules* des Lehrstuhls kultiviert. Die Aufarbeitung dieser Biomasse steht allerdings noch aus.

Die zur Glykananalytik erforderlichen Methoden zur Bestimmung der Monosaccharidzusammensetzung und weiterführend zur Identifizierung der Zuckersequenz konnten erfolgreich etabliert und an Standards getestet werden. Sie können sofort eingesetzt werden, wenn aus transgenen *C. reinhardtii*-Zellen isolierte glykosylierte Proteine zur Verfügung stehen.

Bearbeitet wurde das Forschungsthema von 12/12 bis 05/15 an der **Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut für Chemie- und Bioingenieurwesen, Lehrstuhl Bioverfahrenstechnik** (Paul-Gordan-Str. 3, 91052 Erlangen, Tel.: 09131/85-23022) unter der Leitung von Dr. Stephanie Stute (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. Rainer Buchholz).

[--> TIB](#)

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

Das IGF-Vorhaben Nr. 17599 N der Forschungsvereinigung DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages