

PRAXIS

Eine Publikation von Bioengineering AG

Paul Scherrer Institut, PSI, Villigen, eine Forschungsanstalt des ETH-Bereichs (Eidgenössische Technische Hochschule). Herstellung und Reinigung kompliziert gefalteter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris* in einem Kleinfärmer von Bioengineering.

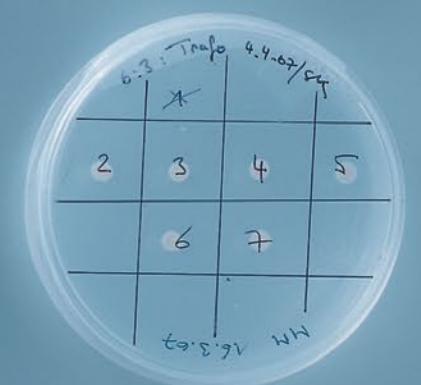
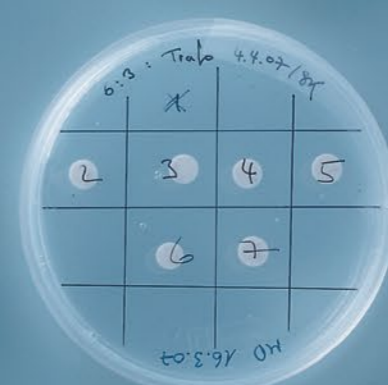
BIOENGINEERING

Bioengineering AG
Sagenrainstrasse 7, 8636 Wald, Schweiz
Telefon +41 (0)55 256 81 11, Fax +41 (0)55 256 82 56
info@bioengineering.ch, www.bioengineering.ch

Bioengineering – die Spezialisten
mit der weltweit anerkannten Erfahrung

Aare. 5.20 p. m.





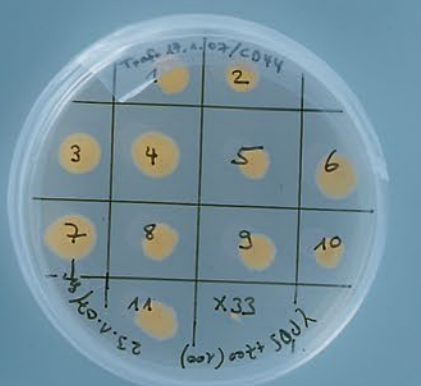
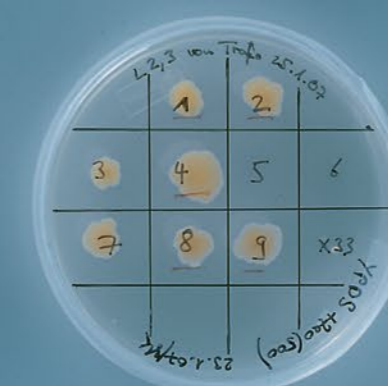
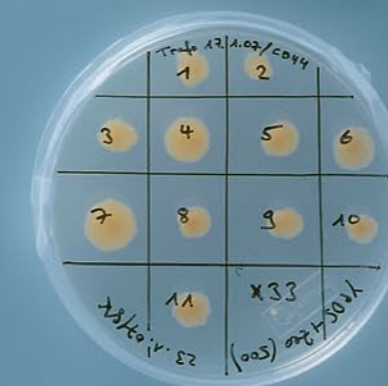
Biomolekulare Wissenschaften am PSI

Lea Noser, Kurt Ballmer-Hofer
 Paul Scherrer Institut
 Biomolekulare Wissenschaften, Molekulare Zellbiologie
 CH-5232 Villigen
 kurt.ballmer@psi.ch
 http://mcb.web.psi.ch

Inhalt

Biomolekulare Wissenschaften am Paul Scherrer Institut. 7
 Expression rekombinanter Proteine in Hefen 17
 Der Vorteil von Hefesystemen 17
 Methylorophe Hefen 17
 Pichia pastoris als Expressionssystem
 für rekombinante Proteine. 18
 Kultivierung von Pichia pastoris in einem Kleinfermenter 18
 Anwendungsbeispiel von Pichia pastoris. 22
 Produktion eines angiogenen Wachstumsfaktors
 (vascular endothelial growth factor, VEGF)
 für Strukturaufklärungen 22
 Strukturbestimmung eines VEGF-Liganden 23
 Schlussfolgerungen 24
 Referenzen 26

Die Verantwortung für die dargestellten Inhalte liegt bei der portraitierten Firma.
 Das Copyright für das Layout der Publikation «Praxis» liegt bei Bioengineering AG.





Biomolekulare Wissenschaften am Paul Scherrer Institut

Das Paul Scherrer Institut, PSI, in Villigen ist eine Forschungsanstalt des ETH Bereichs und somit eng mit den Eidgenössischen Technischen Hochschulen verbunden. Das PSI verfolgt als einen seiner Forschungsschwerpunkte Materialforschung, insbesondere die Aufklärung molekularer und atomarer Strukturen. Dazu betreibt das PSI drei Grossanlagen: die Synchrotronlichtquelle für die Erzeugung von Photonen, einen Protonenbeschleuniger zur Erzeugung hochenergetischer Protonen und Myonen und eine Neutronenquelle zur Erzeugung von Neutronen verschiedener Energie. Diese hochmodernen Werkzeuge werden für vielfältige Forschungsbereiche, vor allem zur Aufklärung kleinster Strukturen, eingesetzt. Das PSI betreibt mit der Gruppe *Biomolekulare Wissenschaften* auch grundlagenorientierte biologische Forschung, bei der Molekülstrukturen, hauptsächlich von Proteinen, untersucht werden. Diese Gruppe betreibt strukturelle und funktionelle Studien an Proteinen, die das Verhalten von Zellen regeln. Ein Schwerpunkt ist die Erforschung von membran gebundenen Proteinen, die bei der Signalübertragung aus der zellulären Umgebung ins Zellinnere wichtig sind. Sowohl Kanäle, die den Austausch verschiedener Moleküle durch die Zellmembran regeln, wie auch Rezeptoren, die Signale aus der zellulären Umgebung ins Zellinnere übertragen, werden untersucht. Eine Voraussetzung für solche Studien ist das Beherrschen verschiedener Expressionssysteme für die Herstellung von Proteinen in grossen Mengen und in hoher Reinheit. Die Gruppe setzt verschiedene Organismen dafür ein, unter anderem eine Vielzahl von Bakterienstämmen, die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* sowie Insektenzellen in Kombination mit Baculoviren und Säugerzellen.



