

Department Chemie  
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Faltungshelferproteine des Endoplasmatischen Retikulums  
und ihr Einfluss auf die Faltung und Aktivität des  
monoklonalen Antikörpers MAK33**

Stephan Frey

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

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Ulrich Heiz

Prüfer der Dissertation: Univ.- Prof. Dr. Johannes Buchner  
Univ.- Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 28.09.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch das Department Chemie am 15.11.2006 angenommen.

*Meiner Familie*

---

1. Einleitung .....	- 1 -
1.1. Proteinfaltung .....	- 3 -
1.1.1. Disulfidbrücken in der Proteinfaltung .....	- 5 -
1.1.2. Antikörper als Modellsystem .....	- 6 -
1.1.3. Die Struktur von Antikörpern .....	- 8 -
1.2. <i>In Vitro</i> Translations- / Transkriptionssysteme .....	- 10 -
1.2.1. <i>Batch</i> Systeme .....	- 10 -
1.2.2. Kontinuierliche Systeme .....	- 13 -
1.2.3. Systeme aus gereinigten Komponenten .....	- 14 -
1.2.4. Rapid Translation System .....	- 15 -
1.3. Molekulare Chaperone .....	- 18 -
1.5. Proteinfaltung im <i>in vitro</i> Transkriptions- / Translationsystemen .....	- 22 -
1.6. Die Hsp90- Familie .....	- 23 -
1.6.1. Grp94 .....	- 28 -
1.7. Die Hsp70- Familie .....	- 31 -
1.7.1. BiP .....	- 34 -
1.8. Proteinfaltung und Qualitätskontrolle im ER .....	- 36 -
1.8.1. ER- Stress und UPR (unfolded protein response) .....	- 38 -
1.8.2. ER-assoziiertes Abbau (ERAD) .....	- 39 -
1.9. Problemstellung .....	- 40 -
2. Material und Methoden .....	- 42 -
2.1. Verwendetes Material .....	- 42 -
2.1.1. Chemikalien .....	- 42 -
2.1.2. Größenstandards, Kits und Spezialreagentien .....	- 43 -
2.1.3. Chromatographische Materialien und Säulen .....	- 44 -
2.1.4. Enzyme und Proteine .....	- 44 -
2.1.5. Geräte .....	- 45 -
2.1.6. Computerprogramme .....	- 46 -
2.2. Verwendete Organismen und ihre Kultivierung .....	- 47 -
2.2.1. Bakterienstämme .....	- 47 -
2.2.2. Oligodesoxynukleotide .....	- 48 -
2.2.3. Plasmide .....	- 48 -
2.2.4. TOPO TA Cloning® .....	- 49 -
2.2.5. Medien .....	- 49 -

---

2.2.6. Antibiotika und Zusätze .....	- 50 -
2.2.7. Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	- 50 -
2.2.8. Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	- 50 -
2.2.9. Transformation mit Plasmiden .....	- 51 -
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	- 51 -
2.3.1. Agarosegelelektrophorese von DNA .....	- 51 -
2.3.2. Isolierung und Reinigung von DNA .....	- 52 -
2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	- 52 -
2.3.4. Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen.....	- 53 -
2.3.5. Phosphatasebehandlung .....	- 54 -
2.3.6. Ligation .....	- 54 -
2.3.7. DNA Sequenzanalyse.....	- 54 -
2.3.8. <i>In vitro</i> Transkription / Translation.....	- 54 -
2.3.9. Aufnahme von Enzymkinetiken der RTS- Reaktion.....	- 57 -
2.4. Proteinchemische Methoden .....	- 57 -
2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	- 57 -
2.4.2. Färbemethode für SDS-Gele nach Fairbanks.....	- 59 -
2.4.3. Immunoblotting (Western Blot).....	- 59 -
2.4.4. Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) .....	- 60 -
2.4.5. Analytische Gelfiltration .....	- 61 -
2.4.6 Derivatisierung von Cysteinen mit Iodacetamid.....	- 61 -
2.4.7. Reduktion und Alkylierung von C <sub>H</sub> 3 .....	- 62 -
2.4.8. Radioaktiver ATPase Assay (Kronberg et al., 1978).....	- 62 -
2.4.9. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	- 63 -
2.4.10. Immunopräzipitation .....	- 64 -
2.4.11. ATPase-Aktivitätstest mit ATP-regenerierendem System.....	- 64 -
2.4.12. Citratsynthase Chaperonaktivitätstest .....	- 65 -
2.4.13. Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation.....	- 67 -
2.5. Proteinbiochemische und analytische Methoden .....	- 68 -
2.5.1. Verwendete Puffer.....	- 68 -
2.5.2. Aufnahme von Expressionskinetiken.....	- 69 -
2.5.3. Anzucht und Induktion von <i>E. coli</i> .....	- 69 -
2.5.4. Zellernte und Zellaufschluss von Bakterienzellen .....	- 69 -
2.5.4.1 Aufschluss für die Reinigung löslicher Proteine.....	- 70 -

2.5.4.2 Periplasmaaufschluss .....	- 70 -
2.5.5. Chromatographische Methoden .....	- 70 -
2.5.5.1. Ammoniumsulfatfällung .....	- 71 -
2.5.5.2. Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	- 71 -
2.5.5.3. GSH-Sepharose- Affinitätschromatographie .....	- 71 -
2.5.5.3. Ionenaustauscher .....	- 72 -
2.5.5.4. Gelfiltrationschromatographie .....	- 72 -
2.5.5.5. Aufkonzentration und Dialyse .....	- 73 -
2.5.7. Reinigungsschemata der in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine.....	- 73 -
2.5.7.1. Grp94 aus Hund .....	- 73 -
2.5.7.2. BiP aus Maus.....	- 74 -
2.5.7.3. Calnexin und ERp44 aus Mensch, .....	- 74 -
2.5.7.4. C <sub>H</sub> 3 von MAK33 aus Maus.....	- 75 -
2.6. Spektroskopische Methoden .....	- 75 -
2.6.1. UV-Vis-Spektroskopie .....	- 75 -
2.6.2. Fluoreszenzspektroskopie .....	- 76 -
2.6.3. Circular dichroismus .....	- 77 -
3. Ergebnisse und Diskussion.....	- 79 -
3.1. Synthese eines funktionellen MAK33 IgG- Moleküls in einem zellfreien Transkriptions-/ Translationssystem .....	- 79 -
3.1.1. Herstellung linearer Expressionskonstrukte für die Expression im RTS100 HY.....	- 79 -
3.1.2. Expressionsanalyse im RTS100 HY .....	- 81 -
3.1.3. Synthese von Antikörpermolekülen im CECF- System.....	- 82 -
3.1.4. Aktivitätsnachweis des im RTS synthetisierten MAK33.....	- 86 -
3.1.5. Einfluss von ER- Chaperonen auf die Aktivität von MAK33 im RTS .....	- 89 -
3.1.6. Einfluss des Redoxmilieus auf die Aktivität des Antikörpers.....	- 90 -
3.1.7. Assemblierungszustand des im RTS exprimierten MAK33 .....	- 91 -
3.1.8. DnaK als Antikörperfaltungshelfer .....	- 95 -
3.1.9. Diskussion zur zellfreien Expression von MAK33 im RTS .....	- 98 -
3.2. Reaktivierung und Renaturierung von Fab <i>in vitro</i> .....	- 102 -
3.2.1. Renaturierung von oxidativ entfalteten Fab .....	- 102 -
3.2.2. Renaturierung von reduziert entfalteten Fab .....	- 103 -
3.2.3. Renaturierung von reduziert entfalteten Fab durch LyTOR .....	- 105 -

---

3.2.3. Der Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von Fab .....	- 108 -
3.2.4. Der Einfluss von Calnexin und ERp57 auf die Rückfaltung von Fab .....	- 109 -
3.2.5. Diskussion der <i>in vitro</i> Rückfaltung von Fab.....	- 113 -
3.3. Charakterisierung von Grp94 .....	- 117 -
3.3.1. Sekundärstruktur und thermische Stabilität von Grp94 .....	- 117 -
3.3.2. Untersuchung der Quartärstruktur und des Faltungszustands von Grp94.....	- 119 -
3.3.3. Die Chaperonaktivität von Grp94 .....	- 123 -
3.3.4. Die ATPase Aktivität von Grp94 .....	- 125 -
3.3.5. Die ATPase Aktivität von GRP ist durch Radicicol, Geldanamycin und NECA inhibierbar .....	- 127 -
3.3.6. Die Michaelis-Menten- Konstante von Grp94 für ATP.....	- 132 -
3.3.7. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATP- Hydrolyse durch Grp94.....	- 133 -
3.3.8. Fluoreszenztitration mit Grp94 und Nukleotid .....	- 135 -
3.3.9. Diskussion zur Charakterisierung von Grp94 .....	- 138 -
4. Zusammenfassung und Ausblick .....	- 143 -
5. Abkürzungen .....	- 148 -
6. Literaturverzeichnis.....	- 150 -
7. Abbildungsverzeichnis .....	- 171 -

## 1. Einleitung

Entgegen der von Aristoteles bis zu Goethe tradierten Auffassung, dass lebende Materie aus unbelebter entstehen kann (Cairns-Smith, 1982), konnte Pasteur mit Hilfe von Sterilisierungsexperimenten zeigen, dass diese Theorie falsch ist. Er konnte widerlegen, dass Leben spontan aus unbelebter Materie entstehen kann (Cairns-Smith, 1982). Demnach musste alles Leben aus belebter Materie entstehen (*omne vivum ex vivo*), aber dies hinterließ auch die Frage, wo dieses Leben ursprünglich einmal herstammte. Die Panspermiehypothese von Svante Arrhenius postuliert, dass das Leben von außen auf die Erde getragen wurde. Allerdings löst diese Theorie die Entstehungsfrage nicht, sie verlagert sie lediglich (Bernal, 1951).

1928 war es dann Friedrich Wöhler, der als erster mit der chemischen Synthese von Harnstoff zeigen konnte, dass ein Stoff, der sonst nur von Lebewesen hergestellt wird, auch abiotisch durch Laborsynthese entstehen kann (Oparin, 1938).

In seinem Buch „*Origin of Life*“ stellte Oparin 1938 erstmals die Theorie der chemischen Evolution vor, wonach es erst zu einer abiotischen Synthese organischer Moleküle gekommen ist (Oparin, 1938). Aufbauend auf dieser Theorie konnte der amerikanische Wissenschaftler Stanley Miller 1953 im Glaskolben eine „Uratmosphäre“ bestehend aus Kohlendioxid, Methan, Wasserstoff und Ammoniak schaffen (Miller, 1953). Unter Zuführung von Energie in Form von elektrischen Gasentladungen gelang es ihm aus einfachsten chemischen Molekülen Aminosäuren, Nukleinsäuren und andere höhermolekulare Bausteine erzeugen. Diese komplexeren Molekülformen konnten sich in der präbiotischen „Ursuppe“ anreichern und mussten sich dann organisieren. Eine Möglichkeit dieser Organisation postulierte Oparin, der von vesikelartigen Hüllstrukturen, so genannten „Koazervaten“, sprach, die sich spontan aus bestimmten Molekülen bildeten. Selbst wenn diese Koazervate eine gewisse Form von Urzellen darstellten, war unklar, wie es dann zu geordneten reproduzierbaren Strukturen, wie zum Beispiel langkettigen identischen Polymerketten, wie Enzymen, oder einem Code in Form der DNA kommen konnte.

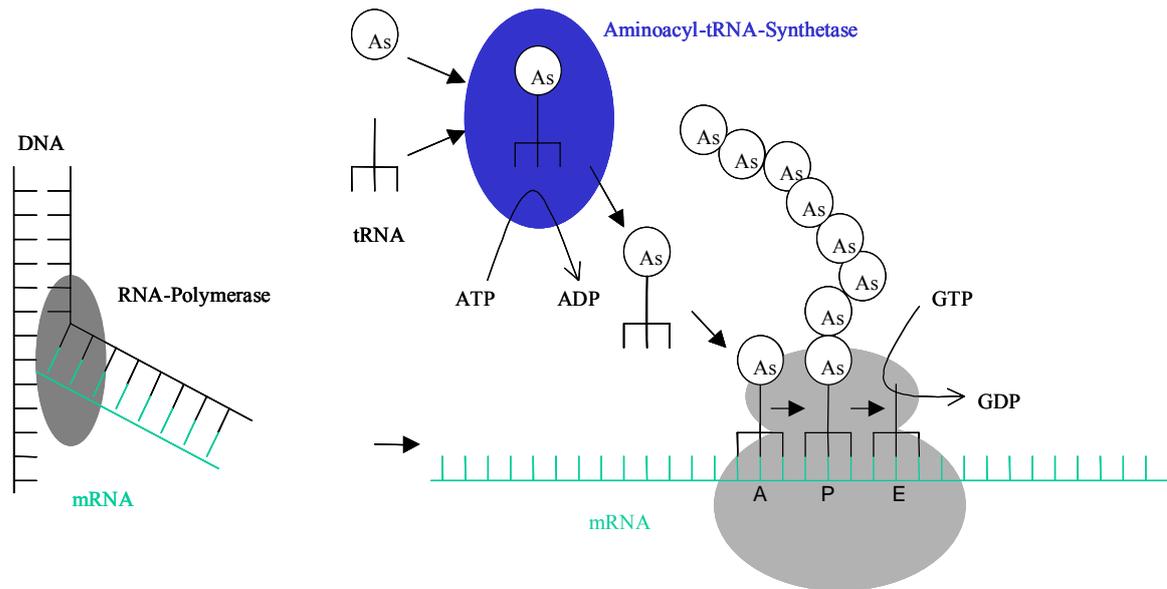
Entgegen dieser Theorien postulierte vor allem der Münchner Günther Wächterhäuser eine rein autotrophe Entstehung des Lebens. Demnach kam die Energie zur Synthese der organischen Urmoleküle nicht von außen in Form von Blitzen oder UV-Strahlung, sondern entstand aus der chemischen Synthese dieser Bausteine selbst (Cech, 1986; Eigen, 1987; Wächterhäuser, 1994). Ende des 20. Jahrhunderts erst konnte der Amerikaner J. Ferris zeigen, dass auf einer Montmorillonit Tonkristallstruktur durch Polykondensation von

Nukleotidmonomeren Oligomere von der Länge kleiner Ribozyme entstehen können (Ferris et al., 1996). Diese hätten dann im Rahmen einer „RNA-Welt“ eine entscheidende Rolle spielen können. Das bedeutet, dass RNA-Moleküle gleichzeitig Träger genetischer Information sein als auch die Rolle als Katalysatoren für ihre eigene Synthese übernehmen können. Enzyme brauchen zu ihrer Synthese den genetischen Code, den sie eigentlich erst selbst herstellen. Sollten aber RNA-Moleküle katalytische und gleichzeitig informationstragende Eigenschaften in der Urzeit vereint haben, wie es heute von einigen RNA-Molekülen bekannt ist, wäre dieses „Ei-Huhn-Problem“ gelöst.

Der Nobelpreisträgers Manfred Eigen (1971) vertritt die Meinung, dass Leben aus dem molekularen Chaos der Ursuppe durch so genannte autokatalytische Hyperzyklen (molekulare Selbstorganisation) entstand. Ein Hyperzyklus ist ein katalytisches System, in dem ein kurzes, tRNA-ähnliches Polynukleotid für die Aminosäuresequenz eines kleinen Proteins codiert, das seinerseits die Produktion eines anderen Polynukleotids katalysiert. Der Zyklus wird solange fortgesetzt, bis er dadurch geschlossen wird, indem ein schon vorhandenes Polynukleotid katalysiert wird. Solche Hyperzyklen könnten Vorläufer von Zellen gewesen sein (Eigen, 1987). Diese neueren Theorien würden somit die frühesten Arten von Proteinsynthese mit Translation und Transkription erklären. Die Translation und die Transkription sind heute ein recht gut verstandener Prozess. An beiden Prozessen ist eine große Anzahl von Proteinen und verschiedene Spezies von Nukleinsäuremolekülen beteiligt.

Der genetische Code aller Zellen wird in Form einer Nukleotidsequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNA) verschlüsselt und durch die Bildung einer ähnlichen Nukleinsäure, der Ribonukleinsäure (RNA), umgesetzt. Um die genetische Information umzusetzen (Expression), wird in allen zellulären Organismen die DNA zunächst in die so genannte mRNA (Messenger RNA) abgeschrieben (Transkription). Später erfolgt an den Ribosomen die Übersetzung der mRNA in Proteine (Translation, Abbildung 1).

Das Wissen über den Ablauf der Proteinsynthese erweitert sich ständig. Mittlerweile ist man auch in der Lage, diesen Prozess in einem zellfreien Synthesystem nachzuahmen.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinsynthese.**

Die DNA wird in eine komplementäre mRNA übersetzt. Für diesen Vorgang ist die RNA-Polymerase verantwortlich. Die mRNA wird ihrerseits am Ribosom in eine Aminosäurekette translatiert. Durch die Hydrolyse von GTP wird die Translation angetrieben. Die tRNAs werden außerhalb des Ribosoms mit ihren dazugehörigen Aminosäuren (As) beladen. Dieser Vorgang wird unter Hydrolyse von ATP durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysiert. Die beladene tRNA wird anschließend zur A-Stelle des Ribosoms transportiert, und bindet dort an das komplementäre mRNA-Triplett. An der P-Stelle befindet sich während der Elongation der Translation eine Peptidkette, die dann auf die hinzutretende Aminosäure übertragen wird. Die von der Aminosäure entladene tRNA verlässt an der E-Stelle das Ribosom.

## 1.1. Proteinfaltung

Die genetische Information codiert für Proteine, und somit ist die räumliche Struktur der Proteine bereits auf DNA-Ebene programmiert. Proteine besitzen in nativer Konformation, die für die biologische Funktion in Zellen unabdingbar ist, eine exakt definierte dreidimensionale Struktur (Dill et al., 2005). Bei der Translation entstehen am Ribosom Polypeptidketten in linearer ungefalteter Form. Um ihre biologischen Aufgaben zu erfüllen, müssen sie eine spezifische dreidimensionale Struktur einnehmen. Das heutige Verständnis über die Faltung von Proteinen begründet sich in erster Linie auf die 60er Jahre auf die Forschungsergebnisse von Christian Anfinsen und seinen Mitarbeiter (Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973). In seinen Versuchen zu Ribonuklease A konnte er erstmals zeigen, dass die Faltung einer Polypeptidkette in ein Molekül mit dreidimensionaler definierter Struktur ein reversibler, thermodynamisch gesteuerter Prozess ist. Seinem Modell nach entspricht der native Zustand eines Proteins dem thermodynamischen Minimum, also dem Zustand des Moleküls mit der geringsten freien Energie. Anfinsons Folge ist die endgültige Faltung eines Proteins kein zufälliger Prozess, sondern vielmehr steht die Information über die korrekte Faltung in der Primärsequenz, also der Abfolge der Aminosäuren (Anfinsen et al.,

1961; Levinthal & Schiff, 1968). Ein Protein erreicht seine korrekte Struktur nicht durch statistisches Testen verschiedener Faltungszustände, sondern über eine Abfolge stabiler, definierter Faltungsintermediate (Levinthal & Schiff, 1968).

Die Triebkraft für diese Faltungsprozesse sind hydrophobe, dem polaren Lösungsmittel exponierte Seitenketten, die eine Koordination im inneren, hydrophoben Milieu des Moleküls anstreben. Diese als „hydrophober Kollaps“ bezeichnete Kondensation führt zu einer Interaktion mit benachbarten Aminosäureketten und zur Ausbildung von einzelnen Sekundärstrukturelementen. Als Folge wird in der Regel Wasser aus dem hydrophoben Kern des Proteins ausgeschlossen, und so genannte „molten globules“ werden gebildet (Kuwajima et al., 1989; Jaenicke & Lilie, 2000). Unter „molten globules“ versteht man eine Stufe während des Faltungsweges einer Polypeptidkette, die zwar Sekundär-, aber noch keine Tertiärstruktur aufweist.

Die klassische Auffassung der Proteinfaltung geht von einem sequentiellen Faltungsmechanismus aus, determiniert durch das Erscheinen exakt definierbarer Intermediate (Kim et al., 1982; Schmid, 1983). Neuere Theorien hingegen postulieren das Auftreten mehrerer simultaner Faltungszustände. Demnach sind Intermediate lediglich in lokale Energieminima, sozusagen energetische Sackgassen geraten, denen sie aufgrund hoher Aktivierungsenergien nur langsam oder gar nicht entkommen können (Baldwin, 1995; Baldwin, 2002).

Die Proteinfaltung in der lebenden Zelle unterscheidet sich in vielen Belangen von der *in vitro* Faltung. Die *in vitro* Faltung geht von einem nicht genau definierten, vom Denaturierungsreagenz abhängigen, entfalteten oder teilentfalteten Zustand aus. Prinzipiell kann die Faltung an nahezu jeder beliebigen Stelle der Polypeptidkette beginnen, was zu Beginn des Faltungsprozesses eine Vielzahl an Konformationen ermöglicht. Kurze Polypeptidketten, die zu einer monomeren Proteinspezies führen, stellen kein Problem dar, und *in vitro* können hohe Rückfaltungsraten erreicht werden. Bei Proteinen, die aus vielen Domänen bestehen oder Oligomere bilden, stößt die *in vitro* Rückfaltung oft an ihre Grenzen. Die Rückfaltung großer nativer Oligomerkomplexe endet häufig in der Bildung unlöslicher Aggregate. Dadurch beträgt die Rückfaltungseffizienz zum nativen Zustand teilweise nur einen Bruchteil des eingesetzten Gesamtprotein (Jaenicke, 1987; Jaenicke & Seckler, 1997). Um optimale Rückfaltungsausbeuten zu erzielen und unerwünschte Nebenreaktionen wie Aggregatbildung zu supprimieren, sollten die äußeren Bedingungen wie Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke optimiert werden (Rudolph et al., 1990; Kiefhaber et al., 1991; Jaenicke & Seckler, 1997).

Die äußeren Bedingungen lebender Zellen hingegen sind in der Regel konstant. Die Faltung der Polypeptidkette beginnt bereits während der Translation am N-terminalen Ende (Bergmann & Lodish, 1979; Braakman et al., 1991). Die Faltungserfolge *in vivo* betragen bis zu 100% (Lorimer, 1996; Bukau et al., 2000). Aber auch *in vivo* geschehen Missfaltung und falsche Assemblierungen von Proteinen (Hurtley & Helenius, 1989; Helenius et al., 1992); um diese Ereignisse auf einem möglichst niedrigen Niveau zu halten, hat sich im Laufe der Evolution ein wirksamer Mechanismus in Form von Helferproteinen entwickelt. Auf der einen Seite werden Faltungsprozesse durch Faltungshelferproteine und Chaperone (s. u.) unterstützt, die korrekte Faltung und Assemblierung von Proteinen u. a. durch Verhindern von Aggregation absichern (Sparrer & Buchner, 1997; Hartl, 1996; Walter & Buchner, 2002). Auf der anderen Seite werden falsch gefaltete Proteine von Proteasen abgebaut (Gottesman & Maurizi, 2001; Wickner et al., 1999). Neueren Ergebnissen zufolge nehmen ca. 30% der in *E. coli* synthetisierten Proteine die Hilfe der Faltungshelferproteine in Anspruch (Bukau et al., 2000). Diese Unterstützung findet dabei co- und posttranslational statt (Bukau et al., 2000) Beispielsweise benötigt Ribonuklease A für die vollständige Assemblierung den C-Terminus (Lin, 1979), der allerdings, entsprechend den Regeln der Translation, als letztes das Ribosom verlässt. Somit sind Teile der Polypeptidkette gezwungen hydrophobe Bereiche ins Cytosol zu exponieren. In diesem aggregationsanfälligen Zustand ist das Protein auf die Interaktion mit Faltungshelfern angewiesen. Ähnliche Zustände können bei der Translokation zwischen einzelnen Zellkompartimenten auftreten, z.B. beim Import cytosolisch synthetisierter Proteine ins Mitochondrium. Auch für solche Ereignisse bedarf es der Hilfe entsprechender Faltungshelfer (Dekker & Pfanner, 1997).

Um Schädigung der Zelle zu vermeiden, wird die Expression solcher Helfer v. a. in Stresssituationen, z. B. durch hohe Temperaturen, verändertes pH-Milieu, Schwermetallionen radikalische Verbindungen oder denaturierende Agenzien stark erhöht (Lindquist & Craig, 1988a). Bei dieser so genannten „heat shock response“ (Miller et al., 1982; Ellis, 1987) bedient sich die Zelle eines ganzen Netzwerks an Helferproteinen, Chaperonen und Co-chaperonen.

### **1.1.1. Disulfidbrücken in der Proteinfaltung**

Die Kopplung der Ausbildung von Disulfidbrücken mit der Proteinfaltung ist mittlerweile ein recht gut verstandener Prozess. Im Gegensatz dazu konnte bisher kaum geklärt werden, inwiefern die Proteinfaltung selbst von der An- oder Abwesenheit von kovalenten

Verknüpfungen abhängt. Die Arbeiten beziehen sich mehr auf eine Beschreibung der Rollen von Disulfidbrücken in Proteinfaltungsreaktionen (Goto & Hamaguchi, 1982; Ramm et al., 1999; Yokota et al., 2000) oder künstlich eingeführte Schwefelbrücken wurden benutzt um lokale Faltung oder Entfaltung zu beschreiben (Clarke et al., 1993; Mason et al., 2002; Mason et al., 2005).

Eines der Hauptaugenmerke des *Protein engineering* liegt auf einer positiven Beeinflussung der Proteinstabilität (Eijsink et al., 2004). Die Stabilisierung eines Proteins durch Disulfidbrücken wird durch eine Konformationsbeschränkung des entfalteten Zustands verursacht. Damit wird der entropische Aufwand, um die native Struktur aufrecht zu erhalten, gesenkt und die Stabilität erhöht. Somit kann die Einführung von Disulfidbrücken zum einen zu einer Erhöhung der Proteinstabilität, so wie sie von einer einfachen Polymertheorie zu erwarten war (Clarke et al., 1993), aber zum anderen auch zu einer erhöhten Unflexibilität führen. Denn eine induzierte Spannung des nativen Zustands oder die reduzierte Dynamik und dadurch eine reduzierte Entropie des gefalteten Zustands können bei Einführen nichtnativer Disulfidbrücken die Stabilität des Proteins erheblich gegenüber dem erwarteten Effekt der kovalenten Verbindung reduzieren.

Theoretische Studien haben gezeigt, dass Disulfidbrücken sehr viele und unterschiedliche Einflüsse auf die Proteinfaltungreaktion haben können. Wenn die Disulfidbrücke in den Faltungskern gelegt wird, dann wird die Reaktion beschleunigt, liegt sie hingegen in eher peripheren Regionen kann die Reaktion deutlich verlangsamt werden (Abkevich & Shakhnovich, 2000; Clarke et al., 1993). Inwiefern der Mechanismus der Proteinfaltung in Abhängigkeit von dem Vorhandensein oder dem Nicht-vorhandensein von Disulfidbrücken im natürlichen System steht, und welche Konsequenzen diese Entwicklung unter Betrachtung evolutionärer Aspekte hat, wurde bisher nicht im Detail untersucht.

### **1.1.2. Antikörper als Modellsystem**

Antikörper sind wohl die wichtigsten Moleküle der humoralen Immunantwort. Von den 5 bekannten Untergruppen im Menschen (IgA, D, E, G und M), ist das Immunglobulin G (IgG) der häufigste Vertreter im Blutplasma. Daher werden sich auch alle hier aufgeführten Überlegungen an der IgG- Untergruppe orientieren.

IgG- Moleküle werden von B2-Zellen hergestellt, allerdings nur nach positiver Stimulation durch T<sub>Helfer</sub>-Zellen (T<sub>H</sub>-Zelle). Diese Stimulation erfolgt lediglich, wenn die T<sub>H</sub>-Zelle in der Lage ist, dasselbe Antigen zu erkennen, gegen das die B-Zelle Antikörper produziert. Dieser

Schritt stellt das wichtigste Auswahlkriterium für das verfügbare Antikörperrepertoire dar. Daher müssen  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen eine negative Selektion, bezüglich Autoimmunität (klonale Deletion) durchleben, sowie eine positive Selektion um die Fähigkeit zu testen MHC-Antigenkomplexe im Thymus binden zu können (klonale Selektion). Das Erkennen zelleigener Moleküle als Antigene führt zu Anergie, einer weiteren Runde der RAG-vermittelten T- Zellrezeptor Editierung, oder, in den meisten Fällen, zum Zelltod durch Apoptose (Janeway, Jr., 2001).

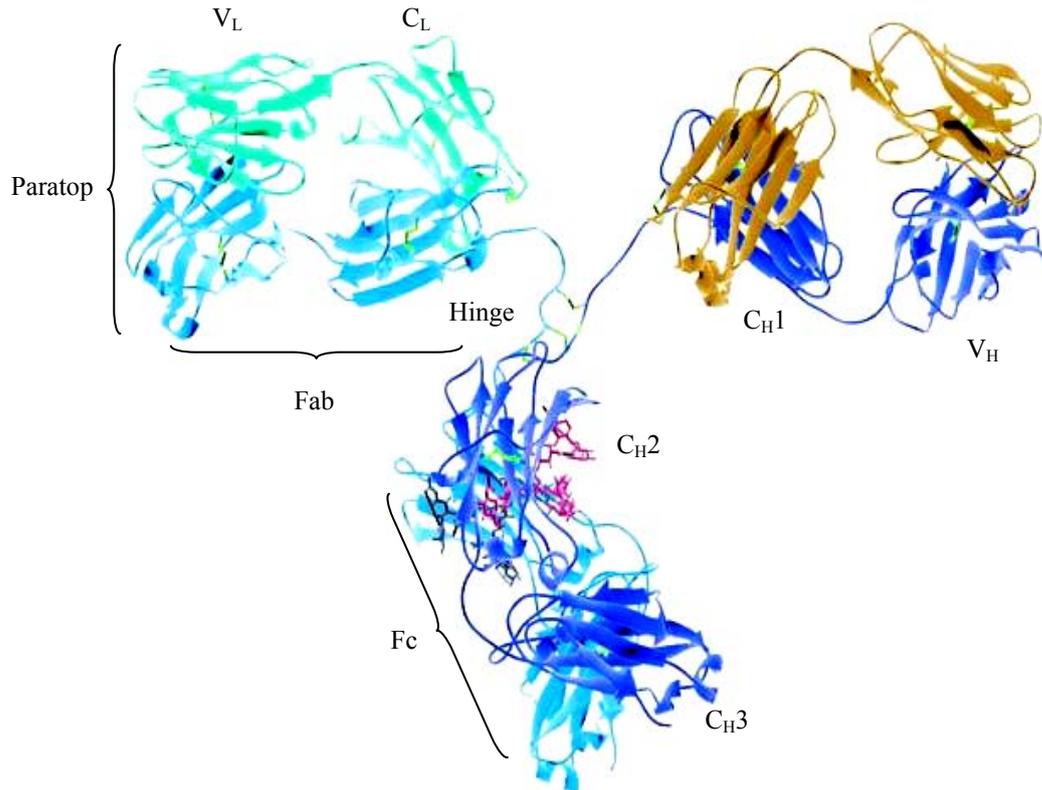
Wenn man sich näher mit der zerstörenden Wirkung, die Antikörper entwickeln können, auseinandersetzt, wird offensichtlich, weshalb ein solch komplexer Auswahlmechanismus absolut essentiell ist. Drei Effekte sind für die Wirksamkeit von Antikörpern bedeutsam. Der erste nennt sich Neutralisation. Einige Pathogene oder speziell Giftstoffe können direkt durch Bindung an Antikörper entschärft werden. Pathogene sind für einen erfolgreichen Angriff auf ihre Wirtszellen häufig abhängig von Adhensions- oder Permeationsfaktoren, die sich auf ihrer Oberfläche befinden. Werden diese Faktoren jedoch durch Antikörper gebunden, kann die Pathogenität eliminiert werden. Die Bindung extrazellulärer Toxine, z. B. des Cholera-toxins, inhibiert direkt ihren Effekt, da die Erkennungsoberflächen geblockt werden und die Zellpenetration gestoppt wird (Casadevall, 2004). Der zweite Haupteffekt nennt sich Opsonierung, und hängt von den Makrophagen des Organismus ab. Wenn Antikörper an ihr Antigen gebunden haben, dann kann der Fc-Teil durch einen Fc-Rezeptor von Macrophagen erkannt werden, der daraufhin das markierte Ziel einschließen und zerstören kann. Meist handelt es sich dabei um Bakterien. Somit agieren Antikörper als molekulare Markierungsstoffe für die Phagozytose. Der dritte Haupteffekt ist der klassische Weg der Komplementaktivierung. Auch diese wird durch den Fc-Teil vermittelt, hauptsächlich durch die  $C_{H2}$ -Domäne, und wird in erster Linie von den IgG und IgM Antikörpern ausgeführt. Ähnlich wie die Caspasen oder die Blutgerinnungskaskade, stellen die Komplementfaktoren ein System selbstaktivierender Proteasen dar. Nach dem Initialisierungsschritt werden diese normalerweise im Plasma lediglich zirkulierenden Proteine weiter prozessiert. Der erste Schritt ist die Aktivierung des Komplementfaktors C3b, was durch eine konformationellen Veränderung der  $C_{H2}$ -Domäne durch Bindung des Antikörpers an die Zielstruktur verursacht wird (Morgan et al., 1995). Einmal aktiviert initiiert C3b drei aufeinanderfolgende Reaktionswege. Erst ist das an die Zielstruktur gebundene C3b in der Lage mit Komplementrezeptoren zu interagieren. Diese Komplementrezeptoren werden auf Phagozyten gefunden, und stellen somit einen weiteren Opsonierungsmechanismus dar. Dann kann C3b weitere Komponenten des Komplementsystems proteolytisch aktivieren, die dann wiederum

zusätzlich Komponenten aktivieren. Einige diese Proteine, speziell C9, sind dann in der Lage, Poren in die Membran des Ziels einzuführen, was zu direkter Lyse führt. Drittens dienen die Peptide, die durch die Komplementfaktoren proteolytisch abgespalten wurden, als „Lockmittel“ für die Phagozyten, indem sie diese Immunzellen zu den bereits für die Phagozytose markierten Zielen führen (Janeway, Jr., 2001).

Nicht nur die Pathogenabwehr eines Organismus, sondern auch die Medizin und Wirtschaftsunternehmen sind heute „abhängig“ von Antikörpern. Von der Grundlagenforschung hin bis zur Entwicklung medizinischer Applikationen werden Antikörper heute als die wichtigsten Biomoleküle angesehen. Sie werden in der Diagnostik zur Identifizierung von Herzerkrankungen und Tumoren verwendet, finden in Therapieansätzen, v. a. bei rheumatischer Arthritis, wie der anti-TNF $\alpha$  Antikörper Infliximab (Hanauer et al., 1998), und verschiedenen Formen von Krebs, z. B. der anti-HER2 Antikörper Herceptin/ Trastuzumab bei Brustkrebs (Milenic et al., 2004), ihre Anwendung. Das heutige Marktvolumen für rekombinante Antikörper ist bereits größer als 30 Milliarden US\$ und steigt stetig an (Scott & Szczepiorkowski, 2005). Die Arbeit an Antikörpern ist somit gleichbedeutend mit der Arbeit am ökonomisch bedeutendsten Protein.

### **1.1.3. Die Struktur von Antikörpern**

Immunglobulin G (IgG) Antikörper sind C<sub>2</sub>-symmetrische heterotetramere Glykoproteine mit einem Gesamtmolekulargewicht von annähernd 150 000. Sie bestehen aus je 2 schweren und 2 leichten Ketten, die hauptsächlich über hydrophobe Dimerisierungsflächen und kovalente Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten in der sog. Hinge Region, sowie zwischen der leichten und der schweren Kette miteinander verbunden sind. Die schwere Kette wird aus drei konstanten Domänen (C<sub>H1</sub> bis C<sub>H3</sub>) und einer variablen Domäne (V<sub>H</sub>) aufgebaut. Die leichte Kette besteht aus einer konstanten (C<sub>L</sub>) und einer variablen (V<sub>L</sub>) Domäne. Die flexible Hinge-Region verbindet die antigenbindenden Fragmente (Fab) mit dem Effektorfunktionen vermittelnden Fc-Teil. Durch diese flexible Region können sich die Paratope weitgehend frei bewegen (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Die Struktur eines IgG Antikörpers.**

Überblick über die wichtigsten strukturellen Eigenschaften eines IgG Antikörpers. Disulfidbrücken sind in hellgrün dargestellt, Zucker in violett. (Abbildung von ghr.nlm.nih.gov entnommen)

Des Weiteren sind Antikörper die Namensgeber einer weit verbreiteten Topologie, die in der gesamten so genannten „*immunglobulin superfamiliy*“ gefunden wird: der Immunglobulin (Ig) Fold (Williams et al., 1988). Diese  $\beta$ -barrel Struktur besteht aus 2 leicht gedrehten  $\beta$ -Faltblättern, die eine Sandwich-ähnliche Struktur mit einem hydrophoben Kern ausbilden (Amzel & Poljak, 1979; Lesk & Chothia, 1982; Bork et al., 1994). Oft befindet sich eine Disulfidbrücke senkrecht zu diesen  $\beta$ -Faltblättern in diesem hydrophoben Zwischenraum und verhält sich dabei als stabilisierendes Element (Goto & Hamaguchi, 1982). Das Grundgerüst eines Ig-Moleküls besteht aus sieben bis neun Polypeptidsträngen. Im Fall der konstanten Antikörperdomänen sind es z.B. sieben und neun im Fall der variablen Abschnitte (Amzel & Poljak, 1979).

## 1.2. *In Vitro* Translations- / Transkriptionssysteme

### 1.2.1. *Batch* Systeme

Auffallenderweise wurde ein großer Teil unseres heutigen Verständnisses und Wissens über die Proteinbiosynthese, einschließlich der Entdeckung der mRNA und des genetischen Codes, sowie die Funktion von Ribosomen, ursprünglich durch die Anwendung von bakteriellen Zellextrakten und *in vitro* Translationssystemen erworben (Spirin, 2002b; Spirin, 2004; Nirenberg, 2004). Seit den ersten wegweisenden Experimenten um 1950 wurde die *in vitro* Proteinbiosynthese weiter entwickelt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Proteinbiosynthese selbst nicht von der Intaktheit einer Zelle abhängt, sondern auch Zellextrakte zur Aufrechterhaltung der Synthese ausreichen, (BOROSOOK et al., 1950; Siekevitz & Zamecnik, 1981; Spirin, 2002b), war ein weiterer Durchbruch die Entdeckung von Ribonukleoproteinen, z.B. Ribosomen, mit der Fähigkeit selbst an der Synthese zu partizipieren (Tissieres & WATSON, 1962; Tissieres & WATSON, 1958; Chao & Schachman, 1956; Littlefield et al., 1955; Spirin, 2002b). Ein zellfreies, ribosomales System, das der Proteinsynthese dient, wurde durch Zamecnik und seine Mitarbeiter schon in den fünfziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts entwickelt. Dieses System basierte auf cytoplasmatischen Extrakten tierischer Zellen (Keller & Zamecnik, 1956). Eine wirkliche Revolution auf diesem Gebiet war die Umkodierung des Systems auf Fremd-mRNA (Nirenberg & Matthaei, 1961). Dieses klassische System (Tabelle 1) ist nach wie vor die Basis, auf der kommerziell erhältliche und die meisten selbstgestalteten *in vitro* Translationssysteme basieren. Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung zellfreier *in vitro* Systeme war die Verbindung von Transkription und Translation (Zubay, 1973; DeVries & Zubay, 1967). In diesem Fall wurden grobe bakterielle Zellextrakte benutzt, in denen zelleigene DNA und RNA durch zelluläre Nukleasen abgebaut waren. Die anschließende Zugabe fremder DNA, z.B. in Form von Plasmid-DNA oder synthetischen DNA-Fragmente, wird durch eine RNA Polymerase, die bereits im Extrakt vorhanden ist oder direkt zugegeben wird, in die zugehörige mRNA übersetzt.

In den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts führte eine Kombination aus eukaryotischen Zellextrakten (normalerweise aus Hasen Retikulozyten Lysaten oder Weizenkeim Extrakten) und bakteriellen oder viralen Polymerasen zu einer neuen Spezies von zellfreien Systemen. Um solche eukaryotischen Extrakte zu gewinnen, musste die cytosolische Fraktion nach Zellaufschluss vom Zellkern getrennt werden, was dazu führte, dass die zelleigene Polymeraseaktivität gewollt verloren ging. Die anschließende Zugabe fremder *E. coli* RNA

Polymerase führte zu leistungsfähigen *batch* Systemen (Spirin, 2002b). Noch wirkungsvoller war die Zugabe viraler Polymerasen, wie der T7 oder SP6 RNA Polymerase (Baranov et al., 1989; Baranov & Spirin, 1993b; Spirin, 2002b; Craig & Ebert, 1992; Kigawa et al., 1999). Ein weiterer Nutzen der viralen RNA Polymerasen ist die gezielte Ansteuerung der zu den Polymerasen gehörigen Promotorregionen. Derzeit nehmen darauf basierende Systeme einen Grossteil der auf dem Markt befindlichen zellfreien Expressionssysteme ein. Des Weiteren hat das bakterielle System gegenüber dem eukaryotischen System den Vorteil, dass die viralen RNA Polymerasen viel schneller arbeiten als die des eukaryotischen Systems. Mitunter liegt das daran, dass z.B. beim *gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem* die mRNA translatiert werden kann, bevor diese überhaupt vollständig synthetisiert wurde. Ein *kombiniertes Translations-/Transkriptionssystem* auf der Basis eines eukaryotischen Zellsystems ist aufgrund räumlicher Trennung von mRNA- Synthese und Translation zu solchen Expressionsgeschwindigkeiten und folglich -Mengen nicht in der Lage.

Die soeben beschriebenen klassischen *batch* System (Abbildung 3), in denen alle Komponenten in kleinen Volumina, zum Beispiel in einem Eppendorf Reagenz Gefäß (ERG), zusammengefügt werden, haben den Nachteil, dass lediglich geringe Mengen an Zielprotein exprimiert werden. Gründe dafür sind geringe Mengen an verfügbarer Energie, die zur Aufrechterhaltung des Systems zwingend von Nöten ist, und Nebenprodukte, die sich durch Inhibierung negativ auf die Reaktion auswirken können (Kim & Swartz, 1999; Spirin, 2004). Daher werden momentan kommerzielle Systeme lediglich zur Selektion von Zielproteinen und zu analytischen Zwecken verwendet, und finden keine Anwendung in der Proteinsynthese im präparativen Maßstab. Normalerweise kann ein bakterielles System bei 37°C für 10-30 Minuten und ein auf Weizenkeim oder Hasen Retikulozyten basierendes System für nicht mehr als eine Stunde funktionell aufrechterhalten werden (Spirin, 2002a).

System	Einfache bakterielle zellfreie Translations-Systeme (Matthaei & Nirenberg, 1961).	Einfaches bakterielles gekoppeltes Transkription / Translations- System (DeVries & Zubay, 1967a)	Einfaches eukaryotisches kombiniertes Transkriptions- / Translations- System (Baranov & Spirin, 1993a).	Rein DNA-gerichtetes zellfreies Transkriptions- / Translations- System (Kung et al., 1977a).
Quelle	Überstand einer S-30 Fraktion von <i>E. coli</i>	Überstand einer S-30 Fraktion von <i>E. coli</i>	Überstand einer S-30 oder S-100 Fraktion von Weizenkeimextrakt oder Hasen Retikulozyten	Gereinigte Komponenten aus <i>E. coli</i>
Vorbehandlung	DNase; vorinkubiert mit Aminosäuren, PEP und PK bei 37°C für 80 min und anschließend dialysiert	Vorinkubiert um keine eigene DNA und RNA mehr zu beinhalten	Behandelt mit einer micrococcalen, Ca <sup>2+</sup> -abhängigen RNase (im Fall des Retikulozytenlysats)	
Generelle Bestandteile				
	Ribosomen tRNAs ARSes Translationsfaktoren natürliche mRNAs	RNA Polymerase Ribosomen tRNAs ARSes Translation Faktoren Aminosäuren	Ribosomen tRNAs ARSes Translationsfaktoren	Ribosomen Formyltetrahydrofolat Met-tRNA <sub>f</sub> - Transformylase; Initiations Faktoren: IF1, IF2, IF3 Elongations- Faktoren: EF-Tu, EF-Ts, EF-G Terminations- Faktoren: RF1, RF2, RF3, RRF
Zusatz Bestandteile				
	Synthetische Polyribonukleotide Aminosäuren	Aminosäuren	DNA (Plasmid mit SP6 oder T7 Promotor) Bakteriophage SP6 oder T7 Polymerase Aminosäuren	DNA (Zielgen) Gesamt tRNA RNA Polymerase 20 individuelle ARSes Aminosäuren
Nukleotide	ATP/GTP	ATP, GTP, UTP, CTP	ATP, GTP, UTP, CTP	ATP, GTP, UTP, CTP
Regenerieren- des System:	PEP + PK	PEP + PK, oder CP + CK, oder AcP	CP + CK	PEP + PK
SH-Komponente	DTT oder ME	DTT oder ME	DTT	DTT
Ionen:	Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , in optimalen Konzentrationen	Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , in optimalen Konzentrationen	Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> und Polyamine in optimalen Konzentrationen für die Translation; Ca <sup>2+</sup> for Weizenkeimlysat	Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , in optimalen Konzentrationen
Weitere Bestandteile		Formyltetrahydrofolat oder cAMP	Hemin, Gluthation und cAMP sind nützlich für das Retikulozytenlysats	Methenyltetrahydrofolat; Spermidin

**Tabelle 1: Vergleich unterschiedlicher in vitro Transkriptions- / Translationssystemen.**

### 1.2.2. Kontinuierliche Systeme

Um das allgegenwärtige Problem kurzer Expressionszeiten und somit geringer Expressionsmengen zu bewältigen, wurden kontinuierliche Systeme, sog. *continuous exchange cell-free systems* (CECF) entwickelt (Spirin, 2004; Spirin, 2002a; Spirin et al., 1988; Kigawa et al., 1999; Kigawa et al., 2004). Diese bestehen aus zwei voneinander durch eine durchlässige Barriere, z.B. eine Dialysemembran, getrennte Kompartimente. Ein Kompartiment enthält alle Komponenten, die für die Reaktion nötig sind, während das andere Kompartiment einerseits die Reaktion mit Substraten versorgt, die für eine Aufrechterhaltung des Systems unbedingt von Nöten sind (Aminosäuren, NTPs sowie Energiekomponenten) und andererseits das Entfernen von Reaktionsnebenprodukten (anorganische Phosphate, kleine abgebaute Peptide, DNA und RNA Fragmente) erlaubt. Die beiden Kompartimente können durch eine Dialysemembran von einander getrennt sein, oder die Reaktionskammer liegt als Membrantasche in der Nachschubkammer (Abbildung 4). Einer solchen Entwicklung folgend, können heute in bis zu 78 Stunden Reaktionszeit bis zu 1-6 mg / ml Zielprotein hergestellt werden (Kigawa et al., 1999; Kigawa et al., 2004; Hoffmann et al., 2004).

Zusätzlich zu den CECF Systemen wurden sog. *continuous flow cell-free systems* (CFCF) beschrieben. In diesem Fall werden ebenfalls durch eine Nachschubkammer Substrate beständig in eine Reaktionskammer transportiert, während zeitgleich das gleiche Volumen aus der Reaktion mit dem erwünschten Produkt das System über eine permeable Membran verlässt (Baranov et al., 1989; Spirin, 2002a). Dabei wird ca. das 0,5 bis 3 -fache Volumen der Reaktion pro Stunde im Durchfluss gewährleistet. Somit erlauben diese Systeme noch weitaus höhere Expressionszeiten als ein CECF sowohl im bakteriellen als auch im eukaryotischen System (Baranov & Spirin, 1993).

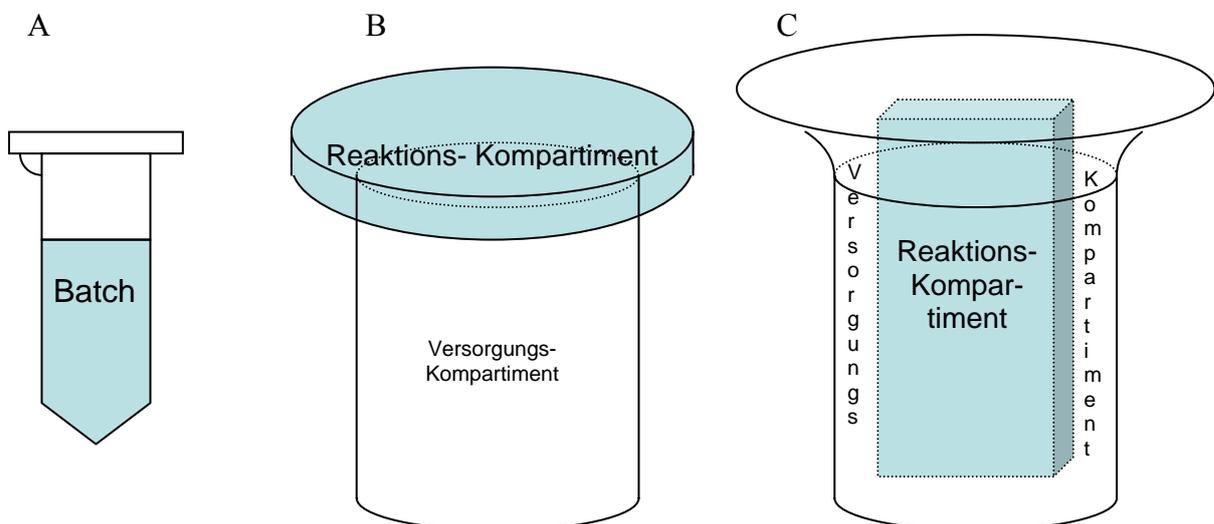
Interessanterweise konnte bisher kein Verlust der Komponenten des Proteinbiosyntheseapparates (tRNAs, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA Synthetasen) durch die Membranen, mit einer Ausschlussgröße von 50 – 300 kDa, beobachtet werden, wohingegen Zielproteine mit vergleichbarer Größe aus dem System entfernt werden konnten (Spirin, 2002a). Das ist wohl dadurch erklärbar, dass sich während der Translation und Transkription große dynamische Komplexe ausbilden, die, wenn sie aktiv sind, kaum frei im System auftauchen.

Vergleicht man das CECF mit dem CFCF System, wird offensichtlich, dass das CECF wegen seiner einfacheren Bauweise und den geringeren Kosten gegenüber dem CFCF von Vorteil ist. Andererseits kann über das CFCF System Proteine mit einem Reinheitsgrad von bis zu

85% gewonnen werden, und darüber hinaus sind die Expressionsraten und –zeiten wesentlich höher (Spirin, 2002b). Zudem ist eine Vergrößerung des CFCF Systems einfacher, da der Austausch durch den kontinuierlichen Nachfluss and Reaktionskomponenten effizienter ist. Dadurch lässt sich durch den regulierbaren Nachfluss und die Komposition des Nachschubgemisches die Reaktion ständig direkt kontrollieren und beeinflussen.

### 1.2.3. Systeme aus gereinigten Komponenten

Allen zellfreien Proteinsynthesen, die bisher beschrieben wurden, liegt in irgendeiner Art das gesamte einfache Zellysate eines jeweiligen Organismus zu Grunde. Seit allerdings die Isolation, Charakterisierung und Reinigung einzelner Proteine mehr und mehr fortschreitet, lassen sich nun auch zellfreie Systeme in der Art erstellen, dass aufgereinigte Komponenten dem System zugeführt werden können (Tabelle 1) (Kung et al., 1977b; Zarucki-Schulz et al., 1979; Green et al., 1985). Natürlich sind solche Systeme äußerst teuer und werden wohl nicht den Status erreichen, der einer Proteinproduktion im hohen Maßstab genügt. Allerdings lassen definierte Bedingungen in solchen Systemen Experimente zu, um die Funktion und Einflüsse einzelner Komponenten zu klären sowie den Nutzen technisch interessanter Proteine sowie anderer positiv oder negativ beeinflussender Komponenten zu untersuchen.



**Abbildung 3: Vergleich eines Batch und zweier kontinuierlicher in vitro Transkriptions- / Translationssysteme**

A: Typisches Batch System, in dem ein kleines Volumen an Reaktionslösung in ein ERG gefüllt wird

B: Typisches CECF System, in dem das Reaktionskompartiment über eine semipermeable Membran vom Versorgungskompartiment getrennt ist. Normalerweise ist Volumen der Versorgungskammer 10-mal so groß wie das des Reaktionskompartiment. Der Austausch der Komponenten findet passiv, angetrieben durch Diffusion statt, und kann durch Rührfische in beiden Kompartimenten beschleunigt werden.

C: Typisches CECF System, in dem das Reaktionskompartiment aus einer Dialysetasche besteht, die im Versorgungskompartiment hängt. Verglichen mit dem System beschrieben in B, wird der passive Austausch der Komponenten häufig in dieser Art bevorzugt, und das System kann in seiner Größe leicht variiert werden. Anstatt der Rührfische, kann die gesamte CECF Einheit geschüttelt werden, um den Austausch zu verstärken.

#### 1.2.4. Rapid Translation System

Das kommerziell erhältliche Rapid Translation System (RTS, Roche Diagnostics, Mannheim) ist ein zellfreies Protein Expressionssystem im präparativen Maßstab, das auf der CECF Technologie basiert (Spirin et al., 1988; Spirin, 2004; Hein et al., 2001). Die momentane Produktpalette besteht aus mehreren unterschiedlichen Anwendungsformaten unterschiedlicher Größen, die von 50 µl bis 10 ml reichen. Das ursprüngliche Format basiert auf eine Reaktionskammer von 1 ml Volumen und einer Versorgungskammer von einem Volumen von 10 ml. Beide Kammern werden durch eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa getrennt. Die Transkription, katalysiert durch eine T7 Polymerase, findet dabei gleichzeitig mit der Translation in der Reaktionskammer statt. Substrate und Komponenten, die für die Zulieferung von Energieversorgung der Proteinsynthese nötig sind, werden fortwährend durch die semipermeable Membran in die Reaktionskammer transportiert. Solange die Reaktion am Laufen gehalten wird, werden störende Nebenprodukte gebildet, die über den Diffusionsgradienten in die Versorgungskammer befördert werden. Somit wird einer Unterversorgung an Substraten und einem Überhandnehmen an, möglicherweise toxischen Abfallprodukten entgegengewirkt. Verstärkt wird der Austausch dieser Stoffe dabei durch das stetige Rühren halbschwebender Magnetrührereinheiten. Normalerweise kann dadurch die Proteinexpression für bis zu 24 Stunden aufrechterhalten, und somit eine Proteinkonzentration von bis zu 5 mg / ml erreicht werden (Hoffmann et al., 2004).

Die Arbeitsschritte zum Zielprotein, ausgehend von seinem Gen, bis zur präparativen Synthese im RTS starten mit einer DNA, die als Hauptkriterium einen T7- Promotor trägt. Ein Vorteil gegenüber der zellulären Expression zeigt sich darin, dass das DNA Konstrukt nicht zwingend ein Plasmid sein muss, sondern auch eine lineare Expressionskassette, hergestellt durch PCR, ist ausreichend für die anschließende Expression. In einer *2-Stufen PCR* wird ein T7- Promotor und - Terminator an das Zielgen fusioniert. Somit bleibt eine Klonierung erspart und die Produktion des Proteins wird erheblich beschleunigt. Der gesamte Vorgang, der die *2-Stufen PCR* und die anschließende *in vitro* Expression inkl. des Nachweises, z.B. mittels SDS-Page, des Proteins umfasst, kann in weniger als 16 Stunden erfolgen. Darüber hinaus erlaubt das RTS eine Optimierung der mRNA- Sequenz des Zielgens, um bei der Transkription das Problem der Sekundärstrukturbildung umgehen zu können ([www.proteoexpert.com](http://www.proteoexpert.com); (Voges et al., 2004; Paulus et al., 2004)). Während eine solche Optimierung *in vivo* äußerst kompliziert und zeitraubend ist, ist sie für die *in vitro* Expression sehr ratsam, um den Expressionserfolg zu steigern. Um die Eignung von *Template* zu

ermitteln, können die linearen, Expressionskonstrukte im kleinen Maßstab, d.h. in 50 µl oder 100 µl *Batch*- oder CECF- Systemen parallel getestet werden.

Nichts desto trotz sollte man dabei im Hinterkopf behalten, dass für größere, präparative Ansätze zirkuläre Expressionskonstrukte erstellt und genutzt werden. Zum einen ist das günstiger, da unter anderem für neue Ansätze nicht immer PCR-Reaktionen zur Generierung der linearen Expressionskonstrukte durchgeführt werden müssen. Des Weiteren sind in der Regel die Expressionsausbeuten, erzielt durch zirkuläre Expressionsvektoren, höher als die durch die lineare. Zur Generierung solch zirkulärer Expressionssysteme dienen PCR Klonierungsvektoren, in die direkt das PCR Produkt, ohne vorhergehende Restriktion, ligiert werden kann (z.B. TOPO, Invitrogen, Karlsruhe, BD In-Fusion, BD Biosciences, Erembodegem, Belgien; pIVEX, Roche Diagnostics, Mannheim).

Die Optimierung der Expression gewünschter Zielproteine kann bereits im kleinen Maßstab durchgeführt werden. Dabei sind die klassischen, zu verändernden Parameter Temperatur und Dauer der Reaktion. So wird z.B. das Protein MIA (Melanoma Inhibitory Activity), ein Protein, das von menschlichen Melanomzelllinien sekretiert wird, in Bakterien nicht korrekt gefaltet und ist demnach nach seiner Synthese inaktiv (Guba et al., 2000; Bosserhoff & Buettner, 2003). Expressionstests im RTS zeigten, dass die größte Menge an Protein bei 30°C erzielt werden konnte, prozentual der Anteil von richtig gefaltetem Protein hingegen bei einer Expressionstemperatur von 25°C höher war (Bosserhoff & Buettner, 2003). Des Weiteren kann die Co-expression oder Addition von Cofaktoren, Bindungspartnern oder Proteinuntereinheiten leicht durchgeführt werden, um die Expression und Faltung des Zielproteins effizienter zu gestalten. Im Fall von Kox1, einem Mitglied der KRAB Zink Finger Proteinfamilie, war die Addition oder Co-expression seines Interaktionspartners TIF1β nötig, um vollständig gefaltetes Protein zu gewinnen (Lorenz et al., 2003). In einer weiteren Arbeit wurden zwei Fragmente des *E. coli* Protein MalE, ein exportierter periplasmatischer Rezeptor für den hochaffinen Transport von Maltodextrinen, separat voneinander exprimiert, aber dennoch korrekt im RTS assembliert (Betton & Hofnung, 1994; Betton, 2003). In diesem Fall war v. a. der proteolytische Abbau des Zielproteins im RTS deutlich niedriger als *in vivo*. Ein weiteres Beispiel stellt die D-Aminosäure Oxidase (DAO) von *T. variabilis* dar, eine FAD beinhaltende Oxidase (D'Aniello et al., 1993). Die Expression des Proteins in *E. coli* behindert das Wachstum von *E. coli* Zellen durch Störung des Zellwand Metabolismus and / oder toxische Effekte durch enzymatisch hergestelltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Im RTS hingegen konnte das Protein in löslicher Form exprimiert werden, sofern der essentielle Cofaktor FAD ausreichend vorhanden war (Thiessen et al., 1999).

Einen weiteren sehr interessanten Punkt stellt die Möglichkeit dar, dass man in diesem offenen System Proteine spezifisch markieren kann. Im letzten Jahrzehnt wurde deutlich, dass der Satz der 20 proteinogenen Aminosäuren erweitert werden kann (Kobayashi et al., 2005; Leconte et al., 2005; Hyun et al., 2003). Die üblichen Aminosäuren, die an ihre tRNAs gebunden sind, können modifiziert werden, oder neu gestaltete Aminosäuren können an gewünschte tRNAs gebunden werden (Hyun et al., 2003). Proteine werden vor allem spezifisch mit veränderten Aminosäuren modifiziert, um Strukturbestimmungen durchführen zu können. Der Einbau von elektronenreichen, seleniumhaltigen, nicht proteinogenen Varianten von Tryptophan und Methionin in Proteine mittels der *in vitro* Translationssysteme stellt eine nützliche Methode dar, um das Phasenproblem der Röntgenkristallographie zu lösen (Kigawa et al., 1999; Johansson et al., 2005). In ähnlichen Versuchen konnte ein effizientes Labeln von Proteinen mit  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^2\text{H}$  Isotopen für anschließende NMR Studien gezeigt werden (Kigawa et al., 1999; Kigawa et al., 1995; Scott et al., 2004; Staunton et al., 2006). Auch hier konnten dem *in vitro* System einige Vorteile gegenüber dem *in vivo* System abgewonnen werden. Ein Hauptproblem resultiert aus den metabolischen Reaktionen, die, einmal von *E. coli* aufgenommen, die Aminosäuren verändern. Aspartat kann zu Glutamat, Asparagin oder Lysin konvertiert werden. Die Zugabe von gelabeltem Aspartat kann daher in einer unbeabsichtigten Markierung verschiedener anderer Aminosäuren führen (McIntosh & Dahlquist, 1990; Zhao et al., 2002). Ähnliche metabolische Umwandlungen existieren noch für eine Anzahl anderer Aminosäuren. Des Weiteren wird aufgrund der unzureichenden Aufnahme und des mangelnden Einbaus eine große Menge der kostenaufwendig markiert hergestellten Aminosäuren verschwendet. In CECF Systemen, wie dem RTS, sind die markierten Aminosäuren im Reaktionskompartiment eingeschlossen und sind völlig unabhängig von den anderen Aminosäuren. Somit wird ausschließlich das Zielprotein - da es das einzige exprimierte Protein ist - mit hoher Effizienz markiert. In Fällen, in denen die Expressionsmenge hoch genug an markiertem Protein ist ( $\sim 5$  mg/ml), kann die NMR-Strukturbestimmung direkt aus dem Reaktionsmix heraus stattfinden, ohne dass eine weitere Aufreinigung nötig wäre (Yee et al., 2003; Guignard et al., 2002; Ozawa et al., 2005). Diese Beobachtungen zeigen, dass die zellfreie Proteinexpression für die Strukturbestimmung von Proteinen einzigartige Vorteile hat, v. a. aufgrund der Markierungseffizienz, der Geschwindigkeit und der Kosten.

Ein weiterer großer Vorteil dieser Applikation ist die Möglichkeit der Ausbildung von Disulfidbrücken durch sulfhydryl-spezifisch alkylierende Agenzien (Yin & Swartz, 2004b). Eine modifizierte Form des RTS (RTS *E. coli* Disulfide Kit; Roche Diagnostics, Mannheim),

in dem das *E. coli* Lysat mit Iodacetamid behandelt wurde, zeigt keine reduzierende Aktivität und ermöglicht die effiziente Herstellung von disulfidverbrückten Proteinen, ohne dass die Kapazität der Proteinsynthese selbst beeinflusst ist. Iodacetamid wurde als das Thiol-modifizierende Agens gewählt, da es wirkungsvoll die thiolvermittelte Katalyse ohne eine Veränderung der Ladung der Proteine blockiert. Die Zugabe von oxidiertem Glutathion zusätzlich zu einer Disulfidisomerase (DsbC) ermöglichte die Expression von aktiver Maus-Urokinase (Yin & Swartz, 2004a).

Das größte Problem, das die Mengen an zellfrei exprimiertem Protein, limitiert, ist Aggregation und folglich die Expression von inaktiven Zielproteinen. Die Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* führt häufig zu Aggregation des Zielproteins, und genau dieser Effekt ist auch in den *in vitro* Transkriptions- / Translationssystemen zu beobachten, v. a. wenn große eukaryotische Proteine hergestellt werden wollen, oder wenn die Produktionsrate und die daraus folgende Endkonzentration sehr hoch wird. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, stellt die Versorgung der Reaktion mit molekularen Chaperonen dar.

### 1.3. Molekulare Chaperone

Im Gegensatz zu Proteinen, die *in vitro* unter optimierten Bedingungen rückgefaltet werden können, scheint die Situation in der lebenden Zelle weniger günstig. Genauer gesagt führen v. a. hohe Proteinkonzentrationen *in vivo* (100- 200 mg/ml) und hohe Temperaturen zu Aggregation, die eine unerwünschte Nebenreaktion der Proteinfaltung darstellt (Jaenicke & Seckler, 1997; Jaenicke, 1998; Walter & Buchner, 2002; Dill & Chan, 1997). Um dieses Problem zu beheben, hat sich im Laufe der Evolution eine spezielle Familie von Proteinen entwickelt (Walter & Buchner, 2002; Bukau et al., 2006; Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Diese Familie scheint eine Art generelle Lösung für Faltungsprobleme in der Zelle darzustellen.

Unter physiologischen sowie speziell unter Stressbedingungen sind molekulare Chaperone daran beteiligt, zelluläre Prozesse aufrecht zu erhalten, was die Toleranz gegenüber Stress und die Unterdrückung von Proteinaggregation im Allgemeinen mit einschließt. Dabei interagieren sie mit einer großen Menge an ungefalteten Proteinen. Sie erkennen ihre Substrate über exponierte hydrophobe Oberflächen und nicht speziell über bestimmte Peptidsequenzen oder strukturelle Elemente. Diese Art hydrophober Interaktionen befähigt Chaperone zwischen nativen, richtig gefalteten und nicht nativ- gefalteten, entarteten Proteinen zu unterscheiden. Entsprechend katalysieren Chaperone nicht spezifisch die

Einstellung des richtigen Faltungszustand ihrer Substrate, sondern verhindern vielmehr unerwünschte intermolekulare Interaktionen durch Bindung an die zu faltende Polypeptidkette (Walter & Buchner, 2002; Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Bukau et al., 2006). Im Gegensatz zu Proteinen, die unspezifische Bindungen während ihrer Aggregation eingehen, bilden Proteine mit ihren ungefalteten Substraten definierte Komplexe. Die kontrollierte Freisetzung des nicht-nativen Proteins aus dem Komplex geht dabei mit einer veränderten Affinität des Chaperons zu seinem Substrat einher. Im Einklang mit den Gesetzen der Thermodynamik, stabilisiert das nicht-nativ gefaltete Protein den hoch affinen Zustand des Chaperons. Daher ist es notwendig Energie für die Rückkehr zum niedrig affinen Substratzustand bereitzustellen. Normalerweise wird diese Energie durch die Hydrolyse von ATP oder durch Interaktion mit weiteren Chaperonen bereitgestellt.

Die Gruppe der molekularen Chaperone kann in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Abbildung 4), die sich auf Sequenzhomologien und Molekülmasse beziehen: die kleinen Hitzestressproteine (sHsps), mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 40 kDa (Haslbeck, 2005); die 70 kDa Hsps, z.B. Hsp70, DnaK, BiP und zusätzlich ihre unterstützenden Hsp40 Co-chaperone, z.B. DnaJ (Bukau & Horwich, 1998); die 60 kDa Hsps, z. B. GroEL, und dessen Co-chaperon GroES (Lorimer, 2001; Walter, 2002; Bukau & Horwich, 1998; Martin & Hartl, 1997); die 90 kDa Hsps, z.B. Hsp90, HptG, Grp94 (Pearl & Prodromou, 2006; Richter et al., 2005), und schließlich die 100 kDa Hsps, z.B. Hefe Hsp104, *E. coli* ClpB (Mogk & Bukau, 2004; Bosl et al., 2006). Von allen fünf aufgeführten Klassen wird angenommen, dass sie Zellen vor schädigenden Einwirkungen schützen, indem sie Proteinaggregationen auflösen oder verhindern. Generell sind die molekularen Mechanismen, die dem zu Grunde liegen, noch nicht aufgeklärt. Interessanterweise haben manche Chaperonfamilien ein relativ breites Spektrum an Substraten, wohingegen andere ziemlich spezifisch agieren. Somit ist es relativ schwierig zu definieren, welches Chaperon nötig ist, um ein bestimmtes Protein in seiner Faltung zu unterstützen.

Das am besten verstandene Chaperon in *E. coli* ist der GroEL Komplex, der aus 14 Untereinheiten besteht, die zu einem Hohlzylinder aus zwei heptameren Ringen angeordnet sind. An den Pol dieses Ringes bindet der ebenfalls aus einem heptameren Ring bestehende GroES-Komplex. Nicht-native Proteine von einer Größe zwischen 10 bis 60 kDa können in die zentrale Aushöhlung des GroEL Komplexes gebunden werden (Bukau et al., 2006; Mayhew et al., 1996; Walter & Buchner, 2002). In Anwesenheit von ATP kann das eingeschlossene Substrat dann wieder freigelassen werden, zudem wird die Dissoziation des GroES Komplexes vom GroEL Komplex durch die ATP-Hydrolyse veranlasst.

Im Gegensatz zu den ringartigen GrpE-Strukturen üben die Chaperone der Hsp70 Familie ihre ATP-abhängigen Chaperonaktivitäten als Monomere aus. Im Allgemeinen ist die Hsp70-Familie an einer großen Anzahl zellulärer Prozesse beteiligt, einschließlich der *de novo* Proteinfaltung. So interagiert diese Chaperonfamilie mit der naszierenden Polypeptidkette schon an den Ribosomen (Bukau et al., 2000) und bewahrt instabile Proteine vor dem sofortigen Abbau (Dougan et al., 2002). Die grundsätzliche Aufgabe von Hsp70 in diesen Prozessen scheint die Bindung an kurze hydrophobe Segmente an teilweise gefalteten Proteinen zu sein, wobei sie Aggregation verhindern und den Faltungsprozess kontrollieren. Ähnlich wie bei GroE ist das am meisten untersuchte Chaperon der Hsp70-Familie der Vertreter aus *E. coli* DnaK. Wie viele andere Hsp70 Familienmitglieder interagiert DnaK mit zwei anderen Klassen von Partnerproteinen (DnaJ und GrpE Proteine), die wichtig für die Regulation der ATPase Aktivität sind. Die ATP Bindung und Hydrolyse erlaubt es dieser Proteinklasse zwischen einem niedrig- und hochaffinen Zustand für Substratproteine umzuschalten. Das Co-chaperon DnaJ (Hsp40) stimuliert die Hydrolyse von ATP, wohingegen der Nukleotidaustauschfaktor GrpE den Austausch von ADP gegen ATP erleichtert (Bukau & Horwich, 1998).

In den letzten Jahren wurde die Hsp100 Chaperonfamilie für die Wissenschaft immer interessanter. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Thermotoleranz, in der Steuerung genetischer Prozesse, der Transposition, der Proteolyse und der Kontrolle proteinabhängiger genetischer Elemente (Prionen) in unterschiedlichen Organismen (Mogk & Bukau, 2004; Bosl et al., 2006). Diese anscheinend zu einander bezuglosen Prozesse werden durch einen gemeinsamen bedeutenden biochemischen Mechanismus verbunden: Hsp100 Proteine fördern die Auflösung von aggregierten Proteinen und höher geordneten Proteinkomplexen. Dazu sind ATP-Hydrolyse Aktivität und die Fähigkeit, sich selbst zu Oligomeren, vorzugsweise zu Hexameren, zusammen zu schließen, von Bedeutung (Schirmer et al., 2001).

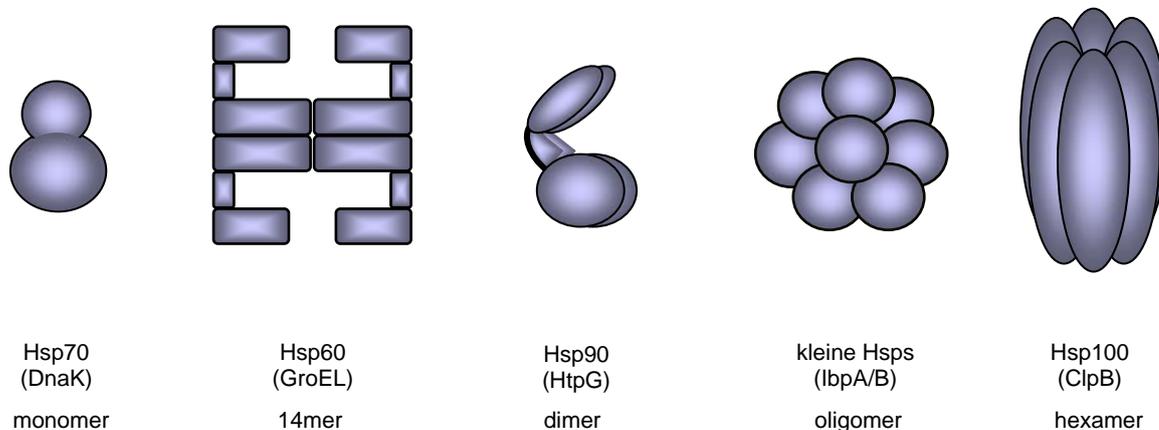
Eine weitere Variante des Schutzes von Proteinen vor irreversibler Aggregation durch die reversible Wechselwirkung mit spezialisierten Faltungshelfern, stellt die Gruppe der kleinen Hitzestressproteine dar (sHsps). Diese Proteine konnten bislang in fast allen Organismen, die bisher untersucht wurden, gefunden werden. Kleine Hitzestressproteine wurden in die Gruppe der Hitzestressproteine mit aufgenommen, da sie *in vitro* spezifisch ungefaltete Proteine binden und deren Aggregation ATP-unabhängig verhindern. (Jakob & Buchner, 1994; Van Montfort et al., 2002; Haslbeck et al., 2005; Haslbeck, 2006). Im Gegensatz zu den Chaperonklassen die zuvor beschrieben wurden, haben sHsps eine bemerkenswerte

Bindekapazität. Sie können eine Großzahl nicht-nativer Proteine binden. Des Weiteren scheint es keine Größenlimitierung für die Substratproteine zu geben (Haslbeck et al., 2004; Basha et al., 2004b; Haslbeck et al., 2004; Basha et al., 2004a). Bakterielle sHsps wurden in enger Verbindung mit *Inclusion Bodies* gefunden, die gebildet werden, wenn es zu Proteinproduktion im großen Maßstab kommt. In *E. coli* wurden daher die beiden zelleigenen sHsps inclusion protein A und B genannt (IbpA und IbpB; (Allen et al., 1992; Kuczynska-Wisnik et al., 2002)). Im Vergleich zu anderen Chaperonklassen zeigen sHsps eine charakteristische Heterogenität in Sequenz und Größe. Ihr allgemeines Merkmal ist eine 90 Aminosäuren großer C-terminale Domäne, die so genannte  $\alpha$ -Kristallindomäne, die sich auf eine der bedeutendsten Proteinfamilien überhaupt bezieht, dem  $\alpha$ -Kristalin aus der Augenlinse (Horwitz, 2003; De Jong et al., 1998). Diese Region wird durch eine N-terminale hydrophobe Region benachbart, wobei die Größe und die Struktur dieses Bereichs zwischen 12 und 42 Untereinheiten erheblich variieren kann (Haslbeck et al., 2005). Neuere Untersuchungen haben das Bild des Chaperonnetzwerkes rund um das Feld der sHsps-Substratproteinkomplexe erheblich erweitert. Forschungen in *E. coli* und *S. cerevisiae* deuten auf eine funktionelle Triade von Chaperonen hin, die die Klassen der Hsp70 sowie der Hsp100 Familie umschließt (Matuszewska et al., 2005; Mogk et al., 2003; Haslbeck et al., 2005; Cashikar et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Chaperone der Hsp70 und Hsp100 Familie in der Lage sind, effizient Substratproteine sowohl aus sHsp/Substratkomplexen als auch aus unlöslichen Aggregat-komplexen rückzufalten.

Die Chaperone der Hsp90-Familie sind hochkonserviert. Vor allem die Eukaryonten haben diese Proteinfamilie zu einer immer komplexeren Chaperonmaschine weiterentwickelt (Pearl & Prodromou, 2006; Richter et al., 2005). Davon abgesehen ist die Hsp90 Familie innerhalb der Eukaryonten eine der opulentesten Proteinfamilien innerhalb der Zelle unter normalen Lebensbedingungen (Lindquist & Craig, 1988b). In Eukaryonten scheint Hsp90 in der konformationellen Regulierung von Schlüsselproteinen der Signalübertragung sowie der von Steroidhormonrezeptoren und Kinasen unter physiologischen sowie Stressbedingungen zu sein. Stabile Interaktionen mit Faltungintermediaten einer großen Anzahl von Partnerproteinen von Hsp90 werden berichtet. Außerdem scheint Hsp90 zum Teil seine Funktion im Komplex mit Hsp70, p23 und großen Prolylisomerasen auszuüben. Die beiden letzteren sind wichtige Partner von Hsp90, die *in vitro* Chaperonaktivität besitzen (Freeman et al., 2000; Freeman et al., 1996; Bose et al., 1996).

Neben diesen klassischen Chaperonfamilien existieren speziell im Cytosol von *E. coli* zwei weitere interessante Chaperone. Das eine ist der Triggerfaktor, ein Chaperon, das direkt an

Ribosomen assoziiert ist. Dort ist an der Faltung von 80% der neu synthetisierten Polypeptidketten beteiligt, nachdem sie den Tunnel am Ribosom verlassen haben (Deuerling & Bukau, 2004). Das andere ist Hsp33, ein redox-reguliertes Chaperon, das unter oxidativen Bedingungen aktiviert wird (Winter & Jakob, 2004).



**Abbildung 4: Die 5 Chaperonfamilien.**

Unter physiologischen und v. a. unter Stressbedingungen sind 5 unterschiedliche Familien von Chaperonen, die gemäß ihres Molekulargewichts benannt werden, an der Aufrechterhaltung der zellulären Proteinhomöostase beteiligt. Hier sind die Vertreter jeder Familie von *E. coli* sowie ihr Oligomerisierungsgrad, in dem sie aktiv sind, abgebildet

## 1.5. Proteinfaltung im *in vitro* Transkriptions- / Translationssystemen

Chaperone stellen ein nützliches Werkzeug dar, um die Proteinausbeute in *in vitro* Transkriptions- / Translationssystemen zu erhöhen. Des Weiteren haben in letzter Zeit einige mechanistische Studien in den *in vitro* Systemen dazu beigetragen um die Funktion einiger Chaperone selbst zu beleuchten. Das jüngste Beispiel stellt die Expression von GFP als Modellsubstrat dar, um zu untersuchen wie sHsps bei Hitzestress ihre gebundenen Substrate wieder freisetzen (Haslbeck et al., 2005). Hefe Hsp26 unterdrückt die Aggregation von GFP, in dem es stabile Komplexe mit diesem Protein ausbildet. Um festzustellen, ob gebundenes GFP nicht auch in unauflöslchen Komplexen gebunden ist, wurde GFP in einem *in vitro* Transkriptions- / Translationssystem synthetisiert. Lediglich 15- 30% des GFP erreichte seinen nativen Zustand, nach dem es *in vitro* synthetisiert wurde. Der Rest bildet unlösliche Aggregate. In Anwesenheit von Hsp26 bildeten sich während der zellfreien Expression Komplexe mit dem aggregierenden GFP aus. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, bewirkte die Zugabe von Hsp70 und Hsp104 eine effiziente Freisetzung des GFP. Im Gegensatz dazu folgte auf die Zugabe von GroE keine deutliche Steigerung der GFP Aktivität. Wurde die *in vitro* Transkription/Translation in Abwesenheit von Hsp26

durchgeführt, steigerte die anschließende Zugabe von Chaperonen nicht die Rückfaltung des Substrates. Unter Einbeziehung anderer Daten ergibt sich so das Bild eines Chaperonnetzwerk (Haslbeck et al., 2005; Cashikar et al., 2005; Mogk et al., 2003).

Aber nicht nur Einflüsse von Chaperonen auf die Faltung von Zielproteinen können analysiert werden, *in vitro* Transkriptions- / Translationssysteme können ebenso benützt werden, um die Faltung von Zielproteinen direkt zu beeinflussen. So hat zum Beispiel Sengua mit seinen Kollegen die Homo- und Heterodimerbildung des *E. coli* RscR Proteins untersucht, ein Protein, das eine Schlüsselrolle bei Enteritis und der Pflanzenpathogenese darstellt (Ross et al., 1997). Die Experimente zeigten den Austausch des natürlichen Trp-Restes im RscR-Protein gegen Trp- Analoge zum einen, und zum anderen die hohe Expressionsmöglichkeit im RTS. Die gereinigten RscR-Moleküle konnten für Interaktionsstudien durch Fluoreszenzspektroskopie verwendet werden.

Eine kürzlich erschienene Arbeit konnte zeigen, dass die *in vitro* Translation auch in Verbindung mit Chip-Technologie funktioniert. Hier werden Proteine direkt auf Microchips hergestellt, auf denen sich die Template-DNAs befinden (Nakano et al., 2004; Jackson et al., 2004; Ramachandran et al., 2006). Auf diesen Chips lassen sich sowohl die enzymatischen Eigenschaften als auch Protein- Proteininteraktionen von Tausenden von Proteinen parallel untersuchen. Auf diese Weise werden High-Throughput Analyseverfahren für Proteine zugänglich. Bis dato musste jedes Protein gereinigt und auf eine Chip gebracht werden. Das sog. NAPPA (nucleic acid programmable protein array) ermöglicht nun die Proteinexpression direkt auf dem Chip (Ramachandran *et al.*, 2006). Dabei startet NAPPA mit der Template-DNA auf dem Chip und gleichzeitig beginnt die zellfreie Proteinexpression. Die synthetisierten Proteine werden eingefangen und auf dem Chip von ihrem N-Terminus zu ihrem C-Terminus orientiert. Auf diese Art und Weise ermöglicht NAPPA die Arbeitsschritte zu minimieren und zu parallelisieren.

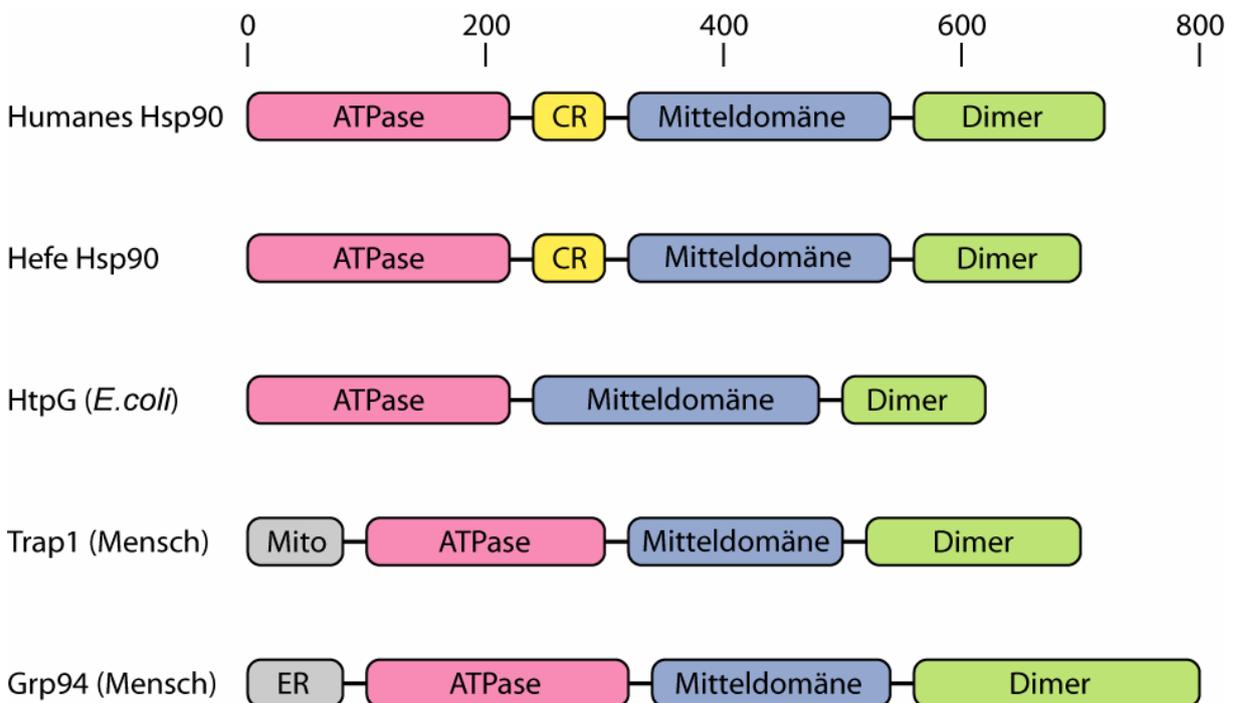
## 1.6. Die Hsp90- Familie

Das molekulare Chaperon Hsp90 ist mit 1-2% aller im Cytosol löslichen Proteine eines der am stärksten exprimierten Polypeptide (Welch & Feramisco, 1982). Es findet sich in nahezu allen Organismen wieder, in Eubakterien sowie in allen Klassen der Eukaryoten (Pratt & Toft, 1997). Bisher konnte es lediglich in Archaeen nicht nachgewiesen werden. Cytoplasmatisches Hsp90 ist essentiell für die Lebensfähigkeit unter allen Lebensbedingungen in Eukaryoten, das homologe bakterielle HptG hingegen ist unter nicht- Stressbedingungen nicht essentiell.

Erste Hinweise, dass es sich bei Hsp90 um ein Hitzestressprotein handelt, konnten Untersuchungen an Affenzellen und *Drosophila melanogaster* zeigen, welche unter unphysiologischen Bedingungen gesteigert Hsp90 exprimierten (Welch & Feramisco, 1982).

Hsp90 besteht aus einer N-terminalen Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Domäne, die durch einen geladenen Linker miteinander verbunden sind. Dieser Linker ist innerhalb der Hsp90-Familie für jedes Protein spezifisch in Länge und Ausprägung. So besitzt Hsp90 z.B. keinen Linker, wohingegen der Linker von Grp94, dem Hsp90 Homologen aus dem Endoplasmatischen Retikulum, eine Länge von ca. 70 Resten hat (Abbildung 5).

Hsp90 liegt als aktives Protein als Homodimer vor, wobei sich die Dimerisierungsstelle im C-terminalen Bereich liegt (Meng et al., 1996; Minami et al., 1994). Werden der C-terminale Bereich von Hsp90 verkürzt oder deletiert, verliert das Protein seine Fähigkeit zur Dimerisierung und somit seine Aktivität.



**Abbildung 5: Schematische Domänenstruktur von Hsp90 und seinen Homologen**

Vergleich der Domänenstrukturen von Hsp90 und den homologen Proteinen aus Hefe und *E. coli*. Pink: ATP bindende Domäne (ATPase); gelb: geladene Linkerregion (CR); blau: Mitteldomäne; grün: Dimerisierungsdomäne; grau: Lokalisationssequenz für Mitochondrien (Mito) oder Endoplasmatisches Retikulum (ER) (Abbildung mit Erlaubnis von Dr. Lin Römer).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass Hsp90 spezifisch mit nicht-nativen Proteinen interagiert und deren stressinduzierte Aggregation zu verhindern vermag (Wiech et al., 1992; Freeman & Morimoto, 1996). *In vivo* interagiert Hsp90 mit zahlreichen Substratproteinen, die von dieser Wechselwirkung für die Adaption der aktiven Konformation abhängig sind. Zu diesen Substratproteinen gehören Steroid-Hormon Rezeptoren (SHR (Pratt & Toft, 1997)), der Aryl-

Hydrocarbon-Rezeptor (Perdew, 1992; Whitelaw et al., 1993; Fukunaga et al., 1995), die mutagene Formen von p53 (Blagosklonny et al., 1996; Nadeau et al., 1993), der Heat Shock Transkriptionsfaktor 1 (HSF-1(Nadeau et al., 1993; Nair et al., 1996; Brugge et al., 1987; Oppermann et al., 1981)), Tyrosinkinase wie p60<sup>v-src</sup> (Oppermann et al., 1981; Brugge et al., 1987), Serin-Threonin Kinasen (Stancato et al., 1993; Wartmann & Davis, 1994) und die Reverse Transkriptase des Hepatitis B Virus (Hu et al., 1997).

Hsp90 bildet mit vielen seiner Substrate stabile Chaperon-Substrat-Komplexe. Zahlreiche Hinweise für Aktivität und Funktion von Hsp90 stammen daher aus der Isolierung von Komplexen mit Hsp90-Substraten, wie Glucocorticoidrezeptoren (Catelli et al., 1985). Daneben konnte auch *in vitro* Chaperonaktivität nachgewiesen werden. Chaperonassays, wie zuvor auch schon bei Vertretern der Hsp70-Familie und GroE zum Einsatz kamen, wiesen daraufhin, dass auch Hsp90 in der Lage ist, die Aggregation denaturierender und aggregierender Proteine zu verhindern (Miyata & Yahara, 1992; Wiech et al., 1992). Als Substrate wurden hierbei nicht die bekannten *in vivo* Substrate verwendet, da deren Reinigung der inherenten Instabilität wegen nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Stattdessen wurden Modellsubstrate wie Citratsynthase (Jakob et al., 1995), Luciferase (Schumacher et al., 1994),  $\beta$ -Galaktosidase und Insulin (Scheibel et al., 1998) verwendet. Diese Untersuchungen wurden weiter ausgedehnt, um die Hsp90-Spezifität zu verstehen. Daraus ergab sich dann, dass die Interaktion mit Hsp90 einen teilweise strukturierten, nativ-ähnlichen Zustand bedingt (Jakob et al., 1995; Freeman & Morimoto, 1996). Nicht-native Substrate, die an Hsp70 gebunden sind, können dann über das Hsp90-System wieder zurückgefaltet werden (Freeman & Morimoto, 1996; Schumacher et al., 1996). Dem Hsp90/ Hsp70 Partnerprotein Hop wird dabei eine Vermittlerrolle zugewiesen (Abbildung 6). Darüber hinaus zeigen *in vivo* Daten, dass Hsp90 nicht wesentlich an der *de novo* Faltung von Polypeptidketten beteiligt ist (Nathan et al., 1997).

Viele Hsp90-Partnerproteine weisen ein degeneriertes Motiv von ca. 34 Aminosäuren auf, die TPR (Tetratricopeptide repeat)- Domäne (Das et al., 1998). Über diese Domäne interagieren sie mit Hsp90. Die Interaktionsdomäne von Hsp90 liegt am C-terminalen Ende mit dem EEVD Sequenzmotiv (s. Abbildung 5 (Owen, 1999; Carrello et al., 1999)).

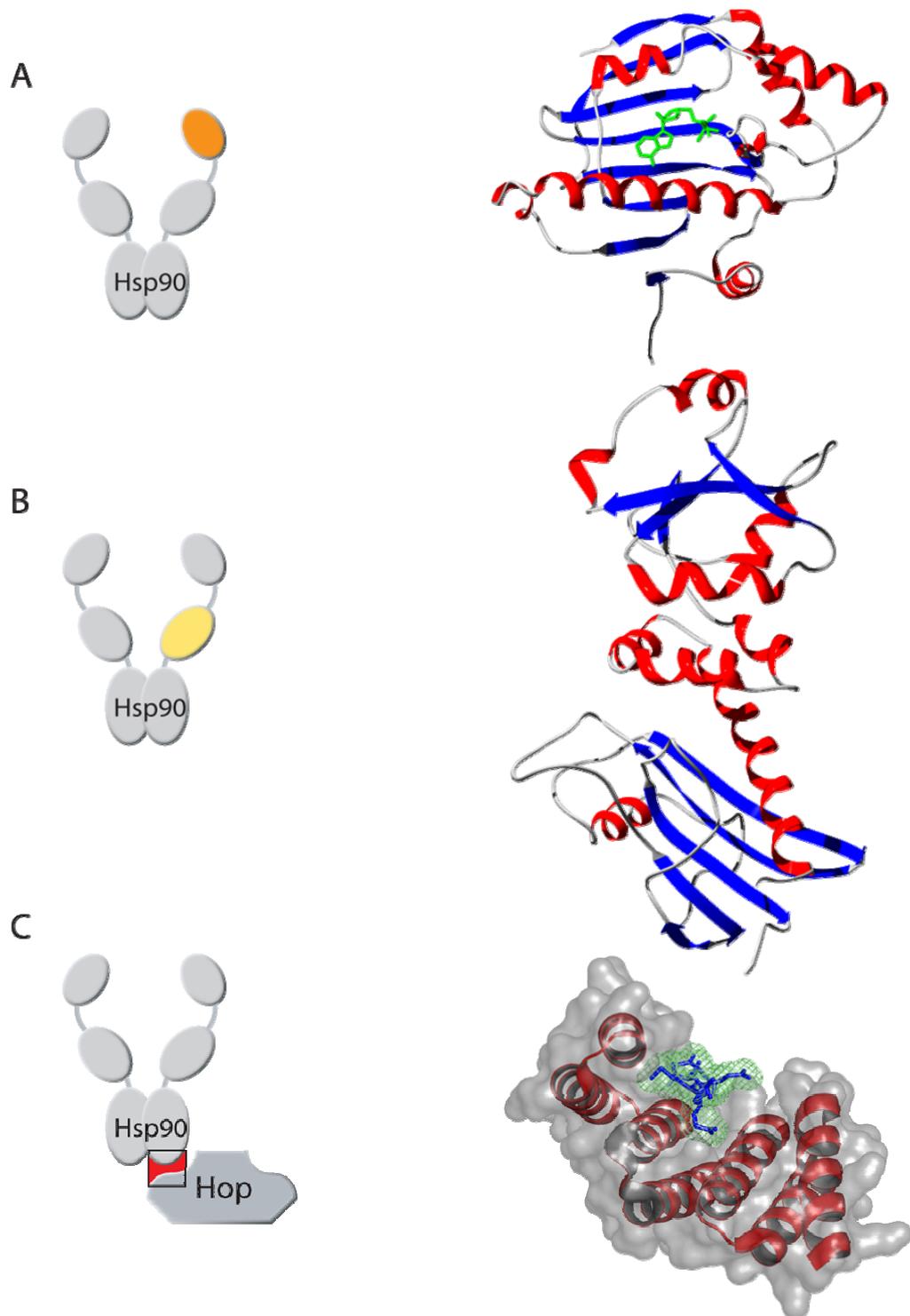
Hsp90 ist in der Lage Substratproteine zu erkennen, deren molekulare Masse von wenigen 100 Dalton bis zu vielen Kilodalton reichen kann. Dabei bindet Hsp90 sowohl komplett entfaltete Proteine wie auch nativ-ähnliche Strukturen. Wichtig scheint der Faltungszustand, nicht aber die Peptidsequenz zu sein.

ATP-Bindung und Hydrolyse sind wichtig für die Bindung von Substraten und Konformationsänderungen durch molekulare Chaperone (Bukau & Horwich, 1998). Die ATPase Aktivität von Hsp90 hat eine geringe Umsatzgeschwindigkeit (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998; Scheibel et al., 1998). Die Hydrolysegeschwindigkeit ist unabdingbar für die Funktion des Hsp90 Homologen Hsp82 aus Hefe (Obermann et al., 1998; Panaretou et al., 1998) und kann durch Bindung von Geldanamycin oder Radicicol an den N-Terminus effizient inhibiert werden (Neckers, 1999; Roe et al., 1999). Die Bindestelle von ATP liegt in der N-terminalen Domäne von Hsp90 und konnte durch Röntgen-Strukturanalyse in Co-Kristallen mit ATP eindeutig zugeordnet werden (Prodromou et al., 1997). Die Bindestelle befindet sich in einer 15 Å tiefen Tasche mit  $\beta$ -Sheets am Boden, Loops und  $\alpha$ -Helices, die den Liganden umgeben. Die gesamte ATP-Bindedomäne besteht aus einem 8-strängigen  $\beta$ -Faltblatt und 9  $\alpha$ -Helices, die zusammen ein  $\alpha/\beta$ - Sandwich ausbilden (Abbildung 6).

Das gebundene ATP liegt in einer geknickten Koordination in der Tasche (Prodromou et al., 2000) und zeigt damit ein Bindungsmuster wie in DNA-Gyrase und MutL (Dutta & Inouye, 2000). Für MutL konnte gezeigt werden, dass Aminosäurereste, die außerhalb der Bindedomäne liegen, wichtig für die Dimerisierung und der damit verbundenen ATPase Aktivität sind (Ban et al., 1999). Studien an Hsp90 deuten auf einen ähnlichen Mechanismus hin (Prodromou et al., 2000). Der Reaktionsmechanismus konnte mittels neuartiger fluoreszierender ATP-Analoga geklärt werden (Weikl et al., 2000). Dabei ist eine Konformationsänderung in Hsp90 wichtig, die das gebundene ATP einschließt, und die Edukte erst nach Hydrolyse durch erneute Konformationsänderung wieder freisetzt. Für diese Reaktion wiederum sind C-terminale Bereiche von Hsp90 entscheidend (Weikl et al., 2000; Wegele et al., 2004).

Die N-terminale Domäne alleine weist nur geringe ATPase Aktivität auf. Durch die Hydrolyse treten Konformationsänderungen auf wodurch die Dimerisierungsstelle im N-terminalen Bereich des Proteins exponiert wird. Es folgt eine vorübergehende Dimerisierung der N-Termini (Prodromou et al., 2000). Diese Dimerisierung stellt einen entscheidenden Schritt im ATPase Zyklus dar, und ist notwendig für die ATPase Aktivität (Richter & Buchner, 2001).

Das Glucose regulierte Protein 94 (Grp94) ist eines der zu Hsp90 homologen Proteine. Es ist nicht nur im Vergleich auf seine Aminosäuresequenz homolog zu Hsp90, sondern Grp94 hat sich evolutionär direkt aus Hsp90 entwickelt, und gilt somit als Paralog von Hsp90.



**Abbildung 6: Kristallstruktur von Hsp90**

A) ATP- Bindedomäne von yHsp90 im Komplex mit ATP (grün) (PDB: 1AM1); B) Mitteldomäne von Hsp90 (Meyer et al., 2003). C) Das Cochaperon Hop (rot/grau) bindet an den C-terminalen Bereich (EEVD; blau) von yHsp90 (PDB 1ELR)

### 1.6.1.Grp94

Das Hsp90 homologe Protein des Endoplasmatischen Retikulum (ER) wird als Grp94 (glucose regulated protein 94), gp96 oder auch Endoplasmin bezeichnet (Mazzarella & Green, 1987). Grp94 wurde in Zellen höherer Eukaryoten entdeckt, die durch Glucosemangel gestresst wurden. Die Expression von Grp94 kann neben Glucosemangel auch durch andere Stressbedingungen, die zum Teil für Grp94 spezifisch sind, beeinflusst werden (Kim & Lee, 1986; Kang & Welch, 1991). Grp94 gehört zu einem der Hauptproteine, die im ER gefunden werden (Ferreira et al., 1994). Wie alle ER-Proteine hat auch Grp94 eine KDEL-Retentionssequenz, die durch den Erd2-Rezeptor erkannt wird, und das Protein im ER zurückhält (Munro & Pelham, 1987). Grp94 ist essentiell für die Assemblierung zahlreicher Substratproteine, wie z.B. des Toll-like Rezeptors, von Integrinen und Immunglobulinen (Melnick et al., 1992; Melnick et al., 1994; Nigam et al., 1994; Muresan & Arvan, 1997).

Hsp90, HptG und Grp94 weisen eine gleiche Domänenstruktur auf (Abbildung 5), bestehend aus einer N-terminalen Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne. Letztere ist für die homodimere Quartärstrukturausbildung der Hsp90 Proteine zuständig (Wearsch & Nicchitta, 1996; Csermely et al., 1995).

Die Struktur der N-terminalen Domäne von Grp94 (Abbildung 7) ähnelt der von Hsp90 stark (Soldano et al., 2003). Säuger-Grp94 allerdings enthält eine hoch-konservierte 5 Aminosäuren lange Insertion in der Nukleotidbindedomäne, die eine Ligandenbinde-Selektivität und eine konformationelle Antwort auf ADP/ ATP Bindung verleiht, die sich wesentlich von Hsp90 unterscheidet (Rosser & Nicchitta, 2000; Soldano et al., 2003). Vergleiche der Konformation der ATP- oder ADP- gebundenen Formen von Grp94 und Hsp90 zeigen, dass der nukleotidgebundene Zustand von Grp94 eine erhebliche Distanzierung der Helix- 1,4,5-Domäne auslöst, um eine offene Lid-Konformation zu erreichen (Immormino et al., 2004; Dollins et al., 2005). Die konformationelle Veränderung bedingt durch die ADP/ATP Bindung an Grp94 legt eine interaktive Oberfläche frei, die nötig für die Dimerisierung der rekombinanten N-terminalen Domäne von Grp94 *in vitro* ist (Immormino et al., 2004). Interessanterweise zeigt auch HptG eine konformationelle Veränderung nach ADP-Bindung auf, wenn auch weniger ausgeprägt als für Grp94 beschrieben (Huai et al., 2005). Es bleibt die Frage offen, ob der ATP-getriebene „molekulare Haken“, der für Hefe- Hsp90 beschrieben wurde, das gemeinsame strukturelle Modell für die Hsp90 Chaperon Funktion ist.

Wie viele andere Chaperone auch, zeigt Grp94 eine Peptidbindefähigkeit (Melnick et al., 1992). Außerdem wird angenommen, dass Grp94 analog zu seinen cytosolischen Homologen,

einen Komplex mit dem ER-Hsp70 Homolog BiP ausbilden kann (Ferreira et al., 1994; Kuznetsov et al., 1997).

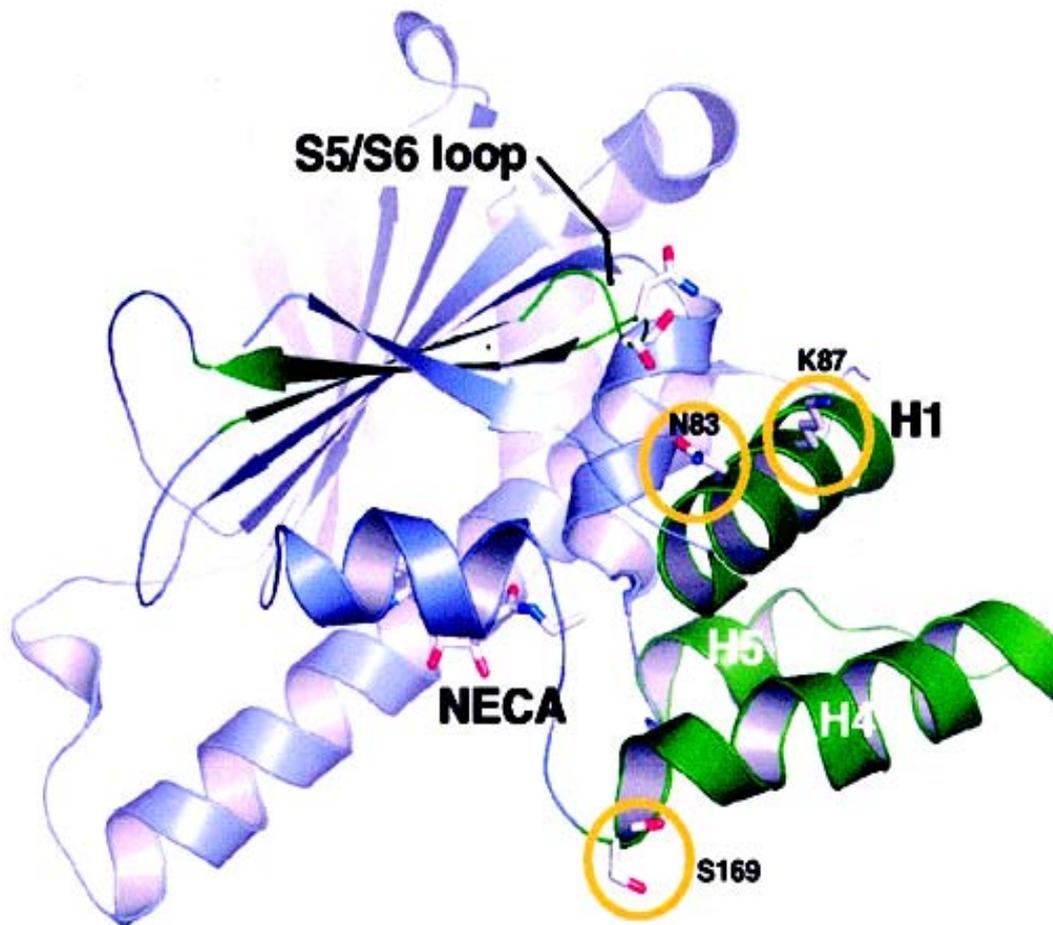
Die Peptidbindung von Grp94 liegt vermutlich im C-terminalen Bereich (Linderoth et al., 2001; Linderoth et al., 2000; Sastry & Linderoth, 1999). Dieser Bereich ähnelt den anderen Hsp90- Homologen am wenigsten, allerdings ist das Substratspektrum auch ein anderes. Die Peptidbindestelle liegt zwischen den Aminosäuren 624 und 630 für Grp94 aus Hund und soll wie die Bindung von Peptiden im MHC I Rezeptor funktionieren (Linderoth et al., 2001). Kontaktstellen wie die TPR-Domäne in Hsp90 ist für Partner- und regulatorische Proteine bisher nicht bekannt. Auf die Peptidbindung geht vermutlich die Fähigkeit zurück, dass Chaperone eine Immunantwort gegen gebundene Peptide auslösen können (Srivastava, 1996). Über diese Fähigkeit konnte gezeigt werden, dass aus Tumorzellen isolierte Grp94/Substratkomplexe eine Immunantwort gegen die gleiche Art Tumorzellen auslösen konnten, aus denen sie präpariert wurden. Dies kann zur vollständigen oder persistierenden Immunisierung führen (Udono et al., 1994; Tamura et al., 1997). Dabei kann Grp94 z.T. ungefaltete, immunrelevante Peptide binden, die bei der Antigenpräsentation eine Rolle spielen. In diesem Rahmen konnte für Grp94 eine Interaktion mit dem TAP-Transporter nachgewiesen werden (Singh-Jasuja et al., 2000). Über die Regulation der Peptidbindung ist wenig bekannt. Eine ATP-Zugabe resultiert in der Regel nicht in einer Änderung der Bindung (Melnick et al., 1994). Da Grp94 Peptide sehr stark binden kann, ist es für die Tumorummunisierung prädestiniert (Feldweg & Srivastava, 1995).

Bisher konnte für Grp94 zwar ATP-Bindung, aber keine Hydrolyse nachgewiesen werden (Li & Srivastava, 1993). Auch konnten für ATP und ADP regulative Einflüsse auf Grp94 oder Eigenschaften, wie Peptidbindung, gezeigt werden (Wearsch & Nicchitta, 1997).

Grp94 ist als Dimer aktiv. Die Dimerisierungsdomäne liegt im C-terminalen Bereich zwischen den Aminosäuren 676-719, bzw. als „Core“-Bindestelle zwischen den Aminosäuren 692-709, die hier einen hydrophoben Bereich bilden (Wearsch & Nicchitta, 1996). Des Weiteren ist eines der drei Cysteine (Position 138) für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren verantwortlich, auch wenn über die Existenz einer solchen kovalenten Verbindung noch gestritten wird (Wearsch & Nicchitta, 1997).

Außerdem ist Grp94 mindestens einfach durch Mannose glykosyliert (Qu et al., 1994). Dieses Glykosylierungsmuster scheint aber nicht konstant und einheitlich zu sein, und kann je nach Zustand der Zelle variieren (Qu et al., 1994; Wearsch & Nicchitta, 1996). *In vivo* im ER sind ca. 95% des gesamten Grp94 glykosyliert (Wearsch & Nicchitta, 1996). Allerdings ist bis heute die Funktion der Glykosylierung von Grp94 unbekannt, aber es gibt Hinweise, dass die

Glykosylierung notwendig für die Interaktion mit Interaktionspartnern der Qualitätskontrolle des ER ist.



**Abbildung 7: Kristallstruktur des N-terminalen Bereich von Grp94 im Komplex mit NECA.** Die geschlossen Konformation von Grp94 im Komplex mit NECA. Die Helix 1-4-5 ist in grün gehalten. Der S5/S6 Loop trägt der Stabilisierung dieses Komplexes bei. Aminosäuren, die den Komplex weiter stabilisieren sind gelb umrandet (Dollins et al., 2005)

## 1.7. Die Hsp70- Familie

Die Proteine der Hsp70- Familie stellen ein Chaperonsystem dar, das eine zentrale Position in nahezu allen Zellen und Kompartimenten eukaryotischer Zellen, Eubakterien und sogar einigen Archaeen einnimmt. Ursprünglich wurden diese Proteine als stressreguliert entdeckt. Inzwischen ist deutlich geworden, dass diese Familie auch unter normalen physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielt. Hsp70- Proteine zeigen ein weites Aufgabenspektrum: Unterstützung der Faltung neu synthetisierter Proteine (Scandurro et al., 1997; Frydman et al., 1994), Translokation von Proteinen durch Membranen (Herrmann et al., 1997; Horst et al., 1997), Auflösung von oligomeren Proteinstrukturen und vereinfachter proteolytischer Abbau instabiler Proteine (Schmid et al., 1985).

Um diesem breiten Aufgabenfeld Herr zu werden, bedienen sich Hsp70 Proteine grundsätzlich dreier Strategien. Erstens haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Hsp70-Gene entwickelt. Eine eukaryotische Zelle z.B. besitzt neben zwei cytosolischen Hsp70 Formen noch eine für je das ER (BiP) und eine für Mitochondrien (PBP74). Zweitens wird die Aktivität der Hsp70-Proteine durch zahlreiche Cochaperone reguliert, wie z.B. durch die Mitglieder der Hsp40-Familie (Abbildung 4) und Homologe der bakteriellen GrpE-Familie. Schließlich arbeitet das Hsp70-System mit dem Hsp90-System (Walter & Buchner, 2002) sowie dem Hsp100-System zusammen (Weibezahn et al., 2004). Die gemeine Funktion dieser Prozesse scheint eine Interaktion mit kurzen, weitestgehend gestreckten hydrophoben Peptidsequenzen in teilweise oder vollständig entfalteten Proteinen zu sein, wobei Aggregation verhindert und eine korrekt gefaltete Konformation des Proteins erreicht wird. Das Bindemotiv dabei scheint in einer großen Anzahl von Proteinen vorhanden zu sein (Rudiger et al., 1997). Ein typisches Bindemotiv im Fall von DnaK (Hsp70- Homolog aus *E. coli*) besteht aus 5 aufeinander folgenden Resten, in denen hydrophobe und basische Aminosäuren benachbart sind (Zhu et al., 1996). Dabei werden die Bindemotive mit einem  $K_D$  von 5 nM bis zu 5  $\mu$ M erkannt (Bukau & Horwich, 1998). Sie befinden sich normalerweise im hydrophoben Kern des nativen Proteins oder in Domänen, die an der Oligomerisierung der Substrate beteiligt sind (Fink et al., 1997).

Der Prozess, durch den Hsp70 Aggregation verhindert und Faltung unterstützt, ist noch nicht im Detail verstanden. Proteine, die mit Hsp70 interagieren unterlaufen Zyklen von Binden und Freisetzung, bis sie schließlich ihre dreidimensionale Struktur eingenommen haben (Buchberger et al., 1996). Die Hsp70-Proteine von Bakterien und höheren Eukaryonten agieren sowohl co- als auch posttranslational, wohingegen Hefen und Pilze Hsp70-Mitglieder

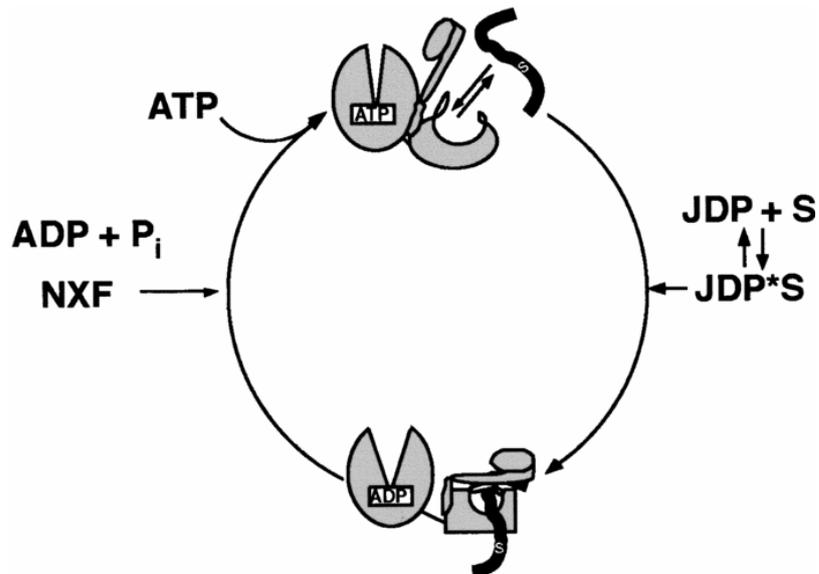
besitzen, die darauf spezialisiert sind, direkt an naszierende Ketten am Exit-Tunnel des Ribosoms zu binden (Gautschi et al., 2002; Pfund et al., 1998). Einige Substrate falten nach Bindung an ein erstes Set von Hsp70-Proteinen direkt in ihren nativen Zustand, wohingegen andere Substrate nach dieser Bindung nochmals an eine weitere Hsp70-Familie binden müssen, die nicht direkt mit dem Ribosom in Kontakt steht (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Die Substrate werden entweder in ihrem nativen Zustand entlassen, oder sie werden zu einem weiteren Chaperonnetzwerk geleitet (Deuerling et al., 1999).

Die Hsp70-Familie unterstützt die Faltung seiner Substrate ATP-abhängig. Substratbindung und -Freisetzung sind mit ATP-Bindung, -Hydrolyse und Nukleotidaustausch gekoppelt (Gething, 1999) In ATP-gebundener Form haben Hsp70 Proteine eine geringe Affinität für ihre Substrate und hohe Austauschraten, wohingegen die ADP-gebundene Form eine hohe Affinität für Substrate und eine geringen Austauschrate haben (Greene et al., 1995; McCarty et al., 1995).

Die ATPase Aktivität von Hsp70 ist generell recht gering und schwankt innerhalb der Familie zwischen  $k_{cat}$ -Werten von 0.02 bis  $1.0 \text{ min}^{-1}$ , und scheint somit in der Regel den ratenlimitierenden Schritt des Zyklus darzustellen (Gao et al., 1993; Wegele et al., 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der Peptidbindedomäne zu erhöhten ATPase-Aktivitäten führt, was darauf schließen lässt, dass die C-terminale Domäne die ATPase-Aktivität unterdrückt (O'Brien & McKay, 1995).

Die ATPase von Hsp70 wird *in vivo* durch Cofaktoren reguliert (Buchberger et al., 1996). Diese Cofaktoren können die ATPase- Aktivität von Hsp70 beschleunigen, in dem sie den Nukleotidaustausch erleichtern. Verantwortlich sind dafür die Proteine der Hsp40/ J-domain Proteine, die eine konservierte ca. 75 Aminosäuren lange J-Domäne haben (Banecki & Zylicz, 1996; McCarty et al., 1995). Ein momentan akzeptiertes Modell beschreibt zwei Aufgaben der J-domain Proteine (JDP): erstens binden sie selbst an die Substrate und leiten das ungefaltete Protein zum Hsp70-Chaperon (Erbse et al., 2004), und zweitens stimulieren sie die ATPase-Aktivität von Hsp70, indem sie das Substrat in die Bindetasche des Chaperons führen. In Anwesenheit der JDPs kann die ATPase Aktivität um den Faktor zehn stimuliert werden (Cheetham et al., 1994; Liberek et al., 1991)

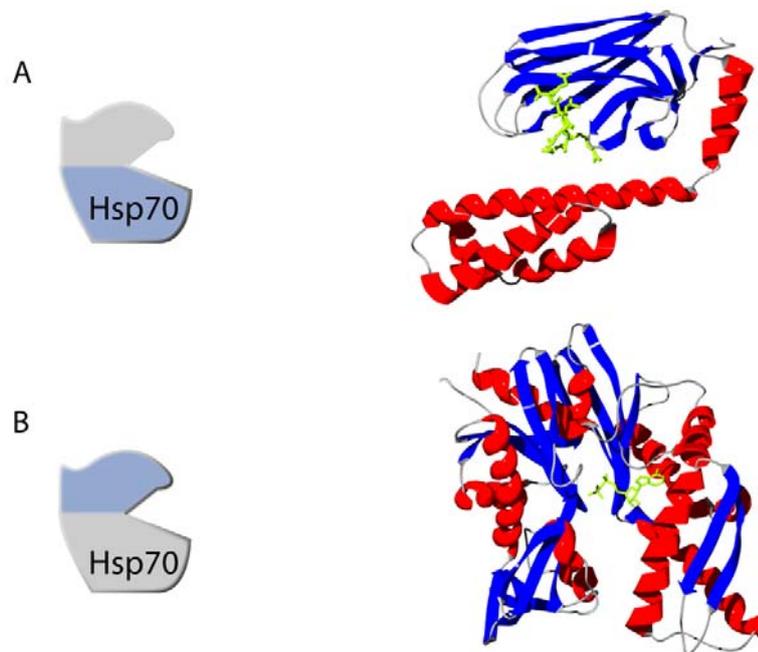
Eine zweite Klasse von Cofaktoren, die häufig auftritt, sind die Homologen des bakteriellen GrpE, die als Nukleotidaustauschfaktoren (NXF) bezeichnet werden. GrpE bindet an die ADP- gebundene Form von DnaK und beschleunigt den Austausch des Nukleotids, indem es die ATP-Bindetasche öffnet (Harrison et al., 1997) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Der funktionelle Zyklus von Hsp70- Chaperonen**

Hsp70 ist in grau und das Substrat in schwarz gezeichnet. NXF ist der Nukleotidaustauschfaktor (z.B. GrpE in E. coli und BAP im ER); JDP, J- domain Protein (z.B. DnaJ in E. coli oder ERd3J im ER. Hsp70 ist schematisch mit der ATPase und der Peptidbindedomäne dargestellt, die in ADP- gebundener Form eine geschlossene Konformation und eine offene, wenn ATP gebunden ist einnimmt (Abb. von Erbse et al., 2004 entnommen)

Hsp70- Proteine sind generell aus einer N-terminalen ATPase Domäne (~44 kDa) und einer C-terminalen Peptidbindedomäne (~28 kDa) aufgebaut. Die Strukturen beider Domänen wurden unabhängig voneinander mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR aufgelöst (Wegele et al., 2003) (Abbildung 9).

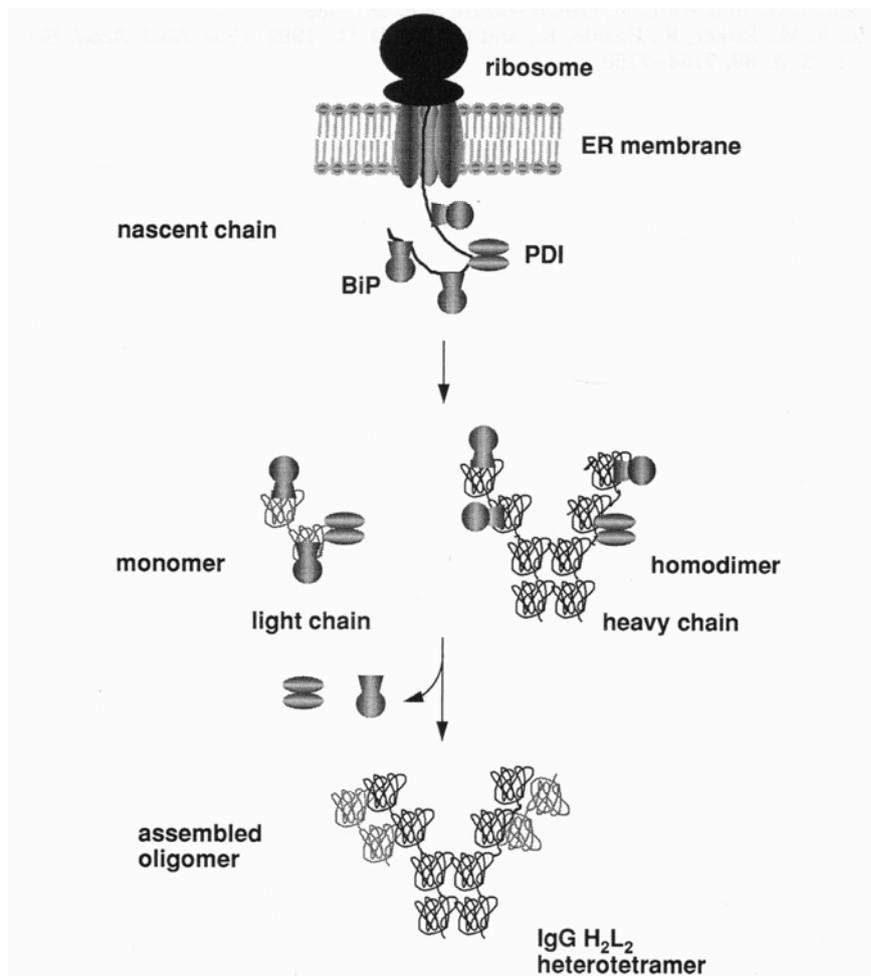


**Abbildung 9: Kristallstruktur von Hsp70.**

A) NMR- Struktur der ~25 kDa E. coli DnaK Peptidbindedomäne (DPB- Eintrag; 1DKX). Das gebundene Peptid ist grün dargestellt. B) ATPase-Domäne von Hsp70. Dargestellt ist die ~42 kDa große N-terminale ATPase Domäne von menschlichem Hsp70 (PDB- Eintrag: 1HJO). Das gebundene Nukleotid ist grün dargestellt (Abb. von Wegele, Römer und Buchner, 2003 entnommen)

### 1.7.1. BiP

Freie schwere Antikörperketten im ER werden nicht sekretiert, sondern durch das Hsp70-Homologe ER-Protein BiP (heavy chain binding protein) zurückgehalten (Haas & Wabl, 1983). Mittlerweile ist aber klar, dass BiP weit mehr Aufgaben erfüllt. BiP bindet an das Translokon und nimmt vom Ribosom Polypeptide auf, die eine Länge von ~70 Aminosäuren erreicht haben (Hamman et al., 1998). Dabei bindet es entsprechend seiner Aufgabe als Hsp70-Protein an ungefaltete Regionen naszierender Polypeptide und unterstützt deren Faltung dabei ATP-abhängig (Abbildung 10). Des Weiteren erkennt BiP falsch gefaltete Proteine und weist sie dem ER-assoziierten Abbau (ERAD) im Cytosol zu (Fewell et al., 2001). BiP ist in der Lage Calcium zu binden (Lievremont et al., 1997). Es bindet an luminale Domänen von ER- Stress- Rezeptorproteinen und hält diese in einem inaktiven Zustand. Sobald der BiP- Spiegel in Stresssituationen im Lumen dann abnimmt, wird BiP von diesen Rezeptoren freigesetzt und die Rezeptoren werden aktiviert, so dass neue ER- Chaperone synthetisiert werden können (Ma et al., 2002).



**Abbildung 10: Schematischer Überblick der Antikörpersynthese und der Rolle von BiP und PDI in diesem Prozess.**

BiP ist u. a. mit für die Assemblierung eines Ig- Moleküls im ER verantwortlich. Auch wenn andere Antikörperdomänen durch BiP gebunden werden, kann durch Bindung an die C<sub>H</sub>1 der ungefaltete Antikörper im ER zurückgehalten werden, auch wenn andere Domänen auch. Synthese und Anlagerung der leichten Kette an die schwere Kette verdrängt BiP von seiner Bindestelle, und der vollständig assemblierte Antikörper kann schließlich aus der Zelle transportiert werden. Während des Faltungsprozesses ist eine PDI für die Ausbildung und Isomerisierung von Disulfiden verantwortlich. Das Einwirken von Cochaperonen (z.B. BAP) und anderen Faltungshelfern (z.B. Grp94) ist nicht dargestellt (Knarr et al., 1995).

Trotz intensiver Forschung konnte bisher keine eine definierte BiP-Bindestelle an einer Antikörperdomäne gefunden werden. *In vitro* wurden viele kurze Peptide synthetisiert um dieser Frage nachzugehen. Augustine et al. (2001) und Knarr et al. (1995) testeten, ob Heptapeptide der Aminosäuresequenz des Antikörper MAK33 die ATPase Aktivität von BiP *in vitro* stimulieren konnten. Der monoklonale Antikörper MAK33 wurde schon in vielen Faltungsstudien eingesetzt (1.1.2. Antikörper als Modellsystem) (Buchner et al., 1991; Lilie et al., 1995a; Lilie et al., 1995b). Insgesamt wurden 14 Heptapeptide von MAK33 für die ATPase Stimulierung von BiP getestet, wobei die Hälfte davon tatsächlich einen positiven Einfluss (Faktor 1.4 – 3.0) hatten (Augustine et al., 2001; Knarr et al., 1995). Drei dieser Peptide stammten aus variablen Bereichen der leichten bzw. der schweren Kette und drei

weitere aus der C<sub>H</sub>3- Domäne von MAK33. Nur je eine Bindestelle lag dabei in der C<sub>L</sub>- und der C<sub>H</sub>1- Domäne, die beide an der Dimerisierung der leichten und der schweren Kette beteiligt sind. Für die C<sub>H</sub>2- Domäne wurden keine Peptide getestet.

## 1.8. Proteinfaltung und Qualitätskontrolle im ER

Das Endoplasmatische Retikulum ist ein hochorganisiertes Zellkompartiment, das mit Chaperonen und Faltungsenzymen ausgestattet ist, die unerlässlich für das Überleben von Eukaryoten sind. Korrekt gefaltete Proteine werden aus dem ER transportiert, wohingegen falsch gefaltete zurückgehalten werden und selektiv abgebaut werden. Letztendlich sind es zwei wesentliche Proteinklassen, BiP und Calnexin/Calreticulin, die in der Qualitätskontrolle aktiv sind. Aufgaben des ER sind u.a. Lipidverteilung an andere Organellen (van Meer und Sprong, 2004), Ca<sup>2+</sup> Homeostase (Kleinschmidt et al., 2003), Biogenese von Organellen (Geuze et al., 2003), Proteinfaltung, Qualitätskontrolle (Ellgaard & Helenius, 2001; Sitia & Braakman, 2003) und der Abbau von Proteinen. Auch wenn die Faltungsinformation von Proteinen in der Primärsequenz liegt, so beeinflusst das ER doch die Proteinfaltung erheblich (Anfinsen, 1973). Ein Drittel aller Proteine einer eukaryotischen Zelle werden ins ER transportiert (Ghaemmaghami et al., 2003); nur im ER ist es aufgrund der dort herrschenden Oxidationsbedingungen möglich, dass Disulfidbrücken ausgebildet werden können (Tu & Weissman, 2002). Schließlich ist die Proteinkonzentration im ER ausgesprochen hoch (>100 mg/ml), so dass Chaperone in diesem dichtgepackten, gelartigen Kompartiment unabdingbar sind (Marquart, 1984).

Alle Proteine, die Faltungswege des ER durchlaufen, werden der primären Qualitätskontrolle unterworfen, der die Mitglieder der Hsp40, Hsp70 und Hsp90 Familie angehören, sowie einige Oxidoreduktasen und Calnexin (Cnx) und Calreticulin (CRT). Die sekundäre Qualitätskontrolle hingegen findet nur in bestimmten Zelltypen statt, und erleichtert den Transport spezifischer Proteine, wie z.B. Tapasin im Bezug auf MHC Klasse 1 Moleküle (Herrmann et al., 1997).

<b>Familie</b>	<b>Protein</b>
<b>Hsp70</b>	<b>BiP</b>
<b>Hsp90</b>	<b>Grp94</b>
<b>Hsp110</b>	<b>GRP170</b>
<b>Lectin</b>	<b>Calreticulin, Calnexin, UGGT</b>
<b>Co-Chaperon</b>	<b>ERp3j, BAP</b>
<b>Oxidoreduktasen</b>	<b>PDI, ERp72, CaBP1, ERp29</b>
<b>PPIase</b>	<b>Cyclophilin B</b>

**Tabelle 2: Chaperone und Faltungshelfer der primären Qualitätskontrolle des ER, klassifiziert nach ihrer Funktion**

Durch einen Mechanismus, der „Unfolded Protein Response“ (UPR) genannt wird, besitzt das ER die Möglichkeit korrekte Faltung während Stresssituationen zu gewährleisten. Proteine, die nicht in der Lage sind, den nativen Zustand zu erreichen, werden zunächst durch den Prozess „ER associated degradation“ in das Cytosol retransloziert (ERAD) und dort durch Proteasen abgebaut.

Ein teilweise recht gut verstandener Prozess der primären Qualitätskontrolle ist das Cnx/ CRT System. CRT und Cnx sind homologe Proteine, mit dem Unterschied, dass Cnx ein Transmembranprotein ist, und CRT löslich im ER vorliegt. Beide interagieren mit (Hammond & Helenius, 1994; Damen et al., 1998). Die Spezifität beider Proteine für Glc<sub>1</sub>Man<sub>7</sub>-<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- Glykane (Glc = Glucose; Man = Mannose; GlcNAc = N-Acetylglucosamin) führt zu einer vorübergehenden Assoziation mit nahezu allen im ER hergestellten Glycoproteinen (Helenius & Aebi, 2001). Zwei funktionell unabhängige Enzyme vermitteln dabei den Bindungsstatus in diesem Chaperonsystem: Glucosidase I ist verantwortlich für die Dissoziation des Substrat- Glykoproteins von CRT oder Cnx. Die Glukosyltransferase (GT) hingegen glykosyliert Substratproteine, damit sie ggf. mit Cnx oder CRT erneut interagieren können. Dabei findet diese Re- Glykosylierung nur statt, wenn durch die GT erkannt wird, dass das Glykoprotein unvollständig gefaltet ist (Parodi, 2000). Nur wenn das Glycoprotein korrekt assembliert und glykosyliert ist, kann es aus diesem Zyklus entkommen. Das bedeutet, dass durch die Glykosylierung unvollständig gefaltete Proteine markiert werden, die das ER nicht verlassen dürfen.

Eine große Familie von Proteinen, die Disulfid-Oxidoreduktasen, von denen die Proteindisulfidisomerase die am besten untersuchte ist, katalysiert die Oxidation,

Isomerisierung und Reduzierung von Disulfidbrücken. Das ist eine entscheidende Eigenschaft des ER, dass viele Proteine Disulfidverbrückungen besitzen (vgl. Tabelle 2)(Sevier & Kaiser, 2006). Die Grundlage für die Möglichkeit Disulfidbrücken ausbilden zu können ist die Tatsache, dass im ER ein oxidierendes Milieu vorherrscht: im Cytosol liegt das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Gluthation >50:1 (Fewell et al., 2001) wohingegen es im ER zwischen 1:1 und 3:1 liegt. Die kontinuierliche Aktivität der Oxidoreduktasen ist für die Faltung von Proteinen im ER unerlässlich, da falsche Verknüpfungen wieder aufgelöst und neuorganisiert werden müssen.

### **1.8.1. ER- Stress und UPR (unfolded protein response)**

Um das Faltungssystem aufrecht zu erhalten, haben Zellen Systeme entwickelt, die es erlauben die Menge an Chaperonen der Menge an ungefalteten Proteinen anzupassen. Im Cytosol veranlasst eine Ansammlung ungefalteter Intermediate die sog. *heat shock response*, was dazu führt, dass cytosolische Chaperone verstärkt synthetisiert werden müssen (Morimoto et al., 1996). Gleichermäßen führt eine Anhäufung von nicht- nativ gefalteten Proteinen im ER zur UPR, die selektiv durch Stoffe wie Tunicamycin (Inhibierung der Glykosylierung), DTT (Inhibierung der Disulfidausbildung) oder Stoffe, mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt des ER wie Thapsigargin induziert werden kann (Kaufman et al., 2002). Auch kann die UPR eine wichtige Rolle in pathoguiden Situationen einnehmen, wenn z.B. das ER Unmengen an Protein herstellt, wie es sonst nur die Aufgabe einer B-Zelle ist (Ma et al., 2002), oder im Fall von Skorbut, wenn Collagen durch das Fehlen von Vitamin C nicht falten kann (Hosokawa & Nagata, 2000).

Im ER von Säugern bindet BiP an die ER-luminale Domäne der Stresssensoren Ire1 $\alpha/\beta$ , PERK und ATF6 (Ma et al., 2002). Befinden sich im ER große Mengen an ungefalteten Protein, wird BiP von den Stresssensoren gelöst, die dann die UPR anschalten (Kaufman). Die *de novo* Synthese von Chaperonen beginnt, angetrieben durch die Proteine ATF6 und Ire1 und durch Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF-2 $\alpha$ . Gleichzeitig kommt es zum Synthesestop anderer Proteine, veranlasst durch PERK, so dass der Anstieg ungefalteter Proteine im ER gehemmt wird (Harding et al., 1999).

### **1.8.2. ER-assoziiertes Abbau (ERAD)**

Ständig falsch gefaltete Proteine werden durch einen Prozess abgebaut, der sich ERAD nennt (ER associated degradation). In diesem Fall werden die betroffenen Proteine durch den SEC61-Porenkomplex zurück ins Cytosol befördert und durch das Proteasom abgebaut (Tsai & Rapoport, 2002; Kostova & Wolf, 2003). Eine interessante Frage in diesem Zusammenhang ist, wie das ER zwischen unvollständig intermediären und permanent gefalteten Polypeptiden entscheiden kann. Ein denkbarer Weg wäre die Glykosylierung, und dadurch die Möglichkeit, ein Polypeptid zur Cnx/ CRT Maschinerie oder zum SEC61 Komplex zu schicken, allerdings noch großer Klärungsbedarf (Hosokawa et al., 2001).

## 1.9. Problemstellung

Die Faltung von Proteinen im Allgemeinen und die im ER im Speziellen ist ein absolut essentieller und daher kontrollbedürftiger Prozess. Proteine, die für die Sekretion bestimmt sind, sind für den Lebenszyklus eines Organismus essentiell. Bei der höheren Eukaryonten erfolgt die Faltung von Molekülen, die essentiell für die Abwehr von Fremdorganismen. Dazu gehört die Ausstattung von Proteinen mit Zuckerresten oder das Einführen von Disulfiden, die u.a. einen wichtigen Bestandteil der Antikörperassemblierung darstellen. Die cytoplasmatische Expression solcher rekombinanten Proteine, insbesondere Antikörper, in *E. coli*, erweist sich auf Grund der reduzierenden Umgebung als äußerst schwierig. Das überexprimierte Protein aggregiert häufig in Form von *Inclusion bodies* und meist können diese nur in geringen Ausbeuten rückgefaltet werden. Die Expression solcher Proteine in einem auf dem Cytosol von *E. coli* basierenden zellfreien Expressionssystem ist daher ein besonderer Anreiz. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die lösliche Expression eines vollständigen IgG-Moleküls (MAK33) in einem zellfreien Transkriptions-/Translationssystem untersucht werden. Zur Verfügung stand das Rapid Translation System (RTS) der Firma Roche Diagnostics. Die hier exprimierten Antikörpermoleküle sollten hinsichtlich Expression, Aktivität und Struktur untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte zum einen diversen Faltungshelfern, die auch *in vivo* an der Faltung im ER beteiligt sind, zum anderen dem Redoxpotential des Systems gelten.

Darüber hinaus sollte die *in vitro* Faltung des Fab-Fragments vom MAK33 näher charakterisiert werden. Von Interesse war es den Einfluss unterschiedlicher, zum Teil noch nicht beschriebener Faltungshelfer und Chaperone zu charakterisieren. Speziell sollte das Lectin Calnexin, die Oxidoreductasen ERp57 und PDI, ein neu entdecktes Protein mit vermuteten Oxidoreductaseeigenschaften namens LyTOR, einem weiteren bisher nicht weiter charakterisiertem ER Protein, das in Zusammenhang mit Proetindisulfidisomerasen gebracht wird, mit Namen smERp1.

Schließlich galt das Interesse noch der strukturellen und regulatorischen Charakterisierung des im ER beheimateten Hsp90-Paralogen Grp94. Wie alle Hsp90 Chaperone arbeitet auch Grp94 in Abhängigkeit von Adenosinnukleotiden. Dabei wird die Hydrolyseaktivität sehr kontrovers diskutiert. Der, wenn vorhandene, ATPase- Zyklus, sowie die Aktivität als Chaperon sollte analysiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben überraschende Einblicke in die Arbeitsweise und Regulation ER-residenter Faltungshelfer. Sie zeigen auch faszinierende Möglichkeiten zur Antikörperherstellung und –entwicklung für die Diagnostik, Analytik und Therapeutik auf.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Verwendetes Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Acrylamidlösung (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Roche, Mannheim, Deutschland
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Roche, Mannheim, Deutschland
[P <sub>32</sub> ]- $\gamma$ ATP	Hartmann, Braunschweig, D
Adenosyl-imidodiphosphat (AMP-PNP)	Roche, Mannheim, Deutschland
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (15 TBq/mmol)	Hartmann, Braunschweig, D.
Agarose, ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roche, Mannheim, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicilin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	ICN, Costa Mesa, USA
Bacto Pepton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Benzamidin	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau S	Serva, Heidelberg, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets TM	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	GE Healthcare, München, D
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECLplus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, München, D
Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Glyzerin	ICN, Costa Mesa, USA
Guanidin Hydrochlorid (GdmCl)	ICN, Costa Mesa, USA
Hefe Extrakt FermTech	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid	Sigma, St. Louis, USA
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Imidazol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NADH), Dinatriumsalz	Roche, Mannheim, Deutschland
Polyoxyethylen-Sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polymyxin B	Sigma, St. Louis, USA
Silbernitrat p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN, Costa Mesa, USA

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth, (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und hatten, falls nicht eigens erwähnt, den Reinheitsgrad p.a..

### 2.1.2. Größenstandards, Kits und Spezialreagentien

ABTS- Tablets	Roche, Mannheim, Deutschland
Blocking Reagent	Roche, Mannheim, Deutschland
Buffer for ABTS	Roche, Mannheim, Deutschland
Centricon 3, Centricon 10, Centricon 30	Amicon, Witten, Deutschland
Centriprep 10, Centriprep 30, Centriprep 50	Amicon, Witten, Deutschland
Conjugate Buffer, universal	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA Längenstandard 1 kb Leiter	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Eichproteine für HPLC	Roche, Mannheim, Deutschland
Einmalküvetten 1,5 ml halbmikro	Zefa, München, Deutschland
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
Immobilon-P (PVDF)-Membran	Millipore, Bedford, USA
Low-Range-Molekulargewichtsstandard (LMW)	BioRad, München, Deutschland
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RTS100 E. coli Disulfide Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
RTS100 HY Translation System	Roche, Mannheim, Deutschland
RTS500 HY Translations System	Roche, Mannheim, Deutschland
RTS <i>E. coli</i> Linear Template Generation Set, His-tag	Roche, Mannheim, Deutschland
Slyde-A-Lyzer, 3,500; Slyde-A-Lyzer 10,000	Pierce, Rockford, USA

Sterifilter 0,2 µM	Zefa, München, Deutschland
Strepta Well (transparent, 96- well)	Roche, Mannheim, Deutschland
Topo TA Cloning	Novagen, Karlsruhe, Deutschland
PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.3. Chromatographische Materialien und Säulen

ATP- Agarose	Sigma, St. Louis, USA
DEAE- Sephacel	GE Healthcare, München, D
GSH-Sepharose, fast flow	GE Healthcare, München, D
Ni- NTA- Superflow	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ni-NTA- Batch Coloums	Qiagen, Hilden, Deutschland
Resource Q	GE Healthcare, München, D
Q-Sepharose	GE Healthcare, München, D
Superdex 200 Prep Grade	GE Healthcare, München, D
Superdex 200 HPLC	GE Healthcare, München, D

### 2.1.4. Enzyme und Proteine

Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphaatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-His <sub>6</sub> -POD (aus Maus)	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-GST-Antikörper (aus Schaf)	GE Healthcare, München, D
Anti- Grp94- Antikörper (aus Hase)	Dr. J. Pineda, Antikörperservice, Berlin, D
Anti- Hase- IgG- POD	Sigma, St. Louis, USA
Anti- Schaf- IgG- POD	Sigma, St. Louis, USA
Creatinkinase (CK-MM)	Roche, Mannheim, Deutschland
DnaJ	Martin Haslbeck
DnaK	Martin Haslbeck
hDJ1	Martin Haslbeck
Hifi-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
hPDI	Ioana Schuster
Hsp82	Otmar Hainzl

MAK33 (Eichstandard)	Roche, Mannheim, Deutschland
L-Lactatdehydrogenase	Roche, Mannheim, Deutschland
Protein A/G- Agarose	GE Healthcare, München, D
Pyruvatkinase	Roche, Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim, Deutschland
Ssa1	Andreas Schmid
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, USA
Trypsin	Roche, Mannheim, Deutschland
yDJ	Andreas Schmid

### 2.1.5. Geräte

#### Absorptionsspektrometer

Cary 50; Cary 100	Varian, Darmstadt, Deutschland
-------------------	--------------------------------

#### Chromatographieanlagen

Äkta FPLC	GE Healthcare, München, D
FPLC- Anlage LKB	GE Healthcare, München, D
Superloop 50 ml, 150 ml	GE Healthcare, München, D
PU- 1580 HPLC Pump	Jasco, Groß- Umstadt, Deutschland
LG- 980- 02S Gradient Unit	Jasco, Groß- Umstadt, Deutschland
FP- 1520- Fluoreszenz Detektor	Jasco, Groß- Umstadt, Deutschland
UV- 1575 UV- Vis Detektor	Jasco, Groß- Umstadt, Deutschland

#### Circulardichroismus- Spektropolarimeter

Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit	Jasco, Groß- Umstadt, Deutschland
--	-----------------------------------

#### Fluoreszenz- Spektrophotometer

FluoroMax 2 Fluoreszenz- Spektrophotometer	Jobin Yvon, Grasbrunn, D
FluoroMax 3 Fluoreszenz- Spektrophotometer	Jobin Yvon, Grasbrunn, D

#### Zentrifugen

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Beckmann Avanti J 25	Beckmann, Palo Alto, USA

Rotoren JA-10, JA-25.50, JLA-16.250

Beckmann, Palo Alto, USA

### Weitere Geräte

Adsorptionsspektrometer

GE Healthcare, München, D

Entwicklermaschine Optimax TR

MS Laborgeräte, Heidelberg, D

Geldokumentationssystem BiodocII

Biometra, Göttingen, Deutschland

Hofer SE600 Ruby Gelkammer

Amersham, Uppsala, Schweden

Homogenisator Ultra Thurrax DIAX 900

Heidolph, Schwabach, D

-80° Kühlschrank Sanyo

Biomed., Osaka, Japan

Magnetrührer Heidolph MR 2000

Heidolph, Schwabach, D

Minigel-Apparatur (Agarose-Gelelektrophorese)

Biorad, München, Deutschland

PCR-Maschine Primus

MWG, Ebersberg, Deutschland

Luminometer

Tecan Genios, Crailsheim, D

RTS Maxi

Roche, Mannheim, Deutschland

Tischschüttler

Heidolph, Schwabach, D

Typhoon Phospho Imager

GE Healthcare, München, D

Varioklav Dampfsterilisator EP-Z

H+P, Oberschleißheim, D

Zellaufschlussgerät Basic Z Model

Constant Systems, Warwick, GB

### 2.1.6. Computerprogramme

Adobe Creative Suite

Adobe

CDNN

Universität Halle

DeepView / Swiss PDB Viewer

Expasy (<http://www.expasy.org>)

Microsoft Office 2003

Microsoft

Origin 7.5 Pro

Microcal Software Inc.

ProtParamTool

Expasy (<http://www.expasy.org>)

Reference Manager

ISI Research Soft

SigmaPlot

SigmaPlot ([www.sigmaplot.com](http://www.sigmaplot.com))

VectorNTI

Suite 8 Informax

mFold

[www.mfold.org](http://www.mfold.org)

## 2.2. Verwendete Organismen und ihre Kultivierung

Alle im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Arbeitsschritte wurden, sofern dies erforderlich war, unter Sterilbedingungen durchgeführt.

### 2.2.1. Bakterienstämme

Stamm	Geno-/ Phänotyp	Herkunft/ Referenz
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> <i>araD</i> 139Δ( <i>ara leu</i> ) 7697Δ <i>lacX74 galU galK mcrA</i> Δ( <i>mrr<sup>-</sup> hsdRMS mcrBC</i> ) <i>rpsL</i> <i>decR</i> 380 Δ <i>lacZ</i> ΔM15 <i>endA1</i> <i>nupG recA1</i>	Jessee, 1986
<i>E. coli</i> XL 1 Blue	Δ( <i>mcrA</i> ) 183 Δ ( <i>mcrCB- hsdSMR- mrr</i> ) 173 <i>endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15</i> Tn10 ( <i>Tet<sup>r</sup></i> )] Su <sup>-</sup>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> M15	<i>nals strs rifs thi- lac- ara+ gal+</i> <i>mtl- F- recA+ uvr+ lon+</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 ara-14 proA2 lacY1</i> <i>galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i> <i>recA13 hsdS20</i>	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>cod<sup>+</sup></i>	F <sup>-</sup> <i>ion ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> <i>gal(λcIts857 ind1 Sam7 nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene1) endA The</i> [ <i>argU ileY leuW Cam<sup>r</sup></i> ]	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> EcoB	<i>lon</i>	(Donch & Greenberg, 1968)

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme

### 2.2.2. Oligodesoxynukleotide

Primer	Sequenz
lcA8forward (Amplifizierung der leichten Kette für TOPO-TA Klonierung)	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGATA TCGTATTA ACTCAGTCTCCAGC
lcB1revers (Amplifizierung der leichten Kette für TOPO-TA Klonierung)	TGATGATGAGAACCCCCCCCCTGATTC CTGTTGAAG
hcA8forward (Amplifizierung der schweren Kette für TOPO-TA Klonierung)	CTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGAAG TGCAAGGTGGTGAATCTGGGGGAGGCT
hcB1revers (Amplifizierung der schweren Kette für TOPO-TA Klonierung)	TGATGATGAGAACCCCCCCCCTTTACCA GGAGAG
BiP- forward (Amplifizierung von Maus-BiP Mutanten (BiPΔC118 und BiPΔC95) mit Sph1- Schnittstelle)	GATCGCATGCAGGAAGAAGAAGACAA GAAGGAG
reversBiP-560 (Amplifizierung der Maus-BiP Mutante (und BiPΔC95) mit BamH1- Schnittstelle)	GATCGGATCCTTAaTACGCTCTTTGAG CTTTTT
reversBiP-537 (Amplifizierung der Maus-BiP Mutanten (BiPΔC118) mit BamH1- Schnittstelle)	GATCATCCTTAATACCATTAACATCTAT CTCAAAAG

**Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotide**

### 2.2.3. Plasmide

pET21a- Grp94	Expressionsvektor (Amp) für Grp94 (Hund) ohne His-tag ohne N-terminale Signalsequenz (Diplomarbeit Rene Leubert, 2001, TU München)
pUJ4	Expressionsvektor (Amp) für Maus-BiP ohne N-terminale Signalsequenz mit C-terminal 6xHis-tag, pASK-Derivat (Knarr et al., 1999)
pSM21	Expressionsvektor (Amp) für CH3-Domäne von MAK33, pASK-Derivat (Mayer, 1993)

pGEX-3X-Cnx	Expressionsvektor (Amp) für humanes Calnexin ohne Membrananteil mit N-terminaler GST- Fusion (von D. Williams)
pGEX-4T ERp44	Expressionsvektor (Amp) für humanes ERp44 mit N-terminaler GST-Fusion (von R. Sitia)
pTOPO-LK	Expressionsvektor (Amp/ Kan) für die leichte Kette von MAK33 (diese Arbeit)
pTOPO-SK	Expressionvektor (Amp/ Kan) für die schwere Kette von MAK33 (diese Arbeit)

#### 2.2.4. TOPO TA Cloning®

Beim TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) handelt es sich um ein Klonierungssystem, mit dem man in kurzer Zeit PCR- Konstrukte ohne vorhergehende Restriktion in ein linearisiertes Plasmid inseriert. Voraussetzung für diese Klonierungsstrategie ist ein überhängendes Adonesin im PCR- Produkt, das mittels Topoisomerase in den pCR 2.1.-Topo ligiert werden kann.

Dieses System wurde verwendet um die für die RTS Reaktion hergestellten PCR-Produkte in ein zirkuläres Expressionssystem zu ligieren. Die Klonierung im Einzelnen wurde entsprechend der Herstellerbroschüre durchgeführt.

#### 2.2.5. Medien

Folgende Medien wurden für die Anzucht von Bakterien verwendet.

LB <sub>0</sub> :	Bacto Pepton 10 g
	Hefe Extrakt 5 g
	Natriumchlorid 5 g
	H <sub>2</sub> O ad 1 L

Für Platten:	Bacto Agar zusätzlich 15 g
--------------	----------------------------

### 2.2.6. Antibiotika und Zusätze

	Endkonzentration	Lösungsmittel	Verwendung
Ampicillin	50 µg/mL	H <sub>2</sub> O	Antibiotikum
Chloramphenicol	25 µg/mL	96%	EtOH Antibiotikum
Kanamycin	25 µg/mL	H <sub>2</sub> O	Antibiotikum
IPTG	1 mM	H <sub>2</sub> O	Expressionsstart
Geldanamycin (GA)	siehe Ergebnisteil	DMSO	Hsp90 Inhibitor
Radicicol (RA)	siehe Ergebnisteil	DMSO	Hsp90 Inhibitor
5'-(N-Ethylcarbox- amidadenosin)	siehe Ergebnisteil	DMSO	Grp94 Inhibitor

### 2.2.7. Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden für 16 Stunden bei 37°C inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftabschluss aufbewahrt. Die Anzucht von *E. coli* Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte unter Zugabe entsprechender Antibiotika zur Selektion auf das jeweilige Plasmid. Volumina bis zu 10 ml wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> von eins etwa 8x10<sup>8</sup> Zellen/ml. Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 500 µl einer exponentiell wachsenden Kultur mit 500 µl 40%igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.8. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit einer frischen Vorkultur wurden 100 ml LB-Selektionsmedium angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert. Der Kultur wurden dann 2 ml einer 1 M MgCl<sub>2</sub> Lösung zugesetzt. 10 Minuten danach wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 4600 x g bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml Puffer (3 M Natriumacetat, 1 M CaCl<sub>2</sub>, 2,8 M MnCl<sub>2</sub>, pH 5,5) resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 1500 x g und 4°C wurde das Pellet in 4 ml Puffer (1 M Natriumacetat, 0,3 M CaCl<sub>2</sub>, 0,9 M

MnCl<sub>2</sub>, 87% Glyzerin, pH 5,5) resuspendiert. Die Zellen wurden in Form von 100 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.2.9. Transformation mit Plasmiden**

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen mit Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Hanahan durchgeführt (Hanahan, 1983). Diese Methode liefert eine Ausbeute von etwa 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> Transformanten pro µg Plasmid-DNA. Je 100 µl kompetenter Zellen wurden mit 0,5-1 µl Plasmid-DNA Lösung vermischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschritt bei 42°C wurden die Zellen wieder auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB<sub>0</sub> Medium versetzt. Dieser Ansatz wurde 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

## **2.3. Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1. Agarosegelelektrophorese von DNA**

Zur Trennung, Mengeabschätzung, Analyse und Reinigung wurden DNA- Fragmente elektrophoretisch auf Agarosegelen aufgetrennt (Sambrook and Russell, 2001).

Dazu wurden 1%ige Gele mit den Massen 8 x 11 cm hergestellt. Zu deren Herstellung wurde Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet als Laufpuffer wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 mA für ca. 15 - 30 min. Unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm konnte die DNA sichtbar gemacht werden. Dies ist möglich durch das an die DNA gebundene Ethidiumbromid, dessen Fluoreszenzemissionsspektrum bei Anregung durch UV-Licht in den sichtbaren Bereich verschoben wird. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems dokumentiert. Die Abschätzung von Menge und Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde anhand der 1 kb DNA- Ladder (PeQlab, Erlangen) vollzogen.

### **2.3.2. Isolierung und Reinigung von DNA**

#### *2.3.2.1. Isolierung von Plasmid- DNA aus E. coli*

Um größere Mengen reiner Plasmid-DNA zu erhalten, bzw. um positive Klone nach einer Transformation zu identifizieren, wurde mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) eine Plasmidpräparation aus 3 ml *E. coli* - ü.N. - Kulturen durchgeführt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, lediglich die Elution erfolgte abweichend von der Vorschrift des Herstellers mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### *2.3.2.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen*

Zur Reinigung von PCR- Produkten und um DNA- Fragmente bzw. aufgeschnittene Vektoren aus präperativen Gelen 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 Herstellerangaben aus dem Gelstück extrahiert.

### **2.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Zur exponentiellen Anreicherung definierter DNA- Fragmente dient die von Mullis & Faloona (Mullis & Faloona, 1987) entwickelte Polymerasekettenreaktion. Dabei wurde der zwischen zwei Primern liegende DNA- Abschnitt während sich wiederholenden Temperaturzyklen durch die Hifi- Polymerase der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) oder durch die Pwo- Polymerase der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) in Anwesenheit aller dNTPs exponentiell vermehrt. Die Hifi- Polymerase ist ein Gemisch aus der Pwo- Polymerase (*Pyrococcus woessii*) mit 3'-5'Exonukleaseaktivität und der Taq- Polymerase (*Thermus aquaticus*) und vereint die Geschwindigkeit der Taq- Polymerase und die Genauigkeit der Pwo- Polymerase.

Ein Standardreaktionsansatz von 100µl enthielt:

100 pmol	Primer
10-20 ng	<i>Template</i> -DNA
je 0,2 mM	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)
2,0 mM	MgCl <sub>2</sub>
2,5 U	Polymerase
10 µl	10x Reaktionspuffer
steriles bidestilliertes Wasser ad 100 µl	

Die Amplifikation der spezifischen DNA- Fragmente während einer PCR erfolgte als *hot start*- Reaktion (um unspezifische Reaktionen und Aktivitätsverluste zu vermeiden) unter folgenden Bedingungen:

<i>Hot Start</i> :	96 °C, 2 min, dann Zugabe der Polymerase
Denaturierung:	96 °C, 30 sec
Annealing:	60 °C, 45 sec
Synthese:	72 °C, 1 min 30 sec
Anzahl der Zyklen:	35

abschließend 10 min Inkubation bei 72 °C zur Vervollständigung der Reaktion

Das Ergebnis einer jeden PCR wurde durch Gelelektrophorese. Das entstandene Produkt wurde entweder mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kit* oder bei Verunreinigung mit unspezifischen Produkten mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* aus dem Gel gereinigt.

#### **2.3.4. Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen**

Durch Restriktionsendonukleasen ist möglich, DNA spezifisch zu schneiden. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 5 µl Plasmid- DNA (ca. 100- 500 ng) mit 2-3 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease verdaut. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet; für den Verdau mit zwei Enzymen wurde auf kompatible Puffer- und Temperaturbedingungen geachtet. Die Hydrolyse erfolgte für 60 min bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur (in der Regel 37 °C). Anschließend wurden die Ansätze auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.3.5. 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. Pro  $\mu\text{g}$  Vektor wurden 1/10 Volumen 10 x Phosphatasepuffer und 0,1 Einheiten alkalische Phosphatase zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut die gleiche Menge Phosphatase zugegeben und weiter 15 min bei 37 °C dephosphoryliert. Die probe wurde anschließend mittels *High Pure Plasmid Isolation Kit* gereinigt und direkt zur Ligation weiter verwendet.

### 2.3.6. Ligation

Mit Hilfe der DNA-Ligase können komplementäre Enden geschnittener DNA wieder kovalent miteinander verbunden werden. Die Ligationen wurden mit jeweils ca. 200 ng Plasmid und dem fünffachen Überschuss an DNA-Fragment unter Verwendung von 2- 3 U T4-Ligase im mitgelieferten Ligasepuffer des Herstellers durchgeführt. Das Volumen des Ansatzes variierte abhängig von der DNA- Menge zwischen 10 und 20  $\mu\text{l}$ . Die Ligation erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder für 3 h bei RT.

### 2.3.7. DNA Sequenzanalyse

Alle molekularbiologisch veränderten Vektoren und DNA-Fragmente wurden vor ihrer Weiterverwendung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firmen GeneArt (Regensburg, Deutschland) und GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland).

### 2.3.8. *In vitro* Transkription / Translation

#### 2.3.8.1. RTS 100 High Yield (HY) Kit

Zur Untersuchung der Expressionsfähigkeit der produzierten DNA- *Templates* wurde das von Roche Diagnostics (Mannheim) vertriebene RTS 100 Expressionssystem verwendet. Dieses System erlaubt es lineare DNA als Transkriptions-*Template* einzusetzen.

Durchführung (gemäß der Anleitung des Herstellers):

<i>E. coli</i> -Lysat:	Der Inhalt wird in 0,36 ml Rekonstitutionspuffer gelöst, und sanft geschüttelt.
Reaction Mix:	Der Inhalt wird in 0,3 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Amino Säure Mix:	Der Inhalt wird in 0,36 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Methionin Lösung:	Der Inhalt wird in 0,33 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.

Präparation der Arbeitslösungen:

12 µl	<i>E. coli</i> - Lysat
10 µl	Reaktions Mix
12 µl	Aminosäure Mix
1 µl	Methionin- Lösung
5 µl	Rekonstitutionspuffer
0,5 µg in 10µl H <sub>2</sub> O	DNA- Template

Dieser Ansatz wurde dann für eine Stunde bei 30 °C in einem Eppendorf- Thermomixer inkubiert. Die Ansätze wurden dann direkt für weitere Versuche verwendet.

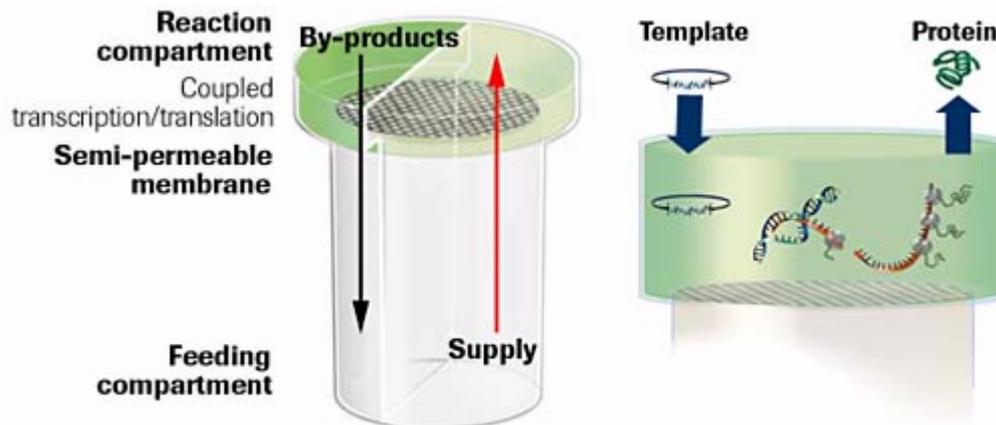
### 2.3.8.2. RTS 500 System

Zur Herstellung funktioneller Antikörperfragmente wurde das RTS 500- System der Firma Roche- Diagnostics (Mannheim) verwendet. Es handelt sich hier bei um ein Zweikammern-System, in dem eine gekoppelte Translation und Transkription stattfindet. Beide Kammern sind durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt. Die obere Kammer hat ein Volumen von 1 ml und bildet die Reaktionskammer. Die untere Kammer hat ein Volumen von 10 ml und bildet die sog. Feeding Kammer.

In der Reaktionskammer findet die eigentliche Proteinsynthese statt. Hier befinden sich das DNA- *Template*, Aminosäuren, dNTPs und der von der Firma als *E.coli*-Lysat mitgelieferte Proteinbiosyntheseapparat.

In der Feeding- Kammer befinden sich Nachschubprodukte wie Aminosäuren und dNTPs, sowie Energie, die im Laufe der Reaktionszeit an die Reaktionskammer nachgeführt werden. Von der Reaktionskammer werden durch die semipermeable Membran während des

Reaktionszeitraum Nebenprodukte, wie NDPs, NMPs, PPi, Pi, kleine degradierte Peptide und DNA-/ RNA- Fragmente, in die Feeding Kammer abgegeben. Das kontinuierliche Fließsystem wird dabei durch einen Magnetrührfisch in jeder Kammer, die sich im halbschwebenden Zustand befinden, aufrechterhalten (Abbildung 1)



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des RTS500**  
([http://www.roche-applied-science.com/rts/docs/2001\\_1\\_b101miltenburg.pdf](http://www.roche-applied-science.com/rts/docs/2001_1_b101miltenburg.pdf))

Durchführung (gemäß der Anleitung des Herstellers):

Das Kit enthält verschiedene Glasgefäße, die die einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes in lyophilisierter Form beinhalten.

<i>E. coli</i> -Lysat:	Der Inhalt wird in 0,525 ml Rekonstitutionspuffer gelöst, und sanft geschüttelt.
Reaction Mix:	Der Inhalt wird in 0,25 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Feeding Mix:	Der Inhalt wird in 8,1 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Amino Säure Mix:	Der Inhalt wird in 3 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Methionin Lösung:	Der Inhalt wird in 1,8 ml Rekonstitutionspuffer gelöst und geschüttelt.
Rekonstitutionspuffer:	Es handelt sich hierbei um eine <i>ready- to- use</i> Lösung

Präparation der Arbeitslösungen:

2,65 ml des Aminosäure Mix und 0,3 ml der Methionin Lösung wurden dem Feeding Mix zugegeben und vermischt.

Dem *E. coli*- Lysat wurden 0,225 ml des Reaction Mix, 0,27 ml des Aminosäure Mix und 30 µl der Methionin Lösung zugeführt. Anschließend wurden 10-15 µg des DNA- *Template* zugegeben und vorsichtig vermischt.

Die Feeding Kammer wurde nun mit dem Feedingmix bis zum Maximum befüllt, so dass keine Luftblasen in der Lösung waren. Ebenso wurde die Reaktionskammer vollständig mit dem Reaktionsmix befüllt.

Das Zweikammernsystem wurde anschließend in den Reaktionsblock gestellt, und bei einer Temperatur von 30 °C und 140 Upm wurde die Reaktion gestartet.

### **2.3.9. Aufnahme von Enzymkinetiken der RTS- Reaktion**

Während der Versuche mit dem RTS 500 System wurden diverse Expressionskinetiken durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden aus dem Totalansatz von 1 ml in gewissen Zeitabständen 100 µl für eine Aktivitätsmessung entnommen. Die Aktivität wurde mittels ELISA bestimmt. Die Messungen fanden nach 0, 2, 4, 7, 10, und 24 Stunden statt. Zu diesen Zeiten wurde jeweils eine Probe à 100 µl entnommen. Die Proben wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, und der Überstand wurde für den ELISA- Test eingesetzt, die relative OD<sub>405</sub> bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

## **2.4. Proteinchemische Methoden**

### **2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Mittels SDS-PAGE werden Proteine unter nicht-nativen (reduzierenden oder nichtreduzierenden) Bedingungen nach ihrer Masse aufgetrennt. Dabei lagert sich das anionische, amphipatische Reagenz SDS im Verhältnis 1: 1,4 pro Aminosäure an ein Protein und verleiht ihm damit eine stark negative Überschussladung, die sich proportional zum Protein verhält, wodurch die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wird. Zudem führt die Bindung mit SDS zu einer stäbchenförmigen Konformation des Proteins, wodurch der Einfluss der nativen Struktur des Proteins auf das Laufverhalten im elektrischen Feld aufgehoben wird. Die Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode, wobei deren

Laufverhalten allein von der Größe abhängig ist. Das Laufverhalten der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts (Cooper, 1981), wobei der Trennbereich über die Konzentration von Acrylamid/ Bisacrylamid im Gel beeinflusst werden kann. Die Proteinbanden im Gel können nach der Elektrophorese über verschiedene Färbemethoden visualisiert werden.

Für diese Arbeit wurden 12,5 %ige SDS- Polyacrylamidgele mit Trenn- und Sammelgele benutzt (modifizierte Methode nach(Fling & Gregerson, 1986).

Für ein Gel der Größe 10 x 8 x 0,075 cm wurden folgende Lösungen verwendet:

Trenngelpuffer (4x)	0,8 % SDS, 5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer (2x)	0,4 % SDS, 0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
Acrylamid (40 % w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid= 38:2

zum Polymerisationsstart:	10% APS (w/v)	60 µl/Gel
	TEMED	6 µl/Gel

10x Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, 2 M Glycin, 1 % SDS, pH 8,8
5x Auftragspuffer	10 % SDS (w/v), 50 % Glycerin (v/v), 300 mM Tris/HCl, pH 6,8, 0,05 % Bromphenolblau (w/v), 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Elektrophoresebedingungen:	1/2-1 h bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA/ Gel
----------------------------	---

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Analyseproben entweder mit 1 x oder 5 x Auftragspuffer aufgenommen. Um eine vollständige Denaturierung der Proteinproben zu erreichen, wurden diese vor dem Start der Gele 5 min bei 95 °C erhitzt (Laemmli, 1970). Um das Molekulargewicht der einzelnen Proben überprüfen zu können, wurde jedes Gel zusätzlich mit einem Molekulargewichtsstandard beladen.

### 2.4.2. Färbemethode für SDS-Gele nach Fairbanks

Das Nachweisminimum bei dieser Methode liegt bei ca. 50 bis 100 ng Protein. Die SDS- Gele werden hierbei mittels Lösung A gefärbt und kontinuierlich in den Lösungen B, C und D entfärbt. Durch kurzes Aufkochen der zu analysierenden Gele wurden die Inkubationszeiten von der Originalvorschrift (Fairbanks et al., 1971): 2 h Färben, je 1 h Entfärben) abweichend auf ca. 10 min pro Schritt verkürzt werden.

Lösungen:

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

### 2.4.3. Immunoblotting (Western Blot)

Durch die negative Ladung des gebundenen SDS an die Proteine können diese nach der Auftrennung durch SDS- Page auf eine PVDF- Membran im elektrischen Feld übertragen werden (Western Blot). Während des Transfers wird das SDS abgetrennt. Die so geblotteten Proteine können anschließend durch eine äußerst spezifische, sehr sensitive Immunreaktion detektiert werden (Towbin et al., 1979).

Lösungen:

- WB-Inkubationspuffer: 50 mM TrisHCl, pH 8,0, 105 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % (v/v) Methanol
- PBS-Puffer: 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 115 mM NaCl
- PBS-Tween-Puffer: PBS-Puffer + 0,1 % (v/v) Tween 20
- ECL+plus Western Blot Detection System Amersham Biotech (UK)

Jeder Blot wurde in einer Semi-Dry-Apparatur durchgeführt (Khyse-Anderson, 1984). Der Transfer dauerte bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 A/  $\text{cm}^2$  etwa 50 min. Zur

Abschätzung des Molekulargewichts der übertragenen Proteine wurde ein gefärbter Molekulargewichtsstandard (Novex) benutzt.

Der immunochemische Nachweis der jeweiligen Polypeptide erfolgte mit einem für das entsprechende Epitop spezifischen (primären) Antikörper. Mit der Ausnahme des POD-konjugierten Anti-His<sub>6</sub>- Antikörper, erfolgte der Nachweis anschließend über einen spezifischen, den primären Antikörper erkennenden sekundären Antikörper:

- Absättigen der Membran durch Schwenken in 5%iger Milchpulverlösung in PBS- Tween- Puffer für eine Stunde oder über Nacht
- 3 x Waschen mit PBS- Tween- Puffer für jeweils 10 min
- Inkubation mit dem POD- Konjugierten Antikörper (1:2000 in PBS- Tween- Puffer für eine Stunde
- 3 x Waschen mit PBS- Tween- Puffer für jeweils 10 min

Die Detektion erfolgte mit dem ECLplus- System (Amersham) nach Herstellerangaben (Lösung A 1 ml, Lösung B 25 µl, Inkubation für 5 min). Zwischen die Membran und den Röntgenfilm wurde eine Klarsichtfolie gelegt. Durch das Auflegen des Röntgenfilms (1 min bis 30 min) wurde die von der Peroxidase katalysierte Reaktion nachgewiesen.

#### **2.4.4. Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)**

Um die Aktivität der einzelnen Antikörperfragmente von MAK33, der gegen die menschliche Kreatinkinase gerichtet ist, und deren Kombinationen zu untersuchen, wurde eine modifizierte ELISA- Methode durchgeführt:

In Anwesenheit der zu untersuchenden Probe wurde biotinylierte Creatinkinase an mit Streptavidin beschichtete Reaktionsgefäße gekoppelt. Nicht gebundenes Material wurde anschließend ausgewaschen und das Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat wurde zugeführt. Schließlich erfolgte die Zugabe von ABTS, dem chromogenen Substrat für die Peroxidase (POD). Die gemessenen relativen Absorptionswerte wurden mit Hilfe deiner Eichkurve von nativem Fab (Verdünnungsreihe von 0 bis 200 ng/ ml in Konjugatpuffer) ausgewertet.

Jeweils 10 µl Probe bzw. Standard wurden in die mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl biotinylierter Creatinkinase- Lösung.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden die Gefäße 3 x mit je 100 µl bidestilliertem Wasser gespült und mit 100 µl Konjugat- Lösung für 30 min inkubiert.

Anschließend wurde 3 x gespült mit je 100 µl bidestilliertem Wasser, und dann 100 µl ABTS- Lösung zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei RT wurde die Extinktion bei 405 nm im Tecan GENios Luminometer gemessen.

Bei Messungen zur Bestimmung der Reaktionskinetiken wurde den RTS 500- Reaktionsgefäßen zu den jeweiligen Zeitpunkten 110 µl Reaktionslösung entnommen, und nach Zentrifugation (15000 g, 5 min) wurde der lösliche Anteil für den ELISA eingesetzt.

Erklärung zu der Darstellung der Auswertungen eines ELISA-Test:

Bei einem ELISA-Test wurde über die Eichung mittels nativem Fab-Fragment die Aktivität der Proben bestimmt. Dabei wird das Fab in verschiedenen Konzentrationen im ELISA eingesetzt: 10 ng/ ml, 25 ng/ ml, 60 ng/ ml, 100 ng/ ml, 150 ng/ ml und 200 ng/ ml.

Von den Proben aus den verschiedenen RTS Reaktionen, die gemessen wurden, wurden jeweils 10 µl unverdünnt im ELISA eingesetzt, d.h. dass die Messungen in diesem Fall in ng/ 10 µl angegeben werden. Daraus ergibt sich der Wert in ng/ml:

Aktivität (ng / ml) = gemessener Wert (ng/ 10 µl) x 100

#### **2.4.5. Analytische Gelfiltration**

Analytische Gelfiltrationsläufe wurden zur Analyse der Komplexbildung zwischen BiP /DnaK/ hHsp70/ Ssa1 und C<sub>H</sub>3-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 MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Die eluierten Proteine wurden durch Fluoreszenzemission bei 330 nm (Anregungswellenlänge = 280 nm) detektiert und mit der Borwin Chromatographie Software registriert.

#### **2.4.6 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.

#### **2.4.7. Reduktion und Alkylierung von C<sub>H3</sub>**

Für die Versuche zur Komplexbildung von BiP/ DnaK und C<sub>H3</sub> musste die C<sub>H3</sub> Domäne reduziert und alkyliert werden (Knarr *et al.*, 2002). Dazu wurden etwa 1 mg C<sub>H3</sub> 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 (IAA) und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das so erhaltene C<sub>H3</sub>-CAM gegen 3 l Dialysepuffer (40 mM Hepes, pH 7.0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 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.

#### **2.4.8. Radioaktiver ATPase Assay (Kronberg et al., 1978)**

Die Bestimmung der ATPase-Aktivität von BiP, anderen Mitgliedern der Hsp70- Familie sowie von Grp94 und Hsp82 wurde nach der Methode von (Kornberg et al., 1978) durchgeführt. Dabei wird die Hydrolyse von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>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.

### *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 MgCl<sub>2</sub> verdünnt (Endkonzentration 2 μM). Die ATPase-Reaktion wurde durch Zugabe eines Gemisches aus unmarkiertem und radioaktiv markiertem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP gestartet. Die ATP-Endkonzentration im Ansatz betrug 500 μM. Der Reaktionsansatz enthielt zwischen 0,1 und 1 μCi radioaktiv markiertem ATP. Während der Inkubationsphase bei 37 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots von 3 μl aus dem Reaktionsansatz entnommen, in denen die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von 3 μl einer 60 mM EDTA-Lösung gestoppt wurde. 4 μl dieses gestoppten Ansatzes wurden auf eine PEI-Cellulose Dünnschichtchromatographieplatte aufgetragen. Die Chromatographie wurde in 0,5 M LiCl und 2 N Ameisensäure für ca. 25 min durchgeführt. Dabei wurde radioaktiv markiertes Phosphat 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:

$$\mu\text{M ADP} = \frac{\text{counts ADP} * 500\mu\text{M}}{\text{counts ATP} + \text{counts P}_i}$$

### *Single turnover Messungen*

Zur Bestimmung der *single turnover* Hydrolyse-Rate von BiP und Grp94 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:  $y = a(1 - e^{-bx})$

## **2.4.9. Bestimmung der Proteinkonzentration**

### *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 ddH<sub>2</sub>O verdünnt). Nach

10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt und mit einer BSA-Eichkurve verglichen.

#### *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.

### **2.4.10. Immunopräzipitation**

Mit Hilfe der Immunopräzipitation wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen durch den Einsatz gereinigter Proteine direkt nachgewiesen. Es wurden jeweils 10 µg der gereinigten Proteine in 100 µL PBS-Puffer gegeben und bei unterschiedlichen Temperaturen für 30 min inkubiert. Anschließend wurde 10 µg monoklonaler Antikörper gegen eines der beiden Proteine (meist p53) zugesetzt und 1 h bei der entsprechenden Temperatur schwach geschüttelt. Zu jedem Ansatz wurden 30 µL Protein-A/G-Agarose gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 3000 x g für 1 min wurden die Komplexe sedimentiert, der Überstand abgezogen und das Sediment 3-5mal mit 500 µL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 30 µL 2x Lämmli-Auftragspuffer resuspendiert und durch SDS-PAGE oder Immunoblot analysiert.

### **2.4.11. ATPase-Aktivitätstest mit ATP-regenerierendem System**

Um Effekte zu vermeiden, die darauf beruhen, dass sich im Verlauf des ATPase-Assays größere Konzentrationen ADP bilden und damit Produktinhibition eintritt, wurden schließlich die meisten Daten mit einem Assay erzeugt, der ein ATP-regenerierendes System verwendet (Ali et al., 1993). Dazu wurde ein gekoppelter enzymatischer Assay benutzt, bei dem das entstehende ADP sofort unter Verwendung von Phosphoenolpyruvat und NADH, sowie der Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase wieder in ATP verwandelt wird. Die Abnahme der NADH-Konzentration lässt sich dabei spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 340nm verfolgen.

Folgender Prämix wurde hergestellt:

8500 µl

Puffer (inklusive MgCl<sub>2</sub>)

240 µl	100 mM Phosphoenolpyruvat
35 µl	50 mM NADH
12 µl	Pyruvatkinase-Suspension (Roche Diagnostics)
44 µl	Lactatdehydrogenase-Suspension (Roche Diagnostics)

Von diesem Prämix wurden 90 µl für jeden 120 µl Assay eingesetzt. Der Rest konnte für eine Variation der Proteinkonzentrationen verwendet werden. Die Assays wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 37 °C im Spektrometer inkubiert und nach Feststellung einer stabilen Baseline (etwa 10 Minuten) mit 2,4 µl einer 100 mM ATP-Lösung gestartet.

#### *Bestimmung der spezifischen Aktivität eines Proteins*

Um eine statistisch signifikante Aussage über die spezifische Aktivität des Proteins zu erhalten, wurden unterschiedliche Konzentrationen des Proteins im ATPregenerierenden ATPase-Assay eingesetzt. Die Auswertung der Steigung erfolgte unter Verwendung des differentiellen molaren Extinktionskoeffizienten von NADH und NAD<sup>+</sup> bei 340 nm von  $-6200 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ .

$$v_{\text{spez}} = \frac{m}{d \cdot \left(-6200 \frac{1}{\text{cm} \cdot \text{M}}\right) \cdot c_{\text{ATPase}}}$$

#### *Bestimmung von $K_M$ - und $k_{\text{cat}}$ -Werten*

$K_M$ -Werte für ATP wurden bestimmt, indem unter ansonsten identischen Bedingungen die Konzentration von ATP variiert wurde und die Veränderung der spezifischen Aktivität des Proteins beobachtet wurde. Die Berechnung der  $K_M$ -Werte ergab sich nach Michaelis-Menten aus folgender Formel.

$$v_{\text{spez}} = k_{\text{cat}} \cdot \frac{c}{c + K_M}$$

### **2.4.12. Citratsynthase Chaperonaktivitätstest**

Citratsynthase aus Schweineherz ist ein Enzym der mitochondrialen Matrix und liegt nativ als Homodimer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 48900 Da vor. Das Enzym katalysiert im Citratzyclus die Umwandlung von Oxalacetat, Acetyl-CoA und Wasser zu

Citrat und Coenzym A. Diese Reaktion stellt eine Aldolkondensation von Oxalacetat mit Acetyl-CoA zu Citryl-CoA dar, der sich die Hydrolyse von Citryl-CoA zu Citrat und CoA-SH anschließt.



Die freien SH-Gruppen am Coenzym A, die bei dieser Reaktion entstehen, werden im Aktivitätstest mit DTNB, einem Thiolnachweisreagenz, nachgewiesen. Die durch die Thiobenzole entstehende Gelbfärbung wird im Photometer bei 412 nm gemessen. Im Aktivitätstest wurde die thermische Inaktivierung der Citratsynthase sowie der Einfluß von p23 auf diese untersucht (Buchner et al., 1998). Die Citratsynthase (15 µM Stammlösung bezogen auf das Monomer) wurde 1:100 im Testansatz verdünnt und bei 43°C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde das zu untersuchende Protein in unterschiedlichen Konzentrationen beigegeben. Je 20 µl wurden zu definierten Zeitpunkten entnommen und sofort in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Inaktivierungskinetiken wurden in 40 mM Hepes/KOH, pH 7,5 durchgeführt. Folgende Reagenzien wurden für den Test in Halbmikroplastikküvetten vorgelegt und auf 25°C temperiert:

0,93 ml	50 mM TE-Puffer pH 8,0
0,01 ml	10 mM DTNB (in TE-Puffer pH 8,0)
0,01 ml	10 mM Oxalacetat (in 50 mM Tris)
0,03 ml	5 mM Acetyl-CoA (in TE-Puffer, pH 8,0)

Die spezifische Aktivität der Citratsynthase konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{spez. Akt.} = \Delta E / \text{min} \times V / (\epsilon \times d \times v \times c)$$

V = Testvolumen [ml]

ε = molarer Extinktionskoeffizient [= 13600 1/M x cm]

d = Schichtdicke [cm]

v = Probenvolumen [ml]

c = Konzentration des Enzyms [mg/ml]

Zur Interpretation der Werte wurde die Aktivität der nativen Citratsynthase zum Zeitpunkt Null gleich 100 % gesetzt.

#### *Citratsynthase-Aggregationstest*

Mitochondriale Citratsynthase eignet sich auch als Modells substrat für Aggregationsmessungen, da dieses Protein bereits bei 43°C unter Aggregatausbildung

irreversibel denaturiert. Diese Aggregatbildung kann photometrisch oder spektrofluorometrisch bestimmt werden, da sie zu vermehrter Lichtstreuung der Proteinlösung führt (Jakob et al., 1995; Buchner et al., 1998) Zur Messung im Spektrofluorometer wurde eine Stammlösung mitochondrialer Citratsynthase (30  $\mu\text{M}$  in TE-Puffer bezogen auf das Monomer) 1:200 in den 1,5 ml Inkubationsansatz (40 mM Hepes/KOH, pH 7,5) verdünnt. Die Aggregation der Citratsynthase bei 43°C wurde in thermostatisierbaren Küvettenhaltern bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 500 nm (Spaltbreite 2 nm) kontinuierlich über einen Zeitraum von 30 min verfolgt. p23 wurde in unterschiedlichen Konzentrationen im Inkubationsansatz vorgelegt. Die Messung von Citratsynthaseaggregation im Absorptionsspektrophotometer wurde nach einem leicht modifizierten Protokoll durchgeführt. Demnach wurde der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 120  $\mu\text{l}$  reduziert und die CS-Konzentration in der Küvette auf 4  $\mu\text{M}$  abgeändert. Die von der aggregierenden CS ausgelöste Lichtstreuung wurde bei 360 nm im Photometer verfolgt.

#### **2.4.13. Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation**

Analytische Gleichgewichts-Ultrazentrifugation eignet sich zur exakten Bestimmung von Molekulargewichten unter nativen Bedingungen, da bei dieser Methode die Form der Proteine und deren hydrodynamischer Radius keine Rolle spielen (Laue & Stafford, III, 1999). Zur Messung wurden 150  $\mu\text{l}$  einer Proteinlösung mit einer Konzentration von etwa 0,2 mg/ml in einer Ultrazentrifugations-Messzelle eingeschlossen. Als Referenz dienten 200  $\mu\text{l}$  des zugehörigen Puffers. Die Proteinprobe und die Referenz wurden in einer Beckman *XL-I analytical ultracentrifuge* rotiert. Die Geschwindigkeit wurde dem zu erwartenden Molekulargewicht angepasst. Während des Laufes sedimentiert das Protein zum Zellenboden, wird jedoch aufgrund der relativ geringen Geschwindigkeit nicht vollständig pelletiert. Es stellt sich ein Konzentrationsgradient ein, der durch das entgegengesetzte Wirken von Sedimentation und Diffusion gebildet wird. Die Detektion des Gradienten erfolgt über ein integriertes UV-Spektrometer und eine Interferenzoptik. Die Zentrifugation erfolgte solange, bis über 12 Stunden keine Veränderung des Konzentrationsgradienten in der Messzelle mehr stattfand. Die Analyse des Konzentrationsgradienten liefert das exakte Molekulargewicht unter der Voraussetzung, dass nur eine Spezies in der Messzelle vorliegt. Um proteolytische Prozesse während der Laufzeit auszuschließen, wurde die Probe vor und nach dem Lauf durch analytische Gelfiltration analysiert. Zur Auswertung des UZ-Laufes wurde das mitgelieferte Softwarepaket zu Origin verwendet, das im Wesentlichen auf folgender Formel beruht.

$$c = c_0 \cdot e^{\frac{\omega^2}{2 \cdot R \cdot T} \cdot (1 - \bar{v} \cdot \rho) \cdot \frac{M}{1000000} \cdot (r^2 - r_0^2)} + \text{Baseline}$$

Näherungsweise wurde für die Dichte der Lösung  $\rho = 1,01$  g/ml angenommen und für das spezifische Volumen des Proteins ein aus den Aminosäuren errechneter Wert. Dieser lag zumeist in der Größenordnung von 0,73 ml/g.

## 2.5. Proteinbiochemische und analytische Methoden

### 2.5.1. Verwendete Puffer

Aufschlusspuffer:

Für BiP und BiP- Mutanten:

Puffer A (pH 7,5):	20 mM Imidazol
	100 mM NaCl
	40 mM Hepes/ NaOH

Für Grp94, ERp44

Puffer 1 (pH 8.0)	300 mM NaCl
	5 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM Hepes/ NaOH

Für Cnx/ CRT

Puffer (I) (pH 8.0)	150 mM NaCl
	5 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM Hepes

HPLC- Probenpuffer

HKM-Puffer (pH 7,5)	150 mM KCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>
	40 mM Hepes/ KOH

HPLC- Laufpuffer

HNM- Puffer (pH 7,5)	150 mM NaCl
----------------------	-------------

5 mM MgCl<sub>2</sub>

40 mM Hepes/ NaOH

### 2.5.2. Aufnahme von Expressionskinetiken

Die Aufnahme von Expressionskinetiken ist im Vorfeld einer Proteinreinigung sinnvoll, um durch Optimierung der Kulturbedingungen möglichst große Ausbeuten zu erzielen.

Hierzu wurden 200 ml LB<sub>0</sub> Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer in der stationären Phase befindlichen Über-Nacht-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,05 eingestellt. Die Kulturen wurden anschließend bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Als weitere Parameter wurden Zeitpunkt und Menge der IPTG- Zugabe variiert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden nun Proben genommen und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Zur Analyse mittels SDS- PAGE wurde das Pellet von 1 ml Bakterienkultur mit 10 µl 1x Auftragspuffer (vgl. 2.4.1.) je OD<sub>600</sub>= 0,1 aufgenommen. So konnte bei konstanter Zellmenge die eventuell auftretende Steigerung der Menge des rekombinant exprimierten Proteins und dessen Sättigung vergleichend eingeschätzt werden.

### 2.5.3. 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 OD<sub>600</sub> 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<sub>H3</sub>-Fragments wurde das Medium zum Zeitpunkt der Induktion zusätzlich mit 4,5 g GSSG pro 2 l Anzuchtkultur versetzt.

### 2.5.4. Zellernte und Zellaufschluss von Bakterienzellen

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

#### 2.5.4.1 *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.

#### 2.5.4.2 *Periplasmaaufschluss*

Da der Expressionsvektor für MAK33 C<sub>H3</sub> eine periplasmatische Signalsequenz enthält, wird C<sub>H3</sub> 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 B 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<sub>H3</sub> 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.

### 2.5.5. **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<sub>H</sub>3 (Mayer, 1998) wurden bereits früher eingehend beschrieben.

#### 2.5.5.1. Ammoniumsulfatfällung

Bei der Ammoniumsulfatfällung werden Proteine ausgesalzen. Das Fällungsreagenz interagiert dabei mit dem Protein und verändert so die Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (Lottspeich und Zorbas, 1998). Für die Reinigung von Grp94 wurde die Konzentration des Ammoniumsulfat auf 60% eingestellt. Es wurde eine 4 M NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung als 100 %ige Lösung definiert. Für die Fällung wurde der Proteinrohextrakt aus dem Zellaufschluss verwendet.

Unter ständigem Rühren auf Eis wurde Ammoniumsulfat in kristalliner Form schrittweise bis zu einer Endkonzentration von 60% zugegeben. Die Lösung wurde im Anschluss an eine einstündige Inkubation bei 4500 Upm für 40 Minuten zentrifugiert. Sowohl Überstand als auch das resuspendierte Pellet gingen in die Dialyse (Puffer 1) ein.

#### 2.5.5.2. Ni-NTA Affinitätschromatographie

Dieser Reinigungsschritt basiert auf der Komplexierung des *His<sub>6</sub>-Tags* an die Ni (2+) Ionen des Säulenmatrix, indem das Zielprotein selektiv aus einer „Vielkomponentenlösung“ an der stationären Phase immobilisiert wird. Andere Proteine werden ausgewaschen. Durch anschließende Erhöhung der Imidazolkonzentration wird das Zielprotein aus der Bindung mit dem Nickel verdrängt, und kann so eluiert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die hier angewendete Ni-NTA- Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur angewendet.

#### 2.5.5.3. GSH-Sepharose- Affinitätschromatographie

Dieser Reinigungsschritt basiert auf einer Komplexierung des *GST-Tags* an die GSH-Sepharose Säulenmatrix, indem das Zielprotein selektiv aus einer „Vielkomponentenlösung“ an der stationären Phase immobilisiert wird. Andere Proteine werden ausgewaschen. Durch anschließende Zugabe von GSH im Überschuß wird das Zielprotein aus der Bindung mit der Säulenmatrix verdrängt, un kann so eluiert werden (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die hier angewendete GSH -Sepharose- Affinitätschromatographie wurde bei Raumtemperatur angewendet.

### 2.5.5.3. Ionenaustauscher

Bei der Ionenaustauschchromatographie beruht das Trennprinzip auf der Anziehung unterschiedlich geladener Teilchen. 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. Die Stärke der Bindung wird dabei durch das Coulombsche Gesetz beschrieben. Das Protein konkuriert dabei mit Salzionen um die Bindung. Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration wird das gebundene Protein von der stationären Phase eluiert (Lottspeich und Zorbas, 1998). Hier angewendete Anionenaustauscher wurden bei 4°C angewendet.

### *Q- Sepharose*

Die Q-Sepharose ist ein starker Anionenaustauscher. Durch Erhöhung der Salzkonzentration von 20 mM auf 1 M wird das an die Säule gebundene Protein eluiert (im 20-fachen Säulenvolumen). Die Flussrate betrug 3ml /min.

### *Resource Q*

Die Resource Q ist ebenfalls ein Anionenaustauscher, der sich durch eine sehr gute Trennschärfe auszeichnet. Die Salzkonzentration wurde in einem 20-fachen Säulenvolumen bei einer Flussrate von 5ml/ min von 20 mM auf 1 M linear erhöht.

### 2.5.5.4. Gelfiltrationschromatographie

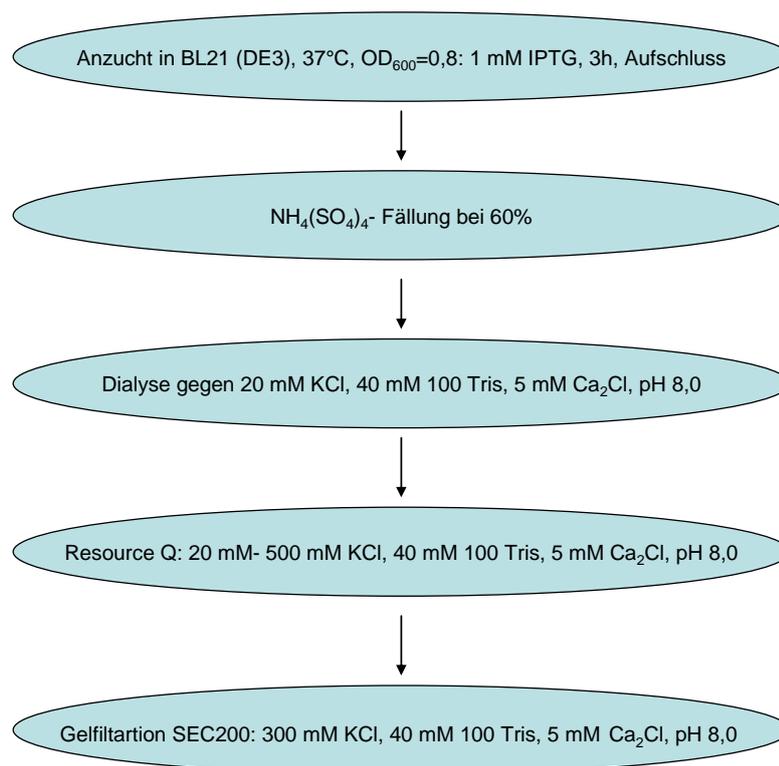
Bei der Gelfiltrationschromatographie erfolgt die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Größe bzw. des hydrodynamischen Radius. Die Matrix der verwendeten Säulen besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk mit definierter Porengröße. Kleine Moleküle können in die Poren der Matrixkügelchen eindringen 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. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/ min bei 4°C.

### 2.5.5.5. Aufkonzentration und Dialyse

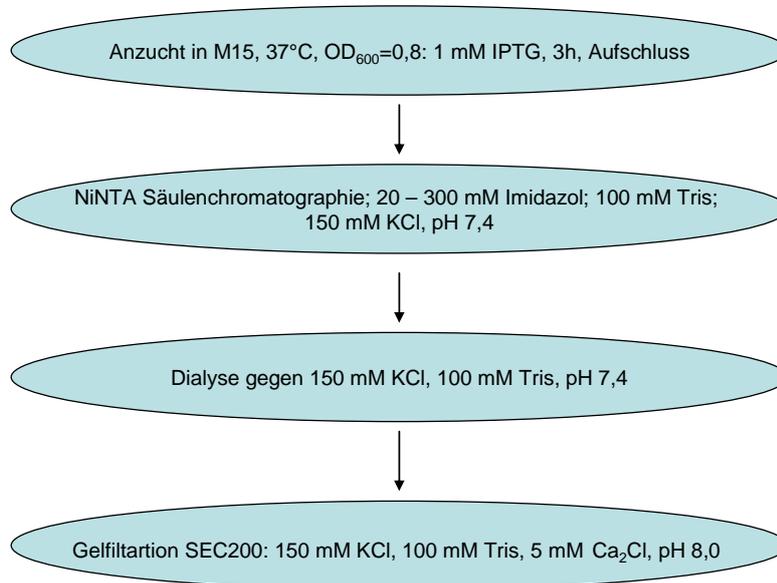
Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurde das Prinzip der Ultrafiltration verwendet. Dabei wird die Lösung entweder durch Zentrifugation (Centricon) oder durch Druck (Amicon) gegen eine Membran gedrückt, welche ein bestimmtes Ausschlussvolumen besitzt. Dadurch kann die Pufferlösung die Membran 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). Dabei wurden verschieden System der Firma Amicon verwendet. Alle Schritte wurden dabei bei 4°C durchgeführt.

## 2.5.7. Reinigungsschemata der in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine

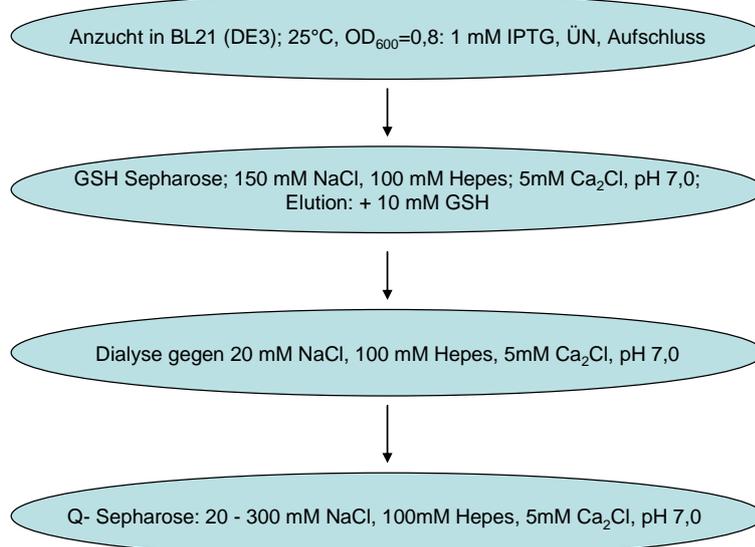
### 2.5.7.1. Grp94 aus Hund



### 2.5.7.2. BiP aus Maus

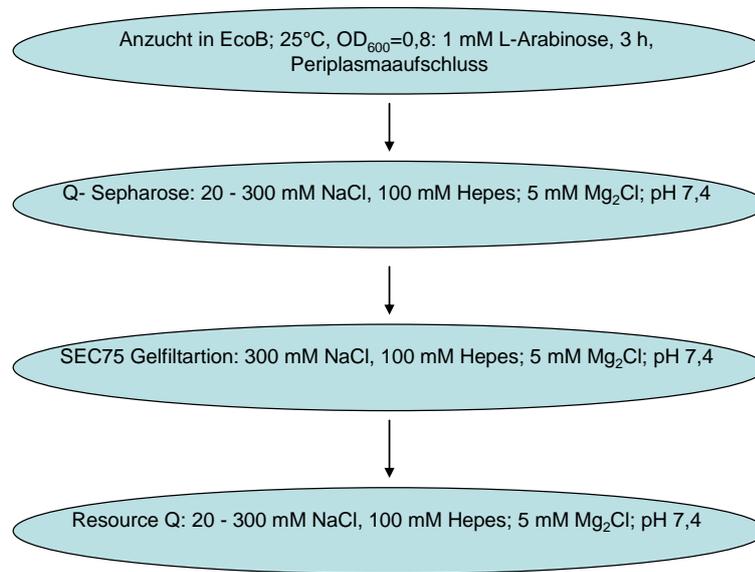


### 2.5.7.3. Calnexin und ERp44 aus Mensch,



Im Gegensatz zur Cnx-Reinigung wurde ERp44 in Gegenwart von KCl gereinigt, der pH-Wert lag bei 7,6

#### 2.5.7.4. $C_H3$ von MAK33 aus Maus



## 2.6. Spektroskopische Methoden

### 2.6.1. UV-Vis-Spektroskopie

Bei der UV-Vis-Spektroskopie wird die Absorption sowohl durch Seitenketten von Aminosäuren und prosthetischen Gruppen als auch durch die Peptidbindung selbst verursacht. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin absorbieren besonders im Bereich von 230 bis 300 nm sehr intensiv, wobei Tryptophan und Tyrosin den weitaus größten Beitrag liefern. Das Absorptionsmaximum von Tryptophan liegt bei 280 nm, während Tyrosin bei 274 nm maximal absorbiert (Schmid & Chambers, 1989). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden UV-Vis-Spektren im Wellenbereich von 240 nm bis 350 nm aufgenommen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnte durch das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration ermittelt werden:

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

A: Absorption bei 280 nm

$\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient  $\varepsilon_{280 \text{ nm}, 0,1 \%}$  ( $\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ )

c: Proteinkonzentration (M)

d: Schichtdicke der Küvette (cm)

M: Molekulargewicht [g/mol]

$c_M$ : Proteinkonzentration [g/l]

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

Die hierzu für die jeweiligen Proteine benutzten Extinktionskoeffizienten für eine 1 mg/ml Lösung in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm bei 280 nm sind der folgenden Tabelle aufgeführt.

Protein	Extinktionskoeffizient
Grp94	$A_{280 \text{ nm}; 0,1 \% 1 \text{ cm}} = 0,888$
BiP	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 0,395$
Calnexin	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 1,738$
MAK33 C <sub>H3</sub>	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 1,950$
MAK33 C <sub>H3</sub> -CAM	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 1,930$
MAK33 IgG	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 1,310$
MAK33 Fab	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 1,678$
DsbC	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 0,621$
ERp57	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 0,838$
LyTOR	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = 0,923$
smERp1	$A_{280 \text{ nm}, 0,1 \% , 1 \text{ cm}} = \text{nicht bekannt}$

**Tabelle 5: Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine**

### 2.6.2. Fluoreszenzspektroskopie

Bei Proteinen verursachen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan aufgrund ihres delokalisierten  $\pi$ -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 eingestrahelten Lichtquanten am stärksten absorbieren und andererseits durch einen Energietransfer von Tyrosin- auf Tryptophanreste zusätzlich angeregt werden können (Schmid et al., 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 gequencht. Wodurch in diesem Fall bei vollständiger Reduktion und Denaturierung eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann. Alle Fluoreszenzmessungen wurden am FluoroMax 2 durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden zuvor filtriert (Porenweite 0,2  $\mu\text{m}$ ) 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.

### 2.6.3. 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 eingestrahlteten Lichtes unterscheidet man im Circular dichroismus zwischen Nah-UV- und Fern-UV-Bereich (Cantor und 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  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter, ein charakteristisches Spektrum. So erzeugen  $\alpha$ -Helices ein Doppelminimum mit hoher Intensität bei 208 und 222 nm, während  $\beta$ -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  $\Theta$  (in Grad), bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren, angegeben (Schmid, 1992).

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

$\Theta_{MRW}$ : Elliptizität der Aminosäure [Grad\*cm<sup>2</sup>\*dmol<sup>-1</sup>]

$\Theta$ : gemessene Elliptizität [Grad]

MRW: mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren

c: Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

M<sub>R</sub>: Molekulargewicht [g/mol]

N<sub>A</sub>: Anzahl der Aminosäuren des Proteins

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Synthese eines funktionellen MAK33 IgG- Moleküls in einem zellfreien Transkriptions-/ Translationssystem

Die prokaryotische Expression rekombinanter, insbesondere disulfidverbrückter Proteine, wie Antikörper, stellt Wissenschaftler vor zum Teil große Probleme, da das reduzierende Milieu des Cytosols von *E. coli* Polypeptide aggregieren lässt. Bis heute gelang es nicht eindeutig, vollständige Ig- Moleküle rückzufalten oder in *E. coli* zu synthetisieren (Cabilly, 1989). Daher wurde in diesem Teil der Arbeit die zellfreie Synthese des IgG MAK33 in einem auf *E. coli* basierendem *in vitro* Transskriptions-/Translationssystem untersucht. MAK33 ist ein Antikörper aus *Mus musculus*, der sich spezifisch gegen menschliche Kreatinkinase richtet. Er findet seine Anwendung in der Analytik und ist zudem ein gut untersuchtes Modell für Antikörper.

Für die folgenden Experimente standen das RTS100 HY, ein *Batch*-System, durch das schnelle Analysen im 50 µl Maßstab möglich sind, sowie das RTS500 HY, ein kontinuierliches System, durch das lange Expressionszeiten von bis zu 24 Stunden für größere Produktmengen ermöglicht werden, zur Verfügung. Dadurch sollten Einblicke in die Faltungswege und Synthesemöglichkeiten von Antikörpern in einem handhabbaren Modellsystem gewonnen werden.

##### 3.1.1. Herstellung linearer Expressionskonstrukte für die Expression im RTS100 HY

Zunächst sollten in einer *2-Stufen PCR* exprimierbare lineare DNA-Konstrukte der leichten (LK) und der schweren Kette (SK) von MAK33 hergestellt werden. Diese Konstrukte konnten im Anschluss im RTS100 HY auf Exprimierbarkeit untersucht werden.

Für LK diente das Plasmid pIVEX 2.1 (ohne MCS) und für SK das Plasmid p12016 (beide Roche Diagnostics Mannheim), die bereits in Vorarbeiten hergestellt wurden, als Template-DNA (Frey, 2001). Beide PCRs wurden unter Standardbedingungen durchgeführt, die sich nach den Vorgaben des Herstellers richteten (vgl. 2.1.2.)

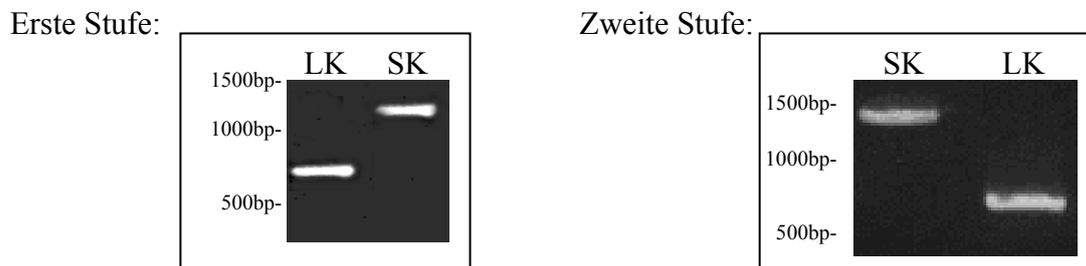
Im ersten Schritt der *2-Stufen PCR* wurde die DNA des jeweiligen Antikörperfragments mit der für die Sequenz spezifischen (vgl. 2.2.2.) Primern amplifiziert. Sowohl Vorwärts- als auch Rückwärtsprimer trugen eine vom Hersteller vorgeschlagene und bezüglich Sekundärstrukturunterdrückung optimierte Überlappungsregion für die folgende zweite

Amplifikation (www.proteinexpression.com), in der das Rapid Translation RTS *E. coli* Linear Template Generation Set, His-tag (2.1.2.) zum Einsatz kommen sollte. Die Primer für den ersten Schritt der *2-Stufen PCR* wurden mit Hilfe des Computerprogramms DNASTar (DNASTAR, Madison, USA) entworfen. Das Programm half Sekundärstrukturbildungen während zellfreien Expression vorherzusagen und zu vermeiden.

In der zweiten PCR wurden an diese Konstrukte ein N-terminaler HisTag, ein T7-Promotor und ein T7-Terminator angefügt. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die zellfreie Synthese von Antikörperkonstrukten mit C-terminalen His-tag zu keiner Aktivität führte.

Mit Hilfe dieser *2-Stufen PCR* sollten sowohl die Antikörperkonstrukte von LK und SK von MAK33 für erste Expressionsanalysen im RTS100 HY als lineare Expressionkonstrukte hergestellt werden, als auch später ein zirkuläres Expressionssystem um die Expression im RTS500 HY zu ermöglichen.

Die Qualität der einzelnen Konstrukte wurde mittels 1%iger Agarosegelelektrophorese im Anschluss an jede PCR- Stufe überprüft. Die Konstrukte sollten eine Bande bei ~700 bp für LK und ein Bande bei ~1450 bp für SK ergeben. Dies wurde DNA- Größenstandard (1 kB Plus Leiter, peqLab, Mannheim) überprüft.



**Abbildung 12: Ergebnis der Amplifikationen des LK- und SK- Konstrukts während der 2-Stufen PCR**

In der ersten PCR wurden LK und SK amplifiziert, in der zweiten PCR wurden N-terminaler His-tag, Promotor und Terminator angefügt. Für die Gelelektrophorese wurden je 10  $\mu$ l eines PCR- Ansatzes für ein 1%iges-Agarosegel bei der Gelelektrophorese eingesetzt wurden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung (Abbildung 12) zeigt, dass die Antikörperkonstrukte durch die *2-Stufen PCR* generiert und für die Versuche im RTS 100 eingesetzt werden konnten. Somit standen nun nach Abschluss dieser Experimente die Antikörperkonstrukte von LK und SK mit der vollständigen genetischen Information sowie den regulativen Elementen (Promotor und Terminator) zur Verfügung, die für die Expression im RTS notwendig waren (Abbildung 13).



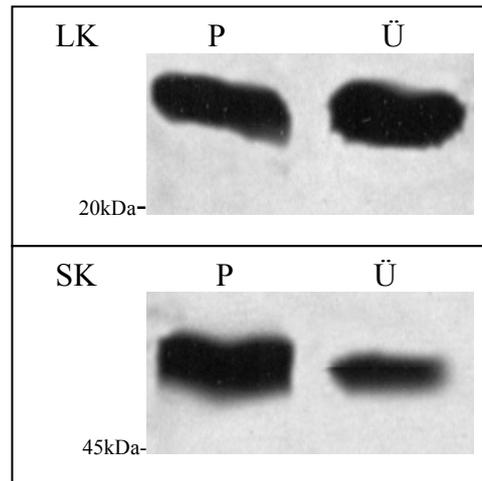
**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte von LK und SK.**

Durch Verwendung des Rapid Translation RTS *E. coli* Linear Template Generation Set, His-tag konnten mittels 2-Stufen PCR Expressionskassetten für weitere Analysen dieser Dr.-Arbeit synthetisiert werden.

### 3.1.2. Expressionsanalyse im RTS100 HY

Das RTS100 HY dient Expressionsanalysen von linearen und zirkulären Expressionskonstrukten. Für die Analyse der Konstrukte, die im Rahmen der 2-Stufen-PCR hergestellt wurden, wurde dieses System verwendet, um die Exprimierbarkeit der Antikörperkonstrukte zu testen. Dazu wurden 10 µg in 5 µl H<sub>2</sub>O des jeweiligen Templates von LK und SK für zwei unabhängige RTS100 HY (50 µl) Reaktionen bei 30°C für 60 Minuten eingesetzt.

Nach der durchgeführten RTS100 HY Reaktion wurden 30 µl des Ansatzes mittels Zentrifugation (13.000 g, 10 min) in Überstand und Pellet getrennt. 5 µl der Fraktionen wurden in gleichen Verhältnissen auf einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetragen, um beurteilen zu können, in welcher Form (löslich oder unlöslich) die Antikörperfragmente exprimiert wurden. Der spezifische Nachweis der Expression der Antikörperketten erfolgte mittels His-tag spezifischen Antikörper (Anti-His<sub>6</sub>-POD, Roche; Verdünnung 1:2000) in einem Westernblotexperiment. Für LK war ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa, und für SK von ca. 50 kDa berechnet worden, das mittels RotiMark (Roth, Karlsruhe) überprüft wurde.



**Abbildung 14: Analyse von LK und SK mittels Westernblot nach Expression im RTS100 HY**

P: Pellet (unlöslicher Anteil der Reaktion); Ü: Überstand (löslicher Anteil der Reaktion). Für den Nachweis wurden je 30µl Probe eines RTS 100 HY 10 Minuten (13.000 Upm, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde in 6µl 5x Lämmli aufgenommen, das Pellet mit 30µl 1x Lämmli versetzt. Je Probe wurden 5µl auf eine SDS-Page für den anschließenden Westernblot eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels monoklonalem Anti-His<sub>6</sub> POD-Konjugat.

Die Expression der beiden Antikörperkonstrukte im RTS100 HY konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 14). Diese Nachweismethode war notwendig, weil die Expressionsmenge so gering war, dass auf einem Coomassie- gefärbten SDS-Gel keine Banden mit den entsprechenden Molekülmassen zu sehen waren (Daten nicht gezeigt). Festzuhalten bleibt, dass SK zu größeren Teilen im Pellet der Reaktion zu finden war, während LK zu gleichen Teilen in Pellet und Überstand anzutreffen war.

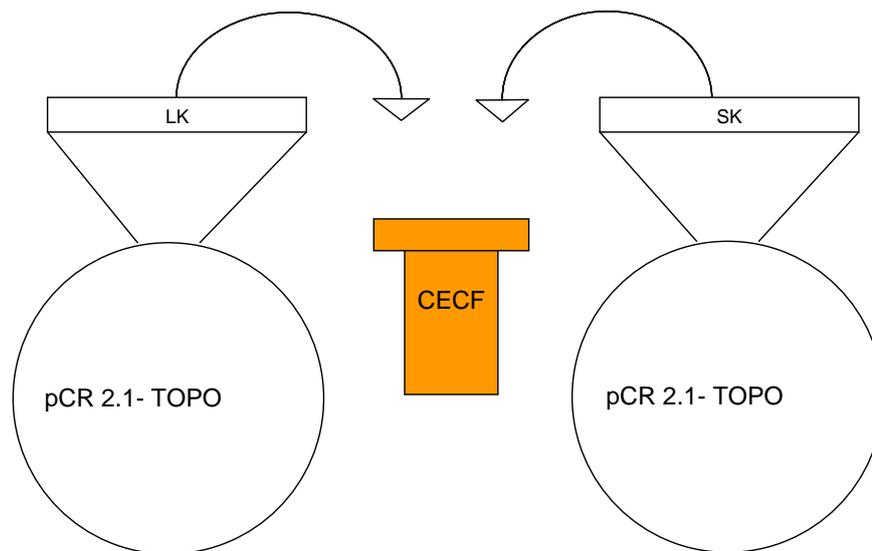
### 3.1.3. Synthese von Antikörpermolekülen im CECF- System

Für die Untersuchung von Aktivität und Struktur der Antikörperfragmente wurden die linearen Konstrukte von LK und SK in ein zirkuläres Expressionssystem kloniert. Die Herstellung eines zirkulären DNA-Konstruktes vereinfacht die Arbeit im RTS erheblich, da die Regenerierung der Konstrukte erleichtert und die Kosten gesenkt werden können.

Als Expressionssystem stand das Topo TA Cloning System (Invitrogen, Karlsruhe) zur Verfügung. Im Kurzen lässt sich das System wie folgt beschreiben: In diesen vom Hersteller linearisiert gelieferten Vektor (pCR 2.1-Topo) lassen sich DNA-Konstrukte klonieren, die am 3'- Ende durch Amplifizierung mit der HiFi-Polymerase (Roche, Mannheim) während der PCR ein überhängendes Adenin tragen. Der Vektor trägt am 5'-Ende ein überhängendes Thymin. In einer Ligationsreaktion, katalysiert durch eine im System beinhalteten

Topoisomerase, kann innerhalb kurzer Zeit ein zirkuläres Plasmid generiert werden, das das Zielgen, in diesem Fall die genetische Information für SK und LK, beinhaltet.

Die so generierten Plasmide konnten anschließend im RTS eingesetzt werden. In diesem Fall wurde die genetische Information für LK und SK auf je ein Plasmid übertragen. Dadurch konnte die Expression der beiden Antikörperfragmente unabhängig voneinander untersucht werden.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der zirkulären Topo- Antikörperkonstrukte, die für die RTS-Applikationen eingesetzt wurden.**

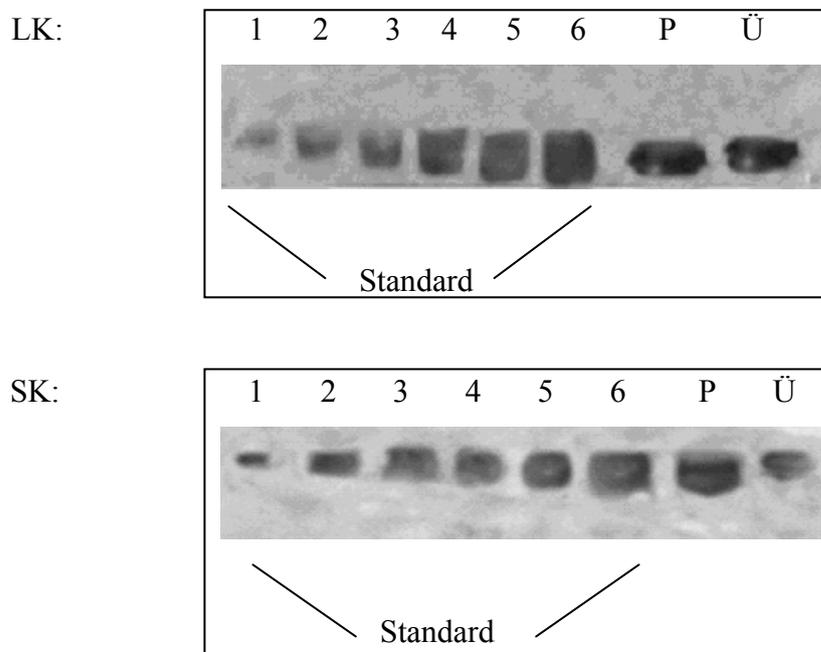
Die in der 2-Stufen PCR generierten DNA- Templates von LK und SK wurden mittels Topo TA Cloning in Plasmidform gebracht und konnten dann in das RTS- CECF eingesetzt werden.

Die Insertion der Konstrukte in das Vektorsystem wurde nach Klonierung, anschließender Transformation der Vektoren in vom Hersteller mitgelieferten kompetenten Zellen, Zellvermehrung und Plasmidisolierung in einer PCR überprüft. Dafür wurden die Primer der ersten PCR- Stufe der 2-Stufen PCR verwendet. Das Ergebnis war positiv. Des Weiteren wurden die Vektoren auf Richtigkeit mittels Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

#### *Expressionstest der zirkulären Expressionskonstrukte*

Die zirkulären Expressionkonstrukte wurden nun auf ihre Expressionstauglichkeit im RTS500 HY untersucht. Daher wurden 10 µg des Plasmids von LK und SK im RTS500 HY bei 30° für 24 Stunden eingesetzt. Nach dem Ende der Reaktion wurde die Reaktionslösung bei 13.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. 10 µl des Pellets bzw. des Überstand wurden in gleichen Verhältnissen auf einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetragen und anschließend mittels Westernblot spezifisch auf die Expression der Antikörperfragmente untersucht. Um Information über die Expressionsmengen von LK und SK im RTS500 HY zu erhalten,

wurden sie mit einer Konzentrationsreihe von in Hybridomazellkultur produziertem nativen MAK33 IgG (Roche Diagnostics, Mannheim) als Standard verglichen. Dieser Standard wurde in den gleichen Konzentrationen wie bei den später folgenden ELISA- Experimenten eingesetzt (vgl. 2.4.4.)



**Abbildung 16: Westernblot nach Expression der Antikörperfragmente im RTS500 HY**

1-6 MAK33 Standard; 10 ng, 25 ng, 60 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng/ml; LK: Leichte Kette; SK: Schwere Kette; P) Pellet, Ü) Überstand. Als primärer Antikörper wurde Anti-Maus-IgG aus Schaf und als sekundärer Antikörper Anti-Schaf-POD Konjugat verwendet (Verdünnung jeweils: 1:2000)

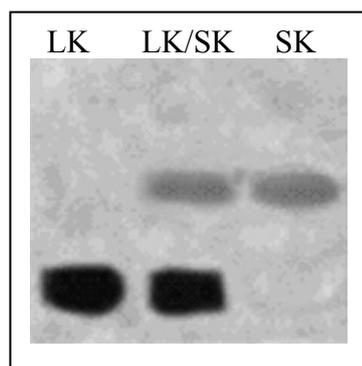
Wie in Abbildung 16 gezeigt, konnten beide Konstrukte im RTS500 HY exprimiert werden. Da für die Westernblot Experimente keine Verdünnungen, sondern direkt 10 µl des Expressionsansatzes der leichten bzw. schweren Kette aufgetragen wurden, ergab sich nach visueller Auswertung für LK in etwa eine Expressionsmenge von je 320 ng/ 10 µl im Pellet und im Überstand und für SK ca. 320 ng/ 10 µl im Pellet und 50 ng/ 10 µl im Überstand.

LK wurde dementsprechend zu etwa gleichen Teilen mit ca. 32 µg/ml sowohl im löslichen als auch unlöslichen Teil der Reaktion exprimiert. Im Fall der schweren Kette lag das Gleichgewicht mit ca. 32 µg /ml auf Seiten des unlöslichen Anteils. Löslich wurden nur ca. 5 µg/ ml exprimiert. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass Westernblot Experimente unter den gegebenen Bedingungen in der Regel nicht für Quantifizierungen herangezogen werden können, da die Peroxidase- Detektion eher ein qualitatives als ein quantitatives Maß ist. Wie auch in den zuvor gezeigten Experimenten (Abbildung 14) konnte visuell mittels Coomassiegefärbtem SDS-Gel keine deutliche Expression festgestellt werden, da auch hier die

Expressions Mengen zu gering waren. Durch die Nutzung eines IgG-spezifischen Antikörpers im Westernblotexperiment, der sich gegen schwere und leichte Kette richtet, konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem detektierten Signal tatsächlich um ein Maus-IgG handelt. Ein Kontrollwesternblot auf das RTS-Lysats war negativ (Daten nicht gezeigt).

#### *Coexpression von LK und SK im RTS500 HY*

Um zu überprüfen, ob auch beide Konstrukte zusammen exprimierbar sind (Coexpression), wurden in einer weiteren Reaktion die *Templates* von LK und SK zu gleichen Teilen (10 µg) im RTS500 HY eingesetzt. In diesem Experiment wurde nur der lösliche Teil der Reaktion nach 24 Stunden (30°C) nach Trennung vom Pellet durch Zentrifugation (13.000 g, 10 Minuten) analysiert. Die Analyse wurde wie unter Punkt 3.1.3.1 beschrieben, durchgeführt. Als Vergleich wurden die Produkte der getrennten Synthese von LK und SK analysiert, um Einblick in eine mögliche Umverteilung der Mengen bei der Coexpression zu erhalten.



#### **Abbildung 17: Coexpression von leichter und schwerer Kette im RTS500 HY**

Für den Westernblot wurden je 10µl der im RTS produzierten Probe vorbereitet (13.000 g, 20°C, 10 min). Die löslichen Teile von LK und SK wurden analysiert. SK und LK alleine wurden als Kontrolle exprimiert und als Referenz aufgetragen. Als Antikörper wurde Anti-His<sub>6</sub>-POD-Konjugat in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet.

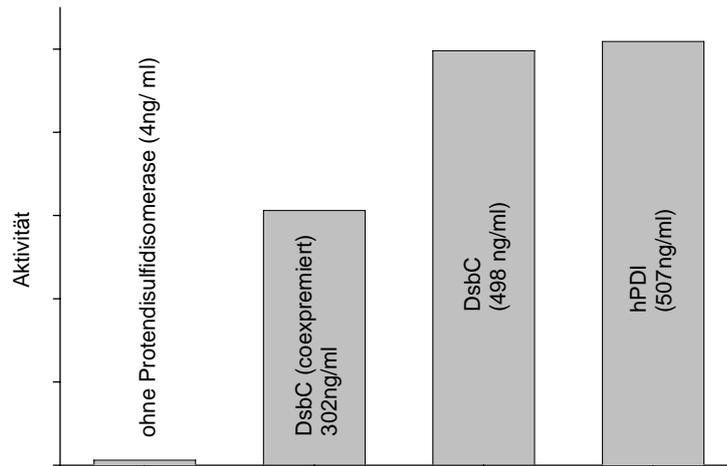
Durch die Coexpression von LK und SK kam es relativ zur Einzelexpression nicht zu einer veränderten Mengenverteilung des jeweiligen Fragments (

Abbildung 17), die Signale des Westernblot sind für die Coexpressionen von leichter und schwerer Kette nahezu gleichzusetzen mit den Intensitäten der Einzelexpressionen. Somit war die Coexpression von LK und SK prinzipiell möglich. Andererseits bedeutete das, dass auch bei der Coexpression SK und LK ausgehend von den zirkulären Topo-Vektoren im löslichen Teil der Reaktion gehalten werden konnten, und dass die Expressionsmengen der einzelnen Konstrukte durch die Coexpression nicht sichtbar gehemmt wurden. Somit konnte mit Untersuchungen zu Aktivität und Struktur begonnen werden.

### 3.1.4. Aktivitätsnachweis des im RTS synthetisierten MAK33

Um herauszufinden, ob der im RTS hergestellte Antikörper auch aktiv ist, kam ein modifizierter ELISA zum Einsatz (Buchner und Rudolph, 1991). Dabei handelt es sich um ein ELISA-System, in dem der hergestellte Antikörper sein Substrat selbst erkennen muss, damit es zu einem verwertbaren Signal kommt. Dieser modifizierte ELISA kam auch bei *in vitro* Rückfaltungsexperimenten zum Einsatz, bei dem denaturiertes reduziertes Fab rückgefaltet wurde (vgl. 3.2., Mayer et al., 2001). Von diesen Versuchen war auch bekannt, dass der Einsatz einer Disulfidisomerase die Reaktivierung reduzierter denaturierter Fab-Fragmente signifikant unterstützt. Daher musste davon ausgegangen werden, dass auch bei der zellfreien Expression im RTS im Hinblick auf Aktivität der Antikörperfragmente eine Proteindisulfidisomerase zum Einsatz kommen musste.

Deshalb wurde untersucht, unter welchen Bedingungen die im RTS exprimierten Antikörperkonstrukte aktiv sind. Zur Verfügung standen ein Plasmid für die Coexpression von DsbC (pIVEX-DsbC; Roche, Mannheim), einer periplasmatischen Disulfidisomerase aus *E. coli*, sowie die rekombinanten Proteine hPDI und DsbC. Im Fall der Coexpression wurde das DsbC-Plasmid ebenfalls wie die *Templates* von LK und SK mit 10 µg eingesetzt. In den weiteren, voneinander unabhängigen Experimenten wurden hPDI oder DsbC (jeweils 5 µM) zu Beginn der Reaktion eingesetzt. Nach den jeweiligen Reaktionen wurden die Aktivitätstests durchgeführt. Dafür wurden 10 µl des löslichen Anteils nach Zentrifugation der Gesamtreaktion (13.000 g, 10 min) für einen ELISA eingesetzt. Zum Abschätzen der jeweiligen Aktivitäten wurde ein Fab-Standard verwendet (vgl. 2.4.4.). Auf diese Weise konnte abgeschätzt werden, ob die Antikörperfragmente, exprimiert im RTS, aktiv sind.



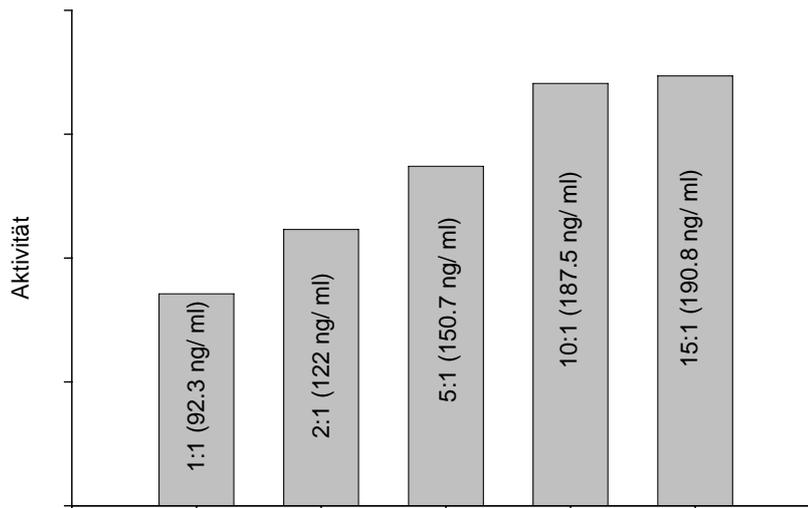
**Abbildung 18: Einfluss von Disulfidisomerasen auf die Aktivität von MAK33**

Vergleich des Einflusses von DsbC in Coexpression und unter Zugabe des rekombinant hergestellten DsbC oder hPDI auf den exprimierten Antikörper. Ausgewertet mittels ELISA nach 24 stündiger Expressionszeit im RTS500 HY

In Abwesenheit einer PDI war die Expression aktiver Antikörperspezies nicht möglich (Abbildung 18). In Anwesenheit einer PDI wurde eine messbare Aktivität der exprimierten Antikörper beobachtet. Die Coexpression von DsbC ergab ca. 300 ng/ml aktiven Antikörper. Wurde eine rekombinante PDI zugegeben, waren größere Mengen an aktiven Antikörper detektierbar (DsbC: 498 ng/ml; hPDI: 507 ng/ml). Im Fall des DsbC-Plasmids ist anzunehmen, dass erst DsbC exprimiert werden musste, um die Disulfidverbrückung zu unterstützen. Allgemein führt Coexpression von mehreren Proteinen gleichzeitig zu einem gesteigerten Energiebedarf und somit zu niedrigeren Transkriptions-/Translationsraten im Vergleich zur Expression eines einzelnen Plasmids (mündliche Mitteilung, Dr Erhard Fernholz, Roche). So war es auch wahrscheinlich, dass vergleichsweise weniger Antikörperplasmid transkribiert wurde, und somit nicht die gleiche Menge an exprimierten Antikörperpeptid in der Reaktion war, wie bei der alleinigen Expression der Antikörperfragmente. Entsprechend war bei der Zugabe nativer PDI war der Anteil an aktivem Antikörper um das 1,6- fache höher als bei Coexpression von DsbC.

Mit dem Wissen, welche Bedingungen zu einer aktiven Antikörperspezies führten, wurden verschiedene Konzentrationsverhältnisse der *Template*-DNA von LK und SK zueinander getestet. In einer Publikation von Knarr et al. (1995) wurde gezeigt, dass erst, wenn eine bestimmte Menge an leichter Kette im ER vorhanden ist, es zur Oligomerisierung der beiden Ketten kommt. Die *Templates* von SK und LK unterscheiden sich in Basenpaarlänge und entsprechend im Molekulargewicht. Deshalb wurde eine Optimierung der

Konzentrationsverhältnisse der Plasmid- DNA vorgenommen. Dazu wurde der Anteil des *Templates* einer Kette immer gleich gelassen (10 µg), und nur der andere in unterschiedlichen Verhältnissen, von 1:1 bis 15:1, in einer RTS Reaktion eingesetzt. Diese Reaktionen wurden im RTS100 HY mit 5 µM hPDI durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten wurden 10 µl des löslichen Anteils jeden Ansatzes im ELISA im Vergleich zu einem Fab-Standard auf Aktivität untersucht.



**Abbildung 19: Aktivitätsmessung einer RTS100 HY Reaktion mit unterschiedlichen Konzentrationen von schwerer zu leichter Kette.**

Verschiedene Verhältnisse der Template-DNA von SK zu LK (1:1 bis 15:1) wurden in einer RTS100 HY Reaktion getestet. hPDI wurde in einer Endkonzentration von 5 µM eingesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA.

Abbildung 19 zeigt, dass durch die Titration der *Template*-Menge von schwerer Kette zu leichter Kette eine Aktivitätssteigerung gemessen werden konnte. Ab einem Konzentrationsunterschied der Templates von SK zu LK von 10:1 konnte keine weitere Steigerung der Aktivität mehr erzielt werden. .

Eine Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses der DNA-*Templates* von LK zu SK erbrachte keine Aktivitätssteigerung (Daten nicht gezeigt).

In Abbildung 18 ist bereits das Ergebnis eines Konzentrationsverhältnisses von 10 zu 1 des Templates von SK zu LK zu sehen. Alle weiteren RTS500 HY Reaktionen bzgl. der MAK33-Expression wurden daher auch mit diesen optimierten Plasmidverhältnissen untersucht.

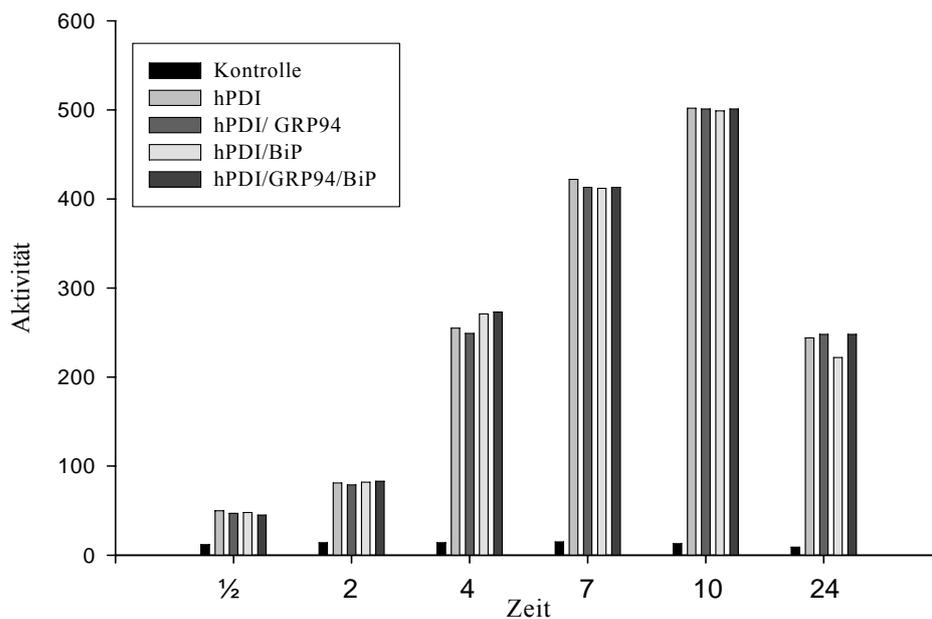
Dass eine Konzentrationserhöhung des *Templates* der schweren Kette in einer verstärkten Aktivität resultiert könnte damit erklärt werden, dass längere *Templates* evtl. öfters Kettenabbrüchen während Transkription und Translation unterworfen sind. Wird mehr Template zur Verfügung gestellt, kann mehr schwere Kette produziert werden, die dann mit

höherer Wahrscheinlichkeit an die leichte Kette bindet, und das wiederum hat eine höhere Aktivität zur Folge (vgl. Abbildung 14). Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die theoretische Vorhersage der Sekundärstrukturunterdrückung durch das Computerprogramm DNASTAR (Madison, USA) in diesem Fall für die Expression im RTS nicht mit der tatsächlichen Situation übereinstimmt, und deshalb die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle bei der Translation nicht optimal ist.

### 3.1.5. Einfluss von ER- Chaperonen auf die Aktivität von MAK33 im RTS

Nachdem geklärt war, unter welchen Bedingungen grundsätzlich aktiver Antikörper exprimiert werden konnte, wurde der Einfluss der ER- Hitzestressproteine BiP und Grp94 auf die Aktivität des zellfrei synthetisierten Antikörpers untersucht. Rückfaltungsexperimente mit rekombinant exprimierten Fab-Fragment, sowie Komplexierungsexperimente mit der Antikörperdomäne C<sub>H</sub>3 haben gezeigt, dass zumindest BiP mit Antikörperfragmenten *in vitro* interagiert (Mayer et al., 2000; Knarr et al., 1999). Für Grp94 wurden Interaktionen mit Ig-Molekülen *in vivo* postuliert (Melnick et al., 1992)

Zu diesen Zwecken wurden unter den bereits beschriebenen Bedingungen zusätzlich zu den Templates von SK und LK, sowie rekombinanter hPDI auch 5 µM BiP und/ oder 5 µM Grp94 in eine RTS500 HY Reaktion gegeben. Bei diesem Versuch wurde gleichzeitig eine Expressionskinetik durchgeführt. Dabei wurden zu gegebenen Zeiten je 50 µl einer RTS500 HY entnommen, abzentrifugiert (13.000 g, 10 Minuten) und 10 µl des Überstandes im ELISA auf Aktivität im Vergleich zum Fab-Standard getestet. Die Reaktion wurde über 24 Stunden beobachtet.



**Abbildung 20: Zugabe von Grp94 und BiP in das RTS, und deren Einfluss auf die Aktivität von MAK33.** Die Aktivität von im RTS500 HY exprimierten MAK33 in Anwesenheit verschiedener ER- Chaperone (BiP und Grp94, je 5  $\mu$ M) in unterschiedlichen Kombinationen zusammen mit hPDI. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in Stunden (h)) wurden je 50  $\mu$ l dem RTS Ansatz entnommen und mittels ELISA ausgewertet.

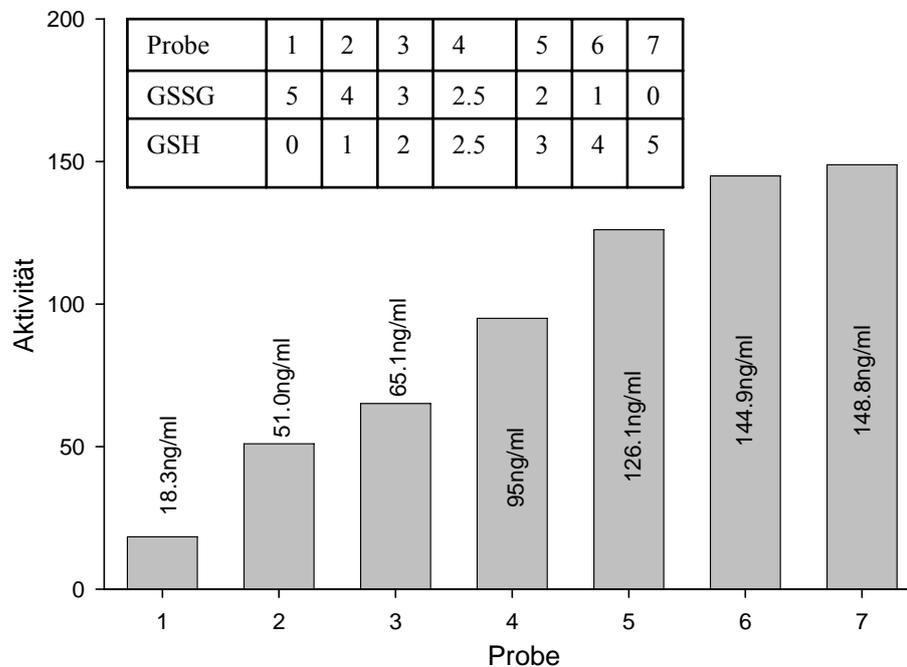
Die Synthese von funktionellen MAK33 hat ihr Maximum bei ca. 10 Stunden erreicht. Durch die Zugabe relevanter ER-Chaperone sollten deren Einflüsse auf die Aktivität des exprimierten Antikörpers untersucht werden. Abbildung 20 zeigt, dass beide Chaperone, BiP und Grp94, einzeln oder in Kombination, weder einen Effekt auf die Aktivierungsgeschwindigkeit noch auf die absolute Aktivität haben. Nach Informationen des Herstellers (Roche) ist das System bereits mit großen Mengen DnaK und GroEL/ES angereichert, so dass sich die Effekte der hier zugegebenen Chaperone möglicherweise relativieren.

### 3.1.6. Einfluss des Redoxmilieus auf die Aktivität des Antikörpers

Unabhängig von diesen Ergebnissen wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Änderung des Redoxmilieus im RTS im Hinblick auf die Aktivität untersucht. Da es sich beim RTS um ein offenes System handelt, können jederzeit nicht nur Proteine, sondern auch andere Additiva hinzugefügt werden. In diesem Fall wurde die Redoxabhängigkeit des synthetisierten MAK33 durch eine Redoxtitration mit verschiedenen Verhältnissen von GSSG und GSH untersucht.

Das Verhältnis der beiden Templates von LK und SK wurde 1:1 eingesetzt, und außer hPDI (5  $\mu$ M) keine weiteren Faltungshelfer verwendet. Auch in diesem Fall wurde auf das RTS100

HY zurückgegriffen, um eine schnelle und parallel vergleichbare Analytik durchführen zu können. Nach Ende der Reaktionszeit (60 Minuten, 37°C) wurde wiederum nur der zentrifugierte Überstand der Reaktion für die Quantifizierung der Aktivität mittels ELISA benutzt



**Abbildung 21: Einfluss verschiedener Gluthationkonzentrationen auf die Aktivität von MAK33.**

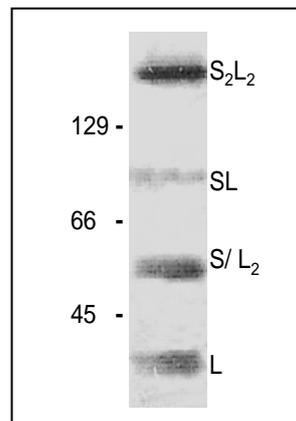
Expression von MAK33 im RTS100 HY mit hPDI (5  $\mu$ M Endkonzentration) unter Einfluss verschiedener GSSG und GSH Konzentrationen (s. Tabelle). Die Zuordnung der Probennummer der Tabelle entspricht der des Graphen. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA.

Die Ergebnisse der Redox Titration zeigen (Abbildung 21), dass eine Reduzierung des Reaktionsmilieus im RTS zu einer Steigerung der Menge an aktiven Antikörpermolekülen führt. Da Antikörper im ER gebildet und assembliert werden, wäre anzunehmen gewesen, dass ein oxidativeres Milieu zu mehr aktivem MAK33 führt.

### 3.1.7. Assemblierungszustand des im RTS exprimierten MAK33

Nach Klärung der optimalen Reaktionsbedingungen im Bezug auf die Aktivität sollte im nächsten Schritt der Assemblierungszustand der im RTS synthetisierten MAK33 geklärt werden. Da mittels immunochemischer Methoden lediglich Angaben über die Funktion, nicht aber über die Struktur von Proteinen gemacht werden können, wurden für diese Zwecke Methoden zur Strukturklärung herangezogen.

Mit Hilfe einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE können nicht nur Angaben zu monomeren Zuständen von Polypeptiden, sondern auch zu oligomeren Zuständen gemacht werden, sofern das Zielprotein kovalente verknüpft vorliegt. Deshalb wurde nach einer RTS500 HY Reaktion, durchgeführt unter optimierten Bedingungen eine nicht-reduzierende SDS-Gelelektrophorese und ein Westernblot des löslichen Anteils (Zentrifugation bei 13.000 g, 10 Minuten; Auftragsvolumen 10  $\mu$ l) der Reaktion durchgeführt. Die sich im Überstand befindlichen aktiven löslichen Antikörpermoleküle wurden zuvor durch Affinitätschromatographie über den N-terminalen His-tag der Fragmente im Batchverfahren (800  $\mu$ l, 2.1.4.) aufgereinigt. Nicht-reduzierend in diesem Zusammenhang bedeutet, dass dem Lämmli-Auftragspuffer kein  $\beta$ -Mercaptoethanol zugesetzt wurde. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des spezifischen Anti-His<sub>6</sub>-POD Antikörper.



**Abbildung 22: Nicht reduzierende SDS-PAGE und Westernblot zur Klärung des Oligomerisierungszustand**

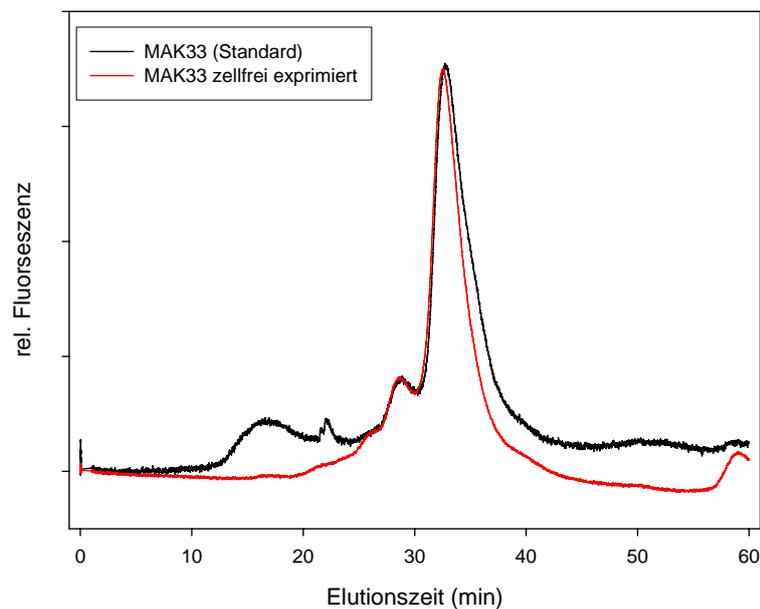
Aufgetragen wurden 10  $\mu$ l eines RTS500 HY Ansatzes ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol im Auftragspuffer unter optimierten Bedingungen nach Aufreinigung mittels Ni-NTA- Säulchen im Batch- Maßstab (800  $\mu$ l). Der Nachweis erfolgte mittels Anti-His<sub>6</sub> POD- konjugiertem Antikörper. Links: Zuordnung mittels RotiMark; rechts: L = Leichte Kette; S = Schwere Kette; S<sub>2</sub> und L<sub>2</sub>: Dimer von schwerer bzw. leichter Kette.

Nach der nicht-reduzierenden SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot (Abbildung 22) konnten vier Banden detektiert werden. Anhand des Markers konnten ihre Massen mit  $\sim$ 25,  $\sim$ 50,  $\sim$ 75 und  $\sim$ 150 kDa bestimmt werden. Das entspricht den Massen der monomeren LK ( $\sim$ 25 kDa), einem Homodimer LK oder einem SK Monomer ( $\sim$ 50 kDa) und dem LK- SK-Heterodimer ( $\sim$ 75 kDa). Die Bande bei  $\sim$ 150 kDa kann nur durch ein Heterotetramer, bestehend aus je zwei LK und SK, sprich dem vollständigen IgG, erklärt werden.

Um das exprimierte Produkt genauer zu analysieren, sollten anhand von in Hybridomazellen hergestellten MAK33 (Roche, Mannheim) die Quartärstruktur und den Faltungszustand im nativen, im denaturierten und im denaturiert reduzierten Zustand vergleichend untersucht

werden. Zu diesem Zweck wurden analytische Gelfiltrationsläufe bzw. fluoreszenzspektroskopischen Experimente durchgeführt.

Der nach unter optimierten Bedingungen im RTS500 HY exprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigte Antikörper wurde für die HPLC- Versuche in HKM-Puffer (2.1.5.) umdialysiert, und auf eine SEC200 HPR Säule (GE Healthcare, München) aufgetragen (20  $\mu$ l, 1,5  $\mu$ M). Zum Vergleich wurden gleiche Mengen von dem in Hybridoma Zellkultur hergestellten Standardantikörper von Roche (Mannheim) analysiert.



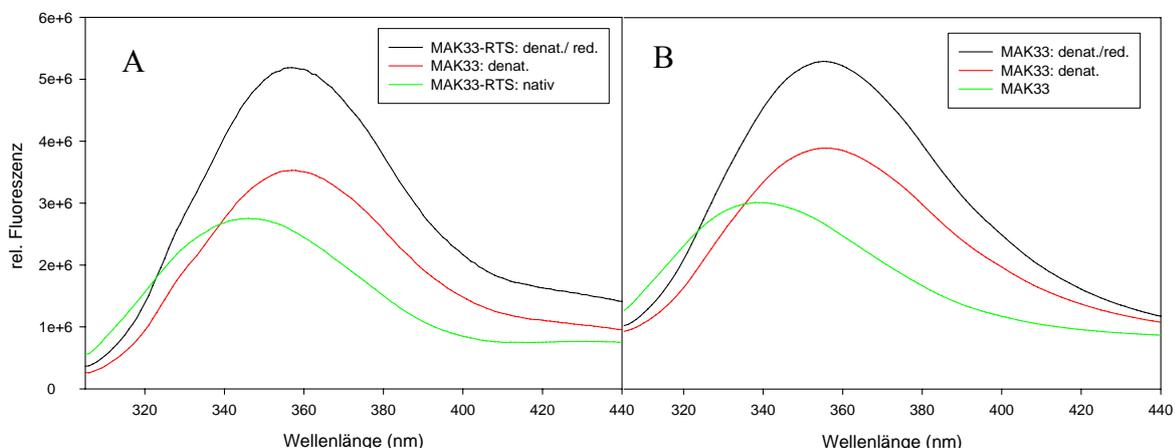
**Abbildung 23: Analytische Gelfiltration von im RTS und in Zellkultur synthetisiertem MAK33**

Von Roche vertriebener MAK33 und im RTS hergestellter MAK33 wurden auf einer SEC200 HPR (GE Healthcare) verglichen. Laufgeschwindigkeit: 0,25 ml/min, 25°C: in HKM-Puffer

Die Elutionsprofile des im RTS500 HY exprimierten MAK33 und des Standards (Abbildung 23) zeigen vergleichbare Kurvenverläufe. *In vitro* synthetisierter MAK33 ist nicht glykosyliert, was das Fehlen der Peaksignale zwischen den Minuten 14 bis 18 erklären könnte. Glykosylierung trägt in der Regel stark zum hydronamischen Radius bei, und auf diesem Kriterium beruht die Methode.

Das starke Signal bei einer Elutionszeit 33 Minuten konnte mittels HPLC-Eichstandard der Größe des 150 kDa IgG-Moleküls zugeordnet werden. Das Elutionsprofil beider unterschiedlich hergestellter Antikörper ist in diesem Bereich identisch, was auf die gleiche Quartärstruktur schließen lässt. Bei Minute 29 wird ein schwaches Signal aufgenommen, was einer Dimerisierung zweier IgG-Moleküle entspräche. IgG-Moleküle können über den F<sub>C</sub>-Teil miteinander interagieren (Buchner et al., 1991).

Um weitere Einblicke in den Faltungszustand des zellfrei exprimierten Antikörpers zu erhalten, wurden vergleichende Fluoreszenzspektren im nativen, im denaturierten und im denaturiert reduzierten Zustand von dem im RTS500 HY hergestellten Antikörper und dem IgG- Standard durchgeführt. Dazu wurden nach Aufreinigung über den His-tag des zellfrei exprimierten MAK33 beide Spezies in HKM-Puffer umdialysiert. Um die Antikörper zu denaturieren wurden sie in 6 M GdmCl aufgenommen, für die zusätzliche Reduktion wurde 10 mM DTT zugegeben. Zur vollständigen Denaturierung wurden diese Ansätze 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Spektren zwischen 305 und 440 nm und einer Anregungswellenlänge von 295 nm wurden 2  $\mu$ M Antikörperlösung eingesetzt.



**Abbildung 24: Vergleichende Fluoreszenzspektroskopie von im RTS und in Zellkultur hergestellten MAK33**

Im RTS (A) und in Zellkultur (B) hergestellter Antikörper wurde in nativem Zustand (in HKM-Puffer) gemessen. Zur Denaturierung wurden die Antikörper 30 Minuten in 6 M GdmCl denaturiert (denat.), bzw. mit 10 mM DTT reduziert (denat. / red). Anregung bei 295nm, Aufnahmeintervall: 305 nm - 440 nm. Spektren sind pufferkorrigiert.

Die Spektren beider Moleküle zeigen in jedem angegebenen Faltungszustand vergleichbare Eigenschaften (Abbildung 24). Leichte Unterschiede können in der Präparation begründet liegen, oder in der Glykosylierung der in Zellkultur hergestellten MAK33- Variante. Für die nativen Spezies liegt das Maximum bei etwa 340 nm, durch die Denaturierung wird das Maximum auf 360 nm verschoben. Im denaturierten Zustand wird das Signal verstärkt, da sich Tryptophane von dem quenchenden Effekt der Disulfidbrücke entfernen. Werden die Disulfidbrücken durch die Reduktion zusätzlich aufgebrochen, verstärkt sich dieser Effekt. Die aufgenommenen Spektren entsprachen dem typischen Verhalten von Antikörpern unter den gegebenen Bedingungen (Buchner et al., 1991).

Somit weisen auch diese Ergebnisse darauf hin, dass der im RTS hergestellte MAK33 die typischen Assemblierungsmerkmale eines IgG aufweist. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass der im RTS exprimierte aktive Antikörper vollständig assembliert, oxidiert und nativ gefaltet vorliegt.

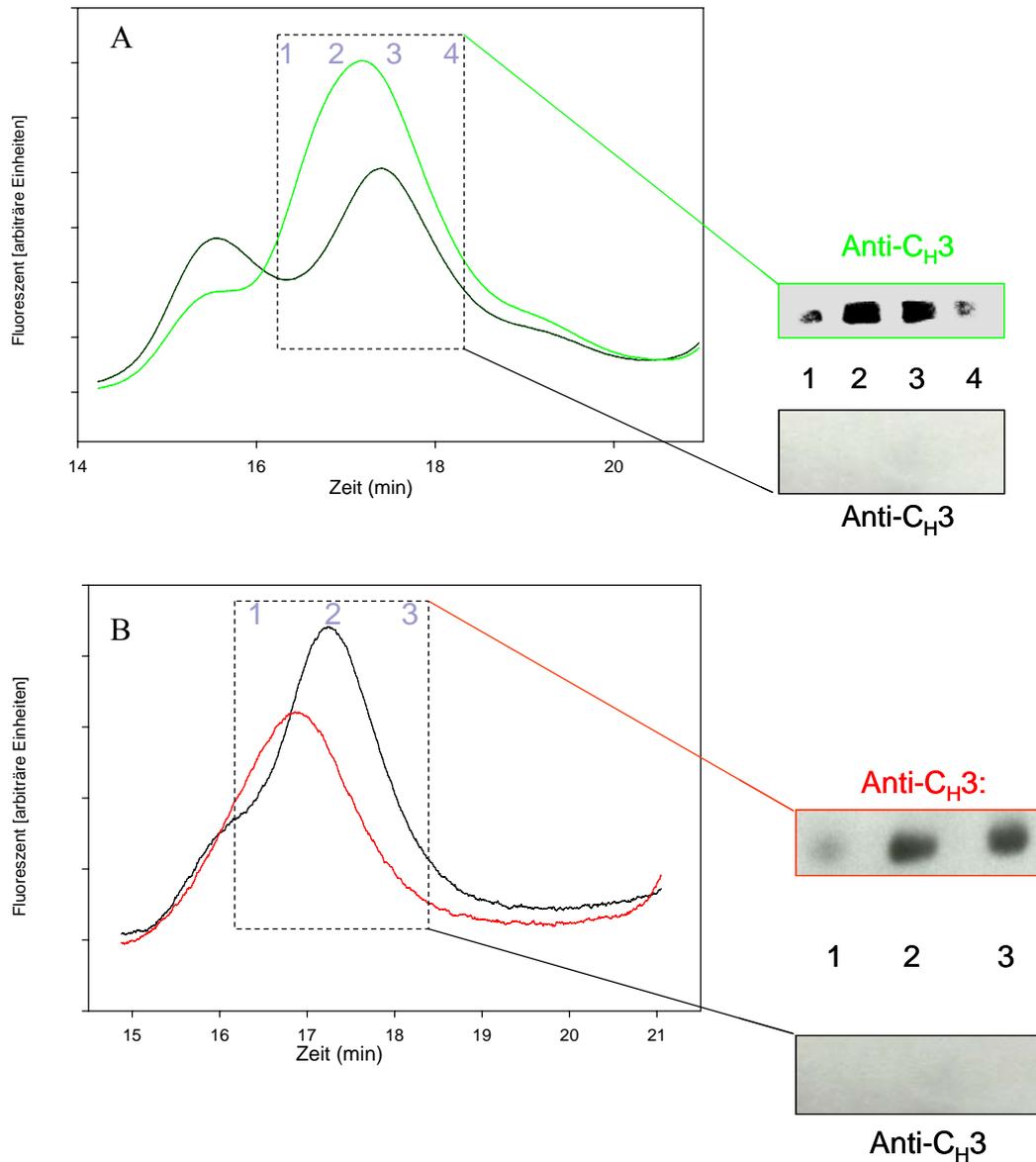
### 3.1.8. DnaK als Antikörperfaltungshelfer

Wie bereits erwähnt hat die Zugabe von BiP im RTS keinen Effekt auf die Aktivierung des produzierten MAK33. Die Aufgabe von Mitgliedern der Hsp70-Familie ist nicht eine Steigerung der Translationsrate, sondern mitunter eine Verhinderung von Aggregationen naszierenden Polypeptidkette (Herrmann & Neupert, 2000). Das führt folglich zu einer Aktivitätssteigerung des synthetisierten Gesamtpeptids nach Verlassen der Translationsmaschinerie. BiP erfüllt diese Aufgabe auf der ER-Seite des Translocon (Hamman et al., 1998), vgl. 1.7.1.).

Um zu überprüfen, ob DnaK im *E. coli*-Lysat einen positiven Einfluss auf die Aktivierung von Antikörperketten haben könnte, wurden vergleichende Komplexierungsversuche mit BiP bzw. DnaK und C<sub>H3</sub> durchgeführt. Knarr et al. (1999) konnten eine transiente Komplexierung zwischen BiP und C<sub>H3</sub> nachweisen. Dabei wird rekombinant erzeugtes C<sub>H3</sub> in 4 M GdmCl und 10 mM DTT denaturiert und reduziert. Um eine Reoxidation der Cysteine zu Disulfiden zu vermeiden wird die entfaltete Antikörperdomäne mittels 1 M Iodacetamid carboxyaminoalkyliert (CAM). Dadurch entsteht ein entfaltetes C<sub>H3</sub>-CAM-Peptid. Die Frage, die es zu beantworten galt war, ob die Komplexbildung zwischen C<sub>H3</sub>-CAM und BiP spezifisch für BiP ist, oder ob andere Hsp70-Vertreter wie DnaK auch Komplexe mit C<sub>H3</sub>-CAM eingehen können.

Dazu wurden in einem Komplexierungsansatz C<sub>H3</sub>-CAM in 10-fachem Überschuss mit DnaK für 0 Minuten und 120 Minuten bei 37°C inkubiert (23 µM; 2,3 µM) und mittels analytischer Gelfiltration auf einer SEC 200 HPR auf Komplexierung hin untersucht. Die Elutionszeiten wurden mittels HPLC-Eichstandards überprüft.

Während den HPLC-Läufen wurden halbminütlich 0,25 ml-Fractionen der Elution im Bereich der Proteinsignale aufgefangen und mittels C<sub>H3</sub>-spezifischen Antikörper durch Westernblotexperimente untersucht.



**Abbildung 25: Komplexierung von BiP (A) bzw. DnaK (B) und C<sub>H3</sub>-CAM**

C<sub>H3</sub> wurde entfaltet, reduziert und carboxyaminoalkyliert (6 M GdmCl, 10 mM DTT, 1 M IAA). Die Analyse der Komplexbildung mittels HPLC erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Auf eine Superdex 200 HR Säule wurde das entsprechende Hsp70-Chaperon (2,3 μM), und im Fall der Komplexierung zusätzlich bei 37 °C für 2 h inkubiert mit 23 μM C<sub>H3</sub>-CAM. Halbminütlich (A:1-4; B 1-3) wurden die Peakfraktionen aufgefangen und C<sub>H3</sub> mittels Westernblot detektiert. A) BiP- C<sub>H3</sub> Komplexierung: BiP alleine (schwarz), BiP-C<sub>H3</sub>- Komplex (grün); B) DnaK- C<sub>H3</sub> Komplexierung: DnaK alleine (rot), DnaK- C<sub>H3</sub>- Komplex (schwarz)

Im Vergleich wurden BiP bzw. DnaK mit der denaturierten Antikörperdomäne inkubiert und auf der HPLC aufgetragen (Abbildung 25). Im Fall von BiP war diese Komplexierung, wie oben beschrieben bereits bekannt. Hier konnte gezeigt werden, dass eine Komplexierung von DnaK mit der entfalteten Antikörperdomäne möglich war. Dabei handelte es sich um eine Peakverschiebung im Monomerbereich des jeweiligen Hsp70-Chaperons von 0,5 Minuten

(entspricht  $\sim 18$  kDa), was der Größe der denaturierten C<sub>H3</sub>-Domäne unter diesen Bedingungen gleichkommt. In der analytischen Gelfiltration verhielt sich BiP als Monomer ( $\sim 17,5$  Minuten)<sup>1</sup> und Dimer ( $\sim 15,5$  Minuten) (Abbildung 25 A). Wurde das C<sub>H3</sub>-CAM zugegeben, verschwand der Dimerpeak fast vollständig und das Monomer war nur noch im Komplex zu beobachten ( $\sim 15$  Minuten). DnaK (Abbildung 25 B) verhielt sich als Monomer ( $\sim 17,5$  Minuten). Auch hier resultierte die Zugabe von C<sub>H3</sub>-CAM in einer Peakverschiebung von 0,5 Minuten ( $\sim 17,5$  Minuten), entsprechend der Größe des eingesetzten C<sub>H3</sub>. Zusätzlich wurden die Peaks der jeweiligen Elutionszeiten aufgefangen und mittels Westernblot auf das Vorhandensein von C<sub>H3</sub> untersucht. Für beide Hsp70-Chaperone wurde ein positives Signal für C<sub>H3</sub> nach der Inkubationszeit von 120 Minuten im Komplexpeak detektiert. Ohne Inkubation war in diesem Bereich kein C<sub>H3</sub> detektierbar.

Des Weiteren wurden vergleichende Fab-Rückfaltungsassays, wie sie im Folgenden unter 3.2. mehrmals beschrieben werden, in Gegenwart von BiP und DnaK durchgeführt. In diesem Fall wurden 2,0  $\mu\text{M}$  BiP bzw. DnaK für die Rückfaltung im ATP regenerierenden System von denaturiertem, reduziertem 5  $\mu\text{M}$  Fab eingesetzt. Vergleiche mit hPDI und BiP wurden ebenfalls durchgeführt, und wie in 3.2.2 eingesetzt.

Proteinkombination	Rückfaltungseffizienz
DnaK ( mit ATP)	7,9%
BiP (mit ATP)	17,3%
hPDI + BiP	48,4%

**Tabelle 6: Einfluss von BiP und DnaK im Vergleich auf die Rückfaltung von Fab**

Fab (0,2  $\mu\text{M}$ ) wurde wie oben in Renaturierungspuffer in Anwesenheit 2,0 mM ATP und entsprechend einem ATP regenerierenden System zurückgefaltet. Faltungshelfer wurden wie folgt eingesetzt: BiP (2,0  $\mu\text{M}$ ), PDI (0,5  $\mu\text{M}$ ). Nach 48 h wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt.

In Anwesenheit von ATP und dem ATP regenerierenden System resultierte die Zugabe von DnaK in einem Rückfaltungserfolg von  $\sim 8\%$  (Tabelle 6). Zum Vergleich wurden die Zugabe von BiP ( $\sim 17\%$ ) und der kooperative Effekt von hPDI und BiP ( $\sim 48\%$ ) bestimmt. Festzuhalten bleibt, dass DnaK einen positiven Effekt auf die Rückfaltung hat.

Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass DnaK in dem von Lilie et al. (1994) etablierten System einen positiven Einfluss auf die Rückfaltung denaturierter Antikörpermoleküle hat.

<sup>1</sup>In Klammern angegebene Minutenwerte geben die Elutionszeiten während der analytischen Gelfiltration an

### 3.1.9. Diskussion zur zellfreien Expression von MAK33 im RTS

Antikörper stellen in der heutigen Medizin, Diagnostik und Grundlagenforschung eines der wichtigsten und leistungsstärksten Moleküle dar. Allerdings ist die rekombinante Expression dieser Proteinklasse aufgrund der komplexen Quartärstruktur, Flexibilität und ausgeprägten Disulfidverbrückung sehr kompliziert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, ein komplexes, multimeres, durch Disulfidverbrückung gekennzeichnetes Polypeptid wie ein IgG-Molekül in einem zellfreien Transkriptions-/Translationssystem auf der Basis von *E. coli*-Lysaten herzustellen. Die schwere und leichte Kette von MAK33 werden löslich wie auch unlöslich im RTS synthetisiert. Die Aktivität des so exprimierten Antikörpers konnte mit Hilfe eines ELISA nachgewiesen werden. Aktivität konnte nur gemessen werden, wenn für das RTS während der Expression von MAK33 mit einer Disulfidisomerase supplementiert worden war. Diese kann entweder co-exprimiert werden oder in nativer Form dem System beigelegt werden. Die höchste Aktivität konnte durch Zugabe rekombinant erzeugter hPDI erzielt werden. Frühere Rückfaltungsexperimente mit dem Fab-Fragment von MAK33 zeigten, dass die Zugabe einer PDI die Reaktivierung denaturierter, reduzierter Fab-Moleküle erheblich steigerte (Lilie et al., 1994). Außerdem konnten weitere *in vitro* Versuche belegen, dass für die erfolgreiche Oxidation der Antikörperdomäne C<sub>H3</sub> eine PDI unbedingt von Nöten ist (Vinci et al., 2004). Allerdings gelang es bis heute nicht, ein vollständiges IgG-Molekül unter *in vitro* Bedingungen zu aktivieren oder assemblieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch die Herstellung eines intakten IgG nur möglich ist, wenn eine Proteindisulfidisomerase zugegeben wird.

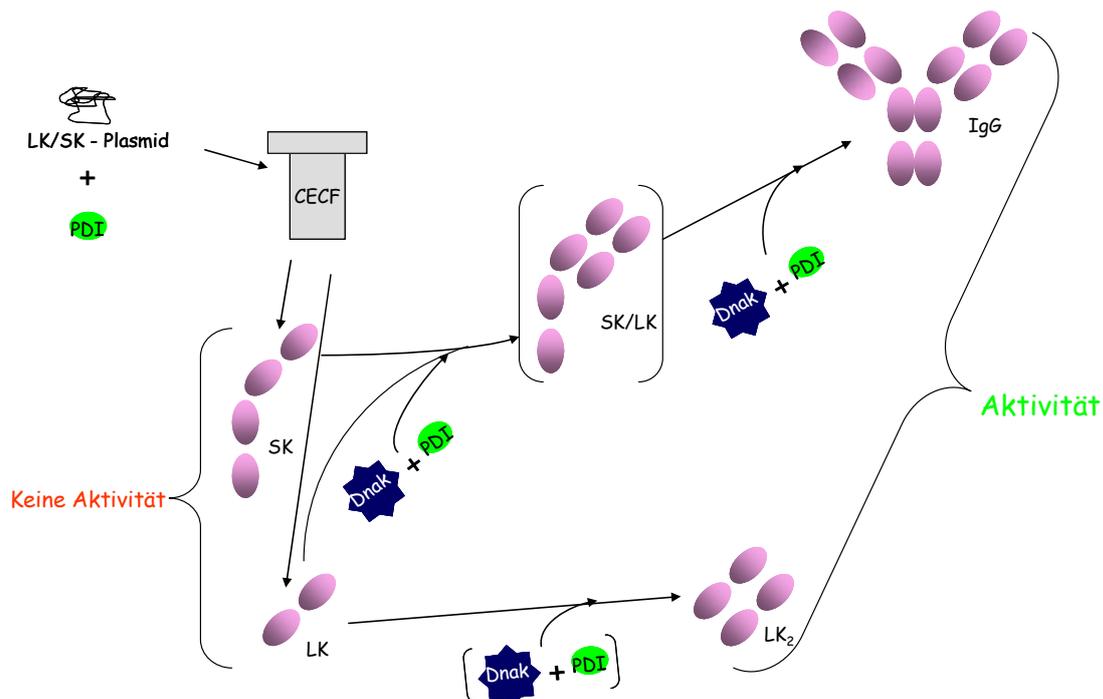
Durch Veränderung der GSH:GSSG-Verhältnisse wurden Redox titrationen durchgeführt, um die Menge an aktiven Antikörper zu steigern. Unerwarteter Weise konnte am meisten aktiver Antikörper unter reduzierenden Bedingungen hergestellt werden. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die Lilie et al. (1994) sowie Mayer et al. (2004) publiziert haben. In diesen Fällen wurden die höchsten Reaktivierungsraten in *in vitro* Rückfaltungen mit Fab unter oxidierenden Bedingungen erreicht. Auch widerspricht das *in vivo* Verhältnis der Redoxbedingungen im ER solchen Beobachtungen. Das Milieu des ER-Lumen ist weitaus oxidativer als das des Cytosol. Das RTS basiert auf der cytosolischen Fraktion von *E. coli*. Das GSH:GSSG-Verhältnis ist dort etwa 100:1, das des ER hingegen nur 3:1 und somit wesentlich oxidierender (Melnick & Argon, 1995). Der Hersteller des RTS (Roche, Mannheim) macht keinerlei Angaben über das Redoxverhältnis im RTS, aber man sollte

davon ausgehen können, dass das *in vitro*-Verhältnis in etwa mit dem des lebenden Organismus übereinstimmt. Von dieser Vermutung ausgehend scheint das Ergebnis verwirrend. Betrachtet man aber die Funktionsweise von Proteindisulfidisomerasen nicht nur unter dem Aspekt der Disulfidneuverbrückung, sondern auch unter der Fähigkeit, Disulfidbrücken zu isomerisieren, kann dieses Ergebnis zu einer Erklärung gelangen. Wie u. a. bei Wilkinson (Wilkinson et al., 2005) beschrieben, muss eine Proteindisulfidisomerase reduziert vorliegen, um eine falsch verknüpfte Disulfidbrücke aufzubrechen und anschließend neu zu knüpfen. Sollten sich also bei der Expression von MAK33 in einem auf *E. coli* basierendem System disulfidverbrückte Aggregat- oder Intermediärzustände bilden, wie es häufig bei disulfidverbrückten Proteinen bei der rekombinanten Expression in *E. coli* zu beobachten ist, besteht durch Reduktion der Disulfidisomerase die Möglichkeit diese Zustände aufzulösen und neu zu koordinieren. Genauer: Bei hPDI handelt es sich um ein Mitglied der Oxidoreduktasefamilie. Diese Familie wird durch ein funktionelles CXXC-Motiv charakterisiert (Edman et al., 1985). Die Cysteine des Motivs können entweder im oxidierten Zustand aktiv sein, wenn sie benötigt werden um Disulfidneuverbrückungen zu katalysieren, oder in reduziertem Zustand, wenn sie die sog. Dithiol- Form annehmen. Das CXXC-Motiv ermöglicht es dieser Enzymklasse Oxidationen, Reduktionen oder Isomerisierungen zu katalysieren, jeweils abhängig vom Redox-Zustand der katalytisch aktiven Cystein-Paare (Wilkinson et al., 2005; Sevier & Kaiser, 2006). Wenn das Cysteinmotiv in oxidiertem Zustand vorliegt, ist das Enzym in der Lage Disulfidverbrückungen zu katalysieren. Liegt das Motiv aber im reduzierten Zustand werden falsch ausgebildete Disulfide reduziert um sie dann wieder in korrekter Weise zu oxidieren. Nach jedem dieser Katalyseschritte muss das Enzym in seinen reduzierten Zustand zurückkehren, um für die nächste Katalyserunde bereit zu sein. Fungiert hPDI als Oxidase, wird sie von dem membranassoziierten Protein Ero1 (Frand & Kaiser, 1999) in ihrem oxidativen Status gehalten. Wird das Protein allerdings als Reduktase oder Isomerase benötigt wird es durch die Anwesenheit von GSH im reduzierten Zustand gehalten, um aktiv zu bleiben. (Jessop & Bulleid, 2004). Für das RTS bedeutet das, dass der höchste Anteil an aktivem Antikörper erhalten werden kann, weil die hPDI wahrscheinlich eher als reduktive als oxidative Aufgaben übernimmt. Möglicherweise ist sie dementsprechend auch in der Lage die schwere Kette, die sich den gelelektrophoretischen Analysen v.a. im unlöslichen Teil der Reaktion befindet (Abbildung 14), zu rekrutieren, um so verstärkt der Aktivität beizutragen. Disulfidverbrückung *in vivo* ist ein kotranslatinaler Prozess (Bergmann & Lodish, 1979). Aber neben Proteindisulfidisomerasen scheinen Antikörper mit einer großen Anzahl weiterer

ER-assoziierten Proteine zu interagieren. Darunter sind die Mitglieder der Hsp90- und Hsp70-Familie zu zählen, Grp94 bzw. BiP (Melnick & Argon, 1995). Im Gegensatz zu bereits publizierten Daten (Mayer et al., 2000) haben BiP und das bisher nicht getestete Grp94 im RTS keinen nachweisbaren Einfluss auf die Expressionsmenge und die Aktivität von MAK33 gezeigt. Das RTS500 HY ist bereits mit den *E. coli* Chaperonkomponenten DnaK (Hsp70-Familie) und GroE (Hsp60-Familie) angereichert. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass bei früheren Experimenten, die im RTS500 Circular Template Kit durchgeführt werden, keine aktive Antikörperspezies nachgewiesen werden konnten (Frey, 2002). Dieses System ist im Gegensatz zur hier verwendeten RTS500 HY Reaktion nicht angereichert mit DnaK/J- und GroE-Komponenten. Übernehmen diese *E. coli* Chaperone die Aufgaben von BiP und Grp94 im *in vitro* Ansatz, dann würde die zusätzliche Zugabe von BiP und Grp94 keine positiven Effekte haben. Grund für solche Annahmen geben die Komplexierungsversuche mit DnaK und C<sub>H3</sub>, sowie Ergebnisse von Fab-Rückfaltungsassays, in denen gezeigt werden konnte, dass DnaK einen positiven Effekt auf die Reaktivierung von denaturiertem reduziertem Fab hat. Überdies konnte eine positive Interaktion von DnaK mit der Antikörperdomäne C<sub>H3</sub> *in vitro* nachgewiesen werden. Bei HPLC-Experimenten konnte eine zumindest transiente Interaktion zwischen DnaK und C<sub>H3</sub> gezeigt werden, wie sie auch vorher schon für BiP und C<sub>H3</sub> gezeigt werden konnte (Knarr et al., 1999). Da es sich beim RTS um ein ER-freies Kompartiment handelt, BiP *in vivo* im ER am Translokon mit naszierenden, ungefalteten Peptiden interagiert und DnaK das in *E. coli* vertretene Pendant darstellt, könnten diese Versuche eine mögliche Übernahme der BiP-Aufgaben durch DnaK darstellen.

Darum wäre es sogar noch eher denkbar, dass Überschüsse dieser ER-residenten Proteine, BiP und Grp94, den Energiehaushalt des Systems stören, und zu einer Senkung der Expression oder Aktivität beitragen könnten. Des Weiteren arbeiten BiP und Grp94 in ihrer Funktion als ER-Chaperone *in vivo* cotranslational und an eukaryotischen Ribosomen (Johnson & van Waes, 1999), so dass sie möglicherweise im auf *E. coli* basierten RTS nicht aktiv sind.

Die im RTS optimiert hergestellten MAK33-Moleküle sind korrekt gefaltete, heterotetramere und disulfidverbrückte Antikörper. Interessant wäre schließlich noch die Stabilität dieser unglykosylierten Antikörper mit der Stabilität des authentischen Antikörpers zu vergleichen. Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass diese Daten zeigen, dass es gelang in einem zellfreien auf *E. coli* basierendem Translations-/ Transkriptionssystem einen vollständig assemblierten MAK33 zu synthetisieren (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Faltungs- und Assemblierungsmodell des im RTS hergestellten MAK33.**

Ausgehend von den Expressionsplasmiden der leichten und schweren Kette werden im CECF System in Abwesenheit einer PDI keine aktiven Antikörperspezies synthetisiert. Die Zugabe von PDI und DnaK kann Aktivität gemessen werden, die von der Dimerisierung der leichten oder dem vollständig synthetisierten MAK33-Ig stammt.

Frühere Experimente haben gezeigt, dass Aktivität auch durch die leichte Kette allein hervorgerufen werden kann (Morgan et al., 1995). Auch im Fall des RTS resultierte die alleinige Expression der leichten Kette in messbaren Aktivitäten, die verglichen mit der Aktivität, entstanden durch die Coexpression von leichter und schwerer Kette, geringer war (Frey, 2002).

Das RTS, angefangen bei der 2-Stufen-PCR bis hin zur Expression im 1 ml- Maßstab, stellt ein sehr wirkungsvolles Werkzeug dar, um schnell vollständig assemblierte und aktive Antikörper für analytische und auch diagnostische Applikationen herzustellen. Ein großer Vorteil dieser Herstellungsmethode ist die Möglichkeit, den Antikörper beliebig durch Mutationen zu modifizieren. Hier sind neben der Untersuchung weiterer Faltungshelferproteine auf ihre Eignung zur Ausbeutenerhöhung auch weitere Variationen der Reaktionsparameter wie Temperatur und Additiva, wie L-Arginin, überlegenswert

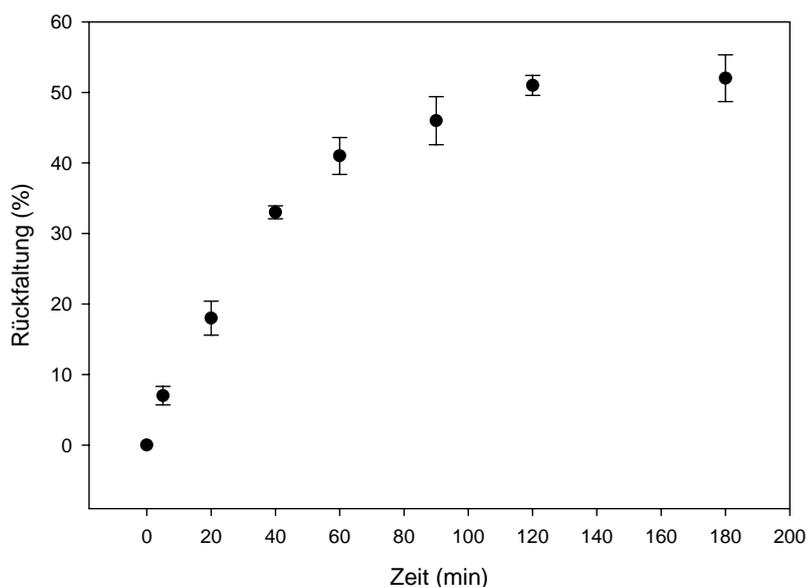
### **3.2. Reaktivierung und Renaturierung von Fab *in vitro***

Die Faltung von Antikörpern ist nicht nur unter wissenschaftlichen Gesichtspunkten interessant. Das Wissen über die Faltungszustände und -vorgänge hat auch einen beträchtlichen Einfluss auf die Herstellung von Antikörpern und deren Fragmente. Im ER, dem Synthesort von Antikörpern in Zellen des Immunsystems, werden immer wieder neue Proteine entdeckt, die mit der Assoziation und Faltung von disulfidverbrückten Proteinen, und möglicherweise direkt mit Antikörpern in Verbindung gebracht werden. In diesem Teil der Arbeit wurden Rückfaltungsassays verwendet, um Proteine auf ihre Katalyseeigenschaften zu untersuchen, die zum Teil in *in vivo* Studien von Kooperationspartnern entdeckt wurden.

#### **3.2.1. Renaturierung von oxidativ entfaltetem Fab**

Wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben, faltet denaturiertes oxidiertes Fab spontan in seine native Form mit Rückfaltungsraten von mehr als 50% zurück (Lilie et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde, um das System zu überprüfen, Fab in GdmCl denaturiert. Die Renaturierung erfolgte anschließend durch eine 1:100 Verdünnung des entfalteten Proteins in Renaturierungspuffer (0.1 M Tris/ HCl, pH 7.0). Die Rückfaltung erfolgte bei 16°C und wurde mittels ELISA überprüft. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, decken sich die hier gemessenen Ergebnisse mit früheren Beobachtungen.



#### Abbildung 27: Spontane Rückfaltung von Fab

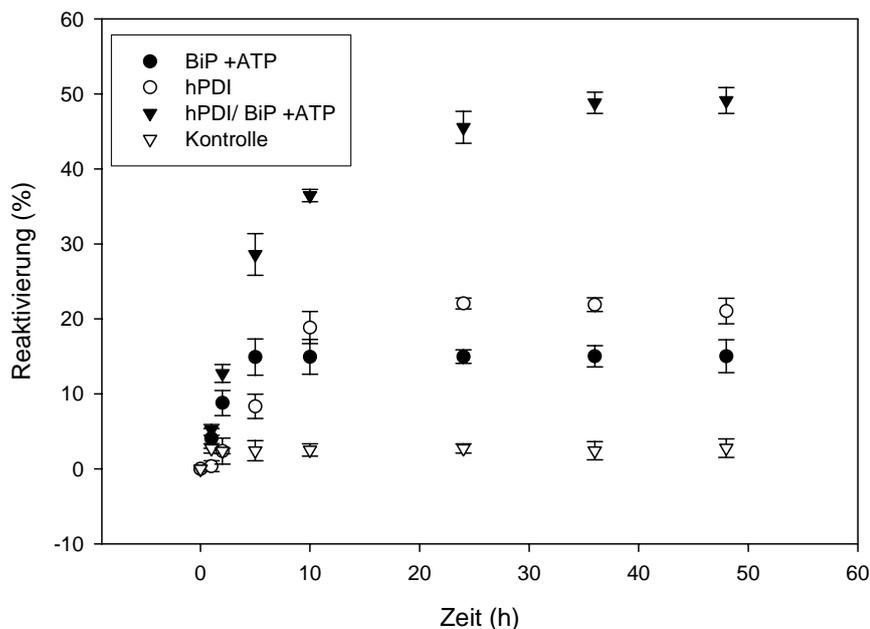
Fab (1 mg/ml) wurde in 6 M GdmCl, 0.1 M Tris/ HCl, pH 8.0 denaturiert. Die Renaturierung erfolgt nach 1:100 Verdünnung in 0.1 M Tris/ HCl, pH 7.0 bei 15°C bei einer Endkonzentration [Fab] von 0,2  $\mu$ M. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels ELISA auf ihre Aktivität untersucht.

#### 3.2.2. Renaturierung von reduziert entfaltetem Fab

Während oxidativ entfaltetes Fab spontan zurückfaltet, kann reduziert entfaltetes Fab kaum spontan zurückgefaltet werden (Lilie et al., 1994). Aufbauend auf der Doktorarbeit von Marcus Mayer (Mayer, 2003) wurde der Einfluss verschiedener Faltungshelfer auf die Rückfaltung von reduziertem, denaturiertem Fab untersucht. Die Reaktivierung wurde wie oben beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die Denaturierung zusätzlich unter Einfluss von 0,3 M DTE und die Renaturierung unter Zugabe von 6 mM GSSG stattfand. Unter diesen Bedingungen findet die Rückfaltung wesentlich langsamer statt, weshalb die Renaturierung über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet wurde. Wie bereits erwähnt, konnte unter diesen Bedingungen kaum spontane Rückfaltung beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für anschließende Versuche die Experimente von Lilie et al. (1994), Mayer (1999) und Mayer et al. (2000, 2004) wiederholt und bestätigt. In Anwesenheit von 3 mM DTT wurde hPDI etwa 10 min vor Beginn der Renaturierung aktiviert und unmittelbar vor Beginn der Reaktion dem Renaturierungspuffer zugesetzt. Fab kann in Anwesenheit von 0,5  $\mu$ M hPDI (entspricht einem molaren Verhältnis von hPDI/ Fab = 2,5:1) zu etwa 20 % reaktiviert werden.

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



**Abbildung 28: Einfluss von PDI und BiP und die Rückfaltung von reduziertem Fab**

Die Rückfaltung von Fab/red bei 16°C wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6 mM GSSG in Gegenwart von 3  $\mu\text{M}$  BSA, und einem ATP regenerierenden System bestehend aus 500  $\mu\text{M}$  ATP, 10 mM Phosphokreatin und 35 U/1 ml Kreatinphosphatase ( $\nabla$ ) (ohne ATP wurden die gleichen Ergebnisse erhalten); in Gegenwart von 2  $\mu\text{M}$  BiP und dem ATP regenerierenden System ( $\bullet$ ) (ohne ATP wurden die gleichen Ergebnisse erhalten); in Gegenwart von 0,5  $\mu\text{M}$  PDI ( $\circ$ ) und in Gegenwart von 2  $\mu\text{M}$  BiP, 0,5  $\mu\text{M}$  PDI und dem ATP regenerierenden System ( $\blacktriangledown$ ). Die Reaktivierung wurde über ELISA bestimmt.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich wird, lag die Reaktivierung in Gegenwart von BiP bei etwa 13%. Wurde dem Renaturierungsansatz gleichzeitig hPDI und BiP zugesetzt, so konnte eine Reaktivierung von knapp 50 % erreicht werden. In Anwesenheit von ATP ist ein synergistischer Effekt zu beobachten (Mayer et al., 2000). Das bedeutet, dass es sich nicht nur um einen additiven Effekt beider Faltungshelfer handelt, sondern um einen kooperativen. Kontrollexperimente mit ATP allein und dem ATP-regenerierenden System alleine sowie mit BSA und dem ATP regenerierenden System zeigten hingegen keinen Einfluss auf die Rückfaltung.

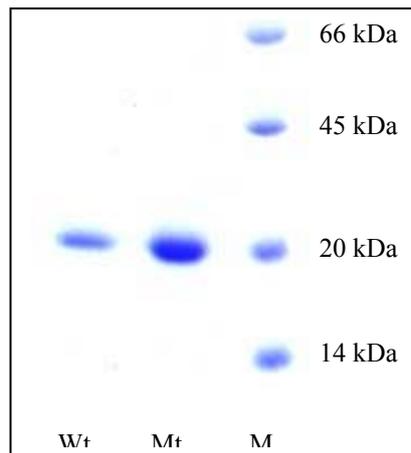
Mit Hilfe dieses sensitiven und spezifischen Assay können Proteine schnell auf eine mögliche Oxidoreduktasefunktion getestet werden. Unter anderem wurden ein ER-Protein mit weitestgehend unbekannter Funktion mit dem Namen smERp1 von I. Braakman (Utrecht, Holland) und ein neu entdecktes Protein aus dem ER des Menschen mit dem vorgeschlagenen

Namen LyTOR mit einem *in vivo* aktiven CXXC Motiv aus dem Labor von L. Hendershot (Memphis, USA) wurden in diesem Assay auf Ihre Wirkung untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von Calnexin als Teil der Qualitätskontrolle auf mögliche positive Effekte in diesem System getestet.

### **3.2.3. Renaturierung von reduziert entfaltetem Fab durch LyTOR**

Das ER-Chaperon BiP wird durch Cochaperone wie ERdj3. und BAP reguliert (Chung et al., 2002; Shen & Hendershot, 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diese und andere Chaperone einen Multiproteinkomplex im ER ausbilden, durch den eine wirkungsvolle Faltungsmaschine im ER aufgebaut wird. In diesem Komplex wurde im Labor von L. Hendershot ein Protein entdeckt, das voraussichtlich den Namen LyTOR tragen wird. Dieses Protein besitzt sechs konservierte Cysteine, u. a. in CXXC-Motiven. Während der Zelldifferenzierung wird dieses Protein stark hochreguliert (persönliche Information L. Hendershot). Es stellte sich die Frage, ob das Protein aufgrund des CXXC-Motivs Thioreduktase-Eigenschaften besitzt.

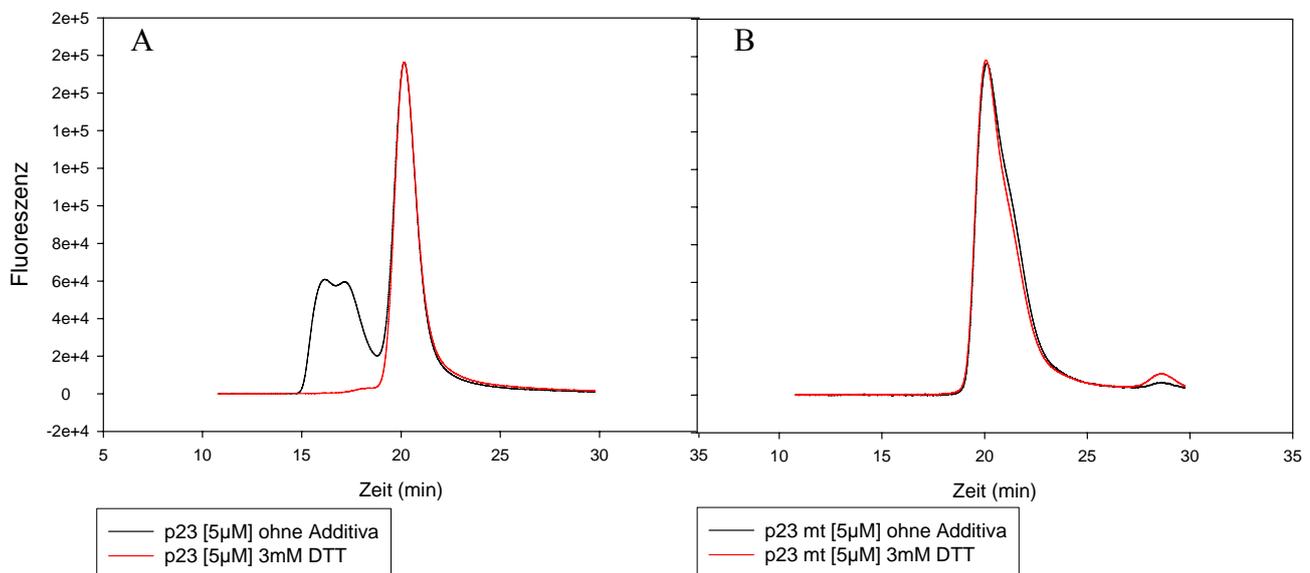
Zur Klärung dieser Frage wurde uns LyTOR (wt) und eine SXXS- Mutante in partiell gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Beide Proteine wurden durch präparative Gelfiltrationsläufe zur Homogenität gereinigt (Abbildung 29).



**Abbildung 29: SDS-PAGE nach Gelfiltration der beiden LyTOR-Varianten**

LyTOR Wildtyp (wt) und Mutante (Mt) wurden mittels Größenausschlußchromatographie aufgereinigt (4°C, 1 ml/min, SEC75). Der Reinheitsgrad wurde mittels 15%iger SDS-Page überprüft. Als Marker wurde ein RotiMark verwendet.

Der Oligomerisierungsgrad wurde mittels SEC-HPLC charakterisiert. Dazu wurden die Proteine unabhängig voneinander auf einer analytischen Gelfiltration (SEC75 HPR, GE Healthcare, München) untersucht. Die Proteine wurden in reduziertem, oxidiertem und unbehandeltem Zustand auf die Säule aufgetragen. Die Konzentrationen der Proteine auf der HPLC entsprachen denen, die auch anschließend im Rückfaltungsansatz eingesetzt wurde (5  $\mu$ M).



**Abbildung 30: Analytische Gelfiltration der beiden LyTOR- Varianten.**

(A) LyTOR Wildtyp. Die unbehandelte Variante eluiert nach 21 Minuten als Monomer. Weitere Oligomerisierungszustände sind bei Minute 16 und 17 zu sehen ( - ). Reduktion des Wildtyps führt zu Dissoziation oligomerer Spezies ( - )

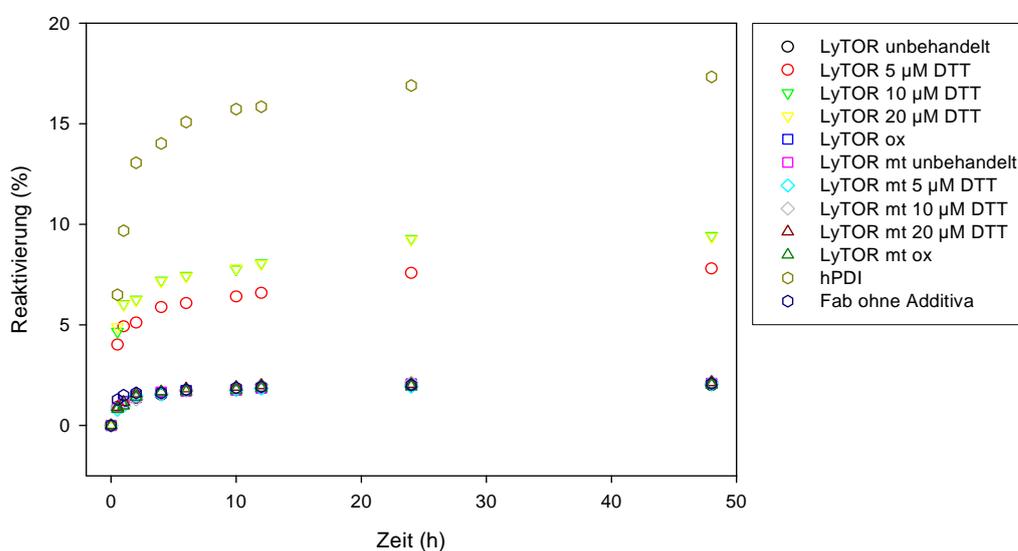
(B) LyTOR Mutante. Sowohl die unbehandelte als auch reduzierte Probe eluieren bei Minute 21 als Monomer. Weitere Oligomerisierungszustände sind nicht zu sehen. ( - und - ).

SEC75 HPR, Laufgeschwindigkeit: 0,5 ml/min; 5  $\mu$ M Protein / Auftrag, Größenabschätzung mittels HPLC-Eichstandard. Reduzierte Proteine wurden 30 Minuten vor jedem Lauf mit DTT inkubiert.

Abbildung 30 zeigt die Auswertung der analytischen Gelfiltration. Der Unterschied der beiden LyTOR-Varianten konnte hier verdeutlicht werden. Der Wildtyp wies im unbehandelten, wie auch im oxidierten (nicht gezeigt) Zustand das gleiche Laufprofil auf. Im Elutionsprofil erscheinen drei Peakssignale (Doppelpeak zwischen Minute 16 und 17, einfach symmetrischer Peak bei Minute 21). Wurde das Protein reduziert, konnte nur noch ein Peakssignal bei Minute 21 aufgenommen werden. Die Mutante mit dem veränderten Cysteinmotiv (Lys-Mutante) wies lediglich einen Peak auf, sowohl im unbehandelten, reduzierten und oxidierten (nicht gezeigt) Zustand auf.

Sowohl für Abbildung 30 A) als auch für B) konnten die Peaks bei einer Elutionszeit von 21 Minuten mit Hilfe des HPLC-Eichstandards dem Monomer zugeordnet werden. Im Fall des Doppelpeaks in Abbildung 30 A) entsprachen die Peaks nach einer Elutionszeit von 16 bzw. 17 Minuten einem Hexamer bzw. Tetramer.

Die beiden LyTOR- Varianten wurden anschließend im Rückfaltungsansatz auf ihre enzymatische Aktivität hin untersucht. Die Rückfaltungsbedingungen entsprachen den oben beschriebenen. Die Proteine wurden in Gegenwart von Reduktionsmitteln vor Beginn der Reaktion bei Raumtemperatur inkubiert und einer Verdünnung von 1:10 in der Reaktion eingesetzt, so dass die Endkonzentration während der Rückfaltung 0,5  $\mu\text{M}$  entsprach.



**Abbildung 31: Einfluss von LyTOR wt und mt auf die Rückfaltung von reduziertem Fab**

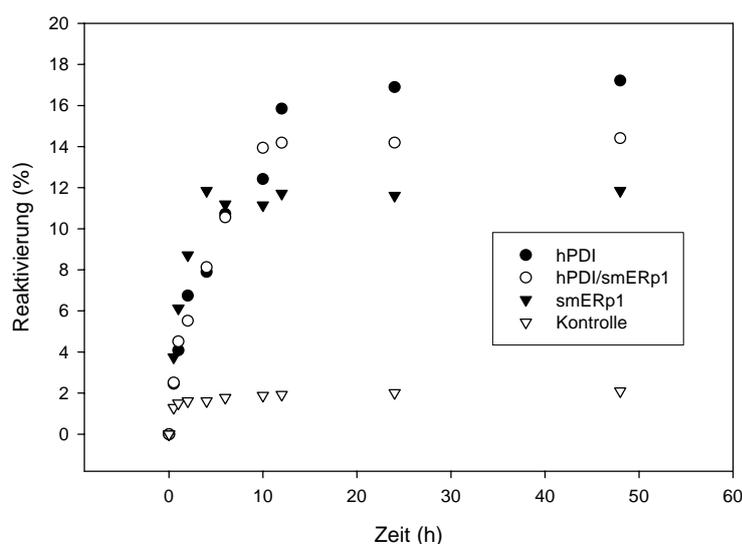
Die Rückfaltung von Fab/red bei 16 °C wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6mM GSSG. Proteine, die vor Beginn der Rückfaltung reduziert oder oxidiert wurden, wurden 30 Minuten vor Beginn der Reaktion bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Redoxäquivalent inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA.

Abbildung 31 zeigt die Auswertung des Rückfaltungsprozesses unter Einfluss von LyTOR. Während die Mutante weder in unbehandeltem, reduziertem noch oxidiertem Zustand die

Rückfaltung beeinflusst, unterstützt der Wildtyp die Reaktion in reduziertem Zustand. Als Kontrollen (Fab ohne Additiva, hPDI) wurden über den Zeitraum der Rückfaltung mitverfolgt. Da LyTOR anders als hPDI nur ein CXXC-Motiv besitzt, ist die Effizienz dieses Proteins möglicherweise deshalb im Vergleich geringer.

### 3.2.3. Der Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von Fab

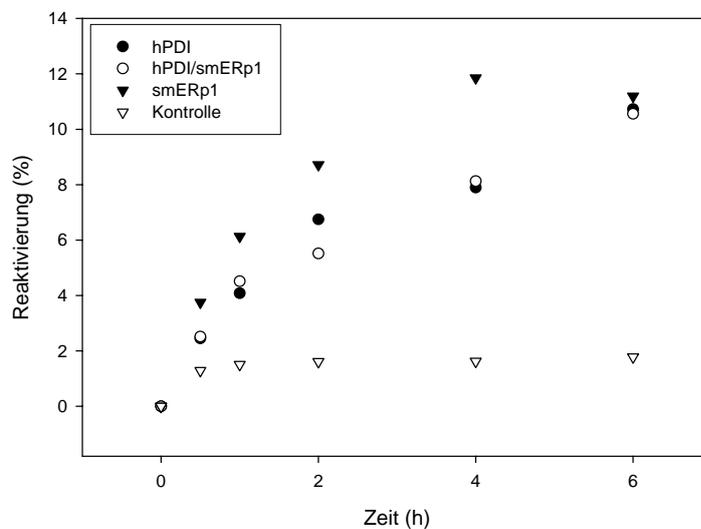
Das Protein smERp1 war bis zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Doktorarbeit noch nicht in der Literatur in Erscheinung getreten. Es wurde in I. Braakmans Arbeitskreis entdeckt. Die einzige Information, die bis dato vorlag, war dass es in Immunopräzipitationen mit Proteinen des Multichaperonkomplexes des ER detektiert werden konnte. Um zu bestimmen, ob das Protein die Fab-Reaktivierung unterstützt, wurde es in dem Rückfaltungsassay eingesetzt. Das Protein wurde im Reaktivierungsansatz in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  verwendet, und 30 Minuten vor dem Start der Reaktion mit 10 mM DTT reduziert. Als Kontrollen wurden die Rückfaltungen von Fab alleine und von Fab mit hPDI mitverfolgt. Zusätzlich wurde überprüft, ob smERp1 einen Einfluss auf die Aktivität von hPDI hat. Über Struktur, Aminosäureanzahl und Molekulargewicht von smERp1 lagen keine Daten vor. Über SDS-PAGE konnte eine Größe von ca. 20 kDa abgeschätzt werden (Daten nicht gezeigt). Eine ungefähre Konzentrationsabschätzung musste mittels Bradford erfolgen, da keine Daten zum Extinktionskoeffizienten vorlagen.



**Abbildung 32: Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von reduziertem Fab**

Die Rückfaltung von Fab/red bei 16 °C wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7.0, 6 mM GSSG. PDI und smERp1 wurden 30 Minuten vor Beginn der Reaktion mit 10 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA.

Wie in Abbildung 32 zu sehen, unterstützt smERp1 die Reaktivierung von Fab. Wurde smERp1 vor Beginn der Rückfaltung nicht mit DTT behandelt, konnte keine messbare Reaktivierungsteigerung gegenüber der Kontrolle (Fab alleine) gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Das Reaktivierungspotential von reduziertem smERp1 liegt in diesem Assay bei ca. 11,8%, somit knapp 7% unter dem von hPDI. In Kombination von smERp1 mit hPDI wurden ca. 14% Rückfaltungseffizienz erreicht. Allerdings scheint bei Betrachtung der Reaktivierung der ersten 6 Stunden ein deutlicher Unterschied zur Reaktivierung unterstützt durch hPDI vorhanden zu sein.



**Abbildung 33: Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von Fab**

Versuchsordnung wie in Abbildung 32, aber zeitlich nur über 6 Stunden aufgelöst

Die Aktivität von hPDI resultiert in einer Reaktivierung von ca. 10% nach sechs Stunden, also gut der Hälfte des nach 48 Stunden gemessenen Endwertes. Den gleichen Reaktivierungserfolg nach sechs Stunden sieht man in der Kombination von hPDI und smERp1. Nach 48 Stunden hingegen war diese Kombination der alleinigen Zugabe von hPDI um etwa 2,6% unterlegen, der von smERp1 alleine hingegen um 2,4% überlegen.

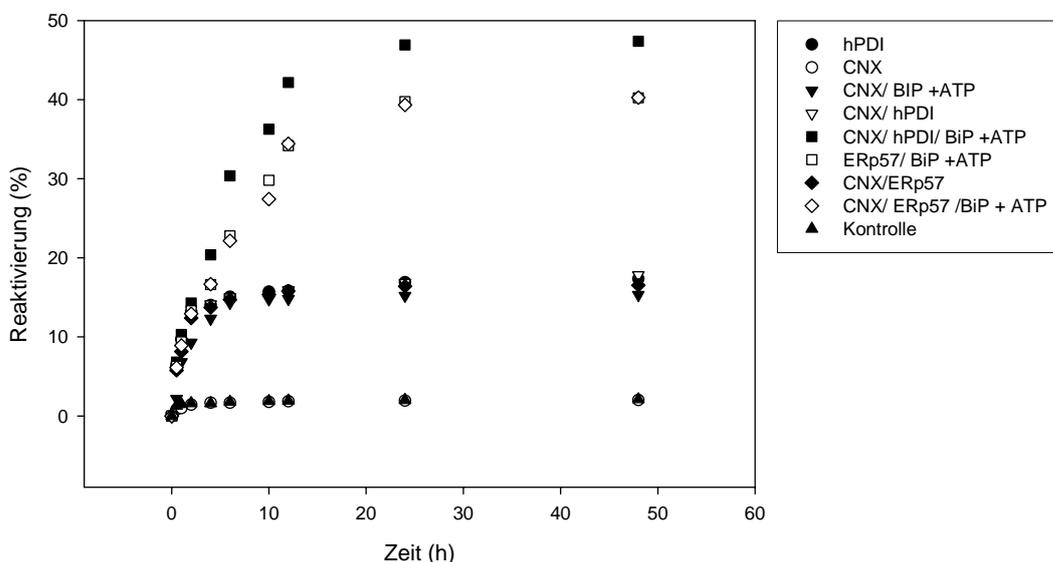
### 3.2.4. Der Einfluss von Calnexin und ERp57 auf die Rückfaltung von Fab

Calnexin (Cnx) ist ein membranständiges Lectin aus dem ER und Teil der primären Qualitätskontrolle (Herrmann et al., 1999). Neben einer Interaktion *in vivo* mit hPDI wird diesem Protein eine Wechselwirkung mit der zweiten prominenten Proteindisulfidisomerase in Eukaryonten, ERp57, zugewiesen (Oliver et al., 1999). Neben dem löslichen Calreticulin interagiert auch Calnexin mit monoglykosylierten Glykoproteinen (Hammond & Helenius,

1994), und somit mit nahezu allen im ER hergestellten Glykoproteinen. Als Chaperon und Teil der Qualitätskontrolle sollte die Funktion von Calnexin im Rückfaltungsansatz *in vitro* untersucht werden. Da es sich bei Cnx weder um eine ATPase noch um ein Protein mit CXXC Motiv handelt, sondern um ein Chaperon, das an der Retention oder Freisetzung eines Substratproteins beteiligt ist (Ellgaard & Frickel, 2003), und in dieser Funktion in Multiproteinkomplexen in Kontakt steht, ist eine Interaktion mit der Proteindisulfidisomerase ERp57 durchaus auch *in vitro* denkbar (Williams, 2006).

ERp57 ist eine der beiden prominenten Proteindisulfidisomerasen im ER von Eukaryonten. Es unterscheidet sich strukturell von hPDI lediglich in einem sauren C-Terminus. In der Doktorarbeit von Dr. Marcus Mayer (Mayer, 2003) konnte bereits gezeigt werden, dass ERp57 nahezu den gleichen Effekt wie hPDI auf die *in vitro* Reaktivierung von Fab hat.

Nach Expression und Reinigung (vgl. 2.5.7.3) konnte Calnexin im Rückfaltungsansatz eingesetzt werden. ERp57 wurde von Marcus Mayer (TU München) aufgereinigt. Der Rückfaltungsansatz wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Cnx wurde als GST-Fusion in einer 1:1 Stöchiometrie zu ERp57 eingesetzt (s. oben). Vor Beginn der Reaktion wurde ERp57 30 Minuten mit 10 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert, und direkt vor dem Start der Reaktion zugesetzt.



**Abbildung 34: Einfluss von Cnx auf die Rückfaltung von Fab**

Die Rückfaltung von Fab/red bei 16°C wurde gestartet durch 1:100 Verdünnung in 0,1 M Tris pH 7,0, 6 mM GSSG und im Fall der BiP (2 µM). Cnx wurde in äquimolarer Konzentration eingesetzt (2 µM); hPDI wurde 30 Minuten vor Start der Reaktion mit 10 mM DTT reduziert; Endkonzentration hPDI = 0,5 µM. Die Reaktivierung wurde über ELISA bestimmt.

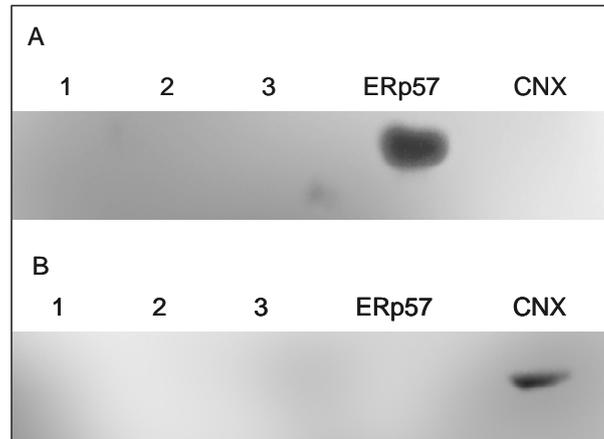
Abbildung 34 zeigt, dass Cnx im Rückfaltungsassay keinerlei Auswirkung auf das System hat. Die Reaktivierungsraten von Fab verändern sich nicht durch die Zugabe von Cnx, alleine

oder in Kombination mit BiP und/ oder hPDI oder ERp57. Nicht gezeigt sind Bedingungen mit Cnx und BiP ohne ATP, da sich auch diese Ergebnisse verglichen mit den Experimenten mit BiP alleine nicht unterscheiden (vgl. Abbildung 28).

Interessant in diesem Zusammenhang scheint, dass zwischen BiP und ERp57 (~38% Reaktivierung) nicht der für BiP und hPDI (~49% Reaktivierung) beschriebene synergistische Effekt vorliegt, sondern lediglich ein additiver (Mayer et al., 2004; Mayer et al., 2000).

Um die *in vivo* beschriebene Partnerschaft von Cnx und ERp57 für die *in vitro* Ansätze zu überprüfen wurden Immunopräzipitationen (IP) durchgeführt, um festzustellen ob Cnx mit ERp57 in stabile Wechselwirkungen treten kann.

Dazu wurden ca. 10 µg von Cnx und ERp57 gemischt und unter physiologischen Pufferbedingungen (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Die IP wurde (entsprechend Punkt 2.4.10.) bei 0°C, 25°C und 30°C für 30 Minuten Inkubationzeit durchgeführt. Je nach Interaktionspartner und verwendetem Antikörper wurde dem Ansatz Protein-A oder G-Sepharose zugegeben. Zur Detektion wurde ein Westernblot durchgeführt, bei dem der jeweils andere Interaktionspartner mittels spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden sollte. Die entsprechenden SDS-Gele waren 12,5%ig, als Längenstandard wurde RotiMark (Roth, Karlsruhe) verwendet.

**Abbildung 35: Immunopräzipitation von ERp57 und Cnx**

Die Wechselwirkung zwischen Cnx und ERp57 wurde in zwei unabhängigen Immunopräzipitationen untersucht. A) ERp57 spezifische Detektion, Cnx wurde mittels Anti-GST-Antikörper an Protein-G-Sepahrose gekoppelt. Der Nachweis für ERp57 mittels Anti-His<sub>6</sub>-POD Konjugat war negativ

B) Cnx spezifische Detektion, ERp57 wurde mittels Anti-His-Antikörper an Protein-A-Sepahrose gekoppelt. Der Nachweis für Cnx mittels Anti-GST-Antikörper und anschließender POD-Reaktion war negativ.

Die Positivkontrollen in beiden Fällen waren positiv.

Je 20 µg von ERp57 und Cnx wurden für die Inkubation eingesetzt bei 1) 4°C, 2) 25°C und 3) 30°C.

Abbildung 35 zeigt das Ergebnis der Immunopräzipitationen zwischen ERp57 und Calnexin. Es konnte keine Interaktion zwischen den beiden Proteinen festgestellt werden. Auch mittels anderer Methoden (HPLC, Biacore) konnten keine Wechselwirkungen beider Reaktionspartner beobachtet werden.

### 3.2.5. Diskussion der *in vitro* Rückfaltung 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 & Lodish, 1979). Dabei interagieren die Antikörperketten mit PDI, welche die Bildung und Isomerisierung der Disulfidbrücken katalysiert (Freedman & Nadler, 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 Cysteinreste von Ig und anderen im ER gebildeten Proteinen länger für PDI zugänglich zu halten (Knarr *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurden deshalb Experimente durchgeführt, die die Rolle von BiP und hPDI bei der Antikörperfaltung weiter aufklären sollten. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass BiP und hPDI einen synergistischen Effekt bei der Rückfaltung des Fab-Fragments haben. Dieser Effekt ist bei BiP und ERp57, der anderen im menschlichen ER befindlichen Oxidoreduktase nicht zu finden und lediglich additiv (Mayer *et al.*, 2004). Das bedeutet, dass sich die positiven Effekte der beiden Proteine lediglich ergänzen, der Prozess aber nicht kooperativ zu sein scheint.

Ein bisher nicht beschriebenes Enzym, LyTOR, mit dem für PDIs typischen CXXC- Motiv, wurde, verglichen mit einer Cysteinmutante, auf seine Oxidoreduktaseeigenschaften hin untersucht. *In vivo* Experiment haben dargelegt, dass es in der Zelle im oligomeren Zustand an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt ist. HPLC-Experimente haben bestätigt, dass der Wildtyp in verschiedenen Oxidationsstufen in unterschiedlichen Oligomerisierungsstufen vorliegen kann. In den Rückfaltungsansätzen von Fab zeigte die Lys-Mutante erwartungsgemäß weder in unbehandeltem, reduzierten oder oxidierten Zustand Aktivität in der Fab- Reaktivierung. Der LyTOR- Wildtyp unterstützte jedoch im reduzierten Zustand die Rückfaltung von Fab. Der Oligomerisierungszustand *in vitro* und *in vivo* scheint sich dabei zu unterscheiden (mündliche Mitteilung Yuichiro Shimazu, L. Hendershots Arbeitskreis). Ein kooperativer Effekt mit BiP, wie es für hPDI beschrieben ist (Mayer *et al.*, 2000), war nicht festzustellen. Um weiter in die Funktionsweise von LyTOR Einblick zu erhalten, sollten auch hier Redox titrationen durchgeführt werden. Ebenso sollte der Einfluss auf das oxidativ entfaltete Fab-Fragment getestet werden. Auch ist noch nichts über eine Spezifität des

Proteins bekannt So ist nicht klar, ob das Protein einen positiven Einfluss nur auf bestimmte oder alle reduzierten Cysteine des Substrats ausübt.

Da zum Zeitpunkt dieser Doktorarbeit wenig über das Protein bekannt war (u. a. kein Eintrag bei [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) kann über die eigentliche Funktion lediglich spekuliert werden. Da es Teil des Multichaperonkomplexes im ER zu sein scheint, besitzt dieses Protein möglicherweise lediglich unterstützende Aufgaben. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass LyTOR in Immunopräzipitationen (durchgeführt durch Yuichiru Shimazu, L. Hendershott's Arbeitskreis) und während der Gelfiltrationsläufe in Anwesenheit von DTT in monomeren Zustand war, *in vivo* befindet sich das Protein unter diesen Bedingungen allerdings auch in multimerem Zustand. Dieser *in vitro* Zustand ist dementsprechend auch für die Rückfaltungsansätze anzunehmen, da das Protein hierfür entsprechend den HPLC-Experimenten behandelt wurde. Das bedeutet, dass LyTOR in diesen *in vitro* Experimenten nicht die gleiche Aktivität (~8%) wie die von hPDI (~18%) erreichen würde. Nichts destotrotz zeigt LyTOR eine CXXC-motivabhängige Induktion der Rückfaltungsaktivität, wodurch anzunehmen ist, dass das Protein als Oxidoreduktase agieren kann.

Das Enzym smERp1 von I. Braakmans' Arbeitskreis, das im Rahmen einer Kooperation in Rückfaltungstests eingesetzt wurde, ist in der Lage, die frühe Phase der Fab-Rückfaltung zu beschleunigen, ist aber in der Endeffizienz hPDI unterlegen. Im Zusammenspiel der beiden Proteine ist eine negative Kooperativität zu beobachten. Das Enzym smERp1 inhibiert die positiven Effekte der hPDI, da sich möglicherweise beide Proteine bei der Reaktivierung in den gerade nötigen Redox-Zustand behindern.

Die Zugabe von reduziertem smERp1 resultierte in den ersten vier Stunden in einer erheblichen gesteigerten Reaktivierungsgeschwindigkeit. Entsprechend Abbildung 33 lag diese gesteigerte Geschwindigkeit bei ca. 30% gegenüber hPDI nach 4 Stunden, allerdings war zu diesem Zeitpunkt dann auch die maximale Reaktivierungsunterstützung durch smERp1 erreicht. Nach spätestens zehn Stunden wurde hPDI in der Kombination anscheinend durch smERp1 gehemmt (Abbildung 32). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reaktivierung durch smERp1 *in vitro* einen der durch hPDI katalysierten Reaktion zeitlich vorgeschalteten Prozess darstellt. Die Inhibierung von hPDI könnte bedeuten, dass der Wechsel von reduziertem zu oxidiertem Zustand in den katalytisch aktiven CXXC-Motiven beeinträchtigt ist, z.B. durch Ausbildung von Disulfiden zwischen den beiden Proteinen. Die katalytisch höhere Anfangsgeschwindigkeit von smERp1 wiederum deutet darauf hin, dass das katalytische Zentrum dieses Proteins schneller wieder in den aktiven Ausgangszustand zurückkehrt.

Leider konnten keine weiteren Messungen unter unterschiedlichen Bedingungen getestet werden, wie z.B. Veränderung der Redoxbedingungen im reduzierenden Bereich während der Inkubation oder unterschiedliche Konzentrationen von smERp1, da zu wenig Protein zur Verfügung stand.

Die für *in vivo* Experimente beschriebenen Wechselwirkungen von Cnx und ERp57 (Ellgaard & Frickel, 2003) haben sich hier, weder für die Fab-Rückfaltung noch in Interaktionsmessungen, bestätigt. Ein direktes Wechselspiel der beiden rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteine konnte weder in Immunopräzipitationen (Abbildung 35) noch bei HPLC-Experimenten (nicht dargestellt) gezeigt werden. Da Cnx *in vivo* mit glykosyliertem Proteinen interagiert (Ellgaard & Helenius, 2001), ist eine Interaktion *in vitro* kaum denkbar, da rekombinantes ERp57 und auch Fab zum Einen keine Zuckerreste trägt und zum Anderen die im IgG normalerweise glykosylierte C<sub>H</sub>2- Domäne (Abbildung 2) fehlt. David Williams Arbeitskreis hat *in vivo* Aktivitäten mit diesem Cnx-Konstrukt publizieren können, allerdings wird es löslich in *E. coli* exprimiert, ist aber *in vivo* membranständig (Danilczyk & Williams, 2001; Williams, 2006; Zhang et al., 2006). Möglicherweise können Wechselwirkungen auch nicht festgestellt werden, da diese Membranständigkeit oder die zuständige Domäne für Interaktionen mit PDI, ERp57 und/ oder Fab unbedingt von Nöten ist (Zhang et al., 2006). Im Zusammenhang mit der Rückfaltung, unterstützt durch ERp57 und BiP, konnte kein synergistischer Effekt festgestellt werden, wie er für BiP und hPDI festgestellt wurde (Mayer et al., 2000). Strukturell unterscheiden sich hPDI und ERp57 dadurch, dass ERp57 C-terminal über einen sauren Aminosäureanteil verfügt (Oliver et al., 1999). Möglicherweise ist dieser fehlende Teil der Grund für die Kooperativität von BiP und hPDI, bzw. der Grund der Interaktion der Lectine mit ERp57 und nicht, soweit beschrieben, mit hPDI (Ellgaard & Frickel, 2003). Um diese Frage zu lösen, müssten Bindungsstudien, z. B. durch Anisotropie, HPLC-Experimente oder Biacore, der jeweiligen Faltungshelfer, u.a. in Anwesenheit von Substraten oder Substratpeptiden, durchgeführt werden.

Als Problem für die angeführten Versuche könnte sich der an Calnexin befindliche GST-tag erweisen, der eine Interaktion zwischen Calnexin und ERp57 negativ beeinflussen könnte. Da aber für diese Immunopräzipitationen kein Cnx-spezifischer Antikörper vorlag, musste Cnx über einen GST-spezifischen Antikörper an die Trägermatrix gekoppelt werden.

Möglicherweise muss die Bindung von Cnx an ERp57 aber auch induziert werden, durch ein drittes Molekül, z. B. ein Immunglobulin. Die Proteinkonzentration *in vivo* im ER liegt, wie bereits erwähnt, bei >100 mg/ml, in Antikörper produzierenden Zellen sogar noch weitaus höher (Ellgaard & Helenius, 2001). Sollte die Komplexierung von ERp57 und Cnx ein

konzentrationsabhängiger Prozess sein, noch dazu unter Stressbedingungen, ist die Immunopräzipitation ausgehend von einer *in vitro* Inkubation im ERG mit 200 – 300 µg / ml nicht die geeignete Methode um diese Interaktion festzustellen.

Um den Einfluss dieser und anderer ER-präsentier Faltungshelfer weiter analysieren zu können, müsste die Rückfaltung eines vollständigen Immunglobulins gelingen, das möglicherweise an der C<sub>H2</sub> Domäne glykosyliert vorliegt. Weitere Untersuchungsmethoden, wie z.B. Anisotropie, könnten dabei auch helfen, potentielle Wechselwirkungen aufzudecken. In einigen Immunopräzipitationsexperimenten mit ER-resindeten Chaperonen wurde deutlich, dass die Proteine mit der Zuckermatrix der Antikörper (Protein- A/G- Sepharose/ Agarose; Daten nicht gezeigt) interagiert, so dass Auswertungen nicht möglich waren.

Allerdings könnten die Ergebnisse dieses Kapitels auch darauf deuten, dass die Rückfaltung eines gesamten Immunglobulins bisher nicht gelang, gerade weil die Anwesenheit eines Lectins für eine solche Applikation von Nöten ist. Bisher gibt es zwar keine Evidenzen, dass Lectine auch mit Antikörpern interagieren, jedoch sind diese eben auch glykosyliert, was die Voraussetzung für eine solche Interaktion darstellt (Ellgaard et al., 2004). *In vivo* zumindest funktioniert ein Großteil Qualitätskontrolle über die Glykosylierung vom Substrat (Ellgaard & Helenius, 2001). Zudem ist die Proteinkonzentration im ER weitaus höher als die in den Rückfaltungsansätzen (Faktor 1000), in Antikörper produzierenden B-Zellen sogar noch höher (Ellgaard & Helenius, 2001; Ellgaard & Frickel, 2003). Des Weiteren muss eine bestimmte Mindestmenge der leichten und schweren Kette im ER *in vivo* vorhanden sein (Knarr et al., 1995), damit der Ig- Faltungsprozess erfolgreich abläuft. Und um den Einfluss der Lectine *in vitro* zu untersuchen mag es sinnvoller sein, das Cnx verwandte Calreticulin in diesen Experimenten einzusetzen (Williams, 2006), da es in löslicher Form im ER vorliegt. Alles in Allem müssen sind die Rückfaltungsexperimente unter Einbezug der gesamten Faltungsmaschinerie in vielen Punkten variiert werden, um weitere Einflüsse, die diesen Prozess unterstützen, abzudecken.

Für die Analyse ER-residenter Chaperone und Oxidoreduktasen ist diese Rückfaltungsmethode sehr gut geeignet, da sich die Reaktion unkompliziert darstellen lässt, es sich um ein offenes System handelt und kaum volumenbeschränkt ist. Es lassen sich beliebig viele Komponenten hinzufügen, die Konzentrationen der Teilnehmer sind frei variabel, die Redoxbedingungen sind beliebig einstellbar und unspezifische Proteininteraktionen beeinflussen die Reaktion nicht.

### 3.3. Charakterisierung von Grp94

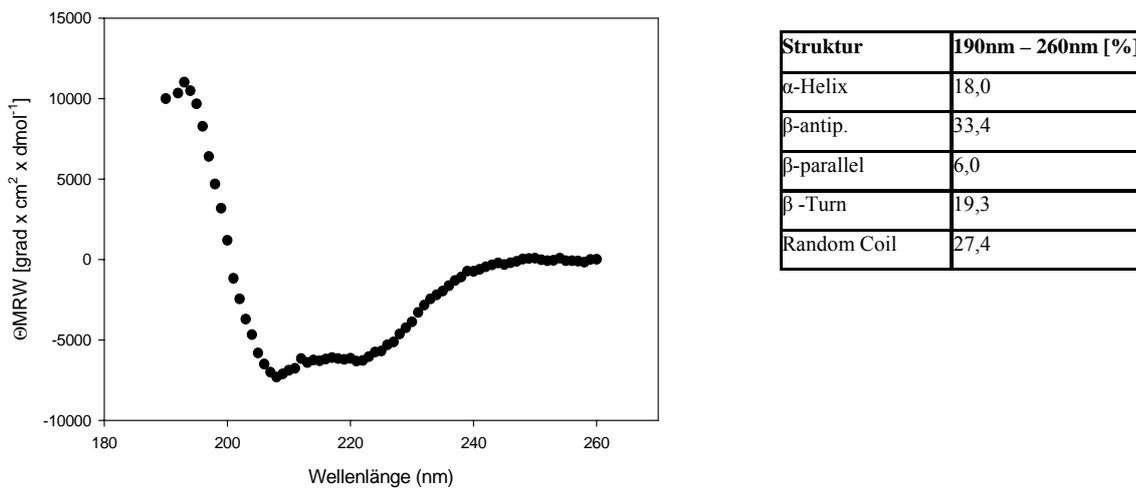
Grp94 ist das ER-residente Paralog der Hsp90-Chaperonfamilie. *In vivo* unterstützt es die Reifung und Faltung von Immunglobulinen oder dem Toll-like Rezeptor (Melnick et al., 1992). Grp94 unterscheidet sich primär von anderen Mitgliedern der Hsp90-Familie v.a. durch die Lokalisation und des dadurch bedingten Redox-milieus. Die Aktivität des molekularen Chaperons Grp94 aber wird ähnlich wie bei den anderen Mitgliedern der Hsp90 Familie durch einen ATP-abhängigen Zyklus reguliert (Soldano et al., 2003). Die Bindung von ATP und ADP erfolgt im N- terminalen Bereich des Proteins (Immormino et al., 2004; Soldano et al., 2003). Ob das Protein ATP nur bindet oder auch hydrolysiert, ist noch unklar (Li & Srivastava, 1993). Deshalb sollten in diesem Teil Untersuchungen bezüglich der Grp94-Nukleotidbindung, des ATPase Zyklus und der Chaperonaktivität durchgeführt werden.

#### 3.3.1. Sekundärstruktur und thermische Stabilität von Grp94

Nach Expression, Reinigung und positiver Detektion mittels Westernblot (vgl. 2.5.7.1), sowie massenspektrometischer Analyse, konnte Grp94 proteinchemisch charakterisiert werden. Dem für die folgenden beschriebenen Versuche verwendeten Grp94 fehlt die ER-Lokalisationssequenz, wodurch sich ein molekulare Masse von 90221 Da ergibt.

Um Informationen über die Struktur und Oligomerisierung zu erhalten, wurden CD- und fluoreszenzspektroskopische Methoden, sowie später beschrieben HPLC- und Sedimentations-Experimente mittels analytischer UZ durchgeführt.

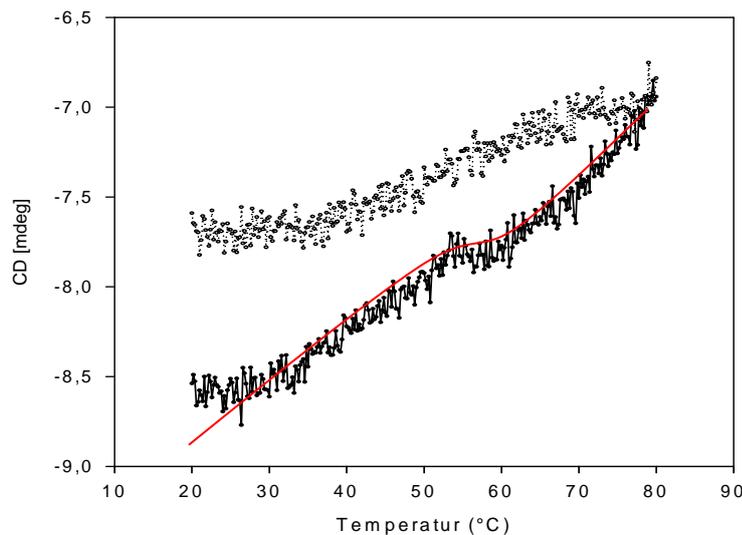
Für die CD-Spektroskopie (vgl. 2.6.3.) wurden 0,26 mg/ml in 10 mM Natriumphosphatpuffer eingesetzt. Das Spektrum wurde bei 20°C 15 mal akkumuliert, und anschließend mit dem Computerprogramm CDNN auf Sekundärstrukturanteile analysiert. Dieses Programm gibt anhand von Vergleichsdaten Auskunft Verteilung von Sekundärelementen.



**Abbildung 36: FernUV- CD Spektroskopie von GRP und Auswertung mittels CDNN**

Grp94 wurde in 10 mM Natriumphosphatpuffer bei 20°C mit 0,26 mg/ml mittels CD-Spektroskopie auf Sekundärstrukturanteile untersucht. Das Spektrum zeigt die Mittelung von 15 Akkumulationen. Die Tabelle gibt Auskunft über die prozentuale Verteilung von Sekundärstrukturelementen, errechnet mittels CDNN

Das FernUV-CD Spektrum (Abbildung 36) zeigt zwei lokale Minima bei 220 nm und 207 nm, und ein Maximum bei 193 nm. Die Auswertung lässt auf einen hohen Anteil  $\alpha$ -helikaler Bereiche schließen. Mit Hilfe des Programms CDNN konnten  $\alpha$ -helikale Strukturanteile von ca. 18% zugeordnet werden. Das lokale Minimum bei ca. 220 nm wurde für die Untersuchung der thermischen Stabilität für den Messbereich zwischen 20°C bis 80°C im FernUV-Bereich der CD-Spektroskopie verwendet.



**Abbildung 37: CD- Temperaturübergang von Grp94**

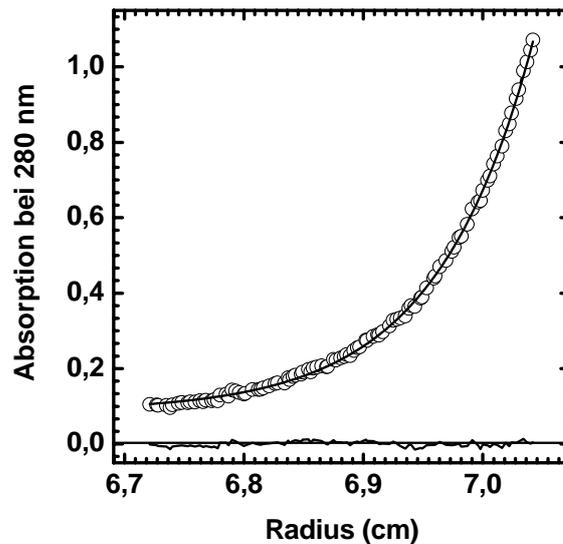
Grp94: 0,26 mg/ml; 10 mM Natriumphosphatpuffer Aufheizrate 10°C/h; Aufgenommen wurde bei 220 nm. (Rot: nicht lineare Regression). Durchgezogen Linie entspricht der thermischen Denaturierung, die gepunktete der thermischen Renaturierung.

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) von Grp94 liegt bei ca. 56°C, und die thermische Entfaltung ist nicht reversibel. Die Messungen wurden auch bei anderen Wellenlängen (207 nm und 193 nm) mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt. Anschließende ATPase-Aktivitätstests haben gezeigt, dass das Protein nach dem Versuch der Rückfaltung nach thermischer Entfaltung irreversibel inaktiv ist (Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit dem cytosolischen Hefe-Hsp90 (Scheibel et al., 1998; Jakob et al., 1995) liegt die  $T_m$  von Grp94 ca. 6°C tiefer.

### 3.3.2. Untersuchung der Quartärstruktur und des Faltungszustands von Grp94

Grp94 ist als aktives Protein als Dimer beschrieben, dessen Dimerisierungsstelle, wie bei cytosolischem Hsp90, im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist (Wearsch & Nicchitta, 1997; Minami et al., 1994). Um dies anhand des hier isolierten Grp94 zu untersuchen, wurde die Oligomerisierung mittels Gleichgewichtszentrifugation untersucht. Dazu wurden 5µM Grp94 und über 48 Stunden bei 8500 g 5°C zentrifugiert.

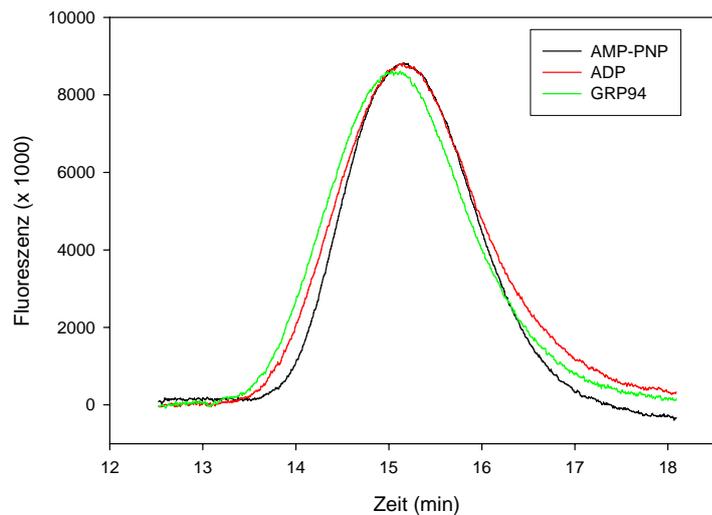


**Abbildung 38: Gleichgewichtszentrifugation von Grp94**

Die Detektion des Proteins erfolgte über UV-Absorption bei 280 nm. Die Laufgeschwindigkeit war 8500 g bei 5°C und es wurde ein Ti60-Rotor verwendet. Als Puffer wurde PBS, pH 7,5 benutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Softwarepakets Origin. In der Abbildung ist der Konzentrationsgradient gezeigt. Im unteren Teil der Graphik sieht man die Abweichung der Messwerte der Kurve, die durch die Datenanalyse erzeugt wurden.

Aus den Daten der Gleichgewichtszentrifugation ließ sich ein Molekülmasse von 179 900 Da errechnen (Abbildung 38). Dieser Wert entspricht mit einer Abweichung von 400 Dalton der Größe zweier Monomere. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass Grp94 in dieser Konzentration als Dimer vorliegt.

Des Weiteren wurde die Quartärstruktur in Gegenwart von Nukleotid untersucht. Dabei wurde das ATP-analog AMP-PNP verwendet, das an Stelle der Phosphorsäureanhydridbindung zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ - Phosphat des ATP eine Diimidbindung aufweist, die die Hydrolyse durch ATPasen nahezu ausschließt. Diese Analyse erfolgte zunächst über HPLC- Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden 5  $\mu$ g des Proteins auf eine Superdex 200 HR-Säule aufgetragen und die Elutionszeit mit Hilfe von Fluoreszenzdetektion bestimmt. Im Fall des nukleotid-gebundenen Proteins wurde Grp94 15 Minuten vor dem Auftrag auf die Säule mit 0,5 mM des jeweiligen Nukleotids bei Raumtemperatur inkubiert



**Abbildung 39: HPLC von Grp94 in nukleotid-gebundener und -ungebundener Form**

Das Laufverhalten der Proteine wurde über Fluoreszenzdetektion verfolgt. Dazu wurde eine Anregungswellenlänge von 280 nm und eine Emissionswellenlänge von 340 nm verwendet. Es wurde der HKM Laufpuffer verwendet. Gezeigt sind die Läufe von Grp94 (—), Grp94 mit ADP (0,5 mM) (.....) und Grp94 mit AMP-PNP (0,5 mM) (—). Die Flussrate betrug 0,4 ml/min.

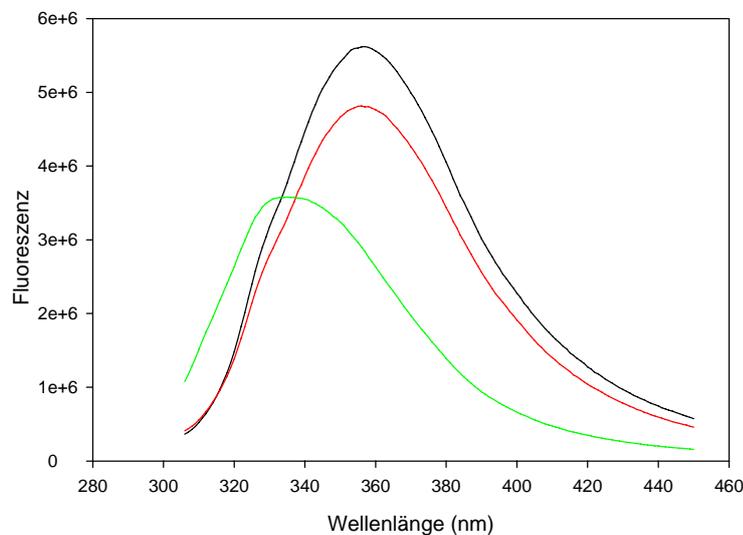
Die unterschiedlichen Formen von Grp94 eluierten ausschließlich als symmetrische Peaks, was darauf hinwies, dass sie eine definierte Quartärstruktur aufweisen (Abbildung 39). Die Elutionszeit von 15,19 Minuten für die Nukleotid ungebundene Spezies und 15,21 Minuten für die Nukleotid gebundenen Spezies deuteten im Vergleich mit HPLC- Eichstandards auf ein Molekulargewicht von über 480 kDa hin. Dies liegt außerhalb der Ausschlussgröße einer Superdex 200 HPR, stand aber in Einklang mit Daten von Hsp82 (Elution bei ca. 430 kDa, Monomer ~82 kDa; Richter, 2004). Das errechnete Molekulargewicht dieser Grp94 Spezies liegt, wie bereits erwähnt, bei 90 221 Da für das Monomer und bei ca. 180 000 Da für das Dimer, und somit ca. 300 kDa unter der Größe, die aus den HPLC-Daten resultierte. Ähnliche Daten konnten durch dynamische Lichtstreuung gewonnen werden. Auch hier erschien die nukleotidgebundene Spezies von Grp94 kleiner als die freie: Auch bei dieser Methode wurden sehr große Diffusionskoeffizienten errechnet, die für Molekulargewichte sprächen, die weit über den dimeren Formen liegen (Daten nicht gezeigt).

Zwischen den nukleotidgebundenen und freien Spezies war nur ein kleiner Unterschied in der Elutionszeit zu erkennen, der möglicherweise auf eine räumliche Strukturveränderung, verursacht durch Nukleotidbindung (Dollins et al., 2005), hinweist.

Grp94 besitzt laut Swissprot-Datenbank ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen den beiden Monomeren an der Stelle 138 im oxidierten Zustand. Die Existenz dieser Disulfidbrücke ist nach wie vor umstritten (Immormino et al., 2004). Deshalb

sollten mittels Fluoreszenzspektroskopie Einblicke über Faltungszustände in diesem Protein gewonnen werden.

Zu diesem Zweck wurden Grp94 in nativem, denaturiertem und denaturiert, reduziertem Zustand bei einer Anregungswellenlänge von 295nm und einem Emissionsmessbereich von 305nm – 450 nm in einem Fluoromax-2 (Jobin Yvon, Grasbrunn) untersucht. Das Protein wurde in Anwesenheit von 6 M GdmCl denaturiert oder zusätzlich mit 10 mM DTT reduziert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert., bevor anschließend die Fluoreszenzspektren gemessen wurden.



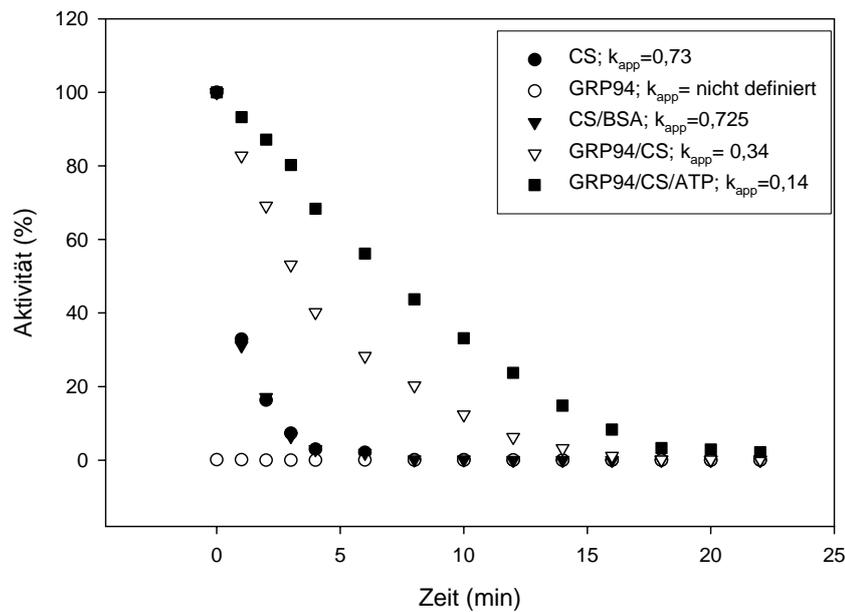
#### Abbildung 40: Fluoreszenzspektroskopie von Grp94

Eingesetzt wurden 1  $\mu$ M Grp94 bei 30°C; 50 mM Hepes, 150 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub> (nativ       ), in Gegenwart von 6 M GdmCl (denaturiert       ); zusätzlich mit 10mM DTT reduziert (      ), Spektren sind pufferkorrigiert, 15 mal akkumuliert.

Abbildung 40 zeigt das Spektrum von nativem, denaturiertem und denaturiert reduziertem Grp94. Das Maximum für den nativen Zustand lag bei 340 nm, und wurde durch Denaturierung zu 360 nm verschoben. Zu dieser Signalverschiebung tragen die Tryptophanreste von Grp94 bei, die durch das Lösungsmittel (6 M GdmCl) exponiert werden. Durch die Reduktion und die dadurch bedingte mögliche Spaltung des Disulfids konnte das Signal weiter ansteigen, da dadurch Tryptophane noch weiter dem Lösungsmittel ausgesetzt werden konnten. Da in der direkten Nachbarschaft des Cysteins 138 keine Tryptophane sind, ist dieser Effekt möglicherweise geringer als bei vergleichbaren Experimenten mit einem Immunglobulin, für das solche Effekte beschrieben sind (vg. 3.1.7.). Allerdings ist der Effekt des reduzierten Antikörpers auch deshalb wesentlich größer, da dort im vollständig gefalteten Ig-Molekül bis zu 16 inter- und intramolekulare Disulfide vorzufinden sind, und nicht nur die eine mögliche bei Grp94.

### 3.3.3. Die Chaperonaktivität von Grp94

Grp94 ist das Paralog von Hsp90. Die Sequenzhomologie zu z.B. Hsp82, dem Hsp90-Homolog der Hefe zeigt eine Übereinstimmung von über 60% auf (Sequenzvergleich über ClustalW, [www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw), Daten nicht gezeigt). In ihrer Funktion als Chaperone haben die Mitglieder der Hsp90-Familie die Aufgabe nicht-native Proteine zu stabilisieren (Panaretou et al., 1998). Eine Möglichkeit, die Aktivität von Chaperonen *in vitro* zu testen, stellt der Citratsynthase-Inaktivierungsassay dar. Citratsynthase (CS) katalysiert die Reaktion von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat und CoA. Die Aktivität kann dann kalorimetrisch mittels DTNB nachgewiesen werden, da DTNB mit den freien Thiolgruppen von Acetyl-CoA reagiert. Diese Interaktion kann photometrisch bei 412 nm beobachtet werden (vgl. 2.4.12). Citratsynthase wurde bei 25°C vorinkubiert und die Aktivität gleich 100% gesetzt. Die Inaktivierung wurde durch Inkubation bei 43°C im Wasserbad gestartet. Während der Inaktivierung wurden über die Zeit Proben entnommen und deren Aktivität zu bestimmt. Um zu testen ob Grp94 einen Effekt auf die Inaktivierung von CS ausübt, wurden vor dem Inaktivierungsstart Grp94 oder Grp94 mit ATP zugegeben. Zur Kontrolle wurden Grp94 ohne CS und CS zusammen mit ATP eingesetzt, und der Einfluss von BSA auf die Inaktivierung untersucht.



**Abbildung 41: Einfluss von Grp94 auf die Citratsynthaseinaktivierung**

Citrat synthase wird hitzeinaktiviert bei 43°C. Der Einfluss von ATP alleine (nicht gezeigt) ist gleich zu setzen mit dem Einfluss von BSA. Die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung ( $k_{app}$ ) sind angegeben.

Die Inaktivierung von CS konnte durch Grp94 verlangsamt werden. Die zusätzliche Zugabe von ATP verstärkte diesen Effekt. Durch diesen Test konnte belegt werden, dass Grp94, Chaperonaktivität im Sinne der Verhinderung des Inaktivierungsprozesses besitzt. Die Verstärkung dieses Effekts durch ATP bedeutet, dass dieser Prozess zwar nicht ATP-abhängig, aber doch von ATP unterstützt ist.

Eine weitere, bereits mehrmals in 3.2. beschriebene Möglichkeit faltungsunterstützende Eigenschaften zu zeigen, ist der Fab-Rückfaltungsassay. In diesem Fall wurden 0,5  $\mu\text{M}$  Grp94 für die Rückfaltung im ATP regenerierenden System und unabhängig davon für die Rückfaltung von denaturiertem, reduziertem 5  $\mu\text{M}$  Fab eingesetzt. Vergleiche mit hPDI und BiP wurden ebenfalls durchgeführt, und wie in 3.2.2 eingesetzt.

Proteinkombination	Rückfaltungseffizienz
Grp94 (ohne ATP)	8,2%
Grp94 (mit ATP)	12,3%
hPDI	18,4%
hPDI + Grp94 (mit ATP)	22,3%
hPDI+ BiP + Grp94 (mit ATP)	48,2%
hPDI+ BiP (mit ATP)	48,3%

**Tabelle 7: Einfluss von Grp94 auf die Rückfaltung von Fab im Vergleich zu hPDI und BiP**

Fab (0,2  $\mu\text{M}$ ) wurde wie oben in Renaturierungspuffer in Anwesenheit und Abwesenheit von 0,5 mM und entsprechend einem ATP regenerierenden System zurückgefaltet. Faltungshelfer wurden wie folgt eingesetzt: BiP (2,0  $\mu\text{M}$ ), Grp94 (0,5  $\mu\text{M}$ ), PDI (0,5  $\mu\text{M}$ ). Nach 48 h wurde die Reaktivierung mittels ELISA bestimmt.

In Anwesenheit von ATP und dem ATP regenerierenden System resultierte die Zugabe von Grp94 in einem Rückfaltungserfolg von  $\sim 12\%$ , ohne ATP von  $\sim 8\%$ . Zum Vergleich wurden die Zugabe von hPDI ( $\sim 18\%$ ) und der kooperative Effekt von hPDI und BiP unter Zugabe von Grp94 ( $\sim 48\%$ ) bestimmt. Festzuhalten bleibt, dass Grp94 einen positiven Effekt auf die Rückfaltung hat, der Effekt durch ATP verstärkt wurde, der synergistische Effekt von hPDI und BiP aber nicht erhöht werden konnte (Tabelle 7).

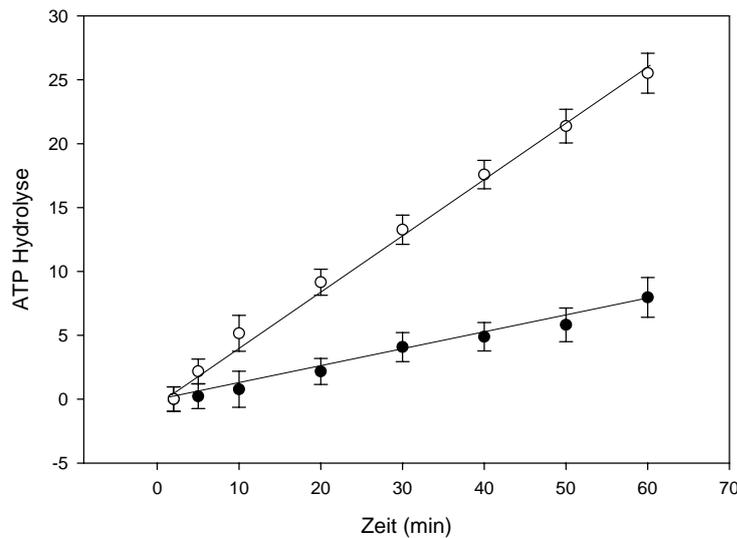
Direkt sind die Aktivitätswerte aus Fab-Rückfaltung und CS-Inaktivierung nicht miteinander vergleichbar, dennoch konnte dadurch der Faltungshelfereffekt von Grp94 bestimmt werden, auch wenn sich auch hier wiederum zeigte, dass Grp94 in seiner Funktion als Chaperone *in vitro* nicht von der Anwesenheit von ATP essentiell war, sondern lediglich unterstützt wurde.

### 3.3.4. Die ATPase Aktivität von Grp94

Grp94 weist die für die Hsp90-Familie typische Domänenstruktur auf, eine N-terminale ATPase Domäne, eine Mitteldomäne und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne. Über die ATPase Aktivität von Grp94 gibt es derzeit keine klaren Aussagen. Li und Srivastava (1993) haben keine ATPase Aktivität nachweisen können. Die ATPase-Domäne wurde im Komplex mit NECA, einem Grp94 spezifischen Inhibitor der ATP-Bindung, und mit ADP kristallisiert (Immormino et al., 2004). Die Fähigkeit der ADP- und ATP-Bindung durch Grp94 (Soldano et al., 2003) ist unumstritten, wohingegen die Frage, ob Grp94 auch ATP hydrolysiert, umstritten ist (Li & Srivastava, 1993; Immormino et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte mit zwei voneinander unabhängigen Methoden ATPase-Aktivität von Grp94 gemessen werden, die vergleichbar mit denen anderer Mitglieder der Hsp90-Familie sind. Die für die Messung der durch Grp94 katalysierten ATP-Hydrolyse-Reaktion beschriebenen Aktivitätstests beruhen üblicherweise auf dem Prinzip des gekoppelten enzymatischen Tests nach Bergmann (1983). Da bei diesem Testverfahren die Beteiligung mehrerer Enzymkomponenten an der Signalentwicklung jedoch eine präzise Charakterisierung der intrinsischen Hsp90-ATPase erschwert, wurden zusätzliche radioaktive Messungen durchgeführt. Diese haben die Vorteil einer großen Sensitivität und, dass direkt die ATP-Hydrolyse verfolgt werden kann. Die Nukleotide müssen mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden (Kornberg et al., 1978). An der Signalentwicklung ist somit nur Grp94 beteiligt, womit diese Methode am geeignetsten schien, um die Einflüsse verschiedener Parameter auf die ATPase-Aktivität von Hsp90 zu testen.

Für den radioaktiven ATPase Assay (s. 3.2.5.) wurden die jeweiligen ATPasen in den entsprechenden Reaktionspuffer umdialysiert (150 mM KCl, 40 mM Hepes, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5). Wie beschrieben wurden der ATPase eine Mischung aus ATP und  $\gamma\text{P}^{32}$ -ATP mit einer Endkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  zupipettiert, und zu gegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt. Die Reaktion wurde über 60 Minuten verfolgt. Die Auswertung erfolgte in den angeführten Beispielen durch Dünnschichtchromatographie unter Verwendung eines Typhoon Phospho Imagers (GE Healthcare, München). Auf diese Weise lassen sich die Steady-State-Hydrolyseraten ermitteln, wenn ATP in hohem Überschuss gegenüber seiner ATPase vorliegt. Diese Standardbedingungen waren auch für ATPase Aktivitätsbestimmungen anderer Mitglieder der Hsp90-Familie erfolgreich verwendet worden (Scheibel et al., 1998; Weikl et al., 2000).



**Abbildung 42: Radioaktiver ATPase Assay von Grp94 im Vergleich mit Hsp82**

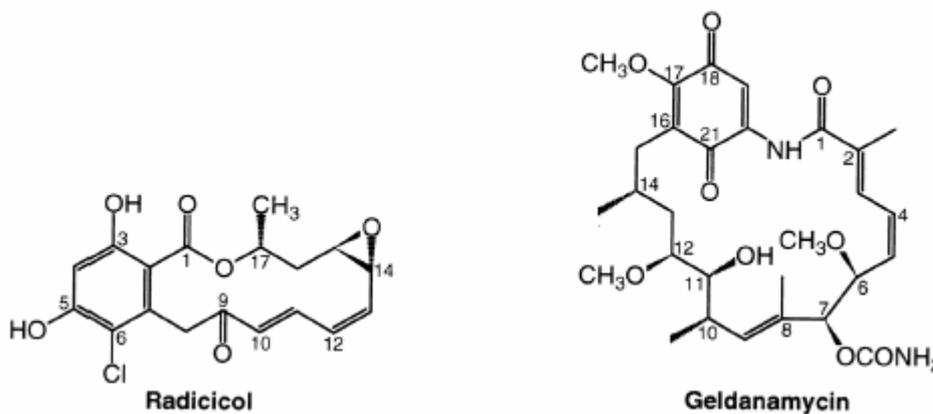
Grp94 (offener Kreis) und Hsp82 (geschlossener Kreis) wurden in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt. 30°C, 150 mM KCl, 50 mM Hepes, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,5) 0.5 mM ATP

Verglichen mit Daten der Dissertation von Dr. Tina Weikl (2000) ist die ATP Hydrolyserate der hier verwendeten Hsp82 Präparation um den Faktor 1,6 niedriger ( $0,15 \text{ min}^{-1}$  gegenüber  $0,25 \text{ min}^{-1}$ ), stimmt aber mit den Aussagen über diese Hsp82- Präparation von Otmar Hainzl (Lehrstuhl f. Biotechnologie, TU München) überein (persönliche Mitteilung). Die ATPase Aktivität des in dieser Arbeit hergestellten Grp94 liegt bei  $\sim 0,4 \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 42). Das entspricht in etwa den Hydrolyseraten der Präparationen des Hsp82 von Dr. Klaus Richter (TU München, mündliche Mitteilung). Grp94 zeigt eindeutig ATPase Aktivität, die sich auch im regenerativen ATPase Assay bestätigen lässt und vergleichbar mit cytosolischen Vertretern der Hsp90- Familie ist. Außerdem wurde als Kontrolle die  $\text{MgCl}_2$ - Abhängigkeit untersucht. Das Fehlen von Magnesium führte zu ausbleibender ATP-Hydrolyse durch Grp94 (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.5. Die ATPase Aktivität von GRP ist durch Radicol, Geldanamycin und NECA inhibierbar

Dass dem Hsp90-System eine sehr wichtige Rolle zugeordnet wird, zeigt die Tatsache, dass einige Pilze Sekundärmetaboliten bilden, die als hochaffine Hsp90-Inhibitoren wirken (Whitesell et al., 1994). So finden sich in Aktinomyceten die Substanzen Geldanamycin, Herbimycin, Macbecin und andere Vertreter der so genannten Benzoquinon-Ansamycine. Diese heterozyklischen Substanzen binden mit hoher Affinität an die ATP-Bindestelle von Hsp90 und blockieren damit die ATPase-Aktivität (Scheibel et al., 1998, Prodromou et al.,

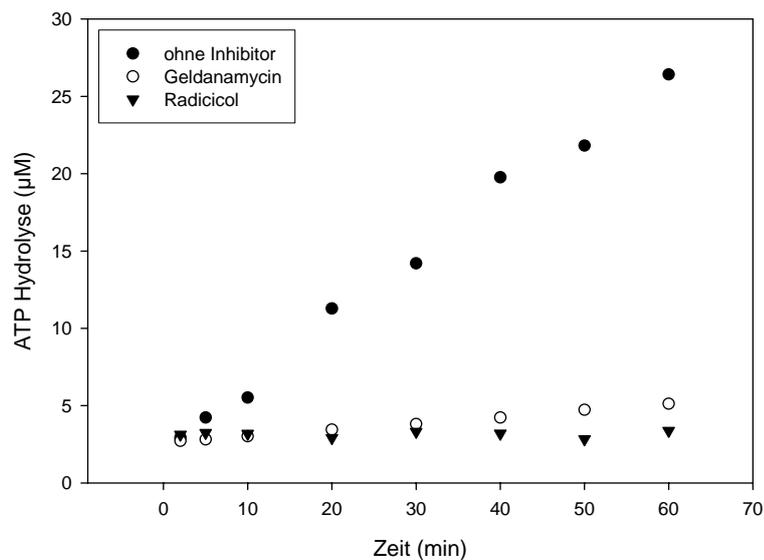
1997). Die Art der Bindung konnte durch die Kristallisation von Geldanamycin•Hsp90 Komplexen geklärt werden (Stebbins et al., 1997).



**Abbildung 43: Chemische Strukturen von Radicicol und Geldanamycin**

Einer weiteren Klasse von Hsp90-spezifischen Inhibitoren wird Radicicol zugeordnet, das von Streptomyceten gebildet wird. Es bindet mit einer Affinität von 9 nM, und damit etwa 100mal stärker als Geldanamycin, ebenfalls an die ATP-Bindestelle und blockiert damit alle ATP-abhängigen Vorgänge von Hsp90 (Roe et al., 1999). Die natürlichen Funktionen dieser Inhibitoren sind nicht bekannt, genauso wenig die Art und Weise wie sich die Produzenten gegen die potentiell schädlichen Einflüsse schützen. Für die Untersuchung Hsp90-abhängiger Prozesse hatte die Entdeckung von Geldanamycin und Radicicol eine entscheidende Bedeutung, da mit ihrer Hilfe wichtige Impulse bei der Identifikation von Hsp90-Substraten erfolgten (Wegele et al., 2004). So führt die Zugabe von Geldanamycin zum Medium zu einem schnellen Abbau vieler Hsp90-abhängiger Proteine. Da für viele der Hsp90-abhängigen Proteine eine Wirkung als Onkogene nachgewiesen wurde, wird eine therapeutische Wirkung dieser Substanzen gegenwärtig erprobt (Neckers, 1999).

Um zu testen, ob diese Hsp90-spezifischen Inhibitoren auch Grp94 inhibieren, wurden ATPase Experimente durchgeführt, die diesen Effekt aufklären sollten. Dazu wurde wiederum der radioaktive ATPase Assay wie beschrieben angewandt. Der regenerative Assay wurde lediglich zur Überprüfung der Effekte verwendet (nicht gezeigt). Des Weiteren konnte mit diesen Inhibitoren überprüft werden, ob andere ATPasen zu den gezeigten Effekten beitragen, da die beiden Inhibitoren als Hsp90-spezifisch gelten.

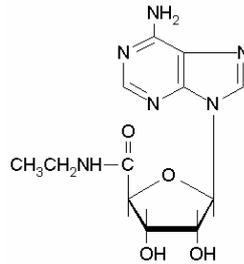


**Abbildung 44: Inhibierung der ATPase von Grp94 durch Radicicol und Geldanamycin**

5 µM Grp94 in Gegenwart von 500 µM ATP (+ 20 µM Radicicol bzw. 25 µM Geldanamycin); 30°C, 150 mM KCl, 50 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5

Anhand dieses Experiments (Abbildung 44) konnte gezeigt werden, dass die ATPase Aktivität von Grp94, wie die anderer Mitglieder der Hsp90-Familie, durch diese Substanzen spezifisch inhibiert werden kann. Im Fall von Geldanamycin wurde keine vollständige Inaktivierung erzielt von Grp94 (analog zu Hsp82, Weikl, 2000). Auch durch Erhöhung der Geldanamycin Konzentrationen (bis zu 150 µM) konnte keine vollständige Inhibierung erreicht werden, so dass man von einer quantitativen Komplexierung von Grp94 mit Geldanamycin unter den gewählten Bedingungen ausgehen kann. Der aus diesem Versuch errechnete  $k_{cat}$  beträgt  $\sim 0,4 \text{ min}^{-1}$ . Experimente, bei denen erst nach einer gewissen Reaktionszeit der jeweilige spezifische Inhibitor zugegeben wurde, erbrachten das gleiche Ergebnis.

Ein weiterer, allerdings Grp94 spezifischer, Inhibitor ist NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosin, Abbildung 45) (Soldano et al., 1999), das ein echtes ATP-Analogon darstellt. Sollte trotz der Anwendung von NECA eine ATPase-Aktivität detektierbar sein, musste man davon ausgehen, dass die Grp94-Präparationen durch eine andere Hsp90-Spezies, kontaminiert gewesen sind.

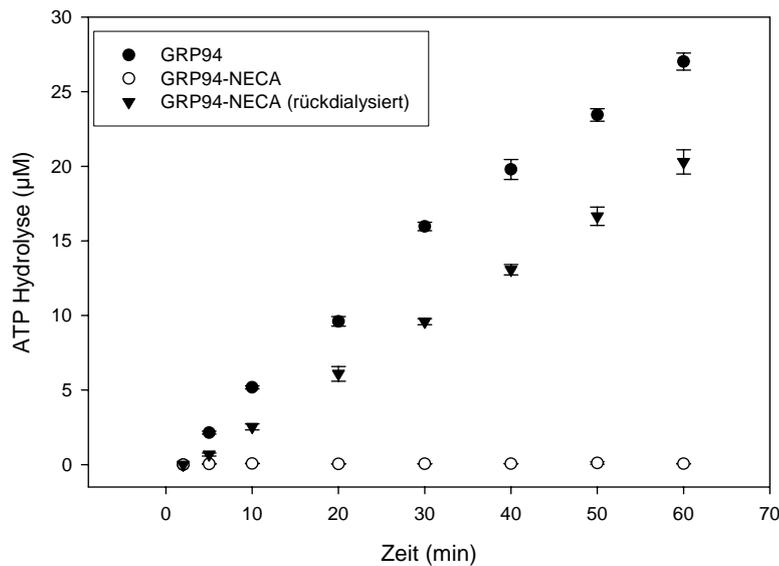


**Abbildung 45: Die chemische Struktur von NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosin)**

NECA (Abbildung 45) ist im Gegensatz zu ATP aufgrund der Amidgruppe an Stelle des Triphosphats nicht hydrolysierbar. Immormino et al. (2004) stellen als eine der Schlüsseleigenschaften von Grp94 die Fähigkeit der NECA-Bindung dar, eine Fähigkeit, die cytosolisches Hsp90 nicht besitzt.

Die Bindungsfähigkeit von NECA ist dadurch zu erklären, dass das hochkonservative Gly196 in Grp94 eine konformationelle Änderung in der Helix 1 des bereits beschriebenen Helix-1,4,5-Motiv in Grp94 relativ zu Hsp90 bewirkt (vgl. 1.6.2.). Eine ATPase Aktivität von Grp94 konnte bereits gezeigt werden (Abbildung 42, Abbildung 44), die Inhibierung selbiger durch NECA war aus chemischen Gründen (s. 3.3.9.) nicht im regenerativen, sondern (vgl. 3.3.9.) nur im radioaktiven ATPase Assay messbar.

Im Rahmen dieser spezifischen Inhibierung wollte untersucht werden, ob die die Bindung von NECA reversibel ist. Zu diesem Zweck wurde vor der Durchführung des radioaktiven ATPase Assays Grp94 bei 30°C eine halbe Stunde mit 10 $\mu$ M NECA inkubiert. Die Probe, die für den Test auf reversible Bindung hin untersucht werden sollte, wurde gegen ATPase Puffer dialysiert. Um den Charakter der NECA- Bindung anschließend zu untersuchen wurden dann eine Grp94 Kontrollprobe, die dialysierte und die undialysierte Probe, im radioaktiven ATPase Assay unter den beschriebenen Bedingungen eingesetzt.



#### Abbildung 46: Untersuchung des NECA -Einfluss auf die ATPase von Grp94

Radioaktiver ATPase Assay: Grp94 alleine (gefüllter Kreis); Grp94 mit NECA inkubiert mit anschließender Dialyse gegen NECA- freien Puffer (schwarzes Dreieck); Grp94 mit NECA inkubiert (leerer Kreis). 30°C, 150 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5; 5 µM Grp94, 10 µM NECA, 500 µM ATP

Abbildung 46 zeigt die reversible Inhibierung von Grp94 durch NECA. Die ATPase Aktivität konnte in Anwesenheit des ATP-Analogs wie zuvor durch Geldanamycin oder Radicol vollständig inhibiert werden. Eine Reaktivierung durch Ausdünnung des Inhibitors war fast vollständig möglich. Als Kontrolle wurde auch die Inhibierung von Hsp82 durch NECA untersucht. Hsp82 konnte durch NECA nicht inhibiert werden (Abbildung nicht gezeigt).

Die ATPase von Grp94 (Abbildung 46) lässt sich mit  $\sim 0,4 \text{ min}^{-1}$  berechnen, die NECA-inhibierte und anschließend ausgedünnte Variante mit  $\sim 0,35 \text{ min}^{-1}$ . Das entspricht einer Reaktivierung von 82%. NECA musste, sowie Geldanamycin und Radicol in 1% DMSO gelöst werden. Die intrinsische ATPase von Grp94 wurde durch 1% DMSO nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Somit kann für die nicht 100%ige Reaktivierungsmöglichkeit ein Einfluss durch das Lösungsmittel ausgeschlossen werden. Auch sind für andere Hsp90 Moleküle keine derartigen Beobachtungen postuliert. Die Affinität von NECA an Grp94 ist 5-10 -fach höher als die von ADP bzw. ATP (Soldano et al., 2003). Daher konnte es möglicherweise nicht vollständig ausgedünnt werden, da hierfür die Affinität zu hoch sein könnte. Die mögliche vollständige Inaktivierung der ATPase durch NECA in diesem Assay zeigte, dass es sich spezifisch um eine Inhibierung von Grp94 handelte. Dadurch konnte eine Kontamination durch andere Hsp90-Mitglieder ausgeschlossen werden.

### 3.3.6. Die Michaelis-Menten- Konstante von Grp94 für ATP

Im Zusammenhang mit der ATPase Aktivität eines Proteins ist die Michaelis- Konstante ( $K_M$ -Wert) eine wichtige Größe, über die bestimmt werden kann, ob die gewählten Bedingungen der ATPase-Assays für die Errechnung der enzymatischen Aktivität geeignet sind. Berechnet wird  $v_{\max}/2$ . Dazu wurden ATPase Assays im regenerativen System gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten ( $v = k_{\text{cat}}$ ) wurden dabei gegen die eingesetzte Menge ATP aufgetragen.

