

Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

Faltung oligomerer Proteine
im
Endoplasmatischen Retikulum und *in vitro*

Ursula Kies

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Th. Bach
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 24.09.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 07.11.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinfaltung	1
1.1.1	Proteinfaltung <i>in vitro</i>	1
1.1.2	Proteinfaltung <i>in vivo</i>	3
1.1.3	Faltungshelferproteine	5
1.1.4	Rückfaltung von Proteinen <i>in vitro</i>	6
1.2	Das Endoplasmatische Retikulum (ER)	7
1.2.1	BiP	9
1.2.2	Prolyl-4-Hydroxylase	10
1.2.3	Bildung von Disulfidbrücken im ER	13
1.2.4	<i>Unfolded Protein Response</i> (UPR)	14
1.2.5	Qualitätskontrolle bei der Faltung von Glykoproteinen	16
1.2.6	Degradation missgefalteter Proteine in Hefe - ERAD (<i>ER-associated protein degradation</i>)	18
1.3	Immunglobuline	19
1.3.1	Struktur von Antikörpern	20
1.3.2	Antikörperfaltung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	22
1.3.3	Der monoklonale Antikörper MAK33	24
1.4	Expression rekombinant erzeugter Proteine	26
1.4.1	Expression rekombinant erzeugter sekretorischer Proteine in Hefen	26
1.4.2	Expression rekombinant erzeugter Antikörper und Antikörperfragmente	28
1.5	Problemstellung	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.1.1	Chemikalien	35
2.1.2	Proteine	36
2.1.3	Standards und Kits	37
2.1.4	Chromatographiematerialien	37
2.1.5	Sonstige Materialien	37
2.1.6	Biologische Materialien	38
2.1.7	DNA	38
2.1.8	ELISA-Reagentien	40
2.1.9	Lösungen, Puffer und Medien	41
2.1.10	Computerprogramme	45

2.2	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E.coli</i> -Stämmen	45
2.2.2	Kultivierung und Konservierung von Hefestämmen	45
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
2.2.4	PCR-Amplifikation (Mullis & Faloona, 1987)	46
2.2.5	Agarosegelelektrophorese von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	47
2.2.6	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	47
2.2.7	Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA	48
2.2.8	Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente	49
2.2.9	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen	49
2.2.10	Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (LiAc-Methode)	50
2.3	Präparative Methoden	50
2.3.1	Kultivierung und Analyse von Bakterienzellen	50
2.3.2	Zellernte und Zellaufschluss von Bakterienzellen	51
2.3.3	Kultivierung und Analyse von Hefezellen	52
2.3.4	Präparation von Mikrosomen aus <i>S. cerevisiae</i>	53
2.3.5	Chromatographische Methoden	55
2.3.6	Aufkonzentrierung und Dialyse	57
2.4	Proteinbiochemische Methoden	57
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	57
2.4.2	Fällung von Proteinlösungen	57
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
2.4.4	Nachweis von Proteinen	59
2.4.5	Immunoblotting (Western Blot)	61
2.4.6	Analytische Gelfiltration	63
2.4.7	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	63
2.4.8	Reduktion der Prolyl-4-Hydroxylase	63
2.4.9	Renaturierung der Prolyl-4-Hydroxylase	64
2.5	Spektroskopische Methoden	64
2.5.1	UV-VIS-Spektroskopie	64
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	65
2.5.3	Circulardichroismus	66
3	Ergebnisse und Diskussion	69
3.1	Expression von Antikörperketten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
3.1.1	Verwendung von Antikörpern für die Detektion von MAK33	69
3.1.2	Herstellung von Expressionsvektoren für die Sekretion von Antikörpern durch die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
3.1.3	Expression der Antikörperfragmente	76
3.1.4	Vergleich der Wachstumskinetiken verschiedener Hefestämme	77
3.1.5	Expressionskinetik des Hefestammes W303 + pUEK9 im Bezug auf die zeitliche Expression der Antikörperketten	81

3.1.6	Sekretion der Antikörperfragmente in das Medium	82
3.1.7	Aktivität der Antikörperfragmente	83
3.1.8	Löslichkeit der Antikörperketten innerhalb der Hefezellen	84
3.1.9	Lokalisation der Antikörperfragmente innerhalb der Zelle	84
3.1.10	Koexpression von Proteinen der <i>unfolded protein response</i>	87
3.1.11	Reinigung von <i>Strep</i> -tag-Antikörperketten aus dem Anzuchtmedium	90
3.2	Diskussion zur Expression von Antikörperketten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
	Ausblick	104
3.3	Struktur, Stabilität und Rückfaltung der Prolyl-4-Hydroxylase	107
3.3.1	Struktur und Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase	107
3.3.2	Analyse der Quartärstruktur der Prolyl-4-Hydroxylase unter verschiedenen Pufferbedingungen	113
3.3.3	Isolierung der α - und β -Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase	117
3.3.4	Versuche zur <i>in vitro</i> -Rückfaltung von Prolyl-4-Hydroxylase Tetrameren	119
3.4	Diskussion zur Prolyl-4-Hydroxylase	129
4	Zusammenfassung	134
5	Literatur	137
6	Abkürzungen	149

1 Einleitung

1.1 Proteinfaltung

1.1.1 Proteinfaltung *in vitro*

Proteine sind die bedeutendste und vielseitigste Gruppe von Biomolekülen. Sie sind an nahezu allen biochemischen Prozessen beteiligt und erfüllen eine Vielzahl von Funktionen wie z.B. enzymatische Katalyse, Transport und Speicherung, Bewegung, mechanische Stützfunktion und Immunabwehr. Voraussetzung für ihre biologische Aktivität ist die Ausbildung einer korrekten dreidimensionalen Struktur. Der Verlust dieser Struktur kann zu einer Funktionseinschränkung bzw. zum Funktionsverlust führen. Im Gegensatz zur genau definierten Struktur des nativen Proteins, ist dem denaturierten, entfalteten Zustand eines Proteins keine eindeutige Molekülkonformation zugeordnet, stattdessen liegt das denaturierte Protein in einer Vielzahl von verschiedenen Konformationen vor, die aufgrund ihrer hohen Flexibilität experimentell nicht einzeln zugänglich sind (Shortle, 1996). Der Übergang eines Proteins von seinem denaturierten, entfalteten Zustand in die native, gefaltete Konformation wird als Proteinfaltung bezeichnet (Anfinsen *et al.*, 1961).

Die Frage, wie der Mechanismus der Proteinfaltung tatsächlich abläuft, beschäftigt die Wissenschaft seit mehreren Jahrzehnten. Bereits in den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden Untersuchungen zur Denaturierung und Renaturierung von Proteinen (u.a. Hämoglobin, Chymotrypsinogen und Trypsinogen) angestellt (zur Übersicht s. Yon, 2001).

In der zweiten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts wurden weitere entscheidende Schritte zur Erforschung dieser außerordentlich komplexen Vorgänge von Anfinsen und Mitarbeitern unternommen, als diese, anhand von denaturierter und reduzierter Ribonuklease, zeigen konnten, dass die Faltung von Proteinen einen reversiblen Prozess darstellt (Anfinsen *et al.*, 1961). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die gesamte Information, die für das Erreichen der nativen Konformation eines Proteins notwendig ist, durch die Aminosäuresequenz bestimmt ist (Anfinsen, 1973). Die native Struktur globulärer Proteine entspricht dabei einem thermodynamisch stabilen Zustand und stellt somit das globale Minimum seiner freien Energie unter Faltungsbedingungen dar (Anfinsen, 1973). Der Unterschied in der freien Enthalpie zwischen nativem und denaturiertem Zustand wird als Triebkraft der Proteinfaltung bezeichnet (Jaenicke, 1996). Die Änderung der freien Enthalpie beruht u. a. auf stabilisierenden Wechselwirkungen, die sich im nativen Zustand bilden: Wasserstoffbrücken, elektrostatische- und van-der-Waals Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen (Jaenicke, 1996).

Da theoretische Überlegungen zum Faltungsproblem ergaben, dass ein Protein seine native Konformation nicht durch statistische Suche innerhalb eines biologisch relevanten Zeitraums

erlangen kann (Levinthal Paradoxon), wurde die Existenz von einem oder mehreren spezifischen Faltungswegen vorgeschlagen (Levinthal, 1968, Kim & Baldwin, 1990). Die Existenz solcher Faltungswege konnte wenig später durch die Entdeckung der ersten Faltungsintermediate belegt werden (Ikai & Tanford, 1971; Tsong *et al.*, 1971).

Auf der Suche nach einer Erklärung, warum Polypeptidketten bei ihrer Faltung das Levinthal Paradox überwinden, entstanden verschiedene Faltungsmodelle, die sich auf theoretische Betrachtungen (Karplus & Sali, 1995), Faltungssimulationen oder experimentelle Betrachtungen (Kim & Baldwin, 1990) stützen.

Es wird zwischen sequentiellen und parallelen Faltungswegen und Faltungswegen mit Verzweigungen unterschieden. Im sog. *nucleation growth model* wird postuliert, dass in der Aminosäuresequenz benachbarte Aminosäuren zunächst einen Nukleationskeim formen (Wetlaufer, 1973), von dem aus sich die native Struktur in sequentieller Art entwickelt. Im Gegensatz dazu wird im *framework model* (Ptitsyn & Rashin, 1973, Ptitsyn, 1991) vorgeschlagen, dass sich zunächst einige lokale Sekundärstrukturelemente ausbilden, die sich dann, z.B. durch einen „Diffusions-Kollisions Mechanismus“ (Karplus & Weaver, 1994) zur nativen Tertiärstruktur zusammenlagern. Das Modell des „hydrophoben Kollapses“ postuliert als frühen Faltungsschritt einen sog. *molten globule* (Kuwajima, 1989; Ptitsyn *et al.*, 1990; Jaenicke, 1991, Jaenicke, 1996), das durch ein schnelles Zusammenlagern der hydrophoben Seitenketten im Innereen des Proteins entsteht, so dass diese vor dem hydrophilen Lösungsmittel geschützt werden. Der *molten globule*-Zustand ist dabei durch seine kompakte Form mit nativähnlicher Sekundärstruktur, dem aber eine deutliche Seitenkettenpackung und eine definierte Tertiärstruktur fehlen, gekennzeichnet (Kuwajima, 1989, Ptitsyn, 1995, Hagihara & Goto, 1997). Im *jigsaw model* wird letztlich postuliert, dass für jedes Proteinmolekül mehrere mögliche Faltungsweges zur Erlangung des nativen Zustandes existieren (Harrison & Durbin, 1985).

Neuere Theorien zur Proteinfaltung stellen die Existenz eines einzigen Faltungsweges mit definierten Intermediaten in Frage. In diesem sog. *new view* wird, basierend auf theoretischen Überlegungen, davon ausgegangen, dass es sich bei Faltungsintermediaten um Produkte inkorrektter Faltung handelt, die in einer kinetischen Falle angehäuft werden (Baldwin, 1995, Onuchic *et al.*, 1997). Proteinfaltung wird als ein diffusionsähnlicher Prozess betrachtet, bei dem die Faltung von Proteinen auf mehreren Wegen ablaufen kann. Dabei befindet sich der native Zustand eines Proteins in einem auf mehreren parallelen Wegen (von denen manche häufiger benutzt werden als andere) zugänglichen Energieminimum (Wolynes *et al.*, 1995; Dill & Chan, 1997; Radford, 2000). Faltungsintermediate stellen auch in diesem Konzept der „Faltungstrichter“ (*folding funnels*) oder „Energiewälder“ (Camacho & Thirumalai, 1993; Hao & Scheraga, 1996) Strukturen dar, die sich in einem lokalen, energetischen Minimum befinden. Die früher gebräuchliche Unterscheidung in *on-pathway* und *off-pathway*-Intermediate ist dabei unnötig bzw. nicht mehr möglich (Dill & Chan, 1997).

Zum genauen Verständnis von Faltungswegen ist neben einer thermodynamischen auch eine kinetische Betrachtungsweise notwendig. Die Faltung eines Proteins ist in der Regel ein sehr schneller Prozess, der innerhalb weniger Minuten oder Sekunden abläuft. Einige Faltungsschritte, die die Geschwindigkeit beeinflussen, sind jedoch deutlich langsamer. Dazu gehören die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken (Creighton, 1986), Prolin-*cis/trans*-Isomerisierungen (Fischer & Schmidt, 1990) sowie Assoziationsreaktionen (Jaenicke, 1987). Insbesondere die Bildung von Disulfidbrücken stellt bei extrazellulären Proteinen einen wichtigen Schritt im Faltungsweg dar. Die Bildung dieser übt zwar keinen Einfluss auf den Faltungsweg selbst aus, wirkt aber oft stabilisierend und ist meist geschwindigkeitsbestimmend (Jaenicke, 1996). Für die Verknüpfung der Cysteine zu Disulfidbrücken scheint auch die Zugänglichkeit für Oxidationsmittel und die Konformation von Intermediaten wichtig zu sein (Hamaguchi, 1991). Einen weiteren geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Faltungsprozess stellt die Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen dar. Sie erfolgt an nicht-nativen Prolinbindungen und vollzieht sich sehr langsam, da die Umwandlung der *trans*-Konformation in die *cis*-Konformation (ca. 7% aller Prolinreste sind im nativem Protein in *cis*) eine hohe Aktivierungsenergie besitzt (Brandts *et al.*, 1975; Goto & Hamaguchi, 1982; Fischer & Schmid, 1990; Schmid, 1992).

Während des Faltungsweges können Nebenreaktionen auftreten, die mit korrekter Faltung und Assoziation konkurrieren. Diese treten typischer Weise beim hydrophoben Kollaps, bei der Bildung von Domänenkontakten und bei der Assoziation von Untereinheiten auf. Durch nicht korrekte intermolekulare Wechselwirkungen zwischen exponierten hydrophoben Regionen kommt es zur Bildung von Aggregaten und zu einer stark beeinträchtigten Ausbeute an korrekt gefalteten Proteinen (Kiefhaber *et al.*, 1991; Jaenicke, 1996; Jaenicke & Seckler, 1997).

Der Anstieg der Konzentration nicht-nativer Polypeptidketten scheint allein für die Aggregation verantwortlich zu sein. Nach einem kinetischen Modell hängt die Ausbeute an nativem Protein damit von der Geschwindigkeit der Faltung, der Aggregation und der Synthese ab (Hoffmann *et al.*, 2001; Kiefhaber *et al.*, 1991; Lilie *et al.*, 1998). Sie kann jedoch durch die Optimierung physiko-chemischer Parameter wie Lösungs-mittelbedingungen, Proteinkonzentration, Ionenstärke oder Temperatur minimiert werden (Kiefhaber *et al.*, 1991; Buchner, 1996).

1.1.2 Proteinfaltung *in vivo*

In vivo findet die Proteinfaltung unter erschwerten Bedingungen statt. Die Konzentration an nativen Proteinen in der Zelle kann bis zu mehreren hundert Milligramm pro Milliliter betragen (Morimoto *et al.*, 1994). Dadurch wird beispielsweise die Aggregation, eine der Hauptnebenreaktionen während des Faltungsprozesses, begünstigt (Buchner, 1996; Radford, 2000), da sie als intermolekularer Prozess in hohem Maße konzentrationsabhängig ist.

Die Faltung *in vivo* beginnt bereits am naszierenden Polypeptid; durch diese Kopplung der Faltung mit der Proteinbiosynthese liegt das Protein zu Beginn des Faltungsweges nicht vollständig zugänglich vor, sondern wird Schritt für Schritt durch die vektorielle Synthese vom N- zum C-Terminus am Ribosom bzw. beim vektoriellen Transport durch eine Membran freigesetzt (Jaenicke, 1999). Dies hat zur Folge, dass eine Domäne schon mit der Faltung beginnen kann, während die restlichen Teile des Proteins noch nicht für die Faltung zur Verfügung stehen. Diese Domänen sind dabei als autonome Faltungseinheiten anzusehen. Insbesondere bei Multidomänen-Proteinen besteht hier die Gefahr der Aggregation durch exponierte Domänenoberflächen. Darüberhinaus wurde kürzlich gezeigt, dass ein Teil der naszierenden Polypeptide bereits am Ribosom durch ein ubiquitinähnliches Signal für die Degradation markiert wird. Auf diese Art werden bis zu 50 % der Polypeptide bereits kotranslational degradiert und erreichen nie ihren nativen Zustand (Turner & Varshavsky, 2000). Damit scheint die Faltung sowohl korrekter als auch abnormaler naszierender Proteine in kinetischer Konkurrenz zu derartigen Abbauwegen zu stehen (Turner & Varshavsky, 2000).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stellt die Proteinfaltung also keinen Prozess dar, der zu 100 % korrekt gefaltetes Protein liefert, so dass es auch unter physiologischen Bedingungen zu ausbeuteminimierender Aggregation kommt, die durch Stressbedingungen, z.B. durch erhöhte Temperatur oder Überproduktion rekombinanter Proteine noch gefördert wird (Haase-Pettingel & King, 1988; Hurtley & Helenius, 1989; Bowden & Georgiou, 1990). Bei der Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* können fehlgefaltete Polypeptidketten zu unlöslichen *inclusion bodies* führen (Marston, 1986; Buchner, 1996; Lilie *et al.*, 1998). Aber auch in höheren Organismen, z.B. Hefen kann es zu Ablagerungen innerhalb der Zelle kommen (z.B. *russell body*-ähnliche Strukturen in *S. cerevisiae*, Umabayashi *et al.*, 1997). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Aggregationsprozesse durch Überexpression zelleigener Hitzeschockproteine minimiert werden können (Goloubinoff *et al.*, 1989; Amrein *et al.*, 1995; Buchner, 1996; Hartl, 1998; Radford, 2000).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Zelle in der Lage, das Problem der Aggregation weitgehend zu umgehen, indem sie eine sehr hohe Effizienz und Geschwindigkeit bei der Proteinfaltung erreicht und langsame Prozesse beschleunigt, um eine Anhäufung nicht-nativer Proteine zu vermeiden. Dies gelingt vor allem durch die Unterstützung von Faltungsenzymen, die langsame Faltungsreaktionen durch Katalyse beschleunigen, und durch die Mitglieder der Proteinfamilie der molekularen Chaperone.

Unter unphysiologischen Bedingungen, z.B. erhöhte Temperaturen, pH-Änderungen, Salzstress oder Sauerstoffmangel, kann es jedoch zur Verlangsamung des Wachstums und der Zellproliferation und letztendlich auch zum Zelltod kommen (van Dongen & van Wijk, 1988). Unter nicht-lethalen Stressbedingungen treten zahlreiche morphologische, biochemische und molekulare Veränderungen der Zelle auf; diese beinhalten Veränderungen der Zelloberflächenmorphologie (Konings, 1988; Burgman & Konings, 1992), der

Membranpermeabilität (Coote *et al.*, 1991) und des Cytoskeletts (Collier & Schlesinger, 1986; Welch & Suhan, 1986). Aber auch Zellorganellen wie der Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum eukaryotischer Zellen können fragmentiert werden oder sich auflösen (Welch & Suhan, 1985). Unter schweren Stressbedingungen schwellen Mitochondrien und der Zellkern an, was zu schwerwiegenden Störungen der Energieversorgung bzw. der Nukleinsäuresynthesewege führt (Patriarca & Maresca, 1990; Welch & Suhan, 1986).

Von physiologischer Bedeutung mit schwerwiegenden Folgen für den gesamten Organismus sind Aggregationsprozesse bei der krankhaften Veränderung von Prionproteinen (Prusiner, 1982,1998; Horwich & Weissman, 1997; Lindquist, 1997), bei der Bildung von Amyloidfibrillen, wie sie im Gehirn von Alzheimerpatienten gefunden werden (Wetzelschell, 1997), sowie bei zahlreichen anderen „Faltungskrankheiten“ (Kelly, 1996)

1.1.3 Faltungshelferproteine

In allen Zellen kommen zwei Typen von Faltungskatalysatoren vor: Unter der Gruppe der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI) wird eine ganze Reihe von ubiquitären Enzymen zusammengefasst, welche die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolinen katalysieren (Fischer, 1994; Schmid, 1997), ohne dabei das Gleichgewicht zwischen nativem und denaturiertem Protein zu beeinflussen (Lilie *et al.*, 1993). Dieser Schritt ist oft geschwindigkeitsbestimmend bei der Proteinfaltung (Brandts *et al.*, 1975; Schmid, 1992) und stellt auf Grund der hohen benötigten Aktivierungsenergie eine langsame Reaktion dar (Brandts *et al.*, 1975).

Die sog. Proteindisulfidisomerasen (PDI) werden ebenfalls in allen Zellen von Pro- und Eukaryoten vorgefunden. Es handelt sich dabei um Protein-Thiol-Oxidoreduktase, welche die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren (Bardwell, 1994; Freedman, 1984). Dabei ist die Funktion der verschiedenen Mitglieder der Familie abhängig von der Lokalisation: Während sie im ER die Oxidation und Isomerisierung von Disulfidbrücken an naszierenden Polypeptiden katalysieren, werden von den entsprechenden Mitgliedern im Cytosol, in Endosomen und an der Zelloberfläche – vermittelt durch die dort vorherrschenden reduzierenden Bedingungen – Reduktionen von Disulfidbrücken durchgeführt (Noiva, 1999). Als Mitglieder der Protein-Thiol-Oxidoreduktasen haben Proteindisulfidisomerasen sequentielle und strukturelle Ähnlichkeiten zu Thioredoxin. Dabei wird eine Struktur vorgeschlagen, die sich aus vier Domänen mit einem Thioredoxin-*fold* (a-b-b'-a') gefolgt von einer c-Region, die wahrscheinlich keine Sekundär- oder Tertiärstruktur aufweist, aufbaut (Kemink *et al.*, 1997). Starke Sequenzähnlichkeiten existieren dabei sowohl zwischen den Domänen a und a' [die das für die Aktivität bedeutende (-Cys-Gly-His-Cys-)-Motiv enthalten] als auch zwischen den Domänen b und b'.

Neben den Faltungsenzymen der Gruppe der PDIs und PPIs sind weitere Faltungshelferproteine, sog. molekulare Chaperone für die Faltung von Proteinen notwendig (Ellis, 1987), die fast alle der großen Gruppe der Hitzeschockproteine angehören (Georgopoulos & Welch, 1993; Buchner, 1996). Deren Hauptaufgabe besteht darin, sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen, unproduktive Seitenwege der Proteinfaltung, insbesondere Aggregationen, zu verhindern, indem sie selektiv nicht-natives Protein an exponierten, hydrophoben Oberflächen binden, ohne dabei sterische Informationen zur Faltung zu liefern (Jaenicke & Buchner, 1993; Jaenicke, 1996; Hartl, 1996; Beissinger & Buchner, 1998). Viele Hitzeschockproteine werden dementsprechend auch unter physiologischen Bedingungen konstitutiv exprimiert und sind z.B. an der Neusynthese von Proteinen, an der Proteintranslokation über Membranen, an der Degradation von Proteinen sowie an der Verhinderung von Aggregation und bei der Entfaltung von Proteinen beteiligt. Sie sind somit für das Zellwachstum essentiell (Becker & Craig, 1994). Molekulare Chaperone werden anhand von Sequenzhomologien und ihrer apparenten molekularen Masse in Familien eingeteilt. Die Hauptklassen sind: die Hsp100/Clp-Familie (Parsell & Lindquist, 1994; Schirmer *et al.*, 1996; Glover *et al.*, 1997), die Hsp70-Familie (Ellis & van der Vies, 1991; Gething *et al.*, 1994; Rüdiger *et al.*, 1997; Mayer & Bukau, 1998), die Hsp60-Familie (Ellis & van der Vies, 1991; Goloubinoff *et al.*, 1989; Beissinger & Buchner, 1998), die Hsp90-Familie (Jakob & Buchner, 1994; Pratt & Toft, 1997; Buchner *et al.*, 1999) und die Familie der kleinen Hitzeschockproteine (Lee *et al.*, 1995; Ehrnsperger *et al.*, 1997). In den meisten Fällen ist für die Faltung von Proteinen nicht nur eine Gruppe von Chaperonen verantwortlich, sondern verschiedene Chaperone kooperieren und interagieren gleichzeitig oder nacheinander mit den entsprechenden Substratproteinen in einem komplexen Netzwerk (Buchner, 1996; Bukau & Horwich, 1998)

1.1.4 Rückfaltung von Proteinen *in vitro*

In bestimmten Fällen ist die Renaturierung von Proteinen aus denaturierten bzw. aggregierten Polypeptiden wünschenswert. Das Hauptziel ist es dabei, eine hohe Ausbeute zu erhalten, die durch eine möglichst hohe Proteinkonzentration bei gleichzeitig niedriger Aggregationsrate erzielt werden soll (De Bernadez Clark, 1998; Jaenicke & Seckler, 1997, Lilie *et al.*, 1998). Die Effizienz der Renaturierung wird maßgeblich von der Konkurrenz zwischen Faltung und Aggregation bestimmt.

Die Entfernung des Denaturierungsmittels durch Verdünnung oder Dialyse stellt den Beginn des Renaturierungsprozesses dar. Der einfachste Weg, die Aggregation zu verlangsamen, ist eine Durchführung der Renaturierung bei niedrigen Proteinkonzentrationen (10-100 µg/ml) (Zettlmeissl *et al.*, 1979). Zusätzlich ist eine Optimierung bestimmter externer Parameter, z.B. pH-Wert und Temperatur, zur Steigerung der Ausbeute notwendig, da beispielsweise die hydrophoben Wechselwirkungen, die entscheidend für die unspezifische Aggregation sind, mit steigender Temperatur stärker werden.

Erschwert wird der Renaturierungsprozess zusätzlich, wenn die Bildung von Disulfidbrücken für die Stabilität des Proteins erforderlich ist. Unter diesen Bedingungen ist die Verwendung eines Redoxsystems erforderlich, das die Bildung und Umordnung von Disulfidbrücken ermöglicht. Am häufigsten werden dazu die Luftoxidation, gemischte Disulfide oder *Oxidoshuffling*-Systeme verwendet (De Bernadez Clark, 1998; Lilie *et al.*, 1998).

Neben den obengenannten Strategien findet der Einsatz niedermolekularer Substanzen zur Unterdrückung der Aggregation häufig Verwendung. So finden Kofaktoren, prosthetische Gruppen, chaotrope Substanzen, Detergenzien und L-Arginin (De Bernadez Clark, 1998; Lilie *et al.*, 1998) Anwendung in der Renaturierung von Proteinen. L-Arginin, dessen Einfluss auf die Rückfaltung noch nicht vollständig verstanden ist, wird häufig erfolgreich eingesetzt (Buchner & Rudolph, 1991; Lin & Traugh, 1993; Schrattenholz *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass L-Arginin die entstehenden Faltungsintermediate solubilisiert und somit stabilisiert (Lilie *et al.*, 1998). Eine ähnliche Wirkungsweise wird auch Detergenzien zugeschrieben (Bam *et al.*, 1996). Zur Steigerung des Ertrages können auch Chaperone bzw. Faltungshelferproteine (PDI, PPI) entsprechend den Bedingungen in der Zelle zugegeben werden (Thomas *et al.*, 1997).

Es ist also möglich, für zahlreiche Proteine entsprechende Renaturierungsprozesse zu entwickeln. Für eine maximale Ausbeute ist es jedoch notwendig, die Rückfaltungsbedingungen für jedes Protein zu optimieren.

1.2 Das Endoplasmatische Retikulum (ER)

Alle eukaryotischen Zellen besitzen ein ausgedehntes Membransystem, das Endoplasmatische Retikulum (ER), das als Eintrittspunkt für den sekretorischen Weg gilt. Etwa ein Drittel aller zellulären Proteine werden in das Lumen des ER transloziert, wo post-translationale Modifikationen, Faltung und Oligomerisierung der Proteine erfolgen. Dafür bietet das ER ein einzigartiges oxidierendes Milieu für die Faltung von Membranproteinen und disulfidverbrückten sekretorischen Proteinen, die an die Zelloberfläche transportiert werden, sowie von Proteinen, die für die Lokalisation in andere Organellen wie Lysosomen und den Golgiapparat bestimmt sind. Darüber hinaus beheimatet das ER zahlreiche Proteine, die durch einen kontinuierlichen vesikelvermittelten Transport von post-ER Kompartimenten des frühen sekretorischen Weges in das ER zurückgeführt werden. Diese ER-Proteine sind zum größten Teil Chaperone und andere Faltungshelferproteine, die neusynthetisierten Proteinen helfen, ihre korrekte Konformation zu erlangen. Neben der Proteinfaltung stellt das ER auch einen wichtigen Ort für die Synthese von zellulären Lipiden und Sterolen dar. Das ER ist außerdem das wichtigste Organell für die Signaltransduktion, das kontinuierlich auf Umwelteinflüsse reagiert (Calcium Freisetzung).

Zu den am häufigsten vorkommenden ER-lokalisierten Chaperonen und Faltungshelferproteinen gehören BiP (Gething, 1999; s. 1.2.1), das mit hydrophoben Aminosäurebereichen einer großen Anzahl von Proteinen interagiert, das glucoseregulierte Protein Grp94 aus der Familie der Hsp90-Proteine (Argon & Simen, 1999), die Proteindisulfidisomerasen (u.a. PDI, Noiva, 1999) die an der Bildung und Umlagerung von Disulfidbrücken beteiligt sind, Hsp47 (Lamande & Bateman, 1999), ein Protein, das nur in kollagenproduzierenden Zellen vorhanden ist und an der Faltung von Kollagen beteiligt ist, sowie die lektinähnlichen Chaperone Calnexin (auch p88 oder IP90 genannt) und Calreticulin (Chevet *et al.*, 1999). Calnexin und Calreticulin sind an der Qualitätskontrolle für Proteine des ER beteiligt und interagieren mit monoglykosylierten N-verknüpften Oligosacchariden (mit hohem Mannoseanteil) in Glykoproteinen. All diese ER-Chaperone und Faltungshelferproteine werden durch ein spezifisches C-terminales KDEL- (in *S. cerevisiae* HDEL) Retentionssignal selektiv im ER zurückgehalten oder sind als integrale Membranproteine an das ER gekoppelt.

Die Helferproteine des ER sind nicht isoliert an der Faltung von Proteinen beteiligt, sondern bilden vielmehr ein Netzwerk von Faltungshelferproteinen, in dem sie gleichzeitig oder nacheinander ihre Funktion erfüllen.

Tabelle 1.1: Faltungshelferproteine des Endoplasmatischen Retikulums

Proteinklasse	Organismus	Protein
<i>Disulfidisomerasen</i>	Säuger	PDI
	<i>S. cerevisiae</i>	Erp72, Erp58, Ero1p
<i>Peptidylprolyl-Isomerasen</i>	Mensch	FKBP13, FKBP65 Cyclophilin B, C, 40, 33A, 33B
	<i>S. cerevisiae</i>	Fpr2p Cyp2p, Cyp5p, Cpr7p, Cpr8p, Scc3p
<i>HSP70</i>	Säuger	Grp78/BiP, Grp170, Lhs1p
	<i>S. cerevisiae</i>	Kar2p
<i>DnaJ-ähnliche Proteine</i>	Säuger	Mtj1, Sec63-ähnliches Protein
	<i>S. cerevisiae</i>	Sec63p, Scj1p, Jcm1p
<i>HSP90</i>	Säuger	Grp94/gp96
<i>Lectin-ähnliche Proteine</i>	Säuger	Calnexin, Calreticulin
	<i>S. cerevisiae</i>	Cne1p
<i>Glykosyltransferasen</i>	Säuger	UDP-Glucose-Glykoprotein:Glucosyltransferase
<i>Sonstige</i>		Hsp47/gp46

1.2.1 BiP

BiP, ein molekulares Chaperon aus der Familie der Hsp70-Proteine (Mayer & Bukau, 1998) ist im Lumen des ER lokalisiert. Es wurde ursprünglich über seine Bindung an die schwere Kette von Antikörpern (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) identifiziert (Haas & Wabl, 1983) und unabhängig davon als glucosereguliertes Protein Grp78 charakterisiert (Pouyssegur *et al.*, 1977). Es bindet aber auch transient an zahlreiche andere neu synthetisierte und in das ER translozierte Proteine und ist dafür zuständig, diese in einem faltungs- und oligomerisierungskompetenten Zustand zu halten. Außerdem ist BiP essentiell für die Translokationsmaschinerie (Hamman *et al.*, 1998) sowie für den retrograden Transport. Bei diesem werden falschgefaltete Proteine, die für die Degradation durch das cytoplasmatisch lokalisierte Proteasom bestimmt sind, über die Membran aus dem ER geschleust. BiP ist unter physiologischen Bedingungen eines der am häufigsten im ER vorkommenden Proteine, zusätzlich wird seine Synthese unter Stressbedingungen, wenn es zu einer erhöhten Akkumulation von aggregierten Proteinen im ER kommt, deutlich erhöht. Unter diesen Bedingungen bindet es verstärkt an missgefaltete und nicht-assemblierte Proteine.

Wie alle Mitglieder der Hsp70-Familie besteht BiP aus zwei Domänen: einer N-terminalen Domäne, die die katalytische Stelle für die ATPase-Aktivität beinhaltet, und einer C-terminalen substratbindenden Domäne (McKay, 1993). Beide Domänen kommunizieren, und regulieren so die Affinität und die Dauer der (Poly-)Peptidbindung. So ist die Substrataffinität der C-terminalen Domäne abhängig davon, ob in der Nukleotidbindestelle der N-terminalen Domäne ATP (geringe Affinität aber schnelle Bindung) oder ADP (erhöhte Affinität aber langsame Bindung) gebunden ist. Außerdem wird die ATP-Hydrolyserate der N-terminalen Domäne durch die Bindung von (Poly-)Peptiden stimuliert (Flynn *et al.*, 1989; Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Ungefaltete Polypeptide, deren Faltung durch BiP assistiert wird, können mehrere Zyklen von Bindung und Dissoziation durchlaufen, ehe sie in der Lage sind, korrekt zu falten. Dabei ist die Dauer des Zyklus abhängig vom Nukleotidaustausch (ADP gegen ATP) und der ATP-Hydrolyserate.

Hsp70-Proteine erfüllen ihre Funktion zusammen mit Proteinen aus der Hsp40-Familie, die als besonderes Charakteristikum sog. J-Domänen enthalten (Cyr *et al.*, 1994; Kelley, 1998), welche die ATPase des Hsp70-Proteins stimulieren. Untersuchungen in Hefe haben ergeben, dass das zu BiP homologe Kar2 mit drei ER-lokalisierten lumenalen bzw. membrandurchspannenden Hsp40-Proteinen interagiert: Sec63p (Feldheim *et al.*, 1992), Scj1p (Schlenstedt *et al.*, 1995) und Jem1p (Nishikawa & Endo, 1997). Es wurde gezeigt, dass das mehrfach die Membran durchspannende Sec63p mit seiner lumenalen J-Domäne mit der ATP-gebundenen Form von BiP interagiert und die Hydrolyse stimuliert. Es kommt somit zu einer schnellen Bindung von Proteinen, die dann nur noch langsam, vermittelt durch den Nukleotidaustausch, freigegeben werden (Misselwitz *et al.*, 1998). Im ATPase-Zyklus des *E. coli*-Homologen DnaK existiert neben dem Hsp40-Protein DnaJ ein sogenannter

Nukleotidaustauschfaktor GrpE, der den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Nukleotidaustausches katalysiert. Arbeiten von Kabani *et al.* (2000) postulieren, dass das ER-Protein Sls1p in *Yarrowia lipolytica* bzw. ein Homologes in *S. cerevisiae* eine GrpE-ähnliche Funktion ausüben.

1.2.2 Prolyl-4-Hydroxylase

Das Strukturprotein Kollagen ist das am weitesten verbreitete tierische Protein und zählt zu den wichtigsten Bestandteilen des Stütz- und Bindegewebes, vor allem der Haut und der Knochensubstanz. Die grundlegende Struktureinheit des Kollagens bildet das Tropokollagen, das aus drei Strängen besteht. Es ist äußerst glycin- und prolinreich und enthält zahlreiche Hydroxyproline und Hydroxylysine, die sonst kaum in Proteinen vorkommen. Das Tropokollagen ist eine stabförmige dreisträngige Helix (Tripelhelix), deren Einzelstränge sich grundlegend von α -Helices unterscheiden. Sie wird durch Wasserstoffbrückenbindungen und durch Proline- und Hydroxyproline stabilisiert. Prokollagen stellt den Vorläufer des Tropokollagens dar, in das es durch Abspaltung der N- und C-terminalen Propeptide durch die Prokollagen-Peptidase umgewandelt wird (Bornstein *et al.*, 1982; Fleischmajer *et al.*, 1985).

Die Assemblierung von Prokollagen erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum. Dort werden die C-Propeptidomänen von drei Polypeptidketten einzeln gefaltet, um dann zu interagieren und zu trimerisieren. Dies initiiert die Faltung der tripelhelikalen Region. Der hoch komplexe Faltungs- und Assemblierungsvorgang erfordert die koordinierte Aktion einer Anzahl von Faltungshelfern und molekularen Chaperonen des ER.

Das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase, eine 2-Oxoglutaratdioxygenase, liegt frei oder membrangebunden in den Zisternen des rauen ER vor (Kivirikko *et al.*, 1992). Es katalysiert die Bildung von 4-Hydroxyprolinen in Xaa-Pro-Gly Sequenzen in Kollagen und mehr als zehn weiteren Proteinen mit kollagenähnlichen Sequenzen. (Prockop & Kivirikko, 1995) Diese Modifikation spielt eine zentrale Rolle in der Kollagensynthese, da 4-Hydroxyprolinreste essentiell für die Faltung von neu synthetisierten Kollagen-Polypeptidketten zu Kollagen-Tripelhelices sind (Kivirikko *et al.*, 1992). Für die Hydroxylierung werden außerdem Fe^{2+} -Ionen, 2-Oxoglutarat, O_2 und Ascorbat für den Schritt der oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat benötigt (Berg *et al.*, 1972; Prockop & Kivirikko, 1995) (s. Abb. 1.1). Die drei Aminosäuren His412, Asp414 und His483 der α -Untereinheit stellen dabei wahrscheinlich die Liganden für die Bindung der Fe^{2+} -Ionen dar (Myllyharju & Kivirikko, 1997).

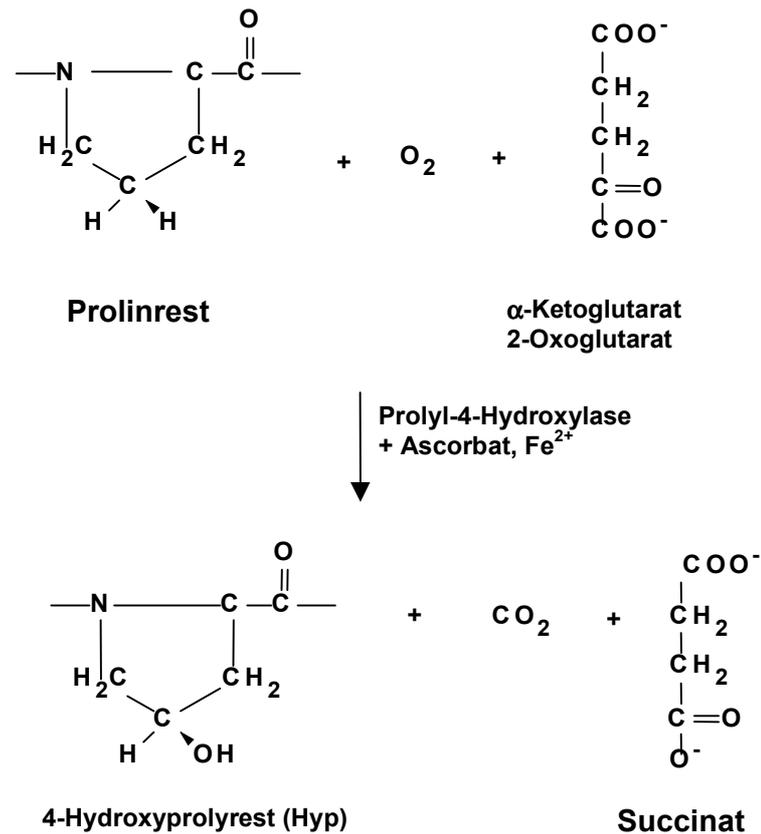


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der von der Prolyl-4-Hydroxylase durchgeführten Reaktion

In Vertebraten liegt die Prolyl-4-Hydroxylase als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vor (Helaakoski *et al.*, 1995), während das Enzym im Nematoden *Caenorhabditis elegans* als $\alpha\beta$ -Dimer auftritt (Veijola *et al.*, 1994) (s. Abb. 1.2). Es wurde lange Zeit vermutet, dass in Vertebraten nur ein Typ der Prolyl-4-Hydroxylase existiert. Vor wenigen Jahren konnte jedoch ein zweiter Isotyp der α -Untereinheit aus Maus (Annunen *et al.*, 1997) bzw. Mensch kloniert und charakterisiert werden (Helaakoski *et al.*, 1995), der in 5-30 % aller Moleküle vorkommt. Dementsprechend wurden die verschiedenen Formen der α -Untereinheit α (I) bzw. α (II) benannt, die in Tetrameren vom Typ I ($[\alpha$ (I)]₂ β ₂) bzw. Typ II ($[\alpha$ (II)]₂ β ₂) vorkommen. Die Untereinheiten der ca. 250 kDa großen Prolyl-4-Hydroxylase haben ein annähernd gleiche molekulare Masse. Die hochglykosylierte (16 Mannose-, ein Galaktose- und zwei N-acetylglucosaminreste) α -Untereinheit (Berg *et al.*, 1979) hat eine molekulare Masse von etwa 64 kDa, während die β -Untereinheit (zwei Mannose- und drei Galactosereste) etwa 60 kDa aufweist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, dass die einzelnen Untereinheiten ein stäbchenförmiges Aussehen haben und dass das Tetramer wahrscheinlich aus zwei V-förmigen Dimeren besteht, die ineinander greifen (Olsen *et al.*, 1973). Intramolekulare Disulfidbrücken scheinen essentiell für die Integrität der Monomere und

somit ihrer nativen Struktur zu sein; die Existenz von intermolekularen Disulfidbrücken ist hingegen unwahrscheinlich (Berg *et al.*, 1979).

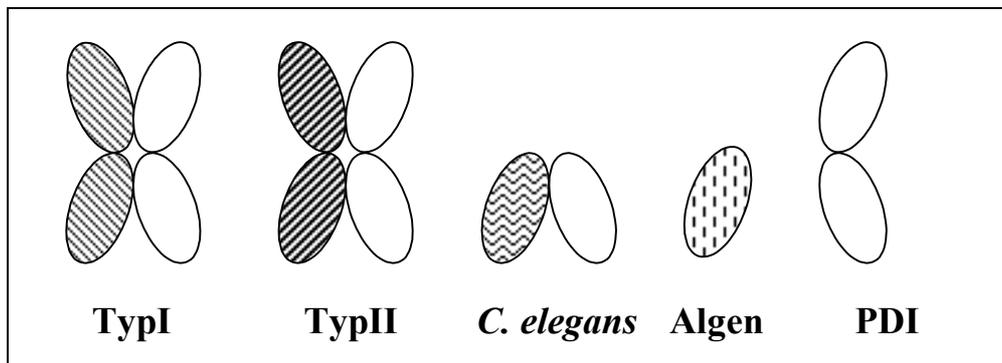


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Formen der Prolyl-4-Hydroxylase und von PDI

gemustert: β -Untereinheit (PDI), weiß: α -Untereinheit

Die α -Untereinheit trägt zum größten Teil, vielleicht sogar vollständig, zur katalytischen Stelle des Enzyms bei (Kivirikko *et al.*, 1989; Kivirikko *et al.*, 1992). Die β -Untereinheit ist in allen bekannten Formen der Prolyl-4-Hydroxylase identisch mit der multifunktionellen Proteindisulfidisomerase (PDI) (Koivu *et al.*, 1987; Pihlajaniemi *et al.*, 1987). Neben ihrer Funktion als Disulfidisomerase und ihrer Rolle als Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase dient PDI unter anderem als Untereinheit des dimeren mikrosomalen Triglyceridtransferproteins (Wetterau *et al.*, 1990), einem chaperonähnlichen Protein, das an der Faltung einer Vielzahl von neusynthetisierten Proteinen beteiligt ist. Die Hauptfunktion der PDI als Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase beruht wahrscheinlich auf ihrer Chaperonfunktion und nicht auf ihrer Disulfidisomeraseaktivität, wie Experimente mit Doppelmutanten gezeigt haben in denen beide katalytischen Stellen inaktiviert wurden (Vuori *et al.*, 1992). Diese Moleküle sind trotzdem in der Lage, Tetramere mit voller Aktivität zu bilden. Die Hauptfunktion der PDI scheint also darin zu liegen, die unlösliche α -Untereinheit in einer katalytisch aktiven, nicht aggregierten Form zu halten (Vuori *et al.*, 1992; John *et al.*, 1993; Freedman *et al.*, 1994).

Zur Assemblierung der Tetramere werden molekulare Chaperone benötigt, eines davon ist wahrscheinlich BiP (John & Bulleid, 1996; Veijola *et al.* 1996). In Koexpressionsexperimenten von BiP und der α -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase in Insektenzellen wurden sowohl lösliche als auch unlösliche Komplexe zwischen den beiden Polypeptiden gefunden (Veijola *et al.*, 1996). Die löslichen BiP- α -Untereinheit-Komplexe wiesen jedoch keine Prolylhydroxylaseaktivität auf. Dies zeigt, dass die Funktion der PDI (β -Untereinheit) nicht nur darauf beruht, die α -Untereinheit in Lösung zu halten, sondern dass diese spezifischer ist, und dazu dient, die α -Untereinheit in einer katalytisch aktiven, nicht-

aggregierten Konformation zu halten (Veijola *et al.*, 1996). Die Zusammenlagerung der Untereinheiten zum aktiven Tetramer erfolgt wahrscheinlich direkt nach der Synthese der leicht aggregierenden α -Untereinheit, während die β -Untereinheit zunächst im Überschuss synthetisiert wird und als *Precursor* (Vorstufe) in einem Pool von membrangebundenen Monomeren (*β -subunit related-protein*) gespeichert wird, ehe sie mit der α -Untereinheit zum Tetramer zusammentritt (Vuorela *et al.*, 1997).

1.2.3 Bildung von Disulfidbrücken im ER

Die Bildung von korrekten Disulfidbrücken ist essentiell für die Faltung und Stabilität zahlreicher Proteine, die sezerniert werden oder für Organellen des sekretorischen Weges bestimmt sind. Das ER weist ein stärker oxidierendes Milieu auf als das Cytosol; dies fördert die Bildung von Disulfidbrücken und wird auch durch einen relativ hohen Anteil an oxidiertem Glutathion (GSSG) gegenüber reduziertem Glutathion (GSH) widergespiegelt. Um diesen Zustand, der die stetige Bildung von Disulfidbrücken garantiert, beibehalten zu können ist ein Nettoeinstrom von Oxidationsäquivalenten in die Zelle erforderlich.

Man geht davon aus, dass die Bildung von Disulfidbrücken zunächst an der naszierenden Kette beginnt und letztendlich posttranslational, d.h. nach Beendigung des Translationsvorganges weitergeführt wird. Dabei hängt die zeitliche Abfolge der Verbrückungen von der Lage der Disulfidbrücke innerhalb der Struktur des komplett gefalteten Proteins ab.

Neben der Proteindisulfidisomerase (PDI, s. 1.1.3), bzw. PDI-homologen Proteinen, wird dem Protein Ero1p (ER oxidation-1) eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Disulfidbrücken im ER von Hefe und anderen Eukaryoten zugesprochen (Frand & Kaiser, 1998; Pollard *et al.*, 1998). Ero1p liegt membrangebunden im Lumen des ER vor (Tu *et al.*, 1993). Trotz einer ähnlichen Funktion konnte keine Homologie zum bakteriellen DsbB (Bardwell *et al.*, 1993) oder anderen Redoxenzymen gezeigt werden. Im Gegensatz zu DsbB, dessen Funktion von Ubiquinon abhängig ist, wurde für Ero1p eine Abhängigkeit von FAD nachgewiesen., die durch die Entdeckung, dass es sich bei Ero1p um ein Flavoprotein handelt, welches nicht-kovalent gebundenes FAD enthält (Tu *et al.*, 2000), unterstützt wird.

Erst kürzlich wurde herausgefunden, dass Ero1p als direkter Überträger von Oxidationsäquivalenten (Frand & Kaiser, 1999) auf PDI dient, die wiederum die Bildung von Disulfidbrücken im Substratprotein katalysiert. Es wurde postuliert, dass Oxidationsäquivalente direkt von Ero1p *via* die oxidierte Form der PDI auf sekretorische Proteine übertragen werden (s. Abb. 1.3). Bisher ist es jedoch noch unklar, wie Ero1p, das Schlüsselprotein zur Einführung von Oxidationsäquivalenten in das ER, selber reoxidiert wird. Es wird vermutet, dass Ero1p in direktem Kontakt zu Proteinen der ER-Elektronentransportmaschinerie steht (Frand *et al.*, 2000) und dass insbesondere die Abhängigkeit des Proteins vom FAD-Gehalt im ER eine Rolle dabei spielt (Tu *et al.*, 2000).

Auch dem erst kürzlich charakterisierten ER-Protein Hut1 wird eine Rolle bei der Faltung von Proteinen im ER zugeschrieben, seine genaue physiologische Funktion ist jedoch noch unklar (Nakanishi *et al.*, 2001).

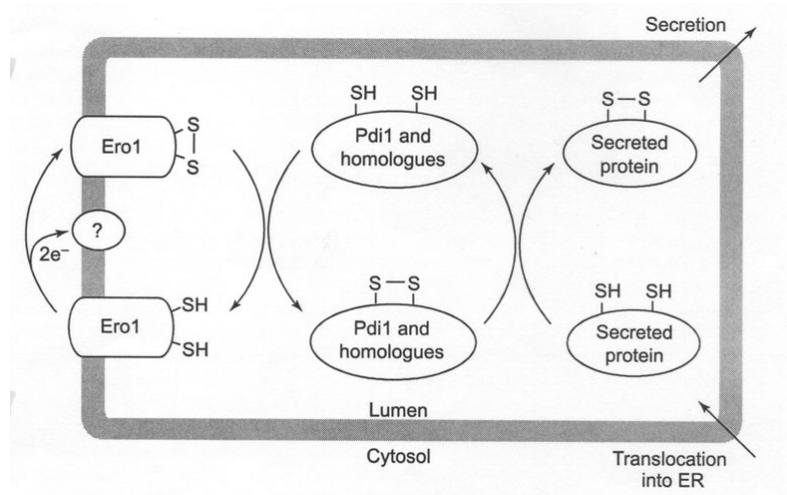


Abb. 1.3: Modell des Weges der Disulfidverbrückung im ER

Oxidationsäquivalente werden von Ero1p an Pdi1p (bzw. homologe Proteine) und weiter auf ein sekretorisches Protein übertragen. Dabei wird eine Reihe von direkten Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen durchlaufen

1.2.4 Unfolded Protein Response (UPR)

Eukaryotische sekretorische Proteine, die nicht korrekt gefaltet werden können, werden nicht sezerniert sondern verbleiben im ER (Rose & Doms, 1988), wo sie stabile Komplexe mit BiP und anderen molekularen Chaperonen bilden (Gething & Sambrook, 1992). Sowohl in Hefe als auch in Säugerzellen führt die Anhäufung von missgefalteten Polypeptiden im Lumen des ER zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Gene, die ER-Chaperone sowie Faltungskatalysatoren [z.B. BiP/Kar2, Proteindisulfidisomerasen, Grp94, Grp170 (Kaufman, 1999)] kodieren. Diese zelluläre Antwort auf einen Überschuss an nicht-nativem Protein wird *unfolded protein response* (UPR) genannt.

Studien haben gezeigt, dass nicht die Ansammlung von ungefalteten Proteinen in der Zelle, sondern vielmehr ein Mangel an freiem BiP im ER, hervorgerufen durch eine vermehrte Bindung von BiP an ungefaltete Proteine, das Signal für das Anschalten der UPR darstellt (Kohno *et al.*, 1993). Die UPR wird sowohl in Hefe als auch in Säugern auf der Ebene der Transkription reguliert (Kozutsumi *et al.*, 1988; Mori *et al.*, 1992). UPR-regulierte Gene enthalten dazu bestimmte konservierte Elemente in ihrer Promotorregion [UPRE in Hefe (Mori *et al.*, 1992), ERSE in höheren Eukaryoten (Yoshida *et al.*, 1998)]. Der Ablauf der UPR ist bisher am besten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erforscht. Das Protein Ern1p (Mori *et al.*, 1993; Cox *et al.*, 1993) enthält drei essentielle Komponenten des UPR-Weges:

(i) es stellt einen lumenalen Sensor dar, (ii) es ermöglicht die Weiterleitung des Signals über die ER-Membran und (iii) es beinhaltet die Fähigkeit zur Induktion der Synthese von Transkriptionsfaktoren, die an die Promotoren UPRE-kontrollierter Gene binden. Das Protein Ern1p scheint dabei mit einer ligandenvermittelten Oligomerisierung auf die Ansammlung von ungefalteten Proteinen zu reagieren (Shamu & Walter, 1996). Es wird vermutet, dass BiP unter normalen Bedingungen direkt an die lumenale, N-terminale Domäne von Ern1p bindet und somit die Oligomerisierung des Sensors verhindert. Bei vermehrtem Vorkommen von ungefalteten Proteinen wird jedoch BiP aus diesem Komplex entzogen, um seine Rolle als Chaperon auszuführen und an die entsprechenden Substratproteine zu binden. Als Folge dessen kann es zu der für die Auslösung der UPR notwendigen Oligomerisierung von Ern1p kommen (McMillan *et al.*, 1994; Shamu & Walter, 1996).

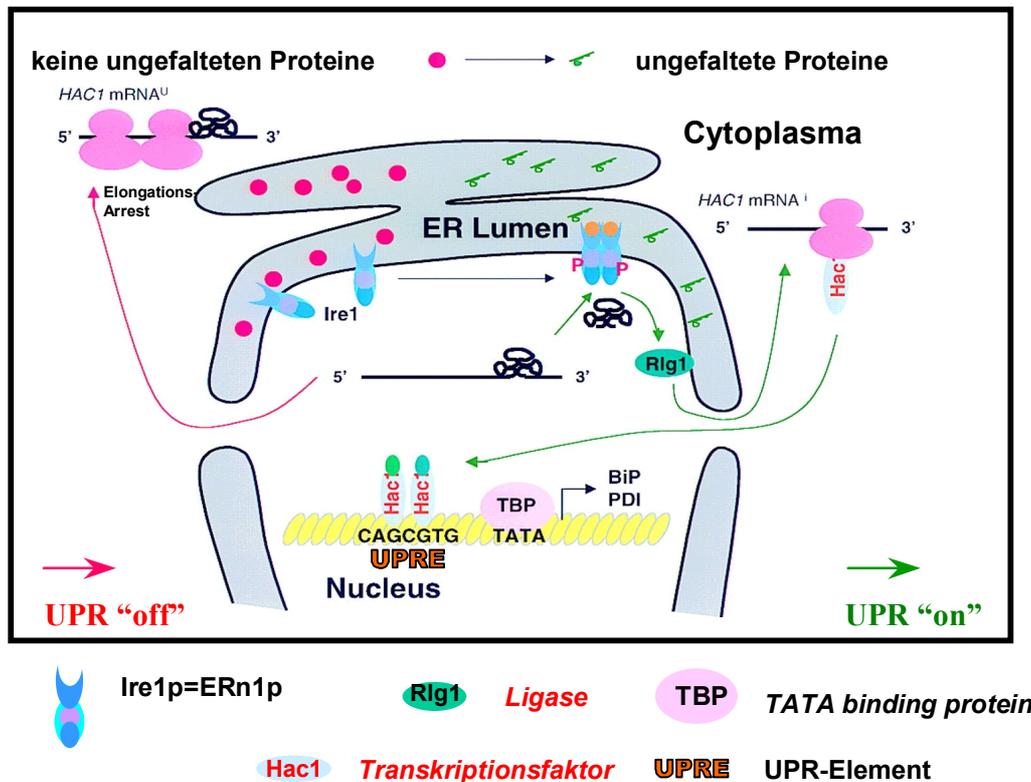


Abb. 1.4: Modell der UPR in *S. cerevisiae* (aus: Kaufmann, 1999)

Die roten Pfeile repräsentieren den Zustand, in dem die UPR ausgeschaltet ist, die grünen Pfeile den Weg der angeschalteten UPR (detaillierte Beschreibung s. Text)

Die cytoplasmatische Domäne von Ern1p enthält eine Serin/Threonin-Kinasedomäne (Mori *et al.*, 1993). Durch die Oligomerisierung von Ern1p wird die Kinasedomäne aktiviert, was wiederum zu einer *Trans*-autophosphorylierung von Serin- und wahrscheinlich auch Threoninresten führt (Shamu & Walter, 1996). Diese wiederum aktivieren die ortspezifische Endonukleaseaktivität, die in der C-terminalen Domäne des Proteins lokalisiert

ist (Sidrauski & Walter, 1997). Diese Endonuklease sowie eine bestimmte tRNA-Ligase (Sidrauski *et al.*, 1996) sind für ein alternatives Spleissen derjenigen mRNA notwendig, die den Transkriptionsfaktor Hac1p/Ern4p kodiert. Hac1p stellt den Faktor dar, der an das sog. *unfolded protein response element* (UPRE) bindet (Cox & Walter, 1996). Hac1p wird nur exprimiert, wenn aus der *HACI* mRNA mit Hilfe der Endonukleaseaktivität von Ire1p und der tRNA-Ligase ein 252 bp Intron herausgeschnitten wird (Cox & Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1997). Die *HACI^u* (uninduced) mRNA, die das Intron enthält, liegt also unter normalen Bedingungen in der Zelle vor, während sich die gespleisste *HACⁱ* (induced) mRNA, von der aus der aktive Transkriptionsfaktor exprimiert wird, nur dann anhäuft, wenn die UPR angeschaltet ist. Somit führt die Aktivierung von Ire1p zur Spaltung der *HACI^u* mRNA, wobei der Ligationsschritt der Splicingreaktion durch die tRNA-Ligase ausgeführt wird (Sidrauski *et al.*, 1996).

1.2.5 Qualitätskontrolle bei der Faltung von Glykoproteinen

Im ER eukaryotischer Zellen hat sich ein komplexes Kontrollsystem für die Faltung von Glykoproteinen herausgebildet, das zuerst von Hammond & Helenius (1994) postuliert wurde. Im Zentrum dieses sog. *quality control systems* stehen dabei in Säugern die lektinähnlichen Proteine Calnexin (Wada *et al.*, 1991) und Calreticulin (Hebert *et al.*, 1995) bzw. das homologe Cne1p (de Virgilio *et al.*, 1992) in *S. cerevisiae*. Calnexin und Cne1p sind Transmembranproteine vom Typ I während das homologe Calreticulin löslich im ER vorliegt und das ER-Retentionssignal KDEL aufweist; alle drei sind in der Lage Calcium zu binden (Wada *et al.*, 1991).

Glykoproteine müssen sowohl in Hefe als auch in Säugern auf ihrem Weg zum korrekt gefalteten und modifizierten Protein das ER durchlaufen, in dem die notwendigen Zuckerreste angehängt werden. Im Falle der N-Glykosylierung in Säugern wird zunächst durch eine Oligosaccharyltransferase eine fertige Oligosaccharidkette (Glc₃Man₉GlcNAc₂) kotranslational an das Protein gekoppelt. Diese Modifizierung erfolgt an einem Asparagin in der Sequenz Asn-X-Ser/Thr (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Im Anschluss daran wird die terminale Glucose durch das Enzym GlucosidaseI und unmittelbar danach ein zweiter Glucoserest durch die GlucosidaseII abgespaltet (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Während der Zuckerabspaltungen sollte das so getrimmte Glykoprotein seine korrekte Tertiär- bzw. Quartärstruktur erlangen. Die Faltung wird dabei von Chaperonen und Faltungshelfern unterstützt und das Protein kann anschließend das ER verlassen und seinem Bestimmungsort zugeführt werden. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden von den lektinähnlichen Proteinen Calnexin/Calreticulin bzw. Cne1p gebunden und im ER zurückgehalten. Nach Abspaltung des dritten Glucoserestes durch GlucosidaseII und Dissoziation des Substratproteins erhält dieses eine erneute Chance, seinen korrekten Faltungszustand zu erlangen. Als Sensor für diesen Faltungszustand dient dabei die UDP-Glucose:Glycoprotein-Glucosyltransferase

(UGGT), die in der Lage ist, zwischen ge falteten und ungefalteten Substratproteinen zu unterscheiden (Sousa *et al.*, 1992).

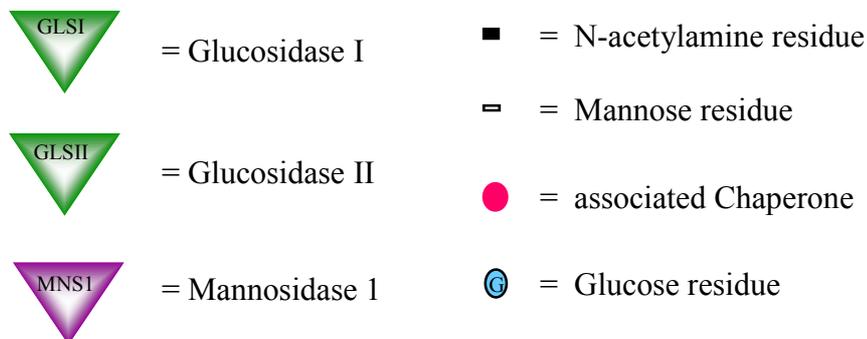
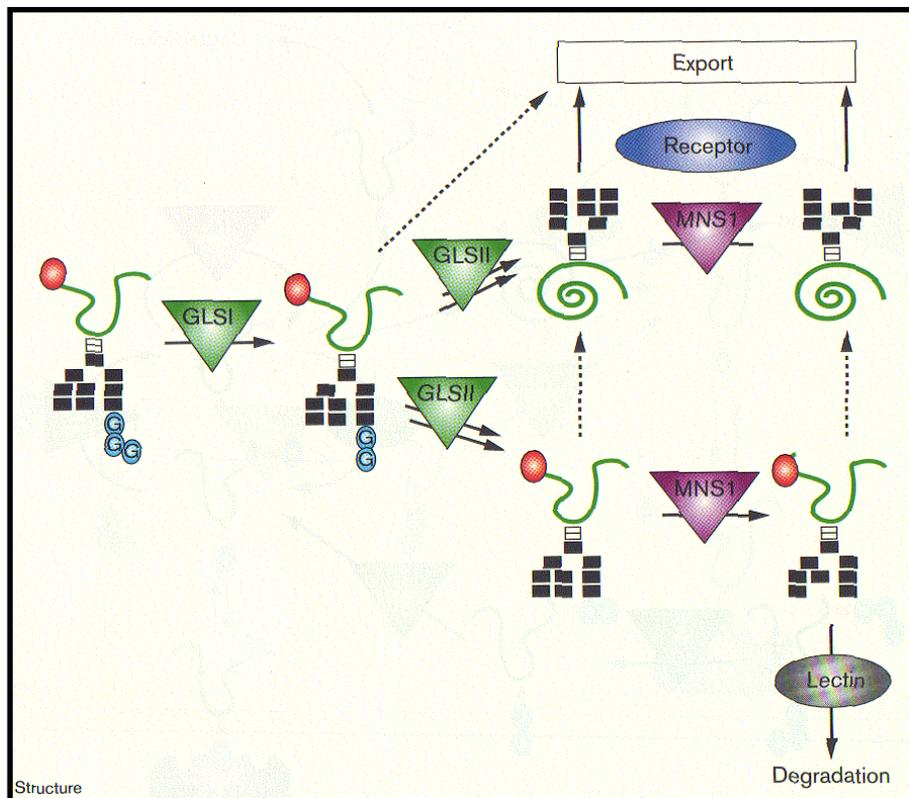


Abb. 1.5: Modell für die Qualitätskontrolle der Glykoproteinfaltung in *S. cerevisiae*
 (aus: Zapun *et al.*, 1999), detaillierte Beschreibung s. Text

Im Falle einer inkorrekten Faltung hängt sie wieder einen Glucoserest an das Protein an und markiert dieses so als inkorrekt gefaltetes Glykoprotein, das dann erneut von Calnexin/Calreticulin gebunden wird und dem Zyklus zugeführt wird (Hammond & Helenius, 1995; Parodi, 1998). Es wird vermutet, dass ungefaltete Proteine zahlreiche Zyklen durchlaufen, ehe sie korrekt falten, also nicht reglucoosyliert werden und aus dem

Zyklus ausscheiden (Hammond *et al.*, 1994). Für den Fall, dass das Substratprotein auch nach mehreren Zyklen nicht korrekt faltet, scheint eine zeitliche Limitierung eingebaut zu sein: Eine ER-Mannosidase spaltet dann einen der Mannosereste ab und markiert das Protein damit für die Degradation (Helenius *et al.*, 1997; Lal *et al.*, 1998). Das so markierte Protein wird wahrscheinlich von einem Rezeptor mit ebenfalls lektin-ähnlichen Eigenschaften erkannt, über die ER-Membran transloziert und dem Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg im Cytosol zugeführt (Jakob *et al.*, 1998).

Das System der *quality control* wurde sowohl in Säugern als auch in *S. cerevisiae* untersucht, wobei der Hauptunterschied darin liegt, dass in der Hefe bisher kein Homologes der UGGT (UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase) nachgewiesen werden konnte (Fernandez *et al.*, 1994) so dass ein linearer Weg postuliert wird (s. Abb. 1.5).

1.2.6 Degradation missgefalteter Proteine in Hefe - ERAD (*ER-associated protein degradation*)

Proteine, die nicht korrekt gefaltet, prozessiert oder assembliert sind, stellen ein Problem für die Zelle dar, denn diese auf verschiedene Arten entgegen wirken kann: Die Akkumulation bzw. Aggregation von Proteinen kann im günstigen Fall die *unfolded protein response* auslösen oder im ungünstigen Fall zu einem pathologischen Zustand führen, wie er bei zahlreichen Krankheiten beobachtet wird (Thomas *et al.*, 1995). Andererseits können die entsprechenden Proteine zu Lysosomen (bzw. zu Vakuolen in Hefe) transportiert werden, wo die Degradation erfolgt (Hong *et al.*, 1996), oder vom Qualitätskontrollapparat der Zelle erkannt werden. Dieser sorgt dafür, dass das missgefaltete Protein für den sofortigen Abbau bestimmt wird und somit dem sekretorischen Weg entzogen wird. Der Mechanismus dieses Abbauprozesses wird als *ER-associated protein degradation* (ERAD) bezeichnet und wurde erst kürzlich am Beispiel der Hefe *S. cerevisiae* annähernd aufgeschlüsselt. Das ERAD-System sorgt für eine Eliminierung missgefalteter Proteine, indem es diese der Degradation im Cytosol zuführt (Bonifacio & Weissman, 1998). Dafür werden die missgefalteten Proteine über die ER-Membran in das Cytosol zurücktransportiert, wo ubiquitin-konjugierende Enzyme diese für die Degradation durch das Proteasom vorbereiten (Ward *et al.*, 1995; Biederer *et al.*, 1997). Zur Durchführung dieser Aufgabe werden verschiedene Faktoren benötigt, unter ihnen die ER-residenten Proteine Der1p (Knop *et al.*, 1996), Hrd3p und Der3p/Hrd1p (Bordallo *et al.*, 1998). ERAD-Proteine müssen auf ihrem Weg vom ER zum Proteasom das Translokon passieren. Dies zeigt, dass mehrere Komponenten des Translokons und der cytosolischen Degradationsmaschinerie gleichzeitig von ERAD und anderen zellulären Prozessen genutzt werden (Hiller *et al.*, 1996; Zhou & Schekman, 1999). Bisher konnte für zahlreiche Proteine gezeigt werden, dass ihr Abbau über ERAD abläuft, wobei jedoch stets ein unterschiedliches Repertoire (unter ihnen BiP, Calnexin, Sec61p Sec63p) an ERAD-Proteinen daran beteiligt zu sein scheint (Brodsky & McCracken, 1999).

Funktionelle und genomische Analysen haben außerdem gezeigt, dass UPR und ERAD koordiniert ablaufen: Einerseits benötigt eine effiziente ERAD eine funktionierende UPR und andererseits führt der Verlust der ERAD-Funktion zu einer konstitutiven Induktion der UPR (Travers *et al.*, 2000).

1.3 Immunglobuline

Der Körper von Wirbeltieren ist dauernd durch infektiöse Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) aus der Umwelt bedroht und besitzt daher Abwehrsysteme, die ihn schützen. Dieser Schutz beruht auf einer Unterscheidung zwischen „eigen“ und „fremd“, d.h. das Immunsystem überprüft ständig unzählige molekulare Einheiten, um zu entscheiden, welche davon fremd sind um anschließend ihre Zerstörung einzuleiten. Bei der Erkennung sind drei Eigenschaften des Immunsystems von entscheidender Bedeutung: es weist eine extrem hohe Spezifität auf, es kann sich sehr gut den gegebenen Bedingungen anpassen und es ist in der Lage nach einer Erstantwort Informationen zu speichern, um dann bei wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Erreger schneller antworten zu können. Das Immunsystem benutzt dazu zwei verschiedene aber miteinander kommunizierende Wege: die zelluläre und die humorale Immunantwort (Janeway & Travers, 1997).

Bei der zellulären Immunantwort töten T-Lymphocyten Zellen, die an ihrer Oberfläche fremde Strukturen [von MHC (*major histocompatibility complex*)-Proteinen präsentierte Antigene] darbieten. Durch Unterstützung der B-Zellen stimulieren die T-Lymphocyten zudem die humorale Immunantwort (Roitt, 1991).

Die humorale Immunantwort besteht aus den von Plasmazellen [die ihrerseits von sog. B-Lymphocyten (B-Zellen) abstammen] sezernierten Antikörpern. Diese reagieren mit Antigenen (Erreger, Toxine, körperfremde Makromoleküle) bzw. mit einer speziellen Region des Antigens, die als antigene Determinante (Epitop) bezeichnet wird (Roitt, 1991).

Antikörper werden entsprechend ihrer Funktion und ihres Aufbaus in fünf Klassen eingeteilt: IgA, IgM, IgD, IgE und IgG (Janeway & Travers, 1997). Als im Serum vorherrschende Antikörperklasse, die in verschiedenen Unterklassen eingeteilt ist, sind die aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehenden IgGs (L_2H_2 , s. 1.3.1) von sehr großer Bedeutung für den Organismus und sind am besten erforscht. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gehören zur Klasse der IgGs.

Das hochmolekulare IgM [$(L_2H_2)_5$] erscheint als erste Antikörpergruppe im Serum als Antwort auf die Exposition des Antigens und kann über die Bindung und Aktivierung des Komplementsystems die Zerstörung von Fremdzellen bewirken. Das ebenfalls komplexe IgA-Molekül [$(L_2H_2)_n$, $n=1,2,3$] stellt hingegen die Hauptantikörperklasse in äußeren Sekreten wie Speichel und Tränenflüssigkeit dar und dient als erste Verteidigungslinie gegen bakterielle und virale Antigene. IgE (L_2H_2) ist entscheidend bei der Abwehr von Parasiten,

ist aber gleichzeitig auch für allergische Reaktionen verantwortlich. Im Gegensatz zu den bereits genannten Klassen ist die Funktion der Klasse der IgDs (L_2H_2) noch nicht geklärt. Als herausragendes Charakteristikum des Immunsystems gilt die Fähigkeit, gegen fast jede fremde Determinante innerhalb relativ kurzer Zeit eine große Menge spezifischer Antikörper zu produzieren. Diese Antikörpervielfalt beruht auf der kombinatorischen Verknüpfung verschiedener Gensegmente und dem gleichzeitigen Vorkommen somatischer Mutationen. Auf diese Art ist der menschliche Organismus theoretisch in der Lage mehr als 10^8 verschiedene Antikörperspezifitäten zu erzeugen (Honjo *et al.*, 1989).

1.3.1 Struktur von Antikörpern

Antikörper gehören ihrer Struktur nach zur sogenannten Immunglobulin-Superfamilie. In ihr wird neben den verschiedenen Klassen der Immunglobuline eine große Anzahl verschiedenartiger, miteinander verwandter Proteine zusammengefasst. Sie zeichnen sich durch einen hohen Grad an Sequenz- und Strukturhomologie aus. Alle Domänen der Ig-ähnlichen Proteine sind durch ein typisches Faltungsmuster gekennzeichnet, das als *immunoglobulin fold* bezeichnet wird (Bork *et al.*, 1994) (s. Abb. 1.6). In der Literatur wird diese Topologie oft auch als *greek key β -barrel* bezeichnet (Richardson, 1981). Es handelt sich dabei um ein Faltungsmotiv aus zwei leicht gegeneinander verdrehten Faltblattstrukturen (β -Sandwich; Lesk & Chotia, 1982) mit jeweils drei bzw. vier antiparallelen β -Strängen. Wechselwirkungen zwischen den Domänen führen in einer Assoziationsreaktion zur Bildung von Dimeren, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Barkley, 1988). Diese unabhängig faltenden

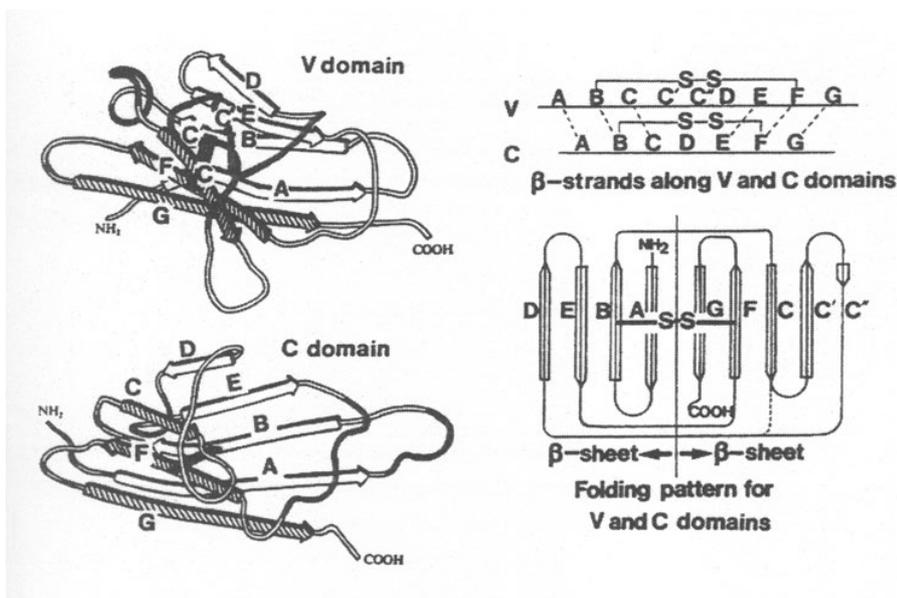


Abb. 1.6: Darstellung des *immunoglobulin fold* (Williams & Barclay, 1988)
Links: Strukturbild einer C_L-Domäne, rechts: schematische Darstellung des Faltungsmusters

Domänen (Rowe & Tanford, 1973) kommen neben den Proteinen des Immunsystems in vielen anderen Proteinen mit verschiedensten biologischen Funktionen vor (Bork *et al.*, 1994), wie z.B. in Zelloberflächenproteinen, Rezeptoren für Wachstumshormone, Transkriptionsfaktoren und Enzymen.

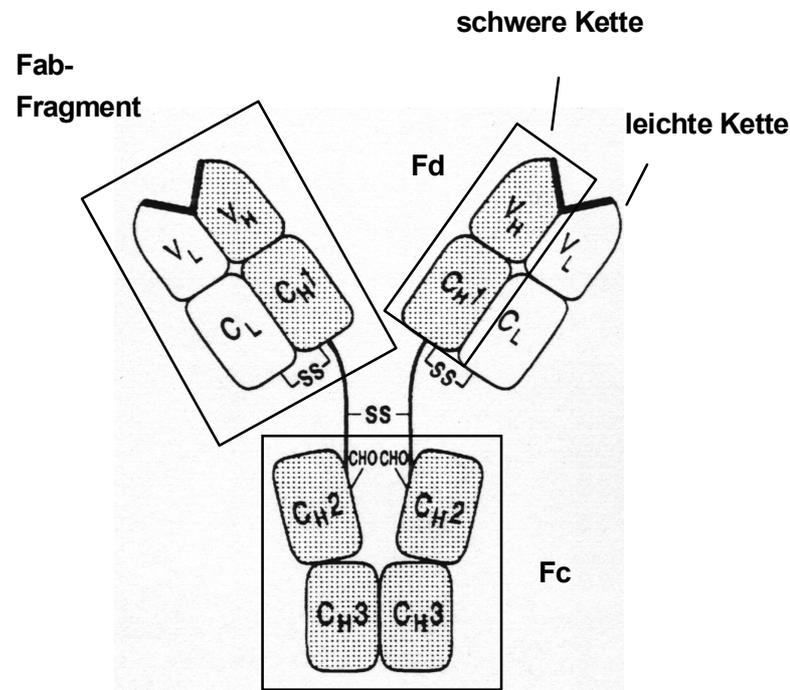


Abb. 1.7.: Schematisierte Struktur eines Antikörpers vom Typ IgG
nach Huston *et al.*, 1993; CHO: Glykoanteil; SS: Disulfidbrücke

Im Falle des IgG besteht der Antikörper aus zwei leichten und zwei schweren Ketten, die über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind (Amzel & Poljak, 1979; s. Abb. 1.7). Die leichte Kette (ca. 25 kDa), die vom κ - oder λ -Typ sein kann, besteht aus zwei Domänen (V_L und C_L), während sich die schwere Kette (ca. 50 kDa) vom γ -Typ aus vier Domänen (V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) zusammensetzt. Alle diese Domänen, die entsprechend dem *immunoglobuline fold* strukturiert sind, umfassen je ca. 100 Aminosäuren und sind homolog in ihrer Primärstruktur. Die verbindenden Polypeptidketten zwischen den Domänen sind relativ gut zugänglich für Proteasen. Am besten zugänglich ist dabei die sogenannte *hinge*-Region, ein wenig strukturierter Bereich zwischen der C_{H1} - und der C_{H2} -Domäne. Nach proteolytischer Spaltung mit Papain in der *hinge*-Region zerfällt das Molekül in die beiden Arme, die als **Fab**-Fragmente (*antigen binding*) bezeichnet werden und in den Stamm, der **Fc**-Fragment genannt wird. Ein Fab-Fragment besteht aus der leichten Kette (V_L - und C_L -Domäne) und aus dem Fd-Fragment (V_H - und C_{H1} -Domäne), während das Fc-Fragment je zwei Kopien der C_{H2} - und der C_{H3} -Domäne enthält. Die beiden variablen Domänen (V_H und V_L) bilden gemeinsam die Antigenbindestelle und werden als Fv-

Fragment bezeichnet. Die *hinge*-Region ist auch für die Flexibilität der Antigenbindung verantwortlich. In ihr liegen die Cysteine, welche die beiden schweren Ketten miteinander verbinden (Davies & Metzger, 1983). Ferner besitzt die C_H2-Domäne einen Zuckerrest, der über einen konservierten Asparaginrest N-glykosidisch an den Antikörper gebunden ist (Deisenhofer, 1981). Dieses hexosereiche Oligosaccharid ist zwischen den beiden C_H2-Domänen eingelagert und vermittelt den gegenseitigen Kontakt in diesem Bereich der beiden schweren Antikörperketten. Dieser Bereich stellt zudem die Bindungsstelle für das Komplementsystem des Immunsystems dar (Mizouchi *et al.*, 1987).

1.3.2 Antikörperfaltung *in vivo* und *in vitro*

Antikörper sind sekretorische Proteine, deren Synthese und Assemblierung am bzw. im Endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet. Faltung, Glykosylierung und Assemblierung der beiden Ketten erfolgen dabei kotranslational und sind innerhalb weniger Minuten abgeschlossen (Bergmann & Kuehl, 1979; Melnick *et al.*, 1992). Dabei bleibt nur wenig Zeit für die Assemblierung der leichten Kette mit der schweren Kette und die Ausbildung von Disulfidbrücken. Wird ein Zeitrahmen von wenigen Minuten überschritten, so wird die leichte Kette unassembliert aus der Zelle sezerniert (Bergman & Kuehl, 1979). Die vollständige kovalente Verknüpfung der beiden Ketten zum (H-L)₂-Molekül erfolgt hingegen erst dann, wenn beide Ketten vollständig synthetisiert sind. Nicht assoziierte schwere Ketten werden nicht alleine aus der Zelle sezerniert, sondern von BiP (*heavy chain binding protein*), einem Chaperon der Hsp70-Familie, gebunden (Haas & Wabl, 1983). Die Interaktion zwischen BiP und den Antikörperdomänen erfolgt dabei in einem ATP-abhängigen Zyklus von Bindung, Freisetzung und Rückbindung, wobei die Freisetzung des Substrates von der Hydrolyse des ATP abhängig ist (Hendershot *et al.*, 1996, Gaut & Hendershot, 1993).

Bisher wurden Bindestellen für BiP in der C_H1-Domäne der schweren Kette nachgewiesen (Hendershot *et al.*, 1987). Auch BiP-Bindestellen innerhalb der V_H- und der C_H3-Domäne wurden vorhergesagt (Knarr *et al.*, 1995), darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass BiP an die variable Domäne der leichten Kette (V_L) bindet (Melnick *et al.*, 1994; Davis *et al.*, 1999). Es wurde postuliert, dass BiP, entsprechend seiner Funktion als Chaperon, an die ungefaltete C_H1-Domäne der schweren Kette bindet. In Abwesenheit der leichten Kette faltet sich die C_H1-Domäne nicht und kann keine Disulfidbrücken ausbilden und bleibt somit an BiP gebunden. Liegt die leichte Kette jedoch in der Zelle in ausreichendem Maße vor, so wird BiP durch die leichte Kette verdrängt (Lee *et al.*, 1999), da diese sich an die schwere Kette lagert und es kommt zur Faltung und Oligomerisierung. Der so entstandene Komplex kann dann aus der Zelle exportiert werden (Cremer *et al.*, 1993).

Neben BiP ist auch die Proteindisulfidisomerase (PDI) an der Faltung von Antikörpermolekülen beteiligt. Entsprechend *in vitro*-Untersuchungen zur assistierten Faltung von

Antikörpern wurde vorgeschlagen, dass die Proteindisulfidisomerase zumindest bei der Rückfaltung von denaturiertem und oxidiertem Fab (Lilie *et al.*, 1994) keine chaperon-ähnlichen Eigenschaften entfaltet, wie unter anderen Bedingungen postuliert wurde (Geetha-Habib *et al.*, 1988; Yao *et al.*, 1997). Stattdessen beschränkt sich in diesem Fall die Rolle von PDI auf die Katalyse der Bildung und der Umlagerung von Disulfidbrücken.

PDI und BiP sind wahrscheinlich simultan an die naszierende und partiell gefaltete aber noch nicht assemblierte Antikörperkette gebunden und sind synergistisch an der Faltung beteiligt (Knarr *et al.*, 1995; s. Abb. 1.8). Es wird vermutet, dass BiP dabei die ungefaltete Polypeptidkette in einer Konformation hält, in der die Cysteine für PDI gut zugänglich sind (Freedman, 1991, Mayer *et al.*, 2000). Es konnte auch gezeigt werden, dass im Falle der leichten Kette bereits ein oder zwei intramolekulare Disulfidbrücken geschlossen sind, solange diese noch mit BiP assoziiert ist (Hendershot *et al.*, 1996; Leitzgen *et al.*, 1997).

Darüber hinaus wird vermutet, dass noch andere Chaperone an der Faltung von Antikörpern beteiligt sind. Das Chaperon Grp94/gp96, ein Mitglied der Familie der Hsp90-Familie, konnte

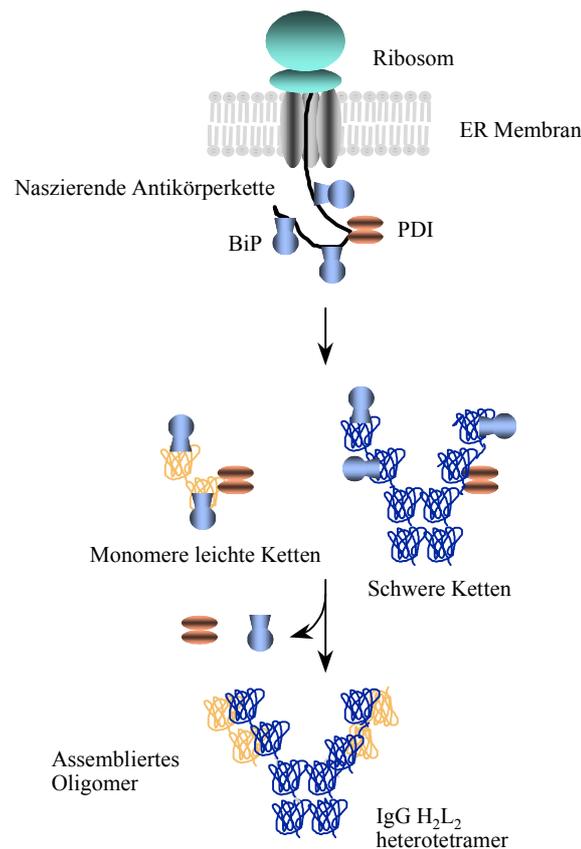


Abb. 1.8: Schematisches Modell zur Rolle von BiP und PDI während der *in vitro*-Faltung und Assoziation von Immunglobulinen (Knarr *et al.*, 1995)

Die Beteiligung anderer bedeutender Faltungshelferproteine (z.B. Grp94, Melnick *et al.*, 1992) ist nicht dargestellt.

in einem Komplex mit BiP und Immunglobulinen nachgewiesen werden (Melnick *et al.*, 1992). Dabei konnte gezeigt werden, dass Grp94 nicht, wie BiP, nur während der ersten Minuten der Faltung mit den Antikörperketten interagiert, sondern vielmehr für längere Zeit an ein späteres, vollständig disulfidverbrücktes Intermediat, das aber noch nicht assembliert vorliegt, bindet (Melnick *et al.*, 1994). Grp94 wurde ursprünglich als Mitglied der Grp (*glucose regulated protein*)-Familie (Pouyssegur *et al.*, 1977; Lee, 1992) beschrieben, während seine Rolle als ER-Chaperon erst später bekannt wurde. Neben Immunglobulinketten wurden auch Prokollagen (Ferreira *et al.*, 1994) und die erb-2-Tyrosinkinase als Substrate beschrieben (Chavany *et al.*, 1996).

Die Bildung der β -Faltblattstrukturen und deren Faltungsweg, der zum weitverbreiteten und für Antikörper charakteristischen hochkonservierten Strukturmotiv des *immunoglobulin fold* führt, sind noch weitgehend unverstanden. Es wird davon ausgegangen, dass die Bildung eines sog. β -hairpin loops den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Finkelstein, 1991). Dieser loop, der zwei Faltblattstränge verbindet, wird dabei als Faltungsnukleus angesehen (Blanco *et al.*, 1994; Ramirez-Alvarado *et al.*, 1999). Untersuchungen zur Faltungsgeschwindigkeit und Stabilität an verschiedenen Ig-ähnlichen β -sandwich Proteinen lassen vermuten, dass diese ebenfalls einen sehr ähnlichen Faltungsweg besitzen (Clarke *et al.*, 1999).

An Antikörpern bzw. deren Fragmenten wurden viele grundlegende *in vitro*-Untersuchungen zum *immunoglobulin fold* gemacht. Von Bedeutung sind dabei Arbeiten zur Faltung der leichten Kette und ihrer Domänen C_L und V_L (Goto & Hamaguchi, 1982), zur Faltung der proteolytisch erzeugten C_{H3}-Domäne (Isenman *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982) sowie zur Faltung des Antikörpers MAK33 (s. 1.3.3) und seiner Fragmente Fab, C_{H2} und C_{H3} (Buchner, 1987; Lilie, 1995; Thies *et al.*, 1999). Es wurde gezeigt, dass Antikörperdomänen im allgemeinen unabhängig von einander falten, wobei insbesondere Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen und die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken stark bestimmende Schritte darstellen (Goto & Hamaguchi, 1982; Thies *et al.*, 1999).

1.3.3 Der monoklonale Antikörper MAK33

MAK33 ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus vom κ /IgG1-Typ. Er ist gegen die Kreatinkinase aus menschlichem Muskel (CK-MM-EC 2.7.3.2) gerichtet und inhibiert deren enzymatische Aktivität zu 80 % (Buckel *et al.*, 1987). Die cDNAs der leichten Kette (κ -Typ), und der schweren Kette (γ 1-Typ) (Buckel *et al.*, 1987) und des Fd-Fragmentes der schweren Kette (Bücheler, 1989) wurden in *E. coli*-Vektoren kloniert. Sehr geringe Mengen immunologisch aktiven MAK33s konnten durch Sekretion aus COS- oder CHO-Zellen gewonnen werden (Weidle *et al.*, 1987). Erfolgreicher war jedoch, z.B. im Falle des Fab-Fragmentes von MAK33, die Gewinnung aktiven Proteins durch die Expression der einzelnen Ketten in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* und anschließender Rekonstitution

zu aktiven Antikörpern (Buchner & Rudolph, 1991). Über die Faltung und die Struktur von MAK33 wurden bereits einige grundlegende Arbeiten durchgeführt. Insbesondere das C_H3-Fragment (Thies *et al.*, 1999) und das Fab-Fragment (Lilie *et al.*, 1995) sind inzwischen gut charakterisiert.

Kürzlich wurde die Kristallstruktur des Fab-Fragmentes von MAK33 mit einer Auflösung von 2.9 Å gelöst (Augustine *et al.*, 2001; s. Abb. 1.9). Die Antigenbindestelle von MAK33 zeigt darin eine konvexe Gestalt, was typisch für Binderegionen ist, die große Antigene binden. Außerdem wurden die Umgebungen der *cis*-Prolyl-Peptidbindungen, deren Isomerisierung für den Faltungsprozess von großer Bedeutung ist, analysiert: Die entsprechenden Reste scheinen dabei nicht nur für die Stabilität der Domäne wichtig zu sein, sondern auch eine Rolle bei der Assoziation der leichten und schweren Kette zu spielen. Innerhalb der Struktur wurden auch potentielle BiP-Bindestellen, die mit dem *Bip-score program* (Blond-Elguindi *et al.*, 1993) bestimmt wurden, zugeordnet (Knarr *et al.*, 1995). Diese sind hauptsächlich innerhalb von β -Strängen lokalisiert, die als Kontaktflächen bei der Interaktion der leichten und der schweren Kette entstehen. Hierdurch wurde die These unterstützt, dass die Funktion von BiP darin liegt, dass es bei der Faltung und Assoziation von Immunglobulinen hydrophobe Oberflächen von Faltungsintermediaten abschirmt und somit die Interaktion mit anderen teilgefalteten Polypeptidketten, unspezifische Aggregation und unproduktive Nebenreaktionen verhindert (Knarr, 1998; Augustine *et al.*, 2001).

Untersuchungen über die Faltung von MAK33 bzw. seiner Fragmente (Lilie *et al.*, 1993, 1994, 1995; Lilie & Buchner, 1995) haben gezeigt, dass die langsamen Schritte der Faltung durch die Isomerisierung der Prolyl-Peptidbindungen begründet sind, obwohl die strukturelle Grundlage für dieses Phänomen noch relativ unverstanden ist. Diese Schritte werden auch hier durch Peptidyl-Prolylisomerasen (PPIs) katalysiert (Lilie *et al.*, 1993), wobei gezeigt wurde, dass der Isomerisierungszustand die Assoziation der Untereinheiten beeinflusst. Kinetische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die relative Lage der Faltung der Polypeptidkette im Faltungsweg des Fab-Fragmentes von der im Faltungsweg des C_H3-Dimers und des Fc-Fragmentes unterscheidet (Lilie *et al.*, 1995; Thies *et al.*, 1999). Die Isomerisierung der entscheidenden Prolinreste im Fab-Fragment kann scheinbar zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Bezug auf die Assoziation der Untereinheiten stattfinden (Lilie *et al.*, 1995). Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen bei der Faltung des C_H3-Dimers, bei der die Prolylisomerisierung bereits vor der Zusammenlagerung der beiden Domänen erfolgen muss (Thies *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Faltung des Antikörpers MAK33 ein komplexer Zusammenhang zwischen der Prolylisomerisierung und der Assoziation der Untereinheiten vorliegt.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zur nativen Struktur, Faltung und Renaturierung des Antikörpers MAK33 stellt dieser eines der besten Modell-Systeme für die Strukturbildung von Antikörpern dar.



Abb. 1.9: Kristallstruktur des Fab-Fragmentes von MAK33

gelb: leichte Kette; grün: schwere Kette; die CDR-Regionen beider Ketten sind markiert (L1-L3 und H1 bis H3), aus: Augustine *et al.*, 2001

1.4 Expression rekombinant erzeugter Proteine

1.4.1 Expression rekombinant erzeugter sekretorischer Proteine in Hefen

Bereits seit mehreren Jahrhunderten werden Hefen, insbesondere die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), biotechnologisch kultiviert und zur Produktion von Nahrungsmitteln und alkoholischen Getränken wie Bier und Brot nutzbringend eingesetzt.

Seit den frühen 80er Jahren werden Hefen nun auch für die Produktion intrazellulärer und extrazellulärer Proteine aus Menschen, Tieren und Pflanzen verwendet (Romanos *et al.*, 1992; Romanos, 1995). Der besondere Vorteil der Hefen gegenüber anderen Expressionssystemen liegt darin, dass sie einerseits ebenso einfach angezogen und genetisch manipuliert werden können wie Bakterien, andererseits aber die Fähigkeit besitzen, bestimmte eukaryoten-spezifische post-translationale Modifikationen durchzuführen, da sie, ebenso wie höhere Eukaryoten einen aus mehreren Komponenten bestehenden sekretorischen Weg besitzen. Von besonderer Bedeutung sind dabei proteolytische Prozessierungen, die intrazelluläre Bildung von Disulfidbrücken sowie N- und O-Glykosylierungen (Eckart & Bussineau, 1996; Schekman & Novick, 1982). Bakterien lassen hingegen diese Fähigkeiten vermissen und produzieren bei Überexpression eukaryotischer Proteine häufig Proteine, die missgefaltet, unlöslich (*s. inclusion bodies*) oder inaktiv sind. Trotz der Vorteile des Hefesystems gegenüber einem bakteriellen System kann es auch hier

zu Aggregationsvorgängen von Fremdproteinen kommen, die sich in Veränderungen der Zellmorphologie widerspiegeln (s. 1.1.2) und einen entscheidenden Einfluss auf die Sekretionsfähigkeit der Zelle haben.

Im Gegensatz zu Expressionssystemen höherer Eukaryoten wie CHO-Zellen aus Hamster oder baculovirus-infizierten Zelllinien, ist die Verwendung von Hefesystemen wesentlich ökonomischer, weniger zeitaufwendig und ergibt für gewöhnlich höhere Erträge (Eckart & Bussineau, 1996; Cregg, 1999). Trotzdem weisen auch Hefeexpressionssysteme einige Nachteile auf, die vor allem in Problemen bei der Durchführung sehr komplexer Modifikationen wie z.B. Prolylhydroxylierungen, Amidierungen, bestimmten Phosphorylierungen und auch komplizierten eukaryotenspezifischen Glykosylierungen (abweichend von den für Hefen typischen mannosereichen Sacchariden) zu finden sind (Cregg & Higgins, 1995).

So können beispielsweise Hyperglykosylierungen von heterolog erzeugten Therapeutika zu unerwünschten immunogenen Effekten führen (Moir & Dumais, 1987; Van Arsdell *et al.*, 1987). Daneben wurden auch *Scale-up*-Probleme aufgrund von Plasmidinstabilitäten beobachtet (Da Silva & Bailey, 1991), die letztendlich zu einer verringerten Ausbeute führten.

Zahlreiche Hefearten wurden bisher für die heterologe Expression getestet und eingesetzt (Muller *et al.*, 1998; Gellissen & Hollenberg, 1997; Gellissen *et al.*, 1995), von denen sich die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* als am häufigsten verwendete herausgebildet haben.

Zahlreiche heterolog exprimierte Proteine wurden insbesondere für diagnostische Zwecke sowie als Therapeutika oder Impfstoffe erfolgreich in *S. cerevisiae* hergestellt (Glick & Pasternack, 1998). 1981 wurde humanes Interferon als erstes rekombinantes Protein aus *S. cerevisiae* hergestellt (Hitzemann *et al.*, 1981). Bereits im nächsten Jahr folgte das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen als erster genetisch konstruierter Impfstoff (Valenzuela *et al.*, 1992).

Neben der Wahl des entsprechenden Hefestammes zur Expression heterologer Proteine sind auch weitere Faktoren, die die Sekretion beeinflussen, von Bedeutung. So kann z.B. die Wahl einer hefeeigenen Signalsequenz, die an das Fremdprotein fusioniert wird, Einfluss auf das Sekretionsverhalten der Wirtszelle haben. Die meist N-terminal lokalisierten Signalsequenzen dienen zur Erkennung derjenigen Proteine, die für die Translokation in das ER bestimmt sind. Die Signalsequenzen verschiedener Proteine und Organismen weisen zwar keine ausgeprägte Konsensussequenz auf, dennoch besitzen sie einige gemeinsame Eigenschaften: (i) sie sind zwischen 13 und 36 Aminosäuren lang, (ii) das aminoterminale Ende besitzt mindestens eine positiv geladene Aminosäure, (iii) ein stark hydrophober Bereich bildet das Zentrum der Signalsequenz und (iv) polare Aminosäuren werden kurz vor der Spaltstelle gefunden. Diese Signalsequenz wird nach ihrer Translokation in das Lumen des ER von einer Signalpeptidase abgespalten, so dass sie am prozessierten nativen Protein nicht mehr vorhanden ist.

Sind der Wirtsorganismus und der Organismus aus dem das Protein stammt gleich, so kann die originale Signalsequenz verwendet werden, wird jedoch ein fremdes Protein exprimiert, so muss eine Wahl der zu verwendenden Signalsequenz stattfinden, die eine erfolgreiche Expression im entsprechenden Wirtsorganismus erlaubt. Für die heterologe Expression in *S. cerevisiae* haben sich die Signalsequenz der Invertase und des α -Faktors für zahlreiche Experimente als erfolgreich erwiesen (Kaiser *et al.*, 1987). Durch *protein engineering* der *leader*-Sequenz konnte sogar die Sekretionsrate zahlreicher Proteine (inkl. des Peptidhormons Insulin; Kjeldsen *et al.*, 1997) erhöht werden.

1.4.2 Expression rekombinant erzeugter Antikörper und Antikörperfragmente

Antikörper sind Proteine mit einer sehr hohen Selektivität für die Bindung ihrer Antigene. Aus diesem Grund wird große Hoffnung auf Antikörper sowohl für die Diagnose als auch die Heilung von Krankheiten gesetzt (Riethmüller, 1993). Beim Einsatz von Antikörpern aus artfremden Säugetieren (z.B. Maus,) wird jedoch die Immunantwort des menschlichen Körpers [genannt HAMA (*human antimurine antibody*)-Immunantwort] aktiviert (Khazaeli *et al.*, 1994). Deshalb wurden stets Bemühungen unternommen, ein Expressionssystem für humane Antikörper zu entwickeln.

Neben der Herstellung von vollständigen Antikörpermolekülen treten dabei die einfacher konzipierten Fab-Fragmente in den Vordergrund. Zusätzlich wurden in den letzten Jahren immer mehr sog. *single chain* Fv-Fragmente (scFv) (s.) entwickelt; sie setzen sich aus den beiden variablen Domänen V_H und V_L zusammen, die durch einen synthetischen Linker verbunden sind. Somit besitzen sie zwar die gleiche Spezifität wie vollständige Antikörpermoleküle, unterscheiden sich jedoch bedingt durch ihre stark vereinfachte Faltung und ihre verbesserte Löslichkeit in ihren Eigenschaften und ihrer Anwendung stark von den ersteren.

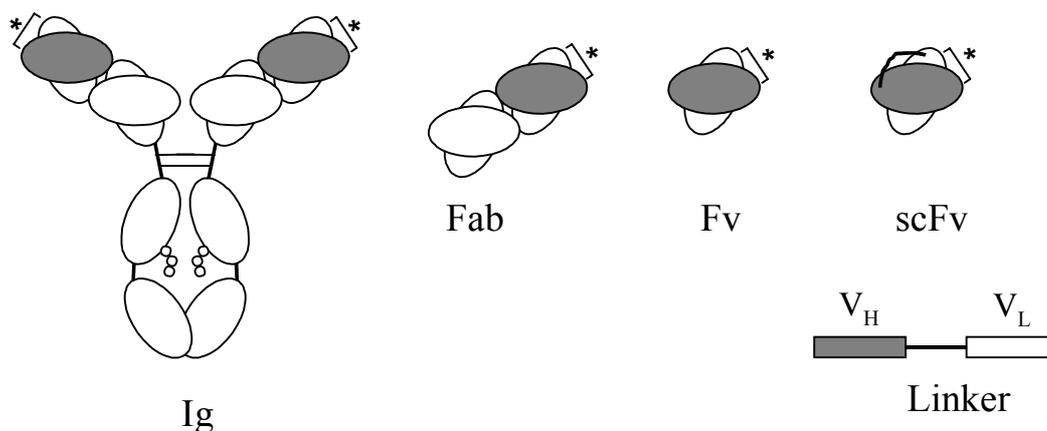


Abb. 1.10: Schematische Darstellung verschiedener Antikörperkonstrukte

(nach Hudson, 1998), *: Antigenbindestelle, g : Glykoanteil

Die Expression in *E. coli* bietet dadurch, dass es sich um einen genetisch und physiologisch gut verstandenen Organismus handelt, einen bedeutenden Vorteil gegenüber anderen Systemen. Ferner ermöglicht das schnelle Wachstum zu hohen Zelldichten die Produktion von relativ großen Mengen rekombinanten Proteins in einer verhältnismäßig kurzen Zeit. Allerdings weist die Expression in *E. coli* auch einige entscheidende Nachteile auf. Insbesondere die Beobachtung, dass bei cytoplasmatischer Expression keine Bildung von Disulfidbrücken erfolgt, sowie die Tatsache, dass viele posttranslationale Modifikationen, die für eukaryotische Proteine häufig von großer Bedeutung sind, nicht durchgeführt werden können (Makrides, 1996), machen die Expression von Antikörperfragmenten in *E. coli* äußerst schwierig. Ein weiteres Problem stellt die Bildung von *inclusion bodies* (s. 1.1.4) bei der Expression heterologer Proteine dar, da eine Extraktion dieser und eine anschließende *in vitro* Faltung der Proteine dadurch notwendig wird. Eine erfolgreiche Rückfaltung wurde inzwischen für zahlreiche Antikörperfragmente, insbesondere das Fab-Fragment von MAK33, erreicht und mit guten Ausbeuten durchgeführt (Buchner & Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1994). Die Expression als Fusionsprotein oder die Expression ins Periplasma bieten Möglichkeiten, diese Probleme zu umgehen und korrekt disulfidverbrückte Antikörperfragmente zu erzeugen (Skerra & Plückthun; 1988; Better *et al.*, 1988; Plückthun & Skerra, 1989; Zemel-Dreassen & Zamir, 1984).

Verschiedene eukaryotische Expressionssysteme wurden bisher für die Expression von Antikörpern verwendet. Hierbei können die meisten der Probleme (z.B. Glykosylierung, Disulfidverbrückung), die bei der Expression in *E. coli* auftreten, ausgeschlossen werden. Da es sich bei Antikörpern um sekretorische Proteine handelt, wurden Zellsysteme benutzt, die die Sekretion der Antikörper in das umgebende Medium möglich machen.

Am naheliegendsten ist sicherlich die Anwendung von Zellen des Immunsystems, welche die natürlichen Produktionsstätten von Antikörpern darstellen. In immortalisierten Plasmazellen bzw. ihren Vorläufern, den B-Zellen, werden dazu die in der entsprechenden Zelllinie vorhandenen eigenen Antikörpergene inaktiviert, um anschließend eine transiente Expression oder eine durch stabile Integration erreichte permanente Expression des heterologen Antikörpers zu induzieren. Auf diese Art wurden verschiedene rekombinante Antikörper bzw. Antikörperfragmente in Plasmamyelom-Zellen oder andere Myelom-Zelllinien exprimiert (Conrad *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1993; King *et al.*, 1993; Kitchin *et al.*, 1995).

Für die transiente Expression von Antikörpern in Säugerzellen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen auch COS-Zellen benutzt, die die vollständige Glykosylierung und anschließende Sekretion von 100 µg IgG pro 10⁶ Zellen für 48 bis 72 h erlaubten (Fouser *et al.*, 1992; Ames *et al.*, 1995). Als stabil transfizierte Zelllinien wurden hingegen CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) oder Mausmyelomzellen verwendet, mit denen je nach Zelllinie eine Produktion von 10-20 mg pro Liter erreicht werden kann (Sun *et al.*, 1987).

In den letzten Jahren wurden auch Versuche unternommen, durch Fusion von Antikörper-cDNAs an milchdrüsenspezifische Regulatorsequenzen die Sekretion von Antikörper in Milch zu erreichen. Insbesondere im Fall von Ziegen waren diese Experimente erfolgreich: mehrere Milligramm Antikörper pro Liter Milch konnten dabei produziert werden (Pollock *et al.*, 1999)

Auch Pflanzenzellen wurden in den letzten Jahren vermehrt für die Expression heterologer Proteine verwendet. Ende der 80er Jahre wurden Tabakpflanzen generiert, die in der Lage waren, korrekt gefaltete leichte und schwere Antikörperketten bzw. Antikörperfragmente zu synthetisieren (Hiatt *et al.*, 1989; Benvenuto *et al.*, 1991; Bruyns *et al.*, 1996). Diese sog. *plantibodies* haben damit die Möglichkeit eröffnet, therapeutische Antikörper relativ billig und in großen Mengen zu produzieren; lediglich die langen Generationszeiten von mehreren Monaten der entsprechenden Pflanzen sind dabei von Nachteil. Neben der Verwendung von Tabakpflanzen wurden auch Kartoffelpflanzen und sogar Samen, die eine langfristige Lagerung erlauben (Fiedler & Conrad, 1995), zur Herstellung von Antikörpern erzeugt.

Fremdproteine können auch effektiv in mit Baculoviren (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*) infizierten Insektenzellen exprimiert werden, die im Labormaßstab einfach kultiviert werden können (Choudary *et al.*, 1995). Invertebratenzellen sind ebenso wie Säugerzellen in der Lage, Signalpeptide abzuspalten, N- und O-Glykosylierungen durchzuführen, die sich jedoch in der Zusammensetzung der Zuckerketten von Säugerzellen unterscheiden (Jarvis *et al.*, 1990) und diese Proteine in extrazelluläre Bereiche zu sezernieren. Eine Vielzahl von Antikörperfragmenten und kompletten Antikörpern konnten mittlerweile in hohen Ausbeuten (viele mg/l) mit Hilfe des Baculovirus-Systems produziert werden (Kretzschmar *et al.*, 1996; Nesbit *et al.*, 1992; Abrams *et al.*, 1994). Die Koexpression des Chaperons BiP konnte zwar die Menge an intrazellulär gebildeten IgG-Molekülen erhöhen, nicht aber die Menge von funktional sekretiertem Produkt (Hsu *et al.*, 1994).

Aufgrund der oben bereits aufgeführten einfachen Kultivierung und der Möglichkeit zur genetischen Manipulation (s. 1.4.1) wurden auch verschiedene Hefen für die Expression von Antikörpern bzw. von Antikörperfragmenten eingesetzt. So wurde auch die Bäckerhefe *S. cerevisiae* benutzt, um IgG-, IgM-Moleküle oder Antikörperfragmente herzustellen (Edqvist *et al.*, 1991). Einerseits wurden Vektoren für die intrazelluläre Expression verwendet (Bowdish *et al.*, 1991), andererseits wurden aber auch Sekretionsvektoren eingesetzt. So konnten mit unterschiedlich guten Ausbeuten z. T. Antikörper und Antikörperfragment (insbesonder *single chain*-Antikörper) aus dem Medium gewonnen werden (Horwitz *et al.*, 1988; Wood *et al.*, 1985), wobei insbesondere eine fehlerhafte Glykosylierung und auch Aggregationsprozesse als Probleme auftraten.

Auch die Eignung anderer Hefen für die Produktion rekombinanter Antikörper wurde untersucht. So konnte ein *single chain*-Antikörper aus *Schizosaccharomyces pombe* gewonnen werden (Davis *et al.*, 1991) und ebenfalls verschiedene rekombinante *single chain*-Antikörper wurden in sehr guten Ausbeuten von *Pichia pastoris* sezerniert (Ridder *et al.*,

1995; Eldin *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1995). Auch die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha* wurde – unter Berücksichtigung der Codonpräferenz von *H. polymorpha* – für die Produktion des Antikörpers MAK33 getestet (Abdel-Salam, 2001).

Relativ hohe Ausbeuten eines rekombinanten Fab-Antikörpers konnten auch aus dem Kulturüberstand des filamentösen Pilzes *Trichoderma reesei* gewonnen werden (Nyyssönen *et al.*, 1993). Dabei wurden die Antikörperketten an das in der Zelle in hohen Mengen vorkommende Enzym Zellobiohydrolyase 1 fusioniert und anschließend durch eine im Kulturüberstand vorkommende Protease abgespaltet.

Organismus/ Zellsystem	Exprimiertes Protein	Art der Expression	Aktivität	Referenz
<i>E. coli</i>	Fab-Fragment	cytoplasmatisch (<i>inclusion bodies</i>)	Rückfaltung erfolgreich durchgeführt	Buchner & Rudolph, 1991; Lilie <i>et al.</i> , 1994
<i>E. coli</i>	Fv-Fragment/Fab-Fragment	periplasmatisch	korrekte Disulfidverbrückung	Skerra & Plückthun, 1988; Better <i>et al.</i> , 1988
COS-Zellen	IgG	Sekretion	100 µg/10 ⁶ , vollständige Glykosylierung	Fouser <i>et al.</i> , 1992 Ames <i>et al.</i> , 1995
CHO-Zellen	IgG	Sekretion	10-20 mg/l aktives Protein	Sun <i>et al.</i> , 1987 Page & Sysenham, 1991
Tabak	IgG und Antikörperfragmente	„Plantibodies“	<ul style="list-style-type: none"> ➤ 1 % der Zellmasse, ➤ aktive Antikörper 	Hiatt <i>et al.</i> , 1989
Tabak	scFv	Sekretion in den interstitiellen Raum, Gewinnung durch Auswaschen aus den Blättern	korrekt gefaltete Antikörper	Firek <i>et al.</i> , 1993
Tabak	scFv	in Samen	korrekt gefaltet Antikörper, langfristige Lagerung	Fiedler & Conrad, 1995
Baculovirus-infizierte Insektenzellen	scFv/IgG/Fab-Fragment eines IgAs	Sekretion	viele mg/ml aktives Protein	Kretzschmar <i>et al.</i> , 1996 Nesbit <i>et al.</i> , 1992/ Abrams <i>et al.</i> , 1994/
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	scFv	Sekretion, Koexpression mit BiP und PDI	bis zu 20 mg/ml aktives Protein	Shusta <i>et al.</i> 1998

Organismus/ Zellsystem	Exprimiertes Protein	Art der Expression	Aktivität	Referenz
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IgG	Sekretion	Assemblierung erfolgreich, 75 % unlösliche	Wood <i>et al.</i> , 1985
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fab	Sekretion	wenige ng/l, aktive Antikörper, keine cytotox. Aktivität	Horwitz <i>et al.</i> , 1988
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	scFv gegen Fluorescein	Sekretion	aktive scFvs	Davis <i>et al.</i> , 1991
<i>Pichia pastoris</i>	scFv gegen humanen Leukämie-Inhibitor-Faktor	Sekretion	bis zu 100 mg/l aktive scFvs	Ridder <i>et al.</i> , 1995
<i>Hansenula polymorpha</i>	Fab-Fragment	Sekretion	schwache Sekretion, Großteil löslich in Zelle	Abdel-Salam <i>et al.</i> , 2001
<i>Trichoderma reesei</i>	Fab-Fragment	Sekretion als Zellhydrolyase1-Fusionsprotein	1g/l aktives Protein	Nyysönen <i>et al.</i> , 1993

Tabelle 1.2: Beispiele für die Expression von Antikörpern und Antikörperfragmenten in verschiedenen Organismen

1.5 Problemstellung

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) eukaryotischer Zellen hat sich als spezialisiertes subzelluläres Kompartiment der Zelle entwickelt. Es bietet durch seine Enzymausstattung eine ideale Umgebung für komplexe Faltungs-, Modifizierungs- und Oligomerisierungsreaktionen von sekretorischen-, ER-lokalisierten und membranständigen Proteinen.

In einem Teil dieser Arbeit sollte die Fähigkeit des Endoplasmatischen Retikulums zur Expression, Strukturbildung und Sekretion heterologer Proteine untersucht werden. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sollte dabei als Modellorganismus dienen, da es sich bei ihr um einen relativ einfach organisierten eukaryotischen Organismus handelt, dessen Genom vollständig analysiert ist und der genetisch sehr gut zugänglich ist.

Die obengenannten Fähigkeiten sollten am Beispiel der Bildung eines Antikörpers und seines Fab-Fragmentes analysiert werden. Der Strukturbildungsprozess von Antikörpern beinhaltet die Faltung einzelner Domänen unter gleichzeitiger Ausbildung von Disulfidbrücken, sowie die Assoziation der leichten und schweren Ketten. Zusätzlich verkompliziert wird der Faltungsprozess durch Prolin-*cis/trans*-Isomerisierungsreaktionen. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper MAK33 ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus und ist gegen die menschliche Kreatinkinase gerichtet.

Das Potential der Hefezellen zur Herstellung von funktionellen Antikörpern (bzw. Fab-Fragmenten) und deren Sekretion sollte anhand von biochemischen Methoden untersucht und im Hinblick auf die, gegenüber höheren Eukaryoten reduzierte, Ausstattung an Faltungshelfern analysiert werden. Ferner sollte untersucht werden, ob durch eine Modifikation des Expressionssystems, d.h. durch Koexpression von relevanten Proteinen, eine gesteigerte Antikörperbildung erreicht werden kann.

Die Prolyl-4-Hydroxylase ist ein Protein des Endoplasmatischen Retikulums (ER), das essentiell für die Faltung von Kollagen ist. In Vertebraten tritt sie als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer auf, das seine Stabilität unter anderem durch intramolekulare Disulfidbrücken erlangt. Obwohl über ihre Funktion und ihre Assemblierung bereits zahlreiche Informationen vorliegen, ist über den genauen Aufbau des Tetramers und die Struktur bisher nur wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb, mit Hilfe biochemischer und biophysikalischer Methoden, ein Verständnis der Stabilität des Tetramers und Ansätze für die *in vitro*-Assemblierung erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (38 % mit 2% Bisacrylamid)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
Agarose, ultra pure	Biozym (Oldendorf)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
Bacto Agar	Becton Dickinson (Sparks, USA)
Bacto Trypton	Becton Dickinson (Sparks, USA)
Bacto Yeast Extract	Becton Dickinson (Sparks, USA)
Bromphenolblau S	Serva (Heidelberg)
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva (Heidelberg)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
ECLplus-Westernblotdetektionssystem	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Ethanol, p.A.	Riedel de Haen AG (Seelze)
Ethidiumbromid	Sigma (St. Louis, USA)
Glutaraldehyd, 25% in Wasser	Serva (Heidelberg)
Glyzerin, 99%	ICN, Biochemicals Inc. (Aurora, USA)
Harnstoff, ultra pure	ICN, Biochemicals Inc. (Aurora, USA)
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	ICN, Biochemicals Inc. (Aurora, USA)
Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	ICN, Biochemicals Inc. (Aurora, USA)
Kanamycin	Sigma (St. Louis, USA)
Lithiumacetat	Sigma (St. Louis, USA)
2-Mercaptoethanol, reinst	Sigma (St. Louis, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Calbiochem (USA)
Ponceau S	Sigma (St. Louis, USA)
Silbernitrat	Sigma (St. Louis, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin (TEMED)	Sigma (St. Louis, USA)
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (Tris)	ICN, Biochemicals Inc. (Aurora, Ohio)

Alle weiteren verwendeten Chemikalien stammen von der Firma Merck in Darmstadt und besitzen, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.A. Alle Lösungen und Puffer wurden mit quartzbidestilliertem Wasser, Bakterienmedien mit Reinwasser hergestellt. Der pH-Wert der Lösungen wurde unter Berücksichtigung des Temperaturkoeffizienten der entsprechenden Puffersubstanz bei der jeweiligen Temperatur eingestellt.

2.1.2 Proteine

2.1.2.1 Restriktionsendonukleasen

ClaI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
EcoRI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
NotI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
SacI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
SpeI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
XbaI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
XhoI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

2.1.2.2 Antikörper

Anti-Maus-IgG (H+L)-POD-Konjugat aus Esel	Dianova (Hamburg)
Anti-Maus-IgG (Fab') ₂ -POD-Konjugat aus Esel	Dianova (Hamburg)
<i>Strep-Tactin</i> [®] HRP-Konjugat	IBA (Göttingen)
Anti-PDI	DAKO/Stressgen (Heidelberg)

2.1.2.3 Sonstige Proteine

Pwo-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Alkalische Phosphatase (Shrimp)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Promega (Madison, USA)
HPLC-Eichproteine	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Albumin aus Rinderserum (BSA), rein	Sigma (St. Louis, USA)

Gereinigte Prolyl-4-Hydroxylase wurde freundlicherweise von Prof. Kari Kivirikko und Dr. Johanna Myllyharju (Collagen Research Unit, University of Oulu, Finnland) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Standards und Kits

High-Range-Molekulargewichtsstandard (HMW) für SDS-PAGE	Biorad Laboratories (München)
Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LMW) für SDS-PAGE	Biorad Laboratories (München)
MultiMark Multi-Colored Standard Rainbow-Marker für SDS-PAGE	Novex (Frankfurt) AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
DNA-Längenstandard λ /BstEII	New England BioLabs (Schalbach)
High Pure™ Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
High Pure™ PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
QIAquick™ Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)

2.1.4 Chromatographiematerialien

ResourceQ (1 ml und 6 ml)	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
ResourceS (1 ml und 6 ml)	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 75-pG-Säule	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 200-pG-Säule	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Superdex 200-HR-Säule	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
<i>Strep</i> -Tactin®-MacroPrep	IBA (Göttingen)
Super-Loop (50 ml und 150 ml)	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Weitere Materialien	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)

2.1.5 Sonstige Materialien

Centricon 3, 10, 30, 100-Mikrokonzentratoren	Millipore (Bedford, USA)
Centriprep Konzentratoren 3 und 30	Millipore (Bedford, USA)
Dialyseschläuche Spectra/Por (Ausschluss- größe 6-8 kDa)	Spectrum (Houston, USA)
Einmalküvetten, 1,5 ml halbmikro	Brand (Wertheim)
Filterpapier	Whatmann (Maidstone, UK)
Glasperlen ($\varnothing=0,45$ mm)	Braun (Meisungen)
Immobilon-N(Nitrocellulose) Membran	Millipore (Bedford, USA)
Immobilon-P(PVDF) Membran	Millipore (Bedford, USA)
Kulturröhrchen (17 x 100 mm)	Elkay Laboratory Products (UK)
PE-Röhrchen (50 und 15 ml)	Greiner & Söhne (Nürtingen)
Petrischalen aus Polystyrol	Greiner & Söhne (Nürtingen)
pH-Indikatorstreifen	Merck (Darmstadt)

Röntgenfilme X-OMAT™ AR	Eastman Kodak (Rochester, USA)
RotiBlock Blockierungsagens	Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 µm	Renner (Darmstadt)
Ultrafiltrationsmembranen YM3, YM10 und YM30	Millipore (Bedford, USA)

2.1.6 Biologische Materialien

2.1.6.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal ^S Str ^S rif ^S lac ⁻ gal ⁻ mtl ⁻ F ⁻ recA ⁺ uvr ⁺ (Villarejo & Zabin, 1974)
<i>E. coli</i> XL1blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 supE44 hsdR17 lac F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZ ΔM15 Tn10(Tet ^r)] Stratagene (La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ araD 139Δ(ara leu) 7697 lacX74 galU galK mcrA Δ(mrr ⁻ hsdRMS- mcrBC) rpsL decR 380 ΔlacZ ΔM15 endA1 nupG recA1, Bethesda Research Laboratories (USA)

2.1.6.2 Hefestämme

<i>S. cerevisiae</i> K603-3	leu2, ura3, his3, trp1, lys2, suc2, kar2::LEU2 (Derivat von W303)
<i>S. cerevisiae</i> W303	leu2, ura3-52, his3, trp1, lys2, suc2
<i>S. cerevisiae</i> KMY1005	α, leu2, ura3, his3, trp1, lys2

Die oben aufgeführten Hefestämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M.J. Gething und Dr. L. Helfenbaum (University of Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt

2.1.7 DNA

2.1.7.1 Oligodesoxynucleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zur Klonierung von:
LK-z1.HP	GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT CCA	pUEK5, pUEK9
LK-h2+Cys.HP	ACG <u>TGC GGC CGC</u> CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GC	pUEK5, pUEK9
LK-v.HP	ACG TAC TAG TAT GCT TTT GCA AGC TTT CCT TTT CCT TTT GGC TGG TTT TGC AGC CAA AAT ATC TGC ATC AAT	pUEK5, pUEK9

	GGA TAT TGT GCT AAC TCA GTC TCC A	
LK-z2.HP	ACG <u>TAC TAG TAT</u> GCT TTT GCA AGC TTT	pUEK5, pUEK9
Fd-h+Cys.HP	TGC <u>ACT CGA GTC</u> AAC CAC AAT CCC TGG G	pUEK5
SK-z1.HP	GAA GTT CAA GGT GTG GAG TCT G	pUEK5, pUEK9
SK-v2.HP	TGC <u>AGA ATT CAT</u> GCT TTT GCA AGC TTT CCT TTT CCT TTT GGC TGG TTT TGC AGC CAA AAT ATC TGC ATC AAT GGA AGT TCA AGG TGT GGA GTC TG	pUEK5, pUEK9
SK-z2.HP	TGC <u>AGA ATT CAT</u> GCT TTT GC	pUEK5, pUEK9
SK-h2.HP	TGC <u>ACT CGA GTT</u> ATC ATT CTT TAC CAG GAG AGT GG	pUEK9
LK-h-strep.HP	GAT <u>CGC GGC CGC</u> TTA CTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA AGC GCT AAT TCC ATT CCT GTT GAA GCT	pUEK18, pUEK19
Fd-h-strep.HP	GAT <u>CCT CGA GTT</u> ACT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC AAG CGC TAC AAC CAC AAT CCC TGG G	pUEK18
SK-h-strep.HP	GAT <u>CCT CGA GTT</u> ACT ATT TTT CGA ACT GCG GGT GGC TCC AAG CGC TTT TAC CAG GAG AGT GGG AGA G	pUEK19

2.1.7.2 Plasmide

p2HGal	2 μ m-Expressionsplasmid zur heterologen Expression in <i>S. cerevisiae</i> mit galaktoseinduzierbarem Promotor Gal1-10
pK603	Disruptionsplasmid zur Insertion von Leu2 in den Kar2-ORF (Normington <i>et al.</i> , 1989)
pX803	2 μ m-Expressionsvektor (Amp, URA) für Maus-BiP in Hefe mit Cu ²⁺ -induzierbarem Promotor (Norminton <i>et al.</i> , 1989)
pY113	Expressionsvektor für Kar2 (Amp, URA) in Hefe, M.-J. Gething (Melbourne, Australien)
pBT111	Expressionsvektor (Amp) für die leichte Kette (κ) von MAK33, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
p12002	Expressionsvektor (Amp) für das Fd-Fragment (γ 1) von MAK33 mit lacZ-Fusion, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
	Expressionsvektor (Amp) für die schwere Kette (γ 1) von

p12016	MAK33 mit lacZ-Fusion, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
p416Gal	Hefe-Shuttlevektor (Amp/URA3) mit Gal-induzierbarem Promotor, ohne Insert M.J. Gething (Melbourne, Australien)
p416Gal-HAC1ΔINT	Hefe-Shuttlevektor (Amp/URA3) mit Gal-induzierbarem Promotor zur Expression von Hac1 ⁱ aus <i>S. cerevisiae</i> , M.J. Gething (Melbourne, Australien)
pY16CUP	Hefe-Shuttlevektor (Amp/URA3) mit Kupfer-induzierbarem Promotor, ohne Insert M.J. Gething (Melbourne, Australien)
p416CUP-HAC1ΔINT WT#1	Hefe-Shuttlevektor (Amp/URA3) mit Kupfer-induzierbarem Promotor zur Expression von Hac1 ⁱ aus <i>S. cerevisiae</i> , Klon #1 M.J. Gething (Melbourne, Australien)
p416CUP-HAC1ΔINT WT#6	Hefe-Shuttlevektor (Amp/URA3) mit Kupfer-induzierbarem Promotor zur Expression von Hac1 ⁱ aus <i>S. cerevisiae</i> , Klon #6 M.J. Gething (Melbourne, Australien)

2.1.7.3 Sonstige DNA

Carrier DNA (Lachssperma DNA)	Sigma (St. Louis, USA)
-------------------------------	------------------------

2.1.8 ELISA-Reagentien

Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
ABTS-Tabletten	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
ABTS-Substratpuffer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Kreatinkinase, biotinyliert	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Blockingpuffer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
MAK33-Fab-Standard	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat (Hybridoma Screening Reagent)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

POD-Konjugatpuffer:	100 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5
	50 mM	NaCl
	0,5 mM	EDTA
	0,1 %	Tween-20
	1 %	Blocking Reagenz

2.1.9 Lösungen, Puffer und Medien

Lösungen und Puffer für mikrobiologische Arbeiten wurden direkt nach ihrer Herstellung autoklaviert oder sterilfiltriert (Sambrook, 1989). Die Lagerung erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur.

2.1.9.1 Medien

LB-Medium:	10 g/l	Bacto Trypton		
	5 g/l	Yeast Extract		
	5 g/l	NaCl		
	mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt			
YPD-Medium:	5 g/l	Yeast Extract		
	10 g/l	Bacto Pepton		
	20 g/l	Glucose		
	1 ml/l	NaOH		
Glucose-Minimalmedium:	6,7 g/l	Bacto-Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren		
	20 g/l	Glucose		
	0,8 g/l	<i>Drop-out mix</i>		
	pH nach Bedarf eingestellt			
Galaktose-Minimalmedium:	6,7 g/l	Bacto-Hefe Stickstoffbase ohne Aminosäuren		
	20 g/l	Galaktose		
	0,8 g/l	<i>Drop-out mix</i>		
	pH nach Bedarf eingestellt			
<i>Drop-out mix:</i>	0,5 g	Adenin	2,0 g	Methionin
	2,0 g	Arginin	2,0 g	Phenylalanin
	2,0 g	Asparaginsäure	2,0 g	Threonin
	2,0 g	Histidin	2,0 g	Tryptophan
	10,0 g	Leucin	2,0 g	Tyrosin
	2,0 g	Lysin	2,0 g	Uracil

Zur Herstellung der gewünschten *Drop-out*-Mischung wurden alle Zutaten abzüglich der als Selektionsmarker verwendeten Aminosäure zusammengegeben und gründlich gemischt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 15 g/l Agar hinzugefügt (Lagerung bei 4 °C).

2.1.9.2 Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C,
dem Medium im Verhältnis 1:1000 zuzusetzen

2.1.9.3 Lösungen für molekularbiologische Methoden

Agarose-Lösung (1 %): 1 g Agarose
100 ml TAE (1×)
1 µl Ethidiumbromidlösung (0,04 %)
(Zugabe nach Abkühlung auf ca. 60 °C)

TAE-Puffer (50×): 2 M Tris/Acetat
50 mM EDTA
mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt

DNA-Auftragspuffer: 50 % v/v Glycerin
0,025 % w/v Xylencyanol
0,025 % w/v Bromphenolblau

Bei der Verwendung von Kits und Enzymen wurden die jeweils von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer benutzt.

2.1.9.4 Puffer für proteinchemische und präparative Methoden

5× Probenpuffer (reduzierend) 5 % w/v SDS
(= 5× Laemmli): 0,1 M Tris/HCl, pH 6,8
0,001 % w/v Bromphenolblau
5 % v/v 2-Mercaptoethanol

5× Probenpuffer (nicht-reduzierend) 5 % w/v SDS
0,1 M Tris/HCl, pH 6,8
0,001 % w/v Bromphenolblau

5× Probenpuffer (nativ) 0,1 M Tris/HCl, pH 6,8
0,001 % w/v Bromphenolblau

2.1.9.5 Geräte

Absorptionsspektrophotometer

Ultrospec 3000 UV/VIS-Spektrophotometer	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Biochrom 4060 UV/VIS-Spektrophotometer	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Jasco V-550 UV/VIS-Spektrophotometer	Jasco (Groß-Umstadt)

Circulardichroismus-Spektropolarimeter

Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit	Jasco (Groß-Umstadt)
--	----------------------

Fluoreszenzspektrofluorimeter

FluoroMax II Fluoreszenz-Spektrophotometer mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Jobin Yvon (Grasbrunn)
--	------------------------

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

LKB 2050 Midget-Elektrophorese-Einheit	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
LKB GNA-100 Agarose-Gelelektrophorese-Einheit	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Fast Blot B44 Apparatur	Biometra (Göttingen)

Spannungsquellen

EPS 301, 600, 1001 und 3500	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
LKB Spannungsgerät 2301 Macro Drive	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)

HPLC

Pumpe PU-1580	Jasco (Groß-Umstadt)
Fluoreszenzdetektor FP-1520	Jasco (Groß-Umstadt)
Entgaser Gastorr 153	Jasco (Groß-Umstadt)

Waagen

Analysenwaage H 20 T	Mettler Toledo (Gießen)
Halbmikrowaage L 160 D	Sartorius (Göttingen)

Chromatographieranlagen

GradiFrac-System	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
FPLC-System	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
SuperRac-System	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
HiLoad System	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Rotina 46 R Kühlzentrifuge mit 4312-Rotor	Hettich (Tuttlingen)
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-E mit MLS50-Rotor	Beckman (Palo Alto, USA)
Avanti J-25 mit JA25.50 und JA10 Rotoren	Beckman (Palo Alto, USA)

ELISA-Geräte

Interface 4010-Epson HX20-Computer mit Digimed-Software	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
ES 22 ELISA-Pipettierstation	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Photometer 4010	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Weitere Geräte

Brutschrank	Memmert (Schwabach)
Digitalthermometer mit Thermofühler	Keithly Instr. (Cleveland, USA)
Dispergierer DIAX 900	Heidolph (Schwabach)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Geldokumentationssystem BiodocII	Biometra (Göttingen)
Kryostaten Haake F3/K und D8/GH	Haake (Karlsruhe)
Magnetrührer Heidolph MR 2000	Heidolph (Schwabach)
Metallblockthermostat Reacti Therm	Pierce (Rockford, USA)
pH-Meter 89 60	Beckmann (Palo Alto, USA)
Phosphorimager Storm 869	Molecular Dynamics
Primus PCR ThermoCycler	MWG Biotech AG (Ebersberg)
Refraktometer	Leica (Solms)
Rotator REAX 2	Heidolph (Kelheim)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Ultrafiltrationszelle	Millipore (Bedford, USA)
Ultraschallaufschlussgerät Sonifier B-12	Branson Company (Danbury)
Ultraschallbad Sonsorex RK 100H	Bandelin (Berlin)
Ultraschallgerät Bandelin Sonoplus GM2200	Bandelin Electronics (Berlin)
Ultraschallgerät Branson Sonifier B-12	Branson Sonic Power Co. (Danbury, USA)
Umluftinkubator	New Brunswick Scientific (Nürtingen)
Umluftinkubator	Mytron (Heiligenstadt)
Varioklav Dampfsterilisator 500E	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Whirlmix	Heidolph (Schwabach)
Zellaufschlussgerät Basic Z	Constant Systems (Warwick, UK)

2.1.10 Computerprogramme

Borwin Chromatographie Software	Jasco (Groß-Umstadt)
CDNN	Backpropagation Neural Networks
Clone Manager 5.1	Scientific & Educational Software
CorelDraw & CorelPhotoPaint 8.0	Corel Corp. (Canada)
Expasy Tools	www.expasy.ch/tools
ImageMaster 1D Prime 2.01 (inkl. LabScan)	AmershamPharmacia (Uppsala, Schweden)
Microsoft Office 97	Microsoft (Redmond, USA)
PeakFit	AISN Software Inc.
PrimerDesign Version 1.02	Scientific & Educational Software
Rasmol 2.6 & 2.7	© R. Sayle, 1993-1997
Sigma Plot 4.0	SPSS Inc. (Chicago, USA)
WebLabViewer Pro 3.7	Molecular Simulations Inc.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die Anzucht von Bakterien und Hefen und bei molekularbiologischen Arbeiten wurden sterile Gefäße und Lösungen verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Arbeiten bei Raumtemperatur ausgeführt.

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E.coli*-Stämmen

Die Anzucht der *E. coli*-Kulturen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989), wenn nicht anders angegeben bei 37 °C, entweder durch Animpfen aus einer Glyzerinkultur oder aus einer Einzelkolonie von der Agarplatte. Das Wachstum der Kulturen wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Ein OD₆₀₀-Wert von 1 entspricht dabei einer Zelldichte von etwa 10⁹ Zellen/ml.

Kulturen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienstämme wurden auf LB-Agarplatten maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Stämme als Glyzerinkultur aufbewahrt. Dazu wurden 1 ml Übernachtskultur mit 0,5 ml 50 % (v/v) Glycerin vermischt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Kultivierung und Konservierung von Hefestämmen

Hefekulturen wurden nach dem Animpfen aus einer Glyzerinkultur oder von einer Agarplatte bei 30 °C angezogen. Das Wachstum wurde wie bei *E. coli*-Stämmen (s. 2.2.1) anhand der OD₆₀₀ verfolgt. Bevor die Hefestämme für weitere Experimente verwendet wurden, wurden diese zunächst über mehrere Generationen in frisches Medium überimpft, um so eine Anpassung der Hefen an die entsprechenden Kulturbedingungen zu gewährleisten.

Die Hefestämme wurden in Flüssigmedium oder auf Agarplatten (YPD oder Minimalmedium) mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden ebenfalls Glycerinkulturen erstellt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um größere Mengen reiner Plasmid-DNA zu erhalten, bzw. um positive Klone nach einer Transformation zu identifizieren, wurde mit Hilfe des *High PureTM Plasmid Isolation Kit* der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), dem das Verfahren der alkalischen Lyse zugrunde liegt, Plasmidpräparationen aus 4-8 ml *E. coli*-Übernacht-Kulturen durchgeführt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, lediglich die Elution erfolgte abweichend von der Vorschrift mit 40-80 μl ddH₂O.

2.2.4 PCR-Amplifikation (Mullis & Faloona, 1987)

Die von Mullis & Faloona (1987) entwickelte Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte. Hierbei wird der zwischen zwei verwendeten Primern liegende DNA-Abschnitt im Verlauf wiederholter Temperaturzyklen in Anwesenheit aller dNTPs durch eine DNA-Polymerase exponentiell vermehrt. Die verwendete Pwo-Polymerase besitzt im Gegensatz zur sonst häufig genutzten Taq-Polymerase eine *proof-reading*-Funktion, die eine geringere Fehlerrate garantiert.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die mit dem Programm PrimerDesign (Scientific & Educational Software) errechneten Schmelztemperaturen lagen zwischen 68 und 72 $^{\circ}\text{C}$, wobei darauf geachtet wurde, dass die zusammengehörigen Primerpaare im *annealing*-Bereich ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine selbstkomplementären Bereiche, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigen, besaßen.

Die PCR wurde in ultradünnen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) durchgeführt. Ein Standardreaktionssansatz von 100 μl enthielt dabei:

10-20 ng	Template-DNA
je 100 pmol	Primer
je 0,2 mM	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
1,5 mM	MgCl ₂
2,5 U	Polymerase
10 μl	10× Reaktionspuffer
steriles bidestilliertes Wasser ad 100 μl	

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde alternativ auch 2,5 mM MgCl₂ eingesetzt, welches die Spezifität der Reaktion leicht herabsetzt.

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen und zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Amplifikation als *hot start*-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde der Ansatz zunächst auf 95 °C erhitzt, ehe die Polymerase zupipettiert wurde.

Die PCR-Amplifikation wurde in der Regel nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung:	95 °C	2 min	
<i>Hot Start</i> :	Zugabe der Polymerase		
Denaturierung:	95 °C	30 sec] 35 Zyklen
Annealing:	60 °C	45 sec	
Synthese:	72 °C	1 min 40 sec	
abschließend 10 min Inkubation bei 72 °C zur Vervollständigung begonnener DNA-Stränge			

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde dieses Standardprotokoll teilweise abgeändert.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel überprüft (s. 2.2.5). Das entstandene Produkt wurde entweder mit Hilfe des *High PureTM PCR Product Purification Kit*, oder bei Verunreinigung mit unspezifischen Produkten, mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel gereinigt (s. 2.2.6).

2.2.5 Agarosegelelektrophorese von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige (w/v) Agarosegele (in TAE-Puffer, (s. 0), versetzt mit 0,5 µl/ml Ethidiumbromid) verwendet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TEA-Puffer. Die Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Auftragspuffer (s. 0) versetzt und die anschließende Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Nach einer Laufzeit von ca. 30 min wurde die DNA mittels UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage fotografiert. Die Größe und Menge der aufgetrennten DNA wurde anhand des mitaufgetragenen λ /BstEII-Standards abgeschätzt

2.2.6 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von PCR-Produkten und um DNA-Fragmente bzw. aufgeschnittene Vektoren aus präparativen Restriktionshydrolysen zu isolieren, wurde die DNA in einem 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Unter UV-Belichtung (254 nm) wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Das zu isolierende Fragment wurde anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) gemäß Herstellerangabe aus dem Gelstück extrahiert.

2.2.7 Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA

2.2.7.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Durch Restriktionsendonukleasen ist es möglich, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Dadurch können DNA-Bereiche gezielt ausgeschnitten und ersetzt werden.

Für analytische Zwecke wurden in der Regel 7 µl Plasmid-DNA (ca. 100-500 ng) mit 2-3 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet; für den Verdau mit zwei Enzymen wurde auf kompatible Puffer- und Temperaturbedingungen geachtet. Die Hydrolyse erfolgte für 60 min bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur (in der Regel bei 37 °C). Anschließend wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Präparative Ansätze wurden in entsprechend vergrößerten Ansätzen von 100-200 µl für drei Stunden durchgeführt.

2.2.7.2 Phosphatasebehandlung

Um die Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) behandelt. In diesem Schritt wird die freie 5'-Phosphatgruppe abgespalten. Diese Phosphatasebehandlung erfolgte im gleichen Ansatz wie die Restriktionshydrolyse. Nach Inaktivierung der Restriktionsenzyme (10 min bei 70 °C) und anschließendem Abkühlen wurden $\frac{1}{10}$ Volumen 10×Phosphatasepuffer und 0,1 Einheiten alkalische Phosphatase pro µg Vektor zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut die gleiche Menge Phosphatase zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Durch Erhitzen auf 70 °C (10 min) wurde die Reaktion gestoppt. Die Probe wurde anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt, mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel gereinigt und direkt zur Ligation weiter verwendet.

2.2.7.3 Ligation

Mit Hilfe der DNA Ligase können die komplementären Enden geschnittener DNA-Fragmente wieder kovalent miteinander verbunden werden.

Die Ligationen wurden jeweils mit 200-300 ng Plasmid-DNA und einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss an Fragment-DNA unter Verwendung von 2-3 U T4-DNA-Ligase im mitgelieferten Ligasepuffer durchgeführt. Das Volumen des Ansatzes variierte abhängig von der DNA-Menge zwischen 10 und 20 µl. Die Ligation erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder für 3 h bei RT.

2.2.8 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente

Alle molekularbiologisch veränderten Vektoren wurden vor ihrer Verwendung durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sequenziert.

Die zu sequenzierende DNA wurde nach folgender Methode gefällt:

Die aus einer Plasmidpräparation gewonnene DNA wurde mit einem Volumen PEG-Lösung (15 % PEG 8000, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0) versetzt und eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, RT) wurde das Pellet mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet.

Für spätere Sequenzierungen wurde die DNA nicht gefällt, statt dessen wurden 17 µl der Plasmidlösung mit 12 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers versetzt und anschließend flüssig zu MWG-Biotech verschickt.

2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen werden DNA-aufnahmefähige Zellen benötigt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung solcher Zellen wurde eine 100 ml Flüssigkultur des benötigten *E. coli*-Stammes bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-1 angezogen.

Nach Zugabe von 2 ml 1 M MgCl₂ wurden die Zellen 10 min bei 37 °C und danach 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 Upm, JA10-Rotor, 5 min, 4 °C) und das Pellet in 20 ml Lösung A (3 M NaAc, 1 M CaCl₂; 2,8 M MnCl₂, pH 5,5;) resuspendiert. Nach einer weiteren 60-minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (3000 Upm, JA10-Rotor, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet in 4 ml Lösung A mit 15 % Glycerin aufgenommen und in 200 µl Portionen aliquotiert. Die Aliquots wurden entweder direkt zur Ligation verwendet oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Transformation nach der CaCl₂-Hitzeschock-Methode

Die Transformation erfolgte nach einer vereinfachten Version der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983, Hanahan, 1985), mit der hohe Transformationsausbeuten von 10⁷-10⁸ Transformanten pro µg Plasmid-DNA erzielt werden können.

Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (aus einer Plasmidpräparation) bzw. mit 10-20 µl eines Ligationsansatzes vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB₀-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C unter langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Bakterienpellet im verbliebenen Restmedium aufgenommen und auf der entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.10 Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen (LiAc-Methode)

Hefezellen wurden in 50 ml YPD oder eines entsprechenden Minimalmediums bis zu einer OD_{600} von 1-2 (log-Phase) angezogen. Zur Ernte wurden die Hefezellen zentrifugiert (Hettich 4312-Rotor, 3000 Upm, RT), das Pellet mit 50 ml sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 5 ml TE/LiAc aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 300 μ l TE/LiAc resuspendiert und in Einheiten zu 50 μ l aliquotiert.

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 μ l der kompetenten Hefen mit 50 μ g Carrier-DNA (Lachssperma-DNA) und 5 μ l des zu transformierenden Plasmids (aus einer Plasmidpräparation, s. 2.2.3) versetzt und gemischt. Anschließend wurden 300 μ l PEG-Lösung zugesetzt und die Ansätze vorsichtig durchmischt. Nach Inkubation für 30 min bei 30 °C wurden die Hefen 15 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml sterilem Wasser wurde der Transformationsansatz zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge, 3000 Upm, RT, 2 min), der Überstand abgeschüttet, das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf einem Selektionsmedium ausplattiert. Das Wachstum der Hefen erfolgte für 2 bis 3 Tage bei 30 °C.

TE/LiAc:	100 mM	LiAc in TE, pH 8,0
PEG-Lösung:	40 %	PEG in TE/LiAc-Lösung

2.3 Präparative Methoden

2.3.1 Kultivierung und Analyse von Bakterienzellen

2.3.1.1 Aufnahme von *E. coli*-Wachstumskurven (Expressionskinetik)

Durch die Aufnahme von Wachstumskurven unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen und deren Vergleich kann untersucht werden, unter welchen Bedingungen das gewünschte Protein löslich oder unlöslich exprimiert wird, bzw. ob eine eventuelle metabolische Belastung der Zellen bei der Expression des rekombinanten Proteins auftritt.

Zur Aufnahme der Kurven wurden 50 ml LB-Medium (mit den jeweiligen Selektionsantibiotika) mit einer 2 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 30 bzw. 37 °C im Kulturschüttler inkubiert.

Die Induktion erfolgte je nach Anzucht bei einer OD_{600} von 0,4-1 durch Zugabe von IPTG (1:1000 einer 1 M Stammlösung). Parallel zu den induzierten Kulturen wurden jeweils nicht-induzierte Kontrollkulturen unter identischen Bedingungen angezogen.

Nach 1, 2, 3, 4, 5 Stunden und nach Übernachtsinkubation wurde die OD_{600} bestimmt, 1 ml steril abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden entsprechend der OD_{600} in 1 \times Laemmli-Puffer aufgenommen (100 μ l pro 0,3 OD-Einheiten) und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.1.2 Anzucht und Induktion von *E. coli*

Für die Expression von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* wurde das mit den entsprechenden Antibiotika versetzte LB-Medium mit einer Vorkultur (je 50 ml pro 2 l Anzuchtkultur im 5 l Erlenmeyerkolben) angeimpft und je nach Anzucht bei 30 oder 37 °C im Umluftschüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 1 wurden die Bakterien mit 1 mM IPTG induziert und bis zur Ernte geschüttelt.

2.3.2 Zellernte und Zellaufschluss von Bakterienzellen

Für den Aufschluss der Zellen wurden je nach Löslichkeit der Proteine verschiedene Methoden verwendet:

2.3.2.1 Aufschluss für die Reinigung löslicher Proteine

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (JA10, 5000 Upm, 15 min, 4 °C) geerntet. Nach Aufnehmen des Zellpellets in einem Aufschusspuffer wurde dieses mit einem Dispergierer resuspendiert und anschließend in zwei Durchgängen mit dem Zellaufschlussgerät aufgeschlossen. Zwischen den Aufschlussschritten wurden die Zellen mittels Ultraschall behandelt, um die chromosomale DNA zu zerkleinern. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, wobei der Proteinlösung stets Protease-Inhibitoren (eine Complete-Tablette pro 50 ml) zugesetzt wurden, um den Proteinabbau durch Proteasen zu verhindern. Zur Abtrennung intakter Zellen, unlöslicher Bestandteile und Zell- sowie Membrantrümmern, wurde der Zellaufschluss anschließend 30 min (14000 Upm, JA25.50) bei 4 °C zentrifugiert und der lösliche Überstand für die Proteinaufreinigung verwendet.

2.3.2.2 Aufschluss zur Gewinnung von *inclusion bodies*

Für die Reinigung von unlöslichen Proteine aus *inclusion bodies* erfolgte der Zellaufschluss zunächst mittels einer Lysozymbehandlung (1,5 mg/ml Zellen, 30 min Inkubation bei 4 °C) mit anschließender Behandlung durch die Zellaufschlussmaschine und Ultraschall (s. 2.3.2.1). Durch Zugabe von 3 mM MgCl₂ und 10 µg/ml DNase und eine 30-minütige Inkubation bei RT wurde ein Abbau der DNA herbeigeführt. Nach Zugabe von 0,5 Volumen Puffer (60 mM EDTA, 6 % Triton-X-100, 1,5 M NaCl, pH 7,0) und 30-minütiger Zentrifugation (JA25.50, 20000 Upm, 30 min, 4 °C) wurden die unlöslichen *inclusion bodies* geerntet, mit 40 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,0 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation als *inclusion body*-Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.3.3 Kultivierung und Analyse von Hefezellen

2.3.3.1 Aufnahme von Hefe-Wachstumskurven

Zur Untersuchung des Wachstumsverhalten der Hefezellen unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen wurden 50 ml der zu untersuchenden Kulturen entsprechend 2.3.3.2 angezogen. Nach verschiedenen Zeitpunkten (eine Stunde bis vier Tage) wurden Proben entnommen, deren OD₆₀₀ bestimmt und eine Analyse des Gesamtproteinextraktes (s. 2.3.3.4) vorgenommen.

2.3.3.2 Anzucht und Induktion von Hefezellen

Zur Anzucht der Hefestämme W303 und KMY1005 wurden 50 ml (Wachstumskurve) bzw. 2 bis 4 l (Mikrosomenpräparation bzw. Analyse des Kulturmediums) des entsprechenden Glucose-Minimalmediums mit einer Übernachtskultur so angeimpft, dass sich eine Start-OD₆₀₀ von ca. 0,1 ergab. Bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,75 wurden die Kulturen bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit Galaktose. Dazu wurden die Hefezellen abzentrifugiert (Hettich 4312-Rotor, 3000 Upm, RT bzw. 5000 Upm, JA10-Rotor, 15 min, RT), das Pellet mit Galaktose-Minimalmedium gewaschen und anschließend im Ausgangsvolumen Galaktose-Minimalmedium aufgenommen. Die Induktion erfolgte entsprechend der weiteren Verwendung für eine Stunde bis vier Tage bei 30 °C. Zur Ernte wurden die Zellen abzentrifugiert (Hettich 4312-Rotor, 3000 Upm, RT bzw. 5000 Upm, JA10-Rotor, 15 min, RT) und entsprechend dem Versuchsansatz weiterverwendet.

Abweichend von der oben beschriebenen Vorschrift wurde der Stamm K603-Y113 von Beginn an in Galaktose-Minimalmedium angezogen.

Die Induktion der Hac1-Expression von einem kupferinduzierbaren Promotor wurde zusätzlich durch Gabe von 100 µM (Endkonzentration) CuSO₄ gestartet.

2.3.3.3 Nachweis löslicher und unlöslicher Proteine in Hefezellen

Zur Untersuchung der Löslichkeit bestimmter Hefeproteine erfolgte eine Auftrennung der Gesamtproteine in lösliche und unlösliche Fraktionen. Dazu wurden die Hefezellen nach der Ernte in 40 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5 aufgenommen und mittels der Zellaufschlussmaschine aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (JA25.50-Rotor, 18000 Upm, 1 h 4 °C) erfolgte eine Abtrennung der löslichen Proteine von den im Pellet vorhandenen unlöslichen Proteinen und Aggregaten.

2.3.3.4 Herstellung eines Gesamtproteinextraktes aus *S. cerevisiae*

Zur Analyse der Gesamtproteine der Hefezellen wurden die Zellen einem Aufschluss mit NaOH und anschließender Fällung mit TCA unterzogen. Durch diese Methode können nahezu alle Proteine der Zelle ausgefällt und anschließend auf einem reduzierenden oder nicht-reduzierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden.

Es wurden dazu drei OD₆₀₀-Einheiten (eingesetztes Volumen [ml] = $\frac{3 \cdot 1 \text{ ml}}{OD_{600} \text{ Wert}}$) in einem

1,5 ml Eppendorfgefäß abzentrifugiert und der Überstand so entfernt, dass 0,5 ml des Mediums im Gefäß verblieben. Anschließend wurden 50 µl 1,85 M NaOH zugegeben, die Probe gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 50 % TCA wurde die Probe erneut gemischt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge, 14000 Upm, 5 min, RT) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 70 µl eines basischen Probenpuffers aufgenommen. Nach 10-minütigem Erhitzen bei 95 °C wurden die Proben eingefroren oder 10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

basischer Probenpuffer	2 Volumen	Probenpuffer (1×) (s. 2.1.9.4)
(nicht-reduzierend):	1 Volumen	1 M Tris-Base
basischer Probenpuffer	2 Volumen	Probenpuffer (1×) (s. 2.1.9.4)
(reduzierend):	1 Volumen	1 M Tris-Base
	2 %	2-Mercaptoethanol

2.3.4 Präparation von Mikrosomen aus *S. cerevisiae*

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) stellt ein membranöses System innerhalb der Zelle dar. Im Gegensatz zum Cytosol herrschen dort oxidative Bedingungen. Diese besonderen Bedingungen, kombiniert mit dem Vorkommen von Proteindisulfidisomerasen erlauben die Bildung von Disulfidbrücken im ER. Außerdem ist im ER ein besonderes Kontingent an molekularen Chaperonen, anderen Faltungshelferproteinen und modifizierenden Proteinen vorhanden, die das ER zu einem spezialisierten Kompartiment machen, in dem Modifikationen (z.B. Anfügung von Zuckerresten) und gegebenenfalls auch Oligomerisierungen von Proteinen stattfinden. In manchen Situationen ist es sinnvoll, die Proteine und Abläufe innerhalb des ERs getrennt von der Gesamtzelle zu betrachten. Zu diesem Zweck wird das ER als sogenannte Mikrosomen präpariert. Zunächst ist es dazu notwendig, die Zellwand der Hefezellen zu entfernen und anschließend aus den entstandenen Sphäroplasten auf schonende Weise die ER-Fractionen zu isolieren.

Die Mikrosomenpräparation wurde nach einem leicht modifizierten Verfahren nach Schekman (s. <http://mcb.berkeley.edu/labs/schekman/microsomes>, Jan. 2000) durchgeführt.

Bildung von Sphäroplasten

Für die Präparation wurden die verwendeten Hefezellen im entsprechenden Minimalmedium mit Glucose bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 angezogen, gewaschen und anschließend die Expression der Antikörperketten durch Überführung in Galaktose-Medium induziert. Nach der gewünschten Induktionszeit wurden die Hefen geerntet (JA10, 5000 Upm, 5 min, RT) und die Gesamtzellmenge in *units* (U) bestimmt (Gesamtzellmenge [U] = OD₆₀₀-Wert × Volumen [ml]). Das Zellpellet wurde zu 100 U/ml in 100 mM Tris, 10 mM DTT, pH 9,4 resuspendiert und anschließend fünf bis zehn min bei 24 °C inkubiert. Nach erneuter Ernte der Zellen durch Zentrifugation wurden diese dann bis zu einer Konzentration von 100 U/ml in Lyticase-Puffer aufgenommen und bei 30 °C für 30 min inkubiert. In dieser Zeit wurde die Zellwand der Hefen durch die Lytikase abgebaut. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert (JA10, 5000 Upm, 10 min, 4 °C) und anschließend so in 2×JR-Puffer (ohne DTT und Proteaseinhibitoren) aufgenommen, dass sich eine Verdünnung von 250 U/ml ergab. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (JA25.50, 10000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde das Sphäroplastenpellet erneut in 2×JR-Puffer (ohne DTT und Proteaseinhibitoren) resuspendiert (500 U/ml) und bei -80 °C – eingewickelt in ein Papierhandtuch – langsam eingefroren. Durch diesen Schritt und das anschließende Auftauen wurde die Lyse der Sphäroplasten verbessert.

Mikrosomenreinigung

Zum Auftauen wurden die Sphäroplasten in ein Eis-Wasser-Bad gegeben und mit einem Volumen eiskaltem ddH₂O verdünnt. DTT wurden zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die Lösung mit Proteaseinhibitoren versetzt. Durch zehn Stöße in einem Glaspotter wurden die Sphäroplasten aufgeschlossen und die Vollständigkeit des Aufschlusses wurde mikroskopisch verifiziert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (JA25.50, 3000 Upm, 5 min, 4 °C) befanden sich die Zelltrümmer im Pellet und die Zellorganellen und das Cytosol im Überstand. Durch Wiederholen des Aufbrechens der Zellen konnte die Aufschlussrate erhöht und somit größere Erträge erzielt werden. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurden im folgenden Zentrifugationsschritt (JA25.50, 15000 Upm, 10 min, 4 °C), bedingt durch eine höhere Drehzahl, die membranhaltigen Fraktionen abgetrennt, während das Cytosol im Überstand verblieb. Nach Aufnehmen der Mikrosomenfraktion in Puffer B88 zu 2500 OD/ml und anschließendem Resuspendieren im *Douncer* erfolgte eine Saccharose-Gradientenzentrifugation. Dazu wurde die Probe auf einen Saccharosegradienten (bestehend aus je 2,5 ml 1,5 und 1,2 M Saccharoselösung) aufgetragen und 60 min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (MLS50-Rotor, 40000 Upm, 4 °C). Nach Einstellung des Gradienten wurde zunächst die obere

Bande, die u.a. die Vakuolen enthält, abgenommen. Anschließend wurde die Mikrosomenfraktion, die sich in der Phase zwischen den beiden Saccharoselösungen befindet, vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Mikrosomenfraktion wurde dann in fünffachem Volumen Puffer B88 gewaschen und zentrifugiert (JA25.50, 15000 Upm, 10 min, 4 °C) und durch vorsichtiges *Douncen* in 1 ml Puffer B88 resuspendiert.

Lyticase-Puffer:	700 mM	Sorbitol
	0,75	YP
	0,5 %	Glucose
	10 mM	Tris, pH 7,4
	1 mM	DTT
JR-Lysis-Puffer:	200 mM	Sorbitol
	50 mM	KOAc
	2 mM	EDTA
	20 mM	Hepes, pH 7,4
	1 mM	DTT
Puffer B88:	20 mM	Hepes, pH 6,8
	250 mM	Sorbitol
	150 mM	KOAc
	5 mM	Mg(OAc) ₂
Saccharose-Lösungen:	20 mM	Hepes, pH 7,4
	50 mM	KOAc
	2 mM	EDTA
	1,2 bzw. 1,5 M	Saccharose
	1 mM	DTT
	1 Tablette	Complete Protease Inhibitor

2.3.5 Chromatographische Methoden

Für die Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* bzw. aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden alle verwendeten Puffer filtriert und entgast. Sämtliche Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Chromatographiearten sind in den folgenden Kapiteln methodisch beschrieben, die genauen Bedingungen der während dieser Arbeit entwickelten Reinigungen sind anhand eines Flussdiagramms im Ergebnisteil dargelegt.

2.3.5.1 Affinitätschromatographie

Das Trennprinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der selektiven, reversiblen Bindung des zu reinigenden Proteins an einen spezifischen Liganden, der kovalent an die Gelmatrix gebunden ist. Aufgrund hochaffiner Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand kann durch Waschen der Säule überschüssiges und unspezifisch gebundenes Protein entfernt werden. Die Elution des entsprechenden Proteins erfolgt dann durch Zugabe des Liganden in löslicher Form oder durch Änderung der Pufferbedingungen. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der höchsten Selektivität und Spezifität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen (Lottspeich & Zorbas, 1998).

2.3.5.2 Gelfiltration

Bei der Gelfiltrationschromatographie erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe bzw. des hydrodynamischen Radius. Die Matrix dieser Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle können in die Poren der Matrixkügelchen eindringen, während für große Moleküle nur das Außenmedium zugänglich ist. Folglich ist den größeren Molekülen ein geringeres Lösungsmittelvolumen zugänglich, während kleineren Moleküle zusätzlich die Poren des Gelmaterials zur Verfügung stehen und diese somit die Säule langsamer passieren. Überschreitet der Radius von aufgetragenen Proteinen jedoch eine bestimmte Größe, so wandern diese im Ausschlussvolumen der Säule und eine Auftrennung ist nicht mehr möglich.

2.3.5.3 Ionenaustauscherchromatographie

Die Ionenaustauscherchromatographie beruht auf der Anziehung unterschiedlich geladener Teilchen. Proteine tragen aufgrund ihrer geladenen Seitenketten und in Abhängigkeit vom pH-Wert positive bzw. negative Ladungen und binden daher reversibel an entsprechend entgegengesetzt geladene Ketten des Trägermaterials. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt durch eine Erhöhung der Ionenstärke oder durch Veränderung des pH-Wertes, wodurch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Säulenmaterial abgeschwächt werden. Dabei können durch Anlegen eines Salz- oder pH-Gradienten unterschiedliche Proteine nacheinander von der Säule eluiert und somit getrennt werden.

Je nach Art der geladenen Gruppen unterscheidet man zwischen Anionenaustauschern, die positive Ladungen an der Oberfläche des Trägermaterials aufweisen, und Kationenaustauschern, die negative Ladungen besitzen.

Als Anionenaustauscher wurde eine ResourceQ und als Kationenaustauscher eine ResourceS verwendet. Beide Säulentypen sind starke Ionenaustauscher und sind in einem breiten pH-Bereich (pH 2-14) einsetzbar. Aufgrund der kleinen Volumina und der kleinen Partikelgröße erreichen beide eine große Trennschärfe.

2.3.6 Aufkonzentrierung und Dialyse

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen und Hefemedien wurde das Prinzip der Ultrafiltration verwendet. Bei diesem wird die Lösung entweder durch Zentrifugation (Centricon, Centriprep) oder durch Druck (Amicon) gegen eine Membran gedrückt, welche ein bestimmtes Ausschlussvolumen (3, 10, 30 bzw. 100 kDa) besitzt. Auf diese Art wurde die Pufferlösung durch die Membran gelassen, während die Moleküle oberhalb des Ausschlussvolumens jenseits der Membran in einem entsprechend verkleinerten Volumen verblieben.

Für kleinere Volumina wurden Centricon®-Konzentratoren (bis zu ca. 5 ml) und Centriprep-Konzentratoren (bis zu ca. 20 ml) verwendet. Für größere Volumina und zur Aufkonzentrierung von Kulturmedien wurde das Amiconsystem benutzt, mit dem wesentlich größere Mengen prozessiert werden können.

Zur Veränderung der Pufferbedingungen wurde gegen das 100-1000fache des entsprechenden Ausgangsvolumens bei 4 °C dialysiert. Der Pufferaustausch erfolgte über eine semipermeable Membran (Ausschlussgröße 6-8 kDa).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.1.1 Nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte durch Inkubation von 100 µl Proteinlösung mit 1 ml Färbelösung (Coomassie Protein Assay, 1:1 in ddH₂O verdünnt). Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und mit einer BSA-Eichkurve verglichen.

2.4.1.2 UV-Absorptionsmethode

Die Proteinbestimmung mittels der UV-Absorptionsmethode erfolgte durch Aufnehmen eines UV-Spektrums des Proteins über einen Wellenlängenbereich von 240 bis 350 nm. Das Prinzip ist in Kapitel 2.5.1 im Detail erläutert.

2.4.2 Fällung von Proteinlösungen

Zur denaturierenden Aufkonzentrierung von Proteinen aus verdünnten Lösungen wurde die Methode der Fällung mit NaDoc (Natriumdesoxycholat) und TCA (Trichlooessigsäure) angewandt.

Dazu wurde die Proteinlösung zunächst mit $\frac{1}{1000}$ -Volumen 10%iger NaDoc-Lösung versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von $\frac{2}{15}$ -Volumen 50%iger TCA und Inkubation der Mischung für 30 min auf Eis wurde die Probe zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, 45

min, 14000 Upm, RT) und der Überstand abgenommen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in 1×Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und die Probe auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei diesem Verfahren werden Proteine unter nicht-nativen (reduzierenden oder nicht-reduzierenden) Bedingungen nach ihrer Masse aufgetrennt. Dabei lagert sich das anionische, amphipatische Reagenz SDS im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an das Protein an und verleiht ihm so eine negative Überschussladung. Diese Ladung verhält sich proportional zur Proteingröße und macht die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar. Darüber hinaus führt die Denaturierung mit SDS zu einer stäbchenförmigen Konformation des Proteins, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur des Proteins auf das Wanderungsverhalten aufhebt. Die Proteine wandern bedingt durch die negative Ladung im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten ausschließlich von der Größe abhängig ist. Die Trennung von Proteinen im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihrer molekularen Masse (Cooper, 1981), wobei der Trennbereich über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration im Gel kontrolliert werden kann.

Für diese Arbeit wurden SDS-Polyacrylamidgele ($10\text{ cm} \times 8\text{ cm} \times 0,075\text{ cm}^3$) mit 12,5- bzw. 15%igen Trenngelen und 3%igen Sammelgelen verwendet (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson, 1986). Zur Auftrennung der Proteine wurde für 30 bis 60 min ein elektrisches Feld konstanter Stromstärke (27 mA pro Gel) angelegt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit $\frac{1}{4}$ -Volumen 5×-Laemmli-Auftragspuffer (s. 2.1.9.4) versetzt, bzw. Pellets wurden in 1× Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Wenn in den Proteinen vorhandene Disulfidbrücken reduziert werden sollten, wurde 5×-Laemmli-Auftragspuffer mit 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol verwendet. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden die Proben vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C erhitzt (Laemmli, 1970). Um die molekulare Masse der einzelnen Proteinbanden abschätzen zu können, wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard mit auf das Gel aufgetragen.

Die Proteinbanden im Gel können durch anschließende Färbung (s. 2.4.4) sichtbar gemacht werden.

Folgende Puffer wurden für die Herstellung der Gele und die sich anschließende Elektrophorese verwendet:

Trenngelpuffer (4×):	0,8 % (w/v)	SDS
	1,5 M	Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer (2×):	0,4 % (w/v)	SDS
	0,25 M	Tris/HCl, pH 6,8
zum Polymerisationsstart:	10 % APS (w/v)	60 µl/Gel
	TEMED	6 µl/Gel
10× Laufpuffer:	250 mM	Tris/HCl, pH 8,8
	2 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

2.4.4 Nachweis von Proteinen

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Proteine durch Coomassiefärbung nach Fairbanks bzw. mittels Silberfärbung auf dem Gel sichtbar gemacht.

2.4.4.1 Färbung nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971)

Die Nachweisgrenze bei der Coomassiefärbung nach Fairbanks liegt bei ca. 50 bis 100 ng Protein. Die SDS-Polyacrylamidgele wurden hierbei zunächst in Lösung A gefärbt und anschließend schrittweise in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der Gele konnten die Inkubationszeiten in den verschiedenen Lösungen abweichend von der Originalvorschrift (Fairbanks *et al.*, 1971: 2 h Färben, je 1 h Entfärben) auf je etwa 10 min verkürzt werden.

Lösung A:	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	technische Essigsäure
	0,05 %	Coomassie Blau R
Lösung B:	10 %	Isopropanol
	10 %	technische Essigsäure
	0,005 %	Coomassie Blau R
Lösung C:	10 %	technische Essigsäure
	0,002 %	Coomassie Blau R
Lösung D:	10 %	technische Essigsäure

2.4.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1988). Im Gegensatz zur weniger sensitiven Coomassie-Färbung liegt hier die Nachweisgrenze bei ca. 10-20 ng Protein.

Die Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- zum Fixieren 20 min in Fixierer I schwenken
- 30 min oder über Nacht in Fixierer II schütteln
- 3× 10 min mit ddH₂O waschen
- 30 min in Färbelösung schwenken
- Entwicklerlösung zugeben und Gel je nach Bedarf wenige Sekunden bis mehrere Minuten entwickeln
- Färbung durch Wechsel in Stopplösung beenden

Fixierer I:	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Fixierer II:	0,4 M	Natriumacetat, pH 6,0
	0,5 % (v/v)	Eisessig
	30 % (v/v)	Ethanol
	zu 100 ml werden frisch zugegeben:	
	0,1 g	Na ₂ S ₂ O ₃
	2 ml	Glutaraldehyd
Färbelösung:	0,5 ml	AgNO ₃
	25 µl	Formaldehyd
	ad 100 ml ddH ₂ O	
Entwicklerlösung:	7,5 g	Na ₂ CO ₃
	120 µl	Formaldehyd
	ad 300 ml ddH ₂ O	
Stopplösung:	50 mM	EDTA, pH 7,5

2.4.5 Immunoblotting (Western Blot)

Im Anschluss an eine SDS-PAGE können Proteine auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran übertragen werden (Western-Blotting). Dabei werden die Proteine aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS auf die Membran transferiert. Anschließend können die geblotteten Proteine durch eine spezifische, sehr sensitive Immunreaktion nachgewiesen werden (Towbin *et al.*, 1979).

WB-Inkubationspuffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	105 mM	Glycin
	1,3 mM	SDS
	20 % (v/v)	Methanol
PBS-Puffer:	4 mM	KH ₂ PO ₄
	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	115 mM	NaCl
PBS-Tween-Puffer:	PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20	
ECL-Lösung 1:	2,5 mM	Luminol
	400 µM	Paracoumarsäure
	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5
ECL-Lösung 2:	100 mM	Tris/HCl, pH 8,5

Der Blot wurde in einer Semi-Dry-Apparatur (Khyse-Anderson, 1984) für ca. 60 min, bei einer konstanten Stromstärke von 1,2 mA/cm² Membran, durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde durch reversible Färbung der Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S (Salinovich & Montelaro, 1986) überprüft. Zur Abschätzung der molekularen Massen der geblotteten Proteine wurde zuvor ein gefärbter *Rainbow*-Standard auf das Gel aufgetragen.

Der immunochemische Nachweis der Antikörperfragmenten erfolgte mit einem Anti-Maus-IgG(H+L)-POD-Konjugat bzw. einem Anti-Maus-IgG (Fab')₂-POD-Konjugat aus Esel und wurde nach folgender Methode durchgeführt:

- Absättigen der Membran mit 5 % Milchpulver in PBS-Tween-Puffer für 1 h oder über Nacht bei RT
- 3× Waschen mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min
- Inkubation mit POD-Konjugat (1:10000 in PBS-Tween-Puffer) für 45 min
- 3× Waschen mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min
- 2× Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 10 min

Für alle anderen Proteine war die Verwendung eines zweiten Antikörpers erforderlich, der Nachweis erfolgte dabei nach untenstehender Methode

- Absättigen der Membran mit 5 % Milchpulver in PBS-Tween-Puffer für 1 h oder über Nacht bei RT
- 3× Waschen mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min
- Inkubation mit einem zielproteinspezifischen Antikörper (Konzentration abhängig vom verwendeten primären Antikörper oder Antiserum) für 45 min
- 3× Waschen mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min
- Inkubation mit POD-Konjugat (1:4000 in PBS-Tween-Puffer) für 90 min
- 3× Waschen mit PBS-Tween-Puffer für jeweils 10 min
- 2× Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 10 min

Beim Nachweis von *Strep*-tag-Fusionsproteinen wurde die Blockierung mit RotiBlock-Blockierungsgagens (Roth GmbH & Co, Karlsruhe) vorgenommen, da Milchpulver in hohem Maße Biotin, das vom Antikörper (*Strep*-Tactin[®] HRP-Konjugat) erkannt wird, enthält und somit eine Störung des Nachweises bewirken würde. Zusätzlich wurde die Membran vor Zugabe des Antikörpers 10 min in PBS-Tween mit 2 µg/ml Avidin inkubiert. Dadurch werden biotinbindende Zellproteine spezifisch blockiert (Schmidt & Skerra, 1993).

Die Detektion erfolgte mit dem ECL- oder alternativ mit dem ECLplus (Amersham-Pharmacia)-System. Beim ECL-System wurden pro Blot je 1 ml der ECL1- bzw. ECL2-Lösung gemischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für eine Minute inkubiert. Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Kopierfolien gelegt und durch Auflegen eines Röntgenfilms (10 s bis 30 min) wurde die von der Peroxidase katalysierte Lichtreaktion nachgewiesen. Bei Verwendung des wesentlich sensitiveren ECLplus-Systems wurde die Detektion entsprechend der Anleitung durchgeführt; der Film konnte dabei bis zu mehreren Stunden aufgelegt werden.

2.4.6 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationsläufe wurden zur Analyse des Oligomerisierungsgrades der Prolyl-4-Hydroxylase durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer Superdex 200-HR-Säule, das Probenvolumen betrug 25 µl und die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,75 ml/min (Laufpuffer: 20 mM Tris, 100 mM NaCl; 100 mM Glycin, pH 7,8). Die eluierten Proteine wurden durch Fluoreszenzemission bei 345 nm (Anregungswellenlänge = 280 nm) detektiert und mit der Borwin Chromatographie Software registriert.

2.4.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Um zu untersuchen, ob sich die von *S. cerevisiae* sezernierten MAK33-Antikörperketten zu aktiven Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten zusammen gelagert hatten, wurde ein modifizierter ELISA-Test durchgeführt.

In Gegenwart der zu untersuchenden Probe wurde biotinylierte Kreatinkinase, die das Antigen für MAK33 darstellt, für 1 h an mit Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße gekoppelt. Nach Auswaschen nicht gebundenen Materials wurde das Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat zugegeben, welches dort innerhalb der Inkubationszeit von 1 h interagieren konnte, wo vorher aktive, d.h. korrekt gefaltete Antikörper bzw. Antikörperfragmente gebunden haben. Schließlich erfolgte für eine weitere Stunde die Zugabe von ABTS, dem chromogenen Substrat für die Peroxidase (POD). Mit Hilfe einer Eichkurve von nativem Fab (Verdünnungsreihe von 0 bis 167 ng/ml in Konjugatpuffer) wurden die gemessenen Absorptionswerte ausgewertet.

Die ELISA-Tests wurden mithilfe eines automatisierten ELISA-Systems (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Zunächst wurden je 100 µl Probe bzw. Standard in die mit Streptavidin beschichteten Gefäße pipettiert. Danach erfolgte die automatische Zugabe von 1 ml biotinylierter Kreatinkinase-Lösung (50 µg biotinylierte Kreatinkinase CK-MM pro 100 ml Blockingpuffer). Nach 60-minütiger Inkubation bei RT wurden die Gefäße dreimal mit je 1 ml bidestilliertem Wasser gespült und mit 1 ml Konjugat-Lösung (100 µl Anti-Maus-IgG-POD Hybridoma Reagenz pro 100 ml Konjugatpuffer) für weitere 60 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit 1 ml bidestilliertem Wasser, wurde 1 ml ABTS-Lösung (zwei ABTS-Tabletten pro 100 ml ABTS-Substratpuffer) zupipettiert. Die Extinktion bei 405 nm, als Maß für die Aktivität der Probe, wurde nach 60-minütiger Inkubation bei RT in einer 0,5 cm Durchflussküvette gemessen.

2.4.8 Reduktion der Prolyl-4-Hydroxylase

Das Protein Prolyl-4-Hydroxylase besitzt mehrer intramolekulare Disulfidbrücken (Berg, *et al.*, 1979). Diese können durch Inkubation des Proteins mit ausreichenden Mengen DTT reduziert werden.

Zur Reduktion von humaner Prolyl-4-Hydroxylase wurden 1,4 µg Protein bei RT in 20 µl Reaktionspuffer (10 mM Tris, pH 7,8; 100 mM NaCl; 100 mM Glycin; 0 µM, 10 µM bzw.

1 mM DTT) inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Inkubation beendet, die Ansätze zentrifugiert (Eppendorffzentrifuge, RT, 14000 Upm, RT) und die Proteinlösung durch SDS-PAGE (s. 2.4.3) bzw. mittels analytischer Gelfiltration (s. 2.4.6) analysiert.

2.4.9 Renaturierung der Prolyl-4-Hydroxylase

Ausgehend von den denaturierten Untereinheiten sollte die Rückfaltung des Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramers analytisch untersucht werden. Die Renaturierung wurde durch eine schnelle 1:100 Verdünnung der denaturierten Untereinheiten in den Renaturierungspuffer gestartet, so dass die Proteinkonzentration (je Untereinheit) zwischen 18 und 126 µg/ml lag. Nach einer Inkubation von 1 bis 24 h bei 10 °C wurden die Proben entweder direkt untersucht oder über Nacht bei 4 °C gegen einen Standartpuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8) dialysiert. Um Aggregate, die sich während der Dialyse und/oder der Rückfaltung gebildet hatten, zu entfernen, wurden die Proben zentrifugiert (14.000 Upm, 30 min, 4 °C). Die nachfolgende Analyse erfolgte mittels analytischer Gelfiltration (s. 2.4.6).

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 UV-VIS-Spektroskopie

Bei der UV-VIS-Spektroskopie sind sowohl die Peptidbindungen als auch die Seitenketten von Aminosäuren und die prosthetischen Gruppen für die Absorption verantwortlich. Dabei absorbieren die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin vor allem im Bereich zwischen 230 und 300 nm, wobei Tryptophan und Tyrosin den weitaus größten Betrag liefern. Das Absorptionsmaximum von Tryptophan liegt bei 280 nm, während Tyrosin bei 274 nm maximal absorbiert (Schmid, 1997). Wie bereits in Abschnitt 2.4.1.2 beschrieben, wurden zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen UV-VIS-Spektren im Wellenlängenbereich von 240 bis 350 nm aufgenommen. Hierbei kann die Proteinkonzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden:

$$\text{Lambert-Beer'schen Gesetz: } A = \epsilon \cdot c \cdot d = \epsilon/M \cdot c_M \cdot d$$

A: Absorption bei 280 nm	M: Molekulargewicht [g/mol]
ϵ : molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	c_M : Proteinkonzentration [g/l]
c: Proteinkonzentration [M]	$\epsilon/M = A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}}$
d: Schichtdicke der Küvette [cm]	

Die Proteinkonzentration kann mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes bei bekanntem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280 \text{ nm}}$ durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden.

Die Extinktionskoeffizienten für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden mittels des Expasy Tools (www.expasy.ch/tools) bestimmt:

Extinktionskoeffizienten:

Prolyl-4-Hydroxylase, α -Untereinheit $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1.421$ (Expasy Tools)
(unglykosyliert)

Prolyl-4-Hydroxylase, β -Untereinheit $\epsilon_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 0.799$ (Expasy Tools)
(PDI) (unglykosyliert)

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei Proteinen verursachen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems eine sogenannte „intrinsische Fluoreszenz“. Dabei werden Elektronen durch Absorption von Lichtquanten (Anregungsenergie) auf ein energetisch höheres Orbital übertragen. Bei spontaner Rückkehr der Elektronen aus diesem höheren Orbital in den energieärmeren Zustand wird die zugeführte Energie in Form von Fluoreszenz frei. Aufgrund der Stoke'schen Verschiebung ist dabei die Wellenlänge des emittierten Lichts größer als die des Anregungslichtes. Das Fluoreszenzverhalten von Proteinen wird hauptsächlich von den Tryptophanresten bestimmt, da diese einerseits die eingestrahlten Lichtquanten am stärksten absorbieren und andererseits durch einen Energietransfer von Tyrosin- auf Tryptophanreste zusätzlich angeregt werden können (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1992).

Die molekulare Umgebung bzw. die Lösungsumgebung hat einen starken Einfluss auf Lage und Amplitude des Emissionsmaximums von Tryptophanen. Im hydrophoben Proteininneren bzw. in hydrophoben Lösungsmitteln liegt das Maximum der Tryptophanemission bei 333 nm. Liegt ein Protein jedoch im denaturierten Zustand vor, in dem die Tryptophanreste zum hydrophilen Lösungsmittel exponiert sind, so verschiebt sich das Emissionsmaximum nach 353 nm und nimmt an Intensität ab. Im Falle von Tyrosin verändert das Emissionsmaximum bei 303 nm seine Lage bei Exposition zu hydrophobem Lösungsmittel kaum, nur die Intensität nimmt stark ab (Schmid, 1992)

Insgesamt können aus Fluoreszenzmessungen Rückschlüsse über den konformationellen Zustand von Proteinen geschlossen werden.

Alle Fluoreszenzmessungen wurden am SpexFluoromax II in 1 cm Küvetten mit einem Volumen von 1 ml und bei konstanter Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden zuvor filtriert (Porenweite 0,2 μm) um so die durch größere Partikel in der Lösung verursachte Lichtstreuung zu minimieren. Da die Fluoreszenz temperaturabhängig ist, wurden die Messungen bei konstanter Temperatur durchgeführt.

Denaturierung und Denaturierungsübergang:

Für die Denaturierung wurde eine Proteinstammlösung in unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff verdünnt. Nach 18-stündiger Inkubation bei RT wurden die Denaturierungsansätze fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

Dazu wurden Fluoreszenzspektren der Prolyl-4-Hydroxylase im Bereich von 305 bis 400 nm aufgenommen. Die Spaltbreite wurde entsprechend der Proteinkonzentration gewählt, um den für das Gerät optimalen Intensitätsbereich auszunutzen. Alle Spektren wurden gegen Puffer korrigiert.

Die genaue Harnstoffkonzentration wurde mit Hilfe eines Refraktometers nach folgender Formel berechnet (Schmid, 1997):

$$[\text{Harnstoff}] = 117,66\Delta N + 29,75(\Delta N)^2 - 185,66(\Delta N)^3$$

ΔN : Differenz der Brechungsindices mit und ohne Harnstoff

2.5.3 Circular dichroismus

Moleküle mit asymmetrischen Kohlenstoffatomen (optisch aktive Moleküle) absorbieren links- und rechtspolarisiertes Licht unterschiedlich stark. Neben der großen Zahl an optisch aktiven Aminosäuren trägt auch die Sekundärstruktur von Proteinen zu deren dichroitischer Absorption bei. Je nach Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes unterscheidet man im Circular dichroismus zwischen Nah-UV- und Fern-UV-Bereich (Cantor & Schimmel, 1980).

Im Nah-UV-Bereich zwischen 250 und 350 nm (aromatische Region), erzeugen die aromatischen Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung ein Signal. Dieses Signal ist sehr empfindlich gegenüber Änderungen in der Tertiärstruktur und kann auch als „Fingerabdruck“ eines Proteins bezeichnet werden. Bei denaturierten Proteinen tritt kein Signal auf, da die asymmetrische Umgebung der Aromaten aufgehoben ist.

Im Fern-UV-Bereich zwischen 170 und 250 nm (Amid-Region) erzeugt vor allem die Konformation der Polypeptidkette, also α -Helices und β -Faltblätter, ein charakteristisches Spektrum. So wird durch α -Helices ein Doppelminimum mit hoher Intensität bei 208 und 222 nm erzeugt, während β -Faltblattstrukturen nur ein einziges Minimum mit geringer Intensität bei 218 nm liefern. Mit Signalen im Fern-UV-Bereich lassen sich somit Rückschlüsse auf die Art und den Gehalt an Sekundärstruktur eines Proteins ziehen.

Als quantitatives Maß für die Ausprägung der Struktur wird die molare Elliptizität Θ (in Grad), bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren, angegeben (Schmid, 1992).

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MRW}{c \cdot d} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_R}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Θ_{MRW} :	Elliptizität der Aminosäure [Grad · cm ² · d mol ⁻¹]
Θ :	gemessene Elliptizität [Grad]
MRW:	mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren
c:	Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]
d:	Schichtdicke der Küvette [cm]
M_R :	Molekulargewicht [g/mol]
N_A :	Anzahl der Aminosäuren des Proteins

Es wurden Fern-UV-CD-Spektren im Bereich von 197 bis 250 nm aufgenommen. Um Signalschwankungen zu verringern wurden die Spektren 10 mal akkumuliert. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0,1 cm. Die Spektren wurden gegen Puffer korrigiert, wobei alle Puffer vor der Messung filtriert wurden (Porenweite 0,2 µm).

Der α -Helix-Gehalt der jeweiligen Proteine wurde einerseits mit Hilfe des Programmes CDNN, (Backpropagation Neural Networks) andererseits gemäß Forood *et al.*, (1993) entsprechend untenstehender Gleichung berechnet:

$$\alpha\text{-Helix-Gehalt} = \frac{\Theta_{MRW222}}{-40.000 \cdot \left[1 - \left(\frac{2,5}{n} \right) \right]}$$

mit Θ_{MRW222} als Elliptizität bei 222 nm und n als die Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression von Antikörperketten in *Saccharomyces cerevisiae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionssystem für die Sekretion heterologer Proteine untersucht. Dafür wurde der Antikörper MAK33 als Modellprotein verwendet, da es sich bei ihm um ein oligomeres und disulfidverbrücktes sekretorisches Protein handelt, dessen *in vitro*-Faltung bereits gut untersucht ist. Zunächst sollte ein System zur heterologen Expression der beiden Ketten von MAK33 erzeugt werden. Im Anschluss daran sollten die rekombinanten Antikörperketten charakterisiert und deren zelluläre Lokalisation bestimmt werden. Die Detektion der rekombinanten Antikörperketten sollte durch immunologischen Nachweis erfolgen.

3.1.1 Verwendung von Antikörpern für die Detektion von MAK33

Die käuflich zu erwerbenden Antikörper gegen Maus-IgG sind in der Regel gegen den Fc-Anteil der schweren Kette gerichtet [anti-IgG (Fc)], der bei der Immunisierung von Tieren ein besonders gutes Antigen darstellt. Zusätzlich sind Antikörper erhältlich, die neben der schweren Kette auch die leichte Kette erkennen, so dass die beiden Ketten gleichzeitig nachgewiesen werden können [anti-IgG (H+L)] bzw. andere Antikörper, die nur die leichte Kette im Fab-Fragment [anti-IgG (Fab)] detektieren. Keiner der zu erwerbenden Antikörper ist jedoch in der Lage, den Fd-Anteil der schweren Kette zu erkennen; dies liegt wahrscheinlich daran, dass dieser wenig immunogen ist, bzw. nicht löslich produziert werden kann.

Versuch der Herstellung eines Anti-Fd-Antikörpers aus Kaninchen

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen durchgeführt werden, in denen die leichte Kette und das Fd-Fragment von MAK33 elektrophoretisch aufgetrennt und unterschieden werden sollten. Dies ist jedoch aufgrund der sehr ähnlichen molekularen Masse (s. Tabelle 3.2) nur sehr schwer möglich. Aus diesem Grund sollte ein Antikörper produziert werden, der nur den Fd-Anteil der schweren Kette, nicht aber die leichte Kette, erkennt.

Dazu wurde das Fd-Fragment in Form von *inclusion bodies* (IBs) aus *E. coli* entsprechend dem Flusschema in Abb. 3.1.1 aufgereinigt. Der Reinigungsverlauf ist in Abb. 3.1.3 dargestellt

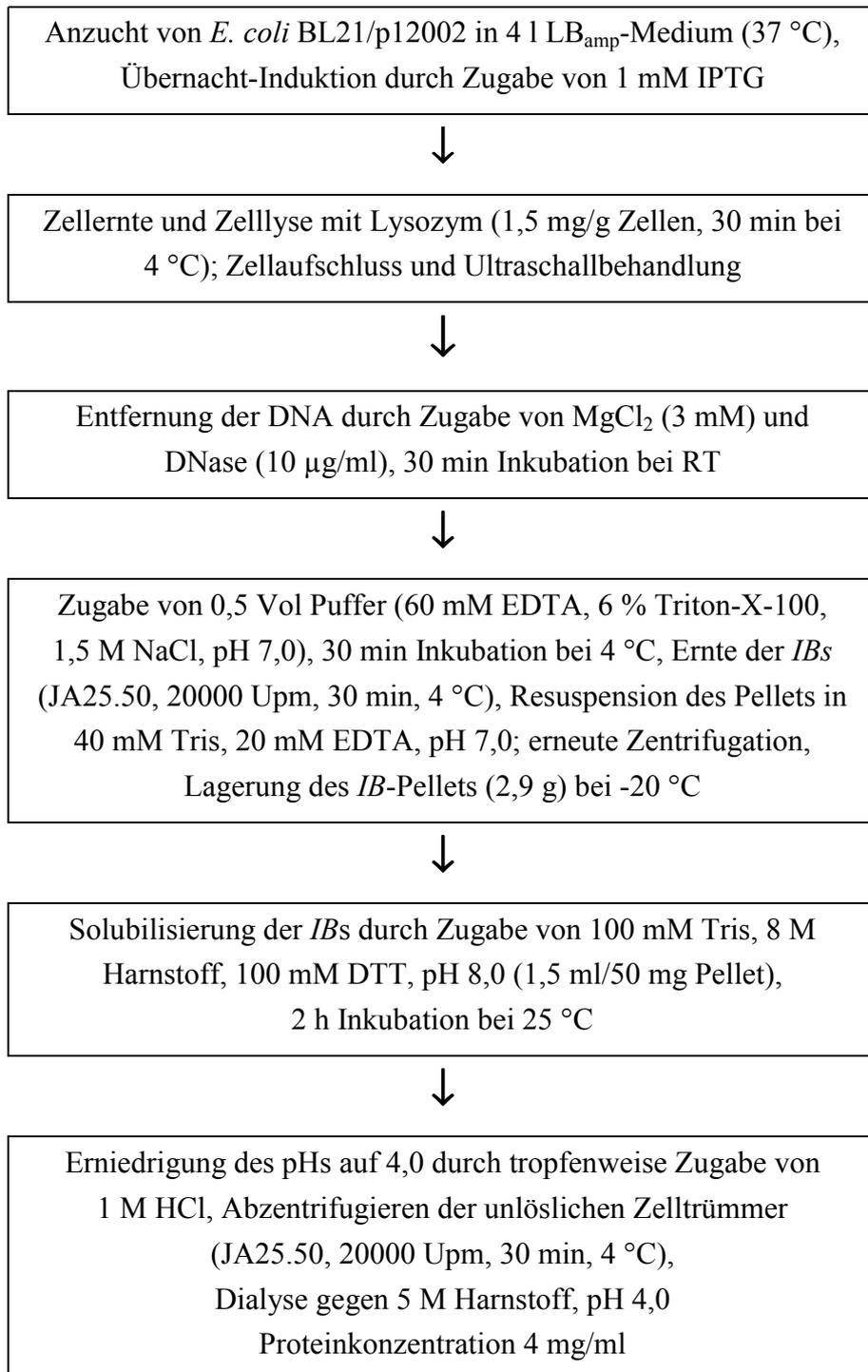


Abb. 3.1.1: Präparation von Fd-inclusion bodies (IB) aus *E. coli*

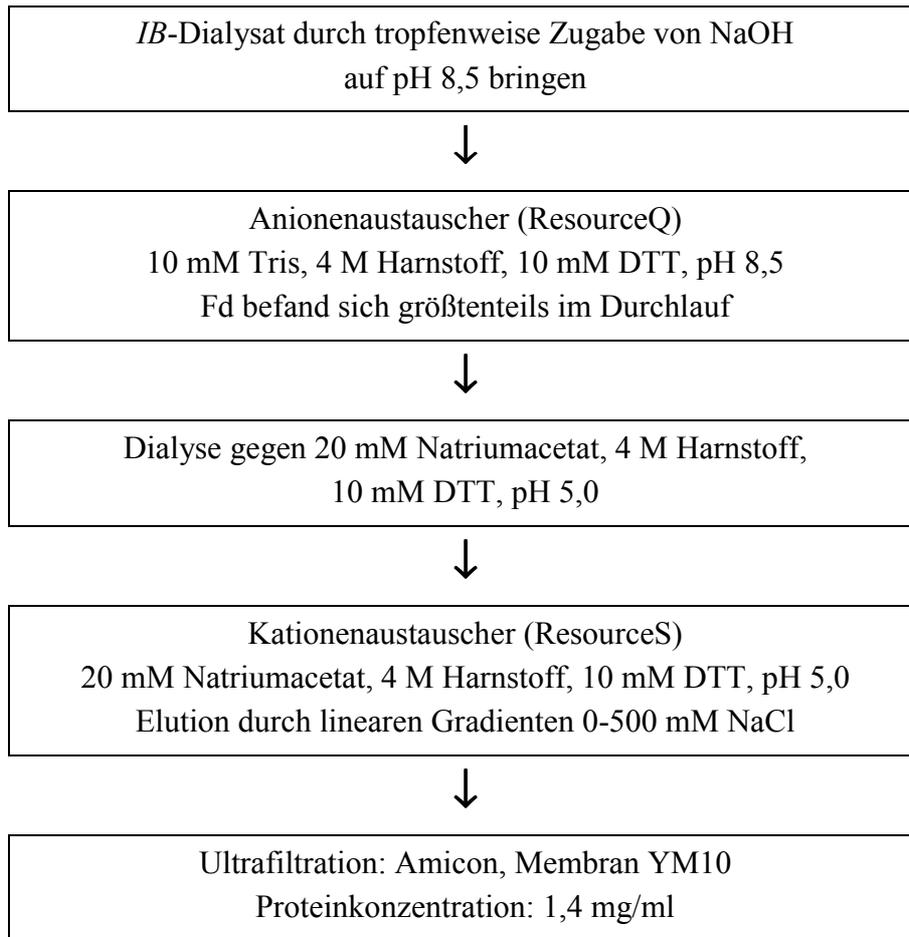


Abb. 3.1.2: Schema der denaturierenden Reinigung von Fd aus *E. coli inclusion bodies*

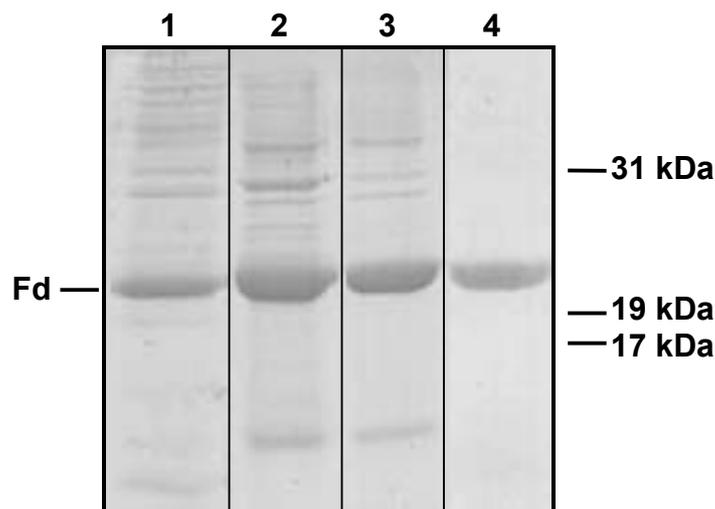


Abb. 3.1.3: Denaturierende Reinigung von Fd aus *E. coli inclusion bodies*

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Coomassiefärbung

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| 1. Zellaufschluss | 3. Durchlauf durch ResourceQ |
| 2. <i>inclusionbody</i> -Präparation | 4. Elution ResourceS |

Zur Herstellung von Anti-Fd-Antikörpern in Kaninchen durch die Firma Pineda-Antikörper-Services (Berlin) war eine Proteinkonzentration von mindestens 1 mg/ml erforderlich; gleichzeitig durfte eine Harnstoffkonzentration von 4 M nicht überschritten werden, da höhere Konzentrationen für das Kaninchen toxisch sein könnten. Diese Bedingungen wurden durch die oben beschriebene Reinigung erfüllt. Das gereinigte Protein wurde für die Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt und das Serum nach 90 Tagen gewonnen.

Test des Anti-Fd-Antikörpers

Zum Test des anti-Fd-Serums wurde das Antigen (Fd) zusammen mit einem Hefegesamtlysat auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Westernblot mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antiserums durchgeführt. Parallel wurde ein Experiment mit dem Fab-Fragment durchgeführt, um den gewonnenen anti-Fd-Antikörper mit dem kommerziell erhältlichen anti-Fab-Antikörper zu vergleichen.

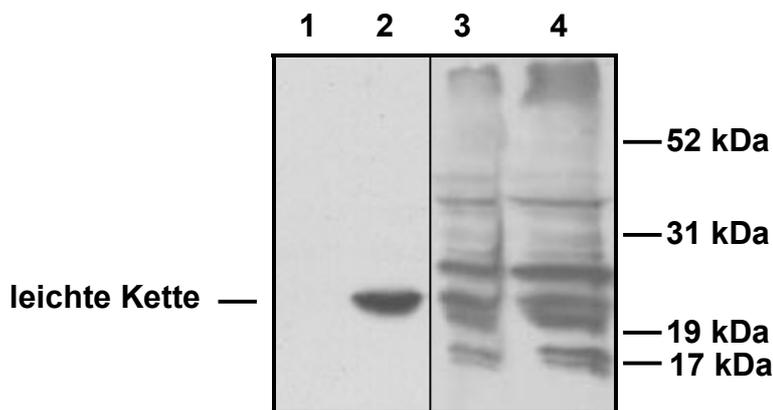


Abb. 3.1.4: Test des anti-Fd-Serums aus Kaninchen

15% SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot

- | | | |
|------------------------------------|---|-------------------------------|
| 1. Hefegesamtextrakt | } | anti-Fab-Antikörper (1:10000) |
| 2. Hefegesamtextrakt+ Fab-Standard | | |
| 3. Hefegesamtextrakt | } | anti-Fd-Antikörper (1:4000) |
| 4. Hefegesamtextrakt+ Fab-Standard | | |

Während der anti-Fab-Antikörper lediglich das Fab-Antigen erkennt, aber kaum Proteine des Hefehintergrundes, wurde bei Anwendung des anti-Fd-Antikörpers eine sehr große Anzahl der Hefeproteine detektiert, aber es konnte keine eindeutige Lokalisierung der Fd-Bande erreicht werden.

Verifizierung der Antikörpersequenz

Bei der Expression von heterologen Proteinen auftretende Probleme können durch geringfügige Mutationen bedingt sein (Eckart & Bussineau, 1995). Aus diesem Grund wurde vor

Beginn dieser Arbeit die Sequenz des Antikörpers MAK33 durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Da an einigen Positionen Unklarheit bestand, wurde die ermittelte Sequenz mit anderen Maus-Antikörpern aus der Literatur verglichen (Kabat, 1992). Insbesondere an Position 209 der schweren Kette (C_H1-Domäne) ergab sich ein Konflikt zwischen den beiden potentiellen Aminosäuren Asparagin und Asparaginsäure (Tabelle 3.1). Vergleiche mit anderen Maus-IgG-Sequenzen ergaben, dass das Vorkommen der bei Buckel *et al.* (1987) dargestellten Aminosäure Asparaginsäure an Position 209 sehr unwahrscheinlich ist und dass die, bei der für diese Arbeit durchgeführten Sequenzierung, ermittelte Aminosäure Asparagin höchstwahrscheinlich korrekt ist.

Tabelle 3.1: Vergleich der ermittelten Aminosäuresequenz von MAK33 mit der Datenbanksequenz von MAK33, verschiedenen Maus-IgG-Sequenzen und einer Ratten-IgG1-Sequenz (nach Kabat, 1992)

Antikörper	Sequenz
MAK33-Buckel <i>et al.</i> (1987)	204 WP-SETVT-CDVAHPASSTK 218
MAK33-sequenziert	WP-SETVT-CNVAHPASSTK
(79)MOUSE IGG3´CL:MOUSE IGG3	WP-SQTVI-CNVAHPASKTE
(81) IGG1´CL:MOUSE IGG1	PR-PSETVTCNVAHPASSTK
(83)MOPC21:MOUSE IGG1	-S-PETVT-CNVAHAPSSTK
(86) IGG2B(A)´CL:MOUSE (BALB/C) IGG2B	WP-SQTVT-CSVAHPASSTT
(87) IGG2B(A)´CL´:MOUSE (BALB/C) IGG2B	WP-SETVT-CSVAHTASSTK
(88) IGG2B(B)´CL:MOUSE (C57BL/6) IGG2B	WP-SQTVT-CSVAHPASSTT
(92) IGG2A(A)´CL:MOUSE (BALB/C) IGG2A	WP_SQSIT_CNVAHPASSTK
(93)17/9´CL:MOUSE IGG2A	WP_SQSIT_CNVAHPASSTK
(94) IGG2A(B)´CL:MOUSE (C57BL/6) IGG2A	WP_SQTIT_CNVAHPASSTK
(95) IGG2A(B)´CL´:MOUSE (C57BL/6) IGG2A	WP_SQTIT_CNVAHPASSTK
(97)MOPC173:MOUSE IGG2A	WP_SQTITNCNVAHPASSTK
(115)RAT IGG1´CL:RAT IGG1	WP_SQTVT_CNVAHPASSTK

3.1.2 Herstellung von Expressionsvektoren für die Sekretion von Antikörpern durch die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.2.1 Wahl des Expressionsvektors

Für diese Arbeit wurde die Transformation der Hefezellen mittels sog. *Shuttle*-Vektoren durchgeführt. Diese können zunächst in *E. coli* kloniert und amplifiziert werden, ehe sie in Hefezellen transformiert werden. Der hier für die Expression von Antikörperketten verwendete Shuttlevektor p2HGal (Abb. 3.1.5) ist vom 2 μ -Typ. D.h., er besitzt den 2 μ -*origin*

of replication und tritt mit einer durchschnittlichen Kopienzahl von 10 bis 40 pro Zelle auf (Futcher & Cox, 1984). Er weist zwar eine relativ hohe Stabilität auf, erfordert jedoch bei einer Verlustrate von 2-6 % pro Generation die Anzucht im entsprechenden Selektionsmedium (Futcher & Cox, 1984).

Der hier verwendete, induzierbare Gal1-10 Promotor (Guarente *et al.*, 1982; Johnston & Davis, 1984) ermöglicht die Transkription in beide Richtungen und somit die gleichzeitige Expression zweier Gene. Die Expression der Gene erfolgt dabei durch Induktion mit Galaktose, indem der Hefestamm in ein Medium, das neben nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen Galaktose als einzige nutzbare Kohlenstoffquelle enthält, überführt wird. Zur Selektion positiver Transformanten in Hefe wurden Selektionsmarker verwendet. Die meisten Laborstämme tragen dazu Mutationen in den Genen bestimmter Enzyme der Aminosäuresynthesewege. Diese können durch Transformation mit Vektoren, die die entsprechenden Markergene tragen, kompensiert werden. Der hier verwendete Vektor p2HGal enthält den HIS3-Marker. Daneben befindet sich auf dem Vektor p2HGal eine Ampicillinresistenz für die Selektion in *E. coli*.

Auch die Wahl der Signalsequenz, die dem Protein vorangestellt wird, kann für die Expression von Bedeutung sein (s. 1.4.1). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Invertase-Signalsequenz aus *S. cerevisiae* N-terminal an die Antikörperketten fusioniert. Sie besteht aus 21 Aminosäuren, besitzt die Sequenz MLLQAFLLFLLAGFAAKISA↓SM und entspricht einer molekularen Masse von 2,2 kDa. (↓ markiert die Spaltstelle der Signalpeptidase).

3.1.2.2 Klonierungsstrategie

Zur Untersuchung der Expression von Antikörpern in *S. cerevisiae* wurden folgende Expressionskonstrukte geplant, die die gleichzeitige Expression der leichten Kette von MAK33 und des Fd-Fragmentes (zur Produktion des Fab-Fragmentes) bzw. der schweren Kette (zur Produktion des gesamten Antikörpers) erlauben.

Konstrukt	Inserts	Templates
pUEK5	leichte Kette + Fd-Fragment	pBT111 bzw.p12002
pUEK9	leichte Kette + schwere Kette	pBT111 bzw.p12016

Wegen der Notwendigkeit, die Signalsequenz an die verschiedenen Ketten anzufügen, reichte ein einfache PCR zur Amplifizierung der cDNA nicht aus. Stattdessen wurde eine *Linker-PCR* (PCR s. 2.2.4) durchgeführt. Mit dieser Methode wurde zunächst die benötigte cDNA mittels PCR aus dem entsprechenden Templatevektor amplifiziert, um nachfolgend mittels einer weiteren PCR die cDNA der Signalsequenz anzufügen. Hierzu wurde die cDNA der Signalsequenz zunächst zusammen mit der entsprechenden Schnittstelle als Oligonukleotid hergestellt und anschließend als Primer für die zweite PCR verwendet.

Das Prinzip der Klonierung ist in Abb. 3.1.5 am Beispiel der leichten Kette von MAK33 dargestellt.

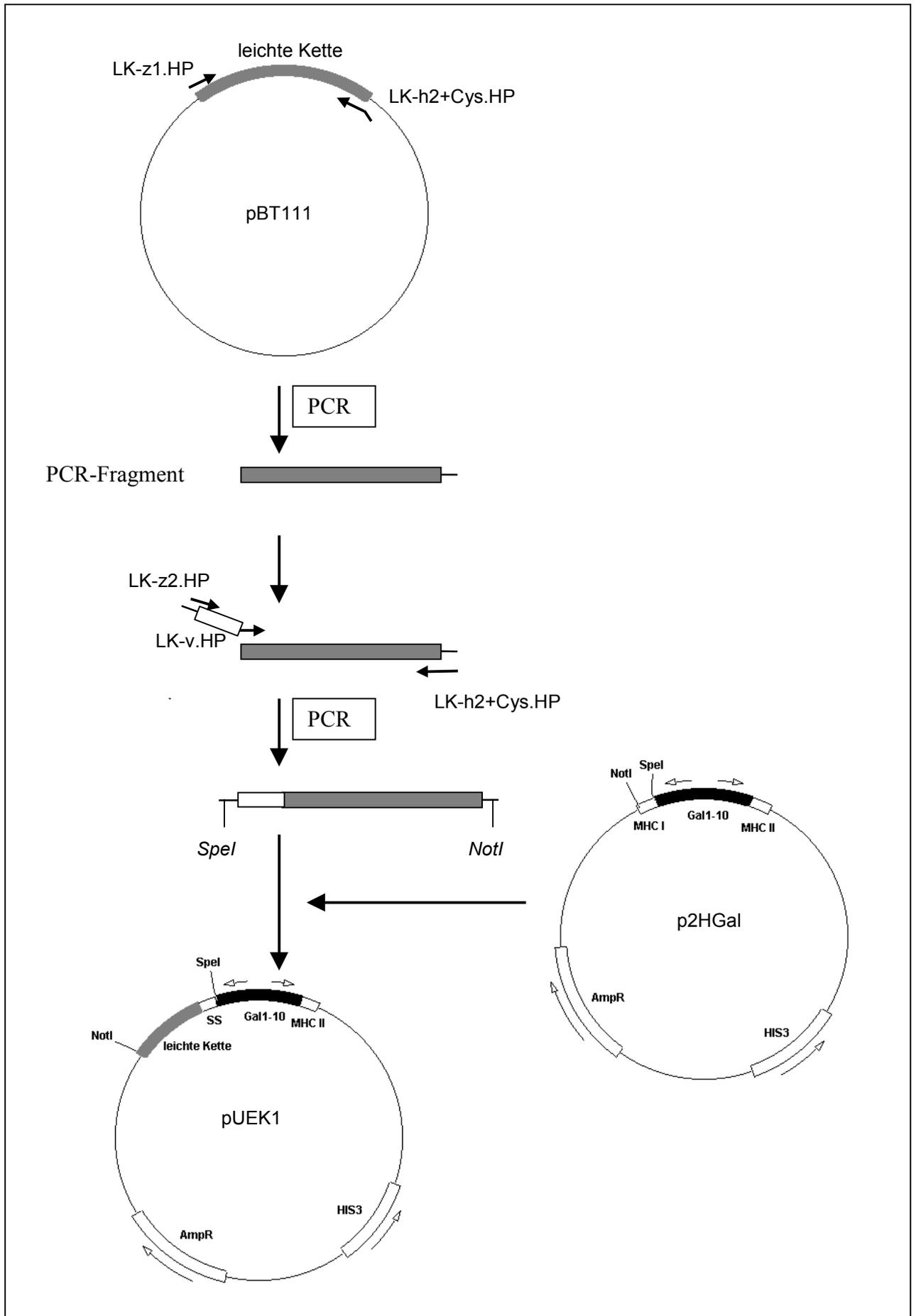


Abbildung der vorhergehenden Seite:

Abb. 3.1.5: Klonierung der leichten Kette von MAK33 in den Hefe-Shuttlevektor p2HGal

pUEK1 stellt eine Vorstufe zu pUEK5 und pUEK9 dar. Für die Klonierung von pUEK5 (bzw. pUEK9) erfolgt die Insertion des Fd-Fragmentes (bzw. der schweren Kette) in die *multiple cloning site II* (MHCII) mittels der Schnittstellen EcoRI und XhoI.

Im Anschluss an die Klonierung wurden die pUEK-Plasmide in *E.coli* transformiert (s. 2.2.9), dort amplifiziert und die Richtigkeit der Klonierungen durch DNA-Sequenzierung überprüft (s. 2.2.8).

3.1.3 Expression der Antikörperfragmente

Anhand der Aminosäuresequenzen wurden mittels des ProtParam Tools (<http://www.expasy.ch>) die erwarteten molekularen Massen der zu exprimierenden Antikörperketten bestimmt.

Tabelle 3.2: Errechnete molekulare Massen der verschiedenen Ketten des Antikörpers MAK33

Fragment	Anzahl der Aminosäuren	Errechnete molekulare Masse (kDa)
Invertasesignalsequenz (SS)	21	2,2
Leichte Kette	213	23,4
Leichte Kette + SS	234	25,6
Fd-Fragment	226	24,3
Fd-Fragment + SS	247	26,6
Schwere Kette	450	49,7
Schwere Kette + SS	461	52

Zur Expression von heterologen Proteinen in Hefe existieren zahlreiche verschiedene Laborstämme, die sich aufgrund ihrer genetischen Ausstattung in ihren Fähigkeiten zur Proteinfaltung, Sekretion u.ä. beträchtlich unterscheiden. In dieser Arbeit wurden die drei Hefestämme K603-Y113, W303 und KMY1005 in Bezug auf die Expression von Antikörpern untersucht.

Die Stämme W303 (*leu2*, *ura3-52*, *his3*, *trp1*, *lys2*, *suc2*) und KMY1005 (*leu2*, *ura3*, *his3*, *trp1*, *lys2*) sind häufig verwendete Laborstämme, die eine Expression von Fremdproteinen (hier von einem Plasmid mit HIS-Selektionsmarker) erlauben.

Beim Hefestamm K603-Y113 (*leu2*, *ura3*, *his3*, *trp1*, *lys2*, *suc2*, *kar2::LEU2*, *pY113 [URA]*) handelt es sich um einen Abkömmling des Stammes W303. Er zeichnet sich dadurch aus, dass das Gen für Kar2 durch Einsetzen einer Leu2-Kassette deletiert wurde. Durch Komplementierung mit dem Plasmid Y113, welches das durch Galaktose induzierbare Gen für Kar2 trägt, wird die Lebensfähigkeit der Zelle wiederhergestellt und gewährleistet.

3.1.4 Vergleich der Wachstumskinetiken verschiedener Hefestämme

Häufig hat die Expression von Fremdproteinen einen entscheidenden Einfluss auf das Wachstum des Wirtsorganismus. Dies liegt oft daran, dass die Anhäufung der Fremdproteine eine Stresssituation für die Zelle darstellt, so dass diese eventuell ihr Zellwachstum verlangsamt (Eckart & Bussineau, 1995).

Zum Vergleich der drei Hefestämme wurde deren Wachstum jeweils ohne (mit p2HGal als Kontrollplasmid) und mit Expression von Antikörperfragmenten (mit pUEK5 zur Expression der leichten Kette und Fd bzw. pUEK9 zur Expression der leichten und schweren Kette) untersucht. Dabei wurden die Hefestämme W303 und KMY1005 zunächst bis zu einer bestimmten Zelldichte angezogen (OD_{600} ca. 0,75). Anschließend wurde die Expression durch Überführen in Galaktosemedium induziert (s 2.3.3.2). Im Falle der K603-Y113-Hefen erfolgte die Induktion der Antikörperexpression von Beginn an, da dieser Stamm zur Expression des essentiellen Kar2 dauerhaft in Galaktosemedium angezogen werden muss.

Die Wachstumskinetiken sind in Abb. 3.1.6 dargestellt. Es ist zu beobachten, dass die Stämme W303 und KMY1005 - sowohl antikörperexprimierend als auch nicht exprimierend - ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten aufwiesen und nach ca. 16-20 h in die stationäre Phase übergingen (Abb. 3.1.6, B und C). Dabei erreichten die Stämme eine maximale OD_{600} von ca. 6. Es konnte also beim Wachstum kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden, d.h. dass einerseits W303 und KMY1005 unter den gegebenen Bedingungen ein fast identisches Wachstumsverhalten aufwiesen und dass die Expression der Antikörperketten keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme W303 und KMY1005 hatte.

Demgegenüber führte die Expression der Antikörperketten im Hefestamm K603-Y113 zu einer deutlichen Verlangsamung des Wachstums gegenüber dem nicht-exprimierenden Stamm, der ebenso wie die beiden Stämme W303 und KMY1005 nach ca. 16-20 h die stationäre Phase erreicht hatte (Abb. 3.1.6, A). Bei Antikörperexpression ging der Stamm K603-Y113 hingegen erst nach mehr als 60 h in die stationäre Phase über. Generell erreichte der Stamm K603-Y113 mit einer maximalen OD_{600} von ca. 8 eine etwas höhere Zelldichte als die Stämme W303 und KMY1005.

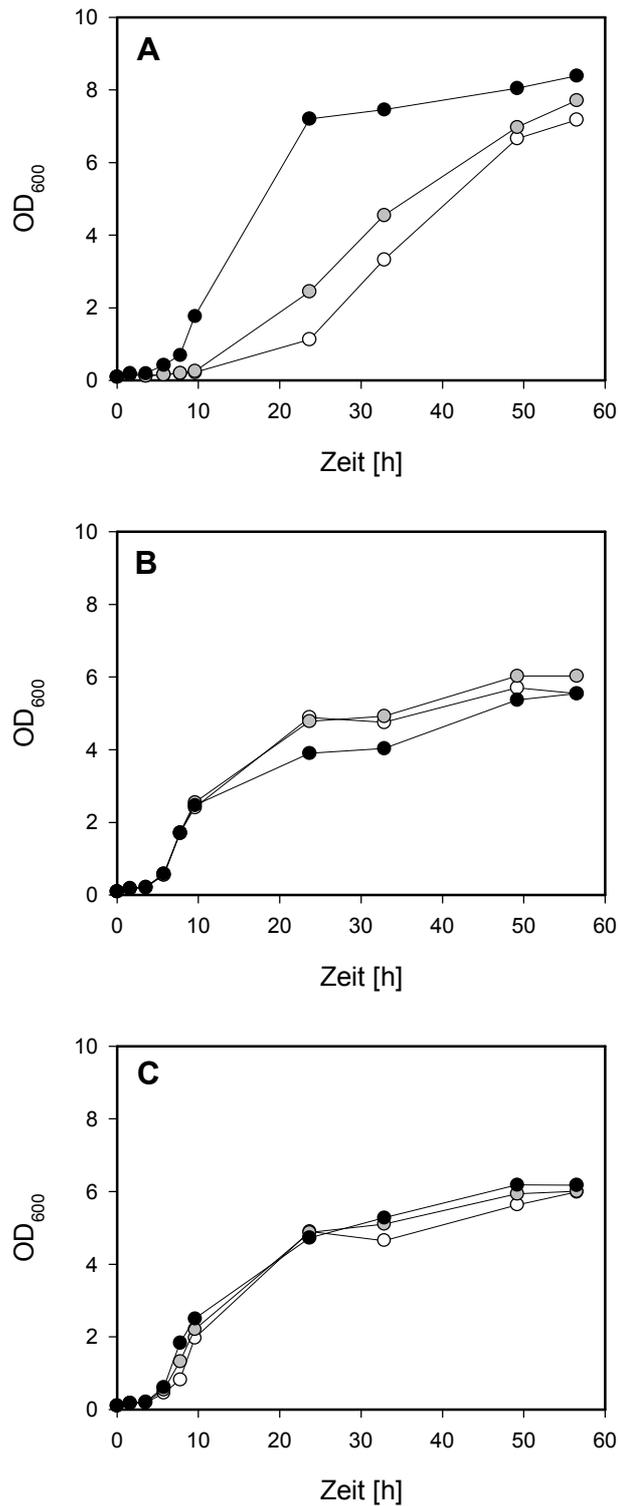


Abb. 3.1.6: Wachstumskinetiken verschiedener Hefestämme

Alle K603-Y113 Hefestämme wurden von Beginn an in URA-HIS-Gal-Selektionsmedium angezogen. Die anderen Stämme wurden bis zu einer OD_{600} von ca. 0,75 in HIS-Glc-Selektionsmedium angezogen und anschließend zur Induktion der Antikörperexpression in HIS-Gal-Medium überführt.

A: K603-Y113

B: W303

C: KMY1005

+p2HGal (●), +pUEK5 (○), +pUEK9 (◐)

3.1.4.1 Vergleich verschiedener Hefestämme bezüglich der Expression von Antikörperketten

Neben der Untersuchung der drei Hefestämme bezüglich ihres Wachstumsverhaltens wurde auch ein Vergleich der Stämme im Bezug auf die intrazelluläre Expression des Fab-Fragmentes durchgeführt (Abb. 3.1.7)

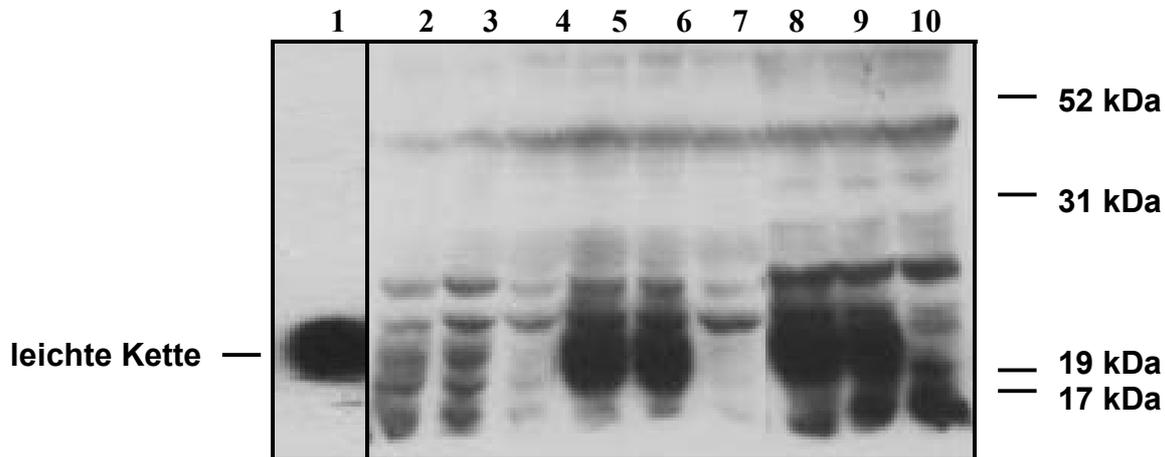


Abb. 3.1.7: Vergleich von verschiedenen Hefeexpressionsstämmen im Bezug auf die Expression von verschiedenen Antikörperketten

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Gesamtextrakt, Westernblot mit anti-Fab-Antikörper

1. Fab-Standard
2. K603-Y113 + pUEK5 [leichte Kette + Fd]
3. K603-Y113 + pUEK9 [leichte Kette + schwere Kette]
4. K603-Y113 + p2HGal [—]
5. W303 + pUEK5 [leichte Kette + Fd]
6. W303 + pUEK9 [leichte Kette + schwere Kette]
7. W303 + p2HGal [—]
8. KMY1005 + pUEK5 [leichte Kette + Fd]
9. KMY1005 + pUEK9 [leichte Kette + schwere Kette]
10. KMY1005 + p2HGal [—]

Die im entsprechenden Stamm heterolog exprimierten Proteine sind in [] angegeben; LK: leichte Kette, Fd: Fd-Fragment, SK: schwere Kette, —: keine Antikörperkette

Aufgrund des Fehlens eines anti-Fd-Antikörpers konnte hier nur die Expression der leichten Kette gezeigt werden. Es ist ersichtlich, dass der Hefestamm K603-Y113 eine sehr geringe Expression der leichten Kette von MAK33 aufwies, während die Stämme W303 und KMY1005 beide eine deutliche Expression zeigten. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Fall zahlreiche Hefepoteine von dem verwendeten anti-Fab-Antikörper als Hintergrund erkannt wurden.

Aufgrund der Beobachtungen, dass scheinbar nur eine sehr geringe und kaum nachweisbare Menge an Antikörperketten im Hefestamm K603-Y113 vorhanden war, wurde dieser für die weiteren Experimente nicht mehr herangezogen. Stattdessen fand ein weiterer Vergleich der beiden verbleibenden Stämme, auch bezüglich der Expression der schweren Kette, statt (s. Abb. 3.1.8).

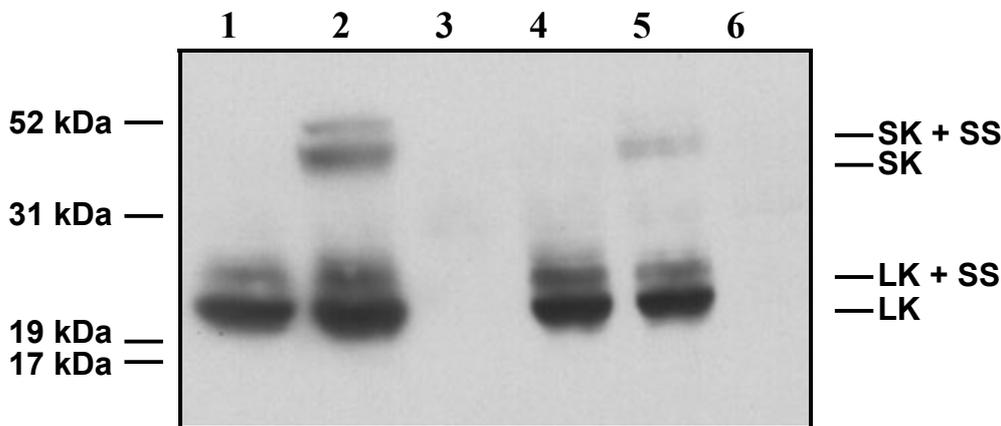


Abb. 3.1.8: Vergleich der Hefestämme W303 und KMY1005 im Bezug auf die Expression von leichter und schwerer Kette von MAK33

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Gesamtzellextrakt, Westernblot mit anti-IgG (H+L)-Antikörper

1. W303 + pUEK5 [leichte Kette + Fd]
2. W303 + pUEK9 [leichte Kette + schwere Kette]
3. W303 + p2HGal [—]
4. KMY1005 + pUEK5 [leichte Kette + Fd]
5. KMY1005 + pUEK9 [leichte Kette + schwere Kette]
6. KMY1005 + p2HGal [—]

Die im entsprechenden Stamm heterolog exprimierten Proteine sind in [] angegeben; LK: leichte Kette, Fd: Fd-Fragment, SK: schwere Kette, —: keine Antikörperkette
SS = Invertasesignalsequenz,

„SK + SS“, „SK“, „LK + SS“ und „LK“ bezeichnen die vermuteten Expressionsprodukte

Es war zu beobachten, dass sowohl die leichte als auch die schwere Kette in den beiden Hefestämmen W303 und KMY1005 hergestellt wurden. Dabei ist neben den prominenten Hauptbanden der leichten und der schweren Kette jeweils eine geringfügig höhere Bande zu erkennen. In Tabelle 3.3 sind die anhand ihrer RF-Wert abgeschätzten molekularen Massen der verschiedenen Proteinbanden dargestellt.

Tabelle 3.3: Abgeschätzte molekulare Massen der prominenten Proteinbanden aus Abb. 3.1.8

*: Die geschätzte molekulare Masse wurde anhand der Laufstrecke im Vergleich zum Proteinmarker berechnet.

Bande	Geschätzte molekulare Masse *	Zugeordnetes Polypeptid	Theoretische molekulare Masse
4	50 kDa	schwere Kette + Invertasesignalsequenz	52 kDa
3	47 kDa	schwere Kette, prozessiert	49,7 kDa
2	26 kDa	leichte Kette + Invertasesignalsequenz	25,6 kDa
1	23 kDa	leichte Kette, prozessiert	23,4 kDa

Anhand der abgeschätzten molekularen Massen der Proteinbanden des SDS-PAGE (Abb. 3.1.8) wurde vermutet, dass es sich bei den Banden 1 und 3 um die prozessierten Formen der schweren bzw. der leichten Ketten handelt, während die beiden jeweils leicht erhöhten Banden (Banden 2 bzw. 4) die entsprechenden unprozessierten Polypeptidketten darstellen können, bei denen die 2,2 kDa schwere Invertasesignalsequenz noch nicht durch die im ER befindlichen Peptidasen abgespalten worden ist.

Aufgrund der sehr ähnlichen Expressionsraten der beiden Hefestämme wurde für die folgenden Experimente nur einer der beiden Stämme - nämlich W303, der als etablierter Laborstamm breite Anwendung findet - herangezogen,

3.1.5 Expressionskinetik des Hefestammes W303 + pUEK9 im Bezug auf die zeitliche Expression der Antikörperketten

Zur Untersuchung der zeitlichen Entwicklung der Expression der Antikörperketten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion Proben entnommen und bezüglich der Menge an produzierten Antikörperketten analysiert (Abb. 3.1.9).

Aus Abb. 3.1.9 ist ersichtlich, dass die Expression insbesondere der leichten Kette bereits nach 1,5 h nachweisbar war. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch noch keine nennenswerte Expression der schweren Kette detektiert werden. Erst nach ca. 6,5 h konnte eine deutliche Bande der schweren Kette zugeordnet werden. Das Maximum der in der Zelle exprimierten Antikörperketten wurde jedoch erst nach Induktion über Nacht (19 h) erreicht. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden die Zellen für den Nachweis von Antikörpern für mindestens 7 h, z.T. auch über Nacht induziert, um eine gut zu detektierende Menge an Antikörperketten zu erhalten.

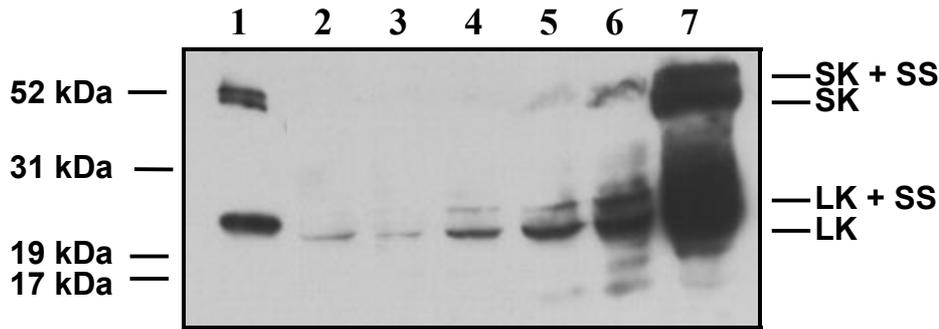


Abb. 3.1.9: Expressionskinetik des Hefestammes W303 + pUEK9

Die Hefezellen wurden bis zu einer OD_{600} von ca. 0,75 in HIS-Glc-Selektionsmedium angezogen und anschließend zur Induktion der Antikörperexpression in HIS-Gal-Medium überführt

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Gesamtextrakt, Westernblot mit anti-IgG(H+L)-Antikörper

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| 1. IgG-Standard | 5. 4,5 h nach Induktion |
| 2. 1,5 h nach Induktion | 6. 6,5 h nach Induktion |
| 3. 2,5 h nach Induktion | 7. 19 h nach Induktion |
| 4. 3,5 h nach Induktion | |

3.1.6 Sekretion der Antikörperfragmente in das Medium

Ein entscheidender Faktor bei der Expression von Antikörpern war die Untersuchung der Sekretion der Antikörperketten in das umgebende Medium. Da es bei Sekretion in das Medium zu einer sehr starken Verdünnung der Proteine kommt, ist es notwendig, das Mediums einzuengen, um so eine detektierbare Konzentration des Proteins zu erhalten.

Dazu wurde das Hefemedium nach Zentrifugation der Hefezellen zunächst filtriert und anschließend mittels Ultrafiltration (s. 2.3.6) aufkonzentriert.

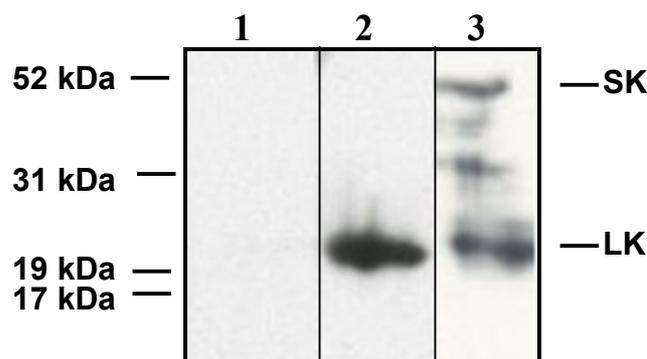


Abb. 3.1.10 Sekretion der Antikörperketten in das Medium

Vier Tage nach Induktion der Antikörperketten wurden die Hefestämme geerntet, das Medium filtriert und auf ca. $1/100$ des Ausgangsvolumens eingengt.

15% SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot mit anti-IgG(H+L)-Antikörper

1. W303 + p2HGal [—]
2. W303 + pUEK5 [LK + Fd]
3. W303 + pUEK9 [LK + SK]

Entsprechend Abb. 3.1.10 konnte gezeigt werden, dass insbesondere die leichte Kette in das Medium sezerniert werden konnte. Im Falle der schweren Kette wurden neben dem Voll-längenprotein auch zahlreiche Abbaufragmente nachgewiesen.

3.1.7 Aktivität der Antikörperfragmente

Ob die in das Medium abgegebenen Antikörperketten (leichte Kette + Fd-Fragment bzw. leichte Kette + schwere Kette) in der Lage waren, sich korrekt zum aktiven Fab-Fragment bzw. zum aktiven IgG-Molekül zusammenzulagern, wurde mit Hilfe eines modifizierten ELISAs getestet (s. 2.4.7).

Dazu wurden die Hefezellen zunächst durch Zentrifugation und anschließende Filtration aus dem Hefemedium entfernt. Die im Medium befindlichen Proteine wurden hundertfach konzentriert.

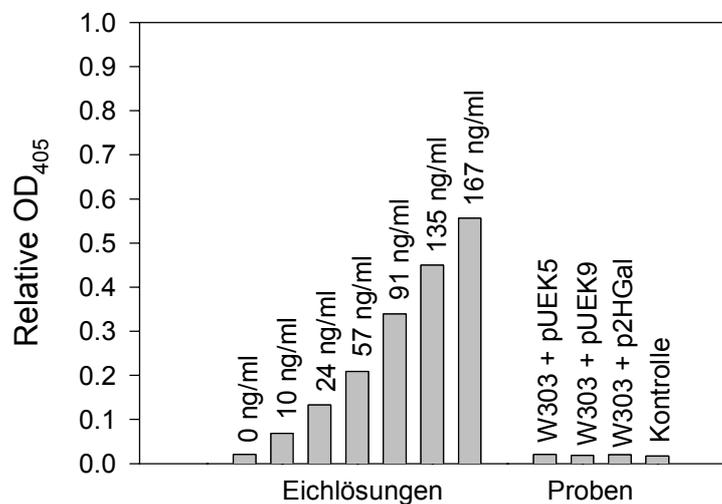


Abb. 3.1.11: ELISA zur Analyse der Antikörperaktivität im Sekretionsmedium

Die untersuchten Hefestämme wurden vier Tage unter induzierenden Bedingungen angezogen (s. 2.3.3.2), anschließend der filtrierte Kulturüberstand auf $1/100$ des Ausgangsvolumens eingengt und je 100 μ l im ELISA (2.4.7) eingesetzt. Als Eichgerade wurden Fab-Lösungen der angegebenen Konzentrationen verwendet. Eine antikörperfreie Lösung wurde als Kontrolle eingesetzt.

Wie aus Abb. 3.1.11 zu erkennen ist, konnte weder im Hefeüberstand des Stammes W303 + pUEK5 noch im Überstand des Stammes W303 + pUEK9 Antikörperaktivität nachgewiesen werden. Beide Werte liegen ebenso wie die Medienkontrolle und der Überstand des Stammes W303 + p2HGal im gleichen Messbereich wie die Negativkontrolle der Eichkurve. Somit wurde gezeigt, dass die Hefen keine unter diesen Bedingungen nachweisbaren Mengen an aktiven Antikörpern oder Antikörperfragmenten sezernieren konnten. Dies lässt darauf schließen, dass sich die im Medium nachgewiesenen Antikörperketten (s. Abschnitt 3.1.6) nicht zu aktiven Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten zusammen gelagert haben.

Im Folgenden sollte eine Analyse des sekretorischen Weges anhand des Hefestammes W303 durchgeführt werden.

3.1.8 Löslichkeit der Antikörperketten innerhalb der Hefezellen

In Stresssituationen, die z.B. bei der Überexpression eines Fremdproteins ausgelöst werden können, ist die Zelle oft nicht in der Lage, die entsprechenden Protein korrekt zu falten; es kommt stattdessen zu Aggregationsprozessen, die neben dem Abbau auch zu einer Ablagerung der falsch gefalteten Proteine innerhalb der Zelle führen können (Umebayashi *et al.*, 1997; Eckart & Bussineau, 1995). Die so abgelagerten Proteine werden zwar bei der Analyse von Proteingestamtexttrakten detektiert, sind aber nicht in der Lage, die Zelle über den sekretorischen Weg zu verlassen.

Demzufolge wurde untersucht, ob die Antikörperketten größtenteils löslich oder unlöslich innerhalb der Zelle vorliegen. Damit sollte geklärt werden, ob die geringe Sekretion eher auf der Aggregation der Antikörperketten oder dem Unvermögen der Zelle, die Antikörperketten zu korrekt gefalteten Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten zusammenzulagern, beruht. Dazu wurden die Hefepoteine des Stammes W303 (Abb. 3.1.12) in lösliche und unlösliche Fraktionen aufgetrennt (s. 2.3.3.3) und mittels SDS-PAGE analysiert.

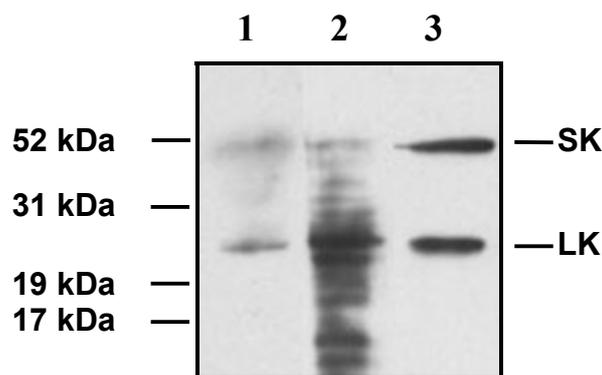


Abb. 3.1.12: Trennung der Hefepoteine in lösliche und unlösliche Fraktionen

15% SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot mit anti-IgG(H+L)-Antikörper

1. W303 + pUEK9 [LK + SK], lösliche Fraktion
2. W303 + pUEK9 [LK + SK], unlösliche Fraktion
3. IgG-Standard

Bei der Detektion wurde im Falle der unlöslichen Fraktionen neben den Antikörperketten auch zahlreiche andere Hefepoteine als Störbanden erkannt.

In allen untersuchten Hefestämmen lag ein Großteil der Antikörperketten in löslicher Form vor. Zusätzlich war aber auch ein Teil der Ketten in der unlöslichen Fraktion vorhanden.

3.1.9 Lokalisation der Antikörperfragmente innerhalb der Zelle

Neben der Trennung der Hefepoteine in lösliche und unlösliche Fraktionen erschien es interessant, die Lokalisation der Antikörperketten innerhalb der Hefezellen zu bestimmen und somit Aussagen über mögliche Schwachstellen bei der Produktion und Sekretion der

Antikörperketten zu machen. Dabei sollte untersucht werden, inwiefern die Polypeptidketten ihren Weg in das ER finden oder etwa im Cytosol zurückgehalten werden.

Dazu wurde die Methode der Mikrosomenpräparation ausgenutzt (s. 2.3.4, Abb. 3.1.13), mit der auf schonende Weise das ER-Kompartiment (mit ER-Membran und Inhalt des ER-Lumens) von allen anderen Bestandteilen der Zelle getrennt wird.

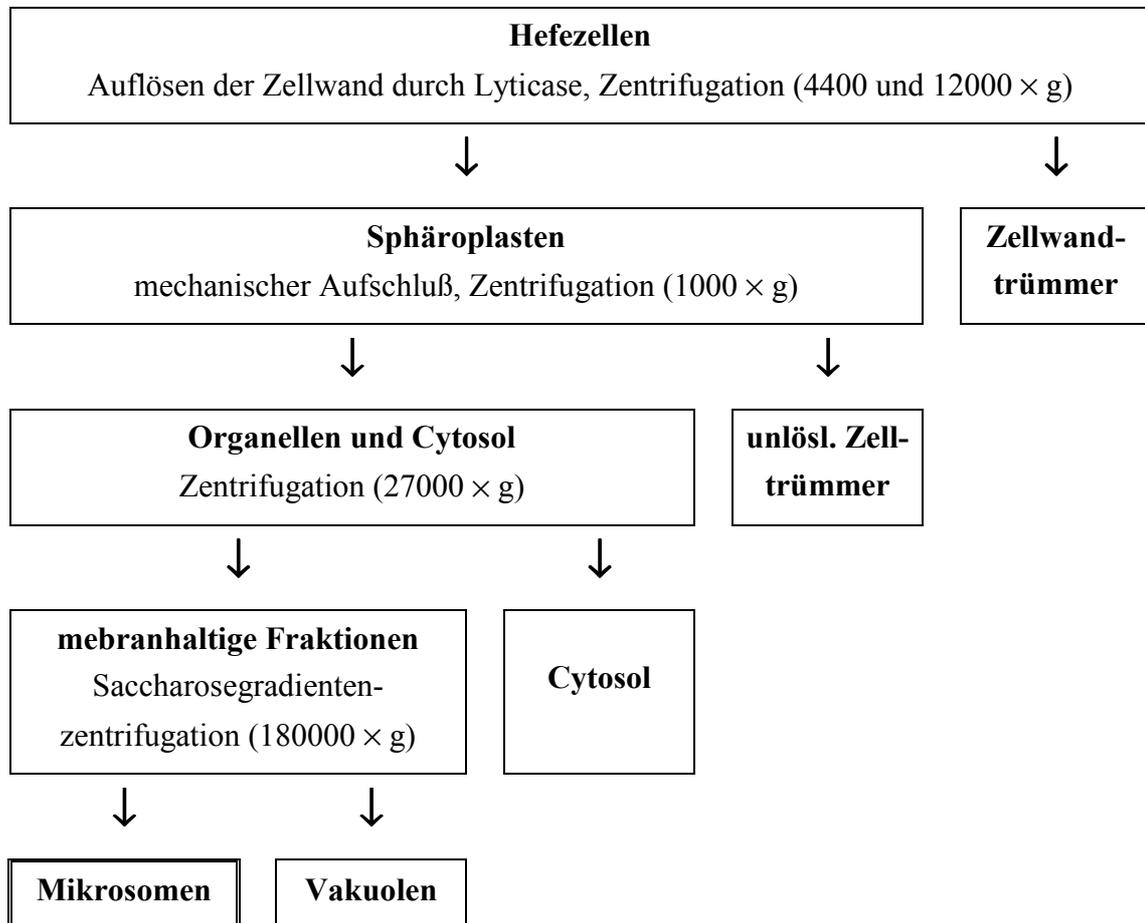


Abb. 3.1.13: Schematische Darstellung einer Mikrosomenpräparation

Die Schritte der Mikrosomenpräparation und die daraus resultierenden Fraktionen sind schematisch dargestellt.

Die Präparation wurde leicht modifiziert nach Schekman *et al.* (s. <http://mcb.berkeley.edu/labs/schekman/microsomes>) durchgeführt und ist im Detail in 2.3.4 beschrieben

Bei der Durchführung einer Mikrosomenpräparation der Expressionsstämme W303 + pUEK5 (leichte Kette + Fd-Fragment) und W303 + pUEK9 (leichte Kette + schwere Kette) sowie des Kontrollstammes W303 + p2HGal wurden die verschiedenen Fraktionen auf das Vorhandensein der leichten und der schweren Antikörperkette untersucht, während die Lokalisation des Fd-Fragmentes aufgrund des fehlenden anti-Fd-Antikörpers nicht möglich war.

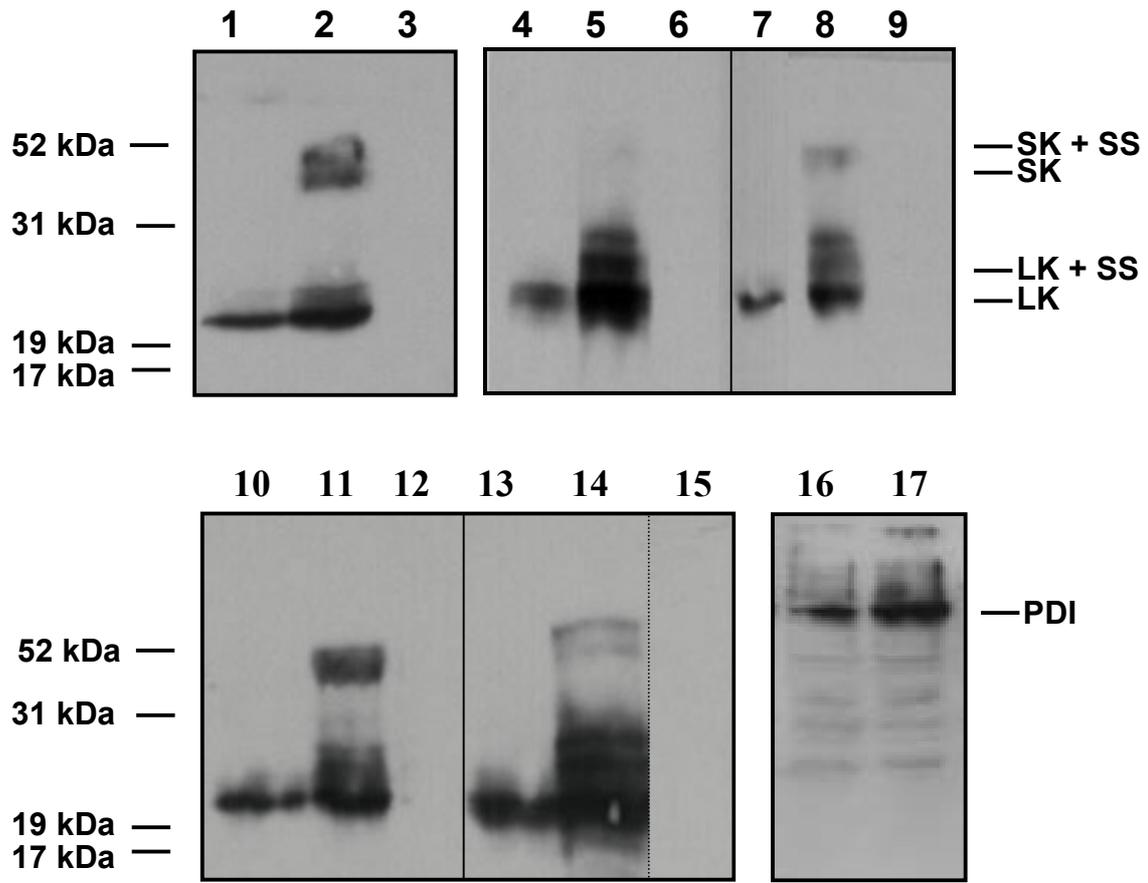


Abb. 3.1.14: Analyse der verschiedenen Fraktionen der Mikrosomenpräparation

Die Bezeichnungen der verschiedenen Fraktionen beziehen sich auf das Schema in Abb. 3.1.13

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------|
| 1. Sphäroplasten (Fab) | anti-IgG(H+L)-Antikörper |
| 2. Sphäroplasten (IgG) | |
| 3. Sphäroplasten (—) | |
| 4. unlösliche Zellbestandteile (Fab) | |
| 5. unlösliche Zellbestandteile (IgG) | |
| 6. unlösliche Zellbestandteile (—) | |
| 7. Organellen und Cytosol (Fab) | |
| 8. Organellen und Cytosol (IgG) | |
| 9. Organellen und Cytosol (—) | |
| 10. Mikrosomen (Fab) | anti-PDI-Antikörper |
| 11. Mikrosomen (IgG) | |
| 12. Mikrosomen (—) | |
| 13. Vakuolen (Fab) | |
| 14. Vakuolen (IgG) | |
| 15. Vakuolen (—) | |
| 16. Mikrosomen (Fab) | |
| 17. Mikrosomen (—) | |

(—): keine Expression von Antikörperketten

(Fab): Expression der leichten Kette und des Fd-Fragmentes von MAK33

(IgG): Expression der leichten und der schweren Kette von MAK33

Es zeigte sich (Abb. 3.1.14), dass in der Sphäroplastenfraktion der Expressionsstämme, die außer den Zellwandbestandteilen alle Proteine der Zelle enthält, beide Ketten (IgG, Spuren 1 und 2) sowohl in ihrer prozessierten als auch in ihrer unprozessierten Form (d.h. vor Abspaltung der Signalsequenz) nachgewiesen werden konnten. Nach Aufschluss der Sphäroplasten und Trennung in unlösliche (Spuren 4 und 5) und lösliche Fraktionen (Spuren 7 und 8) konnte auch hier (in Analogie zu Abschnitt 3.1.8) gezeigt werden, dass in beiden Fraktionen Antikörperketten vorhanden waren, d.h. dass diese sowohl in löslicher als auch in unlöslicher Form innerhalb der Zelle vorlagen. In der unlöslichen Fraktion lag aber insbesondere die schwere Kette nur in relativ geringen Mengen vor und es waren gleichzeitig starke Abbaubanden zu finden. Aber auch die Fraktion der Organellen und des Cytosols (lösliche Fraktion) lässt auf einen Abbau der schweren Kette innerhalb dieser nicht weiter aufgetrennten löslichen Fraktionen schließen.

Entsprechend ihrer erwarteten Lokalisation, wurden die Antikörperketten in großen Mengen in der Mikrosomenfraktion (Spuren 10 und 11) nachgewiesen. Hierbei konnte deutlich gezeigt werden, dass die Mikrosomenfraktion die einzige Fraktion darstellt, die beide Ketten (fast) ausschließlich in ihrer prozessierten und nicht-degradierten Form enthält. Die Vakuolenfraktionen (Spuren 13 und 14), die nach der Ultrafiltration von den Mikrosomenfraktionen abgetrennt wurden, enthielten hingegen zahlreiche Abbaufragmente, insbesondere der schweren Kette.

Zur Verifizierung der Mikrosomenfraktion wurde die ER-lokalisierte Proteindisulfid-isomerase (PDI) verwendet. In einem Westernblot der entsprechenden Fraktion mit einem anti-PDI-Antikörper wurde diese in den Mikrosomenfraktionen des Fab-Expressionsstammes und des Kontrollstammes nachgewiesen (Spuren 16, 17), während im Cytosol und in der unlöslichen Fraktion keine PDI nachweisbar war (ohne Abbildung).

3.1.10 Koexpression von Proteinen der *unfolded protein response*

Wie oben gezeigt, liegt ein Großteil der Antikörperketten unlöslich in den Hefezellen vor. Unter physiologischen Bedingungen sollte eine Induktion der UPR (*unfolded protein response*, s. 1.2.4), und somit eine verminderte Anhäufung missgefalteter Proteine im ER, erfolgen. Da die unter diesen Umständen scheinbar stark gestressten Zellen nicht in der Lage waren, mit der große Menge an missgefalteten Proteinen umzugehen (wie sich auch am verlangsamten Wachstum der K603-Y113-Hefen gezeigt hatte, s. Abb. 3.1.6), sollte eine erhöhte Konzentration des Hac1-Transkriptionsfaktors in der Zelle herbeigeführt werden. Dazu wurde auf einem Plasmid die cDNA für die bereits gespleisste Form der Hac1-mRNA in die Zelle eingebracht. Es wurde vermutet, dass durch Erhöhung der Hac1-Konzentration in der Zelle auch eine Verstärkung der UPR induziert wird.

Neben Plasmiden, die zur Expression von Hac1 - ebenso wie im Falle der Antikörper - eine Induktion mit Galaktose benötigen, wurden auch Plasmide verwendet, die einen

kupferinduzierten Promotor besitzen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 100 μM CuSO_4 .

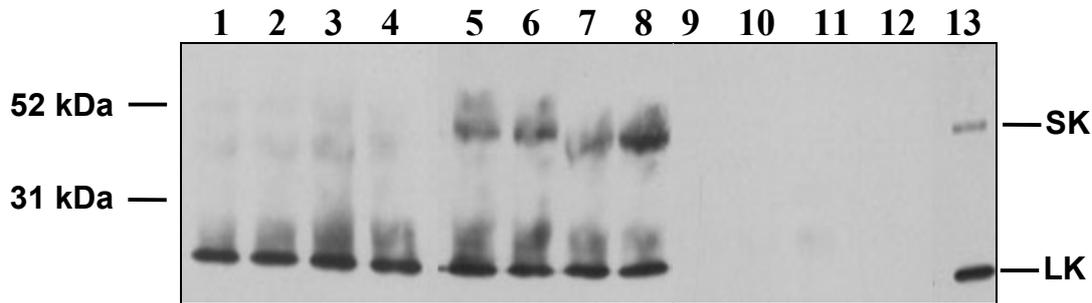


Abb. 3.1.15: Koexpression von Hac1 und Antikörperketten in *S. cerevisiae*-W303

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Gesamtextrakt, Westernblot mit anti-IgG (H+L)-Antikörper

1. W303 + pUEK5 + p416Gal [LK+Fd]
2. W303 + pUEK5 + p416Gal HAC1 Δ INT [LK + Fd + Hac1ⁱ]
3. W303 + pUEK5 + p416Cup [LK+Fd]
4. W303 + pUEK5 + p416Cup-HAC1 Δ INT [LK + Fd + Hac1ⁱ]
5. W303 + pUEK9 + p416Gal [LK+SK]
6. W303 + pUEK9 + p416Gal-HAC1 Δ INT [LK + SK + Hac1ⁱ]
7. W303 + pUEK9 + p416Cup [LK+SK]
8. W303 + pUEK9 + p416Cup-HAC1 Δ INT [LK + SK + Hac1ⁱ]
9. W303 + p2HGal + p416Gal [—]
10. W303 + p2HGal + p416Gal-HAC1 Δ INT [Hac1ⁱ]
11. W303 + p2HGal + p416Cup [—]
12. W303 + p2HGal + p416Cup-HAC1 Δ INT [Hac1ⁱ]
13. IgG-Standard

Die im entsprechenden Stamm heterolog exprimierten Proteine sind in [] angegeben; LK: leichte Kette, Fd: Fd-Fragment, SK: schwere Kette, Hac1ⁱ: gespleisste Form von Hac1, —: keine Antikörperkette

Die Expression von Hac1 (Abb. 3.1.15, Spuren 2, 4, 6, 8) zeigte keinen entscheidenden Einfluss auf die Menge an leichter bzw. schwerer Kette innerhalb der Zelle, lediglich bei Expression von Hac1 nach Induktion durch CuSO_4 , lag innerhalb der Zelle ein geringfügig erhöhter Anteil an der schweren Kette vor (Spur 8).

Da es sich bei Antikörpern um hefefremde Protein handelt, könnte es zu generellen Problemen bei der Faltung der komplexen Antikörpermoleküle kommen. Aus diesem Grund lag die Möglichkeit nahe, dass durch Koexpression von entsprechenden Chaperonen, die an der Faltung von Antikörpern in Säugern beteiligt sind, eine verbesserte Faltung der Antikörper erreicht werden könnte.

Dazu wurden die Hefestämme W303 +pUEK5 bzw. pUEK9 mit einem Plasmid (pX803) transformiert, das, neben dem bereits endogen vorhandenen und essentiellen Kar2, von einem kupferinduzierbaren Promotor aus die Expression des homologen Maus-BiP ermöglicht.

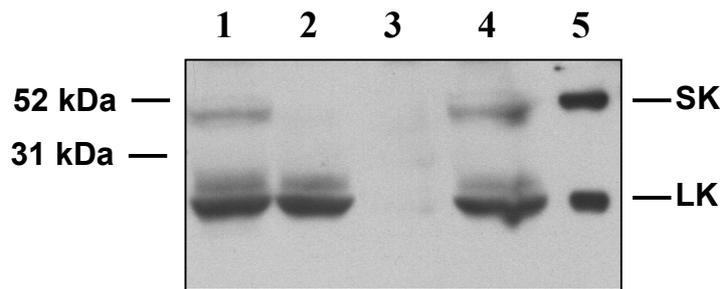


Abb. 3.1.16: Koexpression von murinem BiP mit Antikörperketten aus MAK33

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Gesamtextrakt, Westernblot mit anti-IgG (H+L)-Antikörper

1. W303 + pUEK9 [LK + SK]
2. W303 + pUEK5 + pX803 [LK + Fd + BiP]
3. W303 + p2HGal [—]
4. W303 + pUEK9 + pX803 [LK + SK + BiP]
5. IgG-Standard

Die im entsprechenden Stamm heterolog exprimierten Proteine sind in [] angegeben; LK: leichte Kette, Fd: Fd-Fragment, SK: schwere Kette, BiP: *Heavy chain binding protein*

Die Expression des murinen BiP wurde parallel mit einem anti-BiP-Antikörper bestätigt (ohne Abbildung)

Ebenso wie bei der Koexpression von Hac1 konnte nach Koexpression von BiP mit der leichten und schweren Kette (Spur 4) gegenüber der alleinigen Expression der beiden Ketten (Spur 1) kein Einfluss auf die Gesamtmenge der exprimierten Antikörperketten innerhalb der Zelle (Abb. 3.1.16) nachgewiesen werden.

In den oben beschriebenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Koexpression sowohl des UPR-Transkriptionsfaktors Hac1 als auch des eukaryotischen Chaperons BiP keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an Antikörpern innerhalb der Zelle hatte. Auch ein positiver Effekt auf die Aktivität der sezernierten Antikörperketten konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Es bestand aber die Möglichkeit, dass, die Koexpression der Zellfaktoren zwar keinen Einfluss auf die Gesamtmenge der in der Zelle vorliegenden Antikörperketten, aber eventuell auf das Verhältnis zwischen löslichen und unlöslichen Antikörperketten hatte. Dazu wurde für diejenigen Stämme, welche die leichte und die schwere Kette exprimieren, eine Abtrennung der löslichen Fraktionen (s. 2.3.3.3) unternommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert.

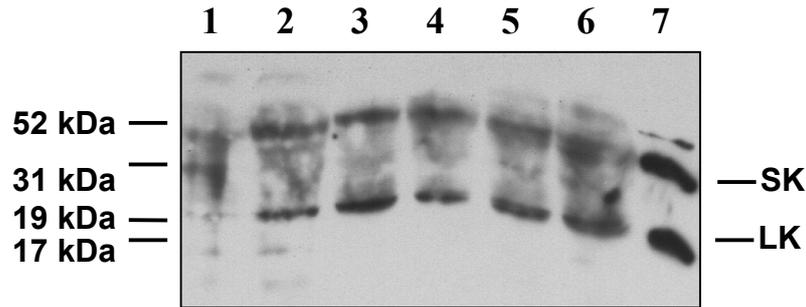


Abb. 3.1.17: Analyse der löslichen Proteinfractionen nach Koexpression von Hac1 bzw. murinem BiP

15% SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot mit anti-IgG(H+L)-Antikörper

1. W303 + pX803 [Maus-BiP]
2. W303 + pUEK9 + pX803 [LK + SK + Maus-BiP]
3. W303 + pUEK9 [LK + SK]
4. W303 + pUEK9 + p416Gal-Hac1 Δ INT [LK + SK + Hac1¹]
5. W303 + pUEK9 + p416Cup [LK + SK]
6. W303 + pUEK9 + p416Cup-Hac1 Δ INT [LK + SK + Hac1¹]
7. IgG-Standard

Bei Analyse der löslichen Fraktionen zeigte sich, dass durch Koexpression von BiP oder Hac1 keine offensichtliche Erhöhung der Menge an löslichen Antikörperketten erzielt werden konnte.

3.1.11 Reinigung von *Strep*-tag-Antikörperketten aus dem Anzuchtmedium

Um eventuell eine verbesserte Reinigung der Antikörperketten aus dem Medium durchführen zu können, wurden die Antikörperketten mittels Klonierung mit einem *Strep*-tag (Schmidt & Skerra, 1994; Skerra & Schmidt, 2000) versehen. Dieser setzt sich aus den Aminosäuren WSHPQFEK zusammen und wurde C-terminal an die Antikörperketten fusioniert. Anschließend wurden die so hergestellten Plasmide [pUEK18 (LK-*strep*/Fd-*strep*) und pUEK19 (LK-*strep*/SK-*strep*)] in W303 transformiert. Die Expression der *Strep*-tag-fusionierten Antikörperketten ist in Abb. 3.1.18 dargestellt.

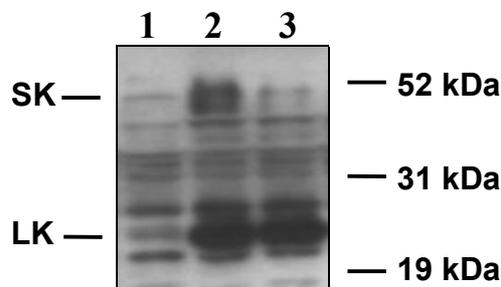


Abb. 3.1.18: Expression der *Strep*-tag-fusionierten Antikörperfragmente

15% SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot mit anti-*Strep*-tag-Antikörper

1. W303 + p2HGal [—]
2. W303 + pUEK19 [LK-*strep* + SK-*strep*]
3. W303 + pUEK18 [LK-*strep* + Fd-*strep*]

Die Erkennung der Antikörperketten erfolgte mit einem anti-*Strep*-tag-Antikörper (IBA, Göttingen). Es wird deutlich, dass neben der leichten und der schweren Antikörperkette zahlreiche andere Hefeproteine erkannt werden. Dies deutet auf eine relativ unspezifische Erkennung des Antikörpers in *S. cerevisiae* hin.

Zur Untersuchung der Antikörperaktivität wurde ein ELISA (s. 2.4.7) der eingeeigneten Kulturüberstände (s. Abb. 3.1.21 für W303 + pUEK19) der Stämme W303 + pUEK18 und W303 + pUEK19 durchgeführt. Aus Abb. 3.1.19 wird ersichtlich, dass auch im Falle der Expression von *Strep*-tag-Antikörpern keine Antikörperaktivität im Medium nachgewiesen werden konnte.

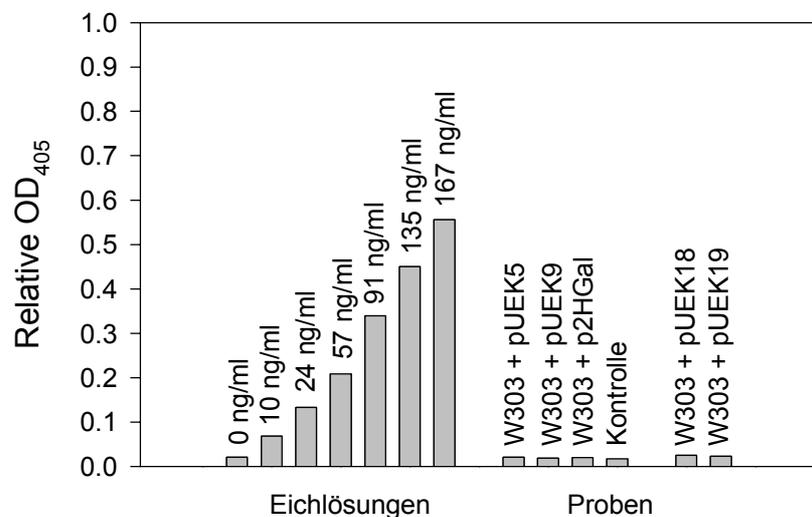


Abb. 3.1.19: ELISA zur Analyse der Antikörperaktivität im Kulturmedium der *Strep*-tag-Antikörper-exprimierenden Stämme

Die untersuchten Hefestämme wurden vier Tage unter induzierenden Bedingungen angezogen (s. 2.3.3.2), anschließend der filtrierte Kulturüberstand auf $1/100$ des Ausgangsvolumens eingeeignet und je 100 μ l im ELISA (2.4.7) eingesetzt. Als Eichgerade wurden Fab-Lösungen der angegebenen Konzentrationen verwendet. Eine antikörperfreie Lösung wurde als Kontrolle eingesetzt. Die Daten der Stämme W303+pUEK5, W303+pUEK9 und W303+p2HGal wurden aus Abb. 3.1.11 entnommen.

Zur Affinitätsreinigung von *Strep*-tag-Fusionsproteinen aus dem Kulturmedium sollte *Strep*-Tactin[®] (IBA, Göttingen), ein modifiziertes Streptavidin, verwendet werden, das gegenüber dem unmodifizierten Streptavidin eine verbesserte *Strep*-tag-Erkennung besitzt. Die Antikörperfusionsproteine banden jedoch nicht in ausreichendem Maße an das Säulenmaterial, so dass eine entsprechende Reinigung nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte (ohne Abbildung). Der schlechte Reinigungseffekt kann wahrscheinlich damit begründet werden, dass in großen Mengen Biotin im Kulturmedium enthalten, bzw. an bestimmte Hefeproteine gebunden war und so mit dem *Strep*-tag-Protein um die Bindung an das Säulenmaterial konkurrierte. Im Gegensatz zur Reinigung von Proteinen aus *E. coli*, wo nur sehr wenig

Biotin vorhanden ist, konnte dieser Effekt hier nicht durch Inkubation der Proben mit Avidin, das überschüssiges Biotin bindet (Skerra & Schmidt, 1999), aufgehoben werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass die so erzeugten Antikörperketten in stärkerem Maße in das Medium abgegeben wurden (ca. 5-10 µg/l im Gegensatz zu weniger als 1 µg) als die entsprechenden nicht-fusionierten Antikörperketten. Zur Analyse der in des Medium sezernierten Antikörperketten (mit *strep*-tag) wurde das Medium entsprechend Abb. 3.1.20 behandelt und statt einer *Strep*-Tactin[®]-Affinitätschromatographie wurden die angegebenen herkömmlichen Chromatographiemethoden angewandt.

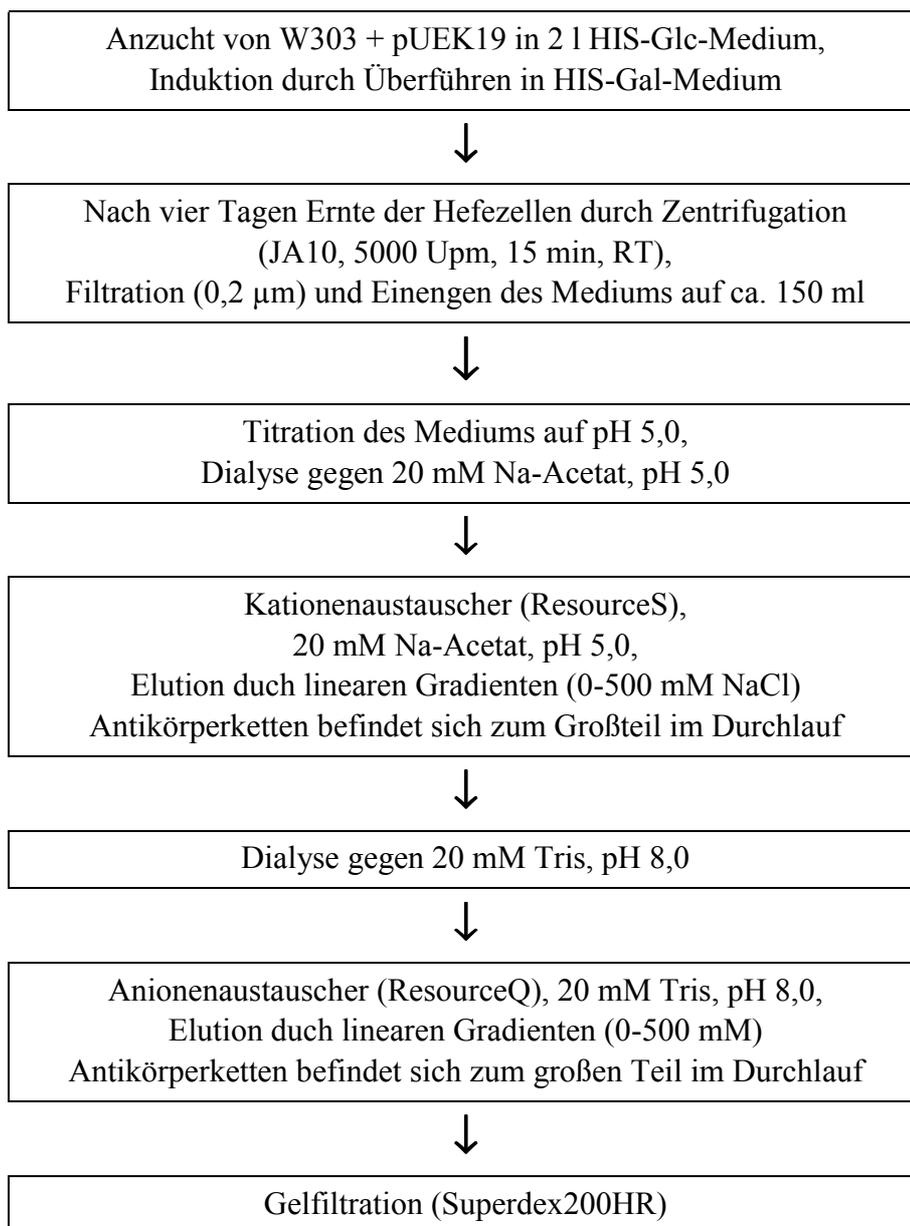


Abb. 3.1.20: Schema der Analyse der in das Medium sezernierten Antikörperketten (mit *strep*-tag)

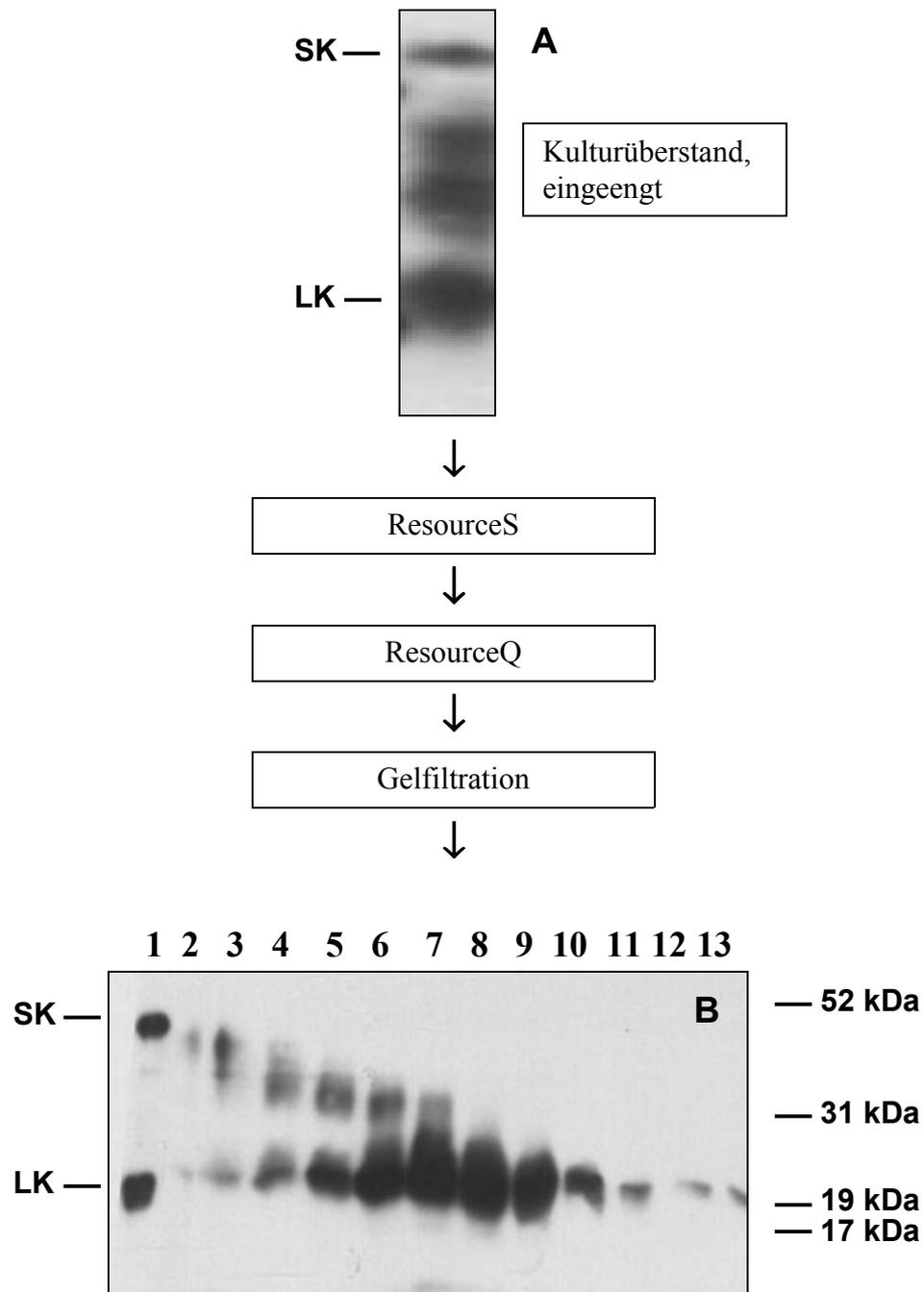


Abb. 3.1.21: Aufreinigung und Analyse der in das Medium sezernierten Antikörperketten (*Strep*-tag-Fusionsprodukte)

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Westernblot mit anti-IgG(H+L)-Antikörper

A: Kulturüberstand, eingeengt

B: Gelfiltration (Superdex 200 HR)

1. IgG-Standard

2.-13. Elutionsfraktionen

Es stellte sich heraus, dass sowohl bei Verwendung des Anionen- als auch des Kationenaustauschers, der Großteil der Antikörperketten nicht an die Säulen gebunden hatte.

Lediglich ein Anteil der leichten Kette interagiert mit dem Säulenmaterial und konnte durch Erhöhung der Salzkonzentration von der Säule eluiert werden. Auf diesem Weg (der Großteil der Antikörperketten befand sich im Durchlauf) konnte ein sehr guter Reinigungseffekt erzielt werden, bei dem die anderen im Medium befindlichen Proteine größtenteils abgetrennt wurden. In dem sich anschließenden Gelfiltrationslauf erfolgte eine Auftrennung der Antikörperketten nach ihrer molekularen Masse. Wie aus Abb. 3.1.21 ersichtlich ist, wurden bei der Gelfiltration Antikörperketten mit variierenden molekularen Massen eluiert. Neben der leichten Kette, die in den meisten Fraktionen nachgewiesen werden konnte, eluierte in einigen Fraktionen auch die schwere Kette, bzw. Antikörperketten, die geringere molekulare Massen als die schwere Kette aufwies und bei denen es sich wahrscheinlich um verschieden große Fragmente der schweren Kette handelt. Die Koelution der leichten Kette mit der wesentlich größeren schweren Kette bzw. mit Fragmenten dieser deutet darauf hin, dass die verschiedenen Ketten wahrscheinlich interagierend vorlagen und deshalb gemeinsam von der Säule eluierten.

Anschließend wurden einige Fraktionen des Gelfiltrationslaufes weiter aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.1.22). So konnte insbesondere die leichte Kette gut nachgewiesen werden. Ferner wurden zahlreiche weitere schwache Banden sichtbar, die wahrscheinlich Abbaufragmenten der schweren Kette zuzuordnen sind.

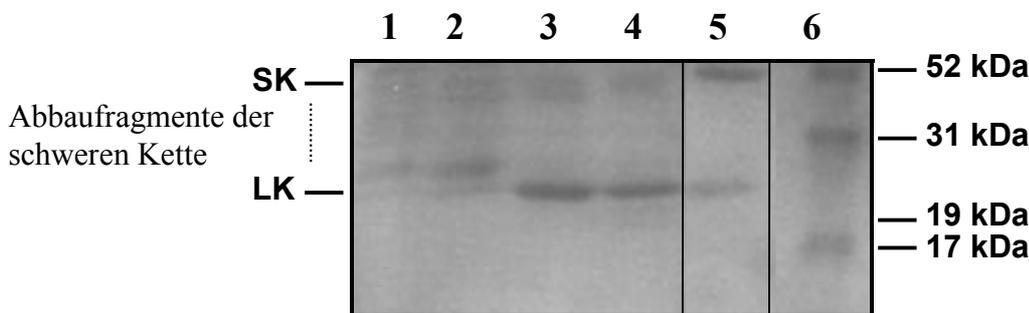


Abb. 3.1.22: Aufreinigung und Analyse der in das Medium sezernierten Antikörperketten (*Strep*-tag-Fusionsprodukte)

15 % SDS-PAGE (reduzierend), Coomassie-Färbung

Die Fraktionen des Gelfiltrationslaufes (Abb. 3.1.21) wurden mittels Centricon® eingengt und analysiert

1. Fraktion 3
2. Fraktion 4
3. Fraktion 8
4. Fraktion 9
5. IgG-Standard
6. Molekulargewichtsmarker

3.2 Diskussion zur Expression von Antikörperketten in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits vielfach erfolgreich für die cytosolische und sekretorische Expression fremder (oft eukaryotischer) Proteine eingesetzt. Dabei kam einerseits die leichte Manipulierbarkeit und eine unkomplizierte Anzucht den Experimentatoren zu gute, andererseits stellt *S. cerevisiae* ein eukaryotisches Expressionssysteme dar und ermöglicht so die Durchführungen bestimmter post-translationaler Modifikationen, die im prokaryotischen *E. coli*-System nicht möglich sind.

Antikörper stellen, bedingt durch ihre Komplexität [Oligomer aus vier Polypeptidketten, Existenz intra- und intermolekularer Disulfidbrücken, Glykosylierungen im Falle der schweren Kette und komplizierter Faltungsweg (inkl. Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen)], ein schwieriges Substrat für die heterologe Expression dar. So konnte insbesondere im Cytoplasma von *E. coli* bisher keine Expression aktiver Antikörper oder Fab-Fragmente erzielt werden. Stattdessen war dazu eine *in vitro*-Rückfaltung aus *inclusion bodies* erforderlich, die z.B. im Falle des Fab-Fragmentes von MAK33 erfolgreich durchgeführt werden konnte (Buchner & Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1994; Lilie *et al.*, 1995). Aus diesem Grund lag es nahe, Antikörper in eukaryotischen Zellen zu exprimieren bzw. aus ihnen zu sezernieren. Dies ist in komplexeren Expressionssystemen (z.B. COS-Zellen, Tabakpflanzen, baculovirusinfizierte Insektenzellen, s. 1.4.2) bereits gelungen, erwies sich jedoch in *S. cerevisiae* stets als schwierig.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vermögen der Hefe *S. cerevisiae* zur Expression und Sekretion des Antikörpers MAK33 bzw. seines Fab-Fragmentes untersucht. Dabei erfolgte die Expression von einem galaktoseinduzierbaren Promotor, der zusammen mit der cDNA der beiden Ketten, jeweils angeführt von der DNA-Sequenz für die Invertasesignalsequenz, auf einem *multi-copy*-Plasmid lokalisiert war. Verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme wurden getestet und Modifikationen des Systems (in Form von Koexpression anderer Zellfaktoren) durchgeführt. Auch die zelluläre Lokalisation der Polypeptidketten wurde untersucht und der Nachweis der Antikörperketten innerhalb der Zelle bzw. im Anzuchtmedium erfolgte mittels immunochemischer Methoden (Westernblot, ELISA).

In dieser Arbeit wurden u.a. die beiden gängigen Laborstämmen W303 und KMY1005 bezüglich ihres Wachstums unter induzierenden Bedingungen und ihrer Fähigkeit zur Expression von Antikörperketten getestet. Die Induktion zur Expression der Antikörperketten erfolgte mit Galaktose und wurde bei einer Zelldichte von ca. 0,75 OD₆₀₀-Einheiten gestartet. Dabei kam es zu keiner äußerlich sichtbaren Veränderung im Zellwachstum. Dies ließ zunächst darauf schließen, dass es hier zu keinem großen Eingriff in die Physiologie des Wirtsstammes gekommen ist. Dies ist durchaus ungewöhnlich, da in der Literatur häufig geschildert wird, dass es bei der Überexpression fremder oder eigener Proteine zu einer

Beeinflussung der physiologischen Gegebenheiten und somit zur Verlangsamung des Zellwachstums kommt (van Dongen & van Wijk, 1988).

Im weiteren wurde der Sekretionsweg genauer bezüglich der Expression von Antikörpern untersucht. Dabei zeigten die Hefestämme W303 und KMY1005 ein deutliches intrazelluläres Vorkommen sowohl der leichten Kette als auch der schweren Kette. Es wurde beobachtet, dass neben einem löslichen Anteil etwa die Hälfte der Antikörperketten unlöslich in den Zellen vorlag.

Die Anhäufung von Antikörpern in Form von Aggregaten konnte im in der Zelle beobachtet werden. Diese setzten sich aus unterschiedlich großen Antikörperketten zusammen. So konnte im Falle der leichten Kette neben einer Proteinspezies mit ca. 22 kDa auch die vermutlich nicht-prozessierte Spezies (ca. 25 kDa) - bei der die N-terminal fusionierte Signalsequenz nicht abgespalten wurde - nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen wurden für die schwere Kette gemacht, die als ca. 50 kDa prozessierte und ca. 52 kDa unprozessierte Form innerhalb der Zelle vorlag. Das Vorkommen der unprozessierten Antikörperketten innerhalb des Cytoplasmas ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass aufgrund einer Überlastung des Translokationsapparates - bedingt durch die Überexpression des Fremdproteins - keine korrekte Translokation (und somit auch keine Abspaltung der Signalsequenz) der naszierenden Kette erfolgen konnte. Aufgrund der im Cytosol herrschenden Bedingungen, die abweichend von denen des ERs sind, waren die Antikörperketten nicht in der Lage, korrekt zu falten, Disulfidbrücken auszubilden und zu oligomerisieren, und lagerten sich dort in Form von Aggregaten ab. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Falle der heterologen Expression der modifizierten peroxisomalen Isocitratlyase aus *Candida tropicalis* in *S. cerevisiae* gemacht. Cytoplasmatische Aggregate wurden (durch Immunelektronenmikroskopie) nachgewiesen und als „proteinspeichernden“ Strukturen (PABs, *protein aggregate bodies*) bezeichnet (Kamasawa *et al.*, 1999).

Neben Antikörperaggregaten im Cytoplasma wurden auch Ansammlungen aus Antikörperketten im ER, bei denen zum Großteil bereits die Signalsequenz abgespalten war, detektiert. Hierfür scheint das Unvermögen der Zelle zum Export aus dem ER über den Golgiapparat und die Plasmamembran verantwortlich zu sein. Die Überexpression der Antikörperketten von einem 2μ -*multi-copy* Plasmid sorgte wohl für einen großen Bedarf an Faltungshelferproteinen, so dass es letztendlich zu einer Blockierung des Faltungs- und Sekretionsweges kam. Ähnliches ist für *S. cerevisiae* bereits beschrieben. Parek *et al.*, (1995) hatten die Überexpression von BPTI (*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) zur Sekretion aus *S. cerevisiae* von einem *multi-copy*-Plasmid (2 μ -Plasmid) mit der von einem *single-copy*-Konstrukt verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass das *multi-copy*-System, wie erwartet, zwar eine höherer Transkriptionsrate erzielte als das *single-copy*-System, dass aber die Mehrzahl der Proteine inkorrekt gefaltet war und somit im ER zurückgehalten wurde.

Auch Ablagerungen innerhalb des ER-Lumens wurden z.B. bei der Expression und Sekretion des Hepatitis B Hautoberflächenproteins aus *S. cerevisiae* beschrieben (Biemans *et al.*, 1992). Diese konnten durch Immunelektronenmikroskopie als Partikel innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums beobachtet werden.

Bezüglich des Problems der Akkumulierung unlöslicher Proteine innerhalb der Zelle postulierten Wittrup *et al.* (1994) ein optimales Maß für die Expression fremder Proteine in *S. cerevisiae*, das einerseits zu einer ausreichenden Menge an gewünschtem Protein, andererseits aber nicht zu einer Überlastung der zelleigenen Systeme führt.

Zusätzlich zu den Problemen der Aggregation, die die Sekretion der Antikörperketten unmöglich macht, kommt hier auch erschwerend hinzu, dass es sich bei Antikörpern um oligomere Proteine handelt, die erst durch Zusammenlagerung von zwei leichten und zwei schweren Ketten (bzw. im Falle der Fab-Fragmente von zwei leichten Ketten und zwei Fd-Fragmenten) ihre volle Funktion und Stabilität erhalten. Der Transport des gesamten Antikörpers im Säugersystem ist dabei abhängig von der korrekten Assemblierung der Komponenten.

In Säugetieren wird die Oligomerisierung unter anderem durch Assoziation der unvollständig gefalteten schweren Kette mit dem Chaperon BiP kontrolliert. Es konnte gezeigt werden (Lee *et al.*, 1999), dass BiP dabei an die ungefaltete schwere Kette (C_{H1}-Domäne) bindet und dafür sorgt, dass diese im ER zurückgehalten wird. Erst bei Anwesenheit der leichten Kette erfolgt die Loslösung von BiP, so dass die schwere Kette falten und mit der leichten Kette assoziieren kann. Ein derartiger Kontrollmechanismus scheint jedoch nicht in allen Organismen zu existieren. So wurde gezeigt (Kirkpatrick *et al.*, 1995), dass bei der Koexpression von schwerer und leichter Kette eines Antikörpers in *Drosophila* neben korrekt gefalteten Antikörper, in Abwesenheit der leichten Kette auch Dimere der schweren Kette (sonst noch nie beobachtet) sezerniert werden. Dieser Mechanismus kann in mechanistischen Unterschieden begründet sein, die die Vertebratenzelle (im Gegensatz zu *Drosophila*- und *S. cerevisiae*-Zellen) evolutiv dazu befähigen, unreife Antikörperketten, sowie unvollständig gefaltete Ig-Moleküle in der Zelle zurückzuhalten (Knittler *et al.*, 1995).

Neben der Ansammlung von Antikörperketten-Aggregaten im Cytoplasma sowie von sekretionsinkompetenten Ketten im ER wurde dennoch ein gewisser Anteil der Ketten, insbesondere der leichten Kette, in das Medium sezerniert. Diese konnten sich jedoch nicht zu korrekt gefalteten Antikörpern zusammenlagern, so dass mittels ELISA keine Antikörperaktivität nachgewiesen wurde. Trotzdem wurden bei Analyse des Mediums Interaktionen zwischen der leichten und der schweren Kette gezeigt. Da diese Komplexe jedoch, wie bereits beschrieben, keine Aktivität aufwiesen, scheint es sich dabei um fehlerhaft assemblierte Antikörperketten zu handeln. Dieses lässt vermuten, dass in der Hefe *S. cerevisiae* im Bezug auf die Sekretion von Antikörperketten keine so exakte Qualitätskontrolle wie in B-Zellen ablaufen kann. Ähnlich wie im Falle der Expression von Antikörper-

perketten in *Drosophila* wurden also vermutlich schwere Ketten trotz fehlender oder falscher Interaktion mit der leichten Kette in das Medium sezerniert. Insbesondere im Falle der schweren Kette wurden dabei auch zahlreiche Fragmente der leichten Kette im Medium nachgewiesen. Es ist ungewiss, ob diese bereits im ER fragmentiert oder erst nach Sekretion in das Medium proteolytisch abgebaut wurden.

Insgesamt war auch zu beobachten, dass besonders die schwere Kette bereits im Zellinneren (und auch in den Aggregaten) fragmentiert vorlag bzw. nur in geringerem Maße nachgewiesen werden konnte. Dies zeugt von einer geringeren Lebensdauer der schweren Kette im Vergleich zur leichten Kette und steht somit in Einklang mit der oft beobachteten schlechten Löslichkeit und Stabilität der schweren Kette.

Obwohl durch das Anfügen eines *Strep*-tags keine Erleichterung der Reinigung erreicht wurde, so konnte doch hier ein anderer besonderer Effekt erzielt werden: Durch Fusion eines *Strep*-tags an die Antikörperketten wurde scheinbar deren Stabilität und damit auch deren Löslichkeit und die Sekretionsrate (um das Fünf- bis Zehnfache) erhöht. Dies steht in Korrespondenz damit, dass auch für die Reinigung anderer Proteine Löslichkeits-tags angefügt werden. So wurden z.B. sog. *solubility-enhancement tags* (SET), die die Löslichkeit und Stabilität von Fusionsproteinen drastisch verbessern, entwickelt und an Proteine fusioniert, deren Struktur mittels NMR bestimmt werden sollte (Zhou *et al.*, 2001).

Die oben diskutierten Daten lassen vermuten, dass das sekretorische System der Wildtyp-Hefen nicht ausreichend ist, um Antikörper in größeren Mengen zu erzeugen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Veränderungen des Systems (zunächst durch Modifikation des Kar2-Levels innerhalb der Zelle) vorgenommen, um zu testen, ob dadurch eine Sekretion aktiver Antikörpermoleküle erreicht werden kann.

Die von BiP in Säugerzellen erfüllten Funktionen werden in *S. cerevisiae* weitgehend vom homologen Protein Kar2 ausgeführt. Zu weiteren Untersuchungen wurde der Hefestamm K603-Y113 herangezogen. Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass das chromosomale Kar2-Gen durch Insertion einer LEU-Kassette deletiert wurde. Die Deletion wurde durch Transformation des Stammes mit einem Plasmid, welches das Gen für Kar2 unter der Kontrolle eines galaktoseinduzierbaren Promotors trägt, ausgeglichen.

Es hatte sich jedoch gezeigt, dass diese Veränderung keinen positiven Einfluss auf die Bildung und Menge von aktiven Antikörpern hatte. Obwohl es sich bei Kar2 um das Hefehomologe von Säuger-BiP handelt, ist nicht geklärt, inwieweit dieses in der Lage ist, die essentielle Rolle des BiP für die Faltung der Antikörper zu übernehmen. Aus diesem Grund wurde in Wildtyp-Hefen zusätzlich die Überexpression von murinem BiP induziert und untersucht, ob die Anwesenheit von Säuger-BiP zu einer verbesserten Faltung der Antikörperketten und somit zur Anhebung der Löslichkeit in der Zelle und letztendlich auch zur Oligomerisierung führt. Doch auch durch diese Modifikation konnten die eben beschriebenen Ziele nicht erreicht werden. Ähnliches wurde auch von Robinson & Wittrup

(1995) beobachtet, die bei Überproduktion von GCSF (*human granulocyte colony stimulating factor*) in *S. cerevisiae* zunächst ein Absinken der Menge an extrahierbarem BiP und die Bildung von Proteinaggregaten beobachtet hatten. Auch hier konnte eine galaktoseinduzierte Expression von BiP keine Verbesserung der Ausbeuten bewirken.

Neben der produktiven Rolle von Kar2/BiP (Unterstützung der Faltung und Oligomerisierung der Antikörper), die durch eine Erhöhung des intrazellulären Levels noch gesteigert werden sollte, muß auch die Rolle von BiP für die *unfolded protein response* bedacht werden. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass freies Kar2/BiP als Zeichen für die Zelle gilt, dass nur wenige Proteine ungefaltet im ER vorliegen und dass kein Bedarf an weiteren Faltungshelfern besteht (d.h. UPR ist ausgeschaltet). Erst ein Mangel an freiem Kar2/BiP wäre hingegen ein Anstoß für das Anschalten der UPR und die transkriptionelle Aktivierung der Expression zahlreicher Faltungshelferproteine des ER [z.B. Kar2/BiP, Proteindisulfidisomerasen (Kaufman, 1999)]. Auf diese Art kann die Zelle dem Problem der Überlastung des Faltungsapparates entgegenreten. In dem in dieser Arbeit untersuchten Fall der Überexpression von Antikörpern war das vorhandene Chaperonsystem scheinbar nicht ausreichend, was sich durch die bereits oben beschriebenen Effekte widerspiegelt. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Koexpression des UPR-Transkriptionsfaktors Hac1 eine Erhöhung des Levels an Faltungskatalysatoren zu bewirken, so dass die Zelle nun in der Lage wäre, mit der angestiegenen Menge an naszierenden Polypeptidketten fertig zu werden. Dieses sollte sich einerseits in einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen unlöslichen und löslichen Antikörperketten innerhalb der Zelle widerspiegeln, andererseits wurde aber auch eine Verbesserung der Sekretion bzw. die Produktion korrekt gefalteter Antikörper erwartet. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die Koexpression der aktiven Form von Hac1 (sowohl induziert durch Galaktose als auch durch Kupersulfat) die Aggregationsprozesse innerhalb der Zelle nicht verhindern konnten.

Zusätzlich sollte auch beachtet werden, dass die Chaperonausstattung von Hefezellen (speziell *S. cerevisiae*) nicht identisch mit der von Vertebratenzellen ist. So existiert z.B. das Chaperon Grp94/gp96, ein Mitglied der Familie der Hsp90-Familie nicht in *S. cerevisiae*. In Säugern wurde es in einem Komplex mit BiP und Immunglobulinen nachgewiesen (Melnick *et al.*, 1992), was für eine essentielle Rolle von Grp94 für die Faltung von Antikörpern in Säugern spricht. Dabei wurde gezeigt, dass Grp94 nicht, wie BiP, nur während der ersten Minuten der Faltung mit den Antikörperketten interagiert, sondern vielmehr für längere Zeit an ein späteres, vollständig disulfidverbrücktes Intermediat, das aber noch nicht assembliert vorliegt, bindet (Melnick *et al.*, 1994). Das Fehlen von Grp94 in Hefezellen könnte also ein Grund dafür sein, dass die Faltung und Assoziation der Antikörperketten nicht korrekt verläuft.

Darüber hinaus existiert eine Vielzahl weiterer ER-Proteine (z.B. PDI, PPIs, Proteine, die an der Glykosylierung beteiligt sind etc.), bei denen eine Beteiligung an der Antikörperreifung vermutet wird.

So könnte auch das Fehlen eines UGGT (UDP-Glukose:Glycoprotein Glucosyltransferase)-Homologen in *S.cerevisiae* einen Einfluss auf die Qualitätskontrolle (s. 1.2.5) in *S. cerevisiae* haben, die eventuell bei derart komplexen Glykoproteinen wie Antikörpern notwendig wäre. Dieses System konnte jedoch bisher in *S. cerevisiae* nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Glykosylierungsmuster der *S. cerevisiae*-Zellen gegenüber antikörperproduzierenden Zellen ist es sehr wahrscheinlich, dass die hier erzeugten Antikörperketten eine fehlende oder falsche Glykosylierung aufweisen. Insbesondere die Eigenart der Hefe *S. cerevisiae*, mannosereiche Hyperglykosylierungen durchzuführen (s. 1.4.1), könnte einen Einfluss auf die Faltung, Assemblierung, Aktivität und Funktion von Antikörpermolekülen haben. Bei den hier untersuchten Hefestämmen konnte keine spezifische Glykosylierung der schweren Kette nachgewiesen werden. Dies zeigte sich im Unvermögen der intrazellulären und sezernierten schweren Kette, an Lectinsäulchen (Amersham Pharmacia, Lectin-Test-Kit) zu binden. Dies wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass bei der Auftrennung der Gesamtproteine durch SDS-PAGE neben den prozessierten und unprozessierten Formen der schweren Kette keine weiteren Banden auf glykosylierte Proteine hinwiesen.

Weitreichende glykosylierungsabhängige Effekte auf die Funktionsausübung *in vivo* wurden bei Antikörpern bereits beobachtet. So wird die Bindung an den zellulären Fc-Rezeptor (Canfield & Morrison, 1991) und die Erkennung durch das Komplementsystem (Morgan *et al.*, 1995) beeinflusst und durch das Fehlen der Zucker z.T. vollständig verhindert (Nezlin, 1998). Auch der Einfluss der Glykosylierung auf die Stabilität der Antikörper wurde diskutiert. So scheint eine veränderte Glykosylierung Einfluss auf die Struktur der C_H2-Domäne und der *low hinge region* zu haben. Mimura *et al.* (2000) zeigten mittels NMR-Untersuchungen, dass die deglykosylierte Form eines Antikörpers gegenüber der glykosylierten Form neben dem teilweisen Funktionsverlust eine deutliche geringere Stabilität aufweist. Generell wird angenommen, dass eine inkorrekte Glykosylierung zwar keinen Einfluss auf die Sekretion und die Erkennung des Antigens, hingegen aber auf die Funktionalität (Bindung an den Fc-Rezeptor, Erkennung des Komplementsystems) und eventuell auch auf die Stabilität hat.

Neben der Aggregation von Proteinen stellen Degradationswege eine Möglichkeit für die Zelle dar, falsch gefaltete Proteine zu entfernen. In dieser Arbeit wurden zahlreiche Abbaufragmente sowohl innerhalb der Zelle als auch im Kulturmedium nachgewiesen. So weist einerseits das Vorkommen von fragmentierten Antikörperketten innerhalb der Vakuolen (dem Äquivalent zum Lysosom höherer Organismen) auf einen Abbau mittels vakuolärer Proteasen hin. Dabei wird der Großteil der abzubauenen Proteine über frühe Kompartimente des sekretorischen Weges (in wenigen Fällen auch aus dem Cytosol) in die Vakuolen transportiert (Hong *et al.*, 1996; Van Den Hazel *et al.*, 1996). Auch die sog. ERAD [(ER)-associated degradation] sollte hier von Bedeutung sein. Bei diesem Prozess

werden missgefaltete Proteine über die ER-Membran in das Cytosol zurücktransportiert, wo ubiquitin-konjugierende Enzyme diese für die Degradation durch das Proteasom vorbereiten (Ward *et al.*, 1995; Biederer *et al.*, 1997). Da jedoch eine funktionelle ERAD von einer ausreichenden Menge an ERAD-Proteinen (unter anderem BiP) abhängt, kann für das hier untersuchte und scheinbar sehr stark überlastete System nicht angenommen werden, dass diese effektiv abläuft. Daneben könnte auch der direkte Abbau der im Cytosol verbliebenen Antikörperketten, bzw. der kürzlich entdeckte kotranslationale Abbau (Turner & Varshasky, 2000) durch das Proteasom in Betracht gezogen werden.

Wie bereits eingangs erwähnt, stellt die Expression zur Sekretion von Antikörpern aus *S. cerevisiae* eine große Herausforderung dar. Bereits andere Arbeitsgruppen hatten Untersuchungen zur Expression ähnlicher Antikörper bzw. Antikörperfragmente angestellt und stießen ebenfalls auf Probleme bei der Sekretion. Wood *et al.* (1985), die die leichte und die schwere Kette eines Maus-Hybridom-Antikörpers, von einem PGK (*yeast 3-phosphoglycerate kinase*)-Promotor aus gemeinsam exprimierten, konnten lediglich Antikörperaktivität innerhalb der Zelle, nicht aber im Kulturüberstand, nachweisen, sie erhielten jedoch ebenfalls einen Großteil (ca. 75 %) der Antikörperketten in unlöslichen Fraktionen innerhalb der Zelle (z.B. in Vakuolen).

Horwitz *et al.* (1988) konnten hingegen die Sekretion von sehr geringen Mengen (wenige ng/l) eines chimären Maus-Mensch-Antikörper und seines Fab-Fragmentes erreichen. Dabei erfolgten Expression und Sekretion vermittelt durch den PGK-Promotor mit Hilfe der Invertase-Signalsequenz. Aufgrund mangelnder Glykosylierung zeigten diese Antikörper keine komplementabhängige zytotoxische Aktivität. Im Vergleich zu dem in dieser Arbeit untersuchten System konnten Horwitz *et al.*, jedoch demonstrieren, dass die Antikörper in der Lage waren ihr Antigen zu binden. Der Nachweis erfolgte dabei mittels der Bindung des Antikörpers an Zielzellen und durch Kompetitions-Inhibition der Bindung an antigen-positive Zellen.

Demgegenüber konnten Shusta *et al.* (1998) sehr erfolgreicher die Sekretion aktiver *single-chain* Antikörper (zu > 99 % aktiv) aus *S. cerevisiae* durchführen und durch ein gezieltes *expression level tuning* von BiP und PDI einen Anstieg der Ausbeute und der Sekretionsrate auf mehr als das Doppelte (bis zu 20 mg/ml) erreichen. Die Expression der scFvs erfolgte von einem CEN-Plasmid lokalisierten GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase)-Promotor. Dem Protein wurde N-terminal die alpha-Faktor-Signalsequenz sowie zur Erleichterung der Detektion und Reinigung C-terminal ein *c-myc*-Epitoptag angefügt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei *single-chain* Antikörpern um wesentlich einfachere Proteine handelt, die aus nur einer Proteinkette bestehen, keine Disulfidbrücken oder Zuckerreste enthalten, nur eine Domäne aufweisen und somit von ihrem Faltungsverhalten her nicht mit gesamten Antikörpermolekülen oder Fab-Fragmenten verglichen werden können.

Zusammenfassend ist zu vermerken, dass sowohl von Wood *et al.*, als auch von Horwitz *et al.* zwar eine geringe intrazelluläre bzw. extrazelluläre Antikörperaktivität gezeigt werden konnten, dennoch wurde aber deutlich, dass die von ihnen verwendeten Systeme ebenfalls sehr zur Aggregation und zu Problemen bei der Glykosylierung und der Sekretion neigten. Im Gegensatz zu Wood *et al.* konnte jedoch in dieser Arbeit eine stärkere Sekretion von Antikörperketten gezeigt werden. Diese könnte vielleicht im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit erreichten starken Überexpression der Antikörperketten stehe, die aber letztendlich auch für die Blockierung der zellulären Wege verantwortlich sein könnte.

Der Ablauf der Produktion, Faltung und Sekretion von Antikörpern ist schematisch in Abb. 3.2.1 dargestellt. Neben den optimalen Abläufen (durchgezogene Pfeile) sind diejenigen Nebenreaktionen (gepunktete Pfeile) beschrieben, die als Auslöser für Aggregationsprozesse und das fehlende Vermögen der Hefezellen zur Bildung korrekt gefalteter Antikörper angesehen werden.

Bereits beginnend mit der Translokation kam es zu Störungen des hier untersuchten Systems, indem ca. die Hälfte der Antikörperketten nicht in das ER transloziert wird. Dies könnte an der Überlastung des Translokationsapparates (bedingt durch die starke Überexpression der Antikörperketten) liegen. Daneben ist aber auch eine ineffiziente Bindung der Invertase-Signalsequenz denkbar. Im Cytosol liegen zum einen nicht die für posttranslationale Modifikationen erforderlichen Proteine vor, zum anderen sind die Bedingungen im Cytoplasma nicht optimal (Redoxzustand, Chaperonausstattung), um eine korrekte Faltung und Disulfidverbrückung der Ketten durchzuführen. In Folge der Missfaltung kommt es zur Ablagerung dieser in Form von cytoplasmatischen Aggregaten.

Die Hefezellen waren jedoch in der Lage den anderen Teil der Antikörperketten in das Lumen des ER zu transportieren. In diesem erfolgte in den meisten Fällen eine erfolgreiche Abspaltung der hefeeigenen Invertasesignalsequenz durch eine Signalpeptidase. In den nun folgenden Schritten ist eine besonders feine Abstimmung der beteiligten Proteine zur Modifikation, Faltung und Disulfidverbrückung erforderlich, die scheinbar in dem hier untersuchten System nicht erfolgreich ablief, so dass keine korrekt assemblierten Antikörpermoleküle nachgewiesen werden konnten.

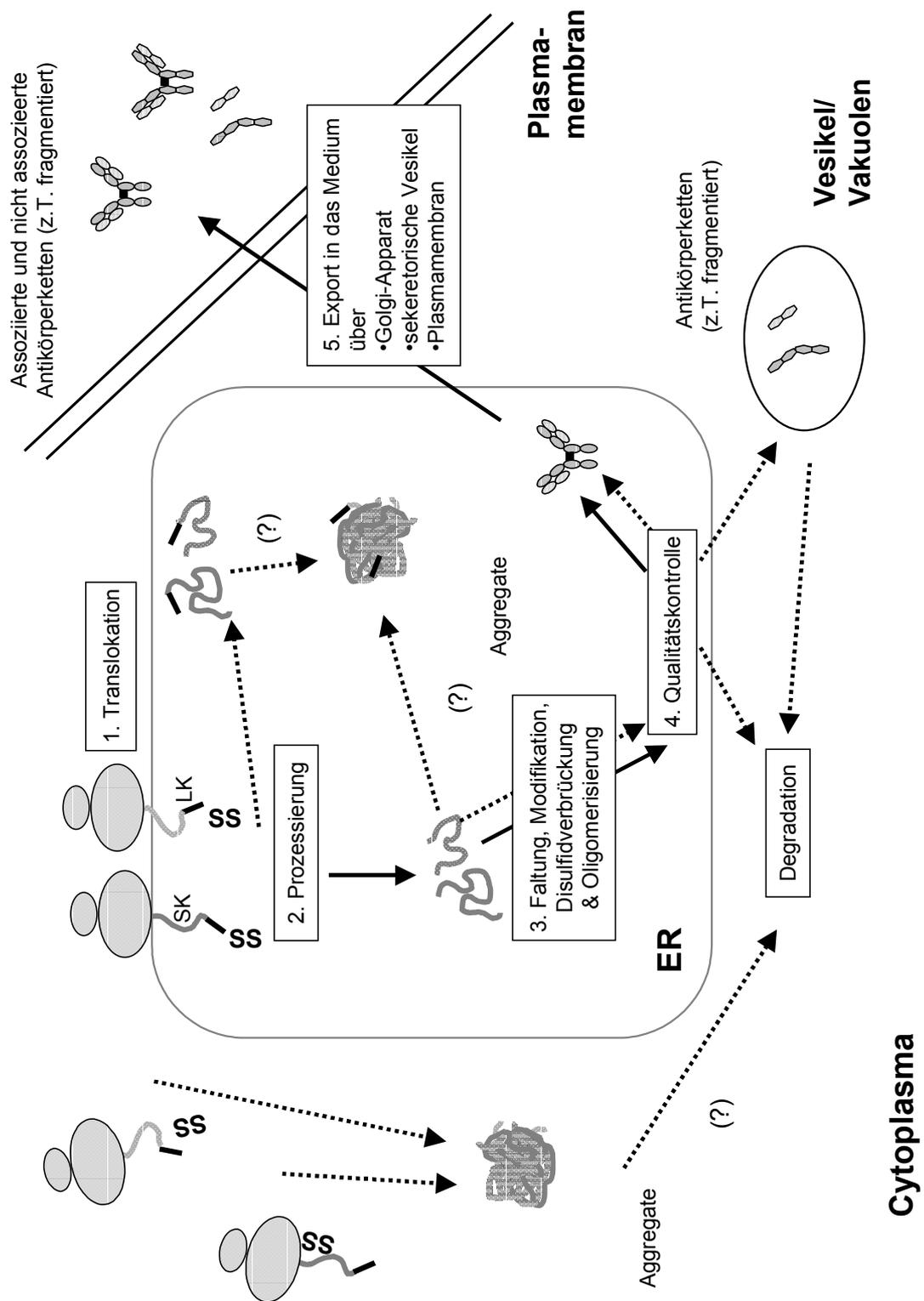


Abb. 3.2.1 Modell zur Produktion und Sekretion von Antikörpern in Hefezellen

Die zur Herstellung korrekt gefalteter und aktiver Antikörper erforderlichen Schritte sind mit durchgezogenen Pfeilen beschrieben. Fehlerhafte Nebenreaktionen sind mit gepunkteten Pfeilen dargestellt.

LK: leichte Kette, SK: schwere Kette

Ausblick

Im Gegensatz zur heterologen Expression anderer Proteine handelt es sich bei der in dieser Arbeit untersuchten Antikörperexpression um ein besonders komplexes System, da es sich bei Antikörpern um oligomere und disulfidverbrückte Proteine handelt, für deren Faltung in B-Lymphozyten ein aufwendiges System von Faltungshelferproteinen notwendig ist. Konsequenterweise war die Expression dieser Protein auch mit einer Reihe von Problemen verbunden, die dazu führten, dass keine aktiven Spezies im Wachstumsmedium nachgewiesen werden konnten. Die Analyse des Expressionsweges hat dabei ergeben, dass es zwar zu einer hohen Expression der leichten Kette kam, die schwere Kette jedoch, eventuell auch aufgrund von Degradation, nur relativ schwach exprimiert wurde. Ein Ansatz zur Lösung der Probleme wäre somit, den optimalen Expressionslevel (wie er von Wittrup *et al.* (1994) für alle Proteine postuliert wurde) für beide Antikörperketten zu ermitteln, so dass eine Überlastung der Translations- und Faltungsmaschinerien minimiert bzw. verhindert werden kann und gleichzeitig ein optimales Assembly der Antikörper im ER erreicht werden kann. Auch eine optimierte Koexpression von Faltungshelfern (Hac1, BiP, Grp94) könnte letztendlich einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit und somit auch auf die korrekte Faltung der Antikörperketten haben. Daneben wäre weiter zu untersuchen, inwiefern fehlerhafte Modifikationen (insbesondere der Zuckerreste, die in *S. cerevisiae* nicht die native Zusammensetzung erhalten) einen Einfluss auf die Faltung der Proteine und auf die korrekte Ausübung der Qualitätskontrolle der Hefe (die nicht für so komplexe Proteine wie Antikörper ausgerichtet ist) haben. Schließlich bleibt zu bedenken, dass die Hefe zwar nicht in der Lage war, korrekt assemblierte und aktive Antikörper zu produzieren, aber trotzdem zur Sekretion der beiden einzelnen Ketten (bzw. von Fragmenten) und unkorrekt assoziierter Komplexe aus leichter und schwerer Kette fähig war. Dies lässt auf eine mangelhafte Qualitätskontrolle schließen, bzw. darauf, dass die Hefe, ebenso wie *Drosophila* (Kirkpatrick *et al.*, 1995) nicht die Möglichkeit besitzt, eine alleinige Sekretion der schweren Kette zu verhindern.

Die Anzahl der Proteine, die heterolog in verschiedenen Organismen hergestellt wurden ist in den letzten Jahren deutlich angestiegen und wird auch weiterhin anwachsen. Dabei liegt eine große Bedeutung in der Expression von Proteinen, die für die Therapie oder Diagnose von Krankheiten verwendet werden. Neben bakteriellen und höheren eukaryotischen Systemen stellen die Hefen eine bedeutende Gruppe von Wirtsorganismen dar. Trotz einiger Nachteile (z.B. bezüglich Glykosylierung und Sekretionsraten) bei der Verwendung von *S. cerevisiae* gegenüber anderen Hefen wie *P. pastoris* und *H. polymorpha* wird diese aufgrund ihrer einfachen Handhabung und weitreichenden Erforschung weiterhin einen bedeutenden Platz einnehmen.

Bisher ist aber noch nicht vollständig verstanden, welche molekularen Mechanismen und welche zusätzlichen Helferproteine erforderlich sind, um heterologe sekretorische Proteine korrekt und effizient zu synthetisieren. Obwohl alle Informationen, die für die Faltung von

Polypeptiden in ihre korrekte dreidimensionale Form notwendig sind, in der Primärstruktur zu finden sind, ist unser Verständnis von der Rolle sekundärer Proteinmodifikationen für die Regulation der Aktivität und das Verhältnis zwischen Proteinstruktur und Proteinfunktion, noch rudimentär.

Letztendlich wird eine weitere Erforschung der Abläufe innerhalb der Hefezelle notwendig sein, um ein Verständnis für ko- und posttranslationale Vorgänge sowie die anschließende Proteinfaltung zu erlangen und somit letztendlich höhere Ausbeuten und einen höheren Anteil an korrekt gefalteten und aktiven Proteinen zu erhalten.

3.3 Struktur, Stabilität und Rückfaltung der Prolyl-4-Hydroxylase

3.3.1 Struktur und Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase

Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur wenige Informationen zur Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase unter *in vitro*-Bedingungen vor. Daher sollte in dieser Arbeit die Struktur und die Stabilität dieses komplexen Tetramers mittels spektroskopische Methoden untersucht werden.

3.3.1.1 Struktur der Prolyl-4-Hydroxylase

Aufgrund des Vorkommens von aromatischen Aminosäuren (insbesondere Tryptophanen) in beiden Untereinheiten, lässt sich das Protein mittels spektroskopischer Methoden (z. B. Circular dichroismus und Fluoreszenzspektroskopie) untersuchen. Einige physikochemische Parameter sind in Tabelle 3.3.1 aufgelistet. Dabei wurde zwischen den in der Literatur dargestellten Werten der glykosylierten Proteine und den durch ProtParam ermittelten Werten, die sich auf die unglykosylierten Formen beziehen, unterschieden.

Tabelle 3.3.1: Vergleich der beiden Untereinheiten der humanen Prolyl-4-Hydroxylase bezüglich einiger physikochemischer Parameter

Die mit ° markierten Parameter wurden aus Kivirikko & Myllylä (1982) übernommen. Die mit * markierten Parameter wurden mittels des ProtParam Tools (<http://www.expasy.ch>) aus der Aminosäuresequenz errechnet.

Parameter	α (I)-Untereinheit	β -Untereinheit (PDI)
Zuckerreste [°]	16× Mannose, 1× Galaktose 2× N-Acetylglucosamin	2× Mannose, 3× Galaktose
Ungefähre molekulare Masse (kDa)/ mit Zuckerresten [°]	64	60
Isoelektrischer Punkt [°]	ca. 5,5	ca. 4,7
Theoretische molekulare Masse (kDa)/ohne Zuckerreste *	59,1	55,3
Aminosäureanzahl ^{°*}	517	491
Tryptophane *	10 (1,9 %)	5 (1,0 %)
Tyrosine *	21 (4,1 %)	12 (2,4 %)
Phenylalanine *	20 (3,9 %)	33 (6,7 %)
Cysteine *	5 (1,0 %)	6 (1,2 %)
Theoretischer isoelektrischer Punkt/ ohne Zuckerreste *	5,70	4,69

Zunächst wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen von nativer und harnstoffdenaturierter Prolyl-4-Hydroxylase unternommen (Abb. 3.3.1)

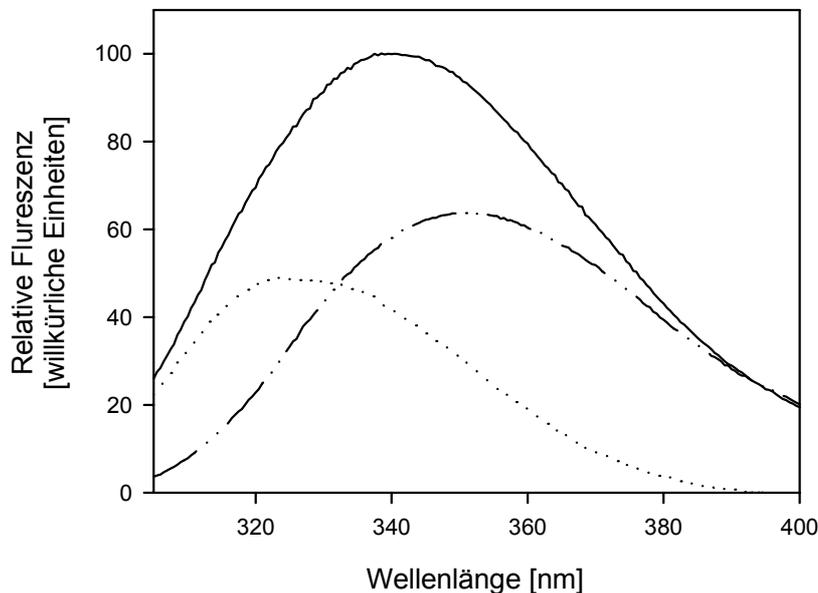


Abb. 3.3.1: Fluoreszenzspektren von nativer und harnstoffdenaturierter Prolyl-4-Hydroxylase

Puffer: 10 mM Tris, 100 mM Glycin 100 mM NaCl, 0 M (nativ) bzw. 8 M (denaturiert) Harnstoff, pH 7,8; Proteinkonzentration: 10 µg/ml; Temperatur: 20 °C; Anregungswellenlänge: 280 nm; Schichtdicke der Küvette: 1 cm; alle Spektren sind pufferkorrigiert

(—): native Prolyl-4-Hydroxylase, (---): harnstoff-denaturierte Prolyl-4-Hydroxylase, (····): Differenzspektrum

Das Fluoreszenzspektrum (Abb. 3.3.1) der nativen Prolyl-4-Hydroxylase wies bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm ein Emissionsmaximum bei 339 nm auf, was auf einen großen Einfluss der Tryptophane (zehn in der α -Untereinheit, fünf in der β -Untereinheit) schließen lässt. Dabei liegt wahrscheinlich ein Teil der Tryptophane lösungsmittlexponiert vor. Im denaturierten Zustand verschiebt sich das Intensitätsmaximum zu höheren Wellenlängen hin und liegt dann bei ca. 351 nm, was einer völligen Lösungsmittlexponierung der Tryptophane entspricht (Schmid, 1997). Zusätzlich verringert sich die Signalintensität bei Denaturierung auf ca. $\frac{2}{3}$ der Intensität des nativen Zustandes.

Um weitere Informationen über die Struktur der Prolyl-4-Hydroxylase zu erhalten, wurde ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen (s. Abb. 3.3.2). Das Spektrum des nativen Proteins weist neben dem absoluten Maximum bei ca. 195 nm ein absolutes Minimum bei 208 nm und ein lokales Minimum bei ca. 220 nm auf, was charakteristisch für α -helikale Proteine mit einem β -Faltblattanteil ist. Auch das Spektrum des thermisch denaturierten Proteins weist noch eine gewisse Reststruktur auf.

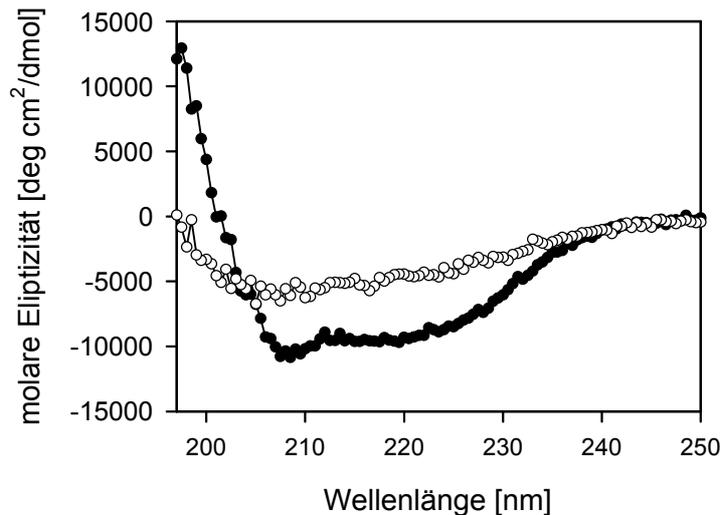


Abb. 3.3.2: Fern-UV-CD-Spektren von nativer und thermisch-denaturierter Prolyl-4-Hydroxylase

Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,8; Proteinkonzentration: 220 $\mu\text{g/ml}$; Schichtdicke der Küvette: 0,1 cm; Temperatur: 20 °C bzw. 80 °C.

(●): native Prolyl-4-Hydroxylase; (○): thermisch-denaturierte Prolyl-4-Hydroxylase

Der Anteil an α -helikaler Sekundärstruktur wurde mit dem Programm CDNN mit 28 % bestimmt. Dieser Wert und die mit anderen Algorithmen bestimmten α -helikalen Anteile der Prolyl-4-Hydroxylase sind in Tabelle 3.3.1 dargestellt.

Zusätzlich wurde ein Fern-UV-Spektrum der isolierten β -Untereinheit (PDI) aufgenommen, das neben Informationen über die PDI auch indirekt Informationen über die Struktur der alleine nicht zugänglichen α -Untereinheit liefern sollte (Abb. 3.3.3).

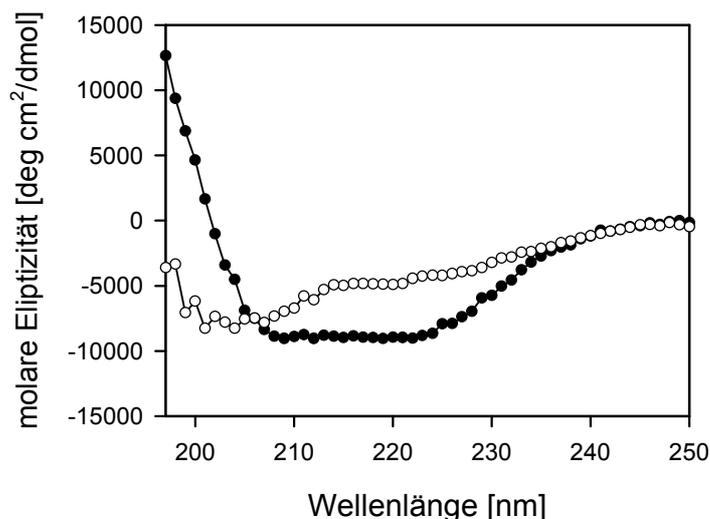


Abb. 3.3.3: Fern-UV-CD-Spektren von nativer und thermisch-denaturierter PDI

Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,8; Proteinkonzentration: 220 $\mu\text{g/ml}$; Schichtdicke der Küvette: 0,1 cm; Temperatur: 20 °C bzw. 80 °C.

(●): native PDI; (○): thermisch-denaturierte PDI

Das Fern-UV-Spektrum der PDI weist ein absolutes Maximum bei ca. 195 nm und ein breites Minimum zwischen ca. 208 und 222 nm auf. Ebenso wie das Holoenzym weist die thermisch denaturierte PDI noch Reststruktur auf. Ähnlich dem Tetramer besitzt sie entsprechend dem Auswerteprogramm CDNN einen α -helikalen Anteil von ca. 29 %. Unter der Voraussetzung, dass die Sekundärstruktur der PDI durch Bindung an die α -Untereinheit nicht verändert wird, kann somit ein berechneter Anteil an α -helikalen Sekundärstrukturelementen in der α -Untereinheit von ebenfalls 20- 30 % angenommen werden (Tabelle 3.3.2).

Tabelle 3.3.2: Zusammenfassung des Gehaltes an α -helikalen Sekundärstrukturelementen in der Prolyl-4-Hydroxylase und der isolierten β -Untereinheit (PDI)

Gezeigt ist der Anteil an α -helikalen Sekundärstrukturelementen berechnet nach der Formel von Forood *et al.* (1993) und mittels des CDNN-Programms (wie in Material und Methoden beschrieben) verglichen mit dem α -Helix-Anteil vorhergesagt nach der Methode von Geourjou & Deleage (1994). Zusätzlich ist der α -helikale Anteil der α -Domäne der PDI entsprechend Kemmink *et al.* (1996) dargestellt. Die Werte für die α -Untereinheit wurden durch gewichtete Berechnungen bestimmt.

n.d.: in dieser Arbeit, bzw. von Kemmink *et al.* wurden keine entsprechenden Daten ermittelt.

	α -Helix-Anteil nach Forood <i>et al.</i> , 1993	α -Helix-Anteil nach CDNN	α -Helix-Anteil nach SOPM- Vorhersage	α -Helix-Anteil entsprechend Kemmink <i>et al.</i> (1996)
Prolyl-4- Hydroxylase	23 %	28 %	42 %	n.d.
PDI	23 %	29 %	44 %	n.d.
α -Domäne der PDI	n.d.	n.d.	39 %	33 %
α -Untereinheit (abgeleitet)	23 %	28 %	42 %	n.d.

3.3.1.2 Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase

Harnstoffübergang

Zur Bestimmung der chemischen Stabilität wurde ein Harnstoffübergang aufgenommen. Aus dem nach den Daten in Abb. 3.3.1 erstellten Differenzspektrum der Spektren bei 0 M und 8 M Harnstoff ergab sich die größte Fluoreszenzdifferenz zwischen nativem und denaturiertem Protein bei einer Emissionswellenlänge von 328,5 nm. Bei dieser Wellenlänge wurde der harnstoffinduzierte Gleichgewichtsentfaltungsübergang ermittelt. Er zeigt einen sehr frühen Entfaltungsmittelpunkt bei ca. 2 M Harnstoff ohne das Auftreten offensichtlicher Faltungsintermediate

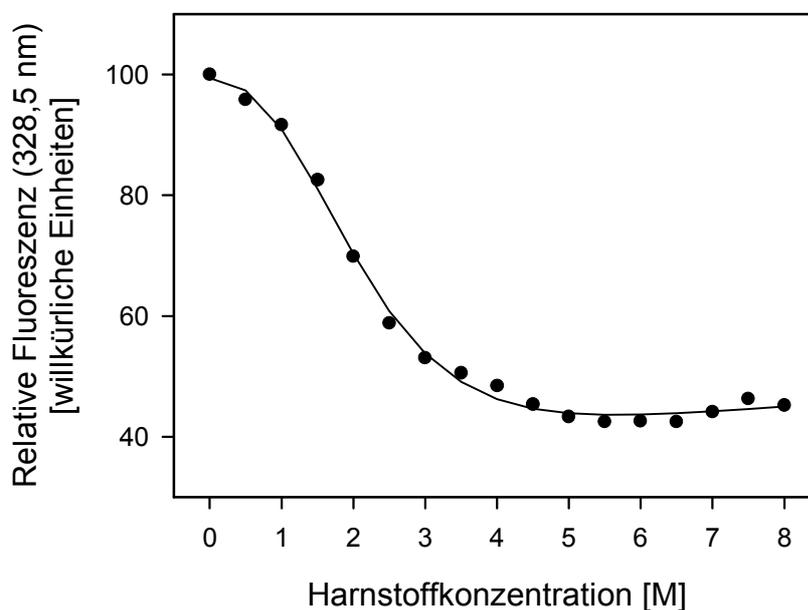


Abb. 3.3.4: Denaturierungsübergang der Prolyl-4-Hydroxylase in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration.

Puffer: 10 mM Tris, 100 mM Glycin, 100 mM NaCl, 0-8 M Harnstoff, pH 7,8

Proteinkonzentration: 10 µg/ml; das Protein wurde in den unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen für je 18 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzspektren aufgenommen

Temperatur: 20 °C; Anregungswellenlänge: 280 nm; Schichtdicke der Küvette: 1 cm; Alle Spektren wurden pufferkorrigiert

Temperaturübergang

Zur Bestimmung der Hitzestabilität der Prolyl-4-Hydroxylase wurde ein Fern-UV-CD-Übergang in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen (s. Abb. 3.3.5). Der Übergang wies einen Mittelpunkt bei ca. 53 °C auf. Insgesamt war der Übergang nicht reversibel.

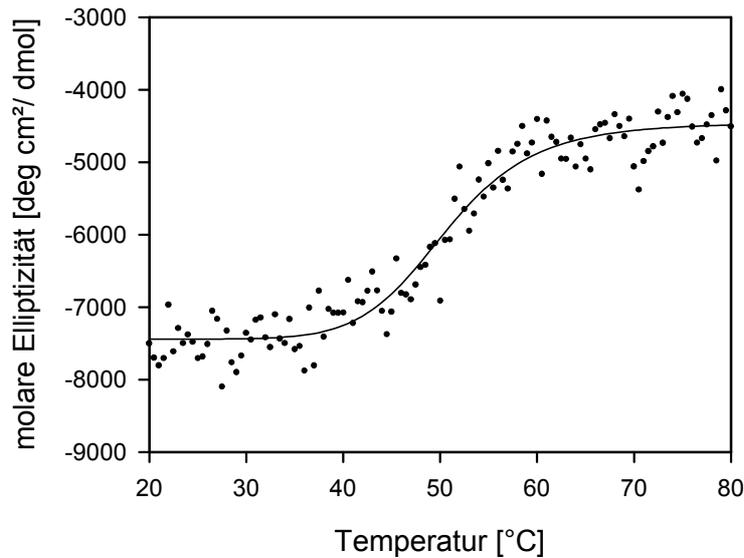


Abb. 3.3.5: CD-Temperaturübergang der Prolyl-4-Hydroxylase

Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,8; Proteinkonzentration: 220 $\mu\text{g/ml}$; Schichtdicke der Küvette: 0,1 cm; Temperaturübergang von 20 $^{\circ}\text{C}$ bis 80 $^{\circ}\text{C}$; die Elliptizität wurde bei 217 nm gemessen.

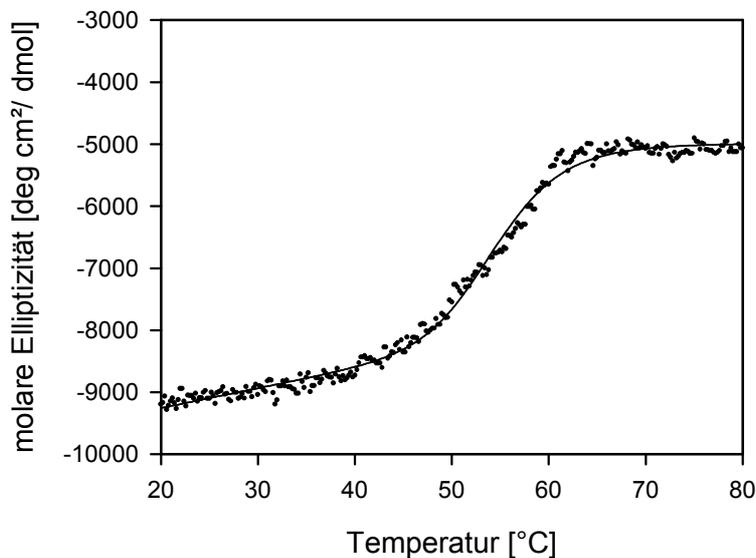


Abb. 3.3.6: CD-Temperaturübergang der PDI

Puffer: 40 mM Kaliumphosphat, pH 7,8; Proteinkonzentration: 220 $\mu\text{g/ml}$; Schichtdicke der Küvette: 0,1 cm; Temperaturübergang von 20 $^{\circ}\text{C}$ bis 80 $^{\circ}\text{C}$; die Elliptizität wurde bei 217 nm gemessen

Ähnlich dem Übergang des Tetramers wies auch der Temperaturübergang der PDI einen Mittelpunkt bei ca. 55 $^{\circ}\text{C}$ auf (Abb. 3.3.6). Auch hier konnte durch Absenken der Temperatur die Struktur des Proteins nicht zurückgewonnen werden.

3.3.2 Analyse der Quartärstruktur der Prolyl-4-Hydroxylase unter verschiedenen Pufferbedingungen

In der Maus liegt die native Prolyl-4-Hydroxylase, wie in allen anderen Vertebraten, als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vor (Helaakoski *et al.*, 1995). Zur Analyse des Oligomerisierungszustandes des Tetramers unter verschiedenen Pufferbedingungen wurde das Prinzip der analytischen Gelfiltration angewandt.

3.3.2.1 Analyse des Oligomerisierungszustandes der Prolyl-4-Hydroxylase unter nativen Bedingungen

Zunächst wurde das Laufverhalten der nativen, tetrameren Prolyl-4-Hydroxylase mittels analytischer Gelfiltration untersucht.

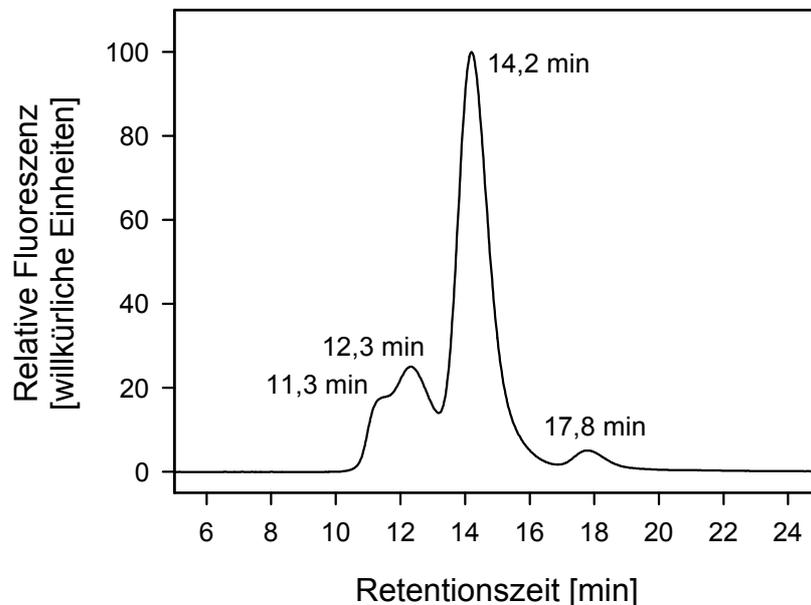


Abb. 3.3.7: Elutionsprofil der nativen Prolyl-4-Hydroxylase

Säule: Superdex 200 HR; Puffer: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8; Flussrate: 0,75 ml/min bei RT. Die Proteinkonzentration betrug 2 μ M (0,5 mg/ml)

Unter nativen Bedingungen eluierte die tetramere Prolyl-4-Hydroxylase (ca. 250 kDa) mit einer Retentionszeit von 14,2 min von einer Superdex 200 HR-Gelfiltrationssäule (Abb. 3.3.7). Die ermittelte Retentionszeit entsprach einer errechneten molekularen Masse von mehr als 400 kDa, was auf die nicht-globuläre Struktur des Tetramers zurückgeführt werden kann. Neben dem Tetramerenpeak wurden weitere Peaks bei 11,3 min (außerhalb des Ausschlussvolumens), 12,3 min und 17,8 min ermittelt.

Um die Verteilung der α - und β -Untereinheiten zu bestimmen, wurden die verschiedenen Proteinpeaks aufgefangen, mit NaDoc gefällt und anschließend über SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.3.8).

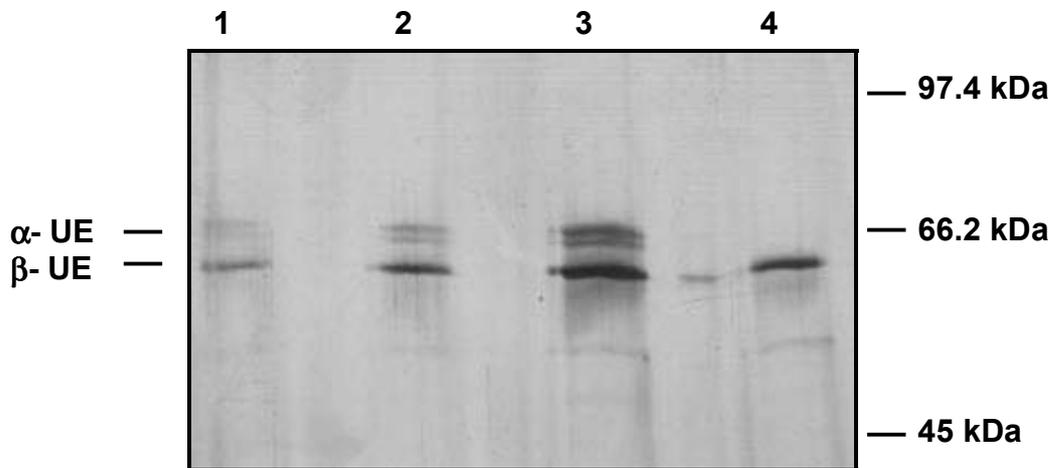


Abb. 3.3.8: Analyse der verschiedenen, unter nativen Bedingungen gewonnenen (s. Abb. 3.3.7) Prolyl-4-Hydroxylase-Peaks

10 % SDS-PAGE (reduzierend), Silberfärbung

1. Probe bei 11,3 min
2. Probe bei 12,3 min
3. Probe bei 14,2 min
4. Probe bei 17,8 min

Während die β -Untereinheit (60 kDa) als definierte Bande läuft, tritt die α -Untereinheit (ca. 64 kDa) in zwei Banden mit leicht unterschiedlichen molekularen Massen auf, die wohl auf die mono- und diglykosylierten Formen zurückzuführen sind (Lamberg *et al.*, 1995). Es wurde auch ersichtlich, dass in den ersten drei Peaks des unter nicht-reduzierenden Bedingungen inkubierten Proteins, sowohl die α -Untereinheit als auch die β -Untereinheit enthalten waren. Dabei ist zu bemerken, dass bei Silberfärbung des Polyacrylamidgels die β -Untereinheit stets stärker angefärbt wird als die α -Untereinheit, so dass keine klaren Aussagen über das Verhältnis der einzelnen Untereinheiten in den Peaks gemacht werden kann. Demgegenüber wies der 17,8 min-Peak nur die β -Untereinheit auf. Aufgrund der berechneten molekularen Masse von ca. 130 kDa handelt es sich dabei sehr wahrscheinlich um Dimere der β -Untereinheit, während die früheren Peaks (11,3 min) Aggregaten und evtl. auch höheren Oligomeren der Prolyl-4-Hydroxylase (12,3 min) entsprachen.

3.3.2.2 Einfluss von DTT auf den Zerfall von Prolyl-4-Hydroxylase Tetrameren

In frühen Experimenten wurde gezeigt, dass das Prolyl-4-Hydroxylase Tetramer durch DTT reduziert werden kann und dass dies zu einer Dissoziation der Untereinheiten führt. Dabei bleibt nur die β -Untereinheit in Lösung, während die α -Untereinheit, bedingt durch das Fehlen der stabilisierenden intramolekularen Disulfidbrücken (Berg *et al*, 1973), aggregiert. Der Zerfall der Tetramere wurde in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration an DTT mittels analytischer Gelfiltration und SDS-PAGE verfolgt.

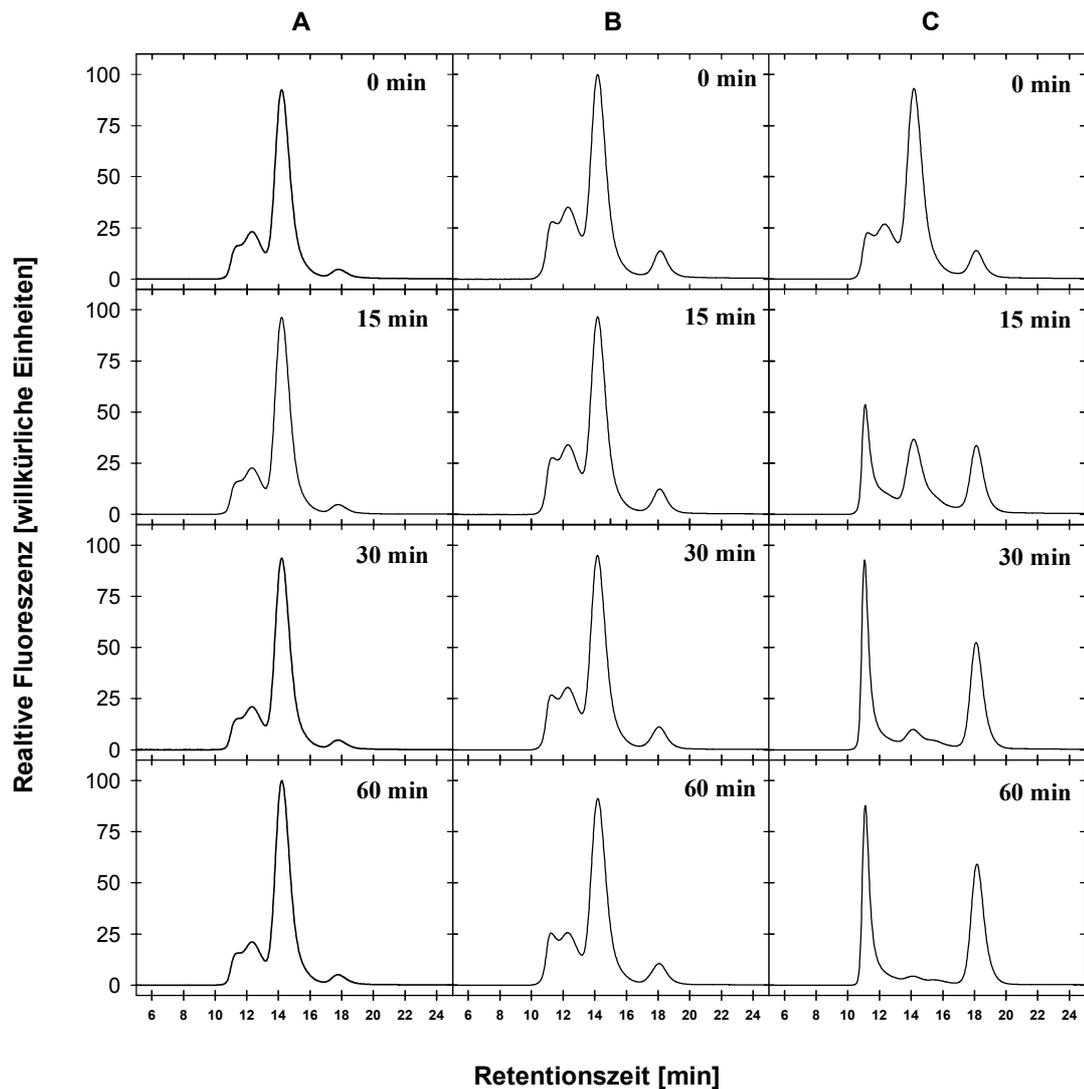


Abb. 3.3.9: Bestimmung des Assoziationsgrades von Prolyl-4-Hydroxylase-Tetrameren unter nicht-reduktiven und reduktiven Bedingungen

Die Prolyl-4-Hydroxylase wurde 0 min, 15 min, 30 min bzw. 60 min bei RT inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration an einer Superdex 200 HR analysiert; Puffer: 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, 0 μ M / 10 μ M / 1 mM DTT, pH 7,8; Proteinkonzentration: 2 μ M (0,5 mg/ml)

A: 0 mM DTT

B: 10 μ M DTT

C: 1 mM DTT

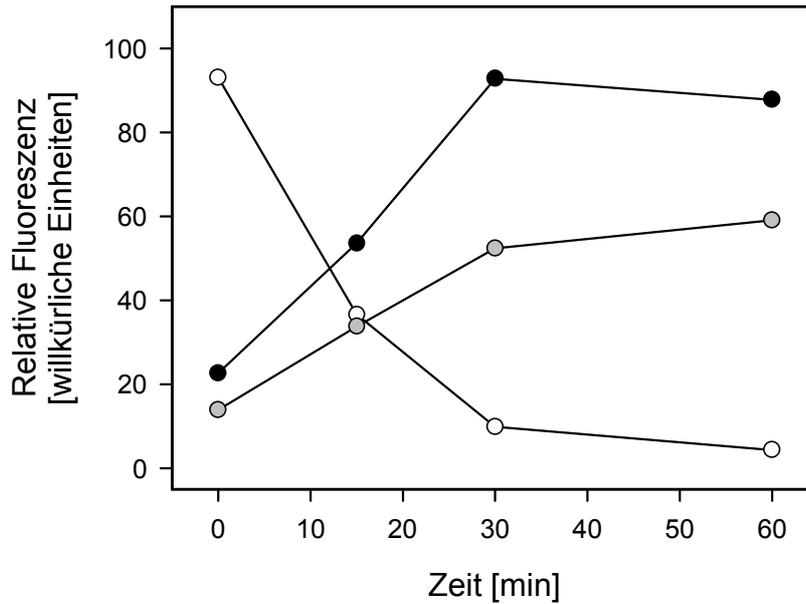


Abb. 3.3.10: Kinetik der Bildung von Aggregaten und PDI-Monomeren, bzw. der Auflösung von Tetrameren unter reduzierenden Bedingungen

Prolyl-4-Hydroxylase wurde bei RT unter reduzierenden Bedingungen (1 mM DTT) inkubiert, nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Flächen der verschiedenen Peaks bestimmt; (●): Aggregatepeak; (○): Tetramerenpeak; (●): PDI-Peak; die Daten wurden aus Abb. 3.3.9 übernommen

Während das Tetramer unter nicht-reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) bzw. unter schwach reduzierenden Bedingungen (10 μ M DTT) bei RT über einen Inkubationszeitraum von einer Stunde stabil war (Abb. 3.3.9, A und B), kam es unter reduktiven Bedingungen (1 mM DTT, Abb. 3.3.9 C) zum Verlust des Tetramers. Der Tetramerenpeak bei 14,2 min ist nach einer Inkubationszeit von einer Stunde nahezu verschwunden, bereits nach 30 min konnten kaum noch Tetramere nachgewiesen werden (s. auch Abb. 3.3.10). Stattdessen konnten das Entstehen bzw. die Vergrößerung zweier anderer Peaks beobachtet werden: Ein Peak bei einer Elutionszeit von 11,3 min (vgl. Abb. 3.3.7), der somit bereits im Ausschlussvolumen der Säule liegt und ein weiterer Peak, der mit einer ermittelten Retentionszeit von 18,1 min einer molekularen Masse von ca. 120 kDa entspricht.

Obwohl sich die Elutionsprofile der Ansätze unter nicht-reduzierenden und unter schwach reduzierenden Bedingungen sehr stark ähneln, so unterschieden sie sich doch in der Elutionszeit des PDI-Peaks (17,8 bzw. 18,1). Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass unter leicht reduzierenden Bedingungen eine geringe Änderung der Struktur erfolgte, die zu einem veränderten Laufverhalten führte.

Nach der analytischen Gelfiltration wurden die entsprechenden Peaks des reduzierenden Ansatzes (Abb. 3.3.9, C, 60 min) getrennt aufgefangen, mittels NaDoc gefällt und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

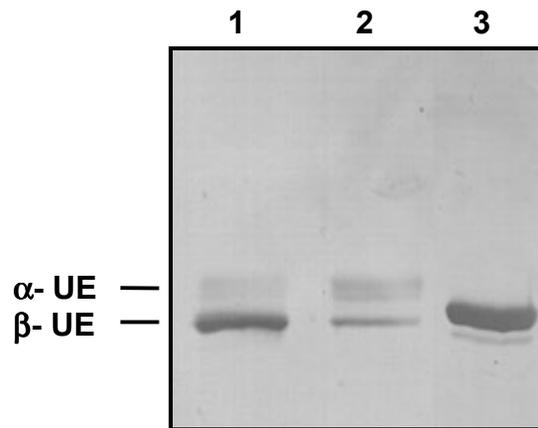


Abb. 3.3.11: Analyse der verschiedenen Prolyl-4-Hydroxylase-Peaks unter reduzierenden Bedingungen

Die Peaks des Elutionsprofils aus Abb. 3.3.9 (C, 60 min) wurden aufgefangen, mit NaDoc gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert

10 % SDS-PAGE (reduzierend), Silberfärbung

1. Prolyl-4-Hydroxylase Standard ($\alpha:\beta=1:1$)
2. Probe bei 11,3 min
3. Probe bei 18,1 min

Aus Abb. 3.3.11 wird ersichtlich, dass, ebenso wie unter nativen Bedingungen (s. Abb. 3.3.8), im 18,1 min Peak ausschließlich die β -Untereinheit enthalten ist, während sich der Aggregate-Peak bei 11,3 min aus einem Gemisch von α - und β -Untereinheit zusammensetzt, wobei die α -Untereinheit quantitativ aggregiert.

3.3.3 Isolierung der α - und β -Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase

Zur Durchführung späterer Renaturierungsversuche mit den beiden Untereinheiten sollten diese voneinander getrennt und isoliert gereinigt werden.

3.3.3.1 Abtrennung der β -Untereinheit unter reduzierenden Bedingungen mittels Gelfiltration

Wie zuvor festgestellt wurde (s. 3.3.2.2), zerfällt das Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramer durch Reduktion der Disulfidbrücken in seine Untereinheiten. Da die α -Untereinheit jedoch unter reduktiven Bedingungen sofort aggregiert, kann diese unter derartigen Bedingungen nicht nativ gewonnen werden. Die β -Untereinheit jedoch liegt unter diesen Bedingungen zum Großteil in Lösung vor und kann somit von der α -Untereinheit abgetrennt werden.

Unter Ausnutzung der oben beschriebenen Abläufe wurde die Isolierung der β -Untereinheit mittels präparativer Gelfiltration vorgenommen. Die Abtrennung erfolgte entsprechend dem in Abb. 3.3.12 dargestellten Ablauf. Außerdem wurde, wie in früheren Untersuchungen, mittels gelelektrophoretischer Analyse festgestellt, dass der Aggregatepeak neben der leicht aggregierenden α -Untereinheit auch einen Anteil an β -Untereinheit aufwies und somit die

α -Untereinheit nicht rein abgetrennt werden konnte (ohne Abbildung, entsprechend Abb. 3.3.11).

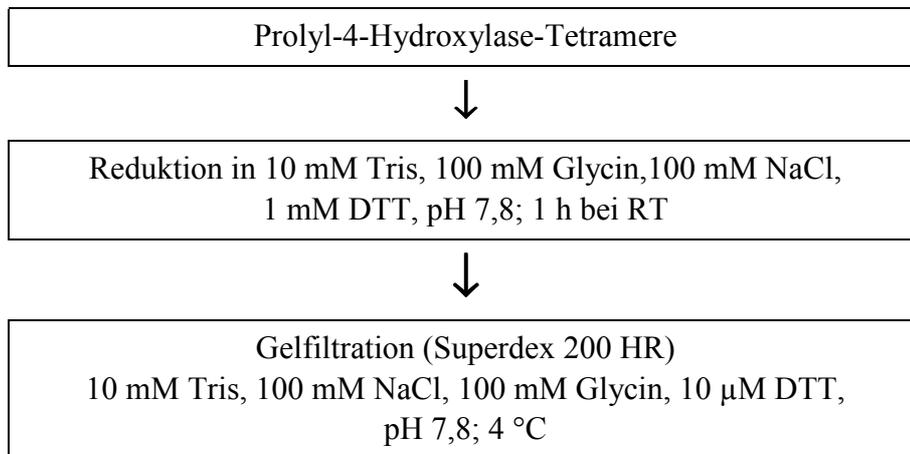


Abb. 3.3.12: Schema der Trennung der α - und β -Untereinheiten aus Prolyl-4-Hydroxylase-Tetrameren unter reduzierenden Bedingungen

3.3.3.2 Trennung der Untereinheiten unter denaturierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen

Da unter den bisher beschriebenen Bedingungen keine Abtrennung der reinen α Untereinheit möglich war, wurde in einem weiteren Ansatz eine Denaturierung mit Harnstoff, die eine Aggregation der α -Untereinheit verhindert, durchgeführt und die Untereinheiten anschließend mittels Anionenaustauscherchromatographie (ResourceQ) getrennt (Abb. 3.3.13).

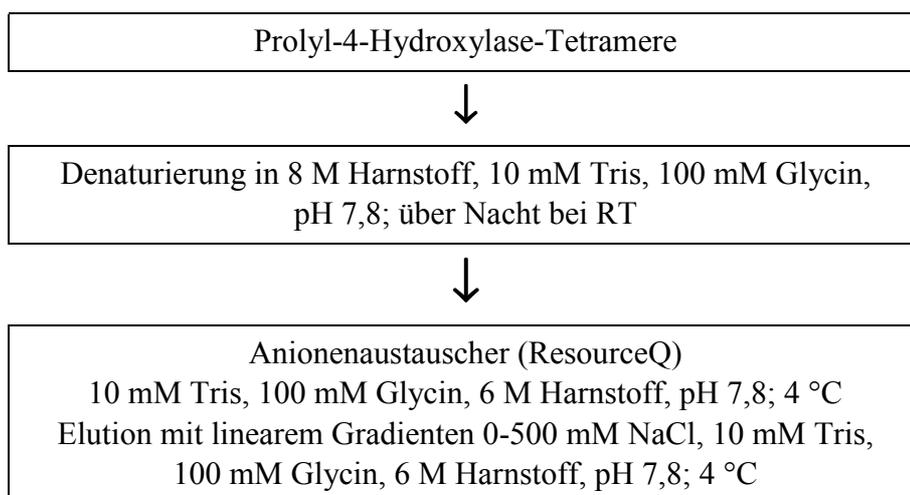


Abb. 3.3.13: Schema der denaturierenden Trennung der α - und β -Untereinheiten aus Prolyl-4-Hydroxylase-Tetrameren

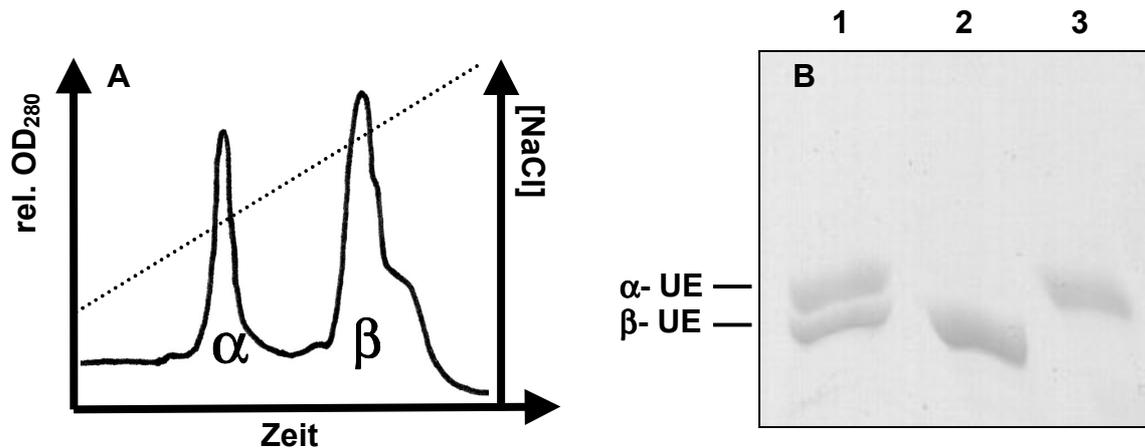


Abb. 3.3.14: Präparative Gelfiltration zur denaturierenden Trennung der beiden Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase

- A: Elutionsprofil der präparativen Gelfiltration
 B: 10 % SDS-PAGE (reduzierend) der vereinigten Fraktionen, Silberfärbung
1. Prolyl-4-Hydroxylase-Standard
 2. vereinigte Fraktionen des zweiten Peaks (β) aus A
 3. vereinigte Fraktionen des ersten Peaks (α) aus A

Aus Abb. 3.3.14 wird ersichtlich, dass durch Harnstoffdenaturierung und anschließende Anionenaustauscherchromatographie eine Trennung der beiden Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase erreicht werden konnte. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und für Renaturierungsexperimente eingesetzt.

3.3.4 Versuche zur *in vitro*-Rückfaltung von Prolyl-4-Hydroxylase Tetrameren

Im Gegensatz zu zahlreichen einfacher strukturierten Proteinen (Rudolph *et al.*, 1997) konnte bisher keine Renaturierung des Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramers aus den einzelnen Untereinheiten erreicht werden.

Renaturierungsansätze erfolgen im Allgemeinen durch Verdünnung des mit Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid denaturierten Proteins in einen Renaturierungspuffer (Rudolph *et al.*, 1997). Dabei sollte die Restkonzentration des Denaturierungsmittels so gering wie möglich gehalten werden (z.B. 1:100 Verdünnung einer 6 M Lösung), damit die Rückfaltung unter nativ-ähnlichen Bedingungen erfolgen kann.

Die Renaturierung wurde durch eine 1:100-Verdünnung des Proteins in einen Renaturierungspuffer gestartet. Die Proteinendkonzentration betrug dabei 18 $\mu\text{g/ml}$ je Untereinheit. Die Renaturierung wurde bei 10 °C durchgeführt.

Die möglichen intermediären Komplexe bzw. die nach Dialyse in einen Standardpuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8) entstehenden Rückfaltungsprodukte wurden mittels analytischer Gelfiltration untersucht.

3.3.4.1 Versuche zur Rückfaltung der einzelnen Untereinheiten

In ersten Versuchen wurden die harnstoffdenaturierten Untereinheiten einzeln in Renaturierungsansätzen eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte in 50 mM Tris, pH 8,0. Die Proben wurden eine bzw. 24 h inkubiert und anschließend mittels Gelfiltration analysiert.

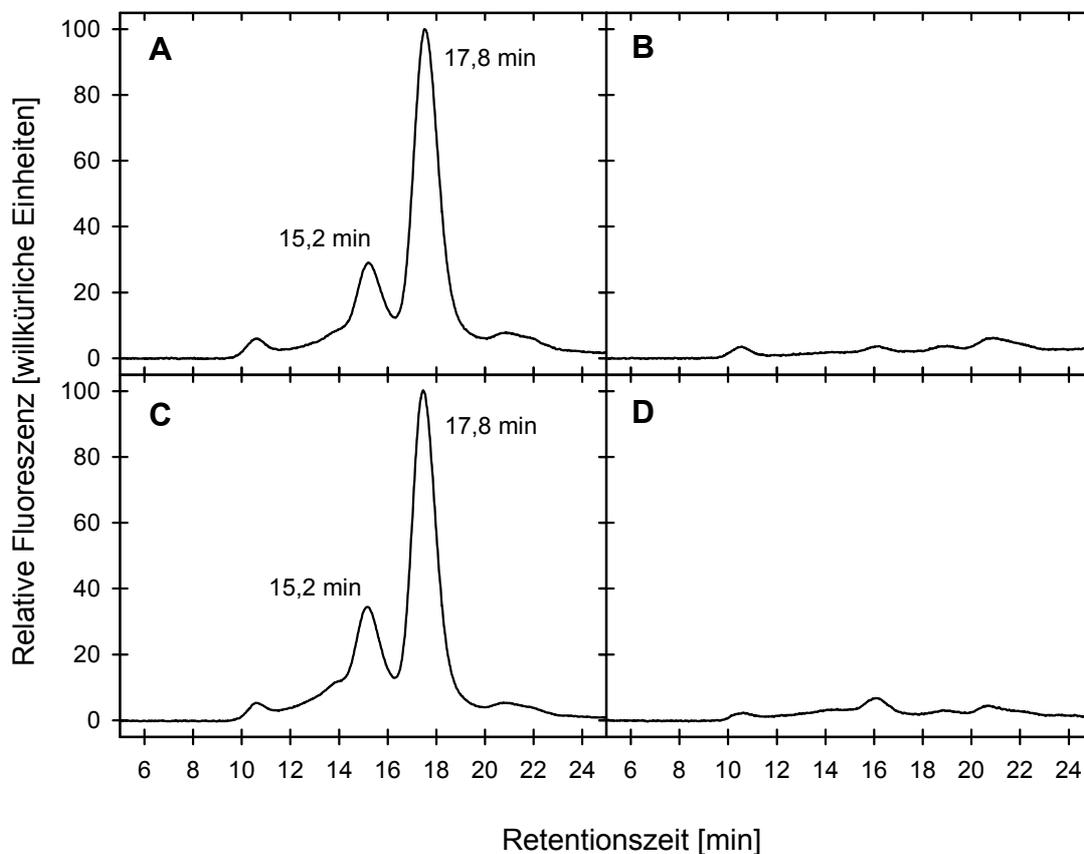


Abb. 3.3.15: Inkubation der isolierten α - und β -Untereinheiten unter Rückfaltungsbedingungen

Die isolierten Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase wurden einzeln unter Rückfaltungsbedingungen (Verdünnung 1:100, Proteinkonzentration 18 $\mu\text{g/ml}$, 1 M Arginin, pH 8,0) für 1 h bzw. 24 h bei 10 °C inkubiert und anschließend mittels analytischer Gelfiltration untersucht.

- A: β -Untereinheit, 1 h Inkubation
- B: α -Untereinheit, 1 h Inkubation
- C: β -Untereinheit, 24 h Inkubation
- D: α -Untereinheit, 24 h Inkubation

Wie aus Abb. 3.3.15 A/C ersichtlich ist, aggregierte die β -Untereinheit nicht und ließ sich unter diesen Bedingungen rückfalten, wobei zwei verschiedene Spezies auftraten. Bei der kleineren Spezies (Elutionszeit ca. 18 min) handelte es sich wahrscheinlich, entsprechend Abb. 3.3.7 um PDI-Dimere, während die größere Spezies (15,2 min) mit einer errechneten molekularen Masse von ca. 300 kDa vermutlich einen höheren Oligomerenzustand darstellt. Bei Inkubation der isolierten α -Untereinheit unter oben genannten Renaturierungsbedingungen konnte keine rückgefaltete Form detektiert werden. Sie aggregierte stattdessen sofort und war mittels analytischer Gelfiltration nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.3.15 B/D).

3.3.4.2 Inkubation der α - und β -Untereinheiten unter verschiedenen Pufferbedingungen

Da die isolierte harnstoffdenaturierte α -Untereinheit in Rückfaltungsansätzen sofort aggregierte, sollte versucht werden, die α -Untereinheit möglichst lange in einem löslichen Zustand zu halten. Dazu wurde die β -Untereinheit entsprechend ihrer postulierten Chaperonfunktion (Vuori *et al.*, 1992), mit der sie die α -Untereinheit in einem faltungskompetenten Zustand hält, vorgelegt. Außerdem sollte versucht werden, mittels Veränderungen der Pufferzusammensetzung Bedingungen zu schaffen, unter denen eine verstärkte Interaktion der beiden Untereinheiten - und somit unter Umständen auch eine erleichterte Bildung von Tetrameren - erreicht werden kann. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt (Buchner & Rudolph, 1991; Brinkmann *et al.*, 1992; Lin & Traugh, 1993), dass Renaturierungsansätze in Arginin (z.B. 1 M) bzw. hochmolaren Trislösungen (z.B. 1 M) zu einer Erhöhung der Ausbeute führen können. Es wird vermutet, dass bei Anwesenheit von Arginin eine Stabilisierung von Intermediaten erfolgt (Rudolph *et al.*, 1997), von denen im Idealfall ein großer Teil in den nativen Zustand überführt werden kann. Aus diesem Grund wurden Renaturierungsansätze sowohl unter Standardbedingungen (50 mM Tris, pH 8,0, s. Abb. 3.3.8 A) als auch unter entsprechenden stabilisierenden Bedingungen durchgeführt (1 M Tris, pH 8,0 und 1 M Arginin, pH 8,0, s. Abb. 3.3.16 B und C). Mittels analytischer Gelfiltration wurde untersucht, ob es unter diesen Bedingungen zu einer erhöhten Ausbildung von stabilisierten Intermediaten bzw. zur Zusammenlagerung der verschiedenen Untereinheiten kommt.

Aus Abb. 3.3.16 ist ersichtlich, dass unter allen drei untersuchten Bedingungen ein ähnliches Elutionsprofil entsteht, das durch die beiden Peaks der β -Untereinheit (ca. 18 min und ca. 15,2 min, s. Abb. 3.3.15 A) charakterisiert ist. Es ist jedoch zu erkennen, dass im Falle der Inkubation in 1 M Arginin eine weitere Spezies mit einer Retentionszeit von ca. 16,5 min in geringer Menge entsteht, die mit steigender Inkubationsdauer noch etwas zunimmt (Abb. 3.3.16 C).

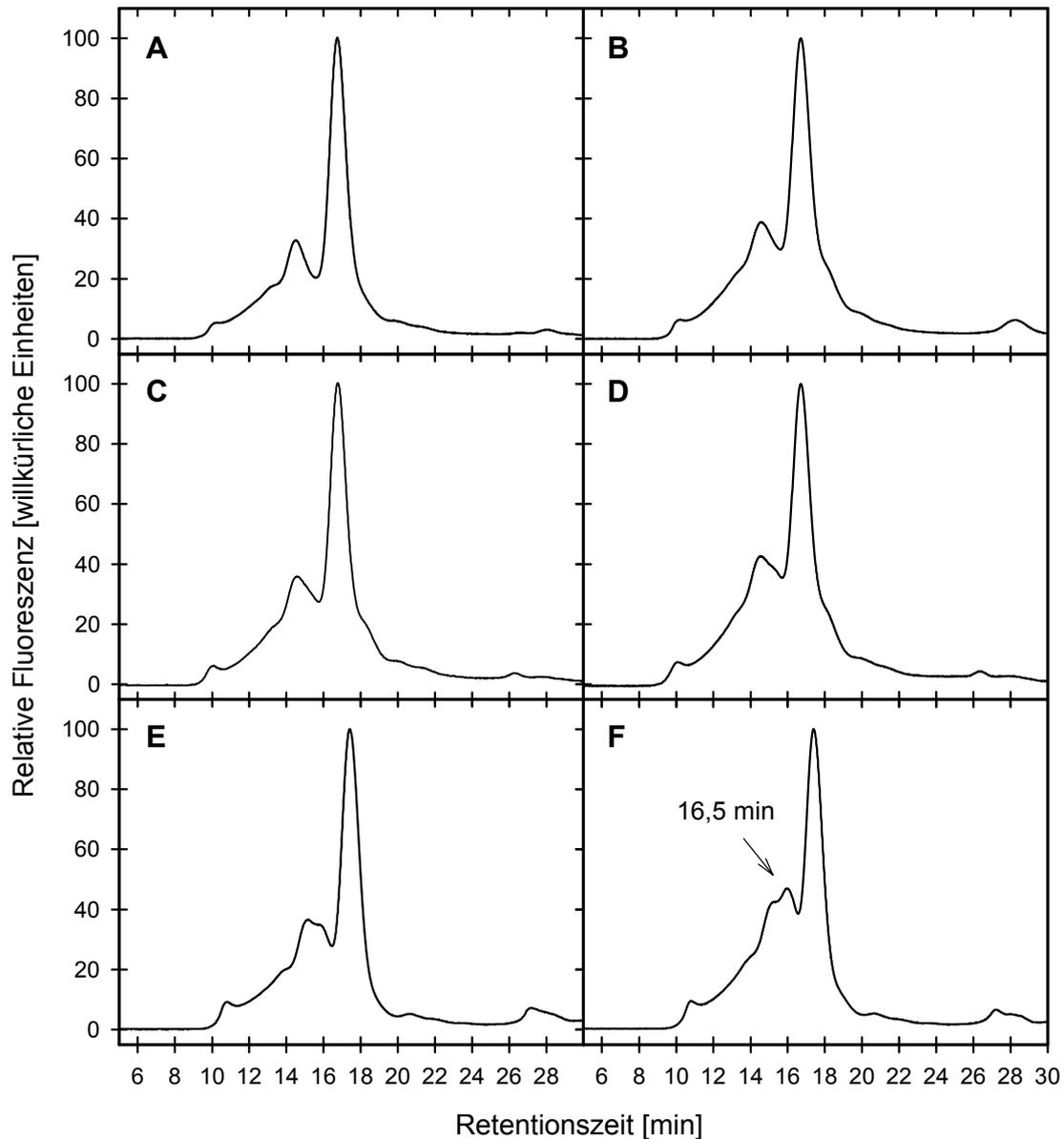


Abb. 3.3.16: Elutionsprofile der Inkubation von Harnstoff-denaturierter α - und β -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase unter verschiedenen Pufferbedingungen

Die Rückfaltung (1:100, Endkonzentration 18 $\mu\text{g/ml}$ je Untereinheit) erfolgte für 1 h bzw. 16 h in folgenden Puffern:

A: 50 mM Tris, pH 8,0; 1 h

B: 50 mM Tris, pH 8,0; 16 h

C: 1 M Tris, pH 8,0; 1 h

D: 1 M Tris, pH 8,0; 16h

E: 1 M Arginin, pH 8,0

F: 1 M Arginin, pH 8,0; 16 h

3.3.4.3 Einfluss der Konzentration der α -Untereinheit auf die Bildung von α - β -Intermediaten

In der Zelle wird die β -Untereinheit zunächst im Überschuss gebildet und in einem *Precursorpool* im ER gespeichert. Erst unmittelbar bei Synthese der α -Untereinheit wird sie aus dem Pool freigegeben, um sich mit dieser zum Tetramer zusammenzufügen (Vuorela *et al.*, 1997). Dadurch wird verhindert, dass die α -Untereinheit alleine im ER vorliegt und somit zum großen Teil aggregiert.

Im folgenden wurde versucht, durch Veränderung des Verhältnisses der beiden Untereinheiten, die Interaktion derselben zu optimieren. Dazu wurden die Renaturierungsansätze unter den bereits erprobten Bedingungen (1 M Arginin, pH 8,0) durchgeführt.

In vitro konnte unter diesen Bedingungen bei ansteigendem Überschuss der β -Untereinheit gegenüber der α -Untereinheit keine Veränderung des Elutionsprofils ermittelt werden, das Elutionsprofil war vielmehr identisch mit dem Elutionsprofil der Rückfaltung der isolierten β -Untereinheit (Daten nicht abgebildet, vgl. Abb. 3.3.15 A, C). D.h. dass bei Überschuss der β -Untereinheit zumindest mit den hier angewendeten Analysemethoden keine gesteigerte Interaktion der beiden Untereinheiten festgestellt werden konnte.

Da unter *in vitro* Rückfaltungsbedingungen die isolierte α -Untereinheit sofort aggregierte, wurde getestet, ob bei Überschuss der α -Untereinheit gegenüber der β -Untereinheit ein Anteil der α -Untereinheit nicht sofort aggregiert, sondern mit der β -Untereinheit assoziieren kann. Aus diesem Grund wurde die β -Untereinheit mit steigenden Mengen der α -Untereinheit unter Rückfaltungsbedingungen inkubiert.

Abb. 3.3.17 zeigt die Veränderung des Profils des Gelfiltrationslaufes nach Inkubation der β -Untereinheit mit verschiedenen Konzentrationen an α -Untereinheit in Anwesenheit von 1 M Arginin. Neben den beiden Peaks der β -Untereinheit entstand ein prominenter Peak mit einer Retentionszeit von ca. 16,5 min, der mit steigender Konzentration der α -Untereinheit zunahm und dem in Abb. 3.3.16 F hervorgehobenen Peak entsprach. Beim Verhältnis α - zu β -Untereinheit von 3:1 wurden die Peaks aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.3.18). Der Peak bei 16,5 min besteht im Gegensatz zum Peak mit der Retentionszeit von 17,8 min nicht nur aus der zurückgefalteten β -Untereinheit sondern enthält auch einen Anteil an α -Untereinheit. Es konnte also gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Arginin stabilisierte Intermediate auftraten, so dass ein Teil der α -Untereinheiten nicht aggregierte, sondern stattdessen eine definierte Interaktion zwischen der α - und der β -Untereinheit stattfand.

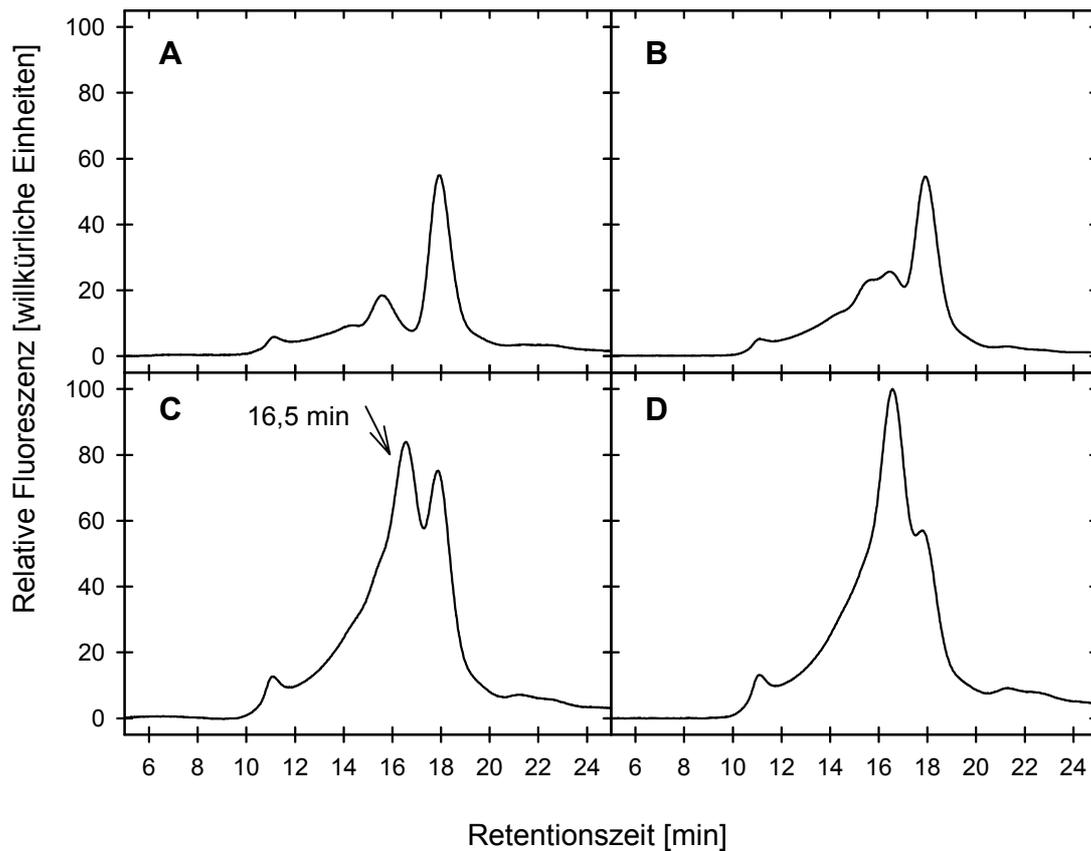


Abb. 3.3.17: Assoziation von α - und β -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase in Abhängigkeit von der Konzentration der α -Untereinheit

Die denaturierte β -Untereinheit (Endkonzentration 18 $\mu\text{g/ml}$) wurde mit steigenden Mengen an α -Untereinheit in 1 M Arginin, pH 8,0 inkubiert und anschließend mittels analytischer Gelfiltration analysiert

A: $\alpha:\beta=0:1$

B: $\alpha:\beta=1:1$

C: $\alpha:\beta=3:1$

D: $\alpha:\beta=7:1$

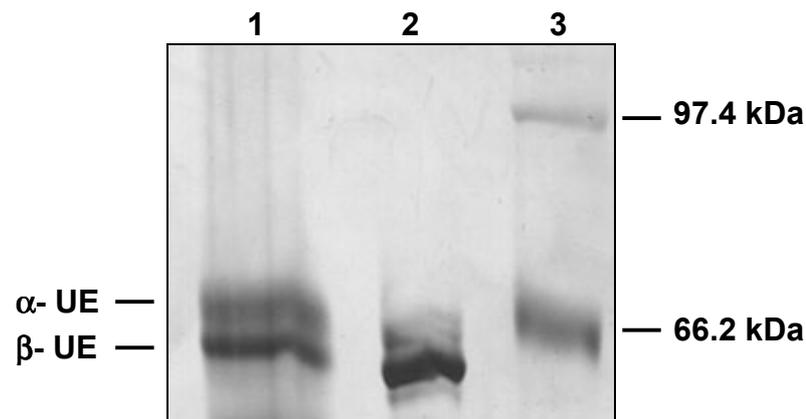


Abb. 3.3.18: Analyse der prominenten Peaks aus Abb. 3.3.17 mittels SDS-PAGE

Die Peaks des Elutionsprofils aus Abb. 3.3.17 (C, 60 min) wurden aufgefangen, mit NaDoc gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert

10 % SDS-PAGE (reduzierend), Silberfärbung

1. Peak bei 16,5 min

2. Peak bei 17,8 min

3. Molekulargewichtsstandard

3.3.4.4 Assoziation der β -Untereinheit mit einem Überschuss an α -Untereinheit unter verschiedenen Pufferbedingungen mit anschließender Dialyse

In Abschnitt 3.3.4.3 konnte gezeigt werden, dass die α - und β - Untereinheiten in 1 M Arginin Komplexe bilden. Es sollte desweiteren untersucht werden, ob unter den gleichen Konzentrationsverhältnissen ($\alpha:\beta=3:1$) bei Inkubation in 1 M Tris, pH 8,0 ebenfalls eine Assoziation stattfindet und ob diese Komplexe auch nach Dialyse gegen den Standardpuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8) noch stabil sind.

Wie aus Abb. 3.3.19 ersichtlich ist, entsteht bei einem α -/ β -Verhältnis von 3:1 bei Inkubation in 1 M Trispuffer im Gegensatz zu 1 M Argininpuffer nur ein relativ schwacher Peak bei einer Retentionszeit von 16,5 min.

Entscheidend für die Ausbildung von Tetrameren ist jedoch auch das Vermögen der Komplexe auch unter nicht stabilisierenden Bedingungen (d.h. ohne hohe Tris- oder Argininkonzentrationen) zu bestehen. Aus diesem Grund wurden die Rückfaltungsproben über Nacht in Standardpuffer dialysiert und anschließend mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Dabei wird ebenfalls aus Abb. 3.3.19 ersichtlich, dass die in 1 M Arginin gebildeten α -/ β -Komplexe unter Standardbedingungen nicht stabil waren. Stattdessen ergab sich nach der Dialyse (sowohl nach vorherige Inkubation in 1 M Tris, pH 8,0 also auch in 1 M Arginin, pH 8,0) ein verändertes Profil. Dieses ist neben dem PDI-Peak (ca. 18 min)

charakterisiert durch einen sehr breiten Peak bei ca. 16 min, der jedoch eine wesentlich geringere Intensität aufwies als der zuvor vorhandene α -/ β -Komplexpeak. Somit ist zu vermuten, dass die PDI unter den verwendeten Bedingungen in der Lage ist, die α -Untereinheit zumindest vorübergehend zu stabilisieren.

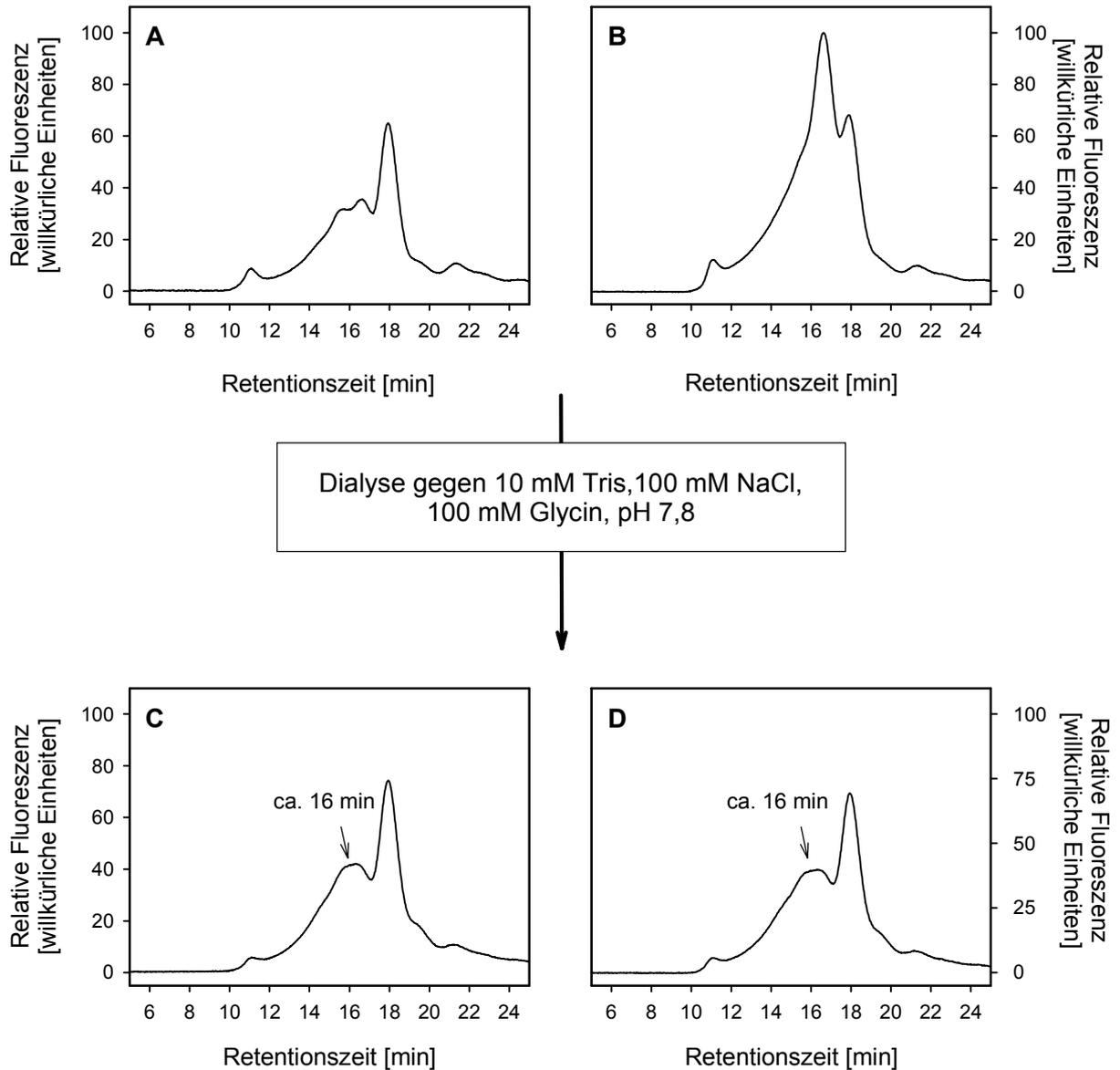


Abb. 3.3.19: Analyse der α -/ β -Komplexpeaks vor und nach Dialyse in Standardpuffer

α - und β -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase wurden im Verhältnis 3:1 (α : 54 $\mu\text{g/ml}$; β : 18 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert (1 M Tris, pH 8,0 bzw. 1 M Arginin, pH 8,0) und vor bzw. nach der Dialyse in Standardpuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8) mittels Gelfiltration analysiert

A: 1 M Tris, pH 8,0; vor Dialyse

B: 1 M Arginin, pH 8,0; vor Dialyse

C: 1 M Tris, pH 8,0; nach Dialyse

D: 1 M Arginin, pH 8,0; nach Dialyse

3.3.4.5 Renaturierungsansätze in Gegenwart von FeCl_2

Zur Katalyse der Prolylhydroxylierung benötigt die Prolyl-4-Hydroxylase neben Ascorbat und Sauerstoff auch Fe^{2+} -Ionen für die Durchführung der Reaktion (Berg *et al.*, 1972). Pro α -Untereinheit ist ein Fe^{2+} -Ion gebunden. Es wird vermutet, dass die Bindung von Eisenionen das Protein stabilisiert (de Jong & Kemp, 1982; Hanauske-Abel, 1991; Myllylä *et al.*, 1992). Es liegt also nahe, dass die Gegenwart von Fe^{2+} -Ionen einen stabilisierenden Effekt bei der Renaturierung von Prolyl-4-Hydroxylase-Tetrameren haben könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die beiden Untereinheiten (Verhältnis 1:1) mit einem fünf-fach-molaren Überschuss an FeCl_2 renaturiert, gegen Standardpuffer dialysiert und mittels analytischer Gelfiltration analysiert. Wie aus Abb. 3.3.20 ersichtlich ist, bildet sich bei Inkubation der beiden Prolyl-4-Hydroxylase Untereinheiten unter Rückfaltungsbedingungen (1 M Tris, pH 8,0 bzw. 1 M Arginin, pH 8,0) in Gegenwart von FeCl_2 nach der Dialyse eine neue Spezies mit einer Retentionszeit von etwa mehr als 14 min aus. Diese entspricht der bereits ermittelten Retentionszeit der Tetramere unter nativen Bedingungen (14,2 min, s. Abb. 3.3.7). Es konnte ferner gezeigt werden, dass sie sich sowohl aus der α - als auch aus der β -Untereinheit zusammensetzt (Abb. 3.3.21). Zusätzlich ist der prominente Peak mit einer Retentionszeit von ca. 18 min vorhanden, welcher der β -Untereinheit entspricht. Die dargestellten Ergebnisse lassen so auf die Existenz eines Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramers schließen.

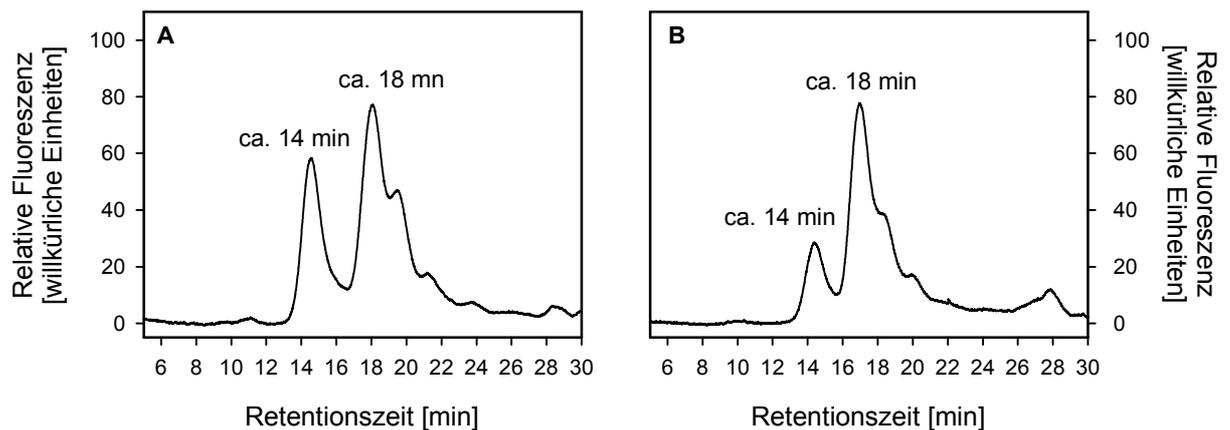


Abb. 3.3.20: Rückfaltung der Prolyl-4-Hydroxylase in Gegenwart von FeCl_2

Die α - und die β -Untereinheiten wurden in Gegenwart von FeCl_2 (fünffach-molarer Überschuss) in 1 M Tris, pH 8,0 (A) bzw. 1 M Arginin, pH 8,0 (B) inkubiert, gegen Standardpuffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 100 mM Glycin, pH 7,8) dialysiert und anschließend mittels Gelfiltration analysiert

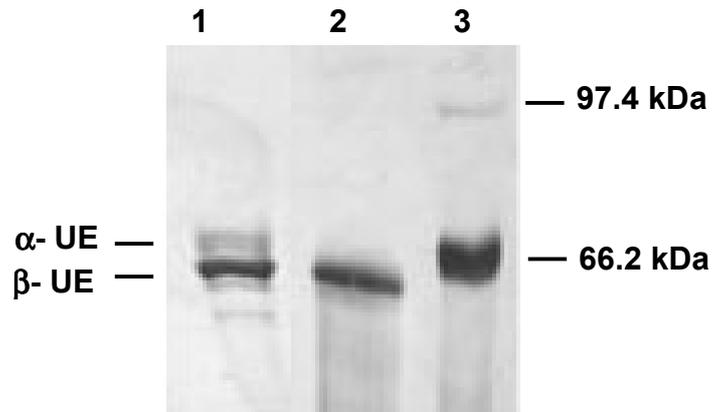


Abb. 3.3.21 Analyse der prominenten Peaks aus Abb. 3.3.20 mittels SDS-PAGE

Die Peaks des Elutionsprofils aus Abb. 3.3.20 (C, 60 min) wurden aufgefangen, mit NaDoc gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert

10 % SDS-PAGE (reduzierend), Silberfärbung

1. Peak bei 14 min
2. Peak bei 18 min
3. Molekulargewichtsstandard

3.4 Diskussion zur Prolyl-4-Hydroxylase

Zu Beginn diese Arbeit lagen kaum *in vitro*-Daten über die Stabilität und Struktur der Prolyl-4-Hydroxylase vor. Die Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase wurde mittels CD-Spektroskopie (thermische Entfaltung) bzw. mittels Fluoreszenzspektroskopie (chemisch induzierte Entfaltung) durchgeführt. Dabei wurde zunächst das intakte Tetramer untersucht. Dieses liegt bei 20 °C in einem nativen Zustand vor, der gemäß des CD-Spektrums einen alphahelikalen Anteil von ca. 23-29 % hat. Da die isolierte β -Untereinheit (PDI) einen nahezu identischen alphahelikalen Anteil wie das Tetramer aufweist, kann daraus abgeleitet werden, dass die α -Untereinheit, die aufgrund ihrer Aggregationsneigung nicht isoliert untersucht werden kann, ebenfalls einen ähnlichen alphahelikalen Anteil besitzt.

Die Messung der thermisch induzierten Entfaltung der Prolyl-4-Hydroxylase ergab einen kooperativen Übergang mit einem T_m -Wert von ca. 53 °C. Durch Vergleich der Stabilität des Tetramers mit der isolierten β -Untereinheit lassen sich so Aussagen über die α -Untereinheit machen. Vergleicht man den Temperaturübergang des Tetramers mit dem ähnlichen Übergang der isolierten PDI ($T_m = \text{ca. } 55^\circ\text{C}$), so wird deutlich, dass die α -Untereinheit bei Betrachtung der thermischen Stabilität keinen oder nur einen sehr leichten destabilisierenden Einfluss auf das Holoenzym aufweist. Außerdem lässt die Kooperativität des Übergangs des Tetramers vermuten, dass beide Untereinheiten gleichzeitig entfalten, d.h., dass mit Verlust der Struktur der β -Untereinheit auch die α -Untereinheit destabilisiert wird, was somit ein Anzeichen für den bereits dargestellten stabilisierenden Effekt der β Untereinheit auf die α -Untereinheit darstellt (vgl. Vuori *et al.*, 1992).

Sowohl der Temperaturübergang der Prolyl-4-Hydroxylase als auch der der isolierten β -Untereinheit haben sich als nicht-reversibel erwiesen. Aufgrund der starken Aggregationsneigung der α -Untereinheit unter reduzierenden Bedingungen konnte erwartet werden, dass nach thermisch induzierter Aggregation eine Rückfaltung dieser und somit der gesamten Prolyl-4-Hydroxylase nicht möglich wäre. Die Beobachtung, dass auch die thermische Entfaltung der isolierten und denaturierten β -Untereinheit nicht reversibel ist, lässt jedoch nicht auf eine alleinige Verantwortung der α -Untereinheit für die Irreversibilität schließen.

Das Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramer liegt bereits bei ca. 2 M Harnstoff zu 50 % und bei ca. 4 M vollständig denaturiert vor. Dieser Zustand wurde für die Trennung der beiden Untereinheiten in Harnstoff ausgenutzt. Trotz der geringen chemischen Stabilität ist der Übergang kooperativ ohne Intermediate, so dass sich daraus folgern lässt, dass beide Untereinheiten etwa gleich instabil gegenüber chemischer Denaturierung sind, bzw. dass die α -Untereinheit bei ansteigender Harnstoffkonzentration solange nativ vorliegt, bis die β -Untereinheit denaturiert wird und somit nicht mehr in der Lage ist, die Stabilität der α -Untereinheit zu gewähren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stabilität der Tetramere auch unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Dabei konnte durch analytische Gelfiltration gezeigt werden, dass die Existenz der Disulfidbrücken unter *in vitro*-Bedingungen einen enormen Einfluss auf die Stabilität der Tetramere hat, da deren Reduktion zu einer vollständigen Dissoziation der Tetramere, sowie zur Aggregation der α -Untereinheit (mit einer Halbwertszeit von ca. 15 min) führte. Dem gegenüber wurde die Integrität der β -Untereinheit (PDI) unter stark reduzierenden Bedingungen nicht beeinflusst.

Die fünf Cysteine der α -Untereinheit sind in allen untersuchten Organismen, von *C. elegans* bis Mensch, konserviert (Helaakoski *et al.*, 1989), dies lässt auf eine wichtige Rolle dieser für die Stabilität und Funktion des Enzyms schließen. Die Disulfidbrücken werden durch Cys-276 und Cys-293 und durch Cys-486 und Cys-511 gebildet, während Cys-150 nicht Bestandteil einer Disulfidbrücke ist (John & Bulleid, 1994, Lamberg *et al.*, 1995). Für beide Disulfidbrücken wurde durch *in vivo*-Experimente gezeigt, dass sie essentiell für die Assemblierung der Tetramere sind (John & Bulleid, 1994, Lamberg *et al.*, 1995), während ihre Funktion für die Ausübung der Prolylhydroxylase-Aktivität noch nicht vollständig geklärt ist.

Es ist zu bemerken, dass die PDI trotz ihrer hohen Stabilität nicht in der Lage ist, die reduzierte α -Untereinheit in Lösung zu halten. Demgegenüber konnte von John & Bulleid (1996) in *in vivo*-Experimenten gezeigt werden, dass die Behandlung von COS-Zellen, die beide Untereinheiten exprimieren, mit DTT nicht zu einer Aggregation der α -Untereinheit führte, sondern dass vielmehr nach Entzug von DTT die beiden Untereinheiten wieder in der Lage waren, korrekt gefaltete und aktive Tetramere zu bilden. Dies lässt vermuten, dass in der Zelle ein Faktor vorhanden ist, der die α -Untereinheit unter reduzierenden Bedingungen in Lösung halten kann, während dies durch die β -Untereinheit allein *in vitro* nicht erfüllt werden kann. John & Bulleid (1996) schlagen zur Ausübung dieser Funktion die Beteiligung des ER-Chaperons BiP vor, das unter den obengenannten experimentellen Bedingungen mit der α -Untereinheit Komplexe formt.

Die Bedingungen, unter denen die Prolyl-4-Hydroxylase aus baculovirus-infizierten Insektenzellen gereinigt wurde, waren mit einer DTT-Konzentration von 10 μ M schwach reduzierend. Diese schwach reduzierenden Bedingungen wurden auch gewählt, um bei der Isolierung die Bildung von falschen Disulfidbrücken zu verhindern (Tudermann *et al.*, 1975). In dieser Arbeit wurde die Prolyl-4-Hydroxylase sowohl unter nicht reduzierenden als auch unter diesen schwach reduzierenden Bedingungen untersucht. Bei der zur Verfügung gestellten Charge der Prolyl-4-Hydroxylase traten neben dem reinen Tetramer auch geringe Mengen an nicht abzentrifugierbaren Aggregaten (Eppendorffzentrifuge, 14000 Upm) oder höheren Oligomeren, sowie ein gewisser Anteil an freier PDI auf. Dabei konnte beobachtet werden, dass der PDI-Peak unter nicht-reduzierenden Bedingungen (0 mM DTT) bei ca. 17,8 min eluierte, während durch Zugabe von 10 μ M DTT eine leichte Verschiebung des Peaks zu 18,1 min erfolgte. Es ist zu vermuten, dass leicht reduzierende Bedingung zwar

keinen Einfluss auf die Integrität der PDI haben, dennoch aber geringe Strukturänderungen mit sich bringen, die in einer späteren Retentionzeit bei der analytischen Gelfiltration resultieren. Trotzdem hatten diese Bedingungen, gemäß der Gelfiltration, keinen Einfluss auf die Integrität der Tetramere.

Entsprechend der oben dargestellten Reduktion lässt sich die β -Untereinheit unter reduzierenden Bedingungen von der α -Untereinheit abtrennen. Zunächst war zu vermuten, dass die β -Untereinheit unter den gegebenen Bedingungen vollständig in Lösung bleibt, so dass sich die gebildeten Aggregate nur aus der α -Untereinheit zusammensetzen. Dies wurde jedoch widerlegt. Es zeigte sich, dass zwar einerseits im löslichen Überstand nur die reine β -Untereinheit vorlag, andererseits die Aggregate aber sowohl aus der α - als auch aus der β -Untereinheit bestanden. Dies lässt darauf schließen, dass die Struktur der PDI durch die stark reduzierenden Bedingungen doch zu einem gewissen Anteil gestört ist, so dass ein Teil der freigesetzten PDI-Moleküle aggregierte oder dass die PDI z.T. noch an die α -Untereinheit gebunden ist und somit in die Aggregate eingelagert wird. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass auch ein geringer Teil der PDI bei der Koexpression beider Untereinheiten in Insektenzellen in Aggregaten vorliegt (John & Bulleid, 1996).

Eine vollständige Trennung der beiden Untereinheiten konnte vielmehr durch Denaturierung mit Harnstoff und eine anschließende chromatographische Trennung durchgeführt werden. Dabei wurden die Disulfidbrücken nicht reduziert, um für die anschließende Renaturierung den Schritt der Disulfidbrückenbildung zu vermeiden und eine erleichterte Assoziation der beiden Untereinheiten zu ermöglichen.

Im Gegensatz zur Dissoziation oligomerer Proteine, die einen unimolekularen Prozess darstellt, bedarf die Rückassemblierung der Oligomere bimolekularer Assoziationsschritte (Rudolph *et al.*, 1997). So kann die Rückfaltung der Oligomere einerseits durch unimolekulare Faltungsvorgänge (auf der Ebene der Mono- oder Oligomere) aber auch durch bimolekulare Assemblierungsreaktionen (oder beides) maßgeblich bestimmt sein, so dass sich sehr komplexe Voraussetzung für eine erfolgreiche Rückfaltung ergeben.

Um zunächst das Verhalten der einzelnen Untereinheiten der Prolyl-4-Hydroxylase unter Renaturierungsbedingungen zu untersuchen, wurden diese zunächst getrennt analysiert. Dabei zeigte sich, dass die harnstoffdenaturierte β -Untereinheit unter den gegebenen Renaturierungsbedingungen in der Lage ist, ihre korrekte Konformation wiederzuerlangen und somit in Lösung zu bleiben. Zusätzlich zu der dimeren PDI wurde eine weitere definierte Spezies nachgewiesen, die mit einer Elutionszeit von 15,2 min eluierte und scheinbar eine höhere oligomere Form (Tetramer) der PDI darstellt. Diese Beobachtung korrespondiert mit Experimenten von Yu *et al.* (1994), die bei Gelfiltrationsanalysen neben dimeren auch tetramere Spezies der PDI nachweisen konnten.

Im Gegensatz dazu konnte die α -Untereinheit in Abwesenheit der β -Untereinheit unter diesen Bedingungen nicht rückgefaltet werden. Vielmehr aggregierte sie sofort und konnte nicht mehr mittels analytischer Gelfiltration nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der *in vivo*-Beobachtung, dass die α -Untereinheit bei alleiniger Expression in Insektenzellen in Form von inaktiven, unlöslichen Aggregaten vorliegt (Helaakoski *et al.*, 1995). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für die Löslichkeit der α -Untereinheit *in vivo* verschiedene Voraussetzungen erörtert: erstens scheint die Löslichkeit abhängig von der Existenz korrekter Disulfidbrücken zu sein, zweitens ist die Anwesenheit der β -Untereinheit (PDI) erforderlich und drittens scheinen lösliche ER-Proteine (z.B. BiP, John & Bulleid, 1996) bei der Synthese und der Faltung des Tetramers notwendig zu sein.

Neben der Anwesenheit der β -Untereinheit und bestimmter ER-Proteine scheint auch die Expression von Kollagen, dem natürlichen Substrat der Prolyl-4-Hydroxylase, für die Faltung der α -Untereinheit und die Assemblierung des Tetramers essentiell zu sein, wie bei der Koexpression der beiden Untereinheiten mit Prokollagen in *Pichia pastoris* gezeigt wurde (Vuorela *et al.*, 1997). Es ist jedoch noch nicht geklärt, welchen Einfluss Prokollagen dabei ausübt und es bleibt fraglich, ob Prokollagen einen positiven Einfluss auf die *in vitro*-Rückfaltung des Prolyl-4-Hydroxylase Tetramers hätte.

Neben der Inkubation der einzelnen Untereinheiten unter Rückfaltungsbedingungen wurden auch beide Untereinheiten gemeinsam eingesetzt. Auch hier zeigte sich, wie bei der alleinigen Inkubation der α -Untereinheit, dass diese unter den Standardpufferbedingungen (50 M Tris, pH 8,0) sofort aggregierte, so dass keine Interaktion mit der β -Untereinheit stattfinden konnte. Wurden die beiden Untereinheiten jedoch in 1 M Arginin, pH 8,0 inkubiert, so konnten Komplexe zwischen der α - und der β -Untereinheit detektiert werden, die jedoch entsprechend ihrer Elutionszeit bei der analytischen Gelfiltration nicht dem $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer entsprachen.

Durch den Einfluss von Arginin, dem die Fähigkeit zur Stabilisierung von Intermediaten zugeschrieben wird (Buchner & Rudolph, 1991; Brinkmann *et al.*, 1992; Lin & Traugh, 1993), kam es offensichtlich zur Stabilisierung von Faltungsintermediaten der ansonsten leicht aggregierenden α -Untereinheit. Derart stabilisiert konnten diese scheinbar mit der β -Untereinheit interagieren und nachweisbare Komplexe bilden.

Stabilisierte Intermediate können, durch Dialyse gegen einen Nativpuffer, im Idealfall in den nativen Zustand überführt werden. Diese Situation lag jedoch hier nicht vor und es kam durch die Dialyse nicht zu einer Ausbildung nativer Untereinheiten und letztlich nicht zur Ausbildung von Tetrameren. Dies spricht dafür, dass die Rückfaltung insbesondere der α -Untereinheit, und die Oligomerisierung derart komplex sind, dass sie unter den gegebenen Bedingungen nicht durchführbar waren.

Die Variation der Verhältnisse, in denen die beiden Untereinheiten eingesetzt wurden lieferte zwar, unerwarteter Weise bei Überschuss der leicht aggregierenden α -Untereinheit, eine Er-

höhung des Anteils an α/β -Komplexen, aber auch die so entstandenen Komplexe konnten nach Dialyse gegen Standardpuffer nicht in Tetramere überführt werden. Außerdem wäre zu erwarten gewesen, dass ein Überschuss der löslichen β -Untereinheit (zumindest unter stabilisierenden Bedingungen) einen positiven Einfluss auf die Komplexbildung zwischen α - und β -Untereinheit hätte, was hier jedoch nicht der Fall war.

Liganden wie Kofaktoren, Substrate oder spezifische Ionen spielen eine bedeutende Rolle bei der Stabilisierung der Proteinstruktur. So hängt für zahlreiche Proteine die Erlangung des funktionellen Zustandes von der Anwesenheit von Metallionen ab. Dabei wird vermutet, dass diese die Strukturbildung entweder durch die Beschleunigung eines geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes oder durch die Stabilisierung eines Faltungsintermediates oder des nativen Proteins beeinflussen (Rudolph *et al.*, 1997).

Im Falle der Prolyl-4-Hydroxylase wird Fe^{2+} als Kofaktor für die Aktivität benötigt. Dabei werden zwei Fe^{2+} -Ionen pro Tetramer gebunden (de Jong & Kemp, 1982), die vermutlich jedes in der entsprechenden Taschen einer α -Untereinheit lokalisiert ist (Hanuske-Abel, 1991). Die Koordinierung der Eisenionen erfolgt wahrscheinlich über zwei konservierte Histidin- und einen Asparaginsäurerest (Myllyharju & Kivirikko, 1997).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe von Fe^{2+} -Ionen zum Renaturierungsansatz (und anschließende Dialyse gegen einen Nativpuffer) neben der Rückfaltung der β -Untereinheit auch zu einer Assoziation der α - und β -Untereinheiten kam. Der entstehende Komplex war in seinem Laufverhalten fast identisch zum nativen Tetramer. Es lässt sich daraus schließen, dass die Interaktion der beiden Untereinheiten im Renaturierungsansatz ohne den entsprechenden Kofaktor nicht ausreichte, um eine Bildung des vollständigen Tetramers zu erreichen. Erst durch Zugabe der Eisenionen konnte es so zu einer Stabilisierung der α -Untereinheit und somit zur Vermeidung von Aggregationsreaktionen kommen. Die so durchgeführten Renaturierungsansätze könnten einen deutlichen Schritt in Richtung quantitative Renaturierung des Prolyl-4-Hydroxylase-Tetramers z.B. aus *E. coli*-inclusion bodies darstellen.

4 Zusammenfassung

Alle eukaryotischen Zellen besitzen ein ausgedehntes Membransystem, das Endoplasmatische Retikulum (ER), das als Eintrittspunkt für Proteine in den sekretorischen Weg gilt. Etwa ein Drittel aller zellulären Proteine werden in das Lumen des ER transloziert, wo post-translationale Modifikationen, Faltung und Oligomerisierung der Proteine erfolgen. Dafür bietet das ER ein einzigartiges oxidierendes Milieu für die Faltung von Membranproteinen und disulfidverbrückter Proteine.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Vermögen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression, Strukturbildung und Sekretion heterologer Proteine untersucht. Als Modells substrat diente dabei der monoklonale Antikörper MAK33 aus Maus, der gegen die menschliche Kreatinkinase gerichtet ist. Er wurde in zahlreichen Studien zur Stabilität und Faltung von Antikörpern eingesetzt. Antikörper sind aus je zwei leichten und zwei schweren Ketten zusammengesetzt. Ihre Faltung stellt einen komplexen Prozess dar und ist neben der Oligomerisierung durch Disulfidverbrückungen und Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungen gekennzeichnet.

Nach Koexpression der leichten und der schweren Kette (bzw. der leichten Kette und des Fd-Fragmentes) von MAK33 in verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen konnte das intrazelluläre Vorkommen, und somit eine erfolgte Produktion, der beiden Ketten nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass neben der Existenz von löslichen Antikörperketten auch ein Großteil der Ketten (ca. 50 %) unlöslich in den Zellen vorlag. Aggregationsprozesse innerhalb des Cytosols könnten dabei durch eine Überlastung des Translokationsapparates bzw. durch eine mangelhafte Bindung der für die Expression verwendeten Invertasesequenz (in Kombination mit den Antikörperketten) an den *signal recognition particle* (SRP) begründet werden. Ein gewisser Anteil der Antikörperketten verblieb somit im Cytosol, wo sie, auf Grund der dort herrschenden Bedingungen, nicht korrekt falten konnten und in Form von Aggregaten abgelagert wurden. Der andere Teil der exprimierten Antikörperketten konnte jedoch in das ER transloziert werden, wo die Abspaltung der Signalsequenz zumeist erfolgreich durchgeführt wurde.

Die anschließende Sekretion der Ketten (über den Goligi-Apparat, sekretorische Vesikel und die Plasmamembran) konnten sowohl für die leichte als auch die schwere Kette nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass zwar beide Ketten (z.T. fragmentiert) in geringen Mengen in das Medium abgegeben wurden, dennoch konnte keine Aktivität der sezernierten Ketten dokumentiert werden. Dies lässt auf eine inkorrekte Faltung der Ketten bzw. die Unfähigkeit zur Zusammenlagerung zu korrekt gefalteten Antikörpermolekülen schließen. Darüberhinaus deutet dies darauf hin, dass die Qualitätskontrolle des ER der Hefe nicht dafür optimiert ist, die Sekretion fehlerhaft assemblierter Antikörpermoleküle zu verhindern, wie es bei Säugern der Fall ist.

Auch durch Koexpression von BiP (dem Kar2-Homologen aus Säugern), dessen Aktivität in Säugerzellen für die Faltung von Antikörpern essentiell ist, sowie des Transkriptionsfaktors Hac1, der das Anschalten der *unfolded protein response* (UPR) bewirken sollte, konnte keine Erhöhung der Löslichkeit und keine Sekretion korrekt gefalteter Antikörperketten erreicht werden.

Durch Fusion eines *Strep*-tags an die Antikörperketten konnte eine deutliche Verbesserung der Sekretion von Antikörperketten erreicht werden (bis zu ca. 20 µg/l). Es wird vermutet, dass der *Strep*-tag, der ursprünglich für eine Verbesserung der Reinigung der Antikörperketten vorgesehen war, in diesem Fall als Löslichkeitstag fungierte und somit die Aggregations- und Degradationsprozesse der Ketten hemmte und andererseits durch die verbesserte Löslichkeit zu einer höheren Sekretionsrate führte.

Insgesamt wurde gezeigt, dass die hier verwendeten Hefen in der Lage waren, Antikörperketten zu produzieren und in geringen Mengen (bis zu ca. 100 µg/l) zu sezernieren, wobei unter den gegebenen Bedingungen keine Sekretion aktiver Antikörper nachgewiesen werden konnte. Daraus lässt sich folgern, dass das zu untersuchende System nicht in der Lage war, die für die Antikörperfaltung erforderlichen komplexen Abläufe (Disulfidverbrückung, Oligomerisierung, Qualitätskontrolle etc.) korrekt durchzuführen. Wegen des einfachen Aufbaus der Hefe *S. cerevisiae* gegenüber höheren eukaryotischen Systemen ist zu erwarten, dass das stetig wachsende Wissen zur Physiologie und Genetik von *S. cerevisiae* in der Zukunft positiv eingesetzt werden kann. Gekoppelt an eine optimalen Regulierung der erforderlichen Faltungshelfer in der Zelle könnte so eine verbesserte Faltung der Antikörperketten und somit die Bildung aktiver Antikörpermoleküle erreicht werden, wie es bereits ansatzweise unter ähnlichen Bedingungen von anderer Seite gezeigt wurde.

Die Prolyl-4-Hydroxylase, ein Enzym des Endoplasmatischen Retikulums kollagensynthetisierender Zellen, stand im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit. Sie katalysiert unter Verwendung von Fe^{2+} , 2-Oxoglutarat, O_2 und Ascorbat die Bildung von 4-Hydroxyprolinen in Xaa-Pro-Gly Sequenzen in Kollagen; diese Modifikation spielt eine zentrale Rolle in der Kollagensynthese, da 4-Hydroxyprolinreste essentiell für die Faltung von neu synthetisierten Kollagen-Polypeptidketten zu Kollagen-Tripelhelices sind. In Vertebraten liegt das Enzym als $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer vor, wobei die β -Untereinheit identisch mit der Proteindisulfidisomerase (PDI) ist. Es wird vermutet, dass die PDI im Tetramer nicht als Disulfidisomerase dient, sondern notwendig ist, um die leicht aggregierenden α -Untereinheiten, die die aktiven Zentren des Proteins beherbergen, in einem aktiven und löslichen Zustand zu halten.

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Informationen zur Struktur und Stabilität der Prolyl-4-Hydroxylase bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, Aussagen über die Sekundärstruktur und die thermische und chemische Stabilität, z.T. im Vergleich mit der isolierten β -Untereinheit, zu machen und ferner den Oligomerisierungsgrad des Tetramers in Abhängigkeit von der reduzierenden Umgebung zu analysieren.

Bisher war es auf Grund der starken Aggregationsneigung der isolierten α -Untereinheit nicht gelungen, eine Rückfaltung des Tetrameres aus den einzelnen Untereinheiten zu erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst, basierend auf den vorhergehenden Ergebnissen, verschiedene Versuche zur Trennung der Untereinheiten unternommen. Diese reinen Untereinheiten wurden dann in den sich anschließenden Renaturierungsansätzen eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Untereinheiten (insbesondere bei einem Überschuss der α -Untereinheit) unter Renaturierungsbedingungen in 1 M Arginin miteinander interagieren, dass aber diese Intermediate bei Dialyse in einen Standardpuffer keinen Bestand hatten. Erst durch Zugabe des Kofaktors Fe^{2+} konnte eine Interaktion der Untereinheiten erzielt werden, die auch nach der Dialyse bestand hatte. Inwieweit diese Komplexe Prolylhydroxylaseaktivität aufweisen, konnte zur Zeit noch nicht geklärt werden, sollte aber nach Optimierung und *upscaling* der Bedingungen möglich sein.

5 Literatur

- Abdel-Salam, H.A., El-Khamissy, T., Enan, G.A. & Hollenberg, G.P. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 157-164
- Abrams, C., Deng, Y.J., Steiner, B., O'Toole, T. & Shattil, S.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18781-18788
- Ames, R.S., Tornetta, M.A., Deen, K., Jones, C.S., Swift, A.M. & Ganguly, S. (1995) *J. Immunol. Methods* **184**, 177-186
- Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A. & Burn, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1048-1052
- Amzel, L.M. & Poljak, R.J. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 961-993
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. & White, F.H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1309-1314
- Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-230
- Annunen, P., Helaakoski, T., Myllyharju, J., Veijola, J., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17342-17348
- Argon, Y. & Simen, B.B. (1999) *Cell Dev. Biol.* **10**, 495-505
- Armstrong, N., De Lencastre, A. & Gouaux, E. (1999) *Protein Sci.* **8**, 1475-1483
- Augustine, J.G., de La Calle, A., Knarr, G., Buchner, J. & Frederick, C.A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3287-3294
- Baldwin, R.L. (1995) *J. Biomol. NMR* **5**, 103-109
- Bam, N.B., Cleland, J.L. & Randolph, T.W. (1996) *Biotechnol. Prog.* **12**, 801-809
- Bardwell, J.C., Lee, J.O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1038-1042
- Bardwell, J.C.A. (1994) *Mol. Microbiol.* **14**, 199-205
- Becker, J. & Craig, E.A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 11-23
- Beissinger, M. & Buchner, J. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 245-259
- Bender, E., Woof, J.M., Atkin, J.D., Barker, M.D., Bebbington, C.R. & Burton, D.R. (1993) *Hum. Antibodies Hybridomas* **4**, 74-79
- Benvenuto, E., Ordas, R.J., Tavazza, R., Ancora, G., Biocca, S., Cattaneo, A. & Galeffi, P. (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 865-874
- Berg, R.A., Olsen, B.R. & Kivirikko, K.I. (1972) *Fed. Proc.* **31**, 479
- Berg, R.A., Kedersha, N.L. & Guzman, N.A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 3111-3118
- Bergman, L.W. & Kuehl, M.W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5690-5694
- Better, M., Cheng, C.P., Robinson, R.R. & Horowitz, A.H. (1988) *Science* **240**, 1041-1043
- Biederer, T., Volkwein, C. & Sommer, T. (1997) *Science* **278**, 1806-1809
- Biemans, R., Thines, D., Petre-Parent, B., De Wilde, M., Rutgers, T. & Cabezon, T. (1992) *DNA Cell Biol.* **11**, 621-626
- Blanco, F.J., Rivas, G. & Serrano, L. (1994) *Nature Struct. Biol.* **1**, 535-542
- Blond-Elguindi, S., Fouric, A.M., Sambrook, J.F. & Gething, M.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12730-12735
- Bonifacino, J.S. & Weissman, A.M. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 19-57
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A. & Wolf, D.H. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 209-222

- Bork, P., Hahn, L. & Sander, C.** (1994) *J. Mol. Biol.* **242**, 309-320
- Bornstein, P., Horlein, D., McPherson, J., Sandmeyer, S. & Gallis, B.** (1982) in: *New Trends in Basement Membrane Research*, Kühn, K., Schoene, H. & Timpl, R. (Hrsg.), Raven Press, New York
- Bowden, G.A. & Georgiou, G.** (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16760-16766
- Bowdish, K., Tang, Y., Hicks, J.B. & Hilvert, D.** (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11901-11908
- Bradford, M.M.** (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Branch, J.R., Strathern, J.N. & Hicks, J.B.** (1979) *Gene* **8**, 121
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R. & Brennan, M.** (1975) *Biochemistry (Mosc.)* **14**, 4953-4963
- Brinkmann, U., Buchner, J. & Pastan, I.** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3075-3079
- Brodsky, J.L. & McCracken, A.A.** (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 507-513
- Bruyns, A.M., De Jaeger, G., De Neve, M., De Wilde, C., Van Montagu, M. & Depicker, A.** (1996) *FEBS Lett.* **386**, 5-10
- Buchner, J.** (1987) Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Buchner, J. & Rudolph, R.** (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 157-161
- Buchner, J.** (1996) *FASEB J.* **10**, 10-19
- Buchner, J.** (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 136-141
- Buckel, P., Hübner-Parajz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H. & Beaucamp, K.** (1987) *Gene* **51**, 13-19
- Buckholz, R.G. & Gleeson, M.A.** (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 1067-1072
- Bukau, B. & Horwich, A.L.** (1998) *Cell* **92**, 351-366
- Burgman, P.W. & Konings, A.W.** (1992) *J. Cell. Physiol.* **153**, 88-94
- Bücheler, U.** (1989) Diplomarbeit, Universität Stuttgart
- Camacho, C.J. & Thirumalai, D.** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6369-6372
- Canfield, S.M. & Morrison, S.L.** (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 1483-1491
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R.** (1980) in: *Biophysical Chemistry 2*, W.H. Freeman & Co, San Francisco, 374-451
- Carlson, M. & Botstein, D.** (1982) *Cell* **28**, 145-154
- Chavany, C., Mimnaugh, E., Miller, P., Bitton, R., Nguyen, P., Trepel, J., Whitesell, L., Schnur, R., Moyer, J. & Neckers, L.** (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4974-4977
- Chevet, E., Jakob, C.A., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M.** (1999) *Cell Dev. Biol.* **10**, 473-480
- Choudary, P.V., Kamita, S.G. & Maeda, S.** (1995) *Methods Mol. Biol.* **39**, 243-264
- Clarke, J., Cota, E., Fowler, S.B. & Hamill, S.J.** (1999) *Structure* **7**, 1145-1153
- Collier, N.C. & Schlesinger, M.J.** (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 1495-1507
- Conrad, U., Becker, K., Ziegner, M. & Walter, G.** (1991) *Mol. Immunol.* **28**, 1201-1209
- Cooper, T. G.** (Hrsg.) (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden*, de Gruyter, Berlin
- Coote, P.J., Cole, M.B. & Jones, M.V.** (1991) *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1701-1708
- Cox, J.S., Shamu, C.E. & Walter, P.** (1993) *Cell* **73**, 1197-1206
- Cox, J.S. & Walter, P.** (1996) *Cell* **87**, 391-404
- Cregg, J.M. & Higgins, D.R.** (1995) *Can. J. Bot.* **73**, 891-897

- Cregg, J.M.** (1999) in: *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Fernandez, J.M. & Hoeffler, J.P. (Hrsg.), Academic Press, San Diego, USA, 157-191
- Creighton, T.E.** (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 83-106
- Cremer, A., Knittler, M.R. & Haas, I.G.** (1993) *Biol. Chem.* **374**, 224
- Da Silva, N.A. & Bailey, J.E.** (1991) *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 309-317
- Davies, D.R. & Metzger, H.** (1983) *Ann. Rev. Immunol.* **1**, 87-117
- Davis, D.P., Khurana, R., Meredith, S., Stevens, F.J. & Argon, Y.** (1999) *J. Immunol.* **163**, 3842-3850
- Davis, G.T., Bedzyk, W.D., Voss, E.W. & Jacobs, T.W.** (1991) *Biotechnology* **9**, 165-169
- De Bernadez Clark, E.** (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 157-163
- De Jong, L. & Kemp, A.** (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **709**, 142-145
- De Vergilio, C., Burckert, N., Barth, G., Neuhaus, J.M., Boller, T. & Wiemken, A.** (1992) *Yeast* **8**, 1043-1051
- Deisenhofer, J.** (1981) *Biochemistry (Mosc).* **20**, 2361-2370
- Dill, K.A. & Chan, H.S.** (1997) *Nature Struct. Biol.* **4**, 10-19
- Eckart, M.R. & Bussineau, C.M.** (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 525-530
- Edqvist, J., Keranen, S., Penttila, M., Straby, K.B. & Knowles, J.K.** (1991) *J. Biotechnol.* **20**, 291-300
- Ehrnsperger, M., Gaestel, M. & Buchner, J.** (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A.L. & Goto, Y. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 533-575
- Eldin, P., Pauza, M.E., Hieda, Y., Lin, G., Murtaugh, M.P., Pentel, P.R. & Pennell, C.A.** (1997) *J. Immunol. Methods* **201**, 67-75
- Ellis, J.** (1987) *Nature* **328**, 378-379
- Ellis, R.J. & van der Vies, S.M.** (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 321-347
- Fairbanks, G., Streck, T.L. & Wallach, D.F.H.** (1971) *Biochemistry (Mosc).* **10**, 2606-2617
- Feldheim, D., Rothblau, J. & Schekman, R.** (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3288-3296
- Fernandez, F.S., Trombetta, S.E., Hellman, U. & Parodi, A.J.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30701-30706
- Ferreira, L.R., Norris, K., Smith, T., Hebert, C. & Sauk, J.J.** (1994) *J. Cell. Biochem.* **56**, 518-526
- Fiedler, U. & Conrad, U.** (1995) *Biotechnology (N.Y.)* **13**, 1090-1093
- Finkelstein, A.V.** (1991) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **9**, 23-27
- Firek, S., Draper, J., Owen, M.R., Gandecha, A., Cockburn, B. & Whitelam, G.C.** (1993) *Plant Mol. Biol.* **23**, 861-870
- Fischer, G. & Schmid, F.X.** (1990) *Biochemistry (Mosc).* **29**, 2205-2212
- Fischer, G.** (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1415-1436
- Fleischmajer, R., Olsen, B. R., & Kühn, K.** (Hrsg.) (1985) *Biology, Chemistry and Pathology of Collagen*, Bd. 260, Ann. N.Y. Acad. Sci., New York
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S.** (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 83-88
- Flynn, G.C., Pohl, J., Flocco, M.T. & Rothman, J.E.** (1991) *Nature* **353**, 726-730
- Forood, B., Feliciano, E.J. & Nambiar, K.P.** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 838-842

- Fouser, L.A., Swanberg, S.L., Lin, B.Y., Benedict, M., Kelleher, K., Cumming, D.A. & Riedel, G.E.** (1992) *Biotechnology (N.Y.)* **10**, 1121-1127
- Frand, A.R. & Kaiser, C.A.** (1999) *Mol. Cell* **4**, 469-477
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W. & Kaiser, C.A.** (2000) *Trends Cell Biol.* **10**, 203-210
- Freedman, R.B.** (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**, 438-441
- Freedman, R.B.** (1991) in: *Conformation and Forces in Protein Folding*, Nall, B.T. & Ill, K.A. (Hrsg.), American Association for the Advancement of Sciences, Washington, D.C., 204-214
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. & Tuite, M.F.** (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 331-336
- Futcher, A.B. & Cox, B.S.** (1984) *J. Bacteriol.* **157**, 283-290
- Gaut, J.R. & Hendershot, L.M.** (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7248-7255
- Geetha-Habib, M., Noiva, R., Kaplan, H.A. & Lennarz, W.J.** (1988) *Cell* **54**, 1053-1060
- Gellissen, G., Hollenberg, C.P. & Janowicz, Z.A.** (1995) *Bioprocess Technol.* **22**, 195-239
- Gellissen, G. & Hollenberg, C.P.** (1997) *Gene* **190**, 87-97
- Georgopoulos, C. & Welch, W.J.** (1993) *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 601-634
- Gething, M.J. & Sambrook, J.F.** (1992) *Nature* **355**, 33-45
- Gething, M.J., Blond-Elguindi, S., Mori, K. & Sambrook, J.F.** (1994) in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 111-135
- Gething, M.J.** (1999) *Cell Dev. Biol.* **10**, 465-472
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H.** (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326
- Glick, B. R. & Pasternack, J. J.,** (Hrsg.) (1998) *Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 2. Ausgabe, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Glover, J.R., Schirmer, E.C., Singer, M.A. & Lindquist, S.L.** (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A.L. & Goto, Y. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 193-224
- Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. & Lorimer, G.H.** (1989) *Nature* **337**, 44-47
- Goto, Y. & Hamaguchi, K.** (1982) *J. Mol. Biol.* **156**, 891-910
- Goto, Y. & Hamaguchi, K.** (1982) *J. Mol. Biol.* **156**, 911-926
- Haas, I.G. & Wabl, M.** (1983) *Nature* **306**, 387-389
- Haase-Pettingel, H. & King, J.** (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4977-4983
- Hagihara, Y. & Goto, Y.** (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A.L. & Goto, Y. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 1-33
- Hamman, B.D., Hendershot, L.M. & Johnson, A.E.** (1998) *Cell* **92**, 747-758
- Hammond, C. & Helenius, A.** (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 41-52
- Hammond, C., Braakman, I. & Helenius, A.** (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 913-917
- Hammond, C. & Helenius, A.** (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523-529
- Hanahan, D.** (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580
- Hanahan, D.** (1985) in: *DNA cloning I*, Glover, D.M. (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 109-135
- Hanauske-Abel, H.M.** (1991) *J. Hepatol.* **13**, S8-15
- Hanes, J., Jermutus, L., Weber-Bornhauser, S., Bosshard, H.R. & Plückthun, A.** (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14130-14135

- Hao, M.-H. & Scheraga, H.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4984-4989
- Harrison, S.C. & Durbin, R. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4028-4030
- Hartl, F.U. (1996) *Nature* **381**, 571-580
- Hartl, F.U. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 235-237
- Hasslacher, M., Schall, M., Hayn, M., Bona, R., Rumbold, K., Lückl, J., Griengl, H., Kohlwein, S.D. & Schwab, H. (1997) *Protein Expr. Purif.* **11**, 61-71
- Hebert, D.N., Simons, J.F., Peterson J.R. & Helenius, A. (1995) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**, 405-415
- Helaakoski, T., Vuori, K., Myllylä, R., Kivirikko, K.I. & Pihlajaniemi, T. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4392-4396
- Helaakoski, T., Annunen, P., Vuori, K., MacNeil, I.A., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4427-4431
- Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N. & Simons, J.F. (1997) *Trends Cell Biol.* **7**, 193-200
- Hendershot, L., Bole, D., Kohler, G. & Kearney, J.F. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 761-767
- Hendershot, L., Wei, Y., Gaut, J.R., Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5269-5274
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988) *Elektrophoresis* **9**, 28-32
- Hiatt, A.C., Cafferkey, R. & Bowdish, K. (1989) *Nature* **342**, 76-78
- Hiller, M., Finger, A., Schweiger, M. & Wolf, D.H. (1996) *Science* **273**, 1725-1728
- Hitzemann, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer, G. & Hall, B.D. (1981) *Nature* **293**, 717-722
- Hoffmann, F., Posten, C. & Rinas, U. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 315-322
- Hong, E., Davidson, A.R. & Kaiser, C.A. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 623-633
- Honjo, T., Alt, F. W., & Rabbitts, T. H., (Hrsg.) (1989) *Immunoglobulin genes*, Academic Press, New York
- Horwich, A.L. & Weissmann, J.S. (1997) *Cell* **89**, 499-510
- Horwitz, A.H., Chang, C.P., Better, M., Hellstrom, K.E. & Robinson, R.R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8678-8682
- Hsu, T.A., Eiden, J.J., Bourgarel, P., Meo, T. & Betenbaugh, M.J. (1994) *Protein Expr. Purif.* **5**, 595-603
- Hudson, P.J. (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 395-402
- Hurtley, S.M. & Helenius, A. (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**, 277-307
- Huston, J.S., McCartney, J., Tai, M.S., Mottola-Hartshorn, C., Jin, D., Warren, F., Keck, P. & Oppermann, H. (1993) *Int. Rev. Immunol.* **10**, 195-217
- Ikai, A. & Tanford, C. (1971) *Nature* **230**, 100-102
- Isenman, D.E., Lancet, D. & Pecht, I. (1979) *Biochemistry (Mosc)*. **18**, 3327-3336
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**, 117-237
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry (Mosc)*. **30**, 3147-3161
- Jaenicke, R. & Buchner, J. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* **4**, 1-30
- Jaenicke, R. (1996) *Curr. Top. Cell. Regul.* **34**, 209-314
- Jaenicke, R. & Seckler, R. (1997) *Adv. Protein Chem.* **50**, 1-59
- Jaenicke, R. (1999) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**, 155-241
- Jakob, C.A., Burda, P., Roth, J. & Aebi, M. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 1223-1233

- Jakob, U. & Buchner, J.** (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 205-211
- Janeway, C. A. & Travers, P.**, (Hrsg.) (1997) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin
- Jarvis, D.L., Oker-Blom, C. & Summers, M.D.** (1990) *J. Cell Biol.* **42**, 181-191
- John, D.C., Grant, M.E. & Bulleid, N.J.** (1993) *EMBO J.* **12**, 1587-1595
- John, D.C. & Bulleid, N.J.** (1996) in: *Connective Tissue and its Heritable Disorders. Molecular, Genetic and Medical Aspects*, Royce, P.M. & Steinman, B. (Hrsg.), Wiley-Liss, New York, 103-147
- Kabani, M., Beckerich, J.M. & Gaillardin, C.** (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 6923-6934
- Kabat, E. A.**, (Hrsg.) (1992) *Sequences of proteins of immunological interest*, Bd. 1, 5. Ausgabe, DIANE Publishing Co, USA
- Kaiser, C.A., Preuss, D., Grisafi, P. & Botstein, D.** (1987) *Science* **235**, 312-317
- Kaloff, C.R. & Haas, I.G.** (1995) *Immunity* **2**, 629-637
- Kamasawa, N., Yoshida, N.T., Ueda, M., Tanaka, A. & Osumi, M.** (1999) *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. **48**, 173-176
- Karplus, M. & Weaver, D.L.** (1994) *Protein Sci.* **3**, 650-668
- Karplus, M. & Sali, A.** (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 58-73
- Kaufman, R.J.** (1999) *Genes Dev.* **13**, 1211-1233
- Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K.** (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 1845-1862
- Kelley, W.L.** (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 222-227
- Kelly, J.W.** (1996) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 11-17
- Kemmink, J., Darby, N.J., Kijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T.E.** (1997) *Curr. Biol.* **7**, 239-245
- Khazaeli, M.B., Conry, R.M. & LoBuglio, A.F.** (1994) *J. Immunother.* **15**, 42-52
- Khyse-Anderson, J.** (1984) *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H. & Buchner, J.** (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 825-829
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L.** (1990) *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 631-660
- King, D.J., Byron, O.D., Mountain, A., Weir, N., Harvey, A., Lawson, A.D., Proudfoot, K.A., Baldock, D., Harding, S.E. & Yarranton, G.T.** (1993) *Biochem. J.* **290**, 723-729
- Kirkpatrick, R.B., Ganguly, S., Angelichio, M., Griego, S., Shatzman, A., Silverman, C. & Rosenberg, M.** (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19800-19805
- Kitchin, K., Lin, G., Shelver, W.L., Murtaugh, M.P., Pentel, P.R., Pond, S.M., Oberst, J.C., Humphrey, J.E., Smith, J.M. & Flickinger, M.C.** (1995) *J. Pharm. Sci.* **84**, 1184-1189
- Kivirikko, K.I. & Myllylä, R.** (1982) *Methods Enzymol.* **82**, 245-304
- Kivirikko, K.I., Myllylä, R. & Pihlajaniemi, T.** (1989) *FASEB J.* **3**, 1609-1617
- Kivirikko, K.I., Myllylä, R. & Pihlajaniemi, T.** (1992) in: *Post-Translational Modifications of Proteins*, Harding, J.J. & Crabbe, M.J.C. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, 1-51
- Kivirikko, K.I. & Pihlajaniemi, T.** (1998) *Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol.* **72**, 325-398
- Kjeldsen, T., Petterson, A.F., Hach, M., Diers, I., Havelund, S., Hansen, P.H. & Andersen, A.S.** (1997) *Protein Expr. Purif.* **9**, 331-336

- Knarr, G.** (1993) Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Knarr, G., Gething, M.J., Modrow, S. & Buchner, J.** (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27589-27594
- Knarr, G.** (1998) Dissertation, Universität Regensburg
- Knittler, M.R., Dirks, S. & Haas, I.G.** (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1764-1768
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K. & Wolf, D.H.** (1996) *EMBO J.* **15**, 753-763
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J.F., Gething, M.J. & Mori, K.** (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 877-890
- Koivu, J., Myllylä, R., Helaakoski, T., Pihlajaniemi, T., Tasanen, K. & Kivirikko, K.I.** (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6447-6449
- Kolodziej, P.A. & Young, R.A.** (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 508-519
- Konings, A.W.** (1988) *Recent Results Cancer Res.* **109**, 9-21
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S.** (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J. & Sambrook, J.F.** (1988) *Nature* **332**, 462-464
- Kretzschmar, T., Aoustin, L., Zingel, O., Marangi, M., Vonach, B., Towbin, H. & Geiser, M.** (1996) *J. Immunol. Methods* **195**, 93-101
- Kuwajima, K.** (1989) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **6**, 87-103
- Laemmli, U.K.** (1970) *Nature* **227**, 680-685
- Lal, A., Pang, P., Kalelkar, S., Romero, P.A., Herscovics, A. & Moremen, K.W.** (1998) *Glycobiology* **8**, 981-995
- Lamande, S.R. & Bateman, J.F.** (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 455-464
- Lamberg, A., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I.** (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 9926-9931
- Lee, A.S.** (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 267-273
- Lee, G.J., Pokala, N. & Vierling, E.** (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10432-10438
- Lee, Y.K., Brewer, J.W., Hellman, R. & Hendershot, L.M.** (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 2209-2219
- Leitzgen, K., Knittler, M.R. & Haas, I.G.** (1997) *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45
- Lesk, A.M. & Chothia, C.** (1982) *J. Mol. Biol.* **160**, 325-342
- Levinthal, C.** (1968) *J. Chim. Phys.* **65**, 44-45
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J.** (1993) *Protein Sci.* **2**, 1490-1496
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R.B. & Buchner, J.** (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14290-14296
- Lilie, H.** (1995) Dissertation, Universität Regensburg
- Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J.** (1995) *J. Mol. Biol.* **248**, 190-201
- Lilie, H. & Buchner, J.** (1995) *FEBS Lett.* **362**, 43-46
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R.** (1998) *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 497-501
- Lin, W.J. & Traugh, J.A.** (1993) *Protein Expr. Purif.* **4**, 256-264
- Lindquist, S.** (1997) *Cell* **89**, 495-498
- Lottspeich, F. & Zorbas, H.,** (Hrsg.) (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- Luo, D., Mah, N., Krantz, M., Wilde, K., Wishart, D., Zhang, Y., Jacobs, F. & Martin, L.** (1995) *J. Biochem. (Tokyo)*. **118**, 825-831

- Ma, L.C. & Anderson, S. (1997) *Biochemistry (Mosc)*. **36**, 3728-3736
- Makrides, S.C. (1996) *Microbiol. Rev.* **90**, 512-538
- Marston, F.A.O. (1986) *Biochem. J.* **240**, 1-12
- Martineau, P. & Betton, J.-M. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 921-929
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R. & Buchner, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29421-29425
- Mayer, M.P. & Bukau, B. (1998) *Biol. Chem.* **379**, 261-268
- McKay, D.B. (1993) *Adv. Protein Chem.* **44**, 67-80
- McMillan, D.R., Gething, M.J. & Sambrook, J.F. (1994) *Curr. Biol.* **5**, 540-545
- Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 21303-21306
- Melnick, J., Dul, J.L. & Argon, Y. (1994) *Nature* **370**, 373-375
- Misselwitz, B., Staeck, O. & Rapoport, T.A. (1998) *Mol. Cell* **2**, 593-603
- Mizuochi, T., Hamato, J. & Titani, K. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 387-394
- Moir, D.T. & Dumais, D.R. (1987) *Gene* **56**, 209-217
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.J. & Sambrook, J.F. (1992) *EMBO J.* **11**, 2583-2593
- Mori, K., Gething, M.J. & Sambrook, J.F. (1993) *Cell* **74**, 743-756
- Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (1994) in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1-30
- Morgan, A., Jones, N.D., Nesbitt, A.M., Chaplin, L., Bodmer, M.W. & Emtage, J.S. (1995) *Immunology* **86**, 319-324
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987) *Methods Enzymol.* **155**, 335-359
- Müller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P. & Dalbøge, H. (1998) *Yeast* **14**, 1267-1283
- Myllyharju, J., Lamberg, A., Notbohm, H., Fietzek, P.P., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 21824-21839
- Myllylä, R., Günzler, V., Kivirikko, K.I. & Kaska, D.D. (1992) *Biochem. J.* **286**, 923-927
- Nakanishi, H., Nakayama, K., Yokota, A., Tachikawa, H., Takahashi, N. & Jibami, Y. (2001) *Yeast* **18**, 543-554
- Nesbit, M., Fu, Z.F., McDonald-Smith, J., Steplewski, J. & Davidson, A.R. (1992) *J. Immunol. Methods* **151**, 201-208
- Nezlin, R., (Hrsg.) (1998) *The Immunoglobulins: Structure and Function*, Academic Press, New York
- Nishikawa, E. & Endo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12889-12892
- Noiva, R. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 481-493
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J. & Sambrook, J.F. (1989) *Cell* **57**, 1223-1236
- Nyssönen, E., Penttilä, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J.K.C. & Keränen, S. (1993) *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 591-595
- Olsen, B.R., Berg, R.A., Kivirikko, K.I. & Prockop, D.J. (1973) *Eur. J. Biochem.* **35**, 135-147
- Onuchic, J.N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P.G. (1997) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 545-600
- Page, M.J. & Sydenham, M.A. (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 64-68

- Parekh, R., Forrester, K. & Wittrup, D. (1995) *Protein Expr. Purif.* **6**, 537-545
- Parodi, A.J. (1998) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**, 601-614
- Parsell, D.A. & Lindquist, S. (1994) in: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 457-494
- Patriarca, E.J. & Maresca, B. (1990) *Exp. Cell Res.* **190**, 57-64
- Pihlajaniemi, T., Helaakoski, T., Tasanen, K., Myllylä, R., Huhtala, M.L., Koivu, J. & Kivirikko, K.I. (1987) *EMBO J.* **6**, 643-649
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) *Methods Enzymol.* **178**, 27-32
- Pollard, M.G. (1998) *Mol. Cell* **1**, 171-182
- Pollock, D.P., Kutzko, J.P., Birck-Wilson, E., Williams, J.L., Echelard, Y. & Meade, H.M. (1999) *J. Immunol. Methods* **231**, 147-157
- Pouyssegur, J., Shiu, R.P.C. & Pastan, I. (1977) *Cell* **11**, 941-947
- Pratt, W.B. & Toft, D.O. (1997) *Endocr. Rev.* **18**, 306-360
- Price, E.R., Zxdowsky, L.D., Jin, M., Baker, C.H., McKeon, F.D. & Walsh, C.T. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1903-1907
- Prockop, D.J. & Kivirikko, K.I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403-434
- Prouty, W.F. & Goldberg, A.L. (1972) *Nat. New Biol.* **240**, 147-150
- Prusiner, S.B. (1982) *Science* **1982**, 136-144
- Prusiner, S.B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13363-13383
- Ptitsyn, O.B. & Rashin, A.A. (1973) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **213**, 473-475
- Ptitsyn, O.B., Pain, R.H., Semisotnov, G.V., Zeriovnik, E. & Razgulyaev, D.I. (1990) *FEBS Lett.* **285**, 20-24
- Ptitsyn, O.B. (1991) *FEBS Lett.* **285**, 176-181
- Ptitsyn, O.B. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 376-379
- Radford, S. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**, 611-618
- Ramirez-Alvarado, M., Kortemme, T., Blanco, F.J. & Serrano, L. (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 93-103
- Richardson, J.S. (1981) *Adv. Protein Chem.* **34**, 176-339
- Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. & Gram, H. (1995) *Biotechnology (N.Y.)* **13**, 255-260
- Riethmüller, G., Schneider-Gadicke, E. & Johnson, J.P. (1993) *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 732-739
- Robinson, A.S. & Wittrup, K.D. (1995) *Biotechnol. Prog.* **11**, 171-177
- Roitt, I. M., (Hrsg.) (1991) *Essential Immunology*, 7. Ausgabe, Blackwell Scientific, Oxford
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J. (1992) *Yeast* **8**, 423-488
- Romanos, R. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 527-533
- Rose, J.K. & Doms, R.W. (1988) *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 257-288
- Rowe, E.S. & Tanford, C. (1973) *Biochemistry (Mosc.)* **12**, 4822-4827
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997) in: *Protein Function: A Practical Approach*, Creighton, T.E. (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 57-99
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1997) *EMBO J.* **16**, 1501-1507
- Salinovich, O. & Montelaro, R.C. (1986) *J. Biochem.* **98**, 1433-1440

- Sambrook, J. F., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.**, (Hrsg.) (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Schekman, R. & Novick, P.** (1982) in: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*, Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 361-393
- Schirmer, E.C., Glover, J.R., Singer, M.A. & Lindquist, S.** (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 289-296
- Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. & Silver, P.A.** (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 979-988
- Schmid, F.X.** (1992) in: *Protein Folding*, Creighton, T.E. (Hrsg.), Freeman, New York, 197-241
- Schmid, F.X.** (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins.*, Fink, A.L. & Goto, Y. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 361-389
- Schmid, F.X.** (1997) in: *Protein Structure: A Practical Approach*, Creighton, T.E. (Hrsg.), IRL Press, Oxford, 261-298
- Schmidt, T.G. & Skerra, A.** (1993) *Protein Eng.* **6**, 109-122
- Schmidt, T.G. & Skerra, A.** (1994) *J. Chromatogr. A.* **676**, 337-345
- Schneider, J.C. & Guarente, L.** (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 373-388
- Schrattenholz, A., Pfeiffer, S., Pejovic, V., Rudolph, R., Godovac-Zimmermann, J. & Maelicke, A.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32393-32399
- Shamu, C.E. & Walter, P.** (1996) *EMBO J.* **15**, 3028-3039
- Shortle, D.** (1996) *FASEB J.* **10**, 27-34
- Sidrauski, C., Cox, J.S. & Walter, P.** (1996) *Cell* **87**, 405-413
- Sidrauski, C. & Walter, P.** (1997) *Cell* **90**, 1-20
- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) *Science* **240**, 1038-1041
- Skerra, A. & Schmidt, T.G.** (1999) *Biomol. Eng.* **16**, 79-86
- Skerra, A. & Schmidt, T.G.** (2000) *Methods Enzymol.* **326**, 271-304
- Skowronek, M.H., Hendershot, L. & Haas, I.G.** (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1574-1578
- Sousa, M.C., Ferrero-Garcia, M.A. & Parodi, A.J.** (1992) *Biochemistry (Mosc).* **31**, 97-105
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. & Davis, R.W.** (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1035-1039
- Sumi, A. & Hamaguchi, K.** (1982) *J. Biochem.* **92**, 823-833
- Sun, L.K., Curtis, P., Rakowicz-Szulcynska, E., Ghrayeb, J., Chang, N., Morrison, S.L. & Koprowski, H.** (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 214-218
- Taniyama, Y., Kuroki, R., Omura, F., Seko, C. & Kikuchi, M.** (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 6456-6461
- Tao, M.-H. & Morrison, S.L.** (1989) *J. Immunol.* **143**, 2595-2601
- Thies, M.J.W., Mayer, J., Augustine, J.G., Frederick, C.A., Lilie, H. & Buchner, J.** (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 67-79
- Thomas, J.G., Ayling, A. & Baneyx, F.** (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197-238
- Thomas, P.J., Qu, B.H. & Pedersen, P.L.** (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.** (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354

- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockart, D.J., Weissmann, J.S. & Walter, P. (2000) *Cell* **101**, 249-258
- Tsong, T.Y., Baldwin, R.L. & Elson, E.L. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 2712-2715
- Tu, B.P., Ho-Schleyer, S.C., Travers, K.J. & Weissman, J.S. (2000) *Science* **290**, 1571-1574
- Tuderman, L., Kuutti, E.-R. & Kivirikko, K.I. (1975) *Eur. J. Biochem.* **52**, 9-16
- Turner, G.C. & Varshavsky, A. (2000) *Science* **289**, 2117-2120
- Umehayashi, K., Hirata, A., Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A. & Takagi, M. (1997) *Yeast* **13**, 1009-1020
- Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. & Hall, B.D. (1982) *Nature* **298**, 347-350
- Van Arsdell, J.N., Kwok, S., Schweichart, B.L., Ladner, M.B., Gelfand, D.H. & Innis, M.A. (1987) *Biotechnology (N.Y.)* **5**, 60-64
- Van den Hazel, H.B., Kielland-Brand, M.C. & Winther, J.R. (1996) *Yeast* **12**, 1-16
- Van Dongen, G. & van Wijk, R. (1988) *Radiat. Res.* **113**, 252-267
- Veijola, J., Koivunen, P., Annunen, P., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26746-26753
- Veijola, J., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1996) *Biochem. J.* **315**, 613-618
- Villarejo, M.R. & Zabin, I. (1974) *J. Bacteriol.* **120**, 466-474
- Vuorela, A., Myllyharju, J., Nissi, R., Pihlajaniemi, T. & Kivirikko, K.I. (1997) *EMBO J.* **16**, 6702-6712
- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Marttila, M. & Kivirikko, K.I. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7467-7470
- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Myllylä, R. & Kivirikko, K.I. (1992) *EMBO J.* **11**, 4213-4217
- Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J.D., Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19599-19610
- Ward, C.L., Omura, S. & Kopito, R.R. (1995) *Cell* **83**, 121-127
- Weidle, U.H., Borgya, A., Mattes, R., Lenz, H. & Buckel, P. (1987) *Gene* **51**, 21-29
- Welch, W.J. & Suhan, J.P. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 1198-1211
- Welch, W.J. & Suhan, J.P. (1986) *J. Cell Biol.* **103**, 2035-2052
- Wetlaufer, D.B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 697-701
- Wetterau, J.R., Combs, K.A., Spinner, S.N. & Joiner, B.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9801-9807
- Wetzel, R. (1997) in: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, Fink, A.L. & Goto, Y. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, 577-613
- Williams, A.F. & Barclay, A.N. (1988) *Ann. Rev. Immunol.* **6**, 381-405
- Wittrup, K.D., Robinson, A.S., Parekh, R.N. & Forrester, K.J. (1994) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **745**, 321-330
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N. & Thirumalai, D. (1995) *Science* **267**, 1619-1620
- Wood, C.R., Boss, M.A., Kenten, J.H., Calvert, J.E., Roberts, N.A. & Emtage, J.S. (1985) *Nature* **314**, 446-449
- Yao, Y., Zhou, Y. & Wang, C. (1997) *EMBO J.* **16**, 651-658
- Yon, J.M. (2001) *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 419-435

- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. & Mori, K.** (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 33741-33649
- Yu, X.C., Wang, C.C. & Tsou, C.L.** (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 109-113
- Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y. & Bergeron, J.J.M.** (1999) *Structure* **7**, R173-R182
- Zemel-Dreassen, O. & Zamir, A.** (1984) *Gene* **27**, 315-322
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R.** (1979) *Biochemistry (Mosc.)* **18**, 5567-5571
- Zhou, M. & Schekman, R.** (1999) *Mol. Cell* **4**, 925-934
- Zhou, P., Lugovskoy, A.A. & Wagner, G.** (2001) *J. Biomol. NMR* **20**, 11-14

6 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BiP	<i>heavy chain binding protein</i> (Immunoglobulin-schwere-Kette-Bindeprotein)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA
C _{H1}	erste konstante Domäne der schweren Antikörperkette
C _{H2}	zweite konstante Domäne der schweren Antikörperkette
C _{H3}	dritte konstante Domäne der schweren Antikörperkette
C _L	konstante Domäne der leichten Antikörperkette
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Antikörperfragment bestehend aus leichter Kette und den beiden N-terminalen Domänen der schweren Kette
Fc	Antikörperfragment bestehend aus den beiden C-terminalen Domänen der schweren Kette
Fd	Antikörperfragment bestehend aus den beiden N-terminalen Domänen der schweren Kette
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
Grp	Glukose reguliertes Protein
GSSG	oxidiertes L-Gluthation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Hitzeschockprotein
IB	„inclusion body“
Ig	Immunoglobulin
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thio-galactopyranosid
kDa	Kilodalton

M	Molar
mA	Milliampere
MAK33	monoklonaler Antikörper aus Maus (κ IgG1), gerichtet gegen die humane Kreatinkinase
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
4-PH	Prolyl-4-Hydroxylase
pI	isoelektrischer Punkt
PPI	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektro- phorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	Units (Enzymaktivität)
ÜN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V _H	variable Domäne der schweren Antikörperkette
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	Sichtbar
w/v	Gewicht pro Volumen

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1997 bis September 2001 am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg sowie am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Prof. Dr. Johannes Buchner danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Stellung des interessanten und herausfordernden Themas, die vielen Anregungen und das stetige Interesse an dieser Arbeit.

Ich danke dem Boehringer Ingelheim Fonds für die finanzielle Unterstützung, die stets herzliche Betreuung und die Möglichkeit, an zahlreichen interessanten und fröhlichen Seminaren teilzunehmen.

Dr. Leon Helfenbaum und Prof. Dr. Mary-Jane Gething von der University of Melbourne, Australien danke ich für die Bereitstellung von Plasmiden und Hefestämmen sowie für die zahlreichen guten Tipps.

Dr. Johanna Myllyharju und Prof. Dr. Kari Kivirikko von der University of Oulu, Finnland danke ich für die Bereitstellung der Prolyl-4-Hydroxylase und die Idee zur Bearbeitung des Prolyl-4-Hydroxylase-Themas.

Dr. Martina Beißinger und Dr. Stefan Walter, unseren beiden schlaun „Postdocs“, danke ich für ihre stete Bereitschaft, Probleme zu diskutieren und ihre zahllosen hilfreichen Ratschläge. Ich glaube, es gab keine Situation, in der Ihr nicht weiter helfen konntet.

Dr. Gerhard Knarr danke ich für die praktische und thematische Einführung in die Welt der Chaperone und Antikörper und auch für die Vermittlung der manchmal nicht leichten Einsicht, dass die Wissenschaft auch sehr herausfordernd und frustrierend sein kann.

Marcus Mayer danke ich dafür, dass er einfach da war und auch um die Tücken der Arbeit mit Antikörpern wusste.

Dr. Monika Ehrnsperger und den anderen Korrektoren danke ich für die gewissenhafte Durchsicht meiner Arbeit.

Meinen Praktikanten/innen und Hiwis sei für die tatkräftige Unterstützung gedankt.

Allen anderen gegenwärtigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ganz herzlich für das ausgezeichnete und persönliche Arbeitsklima danken, dass auch außerhalb des Labors bei Cocktails und dergleichen gepflegt wurde.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei Klaus von Herzen bedanken, der mich insbesondere im letzten Jahr meiner Doktorarbeit mit Tipps, Trost und guter Laune versorgt hat.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 19.09.2001