Labor. 9.30 a. m.



Labor. 9.34 a. m.



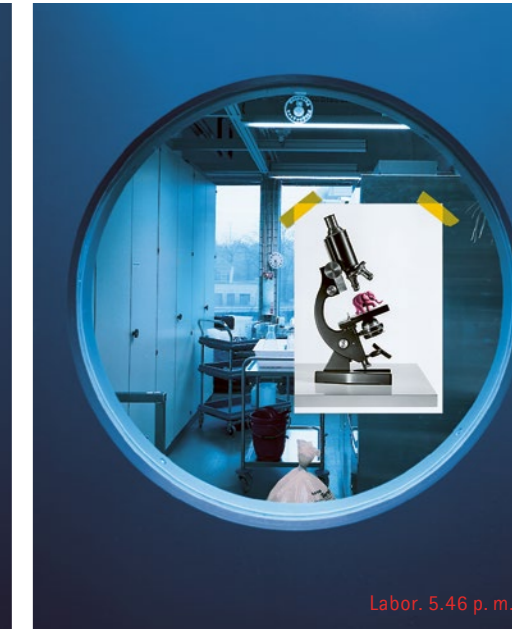
Labor. 10.41 a. m.



Labor. 2.12 p. m.



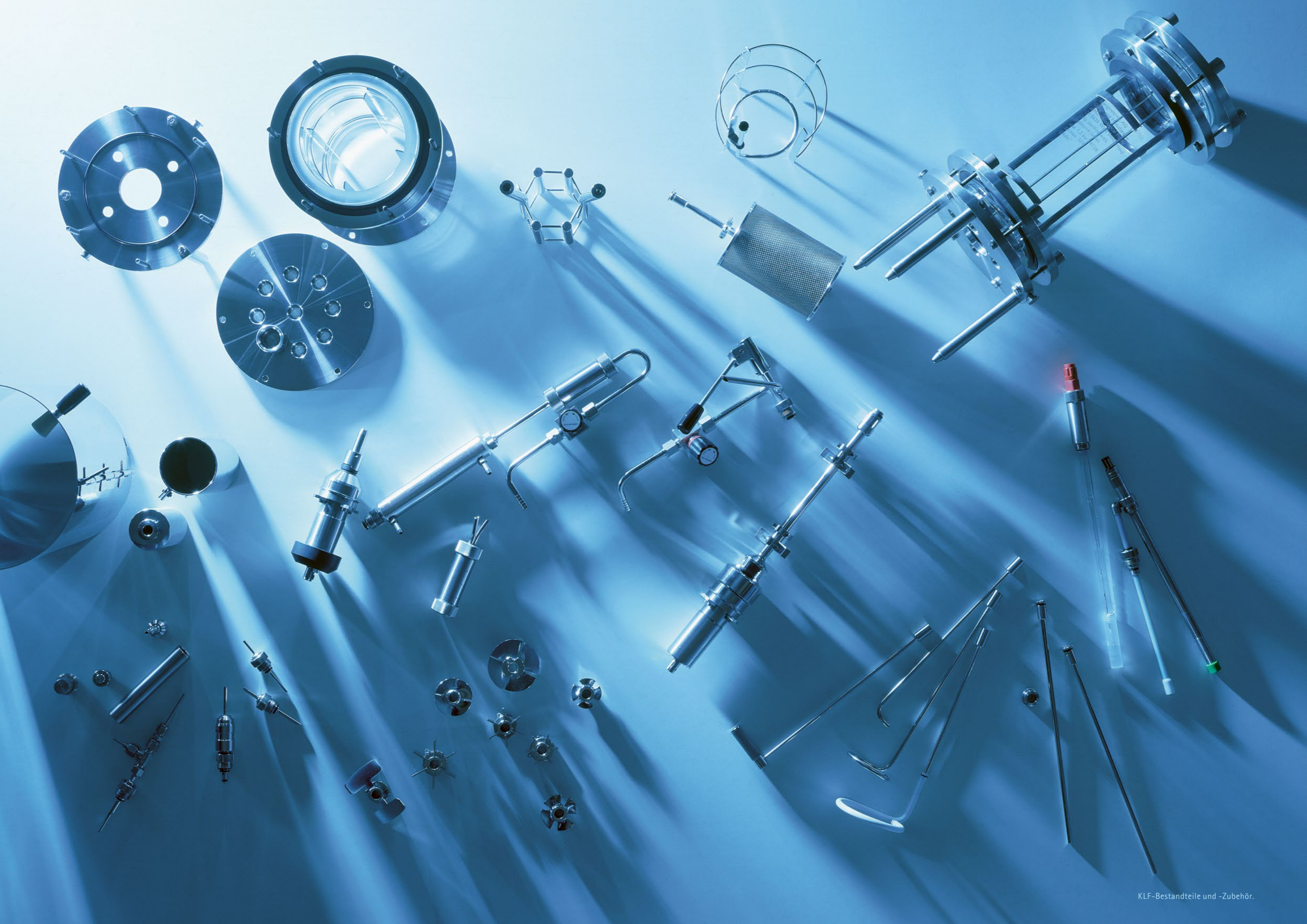
Labor. 3.07 p. m.