Ausgehend von dem vereinfachten Reaktionsschema



mit:

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad \text{und} \quad K_M = K_D + \frac{k_{\text{cat}}}{k_{\text{on}}}$$

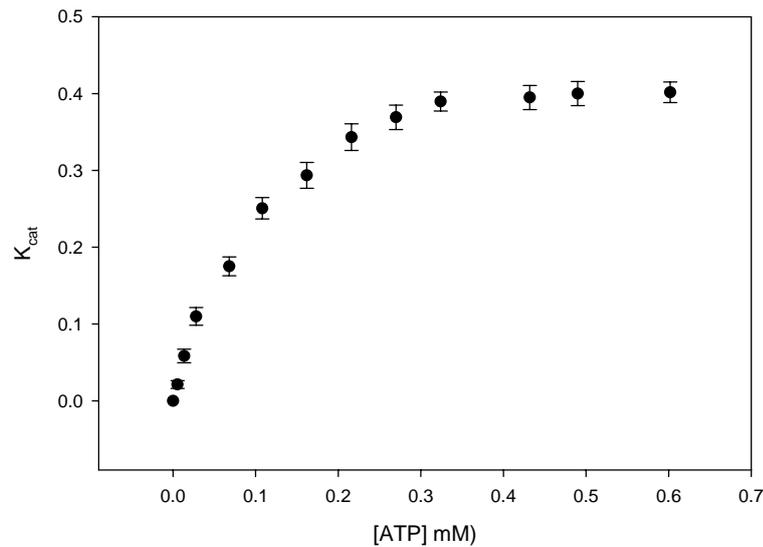
wurde unter der Annahme ähnlich hoher  $K_D$ -Werte für Grp94 wie für Hsp90 (Scheibel et al., 1997; Prodromou et al., 2000) ein  $K_M$ -Wert ebenfalls im 100  $\mu\text{M}$  Bereich erwartet. Zur Ermittlung des  $K_M$ -Wertes wurde die ATP-Konzentration in den verschiedenen Ansätzen von 5  $\mu\text{M}$  bis 3000  $\mu\text{M}$  variiert. Die Umsatzraten wurden aus den linearen Anfangsphasen der einzelnen Kinetiken aus regenerativen ATPase-Assays errechnet und graphisch gegen die ATP-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 47). Aus dem Fit nach folgender Gleichung

$$y = \frac{ax}{b+x}$$

analog zu

$$v = v_{\max} \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ATP}] + K_M}$$

ergab sich für den  $K_M$  in Übereinstimmung mit den Erwartungen ein Wert von 130  $\mu\text{M}$  und für  $v_{\max}$  ein Wert von 0.43  $\text{min}^{-1}$ .



**Abbildung 47:  $K_M$ - Wert Bestimmung von Grp94**

Nach Michaelis-Menten:  $K_M = 0,127$  mM;  $30^\circ\text{C}$ ,  $5 \mu\text{M}$  Grp94,  $0\text{-}3$  mM ATP;  $150$  mM KCl,  $5$  mM  $\text{MgCl}_2$ ;  $40$  mM Hepes, pH  $7,5$

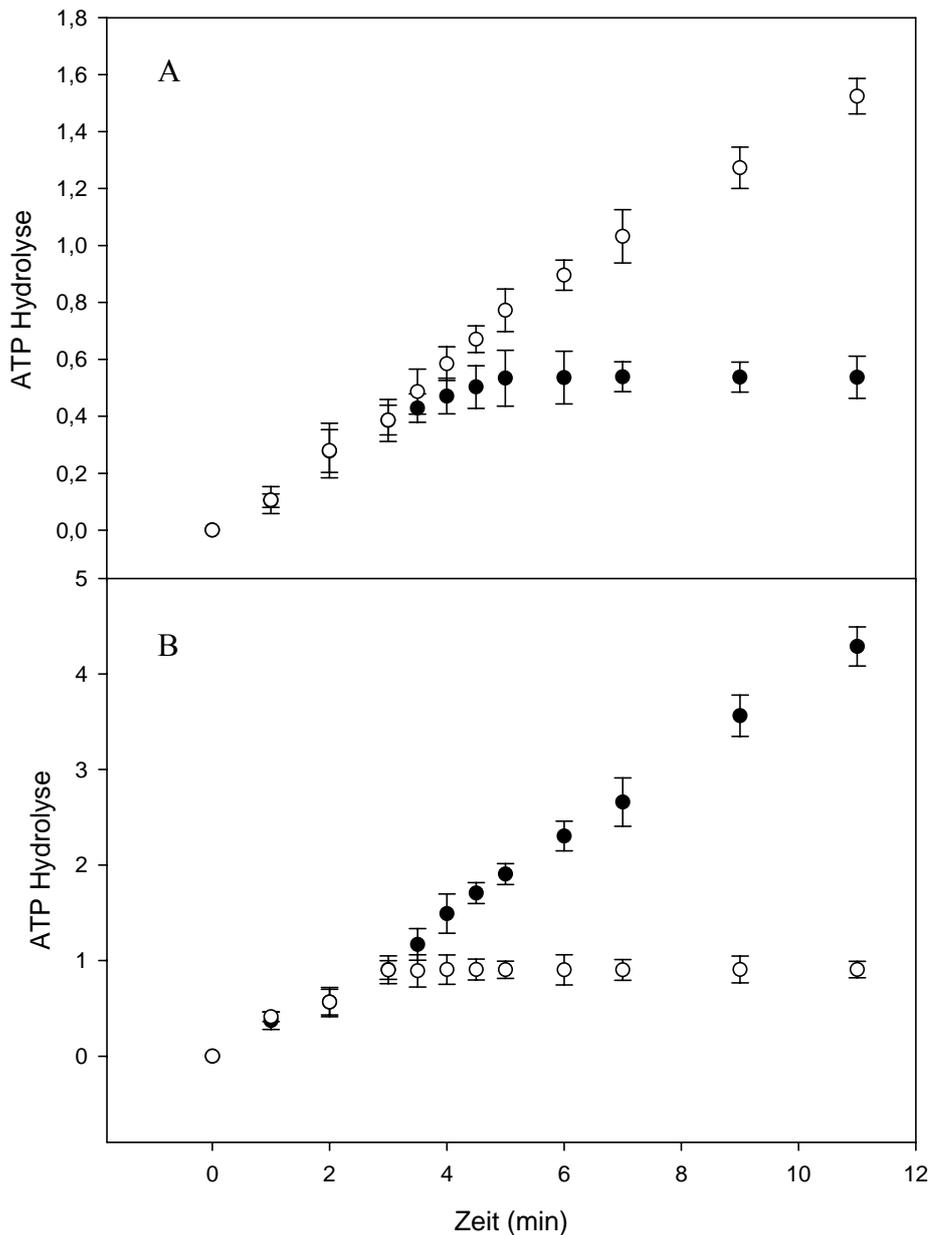
Der im regenerativen ATPase Assay errechnete  $K_M$ -Wert von ca.  $0,13$  mM zeigt (Abbildung 47, nach einfach quadratischer Gleichung), dass die bisherigen ATPase Aktivitätstest unter den gewählten Bedingungen im ATP-gesättigten Bereich durchgeführt wurden. Dieser Wert ist zudem vergleichbar mit dem anderer Mitglieder der Hsp90-Familie (Wegele et al., 2004).

### 3.3.7. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATP- Hydrolyse durch Grp94

Um die Frage zu klären, ob die Hydrolyse oder die ATP- bzw. ADP-Bindung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ATPase-Aktivität von Grp94 darstellt, wurden vergleichende *Single-Turn-Over* Messungen mit Hsp82 durchgeführt. Im Fall von Hsp82 wird postuliert, dass die Hydrolyse von ATP den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Gesamtreaktion darstellt (Weigl, 2000). Bei diesen *Single-Turn-Over* Messungen lag das Substrat ATP im Gegensatz zum *Steady-State* im  $0,8$ -fach molaren Unterschuss zum Grp94 - Molekül vor, so dass nur ein einziger Reaktionszyklus durchlaufen werden kann.

Als Ausgangskonzentration des jeweiligen Hsp90-Chaperons wurde  $20 \mu\text{M}$  gewählt, dementsprechend  $16 \mu\text{M}$  radioaktives ATP zugegeben. Ansonsten entsprach die Durchführung den bereits beschriebenen Ergebnissen, mit der weiteren Ausnahme, dass in kürzeren Abständen Proben entnommen wurden. Die Auswertung erfolgte anschließend wieder mittels Dünnschichtchromatographie und Phosphoimaging.

Um eine Aussage über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt machen zu können, musste die Zugabe des Überschusses von kaltem (= nicht radioaktivem) ATP im Bereich der linearen Hydrolyserate durchgeführt werden. Unter den gewählten Bedingungen ging Grp94 ca. nach 12 Minuten in die Plateauphase über, das bedeutet, das vorhandene ATP war hydrolysiert (Abbildung nicht gezeigt).



**Abbildung 48: Single-Turn-Over-Bestimmung von Grp94 im Vergleich mit Hsp82**

Zugabe von kaltem ATP im Überschuss (500µM) nach 3 Minuten; A): Hsp82 (100µM) ohne Zugabe von kaltem ATP (offener Kreis), Zugabe von kaltem ATP (geschlossener Kreis); B): Grp94 (100µM) ohne Zugabe von kaltem ATP (geschlossener Kreis), Zugabe von kaltem ATP (offener Kreis)

Abbildung 48 zeigt, dass sich Hsp82 und Grp94 nicht nur in der Hydrolyserate, sondern auch bezüglich des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der ATP-Hydrolyse unterscheiden.

Außerdem ist im Fall von Grp94 eine kleine, nicht näher definierbare Lag-Phase der ATP-Hydrolyse zu sehen, was dafür spricht, dass die Bindung von ATP bestimmte Zeit in Anspruch nimmt. Die Hydrolyserate befindet sich erst nach 2,5 Minuten im linearen Bereich der Steigung. Im Fall von Hsp82 wurde nach Zugabe eines Überschusses von nichtradioaktivem (kaltem) ATP noch für ca. 2-3 Minuten radioaktives  $\gamma\text{P}^{32}$  und ADP freigesetzt. Setzt man den Zeitpunkt der Zugabe des kalten ATP gleich Null, ergibt sich für die Freisetzung der Produkte ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ ) eine Ratenkonstante von  $k = 0,89$  (einfach quadratische Gleichung). Das bedeutet für Hsp82, dass ein ATP-Molekül nicht sofort nach Hydrolyse freigesetzt wird, sondern das Edukt oder die Produkte für eine gewisse Zeit in der Bindetasche festgehalten wird, bevor es zur Freisetzung kommt. Somit kommt für das Protein die Hydrolyse oder die Freisetzung von ATP und seinen Produkten als geschwindigkeitsbestimmender Schritt in Frage.

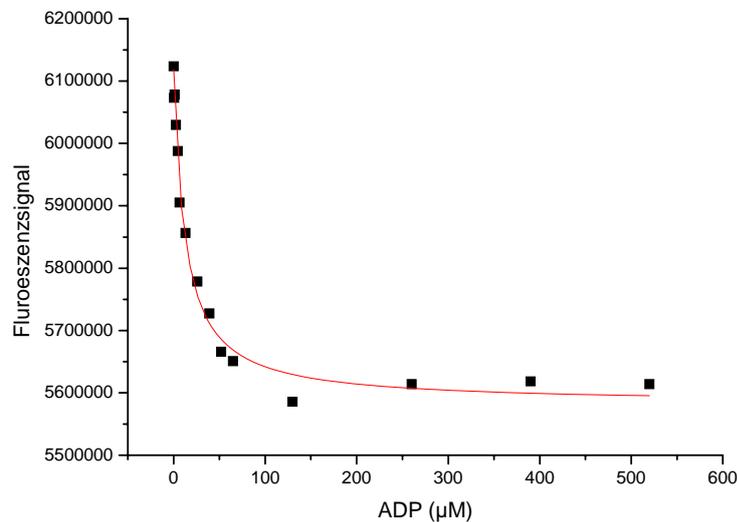
Unterschiedliche Beobachtungen ergaben sich für Grp94. In diesem Fall bewirkte die Zugabe von kaltem ATP eine sofortige Stagnation des radioaktiven Signals, verursacht durch den Austausch des ATP. Eine Ratenkonstante für die Freisetzung des Nukleotids ließ sich somit in diesem Fall somit nicht berechnen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt muss demnach die ATP-Bindung selbst sein, da ADP und  $\text{P}_i$  anscheinend sofort nach der Hydrolyse freigesetzt werden. Dementsprechend wäre die Affinität von Grp94 für ATP höher als die für ADP. Um das zu untersuchen, wurden Fluoreszenztitrationen für Nukleotide durchgeführt, die in diesem Zusammenhang eine Klärung dieses Vorganges erwirken sollten.

### 3.3.8. Fluoreszenztitration mit Grp94 und Nukleotid

Um Bindeaffinitäten, Dissoziations- und Assoziationskonstanten festlegen können, bieten sich mehrere Methoden an. Neben kalorimetrischen Methoden, die u.a. aufgrund präparativer Probleme von Grp94 fehlschlagen und Stopped-Flow-Messungen, die in Kooperation mit dem Institut von Dr. Jochen Reinstein (Heidelberg) stattfanden, wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Bestimmung dieser Werte herangezogen. Dabei wird das Protein und das Bindesubstrat, in diesem Fall NECA, AMP-PNP oder ADP, zusammen in sich ändernden Stöchiometrien inkubiert, im Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax 3, Jobin Yvon, Grasbrunn, D), bei 295 nm angeregt und die Emission zwischen 305 und 450 nm aufgenommen. In mehreren, voneinander unabhängigen Versuchen wurden unterschiedliche Konzentrationen von Grp94 (zwischen 0,7  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$ ) in einer 1400  $\mu\text{l}$  Rührküvette (Helma, Braunschweig) bei 30°C in 40 mM HEPES, 100 mM NaCl und 5 mM

MgCl<sub>2</sub> für diese Untersuchungen eingesetzt. Protein- und Nukleotidkonzentration wurden zuvor photometrisch eingestellt. Für die Titration wurde eine Nukleotidstammlösung von 10mM vorbereitet. Im Bereich des Signalmaximums (335- 345 nm, vgl. Abbildung 40) wurden bei gleich bleibender Wellenlänge die Konzentrationen des Nukleotids gegen die Fluoreszenz aufgetragen, und wenn nicht anders beschrieben, mittels quadratischer Gleichung gefittet.

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \cdot \frac{\frac{[A_0] + [B_0] + Kd_{AB}}{2} - \sqrt{\left(\frac{[A_0] + [B_0] + Kd_{AB}}{2}\right)^2 - [A_0][B_0]}}{B_0}$$



**Abbildung 49: Fluoreszenztitration von Grp94 für ADP**

1.2 µM Grp94; 150mM KCl, 5 mM MgCl, 40mM Hepes, pH 8.0, 30°C; Puffer- und Volumen- korrigiert

Das Ereignis dieser Messung kann durch so genanntes Quenching erklärt werden. Der Quenching-Effekt (von englisch *to quench* für „löschen“) bezeichnet in der Photochemie den Effekt der Fluoreszenzabnahme bzw. Lumineszenzlöschung durch eine chemische Verbindung. Der angeregte Fluorophor wird dabei strahlungslos in den Grundzustand überführt. Im Falle von Grp94 ist die Fluoreszenz eines Trp im Komplex mit ADP, ATP oder anderen Nukleotiden herabgesetzt. Die Unterschiede in den Quantenausbeuten von freiem Grp94 und Substrat-gebundenem Grp94 lassen sich daher für eine quantitative Auswertung und Bestimmung der Dissoziationskonstanten verwenden.

Exemplarisch wird hier die Nukleotidtitration für ADP dargestellt (Abbildung 49). Wie man dem Graphen entnehmen kann, wurde die Sättigung durch Nukleotid in diesem Fall durch die

Zugabe von ca. 120  $\mu\text{M}$  ADP erreicht. Der sich aus dieser Titration ergebene  $k_D$ -Wert für ADP beträgt 12,4  $\mu\text{M}$ , das bedeutet, dass bei dieser Konzentration von Grp94 die Hälfte ADP gebunden vorlag. In weiteren Versuchen wurden die Dissoziationskonstanten von AMP-PNP, NECA und Radicol, dem Hsp90-spezifischen Inhibitor an Grp94 durchgeführt (vgl. Abbildung 43), um die spezifische Inhibierung dieser Stoffe im Bezug auf Grp94 zu untersuchen. In Abbildung 44 und Abbildung 46 wurde bereits gezeigt, dass sich die ATPase von Grp94 durch diese Nukleotidinhibitoren beeinflussen ließ. Aus der Dissoziationskonstante für AMP-PNP sollten Rückschlüsse auf die Bindungsaffinität für ATP gewonnen werden. Wie bereits erwähnt, unterscheidet sich AMP-PNP durch Stickstoffatom an der Stelle des  $\beta$ -Phosphats von ATP, und kann somit nicht hydrolysiert werden.

Nukleotid	$k_D$ -Wert
ADP	12,4 $\mu\text{M}$
AMP-PNP	11,1 $\mu\text{M}$
NECA	5,6 $\mu\text{M}$
Radicol	2,2 $\mu\text{M}$

**Tabelle 8: Übersicht über Dissoziation und Assoziation von Nukleotid und Grp94**

In Anwesenheit von 0,7  $\mu\text{M}$  Grp94 wurden Nukleotid und Nukleotidinhibitoren titriert. Exemplarisch zeigt Abbildung 49 die Vorgehensweise. Messungen wurden in einem Fluoromax 3 (Jobin Yvon, Grasbrunn) Die Auswertung erfolgte mittels quadratischer Gleichung.

Anders als bei anderen Mitgliedern der Hsp90-Familie (Richter et al., 2001) war die Dissoziationskonstante von Grp94 für ATP niedriger als für ADP, das bedeutet, dass die Bindung von ADP schwächer ist. Und weiter bleibt festzustellen, dass die Bindeaffinitäten der Nukleotidinhibitoren nicht in dem Bereich lagen, wie sie für andere Mitglieder der Hsp90-Familie publiziert wurden (Weikl et al., 2000 im Vergleich mit Tabelle 8). Die Affinität von NECA ist nur ca. 2,5-mal so stark unter den gewählten Bedingungen wie die von ADP. Laut der Publikation von Soldano et al. (2003), soll sie zumindest 5mal höher sein, allerdings könnten Unterschiede in diesem Bereich auch auf unterschiedliche Meßmethoden zurückzuführen sein. Die tatsächliche Affinität der Inhibitoren kann aber auch höher sein, da die  $k_D$ -Werte im Bereich der gewählten Proteinkonzentrationen liegen.

### 3.3.9. Diskussion zur Charakterisierung von Grp94

Grp94 ist als Mitglied der Hsp90-Familie in die typische Domänenstruktur aufgeteilt. Eine N-terminale ATPase Domäne, die über einen geladenen Linker, mit der Mitteldomäne verbunden ist, und ein C-terminale Dimerisierungsdomäne (Wearsh et al, 2001). Strukturelle Untersuchungen ergaben ähnliche Werte für Grp94 wie für andere Hsp90-Chaperone, eingeschlossen CD-Spektroskopie, dynamische Lichtstreuung analytische Gelfiltration und Ultrazentrifugation (vgl. Abbildung 36, Abbildung 38, Abbildung 39). Allerdings weisen die Daten zum hydrodynamischen Radius des Proteins auf eine Molekülmasse von knapp 500 kDa hin. Dieser Wert ist durch die gestreckte Konformation von Grp94, analog zu anderen Mitglieder der Hsp90-Familie zu erklären. Auch das knapp 10 kDa kleinere Hsp82 weist einen hydrodynamischen Radius von 430 kDa bei Untersuchungen mittels SEC-HPLC auf (vgl. 3.3.2.; Richter, 2004) Analytische Ultrazentrifugationsläufe zeigen im reduzierten Zustand das tatsächlich Molekulargewicht von 180 000 Da, also ein Dimer (Abbildung 38). Zusätzlich ließen fluoreszenzspektroskopische Daten (vgl. 3.3.2., Abbildung 8) und im oxidierten Zustand ein Nachweis freier Thiolgruppen (nicht gezeigt) darauf schließen, dass das Protein tatsächlich eine Disulfidbrücke besitzt. Das würde den Angaben eines potentiellen Disulfids in Swissprot ([www.expasy.com](http://www.expasy.com); (Kroll, 2002)) entsprechen, sollte aber noch weiter untersucht werden, zumal die Disulfidbrücke an Position 138 liegt, und somit knapp hinter der ATPase-Domäne, räumlich entfernt von der C-terminalen Hsp90-typischen Dimerisierungsdomäne.

*In vivo* konnten für Grp94 (vgl. 1.6.1.; (Randow & Seed, 2001)) eine Anzahl von Substraten ermittelt werden. *In vitro*-Versuche, während dieser Arbeit ein geeignetes Modellsubstrat zu definieren, wie einer Antikörperdomäne (z.B. C<sub>H3</sub>, C<sub>H1</sub>), sowie einen Interaktionspartner (C<sub>Nx</sub>, CRT) zu finden, schlugen fehl (Daten nicht gezeigt), aber generelle Chaperonaktivität wurde für Grp94 gezeigt. Die Inaktivierung von CS konnte gehemmt, und die Reaktivierung von reduziert, denaturierten Fab unterstützt werden. In beiden Fällen wurde dieser Effekt durch die Anwesenheit von ATP verstärkt, was dafür spricht, dass Grp94 im Rahmen der Hydrolyse eine verstärkte Affinität zum Substrat haben dürfte. Auch cytosolisches, eukaryotisches Hsp90 ist in der Lage die thermische Aggregation von CS zu verlangsamen (Johnson et al., 2000).

Die unterstützende Wirkung von Grp94 auf die Fab-Rückfaltung könnte allerdings in weiteren Experimenten näher charakterisiert werden. Diese Tatsache könnte wertvolle Hinweise auch auf *in vivo*-Substrate für zukünftige Versuche geben. Des Weiteren sollten in diesem

Zusammenhang Studien durchgeführt werden, die Informationen über das optimale Konzentrationsverhältnis von Grp94 relativ zu Fab geben. Außerdem sollten GSSG/GSH-Titrationsen durchgeführt werden, um eine Abhängigkeit des Chaperonseffekts vom Redoxmilieu zu untersuchen.

Die ATPase Aktivität von Grp94 ist ein umstrittener Prozess. Während mehrere Gruppen (Nicchitta; Gewirth) die Fähigkeit der ATP-Hydrolyse von Grp94 als nicht existent oder sehr gering ausgeprägt bewiesen haben wollen (Dollins et al., 2005; Immormino et al., 2004), sprechen gegen diese Tatsache zum einen Domänenstruktur und Homologiegrad zu anderen Hsp90-Familienmitgliedern und zum anderen die Ergebnisse dieser Arbeit. Im Vergleich mit dem Hsp90-Homologen aus Hefe, Hsp82, wurden in unabhängigen Experimenten Untersuchungen zur Klärung dieser Frage durchgeführt. Im regenerativen System, sowie durch radioaktive ATPase-Experimente konnte eine Hydrolyserate von  $0,4 \text{ min}^{-1}$  für Grp94 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte durch diese Versuche qualitativ gezeigt werden, dass sich Grp94 zum einen durch die typischen Hsp90 Inhibitoren (Radicicol, Geldanamycin) hemmen lässt, zum anderen durch das Grp94-spezifische Nukleotidanalogen NECA. Im Vergleich dazu ließ sich Hsp82 nicht durch NECA inhibieren. Für NECA wurde untersucht, ob dieser Prozess reversibel ist, da bereits Soldano et al. (2003) eine spezifische, aber nicht sehr starke Inhibierung postuliert hatte ( $\mu\text{M}$ - Bereich). Dazu wurde der Inhibitor im Experiment ausgedünnt, und Grp94 gewann 4/5 seiner ATPase- Aktivität zurück. Das bedeutet, dass die Bindung durch NECA zwar spezifisch, aber vergleichsweise schwach und reversibel ist. Insgesamt ist unter den gewählten Bedingungen die Inhibierung durch die verwendeten Substrate ungewöhnlich gering.

Für die Michaelis-Menten-Konstante konnte durch die ATPase-Bestimmungen ein für Hsp90-Chaperone typischer Wert im  $\mu\text{M}$ -Bereich ( $\sim 130 \mu\text{M}$ ) bestimmt werden

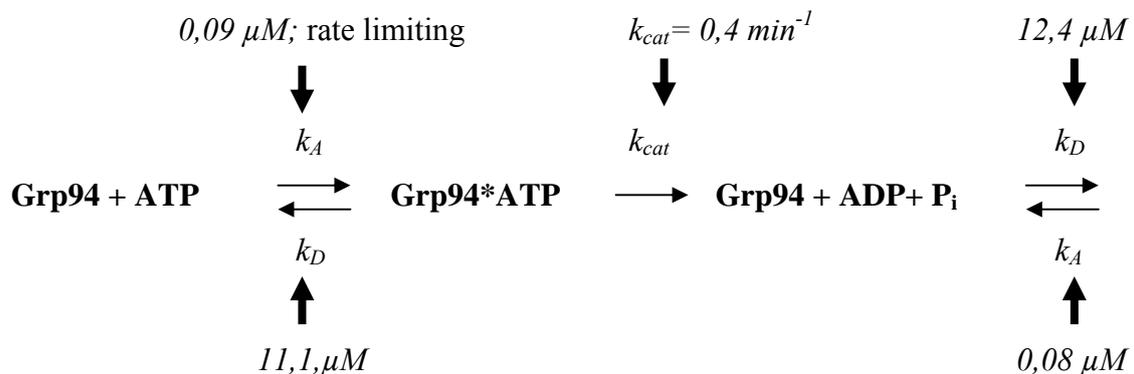
Durch *Single Turn Over* Experimente konnte gezeigt werden, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der ATP-Hydrolyse nicht wie bei Hsp82 die Hydrolyse (Weikl et al., 2000) ist, sondern eher die Bindung von ATP. Das wiederum würde eine schwächere Bindeaffinität für ADP als für ATP voraussetzen. Inwieweit das mit einer Substratbindung in Zusammenhang gebracht werden kann, konnte leider nicht geklärt werden. Um den gesamten Chaperonzyklus für dieses Protein zu klären, wären Informationen über Substratproteine sehr nützlich. *In vivo* ist Grp94 glykosyliert (Muresan & Arvan, 1997; Muresan & Arvan, 1998). Um den Effekt der Glykosylierung zu bestimmen, könnte rekombinantes, z.B. in *Leishmania* exprimiertes Protein weiterhelfen. Es gibt Hinweise, dass die Glykosylierung für Interaktionen mit Partnerproteinen oder für die Substratkomplexierung

von Bedeutung sein könnte (Lee, 2001). Durch Bindung von Substrat könnte sich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolyse auf die Seite der ADP-Bindung bzw. auf die Freisetzung der Hydrolyseprodukte verschieben. Einen Hinweis darauf stellte die ATP-unterstützte Reaktivierung von Fab bzw. die verlangsamte Inaktivierung von CS in Anwesenheit von ATP dar.

Über Nukleotidbindestudien (Tabelle 8) von Grp94 konnten Werte berechnet werden, die mit den Aussagen über substratungebundenes Grp94 in Einklang gebracht werden konnten. Die Affinität von Grp94 für ATP ist höher als die für ADP. Die Inhibitoren bzw. Nukleotidanaloga, Radicol und NECA, haben weitaus geringere Affinitäten für Grp94, wie es für „echte“ Inhibitoren der Fall ist (Richter et al., 2001, Weikl et al., 2000).

Die in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Dr. Jochen Reinstein erzielten Ergebnisse (Daten hier nicht gezeigt) lassen vermuten, dass es ein 2-stufiges Bindemodell für Grp94 und Nukleotid gibt. Das bedeutet, dass die Bindung von ATP in zwei Schritten erfolgt, allerdings konnte diese Vermutung experimentell noch nicht vollständig aufgelöst werden.

Somit lässt sich für die Ergebnisse dieser Doktorarbeit folgendes Modell postulieren:



**Abbildung 50: Modell für den ATP-Reaktionszyklus von Grp94**

Die Bindung von ATP an Grp94 erfolgt im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (rate limiting); dadurch verändert sich die Konformation der Nukleotidbindetasche. ATP-Hydrolyse und ADP-Freisetzung von ADP erfolgen schnell und in einem einstufigen Prozess. Nach der Freisetzung von ADP ist die Reaktion abgeschlossen.

Die molekularen Umlagerungen, die zur Determinierung des gebundenen Nukleotids führen, sind langsamer als die anschließende Hydrolyse- und die folgende Freisetzung des Nukleotids. Auch die Lag-Phase zu Beginn der *Single Turn Over*-Experimente spricht für eine langsame Bindung von ATP, wie es bei Hsp82 nicht beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 48).

Die im Fall von Grp94 schwer bestimmbaren Einzelschritte und das Fehlen bekannter Substrate für *in vitro*-Experimente bedeuten für dieses Modell, dass es lediglich als Näherung der Einzelschritte in der Hydrolyse von Grp94 angesehen werden sollte. Die eng beieinander

liegenden Werte der Dissoziation und Assoziation von ATP und ADP lassen lediglich Vermutungen zu, auch wenn diese Ergebnisse im Rahmen der hier verwendeten Methoden sinnvoll erscheinen. Letztlich stellt sich die Frage, ob dieses Modell mit der Aufgabenstellung von Grp94 *in vivo* in Einklang gebracht werden kann. Dabei muss nochmals betont werden, dass für Grp94 bis heute keine Co-chaperone bekannt sind wie für cytosolisches Hsp90, die das Modell *in vitro* möglicherweise dadurch unterstützen können, dass sie die Teilschritte beschleunigen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden auch Grp94-Experimente in *S. cerevisiae* angestrengt, konnten aber bis dato nicht zu Ende geführt werden. Dabei wurde Grp94 in das ER von Hefe gebracht, um Einflüsse dieses von Natur aus nicht in diesem Organismus vorkommenden Proteins zu untersuchen. Phänotypisch konnten Veränderungen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren hätten dadurch wertvolle Rückschlüsse über Aufgaben und *in vivo* Substrate von Grp94 gewonnen werden können.

Die langsame Bindung von ATP und die folgende schnelle Hydrolyse charakterisieren die Reaktionsreihenfolge von Grp94. Im Rahmen der Qualitätskontrolle im ER könnte es sinnvoll erscheinen, den Mechanismus der ATP-Bindung zusätzlich zu kontrollieren. Sollte die Substratbindung, die Chaperonaktivität und anschließende Freisetzung über den Prozess der ATPase-Aktivität gesteuert werden, wäre damit ein Kontrollsystem entwickelt, das vielfältige Regulationsmechanismen ermöglicht. Dies könnte von besonderer Bedeutung für Proteine des Immunsystems sein. Das cytosolische Chaperonsystem muss „nur“ den korrekten Faltungsweg nicht-sezernerter Polypeptide unterstützen. Im ER werden zudem die Assoziation und falsch gefaltete bzw. nicht-assoziierte Proteine überprüft. Im Rahmen der *Unfolded Protein Response* (UPR (vgl. 1.8.1.; Harding et al., 1999)) und der *ER associated degradation* (ERAD (vgl. 1.8.2.; Kostova und Wolf, 2003)) wird für die Sekretion zwischen geeignet und nicht-geeignet unterschieden. Für BiP ist bereits bekannt, dass die Bindung von Antikörperdomänen zu einer verlangsamten Hydrolyserate führt (Mayer et al., 2001), eine Tatsache, die auch für die Familie der Hsp70 untypisch ist, da Peptidbindung in der Regel die Hydrolyseraten beschleunigt (Bukau et al., 2000; Bukau & Horwich, 1998). Auch hier lässt sich ein regulatorischer Effekt vermuten.

Grp94 besitzt zwischen der N-terminalen und der Mitteldomäne eine geladene Region, deren Funktion bisher nicht geklärt werden konnte. Im Bezug auf Funktion und Substrat-Bindung von Grp94 wäre es sinnvoll die Aufgabe dieser Domäne zu klären. Da sich die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte von Grp94 und dem cytosolischen Hsp90 unterscheiden, könnte dieser Region eine regulatorische Funktion im Bezug auf die ATPase-

Aktivität oder Substratbindung zufallen, zumal die restlichen Bereiche der jeweiligen Proteine einen hohen Grad an Homologie aufweisen. Interessant wäre der Einfluss einer Deletion dieses Peptidteils auf die beschriebene Funktionalität des Gesamtproteins.

In weiteren Studien sollte somit das Zusammenspiel von ATPase- und Substratbindedomäne geklärt werden, unter Berücksichtigung des genannten geladenen Verbindungsstückes hinter der N-terminalen Domäne.

Es bleibt fest zuhalten, dass Grp94 eine ATPase Aktivität aufweist, die mit der anderer Hsp90-Mitgliedern vergleichbar ist. Ebenso sind der  $K_M$ -Wert sowie strukturelle Eigenschaften in Einklang mit anderen Vertretern dieser Chaperonfamilie zu bringen. Die Forschung an Grp94 ist von zentraler Wichtigkeit für das Verständnis der Proteinfaltung im ER. Grp94 wurde in Verbindung mit Krebs, Viruserkrankungen und dem Immunsystem (Lee, 2001) gebracht, und besitzt somit eine Schlüsselrolle für zahlreiche Krankheiten. Daher sind Ergebnisse zur Chaperon- und ATPase-Aktivität von Grp94 von großer Bedeutung auch um zu überprüfen, Grp94 ein geeignetes als therapeutisches Ziel darstellt.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere ER- abhängige Prozesse und Komponenten betrachtet, die direkt oder indirekt an der Faltung und Assemblierung von Antikörpern beteiligt sind.

Den Anfang bildet ein Kapitel, das die Möglichkeit der zellfreien Synthese eines vollständigen IgG- Moleküls in einem Transkriptions-/Translationssystem aufzeigt, das auf dem Zellysate von *E. coli* basiert.

Antikörper sind disulfidverbrückte Proteine und werden daher im lebenden Organismus im ER assembliert, und somit stößt man bei deren Synthese im reduzierenden Milieu des Cytosol eines Organismus, wie *E. coli* auf große Probleme. Nicht selten ist die Bildung von *inclusion bodies*, großen unlöslichen Proteinaggregaten, die sich häufig bei der rekombinanten Expression von Polypeptiden in Bakterien bilden, zu beobachten.

In der vorliegenden Arbeit gelang es in einem von Roche (Mannheim) vertriebenen System (*Rapid Translation System*; RTS), einen vollständig assemblierten und funktionsfähigen löslichen Antikörper (MAK33, mausspezifisches IgG, gerichtet gegen menschliche Kreatinkinase) herzustellen. Die genetische Information für die leichte und die schwere Kette dieses IgG- Moleküls war hierbei der Ausgangspunkt für die Synthese auf zwei unabhängigen Plasmiden. Nach der Synthese im RTS konnte die Expression mittels Westernblot und die Aktivität des Antikörpers durch einen modifizierten ELISA überprüft werden. Die maximale Aktivität dabei lag bei ca. 500 ng/ml, was in etwa einem 80stel der Gesamtmenge der synthetisierten Antikörperfragmente im löslichen und unlöslichen Teil der Reaktion entsprach. Um aktiven Antikörper zu gewinnen, war die Anwesenheit einer PDI unerlässlich, wobei die Zugabe einer rekombinanten PDI (hPDI oder DsbC) effektiver als die Coexpression von DsbC war. Die Zugabe weiterer *in vivo* ER-relevanter Chaperone, wie BiP und Grp94, brachte keinen weiteren Aktivitätsgewinn.

Über verschiedene Konzentrationen der *Templates* von leichter und schwerer Kette konnte die Aktivität der Antikörperfragmente weiter gesteigert werden, wobei das optimale Verhältnis von schwerer zu leichter Kette bei 10: 1 lag, obwohl im lebenden Organismus die schwere Kette für die Assemblierung ganzer Antikörpermoleküle verwendet wird, wenn genügend leichte Kette im Lumen des ER vorliegt.

Durch eine Redox Titration, sprich einer Veränderung des GSH:GSSG-Verhältnis, konnte interessanterweise ein Optimum für die Aktivierung der Antikörper in reduzierender Umgebung verzeichnet werden, was vermutlich dadurch zu erklären ist, dass die

Oxidoreduktasen (hPDI und DsbC) in diesem System nicht als Disulfidbildner agieren, sondern in erster Linie mit der Umlagerung von falsch verbrückten Cysteinen beschäftigt sind. Als Problem stellte sich die Tatsache heraus, dass über den „Redox-Hintergrund“ des Systems keine Angaben vom Hersteller gemacht wurden, so dass dieser Punkt spekulativ diskutiert bleibt.

Charakterisiert wurde der Antikörper durch unterschiedliche biophysikalische Methoden. Mittels nicht-reduzierender SDS- PAGE konnten vier unterschiedliche Spezies detektiert werden, die allen möglichen Oligomerisierungszuständen der Antikörperketten, von MAK33 entsprachen. Aktivität könnte durch das Homodimer aus zwei leichten Ketten, einem Heterodimer aus einer leichten und einer schweren Kette oder das vollständige Heterotetramer eines IgG verursacht werden. Die alleinige Expression der leichten Kette von MAK33 in diesem System führte ebenfalls zu Aktivität, allerdings nicht in dem Maße wie die Coexpression von leichter und schwerer Kette. Die alleinige Expression der schweren Kette resultiert nicht in messbarer Aktivität (Frey, 2002).

Fluoreszenzspektroskopische Methoden haben die für Antikörper typischen Charakteristika für den nativen, denaturierten und reduziert denaturierten Zustand auch für den „RTS-Antikörper“ bestätigt. Mittels analytischer Gelfiltration konnte ebenfalls, im Vergleich zu einem authentischen MAK33 das heterotetramere Elutionsprofil eines IgG- Moleküls aufgezeichnet werden.

Im Hinblick auf die rekombinante Expression von IgG- Molekülen in einem auf *E. coli* basierenden System, geben die Daten der Synthese von MAK33 im zellfreien System wertvolle Hinweise auf eine Funktionsweise und Anwendbarkeit solcher Methoden. Weiter untersucht werden sollte der Zusatz stabilisierender Agentien, wie z.B. Arginin, der Einfluss weiterer ER-aktiver Chaperone und die Reaktionstemperatur. Auf diese Weise ließe sich ein sehr schnelles und handhabbares System etablieren, durch das Antikörper, aber auch andere disulfidverbrückte Proteine herstellen lassen, die für Diagnostik, Analytik und Therapieansätze von Nutzen sind.

Das zweite Kapitel der Arbeit beschäftigt sich mit der Rückfaltung des Fab-Fragments, dem antigenbindenden Teil eines Antikörpers. Es konnte Anfang der 90er Jahre gezeigt werden, dass denaturiertes, reduziertes Fab zurückgefaltet werden kann (Lilie et al., 1994; Cabilly, 1989). Angesichts der unheimlich großen Vielzahl theoretisch möglicher Disulfidverbrückungen im Fall des reduzierten Fab-Fragments bei zehn dazu beitragenden Cysteinen (10!- Möglichkeiten entspricht 3 628 800) ist es erstaunlich, dass jedes Fab-

Fragment in seiner antigenbindenden Funktion fünf definierte Disulfide ausbildet. Die an diesem Prozess maßgeblich beteiligten Katalysatoren stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die oftmals gleich zwei Aufgaben übernehmen: Disulfidisomerasen haben zum einen die Aufgabe neu auszubildende Disulfide zu knüpfen, wobei die entsprechende PDI in oxidiert Form vorliegen muss. Zum anderen müssen sie in reduzierter Form vorliegen, um ein falsch verknüpftes Disulfid zu spalten und es zu isomerisieren. Für diese Prozesse stellt Fab ein hervorragendes Modellsystem dar.

In einer Reihe von Experimenten wurden hier zwei bisher unbekannte Enzyme auf ihre Eigenschaften als Oxidoreduktase untersucht. Darunter fallen die Enzyme smERp1 aus I. Braakmans Labor und LyTOR aus dem Arbeitskreis von L. Hendershot. Während smERp1 nicht nur einen positiven Effekt auf die Rückfaltung von Fab zu haben schien, sondern die frühe Phase der Rückfaltung auch noch beschleunigen konnte, war das Protein LyTOR abhängig vom Oligomersierungszustand aktiv. Eine im CXXC-Motiv veränderte Mutante bestätigte die Bedeutung für die Redoxreaktion.

Aufgabe des ER ist der Transport von löslichen und membranständigen Proteinen. Damit diese Prozesse überprüft werden können, bedient sich dieses Zellkompartiment der überaus wichtigen *quality control*. Dabei handelt es sich um ein System von Proteinen, die über richtige und falsche Faltung urteilen, und somit über Freisetzung oder Abbau von für den Export bestimmten Proteinen. Oft sind es Fehler in diesem System, die z.B. zu Autoimmunkrankheiten führen (Ma et al., 2002). Ein Bestandteil dieser *quality control* stellt das Lectin Calnexin (Cnx) dar, das anhand von Glykosylierungsmuster der ER-Proteinen solche Entscheidungen fällt. Daher sollte im diesem Rahmen festgestellt werden, ob Cnx auch *in vitro* die Faltung von Proteinen beeinflussen kann. Aber die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cnx weder mit Fab noch mit einer ER-residenten PDI, dem ERp57, interagiert. Solche Interaktionen konnten *in vivo* nachgewiesen werden. Da dem *in vitro* System ein Glykosylierungsmuster sowohl an rekombinantem ERp57 noch am von Natur aus unglykosyliertem Fab fehlt, konnte keine Interaktion festgestellt werden, was wiederum für die Spezifität dieses System spricht.

Das Reaktivierungssystem stellt eine einfach durchzuführende Methode dar, Chaperone und andere Faltungshelfer in ihrer Enzymatik zu charakterisieren.

Das dritte Kapitel setzt sich mit der Charakterisierung des ER-residenten Hsp90-Homologen Grp94 auseinander. Das Protein ist evolutionär direkt aus Hsp90 hervorgegangen, somit handelt es sich um ein Paralog von Hsp90. Die Domänenstruktur entspricht prinzipiell der der

anderen Mitglieder der Hsp90- Chaperonfamilie: eine N-terminale ATPase- Domäne, wird, und das ist speziell für Grp94, über ein kurzes geladenes Verbindungsstück mit der Mitteldomäne verbunden, die dann C-terminal durch die Dimerisierungsdomäne abgeschlossen wird. Grp94 wird C-terminal durch eine ER- Retentionssequenz an dem Austritt aus dem ER gehindert, und die N-terminale ER- Lokalisationssequenz wird nach dem Eintritt in das ER-Lumen abgetrennt.

Anders als bei cytosolischem Hsp90 sind für Grp94 keine Co-chaperone bekannt, allerdings kennt man mittlerweile eine ganze Reihe von *in vivo* Substraten. Die Umstände, die zu einer Überexpression des Proteins führen, sind teilweise geklärt, und es wird sogar postuliert, dass Grp94 in der Lage ist, über gebundenes Peptid eine Immunantwort zu induzieren.

Trotz der starken Homologie zu anderen Mitgliedern der Hsp90-Chaperonfamilie wird über die Aufgabe der ATPase-Domäne und deren Aktivität gestritten. Kristallstrukturen der ATPase Domäne im Komplex mit Inhibitoren und ADP wurden von den Autoren mit Nukleotidbindeigenschaften aber nicht mit Hydrolyseaktivitäten belegt (Immormino et al., 2004; Soldano et al., 2003). Hier konnten Daten über die Struktur von Grp94 gewonnen werden, die den Homologiegrad bestätigen und auch die Funktion als Chaperon konnte mit Hilfe eines klassischen Modellsubstrats, der Citratsynthase, sowie eines möglicherweise auch *in vivo* relevanten Substrats, dem Fab-Fragment von Antikörpern belegt werden. Des Weiteren wurden Messungen durchgeführt, die in zwei unabhängigen Messmethoden eindeutig ATPase-Aktivität zeigen, die ebenfalls mit der anderer Hsp90-Mitgliedern in Einklang stehen. Als unterschiedlich hingegen konnte durch *single turn over* Experimente sowie  $k_D$ -Wertbestimmungen in Gegenwart von Nukleotiden und Inhibitoren der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Hydrolysereaktion von Grp94 im Vergleich zu anderen Hsp90- Mitgliedern gezeigt werden. Während im Fall des cytosolischen Hsp90 die Hydrolyse den ratenlimitierenden Schritt darstellt, ist es Grp94 die ATP-Bindung. Unter den gegebenen Bedingungen unterscheiden sich die Dissoziationskonstanten von ATP und ADP kaum. Ebenfalls abweichend ist die mögliche Inhibierung der ATPase durch Nukleotidanaloga oder -inhibitoren. Die Bindekonstante im Fall von Radicicol unterscheidet sich deutlich von der an cytosolischem Hsp90. Hier werden nM-Werte angegeben, im Fall von GRP scheint die Bindung gerade 2,5mal höher als von ADP oder ATP unter den angenommenen Bedingungen. NECA ist eine Grp94 spezifischer Inhibitor (Melnick & Argon, 1995). Das konnte bestätigt werden. Allerdings ist auch hier die Affinität relativ schwach und es war möglich, dieses echte Nukleotidanalogen aus der Bindetasche zu

entfernen und die ATPase Aktivität des Proteins fast vollständig zu reaktivieren. Schließlich konnte ein Modell für den ATPase Zyklus von Grp94 postuliert werden.

Zur Klärung des gesamten Zyklus müssten in zukünftigen Untersuchungen Substrate gefunden werden, die eine strikte Abhängigkeit der ATPase-Funktionalität zeigen. Erste Anzeichen geben möglicherweise die positiven Effekte der Fab-Rückfaltung, so dass im Bereich der Antikörperdomänen doch ein Substrat gefunden werden kann, so wie es für BiP zum Beispiel der Fall ist.

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen einzelnen Proteinen, die an der Faltung im ER beteiligt sind, sowie komplexen Vorgängen, die im Bezug auf die Faltung von Antikörpern zu beobachten waren, gemacht werden. Die Kombination von *in vivo* als auch *in vitro* Experimenten scheint für zukünftige Fragestellungen und weiteren Erkenntnisgewinnen von Bedeutung zu sein.

## 5. Abkürzungen

Abb	Abbildung
Abs	Absorption
ADP	Adenosin-5'-biphosphat
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arg	Arginin
As	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bi. dest.	Doppelt Quarz destilliertes Wasser
BiP	Immunglobulin-schwere-Kette-Bindeprotein
bp	Basenpaare
CECF	Continious Exchange Cell Free technology
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	1,4-Dithioerytol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Antikörperfragment bestehend aus leichter Kette und den beiden N-terminalen Domänen der schweren Kette
g	Gramm
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
GRP	Glucose reguliertes Protein
GSH	reduziertes L-Gluthation
GSSG	oxidiertes L-Gluthation
His	Histidin
HKM- Puffer	Standard Puffer (Hepes-Kalium-Magnesium)
HY	High Yield
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid
Kana	Kanamycin

---

kDA	Kilodalton
LB	Luria Broth
LMW	Low Molucular Weight
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
M	Molar
mA	Milliampere
MAK33	monoklonaler Antikörper aus Maus (κIgG1)
mM	Millimolar
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
OD	optische Dichte
p.A.	pro Analysis
PBD	Peptidbindedomäne
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PPI	Peptidyl-Prolyl-Isomerase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTS	Rapid Translation System
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U	Units (Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
v/v	Volumen pro Volumen
Vis	Sichtbar
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 6. Literaturverzeichnis

Abkevich, V.I. and 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.

Ali, J.A., Jackson, A.P., Howells, A.J., and Maxwell, A. (1993). The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyzes ATP and binds coumarin drugs. *Biochemistry* 32, 2717-2724.

Allen, S.P., Polazzi, J.O., Gierse, J.K., and Easton, A.M. (1992). Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 6938-6947.

Amzel, L.M. and Poljak, R.J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 961-997.

Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230.

Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H., Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 47, 1309-1314.

Augustine, J.G., de La, C.A., Knarr, G., Buchner, J., and 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.

Baldwin, R.L. (1995). Alpha-helix formation by peptides of defined sequence. *Biophys. Chem.* 55, 127-135.

Baldwin, R.L. (2002). Relation between peptide backbone solvation and the energetics of peptide hydrogen bonds. *Biophys. Chem.* 101-102, 203-210.

Ban, C., Junop, M., and Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* 97, 85-97.

Banecki, B. and Zylicz, M. (1996). Real time kinetics of the DnaK/DnaJ/GrpE molecular chaperone machine action. *J. Biol. Chem.* 271, 6137-6143.

Baranov, V.I., Morozov, I.Y., Ortlepp, S.A., and Spirin, A.S. (1989). Gene expression in a cell-free system on the preparative scale. *Gene* 84, 463-466.

Baranov, V.I. and Spirin, A.S. (1993b). Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol.* 217, 123-142.

Baranov, V.I. and Spirin, A.S. (1993a). Gene expression in cell-free system on preparative scale. *Methods Enzymol.* 217, 123-142.

Basha, E., Lee, G.J., Breci, L.A., Hausrath, A.C., Buan, N.R., Giese, K.C., and Vierling, E. (2004a). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress

in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J. Biol. Chem.* 279, 7566-7575.

Basha,E., Lee,G.J., Breci,L.A., Hausrath,A.C., Buan,N.R., Giese,K.C., and Vierling,E. (2004b). The identity of proteins associated with a small heat shock protein during heat stress in vivo indicates that these chaperones protect a wide range of cellular functions. *J. Biol. Chem.* 279, 7566-7575.

Bergmann,J.E. and Lodish,H.F. (1979). A kinetic model of protein synthesis. Application to hemoglobin synthesis and translational control. *J. Biol. Chem.* 254, 11927-11937.

Betton,J.M. (2003). Rapid translation system (RTS): a promising alternative for recombinant protein production. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 73-80.

Betton,J.M. and Hofnung,M. (1994). In vivo assembly of active maltose binding protein from independently exported protein fragments. *EMBO J.* 13, 1226-1234.

Blagosklonny,M.V., Toretsky,J., Bohlen,S., and Neckers,L. (1996). Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional HSP90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 8379-8383.

Bork,P., Holm,L., and Sander,C. (1994). The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* 242, 309-320.

BOROSOOK,H., DEASY,C.L., HAAGEN-SMIT,A.J., KEIGHLEY,G., and LOWY,P.H. (1950). The uptake in vitro of C14-labeled glycine, l-leucine, and l-lysine by different components of guinea pig liver homogenate. *J. Biol. Chem.* 184, 529-543.

Bose,S., Weikl,T., Bugl,H., and Buchner,J. (1996). Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science* 274, 1715-1717.

Bosl,B., Grimminger,V., and Walter,S. (2006b). The molecular chaperone Hsp104-A molecular machine for protein disaggregation. *J. Struct. Biol.*

Bosserhoff,A.K. and Buettner,R. (2003). Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation. *Biomaterials* 24, 3229-3234.

Braakman,I., Keij,J., Hardonk,M.J., Meijer,D.K., and Groothuis,G.M. (1991). Separation of periportal and perivenous rat hepatocytes by fluorescence-activated cell sorting: confirmation with colloidal gold as an exogenous marker. *Hepatology* 13, 73-82.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brugge,J., Cotton,P., Lustig,A., Yonemoto,W., Lipsich,L., Coussens,P., Barrett,J.N., Nonner,D., and Keane,R.W. (1987). Characterization of the altered form of the c-src gene product in neuronal cells. *Genes Dev.* 1, 287-296.

Buchberger,A., Schroder,H., Hesterkamp,T., Schonfeld,H.J., and Bukau,B. (1996). Substrate shuttling between the DnaK and GroEL systems indicates a chaperone network promoting protein folding. *J. Mol. Biol.* 261, 328-333.

- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H.J., Jaenicke, R., Kiefhabel, T., and Rudolph, R. (1991). Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* 30, 6922-6929.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., and Craig, E.A. (2000a). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998a). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125, 443-451.
- Cabilly, S. (1989). Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. *Gene* 85, 553-557.
- Carrello, A., Ingley, E., Minchin, R.F., Tsai, S., and Ratajczak, T. (1999). The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor-associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90. *J. Biol. Chem.* 274, 2682-2689.
- Casadevall, A. (2004). The methodology for determining the efficacy of antibody-mediated immunity. *J. Immunol. Methods* 291, 1-10.
- Cashikar, A.G., Duennwald, M.L., and Lindquist, S.L. (2005a). A chaperone pathway in protein disaggregation: Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.*
- Cashikar, A.G., Duennwald, M.L., and Lindquist, S.L. (2005b). A chaperone pathway in protein disaggregation: Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. *J. Biol. Chem.*
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* 4, 3131-3135.
- Cech, T.R. (1986). RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255, 64-75.
- Chao, F.C. and Schachman, H.K. (1956). The isolation and characterization of a macromolecular ribonucleoprotein from yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 61, 220-230.
- Cheetham, M.E., Jackson, A.P., and Anderton, B.H. (1994). Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HsJ1a and HsJ1b. *Eur. J. Biochem.* 226, 99-107.
- Chung, K.T., Shen, