

Institut für Organische Chemie und Biochemie

Lehrstuhl für Biotechnologie

**Expression und Faltung von Antikörpern
im Cytoplasma von *E. coli* und Einfluss
von Faltungshelfern auf die Antikörperfaltung *in vitro***

Marcus Mayer

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. Thorsten Bach

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 27. Februar 2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 04. April 2003 angenommen.

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	4
1.1.4	Proteinfaltung im Endoplasmatischen Reticulum (ER)	5
1.2	Das molekulare Chaperon BiP	7
1.2.1	Die Hsp70 Chaperon Familie	7
1.2.2	Der Hsp70 Vertreter im ER: BiP	9
1.2.3	Rolle von BiP bei der Faltung von Antikörpern	10
1.2.4	Die Regulation von BiP	11
1.3	Proteindisulfidisomerasen	13
1.3.1	PDI	13
1.3.2	Andere Proteindisulfidisomerasen	16
1.3.3	Erp57 und das <i>quality control</i> System des ER	16
1.4	Immunglobuline	18
1.4.1	Struktur von Antikörpern	18
1.4.2	Antikörperfaltung <i>in vivo und in vitro</i>	21
1.4.3	Der monoklonale Antikörper MAK33	23
1.5	Expression rekombinant erzeugter Proteine	25
1.5.1	Expression rekombinant erzeugter Proteine in <i>E. coli</i>	25
1.5.2	Das Redox-System im Cytoplasma von <i>E. coli</i>	26
1.6	Problemstellung	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	31
2.1.1	Chemikalien	31
2.1.2	Proteine	32
2.1.3	Standards und Kits	33
2.1.4	Chromatographiematerialien	33
2.1.5	Sonstige Materialien	33
2.1.6	Bakterienstämme	34
2.1.7	DNA	35
2.1.8	ELISA-Reagentien	36
2.1.9	Lösungen, Puffer und Medien	37
2.1.10	Geräte	39
2.1.11	Computerprogramme	41
2.2	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	42
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
2.2.3	PCR-Amplifikation	42
2.2.4	Agarosegelelektrophorese von DNA	44
2.2.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	44
2.2.6	Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA	44
2.2.7	Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente	45
2.2.8	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen	46
2.3	Präparative Methoden	47
2.3.1	Kultivierung und Analyse von Bakterienzellen	47
2.3.2	Zellernte und Zellaufschluss von Bakterienzellen	47
2.3.3	Chromatographische Methoden	49
2.3.4	Aufkonzentrierung und Dialyse	50
2.4	Proteinbiochemische Methoden	51

2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
2.4.2	Fällung von Proteinlösungen	51
2.4.3	Derivatisierung von Cysteinen mit Iodacetamid	51
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.4.5	Nachweis von Proteinen	53
2.4.6	Densitometrie	55
2.4.7	Immunoblotting (Western Blot)	55
2.4.8	Analytische Gelfiltration	56
2.4.9	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	56
2.4.10	Reduktion und Alkylierung von C _H 3	57
2.4.11	ATPase Aktivitätstest	58
2.5	Spektroskopische Methoden	60
2.5.1	UV-VIS-Spektroskopie	60
2.5.2	Fluoreszenzspektroskopie	61
2.5.3	Lichtstreuung	61
2.5.4	Dynamische Lichtstreuung	62
2.5.5	Stopped flow	62
2.5.6	Circulardichroismus	63
2.6	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	65
3	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	67
3.1	Expression von Antikörperketten in <i>E. coli</i>	67
3.1.1	Verwendung von Antikörpern für die Detektion von MAK33	67
3.1.2	Herstellung von Expressionsvektoren zur cytoplasmatischen Expression von Antikörperketten in <i>E. coli</i>	68
3.1.3	Expression der Antikörperfragmente	70
3.1.4	Vergleich der Expressionskinetiken verschiedener <i>E. coli Knockout-Stämme</i>	72
3.1.5	Aktivität der Antikörperfragmente	77
3.1.6	Koexpression von BiP	79
3.2	Diskussion zur Expression von Antikörperketten in <i>E. coli</i>	84
3.3	Rückfaltung und Reoxidation des Fab Fragments <i>in vitro</i>	87
3.3.1	Renaturierung von denaturiertem und oxidiertem Fab	87
3.3.2	Renaturierung von denaturiertem und reduziertem Fab	87
3.3.3	Einfluss von BiP und PDI auf die Renaturierung	88
3.3.4	Einfluss von Erp57 und anderen PDI Homologen	96
3.3.5	Einfluss verschiedener Hsp70- und Hsp90-Homologe auf die Rückfaltung	99
3.3.6	Aggregation von Fab während der Rückfaltung	100
3.4	Diskussion <i>in vitro</i> Faltung von Fab	108
3.5	Der ATPase Zyklus von BiP	111
3.5.1	Bestimmung der ATPase Aktivität	111
3.5.2	Einfluss von J-Domänen Proteinen auf die ATPase	113
3.5.3	Nukleotidbindung ohne Substrat	114
3.5.4	Stimulierung der ATPase durch Peptide	119
3.5.5	Komplexbildung zwischen BiP und C _H 3-CAM	120
3.5.6	Inhibierung der ATPase durch C _H 3-CAM	122
3.5.7	Nukleotidbindung in Gegenwart von Substraten	125
3.6	Diskussion des ATPase Zyklus von BiP	128
4	<i>Zusammenfassung</i>	133
5	<i>Literatur</i>	137
6	<i>Abkürzungen</i>	153
7	<i>Veröffentlichungen</i>	ab 157

1. Einleitung

1.1. Proteinfaltung

1.1.1 Proteinfaltung *in vitro*

Proteine stellen innerhalb der Biomoleküle eine äußerst vielseitige und bedeutende Gruppe dar. An fast allen biochemischen Prozessen, die in Lebewesen ablaufen, sind Proteine beteiligt. Sie dienen als Enzyme, Strukturproteine, Transportproteine oder spielen als Antikörper eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Um all diese Aufgaben übernehmen zu können, ist es zwingend erforderlich, dass jedes Protein in seiner nativ strukturierten Form vorliegt. Ausgehend von seiner, in der Aminosäuresequenz codierten Information, faltet das Protein in eine bestimmte Konformation. Verliert das Protein diese native Konformation, etwa durch thermische oder chemische Denaturierung, so kann es seine Funktionen nicht mehr wahrnehmen. Im Gegensatz zur genau definierten Struktur des nativen Proteins ist dem denaturierten, entfalteten Zustand eines Proteins keine eindeutige Molekülkonformation zugeordnet. Das denaturierte Protein kann in einer Vielzahl von verschiedenen Konformationen vorliegen, die aufgrund ihrer schnellen Interkonversion 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. Die Faltung eines Proteins stellt einen reversiblen Prozess dar, wie bereits Anfang der 60er Jahre durch Anfinsen und Mitarbeiter anhand von denaturierter und reduzierter Ribonuklease gezeigt wurde (Anfinsen *et al.*, 1961). Prinzipiell benötigt dieser Faltungsvorgang weder Energie noch in der Aminosäuresequenz codierte Information (Anfinsen, 1973). Die native Struktur globulärer Proteine entspricht dabei dem globalen Minimum der freien Enthalpie unter den gegebenen Faltungsbedingungen (Anfinsen, 1973). Der Unterschied in der freien Enthalpie zwischen nativem und denaturiertem Zustand wird als Triebkraft der Proteinfaltung bezeichnet (Jaenicke, 1996). Dieser Unterschied wird durch stabilisierende Wechselwirkungen im nativen Zustand hervorgerufen: Wasserstoffbrücken, elektrostatische-, van-der-Waals- und hydrophobe Wechselwirkungen (Jaenicke, 1996).

Aus der statistischen Überlegung, dass ein Protein innerhalb eines biologisch relevanten Zeitraums die Suche nach seiner nativen Konformation nicht abschließen könne (Levinthal Paradoxon), schloss man, dass es einen oder mehrere Faltungswege geben müsse (Kim & Baldwin, 1990; Levinthal, 1968). Durch die Entdeckung von Faltungsintermediaten bei unterschiedlichsten Proteinen konnte seither diese These bestätigt werden (Baldwin, 1995; Kim

& Baldwin, 1990). Sowohl theoretische Betrachtungen (Karplus & Sali, 1995) als auch experimentelle Faltungsstudien (Kim & Baldwin, 1990) führten zu verschiedenen Faltungsmodellen wie z.B. dem sog. *nucleation growth model* (Wetlaufer, 1973), dem *framework model* (Ptitsyn, 1991; Ptitsyn & Rashin, 1973) oder dem Faltungsmodell des „hydrophoben Kollapses“ (Jaenicke, 1991; Jaenicke, 1996; Kuwajima, 1989; Ptitsyn *et al.*, 1990).

In neueren Theorien zur Proteinfaltung wird die Existenz eines einzigen Faltungsweges mit definierten Intermediaten in Frage gestellt. Der sog. *new view* geht davon aus, dass es sich bei Faltungsintermediaten um Produkte inkorrekt gefalteter Proteine handelt, die in einer kinetischen Falle angehäuft werden (Baldwin, 1995; Onuchic *et al.*, 1997). Proteinfaltung stellt dabei einen diffusionsähnlichen Prozess dar. Der native Zustand eines Proteins befindet sich dabei in einem Energieminimum, das auf mehreren Wegen erreicht werden kann (Dill & Chan, 1997; Radford, 2000; Wolynes *et al.*, 1995). Dieses Konzept der „Faltungstrichter“ (*folding funnels*) oder „Energiewälder“ (Camacho & Thirumalai, 1993; Hao & Sheraga, 1996) postuliert Faltungsintermediate als Strukturen, die sich in einem lokalen, energetischen Minimum befinden. Bei schnell faltenden Proteinen kann es zwar vorkommen, dass keine Faltungsintermediate isoliert werden können, da sie energetisch instabil und kurzlebig sind, möglicherweise sind diese Intermediate aber trotzdem vorhanden (Jaenicke, 1999).

Bei der Betrachtung der Thermodynamik des Faltungsprozesses darf jedoch die Kinetik nicht außer Betracht gezogen werden. Die Faltung eines Proteins ist in der Regel ein sehr schneller Prozess, der innerhalb weniger Minuten oder Sekunden abläuft. Einige Faltungsschritte sind jedoch deutlich langsamer. Dazu gehört, vor allem bei extrazellulären Proteinen, die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken (Creighton, 1986). Dieser Prozess beeinflusst zwar nicht den Faltungsweg, erhöht aber die Stabilität und ist in den meisten Fällen geschwindigkeitsbestimmend (Jaenicke, 1996). Ein weiterer, oft geschwindigkeitsbestimmender Schritt sind Prolin-*cis/trans*-Isomerisierungen (Fischer & Schmid, 1990). Sie erfolgen bei nicht-nativen Prolinbindungen und vollziehen sich sehr langsam, da die Umwandlung der *trans*-Konformation in die *cis*-Konformation (ca. 7% aller Prolinreste sind im nativen Protein in *cis*) eine hohe Aktivierungsenergie besitzt (Fischer & Schmid, 1990; Goto & Hamaguchi, 1982b). Ausserdem können bei multimeren Proteinen Assoziationsreaktionen die Faltungsgeschwindigkeit beeinflussen (Jaenicke, 1987).

Während der Faltung kann es zur Konkurrenz mit nicht korrekten intermolekularen Wechselwirkungen kommen. Diese Wechselwirkungen treten zwischen exponierten hydrophoben Regionen auf und führen zur Bildung von Aggregaten (Jaenicke, 1996; Kiefhaber

et al., 1991). Die Aggregation ist abhängig von der Konzentration an nicht-nativen Faltungsintermediaten. Nach einem kinetischen Modell hängt die Ausbeute an nativem Protein damit von der Geschwindigkeit der Faltung und der Aggregation ab (Hoffmann *et al.*, 2001; Kiefhaber *et al.*, 1991; Lilie *et al.*, 1998). Durch die Optimierung physiko-chemischer Parameter wie Lösungsmittelbedingungen, Proteinkonzentration, Ionenstärke oder Temperatur können Aggregationsprozesse jedoch minimiert werden (Buchner, 1996; Kiefhaber *et al.*, 1991).

1.1.2 Proteinfaltung *in vivo*

In vivo findet die Proteinfaltung unter ungünstigeren Bedingungen statt. Die Gesamtproteinkonzentration in der Zelle kann einige 100 mg/ml erreichen (Morimoto *et al.*, 1994). Dies stellt besondere Anforderungen an die Proteinfaltung. Vor allem die Gefahr der Aggregation ist deutlich erhöht, da nicht-native Proteine verstärkt hydrophobe Oberflächen anderen ungefalteten Proteinen präsentieren. Die Aggregation als konzentrationsabhängige Nebenreaktion wird unter diesen Bedingungen stark bevorzugt (Buchner, 1996).

Die Zelle umgeht diese Schwierigkeit, indem sie die Faltung des Proteins bereits während seiner Synthese am Ribosom beginnt. Das Protein wird sequentiell am Ribosom vom N- zum C-Terminus synthetisiert, so dass eine Domäne bereits falten kann, während sich der Rest der naszierenden Polypeptidkette noch am Ribosom befindet (Jaenicke, 1999a). Diese Domänen sind dabei als autonome Faltungseinheiten anzusehen. Auch chemische Modifikationen, wie z.B. Disulfidbrückenbildung können bereits an der naszierenden Polypeptidkette erfolgen. Dies wurde am Beispiel von Immunglobulinen nachgewiesen (Bergmann & Kuehl, 1979).

Allerdings müssen Proteinfaltung und Translation nicht zwingend gleichzeitig ablaufen. Ribonuklease A muss erst als vollständig synthetisiertes Protein vorliegen, da der C-Terminus essentiell für die Ausbildung der nativen Struktur ist (Lin, 1970).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* stellt die Proteinfaltung keinen Prozess dar, der zu 100 % korrekt gefaltetes Protein liefert, so dass es auch unter physiologischen Bedingungen in einigen Fällen zu ausbeuteminimierender Aggregation kommen kann, die durch Stressbedingungen, z.B. durch erhöhte Temperatur oder Überproduktion rekombinanter Proteine noch gefördert wird (Bowden & Georgiou, 1990; Haase-Pettingell & King, 1988; Hurtley & Helenius, 1989). Bei der Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* können fehlgefaltete Polypeptidketten unlösliche *inclusion bodies* bilden (Buchner, 1996; Lilie *et al.*, 1998; Marston, 1986) (vgl. 1.5.1).

1.1.3 Faltungshelferproteine

Um auch unter unphysiologischen Bedingungen die Lebensfähigkeit aufrechterhalten zu können, existieren in der Zelle eine Reihe von Faltungshelferproteine, darunter die sog. molekularen Chaperone (Ellis, 1987; Gething, 1997; Walter & Buchner, 2002). Fast alle Chaperone gehören zu der großen Gruppe der Hitzeschockproteine (Buchner, 1996; Georgopoulos & Welch, 1993). Deren Hauptaufgabe besteht darin, sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen, unproduktive Seitenwege der Proteinfaltung, insbesondere Aggregation, zu verhindern, indem sie selektiv exponierte, hydrophobe Oberflächen nicht-nativer Proteine binden, ohne dabei sterische Informationen zur Faltung zu liefern (Hartl, 1996; Jaenicke, 1996; Jaenicke & Buchner, 1993). Anhand von Sequenzhomologien und aufgrund ihres Molekulargewichts werden die Hitzeschockproteine in die Familien Hsp100, Hsp90, Hsp70 (vgl. 1.2.1), Hsp60 und die kleinen Hitzeschockproteine eingeteilt. In den meisten Fällen ist für die Faltung von Proteinen nicht nur ein einzelnes Chaperon verantwortlich, sondern verschiedene Chaperone kooperieren und interagieren gleichzeitig oder nacheinander mit den entsprechenden Substratproteinen in einem komplexen Netzwerk (Buchner, 1996; Bukau & Horwich, 1998).

Zwei weitere in allen Zellen vorkommende Gruppen von Faltungshelferproteinen sind die Proteindisulfidisomerasen (PDI) und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPI).

Unter den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen wird eine ganze Reihe von ubiquitären Enzymen zusammengefasst, welche die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolyl-Peptid-Bindungen katalysieren (Fischer, 1994; Schmid, 1997), ohne dabei das Gleichgewicht zwischen *cis*- und *trans*-Konformation zu beeinflussen (Lilie *et al.*, 1993). Die Isomerisierung von Prolinen stellt während der Proteinfaltung aufgrund ihrer hohen Aktivierungsenergie oft den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Baldwin, 1995; Brandts *et al.*, 1975; Schmid, 1992). In der Literatur unterscheidet man drei strukturell unabhängige Familien von PPIasen: Die Cyclophiline (Cyp), die FK506 Bindeproteine (FKBP) und die Parvuline (Fischer, 1994).

Die sog. Proteindisulfidisomerasen (PDI) (vgl. 1.3) werden ebenfalls in allen Zellen von Pro- und Eukaryoten gefunden. Es handelt sich dabei um Protein-Thiol-Oxidoreduktasen, welche die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysieren (Bardwell, 1994; Freedman, 1984). Die prokaryotischen Vertreter werden als DsbA und DsbC bezeichnet (Bardwell *et al.*, 1991). Bei Eukaryoten unterscheidet sich 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 Reduktionen von Disulfidbrücken durchgeführt (Noiva, 1999).

1.1.4 Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum

Bei Eukaryoten werden Membranproteine, disulfidverbrückte sekretorische Proteine, sowie Proteine, die für andere Organellen wie Lysosomen und Golgiapparat bestimmt sind, noch während sie translatiert werden über den Sec63 Komplex ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert (Zapun *et al.*, 1999). Etwa ein Drittel aller zellulären Proteine gelangt so in das Lumen des ER, wo post-translationale Modifikationen, Faltung und Oligomerisierung der Proteine erfolgen.

Das ER bietet dabei das für die Faltung dieser Proteine erforderliche oxidierende Milieu (Noiva, 1999). Neben den Redoxbedingungen unterscheidet sich das ER von anderen Faltungskompartimenten der Zelle (Cytosol, Mitochondrium) durch eine außergewöhnlich hohe Kalziumkonzentration (Montero *et al.*, 1995) und das Vorhandensein von Kohlehydraten sowie unterschiedlicher Enzyme der Glykosylierung. Darüber hinaus enthält das ER zahlreiche Chaperone und andere Faltungshelferproteine, die neu synthetisierten Proteinen helfen, ihre korrekte Konformation zu erlangen (siehe Tabelle 1.1.1).

Zu den am häufigsten vorkommenden ER-lokalisierten Faltungshelferproteinen gehören das Hsp70 Chaperon BiP (Gething, 1999) (vgl. 1.2.2), das glucoseregulierte Protein Grp94 aus der Familie der Hsp90-Proteine (Argon & Simen, 1999), die Proteindisulfidisomerasen (Noiva, 1999) (vgl. 1.3), Hsp47 (Lamande & Bateman, 1999), sowie die lektinähnlichen Chaperone Calnexin und Calreticulin (Chevet *et al.*, 1999). All diese ER-Chaperone und Faltungshelferproteine werden durch ein spezifisches C-terminales KDEL- (bei *S. cerevisiae* HDEL-) Retentionssignal im ER zurückgehalten oder sind als integrale Membranproteine an das ER gekoppelt.

Diese Faltungshelferproteine arbeiten nicht isoliert, sondern bilden ein Netzwerk, das gleichzeitig oder sequentiell seine Funktionen im ER, Faltung und Modifikation von Proteinen, Qualitätskontrolle, Proteindegradation und Proteinimport, -export erfüllt.

FALTUNGSHELFER	FAMILIE	SPECIES	PROTEINNAME
Chaperone	Hsp70	Säuger S. cerevisiae	Grp78/BiP Kar2p
	DnaJ-Homologe	Säuger S. cerevisiae	Sec61p, Sec63p, JEM1p, Scj1p
	Hsp90	Säuger S.cerevisiae	Grp94/gp96
Lektin-ähnliche Proteine	Calnexin/Calreticulin	Säuger S.cerevisiae	Calnexin, Calreticulin Cne1p
Proteindisulfidisomerasen	PDI	Säuger S.cerevisiae	PDI Pdi1p, Eug1p
	PDI-Homologe	Säuger S. cerevisiae	Erp57/Q2/Erp60/ER60/Erp61 Erp72/CaBP2, PDIR, P5/CaBP1 Yia5p, Mpd1p, Mpd2p
Peptidylprolylisomerasen	FK506 Bindeproteine	Mensch S.cerevisiae	FKBP13, FKB65 Fpr2p
	Cyclophiline	Mensch S. cerevisiae	Cyclophilin B, Cyclophilin C, Cyclophilin 40, Cyclophilin 33A, Cyclophilin 33B Cyp2p, Cyp5p, Cpr7p, Cpr8p, Scc3p
Glykosyltransferasen	UDP- Glucose:Gycoprotein Glycosyltransferase	Säuger S. cerevisiea	UDP-Glucose:Gycoprotein Glycosyltransferase -

Tab. 1.1.1: Faltungshelfer des Endoplasmatischen Reticulums (Noiva, 1999; Zapun *et al.*, 1999).

1.2 Das molekulare Chaperon BiP

1.2.1 Die Hsp70 Chaperon Familie

Die Mitglieder der Hsp70 Chaperon Familie sind in den unterschiedlichsten Kompartimenten der meisten Zellen präsent (Craig *et al.*, 1993; Gething & Sambrook, 1992; Walter & Buchner, 2002), mit Ausnahme einiger Archaeen (Bult *et al.*, 1996). Die Anzahl an Mitgliedern der Hsp70 Familie, die in eukaryotischen Zellen exprimiert werden ist sehr groß, So werden z. B. allein in *Saccharomyces cerevisiae* 14 verschiedene Hsp70 Proteine exprimiert (James *et al.*, 1997). Dies spiegelt die hohe Diversität an Aufgaben wieder, die diese Proteinfamilie in zellulären Systemen wahrnimmt. Konstitutiv exprimierte Vertreter werden Hsc70 genannt (c steht für cognate = verwandt). Andere Vertreter werden hingegen unter Stressbedingungen exprimiert und zur Unterscheidung als Hsp70 bezeichnet (Welch *et al.*, 1997). Der bekannteste Vertreter im Lumen des ER ist BiP (Haas & Wabl, 1983) (vgl. 1.2.2).

Hsp70 Chaperone sind an einer Reihe zellulärer Prozesse beteiligt, wie z. B. dem Transport von Proteinen in bestimmte Kompartimente der Zelle wie das Mitochondrium, das ER oder das Periplasma von *E. coli* (Pilon & Schekman, 1999; Schatz & Dobberstein, 1996), der Faltung von Proteinen im Mitochondrium, im ER und im Cytosol (Bukau & Horwich, 1998; Hartl, 1996; Morimoto *et al.*, 1994; Walter & Buchner, 2002), der Disassemblierung von Clathrin-umhüllten Vesikeln (Chappell *et al.*, 1986), der Replikation des Phagen λ (Zylicz, 1993), der Regulation der Hitzeschockantwort (Bukau & Horwich, 1998; Yura *et al.*, 1993) und der Rückfaltung falsch gefalteter Proteine (Bukau & Horwich, 1998; Hartl, 1996; Walter & Buchner, 2002). Darüber hinaus sind sie im Fall von BiP am ER assoziierten Degradationsprozess (ERAD) beteiligt (Chillaron & Haas, 2000).

Hsp70 Proteine bestehen aus zwei funktionellen Domänen (siehe Abb. 1.1): einer konservierten N-terminalen ATPase Domäne aus ca. 450 Aminosäuren und einer weniger konservierten C-terminalen Substratbindedomäne aus ca. 200 Aminosäuren (Gething & Sambrook, 1992). Die Aminosäuresequenz innerhalb der Familie ist mit 50 % Sequenz-identität relativ hoch (Bardwell & Craig, 1984).

Zwar konnte bisher die Struktur des gesamten Hsp70 Moleküls nicht gelöst werden, aber die Strukturen der einzelnen Domänen, der ATPase Domäne von Hsc70 aus Rind (Flaherty *et al.*, 1990) und vom humanen Hsp70 (Osipiuk *et al.*, 1999) sowie die Substratbindedomäne von DnaK aus *E. coli* (Zhu *et al.*, 1996) sind bekannt.

Die ATPase Domäne besteht aus zwei kompakten Einheiten, die durch eine tiefe Spalte getrennt sind. Am lösungsmittelunzugänglichen Grund dieser Spalte befindet sich die Nukleotidbindestelle (Flaherty *et al.*, 1990). Die Hydrolyse des ATP erfolgt durch den Angriff

eines Wassermoleküls auf den terminalen γ -Phosphatrest. Für diesen Angriff ist ein Lysinrest an Position 71 essentiell (O'Brien *et al.*, 1996). Neben zweiwertigen Magnesium-Ionen ist auch die Anwesenheit von einwertigen Ionen wie Kalium oder Natrium erforderlich, wobei die Aktivität mit dem größeren Kalium-Ion am höchsten ist (O'Brien & McKay, 1995).

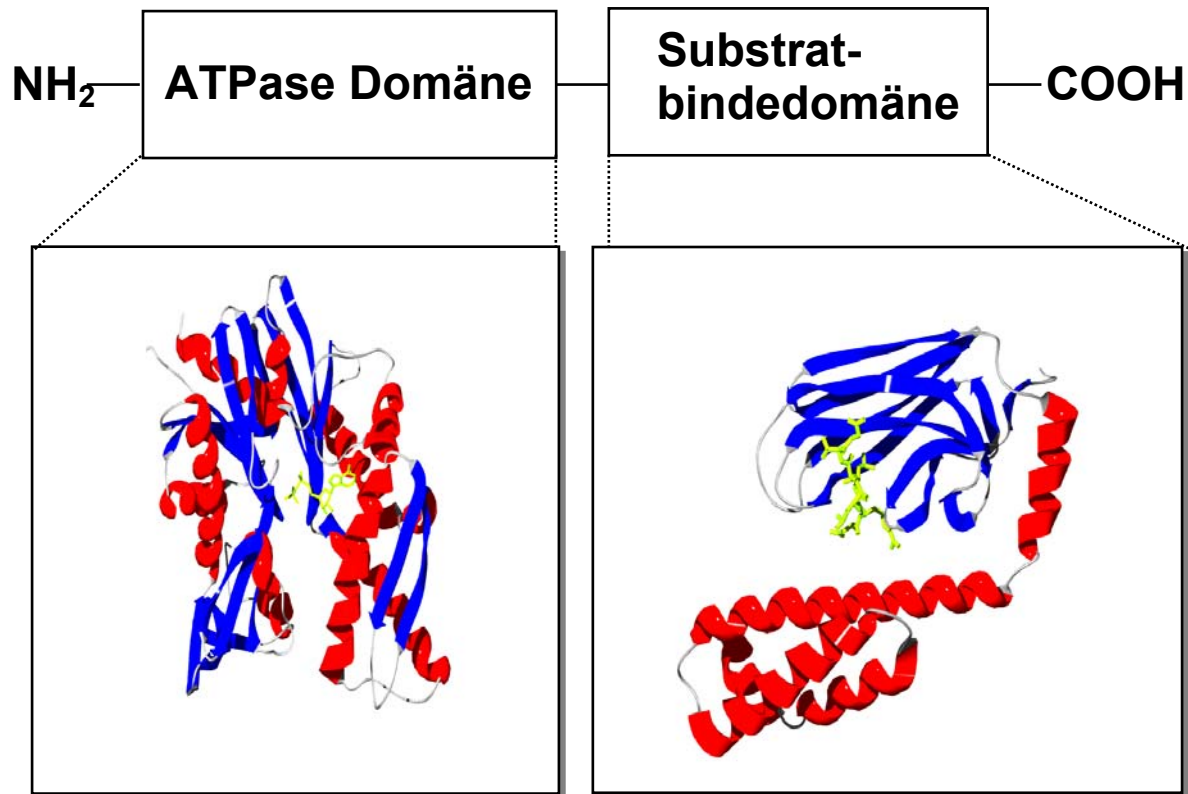


Abb. 1.1: Darstellung der Domänenstruktur von Hsp70 Proteinen.

Links: N-terminale ATPase Domäne mit gebundenem Nukleotid (grün) (Osipiuk *et al.*, 1999).
 Rechts: C-terminale Substratbindedomäne mit gebundenem Peptid (grün) (Zhu *et al.*, 1996).

Die Substratbindedomäne wird von einer achtsträngigen β -Faltblattstruktur gebildet. In dessen Mitte befindet sich eine tiefe Rille, in der das Substrat gebunden wird (siehe Abb. 1.1). Über der Substratbindestelle liegt eine lange α -Helix, welche jedoch keinen direkten Kontakt zum Peptid hat. Zwar ist die genaue Funktion dieser C-terminalen α -Helix noch unbekannt, ihr wird aber eine Rolle bei der Regulation der Geschwindigkeit der Peptidbindung/-freisetzung zugeschrieben (Zhu *et al.*, 1996).

In Lösung bilden Hsp70-Proteine Dimere und kleinere Oligomere, die nach Zugabe von ATP (Schmid & Rothman, 1985) oder Substrat (Blond-Elguindi *et al.*, 1993b) zu Monomeren dissoziieren. Es wird vermutet, dass die Dimerisierung über eine glycinreiche, 30-50 Aminosäuren lange Region am C-Terminus der Substratbindedomäne erfolgt (Buchberger *et*

al., 1995). In Gegenwart von ungefalteten Polypeptidketten dissoziiert Hsp70 und wird aktiviert (Blond-Elguindi *et al.*, 1993b).

Abhängig von der Art des gebundenen Nukleotids, liegen Hsp70 Proteine in zwei verschiedenen Konformationen vor. Im ADP-gebundenen Zustand werden stabile, langlebige Komplexe mit Peptiden gebildet, während im ATP-gebundenen Zustand nur eine temporäre, instabile Bindung auftritt (Schmid *et al.*, 1994). Dieser Konformationswechsel wird allein durch die Bindung von ATP hervorgerufen, eine Hydrolyse ist dazu nicht notwendig (Palleros *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1996).

1.2.2 Der Hsp70 Vertreter im ER: BiP

BiP ist das molekulare Chaperon der Hsp70 Familie, das im Lumen des ER lokalisiert ist. Es wurde ursprünglich über seine Bindung an die schwere Kette von Antikörpern (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) identifiziert (Haas & Wabl, 1983). Unabhängig davon wurde es als glucosereguliertes Protein Grp78 charakterisiert (Pouyssegur *et al.*, 1977). BiP spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung und Assoziation von Antikörpern (vgl. 1.2.3 und 1.4.2). Es bindet aber auch transient an zahlreiche andere neu synthetisierte Proteine und hält diese in einem faltungs- und oligomerisierungskompetenten Zustand. Ebenso bindet BiP an falsch gefaltete oder unzureichend glykosylierte Proteine. Darüber hinaus ist BiP am Transport von Proteinen in das ER beteiligt. BiP interagiert mit der J-Domäne von Sec63p, dem zentralen Bestandteil des Translocons, wobei Sec63p die ATPase-Aktivität von BiP stimuliert (Corsi & Schekman, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass BiP den Proteintransport ins ER erleichtert, indem es die Polypeptidkette bindet und dadurch ein Zurückgleiten in die Translokationspore verhindert (Matlack *et al.*, 1999). Dieser Mechanismus wird als *Brownian ratchet* bezeichnet und unterscheidet sich von einem anderen Modell, bei dem BiP aktiv die Polypeptidkette ins ER hinein zieht. BiP ist auch am retrograden Transport von falsch gefalteten Proteinen beteiligt (Chillaron & Haas, 2000). In diesem ER-abhängigen Degradationsprozess (ERAD) werden nicht-nativ gefaltete Proteine aus dem ER ins Cytosol zurück transportiert, wo sie dem Proteasom zum Abbau zugeleitet werden.

Schließlich ist BiP ein Teil der *unfolded protein response* (UPR) (Okamura *et al.*, 2000). Unter Stressbedingungen erkennt BiP die sich anhäufenden ungefalteten Proteine. Dadurch löst sich BiP von Ire1p, das es unter normalen Bedingungen bindet und in einem unphosphorylierten, inaktiven Zustand hält. Das aktive Ire1p leitet dann ein Signal an den Kern weiter, wo Transkriptionsfaktoren für Hitzeschockproteine aktiviert werden (Okamura *et al.*, 2000).

BiP ist unter physiologischen Bedingungen eines der am häufigsten im ER vorkommenden Proteine. Zudem 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.

BiP besteht wie alle Mitglieder der Hsp70-Familie aus zwei Domänen: einer N-terminalen Domäne, die die katalytische Stelle für die ATPase-Aktivität beinhaltet, und einer C-terminalen substratbindenden Domäne (McKay, 1993).

1.2.3 Rolle von BiP bei der Faltung von Antikörpern

Im Endoplasmatischen Retikulum sind eine Vielzahl von Chaperonen und anderen Faltungshelfern an der Faltung und Assoziation von Antikörpern beteiligt. Eine wichtige Rolle spielt dabei BiP. BiP assoziiert mit schweren Ketten unterschiedlichster Antikörper-Isotypen und verhindert deren vorzeitige Sekretion aus dem ER, bis sie mit leichten Ketten zu kompletten Immunglobulinmolekülen assoziieren (Bole *et al.*, 1986; Hendershot, 1990). Ebenso konnte gezeigt werden, dass BiP auch die leichte Kette bindet und im ER zurückhält bis diese mit einer schweren Kette assoziiert und exportiert wird (Skowronek *et al.*, 1998). Sobald die leichte Kette die schwere Kette bindet, wird BiP verdrängt, und das korrekt assemblierte Antikörpermolekül kann aus der Zelle sezerniert werden (Bole *et al.*, 1986; Cremer *et al.*, 1993; Hendershot, 1990). Die Interaktion mit BiP wird hauptsächlich über die C_{H1}-Domäne vermittelt (Hendershot *et al.*, 1987), jedoch sind für eine stabile Interaktion zusätzliche Bereiche aus anderen Domänen erforderlich (Haas, 1991).

Neben der schweren Kette konnte auch für die leichte Kette eine Assoziation mit BiP festgestellt werden (Knittler & Haas, 1992). Die leichten Ketten werden dabei als Monomere an BiP gebunden, deren Disulfidbrücken nur teilweise ausgebildet sind (Cremer *et al.*, 1993; Knittler *et al.*, 1995; Leitzgen *et al.*, 1997). Auch am Abbau von nicht-assemblierten leichten Ketten ist BiP beteiligt und ermöglicht dabei den retrograde Transport der Immunglobulinkette aus dem ER ins Cytoplasma, wo der Abbau am Proteasom erfolgt (Chillaron & Haas, 2000). Die Bindung an die leichte Kette wird dabei von der variablen Domäne vermittelt (Skowronek *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte inzwischen gezeigt werden, dass BiP und leichte Kette bei der Faltung der schweren Kette und der Assemblierung des Antikörpers kooperativ zusammenarbeiten (Lee *et al.*, 1999).

1.2.4 Die Regulation von BiP

Wie alle Hsp70 Chaperone, so besteht auch BiP aus einer N-terminalen ATPase Domäne, die eine schwache ATPase-Aktivität aufweist (mit einem k_{cat} von ca. 0.2 min^{-1}) und einer C-terminalen Substratbindedomäne, die an ungefaltete Polypeptide und Peptide bindet.

Beide Domänen kommunizieren, und regulieren so die Affinität und die Kinetik 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 (Blond-Elguindi *et al.*, 1993a; Flynn *et al.*, 1989). Die ungefalteten Polypeptide, deren Faltung durch BiP assistiert wird, durchlaufen dabei mehrere Zyklen von Bindung und Dissoziation, bevor sie in ihre korrekte Konformation gelangen. Die Dauer dieses Zyklus ist 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 (Kelley, 1998), welche die ATPase von Hsp70 stimulieren. Es konnte gezeigt werden, dass Maus BiP mit einem DnaJ Homologen, dem lumenalen Transmembranprotein Mtj1, interagiert (Chevalier *et al.*, 2000). Untersuchungen in Hefe haben unter anderem ergeben, dass das zu BiP homologe Kar2-Protein mit dem Hsp40-Protein Sec63p interagiert. Sec63p stimuliert dabei die ATPase-Aktivität von BiP und vermittelt die Bindung von BiP an das Translocon (Corsi & Schekman, 1997). Dabei kommt es zu einer schnellen Bindung von Proteinen, die dann nur noch langsam, vermittelt durch den Nukleotidaustausch, freigegeben werden (Misselwitz *et al.*, 1999).

Im ATPase-Zyklus des *E. coli*-Homologen DnaK existiert neben dem Hsp40-Protein DnaJ ein sog. Nukleotidaustauschfaktor GrpE, der den Nukleotidaustausch katalysiert (Liberek *et al.*, 1991). GrpE bindet dabei an DnaK, worauf strukturelle Änderungen an der Bindetasche die Freisetzung von ADP begünstigen (Packschies *et al.*, 1997). Kürzlich konnte auch für BiP ein Protein identifiziert werden, das den Nukleotidaustausch stimuliert, das BiP assoziierte Protein (BAP) (Chung *et al.*, 2002).

Durch Studien an BiP Mutanten konnte gezeigt werden, dass eine intakte ATPase Funktion für die Aktivität von BiP bei der Faltung und Sekretion von Antikörpern unerlässlich ist. So verhindern bestimmte Mutationen in der Nukleotidbindestelle die Freisetzung gebundener Immunglobulinketten (Gaut & Hendershot, 1993). Dies ist allerdings nicht auf die Unfähigkeit zur Hydrolyse von ATP zurückzuführen, sondern auf die inhibierte ATP Bindung (Vidal *et al.*, 1996).

1.3 Proteindisulfidisomerasen

1.3.1 PDI

Proteindisulfidisomerase (PDI) ist eine Protein-Thiol-Oxidoreduktase, die die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysiert. PDI wurde von Christian Anfinsen entdeckt, auf Grund ihrer Fähigkeit die Rückfaltung von Ribonuklease A, einem Enzym das vier Disulfidbrücken enthält, zu katalysieren (Goldberger *et al.*, 1963). Außer im ER findet man PDI auch in anderen Zellorganellen. Während PDI im ER die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken katalysiert, ist es im reduzierenden Cytosol, in Endosomen und an der Plasmamembran an der Reduktion von Disulfidbrücken beteiligt (Noiva, 1999) (vgl. 1.1.3).

Zwar wurde PDI anfangs nur als Oxidoreduktase charakterisiert, jedoch stellte sich bald heraus, dass das Enzym darüber hinaus innerhalb multifunktionaler Proteinkomplexe an Faltung, Assemblierung und posttranslationaler Modifikation von vielen Proteinen beteiligt ist. So ist PDI identisch mit der β -Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase (4-PH) (Koivu *et al.*, 1987; Pihlajaniemi *et al.*, 1987) und als Untereinheit Bestandteil des dimeren mikrosomalen Triglyceridtransferproteins (MTP) (Wetterau *et al.*, 1990), einem chaperonähnlichen Protein, das an der Faltung einer Vielzahl von neusynthetisierten Proteinen beteiligt ist.

Die Funktion von PDI in diesen Proteinkomplexen ist noch immer unklar. Jedoch geht man davon aus, dass die Hauptfunktion der PDI als Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase auf ihrer Chaperonfunktion und nicht auf ihrer Disulfidisomeraseaktivität beruht, wie Experimente mit Doppelmутanten gezeigt haben in denen beide katalytischen Stellen inaktiviert wurden (Vuori *et al.*, 1992). Diese mutierten 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 (Freedman *et al.*, 1994; Vuori *et al.*, 1992).

Im Falle von Cholera Toxin konnte gezeigt werden, dass PDI, abhängig von seinem Redoxzustand, auch an der Entfaltung von Proteinen beteiligt ist. Im reduzierten Zustand bindet PDI an das Toxin und entfaltet es, während im oxidierten Zustand die Freisetzung des Substrats erfolgt (Tsai *et al.*, 2001). PDI könnte also eine allgemeine Rolle bei der Entfaltung nativer Proteine und deren retrograden Transport über die ER Membran spielen.

Wie bei anderen Chaperonen und Faltungshelfern, scheint auch bei PDI die Expression stark von Stresssituationen wie etwa Hitzeschock abzuhängen, bei denen in der Zelle ein erhöhter Bedarf an Chaperonen besteht.

PDI verfügt über eine hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit zu Thioredoxin, vor allem im Bereich der beiden enzymatisch aktiven Zentren (Edman *et al.*, 1985). Aufgrund von Primärsequenzanalyse, limitierter Proteolyse, NMR-Studien und Computerberechnungen wurde ein fünf Domänen Modell für PDI vorgeschlagen (Abb. 1.2) (Kemnick *et al.*, 1997).

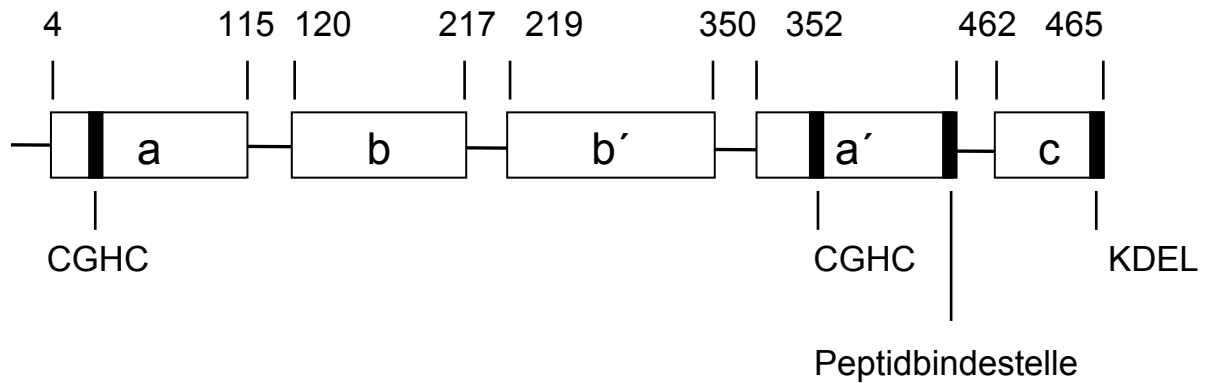


Abb. 1.2: Domänenstruktur von PDI. Struktur von Säuger-PDI mit den vorgeschlagenen Abgrenzungen der Domänen (Darby *et al.*, 1998), dem C-terminalen KDEL ER-Retentionssignal und der potentiellen Peptidbindestelle.

PDI besteht aus vier Thioredoxin ähnlichen Domänen (a-b-b'-a'), gefolgt von einer c Region, die vermutlich keine Sekundär- oder Tertiärstruktur aufweist, jedoch einen hohen Gehalt an sauren Aminosäuren aufweist, die an der Bindung von Calcium beteiligt sind. Außerdem befindet sich am C-terminus eine KDEL-Sequenz, die für den Transport ins ER verantwortlich ist. Es besteht eine hohe Sequenzähnlichkeit zwischen den Domänen a und a', sowie zwischen b und b'. Die beiden aktiven Zentren der Protein-Thiol-Oxidoreduktase bestehen aus der Sequenz (-Cys-Gly-His-Cys-) und liegen in der a und a' Domäne. Obwohl die 3D Struktur von PDI bisher nicht gelöst wurde, zeigen die Röntgenstruktur einer PDI aus Archaeen (Ren *et al.*, 1998) und NMR Studien an der a Domäne von PDI (Kemnick *et al.*, 1996) eine Tertiärstruktur, die sehr ähnlich zu der von *E. coli* Thioredoxin und DsbA ist. Die a Domäne von PDI ist gefaltet wie Thioredoxin mit zwei tiefen Gruben, die möglicherweise als Bindestellen für die Substrate dienen. NMR Studien an der b Domäne von PDI haben gezeigt, dass auch sie ein Thioredoxin Faltungsmotiv aufweist (Darby *et al.*, 1996). Jedoch hat die b Domäne keine aktiven Zentren wie die a Domäne und verfügt auch über keine Sequenzähnlichkeit zu Thioredoxin.

Der katalytische Mechanismus der Oxidoreduktase-Aktivität ist gut charakterisiert (Gilbert, 1990). PDI katalysiert den Austausch von Disulfiden zwischen dem Enzym und dem Substrat über die Bildung gemischter Disulfide zwischen dem Protein und der Oxidoreduktase. Je

nachdem ob PDI die Reduktion oder die Oxidation der Sulfhydrylgruppen eines Proteins katalysiert, wird es selbst oxidiert oder reduziert (Abb. 1.3).

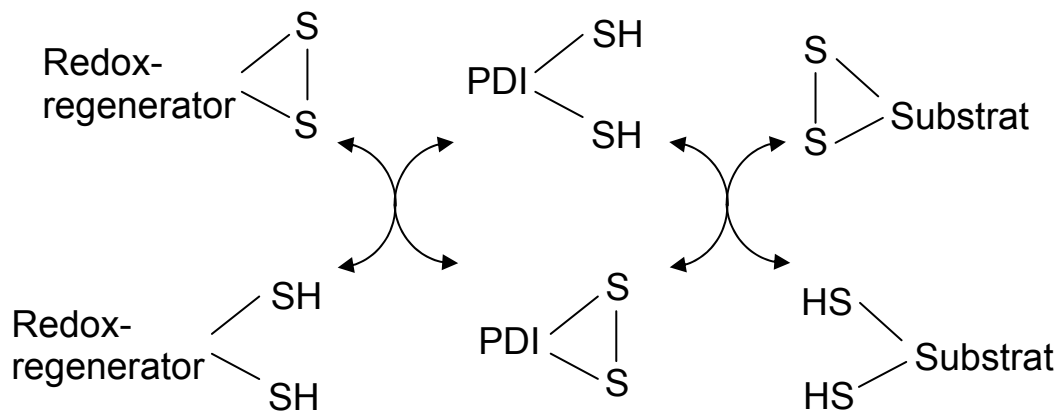


Abb. 1.3: Modell der von PDI katalysierten enzymatischen Reaktion (Noiva, 1999).

Der Redoxzustand von PDI kann anschließend von einem Enzym wie z.B. Thioredoxinreduktase oder über kleine Redoxpuffersubstanzen wie etwa Glutathion regeneriert werden. Ob PDI die Reduktion oder die Oxidation des Substrats katalysiert, hängt von den Konzentrationen an oxidiertem bzw. reduziertem Substrat, dem Redoxpotential und den Redoxverhältnissen im umgebenden zellulären Milieu ab.

Ein bestehendes Modell zur Aktivität von PDI als Disulfidisomerase postuliert einen nukleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins im aktiven Zentrum auf ein Disulfid im Proteinsubstrat und die Bildung eines gemischten Disulfids. Das gebildete gemischte Disulfid ist auf Grund der räumlichen Nähe des zweiten Cysteins im aktiven Zentrum instabil. Daraufhin kommt es zur Rückoxidation der Cysteinreste im aktiven Zentrum. Diese bilden eine Disulfidbrücke und entlassen das Substrat mit einem reduzierten freien Cystein, das nun eine neue Disulfidbrücke mit einem anderen Cystein bilden kann (Hawkins & Freedman, 1991).

Neben seiner Aktivität als Protein-Thiol-Oxidoreduktase konnte gezeigt werden, dass PDI auch als Chaperon wirkt und die Faltung von Proteinen katalysiert. PDI erleichtert die Rückfaltung von Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Cai *et al.*, 1994) und Rhodanese (Song & Wang, 1995), obwohl beide Proteine über keine Disulfidbrücken verfügen. Darüber hinaus wird für PDI eine so genannte Anti-Chaperon-Aktivität vermutet. Dabei beschleunigt PDI die Bildung von gemischten Aggregaten zwischen Substratproteinen und PDI, wenn ungefaltete Polypeptidsubstrate in großem Überschuss vorliegen. Dies konnte sowohl für entfaltetes Lysozym (Puig & Gilbert, 1994) als auch für denaturierte Alkoholdehydrogenase (Primm *et al.*,

1996) gezeigt werden, jedoch nicht für Citratsynthase, was eine Substratspezifität für diesen Effekt vermuten lässt (Primm *et al.*, 1996).

1.3.2 Andere Proteindisulfidisomerasen

Neben PDI kommen im ER von Säugetieren zahlreiche andere PDI-ähnliche Proteine vor (Zapun *et al.*, 1999). Erp57 (auch bekannt als Q-2, ER60, Erp60 oder Erp61) (Srivastava *et al.*, 1991) und P5 (CaBP1) (Chauduri *et al.*, 1992) sind dabei PDI am ähnlichsten, sowohl was ihre Größe als auch ihren modularen Aufbau betrifft. Beide verfügen wie PDI über zwei Thioredoxin ähnliche Domänen. ERp72 (CaBP2) (Mazzarella *et al.*, 1990) und PDIR (PDI *related protein*) (Hayano & Kikuchi, 1995) sind hingegen größer und verfügen über drei Thioredoxin ähnliche Domänen. Bisher ist, mit Ausnahme von Erp57 (vgl. 1.3.3) nur wenig über die Funktion dieser Proteine bekannt. Zwar verfügen alle über die Fähigkeit die Bildung von Disulfidbrücken zu katalysieren, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Auch über die Substratspezifität oder die Kooperation mit anderen Faltungshelfern oder Chaperonen im ER ist bisher nichts bekannt. So kann man über den Grund der Existenz verschiedener Proteindisulfidisomerasen im ER nur spekulieren.

Auch bei Bakterien wurden PDI-artige Proteine gefunden. Während im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas keine Disulfidbrücken gebildet werden können, wurden im Periplasma von Bakterien Proteine entdeckt, die die Oxidation von Cysteinen katalysieren. Diese Proteine wurden als DsbA, DsbB und DsbC bezeichnet (Bardwell & Beckwith, 1993; Bardwell *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1993; Missiakas *et al.*, 1994; Shevchik *et al.*, 1994). Aus phänotypischen Untersuchungen an Bakterien, denen diese Proteine fehlen, schloss man, dass DsbA und DsbC direkt am Einbau von Disulfidbrücken in neu synthetisierte Proteine beteiligt sind, wohingegen DsbB ein Membranprotein ist, welches für die Reoxidation von DsbA wichtig ist (Zapun & Creighton, 1994). DsbA hat dabei nur eine begrenzte Fähigkeit zur Bildung von Disulfiden und zeigt keine Aktivität bei der Isomerisierung von Disulfidbrücken, welche im Periplasma hauptsächlich durch DsbC katalysiert wird (Zapun *et al.*, 1995). Zwar zeigen alle diese Proteine eine gewisse Aktivität bei der Bildung von Disulfidbrücken, die Isomeraseaktivität ist jedoch deutlich geringer als bei PDI (Zapun & Creighton, 1994).

1.3.3 Erp57 und das *quality control* System des ER

Während über die Funktion der anderen PDI ähnlichen Enzyme im ER von Säugetieren wenig bekannt ist, wurde Erp57 funktionell relativ gut charakterisiert. Erp57 ist eine Proteindisulfidisomerase, welche mit den Lektin-ähnlichen Proteinen des ER, Calnexin und Calreticulin, assoziiert (Oliver *et al.*, 1997). In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass

Erp57 wie PDI die Isomerisierung von Disulfidbrücken während der Faltung von Ribonuklease B katalysiert. Erp57 ist jedoch nicht in der Lage, die Glykaneinheit des Substrats zu erkennen. Wurden jedoch Calnexin oder Calreticulin zum Rückfaltungsansatz hinzugefügt, stieg die Disulfidisomeraseaktivität deutlich an (Zapun *et al.*, 1998). Erp57 scheint also spezialisiert darauf zu sein, mit Calnexin/Calreticulin zu assoziieren und die Faltung daran gebundener Substrate zu erleichtern.

Im ER eukaryotischer Zellen existiert ein komplexes Kontrollsystem für die Faltung von Glykoproteinen (Hammond & Helenius, 1994), deren zentraler Bestandteil die beiden Lektin-ähnlichen Proteine Calnexin (Wada *et al.*, 1991) und Calreticulin (Hebert *et al.*, 1995) sind. Calnexin ist ein Transmembranprotein vom Typ I während das homologe Calreticulin löslich im ER vorliegt und das ER-Retentionssignal KDEL aufweist. Beide sind in der Lage Calcium zu binden (Wada *et al.*, 1991).

Auf ihrem Weg zum korrekt gefalteten und modifizierten Protein müssen Glykoproteine im ER dieses als *quality control* bezeichnete System durchlaufen. Dabei wird im Falle der N-Glykosylierung in Säugern zunächst 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). Anschließend wird die terminale Glucose durch das Enzym Glucosidase I und unmittelbar danach ein zweiter Glucoserest durch die Glucosidase II 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 wie Erp57 unterstützt. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden von Calnexin/Calreticulin gebunden und im ER zurückgehalten. Nachdem der dritte Glucoserest durch Glucosidase II abgespalten wurde, erfolgt die Dissoziation von Calnexin/Calreticulin. Als Sensor für den richtigen Faltungszustand dient die UDP-Glucose:Glycoprotein-Glucosyltransferase (UGGT), die in der Lage ist, zwischen gefalteten und ungefalteten Substratproteinen zu unterscheiden (Sousa *et al.*, 1992).

Im Falle einer inkorrekten Faltung wird erneut ein Glucoserest an das Protein angehängt, welches daraufhin erneut von Calnexin/Calreticulin gebunden und dem Zyklus zugeführt wird (Hammond & Helenius, 1995; Parodi, 1998). Die ungefalteten Proteine durchlaufen zahlreiche Zyklen. 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).

1.4 Immunglobuline

1.4.1 Struktur von Antikörpern

Zur Durchführung von Faltungsstudien sind Antikörper besonders geeignet, denn als multimerer, sekretorischer Proteine sind sie ein ideales Faltungsmodell. Die Immunglobulin-Superfamilie umfasst eine große Anzahl verschiedenartiger, miteinander verwandter Proteine, die sich durch einen hohen Grad an Sequenz- und Strukturhomologie auszeichnen.

Immunglobuline (Ig) sind mehr oder weniger stark glykosyliert und extrazellulär lokalisiert. Gemeinsam ist ihnen ein als *immunglobulin fold* bezeichnetes Strukturmotiv, bestehend aus einer 70-110 Aminosäuren langen Sequenz, die als unabhängige Domäne faltet (Amzel & Poljak, 1979). Durch Wechselwirkungen zwischen diesen Domänen bilden sie in einer Assoziationsreaktion Dimere oder höheren Oligomere, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden (Barclay *et al.*, 1988).

Ig-ähnliche Domänen findet man neben den Proteinen des Immunsystems in vielen anderen Proteinen mit unterschiedlichsten biologischen Funktionen (Bork *et al.*, 1994), wie z. B. in Zelloberflächenproteinen, Rezeptoren für Wachstumshormone, Transkriptionsfaktoren und Enzymen.

Antikörper oder Immunglobuline sind die aktiven Proteine des humoralen Immunsystems der Vertebraten, das sich vor allem gegen Bakterien und Viren richtet (Janeway & Travers, 1997). Sie werden in fünf Klassen eingeteilt: IgA, IgM, IgD, IgE und IgG.

Das Immunglobulin G setzt sich aus zwei leichten und zwei schweren Ketten zusammen, die über Cysteinbrücken miteinander verbunden sind (Amzel & Poljak, 1979) (siehe Abb. 1.4). Die schwere Kette (ca. 50 kDa) ist vom γ -Typ und besteht aus vier Domänen, die als V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} -Domäne bezeichnet werden. Die leichte Kette (ca. 25 kDa) ist vom κ - oder λ -Typ und setzt sich aus den Domänen V_L und C_L zusammen. Diese Untereinheiten lagern sich zu einem Y- oder T-förmigen $(L-H)_2$ -Dimer zusammen, dessen Quartärstruktur eine zweizählige Symmetrieachse aufweist (Alzari *et al.*, 1988). Die zwischen C_{H1} und C_{H2} liegende *hinge*-Region weist nur wenig Sekundärstruktur auf und verleiht dem Antikörpermolekül die für die Antigenbindung nötige Flexibilität. Hier liegen auch die Cysteine, die die beiden schweren Ketten kovalent miteinander verbinden (Davies & Metzger, 1983).

Über einen Asparaginrest in der C_{H2} -Domäne ist ein Oligosaccharid N-glykosidisch an den Antikörper gebunden (Deisenhofer, 1981). Dieses hexosereiche Oligosaccharid ist zwischen den beiden C_{H2} -Domänen eingelagert und vermittelt so den gegenseitigen Kontakt in diesem

Bereich der Antikörperketten. Der Bereich stellt zudem den Angriffspunkt für das Komplementsystem dar (Mizuochi *et al.*, 1987).

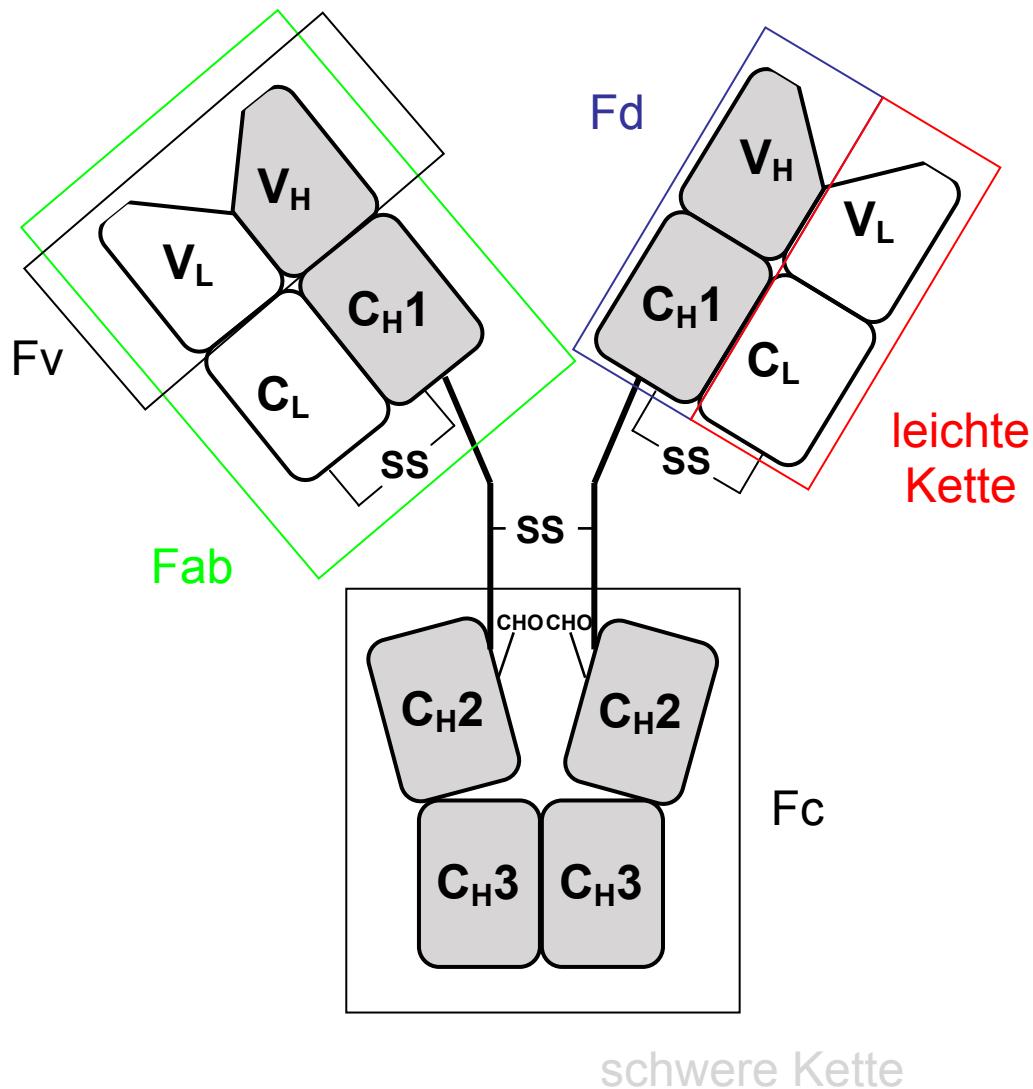


Abb. 1.4: Darstellung eines Antikörpers vom Typ IgG.

Schemazeichnung, CHO: Glykoanteil; SS: Disulfidbrücken.

Die leichte Kette, die aus einer N-terminalen variablen (V_L) und einer konstanten (C_L) Domäne besteht, ist über eine Cysteinbrücke am C-terminalen Ende mit der schweren Kette verbunden. Die V_H-Domäne und die V_L-Domäne bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle und werden auch als F_V-Fragment bezeichnet.

Durch Hydrolyse mit Papain, das definiert in der *hinge*-Region spaltet, erhält man ein Fragment, bestehend aus leichter Kette und dem sog. Fd-Fragment (V_H- und C_H1-Domäne der schweren Kette), welches in der Lage ist Antigene zu binden und deshalb als Fab-Fragment bezeichnet wird.

Die beiden unterschiedlichen Polypeptidketten der Antikörper lassen sich in Domänen unterteilen, die unabhängig voneinander falten. Dieser *immunoglobulin fold* wird gelegentlich auch als *greek key β barrel* bezeichnet (Richardson, 1981). Er setzt sich aus zwei leicht gegeneinander verdrehten β -Faltblättern (ABED und GFC bzw. GFCC'C'' bei den variablen Domänen) zusammen (Amzel & Poljak, 1979) (Abb. 1.5).

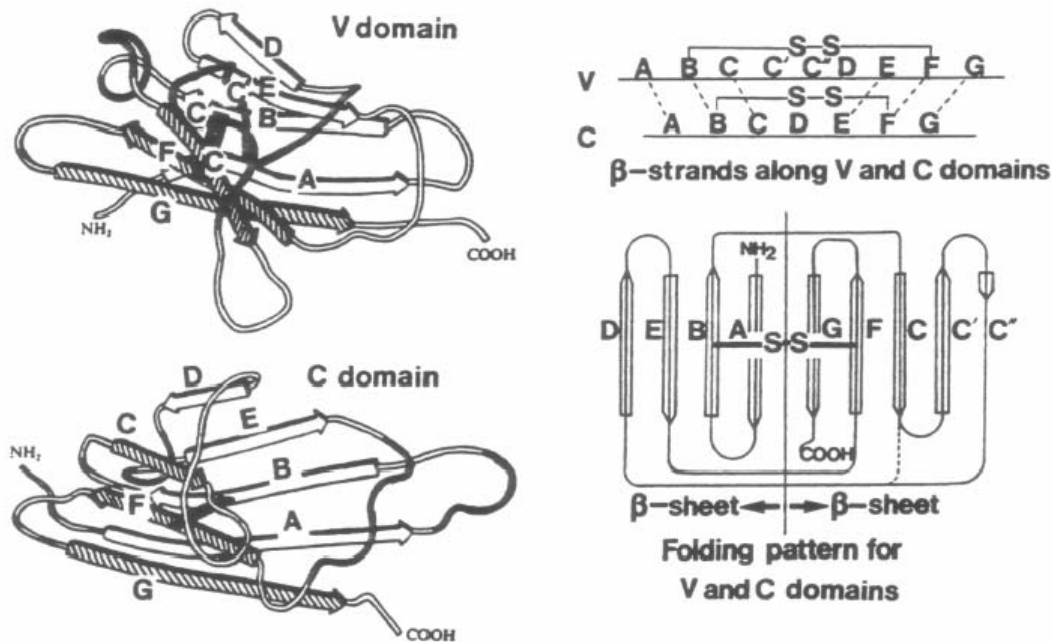


Abb. 1.5: Darstellung des *immunoglobulin fold* der V- und C-Domäne (aus Williams & Barclay, 1988). Links: Strukturbilder der Immunoglobulin-V_L und C_L-Domäne. Rechts: Schematische Darstellung des Faltungsmusters (gleiche Beschriftung wie links).

Charakteristisch für den *immunoglobulin fold* ist ein hydrophober Bereich zwischen den beiden β -Faltblättern (Amzel & Poljak, 1979). In den β -Strängen ABE und GFC liegen hoch konservierte Sequenzbereiche (Lesk & Chothia, 1982), wohingegen die verbindenden Bereiche eine große Variabilität in Bezug auf Struktur und Sequenz aufweisen (Phizackerley *et al.*, 1979). Die Antigenbindungsstelle wird durch die drei sog. *complementary determining regions* (CDR) in den variablen Domänen V_H und V_L gebildet. (Abb. 1.5) (Kehoe & Capra, 1971). Diese hypervariablen Regionen, werden von hochkonservierten sog. *framework regions* begrenzt (Amzel & Poljak, 1979).

Die beiden Faltblätter werden durch eine Disulfidbrücke zwischen den β -Strängen B und F verbunden (Williams & Barclay, 1988). Diese kovalente Verbindung ist hoch konserviert und trägt maßgeblich zur Stabilität der Antikörperdomänen bei (Goto & Hamaguchi, 1979; Rudikoff & Pumphrey, 1986).

Neben der Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den beiden schweren sowie zwischen schwerer und leichter Kette, wird die Assoziation zum Tetramer im Wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen bewirkt, welche durch konservierte Aminosäurenreste auf den viersträngigen Faltblättern der Immunglobulin-Domänen vermittelt werden (Padlan *et al.*, 1987). So liegt zum Beispiel auch die isolierte C_H3-Domäne im nativen Zustand als Dimer vor (Isenman *et al.*, 1979; Mayer, 1993; Phizackerley *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982). Die Assoziation der variablen Domänen wird durch Ausbildung einer dreischichtigen Kontaktfläche gewährleistet. Diese setzt sich aus den beiden viersträngigen Faltblattstrukturen sowie einer dazwischen liegenden Schicht verdrehter Faltblattstränge zusammen (Chothia *et al.*, 1985).

Die *immunoglobulin fold*-ähnliche Topologie taucht neben den Antikörpern noch bei einer Vielzahl anderer Proteine auf. Dazu gehören der Wachstumshormonrezeptor (de Vos *et al.*, 1992), der Transkriptionsfaktor NF-κB (Gosh *et al.*, 1995), Matrixproteine wie Tenascin (Leahy *et al.*, 1992) und Fibronectin (Main *et al.*, 1992), Enzyme wie Cyclodextringlycosyltransferase (Klein & Schulz, 1991) und Regulationsproteine wie das bakterielle Chaperon PapD (Holmgren & Branden, 1989). Obwohl diese Proteine zum Teil erhebliche Unterschiede in ihrer Sequenz aufweisen, werden sie auf Grund ihrer Domänenstruktur zur Immunglobulin-Superfamilie zusammengefasst (Bork *et al.*, 1994).

1.4.2 Antikörperfaltung *in vivo* und *in vitro*

Antikörper werden als sekretorische Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und assembliert. Faltung und Assoziation der schweren und leichten Kette erfolgen co-translational (Bergmann & Kuehl, 1979; Melnick *et al.*, 1994). Freie translatierte leichte Ketten haben nur für wenige Minuten die Fähigkeit, sich an schwere Ketten anzulagern. Nach etwa zwei Stunden werden sie als Monomere aus den Zellen sezerniert (Lee *et al.*, 1999; Skowronek *et al.*, 1998). Die Ausbildung aller weiteren kovalenten Bindungen zum nativen Antikörpermolekül erfolgt nachdem die Polypeptidketten vollständig am Ribosom synthetisiert wurden (Bergmann & Kuehl, 1979). Der überwiegende Teil der Disulfidverbrückungen zwischen den einzelnen Ketten bildet sich schon an den naszierenden schweren Ketten, wobei dieser Prozess auch im ER von PDI katalysiert wird (vgl. 1.3.1) (Freedman, 1991). Freie schwere Ketten können von der Zelle nicht sekretiert werden (Haas & Wabl, 1983). Sie werden vom molekularen Chaperon BiP gebunden und im ER zurückgehalten (vgl. 1.2.3). BiP wird durch Bindung der schweren Kette an die leichte Kette verdrängt. Erst dann kann der Komplex aus der Zelle transportiert werden (Cremer *et al.*, 1993). Falsch gefaltete Antikörperketten

werden von BiP gebunden und über einen retrograden Transport dem Proteasom im Cytosol zugeleitet (Chillaron & Haas, 2000). Dabei ist vermutlich noch ein weiteres Protein an der Faltung und Assoziation von Antikörpern beteiligt: Grp94, ein ER-Mitglied der Hsp90-Familie, bildet einen ternären Komplex mit Immunoglobulinketten und BiP (Melnick *et al.*, 1994).

Viele der grundlegenden *in vitro*-Untersuchungen zum *immunoglobulin fold* sind mit Antikörpern bzw. deren Fragmenten als Modellsystem gemacht worden. Besonders die Arbeiten zur Faltung der leichten Kette und ihrer Fragmente C_L und V_L (Goto *et al.*, 1979; Goto & Hamaguchi, 1982a; Goto & Hamaguchi, 1982b; Tsunenaga *et al.*, 1987), zur Faltung einer proteolytisch erzeugten C_{H3}-Domäne (Isenman *et al.*, 1979; Sumi & Hamaguchi, 1982) sowie zur Faltung des Antikörpers MAK33 und seiner Fragmente Fab, C_{H2} und C_{H3} (Buchner, 1987; Buchner *et al.*, 1991; Kammermeier, 1999; Lilie *et al.*, 1995; Mayer, 1998; Pirkl, 1996; Thies, 1997; Thies *et al.*, 1999; Thies *et al.*, 2002; Thies, 2002) sind hier zu nennen.

Antikörperdomänen enthalten eine Vielzahl von Prolinen. Einige davon liegen im nativen Zustand in der *cis*-Konfiguration vor (Deisenhofer, 1981). Prolin-Isomerisierungen sind in der Antikörperfaltung meist geschwindigkeitsbestimmend (vgl. 1.1), da dieser Prozess eine hohe Aktivierungsenergie besitzt (Schmid, 1993). So zeigte sich beim C_{H3} Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK33, dass die Prolylisomerisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist und vor der Dimerisierung stattfindet (Thies *et al.*, 1999). Durch Zugabe von PPIasen konnte die Faltung deutlich beschleunigt werden. Im Fab Fragment desselben Antikörpers jedoch, findet die Isomerisierung der Peptidyl-Prolyl-Bindung erst nach der Dimerisierung statt (Lilie *et al.*, 1995).

Disulfidbrücken spielen eine wichtige Rolle bei der Faltung von Antikörpern, indem sie den *immunoglobulin fold* stabilisieren. Die reduzierte Form der C_L-Domäne ist gegenüber der oxidierten Spezies deutlich instabiler (Goto & Hamaguchi, 1979). Die Konformation ist jedoch kaum verändert. Das Fehlen der Disulfidbrücke führt dazu, dass die schnelle Faltungsphase um den Faktor 100 verlangsamt wird (Goto & Hamaguchi, 1982b). Faltet man das denaturierte, reduzierte Protein unter oxidierenden Bedingungen zurück, so entsteht ein frühes Faltungsintermediat, das noch keine Disulfidbrücke besitzt. Auch bei der reduzierten C_{H3}-Domäne bleibt die Konformation trotz des Fehlens der Disulfidbrücke weitgehend unberührt. Durch spektroskopische Messungen konnte nur eine leicht veränderte räumliche Struktur festgestellt werden (Thies *et al.*, 2002). Wie das reduzierte C_L-Fragment ist diese Domäne verglichen mit ihrer oxidierten Form deutlich instabiler und aggregations-empfindlicher (Bell, 1997).

Für viele *in vitro*-Faltungsstudien wurde der monoklonale Antikörper MAK33 und dessen Fragmente verwendet. Bei der Renaturierung der oxidierten Form des Fab-Fragments wurden vier unterschiedliche Faltungsintermediate mit bereits assoziierten Ketten beobachtet (Lilie *et al.*, 1995). Diese Intermediate deuten auf vier verschiedene Faltungswege zum nativen Protein hin. Sie unterscheiden sich in der Konfiguration ihrer Proline und der kovalenten Verbindung der beiden Polypeptidketten. Die Rückfaltung beginnt beim denaturierten Protein in einer Form, bei der sich entweder alle Proline in nativer Konfiguration befinden, oder bei der die Proline *trans*-Konfiguration aufweisen. Über einen schnellen ersten Faltungsschritt werden zunächst die isoliert gefalteten Einzelketten gebildet. Anschließend erfolgt eine schnelle Assoziation zu noch nicht-nativen Intermediaten und über einen zusätzlichen schnellen Schritt erfolgt die Bildung des nativen Proteins. Es ist naheliegend, dass die Assoziation der leichten Kette mit dem Fd-Fragment, also die Ausbildung der Quartärstruktur, die *cis*-Konfiguration des Prolins bestimmt (Lilie *et al.*, 1995).

Der monoklonale Antikörper MAK33 weist bei pH 2 eine Struktur auf, die einen *molten globule*-ähnlichen Charakter besitzt und als *alternatively folded state* bezeichnet wird. Dieser Zustand besitzt sowohl Sekundär- als auch Tertiärstruktur. Diese Struktur unterscheidet sich vom *molten globule* durch ihre hohe Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln, was sonst für ein natives Protein charakteristisch ist (Buchner *et al.*, 1991). Auch für das Fab-Fragment von MAK33 konnte dieser Zustand nachgewiesen werden (Lilie & Buchner, 1995). Ein an den Cysteinen alkyliertes Fab-Fragment weist keinen *alternatively folded state* auf, weswegen man annimmt, dass die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen leichter Kette und Fd-Fragment wichtig für die Stabilität dieses Zustandes ist (Lilie & Buchner, 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die C_H3-Domäne von MAK33, die nur über nicht-kovalente Wechselwirkungen dimerisiert, den *alternatively folded state* annehmen kann, allerdings nur bei erhöhter Ionenstärke (Kammermeier, 1999; Thies *et al.*, 2001).

1.4.3 Der monoklonale Antikörper MAK33

MAK 33 ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus vom IgG1-Typ. Er richtet sich gegen menschliche Kreatinkinase aus Muskel (CK-MM-EC 2.7.3.2.) und inhibiert deren enzymatische Aktivität zu 80 %.

Seine cDNA wurde sowohl für die leichte Kette (κ -Typ), die schwere Kette (γ 1-Typ) (Buckel *et al.*, 1987), als auch für das Fd-Fragment der schweren Kette (Bücheler, 1989) in *E. coli*-Vektoren kloniert.

Die Sekretion von MAK33 in COS- oder CHO-Zellen ergab immunologisch aktives Protein in sehr geringen Mengen (Weidle *et al.*, 1987). Erfolgreicher war die Gewinnung aktiven Proteins durch die Expression der einzelnen Ketten in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* und anschließender Rekonstitution (Buchner & Rudolph, 1991).

Auch durch Expression in Pflanzen wie *Nicotiana* oder *Arabidopsis* konnten aktive MAK33 Antikörper bzw. Fab-Fragmente hergestellt werden mit Ausbeuten bis zu 1,3 % der Gesamtzellmasse (De Neve *et al.*, 1993).

Über die Struktur von MAK33 und dessen Faltung wurden bereits einige grundlegende Arbeiten durchgeführt. Vor allem das C_H3-Fragment (Thies *et al.*, 1999; Thies *et al.*, 2001; Thies *et al.*, 2002) und das Fab-Fragment (Augustine *et al.*, 2001) sind inzwischen gut charakterisiert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse zur nativen Struktur, Faltung und Renaturierung machen MAK33 zu einem gut geeigneten Modell-System für Forschungen auf dem Gebiet der Antikörperfaltung.

1.5 Expression rekombinant erzeugter Proteine

1.5.1 Expression rekombinant erzeugter Proteine in *E. coli*

Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* bietet zahlreiche Vorteile. Zum einen ist *E. coli* einer der genetisch und physiologisch am besten verstandenen Organismen. Zum anderen bietet *E. coli* die Möglichkeit, aufgrund des schnellen Wachstums zu hohen Zelldichten, rekombinantes Protein in großen Mengen zu produzieren.

Die Expression in *E. coli* bringt jedoch auch einige Nachteile mit sich. Dabei ist im Falle einer cytoplasmatischen Expression vor allem die begrenzte Fähigkeit zur Bildung von Disulfidbrücken zu nennen. Die cytoplasmatische Expression rekombinanter Proteine mit intakten Disulfidbrücken gelang bisher, auf Grund des reduzierenden Milieus, nur in Ausnahmefällen wie zum Beispiel beim Hämoglobin (Hoffmann *et al.*, 1990) oder dem dimeren Uteroglobin (Miele *et al.*, 1990).

Die mögliche toxische Wirkung des Fremdproteins auf den Organismus und die Tatsache, dass viele posttranslationalen Modifikationen nicht durchgeführt werden können (Makrides, 1996), machen die Expression gerade von Antikörperfragmenten in *E. coli* äußerst schwierig.

Ein weiteres Problem ist die Bildung von *inclusion bodies*. Dieses häufig auftretende Phänomen beschreibt unlösliche Proteinaggregate, die in *E. coli* als Folge der Überproduktion von Proteinen auftreten (Cheng *et al.*, 1981). Diese *inclusion bodies* treten auch bei der Expression rekombinanter Proteine sowohl im Cytoplasma als auch im Periplasma auf (Bowden & Georgiou, 1990; Marston, 1986; Williams *et al.*, 1982). Die Bildung von *inclusion bodies* macht eine anschließende *in vitro* Faltung notwendig, was inzwischen häufig erfolgreich und mit guten Ausbeuten durchgeführt werden kann (Buchner & Rudolph, 1991; Rudolph & Lilie, 1996).

Die rekombinante Proteinexpression in Form von *inclusion bodies* bietet jedoch auch einige Vorteile. So enthalten *inclusion bodies* das überexprimierte Protein in angereicherter Form und schützen es zudem vor dem Abbau durch Proteasen. Auch das Problem der Toxizität bestimmter Proteine auf den Wirtsorganismus wird dabei umgangen.

Für Proteine, für die kein Erfolg versprechendes Rückfaltungsprotokoll existiert, wird jedoch weiterhin nach Möglichkeiten gesucht, die Bildung von *inclusion bodies* zu umgehen. Eine Möglichkeit besteht darin, das Protein als Fusionsprotein oder im Periplasma zu exprimieren. Dies war zum Beispiel im Fall von kleinen Antikörperfragmenten (F_v) erfolgreich (Plückthun & Skerra, 1989). Durch Verwendung eukaryotischer Signalsequenzen oder durch Verknüpfen

eines prokaryotischen Signalpeptids mit dem N-Terminus des rekombinanten Proteins kann dieses Ziel erreicht werden (Skerra & Pluckthun, 1988; Zemel-Dreassen & Zamir, 2002).

Ein grundsätzliches Problem bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* stellt das Vorhandensein einer großen Zahl von Proteasen sowohl im Cytosol, als auch in der inneren und äußeren Membran des Periplasmas dar. Diese Proteasen dienen dem Abbau von Fremdproteinen (Goldberg & Goff, 1986) und verringern damit die Stabilität und Ausbeute des exprimierten Proteins. Abhilfe bietet die Verwendung von Stämmen, die Mutationen in Protease-Genen enthalten, die diese inaktivieren (Baneyx & Georgiou, 1991; Gottesman, 1990).

1.5.2 Das Redox-System im Cytoplasma von *E. coli*

Proteine des Cytoplasmas enthalten, im Gegensatz zu vielen sezernierten Proteinen, keine Disulfidbrücken. Eine Ausnahme stellen bestimmte cytoplasmatische Enzyme dar, die im Verlauf ihres katalytischen Zyklus Disulfidbrücken bilden (Stewart *et al.*, 1998). Grund dafür ist die reduzierende Umgebung im Cytoplasma, die die Bildung von Cysteinbrücken verhindert (Gilbert, 1990). Proteine, die normalerweise Disulfidbrücken enthalten, aggregieren deswegen bei cytoplasmatischer Expression (Derman & Beckwith, 1991; Pollit & Zalkin, 1983).

Die Bildung von Disulfidbrücken kann die Aktivität von Proteinen im Cytoplasma regulieren (Aslund & Beckwith, 1999). Gerade unter Stressbedingungen reagieren viele Organismen mit der Bildung von Disulfidbrücken. Zum Beispiel werden der Transkriptionsfaktor OxyR und das Hitzeschockprotein Hsp33 durch die Oxidation von Cysteinresten zu Disulfidbrücken aktiviert (Jakob *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1998). Das genaue Verständnis der Redoxsysteme von Organismen ist deshalb von besonderem Interesse.

Das Thiol-Disulfid-Gleichgewicht und damit das Redoxpotential im Cytoplasma wird von einer Vielzahl von Faktoren bestimmt. Glutathion, ein Cystein enthaltendes Tripeptid, stellt dabei die wichtigste Puffersubstanz im Cytoplasma von *E. coli* dar. Das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion beträgt in etwa 50:1 bis 200:1 (Hwang *et al.*, 1992). *In vitro* führen ähnliche Verhältnisse zu einem Redoxpotential, das die Bildung von Disulfidbrücken in den meisten Proteinen verhindert (Hwang *et al.*, 1992; Walker & Gilbert, 1994).

In *E. coli* nutzen zwei Stoffwechselwege NADPH um Disulfidbrücken zu reduzieren: Das Thioredoxin-System, bestehend aus Thioredoxinreduktase und zwei Thioredoxinen und das Glutaredoxin-System, bestehend aus Glutathionreduktase, Glutathion und drei Glutaredoxinen (Prinz *et al.*, 1997).

Diese beiden Systeme sind für die Reduktion der Disulfidbrücken cytoplasmatischer Proteine in *E. coli* verantwortlich. *In vivo* können sich diese beiden Systeme teilweise ersetzen. Doppelmutanten, die Mutationen in beiden Systemen aufweisen, können die Bildung von Disulfidbrücken erleichtern (Prinz *et al.*, 1997).

Einige dieser Doppelmutanten wachsen nur dann unter aeroben Bedingungen, wenn dem Medium ein Reduktionsmittel zugesetzt wird. *E. coli* benötigt also ein funktionierendes Thioredoxin- oder Glutaredoxin-System, um Disulfidbrücken zu reduzieren. Die Reduktion von Disulfidbrücken ist vor allem im katalytischen Zyklus des essentiellen Enzyms Ribonukleotidreduktase, aber auch bei anderen Enzymen, erforderlich. Außerdem werden durch diese Systeme nicht-native Disulfidbrücken von cytoplasmatischen Proteinen reduziert (Prinz *et al.*, 1997).

In vitro konnte gezeigt werden, dass Thioredoxin eine große Anzahl von Proteinen reduziert (Holmgren, 1984; Holmgren, 1985). Glutaredoxine sind hingegen weniger wirksame Reduktionsmittel für Disulfidbrücken (Aslund *et al.*, 1996; Holmgren, 1989), was sich durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale erklären lässt (Thioredoxin 1: -270mV; Glutaredoxin 1: -233 mV; Glutaredoxin 3: -198 mV) (Prinz *et al.*, 1997).

Bei der Reduktion von Protein-Disulfidbrücken werden die Oxidoreduktasen oxidiert und müssen anschließend reduziert werden. Das Flavoenzym Thioredoxinreduktase benutzt NADPH um Thioredoxin zu reduzieren, kann jedoch keine Glutaredoxine reduzieren. Diese werden von Glutathion reduziert, welches wiederum selbst von Glutathionreduktase reduziert wird, einem Flavoenzym, das NADPH verbraucht. Da auch Glutathionreduktase nur in sehr geringem Umfang Thioredoxine reduzieren kann, nimmt man an, dass die beiden Redoxsysteme unabhängig voneinander arbeiten. Diese Überlegungen sind in folgendem Schema zusammengefasst (Abb. 1.6).

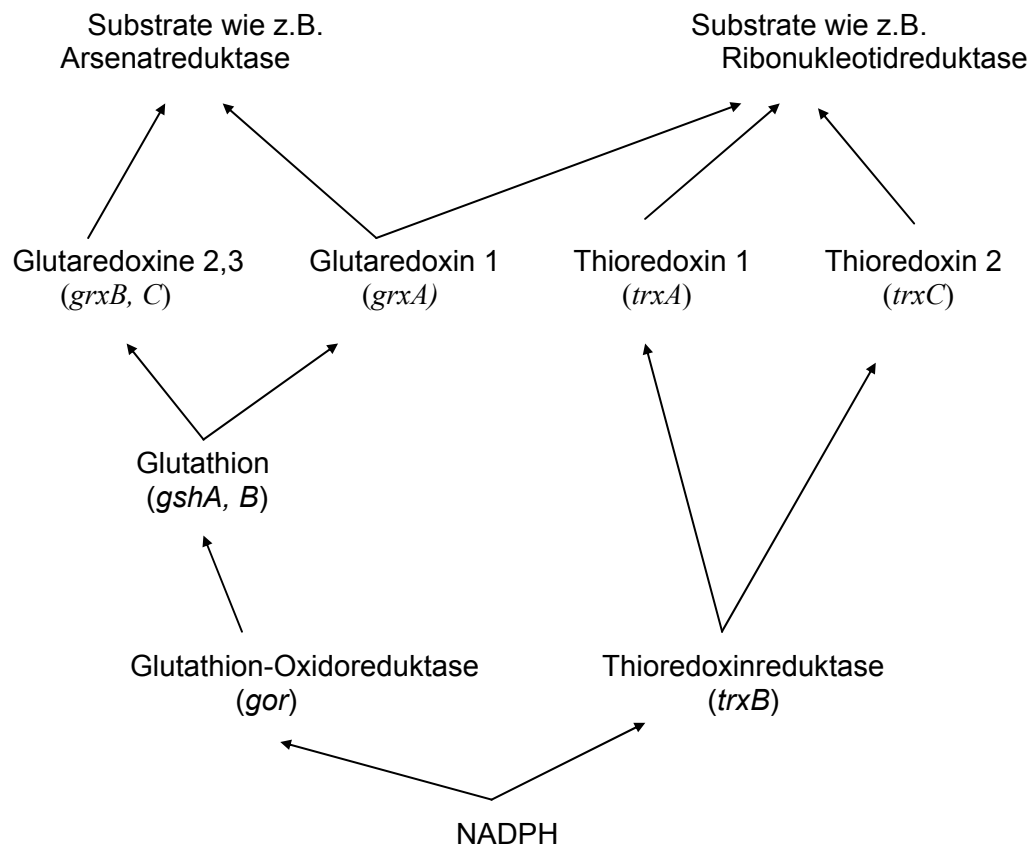


Abb. 1.6: Bekannte Komponenten des Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systems. Die Gene, die die entsprechenden Enzyme codieren, sind in Klammern angegeben. Pfeile entsprechen dem Elektronenfluss (Stewart *et al.*, 1998).

Die Bildung von Disulfidbrücken wurde anhand der Alkalischen Phosphatase in verschiedenen *knock-out*-Mutanten gemessen (Prinz *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1998). Alkalische Phosphatase enthält zwei Disulfidbrücken, die für die Aktivität des Enzyms essentiell sind. Deletiert man im Gen der Alkalischen Phosphatase (AP) die Signalsequenz für den Transport ins Periplasma ($\Delta 2-22$), so verbleibt das Enzym im Cytoplasma. Die Disulfidbrückenbildung kann dann durch Bestimmung der Aktivität des Enzyms gemessen werden.

Durch Deletion verschiedener Komponenten des Thioredoxin- und/oder Glutaredoxin-Systems konnte eine gesteigerte Disulfidbrückenbildung im Vergleich zum Wildtyp erreicht werden (Prinz *et al.*, 1997). Dabei stellte sich jedoch heraus, dass mit der Anzahl der Mutationen nicht unbedingt eine Erhöhung der AP-Aktivität und damit eine gesteigerte Disulfidbrückenbildung einher geht. Die Redoxverhältnisse stellten sich als wesentlich komplizierter heraus. Neuere Untersuchungen ergaben sogar, dass einige Komponenten des Thioredoxin-Systems für die Bildung von Disulfidbrücken unbedingt erforderlich sind (Stewart *et al.*, 1998). In einer Mutante, die keine Thioredoxinreduktase, wohl aber die beiden Thioredoxine enthält, konnte

eine deutliche Steigerung der AP-Aktivität gemessen werden. Hingegen zeigte eine Dreifachmutante ohne Thioredoxine und Thioredoxinreduktase keinen Anstieg der AP-Aktivität. Daraus wurde gefolgert, dass die beiden Thioredoxine, wenn sie in oxidiertem Form vorliegen, die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren können, also genau die gegenteilige Rolle übernehmen, die sie sonst in ihrer reduzierten Form haben (Stewart *et al.*, 1998).

1.6 Problemstellung

Die cytoplasmatische Expression von rekombinanten Proteinen, insbesondere Antikörpern in *E. coli*, erweist sich auf Grund der reduzierenden Umgebung als äußerst schwierig. Das überexprimierte Protein aggregiert in Form von *inclusion bodies* und muss aufwendig und oftmals mit nur geringen Ausbeuten zurückgefaltet werden. Die Möglichkeit einer löslichen Expression im Cytoplasma ist daher ein besonderer Anreiz, gerade auch unter dem Gesichtspunkt der industriellen Anwendung. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression des Fab-Fragments des monoklonalen Antikörpers MAK33 im Cytoplasma von *E. coli Knockout*-Mutanten untersucht werden. Verschiedene *Knockout*-Stämme, denen Komponenten des Thioredoxin- und/oder Glutaredoxinsystems fehlen, sollten hinsichtlich ihres Wachstums und der Expression des Fab-Fragments miteinander verglichen werden.

Darüber hinaus sollte die *in vitro* Faltung des Fab-Fragments näher charakterisiert werden. Besonderer Augenmerk galt dabei dem Einfluss von Chaperonen und Faltungshelfern. Verschiedene Proteindisulfidisomerasen, wie etwa PDI und Erp57, sowie unterschiedliche ER-residente Chaperone wie das Hsp70-Homologe BiP sollten auf ihren Einfluss auf die Faltung und Reaktivierung des Antikörperfragments getestet werden. Insbesondere die Zusammenarbeit von PDI mit dem molekularen Chaperon BiP sollte eingehend untersucht werden.

In diesem Zusammenhang galt das Interesse auch dem Regulationsmechanismus von BiP als Mitglied der Hsp70 Chaperon Familie. Wie alle Hsp70 Chaperone arbeitet BiP ATP-abhängig. Der ATPase Zyklus sollte sowohl in Abwesenheit von Substrat als auch in Gegenwart von bindenden Peptiden und einer Antikörperdomäne als natürlichem Substrat kinetisch charakterisiert werden. Auch der Einfluss verschiedener DnaJ homologer Proteine der Hsp40 Familie sollte dabei näher untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einem Modell zusammengefasst, das überraschende Einblicke in die Arbeitsweise und Regulation des Chaperons BiP bei der Faltung von Antikörpern erlaubt.

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)	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH & Co (Karlsruhe)
ECLplus-Westernblotdetektionssystem	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
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 vorentionisiertem Wasser 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

BsaAI	New England BioLabs (Beverly, USA)
ClaI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
EcoRV	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
HincII	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
HindIII	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
NdeI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
NcoI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
ScaI	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
SspI	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	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, USA)
Anti-Kaninchen-IgG -POD-Konjugat aus Ziege	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-6xHIS aus Kaninchen	ABR Affinity Bioreagents Inc. (Golden, USA)

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	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
T4-DNA-Polymerase	Promega (Madison, USA)
T4-Polynukleotidkinase	Promega (Madison, USA)

Albumin aus Rinderserum (BSA), rein	Sigma (St. Louis, USA)
MAK33 Fab aus Papainspaltung	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

Prolyl-4-Hydroxylase und Erp57 wurden freundlicherweise von Prof. Kari Kivirikko und Dr. Peppi Karppinen von der Universität Oulu (Finnland) zur Verfügung gestellt. DsbC wurde freundlicherweise von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) 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	Novex (Frankfurt)
Rainbow-Marker für SDS-PAGE	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
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)	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
ResourceS (1 ml und 6 ml)	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Superdex 75-pG-Säule	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Superdex 200-pG-Säule	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Superdex 200-HR-Säule	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Ni-NTA Superflow	QIAGEN (Hilden)
Protein L Agarose	Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, USA)
Super-Loop (50 ml und 150 ml)	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Weitere Materialien	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

2.1.5 Sonstige Materialien

Centricon 3, 10, 30, 100-Mikrokonzentratoren	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)
Immobilon-N(Nitrocellulose) 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 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)
<i>E. coli</i> EcoB	lon (Donch & Greenberg, 1968)
<i>E. coli</i> JM 83	ara, Δ(lac-pro AB) rpsL (=str A), Φ80, lac ZΔM15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<i>E. coli</i> BL21 DE3	F-lon ompT hsdS _B (rB ⁻ mB ⁻), gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1) (Stratagene, La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> DHB4 (wt)	F' lac-pro lacI ^q /Δ (ara-leu)7697 araD139 ΔlacX74 galE galK rpsL phoR Δ(phoA)PvuII ΔmalF3 thi
<i>E. coli</i> DHB4 (gor)	gor...Tc
<i>E. coli</i> DHB4 (gshA)	gshA::Kan
<i>E. coli</i> DHB4 (grxB)	grxB::Kan
<i>E. coli</i> DHB4 (grxC)	grxC::Cm
<i>E. coli</i> DHB4 (grxA)	grxA::Kan
<i>E. coli</i> DHB4 (trxA)	ΔtrxA
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrxB)	gor...Tc-grxB::Kan
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrxC)	gor...Tc-grxC::Cm
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrxABC)	gor-grxA::Kan-grxB::Kan...Tc-grxC::Cm
<i>E. coli</i> DHB3 (grxABC)	grxA::Kan-grxB::Kan...Tc-grxC::Cm; DHB3=DHB4 ohne F'
<i>E. coli</i> DHB4 (gortrxA)	gor...Tc-ΔtrxA

E. coli DHB4 (gortrxAgrxB) *gor...Tc-ΔtrxA-grxB::Kan*

E. coli DHB4 (gortrxAgrxC) *gor...Tc-ΔtrxA-grxC::Cm*

E. coli DHB4 (trxB) *trxB::Kan*

Die *E. coli* DHB4 *Knockout-Stämme* wurden freundlicherweise von Prof. Arne Holmgren und Dr. Alexios Vlamis vom Karolinska Institut in Schweden bereitgestellt.

2.1.7 DNA

2.1.7.1 Oligodesoxynucleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	Zur Klonierung von:
L3 (Start)	G ATC <u>CCA TGG</u> ATA TTG TGC TAA CTC AGT CTC CAG	pMM2
L2 (Stopp)	C TAG <u>TCT AGA</u> CTA CTA ACA CTC ATT CCT GTT GAA GCT	pMM2
Fd4 (Start)	G ATC <u>CAT ATG</u> GAA GTT CAA GGT GTG GAG TCT	pMM4
Fd3b (Stopp)	C TAG <u>AAG CTT</u> CTA CTA TCA ACC ACA ATC CCT GGG CA	pMM4
Fd1His (Start)	T TTT <u>CAT ATG</u> CAT CAT CAT CAT ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG	pMM3
Fd3c (Stopp)	T TTT <u>AAG CTT</u> CTA CTA TCA ACC ACA ATC CCT GGG CA	pMM3

2.1.7.2 Plasmide

pBAD/Myc-HisB	Expressionsvektor (Amp), 4,1 kbp, pUC-Derivat, C-terminal 6xHis-tag, araBAD-Promotor, Invitrogen (De Schelp, NL)
pMM2	Expressionsvektor (Amp) für die leichte Kette (κ) von MAK33, pBAD-Derivat, diese Arbeit
pMM3	Expressionsvektor (Amp) für das Fd-Fragment ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion, pBAD-Derivat, diese Arbeit
pMM4	Expressionsvektor (Amp) für das Fd-Fragment ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion und N-terminalem 4x HIS tag, pBAD-Derivat, diese Arbeit

pMM24	Expressionsvektor (Amp) für die leichte Kette (κ) von MAK33 und für das Fd-Fragment ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion, pBAD-Derivat, diese Arbeit
pMS1	Expressionsvektor (Amp) für die leichte Kette (κ) von MAK33 und für das Fd-Fragment ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion und N-terminalem 4x HIS tag, pBAD-Derivat, diese Arbeit
pBT111	Expressionsvektor (Amp) für die leichte Kette (κ) von MAK33, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
p12002	Expressionsvektor (Amp) für das Fd-Fragment ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
p12016	Expressionsvektor (Amp) für die schwere Kette ($\gamma 1$) von MAK33 mit lacZ-Fusion, Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
pUJ4	Expressionsvektor (Amp) für Maus-BiP ohne N-terminale Signalsequenz mit C-terminal 6xHis-tag, pASK-Derivat (Knarr <i>et al.</i> , 1999)
pUJ4-Cm	pUJ4 mit Cm-Resistenzgen inseriert in Amp-Resistenzgen, diese Arbeit
pTGroE	Expressionsvektor (Cm) für GroES und GroEL, pET-Derivat (Yasukawa <i>et al.</i> , 1995)
pSM21	Epressionsvektor (Amp) für C _{H3} -Domäne von MAK33, pASK-Derivat (Mayer, 1993)
pLWRP7	Expressionsvektor (Amp) für humane PDI, pET23b-Derivat (Darby & Creighton, 1995)

pLWRP7 zur Expression von humanem PDI wurde freundlicherweise von Prof. Robert Freedman und Dr. Llyod Ruddock zur Verfügung gestellt.

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 *et al.*, 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	

SB-Medium:	10 g/l	Yeast Extract
	20 g/l	Bacto Trypton
	5 g/l	NaCl
	1 g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O

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
Chloramphenicol-Stammlösung	35 mg/ml in Ethanol p.a., stabil bei -20°C, dem Medium im Verhältnis 1:1000 zuzusetzen
Kanamycin-Stammlösung	35 mg/ml in Wasser, stabil bei -20°C, dem Medium im Verhältnis 1:1000 zuzusetzen
Tetracyclin-Stammlösung	35 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

2.1.10 Geräte

Absorptionsspektrophotometer

Ultrospec 3000 UV/VIS-Spektrophotometer	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Biochrom 4060 UV/VIS-Spektrophotometer	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Jasco V-550 UV/VIS-Spektrophotometer	Jasco (Groß-Umstadt)

Circulardichroismus-Spektropolarimeter

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

Fluoreszenzspektrofluorimeter

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

Stopped flow Gerät

Hi-Tech Scientific SF-61 MX Stopped Flow Multi Mixing Spectrofluorimeter	Hi-Tech Ltd. (Salisbury, UK)
--	------------------------------

Dynamisches Lichtreuungsmessgerät

DynaPro MS Dynamic Light Scattering Instrument	Protein Solutions Inc. (Charlottesville, USA)
--	---

Gelelektrophorese- und Blotapparaturen

LKB 2050 Midget-Elektrophorese-Einheit	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
LKB GNA-100 Agarose-Gelelektrophorese-Einheit	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
Fast Blot B44 Apparatur	Biometra (Göttingen)

Spannungsquellen

EPS 301, 600, 1001 und 3500	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)
LKB Spannungsgerät 2301 Macro Drive	Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

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)

Chromatographieanlagen

GradiFrac-System

Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

FPLC-System

Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

SuperRac-System

Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

HiLoad System

Amersham Biosciences (Little Chalford, UK)

Zentrifugen

Tischzentrifuge 5415 C

Eppendorf (Hamburg)

Rotina 46 R Kühlzentrifuge mit 4312-Rotor

Hettich (Tuttlingen)

Ultrazentrifuge OptimaTM 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)

Transmissionselektronenmikroskop

Philips CM 120 Transmissions-
Elektronenmikroskop

Phillips

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 Sonesorex 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)

2.1.11 Computerprogramme

Adobe Photoshop 6.0	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)
Borwin Chromatographie Software	Jasco (Groß-Umstadt)
CorelDraw & CorelPhotoPaint 10	Corel Corp. (Canada)
Expasy Tools	www.expasy.ch/tools
Hi-Tech Scientific IS-2 Software Suite v. 2.3b6	Hi-Tech Ltd. (Salisbury, UK)
Image Master 1D Prime	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
Microsoft Office XP	Microsoft (Redmond, USA)
PeakFit	AISN Software Inc.
PrimerDesign Version 1.02	Scientific & Educational Software
Rasmol 2.6 & 2.7	© R. Sayle, 1993-1997
Scientist	Micromath (Salt Lake City, USA)
Sigma Plot 2001	SPSS Inc. (Chicago, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die Anzucht von Bakterien 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 wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) bei 37 °C, durch Animpfen aus einer Glycerinkultur oder aus einer Einzelkolonie von der Agarplatte. Das Wachstum der Kulturen konnte anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt werden. 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 für kürzere Zeit auf LB-Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen hergestellt. Dazu wurde 1 ml Übernachtskultur mit 0,5 ml 50 % (v/v) Glycerin steril vermischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

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

Zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA wurden Plasmidpräparationen aus 4-8 ml *E. coli*-Übernacht-Kulturen durchgeführt. Es wurde dazu das *High PureTM Plasmid Isolation Kit* der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) verwendet, dem das Verfahren der alkalischen Lyse zugrunde liegt. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Elution wurden 40-80 µl ddH₂O verwendet.

2.2.3 PCR-Amplifikation (Mullis & Faloona, 1987)

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich schnell und gezielt bestimmte DNA-Fragmente amplifizieren. Dabei wird der zwischen den zwei verwendeten Primern liegende DNA-Abschnitt im Verlauf wiederholter Temperaturzyklen in Anwesenheit aller dNTPs durch eine DNA-Polymerase exponentiell vermehrt. In dieser Arbeit wurde die Pwo-Polymerase verwendet, die im Gegensatz zur sonst häufig genutzten Taq-Polymerase eine *proof-reading*-Funktion besitzt, was 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 66 und 72 °C. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zusammengehörigen Primerpaare ähnliche Schmelztemperaturen aufwiesen und keine selbstkomplementären Bereiche enthielten, die die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigt hätten.

Die PCR wurde in ultradünnen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) durchgeführt. Ein Standardreaktionssatz 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 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, bevor 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 von diesem Standardprotokoll teilweise abgewichen.

Der Erfolg der PCR wurde auf einem 1%igen (w/v) Agarosegel überprüft (s. 2.2.4). Das entstandene Produkt wurde mit Hilfe des *High PureTM PCR Product Purification Kit* gereinigt. Im Falle von unspezifischen Nebenprodukten wurden die Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* extrahiert (s. 2.2.5).

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

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige (w/v) Agarosegele (in TAE-Puffer, (s. 2.1.9.3), versetzt mit 1 µl Ethidiumbromid pro 50ml Agarosegel) verwendet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Die Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Auftragspuffer (s. 2.1.7.3) versetzt und die anschließende Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt. Danach wurde die DNA mittels UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationsanlage (Biometra) fotografiert. Die Größe und Menge der aufgetrennten DNA wurde anhand des aufgetragenen λ /BstEII-Standards abgeschätzt.

2.2.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur präparativen Reinigung von PCR-Produkten und um mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Fragmente bzw. Vektoren 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 extrahiert.

2.2.6 Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA

2.2.6.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA sequenzspezifisch. 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, war dies nicht möglich, so wurden die beiden Hydrolysereaktionen getrennt durchgeführt. 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 mindestens drei Stunden oder über Nacht durchgeführt.

2.2.6.2 Modifikation von Schnittstellen mit T4-Polymerase

In den Fällen, in denen es nicht möglich war über komplementäre Schnittstellen *sticky end* zu klonieren, wurden die Enden mittels T4-Polymerase so modifiziert, dass eine *blunt end* Klonierung möglich wurde (Sambrook *et al.*, 1989). Durch die Exonucleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase ist es dabei möglich unter Verwendung nur eines dNTPs die Enden zunächst abzubauen und dann nach Zugabe aller dNTPs diese *blunt end* aufzufüllen. Da die T4-Polymerase die Enden nicht phosphoryliert wurde anschließend eine Behandlung mit T4-Polynukleotidkinase nötig, um die spätere Ligation der Fragmente zu ermöglichen (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.6.3 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. Die Phosphatasebehandlung erfolgte im gleichen Ansatz wie die Restriktionshydrolyse. Nach Inaktivierung der Restriktionsenzyme (10 min bei 75 °C) und anschließendem Abkühlen wurden $\frac{1}{10}$ Volumen 10×Phosphatasepuffer und 0,1 Einheiten alkalische Phosphatase pro µg Vektor zugegeben. Durch Erhitzen auf 75 °C für 10 Minuten 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.

2.2.6.4 Ligation

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

Die Ligationen wurden mit 200-300 ng Plasmid-DNA und einem fünffachen molaren Überschuss an Insert-DNA durchgeführt. Die Reaktion erfolgte unter Verwendung von 2-3 U T4-DNA-Ligase im mitgelieferten Ligasepuffer in einem Endvolumen von 10 oder 20 µl über Nacht bei 4 °C.

2.2.7 Sequenzierung klonierter DNA-Fragmente

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

Für die Sequenzierungen wurde die Plasmidlösung (300 ng bis 1 µg Plasmid) mit 12 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers versetzt und anschließend flüssig zu MWG-Biotech verschickt.

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

Zur Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen werden DNA-aufnahmefähige Zellen benötigt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung solcher kompetenter Zellen wurde eine 100 ml Flüssigkultur des benötigten *E. coli*-Stammes bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 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) re-suspendiert. 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 nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C bis zur ihrer Verwendung gelagert.

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.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 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. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h (bei Ampicillin-Resistenz) oder 2 h (bei Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyclin-Resistenz) unter langsamem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgossen, das Bakterienpellet im verbliebenen Restmedium aufgenommen und auf der entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

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 exprimiert wird, bzw. ob eine eventuelle metabolische Belastung der Zellen bei der Expression des rekombinanten Proteins auftritt.

Dazu 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 OD₆₀₀ von 0,4-1 durch Zugabe von IPTG (1:1000 einer 1 M Stammlösung) oder L-Arabinose (0,02 bis 0,2 % Endkonzentration). Parallel zu den induzierten Kulturen wurden jeweils nicht-induzierte Kontrollkulturen unter identischen Bedingungen angezogen.

Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die OD₆₀₀ bestimmt, 1 ml steril abgenommen und die Zellen abzentrifugiert. Die Zellen wurden entsprechend der OD₆₀₀ in 1× Laemmli-Puffer aufgenommen (100 µl 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 bzw. 0,2 % L-Arabinose induziert und bis zur Ernte geschüttelt. Im Falle der periplasmatischen Expression des C_{H3}-Fragments wurde das Medium zum Zeitpunkt der Induktion zusätzlich mit 4,5 g GSSG pro 2 l Anzuchtkultur versetzt.

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. Das Zellpellet wurde in Aufschlusspuffer 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. Anschließend wurde die DNA mit DNaseI für 30 Minuten bei 25 °C verdaut. 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 Periplasmaaufschluss

Da der Expressionsvektor für MAK33 C_{H3} eine periplasmatische Signalsequenz enthält, wird C_{H3} ins Periplasma sekretiert. Zur Reinigung war deshalb ein Periplasmaaufschluss nötig. Dabei wurde auf eine Methode unter Verwendung von Polymyxin zurückgegriffen (Pirkl, 1996). Das zyklische polykationische Peptidantibiotika Polymyxin zertört die Zellwände von Bakterien, so dass die Proteine des Periplasmas freigesetzt und von den Proteinen des Cytoplasmas abgetrennt werden können.

Zur Reinigung von C_{H3} wurden die Zellen nach der Anzucht abzentrifugiert (JA-10, 5000 Upm, 4 °C, 15 min). Das Pellet wurde in 1/40 des Ausgangsvolumens Waschpuffer (20 mM MOPS, pH 7.5, 50 mM NaCl) resuspendiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet wurde in 1/40 des Ausgangsvolumens Aufschlusspuffer (10 mM MOPS, pH 7.0, 5 mM EDTA, 1 mg/ml Polymyxin B Sulfat) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 1/80 des Ausgangsvolumens Aufschlusspuffer versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (Ja 25.50, 20.000 Upm, 4°C 30 min) wurde der Überstand mit Proteaseinhibitoren versetzt und für die chromatographische Aufreinigung verwendet.

2.3.2.3 Analytischer Test auf *inclusion bodies*

Um die Löslichkeit der exprimierten Proteine während der Expressionskinetiken schnell zu überprüfen wurde auf ein verkürztes Aufschlussprotokoll zurückgegriffen. Dabei wurden 2 ml Expressionskultur abzentrifugiert (5000 Upm, 15 min, 4 °C) und in 200 µl Nativ-Puffer aufgenommen. Da Lysozym eine ähnlich molekulare Masse wie Fd-Fragment und leichte Kette besitzt, wurde auf dessen Verwendung zum Aufschluss verzichtet, um spätere Komplikationen bei der Analyse zu verhindern. Die Zellen wurden für 15 min im Ultraschallwasserbad aufgeschlossen und danach abzentrifugiert (14.000 Upm, 30 min, 4 °C). Der lösliche Überstand wurde mit 50 µl 5xLaemmli-Puffer versetzt, das Pellet wurde in 200 µl 1x Laemmli-

Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeweils vergleichbare Mengen an Protein aus identischen Mengen an *E.coli* Zellen aufgetragen wurden. Dazu wurden die optische Dichte sowie die jeweilige Verdünnung der Probe durch Probenpuffer für die Berechnung des Auftragsvolumens für die SDS-PAGE berücksichtigt. So konnten die erhaltenen Banden der unlöslichen Pellets und der löslichen Überstände sowie die Geamtzellextrakte der Expressionskinetiken direkt miteinander verglichen werden.

2.3.3 Chromatographische Methoden

Für die Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* 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 Reinigungsvorschriften für BiP (Mayer *et al.*, 2000), PDI (Mayer *et al.*, 2000) und C_H3 (Mayer, 1998) wurden bereits früher eingehend beschrieben.

2.3.3.1 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. Durch die hochaffine Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand ist es möglich, durch Waschen der Säule unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution des spezifisch gebundenen 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).

2.3.3.2 Gelfiltration

Bei der Gelfiltrationschromatographie erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe bzw. des hydrodynamischen Radius. Die Matrix der verwendeten Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle können in die Poren der Matrixkügelchen eindringen und werden auf der Säule zurückgehalten, während große Moleküle dies nicht können und deshalb schneller 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.

2.3.3.3 Ionenaustauscherchromatographie

Die Ionenaustauscherchromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem geladenen Protein und dem Säulenmaterial. Je nach Aminosäurezusammensetzung und pH-Wert tragen Proteine positive bzw. negative Ladungen und binden daher reversibel an entsprechend entgegengesetzt geladene Gruppen des Trägermaterials. Die Elution der gebundenen Proteine kann durch eine Erhöhung der Ionenstärke oder durch die Veränderung des pH-Wertes erzielt werden. Durch Verwendung eines Salz- oder pH-Gradienten können unterschiedliche Proteine aufgetrennt werden.

Je nach Art der geladenen Gruppen unterscheidet man zwischen Anionenaustauschern, mit positiven Ladungen an ihrer Oberfläche, und Kationenaustauschern, mit negativen Ladungen.

2.3.4 Aufkonzentrierung und Dialyse

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurde das Prinzip der Ultrafiltration verwendet. Dabei wird die Lösung entweder durch Zentrifugation (Centricon) oder durch Druck (Amicon) gegen eine Membran gedrückt, welche ein bestimmtes Ausschlussvolumen besitzt. Dadurch kann die Pufferlösung die Membran passieren, während Proteine oberhalb des Ausschlussvolumens die Membran nicht passieren können und somit aufkonzentriert werden.

Für kleinere Volumina wurden Centricon[®]-Konzentratoren (bis zu ca. 5 ml) (Millipore) verwendet, für größere Volumina eine Ultrafiltrationszelle (Millipore).

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.1.1 Nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (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 bei Raumtemperatur 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 beschrieben.

2.4.2 Fällung von Proteinlösungen

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

Dazu wurde die Proteinlösung zunächst mit $1/1000$ -Volumen 10%iger NaDoc-Lösung versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von $2/15$ -Volumen 50%iger TCA und Inkubation der Mischung über Nacht 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 Derivatisierung von Cysteinen mit Iodacetamid

Iodacetamid (IAA) ist ein starkes Acylierungsmittel mit dem reaktive Gruppen in Proteinen vor unerwünschten Reaktionen geschützt werden können. Der elektrophile Angriff - z. B. an die Thiolgruppen von Cysteinen – blockiert deren Oxidation zu Disulfidbrücken. In dieser Arbeit wurde die oben beschriebene Reaktion dazu verwendet, um die Rückfaltung des Fab Fragments bei Faltungskinetiken abzustoppen. Durch die Acylierung der Cysteine wurde die Bildung der Disulfidbrücke verhindert, deren Ausbildung für die Faltung zwingend erforderlich

ist. Dazu wurden zu den angegebenen Zeiten Aliquots aus dem Rückfaltungsansatz entnommen und mit einem Überschuss an Iodacetamid versetzt.

Danach wurden die Proben auf Eis aufbewahrt bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE oder ELISA.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE 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 ist proportional zur Proteingröße wobei die Eigenladung des Proteins vernachlässigt werden kann. 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 durch die negative Ladung 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, 15, 18 oder 20%igen Trenngelen und 3%igen Sammelgelen verwendet (modifizierte Methode nach Fling & Gregerson (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 \times -Laemmli-Auftragspuffer (s. 2.1.9.4) versetzt, Pellets wurden in 1 \times Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen. Wenn in den Proteinen vorhandene Disulfidbrücken reduziert werden sollten, wurde 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol dem 5 \times -Laemmli-Auftragspuffer zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C erhitzt um eine vollständige Denaturierung zu erreichen (Laemmli, 1970). Zur Abschätzung der molekularen Masse, wurde ein Molekulargewichtsstandard mit auf das Gel aufgetragen.

Die Proteinbanden im Gel wurden durch anschließende Färbung (s. 2.4.5) sichtbar gemacht.

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

2.4.5 Nachweis von Proteinen

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

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

Die Nachweisgrenze bei der Coomassiefärbung nach Fairbanks liegt bei ca. 50 bis 100 ng Protein. Die SDS-Polyacrylamidgelle 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

2.4.5.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven & Dernick, 1988). Die Nachweisgrenze liegt hier 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 Na₂S₂O₃
2 ml Glutaraldehyd

Färbelösung: 0,5 ml AgNO₃
 25 µl Formaldehyd
ad 100 ml ddH₂O

Entwicklerlösung: 7,5 g Na₂CO₃
 120 µl Formaldehyd
ad 300 ml ddH₂O

Stopplösung: 50 mM EDTA, pH 7,5

2.4.6 Densitometrie

Zur Quantifizierung von Proteinbanden, die mit Hilfe der Fairbanks-Färbung sichtbar gemacht wurden, wurde ein Sharp JX-330 Scanner eingesetzt. Die digitalisierten Banden wurden mit Hilfe der ImageMaster 1D Prime Software (Amersham Biosciences) ausgewertet.

2.4.7 Immunoblotting (Western Blot)

Bei dieser Methode werden Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose Membran übertragen (Western-Blotting). Aufgrund ihrer negativen Ladung durch das gebundene SDS werden die Proteine 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

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. Zur Abschätzung der molekularen Massen der geblotteten Proteine wurde ein gefärbter *Rainbow*-Standard (Novex) auf das Gel aufgetragen.

Der immunochemische Nachweis der Antikörperfragmente erfolgte mit einem Anti-Maus-IgG(H+L)-POD-Konjugat (Jackson Immuno Research) bzw. einem 6xHis-tag Antikörper aus Kaninchen (ABR Affinity Bioreagents) und anschließend einem Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat aus Maus (Sigma). Dabei wurde nach folgender Methode verfahren:

- 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

Bei Verwendung eines sekundären Antikörpers erfolgte der Nachweis 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

Die Detektion erfolgte mit dem ECLplus-System (Amersham Biosciences). Dabei wurde nach Angabe des Herstellers verfahren.

2.4.8 Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltrationsläufe wurden zur Analyse der Komplexbildung zwischen BiP und C_H3-CAM durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer Superdex 200-HR-Säule, das Probenvolumen betrug 25 µl und die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 ml/min (Laufpuffer: 40 mM Hepes, 100 mM KCl; 5 mM MgCl₂, pH 7,5). Die eluierten Proteine wurden durch Fluoreszenzemission bei 330 nm (Anregungswellenlänge = 280 nm) detektiert und mit der Borwin Chromatographie Software registriert.

2.4.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Um zu untersuchen, ob sich die von *E. coli* produzierten MAK33-Antikörperketten zu aktiven Fab-Fragmenten zusammen gelagert hatten, wurde ein modifizierter ELISA-Test durchgeführt (Lilie *et al.*, 1994).

Dazu wurden aus den Rückfaltungsansätzen Aliquots entnommen und in ELISA Puffer verdünnt. Um eine weitere Rückfaltung zu verhindern, wurden die Proben auf Eis aufbewahrt

und es wurde Trypsin mit einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml zugesetzt. 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 an Fab MAK33 Fab bindet und für 1 h inkubiert. 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 mit Hilfe 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 dreimaligem 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.

2.4.10 Reduktion und Alkylierung von C_{H3}

Für die Versuche zur Komplexbildung von BiP und C_{H3} musste die C_{H3} Domäne reduziert und alkyliert werden (Knarr *et al.*, 2002). Dazu wurden etwa 1 mg C_{H3} in 4 M GdmCl, 100 mM Tris, pH 8.0, 20 mM DTT für 45 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Zugabe von 150 mM Iodacetamid und 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das so erhaltene C_{H3}-CAM gegen 3 l Dialysepuffer (40 mM Hepes, pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) über Nacht bei 4 °C dialysiert.

Nach abzentrifugieren (14.000 Upm, 4°C, 30 min) wurde das Protein über Centrikon aufkonzentriert. Die Konzentration wurde spektroskopisch bestimmt. Die erfolgreiche Modifikation wurde mittels Fluoreszenz und CD-Messung überprüft (Knarr *et al.*, 2002). Das Protein wurde danach aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.11 ATPase Aktivitätstest

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von BiP wurde nach der Methode von (Kornberg *et al.*, 1978) durchgeführt. Dabei wird die Hydrolyse von [α - 32 P] markiertem ATP zu ADP und Phosphat vermessen.

Die Methode von Kornberg zeichnet sich gegenüber anderen üblichen ATPase-Aktivitätstests durch eine hohe Sensitivität aus. Zudem bietet sie den Vorteil, dass der ATP-Hydrolyse keine weiteren Reaktionen nachgeschaltet werden müssen, um ein messbares Signal zu erhalten, wie etwa bei gekoppelten enzymatischen Tests.

2.4.11.1 *Steady state* Messungen

Zur Bestimmung der ATPase Aktivität von BiP unter *steady state* Bedingungen wurde das Protein, wenn nicht anders angegeben, in 40 mM HEPES, pH 7,0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ verdünnt (Endkonzentration 2 μ M). Die ATPase-Reaktion wurde durch Zugabe eines Gemisches aus unmarkiertem und radioaktiv markiertem [α - 32 P]-ATP gestartet. Die ATP-Endkonzentration im Ansatz betrug 500 μ M. Der Reaktionsansatz enthielt zwischen 0,1 und 1 μ Ci radioaktiv markiertem ATP. Während der Inkubationsphase bei 37 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots von 3 μ l aus dem Reaktionsansatz entnommen, in denen die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 3 μ l einer 60 mM EDTA-Lösung gestoppt wurde. 4 μ l dieses gestoppten Ansatzes wurden auf eine PEI-Cellulose Dünnschicht-chromatographieplatte aufgetragen.

Die Chromatographie wurde in 0,5 M LiCl und 2 N Ameisensäure für ca. 25 min durchgeführt. Dabei wurde radioaktiv markiertes ADP vom nicht hydrolysierten radioaktiven ATP aufgrund der unterschiedlichen Ladungsdichte beider Nukleotide abgetrennt. Nach Trocknung der Platten unter Rotlicht wurden die ATP- bzw. ADP-Spots mit Hilfe eines Storm 860 Phosphoimagers oder Typhoon Phosphoimagers (beide Molecular Dynamics) quantifiziert. Nach Abzug der entsprechenden Nullprobenwerte konnte so die tatsächliche Menge an produziertem ADP nach folgender Formel berechnet werden:

$$\mu\text{M ADP} = (\text{counts ADP} \times 500 \mu\text{M}) / (\text{counts ATP} + \text{counts ADP})$$

2.4.11.2 *Single turnover* Messungen

Zur Bestimmung der *single turnover* Hydrolyse-Rate von BiP wird ATP im molaren Überschuss (0,8 : 1) zugegeben, um zu gewährleisten, dass die Reaktion nach einem komplett

durchlaufenen Zyklus zum Erliegen kommt. Die Durchführung des Experiments verlief nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Nach der Messung wurde die erhaltene Kinetik nach folgender Gleichung erster Ordnung gefittet, um die Ratenkonstante der Hydrolysereaktion zu erhalten: $y = a(1 - e^{-bx})$

2.5 Spektroskopische Methoden

2.5.1 UV-VIS-Spektroskopie

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

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

A: Absorption bei 280 nm

M: Molekulargewicht [g/mol]

ε : molarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280 \text{ nm}}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

c_M : Proteinkonzentration [g/l]

c: Proteinkonzentration [M]

$$\varepsilon/M = A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}}$$

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

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

Extinktionskoeffizienten:

BiP	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 0,395$ (Expasy Tools)
PDI	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 0,795$ (Expasy Tools)
MAK33 Fab	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1,678$ (Expasy Tools)
MAK33 C _{H3}	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1,950$ (Expasy Tools)
MAK33 C _{H3} -CAM	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1,930$ (Expasy Tools)
MAK33 C _L	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1,310$ (Expasy Tools)
Erp57	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 0,740$ (Expasy Tools)
DsbC	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 0,621$ (Expasy Tools)
Prolyl-4-Hydroxylase (α -Untereinheit) (unglykosyliert)	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \%, 1 \text{ cm}} = 1,421$ (Expasy Tools)

2.5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Bei Proteinen verursachen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aufgrund ihres delokalisierten π -Elektronensystems eine sog. „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. Dabei ist aufgrund der Stoke'schen Verschiebung die Wellenlänge des emittierten Lichts größer als die des Anregungslichtes. Das Fluoreszenzverhalten von Proteinen wird hauptsächlich von den Tryptophanresten bestimmt, da diese einerseits die eingestrahlteten 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 Antikörpern wird die Fluoreszenzintensität durch die Disulfidbrücke gequenchet. Wodurch in diesem Fall bei vollständiger Reduktion und Denaturierung eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann.

Alle Fluoreszenzmessungen wurden am SpexFluoromax II 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. Die genauen Messbedingungen sind im Ergebnisteil angegeben.

2.5.3 Lichtstreuung

Die Aggregation von MAK33 Fab während der Rückfaltung wurde mit Hilfe von Lichtstreuungsmessungen verfolgt. Die Messungen erfolgten im Fluoreszenzspektrophotometer, wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen gleich gewählt wurden. Um ein Absinken der Aggregate zu vermeiden, erfolgten die Messungen unter konstantem Rühren. Die Versuche wurden in thermostatisierbaren Küvettenhaltern bei 15 °C durchgeführt.

Die genauen Parameter der jeweiligen Experimente sind im entsprechenden Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben

2.5.4 Dynamische Lichtstreuung

Alle Experimente wurden bei 15 °C und einem Streuwinkel von 90 ° durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 25 µl. Puffer und Proteinproben wurden vor der Messung mit Hilfe eines Filters mit 100 nm Porengröße (Anodisc-13, Whatman) von Staub und Luftblasen befreit. Der Diffusionskoeffizient D und der hydrodynamische Radius wurden mit der Autokorrelationsfunktion des Programms Dynamics (Protein Solutions) berechnet. Dazu erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten die Messung der Streuungsintensität I_s . Aus jeweils fünf Einzelmessungen wurde ein Mittelwert für den hydrodynamischen Radius bestimmt. Mittels einer vom Hersteller gelieferten Eichgerade für globuläre Proteine, wurden daraus die Molekulargewichte automatisch vom Auswerteprogramm berechnet.

2.5.5 *Stopped flow* Messungen

Viele chemische Reaktionen laufen so schnell ab, dass man ihre Reaktionsgeschwindigkeit mit üblichen Mitteln (Spektroskopie, Temperatur-, pH-, Konzentration- od. Leitfähigkeitsmessung) nicht mehr messen kann. Die untere Zeitgrenze liegt bei herkömmlichen Methoden im Sekundenbereich und wird vor allem durch die Effizienz und Schnelligkeit des Mischvorgangs limitiert.

Die Einführung einer neuen Mischtechnik in den 20er Jahren machte es möglich Reaktionen mit Halbwertszeiten im Millisekundenbereich zu messen. Dabei werden die zu untersuchenden Komponenten durch Spritzen in eine Mischkammer gedrückt und nach vollständiger Vermischung durch eine Beobachtungszelle geleitet, wo der Fluß zum stehen kommt (*stopped flow*). Dort kann das Verhalten der Reaktanden spektroskopisch untersucht werden.

Aus der Strömungsgeschwindigkeit und der Konzentration kann man mit *stopped flow*-Methoden die Reaktionsgeschwindigkeit bis in den Bereich von 0,1 ms bestimmen. Die Untersuchung von Hochgeschwindigkeitsreaktionen hat besonders eine Bedeutung bei der Aufklärung von Zwischenstufen beobachteter Reaktionsmechanismen. In der Biochemie sind dies vor allem Enzymreaktionen und Faltungen (Khundkar & Zewail, 1990). In dieser Arbeit wurde ein *stopped flow* Gerät von Applied Photophysics verwendet, um die Bindung von MABA-ATP/ADP an BiP bzw. deren Verdrängung durch ATP/ADP zu messen.

Bei MABA-ATP/ADP (N_8 -(4- N' -methylantraniloylaminobutyl)-8-aminoadenosine 5'-triphosphate) handelt es sich um ein fluoreszierendes ATP/ADP-Analogon, welches nach Anregung bei 364 nm charakteristisch bei einem Emissionmaximum von 425 nm emittiert. Die Emission ist abhängig vom Bindungszustand. Die Signalintensität nimmt bei Bindung von MABA-ATP/ADP an das Protein zu.

Zur Messung der Bindung von MABA-ATP an BiP wurden gleiche Volumina (in der Regel 100 μ l) von Protein (BiP bzw. BiP vorinkubiert mit Peptid HD14 oder MAK33 C_{H3} -CAM) und MABA-ATP gemischt. Die Anregung erfolgte bei 364 nm. Die Emission von MABA-ATP wurde durch Verwendung eines entsprechenden *cut-off*-Filters oberhalb von 405 nm gemessen. Es wurde bei einer konstanten Temperatur von 37 °C gemessen.

Eine Messung der Verdrängung von MABA-ATP durch ATP war nicht möglich, da das verwendete ($P\alpha$)MABA-ATP chemisch instabil ist und ebenso wie ATP von BiP hydrolysiert wird. Für die Messung der Verdrängung von MABA-ADP durch ADP wurde BiP mit MABA-ADP in einer Spritze vorinkubiert und dann mit ADP in der anderen Spritze gemischt.

Die verwendeten Konzentrationen, die genauen Messbedingungen sowie die Auswertung der Daten sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.5.6 Circular dichroismus

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

Im Nah-UV-Bereich (250 bis 350 nm), 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 (170 bis 250 nm) verursacht die Konformation der Polypeptidkette, entweder α -Helices oder β -Faltblätter, ein charakteristisches Spektrum. So erzeugen α -Helices ein Doppelminimum mit hoher Intensität bei 208 und 222 nm, während β -Faltblattstrukturen nur ein einziges Minimum mit geringer Intensität bei 218 nm hervorrufen. 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 · dmol ⁻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

2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

Durch Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen ist es möglich, Proteine und Proteinaggregate mit einer Auflösung von 1,0-1,5 nm darzustellen. Diese Auflösung entspricht Proteindomänen mit ca. 5-15 Aminosäuren.

Dazu wurden mit amorpher Kohlefolie bedampfte Kupfernetzchen (Grids) verwendet. Diese hydrophoben Objektträger müssen vor dem Aufbringen der wässrigen Probe benetzbar gemacht werden. Dies geschieht durch Beglimmen unter Hochvakuum bei hoher Spannung, wobei Ladungen auf die Kohlefolie aufgebracht werden und diese vorübergehend einen hydrophilen Charakter erhält. Dadurch können partiell geladenen Makromolekülen auf dem Trägermaterial adsorbieren.

Anschließend wurde 100 µl Aliquots (ca. 50 µg Protein) der zu untersuchenden Probe auf die Kupfer-Grids aufgebracht und maximal 1 Minute inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde mittels eines Filterpapiers abgezogen, wobei darauf geachtet wurde, dass das Präparat nicht eintrocknet. Schließlich wurde mit einer 1-2%igen, wässrigen Uranylacetat-Lösung (pH 3,5-4,5) eine Negativ-Kontrastierung durchgeführt.

Die Einbettung in Schwermetallsalze ist eine gängige Methode zur Kontrastierung von Biomolekülen. Dabei füllt die Schwermetallsalz-Lösung den nicht vom Objekt eingenommenen Raum aus und erhöht dadurch den Kontrast des Untergrundes gegenüber dem Objekt (Bremer *et al.*, 1992). Das Kontrastmittel kann dabei zum Teil in die hydrophilen Bereiche des Objektes eindringen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden bei einer Anodenspannung von 100 kV und einer Vergrößerung von 33000x mit einem Philips CM 120 Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen wurden auf Negativen dokumentiert.

In dieser Arbeit wurde die Bildung von Aggregaten während der Rückfaltung des MAK33 Fab-Fragments untersucht. Dazu wurde zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots aus dem Rückfaltungsansatz entnommen, mit Vivaspin eingeeengt und für die Elektronenmikroskopie verwendet. Für die Präparation wurden steril filtrierte Puffer und frisch aufgetaute, abzentrifugierte Proteinlösungen (Eppendorf Zentrifuge, 14000 UpM, 30 min, 4 °C) verwendet. Die genauen Pufferbedingungen sind im Ergebnisteil angegeben.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression von Antikörperketten in *Escherichia coli*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *E. coli knock-out*-Stämme (vgl. 2.1.6 und 3.1.3), bei denen Komponenten des Thioredoxin- und/oder Glutaredoxinsystems ausgeschaltet wurden, als Expressionssystem für die cytoplasmatische Expression von disulfidverbrückten Proteinen verwendet. Der Antikörper MAK33 wurde als Modellprotein eingesetzt, 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 verschiedenen *E. coli knock-out*-Stämme hinsichtlich Wachstum und Expression miteinander verglichen werden. Die rekombinanten Antikörperketten wurden auf ihre Expression, Löslichkeit und Disulfidverbrückung untersucht. Die Detektion der rekombinanten Antikörperketten erfolgte durch immunologischen Nachweis.

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-Teil der schweren Kette zu erkennen; dies liegt wahrscheinlich daran, dass dieser wenig immunogen ist. Deswegen wurden in dieser Arbeit Konstrukte hergestellt, die das Fd-Fragment mit einem N-terminalen 4xHis-tag enthalten. Dadurch sollte ein immunochemischer Nachweis über einen [anti-His-tag] Antikörper sowie eine eventuelle spätere Reinigung der exprimierten Fragmente über Affinitätschromatographie ermöglicht werden.

3.1.2 Herstellung von Expressionsvektoren zur cytoplasmatischen Expression von Antikörperketten in *E. coli*

3.1.2.1 Wahl des Expressionsvektors

Zur Expression der Antikörperketten von MAK33 im Cytosol der verschiedenen *E. coli*-Stämme mußte zunächst ein geeigneter Expressionsvektor hergestellt werden. Da in den für die Expression vorgesehenen DHB4-*knock-out*-Stämmen bereits Antibiotika-Resistenzen enthalten sind (vgl. Material und Methoden) und deshalb nur die Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker für den Expressionsvektor zur Verfügung stand, sollten sowohl die cDNA für die leichte Kette, als auch für das Fd-Fragment von MAK33 in den selben Vektor kloniert werden.

Als Expressionssystem wurde das auf dem pBR322 Plasmid basierende pBAD System ausgewählt. Das pBAD/Myc-His Plasmid wurde speziell für die regulierbare, dosisabhängige Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* entwickelt. Der *araBAD*-Promotor aus *E. coli* ermöglicht durch Variation der zur Induktion verwendeten L-Arabinose-Konzentration eine Optimierung der Expression des rekombinanten Proteins, um der Bildung von *inclusion bodies* entgegenzuwirken.

Der Arabinose-Promotor wird sehr stringent durch das ebenfalls auf dem Vektor vorhandene Regulatorprotein AraC kontrolliert. Dies ermöglicht auch die Expression toxischer bzw. essentieller Gene (Russell *et al.*, 1989), da nur in Anwesenheit von L-Arabinose die Transkription erfolgt (Lee *et al.*, 1987). Eine Basaltranskription des *araBAD*-kontrollierten Gens in Abwesenheit von L-Arabinose wird auch durch die Anwesenheit von Glukose im Medium unterdrückt, da es sich bei *araBAD* um einen katabolit-reprimierten Promotor handelt (Miyada *et al.*, 1984).

3.1.2.2 Klonierungsstrategie

Zur Untersuchung der Expression von Antikörpern in *E. coli* wurden folgende Expressionskonstrukte hergestellt, die die getrennte Expression der leichten Kette von MAK33 und des Fd-Fragments sowie die gleichzeitige Expression der beiden Ketten zur Produktion des Fab-Fragments erlauben.

Konstrukt	Insert	Ausgangsplasmid
pMM2	leichte Kette	pBT111
pMM3	4xHis-Fd-Fragment	p12002
pMM4	Fd-Fragment	p12002
pMM24	leichte Kette + Fd-Fragment	pBT111 bzw.p12002
pMS1	leichte Kette + 4xHis-Fd-Fragment	pBT111 bzw.p12002

Tab. 3.1.1: Expressionskonstrukte zur cytoplasmatischen Expression in *E. coli*

Zunächst wurde die benötigte cDNA mittels PCR mit den entsprechenden Primern (siehe Material und Methoden Kapitel 2.1.7.1) aus den angegebenen Ausgangsplasmiden amplifiziert (vgl. Tabelle 3.1.1). Danach wurden die Einzelketten in den pBAD Vektor ligiert (siehe Abbildung 3.1.1). Zur Herstellung eines Vektors für die Expression des kompletten Fab-Fragments wurde das Fd-Fragment samt *araBAD*-Promotorsequenz aus dem Vektor ausgeschnitten und in den pBAD Vektor mit der leichten Kette eingefügt. Das Resultat war ein Expressionsvektor mit Fd-Fragment und leichter Kette, beide jeweils unter der Kontrolle des *araBAD*-Promotor. Das Prinzip der Klonierung ist in Abb. 3.1.1 dargestellt.

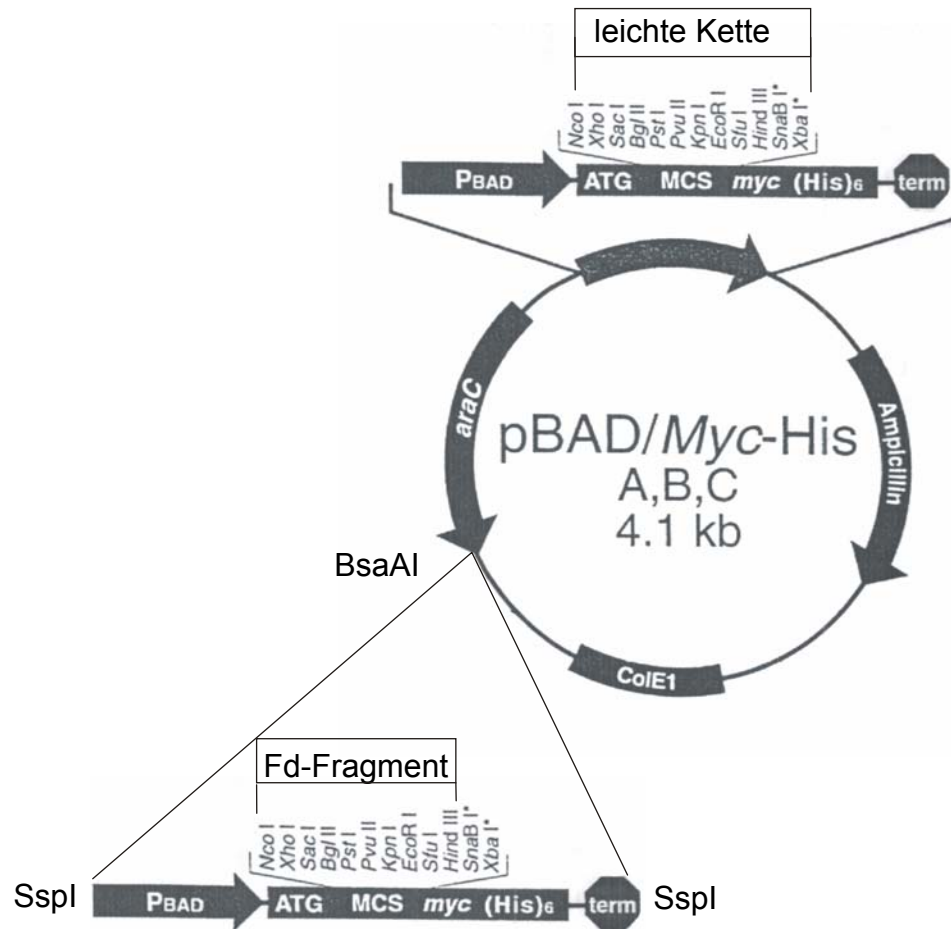


Abb. 3.1.1: Klonierung der leichten Kette und des Fd-Fragments in den Expressionsvektor pBAD. pMM2, pMM3 und pMM4 sind Vorstufen zu pMM24 und pMS1. Für die Klonierung von pMM24 (bzw. pMS1) erfolgt die Insertion des Fd-Fragments samt Promotorregion (mit SspI *blunt end* aus den Vektoren pMM3 bzw. pMM4 ausgeschnitten) in die *blunt end* BsaAI Schnittstelle von pMM2.

Im Anschluss an die Ligation wurde *E. coli* XL1blue mit den Plasmiden transformiert. Die aus den Transformanden isolierte Plasmid DNA wurde durch Kontrollverdaue und Sequenzierung auf den Klonierungserfolg getestet.

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.

Fragment	Anzahl der Aminosäuren	Errechnete molekulare Masse (kDa)
Leichte Kette	213	23,4
Fd-Fragment	226	24,3
4xHis-tag-Fd-Fragment	235	25,4

Tab. 3.1.2: Bestimmung der molekularen Massen der Antikörperketten

Zur Expression der Antikörperketten im Cytoplasma von *E. coli* standen verschiedene *knock-out* Mutanten des Stammes DHB4 zur Verfügung.

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DHB4 (wt)	$F' lac-pro lacI^Q/\Delta (ara-leu)7697 araD139 \Delta lacX74 galE galK rpsL phoR \Delta(phoA)PvuII \Delta malF3 thi$
<i>E. coli</i> DHB4 (gor)	<i>gor...Tc</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (gshA)	<i>gshA::Kan</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (grxB)	<i>grxB::Kan</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (grxC)	<i>grxC::Cm</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (grxA)	<i>grxA::Kan</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (trxA)	$\Delta trxA$
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrxB)	<i>gor...Tc-grxB::Kan</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrxC)	<i>gor...Tc-grxC::Cm</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (gorgrABC)	<i>gor-grxA::Kan-grxB::Kan...Tc-grxC::Cm</i>
<i>E. coli</i> DHB3 (grxABC)	<i>grxA::Kan-grxB::Kan...Tc-grxC::Cm</i> ; DHB3=DHB4 ohne F'
<i>E. coli</i> DHB4 (gortrxA)	<i>gor...Tc-$\Delta trxA$</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (gortrxAgrxB)	<i>gor...Tc-$\Delta trxA$-grxB::Kan</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (gortrxAgrxC)	<i>gor...Tc-$\Delta trxA$-grxC::Cm</i>
<i>E. coli</i> DHB4 (trxB)	<i>trxB::Kan</i>

Tab. 3.1.3: Genotypen der *E. coli* knock-out-Mutanten

3.1.4 Vergleich der Expressionskinetiken verschiedener *E. coli Knockout-Stämme*

Zum Vergleich der Expression des Fab-Fragments von MAK33 im Cytoplasma der verschiedenen *E. coli knock-out*-Stämme (vgl. Tabelle 3.1.3) wurden die entsprechenden Stämme mit dem Plasmid pMM24 transformiert, welches die Gene für Fd und leichte Kette unter dem arabinose-induzierbaren pBAD Promotor enthielt.

Die Expressionskinetiken wurden wie unter Material und Methoden beschrieben aufgenommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert. Die Expression wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dabei wurden folgende Parameter variiert: Temperatur (30 bzw. 37 °C), Induktionszeitpunkt (bei $OD_{600} = 0,5$; 0,7 oder 1,0), Induktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Arabinose (0,05; 0,1; 0,2 und 0,4 % w/v). Es stellte sich heraus, dass alle getesteten Stämme unter folgenden Bedingungen die beste Expression zeigten: Induktion bei $OD_{600} = 0,5$ mit 0,1 % L-Arabinose und Inkubation bei 37 °C (Daten nicht gezeigt).

Anders als erwartet, hatten die *knock-out*-Stämme im Vergleich zum Wildtyp-Stamm keinen signifikanten Wachstumsnachteil. Die Wachstumsraten waren für alle Stämme im uninduzierten Zustand vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Das Fab-Fragment wurde in allen transformierten Stämmen in unlöslicher Form gleich stark exprimiert. Unterschiede ergaben sich nur im Anteil an löslichem Protein sowie beim Grad der Disulfidverbrückung. Bei allen Stämmen konnte festgestellt werden, dass das Fab-Fragment nach einer gewissen Zeit von *E. coli* eigenen Proteasen abgebaut wird. So lag das Expressionsmaximum in der Regel bei 4 bis 6 h nach der Induktion, wohingegen 24 h nach Induktion kaum mehr Fab-Fragment detektiert werden konnte. Normalerweise sind Proteine, die in Form von *inclusion bodies* exprimiert werden, weitgehend vor dem Abbau durch Wirtsproteasen geschützt. In diesem Fall scheint das Fab-Fragment in weniger dicht gepackten *inclusion bodies* vorzuliegen, so dass der Schutz vor Proteasen nicht vollständig gegeben ist.

Um zu testen inwieweit eine lösliche Expression von Fab stattfindet, wurde ein analytischer Test auf *inclusion bodies*, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt (vgl. 2.3.2.3). Nur in zwei der getesteten Stämme konnte eine lösliche Expression nachgewiesen werden. Beim Stamm DHB4 (*trxB*) liegen etwa 20-30 % des exprimierten Proteins sechs Stunden nach Induktion in löslicher Form vor (siehe Abbildung 3.1.2). Bei einer Wachstumstemperatur von 30 °C (Spur 5) befinden sich etwa 30 % im löslichen Überstand,

bei 37 °C (Spur 9) nur 20 %, während 80 % im unlöslichen *inclusion body* Pellet detektiert wurden.

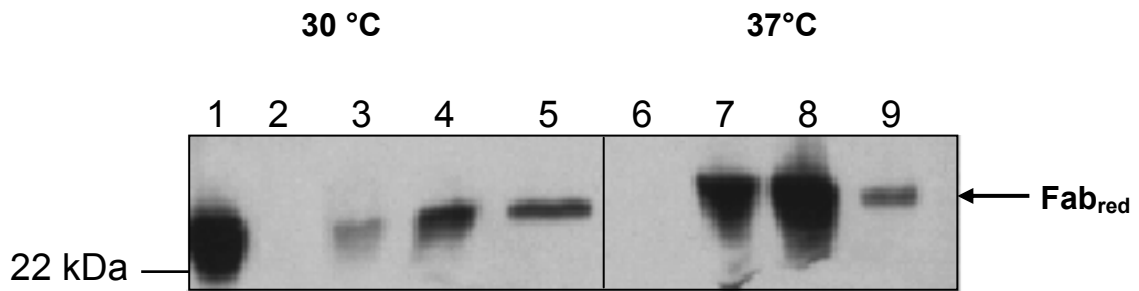


Abb. 3.1.2: Expressionskinetik Fab in DHB4 (*trxB*). 15% SDS-PAGE (reduzierend). Western-Blot anti-IgG(H+L). DHB4 (*trxB*) transformiert mit pMM24, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose, 30 °C (2-5) bzw. 37 °C (6-9). 1: Fab-Standard 50 ng; 2/6: Gesamtextrakt vor Induktion; 3/7: Gesamtextrakt 2 h nach Induktion; 4/8: Gesamtextrakt 6 h nach Induktion; 5/9: löslicher Überstand 6 h nach Induktion.

Die Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 3.1.3) ergab, dass sich kaum disulfidverbrückte Spezies im Molekulargewichtsbereich von Fab (ca. 50 kDa) ausbilden.

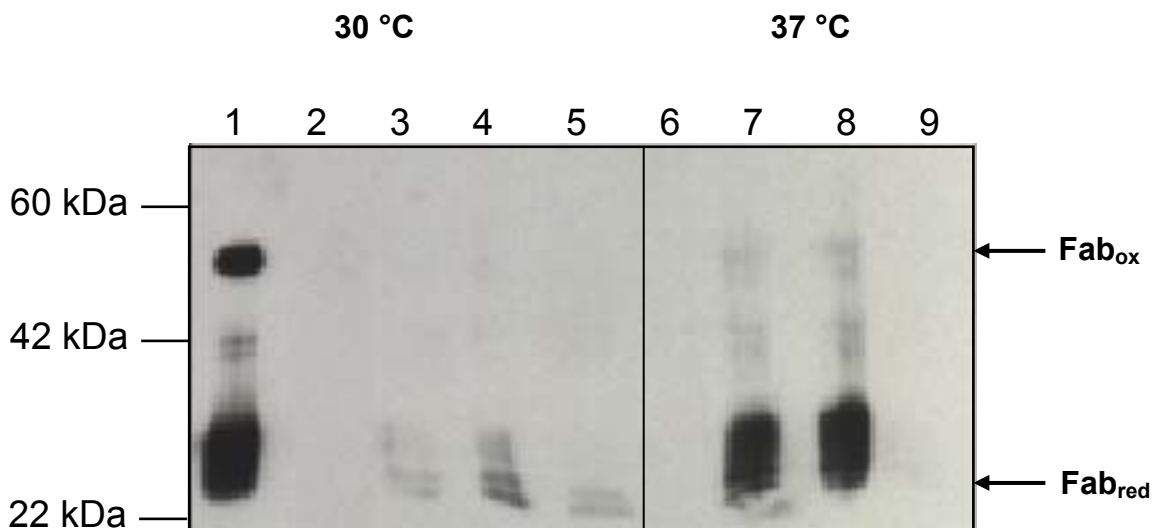


Abb. 3.1.3: Expressionskinetik Fab in DHB4 (*trxB*). 15% SDS-PAGE (nicht-reduzierend). Western-Blot anti-IgG(H+L). DHB4 (*trxB*) transformiert mit pMM24, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose, 30 °C (2-5) bzw. 37 °C (6-9). 1: Fab-Standard 50 ng; 2/6: Gesamtextrakt vor Induktion; 3/7: Gesamtextrakt 2 h nach Induktion; 4/8: Gesamtextrakt 6 h nach Induktion; 5/9: löslicher Überstand 6 h nach Induktion.

Die Expression von Fab im Stamm DHB4 (*grxABC*) zeigte ebenfalls einen löslichen Anteil (Abbildung 3.1.4). Während bei 30 °C etwa 20 % (Spur 5) des Proteins in löslicher Form vorliegen, sind es bei 37 °C sogar 30 % (Spur 9). Dies ist überraschend, da in der Regel bei höheren Temperaturen die Bildung von *inclusion bodies* bevorzugt wird.

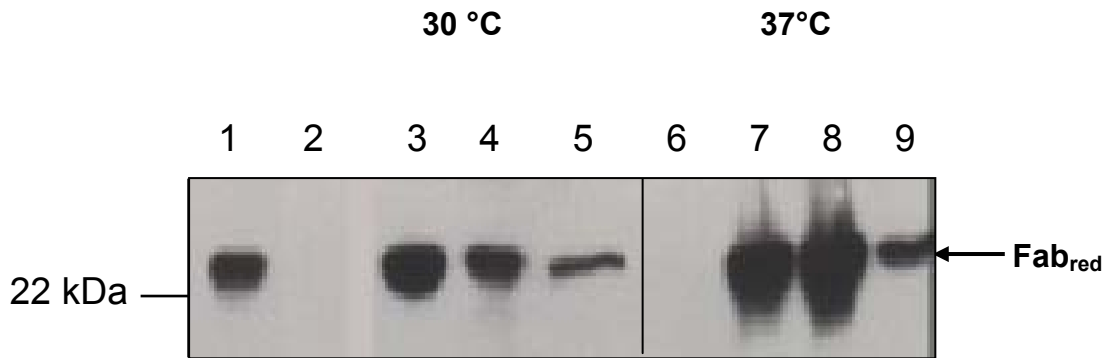


Abb. 3.1.4: Expressionskinetik Fab in DHB4 (*grxABC*). 15% SDS-PAGE (reduzierend). Western-Blot anti-IgG(H+L). DHB4 (*grxABC*) transformiert mit pMM24, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose, 30 °C (2-5) bzw. 37 °C (6-9). 1: Fab-Standard 50 ng; 2/6: Gesamtextrakt vor Induktion; 3/7: Gesamtextrakt 2 h nach Induktion; 4/8: Gesamtextrakt 6 h nach Induktion; 5/9: löslicher Überstand 6 h nach Induktion.

Die Detektion unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 3.1.5) zeigt bei 37 °C eine Bande von der Größe von disulfidverbrücktem Fab (Spur 9). Jedoch liegt der Großteil des Proteins in reduzierter Form vor. Bei 30 °C ist keine disulfidverbrückte Spezies nachweisbar (Spur 5).

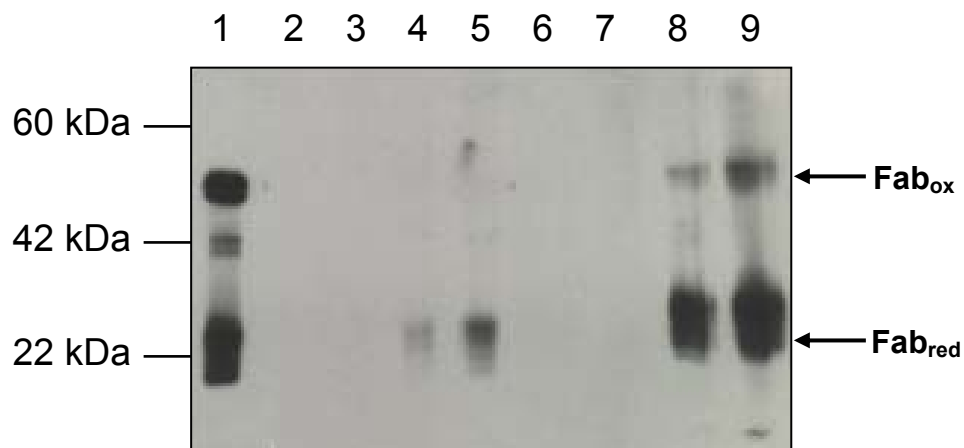


Abb. 3.1.5: Expressionskinetik Fab in DHB4 (*grxABC*). 15% SDS-PAGE (nicht-reduzierend). Western-Blot anti-IgG(H+L). DHB4 (*grxABC*) transformiert mit pMM24, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose, 30 °C (2-5) bzw. 37 °C (6-9). 1: Fab-Standard 50 ng; 2/6: Gesamtextrakt vor Induktion; 3/7: Gesamtextrakt 2 h nach Induktion; 4/8: Gesamtextrakt 6 h nach Induktion; 5/9: löslicher Überstand 6 h nach Induktion.

Da der zur Detektion verwendete Antikörper hauptsächlich die leichte Kette erkennt und nicht das Fd-Fragment, war zu diesem Zeitpunkt nicht klar, ob es sich bei der detektieren Bande um ein disulfidverbrücktes Hetero-Dimer aus Fd und leichter Kette handelte, oder etwa um ein

Homo-Dimer aus zwei leichten Ketten. Um diese Möglichkeit auszuschließen und sicherzustellen, dass beide Ketten exprimiert wurden, wurden die Experimente mit dem Plasmid pMS1 (vgl. Tabelle 3.1.1), welches im Gegensatz zu pMM24 das Fd-Fragment mit einem 4xHis-tag am N-Terminus enthält, wiederholt. Dadurch war eine Detektion der leichten Kette mit dem bereits zuvor verwendeten anti-IgG (H+L)-Antikörper und eine Detektion des Fd-Fragments mit einem anti-4xHis-Antikörper möglich.

Abbildung 3.1.6 zeigt das Ergebnis einer Expressionskinetik unter reduzierenden Bedingungen im Wildtyp-Stamm BL21. Die Detektion mit dem gegen die leichte Kette gerichteten anti-IgG(H+L)-Antikörper zeigt eine deutliche Expression der leichten Kette (Spur 3-5) in *inclusion bodies* und sogar eine lösliche Expression zwei Stunden nach Induktion (Spur 7). Zu späteren Zeitpunkten wird das Protein anscheinend durch *E. coli* eigene Proteasen abgebaut, so dass keine Banden mehr detektiert werden können.



Abb. 3.1.6: Expressionskinetik Fab (4xHis-tag-Fd-Fragment) in BL21. 15% SDS-PAGE (reduzierend). Western-Blot anti-IgG (H+L). BL21 transformiert mit pMS1, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose. **1:** Pellet vor Induktion; **2:** 50 ng Fab; **3:** Pellet 2 h nach Induktion; **4:** Pellet 4 h nach Induktion; **5:** Pellet 20 h nach Induktion; **6-9:** lösliche Überstände vor Induktion, 2 h, 4 h und 20 h nach Induktion.

Die Detektion derselben Proben mit einem anti-4xHis-Antikörper (Abbildung 3.1.7) zeigt eine deutliche Expression des 4xHis-Fd-Fragments (Spur 2,3 und 5) und eine schwache Bande im löslichen Überstand vier Stunden nach Induktion (Spur 8).

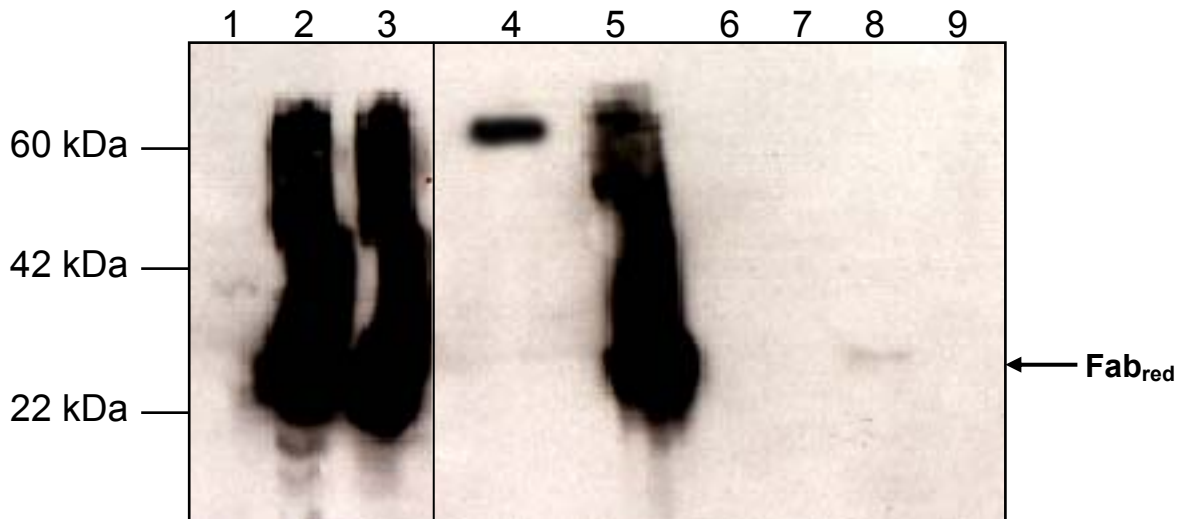


Abb. 3.1.7: Expressionskinetik Fab (4xHis-tag-Fd-Fragment) in BL21. 15% SDS-PAGE (reduzierend). Western-Blot anti-4xHis (rabbit). BL21 transformiert mit pMS1, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose. 1: Pellet vor Induktion; 2: Pellet 2 h nach Induktion; 3: Pellet 4 h nach Induktion; 4: 1 µg 6xHis-tag-BiP; 5: Pellet 20 h nach Induktion; 6-9: lösliche Überstände vor Induktion, 2 h, 4 h und 20 h nach Induktion.

Nach Transformation mit dem Plasmid pMS1 wurde von dem Stamm DHB4 (*grxABC*) erneut eine Expressionskinetik mittels Western-Blot gemacht. Die Detektion erfolgte mit dem anti-4xHis-Antikörper, welcher das Fd-Fragment mit His-tag erkennt (Abbildung (3.1.8)).

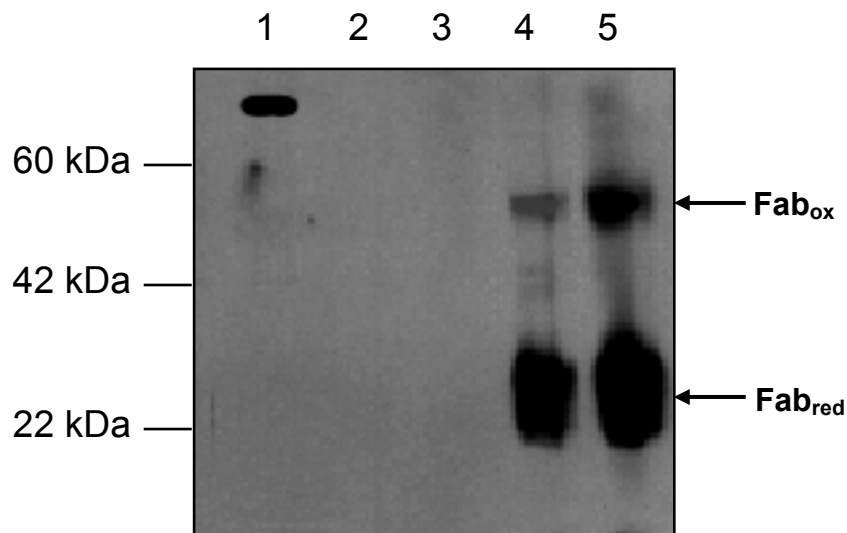


Abb. 3.1.8: Expressionskinetik Fab (4xHis-tag-Fd-Fragment) in DHB4 (*grxABC*). 15% SDS-PAGE (nicht-reduzierend). Western-Blot anti-4xHis (rabbit). DHB4 (*grxABC*) transformiert mit pMS1, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose. 1: 1 µg 6xHis-tag-BiP; 2: löslicher Überstand vor Induktion; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 6 h nach Induktion.

Wie zu erkennen ist, detektiert der Antikörper das 4xHis-Fd-Fragment in den löslichen Überständen vier und sechs Stunden nach Induktion. Die Bande bei etwa 50 kDa enthält also sowohl die leichte Kette als auch das Fd-Fragment.

Diese Ergebnisse zeigen, dass tatsächlich leichte Kette und Fd-Fragment gemeinsam exprimiert werden und im Stamm DHB4 (*grxABC*) teilweise lösliche disulfidverbückte Dimere bilden.

3.1.5 Bestimmung der Aktivität der Antikörperfragmente

Um zu testen ob das exprimierte Fab-Fragment auch in aktiver Form vorliegt, wurde mit den löslichen Überständen der Expressionskinetik ein ELISA Aktivitätstest durchgeführt (siehe Material und Methoden). Das Ergebnis zeigte keinerlei Aktivität der exprimierten Antikörperfragmente (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzustellen, dass der ELISA-Aktivitätstest nicht durch das *E. coli* Lysat beeinflusst wird, wurden Eichgeraden mit Fab-Standard (durch Papain-Spaltung aus MAK33 gewonnen) in ELISA-Konjugatpuffer und Gesamtextrakt des DHB4-Wildtyp-Stammes erstellt. Das Ergebnis in Abbildung 3.1.9 zeigt, dass das *E. coli* Lysat kaum einen Einfluss auf den Test hat und eine Detektion auch unter diesen Bedingungen möglich wäre.

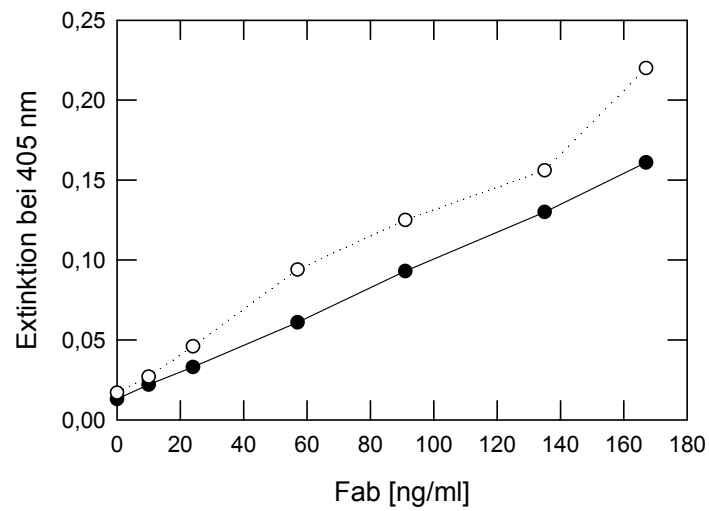


Abb. 3.1.9: ELISA Eichgeraden
Fab-Standard (0 bis 167 ng) in Konjugatpuffer (●) bzw. in DHB4-Wildtyp-Stamm-Gesamtextrakt (○)

3.1.6 Koexpression von BiP

Da das Chaperon BiP die *in vitro* Faltung des Fab-Fragments positiv beeinflusst (vgl. diese Arbeit Kapitel 3.3.3) und da BiP in früheren Arbeiten eine Rolle bei der Antikörperfaltung *in vivo* zugeschrieben wurde (vgl. 1.2.3), sollte getestet werden, ob eine Koexpression von BiP die lösliche Expression von Fab und die Faltung hin zum aktiven Zustand erleichtert.

Dazu war es erforderlich, den Expressionsvektor für BiP so zu modifizieren, dass er eine geeignete Resistenz aufwies (siehe Abbildung 3.1.10). Um eine Koexpression zusammen mit pMM24 (Ampicillin-Resistenz) im Stamm DHB4 (*trxB*) (Kanamycin-Resistenz) zu ermöglichen, musste der BiP-Expressionsvektor pUJ4 modifiziert werden. Dazu wurde eine Kasette aus dem Vektor pTGroE ausgeschnitten, die das Resistenzgen für Chloramphenicol enthält, und in eine passende Schnittstelle innerhalb des β -Lactamasegens eingefügt. Die ausgeschnittene Kasette enthält außerdem einen p15A Replikationsorigin. Dadurch konnten Kompatibilitätsprobleme mit dem ColE1-Replikationsorigin des Vektors pMM24 umgangen werden. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Kontrollverdaus des erhaltenen Vektors überprüft. Eine Sequenzierung war nicht notwendig, da das Ausgangsplasmid, welches das BiP-Gen enthält, bereits vorher sequenziert wurde.

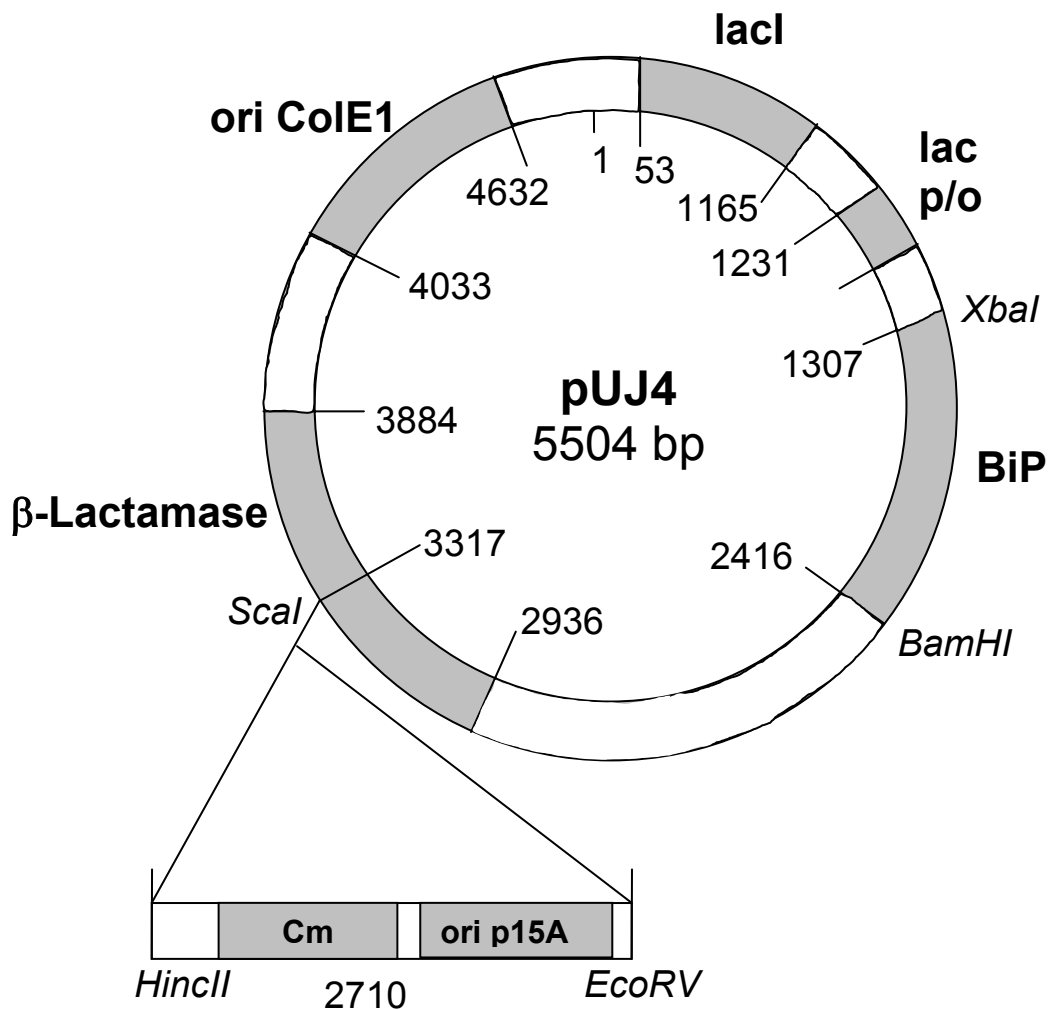


Abb. 3.1.10: Klonierung einer Chloramphenicol-Resistenzkassette in den BiP-Expressionsvektor pUJ4 zur Koexpression von BiP mit Fab. Die Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde aus dem Vektor pTGroE mit *HincII* und *EcoRV* ausgeschnitten und über die *Scal* Schnittstelle in das β -Lactamase-Gen des Vektors pUJ4 eingefügt.

Die mit pMM24 transformierten DHB4 (*trxB*) Zellen sowie die DHB4-Wildtyp-Zellen wurden nun mit dem Plasmid pUJ4-Cm transformiert.

Anzucht und Induktion erfolgten wie in den Experimenten zuvor, wobei dem Medium zusätzlich 35 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol zugesetzt wurde. Die Induktion der Expression von Fab erfolgte erneut durch Zugabe von 0,1 % L-Arabinose. Die Expression von BiP wurde gleichzeitig durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Der Nachweis von BiP war durch Western-Blot mit einem anti-4xHis-Antikörper möglich, da BiP einen 6xHis-tag am N-Terminus enthält. Wie in Abbildung 3.1.11 ersichtlich, wird BiP im

DHB4-Wildtyp-Stamm fast ausschließlich in löslicher Form exprimiert und ist auch nach 24 Stunden noch nicht durch *E. coli* Proteasen abgebaut (Spur 8).

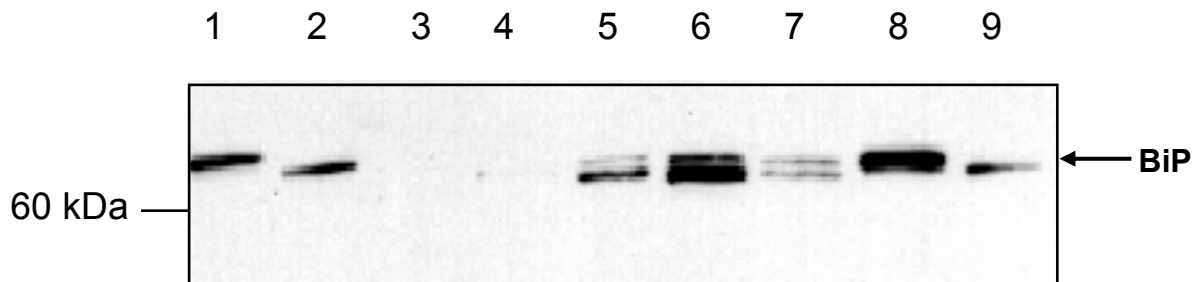


Abb. 3.1.11: Expressionskinetik Fab und BiP in DHB4 Wildtyp. 15% SDS-PAGE. Western-Blot anti-4xHis (rabbit). DHB4 transformiert mit pMM24 und pUJ4-Cm, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose und 1 mM IPTG, Wachstum bei 37 °C. **1:** 1 µg 6xHis-tag-BiP reduziert; **2:** 1 µg 6xHis-tag-BiP oxidiert; **3:** Gesamtextrakt vor Induktion; **4:** 2 h nach Induktion; **5:** 4 h nach Induktion; **6:** 24 h nach Induktion; **7:** Pellet 24 h nach Induktion; **8:** löslicher Überstand 24 h nach Induktion; **9:** 1 µg 6xHis-tag-BiP oxidiert.

Dieselben Proben wurden anschließend einer Western-Blot Detektion mit anti-IgG(H+L)-Antikörper unterzogen (Abbildung 3.1.12). Fab exprimiert ausschließlich in unlöslicher Form als *inclusion bodies*, im löslichen Überstand konnte kein Fab detektiert werden (Spur 6 und 8).

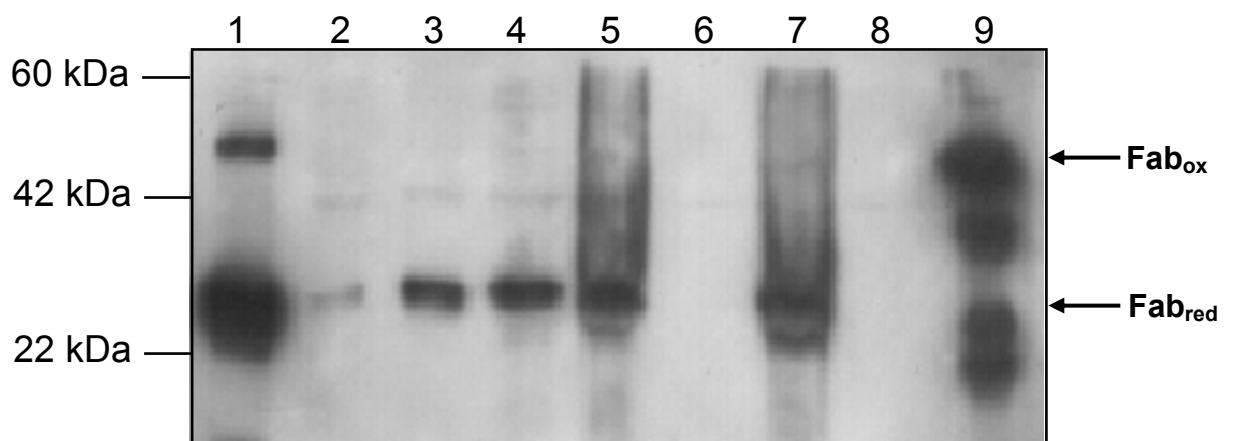


Abb. 3.1.12: Expressionskinetik Fab und BiP in DHB4 Wildtyp. 15% SDS-PAGE. Western-Blot anti-IgG (H+L). DHB4 transformiert mit pMM24 und pUJ4-Cm, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose und 1 mM IPTG. **1:** Fab-Standard reduziert 50 ng; **2:** Gesamtextrakt vor Induktion; **3:** 2 h nach Induktion; **4:** 4 h nach Induktion; **5:** Pellet 4 h nach Induktion reduziert; **6:** löslicher Überstand 4 h nach Induktion reduziert; **7:** Pellet 4 h nach Induktion oxidiert; **8:** löslicher Überstand 4 h nach Induktion oxidiert; **9:** Fab-Standard oxidiert 50 ng.

Dagegen konnte bei der Expression in der *knock-out*-Mutante DHB4 (*trxB*) ein löslicher und disulfidverbrückter Anteil von Fab festgestellt werden. Abbildung 3.1.13 zeigt die Detektion von ko-exprimiertem BiP detektiert mit anti-4xHis-Antikörper. Auch in der DHB4(*trxB*)-Mutante konnte BiP löslich exprimiert werden (Spur 4-6).

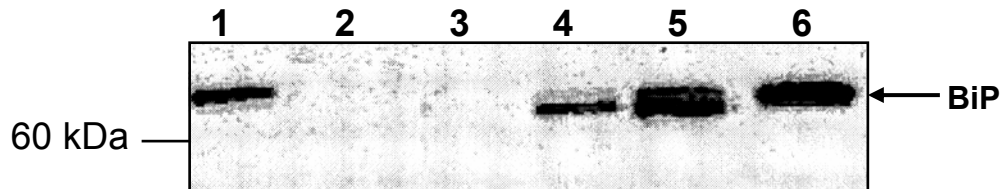


Abb. 3.1.13: Expressionskinetik Fab und BiP in DHB4 (*trxB*). 15% SDS-PAGE (reduzierend). Western-Blot anti-4xHis (rabbit). DHB4 (*trxB*) transformiert mit pMM24 und pUJ4-Cm, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose und 1 mM IPTG. **1:** 1 µg 6xHis-tag-BiP; **2:** löslicher Überstand vor Induktion; **3:** 2 h nach Induktion; **4:** 4 h nach Induktion; **5:** 6 h nach Induktion; **6:** 24 h nach Induktion.

Abbildung 3.1.14 zeigt die Detektion von Fab mit anti-IgG(H+L)-Antikörper. Wie deutlich zu sehen ist, wird ein Teil des exprimierten Proteins in löslicher, disulfidverbrückter Form hergestellt, wohingegen der Großteil in Form von *inclusion bodies* vorliegt (Spur 11). Wie ebenfalls zu sehen ist, wird Fab auch bei der Koexpression von BiP nach 24 Stunden vollständig von *E. coli* abgebaut. Im Vergleich zur Expression von Fab alleine in diesem Stamm ist der Anteil an löslichem Protein bei Koexpression von BiP deutlich erhöht, etwa 30 % im Vergleich zu 20 % bei alleiniger Expression von Fab. Der Anteil an disulfidverbrücktem Fab ist dagegen gleich.

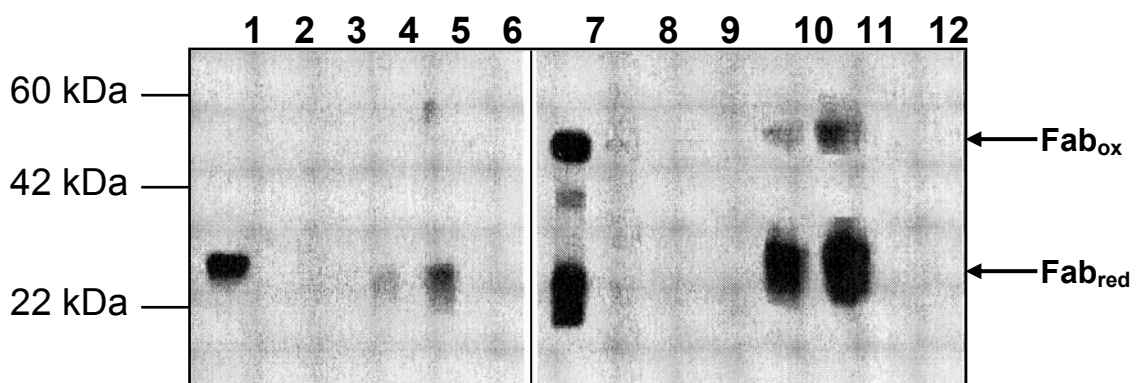


Abb. 3.1.14: Expressionskinetik Fab und BiP in DHB4 (*trxB*). 15% SDS-PAGE. Western-Blot anti-IgG (H+L). DHB4 transformiert mit pMM24 und pUJ4-Cm, Induktion mit 0,1 % L-Arabinose und 1 mM IPTG. **1-6:** reduzierend; **7-12:** nicht-reduzierend; **1:** Fab-Standard 50 ng; **2:** löslicher Überstand vor Induktion; **3:** 2 h nach Induktion; **4:** 4 h nach Induktion; **5:** 6 h nach Induktion; **6:** 24 h nach Induktion; **7:** Fab-Standard 50 ng; **8:** löslicher Überstand vor Induktion; **9:** 2 h nach Induktion; **10:** 4 h nach Induktion; **11:** 6 h nach Induktion; **12:** 24 h nach Induktion.

Von den löslichen Überständen wurde die Aktivität mittels ELISA bestimmt (vgl. 3.1.5). Dabei konnte keine Aktivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2 Diskussion zur Expression von Antikörperketten in *E. coli*

Die Ergebnisse der Expressionsstudien in den verschiedenen *knock-out*-Stämmen sind in Tabelle 3.2.1 zusammengefasst.

DHB4	<i>wt</i>	<i>gor</i>	<i>gshA</i>	<i>grxB</i>	<i>grxC</i>	<i>grxA</i>	<i>gorgrxB</i>	<i>gorgrxC</i>	<i>gorgrxABC</i>	<i>grxABC</i>	<i>trxB</i>
Expression in <i>inclusion bodies</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
löslicher Anteil bei 30°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/5	1/5
löslicher Anteil bei 37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3	1/5
intermolekulare Disulfidbrücke bei 30°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
intermolekulare Disulfidbrücke bei 37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓
Aktivität (ELISA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koexpression von BiP	✓										✓
löslicher Anteil bei 37°C	-										1/3
intermolekulare Disulfidbrücke bei 37°C	-										✓
Aktivität (ELISA)	-										-

Tab. 3.2.1: Ergebnisse der Expressionsstudien

Die Expression, Löslichkeit und Disulfidverbrückung sowie die Aktivität der Antikörperfragmente wurden wie beschrieben bestimmt. Legende: -: nicht vorhanden, ✓: vorhanden, Leerzeichen: nicht getestet, %-Angaben: Anteil an löslichen Protein an Gesamtextrakt

In allen getesteten Stämmen konnte eine Expression von Fab (leichte Kette und Fd-Fragment) in Form von unlöslichen *inclusion bodies* festgestellt werden. Jedoch nur in den Stämmen DHB4 (*trxB*) und DHB4 (*grxABC*) konnte ein Teil des exprimierten Proteins in der löslichen Fraktion detektiert werden. In beiden Fällen lag auch ein Teil des löslichen Proteins als

disulfidverbrücktes Dimer aus leichter Kette und Fd-Fragment vor. Im Falle von DHB4 (*grxABC*) war dieser Anteil etwas höher als bei DHB4 (*trxB*).

Diese beiden *knock-out*-Stämme hatten sich auch bei früheren Untersuchungen zur cytoplasmatischen Expression von alkalischer Phosphatase, einem Enzym das in seiner aktiven Form ebenfalls Disulfidbrücken benötigt, als am geeignetsten erwiesen (Prinz *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1998).

Aufgrund früherer Ergebnisse zur Rolle des Hsp70 Chaperons BiP bei der Antikörperfaltung *in vitro* (Mayer *et al.*, 2000) und *in vivo* (Gaut & Hendershot, 1993; Hendershot *et al.*, 1996; Knittler & Haas, 1992; Lee *et al.*, 1999) sollte untersucht werden, ob sich eine cytoplasmatische Expression von aktiven Fab-Fragment durch Koexpression dieses Chaperons bewerkstelligen lässt. Da die vorhandenen *knock-out*-Stämme bereits selbst über verschiedene Resistenzgene verfügten, war die Möglichkeit zur Koexpression von BiP auf die Einfachmutante (*trxB*) und den Wildtyp von DHB4 beschränkt. Während die Koexpression von BiP beim Wildtyp Stamm keine Wirkung hatte, konnte der lösliche Anteil in DHB4 (*trxB*) erhöht werden. Jedoch konnte auch in diesem Fall, wie auch in allen anderen Fällen keine Aktivität der exprimierten Fab-Fragmente festgestellt werden. Offensichtlich ist die Koexpression von einem Chaperon, nämlich BiP, nicht ausreichend, um Fab in seine native Konformation zu falten. Dies ist nicht überraschend, da bekannt ist dass ein ganzes Netzwerk von Faltungshelfern im ER aktiv ist, um aktive Antikörper herzustellen (vgl. 1.1.4). Zwar ist BiP *in vitro* in der Lage, die Aggregation des Fab-Fragments zu unterdrücken und zeigt einen synergetischen Effekt mit PDI bei der Reaktivierung des Fab-Fragments (Mayer *et al.*, 2000), unter weitaus schwierigeren Bedingungen *in vivo* (erhöhte Proteinkonzentration, Proteasen) sind offensichtlich weitere Faltungshelfer nötig, um die Faltung von Antikörper in ihren aktiven Zustand zu gewährleisten. Einen weiteren Hinweis darauf, dass das lösliche und disulfidverbrückte Fab nicht in seiner korrekt gefalteten Struktur vorliegt, gaben die Ergebnisse von Versuchen zur Reinigung des exprimierten Fab-Fragments. Sowohl die Reinigung über eine Ni-NTA-Säule (im Falle des 4xHis-Fd-Fragments) als auch die Reinigung des nicht getagten Fabs über ein Protein-L-Agarose Material (Pierce Biotechnology Inc.), welches natives Fab bindet, war erfolglos. Möglicherweise ist der His-tag nicht zugänglich im Inneren des Proteins verborgen und das nicht getagte Fab liegt in einer fehlgefalteten Konformation vor, die es dem Protein nicht ermöglicht, an Protein-L-Agarose zu binden. Eine Testreinigung von Fab-Standard (aus dem ganzen MAK33 Antikörper durch Papainspaltung gewonnen) war hingegen erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

Möglicher Grund für das Nichterreichen der richtigen Konformation ist das Fehlen weiterer für die Faltung essentieller Chaperone. In Säugetierzellen ist ein ganzes Netzwerk von Chaperonen und anderen Faltungshelfern im ER aktiv, um immunologisch aktive Antikörper zu produzieren. Vor allem der Proteindisulfidisomerase PDI und dem Chaperon Grp94 wurden neben BiP eine Rolle bei der Faltung von Antikörpern zugeschrieben (Zapun *et al.*, 1999). Möglicherweise wäre eine Koexpression von weiteren Faltungshelfern erfolgversprechend. Aufgrund der zur Verfügung stehenden Resistenzgene ist jedoch die Anzahl der möglichen Koexpressionen beschränkt. Dass dieser Weg, über die Koexpression von Chaperonen zu nativem disulfidverbrücktem Proteinen aus dem Cytoplasma von *E. coli* zu gelangen, durchaus eine Möglichkeit darstellt, zeigen Arbeiten, bei denen funktionelle *single-chain* Fv-Fragmente (Jurado *et al.*, 2002) oder sogar Fab-Fragmente (Levy *et al.*, 2001) eines Antikörpers exprimiert wurden. Durch Koexpression von cytoplasmatischen Chaperonen wie etwa GroEL/ES, Trigger Faktor und DnaK/J konnten dabei aktive Fab-Fragmente des 26-10 Anti-Digoxin-Antikörpers im Cytoplasma von *E. coli trxB gor* Mutanten produziert werden (Levy *et al.*, 2001).

3.3 Rückfaltung und Reoxidation des Fab Fragments *in vitro*

3.3.1 Renaturierung von denaturiertem und oxidiertem Fab

Wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben, faltet denaturiertes und oxidiertes Fab spontan in seine native Form mit Rückfaltungsausbeuten von bis zu 50 % zurück (Lilie *et al.*, 1994; Schmidt & Buchner, 1992).

In dieser Arbeit wurde Fab (20 μM) 2 Stunden bei Raumtemperatur in Denaturierungspuffer (6 M GdmCl, 0,1 M Tris pH 8.0) entfaltet. Die Renaturierung erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung des denaturierten Proteins in Renaturierungspuffer (in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 2mM EDTA). Die Rückfaltung wurde bei 15 °C durchgeführt, und die Reaktivierung wurde mittels ELISA analysiert. Wie in Abbildung 3.2.1 zu sehen ist, decken sich die hier gemessenen Ergebnisse mit den früheren Beobachtungen.

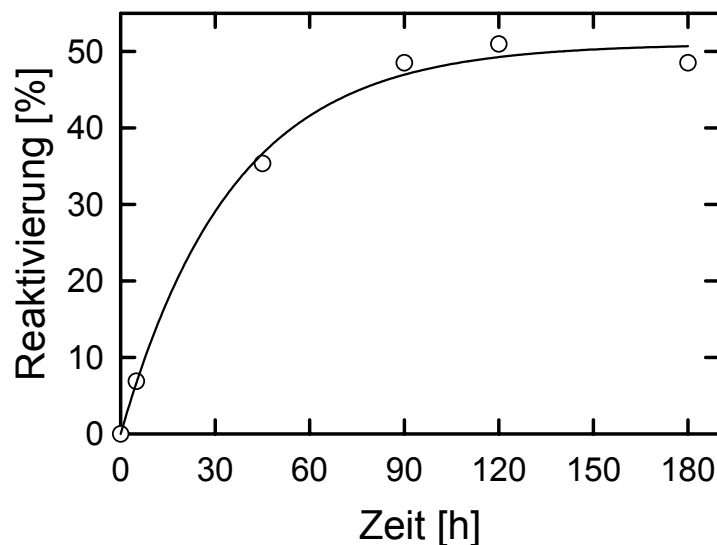


Abb. 3.3.1: Spontane Reaktivierung von Fab/ox

20 μM Fab wurden 2 h bei RT in Denaturierungspuffer (6 M GdmCl, 0,1 M Tris pH 8.0) denaturiert. Die Renaturierung erfolgte durch 1:100 Verdünnung (Endkonzentration Fab= 0,2 μM) in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 2 mM EDTA, bei 15°C. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels ELISA auf ihre Aktivität hin untersucht.

3.3.2 Renaturierung von denaturiertem und reduziertem Fab

Während das denaturierte und oxidierte Fab Fragment spontan zurückfaltet, zeigt die reduzierte Form kaum eine spontane Reaktivierung (Lilie *et al.*, 1994). Im Rahmen dieser Arbeit wurde

der Einfluss verschiedener Faltungshelferproteine auf die Rückfaltung und Reoxidation untersucht. Die Renaturierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch enthielt der Denaturierungspuffer 0,3 M DTE um die Disulfidbrücken vollständig zu reduzieren. Der Rückfaltungspuffer enthielt, wenn nicht anders angegeben kein EDTA, dafür aber 6 mM GSSG. Die Rückfaltung erfolgte deutlich langsamer als im Falle des oxidierten Fabs, weshalb die Renaturierung über einen Zeitraum von 48 Stunden verfolgt wurde. Wie bereits in früheren Arbeiten konnte auch hier kaum eine spontane Reaktivierung beobachtet werden (siehe Abbildung 3.3.2).

3.3.3 Einfluss von BiP und PDI auf die Renaturierung von reduziertem Fab

Wie bereits früher gezeigt (Lilie *et al.*, 1994), kann bei reduziertem Fab in Anwesenheit von 0,5 μ M PDI (entspricht einem molaren Verhältnis PDI/Fab = 2,5) eine Reaktivierung von etwa 20 % beobachtet werden. Diese Beobachtung wurde bereits mehrfach bestätigt (Mayer, 1999; Mayer *et al.*, 2000) und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gemacht werden (siehe Abbildung 3.3.2).

PDI wurde 10 min vor Beginn der Renaturierung in Gegenwart von 1 mM DTE reduziert und unmittelbar vor Start der Rückfaltung dem Renaturierungspuffer zugesetzt. Wie aus Abbildung 3.3.2 hervorgeht, konnte bei Anwesenheit von PDI eine Reaktivierung von etwa 20 % erreicht werden.

Um den Einfluss von BiP auf die Rückfaltung von Fab/red zu untersuchen, wurde den Renaturierungsansätzen 2 μ M BiP (entspricht einem molaren Verhältnis BiP/Fab = 10:1) zugesetzt. Außerdem enthielten die Ansätze 500 μ M ATP sowie ein ATP-regenerierendes System, bestehend aus 10 mM Phosphokreatin und 3,5 U/100 μ l Kreatinphosphatase.

Wie aus Abbildung 3.3.2 ersichtlich, lag die Reaktivierung in Gegenwart von BiP bei etwa 13 %. Wurde dem Renaturierungsansatz gleichzeitig PDI und BiP zugesetzt, so konnte eine Reaktivierung von 50 % erreicht werden. In einem Kontrollansatz ohne ATP, jedoch mit BiP und PDI, konnten nur noch 35% Reaktivierung erzielt werden, was einem additiven Effekt der beiden Faltungshelfer auf die Faltung von Fab gleichkommt. In Anwesenheit von ATP ist ein synergistischer Effekt zu beobachten (Mayer, 1999; Mayer *et al.*, 2000). Kontrollexperimente mit ATP und dem ATP-regenerierenden System alleine sowie mit BSA und dem ATP regenerierenden System zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Rückfaltung.

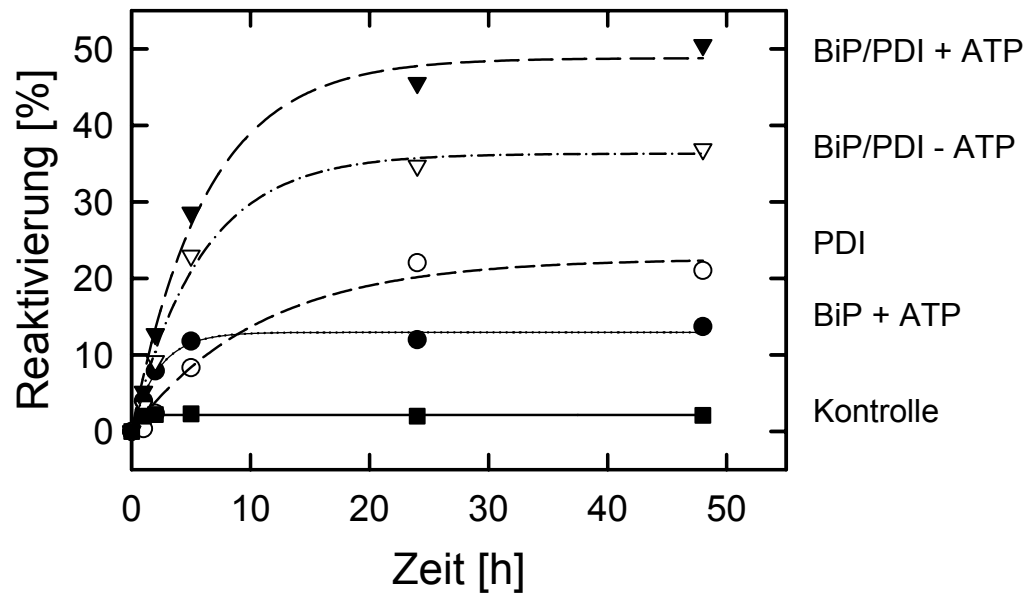


Abb. 3.3.2: Einfluss von PDI und BiP auf die Rückfaltung von reduziertem Fab.

Die Rückfaltung von Fab/red bei 15 °C wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6mM GSSG in Gegenwart von 3 µM BSA, und einem ATP regenerierenden System bestehend aus 500 µM ATP, 10 mM Phosphokreatin und 3,5 U/100 µl Kreatinphosphatase (■) (ohne ATP wurden die gleichen Ergebnisse erhalten); in Gegenwart von 2 µM BiP und dem ATP regenerierenden System (●) (ohne ATP wurden die gleichen Ergebnisse erhalten); in Gegenwart von 0,5 µM PDI (○); in Gegenwart von 2 µM BiP und 0,5 µM PDI (▽) und in Gegenwart von 2 µM BiP, 0,5 µM PDI und dem ATP regenerierenden System (▼). Die Reaktivierung wurde über ELISA bestimmt.

Um zu überprüfen, ob der Einfluss der Faltungshelfer auf die Fab Faltung konzentrationsabhängig ist, wurden entsprechende Experimente durchgeführt. In Gegenwart von PDI und ATP wurde die Rückfaltung mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen von BiP zu Fab gemessen. Wie in Abbildung 3.3.3 zu sehen ist, ist ein molarer Überschuss von BiP zu Fab im Verhältnis 10:1 für eine maximale Wirkung erforderlich.

Auch der Effekt von PDI ist konzentrationsabhängig. Allerdings reicht hier ein Überschuss von PDI zu BiP von etwa 4:1 aus um die maximale Renaturierung von 20 % zu erreichen (siehe Abbildung 3.3.4).

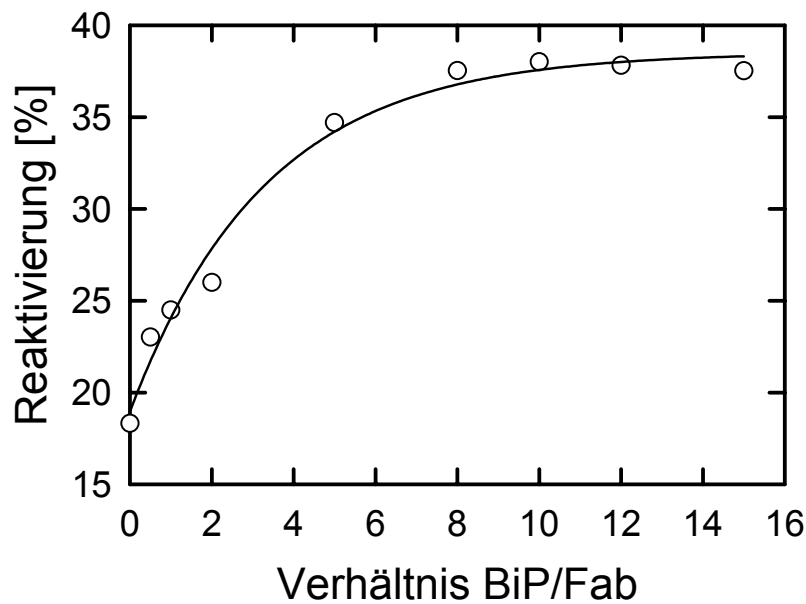


Abb. 3.3.3: Einfluss des Verhältnisses von BiP zu Fab auf die Rückfaltung von Fab/red. Die Rückfaltung von Fab/red (Endkonzentration Fab= 0,2 μ M) wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6 mM GSSG mit 0,5 μ M PDI, 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System sowie unterschiedlichen Konzentrationen an BiP (0-3 μ M). Die Reaktivierung wurde nach 48 h mit ELISA bestimmt.

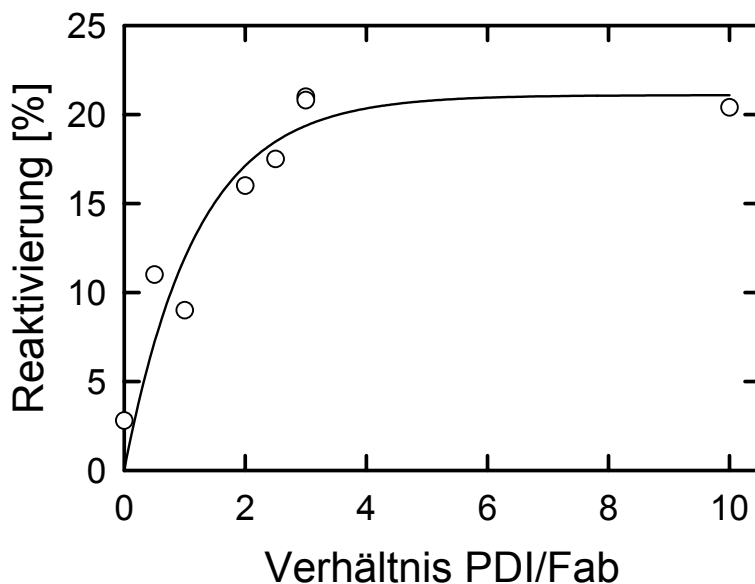


Abb. 3.3.4: Einfluss des Verhältnisses von PDI zu BiP auf die Rückfaltung von Fab/red. Die Rückfaltung von Fab/red (Endkonzentration Fab= 0,2 μ M) wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6mM GSSG mit unterschiedlichen Konzentrationen an PDI (0-2 μ M). Die Reaktivierung wurde nach 48 h mit ELISA bestimmt.

Der Einfluss von PDI ist jedoch stark zeitabhängig. Wie gezeigt werden konnte, ist es absolut erforderlich, dass PDI bereits zu Beginn der Rückfaltung vorhanden ist. Wird PDI erst nach Beginn der Rückfaltung zugegeben, so sinken die Reaktivierungsausbeuten dramatisch (Abbildung 3.3.5). Bereits 5 Minuten nach Beginn der Rückfaltung hat eine Zugabe von PDI keinen Effekt mehr.

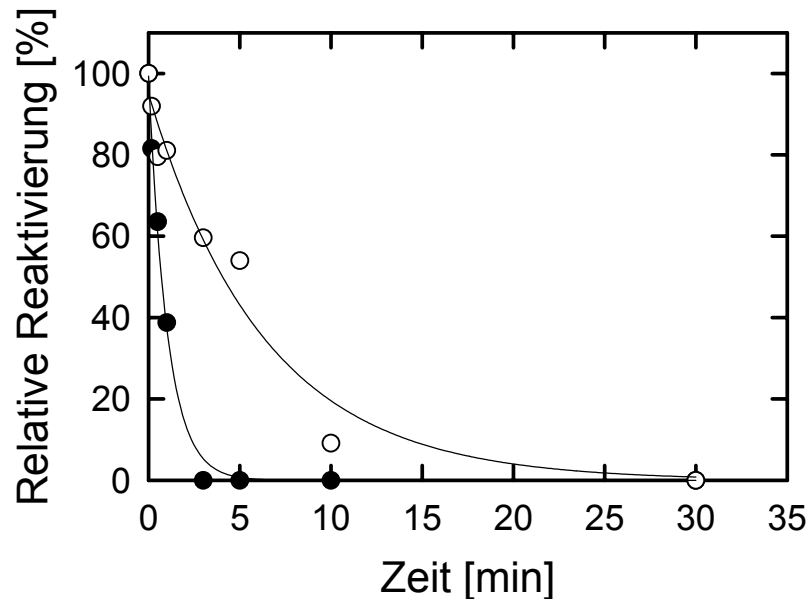


Abb. 3.3.5: Zeitlich verzögerte Zugabe von PDI zu rückfaltendem Fab/red.
Die Renaturierung erfolgte durch 1:100 Verdünnung (Endkonzentration Fab= 0,2 μM) in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 6 mM GSSG, 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System bei 15 °C. Die Reaktivierungsausbeute wurde nach 48 h in Abwesenheit (●) oder in Gegenwart von 2 μM BiP (○) mittels ELISA bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde PDI zugegeben (Endkonzentration 0,5 μM). Die Geschwindigkeitskonstanten waren 0,95 in Abwesenheit von BiP und 0,15 in Gegenwart von BiP. Die Rückfaltungsausbeute bei PDI Zugabe am Beginn der Rückfaltung wurde gleich 100 % gesetzt. Die absoluten Reaktivierungsausbeuten waren 49 % in Gegenwart von BiP bzw. 21 % in Abwesenheit von BiP.

Wie bereits früher gezeigt werden konnte, beruht dieser Effekt nicht auf einer Änderung im Redoxpotential, da die Anzahl an Sulfhydrylgruppen in dieser Zeitspanne unverändert blieb (Lilie *et al.*, 1994). Wenn BiP die Reaktivierung von Fab unterstützt, indem es die Strukturbildung verhindert und damit die Cysteinreste für längere Zeit für PDI zugänglich hält, sollte es möglich sein, die Zeitspanne, in der eine Zugabe von PDI Wirkung zeigt, auszudehnen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Experimente durchgeführt, in denen eine zeitlich verzögerte Zugabe von PDI in Gegenwart von BiP durchgeführt wurde. Wie in Abbildung 3.3.5 zu sehen ist, nimmt der Effekt von PDI bei zeitlich verzögerter Zugabe langsamer ab wenn BiP vorhanden ist. Dabei liegt die relative Reaktivierungsausbeute nach 5

Minuten noch bei 40 %, wohingegen in Abwesenheit von BiP zu diesem Zeitpunkt bereits keine Reaktivierung mehr festgestellt werden kann. Wie die in Abbildung 3.3.5 und 3.3.6 dargestellten Einzelmessungen zeigen, ändert sich nur die Gesamtreaktivierungsausbeute, nicht jedoch die Kinetik der Rückfaltungsreaktion.

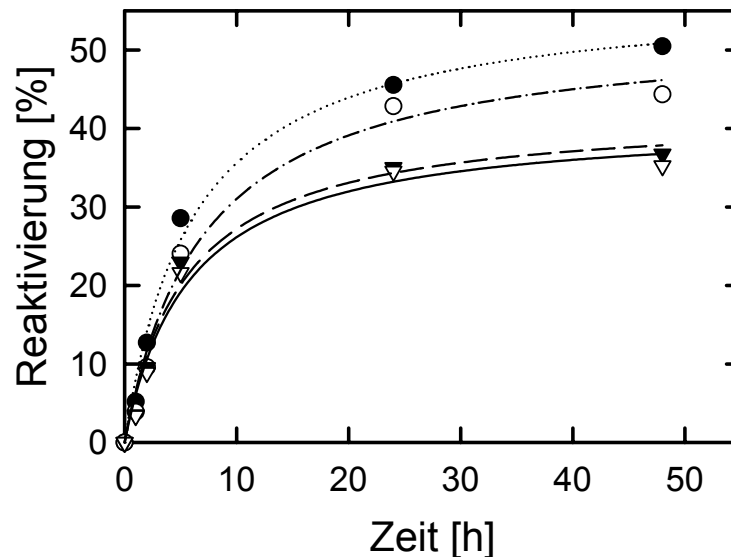


Abb. 3.3.6: Renaturierung von Fab/red in Gegenwart von BiP und bei Zugabe von PDI nach unterschiedlichen Zeiten. 20 μ M Fab wurden 2 h bei RT in Denaturierungspuffer denaturiert. Die Renaturierung erfolgte durch 1:100 Verdünnung (Endkonzentration Fab= 0,2 μ M) in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 6 mM GSSG, 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System bei 15 °C. 2 μ M BiP wurden sofort und 0,5 μ M PDI (10 min vor Zugabe mit 1 mM DTE reduziert) wurden zu entsprechenden Zeiten zugegeben. Zugabe von PDI von Beginn an (●); nach 10 s (○); nach 60 s (▼); nach 5 min (▽).

Um zu untersuchen, ob der positive Effekt von BiP die Interaktion mit nur einer oder mit beiden Polypeptidketten des Fab Fragments erfordert, wurden Experimente mit der isolierten leichten Kette und dem Fd-Fragment durchgeführt. Diese wurden als *inclusion bodies* durch rekombinante Expression in *E. coli* gewonnen. Nach Denaturierung und Reduktion der *inclusion body* Proteine wurden Rückfaltungsexperimente durchgeführt, bei denen entweder nur die leichte Kette, das Fd-Fragment oder beide Polypeptidketten in Gegenwart von BiP vorinkubiert wurden. In einem zweiten Schritt wurden dann die getrennt vorinkubierten Ketten vereinigt, mit PDI und ATP versetzt und weiterinkubiert. Wie in Abbildung 3.3.7 gezeigt, wurden annähernd gleiche Reaktivierungsausbeuten wie im Fall des kompletten Fab-Fragments erzielt, wenn Fd-Fragment und leichte Kette direkt nach Beginn der Rückfaltung vereinigt wurden. Wurden die beiden Ketten jedoch erst später vereinigt, sank die Reaktivierung deutlich ab, innerhalb der ersten Minute von 20 auf 5 %. Wurden entweder leichte Kette oder Fd-

Fragment in Gegenwart von BiP vorinkubiert, so betrug die Reaktivierungsausbeute 50 % bei sofortiger Vereinigung beider Ketten. Die Reaktivierungsausbeute sank genauso schnell wie in Abwesenheit von BiP wenn die beiden Ketten erst später vereinigt wurden. Jedoch konnte dieser Effekt deutlich verlangsamt werden, wenn beide Ketten mit BiP vorinkubiert wurden.

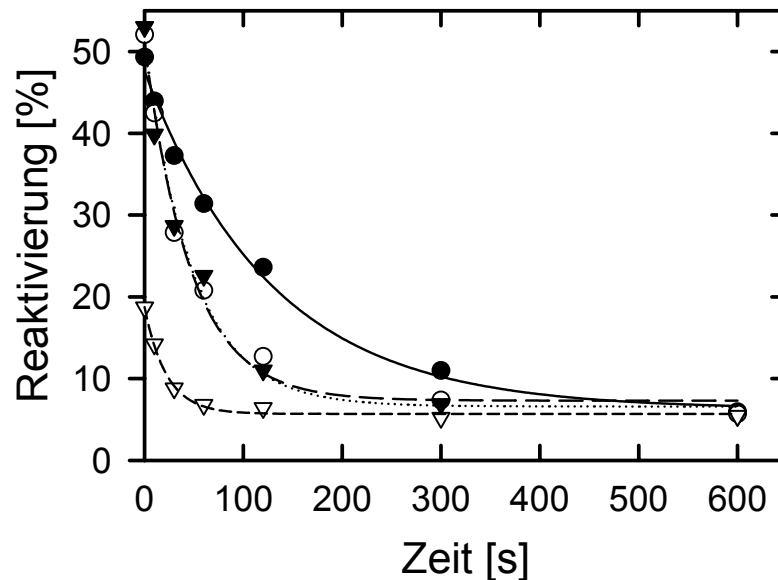


Abb. 3.3.7: Rückfaltung von Fab nach separater Vorinkubation von leichter Kette und Fd-Fragment. Leichte Kette und Fd-Fragment wurde getrennt in 0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 6 mM GSSG in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 μ M BiP vorinkubiert. Bei den angegebenen Zeitpunkten wurde leichte Kette und Fd-Fragment vereinigt und PDI, ATP und ein ATP regenerierendes System wurden hinzugefügt. Die Endkonzentrationen waren je 0,2 μ M leichte Kette und Fd-Fragment, 6 mM GSSG, 2,0 μ M BiP, 0,5 μ M PDI und 0,5 mM ATP. Nach 48 h Rückfaltung wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt. Leichte Kette und Fd-Fragment vorinkubiert in Gegenwart von BiP (●); leichte Kette vorinkubiert in Gegenwart von BiP und Fd-Fragment vorinkubiert in Abwesenheit von BiP (▼); leichte Kette in Abwesenheit von BiP und Fd-Fragment in Gegenwart von BiP (○) sowie leichte Kette und Fd-Fragment, beide in Abwesenheit von BiP (▽). Die Halbwertszeiten betragen 91 s, wenn beide Fragmente mit BiP vorinkubiert wurden, 32 s, wenn nur ein Fragment mit BiP vorinkubiert wurde und 8 s, wenn beide Fragmente ohne BiP vorinkubiert wurden. Bei sofortiger Vereinigung von leichter Kette und Fd-Fragment waren die Reaktivierungsausbeuten vergleichbar mit dem gesamten Fab Fragment, nämlich 50 % in Gegenwart von BiP und 20 % in Abwesenheit von BiP.

Da kein Unterschied in der Reaktivierungsausbeute und in der Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt werden konnte, wenn entweder Fd-Fragment oder leichte Kette mit BiP vorinkubiert wurden, muss man davon ausgehen, dass es für eine effektive Rückfaltung wichtig ist, dass BiP an beide Ketten bindet.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde folgendes Modell für die Rolle von BiP und PDI bei der Antikörperfaltung vorgeschlagen (Mayer *et al.*, 2000). Wie in Abbildung 3.3.8 schematisch

dargestellt, können die entfaltenen und reduzierten Polypeptidketten (leichte Kette und Fd) drei Wege einschlagen. Unter den verwendeten Rückfaltungsbedingungen ist in Abwesenheit von Faltungshelfern keine spontane Rückfaltung möglich, es kommt zur Aggregation.

In Gegenwart von PDI erreichen bis zu 20 % der Fab Moleküle ihren nativen Zustand, solange PDI von Beginn der Rückfaltung an zugegen ist. Die limitierte Fähigkeit von PDI die Rückfaltung zu unterstützen, kann auf eine kinetische Konkurrenz zwischen Struktur-bildung und Zugänglichkeit der Cysteine zurückgeführt werden. Während der Faltung werden die Cysteinreste im Inneren des Antikörpermoleküls verborgen, so dass sie für PDI nicht mehr zugänglich sind.

In Gegenwart von BiP binden die Antikörperketten an das Chaperon in seiner ADP-Form und werden in einer Konformation gehalten, in der die Cysteine für PDI zugänglich sind. Mehrere ATP abhängige Zyklen von Bindung und Freisetzung scheinen für eine effektive Katalyse des Faltungsprozesses erforderlich zu sein. Es ist notwendig, dass BiP in molarem Überschuss vorliegt, da unproduktive Faltungsschritte mit der Bindungsreaktion konkurrieren. PDI bindet entweder gleichzeitig mit BiP, oder nachdem BiP das gebundene Substrat entlassen hat, und katalysiert die Bildung der Disulfidbrücken bzw. deren Isomerisierung. Sind die korrekten Disulfidbrücken gebildet, falten die Ketten in ihre native Konformation und assoziieren zum aktiven Fab-Fragment.

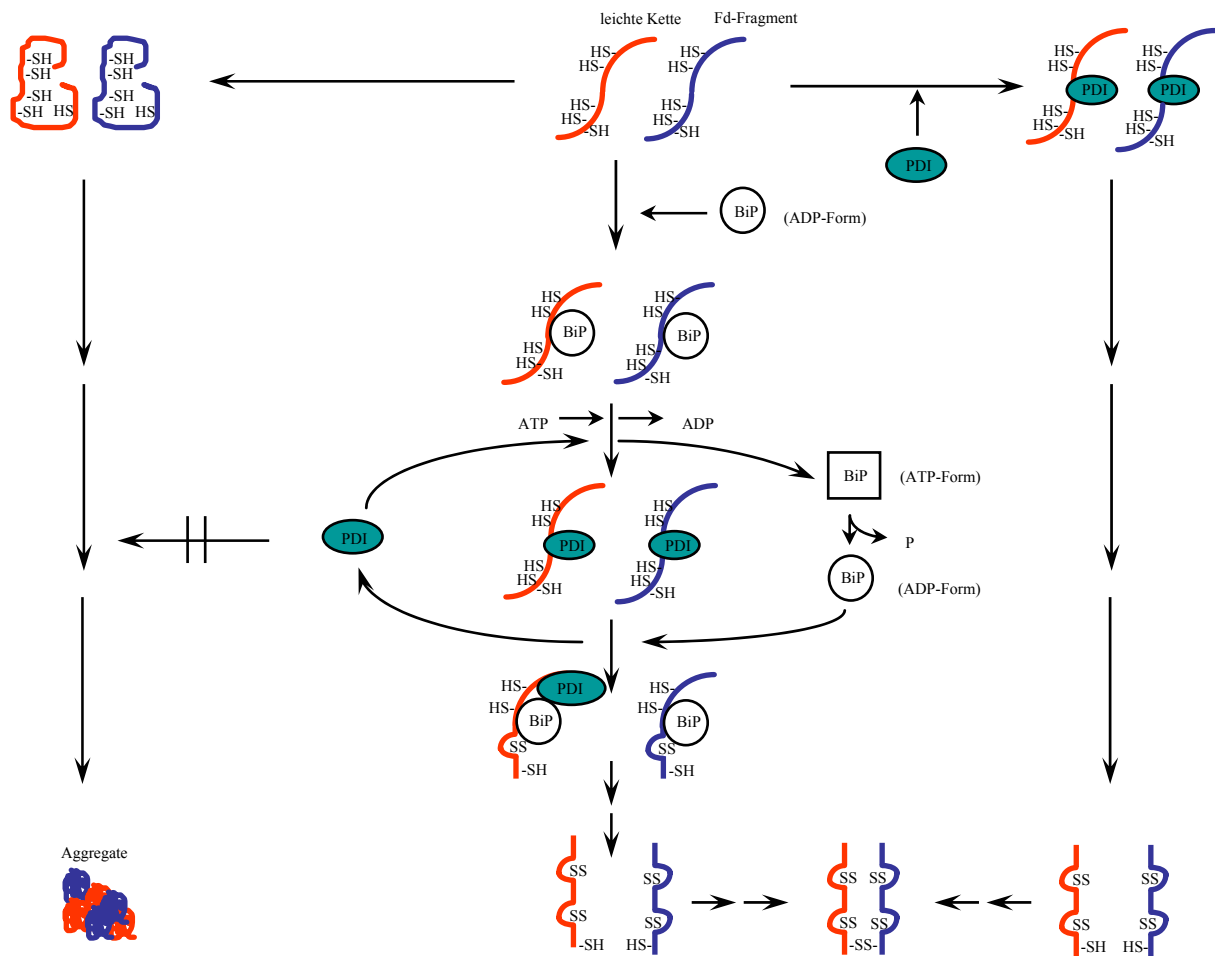


Abb. 3.3.8: Modell für die Rolle von BiP und PDI bei der oxidativen Faltung von Antikörpern *in vitro*

Ausgehend von entfalteten und reduzierten Antikörperketten gibt es abhängig von der Präsenz von Faltungshelfern drei Wege, die die Polypeptidketten einschlagen können. In Abwesenheit von BiP und PDI führt die Renaturierung zu inaktivem Protein in Form von Aggregaten (linke Seite). In Gegenwart von PDI können Reaktivierungsausbeuten von bis zu 20 % erreicht werden (rechte Seite). Das Chaperon BiP bindet beide Antikörperketten. Während der ATP-abhängigen Zyklen von Bindung und Freisetzung werden die Cysteinreste der Antikörperketten für PDI zugänglich gehalten. Dies erlaubt eine effiziente Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken. Weitere Reaktionsschritte führen dann zum vollständig oxidierten und aktiven Antikörper (Mitte).

3.3.4 Einfluss von Erp57 und anderen PDI Homologen

Die interessante Feststellung, dass die Proteindisulfidisomerase PDI mit BiP zusammenarbeitet, führte zu der Überlegung, ob auch andere Proteindisulfidisomerasen des ER einen kooperativen Effekt mit BiP bei der Faltung von Antikörpern zeigen. Eine weitere Proteindisulfidisomerase, die im ER vorkommt, ist Erp57. Von Erp57 ist bekannt, dass es mit dem Calnexin/Calreticulin-Kontrollsystem des ER zusammenarbeitet (Chevet *et al.*, 1999b).

Um zu untersuchen, inwieweit sich PDI und Erp57 bei der Rückfaltung des Fab Fragments gleichen oder unterscheiden, wurden Rückfaltungsexperimente, wie oben beschrieben, in Gegenwart von Erp57 durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.3.9 zu sehen, hat Erp57 ebenso wie PDI einen positiven Effekt auf die Reaktivierungsausbeute bei der Fab Rückfaltung. Bei beiden Proteindisulfidisomerasen liegt die maximale Reaktivierungsausbeute bei etwa 20 %. Die Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts ist bei beiden Faltungshelfern vergleichbar.

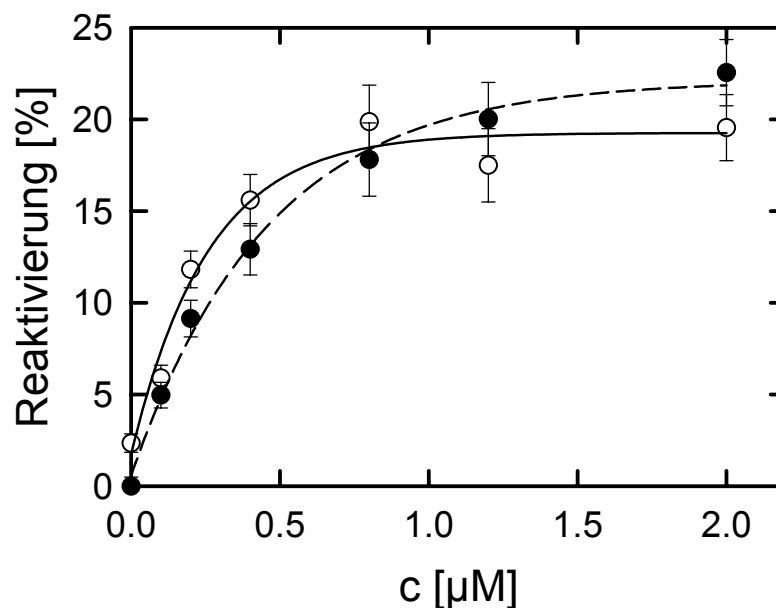


Abb. 3.3.9: Einfluss von PDI und Erp57 auf die Rückfaltung von Fab/red.

Die Rückfaltung wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in Rückfaltungspuffer (Endkonzentration Fab= 0,2 μM) mit steigenden Konzentrationen von PDI (●) bzw. Erp57 (○). Die Reaktivierung wurde nach 48 h mittels ELISA bestimmt.

Die Untersuchung der Kinetik der Rückfaltungsreaktion zeigte jedoch Unterschiede (siehe Abbildung 3.3.10). Fab (0,2 μM) wurde wie zuvor in Gegenwart von 0,5 μM PDI oder Erp57 zurückgefaltet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mittels ELISA auf ihre Aktivität hin untersucht. Dabei zeigte sich im Falle von Erp57 eine lag-Phase,

was die Vermutung nahe legte, dass Erp57 ein anderes Bindungsverhalten gegenüber Fab besitzt als PDI.

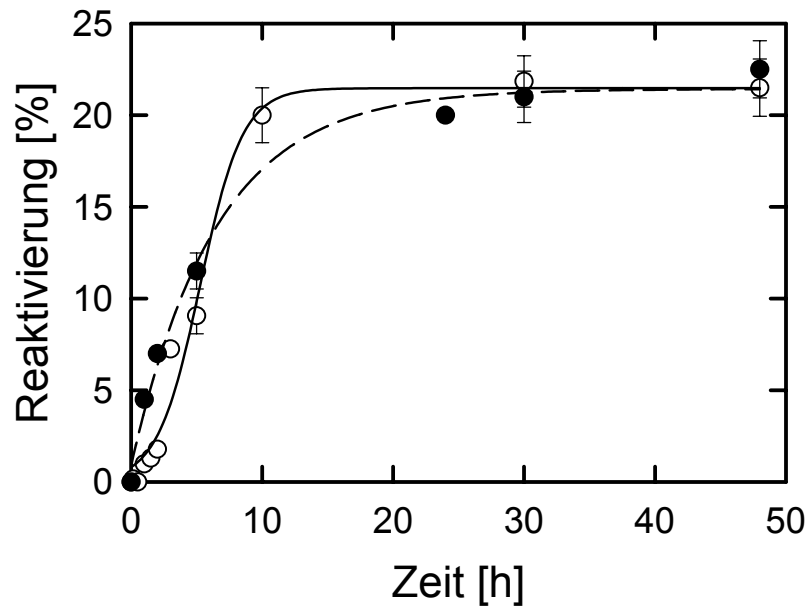


Abb. 3.3.10: Einfluss von PDI und Erp57 auf die Kinetik der Rückfaltung von Fab/red.
 Fab (0,2 μM) wurde wie oben zurückgefaltet, entweder in Gegenwart von 0,5 μM PDI (●) oder 0,5 μM Erp57 (○). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt.

Die Beobachtung, dass bei höheren Konzentrationen an Erp57 diese lag-Phase verschwindet (Daten nicht gezeigt), deutet darauf hin, dass die Bindung von Erp57 an Fab langsamer erfolgt als die Bindung von PDI.

Um zu testen, ob Erp57 wie PDI mit BiP synergistisch zusammenarbeitet, wurde die Fab Rückfaltung in Gegenwart von Erp57 und BiP durchgeführt. Nach 48 Stunden wurden die maximalen Reaktivierungsausbeuten bestimmt (siehe Abbildung 3.3.11). Als Kontrolle wurde die Reaktivierungsausbeuten ohne Faltungsfaktoren, in Gegenwart von PDI, Erp57 und BiP alleine, sowie in Gegenwart von BiP und PDI bestimmt. Als zusätzlicher Vergleich wurde auch die Proteindisulfidisomerase DsbC aus *E. coli* getestet. Das Ergebnis zeigte, dass DsbC (ca. 8 % Reaktivierung) einen deutlich geringeren Effekt hat als PDI und Erp57 (ca. 20 %). In Gegenwart von BiP und PDI konnte eine Reaktivierungsausbeute von 50 % erreicht werden, was mehr als die Summe der Einzeleffekte von PDI (20 %) und BiP (17 %) ist. Dieser synergistische Effekt konnte bei Erp57 und BiP nicht festgestellt werden. Hier lag die Reaktivierung nur bei 40 %, was gerade der Summe der Einzeleffekte entspricht. In Gegenwart von DsbC und BiP sank die Reaktivierungsausbeute auf 17 %, was nicht einmal der Summe der Einzeleffekte von BiP (17 %) und DsbC (8 %) entspricht.

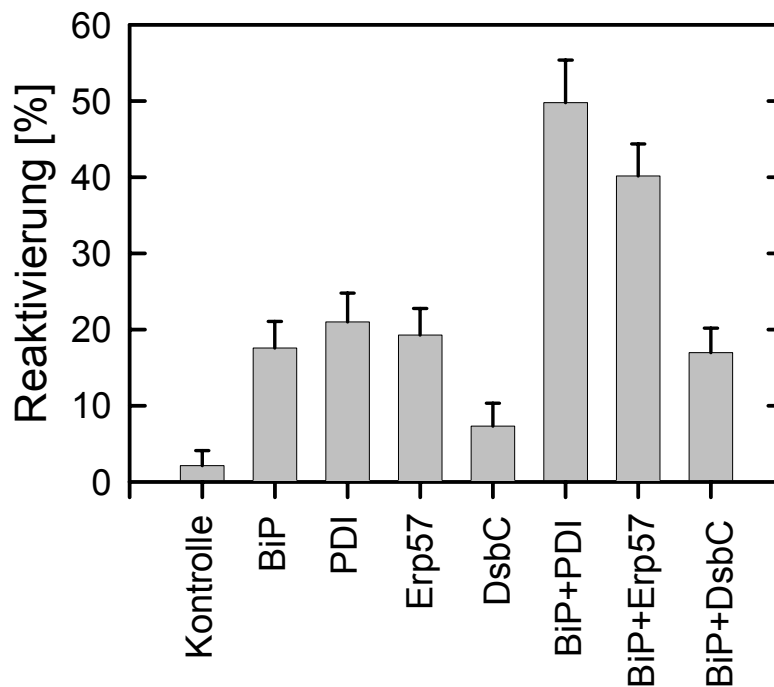


Abb. 3.3.11: Einfluss von PDI, DsbC, Erp57 und BiP auf die Reaktivierungsausbeute bei der Rückfaltung von Fab/red. Fab (0,2 μ M) wurde wie oben in Renaturierungspuffer mit 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System zurückgefaltet in Gegenwart von BiP (2,0 μ M), PDI (0,5 μ M), Erp57 (0,5 μ M), DsbC (1,0 μ M) oder in Gegenwart von BiP und einer der Disulfidisomerasen. Nach 48 h wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt.

Offensichtlich ist nur PDI in der Lage mit BiP zusammenzuarbeiten, wohingegen Erp57 für andere Aufgaben in Zusammenarbeit mit dem *quality control* System des ER verantwortlich zu sein scheint.

DsbC als Proteindisulfidisomerase aus *E. coli* hat nicht nur einen geringeren Einzeleffekt, sondern zeigt auch nicht einmal einen additiven Effekt in Zusammenarbeit mit BiP.

3.3.5 Einfluss verschiedener Hsp70- und Hsp90- Homologe auf die Rückfaltung

Um zu testen, inwieweit sich BiP durch Homologe ersetzen läßt, wurden Rückfaltungsexperimente in Gegenwart verschiedener Hsp70 und Hsp90 Chaperone sowie PDIs durchgeführt. Wie in Abbildung 3.3.12 zu sehen ist, zeigt keine der getesteten Kombinationen einen derartig kooperativen Effekt wie BiP und PDI. Dabei zeigte sich auch, dass bei Verwendung von Faltungshelfern aus dem gleichen Organismus (z.B. DnaK, DnaJ und DsbC aus *E. coli*) höhere Reaktivierungsraten erreicht werden als wenn eine Komponente durch ein artfremdes Homolog (z.B. humane PDI anstelle von DsbC) ersetzt wird.

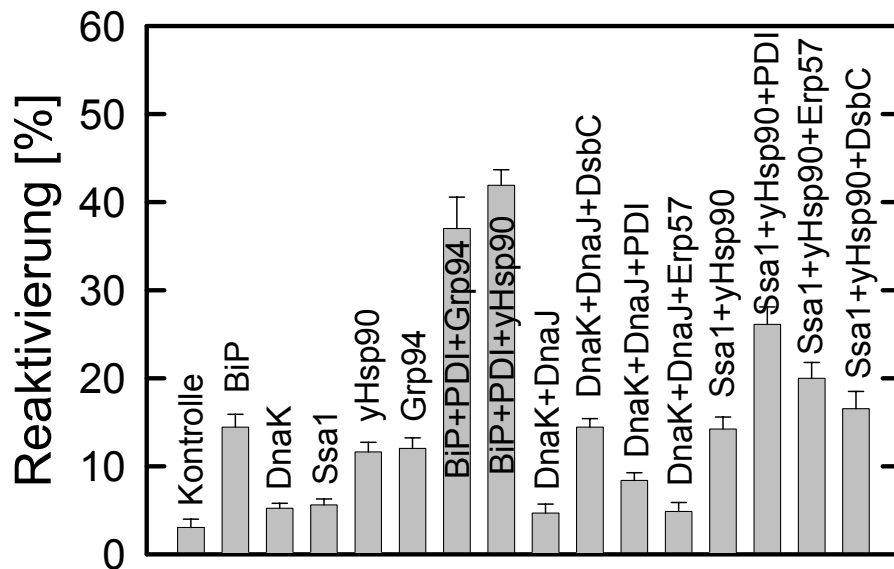


Abb. 3.3.12: Einfluss verschiedener Hsp70 und Hsp90 Chaperone in Kombination mit verschiedenen PDIs auf die Reaktivierungsausbeute bei der Rückfaltung von Fab/red. Fab (0,2 μ M) wurde wie oben in Renaturierungspuffer mit 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System zurückgefaltet in Gegenwart der angegebenen Faltungshelfer: BiP (2,0 μ M), DnaK (2,0 μ M), Ssa1 (2,0 μ M), yHsp90 (0,5 μ M), Grp94 (0,5 μ M), DnaJ (2,0 μ M), PDI (0,5 μ M), Erp57 (0,5 μ M) und DsbC (1,0 μ M). Nach 48 h wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt.

3.3.6 Aggregation von Fab während der Rückfaltung

Der Grund für die nicht vollständige Reaktivierung des Fab Fragments bei der Rückfaltung liegt vermutlich in der Aggregation der Polypeptidketten. Um dies zu zeigen, wurde wie zuvor die Rückfaltung in Anwesenheit verschiedener Faltungshelfer durchgeführt. An den Endpunkten der Rückfaltungskinetiken wurden die Proben abzentrifugiert. Die gesamte Probe sowie das resuspendierte Pellet und der lösliche Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 3.3.13).

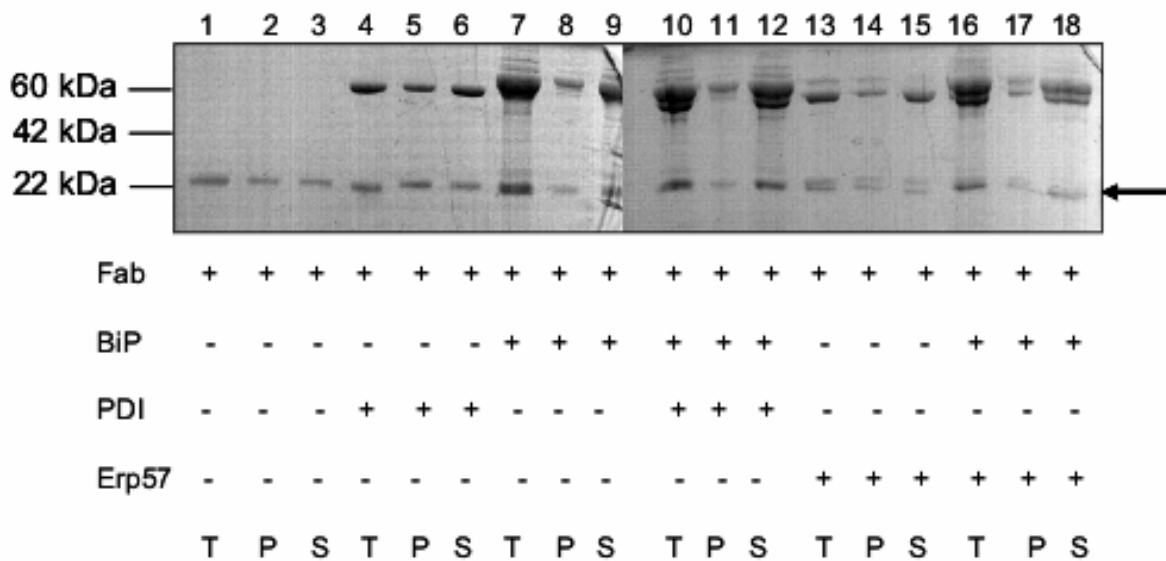


Abb. 3.3.13: Zusammenhang zwischen Aggregation und Aktivität (15 % SDS PAGE)

Fab (1,0 μM) wurde wie oben beschrieben zurückgefaltet. An den Endpunkten der Rückfaltungskinetiken wurden die Proben zentrifugiert. Die gesamte Probe (**T**), das Pellet (**P**) und der lösliche Überstand (**S**) wurden auf 15%igen SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt. Die Rückfaltung/Aggregation wurde durchgeführt in Rückfaltungspuffer mit 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System ohne weitere Zusätze (**1-3**), in Gegenwart von 2,5 μM PDI (**4-6**); 5,0 μM BiP (**7-9**); 0,5 μM PDI und 5,0 μM BiP (**10-12**); 2,5 μM Erp57 (**13-15**) oder 2,5 μM Erp57 und 5,0 μM BiP (**16-18**).

Von den selben Proben wurde mittels ELISA die Aktivität bestimmt. Wie in Abbildung 3.3.14 zu sehen ist, findet sich bei allen Ansätzen die Aktivität fast ausschließlich im löslichen Überstand und nicht im Pellet der unlöslichen Proteinaggregate.

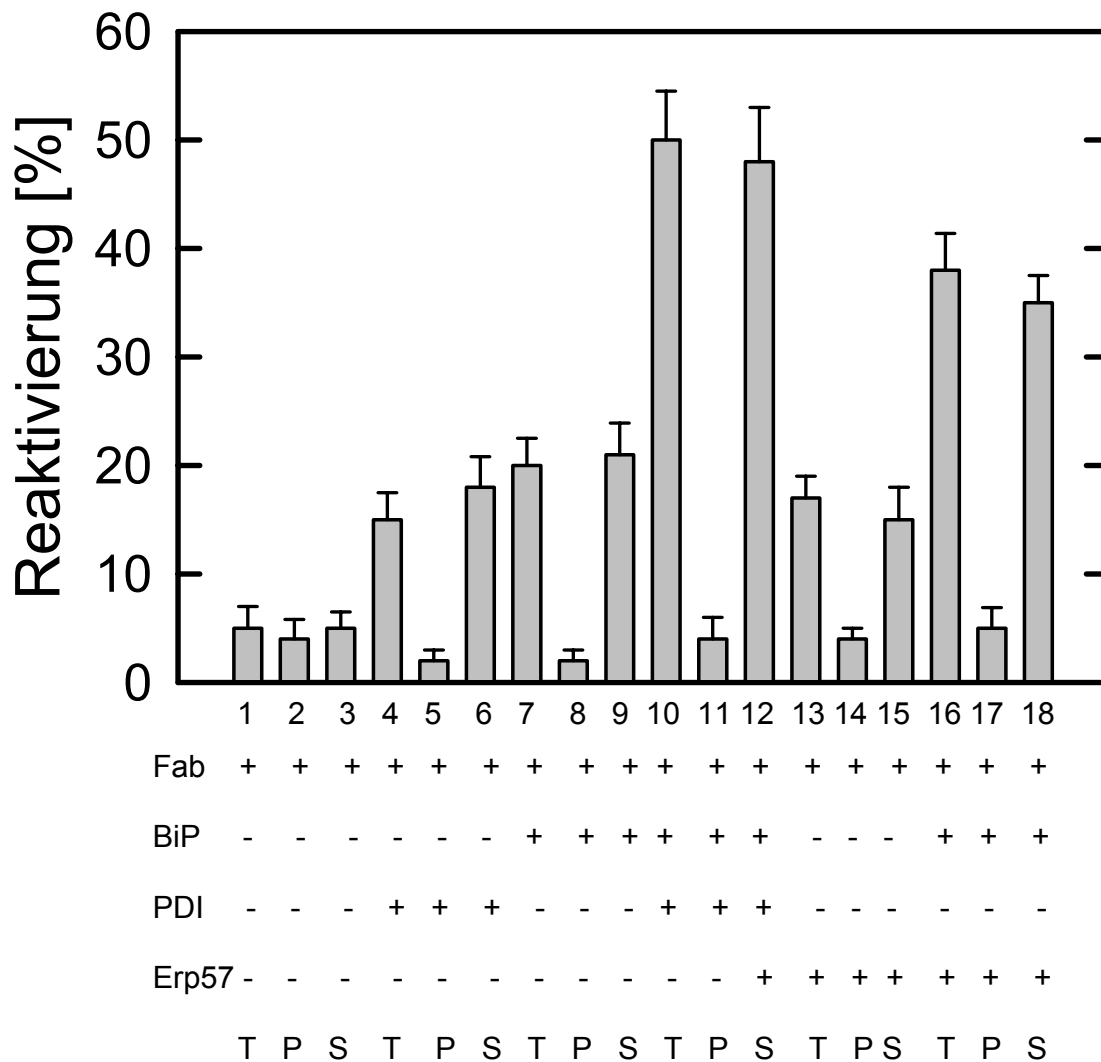
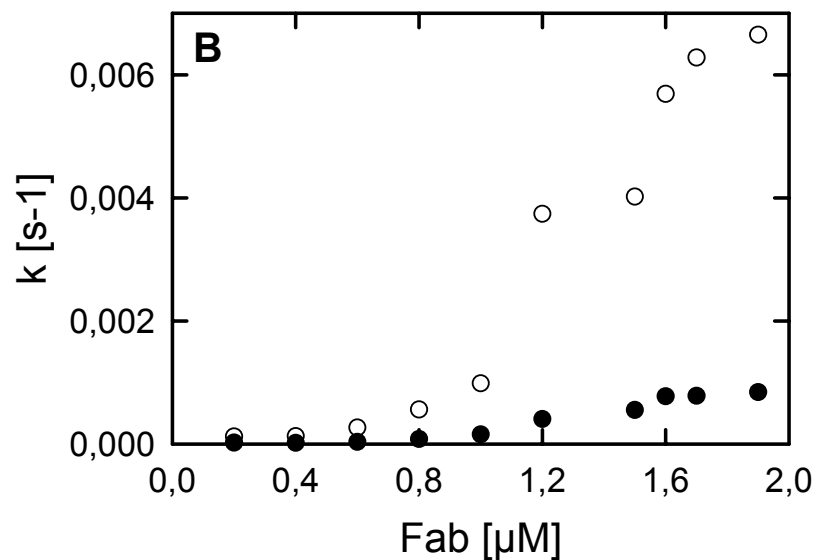
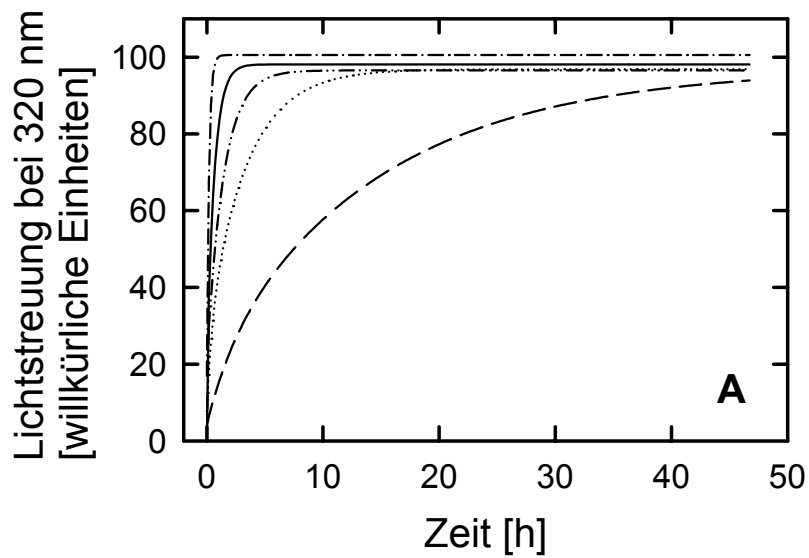


Abb. 3.3.14: Zusammenhang zwischen Aggregation und Aktivität (ELISA).

Fab (1,0 μM) wurde wie oben beschrieben zurückgefaltet. An den Endpunkten der Rückfaltungskinetiken wurden die Proben zentrifugiert und die Aktivität der gesamten Probe (**T**), des Pellets (**P**) und des Überstands (**S**) mittels ELISA bestimmt. Die Rückfaltung/Aggregation wurde durchgeführt in Rückfaltungspuffer mit 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System ohne weitere Zusätze (**1-3**), in Gegenwart von 2,5 μM PDI (**4-6**); 5,0 μM BiP (**7-9**); 2,5 μM PDI und 5,0 μM BiP (**10-12**); 2,5 μM Erp57 (**13-15**) oder 2,5 μM Erp57 und 5,0 μM BiP (**16-18**).

Zur weiteren Untersuchung des Aggregationsverhaltens von Fab während der Rückfaltung wurden Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Steigende Konzentrationen von Fab wurden wie zuvor in Rückfaltungspuffer verdünnt. Dabei wurden die mit steigender Proteinkonzentration zunehmende Menge an restlichem DTE aus dem Denaturierungsansatz durch entsprechend erhöhte Mengen an GSSG ausgeglichen, um die Redoxbedingungen

konstant zu halten (GSSG:GSH= 3:1). Die steigende Gesamtkonzentration an Dithiolen hatte dabei keinen Einfluss auf die Aggregation (ohne Abbildung). Wie in Abbildung 3.3.15 (A) zu sehen ist, ist die Geschwindigkeit der Aggregation von der Konzentration abhängig. Während die Aggregation bei einer Fab Konzentration von 1,8 μM bereits nach einer Stunde abgeschlossen ist, dauert die Aggregation bei einer Konzentration von 0,4 μM mehr als 48 h.



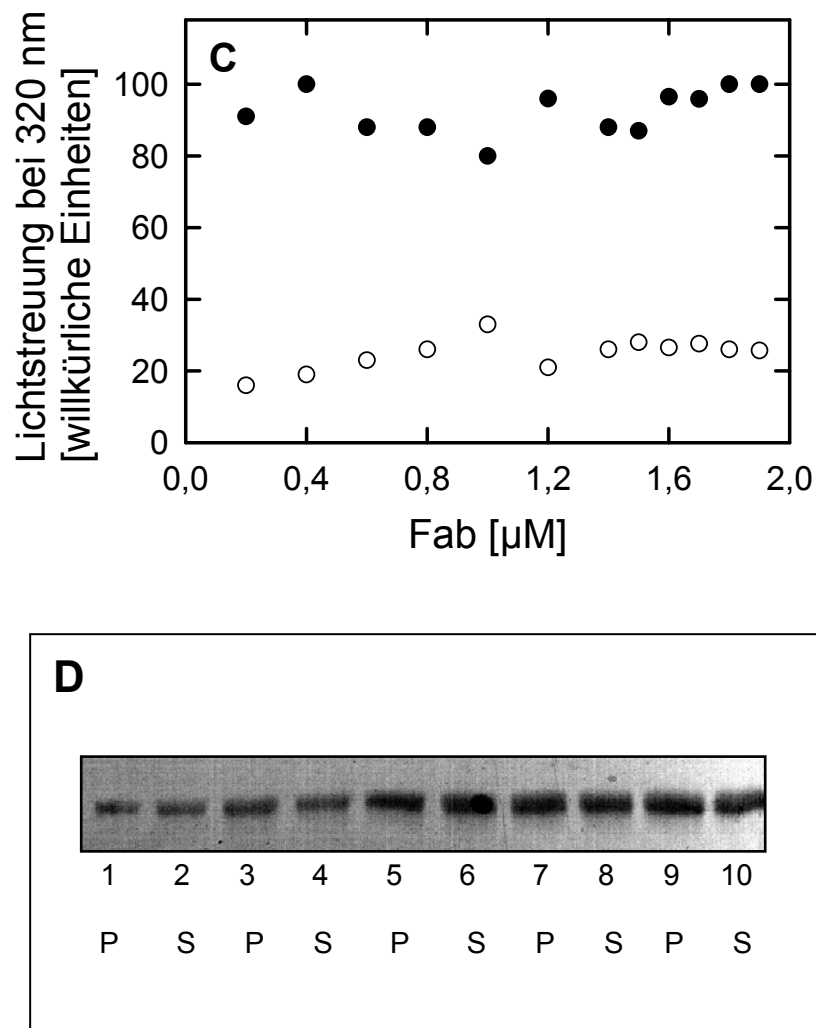


Abb. 3.3.15: Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation von Fab.

Fab wurde wie oben beschrieben in Renaturierungspuffer zurückgefaltet. **(A)** Die Lichtstreuung wurde bei 320 nm für verschiedene Fab Konzentrationen gemessen. Die Aggregationskinetiken für 0,4 µM (---), 0,8 µM (· · ·), 1,0 µM (— · —), 1,2 µM (—) und 1,8 µM (— · —) sind hier dargestellt. **(B)** Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der schnellen (○) und langsamen Phase (●) der Aggregation gegen die Fab Konzentration. **(C)** Auftragung der Amplituden der schnellen (○) und langsamen Phase (●) der Aggregation gegen die Fab Konzentration. **(D)** Am Ende der Aggregationskinetiken wurden Aliquots entnommen und abzentrifugiert. Die Pellets (**P**) und die löslichen Überstände (**S**) wurden auf ein 15%iges SDS-PAGE aufgetragen. **1/2**: 0,4 µM Fab; **3/4**: 0,8 µM; **5/6**: 1,0 µM; **7/8**: 1,4 µM; **9/10**: 1,8 µM,

Das Ausmaß der Aggregation ist im Gegensatz zur Geschwindigkeit der Aggregationsreaktion unabhängig von der Proteinkonzentration. Die Amplituden der Aggregationskinetiken waren für alle Proteinkonzentrationen gleich (Abbildung (3.3.15 A)) und auch die Analyse der löslichen Überstände sowie der Pellets am Ende der Rückfaltung mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.3.15 D) ergab, dass für alle Proteinkonzentrationen der Anteil an unlöslichen Aggregaten bei 50 % lag.

Die weitere Untersuchung der Aggregationskinetiken ergab, dass sich die Reaktion aus mindestens zwei Phasen zusammensetzt. Die Analyse des zweifach exponentiellen *fits* der Aggregationskinetiken ergab eine Geschwindigkeitskonstante für die schnelle Phase der Reaktion, die mit steigender Proteinkonzentration stark zunimmt, wohingegen die Geschwindigkeitskonstante der langsamen Phase weniger stark mit steigender Proteinkonzentration zunimmt (Abbildung 3.3.15 B). Der Anteil der schnellen Phase am gesamten Lichtstreuungssignal beträgt bei allen Fab Konzentrationen etwa 20 %, der der langsamen Phase 80 % (Abbildung 3.3.15 C). Da das Lichtstreuungssignal mit der Größe der Partikel zunimmt, könnte dies bedeuten, dass sich bei der Aggregation von Fab zunächst in einer schnellen Phase kleinere Aggregate ausbilden, die sich dann in einer langsameren Reaktion zu größeren Aggregaten zusammenlagern.

Um die Größe der entstehenden Aggregate abschätzen zu können, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurden die Aggregationskinetiken bei unterschiedlichen Wellenlängen durchgeführt. Wie sich aus der Auftragung des maximalen Lichtstreuungssignals gegen die Wellenlänge (Abbildung 3.3.16) ersehen lässt, sind die entstehenden Aggregate relativ klein.

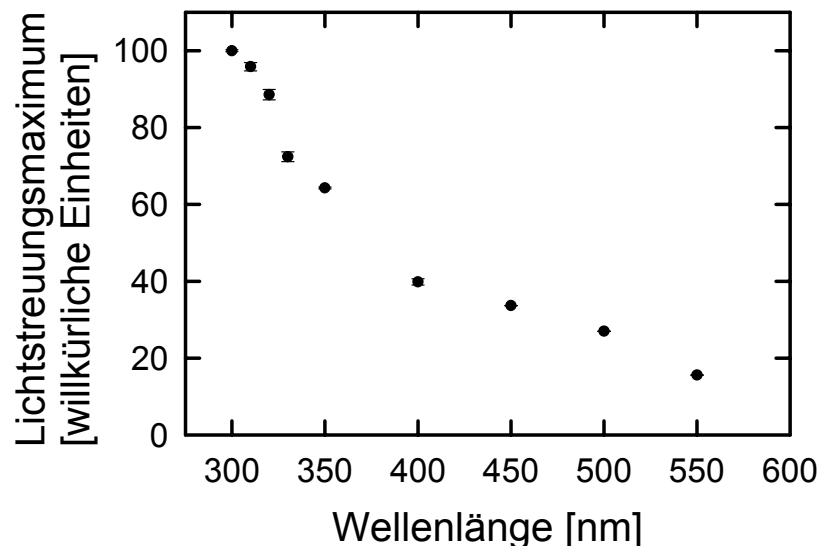


Abb. 3.3.16: Größenbestimmung der Fab Aggregate mittels Lichtstreuung.
Für eine Fab Konzentration von 1,4 μM wurde das Maximum der Lichtstreuungsintensität bei unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt.

Eine genauere Methode zur Bestimmung von Partikelgrößen bietet die dynamische Lichtstreuung. Aus der Streuungsintensität lässt sich dabei der hydrodynamische Radius der Partikel bestimmen. Fab (Endkonzentration 1,2 μM) wurde wie zuvor zurückgefaltet. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Aggregatgröße mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Abbildung 3.3.17 zeigt die Auftragung der aus den Mittelwerten der hydrodynamischen Radii bestimmten molekularen Masse gegen die Zeit. Wie zu sehen, nimmt die Partikelgröße im Laufe der Reaktion zu. Haben die Aggregate nach fünf Minuten noch eine Größe von 8 200 kDa (entspricht einem hydrodynamischen Radius R_H von 7,5 nm), so sind sie am Ende der Aggregationsreaktion nach zwei Stunden ca. 28 900 kDa groß ($R_H = 26,3$ nm). Eine Kontrollmessung mit dem entfalteten Fab-Fragment in Denaturierungspuffer ergab eine molekulare Masse von 30 kDa. Die entspricht in etwa der molekulare Masse der monomeren leichten Kette bzw. dem Fd-Fragment. Somit bestehen die Aggregate am Ende der Kinetik aus ca. 1 000 Antikörperketten.

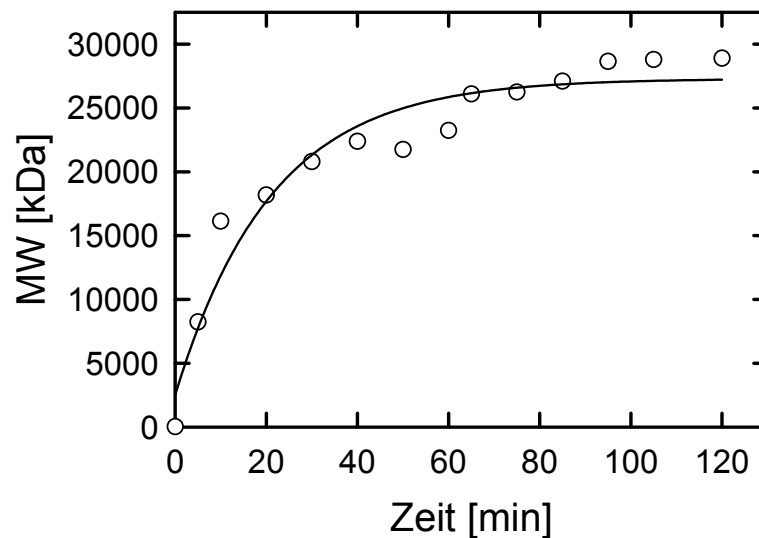


Abb. 3.3.17: Größenbestimmung der Fab Aggregate mittels dynamischer Lichtstreuung

Fab (1,2 μM) wurde in Rückfaltungspuffer bei 15 °C zurückgefaltet. Zu den angegebenen Zeiten wurde der hydrodynamische Radius der Aggregate mittels dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Es wurden jeweils fünf Einzelmessungen zur Berechnung des hydrodynamischen Radius herangezogen. Mittels einer Eichgerade (Protein Solutions Inc.) wurde aus dem hydrodynamischen Radius das Molekulargewicht bestimmt.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen wurden elektronenmikroskopischen Aufnahmen gemacht (Abbildung 3.3.18). Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben aus dem Rückfaltungsansatz entnommen und wie in Material und Methoden beschrieben (vgl. 2.6), für die Aufnahmen am

Transmissionselektronenmikroskop präpariert. Das Ergebnis zeigt, dass sich nach einer Stunde noch keine sichtbaren Aggregate ausgebildet haben, obwohl die Lichtstreuungsintensität zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich erhöht war (Abbildung 3.3.15 A). Dagegen entstehen nach fünf Stunden deutlich sichtbare Aggregate mit einem Durchmesser von etwa 3 bis 5 μm , deren Anzahl sich im weiteren Verlauf der Rückfaltung erhöht. Auch die Morphologie dieser Aggregate ändert sich mit zunehmender Dauer der Reaktion, wobei die Aggregate dichter werden.

Die deutliche Abweichung von den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung (Durchmesser der entstehenden Aggregate ca. 52 nm) lässt sich möglicherweise durch eine Zusammenlagerung der Aggregate bei der Präparation erklären.

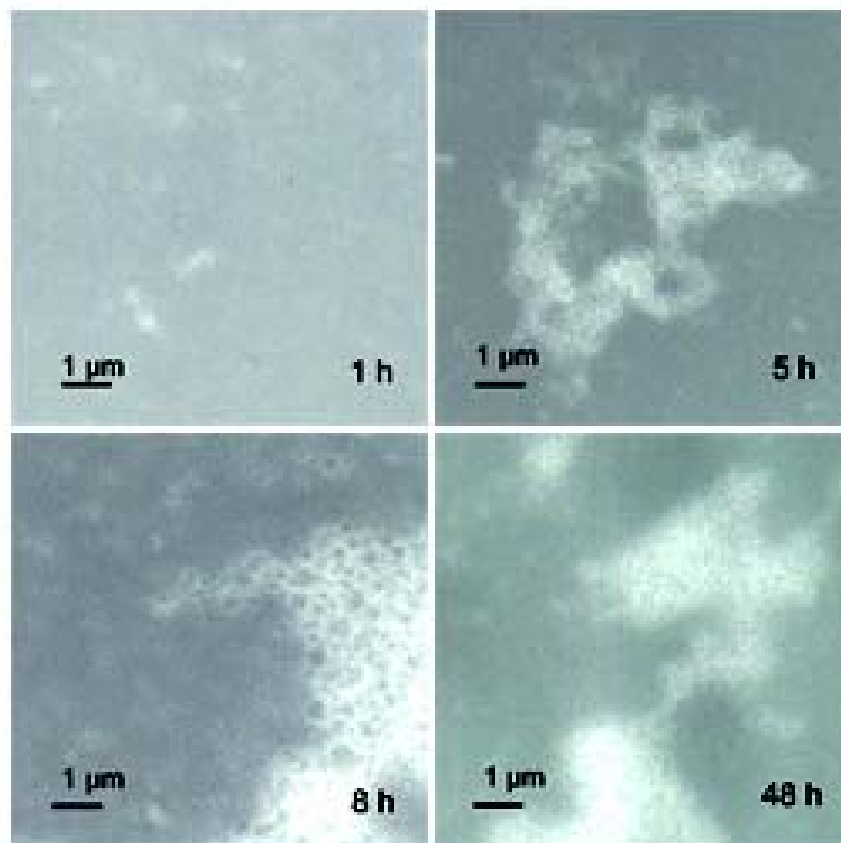


Abb. 3.3.18: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen der Fab Aggregate
Fab (Endkonzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde wie zuvor in Rückfaltungspuffer zurückgefaltet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1 ml Proben entnommen mit Vivaspin auf 100 μl eingengt und auf Kupfer-Grids aufgebracht. Schließlich wurde mit einer 1-2%igen, wässrigen Uranylacetat-Lösung (pH 3,5-4,5) eine Negativ-Kontrastierung durchgeführt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden bei einer Anodenspannung von 100 kV und einer Vergrößerung von 33000x mit einem Philips CM 120 Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen wurden auf Negativen dokumentiert.

Um den Einfluss verschiedener Faltungsfaktoren auf den Aggregationsprozess zu untersuchen, wurden die Lichtstreuungskinetiken in Gegenwart von GSSG, BiP, PDI, Erp57 und ATP durchgeführt (Abbildung 3.3.19). GSSG hat auf das Ausmaß der Aggregation nur einen geringen Einfluss. Jedoch vereinfacht sich die Kinetik der Aggregation in Abwesenheit von GSSG zu einer einfach exponentiellen Reaktion. In Gegenwart von PDI wird die Aggregation auf 65 % reduziert. Das molekulare Chaperon BiP unterdrückt die Aggregation jedoch deutlich mehr. In Gegenwart von BiP ohne ATP sinkt die Aggregation von Fab auf 40 %. Gibt man zusätzlich ATP hinzu, so sinkt die Aggregation auf unter 20 %. Der Effekt von Erp57 auf die Aggregation ist in etwa der von BiP ohne ATP. In Gegenwart von BiP, PDI und ATP ist fast keine Aggregation bzw. Lichtstreuung mehr zu detektieren.

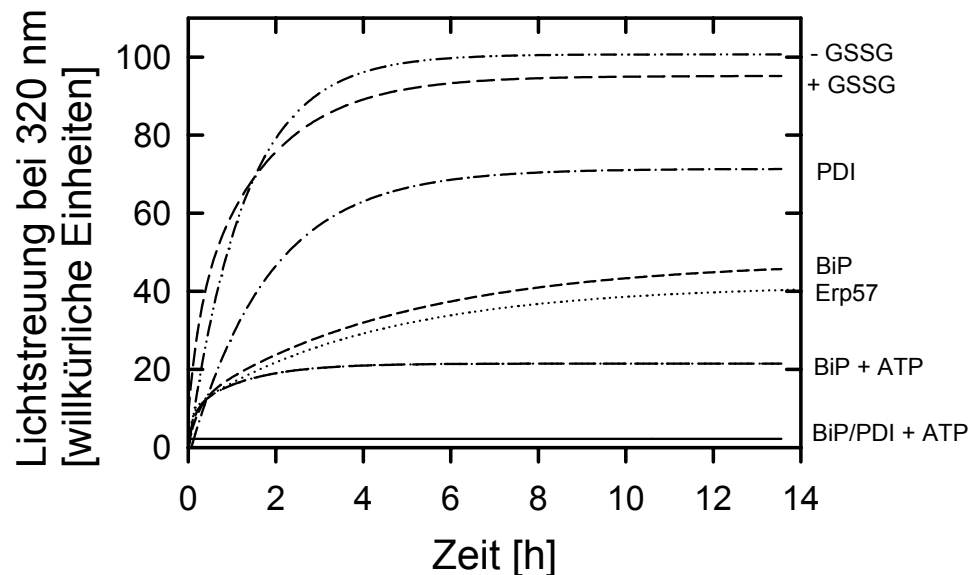


Abb. 3.3.19: Einfluss von PDI und BiP auf die Aggregation von Fab.

Fab wurde in 6 M GdmCl, 0,1 M Tris pH 8,0, 0,3 M DTE denaturiert. Die Rückfaltung wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung (Endkonzentration Fab = 1 μ M) in 0,1 M Tris pH 7,0, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl (---); in Gegenwart von 6 mM GSSG (---); 6 mM GSSG, 2,5 μ M PDI (-·-); 6 mM GSSG, 2,5 μ M Erp57 (····); 6 mM GSSG, 5 μ M BiP (---); 6 mM GSSG, 5 μ M BiP, 0,5 mM ATP und einem ATP regenerierenden System (—); 6 mM GSSG, 5 μ M BiP, 0,5 mM ATP, einem ATP regenerierenden System und 2,5 μ M PDI (—).

3.4 Diskussion der *in vitro* Faltung von Fab

In vivo beginnt die Faltung und Dimerisierung von Antikörpern bereits während der Translation am Ribosom, die vollständige Oxidation der Antikörperketten wird jedoch erst nach Vollendung der Translation beendet (Bergmann & Kuehl, 1979). Dabei interagieren die Antikörperketten mit PDI, welche die Bildung und Isomerisierung der Disulfidbrücken katalysiert (Freedman, 1991). Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt wurde, hat PDI auch bei der *in vitro* Rückfaltung eines Fab-Fragments einen positiven Effekt auf die Reaktivierung. Dieser Effekt ist auf die Isomeraseaktivität von PDI beschränkt und wird nur erzielt, wenn PDI bereits am Anfang der Rückfaltungsreaktion vorhanden ist (Lilie *et al.*, 1994). Ausgehend von dieser Arbeit wurde spekuliert, dass das ER residente Hsp70 Chaperon BiP die Aufgabe haben könnte, die ungefalteten Antikörperketten zu binden und somit die Cysteinreste länger für BiP zugänglich zu halten. In dieser Arbeit wurden deshalb Experimente durchgeführt, die die Rolle von BiP und PDI bei der Antikörperfaltung weiter aufklären. Es konnte gezeigt werden, dass BiP und PDI einen synergistischen Effekt bei der Rückfaltung des Fab-Fragments haben. Dabei konnten Reaktivierungsausbeuten von 50 % erzielt werden, was mehr ist als die einfache Addition der Einzeleffekte beider Faltungshelfer.

Eine überraschende Feststellung war, dass sich die beiden Antikörperketten schon zu Beginn des Faltungsprozesses sehen müssen. Werden die beiden Antikörperketten selbst nur für kurze Zeit getrennt voneinander vorinkubiert und erst später zur weiteren Renaturierung vereinigt, so sinkt die Reaktivierungsausbeute dramatisch ab. Dieses Phänomen kann von BiP lediglich etwas abgemildert werden. Wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, können sich auch schon bei noch reduzierten Antikörperdomänen spezifische intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden (Stevens & Argon, 1999), die wie es scheint bereits in der frühen Faltungsphase von Bedeutung sind.

Die hier erhaltenen Ergebnisse wurden in einem Modell zur Faltung von Antikörpern zusammengefasst. Abbildung 3.4.1 zeigt schematisch die Interaktion von BiP mit den entfalteten Antikörperketten und die Katalyse der Disulfidbrückenbildung und -isomerisierung durch PDI. Weitere Experimente unter Verwendung unterschiedlicher Hsp70 Chaperone und ihrer regulatorischen Hsp40 Cochaperone wie z.B. DnaJ- und GrpE-Homologe, sowie unterschiedlicher Hsp90 Chaperone wie etwa dem Hsp90 Vertreter im ER (Grp94) und unterschiedlicher PDIs und weiterer Faltungshelfer des ER sollten in Zukunft zur weiteren Aufklärung der Antikörperfaltung beitragen können.

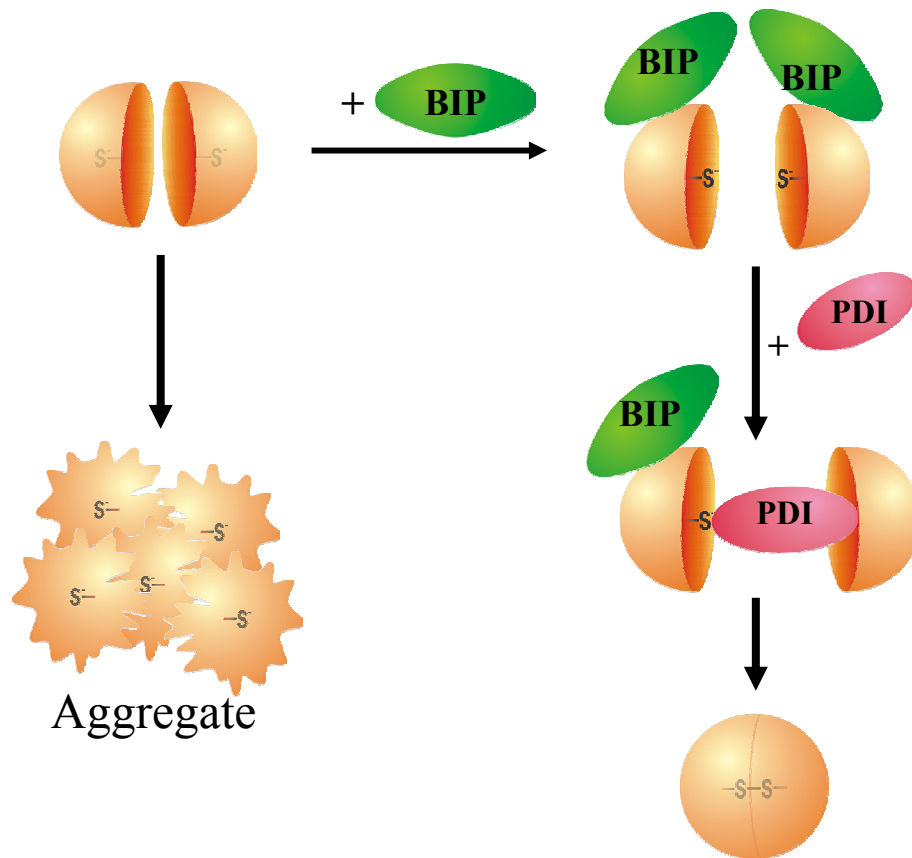


Abb. 3.4.1: BiP und PDI kooperieren bei der Faltung von Antikörpern

In Abwesenheit von Faltungshelfern aggregiert Fab und es wird keine Reaktivierung erzielt. In Gegenwart von BiP kommt es zu einer Bindung der entfalteten Antikörperketten. Diese werden in einer Konformation gehalten, die es PDI erlaubt, die Bildung der Disulfidbrücken zu katalysieren. Ergebnis sind korrekt gefaltete und aktive Antikörper.

Die Funktion von BiP ist dabei ATP abhängig. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen zur Funktionsweise von BiP (Gaut & Hendershot, 1993; Haas, 1994). Mehrere ATP abhängige Zyklen von Substratbindung und - freisetzung sind nötig, bis der Antikörper seine native Struktur erreicht.

Das weitere Interesse dieser Arbeit galt der Frage, ob nur PDI synergistisch mit BiP zusammenwirkt oder ob auch andere PDI-Homologe ähnliche Effekte erzielen. Dabei konnte festgestellt werden, dass, obwohl es starke Homologien zwischen den verschiedenen PDIs gibt, die Zusammenarbeit mit anderen Faltungshelfern und die Erkennung von Substraten sehr spezifisch zu sein scheint. Sowohl das ebenfalls im ER vorhanden PDI-Homolog Erp57 als auch die bakterielle Proteindisulfidisomerase DsbC konnte keine kooperativen Effekte mit BiP

erreichen. Wie in weiteren Messungen festgestellt wurde (vgl. 3.3.5), zeigen auch die verschiedenen Hsp70 Chaperone sehr unterschiedliche Effekte, wobei nur BiP zusammen mit PDI einen derart positiven Einfluss auf die Reaktivierung von Fab hat.

Auch die Untersuchung der Oxidation von Antikörperketten sowie der frühen Faltungsphase scheint eine Schlüsselrolle bei der Aufklärung des Faltungsprozesses zuzukommen. Wie in dieser Arbeit und bereits früher (Lilie *et al.*, 1994) gezeigt werden konnte, muss PDI bereits in der frühen Faltungsphase präsent sein, um seine volle Wirkung entfalten zu können, obwohl die Oxidation einen viel längeren Zeitraum beansprucht. Auch für BiP ist es absolut notwendig bereits zu Beginn der Faltung mit den Antikörperketten zu interagieren. Entscheidende Reaktionen für den weiteren Faltungsverlauf scheinen also in dieser Initialphase stattzufinden.

Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Aggregation der Antikörperketten während der Rückfaltung zeigen, sind die Aktivitätsverluste bei der Renaturierung des Fab-Fragments auf Aggregationsprozesse zurückzuführen. Die gesamte Aktivität befindet sich im löslichen Überstand, während das unlösliche Aggregatpellet keinerlei Aktivität aufweist. Die Aggregation ist wie die Reaktivierung ein langsamer Prozess, der abhängig von der Konzentration, mehrere Stunden in Anspruch nimmt. Die gemessenen Aggregations-kinetiken sind abhängig von der Proteinkonzentration, wobei zwar die Geschwindigkeit der Aggregation mit steigender Konzentration zunimmt, das Ausmass der Aggregation jedoch unverändert bleibt. Die erhaltenen Kinetiken weisen zwei unterschiedliche Phasen auf, wobei überwiegend die schnelle Phase durch steigende Proteinkonzentrationen beschleunigt wird. Dabei scheinen sich unterschiedliche Aggregatformen in einem Gleichgewicht auszubilden. Während zunächst kleinere Aggregate entstehen, lagern sich diese im weiteren Verlauf zu größeren Aggregatansammlungen mit unterschiedlicher Strukturierung zusammen, wobei diese Bildung größerer Aggregate der deutlich langsameren zweiten Phase der Aggregationskinetik zu entsprechen scheint.

Die Effekte, die BiP und PDI bei der Reaktivierung des Fab-Fragments haben, spiegeln sich auch bei der Aggregation wieder. Sowohl BiP als auch PDI unterdrücken die Aggregation und führen zusammen zu einer fast vollständigen Inhibierung der Aggregation während des gesamten Rückfaltungszeitraums. Die Reaktivierung des Fab-Fragments wird jedoch nicht nur durch Aggregation verhindert. Obwohl diese fast vollständig durch BiP und PDI unterdrückt werden kann, erreichen nur 50 % der Antikörperfragmente ihren aktiven Zustand. Offensichtlich entsteht während der Renaturierung auch eine nicht aggregierte, lösliche Spezies, die jedoch nicht in der nativen Form vorliegt und keine Aktivität aufweist.

3.5 Der ATPase Zyklus von BiP

Die Aktivität des molekularen Chaperons BiP wird wie auch bei den anderen Mitgliedern der Hsp70 Familie durch einen ATP abhängigen Zyklus reguliert. Zur Untersuchung des ATPase Zyklus von BiP wurden ATPase Messungen und Nukleotidbindungsstudien mit und ohne Substraten sowie regulatorischen Proteinen durchgeführt.

3.5.1 Bestimmung der ATPase Aktivität

Um die ATPase Aktivität von rekombinantem Maus-BiP zu bestimmen, wurden ATPase *assays* mit radioaktiv markiertem ^{32}P -ATP durchgeführt. Die ATPase Aktivität wurde unter *steady state* und *single turnover* Bedingungen gemessen, wie unter Material und Methoden beschrieben. Für die *steady state* Messungen wurden $2,0\ \mu\text{M}$ BiP und $500\ \mu\text{M}$ ATP verwendet. Die Auftragung der Konzentration an hydrolysiertem ATP gegen die Zeit (Abbildung 3.5.1) ergibt eine Gerade, aus deren Steigung dividiert durch die eingesetzte BiP Konzentration sich ein k_{cat} von $0,2\ \text{min}^{-1}$ berechnet.

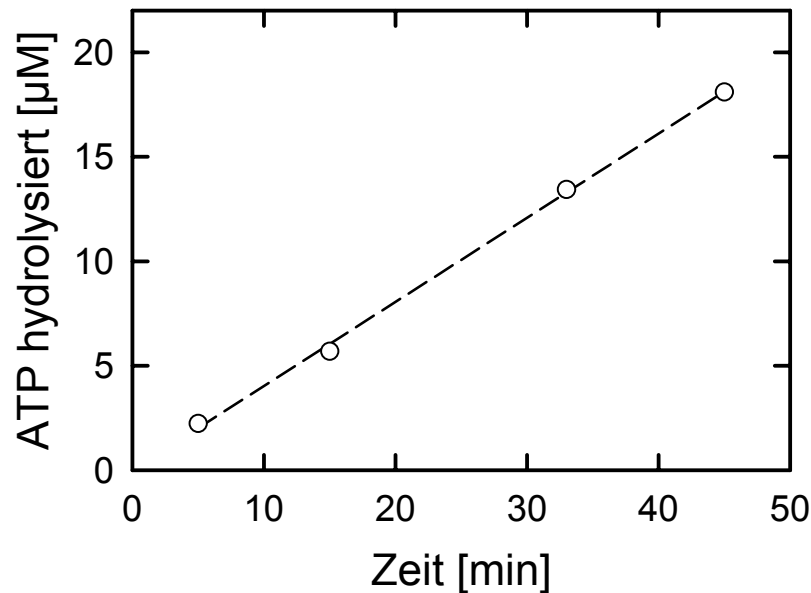


Abb. 3.5.1: ATPase Aktivität von BiP (*steady state* Messung).

Die *steady state* Messung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt mit $2,0\ \mu\text{M}$ BiP und $500\ \mu\text{M}$ ATP. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und mittels Dünnschichtchromatographie wurde das hydrolysierte ADP von nicht hydrolysiertem ATP abgetrennt. Die Auftragung der Konzentration an hydrolysiertem ATP gegen die Zeit ergibt eine Gerade. Aus deren Steigung berechnet sich ein k_{cat} von $0,2\ \text{min}^{-1}$.

Für die *single turnover* Messungen wurde sichergestellt, dass jedes Molekül BiP nur ein Molekül ATP hydrolysieren kann. Dadurch beinhaltet die gemessene Ratenkonstante nur die Geschwindigkeitskonstanten für die ATP Bindung und Hydrolyse aber nicht für die Freisetzung von ADP. In diesem Fall wurden $2,0 \mu\text{M}$ BiP und $1,6 \mu\text{M}$ ATP verwendet. Die Auftragung der Konzentration an hydrolysiertem ATP gegen die Zeit ergibt eine Sättigungskurve, die sich durch eine einfache Exponentialfunktion beschreiben lässt. Die Zeitkonstante dieser Exponentialfunktion ist gleich dem k_{cat} . Der gemessene k_{cat} -Wert beträgt $0,2 \text{ min}^{-1}$ wie unter *steady state* Bedingungen (Abb. 3.4.1). Daraus folgt, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bindung von ATP oder die Hydrolyse ist, nicht aber die Freisetzung von ADP. Die schwache ATPase Aktivität von $0,2 \text{ min}^{-1}$ ist in guter Übereinstimmung mit früheren Messungen an BiP aus Hamster (Wei & Hendershot, 1995) und Hund (Wei *et al.*, 1995).

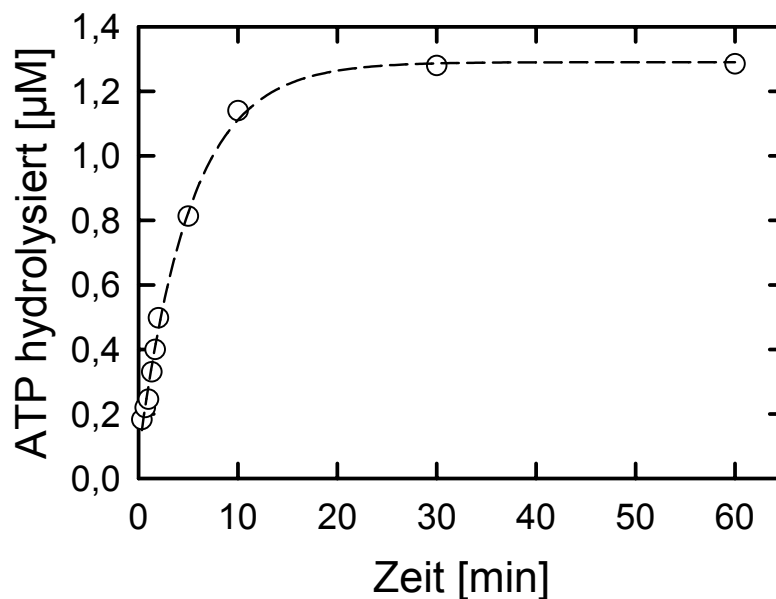


Abb. 3.5.2: ATPase Aktivität von BiP (*single turnover* Messung)

Die *single turnover* Messung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt mit $2,0 \mu\text{M}$ BiP und $1,6 \mu\text{M}$ ATP. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion gestoppt und mittels Dünnschichtchromatographie wurde das hydrolysierte ADP von nicht hydrolysiertem ATP abgetrennt. Die Auftragung der Konzentration an hydrolysiertem ATP gegen die Zeit ergibt eine Gerade. Aus deren Steigung berechnet sich ein k_{cat} von $0,2 \text{ min}^{-1}$. Dieser Wert entspricht exakt dem Wert aus der *steady state* Messung.

3.5.2 Einfluss von J-Domänen Proteinen auf die ATPase

Hsp70 Chaperone werden durch Mitglieder der Hsp40 Familie reguliert. Diese sog. J-Proteine interagieren mit ihrer J-Domäne mit BiP und stimulieren die ATPase-Aktivität (Laufen *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Erj3p einem Hsp40 Homolog aus dem Pankreas von Hund, auf Maus-BiP untersucht.

Unter *steady state* Bedingungen stimuliert Erj3p die ATPase Aktivität von BiP um den Faktor 10 (Abbildung 3.5.3). Die ATPase Aktivität von BiP (2,0 μM) wurde mit 500 μM ATP ohne und mit Erj3p (5,0 μM) gemessen. Die k_{cat} -Werte betragen 0,18 min^{-1} für das nicht stimulierte BiP und 2,0 min^{-1} für BiP stimuliert durch Erj3p. Kontrollmessungen nur mit Erj3p zeigten keine ATPase Aktivität (Daten nicht gezeigt).

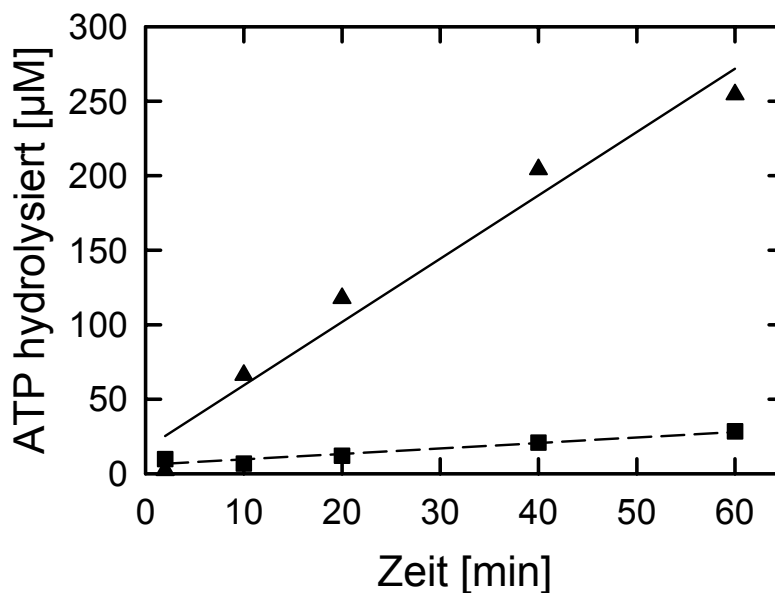


Abb. 3.5.3: Stimulierung der ATPase Aktivität von BiP durch Erj3p (*steady state* Messung). Die *steady state* Messung wurde wie oben beschrieben durchgeführt mit 2,0 μM BiP (■) und 2,0 μM BiP in Gegenwart von 5,0 μM Erj3p (▲). Die berechneten k_{cat} Werte ergaben 0,18 min^{-1} für BiP bzw. 2,0 min^{-1} für BiP un Erj3p.

Dieselben Messungen wurden unter *single turnover* Bedingungen mit 1,6 μM ATP durchgeführt (Abbildung 3.5.4). Ohne Erj3p betrug der k_{cat} -Wert 0,19 min^{-1} , in Gegenwart von Erj3p ergab sich ein k_{cat} von 0,79 min^{-1} . Das bedeutet, dass Erj3p unter *single turnover* Bedingungen die ATPase um einen Faktor 4 stimuliert, unter *steady state* Bedingungen jedoch um einen Faktor 10. Das lässt möglicherweise dadurch erklären, dass Erj3p neben der Stimulierung der ATP Hydrolyse auch die Verdrängung von ADP durch ATP katalysiert.

Zumindest unter den verwendeten Messbedingungen scheint Erj3p also auch als Nukleotid-austauschfaktor zu wirken. Ein solches Verhalten konnte bisher für Hsp40 Proteine jedoch noch nicht festgestellt werden.

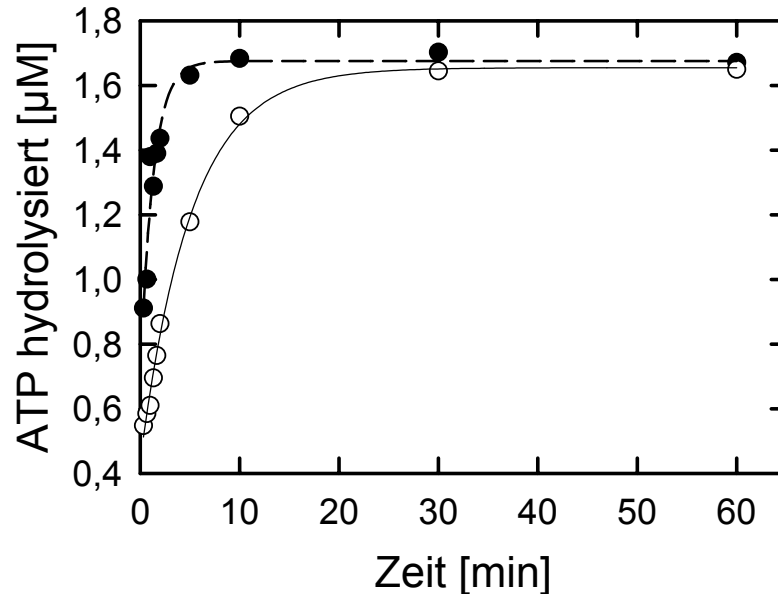


Abb. 3.4.4: Stimulierung der ATPase Aktivität von BiP durch Erj3p (*single turnover Messung*). Single turnover Bedingungen (2,0 µM BiP, 1,6 µM ATP) ergaben für BiP (○) und für BiP in Gegenwart von 5,0 µM Erj3p (●) k_{cat} Werte von 0,19 min⁻¹ bzw. 0,78 min⁻¹.

3.5.3 Nukleotidbindung ohne Substrat

Um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ATPase Reaktion zu bestimmen und den ATPase Zyklus weiter kinetisch zu charakterisieren, wurde die Bindung von ATP und ADP an BiP gemessen. Dazu wurden *stopped flow* Messungen mit den fluoreszierenden Nukleotidanaloga MABA-ATP und ADP durchgeführt. Durch anschließende Verdrängung von MABA-ADP durch das nicht-fluoreszierende Nukleotid konnte der k_{off} -Wert für MABA-ADP bestimmt werden.

Die *stopped flow* Messungen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben durchgeführt. BiP (0,2 µM Endkonzentration) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ATP gemischt. Die Zunahme im Fluoreszenzsignal nach Bindung an BiP wurde gemessen und die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die MABA-ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 3.5.5). Die Steigung der erhaltenen Geraden ergab

einen k_{on} von $0,031 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt ergab einen k_{off} von $0,032 \text{ s}^{-1}$. Daraus resultiert ein K_{D} -Wert für MABA-ATP von $1,1 \mu\text{M}$.

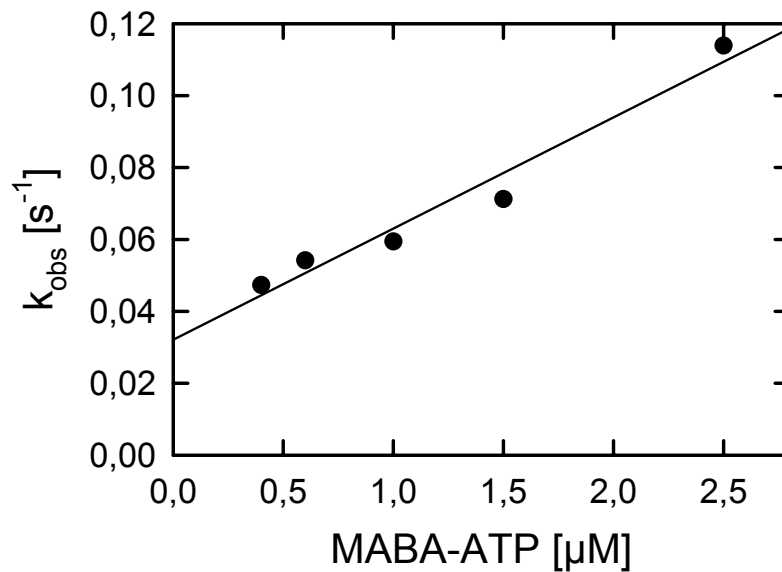


Abb. 3.5.5: Bindung von MABA-ATP an BiP (stopped flow Messung). $0,2 \mu\text{M}$ BiP (Endkonzentration) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ATP gemischt. Die durch die Bindung verursachte Fluoreszenzänderung wurde gemessen und die Geschwindigkeitskonstanten des einfach exponentiellen Fits wurden gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Die Steigung der erhaltenen Geraden ergibt einen k_{on} für die Bindung von MABA-ATP von $0,031 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt einen k_{off} von $0,032 \text{ s}^{-1}$.

Die Bindekonstanten für MABA-ADP wurden auf die selbe Art und Weise ermittelt. BiP ($0,2 \mu\text{M}$) wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ADP gemischt und die Änderung des Fluoreszenzsignals wurde gemessen (s. Abbildung 3.5.6). Der *Replot* der Ratenkonstanten gegen die entsprechenden MABA-ADP Konzentrationen ergab einen k_{on} von $0,043 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und einen k_{off} von $0,15 \text{ s}^{-1}$. Daraus konnte ein K_{D} -Wert von $3,5 \mu\text{M}$ berechnet werden.

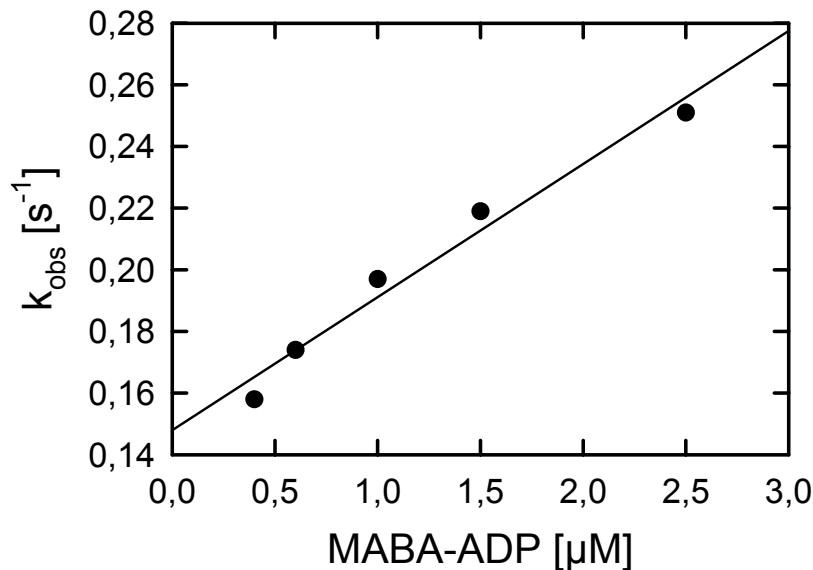


Abb. 3.5.6: Bindung von MABA-ADP an BiP (*stopped flow* Messung)

0,2 μM BiP (Endkonzentration) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ADP gemischt. Die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten wurden gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Die Steigung der erhaltenen Geraden ergibt einen k_{on} für die Bindung von MABA-ADP von $0,043 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt einen k_{off} von $0,15 \text{s}^{-1}$.

Zur direkten Bestimmung des k_{off} -Werts für ADP wurde die Verdrängung von MABA-ADP durch ADP mit *stopped flow* gemessen. BiP (0,2 μM) und MABA-ATP (0,5 μM) wurden dazu vorinkubiert und dann mit 50 μM ADP gemischt. Dabei wurde die aus der Verdrängung von MABA-ADP durch ADP resultierende Abnahme im Fluoreszenzsignal gemessen (siehe Abbildung 3.5.7). Die erhaltene Kurve wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung *gefittet*. Die erste schnelle Phase trägt dabei 90 % zur gesamten Signalamplitude bei und wurde deshalb zur Berechnung von k_{off} herangezogen. Die Ratenkonstante lieferte einen k_{off} -Wert für MABA-ADP von $0,20 \text{s}^{-1}$.

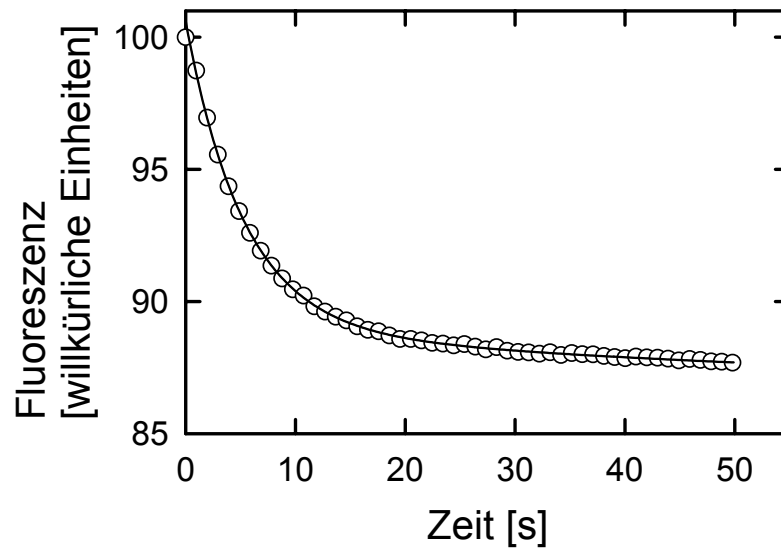


Abb. 3.5.7: Verdrängung von MABA-ADP durch ADP.
 2,0 μM BiP wurden mit 0,5 μM MABA-ADP vorinkubiert und dann mit 50 μM ADP gemischt. Die resultierende Fluoreszenzabnahme wurde über die Zeit verfolgt. Der zweifach exponentielle *fit* der erhaltenen Kurve liefert als Ratenkonstante der schnellen Phase den k_{off} -Wert von 0,20 s^{-1} .

Die gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.5.8 zusammengefasst. In Abwesenheit von Substrat bindet BiP MABA-ATP mit einem K_D von 1,1 μM . Die Hydrolyse von ATP ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Zyklusses. Der Umsetzung des ATP erfolgt mit einem für die Hsp70 Familie typischen schwachen k_{cat} von 0,2 min^{-1} . Die Freisetzung von MABA-ADP erfolgt einem k_{off} von von 0,15 s^{-1} (direkte Messung durch Verdrängung mit ADP liefert vergleichbaren Wert von 0,20 s^{-1}). Der K_D für MABA-ADP liegt bei 3,5 μM .

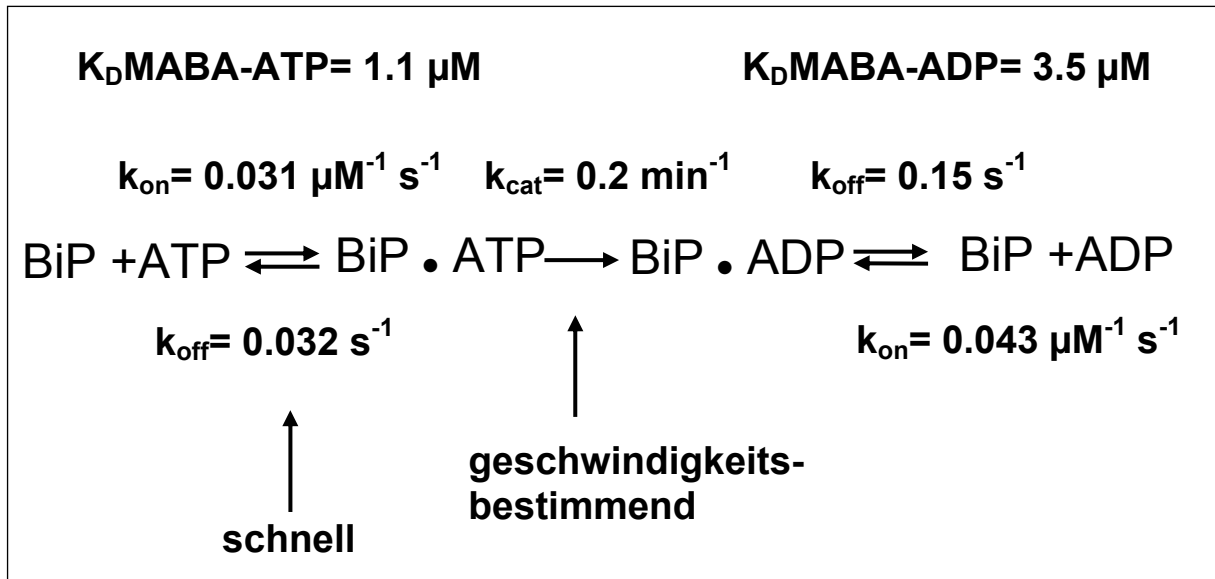


Abb. 3.5.8: ATPase Zyklus von BiP ohne Substrat

Die Bindung von ATP an BiP erfolgt deutlich schneller als alle anderen Schritte des Zyklus. BiP bindet ATP mit einem K_D von $1,1 \mu\text{M}$. Die Bindung erfolgt mit einem k_{on} von $0,031 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Im Vergleich dazu ist die Hydrolyse von ATP mit einem k_{cat} von $0,2 \text{min}^{-1}$ deutlich langsamer und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Zyklus dar. Die Freisetzung von ADP erfolgt hingegen mit einem k_{off} von $0,15 \text{s}^{-1}$ deutlich schneller.

3.5.4 Stimulierung der ATPase durch Peptide

Wie bereits früher gezeigt, stimulieren synthetisch hergestellte Peptide die ATPase Aktivität von BiP (Blond-Elguindi *et al.*, 1993b; Flynn *et al.*, 1991; Knarr *et al.*, 1995). Als Kontrolle für weitere Messungen, und um den ATPase Zyklus von BiP in Gegenwart von Peptiden zu charakterisieren, wurde das Peptid HD14 verwendet (siehe Material und Methoden).

Unter *steady state* Bedingungen wurde die ATPase von BiP (2,0 μM) ohne Peptid und mit sättigender Konzentration an Peptid HD14 gemessen (Abbildung 3.5.9). In Gegenwart von HD14 wurde die ATPase Aktivität um einen Faktor 5 stimuliert. Im unstimulierten Zustand betrug der k_{cat} 0,2 min^{-1} , in Gegenwart von HD14 0,96 min^{-1} .

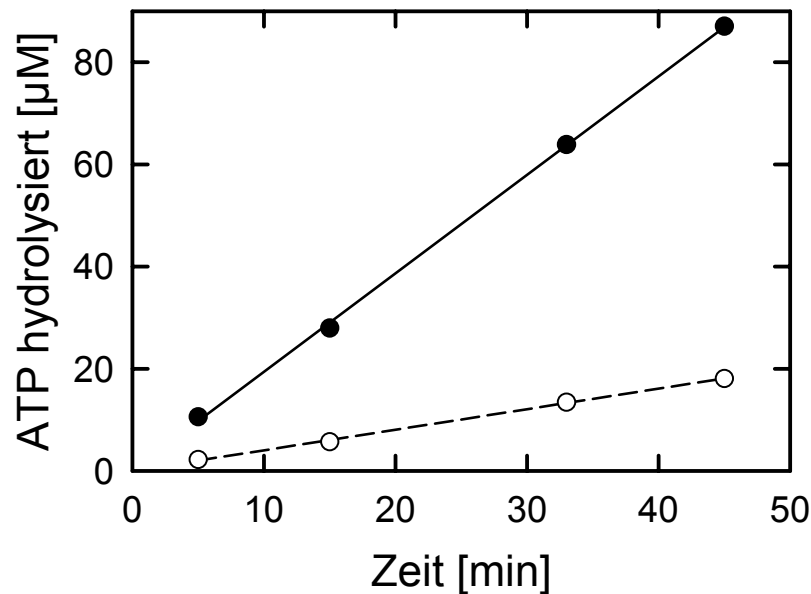


Abb. 3.5.9: Stimulierung der ATPase von BiP durch Peptid HD14 (*steady state* Messung). Die ATPase Aktivität für 2,0 μM BiP (○) und 2,0 μM BiP mit gesättigter Konzentration an Peptid HD14 (●) wurde wie beschrieben unter *steady state* Bedingungen bestimmt. Die berechneten k_{cat} Werte ergaben 0,2 min^{-1} für BiP und 0,96 min^{-1} für BiP und HD14.

Die Messungen unter *single turnover* Bedingungen erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Während der k_{cat} im unstimulierten Zustand bei 0,2 min^{-1} lag, wurde in Gegenwart von HD14 für die ATPase ein k_{cat} von 1,0 min^{-1} erzielt.

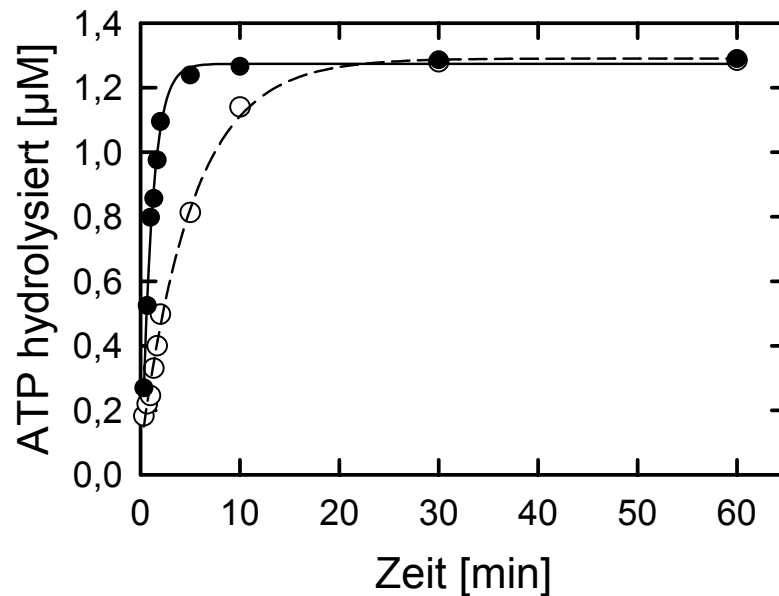


Abb. 3.4.10: Stimulierung der ATPase von BiP durch Peptid HD14 (*single turnover* Messung). Die ATPase Aktivität für 2,0 μM BiP (\circ) und 2,0 μM BiP mit gesättigter Konzentration an Peptid HD14 (\bullet) wurde wie beschrieben unter *single turnover* Bedingungen bestimmt. Die berechneten k_{cat} Werte ergaben 0,2 min^{-1} für BiP und 1,0 min^{-1} für BiP und HD14.

3.5.5 Komplexbildung zwischen BiP und $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM

Wie bereits früher gezeigt, bildet BiP einen Komplex mit einer modifizierten $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domäne des Antikörpers MAK33 (Knarr *et al.*, 1999). Da BiP nur an ungefaltete Substrate bindet, ist es notwendig das Antikörperfragment zu denaturieren und zu reduzieren. Danach wurden die Cysteinreste mit Iodacetamid alkyliert. Die so modifizierte $\text{C}_{\text{H}3}$ -Domäne ist ein löslich entfaltetes Substrat für BiP (Knarr *et al.*, 2002).

Zum Nachweis der Komplexbildung wurde 1 μM BiP mit 10 μM $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe auf einer analytischen Gelfiltrationssäule analysiert. Abbildung 3.5.11 zeigt den Monomer- und Dimer-*peak* von BiP sowie den Komplex-*peak* des BiP- $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM Komplexes.

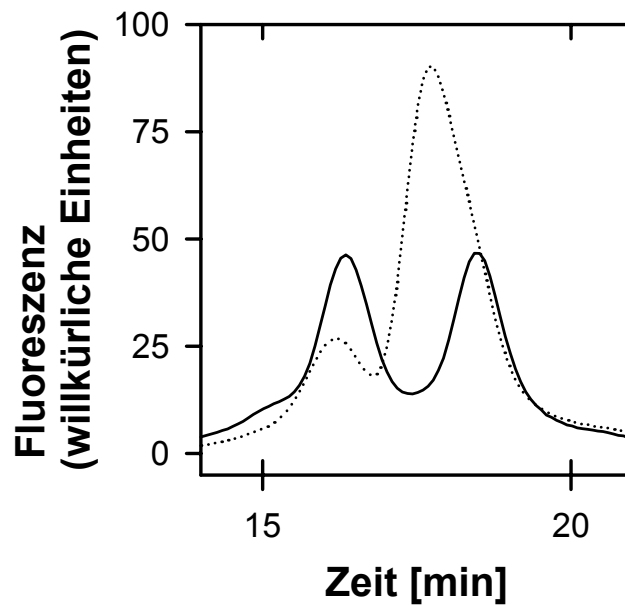


Abb. 3.5.11: Komplexbildung zwischen BiP und C_{H3} -CAM (Analytische Gelfiltration an Superdex 200 HR). Die Analyse der Komplexbildung mittels HPLC erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Auf eine Superdex 200 HR Säule wurden 1 μ M BiP (—) sowie 1 μ M BiP bei 37 °C für 2 h inkubiert mit 10 μ M C_{H3} -CAM (···). (Knarr *et al.*, 2002)

Die Analyse des Komplex-*peaks* mittels SDS-PAGE ergab, dass tatsächlich BiP und C_{H3} -CAM im Komplex vorhanden waren.

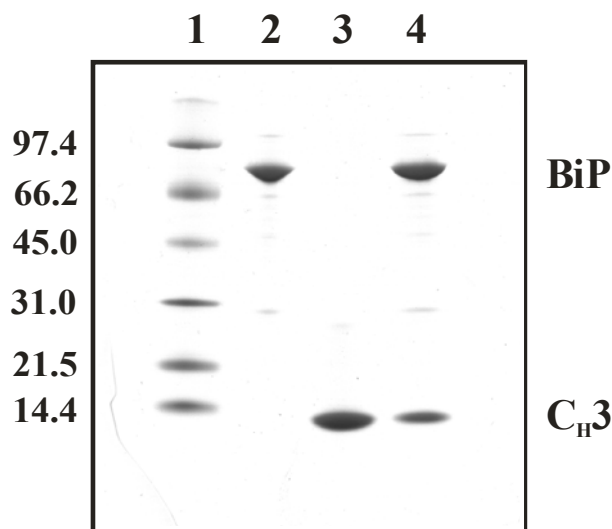


Abb. 3.5.12: Komplexbildung zwischen BiP und C_{H3} -CAM (SDS-PAGE).

Der durch analytische Gelfiltration erhaltene Komplexpeak wurde mittels 15 % SDS-PAGE analysiert und enthielt sowohl BiP als auch C_{H3} -CAM. 1: Molekulargewichtsstandard; 2: BiP; 3: CH3; 4: Komplexpeak. (Knarr *et al.*, 2002)

3.5.6 Inhibierung der ATPase durch C_H3-CAM

In dieser Arbeit wurde nun der Einfluss dieses natürlichen Substrats auf die ATPase Aktivität von BiP untersucht. Dazu wurde der BiP- C_H3-CAM Komplex wie oben beschrieben hergestellt und die ATPase Aktivität unter *steady state* Bedingungen gemessen (Abbildung 3.5.13). Erstaunlicherweise zeigte sich, dass sich das natürliche Substrat C_H3-CAM völlig anders verhält als das zuvor getestete synthetische Peptid. Während Peptide wie zum Beispiel HD14, die ATPase von BiP stimulieren, wurde die ATPase von BiP im Komplex mit C_H3-CAM inhibiert. Ohne C_H3-CAM betrug der k_{cat} für die Hydrolyse von ATP durch BiP $0,21 \text{ min}^{-1}$. In Gegenwart von C_H3-CAM sank der k_{cat} auf $0,11 \text{ min}^{-1}$.

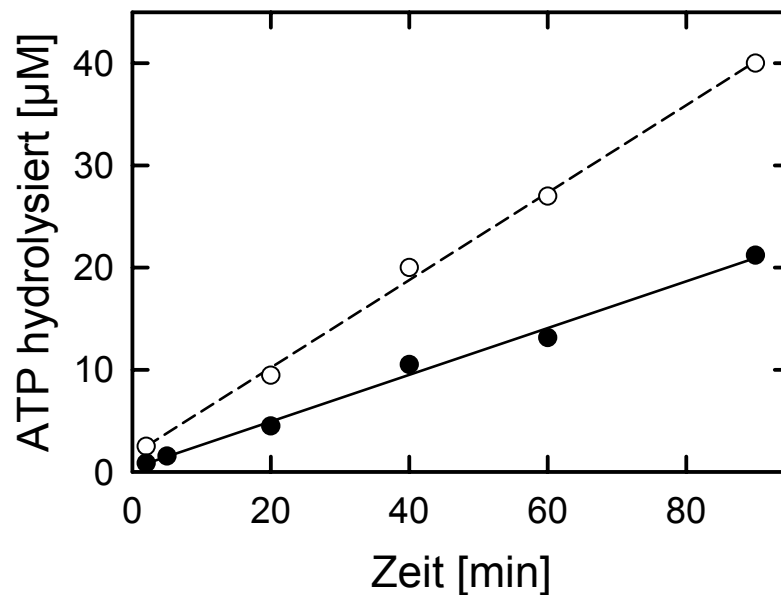


Abb. 3.5.13: Inhibierung der ATPase von BiP durch C_H3-CAM (*steady state* Messung).

Nach Bildung des BiP-CH₃-CAM Komplexes wurden *steady state* ATPase Messungen durchgeführt. In Gegenwart von C_H3-CAM (○) wurde die ATPase Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (●) um den Faktor 2 reduziert. Kontrollen mit nativem C_H3, nativem Fab, nativem C_L und BSA führten zum gleichen Ergebnis wie die Kontrolle mit BiP alleine. Die berechneten k_{cat} Werte ergaben $0,21 \text{ min}^{-1}$ für BiP und $0,11 \text{ min}^{-1}$ für BiP im Komplex mit C_H3-CAM.

Auch unter *single turnover* Bedingungen wurden die gleichen Messwerte erzielt. Der k_{cat} für BiP alleine lag bei $0,2 \text{ min}^{-1}$. Im Komplex mit C_H3-CAM reduzierte sich der k_{cat} um den Faktor 2 auf $0,098 \text{ min}^{-1}$.

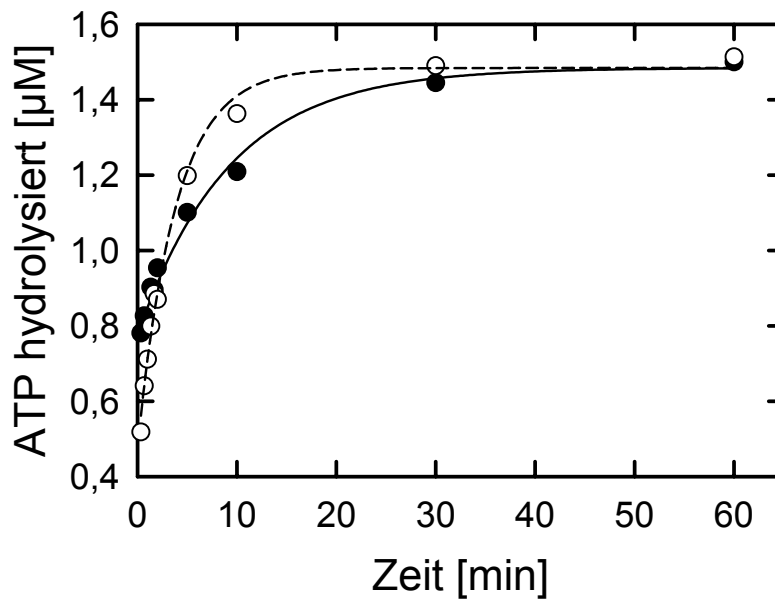


Abb. 3.5.14: Inhibierung der ATPase von BiP durch $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM (*single turnover* Messung). *Single turnover* Messungen ergaben das gleiche Ergebnis. In Gegenwart von $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM (\bullet) wird die ATPase Aktivität verglichen mit der Kontrolle (\circ) um den Faktor 2 erniedrigt mit k_{cat} Werten von $0,2 \text{ min}^{-1}$ für BiP alleine und $0,098 \text{ min}^{-1}$ für BiP im Komplex mit $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden parallel *steady state* Messungen mit BiP alleine sowie in Gegenwart von HD14 bzw. $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM und in Gegenwart von $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM und HD14 durchgeführt (Abbildung 3.5.15). Während die ATPase Aktivität von BiP in Gegenwart von $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM inhibiert wird, wird dieser Effekt bei gleichzeitigem Überschuss an HD14 vollständig wieder aufgehoben und die ATPase Aktivität stimuliert. In Gegenwart von $\text{C}_{\text{H}3}$ -CAM sinkt der k_{cat} Wert wie bereits zuvor gezeigt von $0,2$ auf $0,1 \text{ min}^{-1}$. Ist jedoch gleichzeitig HD14 im Überschuss vorhanden, wird diese Inhibierung aufgehoben und die ATPase wird sogar aktiviert mit einem k_{cat} Wert von $0,8 \text{ min}^{-1}$, erreicht jedoch nicht den Wert der Stimulierung wie wenn nur HD14 zugegen ist ($1,0 \text{ min}^{-1}$).

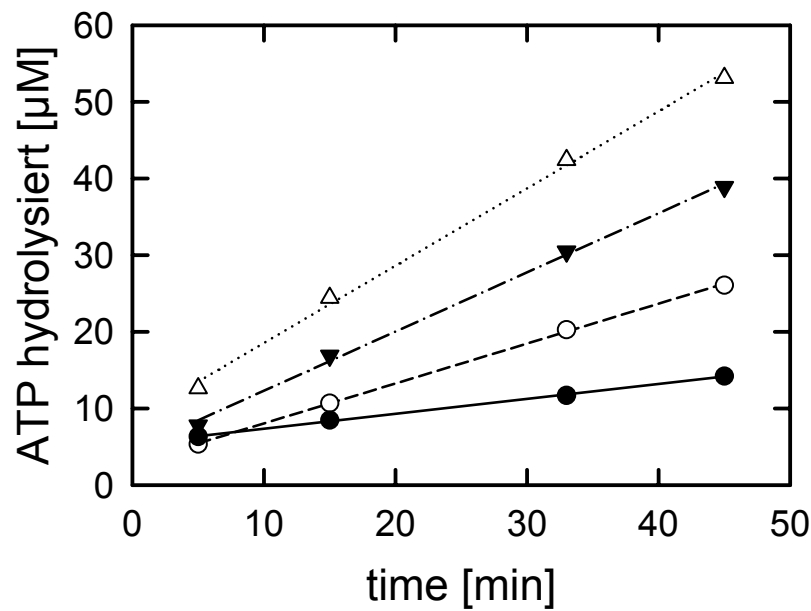


Abb. 3.5.15: Konkurrenz von C_{H3}-CAM mit HD14 (steady state Messung).

ATPase Messungen wurden unter steady state Bedingungen durchgeführt für BiP alleine (○), in Gegenwart von C_{H3}-CAM (●), HD14 (△) sowie C_{H3}-CAM und HD14 (▼). Die Berechnung der k_{cat} Werte ergab $0,2 \text{ min}^{-1}$ für BiP allein, $0,1 \text{ min}^{-1}$ in Gegenwart von C_{H3}-CAM, $1,0 \text{ min}^{-1}$ in Gegenwart von HD14 und $0,8 \text{ min}^{-1}$ in Gegenwart von C_{H3}-CAM und HD14.

Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass HD14 den Komplex zwischen BiP und C_{H3}-CAM auflöst, indem es an dieselbe Bindestelle bindet und C_{H3}-CAM verdrängt. Um diese Hypothese zu beweisen, wurden analytische Gelfiltrationsläufe gemacht (Abbildung 3.5.16). Sowohl BiP allein, als auch BiP im Komplex mit C_{H3}-CAM und BiP inkubiert mit C_{H3}-CAM und HD14 wurden auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Wie deutlich zu sehen ist, bildet sich mit C_{H3}-CAM ein Komplex-*peak* (Abb. 3.5.16 gepunktete Linie), während in Gegenwart von HD14 die Ausbildung des BiP- C_{H3}-CAM-Komplexes verhindert wird (Abb. 3.5.16 gestrichelte Linie).

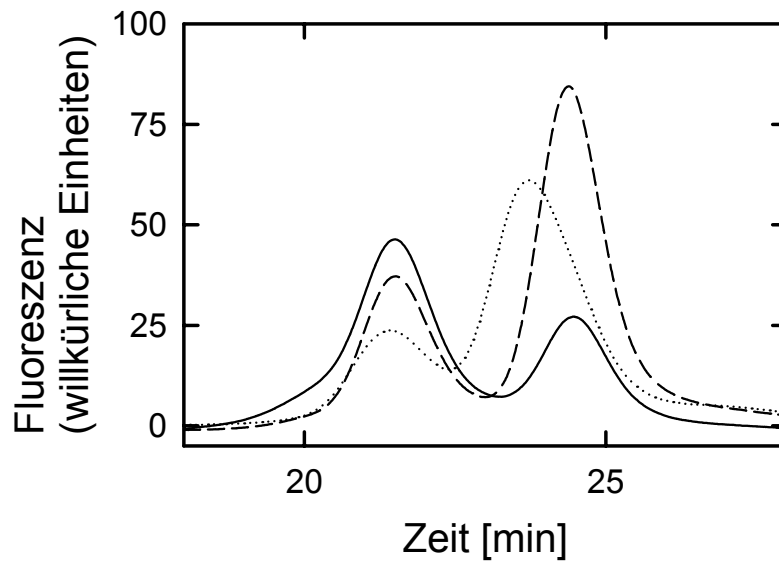


Abb. 3.5.16: Konkurrenz von C_H3-CAM mit HD14 (Analytische Gelfiltration an Superdex 200 HR). HPLC Läufe wurden durchgeführt für BiP alleine (—), BiP im Komplex mit C_H3-CAM (···) und BiP mit C_H3-CAM und HD14 (---). Die Komplexe wurden vor Auftragung auf die Säule für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die HPLC Analyse erfolgte wie bereits früher beschrieben (Knarr *et al.*, 2002).

3.5.7 Nukleotidbindung in Gegenwart von Substraten

Um zu untersuchen inwieweit die Bindung von Peptiden an BiP die Nukleotidbindung beeinflusst, wurden stopped flow Messungen mit MABA-ATP durchgeführt. 0,2 μM BiP wurden mit sättigendem Überschuß an Peptid HD14 vorinkubiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ATP gemischt. Die resultierende Zunahme der Fluoreszenz wurde gemessen. Die erhaltenen Kurven wurden mit einer einfach exponentiellen Gleichung *gefittet*. Der *replot* der erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten gegen die MABA-ATP Konzentration (Abb. 3.5.17) ergibt eine Gerade. Die Steigung ergibt einen k_{on} -Wert von $0,035 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Der y-Achsenabschnitt liefert einen k_{off} von $0,015 \text{s}^{-1}$. Daraus berechnet sich ein K_{D} -Wert für MABA-ATP von $0,43 \mu\text{M}$.

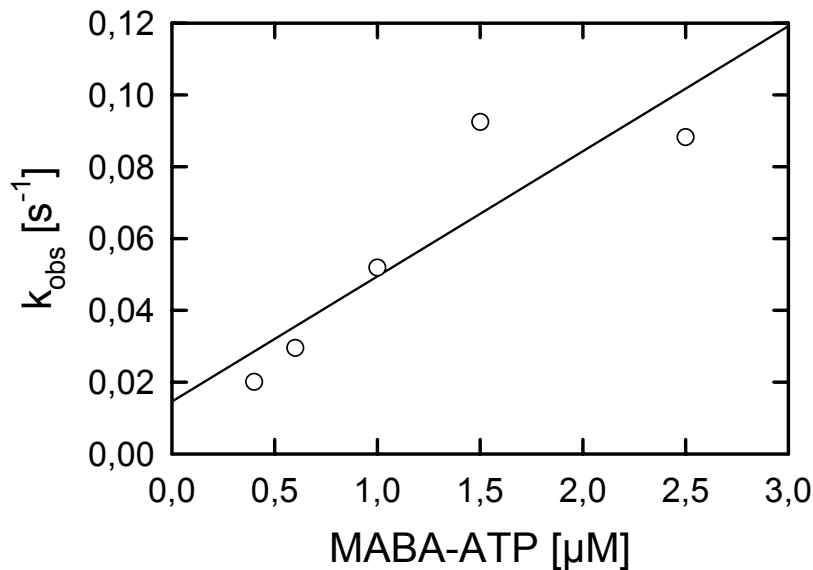


Abb. 3.5.17: Bindung von MABA-ATP an BiP in Gegenwart von HD14

0,2 μM BiP wurde mit sättigender Konzentration an HD14 vorinkubiert und dann mit unterschiedlichen Konzentrationen an MABA-ADP gemischt. Die durch die Bindung verursachte Fluoreszenzänderung wurde gemessen und die Geschwindigkeitskonstanten des einfach exponentiellen Fits wurden gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen. Die Steigung der erhaltenen Geraden ergibt einen k_{on} für die Bindung von MABA-ATP von $0,035 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt einen k_{off} von $0,015 \text{s}^{-1}$.

Die Bindung von MABA-ATP an den BiP-C_{H3}-CAM-Komplex lieferte nur sehr unbefriedigende Messergebnisse (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise bindet C_{H3}-CAM unter bestimmten Bedingungen unspezifisch an die fluoreszierende Gruppe des MABA-ATP, was dann zu einer Verfälschung der Messwerte, vorallem bei steigenden Konzentrationen an MABA-ATP führt.

Wie jedoch die Messungen an BiP alleine gezeigt haben, ist die Hydrolyse von ATP deutlich langsamer als die Bindung des Nukleotids. Damit ist die Hydrolyse der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

Im folgenden wurden die *off-rates* für MABA-ADP durch Verdrängung mit ADP bestimmt.

BiP (0,2 μM) wurde mit sättigender Konzentration an Peptid HD14 und MABA-ATP (0,5 μM) vorinkubiert und dann mit 50 μM ADP gemischt. Die aus der Verdrängung von MABA-ADP durch ADP resultierende Abnahme im Fluoreszenzsignal wurde gemessen (siehe Abbildung 3.5.18 A). Die erhaltene Kurve wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung *gefittet*. Die Ratenkonstante der schnellen Phase lieferte einen k_{off} -Wert für MABA-ADP von $0,20 \text{s}^{-1}$.

Zur Bestimmung von k_{off} für MABA-ADP beim BiP-C_{H3}-CAM-Komplex wurde BiP (0,2 μM) wurde mit 2,0 μM C_{H3}-CAM 2 h bei 37 °C vorinkubiert und dann mit MABA-ATP (0,5

μM)versetzt. Nach Mischung mit $50 \mu\text{M}$ ADP wurde die aus der Verdrängung von MABA-ADP durch ADP resultierende Abnahme im Fluoreszenzsignal gemessen (siehe Abbildung 3.5.18 B). Die erhaltene Kurve wurde mit einer zweifach exponentiellen Gleichung *gefittet*. Die Ratenkonstante der schnellen Phase lieferte einen k_{off} -Wert für MABA-ADP von $0,20 \text{ s}^{-1}$.

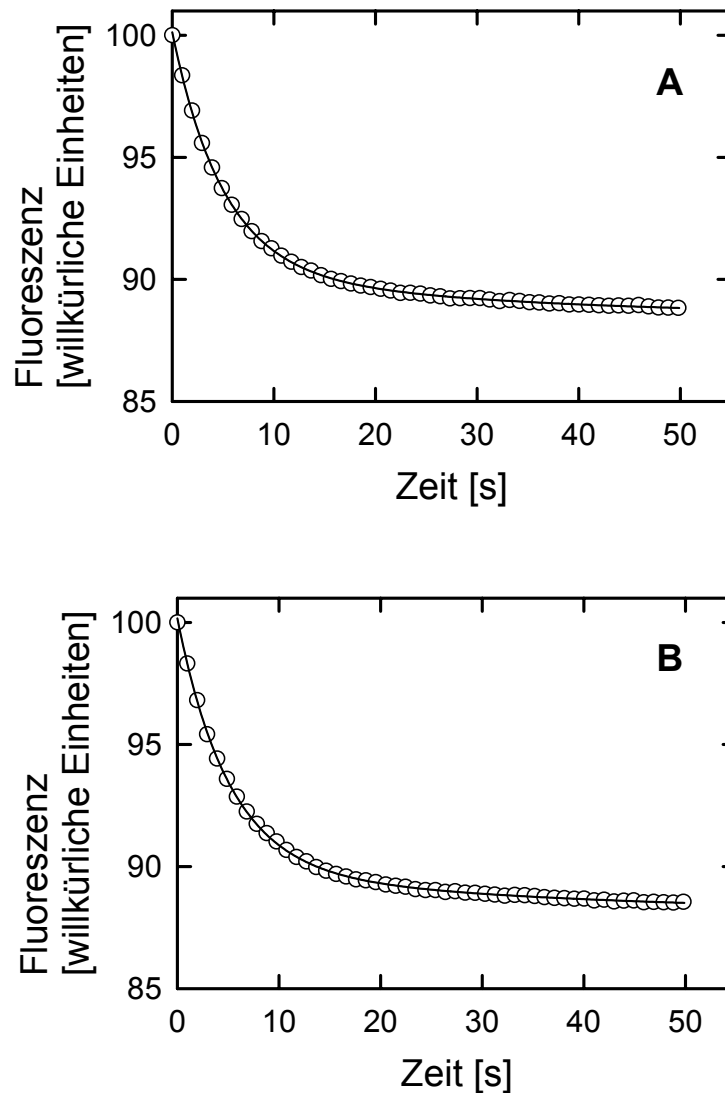


Abb. 3.5.18: Verdrängung von MABA-ADP durch ADP in Gegenwart von HD14 bzw. $\text{C}_{\text{H}}3\text{-CAM}$. (A) $0,2 \mu\text{M}$ BiP wurden mit sättigender Konzentration an Peptid HD14 und $0,5 \mu\text{M}$ MABA-ADP vorinkubiert und dann mit $50 \mu\text{M}$ ADP gemischt. Die resultierende Fluoreszenzabnahme wurde über die Zeit verfolgt. Der zweifach exponentielle *fit* der erhaltenen Kurve liefert als Ratenkonstante der schnellen Phase den k_{off} -Wert von $0,20 \text{ s}^{-1}$. (B) $0,2 \mu\text{M}$ BiP wurden mit $2,0 \mu\text{M}$ $\text{C}_{\text{H}}3\text{-CAM}$ 2 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert und dann mit MABA-ATP ($0,5 \mu\text{M}$) versetzt. Nach Mischung mit $50 \mu\text{M}$ ADP wurde die resultierende Fluoreszenzabnahme über die Zeit verfolgt. Die Auswertung ergab ebenfalls einen k_{off} -Wert von $0,20 \text{ s}^{-1}$.

3.6 **Diskussion des ATPase Zyklus von BiP**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der komplette ATPase Zyklus des Hsp70 Chaperons BiP kinetisch charakterisiert.

BiP bindet ATP mit einem K_D von 1.1 μM . The geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase Zyklus ist die Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat. Die Hydrolyserate ist, typisch für Hsp70 Proteine, sehr niedrig. Der k_{cat} beträgt 0.2 min^{-1} . Nach der Hydrolyse wird ADP mit einem k_{off} von 0.15 s^{-1} freigesetzt. Mit diesen Daten lässt sich die ATP Hydrolyse von BiP mit den besser charakterisierten Homologen DnaK (*E.coli*) und dem cytosolischen Säuger-Hsc70 vergleichen (siehe Tabelle 3.6.1).

Wie bei DnaK (McCarty *et al.*, 1995) und Hsc70 (Gao *et al.*, 1993) ist auch bei BiP die Hydrolyse des Triphosphats der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Zwar sind die Hydrolyseraten bei Hsp70 Proteine sehr klein, sie werden jedoch deutlich stimuliert, sobald Peptide gebunden werden. Dies ist sowohl bei BiP (Flynn *et al.*, 1989; Flynn *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1995) als auch bei DnaK (McCarty *et al.*, 1995; Theyssen *et al.*, 1996) und Hsc70 (Takeda & McKay, 1996) der Fall.

In vivo werden die Hsp70 Chaperone durch Co-Chaperone der Hsp40 Familie reguliert. Diese interagieren mit der sog. J-Domäne mit dem Hsp70 Protein und stimulieren dabei die ATPase Aktivität. Ausserdem sind sie wahrscheinlich an der Erkennung und Bindung von Substraten beteiligt. Das am besten charakterisierte Hsp40 Protein ist DnaJ das Co-Chaperon von DnaK (Laufen *et al.*, 1999; Pierpaoli *et al.*, 1997; Schröder *et al.*, 1993). Aber auch für BiP (Chevalier *et al.*, 2000; Corsi & Schekman, 1997) und Hsc70 (Höhfeld *et al.*, 1995) wurden DnaJ homologe Proteine gefunden.

	BiP (MAUS)	DnaK (<i>E. COLI</i>)	Hsc70 (RATTE,R/RIND,RI)
k_{on} MABA-ATP [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	0.031	k.A.	k.A.
k_{off} MABA-ATP [s^{-1}]	0.032 (B)	0,0013 ¹ (V)	k.A.
K_D MABA-ATP [μM]	1.1	k.A.	k.A.
k_{on} MABA-ADP [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	0.043	k.A.	k.A.
k_{off} MABA-ADP [s^{-1}]	0.15(B) 0.20(V)	0,022 ¹ (V)	k.A.
K_D MABA-ADP [μM]	3.5	k.A.	k.A.
k_{cat} [min^{-1}]	0.2	0.035 ² 0.045 ³ 0.018 ⁴ 0.15 ⁵	0.2-0.4 ⁶ (R) 0.05 ⁷ (RA) 0.07 ⁸ (R)

Tab. 3.6.1: Vergleich der Nukleotidbindung und der ATP-Hydrolyse bei BiP, DnaK und Hsc70. The Daten für DnaK und Hsc70 wurden der Literatur entnommen ¹(Theysen *et al.*, 1996), ²(Buchberger *et al.*, 1994), ³(McCarty *et al.*, 1995), ⁴(Pierpaoli *et al.*, 1997), ⁵(McCarty & Walker, 1991), ⁶(Huang *et al.*, 1993), ⁷(Gao *et al.*, 1992), ⁸(Höfeld & Jentsch, 1997), ⁹(Packschies *et al.*, 1997). k.A. (für diese Werte konnten keine Angaben in der Literatur gefunden werden). k_{off} -Werte für MABA-ADP/ATP wurden entweder durch Bindungsstudien (B) oder durch Verdrängung mit ADP/ATP bestimmt.

Die Freisetzung des ADP nach dem Hydrolyseschritt wird im Fall von DnaK von einem Nukleotidaustauschfaktor (GrpE) stimuliert (Liberek *et al.*, 1991). Vor kurzem wurde auch für BiP ein Protein isoliert, welches womöglich als Nukleotidaustauschfaktor fungiert. BAP interagiert dabei ähnlich wie GrpE mit BiP und stimuliert die Freisetzung von ADP (Chung *et al.*, 2002). All diese Daten zeigen, dass das Hsp70 System in allen Organismen sehr konserviert zu sein scheint.

Während Peptide die ATP Hydrolyse durch BiP stimulieren, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich ein natürliches Substrat, nämlich die modifizierte Antikörperdomäne C_{H3}, anders verhält. Im Komplex mit CH₃ wird die ATP Hydrolyse durch BiP deutlich verlangsamt. Dieser Effekt beruht auf der Inhibierung des Hydrolyseschrittes und nicht auf eine Modifikation der Nukleotidbindung. Tabelle 3.6.2 fasst diese Daten zusammen.

	BIP	BIP·HD14	BIP·CH ₃ -CAM
k _{off} MABA-ADP [s ⁻¹]	0.20	0.20	0.20
k _{cat} [min ⁻¹]	0.2	1.0	0.1

Tab. 3.6.2: Vergleich der off-rates für MABA-ADP und der k_{cat}-Werte der ATP-Hydrolyse bei BiP und Komplexen von BiP mit HD14 bzw. C_{H3}-CAM.

Viele Chaperone nutzen die Energie durch ATP Hydrolyse für Konformationsänderungen, die ihre Affinität zu Substraten beeinflussen (McCarty *et al.*, 1995; McKay, 1993; Schmid *et al.*, 1994).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Peptiden an BiP die ATPase stimuliert und es wurde zunächst angenommen, dass die Hydrolyse die Freisetzung des gebundenen Peptids bewirkt (Flynn *et al.*, 1989). Aber spätere Experimente zeigten dass nicht die Hydrolyse sondern die ATP Bindung für die Freisetzung verantwortlich ist (Vidal *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte im Fall von DnaK und Hsc70 gezeigt werden, dass die Geschwindigkeit der Peptidfreisetzung größer ist als die der ATP Hydrolyse (Palleros *et al.*, 1993). Hsp70 Proteinen haben im allgemeinen eine sehr langsame ATP Hydrolyserate. Dies erscheint sinnvoll, wenn man bedenkt dass viele zelluläre Prozesse an denen Hsp70 Chaperone beteiligt sind sehr langsam ablaufen. So benötigt eine Säugerzelle zum Beispiel etwa eine Minute, um ein Protein zu translatieren oder es cotranslational ins ER zu transportieren (Flynn *et al.*, 1989). Um effizient arbeiten zu können, erscheint es für das Chaperon von Vorteil die ATP Hydrolyse zu verlangsamen, wenn Substrat gebunden ist.

Die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse unterstützen ein Modell, nach dem eine Verlangsamung der ATP Hydrolyse zu einer Verlängerung der Zeitspanne führt, in der das Chaperon produktiv Arbeit verrichten kann während es mit dem Substrat interagiert. Dieses Modell stützt sich auf Überlegungen, wonach Hsp70 Proteine ihre Substrate nicht nur binden, sondern aktiv an der Faltung beteiligt sind (Slepenkov & Witt, 2002).

Aber auch die konventionelle Ansicht, dass Hsp70 Proteine lediglich Substrate binden und festhalten lässt sich damit in Einklang bringen. So zeigt zum Beispiel BiPs Rolle bei der *unfolded protein response* (UPR), dass eine stabile und langfristige Bindung durch Verlangsamung der ATP Hydrolyse durchaus von Nutzen ist. Bei der UPR (vgl. 1.2.2) bindet BiP unter physiologischen Bedingungen das Protein Ire1p und hält es damit in einem inaktiven Zustand. Unter Stressbedingungen häufen sich entfaltete Proteine an, welche an BiP binden und dieses damit von Ire1p ablösen. Daraufhin erfolgt die Aktivierung von Ire1p und die ausgelöste Signalkaskade führt zu einer Hitzeschockantwort der Zelle (Okamura *et al.*, 2000). Durch Verlangsamung der ATPase wird die Bindung von Ire1p durch BiP unter normalen Bedingungen sichergestellt und gleichzeitig spart die Zelle dabei Energie durch eine verminderte ATP Hydrolyse.

Möglicherweise können die früher mit kurzen Peptiden gemachten Studien nicht vollständig auf Substratinteraktion von BiP übertragen werden. Die Bindung von natürlichen Substraten stellt größere Anforderungen an das Chaperon BiP und ist weitaus komplexer, als bisher angenommen.

4. Zusammenfassung

Neben ihrer physiologischen Bedeutung für die Immunabwehr, sind Antikörper als multimere, sekretorische Proteine ein ideales Faltungsmodell. Deswegen sind Antikörper nicht nur aus industrieller Sicht ein lohnendes Forschungsobjekt sondern sind auch für die Grundlagenforschung von besonderem Interesse. Trotz zahlreicher Studien auf dem Gebiet der Antikörperfaltung, ist die Strukturbildung dieser komplizierten Moleküle bis heute noch nicht völlig verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, aktive Fab Fragmente des monoklonalen Antikörpers MAK 33 im Cytoplasma von *E. coli* zu exprimieren. Eine lösliche cytoplasmatische Expression in *E. coli* würde zahlreiche Vorteile bieten, ist aber auf Grund des reduzierenden Milieus und der damit erschwerten Bildung der strukturell essentiellen Disulfidbrücken mit Hindernissen verbunden.

Deshalb wurden in dieser Arbeit spezielle Knockout-Stämme verwendet, denen unterschiedliche Komponenten des Thioredoxin- und/oder Glutaredoxinsystems fehlen und somit deutlich oxidierendere Bedingungen im Cytoplasma aufweisen. Der Vergleich dieser Stämme zeigte, dass Fab in allen in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert wird, jedoch in zweien auch ein löslicher Anteil (ca. 20-30 %) detektiert werden konnte. Obwohl ein Anteil des löslichen Proteins auch als disulfidverbrücktes Dimer vorlag, konnte in keinem Fall eine Aktivität festgestellt werden. Mehrere Versuche zur Aufreinigung dieser Antikörperspezies scheiterten. Möglicherweise liegt das exprimierte Fab Fragment in einer nicht aktiven Konformation vor, die auch die Bindungseigenschaften des Proteins nachhaltig verändert. Auch der Versuch durch Koexpression des ER Chaperons BiP, einem Mitglied der Hsp70 Familie, das an der Faltung von Antikörpern *in vivo* beteiligt ist, aktive Antikörperfragmente zu erhalten war nicht erfolgreich. Sehr wahrscheinlich sind weitere Faltungshelfer notwendig, damit die exprimierten Fab Fragmente ihre native Struktur erreichen können. Dies ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass *in vivo* ein ganzes Netzwerk von Chaperonen und anderen Faltungshelfern im ER aktiv ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die *in vitro* Rückfaltung dieses Fab Fragments unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Das denaturierte und reduzierte Fab Fragment zeigt kaum eine spontane Reaktivierung, wohingegen in Gegenwart der Proteindisulfid-isomerase PDI 20 % der Antikörperfragmente ihren aktiven Zustand erreichen. Das molekulare Chaperon BiP führt zu einer Reaktivierung von knapp 20 % der Antikörperfragmente, wobei dieser Effekt ATP abhängig ist. In Gegenwart von beiden Faltungshelfern beträgt die Reaktivierung hingegen 50 %, was mehr ist als die Summe der Einzeleffekte. Dieser kooperative Effekt

scheint auf BiP und PDI begrenzt zu sein, wie Messungen mit PDI- und Hsp70- Homologen aus anderen Systemen zeigen. So zeigen zum Beispiel andere Proteindisulfidisomerasen wie etwa Erp57 oder DsbC einen geringeren Effekt auf die Reaktivierung von Fab als PDI. Auch eine Kooperation mit dem Chaperon BiP konnte nur bei PDI festgestellt werden. Auch BiP läßt sich nicht durch andere Hsp70 Chaperone wie DnaK, Ssa1 oder das humane Hsp70 ersetzen. Genauso zeigen Rückfaltungsexperimente mit den bakteriellen Komponenten DnaK, DnaJ und DsbC einen größeren Effekt als wenn die bakterielle Disulfidisomerase DsbC durch humane PDI ersetzt wird. Diese Faltungshelfer scheinen also eine hohe Art- und Substratspezifität zu besitzen. BiP bindet die entfaltenen Antikörperketten in der frühen Phase der Rückfaltung und hält sie in einer Konformation, die es PDI erlaubt die Bildung der Disulfidbrücken zu katalysieren. In Abwesenheit von BiP ist der Effekt von PDI auf die ersten 5 Minuten der Rückfaltungsreaktion beschränkt. Danach falten die Antikörperketten in eine Konformation, die die Cysteine im Molekülinneren verbirgt und für PDI unerreichbar macht. Durch BiP kann die Phase in der PDI aktiv ist deutlich auf etwa 20 Minuten erhöht werden.

In Abwesenheit von Faltungshelfern kommt es zur Aggregation. Wie Lichtstreuungsmessungen zeigen, aggregiert Fab konzentrationsabhängig, wobei nur die Geschwindigkeit nicht aber das Ausmaß der Aggregation beeinflusst wird. In einer zweiphasigen Aggregationsreaktion entstehen zunächst kleinere Aggregate, die sich im weiteren Verlauf zu größeren Aggregaten zusammenlagern. Sowohl BiP als auch PDI inhibieren die Aggregation zu einem bestimmten Ausmaß, wobei auch hier ein synergistischer Effekt von BiP und PDI festgestellt werden kann, der die Aggregation fast vollständig unterdrückt.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der ATPase Zyklus von BiP eingehend untersucht. Sowohl die Nucleotidbindung als auch die ATP Hydrolyse wurden analysiert. Die Bestimmung des kompletten ATPase Zyklus erlaubt einen Vergleich mit dem besser charakterisierten DnaK System. In beiden Fällen ist die Hydrolyse der geschwindigkeits-bestimmende Schritt. Die Umsetzung von ATP durch BiP erfolgt mit einem für die Hsp70 Familie typischen, langsamen k_{cat} von $0,2 \text{ min}^{-1}$. Die Bindung von ATP ist bei beiden Systemen in etwa vergleichbar, jedoch setzt BiP das hydrolysierte ADP 10 mal schneller frei als DnaK. Dies kann erklären warum dieser Schritt im bakteriellen System durch einen Nucleotidaustauschfaktor beschleunigt werden muß. Die mögliche Existenz eines solchen Faktors auch für BiP muß noch eingehender untersucht werden.

Überraschende Ergebnisse lieferte die Bestimmung der ATPase Aktivität von BiP in Gegenwart von Peptiden bzw. einer modifizierter Antikörperdomäne, die als natürliches Substrat diente. Während die ATPase durch Peptide stimuliert wird, inhibiert die C_{H3} Domäne

die ATP Hydrolyse. Dabei wird nicht die Bindung oder Freisetzung der Nukleotide beeinflusst, sondern der Hydrolyseschritt. Dies erscheint durchaus sinnvoll, wenn man bedenkt das BiP für seine physiologischen Funktionen wie etwa die Antikörperfaltung oder die *unfolded protein response* langlebige stabile Komplexe bilden muß. Durch eine Verlangsamung der ATPase wird dies sichergestellt. Die zahlreichen Ergebnisse aus Experimenten mit kurzen, synthetischen Peptiden sind wahrscheinlich nicht einfach auf natürliche Proteinsubstrate zu übertragen. Möglicherweise interagiert BiP nicht nur über die von Peptiden bekannten Bindestellen sondern noch über weitere Kontaktflächen mit dem weitaus größeren Substrat. Diese neuen Bindestellen könnten z.B. in der lid-Region von BiP liegen. Die Funktion dieser Region ist bisher noch nicht eindeutig erforscht. Vermutungen über eine Rolle bei der Substratbindung und -freisetzung geben aber einen Hinweis auf eine derartige Funktion. Offensichtlich ist die Interaktion von BiP mit natürlichen Substraten weitaus komplexer und beinhaltet sicherlich auch Interaktionen mit Partnerproteinen wie etwa Hsp40.

5. Literatur

- Alzari, P. M., Lascombe, M. B. & Poljak, R. J. (1988) Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 555-80
- Amzel, L. M. & Poljak, R. J. (1979) Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.* **48**: 961-97
- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-30
- Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. & White, F. H. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **47**: 1309-14
- Argon, Y. & Simen, B. B. (1999) *Cell Dev. Biol.* **10**: 495-505
- Aslund, F. & Beckwith, J. (1999) *Cell* **96**: 751-3
- Aslund, F., Nordstrand, K., Berndt, K. D., Nikkola, M., Bergman, T., Ponstingl, H., Jörnvall, H., Otting, G. & Holmgren, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 6736-45
- Augustine, J. G., de La, C. A., Knarr, G., Buchner, J. & Frederick, C. A. (2001) The crystal structure of the fab fragment of the monoclonal antibody MAK33. Implications for folding and interaction with the chaperone bip. *J. Biol. Chem.* **276**: 3287-94
- Baldwin, R. L. (1995) The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J. Biomol. NMR* **5**: 103-9
- Baneyx, F. & Georgiou, G. (1991) *J. Bacteriol.* **173**: 2696-703
- Barclay, W. S., Callow, K. A., Sergeant, M. & al Nakib, W. (1988) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay that measures rhinovirus-specific antibodies in human sera and nasal secretions. *J. Med. Virol.* **25**: 475-82
- Bardwell, J. C. & Beckwith, J. (1993) The bonds that tie: catalyzed disulfide bond formation. *Cell* **74**: 769-71
- Bardwell, J. C. A. (1994) *Mol. Microbiol.* **14**: 199-205
- Bardwell, J. C. A. & Craig, E. A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**: 848-52
- Bardwell, J. C. A., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991) *Cell* **67**: 581-9
- Bell, S. (1997) Expression und Charakterisierung rekombinant erzeugter Antikörperdomänen (Diplomarbeit). Dissertation, Universität Regensburg
- Bergmann, L. W. & Kuehl, M. W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 5690-4
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993a) Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell* **75**: 717-28

- Blond-Elguindi, S., Fourie, A. M., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993b) Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J. Biol. Chem.* **268**: 12730-5
- Bole, D. G., Hendershot, L. & Kearney, J. F. (1986) *J. Cell Biol.* **102**: 1558-66
- Bork, P., Holm, L. & Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* **242**: 309-20
- Bowden, G. A. & Georgiou, G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 16760-6
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**: 248-54
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975) *Biochemistry (Mosc.)* **14**: 4953-63
- Bremer, A., Henn, C., Engel, A., Baumeister, W. & Aepli, U. (1992) Has negative staining still a place in biomacromolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy* **46**: 85-111
- Buchberger, A., Theyssen, H., Schroder, H., McCarty, J. S., Virgallita, G., Milkereit, P., Reinstein, J. & Bukau, B. (1995) Nucleotide-induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* **270**: 16903-10
- Buchberger, A., Valencia, A., McMacken, R., Sander, C. & Bukau, B. (1994) The chaperone function of DnaK requires the coupling of ATPase activity with substrate binding through residue E171. *EMBO* **13**: 1687-95
- Bücheler, U. (1989) Expression vom Fd-Fragment des monoklonalen Antikörpers MAK33 in E.coli (Diplomarbeit). Dissertation, Universität Stuttgart
- Buchner, J. (1987) Renaturierung eines monoklonalen Antikörpers (K-IgG1), Diplomarbeit. Dissertation, Universität Regensburg
- Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* **10**: 10-9
- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H. J., Jaenicke, R., Kiefhabel, T. & Rudolph, R. (1991) Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* **30**: 6922-9
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991) Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in Escherichia coli. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 157-62
- Buckel, P., Hubner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H. & Beaucamp, K. (1987) Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light-chain cDNAs from a creatine-kinase-specific monoclonal antibody. *Gene* **51**: 13-9
- Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* **92**: 351-66
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J., al. & e. & Venter, J. C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-73

- Cai, H., Wang, C. C. & Tsou, C. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 7764-71
- Camacho, C. J. & Thirumalai, D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 6369-72
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry 2. W.H. Freeman & Co, San Francisco*
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossmann, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. & Rothman, J. E. (1986) Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* **45**: 3-13
- Chaudhuri, M. M., Tonin, P. M., Lewis, W. H. & Srinivasan, P. R. (1992) *Biochem. J.* **281**: 645-50
- Cheng, Y. S., Kwoh, D. Y., Kwoh, T. J., Soltvedt, B. C. & Zipser, D. (1981) Stabilization of a degradable protein by its overexpression in Escherichia coli. *Gene* **14**: 121-30
- Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C. & Blond, S. Y. (2000) Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* **275**: 19620-7
- Chevet, E., Jakob, C. A., Thomas, D. Y. & Bergeron, J. J. M. (1999) The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Cell Dev. Biol.* **10**: 473-80
- Chillaron, J. & Haas, I. G. (2000) Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. *Mol. Biol. Cell* **11**: 217-26
- Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. & Karplus (1985) *J. Mol. Bio.* **186**: 651-63
- Chung, K. T., Shen, Y. & Hendershot, L. (2002) BAP, a Mammalian BiP-associated Protein, Is a Nucleotide Exchange Factor That Regulates the ATPase Activity of BiP. *J. Biol. Chem.* **277**: 47557-63
- Cooper, T. G. (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden. de Gruyter, Berlin*
- Corsi, A. K. & Schekman, R. (1997) The luminal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **137**: 1483-93
- Craig, E. A., Gambill, B. D. & Nelson, R. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein synthesis. *Microbiol. Rev.* **57**: 402-14
- Creighton, T. E. (1986) *Methods Enzymol.* **131**: 83-106
- Cremer, A., Knittler, M. R. & Haas, I. G. (1993) *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **374**: 224-8
- Darby, N. J. & Creighton, T. E. (1995) *Biochemistry* **34**: 11725-35
- Darby, N. J., Kemmink, J. & Creighton, T. E. (1996) *Biochemistry* **35**: 10517-28
- Darby, N. J., Penka, E. & Vincentelli, R. (1998) *J. Mol. Bio.* **276**: 239-47

- Davies, D. R. & Metzger, H. (1983) Structural basis of antibody function. *Annu. Rev. Immunol.* **1**: 87-117
- De Neve, M., De Loose, M., Jacobs, A., Van Houdt, H., Kaluzza, B., Weidle, U., Van Montagu, M. & Depicker, A. (1993) Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Research* **2**: 227-37
- de Vos, A. M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. (1992) *Science* **255**: 306-12
- Deisenhofer, J. (1981) Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**: 2361-70
- Derman, A. I. & Beckwith, J. (1991) *J. Bacteriol.* **173**: 7719-23
- Dill, K. A. & Chan, H. S. (1997) *Nat. Struct. Biol.* **4**: 10-9
- Donch, J. & Greenberg, J. (1968) Ultraviolet sensitivity gene of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* **95**: 1555-9
- Edman, J. C., Ellis, J., Blacher, R. W., Roth, R. A. & Rutter, W. J. (1985) Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* **317**: 267-70
- Ellis, J. (1987) *Nature* **328**: 378-9
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-17
- Fischer, G. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**: 1415-36
- Fischer, G. & Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry (Mosc.)* **29**: 2205-12
- Flaherty, K. M., De Luca-Flaherty, C. & McKay, D. B. (1990) *Nature* **346**: 623-8
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-8
- Flynn, G. C., Chappell, T. G. & Rothman, J. E. (1989) Peptide Binding and Release by Proteins Implicated as Catalysts of Protein Assembly. *Science* **245**: 385-90
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. & Rothman, J. E. (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* **353**: 726-30
- Freedman, R. (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**: 438-41
- Freedman, R. (1991) Conformations and Forces in Protein Folding, Ed: Nall, B. T. & Ill, K. A., *American Association for the Advancement in Science*, Washington D.C., USA
- Freedman, R., Hirst, T. R. & Tuite, M. F. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**: 331-6

- Gao, B., Eisenberg, E. & Greene, L. E. (1992) Binding of nucleotides to the bovine brain uncoating ATPase. *Mol. Biol. Cell* **3S**: 58a
- Gao, B., Yumiko, E., Greene, L. E. & Eisenberg, E. (1993) Nucleotide binding properties of bovine brain uncoating ATPase. *J. Biol. Chem.* **268**: 8513
- Gaut, J. R. & Hendershot, L. M. (1993) Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. *J. Biol. Chem.* **268**: 7248-55
- Georgopoulos, C. & Welch, W. J. (1993) *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**: 601-34
- Gething, M. J. (1997) Guidebook to Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts, *Gething, M.J., Oxford University Press, Oxford, UK*
- Gething, M. J. (1999) *Cell Dev. Biol.* **10**: 465-72
- Gething, M. J. & Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45
- Gilbert, H. F. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.* **63**: 69-172
- Goldberg, A. L. & Goff, S. A. (1986) Maximizing Gene expression, Ed: Reznikoff, W. & Gold, L., *Butterworths, Boston*
- Goldberger, R. F., Epstein, C. J. & Anfinsen, C. B. (1963) Acceleration of the reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**: 628-35
- Gosh, G., Van Duyne, G., Gosh, S. & Sigler, P. B. (1995) *Nature* **373**: 303-10
- Goto, Y., Azuma, T. & Hamaguchi, K. (1979) Refolding of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem. (Tokyo)* **85**: 1427-38
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1979) The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem. (Tokyo)* **86**: 1433-41
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982a) Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.* **156**: 891-910
- Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1982b) Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**: 911-26
- Gottesman, S. (1990) *Methods Enzymol.* **185**: 119-29
- Haas, I. G. (1991) BiP--a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **167**: 71-82
- Haas, I. G. (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* **50**: 1012-20

- Haas, I. G. & Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* **306**: 387-9
- Haase-Pettingell, C. & King (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 4983
- Hammond, C. & Helenius, A. (1994) *J. Cell Biol.* **126**: 41-52
- Hammond, C. & Helenius, A. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**: 523-9
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-80
- Hanahan, D. (1985) DNA cloning 1. *IRL-Press*, Oxford
- Hao, M. H. & Sheraga, H. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 4984-9
- Hartl, F. U. (1996) *Nature* **381**: 571-80
- Hawkins, H. C. & Freedman, R. (1991) *Biochem. J.* **275**: 335-9
- Hayano, T. & Kikuchi, M. (1995) *FEBS Lett.* **372**: 210-4
- Hebert, D. N., Simons, J. F., Peterson, J. R. & Helenius, A. (1995) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**: 405-15
- Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N. & Simons, J. F. (1997) *Trends Cell Biol.* **7**: 193-200
- Hendershot, L. (1990) *J. Cell Biol.* **111**: 829-37
- Hendershot, L., Bole, D. G., Kohler, G. & Kearney, J. F. (1987) *J. Cell Biol.* **104**: 761-7
- Hendershot, L., Wei, J., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y. (1996) Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**: 5269-74
- Heukeshofen, J. & Dernik, R. (1988) *Elektrophoresis* **9**: 28
- Hoffmann, F., Posten, C. & Rinas, U. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **72**: 315-22
- Hoffmann, S. J., Loober, D. L., Roehrich, J. M., Lozart, P. E., Durfee, S. L., Tedesco, J. L. & Stetler, G. L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 8521-5
- Höhfeld, J. & Jentsch, S. (1997) GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO* **16**: 6209-16
- Höhfeld, J., Minami, Y. & Hartl, F. U. (1995) Hip, a novel cochaperone involved in the eycariotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**: 589-98
- Holmgren, A. (1984) *Methods Enzymol.* **107**: 295-300
- Holmgren, A. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 237-71
- Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-6

- Holmgren, A. & Branden, C. I. (1989) Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* **342**: 248-51
- Huang, S., Tsai, M. Y., Tzou, W. & Wang, C. (1993) Aspartyl residue 10 is essential for ATPase activity of rat hsc70. *J. Biol. Chem.* **268**: 2063-86
- Hurtley, S. M. & Helenius, A. (1989) *Ann. Rev. Cell Biol.* **5**: 277-307
- Hwang, C., Sinsky, A. J. & Lodish, H. F. (1992) *Science* **257**: 1496-502
- Iseman, D. E., Lancet, D. & Pecht, J. (1979) *Biochemistry* **18**: 3327-36
- Jaenicke, R. (1987) Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **49**: 117-237
- Jaenicke, R. (1991) *Biochemistry (Mosc.)* **30**: 3147-61
- Jaenicke, R. (1996) Protein folding and association: in vitro studies for self-organization and targeting in the cell. *Curr. Top. Cell Regul.* **34**: 209-314
- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **71**: 155-241
- Jaenicke, R. & Buchner, J. (1993) *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.* **4**: 1-30
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. A. (1999) *Cell* **96**: 341-52
- James, P., Pfund, C. & Craig, E. A. (1997) Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* **275**: 387-9
- Janeway, C. A. & Travers, P. (1997) *Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag*, Berlin
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V. & Fernandez, L. A. (2002) Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *J. Mol. Bio.* **320**: 1-10
- Kammermeier, R. (1999) Stabilität und Faltung der CH3-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33 (Diplomarbeit). Dissertation, Universität Regensburg
- Karplus, M. & Sali, A. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**: 58-73
- Kehoe, J. M. & Capra, J. D. (1971) Localization of two additional hypervariable regions in immunoglobulin heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **68**: 2019-21
- Kelley, W. L. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**: 222-7
- Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T. E. (1996) *Biochemistry* **35**: 7684-91
- Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T. E. (1997) The folding catalyst protein disulphide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Current Biology* **7**: 239-45

- Khundkar, L. R. & Zewail, A. H. (1990) Ultrafast Molecular Reaction Dynamics In Real-Time: Progress Over A Decade. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**: 15-60
- Khyse-Anderson, J. (1984) *Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-9
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. & Buchner, J. (1991) Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 825-9
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 631-60
- Klein, C. & Schulz, G. E. (1991) Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**: 737-50
- Knarr, G., Gething, M. J., Modrow, S. & Buchner, J. (1995) BiP binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.* **270**: 27589-94
- Knarr, G., Kies, U., Bell, S., Mayer, M. & Buchner, J. (2002) Interaction of the Chaperone BiP with an Antibody Domain: Implications for the Chaperone Cycle. *J. Mol. Biol.* **318**: 611-20
- Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M. J. & Buchner, J. (1999) BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip. *J. Biol. Chem.* **274**: 29850-7
- Knittler, M. R., Dirks, S. & Haas, I. G. (1995) Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**: 1764-8
- Knittler, M. R. & Haas, I. G. (1992) Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.* **11**: 1573-81
- Koivu, J., Myllylä, R., Heelaakoski, T., Pihlajaniemi, T., Tasanen, K. & Kivirikko, K. I. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 6447-9
- Kornberg, A., Scott, J. F. & Bertsch, L. L. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**: 3298-304
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-64
- Kuwajima, K. (1989) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **6**: 87-103
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lal, A., Pang, P., Kalelkar, S., Romero, P. A., Herscovics, A. & Moremen, K.-W. (1998) *Glycobiology* **8**: 981-95
- Lamande, S. R. & Bateman, J. F. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**: 455-64
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. & Bukau, B. (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**: 5452-7

- Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. & Erickson, H. P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**: 987-91
- Lee, N., Francklyn, C. & Hamilton, E. P. (1987) Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**: 8814-8
- Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R. & Hendershot, L. M. (1999) BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell* **10**: 2209-19
- Leitzgen, K., Knittler, M. R. & Haas, I. G. (1997) Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding. *J. Biol. Chem.* **272**: 3117-23
- Lesk, A. M. & Chothia, C. (1982) *J. Mol. Bio.* **160**: 325-42
- Levinthal, C. J. (1968) *J. Chem. Phys.* **65**: 44-5
- Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B. L. & Georgiou, G. (2001) Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of Escherichia coli trxB gor mutants via the coexpression of molecular chaperones. *Protein Expr. Purif.* **23**: 338-47
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1991) Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 2874-8
- Lilie, H. & Buchner, J. (1995) Domain interactions stabilize the alternatively folded state of an antibody Fab fragment. *FEBS Lett.* **362**: 43-6
- Lilie, H., Jaenicke, R. & Buchner, J. (1995a) Characterization of a quaternary-structured folding intermediate of an antibody Fab-fragment. *Protein Sci.* **4**: 917-24
- Lilie, H., Lang, K., Rudolph, R. & Buchner, J. (1993) Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Sci.* **2**: 1490-6
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R. & Buchner, J. (1994) Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**: 14290-6
- Lilie, H., Rudolph, R. & Buchner, J. (1995) Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure. *J. Mol. Biol.* **248**: 190-201
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 497-501
- Lin, M. C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 6726-31
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) *Spektrum Akad. Verlag*, Heidelberg
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. & Campbell, I. D. (1992) The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* **71**: 671-8

- Makrides, S. C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-38
- Marston, F. A. (1986) The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**: 1-12
- Martin, J. L., Bardwell, J. C. & Kuriyan, J. (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. *Nature* **365**: 464-8
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. & Rapoport, T. A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**: 553-64
- Mayer, J. (1993) Reinigung und Charakterisierung der rekombinat erzeugten Antikörperdomäne CH3 (Diplomarbeit). Dissertation, Universität Regensburg
- Mayer, J. (1998) Faltung und Assoziation der CH3-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33 (Dissertation). Dissertation, Universität Regensburg
- Mayer, M. (1999) Expression von Antikörper Fab-Fragmenten im Cytosol von *E. coli* und deren Renaturierung/Reoxidation in vitro. Dissertation,
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R. & Buchner, J. (2000) BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J. Biol. Chem.* **275**: 29421-5
- Mayhew, M., da Silva, A. C. R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Hartl, F. U. (1996) Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* **379**: 420-6
- Mazzarella, R. A., Srinivasan, P. R., Haugejorden, S. M. & Green, M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 1094-101
- McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J. & Bukau, B. (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* **249**: 126-37
- McCarty, J. S. & Walker, G. C. (1991) DnaK as a thermometer: Threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**: 9513-7
- McKay, D. B. (1993) *Adv. Protein Chem.* **44**: 67-80
- Melnick, J., Dul, J. L. & Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* **370**: 373-5
- Miele, I., Cordella-Miele, E. & Mukhenjee, A. B. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 6427-37
- Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K. E. & Rapoport, T. A. (1999) Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **274**: 20110-5

- Missiakas, D., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1993) Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene *dsbB*, whose product is involved in the formation of disulfide bonds in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**: 7084-8
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1994) The *Escherichia coli* *dsbC* (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**: 2013-20
- Miyada, C. G., Stoltzfus, L. & Wilcox, G. (1984) Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**: 4120-4
- Mizuochi, T., Hamato, J. & Titani, K. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **257**: 387-94
- Montero, M., Brini, M., Marsault, R., Alvarez, J., Sitia, R., Pozzan, T. & Rizzuto, R. (1995) Monitoring dynamic changes in free Ca^{2+} concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO* **14**: 5467-75
- Morimoto, R. I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (1994) *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Morimoto, R.I., Tissières, A. & Georgopoulos, C. (Hrsg.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987) *Methods Enzymol.* **155**: 335-50
- Noiva, R. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**: 481-93
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A. & Kohno, K. (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**: 445-50
- Oliver, J. D., van der Waal, F. J., Bulleid, N. J. & High, S. (1997) *Science* **275**: 86-8
- Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z. & Wolynes, P. G. (1997) *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**: 545-600
- Osipiuk, J., Walsh, M. A., Freeman, B. C., Morimoto, R. I. & Joachimiak, A. (1999) Structure of a new crystal form of human Hsp70 ATPase domain. *Acta Cryst.* **D55**: 1105-7
- O'Brien, M. C., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**: 15874-8
- O'Brien, M. C. & McKay, D. B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 2247-50
- Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. & Reinstein, J. (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* **36**: 3417-22
- Padlan, E. A., Cohen, G. H. & Davies, D. R. (1987) *Mol. Immunol.* **23**: 951-60
- Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J. & Fink, A. L. (1993) *Nature* **365**: 664-6
- Parodi, A. J. (1998) *Braz. J. Med. Biol. Res* **31**: 601-14

- Phizackerley, R. P., Wishner, B. C., Bryant, S. H., Amzel, L. M., Lopez de Castro, J. A. & Poljak, R. J. (1979) Three dimensional structure of the pFc' fragment of guinea pig IgG1. *Mol. Immunol.* **16**: 841-50
- Pierpaoli, E. V., Sandmeier, E., Baici, A., Schönfeld, H. J., Gisler, S. & Christen, P. (1997) The Power Stroke of the DnaK/DnaJ/GrpE Molecular Chaperone System. *J. Mol. Biol.* **269**: 757-68
- Pihlajaniemi, T., Heelaakoski, T., Tasanen, K., Myllylä, R., Huhtala, M. L., Koivu, J. & Kivirikko, K. I. (1987) *EMBO J.* **6**: 643-9
- Pilon, M. & Schekman, R. (1999) Protein Translocation: How Hsp70 Pulls It Off. *Cell* **97**: 679-82
- Pirkl, F. (1996) Reinigung und Charakterisierung der rekombinant erzeugten Antikörperdomäne CH2. Dissertation, Universität Regensburg
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) *Methods Enzymol.* **178**: 597-615
- Pollit, S. & Zalkin, H. (1983) *J. Bacteriol.* **153**: 27-32
- Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C. & Pastan, I. (1977) Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. *Cell* **11**: 941-7
- Primm, T. P., Walker, K. W. & Gilbert, H. F. (1996) Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* **271**: 33664-9
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**: 15661-7
- Ptitsyn, O. B. (1991) *FEBS Lett.* **285**: 176-81
- Ptitsyn, O. B., Pain, R. H., Semisotnov, G. V., Zeriovnik, E. & Razgulyaev, D. I. (1990) *FEBS Lett.* **285**: 20-4
- Ptitsyn, O. B. & Rashin, A. A. (1973) *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **213**: 473-5
- Puig, A. & Gilbert, H. F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 7771
- Radford, S. (2000) *Trends Biochem. Sci.* **25**: 611-8
- Ren, B., Tibbelin, G., dePascale, D., Rossi, M., Bartolucci, S. & Ladenstein, R. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**: 602-11
- Richardson, J. S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* **34**: 167-339
- Rudikoff, S. & Pumphrey, J. G. (1986) Functional antibody lacking a variable-region disulfide bridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**: 7875-8

- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**: 49-56
- Russell, C. B., Stewart, R. C. & Dahlquist, F. W. (1989) Control of transducer methylation levels in *Escherichia coli*: investigation of components essential for modulation of methylation and demethylation reactions. *J. Bacteriol.* **171**: 3609-18
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Cold Spring Harbor
- Schatz, G. & Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**: 1519-26
- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. & Christen, P. (1994) Kinetics of Molecular Chaperone Action. *Science* **263**: 971-3
- Schmid, F. X. (1992) *Protein Folding*, Creighton, T.E. (Hrsg.), Freeman, New York
- Schmid, F. X. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomed.* **22**: 123-42
- Schmid, F. X. (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*, Ed: Creighton, T. E., IRL Press, Oxford, New York, Tokyo
- Schmid, S. L. & Rothman, J. E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 10044-9
- Schmidt, M. & Buchner, J. (1992) Interaction of GroE with an all-beta-protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 16829-33
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. & Bukau, B. (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* **12**: 4137-44
- Shevchik, V. E., Condemine, G. & Robert-Baudouy, J. (1994) Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J.* **13**: 2007-12
- Shortle, D. (1996) The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *FASEB J.* **10**: 27-34
- Skerra, A. & Pluckthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**: 1038-41
- Skowronek, M. H., Hendershot, L. M. & Haas, I. G. (1998) The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 1574-8
- Slepenkov, S. V. & Witt, S. N. (2002) The unfolding story of the *Escherichia coli* Hsp70 DnaK: is DnaK a holdase or an unfoldase? *Mol. Microbiol.* **45**: 1197-206
- Song, J. L. & Wang, C. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 312-6
- Sousa, M. C., Ferrero-Garcia, M. A. & Parodi, A. J. (1992) *Biochemistry (Mosc.)* **31**: 97-105

- Srivastava, S. P., Chen, N. Q., Liu, Y. X. & Holzman, J. L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 20337-44
- Stevens, F. J. & Argon, Y. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**: 443-54
- Stewart, E. J., Aslund, F. & Beckwith, J. (1998) Disulfide bond formation in the escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **17**: 5543-50
- Sumi, A. & Hamaguchi, K. (1982) Denaturation by guanidine hydrochloride of the Fc(t) and pFc' fragments of human immunoglobulin G. *J. Biochem. (Tokyo)* **92**: 823-33
- Takeda, S. & McKay, D. B. (1996) Kinetics of Peptide Binding to the Bovine 70 kDa Heat Shock Cognate Protein, a Molecular Chaperone. *Biochemistry* **35**: 4636-44
- Theysen, H., Schuster, H. P., Packschies, L., Bukau, B. & Reinstein, J. (1996) The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* **263**: 657-70
- Thies, M. J. (1997) Expression, Renaturierung und Charakterisierung der CH2-Domäne des monoklonalen Antikörpers MAK33. Dissertation, Universität Regensburg
- Thies, M. J. (2002) Struktur, Stabilität und Faltung von Antikörperdomänen (Dissertation). Dissertation, Technische Universität München
- Thies, M. J., Kammermeier, R., Richter, K. & Buchner, J. (2001) The alternatively folded state of the antibody C(H)3 domain. *J. Mol. Biol.* **309**: 1077-85
- Thies, M. J., Mayer, J., Augustine, J. G., Frederick, C. A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999) Folding and association of the antibody domain CH3: prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol.* **293**: 67-79
- Thies, M. J., Talamo, F., Mayer, M., Bell, S., Ruoppolo, M., Marino, G. & Buchner, J. (2002) Folding and oxidation of the antibody domain C(H)3. *J. Mol. Biol.* **319**: 1267-77
- Todd, M. J., Viitanen, P. V. & Lorimer, G. H. (1994) *Science* **265**: 659-64
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**: 4350-4
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I. & Rapoport, T. A. (2001) Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* **104**: 937-48
- Tsunenaga, M., Goto, Y., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987) Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry* **26**: 6044-51
- Vidal, V., Qiu, N. H., Redfield, B., Carlino, A., Brot, N. & Weissbach, H. (1996) ATP hydrolysis is not required for the dissociation of a substance P.BiP complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **330**: 314-8
- Villarejo, M. R. & Zabin, I. (1974) Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* **120**: 466-74

- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Myllylä, R. & Kivirikko, K. I. (1992) *EMBO* **11**: 4213-7
- 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**: 19599-610
- Walker, K. W. & Gilbert, H. F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 28487-93
- Walter, S. & Buchner, J. (2002) Molecular Chaperones-Cellular Machines for Protein Folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**: 1098-113
- Wei, J., Gaut, J. R. & Hendershot, L. M. (1995) In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **270**: 26677-82
- Wei, J. & Hendershot, L. M. (1995) Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. *J. Biol. Chem.* **270**: 26670-6
- Weidle, U. H., Borgya, A., Mattes, R., Lenz, H. & Buckel, P. (1987) Reconstitution of functionally active antibody directed against creatine kinase from separately expressed heavy and light chains in non-lymphoid cells. *Gene* **51**: 21-9
- Weissman, J. S., rye, H. S., Fenton, W. A., Beechem, J. M. & Horwich, A. L. (1996) *Cell* **84**: 481-90
- Welch, W. J., Eggers, D. K., Hansen, W. J. & Nagata, H. (1997) Molecular Chaperone in the Life Cycle of Proteins, Ed: Fink A.L. & Goto, M., *Marcel Dekker*, New York
- Wetlaufer, D. B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**: 697-701
- Wetterau, J. R., Combs, K. A., Spinner, S. N. & Joiner, B. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 9801-7
- Williams, A. F. & Barclay, A. N. (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 381-405
- Williams, D. C., Van Frank, R. M., Muth, W. L. & Burnett, J. P. (1982) *Science* **215**: 684-7
- Wolynes, P. G., Onuchic, J. N. & Thirumalai, D. (1995) *Science* **267**: 1619-20
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19
- Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Maekawa, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. & Ishii, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**: 25331
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 321-50
- Zapun, A. & Creighton, T. E. (1994) Effects of DsbA on the disulfide folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor and alpha-lactalbumin. *Biochemistry* **33**: 5202-11
- Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J. M. & Thomas, D. Y. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 6009-12

- Zapun, A., Jakob, C. A., Thomas, D. Y. & Bergeron, J. J. M. (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* **7**: R173-R182
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. & Creighton, T. E. (1995) Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**: 5075-89
- Zemel-Dreassen, O. & Zamir, A. (2002) *Gene* **27**: 315-22
- Zheng, M., Aslund, F. & Storz, G. (1998) *Science* **279**: 1718-21
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. & Hendrickson, W. A. (1996) *Science* **272**: 1606-14
- Zylicz, M. (1993) *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **339**: 271-8

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
ddH ₂ O	quarzbdestilliertes Wasser
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
MABA-ATP/ADP	N ₈ -(4-N'-methylantraniloylaminobutyl)-8-aminoadenosine 5'-trip-/di-phosphate
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-Proly-Isomerase

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
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

7. Veröffentlichungen

Mayer M., Kies U., Kammermeier R. and Buchner J. (2000). BiP and PDI Cooperate in the Oxidative Folding of Antibodies *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **275** (38), 29421-29425

Mayer M., Reinstein, J. and Buchner J. (eingereicht). Modulation of the ATPase cycle of BiP by peptides and proteins.

Mayer M. and Buchner J. (im Druck). Refolding of inclusion body proteins. In *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases 2nd edition*, The Humana Press Inc., Totowa, USA

Thies M.J.W., Talamo F., Mayer M., Bell S., Ruoppolo M., Marino G. and Buchner J. (2002). Folding and Oxidation of the Antibody Domain C_H3. *Journal of Molecular Biology* **319**, 1267-1277

Knarr G., Kies, U., Bell S., Mayer M. and Buchner J. (2002). Interaction of the Chaperone BiP with an Antibody Domain: Implications for the Chaperone Cycle. *Journal of Molecular Biology*, **318**, 611-620

BiP and PDI Cooperate in the Oxidative Folding of Antibodies *in Vitro**

Received for publication, March 29, 2000, and in revised form, May 22, 2000
Published, JBC Papers in Press, July 12, 2000, DOI 10.1074/jbc.M002655200

Marcus Mayer, Ursula Kies‡, Robert Kammermeier, and Johannes Buchner§

From the Institut für Organische Chemie & Biochemie, Technische Universität München, 85747 Garching, Germany

Immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP), a member of the Hsp70 chaperone family, and the oxidoreductase protein-disulfide isomerase (PDI) play an important role in the folding and oxidation of proteins in the endoplasmic reticulum. However, it was not clear whether both cooperate in this process. We show here that BiP and PDI act synergistically in the *in vitro* folding of the denatured and reduced Fab fragment. Several ATP-dependent cycles of binding, release, and rebinding of the unfolded antibody chains by BiP are required for efficient reactivation. Our data suggest that in the absence of BiP unfolded antibody chains collapse rapidly upon refolding, rendering cysteine side chains inaccessible for PDI. BiP binds the unfolded polypeptide chains and keeps them in a conformation in which the cysteine residues are accessible for PDI. These findings support the idea of a network of folding helper proteins in the endoplasmic reticulum, which makes this organelle a dedicated protein-processing compartment.

In the endoplasmic reticulum, several chaperones and folding catalysts are involved in the folding of secretory proteins (1–5). It is still poorly understood how these proteins cooperate to assist folding. Immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP),¹ an ER-located member of the Hsp70 chaperone family, was originally found noncovalently associated with immunoglobulin heavy chains (6). It is known that BiP associates transiently with a large number of newly synthesized proteins in the ER (7–9). Like other Hsp70 proteins, BiP has a weak ATPase activity (10). Binding of ATP is necessary for the release of peptides bound to BiP (11). BiP has a binding site selective for linear sequences of seven amino acids containing hydrophobic residues (12). Based on this binding algorithm, BiP binding sequences were identified in the light chain and in the V_H, C_H1 and C_H3 domains of the heavy chain (13).

PDI is a homodimer of 55-kDa subunits, which catalyzes the

formation of disulfide bonds (14). Because PDI also binds to different peptides that lack cysteines (15), it had been proposed that PDI acts not only as an enzyme but also as a chaperone (16–18). Both activities are required for reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A₂ (19). However, in the refolding of antibody fragments, PDI has no chaperone-like effect but acts as an enzyme that catalyzes disulfide bond formation and reshuffling (20).

The antibody Fab fragment is a good model system, because antibody domains contain a disulfide bond that is part of the hydrophobic core of the protein. We used the Fab fragment of the murine monoclonal antibody MAK33 (21) for examining the influence of BiP and PDI on the refolding and reoxidation of antibodies, because the effect of PDI on antibody reactivation had been investigated in detail before (20). PDI has to be present during the initial stages of folding to influence the reaction. This may be due to the kinetic competition between Fab structure formation and accessibility of the cysteines for PDI (20).

Here we addressed the question of whether the binding of unfolded antibody fragments to BiP may keep the cysteines accessible for PDI and whether these folding helpers cooperate in a synergistic way.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—Phosphocreatine, creatine phosphatase, apyrase, and BSA (RIA Grade) were from Sigma. MAK33 Fab was from Roche Diagnostics.

Purification of Recombinant Protein-disulfide Isomerase—Human PDI was expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The pet 23a-based plasmid containing the coding sequence for PDI was obtained from R. Freedman and L. Ruddock (University of Kent, UK).

Cells were grown at 37 °C in LB medium supplemented with 100 μg ml⁻¹ ampicillin at an A₆₀₀ of 0.6. Gene expression was induced by the addition of isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside to a final concentration of 1 mM. After 6–7 h, the cells were harvested by centrifugation at 5000 × g for 15 min at 4 °C.

Cell pellets were washed and resuspended in 0.1 M Tris/HCl, pH 8, 2 mM EDTA containing a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics). The cells were lysed using a disrupter (Constant Systems). After centrifugation (40,000 × g, 40 min, 4 °C) to remove debris, PDI was enriched by heat treatment and ammonium sulfate precipitation. First the cell extract was heated up to 54 °C and maintained at this temperature for 15 min. After cooling, the extract was centrifuged (40,000 × g, 30 min, 4 °C), and the pellet was discarded. (NH₄)₂SO₄ was added to the supernatant to 55% saturation. After stirring for 30 min at room temperature, the precipitate was centrifuged (40,000 × g, 40 min, 4 °C), and the pellet was discarded. Further (NH₄)₂SO₄ was added to a final saturation of 85%, and the material was centrifuged as before. The pellet was dissolved in 100 ml of 20 mM sodium-phosphate buffer, pH 6.3, and dialyzed against the same buffer.

The dialyzed material was loaded on to a resource Q column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with 20 mM sodium-phosphate buffer, pH 6.3. For elution, a linear NaCl gradient was applied. PDI was detected between 0.3 and 0.4 M NaCl by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Next, the PDI-containing fractions were bound to a hydroxylapatite column (Bio-Rad) equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer, pH

* This work was supported in part by Grant Bio4-CT96-0436 from the European Union (to J. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ Supported by a Boehringer Ingelheim fellowship.

§ To whom correspondence should be addressed: Institut für Organische Chemie & Biochemie, Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching, Germany. Tel.: 49-89-289-13340; Fax: 49-89-289-13345; E-mail: johannes.buchner@ch.tum.de.

¹ The abbreviations used are: BiP, immunoglobulin heavy chain binding protein; BSA, bovine serum albumin; ER, endoplasmic reticulum; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Fab, proteolytically derived antigen-binding antibody fragment consisting of the entire light chain and the two NH₂-terminal domains of the heavy chain; Fab/red, Fab fragment with reduced cysteines; Fd, part of the immunoglobulin heavy chain consisting of the two amino-terminal domains (V_H and C_H1); MAK33, murine monoclonal antibody of subtype κ/IgG1 directed against human creatine kinase; PDI, protein-disulfide isomerase.

6.3, and eluted with a linear sodium phosphate gradient. The PDI-containing fractions were pooled and dialyzed overnight against 20 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, pH 6.3.

The dialyzed fractions were applied to a Superdex 200-pg gel filtration column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with 20 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, pH 6.3. The protein was concentrated by Amicon ultrafiltration, dialyzed against 50 mM NH_4HCO_3 , and freeze-dried. The freeze-dried enzyme was stored at -20°C .

The concentration of PDI was determined using the published extinction coefficient of $E_{280, 0.1\%}^{1\text{ cm}} = 0.795$. Here molar concentrations refer to the dimer.

Purification of Recombinant BiP—Murine BiP was expressed in the *E. coli* strain M15. The pASK-based plasmid contains the coding sequence for BiP with a His₆ tag at its COOH terminus (22).

Expression and purification was carried out basically as described previously (22). Cell pellets were washed and resuspended in 40 mM Hepes (pH 7.0) containing a protease inhibitor mixture (Roche Diagnostics) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The cells were lysed using a disrupter (Constant Systems).

After centrifugation ($40,000 \times g$, 30 min, 4°C) to remove debris, the supernatant was loaded on a Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid-Sepharose fast flow column. BiP was detected in a sharp peak at 150 mM imidazole.

The fractions containing BiP were pooled, dialyzed overnight against 40 mM Hepes, 0.5 M NaCl, 5% glycerol, pH 7.5, and concentrated by Amicon ultrafiltration.

The concentrated protein solution was applied to a Superdex 200-pg gel filtration column (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrated with 40 mM Hepes, 0.5 M NaCl, 5% glycerol, pH 7.5.

The protein was dialyzed overnight against 40 mM Hepes, 5% glycerol, pH 7.5, and concentrated by Amicon ultrafiltration. The protein was frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C .

The concentration of BiP was determined using the published extinction coefficient of $E_{280, 0.1\%}^{1\text{ cm}} = 0.395$. Here molar concentrations refer to the monomer.

Unfolding and Refolding of the Fab Fragment—Denaturation and renaturation of the proteolytically derived Fab fragment were carried out as described previously (20). The Fab fragment was denatured in 6 M guanidinium chloride, 0.1 M Tris, pH 8.0, for 2 h at 25°C . Reduction of the disulfide bonds was achieved by adding 0.3 M dithioerythritol to the denaturation solution. Renaturation was initiated by diluting the denatured protein 100-fold into the buffer preincubated at 15°C containing 0.1 M Tris, pH 7.0, with vigorous stirring for 10 s. The renaturation buffer contained in addition 6 mM GSSG, and the final concentration of DTE was 3 mM. In the cases indicated, the renaturation buffer was supplemented with an ATP-regenerating system containing 0.5 mM ATP, 10 mM phosphocreatine, and 35 units/ml creatine phosphatase. Refolding was carried out at 15°C . The final concentrations during renaturation were 0.2 μM for Fab and 60 mM for guanidinium chloride. PDI was reduced in the presence of 1 mM dithioerythritol for 10 min before it was added to the renaturation buffer.

Isolation and Solubilization of Light Chain and Fd Inclusion Bodies—Light chain and Fd fragment of MAK33 were expressed recombinantly in the *E. coli* strain BL21(DE3) harboring the plasmid for either the light chain or the Fd fragment (23).

Cells were grown at 37°C in LB media supplemented with 100 μg ml^{-1} ampicillin at an A_{600} of 0.5. Gene expression was induced by the addition of isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside to a final concentration of 1 mM. After 24 h, the cells were harvested by centrifugation at $5000 \times g$ for 15 min at 4°C .

Inclusion body isolation and solubilization were performed as described previously (23). The cell pellet was resolved in 0.1 M Tris, 1 mM EDTA, pH 7.0, and incubated with 1.5 mg of lysozyme/g of cells for 30 min at 4°C . Cells were lysed with a disrupter (Constant Systems). The lysed cells were incubated with 10 μg of DNase I and 3 mM MgCl_2 for 30 min at 25°C to digest the DNA. The inclusion bodies were isolated by adding 0.5 volumes of 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5 M NaCl, pH 7.0, and incubation for 30 min at 4°C . The inclusion body pellet was centrifuged ($40,000 \times g$, 30 min, 4°C) and washed in 0.1 M Tris, 20 mM EDTA, pH 7.0. The pellet was resolved in 0.1 M Tris, 8 M urea, 100 mM dithioerythritol, pH 8.0, and incubated for 2 h at 25°C . After a pH shift to pH 4.0 and centrifugation ($40,000 \times g$, 30 min, 4°C) the solution was dialyzed overnight against 5 M urea, pH 4.0.

The purity and protein concentration of the preparations were checked by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Bradford assay (24).

ELISA—The ELISA assay was carried out as described previously (23, 25). In short, dimeric muscle-specific human creatine kinase was attached to tubes using the biotin/streptavidin system. At the times

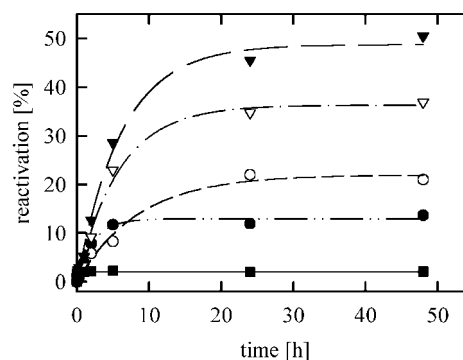


FIG. 1. Influence of BiP and PDI on the refolding of Fab/red. Reactivation of Fab/red (the final concentration of Fab was 0.2 μM) was initiated by a 100-fold dilution in 0.1 M Tris, pH 7.0, 6 mM GSSG in the presence of 3 μM BSA with 0.5 mM ATP and an ATP-regenerating system (■) (the same results were observed without ATP; data not shown), in the presence of 2 μM BiP with 0.5 mM ATP and an ATP-regenerating system (●) (the same results were observed without ATP; data not shown), in the presence of 0.5 μM PDI (○), in the presence of 2 μM BiP and 0.5 μM PDI (▽), and in the presence of 2 μM BiP, 0.5 μM PDI, 0.5 mM ATP, and an ATP-regenerating system (▲). Reactivation yields were determined by ELISA.

indicated, aliquots of the refolding Fab fragment were diluted in ELISA buffer. To prevent further reactivation of the Fab fragment, the samples were kept on ice, and trypsin with a final concentration of 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added. Binding of functionally refolded Fab fragments to dimeric muscle-specific human creatine kinase was detected by using peroxidase-coupled anti-mouse-IgG-antiserum. The amount of functionally reactivated protein was quantified by comparison with standard curves obtained with the authentic Fab fragment.

ATPase Measurements—ATPase activity of BiP was determined as described previously (13). The assay was carried out in the same buffer used for the refolding experiments (0.1 M Tris, pH 7.0, 50 mM KCl, and 2 mM MgCl_2). 5 μM BiP was incubated at 37°C with 500 μM (final concentration) unlabeled ATP and 10 μCi of [α - ^{32}P]ATP in a total volume of 30 μl . ATP hydrolysis was stopped after different times by adding EDTA (final concentration 24 mM). After thin layer chromatography on polyethyleneimine-cellulose (Merck), the ATP/ADP ratio was quantified with a Molecular Dynamics Storm 860 PhosphorImager. Hydrolysis rates were corrected for uncatalyzed, spontaneous ATP hydrolysis at the respective conditions.

RESULTS

PDI and BiP Affect the Refolding of Fab/red—It had been shown previously that PDI influences the reactivation of denatured and reduced Fab fragments *in vitro*. Whereas in the absence of PDI hardly any refolding could be achieved, the presence of PDI lead to reactivation yields of about 20% (Ref. 20 and Fig. 1). It is known that *in vivo* BiP associates transiently with immunoglobulin heavy and light chains (8, 9), and BiP binding sequences were determined in the Fab fragment of antibodies (13). It had therefore been proposed that BiP could act together with PDI in the folding of antibodies (20).

To test this hypothesis, we performed refolding experiments in the presence of either PDI, BiP, or both folding helpers. BSA was used to test whether nonspecific protein effects influence the reaction. As shown in Fig. 1, no reactivation could be achieved in the presence of BSA, whereas with PDI 20% reactivation was obtained, as described previously (20). In the presence of BiP alone, the reactivation yields were 15%. Surprisingly, when ATP was present in addition to BiP, no further increase in reactivation yields was observed. In the presence of PDI and BiP, 35% of the molecules reached the native state. This corresponds to the sum of the reactivation yields of BiP (15%) and PDI (20%). However, in the presence of BiP, PDI, and ATP, yields of 50% were observed (Fig. 1). This indicates that BiP and PDI act in a synergistic way and that this effect is ATP-dependent. Using radiolabeled [α - ^{32}P]ATP, we demon-

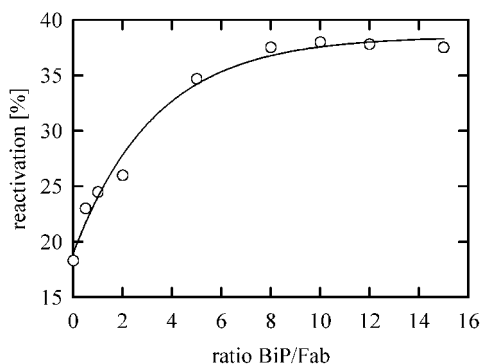


FIG. 2. Influence of the BiP to Fab ratio on the refolding of Fab/red. Reactivation of Fab/red (the final concentration of Fab was $0.2 \mu\text{M}$) was initiated by a 100-fold dilution in 0.1 M Tris, pH 7.0, 6 mM GSSG, containing 0.5 mM ATP, an ATP-regenerating system, $0.5 \mu\text{M}$ PDI, and different amounts of BiP ($0\text{--}3 \mu\text{M}$). Reactivation was determined after 48 h of incubation.

strated that the ATPase of BiP did not lose activity during reactivation (48 h) and that the ATP-regenerating system stayed effective (data not shown).

Next, we asked how the influence of BiP on the refolding reaction depends on the BiP/Fab ratio. We performed experiments in which different amounts of BiP were present during the refolding reaction. As shown in Fig. 2, reaction yields increased with increasing BiP concentrations up to a BiP/Fab ratio of about 10:1. This indicates that there is a kinetic competition between binding to BiP and rapid structure formation or misfolding.

BiP Holds Cysteines Accessible for PDI during the Initial Phase of Refolding—It had been shown that the effect of PDI on refolding decreased when PDI was added after the initiation of refolding with a half-time of less than 10 s. After 30 s, the addition of PDI no longer influenced the reactivation process (20). This effect was not due to a change in the redox environment, since the number of sulfhydryl groups did not change during this period of time (20). We reasoned that the positive effect of BiP on the reactivation of the Fab fragment could be due to prevention of structure formation. If this way BiP kept the cysteines accessible for PDI for a longer period of time, we should be able to increase the time span during which the addition of PDI is effective.

To test this, we performed refolding experiments in the absence and presence of BiP, adding PDI at certain time points after the initiation of the refolding reaction. As shown in Fig. 3, reactivation yields decreased dramatically when PDI was added after the initiation of refolding in the absence of BiP. After 3 min, the addition of PDI had no detectable effect on Fab reactivation. In the presence of BiP, however, an influence on the reactivation was still observed, when PDI was added 20 min after starting reactivation. The decrease of reactivation yields was 6 times slower than in the absence of BiP.

BiP Binds Both Light Chain and Fd—From the previous experiments, it was clear that BiP influences the folding of the Fab fragment in an ATP-dependent way. However, it was not established whether this effect involves the interaction with one or both of the polypeptide chains of the Fab fragment. To answer this question, we used isolated Fd and light chain obtained as inclusion bodies after recombinant expression in *E. coli*. After denaturation and reduction of the respective inclusion body proteins, we performed folding reactions with either light chain or Fd in the presence or absence of BiP. In a second step, the individual folding reactants were combined and further incubated in the presence of PDI and ATP.

As shown in Fig. 4, nearly the same reactivation yields were

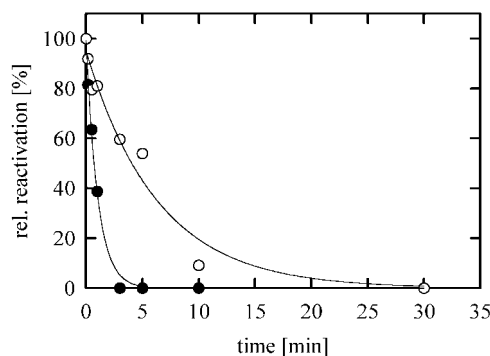


FIG. 3. Timed addition of PDI to refolding Fab/red. Reactivation of Fab/red (the final concentration of Fab was $0.2 \mu\text{M}$) was initiated by a 100-fold dilution in 0.1 M Tris, pH 7.0, 6 mM GSSG, containing 0.5 mM ATP and an ATP-regenerating system. Reactivation yields were determined after a 48-h incubation in the absence of BiP (●) or in the presence of $2 \mu\text{M}$ BiP (○). At the times indicated, PDI was added to the refolding Fab fragment at a final concentration of $0.5 \mu\text{M}$. The rate constants were 0.95 in the absence of BiP and 0.15 in the presence of BiP. Renaturation yields with PDI present from the start of renaturation were defined as 100%. The actual renaturation yields were 49% in the presence of BiP and 21% in the absence of BiP, respectively.

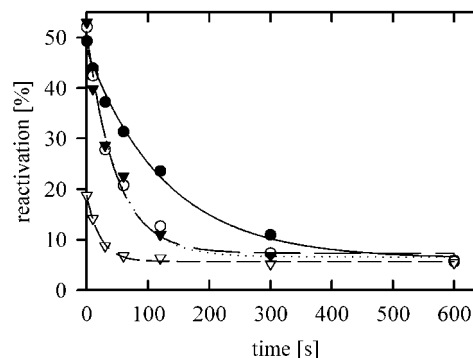


FIG. 4. Refolding of Fab after separate preincubation of light chain and Fd fragment. Light chain and Fd fragment were preincubated separately in 0.1 M Tris, pH 7.0, 6 mM GSSG in the presence and in the absence of $2 \mu\text{M}$ BiP. At the times indicated, light chain and Fd were combined, and PDI, ATP, and an ATP-regenerating system were added. The final concentrations for light chain and Fd were $0.2 \mu\text{M}$ each, 6 mM for GSSG, $2.0 \mu\text{M}$ for BiP, $0.5 \mu\text{M}$ for PDI, and 0.5 mM for ATP. After 48 h of reactivation, yields were determined by ELISA for light chain and Fd both incubated in the presence of BiP (●), light chain preincubated in the presence of BiP and Fd preincubated in the absence of BiP (▲), light chain preincubated in the absence of BiP and Fd preincubated in the presence of BiP (○), and light chain and Fd both preincubated in the absence of BiP (▽). The half-times were 91 s for both fragments incubated in the presence of BiP, 32 s for either light chain or Fd incubated in the presence of BiP, and 8 s for both fragments incubated in the absence of BiP. When the subunits were combined at the beginning of reactivation, the yields of active antibody were similar to those for the complete Fab fragment *i.e.* 50% in the presence of BiP and 20% in the absence of BiP.

achieved for the complete Fab fragment and for Fd and light chain combined immediately after initiating reactivation. However, if light chain and Fd were combined after starting refolding, reactivation yields decreased dramatically from 20 to 5% within the first minute. When either Fd or light chain were preincubated in the presence of BiP, reactivation yields of 50% were achieved if the antibody chains were combined immediately. The reactivation yields decreased as fast as in the absence of BiP if the chains were combined after starting reactivation. However, when light chain and Fd were both preincubated in the presence of BiP, this decrease could be decelerated effectively.

Since we did not observe any difference in the time course and yield of reactivation when either light chain or Fd were

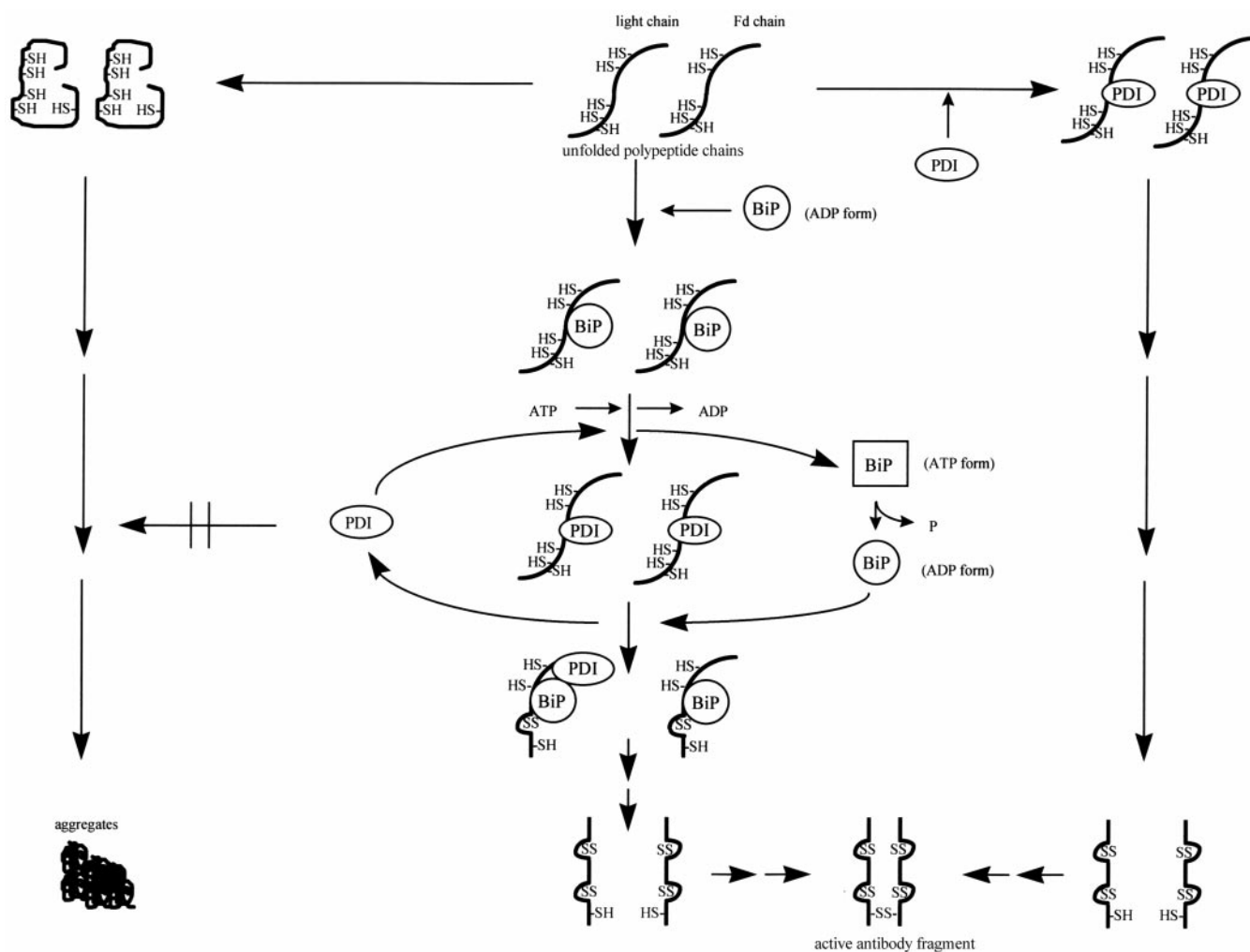


FIG. 5. A schematic model for the role of BiP and PDI during the oxidative folding of antibodies *in vitro*. Starting with the unfolded and reduced antibody chains, there are, dependent on the presence of folding factors, three different routes the polypeptide chains can take. In the absence of BiP and PDI, renaturation leads to completely inactive protein. In the presence of PDI, active antibodies are obtained with yields of about 20%. The chaperone BiP, when present during refolding, binds to both antibody chains. During the ATP-dependent cycles of binding, release, and rebinding, the cysteine residues of the antibody chains are kept accessible for PDI. This allows efficient disulfide bond formation and reshuffling. Further reaction steps lead to the fully oxidized and active antibody.

preincubated with BiP, it is obviously important for refolding that BiP binds to both antibody chains.

DISCUSSION

In vivo, the folding and formation of disulfide bonds in antibody chains seems to start cotranslationally, and complete oxidation is achieved posttranslationally (26). During these processes, the antibody chains interact with PDI, which catalyzes formation and reshuffling of disulfide bonds (14). Although PDI shows chaperone-like activity independent of its isomerase activity in the refolding of proteins containing no disulfide bonds (27, 28), the function of PDI in the folding of antibodies seems to be restricted to its isomerase activity (20). An influence of PDI on the folding of an antibody Fab fragment *in vitro* could be detected only when PDI was present during the initial phase of refolding. Based on these results, it was speculated that BiP may be able to keep the cysteine residues accessible for PDI (13, 20)

To test whether BiP and PDI cooperate in the folding of antibody chains, we performed *in vitro* folding experiments with the denatured and reduced Fab fragment of the monoclonal antibody MAK33 in the presence and absence of folding helpers. We were able to show that BiP and PDI act in a synergistic way, since the reactivation yields were not only the

sum of the yields obtained in the presence of one of the folding factors.

An unexpected feature of the folding of antibodies was revealed by experiments in which the antibody chains were first preincubated separately and then combined during reactivation. The yields decreased dramatically even after short times of separation during refolding, suggesting that contacts between the two chains are important already during early stages of folding. This explanation is in agreement with results showing that specific domain interactions can occur in reduced antibody domains.²

The results presented here led to a model for the oxidative folding of antibodies *in vitro* shown in Fig. 5. Starting from the denatured and reduced polypeptide chains, folding of the Fab fragment can occur in three different reactions. Under the conditions used, spontaneous reactivation in the absence of folding factors is not possible. However, after optimization of buffer conditions, as shown previously, up to 40% of the reduced and denatured Fab could be reactivated (23). These experiments were performed in the presence of high concentrations of L-arginine. L-Arginine acts as a "labilizing" agent that

² M. Thies and J. Buchner, unpublished results.

preferentially destabilizes incorrectly folded or aggregation-prone species (29, 30). Because the correctly folded species is not affected by arginine, the folding reaction is shifted toward the correctly folded structure by an iterative mechanism. This strong dependence of the folding on reaction conditions suggests that misfolding is a major factor in structure formation of antibodies *in vitro*. In the presence of PDI and under otherwise nonpermissive folding conditions, up to 20% of the molecules reach the native state when PDI is present from the start of reactivation. The limited ability of PDI to influence antibody folding may be explained by a kinetic competition between Fab structure formation and accessibility of the cysteines for PDI. The cysteines seem to become rapidly buried in the core of the folding polypeptide chains, and the influence of PDI on disulfide bond formation is therefore very inefficient. In the presence of PDI and BiP, the antibody chains take a much more efficient folding route. Binding to BiP seems to prevent the unfolded antibody chains from forming conformations in which the cysteines are buried. Several ATP-dependent cycles of binding, release, and rebinding are necessary for maximum oxidation of the antibody chains. As previously observed for other chaperones, an excess of BiP over Fab is required in this assay. This is due to the kinetic competition between unproductive folding reactions and the binding to BiP. It seems that BiP has to be able to trap the unfolded polypeptide chains rapidly at the beginning of refolding. In addition, repeated ATP-dependent binding and release cycles of BiP and Fab are required during reactivation. The ATP dependence of the reaction is in agreement with previous results, demonstrating that the release of peptides bound to BiP is dependent on its ATPase activity (31–33). During these ATP-dependent cycles, PDI may bind to the antibody chains simultaneously with BiP or after BiP is released from the polypeptide chain.

In this context, it remains to be seen how co-chaperones and additional ER-specific folding helpers such as Grp94, PPI, calreticulin, and calnexin (2, 5) modulate the effects of BiP and PDI on antibody folding. Specifically, Hsp70 proteins are known to be regulated by J-domain-containing proteins (34). It has been demonstrated in *Saccharomyces cerevisiae* that BiP (Kar2p) interacts with at least three ER-located HSP70 proteins, Sec63p (35, 36), Scj1p (37), and Jem1p (38). Three DnaJ domain-containing proteins have been found in mammalian cells: Mtj1p, Sec63p (39, 40), and a Scj1p homolog (ERj3p) (41). Yeast Sec63p interacts with the ATP-bound form of BiP and stimulates hydrolysis, resulting in the rapid trapping of peptides, which are then only slowly released upon nucleotide exchange (36, 42).

Although BiP has a marked effect on antibody refolding, the overall folding rate remains very slow, as observed in previous studies (20). It is known that the oxidation of the cysteines and reshuffling of disulfide bonds take place during the whole time course of renaturation (20). Therefore, disulfide bond formation or a folding/association step which is required for correct disulfide bond formation seems to be the limiting step in antibody folding. It has been shown previously that formation of the intrachain disulfide bond of antibody domains is a slow process because the cysteine residues are buried in the core of the protein (43). Therefore, their accessibility is largely restricted for thiol reagents and even more for a large enzyme like PDI.

Although we do not have direct experimental evidence, it is tempting to speculate that the inability of BiP and PDI to influence reactivation when added at later stages of folding may be due to a preceding structural collapse.

These results suggest that different classes of folding helper proteins including components of the protein translocation work together synergistically in a network-like manner in the ER of eukaryotic cells.

Acknowledgments—We thank Robert Freedman and Lloyd Ruddock for generously providing the PDI-containing plasmid and Michael Thies for stimulating discussions and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A. (1999) *Science* **286**, 1882–1888
2. Stevens, F. J., and Argon, Y. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 443–454
3. Gething, M.-J. (1997) in *Molecular Chaperones and Protein Folding Catalysts* (Gething, M.-J., ed) pp. 59–65, Oxford University Press, Oxford
4. Hammond, C., and Helenius, A. (1994) *Science* **266**, 456–458
5. Bergeron, J. J., Brenner, M. B., Thomas, D. Y., and Williams D. B. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 124–128
6. Haas, I. G., and Wabl M. (1983) *Nature* **306**, 387–389
7. Hendershot, L. M., Bole, D., Kohler, G., and Kearny, J. F. (1987) *J. Cell Biol.* **104**, 761–767
8. Knittler, M. R., and Haas, I. G. (1992) *EMBO J.* **11**, 1573–1581
9. Segal, M. S., Bye, J. M., Sambrook, J. F., and Gething, M.-J. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 227–244
10. Kassenbrock, C. K., and Kelly, R. B. (1989) *EMBO J.* **8**, 1461–1467
11. Wei, L., and Hendershot, L. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26670–26676
12. Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F., and Gething, M.-J. (1993) *Cell* **75**, 717–728
13. Knarr, G., Gething, M.-J., Modrow, S., and Buchner, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27589–27594
14. Freedman, R. B. (1991) in *Conformation and Forces in Protein Folding* (Nall, B. T., and Ill, K. A., eds) pp. 204–214, American Association for the Advancement of Science, Washington, D. C.
15. Noiva, R., Kimura, H., Roos, J., and Lennarz, W. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19645–19649
16. Noiva, R., and Lennarz, W. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 3553–3556
17. Wang, C. C., and Tsou, C. L. (1993) *FASEB J.* **7**, 1515–1517
18. Wang, C. C. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **864**, 9–13
19. Yao, Y., Zhou, Y. C., and Wang, C. C. (1997) *EMBO J.* **16**, 651–658
20. Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R., Buchner, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 14290–14296
21. Buckel, P., Hübner-Parajsz, C., Lenz, H., Haug, M., and Beaucamp, K. (1987) *Gene (Amst.)* **51**, 13–19
22. Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M.-J., Buchner, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29850–29857
23. Buchner, J., and Rudolph, R. (1991) *Nature Biotechnol.* **9**, 157–161
24. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
25. Schmidt, M., and Buchner J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16829–16833
26. Bergman, L. W., and Kuehl, M. W. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 5690–5694
27. Cai, H., Wang, C. C., and Tsou, C. L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24550–24552
28. Song, J. L., and Wang, C. C. (1995) *Eur. J. Biochem.* **231**, 312–316
29. Rudolph, R. (1990) in *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Analysis* (Tschesche, H., ed) pp. 149–171, Walter de Gruyter, Berlin
30. Buchner, J., Pastan, I., and Brinkmann, U. (1992) *Anal. Biochem.* **205**, 263–270
31. Gaut, J. R., and Hendershot, L. M. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7248–7255
32. Haas, I. G. (1994) *Experientia* **50**, 1012–1020
33. Hendershot, L. M., Wei, L., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S., and Argon Y. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5269–5274
34. Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998) *Cell* **92**, 351–366
35. Feldheim, D., Rothblatt, J., and Schekman, R. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3288–3296
36. Misselwitz, B., Staack, O., and Rapoport, T. A. (1998) *Mol. Cell* **2**, 593–603
37. Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R., and Silver P. A. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 979–988
38. Nishikawa S., and Endo, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12889–12892
39. Brightman, S. E., Blatch, G. L., and Zetter, B. R. (1995) *Gene (Amst.)* **153**, 249–254
40. Skowronek, M. H., Rotter, M., and Haas, I. G. (1999) *Biochemistry* **380**, 1133–1138
41. Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (1999) *Biol. Chem.* **380**, 1175–1182
42. Gething, M.-J. (1999) *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 465–472
43. Goto, Y., and Hamaguchi, K. (1981) *J. Mol. Biol.* **146**, 321–340

Refolding of inclusion body proteins

Marcus Mayer and Johannes Buchner*

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München,
Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching, Germany

*corresponding author:

Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität München,
Lichtenbergstrasse 4, 85747 Garching

Fax: +49 89 289 13345

Phone +49 89 289 13340

Email: johannes.buchner@ch.tum.de

keywords: recombinant protein expression, protein renaturation, refolding parameters, protein overproduction, protein aggregation

Abbreviations

Chaps, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate ; DTT, dithiothreitol; *E. coli*, *Escherichia coli*; EAN, ethylammonium nitrate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid (sodium salt); GdmCl, guanidine hydrochloride ; GSH, reduced glutathione ; GSSG, oxidized glutathione ; NaCl, sodium chloride; Ni²⁺-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PPS, 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate; SDS, sodium dodecylsulfate; SEC, size exclusion chromatography.

Abstract

Genome sequencing projects have lead to the identification of an enormous number of open reading frames that code for unknown proteins. Elucidation of the structure and function of these proteins makes it necessary to produce proteins fast, in high yields and at low cost. The recombinant expression of proteins in bacterial hosts often results in the formation of inclusion bodies. Here, the protein accumulates in large quantities separated from the cellular protein. However the protein is insoluble and inactive. Thus, it is necessary to establish efficient refolding protocols. Progress has been made recently in this field concerning refolding strategies, the use of low molecular weight additives as folding enhancers and the determination of optimum refolding parameters. Here we present an overview of the refolding technology and give a standard protocol for inclusion body refolding.

Introduction

The recombinant expression of genes is of great interest both for biotechnology and basic research in the context of protein function and structure. Thousands of DNA targets have been cloned and expressed but 40% of them were expressed in an insoluble form (1;2). Thus, soluble protein expression seems to be one of the main bottlenecks in this field. The most commonly used expression system is *E. coli*. Protein production in bacteria offers several advantages over other, mostly eucaryotic hosts such as short doubling times, well established methods for genetic manipulation and simple, inexpensive cultivation. However, the expressed proteins often accumulate in insoluble and inactive deposits called inclusion bodies. Inclusion body formation is a quite frequently observed phenomenon upon overexpression in *E. coli* (3). Especially for eucaryotic proteins or proteins containing disulfide bonds in the native state, inclusion bodies are observed in a host organism like *E. coli*. The different biology of prokaryotic protein production, especially the different codon usage favors the accumulation of nonnative folding intermediates. Furthermore, disulfide bonds cannot be formed in the reducing milieu of the *E.coli* cytoplasm. Therefore, proteins which require disulfide bonds for their stability cannot reach their native states.

During the folding process, starting from the unstructured polypeptide chain, secondary structure elements are formed first. These associate to the tertiary structure and, in the case of oligomeric proteins, the quaternary structure. For many proteins it has been observed, in addition to these intramolecular interactions, that the folding polypeptide chains can undergo unwanted intermolecular interactions which lead to the formation of aggregates. Especially when proteins are produced at unphysiologically high levels, folding competes with aggregation due to the exposure of hydrophobic surfaces (Fig. 1) (4). This is especially true in the case of proteolytically resistant proteins (5). One important factor in the folding process is the protein concentration. It has been shown that proteins tend to aggregate with increasing concentration whereas low protein concentrations favour the formation of the correctly folded

protein (6). This phenomenon has been quantified by a kinetic model with the yield of native protein as a function of the competition between folding and aggregation (7). Thus, a decrease in protein synthesis rate will lead to an increase in the yield of functional protein. This was confirmed experimentally by recombinant protein expression under suboptimal conditions, i.e. the reduction of the cultivation temperature from 37 °C to 30 °C in *E. coli* (8). Inclusion body formation was also observed for *E. coli* proteins upon overexpression in their natural environment (9). Thus, an important aspect for the aggregation of recombinantly overproduced proteins is the imbalance in the ratio of chaperones and folding helpers versus the folding polypeptide (10;11). In this context, it has been shown that heatshock genes coding for chaperones are overexpressed as a response to protein overproduction (12;13).

At first glance, the deposition of the target protein in insoluble, inactive forms seems to be a failure and dead end of the expression strategy. However, inclusion bodies also offer some advantages as the over-expressed protein is often highly enriched and protected from proteolytic degradation (14). In addition, the high level expression of certain proteins in a soluble form would be toxic to the host organism in some cases.

Since the formation of inclusion bodies was first observed already 25 years ago (15), a number of folding protocols for different proteins has been developed. In general, for complex proteins e.g. multidomain, oligomeric or disulfide-bonded proteins, several bottlenecks that need to be overcome during the folding process have been identified. Based on these findings it is possible to develop an efficient refolding strategy for a given protein by optimizing key parameters of the folding reaction.

Inclusion body morphology and physiology

Inclusion bodies are very dense particles formed of aggregated protein. *Inclusion* bodies can reach diameters of up to the μm range and can therefore be seen under the light microscope (Fig. 2).

Interestingly, in many cases only two large inclusion bodies are observed in an *E. coli* cell. They show amorphous or paracrystalline structure and contain almost exclusively the overexpressed protein (16). It has been observed that heat shock proteins (Hsps) expressed in response to protein overproduction are tightly coupled to inclusion bodies. In *E.coli*, two inclusion body associated proteins, termed IbpA and IbpB (for inclusion body protein A and B) have been found to be members of the small Hsp family (17).

The concept of inclusion bodies as irreversibly aggregated proteins may not apply for all forms of aggregated proteins in *E. coli*. In the case of beta-galactosidase, inclusion bodies can be redissolved *in vivo* (18). After protein expression was arrested, inclusion bodies were found to dissociate leading to the release of soluble and active protein. This implies that at least in this case there is an equilibrium between soluble and native protein and inclusion bodies as protein deposits.

Until now there is little information about the structural properties of inclusion bodies, but it is suggested that they possess at least some amount of secondary structure (6;19). Contaminating proteins in inclusion body preparation are often not part of the inclusion bodies themselves but result from copurification of non-solubilized membrane proteins. These contaminants can be separated effectively during inclusion body preparation.

Inclusion body preparation and purification

The isolation of inclusion bodies is generally performed by centrifugation because of their relative high density (1.3 mg/ml) compared to other cellular components (20). Only intact cells would pellet together with the inclusion bodies. After cell disruption by high pressure dispersion and a subsequent lysozyme treatment, chromosomal DNA is digested by DNase treatment (10 µg/ml DNase I, 3 mM MgCl₂, 30 min, 25 °C). Then, detergent such as Triton X-100 at a concentration of 2% (v/v) is added to the lysate to solubilize lipids and membrane proteins (21). The presence of high salt concentrations (e.g. 0.5 M NaCl) is helpful for solubilizing contaminating proteins. After incubation for 30 min at room temperature, the inclusion body pellet can be harvested by centrifugation (25 000 g, 60 min, 4°C).

Subsequently, the inclusion body pellet is resuspended and homogenized in a buffer containing 20 mM EDTA to remove contaminants. This washing step is repeated several times and the resulting pellet is homogenized well between the centrifugation steps to improve the purity of the inclusion body preparation. It should however be noted that the presence of contaminating proteins in the final inclusion body preparation does not prevent successful renaturation.

Protein denaturation

Before starting renaturation, the inclusion bodies need to be solubilized by strong denaturants. Either 6 M GdmCl or 8 M urea are normally used. Although there are several different solubilization methods using lower denaturant concentrations in combination with high or low pH values, this method is the most appropriate starting point. The solubilization buffer should also contain a reducing agent e.g. DTT to keep cysteines reduced, even for proteins lacking disulfide bonds in the native state but containing free cysteines. The time of solubilization depends on the temperature and on the inclusion body concentration used. Normally, 2 h of

incubation at room temperature at a protein concentration of 50 mg/ml should be sufficient.¹ Various buffer substances can be chosen for denaturation. However, for efficient reduction an alkaline pH (> 7.5) is required.

In the case of proteins containing disulfides it can be useful to modify the denatured protein by creating mixed disulfides with glutathione. To this end, after denaturation, the protein is incubated with an excess of GSSG. This results in the reversible derivatisation of the cysteines with glutathione. After dialysis against 6 M GdmCl, the protein is ready for refolding. This procedure has been used successfully in the case of an antibody Fab fragment (23). In this state the protein is more stable and in the case of pulse renaturation (see chapter below) the problem of increasing the concentration of reducing agent with every pulse added is avoided.

The refolding process

Renaturation requires the decrease of the high concentrations of denaturant and reducing agents. This is achieved by either dilution or a buffer-exchange step. The method most commonly used is to dilute the denatured protein in a large volume of refolding buffer (typically 100fold). It is necessary to provide good mixing during dilution to prevent intermolecular interactions and aggregation.

The optimum protein concentration during refolding has to be determined experimentally for the target protein. In this context, aggregation can be monitored by the increase in absorbance of the solution after addition of the unfolded protein or by determining the soluble and insoluble fraction of the refolding solution by SDS PAGE after centrifugation (25 000 g, 60 min, 4 °C). Because the solubilized inclusion body proteins are refolded typically at high dilution (e.g. 10 – 100 µg/ml), additional steps to increase the concentration after renaturation are required.

¹ Protein concentrations can be determined by Bradford assay (22)

Continuous refolding methods have been developed (24) where the protein is gradually added to the renaturation buffer. Buffer exchange can also be done by diafiltration (25) and dialysis (26) using ultrafiltration membranes. These methods have the disadvantage that the refolding protein often sticks to membranes or dialysis tubes due to hydrophobic interactions. Also size-exclusion chromatography (SEC) has been used successfully for refolding. This method leads to an effective removal of the denaturant (27) including a first purification step, but is not suitable for large volumes. Because of the limitations outlined above, dilution seems to be the method of choice for most proteins.

Adding the protein in multiple steps to the refolding buffer, known as “pulse renaturation”, has been shown to be successful in many cases (16;28;29). This method allows to reach higher end concentrations of protein without increasing the concentration of still unfolded and aggregation-prone protein to a level where aggregation is favoured. As outlined above, aggregation is strongly concentration-dependent, while folding is concentration-independent. Therefore, after dilution of the protein, aggregation is rapid at high protein concentrations, whereas reactivation is a much slower process. However, aggregation does not occur during the entire time course of refolding. Aggregation-prone intermediates form early; further intermediates downstream the folding pathway seem to be protected against interchain interactions leading to aggregation (Fig 3 A). Therefore it is possible to keep the concentration of the aggregation-sensitive intermediate low by a step-wise addition. It is important to choose the right time between the pulses to prevent an accumulation of interchain interacting intermediates (Fig. 3 B). This procedure allows to reach high volume yields of the target protein. Of course, also here, an upper limit for the number of productive pulses exists (Fig. 3 C). However, this number seems to be strongly dependent on the respective protein.

It is important to employ a functional assay for the protein of interest to test the successful regain of the native structure. These assays have to be performed under identical solvent conditions.

Optimizing renaturation conditions

Temperature is an important parameter that influences folding. In most cases, a higher refolding yield and less aggregation can be observed at lower temperatures (23). This decreases the folding speed and hydrophobic interaction whereas high temperatures favour aggregation (30). The optimum refolding temperature must be determined experimentally for each target protein (Fig. 4 A).

For the refolding of disulfide-bonded proteins, the presence of an adequate redox system has been shown to be essential for functional refolding (Fig. 4B). In many cases the formation of the correct disulfide bond is the limiting step during the folding process. This process can be influenced by the use of a suitable redox system consisting of oxidized and reduced thiol reagents which allows disulfide reshuffling, i.e. wrong disulfide bonds will be reduced again because they are not protected by the correct structural context (23;31-34). One of the most frequently used redox couples is oxidized and reduced glutathione (GSSG/GSH). However, in some cases, smaller redox couples seem to be more useful. For example during renaturation of human proinsulin cystein/cystine seems to be the most favourable redox system (35). The di-thiol reagent VectraseTM-P (BioVectra) also allows to achieve high renaturation yields (36). To suppress aggregation, small chemical compounds have been used successfully for different target proteins. A very common additive is L-arginine (Fig. 4 C). Although the effect of arginine in refolding proteins is not yet understood in detail, it is assumed that arginine destabilizes nonnative conformations (37). Provided that the correctly structured species is not affected, the addition of high concentrations of arginine allows reshuffling of molecules trapped in nonproductive side reactions (37). Other low molecular weight additives are

denaturants such as urea or GdmCl and detergents like SDS, Chaps or Triton X-100. Their effects on refolding and the concentration range in which they can be used have been reviewed recently (29). In addition, nondetergent sulfobetaines prevent aggregation and improve refolding effectively (38). A large number of new nondetergent sulfobetaines has been designed which are efficient in improving renaturation. In the refolding of the human p53 tumor suppressor protein the sulfobetain 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate (PPS) has been used successfully (39).

The ionic liquid, ethylammonium nitrate (EAN) has been shown to have a positive effect on the refolding of denatured lysozyme with renaturation yields reaching 90%. The ethyl group of EAN interacts with the hydrophobic portion of the protein and protects it from intermolecular association, while the charged portion of the salt stabilizes the electrostatic interactions of its secondary structure (40).

The pH of the solution is also an important factor. All proteins have characteristic pH range where they can fold efficiently and reach their active state (Fig. 4 D). For proteins containing disulfide bonds, an alkaline pH is necessary to allow formation and reshuffling of disulfide bonds.

It should be noted here, that it is not possible to give a general recipe or a set of parameters optimal for any protein. Finding out the best conditions for refolding of a specific protein can be complicated and laborious. If one wanted to vary 12 parameters systematically, which is not necessary for many proteins, this would require 4 096 experiments. Therefore factorial matrix screens for determining the optimum renaturation conditions have been developed (41;42). Using only a fraction of the full factorial is sufficient to determine multifactor interactions (43). Having found the parameters that have the greatest impact on the refolding yield, the folding conditions can be optimized using a subset of the original folding conditions. Although interactions of different folding parameters are neglected and it is assumed that the refolding yield depends linearly on the change of the folding factor, which

must not be true in all cases, the use of such a fractional factorial design for determining the optimum folding conditions is a helpful tool.

Additional strategies

Refolding of denatured proteins on a column may be a useful option. Typically, this strategy is used for fusion proteins containing suitable tags for affinity binding to a column. Binding occurs under denaturing conditions and refolding is initiated by going from denaturing to native conditions, using flat gradients and slow flow rates. After refolding, the protein is eluted. Matrix-assisted refolding offers some advantages, i.e. aggregation is prevented by the binding to a column, the target protein already undergoes a first purification step and the protein can be concentrated by elution.

The most common fusion tag still binding under denaturing conditions is the hexa-histidine tag for metal chelate affinity chromatography using a Ni²⁺-NTA resin. Matrix-assisted refolding has been shown to be the method of choice, for example in the case of polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa* (44). Other tags have also been used successfully. Using cellulose binding domain from *Clostridium thermocellum* as a fusion tag, which retains its specific cellulose binding capability up to 6 M urea, a single chain Fv antibody has been refolded efficiently (45). Polyionic peptides are used as fusion tags for the purification and refolding of proteins (46). For the purification of a viral coat protein, a tag containing eight glutamic acid residues was used which allowed efficient refolding and purification by ion-exchange chromatography (46;47).

A new approach for protein refolding is folding proteins inside a micelle. Micelles provide a separate folding volume for the protein where intermolecular interactions and aggregation are suppressed and therefore higher protein concentrations during folding can be achieved. As a model, denatured RNase A was refolded in reversed micelles formulated with sodium di-2-ethylhexyl sulfosuccinate in isooctane (48). The denatured RNase A was dissolved into the

reversed micellar solution under ultrasonic irradiation. With this method a high concentration of protein during refolding could be achieved. At 4.8 mg/ml RNase A, a renaturation yield of 100% was achieved and after recovery from the micelles almost 60% of active protein was obtained.

Molecular chaperones and folding helpers

In vivo, molecular chaperones, protein disulfide isomerases and peptidyl prolyl isomerases are known to prevent protein aggregation and enhance the correct folding and oxidation. This has to be a very effective process considering the very unfavourable folding conditions *in vivo* (e.g. high protein concentrations, high temperature) and the severe impact of misfolding and aggregation on the metabolism. The principal property of molecular chaperones is their ability to bind unfolded or partially folded polypeptides and therefore to suppress aggregation effectively. The low specificity of the hydrophobic interaction and the conformational flexibility of folding intermediates ensures that chaperones bind to a large variety of polypeptides (49). The *in vivo* co-expression of chaperones increased the solubility of recombinantly expressed proteins (50-53). Especially the overproduction of GroEL/ES and DnaK has been proofed to be helpful (54). Protein disulfide isomerase (PDI), when it was co-expressed, had an positive effect on the expression of an antibody Fab fragment (55) and bovine pancreatic trypsin inhibitor (56). But there are also a number of cases where co-expression of a restricted number of chaperones was not successful. For proper folding a whole network of chaperones and other folding helpers as it is present and active *in vivo* could be necessary. Nevertheless, it is tempting to test molecular chaperones for optimizing the refolding of proteins *in vitro*. In the refolding of an antibody fragment it had been shown that the ER Hsp70 homologue BiP and PDI have an cooperative effect (57). Because of the high costs the use of these proteins will be restricted to small analytical refolding experiments and probably not be suitable for large scale purposes if the chaperone components cannot be

recycled. In principle, however, it seems possible to re-use immobilized chaperone compounds for refolding *in vitro* (58).

Purification of refolded proteins

In most cases studied, the renaturation yield does not depend on the purity of the denatured protein. Therefore it is not necessary to purify the protein under denaturing conditions prior to refolding except in special cases, e.g. where degradation during refolding is observed.

After refolding, protein purification is performed under native conditions using conventional techniques such as ion exchange, size exclusion or hydrophobic interaction chromatography. Often, the isolated and refolded protein from inclusion body preparations is quite pure so that further purification may be limited to one or two steps. Incorrectly folded species can be separated easily from the native protein because they differ in the exposure of hydrophobic side chains and the charge distribution, among others.

A standard protocol for protein refolding

Importantly, the critical parameters of the refolding process have to be varied for each unfolded protein. Taking this into concern and knowing about the effects of the different parameters discussed above, the following procedure can be seen as a basic protocol and a guideline for optimizing the renaturation process. Figure 5 shows a schematic overview of the different steps involved.

In most cases dilution either in a single step or in a pulse renaturation seems to be the most efficient and reproducible way to dilute the denaturant and establish refolding conditions. The protein concentration is normally kept low (10-100 µg/ml). Renaturation conditions must be carefully optimized regarding solvent parameters like temperature, pH and ionic strength. Refolding is performed at temperatures between 5 and 15 °C. It is helpful to perform small-scale screening experiments to find the optimum buffer system for refolding.

For proteins containing disulfide bonds, a redox system should be present, because oxidation by air even in the presence of a metal catalysator is not efficient enough in most cases. Low molecular thiol reagents like glutathione or cysteine are suitable for this purpose. The ratios of reduced to oxidized compounds should be between 3:1 and 1:1 and total thiol concentrations of 5-15 mM were found to be optimal (23;29;59;60). The addition of small molecular compounds like the popular amino acid L-arginine can suppress aggregation (58). In some cases, the presence of specific co-factors can be required. For example, refolding of the human p53 tumor suppressor protein requires the presence of Zn^{2+} for effective renaturation (39).

In the case of pulse renaturation it must be considered that the final concentration of denaturant increases with every pulse added. The increase in denaturant concentration is the main limitation in achieving higher protein concentrations with this method. The concentration of reducing agent is also increased with every pulse added. Therefore GSSG must be added with every pulse to keep the redox conditions equal. In some cases it may be advantageous to overcome the problem by producing mixed disulfides prior renaturation as outlined above.

Perspectives

The main obstacles for expressing recombinant proteins in a procaryotic host like *E.coli* are the inability to perform posttranslational modifications, the lack of chaperones in the case of protein expression at unphysiological high amounts and the redox conditions in the bacterial cytoplasm which are unfavourable for forming disulfide bonds.

Several strategies are emerging, which may allow to avoid inclusion body formation. There have been successful attempts to overcome the problem of the reducing environment of the cytoplasm by using *E. coli* knockout strains lacking parts of the glutaredoxin or thioredoxin system (61;62). These knockout strains show a less reducing milieu in the cytoplasm and

allow the formation of structurally important disulfide bonds in some model proteins tested. It remains to be seen whether these strains combined with appropriate chaperones will allow to achieve protein yields so far obtained with the expression in inclusion bodies.

The co-expression of chaperones seems to be a helpful tool in achieving soluble protein expression. Different experiments have been performed co-expressing chaperones and other folding helpers, that lead to an increased yield in soluble and active protein (11;55;56;63).

Nevertheless, recombinant expression of proteins resulting in inclusion bodies and subsequent refolding will still remain an important method especially for large scale applications.

Although the optimum conditions for protein renaturation differ from protein to protein, it is possible to find out suitable conditions for the target protein by the strategies outlined above and by considering the growing knowledge of the principles of protein folding and aggregation. Ongoing studies in this field will further improve existing refolding strategies.

Thus, recombinant expression of proteins in inclusion bodies offers an efficient way of protein production for structural therapeutic and industrial applications.

Figure Legends

Figure 1

Protein overexpression leads to protein aggregation due to the lack of a sufficient amount of chaperones and the high concentration of folding intermediates.

Figure 2

E. coli cells containing inclusion bodies. The recombinant protein deposits are the dark spherical particles in the bacterial cytoplasm. They can amount up to 50% of the volume of the bacteria.

Figure 3

“Pulse renaturation” enhances the yield of properly folded proteins. (A) By stepwise protein addition the concentration of aggregation-sensitive intermediates (I_1) is kept low. Later intermediates (I_2 , I_3) seem to be protected against unwanted interchain interactions and aggregation. (B) The time between the different pulses has to be analyzed for optimum refolding. In this example, the maximum renaturation yield for one sample is set to 100%. Doubling of the amount of unfolded protein does not result in an increase in refolding. However, when the protein is added at later time points an increase in refolding is observed. After 100 min, the refolding yields correspond to those obtained in two independent reactions performed at low protein concentrations. (C) First pulses can be done with nearly no loss of renaturation yield (refolding yield of first pulse is normalized to 100%). Later on, also “pulse renaturation” reaches its limits.

Figure 4

Optimum folding conditions must be determined experimentally. The optimum curves for four important folding parameters, the temperature (A), the redox conditions i.e. the concentration of GSSG (GSH concentration kept constant at 5 mM) (B), the concentration of L-arginine (C) and the pH (D) are shown for a certain target protein.

Figure 5

Flow-chart of a standard protocol for inclusion body preparation and refolding.

Reference List

1. Service, R. F. (2002) *Science* **298**, 948-950
2. Christendat, D., Yee, A., Dharamsi, A., Kluger, Y., Savchenko, A., Cort, J. R., Booth, V., Mackereth, C. D., Saridakis, V., Ekiel, I., Kozlov, G., Maxwell, K. L., Wu, N., McIntosh, L. P., Gehring, K., Kennedy, M. A., Davidson, A. R., Pai, E. F., Gerstein, M., Edwards, A. E., and Arrowsmith, C. H. (2000) *Nature Structural Biology* **7**, 903-909
3. Marston, F. A. (1986) *Biochem.J.* **240**, 1-12
4. King, J., Haase-Pettingell, C., Robinson, A. S., Speed, M., and Mitraki, A. (1996) *FASEB J.* **10**, 57-66
5. Corchero, J. L., Viaplana, E., Benito, A., and Villaverde, A. (1996) *J.Biotechnol.* **48**, 191-200
6. Zettlmeissl, G., Rudolph, R., and Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* **18**, 5567-5571
7. Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H., and Buchner, J. (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 825-829
8. Schein, C. H. and Noteborn, M. H. M. (1988) *Bio/Technology* **6**, 291-294
9. Cecilian, F., Caramori, T., Ronchi, S., Tedeschi, G., Mortarino, M., and Galizzi, A. (2000) *Protein Expr.Purif.* **18**, 64-70
10. Lorimer, G. H. (1996) *FASEB J.* **10**, 5-9
11. Thomas, J. G. and Baneyx, F. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 11141-11147
12. Goff, S. A. and Goldberg, A. L. (1985) *Cell* **41**, 587-595
13. Jurgen, B., Lin, H. Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M., and Schweder, T. (2000) *Biotechnol.Bioeng.* **70**, 217-224
14. Cheng, Y. S., Kwoh, D. Y., Kwoh, T. J., Soltvedt, B. C., and Zipser, D. (1981) *Gene* **14**, 121-130
15. Prouty, W. F., Karnovsky, M. J., and Goldberg, A. L. (1975) *J.Biol.Chem.* **250**, 1112-1122
16. Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1998) *Curr.Opin.Biotechnol.* **9**, 497-501
17. Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K., and Easton, A. M. (1992) *J.Bacteriol.* **174**, 6938-6947
18. Carrio, M. M. and Villaverde, A. (2001) *FEBS Lett.* **489**, 29-33
19. Oberg, K., Chrnyk, B. A., Wetzel, R., and Fink, A. L. (1994) *Biochemistry* **33**, 2628-2634
20. Mukhopadhyay, A. (1997) *Adv.Biochem.Eng Biotechnol.* **56**, 61-109

21. Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H., and Jaenicke, R. (1997) Folding Proteins. In Creighton, T. E., editor. *Protein Function, a Practical Approach*, IRL Press, Oxford
22. Bradford, M. M. (1976) *Anal.Biochem.* **72**, 248-254
23. Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 157-162
24. Katoh, S. and Katoh, Y. (2000) **35**, 1119-1124
25. Varnerin, J. P., Smith, T., Rosenblum, C. I., Vongs, A., Murphy, B. A., Nunes, C., Mellin, T. N., King, J. J., Burgess, B. W., Junker, B., Chou, M., Hey, P., Frazier, E., MacIntyre, D. E., Van der Ploeg, L. H., and Tota, M. R. (1998) *Protein Expr.Purif.* **14**, 335-342
26. West, S. M., Chaudhuri, J. B., and Howell, J. A. (1998) *Biotechnol.Bioeng.* **57**, 590-599
27. Fahey, E. M., Chaudhuri, J. B., and Binding, P. (2000) *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **737**, 225-235
28. Buchner, J., Pastan, I., and Brinkmann, U. (1992) *Anal.Biochem.* **205**, 263-270
29. De Bernardez, C. E., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1999) *Methods Enzymol.* **309**, 217-236
30. Chalmers, J. J., Kim, E., Telford, J. N., Wong, E. Y., Tacon, W. C., Shuler, M. L., and Wilson, D. B. (1990) *Appl.Environ.Microbiol.* **56**, 104-111
31. Rajesh Singh, R. and Appu Rao, A. G. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta* **1597**, 280-291
32. Thies, M. J., Talamo, F., Mayer, M., Bell, S., Ruoppolo, M., Marino, G., and Buchner, J. (2002) *J.Mol.Biol.* **319**, 1267-1277
33. Chatrenet, B. and Chang, J. Y. (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 3038-3043
34. Wetlaufer, D. B., Branca, P. A., and Chen, G. X. (1987) *Protein Eng* **1**, 141-146
35. Winter, J., Klappa, P., Freedman, R. B., Lilie, H., and Rudolph, R. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 310-317
36. Woycechowsky, K. J., Wittrup, K. D., and Raines, R. T. (1999) *Chem.Biol.* **6**, 871-879
37. Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1989) Folding Proteins. In Creighton, T. E., editor. *Protein Structure, a Practical approach*, IRL Press, Oxford,
38. Goldberg, M. E., Expert-Bezancon, N., Vuillard, L., and Rabilloud, T. (1996) *Fold.Des* **1**, 21-27
39. Bell, S., Hansen, S., and Buchner, J. (2002) *Biophys.Chem.* **96**, 243-257
40. Summers, C. A. and Flowers, R. A. (2000) *Protein Sci.* **9**, 2001-2008

41. Armstrong, N., de Lencastre, A., and Gouaux, E. (1999) *Protein Sci.* **8**, 1475-1483
42. Chen, G. Q. and Gouaux, E. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13431-13436
43. Box, G. E. P., Hunter, W. G., and Hunter, J. S. (1978) *Statistics for experimenters*, New York: John Wiley & Sons, Inc.,
44. Rehm, B. H., Qi, Q., Beermann, B. B., Hinz, H. J., and Steinbuchel, A. (2001) *Biochem.J.* **358**, 263-268
45. Berdichevsky, Y., Lamed, R., Frenkel, D., Gophna, U., Bayer, E. A., Yaron, S., Shoham, Y., and Benhar, I. (1999) *Protein Expr.Purif.* **17**, 249-259
46. Stempfer, G., Holl-Neugebauer, B., Kopetzki, E., and Rudolph, R. (1996) *Nat.Biotechnol.* **14**, 481-484
47. Stubenrauch, K., Bachmann, A., Rudolph, R., and Lilie, H. (2000) *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* **737**, 77-84
48. Goto, M., Hashimoto, Y., Fujita, T., Ono, T., and Furusaki, S. (2000) *Biotechnol.Prog.* **16**, 1079-1085
49. Walter, S. and Buchner, J. (2002) *Angew.Chem.Int.Ed.* **41**, 1098-1113
50. Levy, R., Weiss, R., Chen, G., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (2001) *Protein Expr.Purif.* **23**, 338-347
51. Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1998) *Appl.Environ.Microbiol.* **64**, 1694-1699
52. Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., and Yura, T. (2000) *Appl.Environ.Microbiol.* **66**, 884-889
53. Goloubinoff, P., Gatenby, A. A., and Lorimer, G. H. (1989) *Nature* **337**, 44-47
54. Thomas, J. G., Ayling, A., and Baneyx, F. (1997) *Appl.Biochem.Biotechnol.* **66**, 197-238
55. Humphreys, D. P., Weir, N., Lawson, A., Mountain, A., and Lund, P. A. (1996) *FEBS Lett.* **380**, 194-197
56. Ostermeier, M., De Sutter, K., and Georgiou, G. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 10616-10622
57. Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R., and Buchner, J. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 29421-29425
58. Buchner, J., Brinkmann, U., and Pastan, I. (1992) *Biotechnology (N.Y.)* **10**, 682-685
59. Tran-Moseman, A., Schauer, N., and De Bernardez, C. E. (1999) *Protein Expr.Purif.* **16**, 181-189
60. Wetlaufer, D. B. and Xie, Y. (1995) *Protein Sci.* **4**, 1535-1543

61. Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 15661-15667
62. Stewart, E. J., Aslund, F., and Beckwith, J. (1998) *EMBO J.* **17**, 5543-5550
63. Cole, P. A. (1996) *Structure.* **4**, 239-242

Figure 1

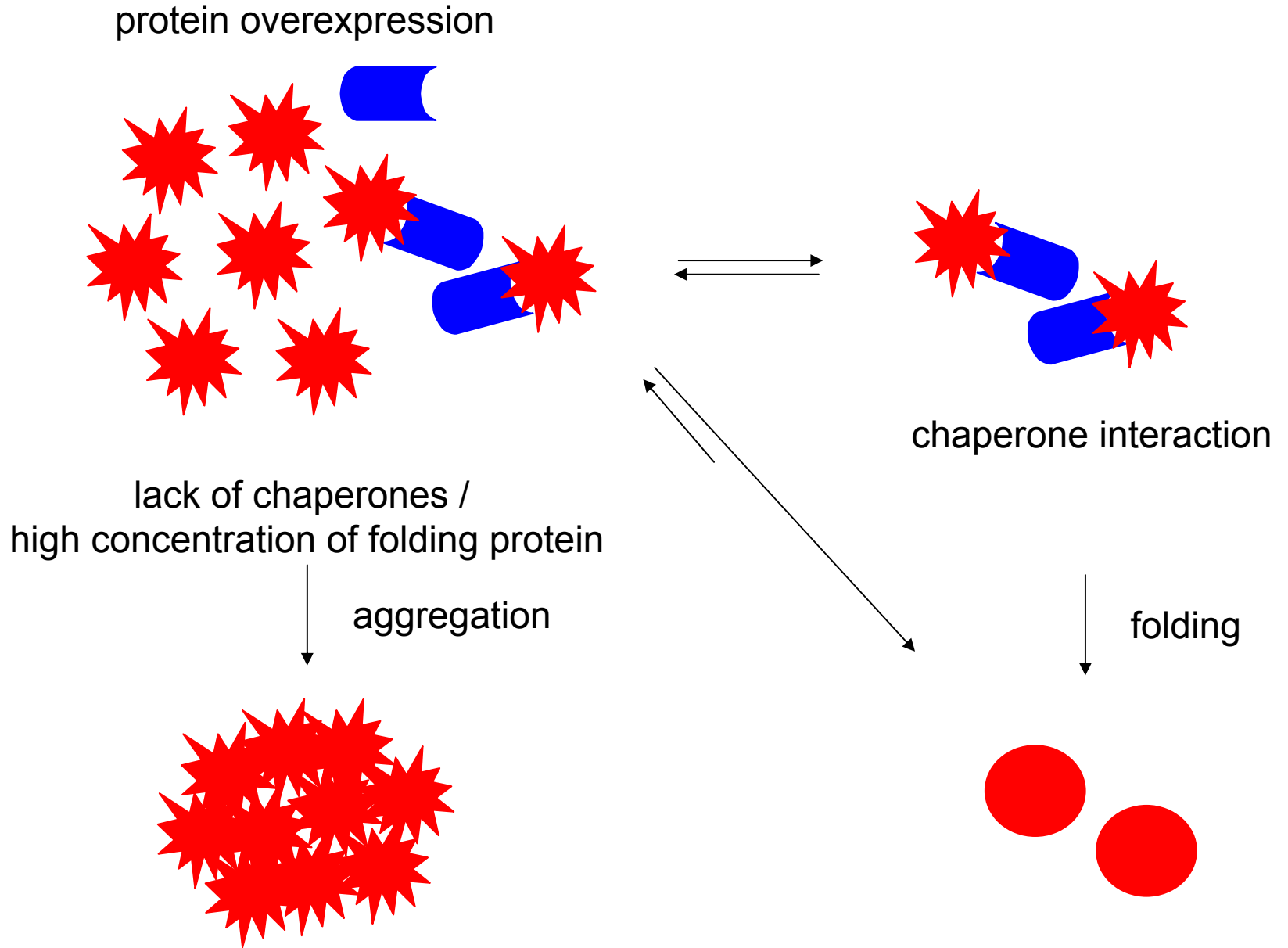


Figure 2



Figure 3 A

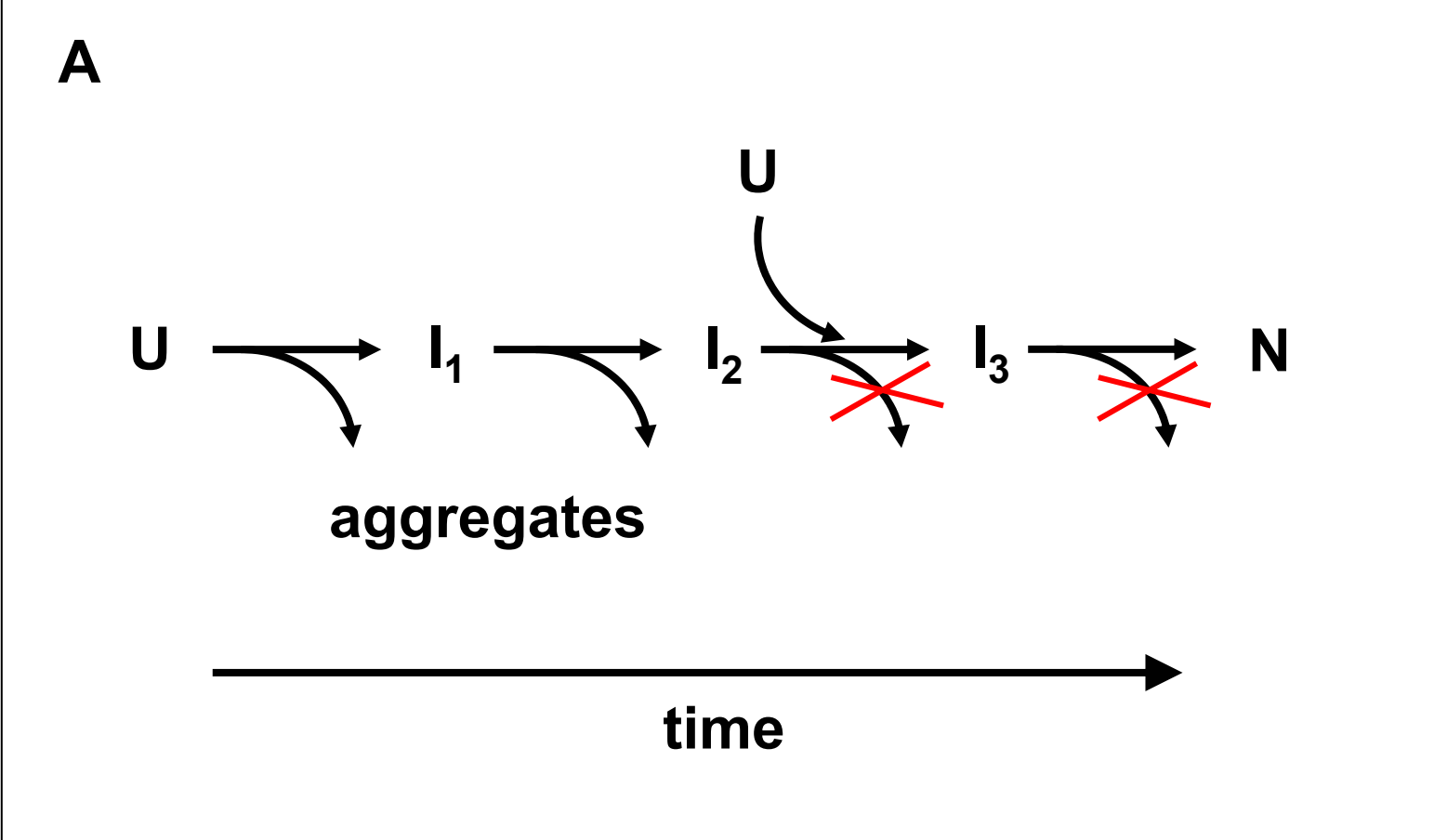


Figure 3 B

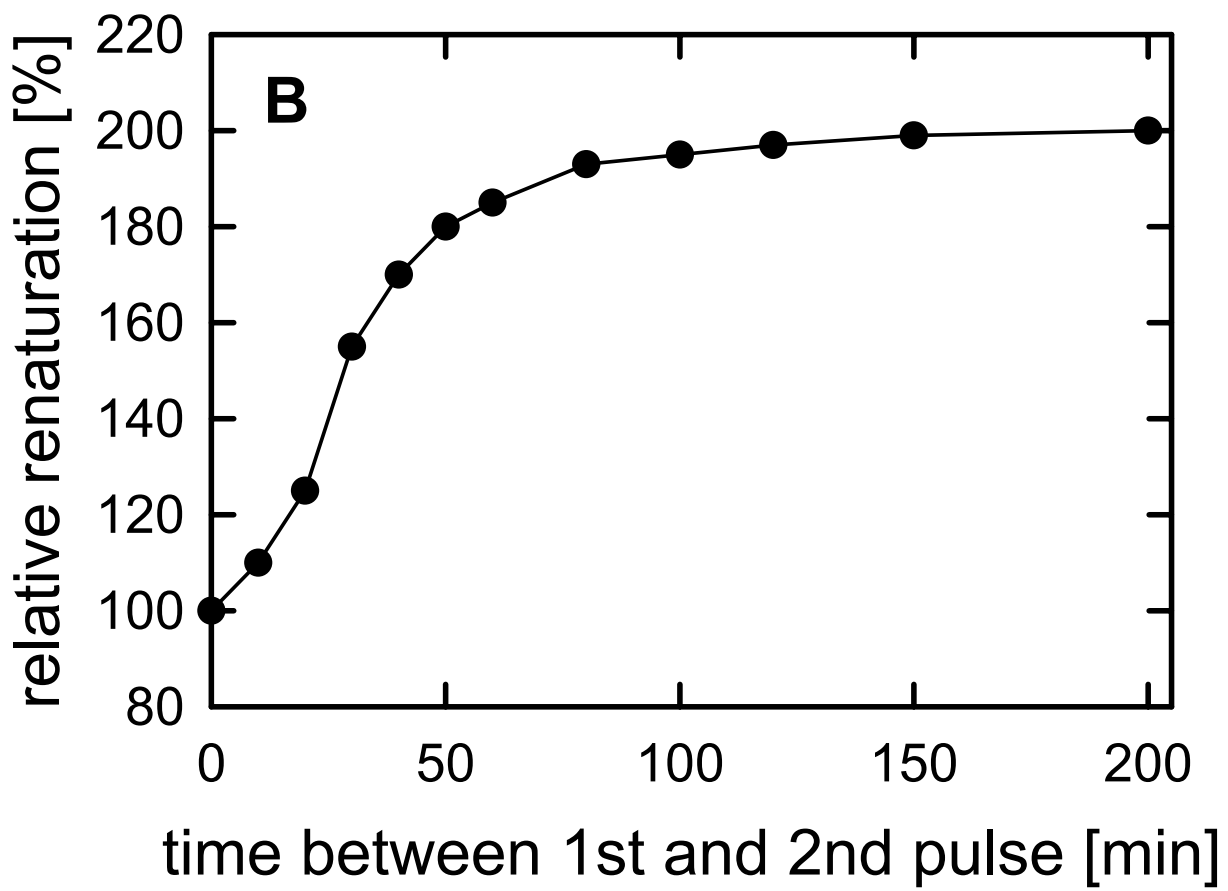


Figure 3 C

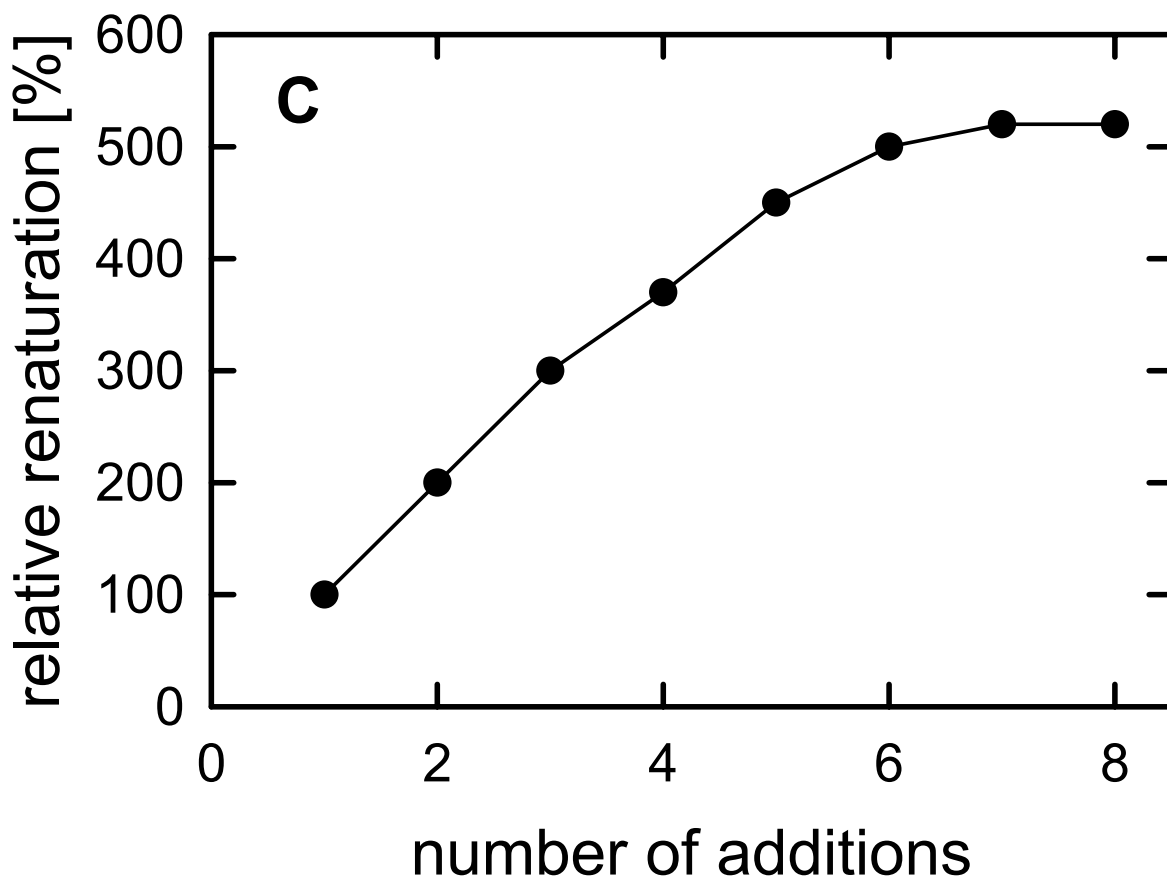


Figure 4 A

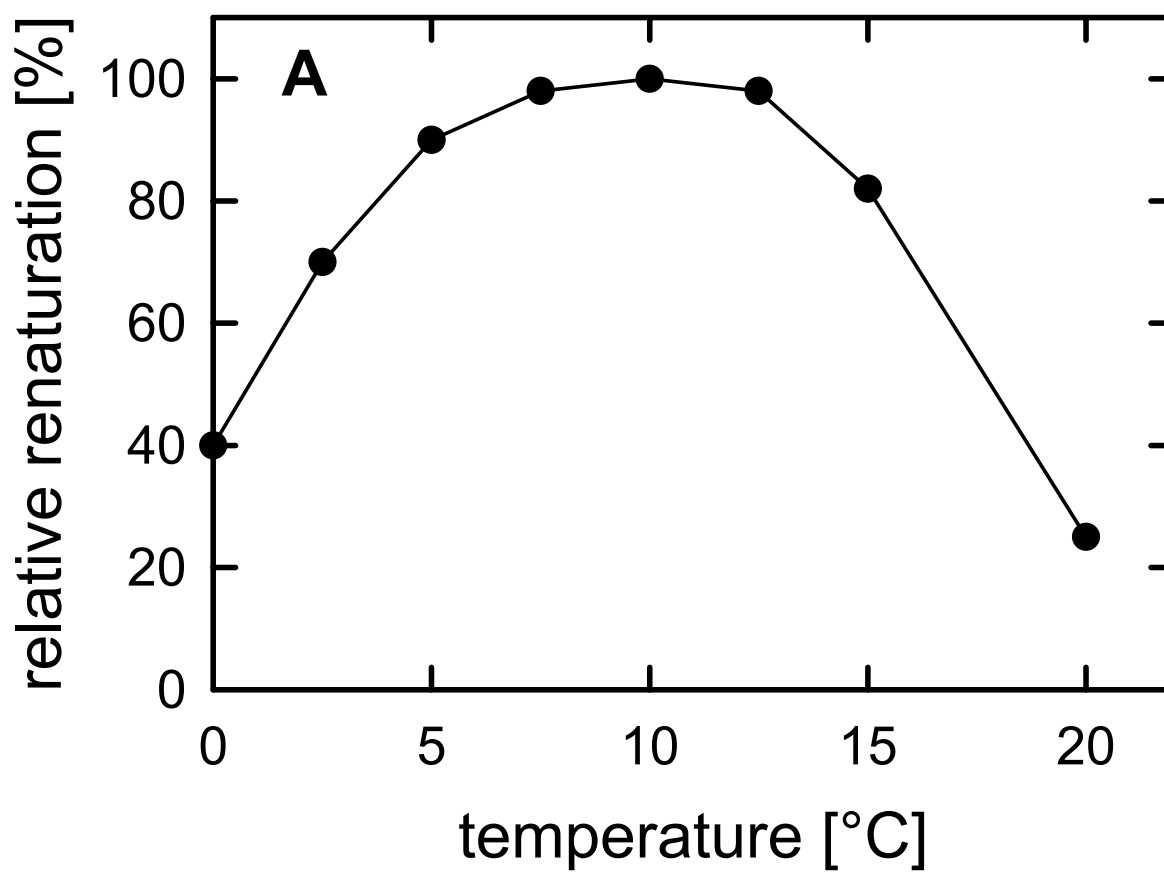


Figure 4 B

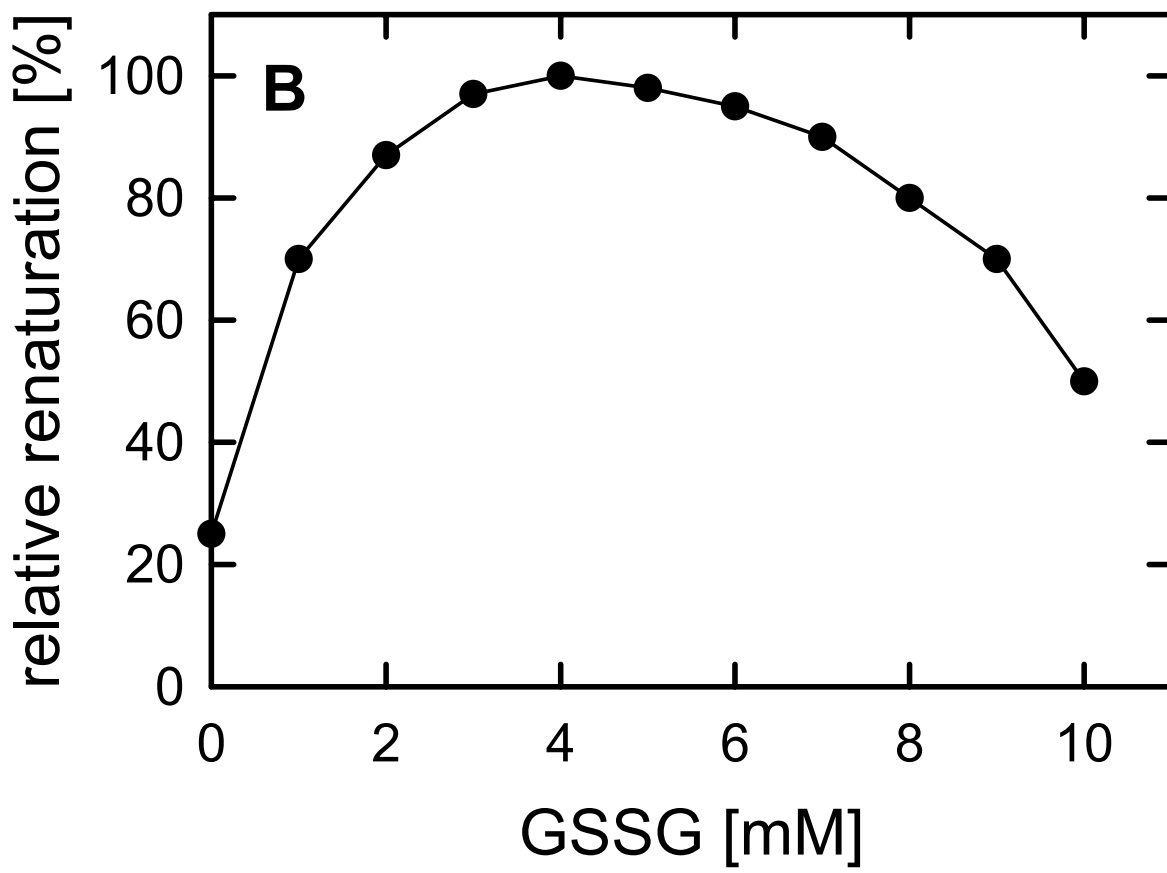


Figure 4 C

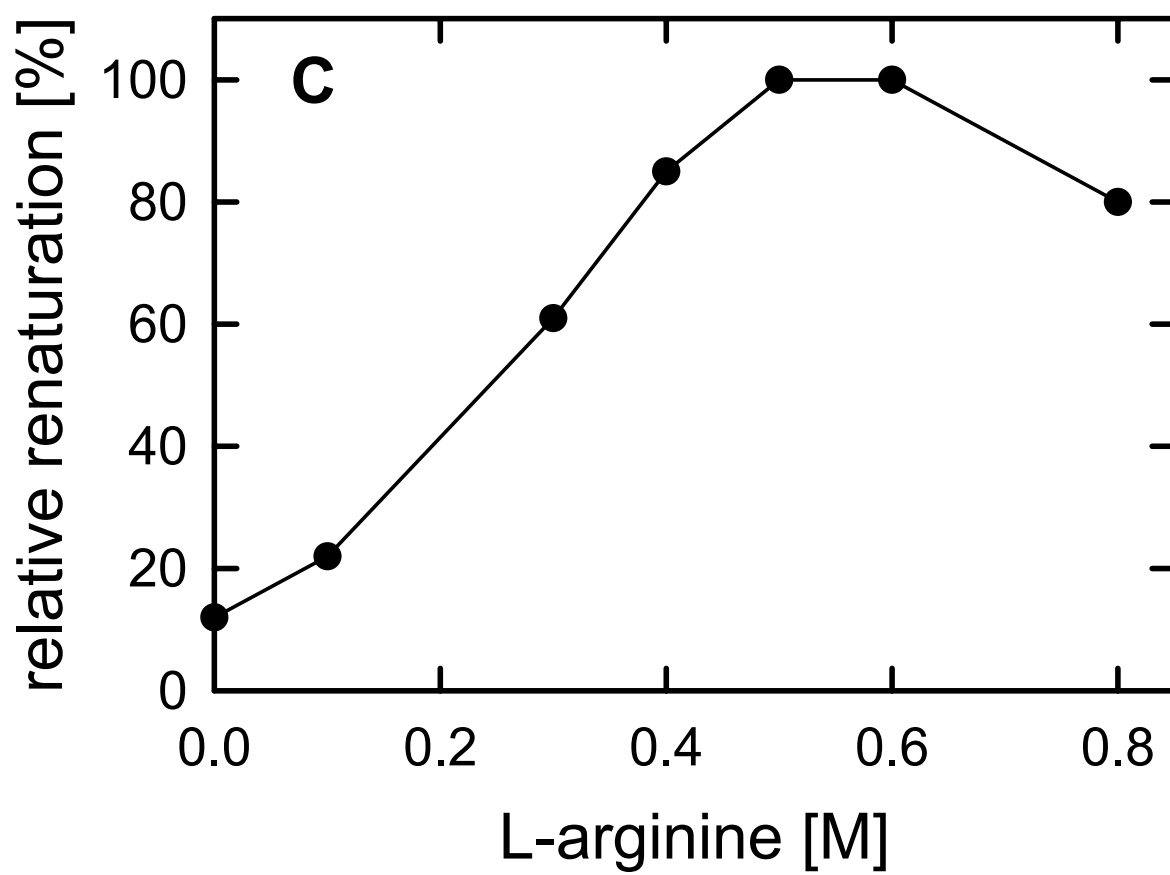


Figure 4 D

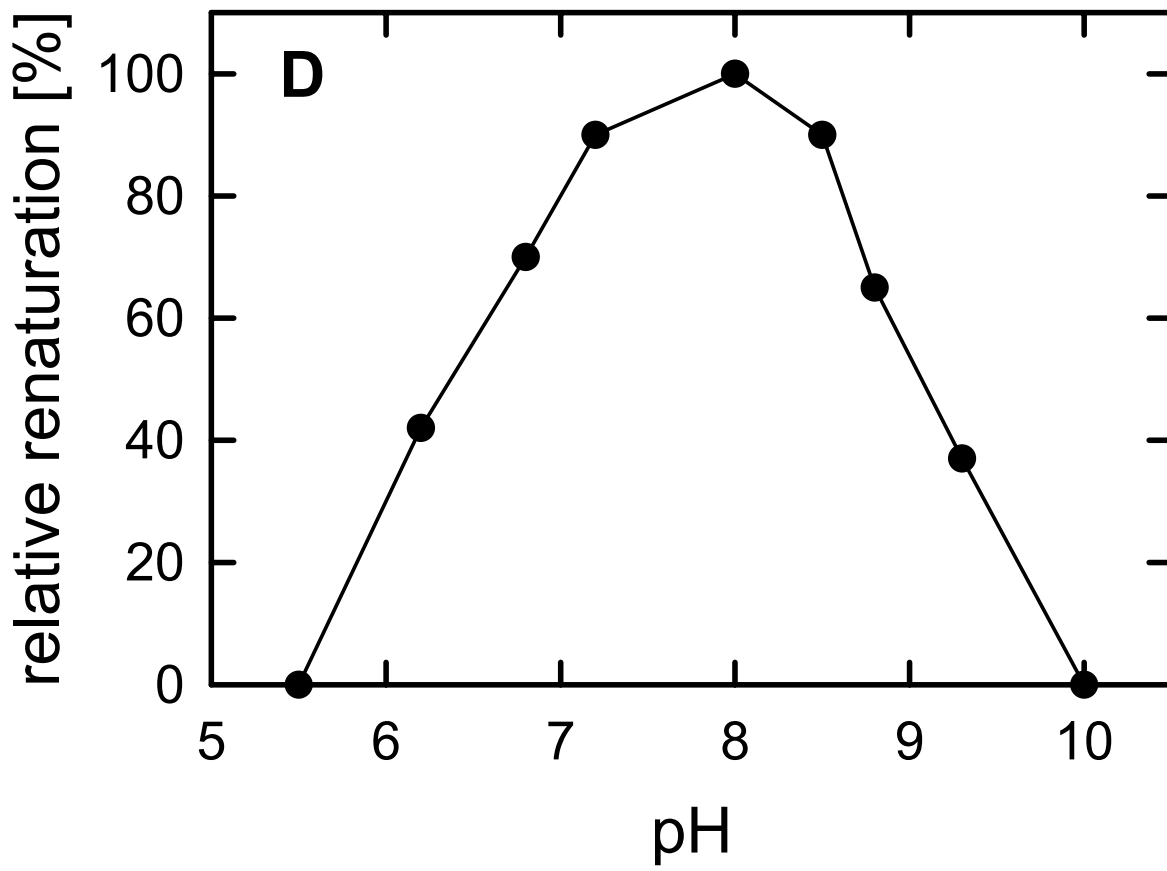
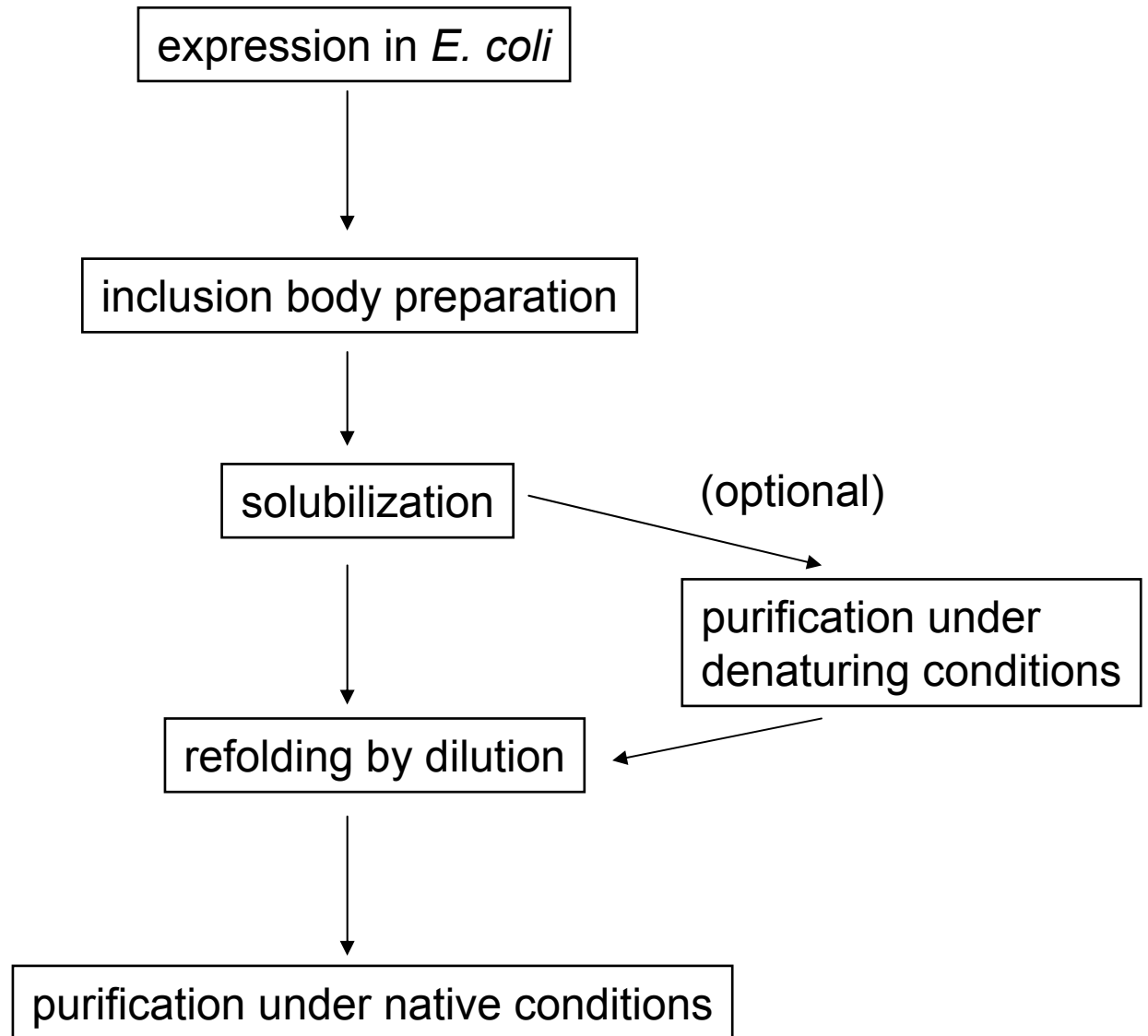


Figure 5



Folding and Oxidation of the Antibody Domain C_H3

Michael J.W. Thies¹, Fabio Talamo^{2,3}, Marcus Mayer¹, Stefan Bell¹
Margherita Ruoppolo⁴, Gennaro Marino^{2,3} and Johannes Buchner^{1*}

¹Institut für Organische Chemie und Biochemie Technische Universität München, Lichtenbergstrasse 4 85747 Garching, Germany

²Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica Università di Napoli "Federico II", Napoli, 80134 Italy

³Centro Internazionale di Servizi di Spettrometria di Massa, CNR-Università di Napoli, "Federico II" Napoli, 80131 Italy

⁴Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università degli Studi di Napoli, "Federico II" Napoli, 80131 Italy

The non-covalent homodimer formed by the C-terminal domains of the IgG1 heavy chains (C_H3) is the simplest naturally occurring model system for studying immunoglobulin folding and assembly. In the native state, the intrachain disulfide bridge, which connects a three-stranded and a four-stranded β -sheet is buried in the hydrophobic core of the protein. Here, we show that the disulfide bridge is not required for folding and association, since the reduced C_H3 domain folds to a dimer with defined secondary and tertiary structure. However, the thermodynamic stability of the reduced C_H3 dimer is much lower than that of the oxidized state.

This allows the formation of disulfide bonds either concomitant with folding (starting from the reduced, denatured state) or after folding (starting from the reduced dimer). The analysis of the two processes revealed that, under all conditions investigated, one of the cysteine residues, Cys 86, reacts preferentially with oxidized glutathione to a mixed disulfide that subsequently interacts with the less-reactive second thiol group of the intra-molecular disulfide bond. For folded C_H3, the second step in the oxidation process is slow. In contrast, starting from the unfolded and reduced protein, the oxidation reaction is faster. However, the overall folding reaction of C_H3 during oxidative folding is a slow process. Especially, dimerization is slow, compared to the association starting from the denatured oxidized state. This deceleration may be due to misfolded conformations trapped by the disulfide bridge.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Keywords: immunoglobulin; cysteine residues; oxidation; protein stability; conformation

*Corresponding author

Introduction

Antibodies exhibit a characteristic domain structure called the immunoglobulin fold. The β -barrel is formed of two sheets connected by a disulfide bridge.¹ This covalent linkage, which is highly conserved within the immunoglobulin (Ig) fold,² is

part of the hydrophobic core of the protein. *In vivo*, folding and disulfide bond formation is initiated already during translation and translocation into the endoplasmic reticulum (ER).³ These processes are completed after translocation in the lumen of the ER with the assistance of protein disulfide isomerase and molecular chaperones.^{4–6} The intramolecular disulfide bridge influences the thermodynamic stability of antibodies and their fragments significantly.^{7–11} Detailed mechanistic studies on protein folding and oxidation were carried out on antibody fragments and single antibody domains. These investigations revealed that the reduction of the intradomain disulfide bridge of the constant immunoglobulin domain C_L does not affect the three-dimensional structure of the protein.⁷ However, the stability is decreased significantly compared to the native oxidized state. Beside thermodynamic effects, the presence of disulfide bonds can influence the kinetic of protein folding.^{12,13} In the case of the antibody C_L domain in the reduced state, folding is decelerated

Present addresses: M. J. W. Thies, November AG, Gesellschaft für Molekulare Medizin, Ulrich-Schalk-Strasse 3, 91056 Erlangen, Germany; F. Talamo, Fondazione Centro San Raffaele, DIBIT-hSR, Milano, 20132 Italy.

Abbreviations used: CAM, carboxyamidomethyl group; DTNB, dithionitrobenzoate; ESI-MS, electrospray mass spectrometry; GdmCl, guanidinium chloride; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HPLC-SEC, high-pressure liquid chromatography-size-exclusion chromatography; IAA, iodacetamide; MALDI-MS, matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry; TFA, trifluoroacetic acid.

E-mail address of the corresponding author: johannes.buchner@ch.tum.de

100-fold compared to the folding of the oxidized domain.¹⁴ Starting from the reduced, denatured state of C_L, concomitant folding and oxidation leads to a folding intermediate that lacks the internal disulfide bridge.¹⁴ Native protein is obtained after the subsequent oxidation. Although nearly 100% of reduced and denatured C_L can be transformed into the native state, the renaturation of larger proteins, such as the immunoglobulin Fab fragment, is accompanied by unproductive side-reactions.¹⁵ It has been shown that, under refolding conditions that allow the reshuffling of incorrect disulfide bonds, about 40% of the Fab molecules reach their functional state. The kinetics of functional reactivation are very slow, with a half-time of 15 hours at 10 °C, whereas the renaturation of denatured Fab fragment with intact disulfide bonds is a fast process.^{16,17} The presence of the intradomain disulfide bonds is a prerequisite for the formation of functional antibody molecules, since renaturation under reducing conditions did not result in the formation of active protein.¹⁵

A simple model system for folding and oxidation of immunoglobulin domains that includes association is the C-terminal domain of the antibody heavy chain. Previously, it had been shown that the C_{H3} dimer can be isolated by limited proteolysis or recombinant expression in *Escherichia coli*.^{18,19} Refolding of the oxidized dimer is completely reversible and involves a step that is limited by the isomerization of a proline-peptide bond (₃₄F-₃₅P).^{18,19} Due to this slow isomerization reaction, a native-like folding intermediate accumulates.¹⁹ Transforming the respective proline-peptide bond from the *trans* to the native *cis* configuration is the prerequisite to form native C_{H3}.¹⁹ In these studies, folding was followed with the internal disulfide bond intact ignoring the folding conditions that are present *in vivo*.

Here, we set out to elucidate the folding and oxidation process of reduced C_{H3}.

Results

Reduced C_{H3} is a dimer

To investigate the influence of the immunoglobulin intradomain disulfide bond on the conformation of the antibody C_{H3} domain, we prepared the reduced form of the protein (see Materials and Methods). The spectroscopic analysis revealed that reduced C_{H3} had an intact secondary and tertiary structure (Figure 1). Compared to the native oxidized domain, the far-UV CD spectrum of reduced C_{H3} showed a significant increase in the intensity of the signal at 220 nm (from -2500 to -7000 deg cm² dmol⁻¹) (Figure 1(a)). The minimum was shifted from 220 nm to 217 nm. Furthermore, a local maximum at 235 nm present in the spectrum of the oxidized form disappeared. In the near-UV CD spectrum (Figure 1(b)), two local minima, at 285 nm and 295 nm, were detected in

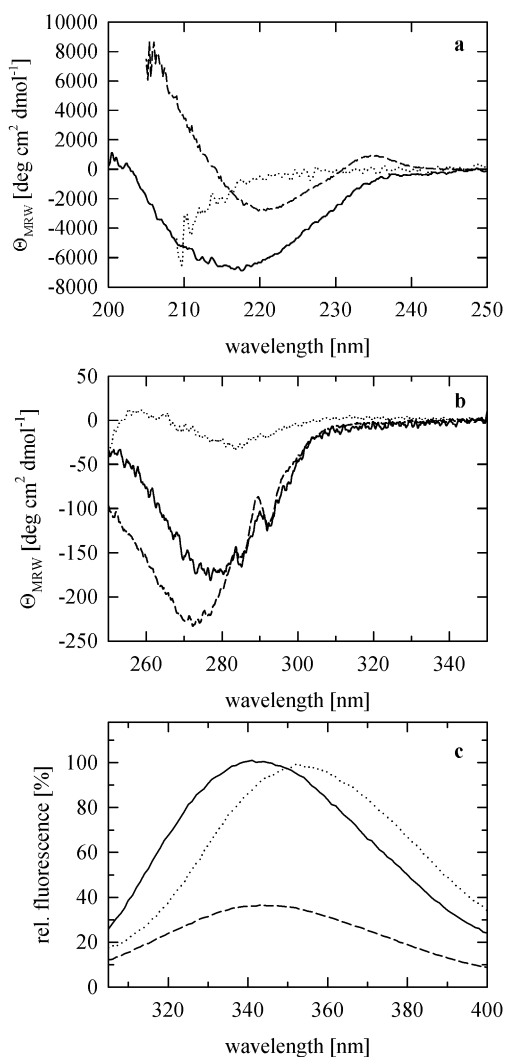


Figure 1. Spectroscopic properties of reduced C_{H3}. (a) Far-UV CD spectra of native (---), reduced (—) and unfolded C_{H3} (···). The protein concentration was 200 μg/ml (8.2 μM dimer) in 0.1 M Tris-HCl, pH 8 (oxidized state) and 0.1 M Tris-HCl, pH 7 (reduced state), respectively. Unfolded C_{H3} was generated by incubating the protein in 3 M GdmCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8. (b) Near-UV CD spectra of C_{H3}: native state (---), reduced state (—) and unfolded state (···). (c) Fluorescence spectra of native C_{H3} (---), reduced C_{H3} (—) and the unfolded antibody domain (···). The C_{H3} concentration was 10 μg/ml (0.4 μM dimer). All measurements were carried out at 20 °C.

the reduced and in the oxidized state. The main minimum was slightly red-shifted from 274 nm to 279 nm in the reduced state. The overall intensity was decreased for the reduced protein. The maximum of fluorescence emission was at 345 nm or 342 nm for the oxidized and the reduced state of C_{H3}, respectively (Figure 1(c)), suggesting that the tryptophan residues are in a similar environment. In the oxidized state of C_{H3}, the fluorescence of one tryptophan residue is quenched by the disulfide bond.¹⁹ Accordingly, a fourfold higher fluorescence signal was observed here for the

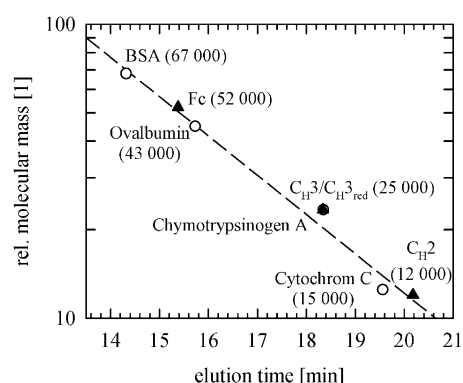


Figure 2. Analytical gel-filtration runs of MAK33 fragments. The flow-rate was 0.6 ml/minute on a BioSep SEC S2000 column at 20 °C. The buffer was 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 0.3 M NaCl, 2 mM EDTA. Runs were carried out with different MAK33 fragments (▲) and compared with proteins for column calibration (○).

reduced protein. This allowed us to monitor disulfide bond formation of C_{H3} by fluorescence spectroscopy (see below).

Taken together, these results show that the reduction of the internal disulfide bridge influences the overall structure of the C_{H3} domain only slightly. Compared to the oxidized form, the spectra of the reduced protein show a change in secondary structure, whereas the tertiary structure seems to remain unaffected.

The native C_{H3} domain forms a dimer within the antibody and occurs as a dimer in solution when produced recombinantly.¹⁹ Interestingly, the quaternary structure of reduced C_{H3} did not change compared to the native, oxidized state. The reduced form of the domain was still dimeric as monitored by HPLC-SEC (Figure 2). The elution time was identical with that of the oxidized protein. Native gel electrophoresis and analytical ultracentrifugation confirmed the dimeric state of reduced C_{H3} (data not shown).

Thus, in spite of the loss of the intramolecular disulfide bridge, the dimerization interface of C_{H3} remains intact.

The stability of C_{H3} is decreased significantly by reduction

GdmCl-induced equilibrium unfolding transitions were performed to analyze the influence of the disulfide bond on the stability of C_{H3} (Figure 3). While the oxidized protein was stable up to 0.4 M GdmCl, reduced C_{H3} started to unfold at GdmCl concentrations of 0.05 M. The midpoints of the transition (*C_m*) were 0.3 M GdmCl for reduced C_{H3} (Figure 3) and 1.0 M GdmCl for oxidized C_{H3}.¹⁹ When the protein concentration was increased 20-fold, a slight shift of the transition to higher values was observed for reduced C_{H3}, suggesting that dimerization has an influence on

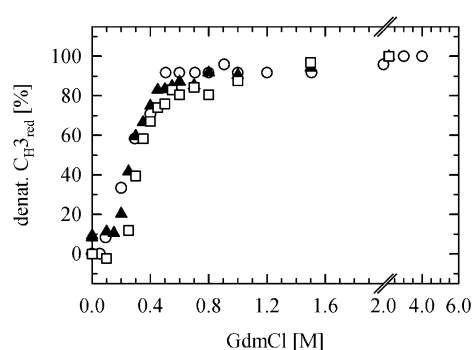


Figure 3. Stability of reduced C_{H3} against denaturation. GdmCl-induced unfolding transitions of reduced C_{H3} were performed as described in Materials and Methods. The C_{H3} concentration was 5 μg/ml (0.2 μM dimer; ○), 40 μg/ml (1.6 μM dimer; ▲) and 100 μg/ml (4.1 μM dimer; □), respectively.

the stability of the protein (Figure 3). However, this contribution is significantly smaller than that observed for oxidized C_{H3}. For the oxidized protein, the stability was determined to be $-66.5 \text{ kJ mol}^{-1}$.¹⁹ In contrast to the oxidized protein, unfolding of reduced C_{H3} was not completely reversible. Therefore, it was not possible to

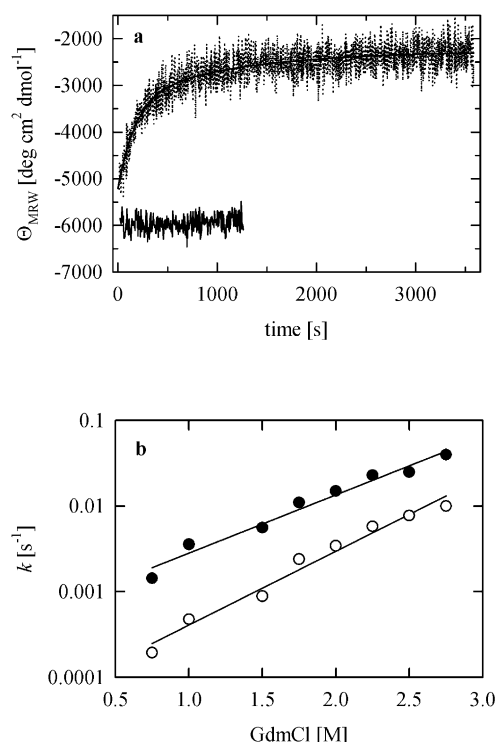


Figure 4. Unfolding of C_{H3}-red. (a) Unfolding of reduced C_{H3} was measured by far-UV CD spectroscopy at 220 nm. The protein concentration was 50 μg/ml (2.0 μM C_{H3} dimer). The buffer was 0.1 M Tris-HCl (pH 7), 2 mM EDTA, with 1.5 M GdmCl. The kinetics were recorded at 20 °C: unfolding kinetic (···) and signal of the folded protein (—). (b) The dependence of the two kinetic phases (*k*₁, ●; *k*₂, ○) on the GdmCl concentration.

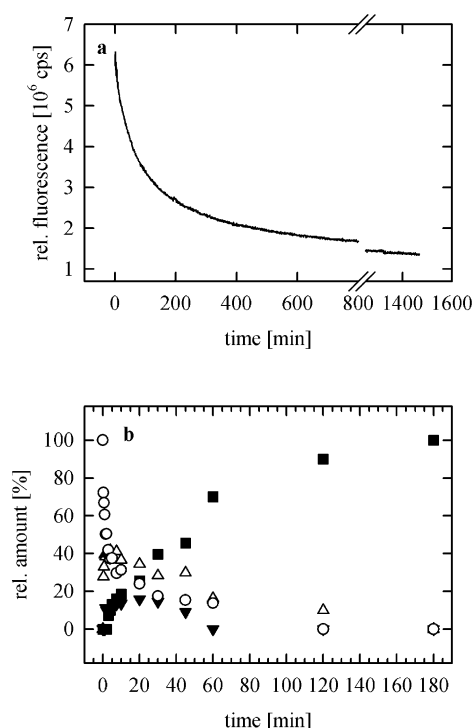


Figure 5. Folding and oxidation of C_{H3}. (a) The fluorescence kinetics were measured at a wavelength of 355 nm (excitation 280 nm). The protein concentration was 7.5 μg/ml (0.3 μM dimer) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 3 mM GSSG, 6 mM GSH, 4 °C. (b) Refolding and oxidation of C_{H3} analyzed by ESI-MS after derivatization of the free cysteine residues with IAA: (○) The 2H species, (△) 1G1H, (▼) 2G and (■) 1S. The buffer conditions and protein concentrations were the same as for the fluorescence measurements.

calculate the thermodynamic parameters of the transition. As an estimate, the reduced dimer has an eightfold lower stability than the oxidized dimer.

Besides the low thermodynamic stability, reduced C_{H3} exhibited a kinetic instability against chemical denaturants. As shown in Figure 4(a), reduced C_{H3} unfolded in a fast reaction within one hour, with a half-time of 900 seconds. The much more stable oxidized protein had a half-time of 2800 seconds.¹⁹ Interestingly, the analysis of the unfolding kinetic of reduced C_{H3} revealed two rate constants ($k_{1u} = 5.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (64% of the amplitude) and $k_{2u} = 8.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (36% of the amplitude); u stands for unfolding), whereas the unfolding process of the oxidized domain

could be described by one rate constant ($k_u = 2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).¹⁹ Both rate constants of reduced C_{H3} were influenced by the concentration of the denaturant, the slow phase being affected more strongly than the fast unfolding phase (Figure 4(b); Table 2).

Oxidation of C_{H3} during folding

To analyze how folding and disulfide bond formation are coupled, folding of C_{H3} was monitored by fluorescence spectroscopy under oxidizing conditions in the presence of a redox system consisting of reduced and oxidized glutathione (Figure 5(a)). At pH 8, the kinetic trace could be described adequately only by a three-exponential function with rate constants $k_{fo1} = 2.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{fo2} = 3.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_{fo3} = 5.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (fo stands for folding and oxidation). The overall process is very slow, reaching completion after 24 hours.

Whereas the fluorescence kinetics reflect both oxidation and the concomitant changes in the protein structure, oxidation was monitored directly by mass spectrometry (MS) to gain insight into the mechanism of disulfide formation of C_{H3}. Reduced and denatured C_{H3} was diluted in refolding buffer with the redox system mentioned above, aliquots were withdrawn at different times and the cysteine residues were alkylated with iodacetamide (IAA). The carboxy-amido-methylation reaction increased the molecular mass of oxidation intermediates by 57 Da for each free SH group, thus allowing the separation of intermediates containing different numbers of disulfide bonds. Using electroionisation spray (ESI)-MS, alkylated intermediates can be quantified accurately by measuring the total ion current produced by each species (Figure 5(b)).²⁰ The measured molecular masses, the expected mass values, and the identification of the detected intermediates are summarized in Table 1. At the beginning of the oxidation of C_{H3}, the fully reduced species (2H) disappeared fast ($k = 2.8 \text{ s}^{-1}$). After ten minutes, the decrease of 2H continued very slowly (Table 2). Fully reduced protein could be detected up to 120 minutes after initiating refolding. Intermediates with one reduced cysteine residue and one mixed disulfide with glutathione (1G1H) appeared rapidly, with the same rate constant as that determined for the disappearance of 2H at early stages of refolding and predominated during the first 25 minutes. Later, the fully oxidized species (1S) became most abundant. The

Table 1. ESI-MS analysis of the intermediates formed during refolding of C_{H3}

Measured mass (Da)	Identification ^a	Expected mass (Da)	Possible isomers	
12,363.57 ± 0.65	2CAM	(2H)	12,363.93	1
12,612.51 ± 0.34	1G 1CAM	(1G1H)	12,612.03	2
12,247.25 ± 0.46	1S	(1S)	12,247.71	1
12,860.53 ± 0.72	2G	(2G)	12,860.10	1

^a CAM, carboxyamidomethyl groups; G, mixed disulfide with glutathione; S, intramolecular disulfide; H, free cysteine.

Table 2. Comparison of kinetic constants of reduced and oxidized C_{H3} shown as half-times

	Unfolding	Oxidation during folding	Folding	Oxidation after refolding	Dimerization <i>t</i> _{1/2} (min- utes)
C _{H3} _{red}	<i>t</i> _{1/2} ^{1u} = 120 s; <i>t</i> _{1/2} ^{2u} = 780 s	<i>t</i> _{1/2} ^{fo1} = 300 s; <i>t</i> _{1/2} ^{fo2} = 2240 s; <i>t</i> _{1/2} ^{fo3} = 12, 380 s	–	<i>t</i> _{1/2} ^{oaf1} = 390 s; <i>t</i> _{1/2} ^{oaf2} = 1930 s; <i>t</i> _{1/2} ^{oaf3} = 14, 440 s	200
C _{H3} _{ox} (19)	<i>t</i> _{1/2} = 2800 s	–	<i>t</i> _{1/2} ^{f1} = 65 s; <i>t</i> _{1/2} ^{f2} = 1330 s; <i>t</i> _{1/2} ^{f3} = 4330 s	–	10

C_{H3}_{red}, C_{H3} reduced form; C_{H3}_{ox}, C_{H3} oxidized form.

1S species was formed with a rate constant of $1.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ and reached a level of 100% after 180 minutes. Interestingly, in addition to these species, a non-productive 2G intermediate was formed. This mixed disulfide derivative accumulated at a concentration of about 10% in the first 30 minutes and then disappeared.

Dimerization of C_{H3} during folding and oxidation: association of the monomers is very slow

We were interested in determining at which stage of this reaction dimerization of C_{H3} takes place. Therefore, we analyzed the time-course of association by chemical crosslinking and subsequent SDS-PAGE. The time-course of dimerization was quantified by densitometry of the monomer and dimer bands (Figure 6(a)).

Figure 6(b) shows that dimerization of C_{H3} under redox conditions occurred with a half-time of 200 minutes. For the oxidized C_{H3} domain, the half-time for dimerization was determined to be ten minutes.¹⁹ Thus, association of C_{H3} is decelerated significantly compared to dimerization of the oxidized domain.¹⁹ The amount of dimer reached 100% after 24 hours. Interestingly, the dimerization process was remarkably slower than the oxidation

of C_{H3} (see Figure 5(b)), but correlates well with the overall kinetics of the folding and oxidation process monitored by fluorescence spectroscopy (Figure 5(a)).

Oxidation after refolding: the compact structure of reduced folded C_{H3} prevents fast oxidation

To determine to what extent disulfide bond formation depends on the steric environment of the respective cysteine residues and on protein structure formation in general, we next analyzed the oxidation process starting from the structured protein. To this end, the protein was first refolded under reducing conditions. GSSG was then added to start the oxidation reaction. This process was followed by monitoring the decrease in fluorescence intensity (Figure 7(a)). The fluorescence kinetics consisted of three phases with the corresponding rate constants $k_{\text{oaf1}} = 1.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{oaf2}} = 3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{oaf3}} = 4.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (oaf stands for oxidation after folding). This reaction was completed after 16 hours (Table 2).

ESI-MS measurements revealed the relative intensities of the intermediates formed during the oxidation of folded C_{H3} (Figure 7(b)). The 2H species decreased rapidly during the first 15

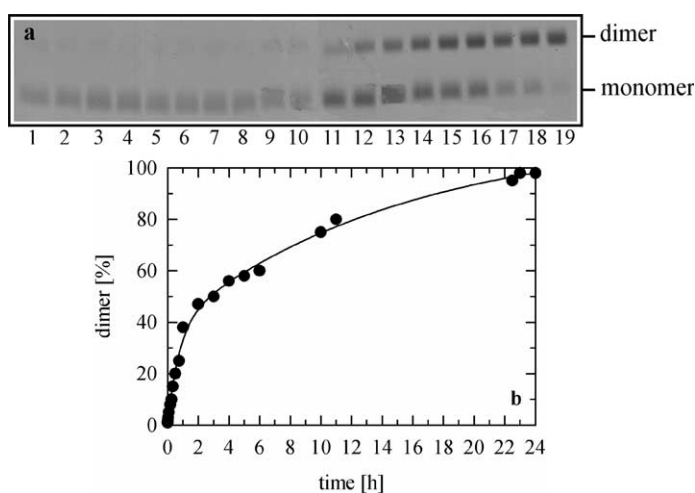


Figure 6. Dimerization of C_{H3} during folding and oxidation. Crosslinking experiments were carried out in 50 mM Hepes (pH 8.0), 25 mM GdmCl, 3 mM GSSG and 6 mM GSH at 4 °C. The protein concentration was 7.5 μg/ml (0.3 μM C_{H3} dimer). During refolding, samples of 5 μg of protein were taken, crosslinked with glutaraldehyde for two minutes and precipitated. (a) Coomassie-stained SDS/polyacrylamide gel. Lanes 1–19 represent the time-course of dimerization: lane 1, 0.5 minute; lane 2, one minute; lane 3, two minutes; lane 4, five minutes; lane 5, ten minutes; lane 6, 15 minutes; lane 7, 20 minutes; lane 8, 30

minutes; lane 9, 45 minutes; lane 10, one hour; lane 11, two hours; lane 12, three hours; lane 13, four hours; lane 14, five hours; lane 15, six hours; lane 16, ten hours; lane 17, 11 hours; lane 18, 22.5 hours; lane 19, 23 hours. (b) The time-course of the formation of the C_{H3} dimer determined by densitometry.

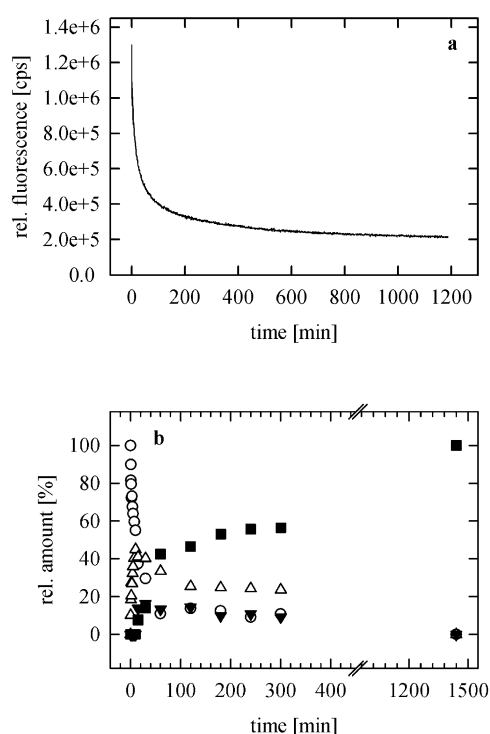


Figure 7. Oxidation after refolding. The protein was allowed to refold for three hours under reducing conditions. Then, the formation of the disulfide bond was induced by addition of GSSG. The protein concentration was 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (0.3 μM dimer) in 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 3 mM GSSG, 6 mM GSH, 4 $^{\circ}\text{C}$. (a) Fluorescence kinetic measured at a wavelength of 355 nm (excitation 280 nm). (b) ESI-MS analysis of the C_{H3} species after derivatization of the free cysteine residues: (○) 2H species, (Δ) 1G1H, (▼) 2G and (■) 1S.

minutes together with the accumulation of the 1G1H (45%) species, which represents the mixed disulfide with glutathione. The kinetic of the formation and disappearance of 1G1H is comparable to that of 1G1H during oxidative folding of the denatured and reduced protein (Figure 5(b)). After 15 minutes, however, the remaining 2H species disappeared very slowly over 24 hours. The fully oxidized species, 1S, appeared after 15 minutes and became the most abundant after 45 minutes. The relative amount reached 100% after 24 hours. It should be noted that the non-productive intermediate 2G, containing two mixed disulfides with glutathione, accumulated at a level higher than 15% from 15 minutes onwards.

Taken together, these experiments show that oxidation of folded C_{H3} is a very slow process. The rapid formation and accumulation of the 1G1H intermediate is not correlated with the fast formation of the fully oxidized species. This indicates that there is an intrinsic difficulty in forming the disulfide in the structured C_{H3} domain, possibly due to the environment of the respective cysteine residues.

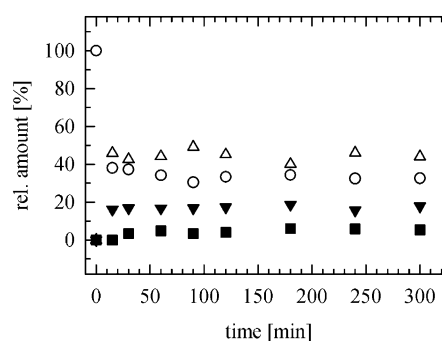


Figure 8. Refolding and oxidation of C_{H3} under destabilizing conditions. The reaction was performed in 1 M GdmCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 8), 3 mM GSSG and 6 mM GSH at 4 $^{\circ}\text{C}$. The protein concentration was 7.5 $\mu\text{g/ml}$ (0.3 μM dimer). The reaction solution was analyzed by ESI-MS after derivatization of the free cysteine residues with IAA. (○) The 2H species, (Δ) 1G1H, (▼) 2G and (■) 1S.

To further analyze the influence of the protein structure on the oxidation reaction, we oxidized C_{H3} in a partially folded state in the presence of limited concentrations of denaturant (1 M GdmCl). Aliquots were collected at different times during refolding and intermediates were analyzed by ESI-MS after alkylation, as described (Figure 8). In this experiment, a steady state was reached after 30 minutes. It is important to underline the fact that the concentration of species 2H and 1G1H was approximately equal from 30 minutes onwards, while species 1S was present throughout at a very low level. The kinetic analysis showed further that the non-productive intermediate 2G accumulated at a concentration higher than 15%.

As a control, the reduced and denatured C_{H3} domain was diluted into a buffer containing 6 M GdmCl. The kinetic analysis of species formed in the presence of the redox system showed clearly that 2H is the only stable species present in solution (data not shown).

Taken together, these results suggest that, starting from the structured domain, oxidation of C_{H3} is hampered by the steric constraints. On the other hand, formation of the structure of C_{H3} is necessary for protecting this covalent bond against reduction.

Assignment of disulfide bonds within the population of 1G1H intermediates

From the analysis described above, the question arose whether in the 1G1H species one of the two cysteine residues is preferentially labelled or whether the 1G1H intermediate represents a mixture of the two isomers differing in the cysteine residue involved in the formation of the mixed disulfide with glutathione. In order to address this point, the sequence position of the modified cysteine residue was assigned using a mass mapping strategy.²¹ Aliquots of the folding and oxidation reaction were withdrawn after one, two,

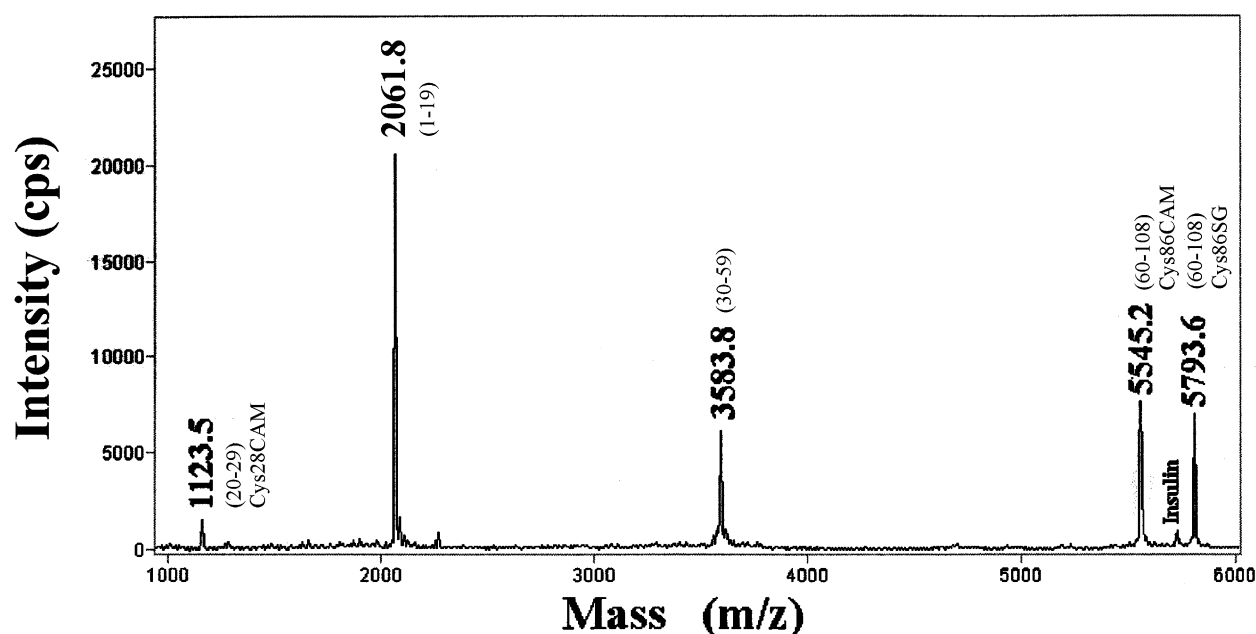


Figure 9. Disulfide bond assignment within the population of 1G1H intermediates. MALDI-MS analysis of the peptide mixture derived from the hydrolysis of the sample withdrawn one minute after starting folding and oxidation of C_{H3}. The amount of 1G1H in the solution was about 40%.

15 or 30 minutes, alkylated as described and lyophilized. The samples were then hydrolyzed with cyanogen bromide and the mixture of peptides was analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MS. **Figure 9** shows the MALDI-MS analysis of the peptide mixture derived from the hydrolysis of the sample withdrawn after one minute when the species 1G1H reached almost 40% (**Figure 5(b)**). The signals at m/z 5793.6 and 5545.2 represent peptide 60–108 linked to a molecule of glutathione or containing a carboxyamidomethylated cysteine residue, respectively. In addition, the spectrum shows the presence of a signal at m/z 1123.5 corresponding to peptide 20–29 containing a carboxyamidomethylated cysteine residue. The two signals at m/z 3583.8 and 2061.8, respectively, were assigned to peptides along the C_{H3} sequence as reported in **Figure 9**. This analysis shows clearly that only cysteine 86 was involved in the formation of the mixed disulfide with glutathione. No signal corresponding to peptide 20–29 linked to a molecule of glutathione was ever observed. The analysis of the peptide mixture derived from the hydrolysis of the sample withdrawn after two minutes revealed the presence of the same mass signals, confirming that species 1G1H is homogeneous and contains cysteine 86 involved in a mixed disulfide with glutathione.

The same analysis was performed on aliquots withdrawn after 15 and after 30 minutes of the refolding in the presence of 1 M GdmCl when the 1G1H species reached a concentration of about 45% (see **Figure 8**). The MALDI spectra of these samples showed the presence of the same signals described above, thus strengthening the conclusion

that cysteine 86 is more reactive than cysteine 28 in forming the mixed disulfide with glutathione.

To investigate whether the reactivity of the cysteine residues is influenced by the conformation of C_{H3} or the sequential context, we analyzed the reaction of the reduced and denatured C_{H3} domain with dithionitrobenzoate (DTNB). The kinetics of oxidation could be fitted by a two-exponential fit resulting in the rate constants of $k_1 = 2.8 \text{ s}^{-1}$ and $k_2 = 0.6 \text{ s}^{-1}$ (data not shown). This indicates that one cysteine residue reacts with DTNB slightly faster than the other. Because of the absence of any protein structure, this behavior must be due to the amino acid sequence flanking cysteine residues 28 and 86, respectively.

Discussion

Proteins that traverse the secretory pathways typically contain one or more disulfide bonds that stabilize the folded conformation by lowering the entropy of the unfolded state.²² Systematic experimental studies revealed a significant impact of disulfide bonds on the thermodynamics and kinetics of protein folding.^{13,23,24}

In immunoglobulin domains, the disulfide bridge connecting the sheets of the β -sandwich structure is well conserved.^{10,25–27} It has been shown experimentally that it is an exceptionally important factor in stabilizing the structure of the constant part of the immunoglobulin light chain, of two different variable domains of the light chain and of an scFv fragment.^{7–11} Here, we have evaluated the impact of the intramolecular disulfide bond on the structure and stability of the

antibody C_{H3} dimer. Reduced C_{H3} shows a much lower stability than the oxidized state. Compared to the contribution of the disulfide bond to the stability of the C_L domain^{7,28} the 4D5-SS⁺ scFv fragment¹¹ and of different mutants of the REIV-κ variable domain,⁹ the influence of the disulfide bridge on the stability of C_{H3} is remarkably greater. In contrast to the oxidized domain, unfolding of C_{H3} occurs in two phases: a fast phase, characterized by a large change in CD-signal intensity, which seems to be due to the destruction of the domain interface, and a slow phase with a small increase in signal intensity, as would be expected for the unfolding of an isolated domain. The resulting rate constant corresponds to that of the unfolding phase of oxidized C_{H3}. A similar behavior was observed in the case of the wild-type and the V_L⁺V_H⁻ variant of the scFv fragment 4D5.²⁹

Interestingly, reduced C_{H3} shows a slightly altered secondary structure, but the tertiary structure, as judged by fluorescence and CD spectroscopy, seems to remain unchanged compared to the native oxidized state. The increased signal in the far-UV CD spectrum may indicate a more compact secondary structure due to the removal of the disulfide spacer between the two β-sheets of C_{H3}. These results are consistent with that obtained for the C_L domain after reduction.⁷ However, the C_L domain is monomeric, whereas reduced C_{H3} is a dimer. The domain interface of oxidized C_{H3} buries a significant part of the surface upon association. The conformation of this surface seems to be conserved in reduced C_{H3}, since the protein retains its dimeric state. A similar behavior was observed for the reduced 4D5-SS scFv fragment.¹¹ Here, however, the two domains are linked artificially by a peptide sequence that favors association by increasing the local concentration of the two domains. Our results show that in reduced C_{H3} non-covalent interactions are sufficient to maintain the β-sheet structure and promote stable and specific dimerization.

The necessity of a fine-tuned coordination between structure formation and oxidation in the formation of native protein is clearly illustrated by the refolding/oxidation experiments of C_{H3}. Here, redox reactions are decelerated by the burial of the reactive groups in stable tertiary structure. The velocity of disulfide bond formation in folded, reduced C_{H3} illustrates this effect. We observed an eightfold deceleration of the reaction compared to the oxidation concomitant with refolding of denatured C_{H3}. The rate of disulfide bond formation depends also on the proximity in space of the respective cysteine residues, defined here as the probability of their sulfur atoms to come within the distance required for thiol/disulfide exchange. Consequently, the formation of the internal disulfide bridge of C_{H3} is influenced significantly by the concentration of denaturant in the solution. When oxidation and folding take place simultaneously, disulfide bond formation occurs within three hours *via* mixed disulfide intermediates,

complexes of one or two glutathione molecules with the free thiol groups of the C_{H3} domain. These derivatives accumulate at the beginning of the reaction and disappear subsequently because of the formation of oxidized C_{H3}. In contrast, folding monitored by fluorescence is completed only after 24 hours. These kinetics may be due to misfolded states of C_{H3} that are caught in their conformation by the disulfide bridge. Subsequently, rearrangements in these conformational states may occur only slowly. This is in agreement with previous observations that fast disulfide bond formation can decelerate folding by stabilizing entropically misfolded conformations.²² Similar to the overall kinetics of folding and oxidation determined by fluorescence spectroscopy, the dimerization process of C_{H3} starting from the unfolded and reduced protein is very slow. In contrast to oxidized C_{H3}, where monomers dimerize in a single-exponential reaction,¹⁹ dimerization of reduced C_{H3} seems to involve two different reactions. Fast association seems to involve C_{H3} molecules that are properly folded and oxidized. This species reaches the dimeric state within the time range necessary for the oxidation of C_{H3}. The slow association reaction may represent incompletely or misfolded states that have to undergo structural changes before association can take place. The changes in fluorescence intensity observed during the later stages of folding could be due to rearrangements of the contact surfaces during dimerization. Our results suggest that folding and oxidation of the C_{H3} domain are tightly coupled. Folding is required to bring the cysteine residues within bonding distance; on the other hand, structure formation negatively influences redox shuffling.

In agreement with this interpretation, increasing the amount of denaturant in the solution slows C_{H3} oxidation. Under unfolding conditions, the formation of disulfide bonds no longer takes place. Remarkably, the mixed disulfide derivative of C_{H3} with glutathione (1G1H) is formed with the same velocity under all conditions investigated. Within the first 15 minutes, the amount of 1G1H reaches 40 to 45%. In a partially folded state, oxidation of C_{H3} arrests after 30 minutes. The fully oxidized species is present at a very low level, whereas reduced and partially oxidized C_{H3} molecules predominate. Under unfolding conditions, the distance between the cysteine residues and the high conformational flexibility of the polypeptide chain completely prevent the formation of the internal disulfide bridge of C_{H3}. The fully reduced species is the only one observed in solution since, in the absence of structure, disulfide bonds are accessible for reducing compounds.

Under all conditions investigated, oxidation of C_{H3} occurs *via* a homogeneous 1G1H species in which exclusively cysteine 86 forms the mixed disulfide with glutathione. Cysteine 28 is much less reactive and oxidized in a second step forming the redox species 2G. Since this behavior is

observed independent of the presence of a folded conformation of C_{H3}, the redox reactivity of the thiol groups may be due to different p*K*-values, caused by the environment in the amino acid sequence. In contrast, the second step in the oxidation of C_{H3}, in which the intra-molecular disulfide bridge is finally formed, is influenced remarkably by the presence of a three-dimensional structure.

Folding, oxidation and association of the immunoglobulin domain C_{H3} requires a fine-tuned and well-coordinated interplay between structure formation to bring the cysteine residues into proximity and shield disulfide bonds from the solvent and structural flexibility that is required for redox shuffling and rearrangements of structural elements.

Materials and Methods

Purification of native C_{H3}

The C_{H3} domain of the monoclonal antibody was purified as described.¹⁹ Finally, the protein was dialyzed against 0.1 M Tris-HCl (pH 8). The concentration of C_{H3} was determined photometrically ($A_{1\%, 1\text{ cm}}^{280\text{ nm}} = 1.95$).

Preparation of reduced C_{H3}

The native C_{H3} domain was unfolded and reduced in 3 M GdmCl, 0.3 M DTT, 0.1 M Tris-HCl (pH 7) for three hours at room temperature. The protein was allowed to refold in 0.1 M Tris-HCl (pH 7) with 0.45 M L-arginine and 6 mM DTT for 24 hours at 10 °C. Subsequently, the solution was dialyzed against 0.1 M Tris-HCl (pH 7) overnight at 4 °C. For CD measurements, the protein was dialyzed against 40 mM sodium phosphate (pH 7).

Determination of free cysteine residues and their reactivity (Ellman's assay)

The assay was performed in 8 M urea, 100 mM Tris-HCl (pH 6.5) at 4 °C essentially as described.³⁰ The final C_{H3} concentration was 30 μM. Dithionitrobenzoate (DTNB; 4 mg/ml in 100 mM potassium phosphate (pH 8), 1 mM EDTA) was added to a final concentration of 75 μM. To determine the number of free cysteine residues, the solution was incubated for 20 minutes at room temperature. Thereafter, the extinction was measured at 412 nm. Using the extinction coefficient of DTNB ($\epsilon = 13,600\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and the protein concentration, the number of free thiol groups could be calculated.³⁰ The kinetics of the oxidation of the cysteines by DTNB were monitored at 412 nm for ten minutes immediately after adding DTNB to the protein solution.

Chemical crosslinking and densitometry

Crosslinking was carried out as described.³¹ During renaturation and oxidation of C_{H3}, crosslinking experiments were performed in 50 mM Hepes (pH 8.0), 25 mM GdmCl, 3 mM GSSG and 6 mM GSH at 4 °C. 80 mM glutaraldehyde were added at different time-points and, after two minutes at 37 °C, the reaction was stopped with 80 mM NaBH₄ in 0.1 M NaOH. The protein

was precipitated by sodium desoxycholate and trichloroacetic acid (TCA),³² resolubilized in Laemmli buffer and separated on SDS-PAGE.

The amount of monomers and dimers of C_{H3} present in the crosslinked samples was quantified by densitometry of Coomassie blue-stained gels. The digitized protein bands were analyzed using the Image Master 1D Elite software (Amersham Pharmacia Biotech).

Spectroscopic techniques

Circular dichroism (CD) spectra were recorded in a Jasco J-715 spectropolarimeter with a PTC 343 Peltier unit. The experiments were carried out in quartz cuvettes of 0.1 and 0.5 cm pathlength. Far-UV spectra were recorded from 190 to 250 nm in 40 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7) at 20 °C. Near-UV data were recorded from 250 to 350 nm in 0.1 M Tris-HCl (pH 7) at 20 °C. All spectra were buffer-corrected. Kinetics were monitored at a wavelength of 213 nm.

Fluorescence spectra of C_{H3} were determined using a Spex FluoroMax-2 fluorimeter and a 1 cm stirred and thermostatically controlled cell at 20 °C. The excitation wavelength was set to 280 nm or 295 nm. Spectra were recorded from 290 to 400 nm. The spectral bandwidths were 2 nm for excitation and 7 nm for emission, respectively. Fluorescence kinetics were monitored after excitation at 280 nm at a wavelength of 355 nm.

Chemical denaturations were measured by recording far-UV CD spectra in a 1 mm thermostatically controlled cell and analyzing the ellipticity at 213 nm. Additionally, the transition was followed by measuring fluorescence spectra and determining the shift of the fluorescence maximum λ_{max} .

Analytical gel-filtration

Runs were performed on an HPLC system with fluorescence detection (Jasco) using a silica-based Biosep S-2000 gel-filtration column (Phenomenex) and a flow-rate of 0.3 ml min⁻¹. The runs were performed in 0.1 M Tris-HCl (pH 7 at 20 °C), 0.3 M NaCl. Fluorescence was excited at 280 nm and detected at 343 nm. The UV/Vis absorbance signal was followed at 280 nm. The runs were analyzed using the Borwin software (Jasco).

Analytical ultracentrifugation

An Optima XL-I analytical ultracentrifuge with integrated optical systems (Beckman) was used. The equilibrium runs were monitored by scanning UV/Vis absorbance and Rayleigh interference at 20 °C. The buffers were the same as those mentioned above. The protein concentration was 2 mg/ml.

Mass spectrometry

Denaturation and reduction of the C_{H3} domain

C_{H3} was reduced and denatured at a final concentration of 750 μg/ml in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 300 mM DTT, 6 M GdmCl, for one hour at 37 °C, under nitrogen atmosphere.

Oxidation after refolding of C_{H3}

The renaturation was started by diluting 100-fold the reduced and denatured protein in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA containing DTT at a final concentration of 3 mM. The process was carried out at 4 °C at a final protein concentration of 7.5 µg/ml. After three hours of refolding, 6 mM GSSG was added and the oxidation carried out at 4 °C.

Refolding and oxidation of C_{H3}

Oxidative refolding was started by diluting 100-fold the reduced and denatured protein in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, containing 6 mM GSSG. The process was carried out at 4 °C at a final protein concentration of 7.5 µg/ml.

Formation of the disulfide bond of the C_{H3} domain in the presence of GdmCl

The process was started by diluting 100-fold the reduced and denatured protein in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, containing 6 mM GSSG and 1 M GdmCl. Alternatively, the refolding buffer contained 36 or 60 mM GSSG. The reaction was carried out at 4 °C at a final protein concentration of 7.5 µg/ml.

Alkylation of the intermediates during refolding

The refolding of the C_{H3} domain was monitored on a time-course basis by sampling aliquots of the refolding mixtures at appropriate intervals. The protein samples were alkylated with IAA as described^{33,34} IAA was freshly dissolved to a concentration of 2.2 M in 1 M Tris-HCl (pH 6.5), 10 mM EDTA, at 65 °C and cooled to room temperature before use. During preparation of reagents, the solutions were protected from light to minimize photolytic production of iodine, which is a very potent oxidizing agent for thiol groups. The refolding aliquots (2 ml) were added to 1.1 ml of IAA solution at a final IAA concentration of 0.8 M. Alkylation was performed for 15 seconds in the dark at room temperature. After 15 seconds, 0.9 ml of 0.45% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) was added and the aliquots were quickly vortex mixed and desalted by HPLC using a Vydac reversed-phase C4 column (0.46 cm × 25 cm). The elution system consisted of solvent A (0.1% TFA in water) and solvent B (0.07% TFA in 95% acetonitrile/5% water). Refolding intermediates were desalted with a linear gradient of solvent B from 20% to 95% in five minutes at a flow-rate of 1 ml/minute. Eluted proteins were monitored at 220 nm, collected manually and analyzed directly by mass spectrometry.

Peptide mapping

Refolding intermediates were alkylated as described and lyophilized. The carboxyamidomethylated proteins were hydrolyzed with cyanogen bromide in 200 µl of 70% TFA using a tenfold molar excess of reagent over methionine residues for 18 hours at room temperature in the dark. The cyanogen bromide reaction was stopped by adding ten volumes of cold water and lyophilizing the sample.

Mass spectrometric analysis

ESI-MS analyses were carried out using a BIO-Q triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ion source (Micromass). Formic acid was added to the eluted protein samples to a final concentration of 5% (v/v). Samples were introduced into the ion source by infusion at a flow-rate of 5 µl/minute. Spectra were recorded by scanning the quadrupole at ten seconds/scan. Data were acquired and elaborated by the MassLynx software. Mass scale calibration was performed by means of multiply charged ions from a separate injection of horse heart myoglobin (average molecular mass 16,951.5 Da). Each set of refolding data was obtained as the means of three independent folding experiments. The differences between refolding experiments performed completely independent of each other were about 5%. The disulfide intermediates that formed could be identified by ESI-MS. Each trapped intermediate is characterized by the presence of an intramolecular disulfide bond (indicated as 1S), mixed disulfides with the exogenous glutathione (nG) and carboxyamidomethyl groups (nCAM). The number of CAM groups corresponds to the number of free thiol groups present in the refolding intermediates and is therefore indicated as nH. It is important to emphasize that in the species 1G1H, the position of the effective cysteine residue involved in the mixed disulfide is not identified (Table 1).

Peptide mixtures were analyzed by MALDI-time-of-flight (TOF)-MS. The MALDI-MS analyses were carried out using a Voyager DE mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Boston, MA, USA). The mass range was calibrated using bovine insulin (average molecular mass 5734.6 Da) and a matrix peak (379.1 Da) as internal standards. Samples were dissolved in 0.2% (v/v) TFA at 10 pmol/µl. An aliquot (1 µl) was applied to a sample slide together with 1 µl of a solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/ml) in acetonitrile/0.1%TFA (1:2, v:v). The matrix and the sample were allowed to air-dry before spectra were collected. Mass spectra were generated from the sum of 50 laser shots.

Acknowledgments

We thank Hauke Lilie for stimulating discussions and critically reading the manuscript. The work was supported by funds from the European Union and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

1. Deisenhofer, J. (1981). Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9 and 2.8 Å resolution. *Biochemistry*, **20**, 2361–2370.
2. Williams, A. F. & Barclay, A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 381–405.
3. Bergman, L. W. & Kuehl, W. M. (1979). Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains. *J. Biol. Chem.* **254**, 5690–5694.
4. Bardwell, J. C. A. (1994). Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* **14**, 199–205.

5. Freedman, R. B., Brookway, D. E. & Lambert, N. (1984). Protein disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 929–932.
6. Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y. (1992). The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**, 21303–21306.
7. Goto, Y. & Hamaguchi, Y. (1979). The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem.* **86**, 1433–1441.
8. Rudikoff, S. & Pumphrey, J. G. (1986). Functional antibody lacking a variable-region disulfide bridge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **83**, 7875–7878.
9. Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E. *et al.* (1996). Contribution of the intramolecular disulfide bridge to the folding stability of REIv, the variable domain of a human immunoglobulin kappa light chain. *Fold. Des.* **1**, 431–440.
10. Proba, K., Honegger, A. & Plückthun, A. (1997). A natural antibody missing a cysteine in V_H: consequences for thermodynamic stability and folding. *J. Mol. Biol.* **265**, 161–172.
11. Wörn, A. & Plückthun, A. (1998). An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly. *FEBS Letters*, **427**, 357–361.
12. Creighton, T. E. (1997). Protein folding coupled to disulfide bond formation. *Biol. Chem.* **378**, 731–744.
13. Abkevich, V. I. & Shakhnovich, E. I. (2000). What can disulfide bonds tell us about protein energetics, function and folding: simulations and bioinformatics analysis. *J. Mol. Biol.* **300**, 975–985.
14. Goto, Y. & Hamaguchi, Y. (1982). Unfolding and refolding of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* **156**, 911–926.
15. Buchner, J. & Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *BioTechnology*, **9**, 157–162.
16. Schmidt, M. & Buchner, J. (1992). Interaction of GroE with an all-beta-protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 16829–16833.
17. Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R. & Buchner, J. (1994). Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **269**, 14290–14296.
18. Iserman, D. E., Lancet, D. & Pecht, I. (1979). Folding pathways of immunoglobulin domains. The folding kinetics of the C_{v3} domain of human IgG1. *Biochemistry*, **18**, 3327–3336.
19. Thies, M. J. W., Mayer, J., Augustine, J. G., Frederick, C. A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). Folding and association of the antibody domain C_{H3}: prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol.* **293**, 67–79.
20. Ruoppolo, M., Freedman, R. B., Pucci, P. & Marino, G. (1996). Glutathione-dependent pathways of refolding of RNase T1 by oxidation and disulfide isomerization: catalysis by protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, **35**, 13636–13646.
21. Pucci, P. & Morris, H. R. (1985). A new method for rapid assignment of SS bridges in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 1122–1128.
22. Anfinsen, C. & Scheraga, H. (1975). Principles that govern the folding of protein chains. *Advan. Protein Chem.* **29**, 205–299.
23. Clarke, J. & Fersht, A. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase—increasing the stability of protein against the rate of denaturation. *Biochemistry*, **32**, 4322–4329.
24. Yokata, A., Izutani, K., Takai, M., Kubo, Y., Noda, Y., Koumoto, Y. *et al.* (2000). The transition state in the folding–unfolding reaction of four species of three-disulfide variant of hen lysozyme: the role of each disulfide bridge. *J. Mol. Biol.* **295**, 1275–1288.
25. Alzari, P. M., Lascombe, M. B. & Poljak, R. J. (1988). Three-dimensional structure of antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* **6**, 555–580.
26. Davies, D. R., Padlan, E. A. & Sherriff, S. (1990). Antibody–antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439–473.
27. Padlan, E. A. (1996). X-crystallography of antibodies. *Advan. Protein Chem.* **49**, 57–133.
28. Goto, Y., Tsunenaga, M., Kawata, Y. & Hamaguchi, K. (1987). Conformation of the constant fragment of the immunoglobulin light chain: effect of cleavage of the polypeptide chain and the disulfide bond. *J. Biochem.* **101**, 319–329.
29. Ramm, K., Gehrig, P. & Plückthun, A. (1999). Removal of the conserved disulfide bridges from the scFv fragment of an antibody: effects on folding kinetics and aggregation. *J. Mol. Biol.* **290**, 535–546.
30. Sedlak, J. & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* **25**, 192–205.
31. Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1989). Folding proteins. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.), pp. 191–223, IRL Press, Oxford.
32. Bensadoun, A. & Weinstein, W. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241–250.
33. Gray, W. R. (1993). Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis. *Protein Sci.* **2**, 1732–1748.
34. Torella, C., Ruoppolo, M., Marino, G. & Pucci, P. (1994). Analysis of RNase A refolding intermediates by electrospray/mass spectrometry. *FEBS Letters*, **352**, 301–306.

Edited by R. Huber

(Received 2 January 2002; received in revised form 3 April 2002; accepted 10 April 2002)

COMMUNICATION

Interaction of the Chaperone BiP with an Antibody Domain: Implications for the Chaperone Cycle

Gerhard Knarr, Ursula Kies, Stefan Bell, Marcus Mayer
Johannes Buchner*

Institut für Organische Chemie
und Biochemie, Technische
Universität München
Lichtenbergstr. 4, 85747
Garching, Germany

BiP is an Hsp70 homologue found in the endoplasmic reticulum of eukaryotic cells. Like other Hsp70 chaperones, BiP interacts with its substrate proteins in an ATP-dependent manner. The functional analysis has so far been performed mainly with short, synthetic peptides. Here, we present an experimental system that allows to study the partial reactions of the BiP chaperone cycle for a natural substrate protein domain in its soluble, stably unfolded conformation. This unfolded antibody domain forms a binary complex with BiP in the absence of ATP. The dissociation of the BiP dimer seems to be the rate-limiting step in this reaction. The BiP-C_H3 complexes dissociate rapidly in the presence of ATP. The affinity for BiP-binding peptides and the non-native antibody domain was determined to be similar, suggesting that only the peptide binding site is involved in these interactions. Furthermore, these results imply that, also in the context of the antibody domain, an extended peptide sequence is recognized. However, the accessibility of the BiP-binding site in the non-native protein seems to influence the kinetics of complex formation.

© 2002 Published by Elsevier Science Ltd

Keywords: molecular chaperones; protein folding; Hsp70; antibodies; ATPase

*Corresponding author

BiP was identified as an endoplasmic protein non-covalently associated with immunoglobulin heavy chains in the absence of light chains. The protein was therefore called heavy-chain-binding protein (BiP).¹ Originally, mainly the C_H1 domain of the heavy chain was thought to be important for the interaction of BiP with antibodies.² Further analysis revealed that the interaction between BiP and immunoglobulin heavy chains is not restricted to the C_H1 domain.^{3–7} A stable interaction with BiP could be demonstrated for non-secreted forms of immunoglobulin light chains,^{8,9} whereas secreted light chains associate with BiP only transiently.^{10–12} Additionally, using a computer algorithm that predicts BiP-binding sites within protein

sequences,^{13,14} potential BiP-binding sites could be identified within each of the antibody domains.^{15–17}

Analysis of the binding of short heptapeptides to BiP^{18–20} and other members of the Hsp70 family^{21,22} revealed that mainly hydrophobic residues are responsible for binding. It was therefore suggested that Hsp70 chaperones bind to hydrophobic regions on nascent or non-assembled polypeptide chains that are normally buried in the interior of native folded proteins. Which of the potential BiP-binding sites are used *in vivo* may depend on the folding kinetics and the stability of the folded state.^{15,23} Like other Hsp70 proteins, BiP binds ATP with high affinity²⁴ and has a weak, peptide- and protein-stimulated ATPase activity.^{19,25,26}

The interaction of BiP with non-native proteins has been studied almost exclusively by *in vivo* experiments. An *in vitro* folding assay allowing analysis of the interaction of BiP with a natural substrate was still lacking. Thus, it was completely unknown whether the results obtained in the BiP-peptide systems are representative of its interaction with non-native proteins.

Here, we present an experimental system that allows dissection of the constituent partial

Abbreviations used: BiP, immunoglobulin heavy-chain-binding protein; C_H3-CAM, reduced and carboxyamido-methylated C_H3 domain; DTNB, dithionitrobenzol; ER, endoplasmic reticulum; GdnCl, guanidinium hydrochloride; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride.

E-mail address of the corresponding author: johannes.buchner@ch.tum.de

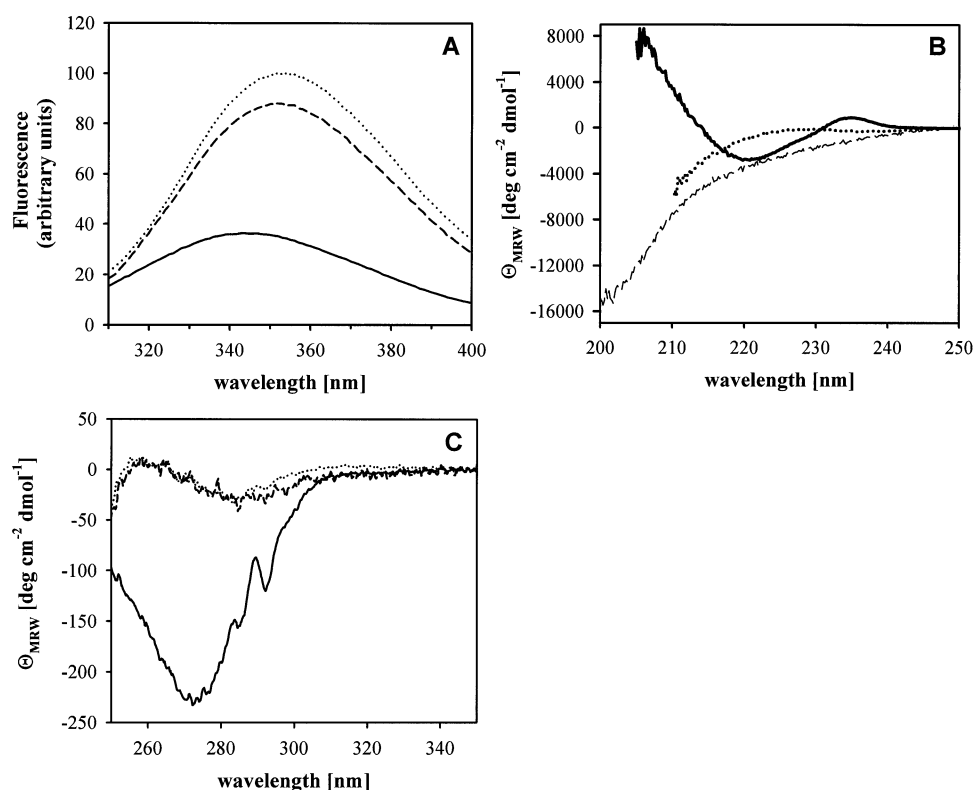


Figure 1. Spectroscopic properties of C_{H3} and C_{H3} -CAM. (a) Fluorescence emission spectra of native C_{H3} (—), C_{H3} -CAM (---) and C_{H3} , denatured in 6 M GdnCl (···). The protein concentration was 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for each. (b) Far-UV spectra of native C_{H3} (—), C_{H3} -CAM (---) and C_{H3} (···), denatured in 3 M GdnCl. The spectrum of C_{H3} -CAM in 3 M GdnCl was identical with that of denatured C_{H3} . The protein concentration was 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for native and denatured C_{H3} , respectively, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for C_{H3} -CAM. (c) Near-UV spectra of native C_{H3} (—), C_{H3} -CAM (---) and C_{H3} (···), denatured in 3 M GdnCl. The spectrum of C_{H3} -CAM in 3 M GdnCl was identical with that of denatured C_{H3} . The protein concentration was 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for native and denatured C_{H3} , respectively, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for C_{H3} -CAM.

reactions of the chaperone cycle of BiP kinetically. As a non-native substrate protein, we used the antibody C_{H3} domain. The generation of a soluble, unfolded C_{H3} species was the prerequisite for the kinetic analysis of the interaction with BiP.

Characterization of C_{H3} -CAM

BiP is known to bind only to unfolded or unassembled polypeptide chains, and not to completely folded native proteins. In order to investigate the interaction between BiP and an antibody domain *in vitro*, we modified the C_{H3} domain of the antibody MAK33 by reductive alkylation.^{27,28} The incorporated acetamide groups should allow C_{H3} to be maintained in a non-native state, potentially competent for association with BiP. Titration of free thiol groups with dithionitrobenzyl (DTNB)²⁹ showed that the alkylation reaction was complete (data not shown). As shown in Figure 1(a), the fluorescence emission spectra of C_{H3} -CAM resemble that of guanidinium-denatured C_{H3} . The maximum of emission is shifted from 344 nm for the native molecule to 353 nm for denatured C_{H3} and reduced and carboxyamido-methylated C_{H3} (C_{H3} -CAM), respectively.

Additionally, a 2.8-fold increase in the intensity was observed, which is due to the absence of the disulfide bond that quenches the tryptophan fluorescence in the native molecule.³⁰ The non-native state of C_{H3} -CAM could be further confirmed by CD spectroscopy. The far-UV spectra of native C_{H3} showed the typical features of an all- β -protein lacking α -helical structures, with a minimum at 220 nm and a local maximum at 235 nm, which is probably caused by the disulfide bond (Figure 1(b)). The far-UV spectra of C_{H3} -CAM, however, did not reveal any local maxima or minima, indicating that C_{H3} -CAM lacks stable secondary structure, and therefore resembles the completely denatured C_{H3} molecule. As shown in Figure 1(c), the near-UV spectra of native C_{H3} showed a global minimum between 272 nm and 274 nm with a second, local minimum at 292 nm. In the guanidinium-denatured state, only a strong decrease in the signal of C_{H3} was monitored with a local minimum at 285 nm and a broad local maximum in the range of 265 nm. The spectra of C_{H3} -CAM with and without guanidinium were almost identical with that of denatured C_{H3} . Taken together, the results of the spectroscopic characterization reveal that C_{H3} -CAM is in a soluble, unfolded conformation.

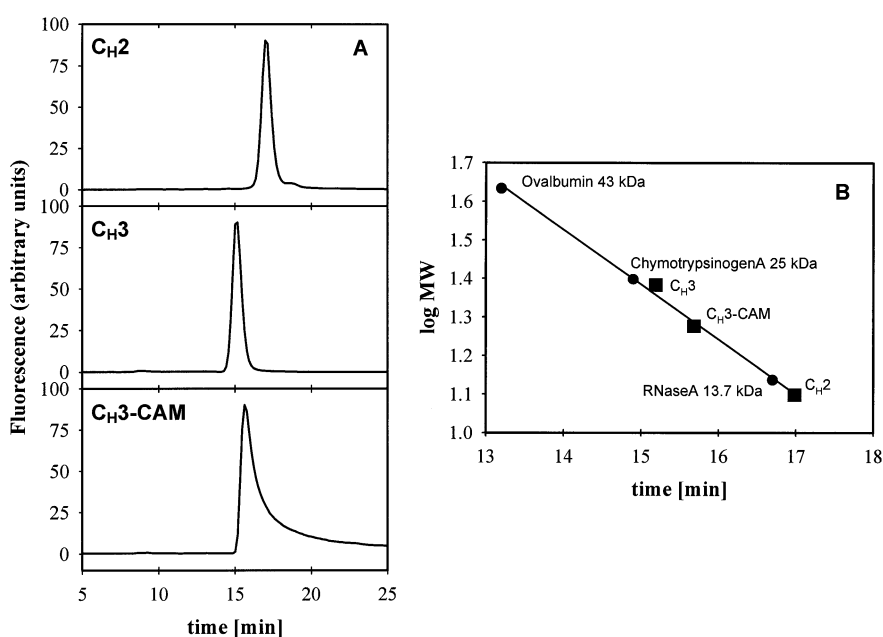


Figure 2. Analytical gel-filtration with different antibody domains. (a) Elution profiles of dimeric C_{H3}, monomeric C_{H2} and C_{H3}-CAM. Approximately 6 μ g of C_{H3} and C_{H2}, and 20 μ g of C_{H3}-CAM were loaded onto a Superdex 75 HR 10/30 column. The column was equilibrated in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) and run at a flow-rate of 0.75 ml min⁻¹. (b) Molecular mass was determined from a standard curve. This resulted in a molecular mass of 19 kDa for C_{H3}-CAM compared to 12.5 kDa for C_{H2} and 24 kDa for dimeric C_{H3}.

Analytical gel-filtration confirmed that the native C_{H3} domain forms dimers with a molecular mass of 24 kDa. For C_{H3}-CAM, an apparent molecular mass of 19 kDa could be determined, which is in between the values of 24 kDa for dimeric C_{H3} and 12.5 kDa for the monomeric C_{H2} domain. This result is in agreement with an extended, monomeric conformation of C_{H3}-CAM (Figure 2).

Complex formation between BiP and C_{H3}-CAM

As reported previously, BiP exists as a mixture of monomeric and dimeric species.^{13,31} Figure 3(a) shows the separation of BiP monomers and dimers by size-exclusion chromatography, with retention times of 18.3 minutes for the monomer and 16.1 minutes for the dimeric species. After incubation of BiP with C_{H3}-CAM at 37 °C, a prominent peak

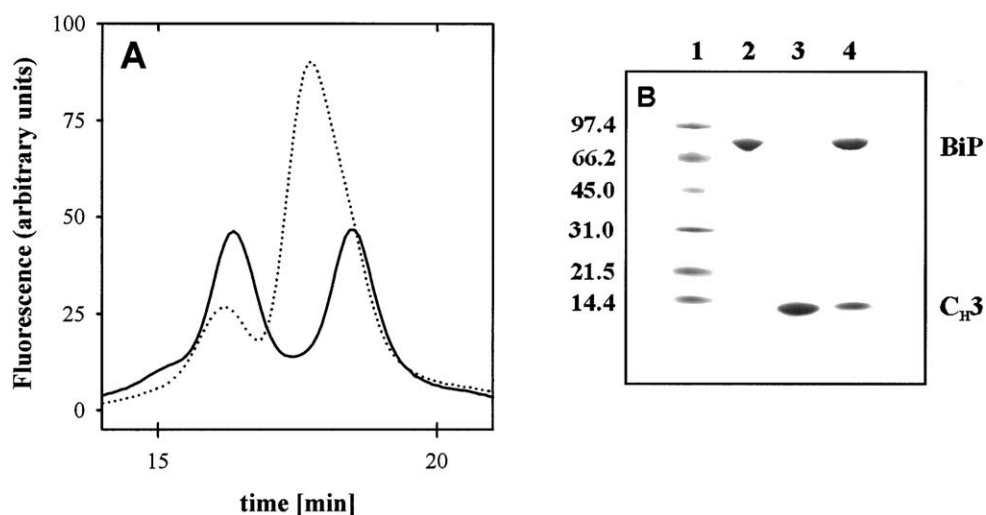


Figure 3. Complex formation between BiP and C_{H3}-CAM. (a) Complex formation between BiP and C_{H3}-CAM was analyzed by analytical gel-filtration as described in the text. BiP (1 μ M) was incubated in the presence (···) or in the absence (—) of C_{H3}-CAM (10 μ M) at 37 °C in a total volume of 50 μ l. After two hours, complex formation was analyzed by analytical gel-filtration (Superdex 200 HR 10/30 column equilibrated in 40 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, flow-rate 0.75 ml min⁻¹). (b) The complex peak between BiP and C_{H3}-CAM with a retention time of 17.8 minutes was isolated and further analyzed by SDS-PAGE using gradient gels with an acrylamide concentration of 10–20% (w/v). Proteins were subsequently visualized by Coomassie staining. Lanes 1–3, molecular mass markers, BiP and C_{H3}-CAM; lane 4, the isolated complex peak.

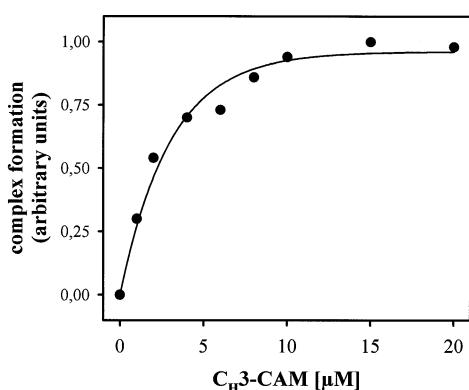


Figure 4. Concentration-dependence of complex formation between BiP and C_{H3}-CAM. Increasing amounts of 1–20 μM C_{H3}-CAM were incubated with 1 μM BiP in a total volume of 50 μl for two hours at 37 °C, subsequently complex formation was analyzed by analytical gel-filtration. The data points were fit as described in the text (equation (1)) and K_D for C_{H3}-CAM and BiP was determined to be 2.52(±0.41) μM.

with a retention time of 17.8 minutes was detected. This corresponds to an increase in molecular mass of 16 kDa compared to the BiP monomer, indicating an interaction between one molecule of C_{H3}-CAM and a BiP monomer. Subsequent analysis of the isolated peak by SDS-PAGE confirmed the presence of both BiP and C_{H3}-CAM in this peak (Figure 3(b)).

To determine the affinity of BiP for the modified antibody domain, the C_{H3}-CAM concentration was varied. As shown in Figure 4, complex formation increased with C_{H3}-CAM concentration. A plateau was reached between 10 μM and 20 μM C_{H3}-CAM. Analysis of the data by non-linear regression (equation (1)) resulted in a K_D of 2.5 μM for BiP and C_{H3}-CAM.

In order to investigate whether this interaction involves the peptide-binding site of BiP, we determined the influence of peptides HD14 (PGRSLRL)

and HD125 (SSASTKG) derived from the sequence of the antibody 3D6¹⁵ on the association of BiP and C_{H3}-CAM. These peptides do not contain Tyr or Trp residues and therefore did not interfere with the fluorescence detection of the BiP–C_{H3}-CAM complexes. Although there were binding peptides identified within the C_{H3} domain of the antibody MAK33, it was not possible to investigate their influence on complex formation, since all of them contained Tyr or Trp. Figure 5(a) shows that peptide HD125, which does not bind to BiP, had no influence on complex formation even when added in a 100-fold excess. Incubation with the BiP-binding peptide HD14, however, led to a complete suppression of association. Here, only BiP monomers with a retention time of 18.1 minutes could be detected. At a peptide (HD14) concentration of 10 μM, a significant decrease (30%) in complex formation could be monitored (Figure 5(b)). At higher concentrations (100–200 μM) of peptide, association between BiP and C_{H3}-CAM was suppressed completely. According to equation (2), the K_D value for peptide HD14 was determined to be 3.4 μM, which is in good agreement with values obtained earlier for viral or antibody peptides^{15,21} as well as with the K_D value determined for formation of BiP–C_{H3}-CAM complexes. This suggests that C_{H3}-CAM and the peptide HD14 compete for the substrate-binding site on BiP with similar affinity.

Kinetics of complex formation

Incubation of BiP with increasing C_{H3} concentrations revealed a strict correlation between complex formation and C_{H3} concentration. At a tenfold excess of C_{H3}, all BiP molecules were found in complexes with C_{H3}-CAM. An increase in the concentration of C_{H3} led to an acceleration of complex formation and saturation was reached at a BiP to C_{H3} ratio of 1:10. At this ratio (Figure 6(a)), binding was complete after 90–120 minutes,

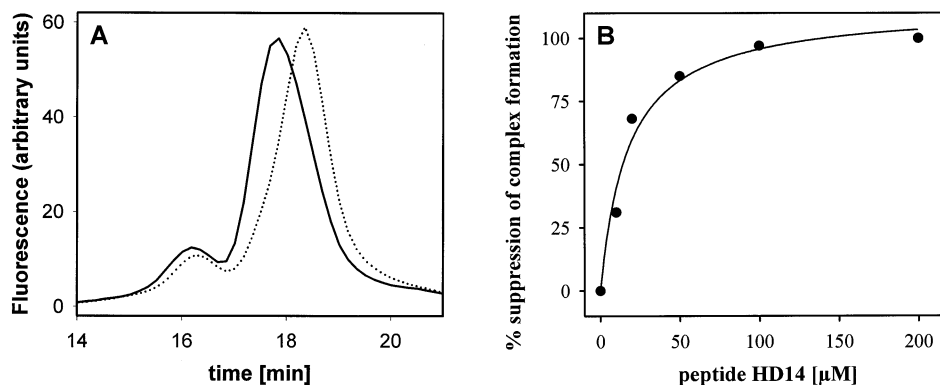


Figure 5. Influence of antibody peptides on complex formation between BiP and C_{H3}-CAM. (a) BiP (1 μM) was incubated for two hours at 37 °C with 10 μM C_{H3}-CAM and 100 μM antibody peptide HD125 (—) or HD14 (···), respectively. Subsequently, complex formation was analyzed by analytical gel-filtration. (b) BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were incubated with increasing amounts (10–200 μM) of the competing peptide HD14. After two hours of incubation, the amount of complex formation was determined by analytical gel-filtration. The data points were fit as described in the text (equation (2)) and K_D for peptide HD14 and BiP was calculated 3.38(±1.06) μM.

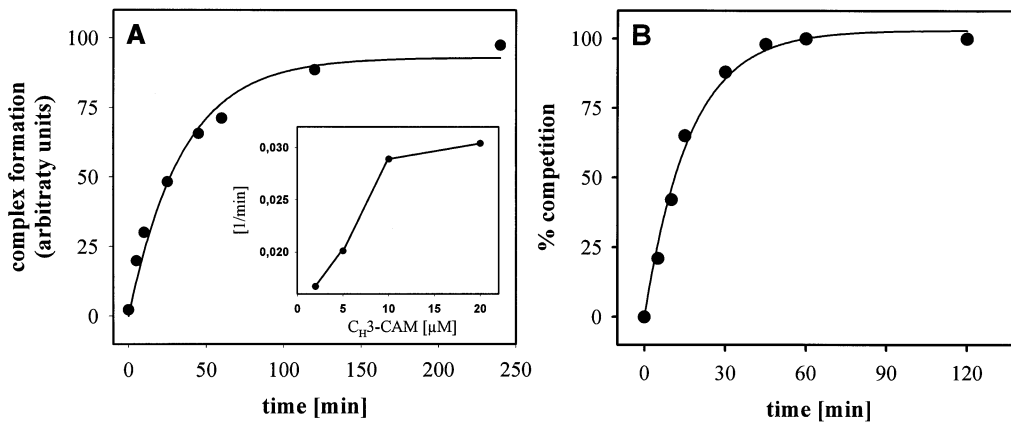


Figure 6. Time-course of complex formation between BiP and C_{H3}-CAM. (a) BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were incubated at 37 °C. At different time-points, the amount of complex formation was determined by analytical gel-filtration. Data points were fit with a single-exponential equation: $f = a(1 - \exp(-bx))$. The rate constant b was determined to be $0.0289(\pm 0.0036) \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 24$ minutes). Inset: Rate of complex formation with increasing concentration of C_{H3}. Complex formation was determined for different concentrations of C_{H3}. Data were fit and rate constants were determined using the equation given above. (b) Complexes between BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were preformed at 37 °C. After two hours, competing peptide HD14 was added to 200 μM. The time-course of complex dissociation was determined by analytical gel-filtration. Data points were fit with a single-exponential equation: $f = a(1 - \exp(-bx))$. The rate constant b was determined to be $0.0595(\pm 0.0047) \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 12$ minutes).

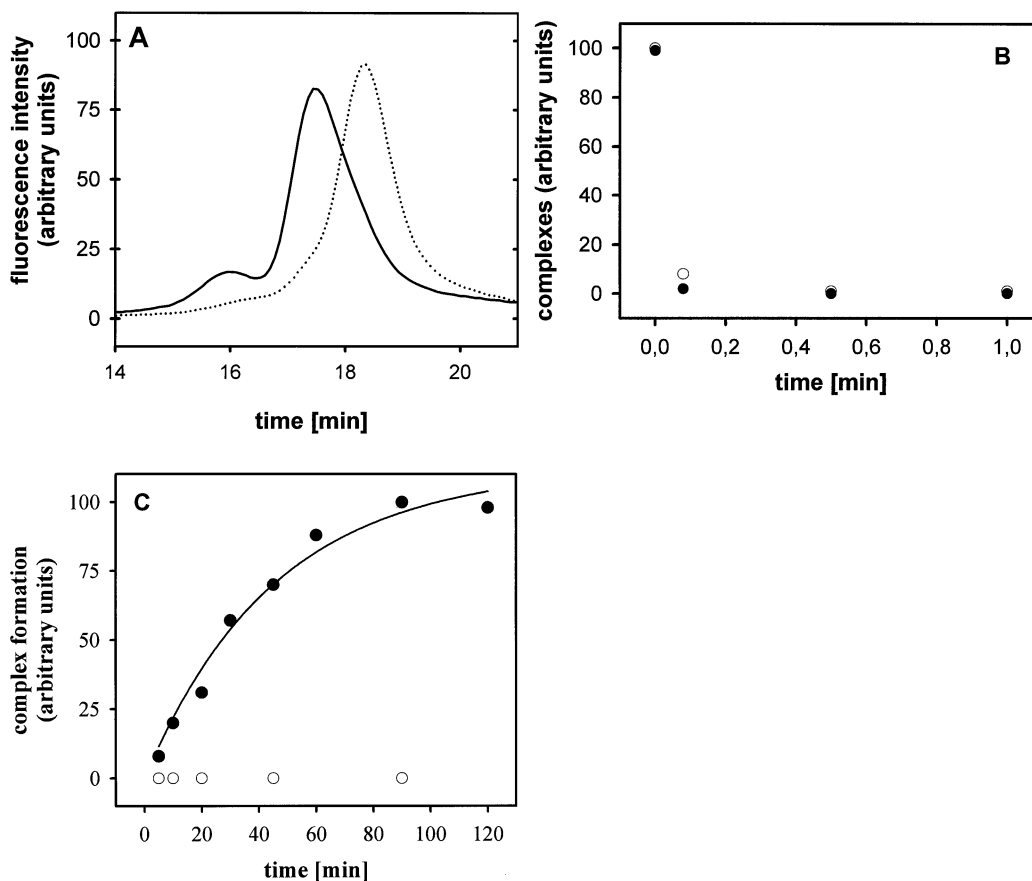


Figure 7. Influence of nucleotides on complex formation between BiP and C_{H3}-CAM analyzed by gel-filtration. (a) BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were incubated at 37 °C in the presence of 1 mM ADP (—) or 1 mM ATP (···), respectively. After one hour, complex formation was analyzed. (b) Complexes between BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were preformed at 37 °C in the presence (●) or absence (○) of 100 μM ADP. Subsequently, ATP was added to 1 mM and dissociation of the complexes was analyzed by gel-filtration. (c) BiP (1 μM) and C_{H3}-CAM (10 μM) were incubated at 37 °C with 1 mM ADP (●) or 50 μM ATP (○), respectively, and the kinetics of complex formation was determined. Data points were fit with a single-exponential equation: $f = y_0 + a(1 - \exp(-bx))$. The rate constant b was determined to be $0.0261(\pm 0.0045) \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2} = 27$ minutes).

while after five minutes of incubation only 20% of the amplitude was reached. The half-time of complex formation under these conditions was determined to be 24 minutes. Thus, complex formation between BiP and a non-native protein is a relatively slow process.

Since binding of peptides to BiP is much faster³² than complex formation between BiP and C_{H3}-CAM, it was possible to analyze the dissociation rate of the complexes by competition with the BiP-binding peptide HD14. As shown in Figure 6(b), dissociation of preformed complexes between BiP and C_{H3}-CAM occurred within the same time range as complex formation. Dissociation was completed after 45–60 minutes, the half-time was determined to be 12 minutes.

Influence of nucleotides on complex formation

Nucleotides play a central role in the functional cycle of Hsp70 molecular chaperones. For both bacterial DnaK and eucaryotic BiP, it was shown that binding of ATP is sufficient for the release of bound substrate.^{33–35} We therefore investigated the influence of ADP and ATP on the interaction between BiP and the modified antibody domain. The presence of ADP did not affect complex formation (Figure 7(a)). In the presence of ATP, however, almost exclusively BiP monomers and free C_{H3}-CAM were observed. The same result was obtained when ATP was added to preformed BiP–C_{H3}-CAM complexes. While the complexes were stable in the presence of ADP, addition of ATP to preformed C_{H3}-CAM–BiP complexes resulted in an extremely rapid dissociation. As shown in Figure 7(b), complexes could no longer be detected a few seconds after the addition of ATP. The half-time of dissociation induced by ATP was therefore determined to be faster than five seconds.

Since ADP obviously had no influence on complex stability, we investigated whether ADP had any effect on the kinetics of complex formation. Figure 7(c) shows that the half-time of complex formation in the presence of ADP ($t_{1/2} = 27$ minutes) was comparable to that determined in the absence of nucleotides ($t_{1/2} = 24$ minutes). The half-time of complex formation as well as the calculated k_{off} of 0.06 min^{-1} and k_{on} of $0.02 \text{ } \mu\text{M min}^{-1}$ underline the fact that binding of C_{H3}-CAM to BiP is a very slow process. It had been reported that the rate constants for binding of small peptides to BiP³² or DnaK^{36,37} were enhanced in the presence of ATP. Therefore, we investigated whether the presence

of ATP had any effect on the formation of the C_{H3}-CAM–BiP complex. However, even at low concentrations of ATP (50 μM), it was not possible to detect any interaction between BiP and C_{H3}-CAM by analytical gel-filtration.

The interaction between BiP and immunoglobulin heavy or light chains has so far been investigated mainly *in vivo*.^{1,10,11,38–40} For the analysis of complex formation of BiP with non-native proteins, we used a recombinantly expressed IgG C_{H3} domain. Modification of the reduced cysteine residues that are normally engaged in a disulfide bond in the interior of the protein with iodo acetamide resulted in a non-native derivative of C_{H3}. C_{H3}-CAM is a monomeric protein devoid of stable secondary or tertiary structure. Importantly, the modified protein was unfolded but soluble. Using this stably unfolded antibody domain, we were able to analyze complex formation and dissociation between BiP and a natural substrate *in vitro*. The complex formed upon incubation of the two proteins consists of one molecule of C_{H3}-CAM and one BiP monomer. A 1:1 ratio of BiP to antibody chains had been suggested on the basis of *in vivo* observations.¹⁰ However, the ratio clearly depends on the number of accessible BiP-binding sites and their relative localization. Therefore, we assume that in the case of IgG heavy chains, which consist of four immunoglobulin domains, several BiP molecules can bind in principle. In contrast to *in vivo* studies,^{31,41} no binding of BiP dimers or higher oligomers to the substrate protein could be observed. Since BiP was present as a mixture of dimers and monomers at the beginning of the association reaction, our results demonstrate that unfolded protein domains induce dissociation of BiP dimers. This is consistent with the effect of short peptides on BiP oligomers.^{13,41,42}

The interaction between BiP and C_{H3}-CAM was proven to be highly specific, with a K_D value of 2.5 μM . This value is in good agreement with K_D values obtained previously for peptides binding with high affinity to BiP.^{13,15,18,21} The specificity of binding could be further confirmed by competition experiments with two antibody peptides. Peptide HD125, which does not bind to BiP, did not influence the binding of C_{H3}-CAM to BiP. However, the BiP-binding peptide HD14 competed efficiently with C_{H3}-CAM for binding to BiP, with a K_D value of 3.4 μM . Thus, the peptide binding site seems to be determining the affinity between BiP and its substrate proteins exclusively.

Table 1. Summary of the kinetic data for the interaction between BiP and the antibody domain C_{H3}-CAM

	$t_{1/2}$ of complex formation (minutes)	$t_{1/2}$ of complex dissociation (minutes)
Without nucleotides	24	12
+ ADP	27	13
+ ATP	Not detectable	<0.08

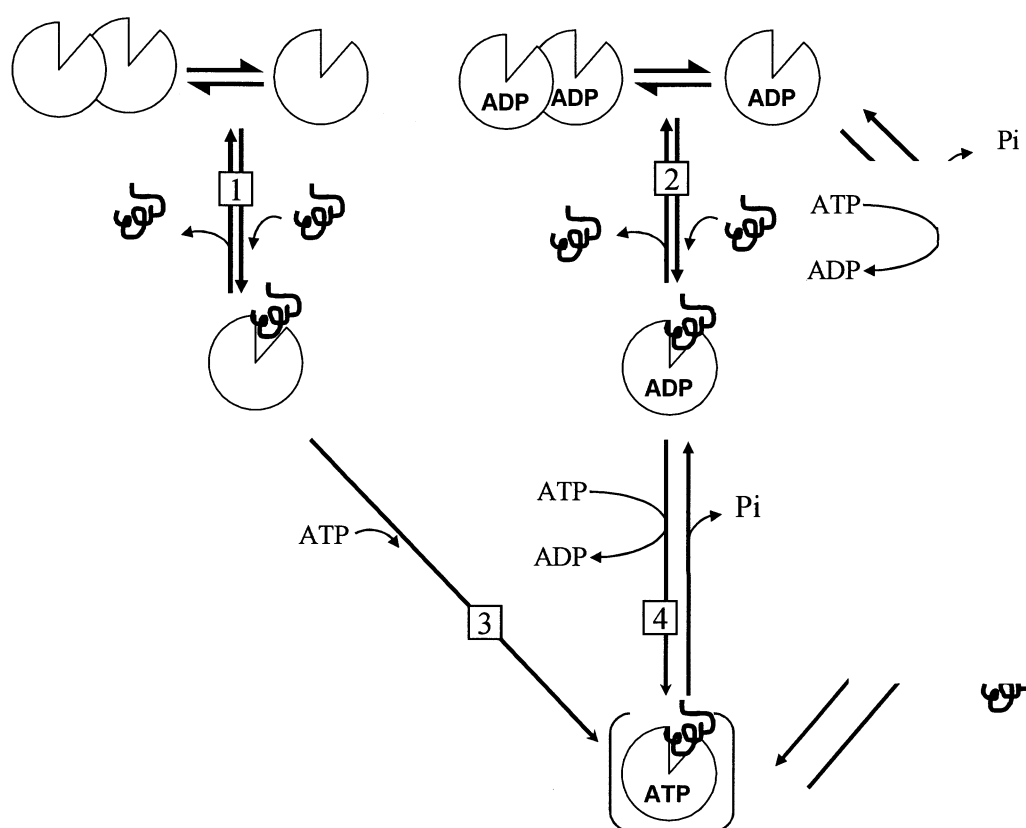


Figure 8. A model for the interaction between BiP and the modified antibody domain C_H3 -CAM.

Analysis of the kinetic data for the interaction of BiP and C_H3 -CAM showed that the half-times for complex association and dissociation were comparable in the presence or in the absence of ADP. With half-times of 24 minutes and 12 minutes, respectively, association and dissociation of the complexes are slow processes (see Table 1). For peptides, faster association reactions have been observed.³² This implies that, in the case of the unfolded antibody domain, the accessibility of the BiP-binding sequences influences the association reaction to some extent. This must be a more decisive factor *in vivo*, where, unlike with C_H3 -CAM, folding proceeds to the native state. Therefore, not all BiP-binding sites may be used under physiological folding conditions in the cell. However, taking into account the dissociation constant and the high concentrations of BiP present in the endoplasmic reticulum, complex formation *in vivo* will be faster than the values determined here by analytical gel-filtration, in which the samples are diluted considerably.

In the presence of ATP, the rate constants for dissociation of peptides from Hsp70 proteins are increased strongly.^{34,36,43–45} Accordingly, the ATP-induced dissociation of complexes between BiP and C_H3 -CAM was almost complete within five seconds after the addition of ATP. While for DnaK^{36,37} and Hsc70⁴³ increased rate constants for binding of substrate peptides in the presence of ATP were reported, it was not possible to detect

by gel-filtration any interaction between BiP and C_H3 -CAM in the presence of ATP. Since the affinity of DnaK or Hsc70 for peptides in the presence of ATP were remarkably decreased, by factors ranging from 40 to 80,^{36,37,43} a K_D value of 120–240 μ M for the affinity of C_H3 -CAM to BiP in the presence of ATP would be expected. These concentrations could not be achieved, since C_H3 -CAM tends to aggregate at concentrations higher than 50 μ M (data not shown).

The BiP- C_H3 -CAM complex dissociated within a few seconds after the addition of ATP. However, the rate of ATP-hydrolysis by BiP was reported to be 8 pmol $mg^{-1} min^{-1}$ (i.e. one turnover in two minutes).¹⁵ Since the rate-limiting step in the ATPase cycle of Hsp70 proteins is the cleavage of the phosphate bond and not the subsequent release of ADP and Pi, ATP hydrolysis is too slow to correlate with the dissociation kinetics of the BiP- C_H3 -CAM complex. This suggests that *in vitro* binding of ATP is sufficient for the release of C_H3 -CAM bound to BiP. This is consistent with the analysis of DnaK, where binding of ATP was found to be responsible for the dissociation of DnaK-peptide complexes.³⁴ The subsequent ATP hydrolysis and the exchange of ADP for ATP are required for resetting the conformational changes brought about by ATP binding.

Taken together, our findings allow definition of a reaction cycle for the interaction of BiP with non-native proteins (Figure 8).

Monomerization of the BiP dimer precedes the binding of the substrate and may be the rate-limiting step under conditions where no ATP is present. The first detectable step in the interaction with the substrate is the binding of C_{H3}-CAM to monomeric BiP or to a BiP-ADP complex (steps 1 or 2). In both cases, complex formation is slow and the resulting complexes are stable. Binding of ATP to these complexes leads to a conformational change within the BiP molecule that decreases the affinity for the substrate (steps 3 or 4). As a consequence, C_{H3}-CAM dissociates from the BiP-ATP-C_{H3}-CAM complexes (step 5) and, after hydrolysis of ATP (step 6), BiP can bind in its ADP form to another substrate molecule (step 2). The ternary ATP complex postulated in this scheme could not be detected directly, probably because it dissociates too fast.

In vivo, BiP is predominantly in its ATP or ADP form.⁴ Since it has been shown for DnaK that binding of peptides can occur to the ATP-bound form,³⁶ a similar scheme of events can be envisioned for BiP (step 7). This complex could not be detected, however, because of technical limitations imposed by the affinity and release kinetics.

The *in vitro* assay described here is a first step towards a more complex assay system employing "foldable" substrate proteins and co-factors of BiP. As in the case of other Hsp70 systems, these co-chaperones, specifically the recently identified ER-localized DnaJ homologues⁴⁶⁻⁵⁰ may influence individual steps of the cycle and modify the intrinsic binding properties of BiP for non-native proteins described in this study.

Proteins

For the expression of mouse BiP⁵¹ in the cytoplasm of *Escherichia coli*, plasmid pUJ4 was used. The purification was carried out as described.¹⁴ The concentration of BiP was determined using an extinction coefficient of $E_{280\text{ nm},0.1\%,1\text{ cm}} = 0.395$. C_{H3} was expressed in *E. coli* and purified as described.³⁰

Modification of recombinant C_{H3}

For the reduction and subsequent alkylation of C_{H3}, approximately 1 mg of protein was denatured in 4 M Gdm-HCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM DTT for ten minutes at 25 °C. Iodoacetamide was added to a final concentration of 100 mM and incubated for 30 minutes at 25 °C. Subsequently, the sample was desalted using a PD10 column (Pharmacia) and dialysed against 100 mM Tris-HCl (pH 8.0). Finally, after centrifugation, the concentration of the C_{H3}-CAM was determined spectroscopically using an extinction coefficient of $E_{280\text{ nm},0.1\%,1\text{ m}} = 1.93$.

Fluorescence measurements

Fluorescence measurements were performed with a Fluoromax spectrofluorimeter (Spex) at

25 °C. The spectra were recorded from 305 to 400 nm in 1 cm quartz cuvettes at an excitation wavelength of 280 nm. The buffer was 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), the spectral bandwidth for both, excitation and emission was 4.25 nm.

Circular dichroism (CD) measurements

Near- and far-UV CD spectra were recorded using a Jasco J715 spectropolarimeter. Near-UV CD spectra were recorded from 250 to 350 nm in a 1 cm quartz cuvette, far-UV spectra from 200 to 250 nm in a 0.1 cm quartz cuvette in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0). All spectra were base-line-corrected, the temperature was 20 °C for both near- and far-UV CD spectra.

Analytical gel-filtration

The oligomeric state of the modified antibody domain C_{H3}-CAM was determined by analytical gel-filtration using a Superdex 75 HR 10/30 column (Pharmacia), equilibrated in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0). The monomeric C_{H2} domain and the dimeric C_{H3} domain were used as molecular mass standards. Calibration was done with the LMW Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia).

The interaction between BiP and C_{H3} was detected by HPLC gel-filtration using a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia) equilibrated in 40 mM Hepes (pH 7.5), 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂. 1 μM BiP was incubated in equilibration buffer at 37 °C with various amounts of C_{H3}-CAM, complex formation was monitored by measuring the fluorescence emission at 330 nm with an excitation wavelength of 280 nm using a FP920 fluorescence detector (Jasco). The relative peak areas of the different species were quantified using the Borwin chromatography software (Jasco).

Data modelling and curve fits

The Scientist software was used for data modelling and curve fits.

The concentration-dependence of complex formation between BiP and C_{H3}-CAM (Figure 4) was modelled with a Langmuire absorption isotherm described by the following equation:

$$\text{signal} = \text{signal}_0 + (\text{signal}_{\text{max}} - \text{signal}_0) \cdot c_{\text{CH}_3} / (c_{\text{CH}_3} + K_D c_{\text{CH}_3}) \quad (1)$$

where signal₀ means that all the BiP is free, whereas signal_{max} means that all the BiP is bound to C_{H3}-CAM. The value for signal_{max} was calculated to be 1.13 (± 0.042). The calculated K_D for C_{H3}-CAM was 2.52 (± 0.41) μM.

The suppression of the BiP-C_{H3}-CAM complex formation by peptides (Figure 5(b)) was fit with a simple competition model with the following

equation:

$$\text{signal} = \text{signalmax} - (\text{signalmax} - \text{signal0}) \cdot c\text{CH3} / (c\text{CH3} + K_D\text{CH3} + c\text{Peptide}/K_D\text{Pep}) \quad (2)$$

where signal0 is the point where all the BiP is in complex with C_{H3}-CAM; signalmax means that all the BiP is in complex with the peptide. The parameters cCH3 (concentration of C_{H3}-CAM = 10 μM) and K_DCH3 (2.5 μM) were fixed. The calculation leads to a signalmax of 112.27 (± 8.08) μM. The calculated K_D for peptide HD14 was 3.38 (± 1.06) μM.

Acknowledgments

The antibody domain C_{H2} was a kind gift from Michael Thies (Technische Universität München, Germany). We thank the members of the laboratory, especially Klaus Richter and Stefan Walter, for stimulating discussions, and Linda Hendershot for continued interest in the project. Work in the author's laboratory was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. U. K. was supported by the Boehringer Ingelheim Fonds.

References

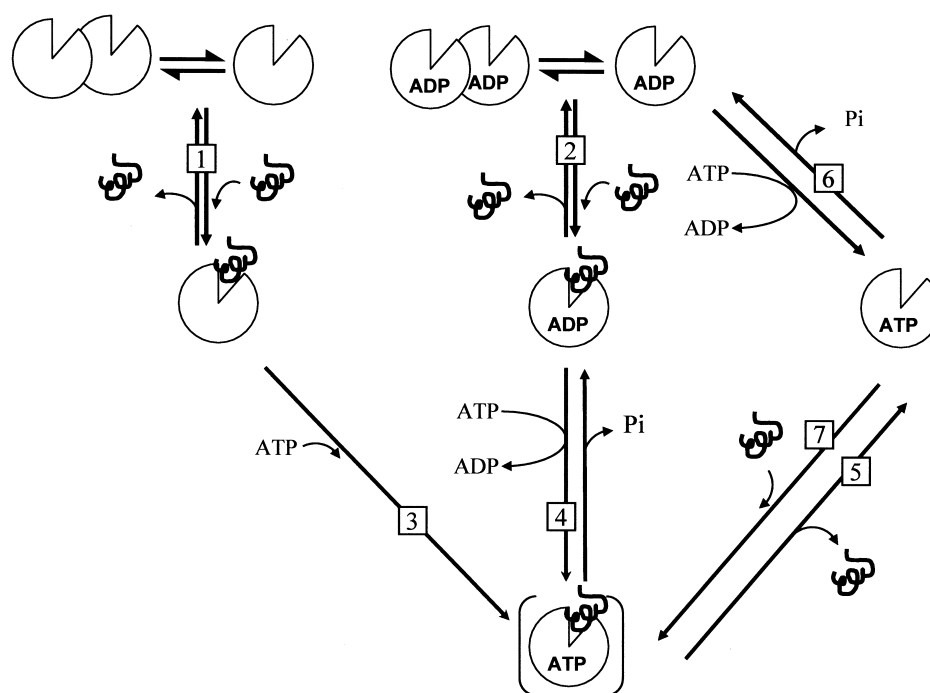
- Haas, I. G. & Wabl, M. R. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, **306**, 387–389.
- Hendershot, L. M., Bole, D., Kohler, G. & Kearney, J. F. (1987). Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J. Cell Biol.* **104**, 761–767.
- Capon, D. J., Chamov, S. M., Mordenti, J., Marsters, S. A., Gregory, T., Mitsuya, H. *et al.* (1989). Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*, **337**, 525–531.
- Haas, I. G. (1991). BiP: a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **167**, 71–82.
- Kaloff, C. R. & Haas, I. G. (1995). Coordination of immunoglobulin chain folding and immunoglobulin chain assembly is essential for the formation of functional IgG. *Immunity*, **2**, 629–637.
- Davis, D. P., Khurana, R., Meredith, S., Stevens, F. J. & Argon, Y. (1999). Mapping the major interaction between binding protein and Ig light chains to sites within the variable domain. *J. Immunol.* **163**, 3842–3850.
- Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellman, R. & Hendershot, L. M. (1999). BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 2209–2219.
- Nakaki, T., Deans, R. J. & Lee, A. S. (1989). Enhanced transcription of the 78,000-dalton glucose-regulated protein (GRP78) gene and association of GRP78 with immunoglobulin light chains in a nonsecreting B-cell myeloma line (NS-1). *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2233–2238.
- Ma, J., Kearney, J. F. & Hendershot, L. M. (1990). Association of transport-defective light chains with immunoglobulin heavy chain binding protein. *Mol. Immunol.* **27**, 623–630.
- Knittler, M. R. & Haas, I. G. (1992). Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. *EMBO J.* **11**, 1573–1581.
- Knittler, M. R., Dirks, S. & Haas, I. G. (1995). Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 1764–1768.
- Skowronek, M. H., Hendershot, L. M. & Haas, I. G. (1998). The variable domain of nonassembled Ig light chains determines both their half-life and binding to the chaperone BiP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 1574–1578.
- Blond-Elguindi, S., Cwirla, S. E., Dower, W. J., Lipshutz, R. J., Sprang, S. R., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993). Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, **75**, 717–728.
- Knarr, G., Modrow, S., Todd, A., Gething, M.-J. & Buchner, J. (1999). BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of BiP. *J. Biol. Chem.* **274**, 29850–29857.
- Knarr, G., Gething, M.-J., Modrow, S. & Buchner, J. (1995). BiP binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.* **270**, 27589–27594.
- Augustine, J. G., de La Calle, A., Knarr, G., Buchner, J. & Frederick, C. A. (2001). The crystal structure of the Fab fragment of the monoclonal antibody MAK33. Implications for folding and interaction with the chaperone BiP. *J. Biol. Chem.* **276**, 3287–3294.
- Vanhove, M., Usherwood, Y. K. & Hendershot, L. M. (2001). Unassembled Ig heavy chains do not cycle from BiP *in vivo* but require light chains to trigger their release. *Immunity*, **15**, 105–114.
- Flynn, G. C., Chappel, T. G. & Rothman, J. E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*, **245**, 385–390.
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. & Rothman, J. E. (1991). Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, **353**, 726–730.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A. M., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1993). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J. Biol. Chem.* **268**, 12730–12735.
- Fourie, A. M., Sambrook, J. F. & Gething, M. J. (1994). Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **269**, 30470–30478.
- Rüdiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* **16**, 1501–1507.
- Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F. J. & Hendershot, L. M. (1999). The *in vivo* association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J. Cell Biol.* **144**, 21–30.
- Wei, J. & Hendershot, L. M. (1995). Characterization of the nucleotide binding properties and ATPase activity of recombinant hamster BiP purified from bacteria. *J. Biol. Chem.* **270**, 26670–26676.

25. Kassenbrock, C. K. & Kelly, R. B. (1989). Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides. *EMBO J.* **8**, 1461–1467.
26. Puig, A. & Gilbert, H. F. (1994). Anti-chaperone behavior of BiP during the protein disulfide isomerase-catalyzed refolding of reduced denatured lysozyme. *J. Biol. Chem.* **269**, 25889–25896.
27. Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1979). The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *J. Biochem.* **86**, 1433–1441.
28. Kikuchi, H., Goto, Y. & Hamaguchi, K. (1986). Reduction of the buried intrachain disulfide bond of the constant fragment of the immunoglobulin light chain: global unfolding under physiological conditions. *Biochemistry*, **25**, 2009–2013.
29. Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77.
30. Thies, M. J. W., Mayer, J., Augustine, J. G., Frederick, C. A., Lilie, H. & Buchner, J. (1999). Folding and association of the antibody domain CH3: prolyl isomerization precedes dimerization. *J. Mol. Biol.* **293**, 67–79.
31. Toledo, H., Carlino, A., Vidal, V., Redfield, B., Nettleton, M. Y., Kochan, J. P. *et al.* (1993). Dissociation of glucose-regulated protein Grp78 and Grp78-IgE Fc complexes by ATP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 2505–2508.
32. Weissbach, H., Redfield, B., Qiu, N. H., Chen, G. J., Carlino, A., Vidal, V. *et al.* (1995). Interaction of BiP with substance P and nucleotides. *Cell. Mol. Biol. Res.* **41**, 397–403.
33. Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J. & Fink, A. L. (1993). ATP-induced protein-Hsp70 complex dissociation requires K⁺ but not ATP hydrolysis. *Nature*, **365**, 664–666.
34. Wei, J., Gaut, J. R. & Hendershot, L. M. (1995). *In vitro* dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **270**, 26677–26682.
35. Theyssen, H., Schuster, H. P., Packschies, L., Bukau, B. & Reinstein, J. (1996). The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J. Mol. Biol.* **263**, 657–670.
36. Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. & Christen, P. (1994). Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, **263**, 971–973.
37. Pierpaoli, E. V., Sandmeier, E., Baici, A., Schönfeld, H. J., Gisler, S. & Christen, P. (1997). The power stroke of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone system. *J. Mol. Biol.* **269**, 757–768.
38. Hendershot, L. M. (1990). Immunoglobulin heavy chain and binding protein complexes are dissociated *in vivo* by light chain addition. *J. Cell Biol.* **111**, 829–837.
39. Hendershot, L. M., Wei, Y., Gaut, J., Melnick, J., Aviel, S. & Argon, Y. (1996). Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 5269–5274.
40. Lee, Y. K., Brewer, J. W., Hellmann, R. & Hendershot, L. M. (1999). BiP and immunoglobulins light chain cooperate to control the folding heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2209–2219.
41. Freiden, P. J., Gaut, J. R. & Hendershot, L. M. (1992). Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *EMBO J.* **11**, 63–70.
42. Chevalier, M., King, L., Wang, C., Gething, M.-J., Elguindi, E. & Blond, S. Y. (1998). Substrate binding induces depolymerization of the C-terminal peptide binding domain of murine GRP78/BiP. *J. Biol. Chem.* **273**, 26827–26835.
43. Greene, L. E., Zinner, R., Naficy, S. & Eisenberg, E. (1995). Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 2967–2973.
44. Gao, B., Eisenberg, E. & Greene, L. E. (1995). Interaction of nucleotide-free Hsc70 with clathrin and peptide and effect of ATP analogues. *Biochemistry*, **34**, 11882–11888.
45. Takeda, S. & McKay, D. B. (1996). Kinetics of peptide binding to the bovine 70 kDa heat shock cognate protein, a molecular chaperone. *Biochemistry*, **35**, 4636–4644.
46. Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C. & Blond, S. Y. (2000). Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. *J. Biol. Chem.* **275**, 19620–19627.
47. Misselwitz, B., Staeck, O. & Rapoport, T. A. (1998). J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell*, **2**, 593–603.
48. Misselwitz, B., Staeck, O., Matlack, K. E. & Rapoport, T. A. (1999). Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 20110–20115.
49. Bies, C., Guth, S., Janoschel, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. & Zimmermann, R. (1999). A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *J. Biol. Chem.* **380**, 1175–1182.
50. Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G. *et al.* (2000). Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 7214–7219.
51. Haas, I. G. & Meo, T. (1988). cDNA cloning of the immunoglobulin heavy chain binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 2250–2254.

Edited by R. Huber

(Received 26 November 2001; received in revised form 21 February 2002; accepted 25 February 2002)

ERRATUM

Erratum to “Interaction of the Chaperone BiP with an Antibody Domain: Implications for the Chaperone Cycle”[☆]*J. Mol. Biol.* (2002) 318, 611–620**Gerhard Knarr, Ursula Kies, Stefan Bell, Marcus Mayer and Johannes Buchner**It is regretted that an incomplete version of [Figure 8](#) was printed. The correct version is printed here.**Figure 8.** A model for the interaction between BiP and the modified antibody domain CH₃-CAM.[☆] DOI of original article: 10/1016/S0022-2836(02)00166-3.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2000 bis Februar 2003 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt. Prof. 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.

Prof. Arne Holmgren und Dr. Alexios Vlamis danke ich für die Bereitstellung von *E. coli* Knockout-Stämmen.

Prof. Kari Kivirikko und Dr. Peppi Karppinen danke ich für die Bereitstellung von Prolyl-4-Hydroxylase und Erp57.

Prof. Robert Freedman und Dr. Lloyd Ruddock danke ich für die Bereitstellung des Klons für humane PDI.

Prof. Robert Huber danke ich für die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung durchführen zu können.

Dr. Jochen Reinstein danke ich für die Möglichkeit am MPI in Dortmund stopped flow Messungen durchzuführen und seine Hilfe bei der Datenauswertung.

Der Roche AG insbesondere Herrn Dr. Lenz danke ich für die Bereitstellung von MAK33 Fab und ELISA Reagentien sowie eines automatischen ELISA Messgerätes.

Besonderer Dank gilt Frau Thusnelda Stromer für die Durchführung der TEM-Aufnahmen.

Dr. Ursula Kies und Dr. Martin Haslbeck danke ich für die Betreuung meines Praktikums und meiner Diplomarbeit sowie unzähliger hilfreicher Ratschläge.

Dr. Stefan Bell, Dr. Holger Grallert, Dr. Michael Thies und Dr. Stefan Walter danke ich für ihre stetige Hilfe zu allen Fragen rund um die Faltung von Proteinen und Antikörpern.

Ein ganz besonderer Dank gilt unseren TAs, vor allem Ioana Schuster für die Reinigung von PDI.

Meinem Diplomanten Jan Havel und meinen Praktikanten/innen und Hiwis sei für die tatkräftige Unterstützung gedankt.

Allen Korrekturlesern danke ich für Ausdauer beim Lesen der zahlreichen Seiten.

Allen anderen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für ein allzeit herzliches und ausgezeichnetes Arbeitsklima.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner geliebten Eva von Herzen dafür bedanken, dass sie mir immer zur Seite stand. Ohne sie wäre diese Arbeit wohl nie vollendet worden.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Garching, Februar 2003