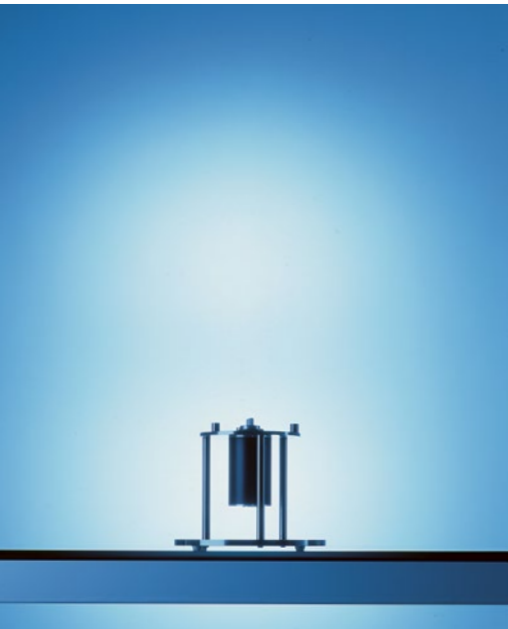


Labor. 5.46 p. m.

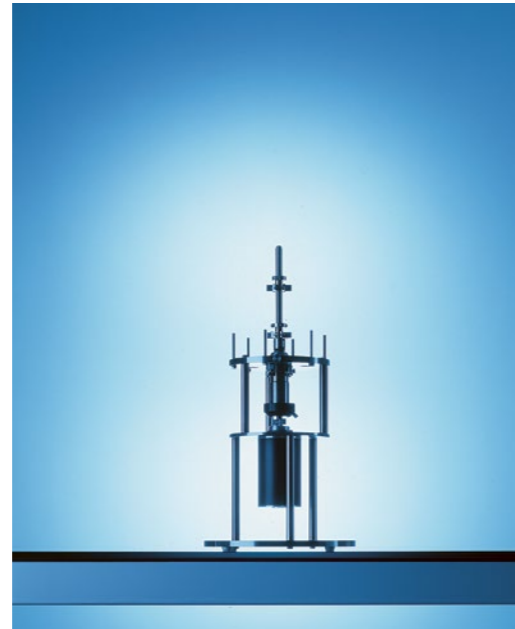
Die Herstellung und Reinigung von Proteinen im Milligramm-Massstab ist eine Grundvoraussetzung für strukturelle und funktionelle Studien in der modernen biologischen Forschung. Das Labor am PSI untersucht den Wirkungsmechanismus eines Wachstumsfaktors, *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, der die Bildung und das Verhalten von Blutgefässen steuert. VEGF ist ein kompliziert gefaltetes Eiweiss, dessen Produktion in grossen Mengen nur in höheren Organismen wie Hefen, Insekten- oder Säugerzellen zu bewerkstelligen ist. Unser Labor hat die Hefe *P. pastoris* als Wirtsorganismus gewählt. Diese Hefe kann gut in einem Kleinlaborfermenter kultiviert werden. Wir stellen eine Vielzahl von VEGF-Varianten für strukturelle und funktionelle biologische Studien her.







Grundlage für den Aufbau eines Kleinlaborfermenters bildet das Grundgestell mit Motor.



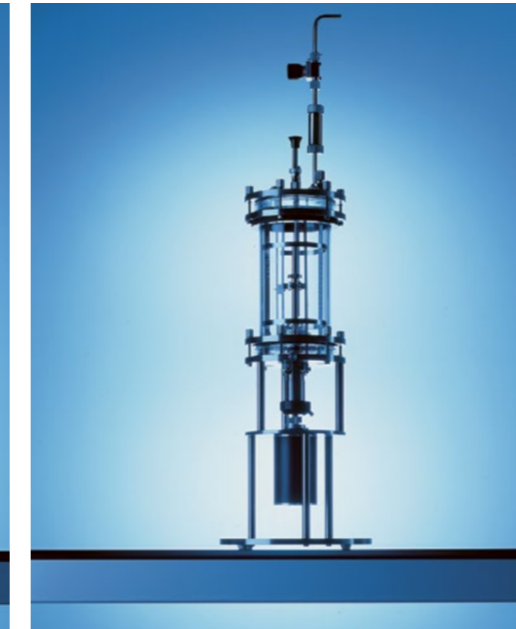
In einem weiteren Schritt wird der Boden mit Lagerungseinheit und Rührerwelle montiert.



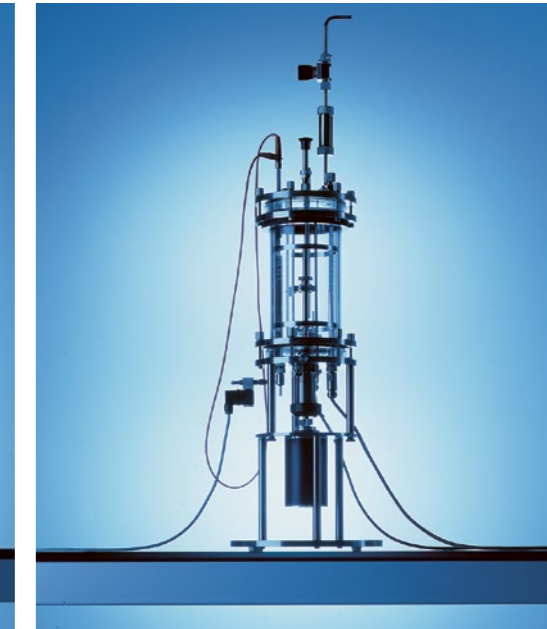
Das Glas wird mittels Klemmrings auf den Boden geklemmt.



Nach dem gleichen Klemmprinzip erfolgt die Montage des Deckels.



Weitere mechanische Bestand- und Zubehörteile wie Zu- und Abluftstrecke, Ventile, Heizung/Kühlung etc. werden eingebaut.



Abschliessend erfolgt der Einbau der Messkomponenten wie pH-, pO₂-Sonden etc.

Der Vorteil von Hefesystemen

Gegenüber bakteriellen Expressionssystemen liegt der Vorteil von Hefesystemen in der Möglichkeit zu posttranslationalen Modifikationen sowohl sekretierter Proteine als auch von Membranproteinen. Diese Hefen ermöglichen die korrekte Faltung der Proteine im endoplasmatischen Retikulum (ER), die proteolytische Prozessierung der neu synthetisierten Proteine im ER und im Golgiapparat, die Bildung von Disulfidbrücken im oxydierenden Milieu des ER und des Golgi sowie die Glykosylierung der Proteine im späten ER und im Golgi.² In bakteriellen Expressionssystemen werden eukaryotische Proteine oft nicht richtig gefaltet und werden dann von den Zellen in sogenannten *inclusion bodies* entsorgt. Das bedeutet, dass bakterielle Expressionssysteme oft denaturiertes Material liefern, das in einer Nachfaltung richtig prozessiert werden muss. Dieses Vorgehen ist bei extrazellulären Proteinen aus höheren Organismen oft sehr ineffizient. Der Vorteil von Hefeexpressionssystemen gegenüber Mehrzellern, wie Säuger- oder Insektenzellen, liegt in der schnelleren und billigeren Kultivierung, da weniger komplexe Medien eingesetzt werden müssen. Ausserdem werden in Hefen viel höhere Expressionsniveaus der rekombinanten Proteine erreicht. Hefen sind auch für die Produktion von pharmazeutischen Proteinen von grossem Vorteil, da die Produkte frei von Endotoxinen und einer allfälligen onkogenen oder viralen DNA sind. Zu den am häufigsten verwendeten Hefeexpressionssystemen gehört die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Allerdings hat in den letzten 30 Jahren die Verwendung von alternativen Hefeexpressionssystemen zur Produktion rekombinanter Proteine immer mehr an Bedeutung gewonnen. *S. cerevisiae* hat den Nachteil, in *Fed-Batch-Fermentationsverfahren* nicht zu hohen Zelldichten kultiviert werden zu können. Im Gegensatz dazu können andere Hefen, wie z. B. methylotrophe Hefearten, in der *Fed-Batch-Kultur* sehr hohe Zelldichten erreichen, was für die Proteinausbeute von grossem Vorteil ist.

Methylotrophe Hefen

Die Fähigkeit bestimmter Hefen, Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, ist vor über 30 Jahren von Koichi Ogata entdeckt worden.³ Methanol ist ein billiges Ausgangsmaterial und hat sich für die Kultivierung von methylotrophen Hefen in den 70er-Jahren als praktische Lösung bei der Gewinnung von Biomasse als Tierfutter erwiesen. Von diesen methylotrophen Hefen sind vier Gattungen bekannt: *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* und *Torulopsis*. Diese werden durch die Arten *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), *Candida boidinii* und *Pichia methanolica* repräsentiert. Durch den Einsatz geeigneter Promotoren kann die Proteinexpression auf Transkriptionsebene optimal, auch für toxische Proteine, kontrolliert werden. Methylotrophe Hefen besitzen durch Methanol induzierbare Promotoren, die aus Genen abgeleitet wurden, die dem Methanolstoffwechselweg (methanol utilisation pathway, MUT-pathway) dienen. Zu den bekanntesten Promotoren gehört der AOX1-Promotor des Locus, der in *P. pastoris* für das erste Enzym des MUT-Stoffwechselweges, eben die Alkoholoxidase 1, zuständig ist. Zusammen mit den entsprechenden Promotoren (Alkoholoxidasepromotoren) aus anderen methylotrophen Hefen werden diese häufig zur Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt.

Nur in *H. polymorpha* wird nicht der Alkoholoxidasepromotor des ersten MUT-Stoffwechsell-enzym Methanoloxidase (MOX) verwendet. Anstelle dieses Promotors wird am häufigsten der Promotor der Formaldehydhydrogenase (FMD) für die kontrollierte Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. Unter den methylotrophen Hefen werden bevorzugt *P. pastoris* und *H. polymorpha* zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt. *H. polymorpha* wird dank der guten Fermentationscharakteristiken primär für industrielle Anwendungen verwendet. Mit einem Temperaturoptimum zwischen 30–43 °C ist diese Hefe thermotoleranter als *P. pastoris* mit einem Optimum um die 30 °C. Zusätzlich ist eine schnellere Kultivierung mit hoher Produktausbeute möglich, ohne dabei auf die Verwendung von Methanol angewiesen zu sein. *P. pastoris* ist ein in der Forschung oft benutztes Expressionssystem, wobei auf ein kommerzielles Kit von Invitrogen zurückgegriffen werden kann. *P. pastoris* wird aber auch in der industriellen Biotechnologie verwendet. Viele Proteine aus *P. pastoris* sind bereits generiert worden, inklusive Proteine für detaillierte Strukturanalysen. Vor einigen Jahren ist neben den beiden gängigen methylotrophen Hefen für die Proteinexpression auch ein Produktionssystem, basierend auf *C. boidinii*, beschrieben worden.

Pichia pastoris als Expressionssystem für rekombinante Proteine

Die Verwendung der methylotrophen Hefe *P. pastoris* hat sich aus verschiedenen Gründen als sehr erfolgreiches Expressionssystem für rekombinante Proteine erwiesen. Neben der bereits erwähnten kontrollierten Genexpression über den AOX1-Promotor kommen weitere Vorteile hinzu. Die Techniken zur genetischen Manipulation von *P. pastoris* sind jenen der sehr gut charakterisierten Expressionsorganismen *S. cerevisiae* sehr ähnlich und einfach durchzuführen. Auch die Möglichkeit der Kultivierung zu sehr hohen Zelldichten macht *P. pastoris* für die Kultivierung in Fermentern interessant. Dadurch wird sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre Produktion von Fremdproteinen in hohen Mengen ermöglicht. Neben der Verwendung als Expressionssystem für rekombinante Proteine wird *P. pastoris* sekundär auch als Modellorganismus in der Zellbiologie eingesetzt. Für die erfolgreiche Proteinexpression mit *P. pastoris* sind verschiedene Punkte wichtig. Die Herausforderung liegt in der Wahl eines passenden *P. pastoris*-Stammes sowie eines geeigneten Expressionsvektors.

Kultivierung von Pichia pastoris in einem Kleinfemter

Zur Steigerung der Proteinexpressionsrate, und um ein schnelles Wachstum der Hefezellen zu gewährleisten, müssen sowohl die Kultivierungssysteme als auch die Medien optimiert werden. Für eine Kultivierung im kleineren Massstab werden Schüttelkolben eingesetzt. Um eine gute Belüftung zu erreichen, sind diese mit Schikanen besetzt. Allerdings werden mit diesen Kultivierungssystemen ungefähr zehnmal geringere Proteinausbeuten erzielt als mit Fermentern. Das liegt daran, dass in Schüttelkolben die Belüftung unzureichend ist, was zur Sauerstofflimitation führt. Vor allem Mut⁺-Stämme reagieren auf ungenügende Sauerstoffzufuhr empfindlich. Zudem benötigen sie eine konstante Methanolzufuhr. Deshalb ist eine Kultivierung in Schüttelkolben für Mut⁺-Stämme nur zur Kontrolle der Proteinexpression zu empfehlen. Für die Proteinexpression empfiehlt sich eine Kultivierung im Grossmass-

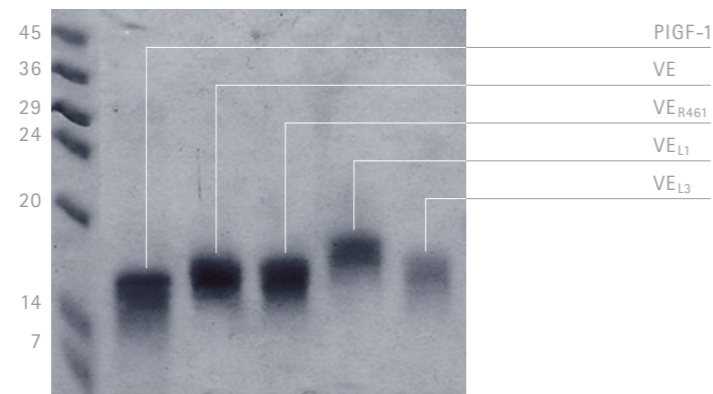
stab mittels eines Fermenters. Die Vorteile solcher Bioreaktoren liegen in der Möglichkeit zur Überwachung der meisten Kultivierungsparameter mit Hilfe spezifischer Sonden, z. B. für Sauerstoff, CO₂, pH und Methanolkonzentration. Durch die Messung und Regelung der einzelnen Parameter erfolgt die Kultivierung optimal kontrolliert, es werden sehr hohe Zelldichten und folglich auch entsprechend hohe Proteinausbeuten erzielt.

Die Kultivierung von *P. pastoris*-Stämmen, deren Proteinexpression mittels AOX1-Promotor erfolgt, gliedert sich in eine Wachstums- und eine Produktionsphase. Die Wachstumsphase dient der Generierung von Biomasse im Repressionsmedium mit Glucose oder Glycerol als Kohlenstoffquelle. Nach einer kurzen Hungerphase, nach der im Medium kein Glycerol mehr verfügbar ist, folgt die Produktionsphase. Die Proteinexpression wird über das im Induktionsmedium enthaltene Methanol induziert. Innerhalb der Produktionsphase ist eine regelmässige Methanolzufuhr notwendig, um die Proteinexpression in den Hefezellen aufrechtzuerhalten. Eine zu hohe Methanolkonzentration beeinflusst die Proteinexpression negativ. Oft wird die Hefe durch hohe Methanolkonzentrationen sogar abgetötet, da bei ungenügender Sauerstoffzufuhr das hochtoxische Formaldehyd entsteht. Eine Optimierung der Methanolkonzentration ist deshalb wichtig für die optimierte Produktion von Proteinen. Im Allgemeinen wird Methanol in einer Konzentration von 0.5–1.0 % (v/v) eingesetzt. Wie erwähnt, benötigen MutS-Stämme alternative Kohlenstoffquellen für das Wachstum während der Produktionsphase. In diesem Fall werden nicht AOX-reprimierende Kohlenstoffquellen wie die Substrate Sorbitol, Mannitol, Alanin oder Trehalose eingesetzt. Durch die Pufferung der Medien bei einem pH zwischen 3,0 und 6,0 können proteolytische Prozesse, die die Proteinausbeute schmälern, reduziert werden. Durch die Verwendung von Medien mit Pepton- oder Hefeextrakt-Zusätzen, der Zugabe von 1 % Casaminsäuren oder 5 mM- EDTA kann die Proteolyse zusätzlich eingeschränkt werden. Ammoniumionen in der Form von Ammoniumphosphaten schränken die Aktivität von Proteasen zusätzlich ein. Schliesslich ist die Dauer der Produktionsphase wichtig. Es zeigte sich, dass die proteolytische Aktivität mit abnehmender Anzahl lebender Zellen in der Kulturflüssigkeit zunimmt. Durch ein fortlaufendes Zu- und Abführen des Mediums mit gleichzeitigem Zellrückhalt, einer kontinuierlichen Kultur, kann diesem Effekt vorgebeugt werden. Aber auch semikontinuierliche *Fed-Batch-Kulturen*, bei denen lediglich eine Medienzufuhr erfolgt, eignen sich bestens zur erfolgreichen Kultivierung von *P. pastoris*. Die Kultivierungstemperatur während der Produktionsphase hat nicht nur einen Einfluss auf die proteolytische Aktivität im Medium, sondern auch auf die Ausbeute an exprimierten Proteinen. Im Allgemeinen wird beim Wechsel von der Wachstums- in die Produktionsphase eine Temperatursenkung von z. B. 30 °C auf 15–25 °C vorgenommen, wobei für jedes Protein die optimale Kultivierungstemperatur ermittelt werden muss. In unserem Labor wird ein modifizierter Kleinfemter KLF 2000 von Bioengineering eingesetzt. Dieser Fermenter wurde vom Hersteller mit einer zusätzlichen Kühlung ausgerüstet, die sich für ein effizientes Bewirtschaften der Zellen als unabdingbar erwiesen hat. Aus einem Fermentationsvolumen von drei Litern gewinnen wir routinemässig für lösliche Proteine Ausbeuten von 200–800 mg, für intrazelluläre oder Membranproteine liegen die Ausbeuten 10–100 mal tiefer.



In situ-sterilisierbarer Laborfermenter KLF 3,7 Liter mit Mess- und Regeltechnik, inkl. Abgasanalytik. Ausgerüstet mit zusätzlicher Kühlfläche.

