Inclusion body-Prozessierung

Von der Wurzel ins Labor: Meerrettichperoxidase produziert in *E. coli*

JULIAN EBNER, DIANA HUMER, OLIVER SPADIUT
IBD-GROUP; INSTITUT FÜR VERFAHRENSTECHNIK, UMWELTECHNIK
UND TECHN. BIOWISSENSCHAFTEN, TU WIEN

The enzyme Horseradish Peroxidase (HRP) is omnipresent in modern biotechnology. Although promising for therapeutic purposes, no suitable production process for this enzyme has been available until now. Medical applications require the enzyme to be highly pure, homogeneous and well-defined. We have developed an efficient production process for recombinant HRP from *Escherichia coli* inclusion bodies. With this strategy we are able to provide active, highly pure and non-glycosylated enzyme at competitive yields.

DOI: 10.1007/s12268-021-1660-y
© Die Autorinnen und Autoren 2021

■ Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) ist ein in der Meerrettichwurzel vorkommendes Enzym aus der Klasse der Peroxidasen. Generell spielen Peroxidasen eine wichtige Rolle in der Pflanzenzelle, z. B. beim Zellwandmetabolismus, als Reaktion auf oxidativen Stress oder beim Wachstum von Wurzeln und Trieben [1]. Dennoch konnte die physiologische Funktion der HRP bis heute nicht vollständig geklärt werden. Hingänglich bekannt ist allerdings, dass HRP eine große Bandbreite aromatischer Verbindungen oxidiert. Diese Fähigkeit macht man sich seit Jahrzehnten in Forschung und Industrie zunutze, wo HRP vor allem als „Reporterenzym“ verwendet wird.

Bereits 1810 beschrieb Louis Antoine Planché das Auftreten einer intensiv blauen Färbung, sobald ein Stück Meerrettichwurzel mit Guajak-Tinktur benetzt wurde. Der Grund hierfür ist die im Wurzelgewebe vorhandene HRP, welche die Oxidation verschiedener in der Tinktur enthaltener Phenolverbindungen zu radikalischen Produkten katalysiert. Wie bereits bei der Guajak-Tinktur beobachtet, absorbieren viele Reaktionsprodukte der HRP sichtbares Licht.

Dadurch ergibt sich eine einfach zugängliche Messgröße, die direkt mit der Menge an HRP im Reaktionsgemisch korreliert. An Nukleinsäuren, Antikörper oder andere Pro-

teine konjugiert, kann HRP so für Immunoassays, Mikroarrays und medizinisch-diagnostische Tests verwendet werden. Dies ermöglicht die Detektion und Mengenbestimmung verschiedenster Moleküle, Proteine und Virenpartikel [2]. In den letzten Jahren ist mit der spezifischen Krebsimmuntherapie (*targeted cancer treatment*) eine weitere Anwendungsmöglichkeit für HRP in den Fokus gerückt. Diese neue Therapieform bietet eine vielversprechende, nebenwirkungs-

arme Alternative zu herkömmlichen Strahlen- oder Chemotherapien [3, 4].

Gerade für diese Anwendung ist die großtechnische Gewinnung durch Isolation aus der Meerrettichwurzel ein Problem, da das Enzym aufgrund seiner Zuckerketten (Glykosylierung) schnell aus dem Körper ausgeschieden wird oder gar eine Immunantwort beim Menschen auslöst [5]. Weitere Nachteile dieser Produktionsstrategie sind niedrige Ausbeuten und eine heterogene Mischung verschiedener Isoenzyme der HRP. Isoenzyme besitzen unterschiedliche biochemische Eigenschaften und sind damit für medizinische Anwendungen ungeeignet, da ein hochreines Enzym mit einer definierten Zusammensetzung benötigt wird. Aus diesem Grund ist die Entwicklung einer rekombinanten, biotechnologischen Herstellungsmethode für die HRP sehr erstrebenswert. Dazu wird die genetische Information des genau definierten Produkts gezielt in einen Wirtsorganismus eingebracht. Etablierte Wirtsorganismen sind dabei Säugetierzellen, Hefen oder das Bakterium *Escherichia coli*.

Dennoch existiert derzeit keine rekombinante Herstellungsmethode, welche kommerziell mit jener aus der Pflanze konkurrieren kann, obwohl z. B. Bakterien als Wirts-

▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der wichtigsten Strukturmerkmale der Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP). In Summe enthält eine funktionsfähige Enzymeinheit ein Hämin, zwei Calciumionen, vier Disulfidbindungen und neun potenzielle Glykosylierungsstellen. Darstellung mittels UCSF Chimera [7].

organismen den Vorteil einer schnellen und kostengünstigen Kultivierung bieten [6]. Der Grund hierfür findet sich in der besonderen Struktur der HRP, welche beispielhaft in **Abbildung 1** gezeigt ist. HRP ist ein Metalloenzym, welches einen organischen Eisenkomplex, die Häm-Gruppe, im aktiven Zentrum trägt. Zudem benötigt das funktionsfähige Enzym zwei Calciumionen und vier Disulfidbindungen für strukturelle Stabilität. In der Pflanze werden zusätzlich noch an mehreren definierten Aminosäuren Zuckerketten angehängt, die Glykosylierung. Wird HRP nun, wie oben erwähnt, in *E. coli* produziert, so können manche posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie z. B. die Glykosylierung, nicht durchgeführt werden. Dadurch kann sich das produzierte Protein in der Bakterienzelle nicht richtig falten und es bilden sich unlösliche Proteinaggregate. Diese Aggregate lagern sich in weiterer Folge zu Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) zusammen.

Somit erscheint die Herstellung in *E. coli* auf den ersten Blick als ungeeignet. Jedoch besteht die Möglichkeit, die unlöslichen Proteinaggregate *in vitro* in ihre native Faltung zu überführen. Dabei werden die Aggregate

in einem ersten Schritt denaturiert und dadurch in Lösung gebracht (Solubilisierung). Im Anschluss wird die chemische Umgebung so verändert, dass die einzelnen Proteinketten wieder in ihre native Konformation überführt werden (Faltung) [8]. Aufgrund der komplexen Struktur konnten während der *in vitro*-Faltung bisher allerdings nur niedrige Ausbeuten erreicht werden. Unter Berücksichtigung der besonderen Anforderungen dieses Enzyms haben wir kürzlich einen gesamtheitlichen Herstellungsprozess für die HRP entwickelt (Patent Nr. EP20165131.2) [9]. Die einzelnen Prozessschritte von der Fermentation bis zur Proteinreinigung sind in **Abbildung 2** gezeigt und können in drei Abschnitte eingeteilt werden:

1. Kultivierung von *E. coli*, Zellaufschluss und Isolation der *inclusion bodies* (Produktionsprozess)
2. Solubilisierung, *in vitro*-Faltung und Aktivierung durch Zugabe von Hämin (Renaturierungsprozess)
3. Abtrennung von Verunreinigungen und Aufkonzentrierung der HRP (Reinigungsprozess)

Im ersten Schritt werden rekombinante *E. coli*-Zellen in einem Bioreaktor kultiviert. Dies ermöglicht die Produktion von HRP in Form von *inclusion bodies* unter kontrollierten Bedingungen. Danach erfolgt der Zellaufschluss, um die in der Zelle lokalisierten und unlöslichen *inclusion bodies* freizusetzen. Diese werden anschließend mittels Zentrifugation von löslichen Verunreinigungen getrennt. Im zweiten Schritt, dem Renaturierungsprozess, wird nun aus den isolierten *inclusion bodies* wieder funktionsfähige und richtig gefaltete HRP gewonnen. Dazu wird das Protein während der Solubilisierung in eine lösliche Form überführt, wobei alle Disulfidbindungen vollständig geöffnet werden. Dies geschieht im Allgemeinen durch die Zugabe eines Reduktionsmittels. Im nächsten Schritt, der *in vitro*-Faltung, müssen die reduzierten Cysteine mithilfe eines Oxidationsmittels wieder zu Disulfidbindungen überführt werden [10]. In diesem Fall ist die Ausbeute der Faltungsreaktion nicht nur von der gewählten Konzentration des Oxidationsmittels abhängig, sondern zeigt auch eine Interaktion mit der gewählten Konzentration des Reduktionsmittels während der Solubilisierung. Um das funktionsfähige Enzym zu bilden, benötigt HRP außerdem eine Häm-Gruppe im aktiven Zentrum. Die Zugabe des Hämins zu Beginn der *in vitro*-Faltung resultiert jedoch in einer stark verringerten Ausbeute, da Fehlfaltungen der HRP gefördert werden. Aus diesem Grund wird Hämin im von uns entwickelten Prozess am Ende der *in vitro*-Faltung kontinuierlich über mehrere Stunden zugesetzt. Die dadurch erreichte geringe, aber konstante Hämin-Konzentration fördert den Einbau des Hämins ins aktive Zentrum und führt zu einer signifikanten Steigerung der Ausbeute. Trotz dieser Verbesserungen liegt ein Teil des Hämins am Ende des Prozesses ungebunden – und damit als Verunreinigung – vor. Daher erfolgt im letzten Schritt die Reinigung der korrekt gefalteten HRP. Hierfür wird zuerst überschüssiges Hämin und nicht korrekt gefaltete HRP mittels Salzfällung abgetrennt. Die noch in Lösung befindliche aktive HRP wird dann durch eine präparative Chromatographie (hydrophobe Interaktionschromatographie) von den verbleibenden Verunreinigungen getrennt und konzentriert.

Durch die integrierte Prozessentwicklung und die Berücksichtigung der speziellen Anforderungen wird eine Ausbeute von 960 Milligramm reiner ($\geq 99\%$), nicht glykosylierter HRP pro Liter Fermentationsbrühe

erreicht. Dies ist eine deutliche Erhöhung zu den bekannten Werten aus der Literatur (ca. 20 mg/L) [11]. Wie exemplarisch für die HRP gezeigt wurde, gelingt es mithilfe moderner Methoden der biotechnologischen Prozessentwicklung, selbst für komplexe Proteine effiziente Produktionsstrategien zu entwickeln. Dadurch werden sich auch in Zukunft herausfordernde und spannende neue Anwendungsgebiete für die rekombinante Proteinproduktion in *E. coli* ergeben.

Danksagung

Wir bedanken uns für die Unterstützung dieser Arbeit durch den Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (FWF, Projektnummer P30872-B26) und dem Stipendium der Monatshefte für Chemie (MoChem). Wir danken den Entwicklern der Programme UCSF Chimera und BioRender, welche für die Erstellung der **Abb. 1** bzw. **Abb. 2** verwendet wurden. ■

Literatur

[1] Veitch NC (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249–259

- [2] Pandey VP, Awasthi M, Singh S et al. (2017) A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem* 6: 308
- [3] Folkes LK, Greco O, Dachs GU et al. (2002) 5-Fluorindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 63: 265–272
- [4] Bonifert G, Folkes L, Gmeiner C et al. (2016) Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment. *Cancer Med* 5: 1194–203
- [5] Brooks SA (2004) Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system. *Mol Biotechnol* 28: 241–256
- [6] Krainer FW, Glieder A (2015) An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 1611–1625
- [7] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC et al. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612
- [8] Eggenreich B, Willim M, Wurm DJ et al. (2016) Production strategies for active heme-containing peroxidases from *E. coli* inclusion bodies – a review. *Biotechnol Rep (Amst)* 10: 75–83
- [9] Humer D, Ebner J, Spadiut O (2020) Scalable high-performance production of recombinant horseradish peroxidase from *E. coli* inclusion bodies. *Int J Mol Sci* 21: 4625
- [10] Lange C, Rudolph R (2008) Oxidative Proteinfaltung in vitro. *BIOspektrum* 4: 376–378
- [11] Gazaryan IG, Chubar TA, Ignatenko OV et al. (1999) Tryptophanless recombinant horseradish peroxidase: stability and catalytic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 297–301

Funding note: Open Access funding enabled and organized by TU Wien (TUW).
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und

angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Oliver Spadiut, Diana Humer und Julian Ebner (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Oliver Spadiut
 IBD-Group
 Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik
 und Techn. Biowissenschaften
 TU Wien
 Gumpendorferstraße 1a
 A-1060 Wien
oliver.spadiut@tuwien.ac.at

Hier steht eine Anzeige.

Springer