Anwendungsbeispiel von *Pichia pastoris*



1

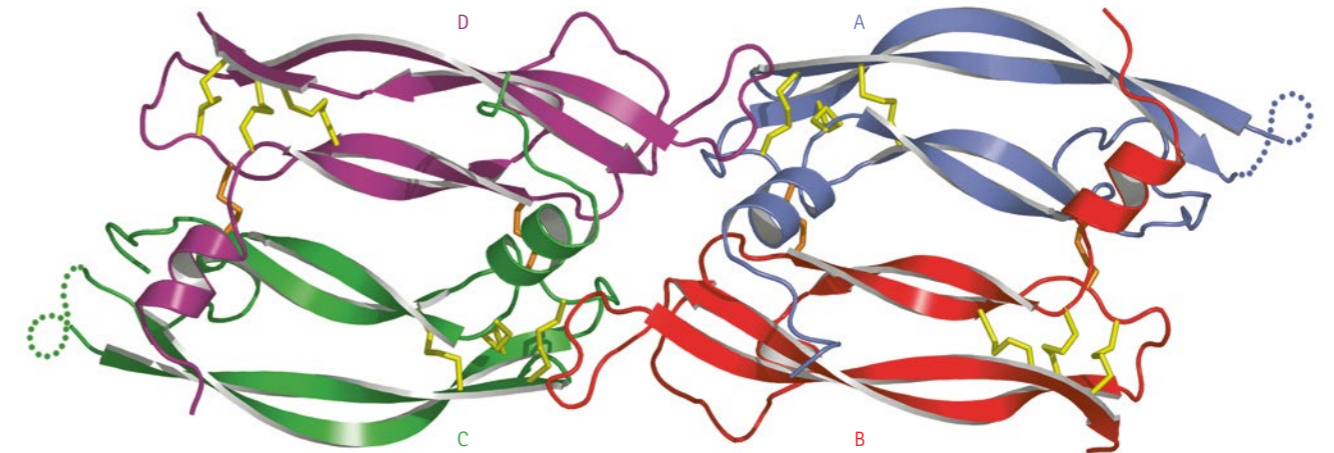
Reinigung verschiedener VEGF Varianten aus *P. pastoris*-Überständen. Die Proteine wurden in zwei Schritten mit Hilfe einer Affinitätschromatographie und einer Chromatographie nach Molekülgröße gereinigt. Ballmer-Hofer et al. Biomolecular research, Paul Scherrer Institut, unpubliziert.

Produktion eines angiogenen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF) für Strukturaufklärungen

Die Bildung des Gefäßsystems innerhalb eines Organismus wird durch zwei Mechanismen sichergestellt.

Bei der *Vaskulogenese* handelt es sich um die *de-novo*-Entwicklung von Blutgefässen während der Embryogenese. Dieser Vorgang wird durch die Differenzierung früher hämatopoietischer Stammzellen realisiert.

Bei der Reifung oder Reparatur eines bereits bestehenden Gefäßsystems spricht man dann von *Angiogenese*. Dabei werden Gefässe neu aus bestehenden Vorläufern gebildet. Das geschieht durch Umbau der bestehenden Vaskulatur, z. B. durch zusätzliche Unterteilung oder durch Ein- und Ausstülpung bestehender Gefässe. Endotheliale Zellen in den Gefässen müssen sich dabei aus dem bestehenden Zellverband lösen und an den Ort der Neubildung von Gefässen auswandern. Diesem Prozess der physiologischen Angiogenese steht die pathologische Angiogenese gegenüber, die zu unerwünschter Ausweitung des Gefäßsystems führt. Bei vielen Erkrankungen spielen diese Prozesse eine Rolle, so in Tumorgewebe, wo neue Gefässe den wachsenden Tumor ernähren helfen, bei der Atherosklerose, bei der exzessives Wachstum der Endothelzellen die Gefässwände schädigt oder bei Augenkrankungen (Retinopathien), bei denen exzessive Gefässbildung den Augennerv schädigt. Die Regulation der Angiogenese unterliegt dem Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren, welche im Normalzustand in einem Gleichgewicht vorliegen. Aktivatoren wie vascular endothelial growth factor, VEGF, wirken als positive Regulatoren und stimulieren



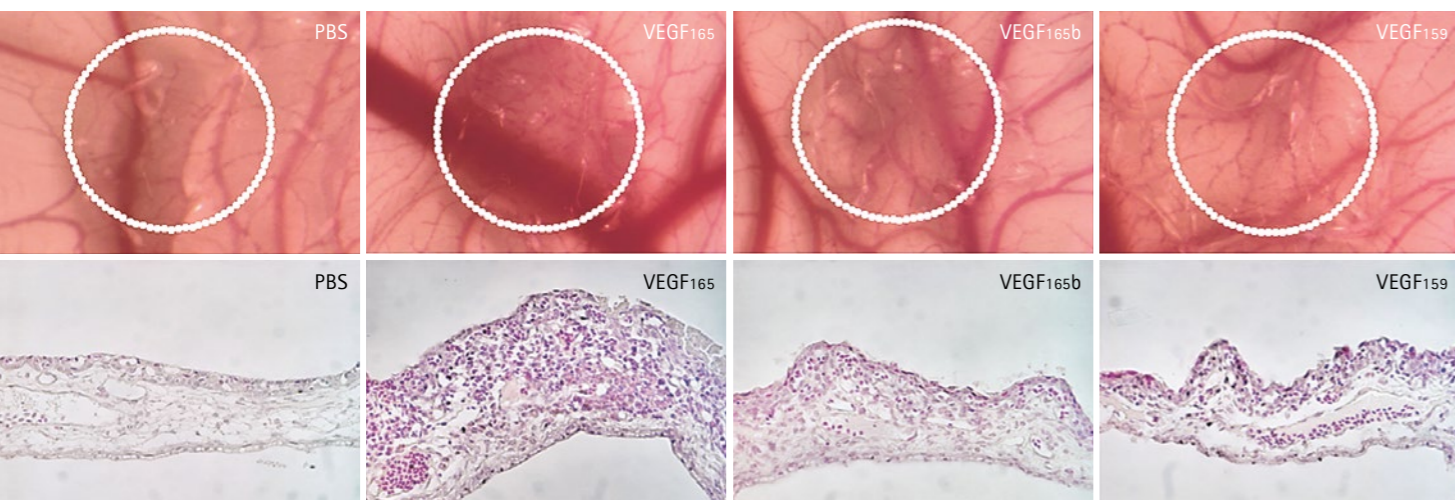
2

Struktur von VEGF-E NZ2.¹
Das Molekül liegt als Dimer vor, und in der Kristallstruktur sind zwei benachbarte Dimere (grün/violett und rot/blau) dargestellt. Pieren et al. The Journal of Biological Chemistry, vol.281, No. 28, pp. 19578 – 19587, 14. Juli 2006.

die Angiogenese, im Gegensatz zu den Inhibitoren, welche die Gefässbildung unterbinden. Die VEGF-Produktion erfolgt als Reaktion auf Sauerstoffarmut, Hypoxie, in wachsenden oder verletzten Geweben. VEGF reguliert das Verhalten hämatopoetischer Zellen wie Makrophagen und natürlich vor allem von Endothelzellen. Nur geringfügige Abweichungen in der Herstellungsrate von VEGF oder der VEGF-Rezeptoren auf den Zielzellen haben katastrophale Auswirkungen auf das Gefäßsystem. Es konnte an genveränderten Mäusen gezeigt werden, dass eine Deregulierung der Vaskulo- oder Angiogenese den frühen embryonalen Tod zur Folge hat. Dies erklärt, weshalb bisher, ausser bei einzelnen Erkrankungen des lymphatischen Gefäßsystems, keine genetischen Defekte in den Genen des VEGF-Systems gefunden wurden. Die Tatsache, dass VEGF-Liganden bei vielen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen, führte zur Entwicklung von Pharmazeutika, die die Wirkung von VEGF blockieren.⁴ So werden Antikörper oder lösliche Rezeptoren zur Neutralisierung der VEGF-Aktivität in der Tumorbehandlung und der Behandlung von Retinopathien bereits eingesetzt (Avastin, Genentech/Roche). Ausserdem sind mehrere Inhibitoren der Rezeptoren in klinischer Prüfung.

Strukturbestimmung eines VEGF-Liganden

Wir studieren biologische und strukturelle Aspekte verschiedener Varianten von VEGF, unter anderem virale Varianten, VEGF-E genannt, die von gewissen Pockenviren freigesetzt werden. Die Funktion dieser Proteine im Lebenszyklus der Viren ist nicht genau geklärt, vermutlich erleichtert VEGF-E dem Virus die Freisetzung aus dem infizierten



3

Chorioallantois-Angiogeneseversuch.

Obere Reihe: Verschiedene Varianten von VEGF wurden auf die Chorioallantois eines neun Tage alten Hühnerembryos aufgetragen. Das freigesetzte VEGF stimuliert die Endothelzellen in den unter der Chorioallantois liegenden Blutgefäßen und regt deren Wachstum an. Das führt zur Bildung zusätzlicher Blutgefäße, hier als rötliche Färbung sichtbar.

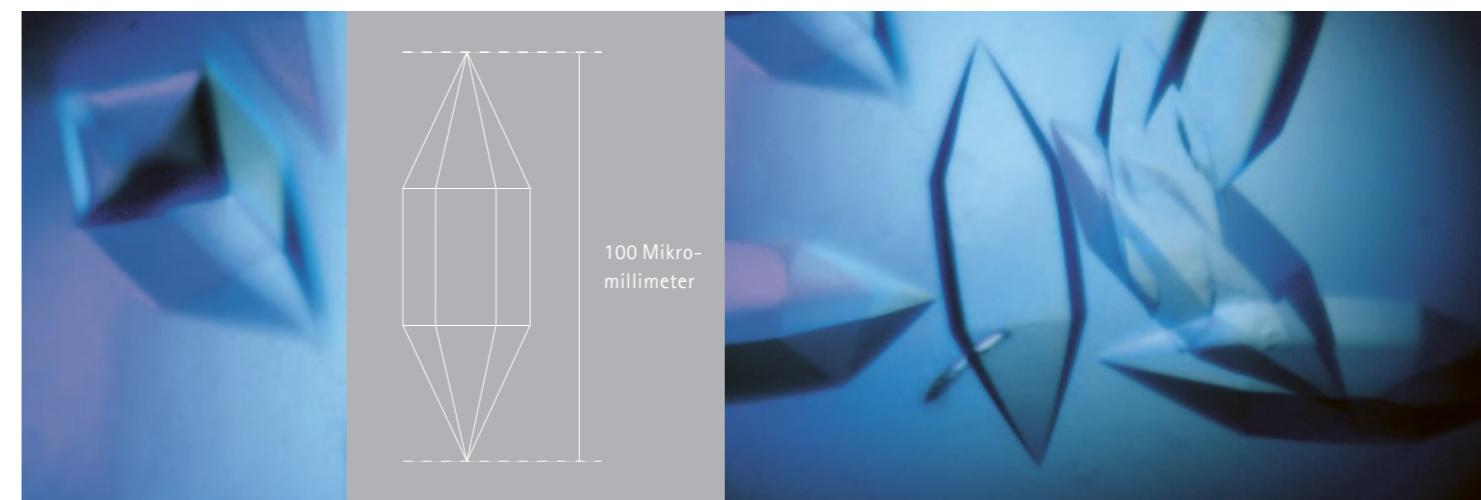
Untere Reihe: Die histologische Analyse der Chorioallantois zeigt, dass vermehrt rote Blutkörperchen (violette Färbung) in die neu gebildeten Blutgefäße eingewandert sind.

Cébe-Suarez et al. Cell. Mol. Life Sci. 63 (2006) 2067–2077.

Gewebe. Alle Varianten von VEGF wurden in *P. pastoris* produziert⁵ und mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt. Für eine Strukturaufklärung wurde VEGF-E kristallisiert und an der Synchrotronlichtquelle des PSI analysiert¹. Abb. 1 zeigt das Profil der Proteinreinigung, Abb. 2 die Struktur des Proteins bei einer Auflösung von 2,3 Å. Die Struktur erlaubte die Bestimmung des Bindungsmechanismus an den Rezeptor, der auf den Endothelzellen die Wirkung dieses Wachstumsfaktors vermittelt.

Schlussfolgerungen

Unsere Arbeit zeigt, dass *P. pastoris* ideal für die Herstellung hochkomplexer Proteine geeignet ist. Das untersuchte VEGF-E ist sehr kompliziert gefaltet und enthält eine sogenannte *Cysteine-knot*-Struktur, deren korrekte Faltung in bakteriellen Expressionssystemen bisher nie beobachtet werden konnte. Die Ausbeuten an VEGF liegen im Bereich von mehreren hundert mg pro Ansatz. Alle Proteine sind löslich, korrekt gefaltet, stabil und biologisch aktiv. Die Aktivität wurde mit Hilfe eines Chorioallantois-Angiogeneseversuchs gezeigt (Abb. 3). Die Chorioallantois ist eine dünne Haut, durch die das Embryo während der Reifung in der Eierschale atmet. Deshalb ist das Gewebe, das unter dieser Haut liegt, stark mit Blutgefäßen durchwachsen. Auf die Chorioallantois aufgebracht VEGF fördert zusätzlich die Bildung neuer Mikrogefäße, deren Zunahme quantifiziert werden kann.



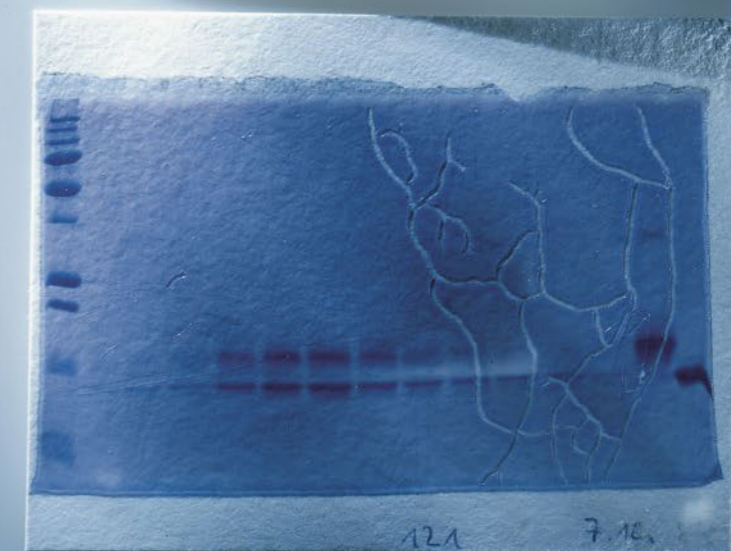
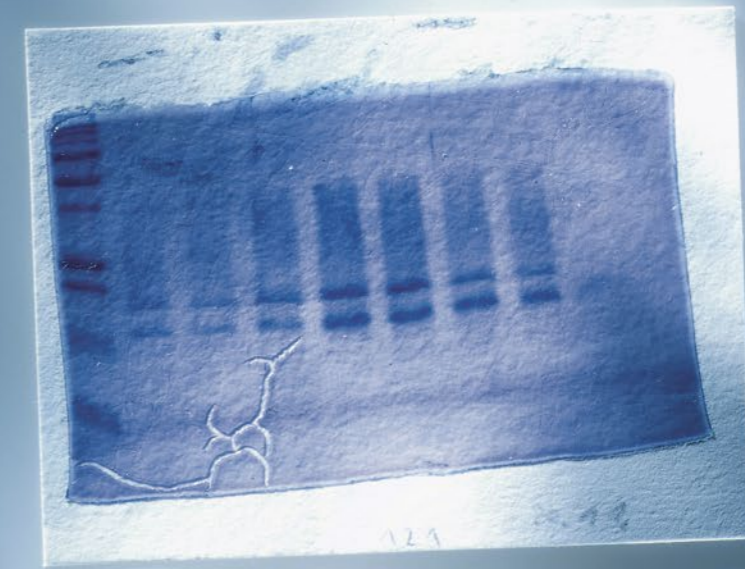
4

Proteinkristall, der zur Bestimmung der Struktur von VEGF-E NZ2 an der Synchrotron-Lichtquelle am PSI benutzt wurde.

Ballmer-Hofer et al. Biomolecular research, Paul Scherrer Institut, unpubliziert.

Referenzen

- [1] Pieren, M., Prota, A., Ruch, C., Kostrewa, D., Wagner, A., Biedermann, K., Winkler, F., and Ballmer-Hofer, K. Crystal structure of the Orf virus NZ2 variant of VEGF-E: Implications for receptor specificity. *J. Biol. Chem.*, **281**: 19578–19587, 2006.
- [2] Lundblad, R. L. Glycosylation in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **30 (Pt 3)**: 191–192, 1999.
- [3] Kato, N., Omori, Y., Tani, Y., and Ogata, K. Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. Catalytic properties and subunit structures. *Eur. J. Biochem.*, **64**: 341–350, 1976.
- [4] Kowanetz, M. and Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin. Cancer Res.*, **12**: 5018–5022, 2006.
- [5] Scheidegger, P., Weighofer, W., Suarez, S., Kaser-Hotz, B., Steiner, R., Ballmer-Hofer, K., and Jaussi, R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in tumor-bearing dogs. *Biol. Chem.*, **380**: 1449–1454, 1999.



Von links nach rechts:
Dr. Philipp Berger, Gruppenleiter
Andreas Gsell, Master Student
Katharina Schmid, Doktorandin
Dr. Kurt Ballmer-Hofer, Gruppenleiter
Dr. Pascale Hazel, Postdoktorandin
Petra Kummerer, FH Ingenieurin
Edward Stuttfeld, Doktorand
Debora Dosch, Doktorandin
Nadia Baumgartner, Master Studentin
Alexandra Giese, Doktorandin





000
lml



35
38
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100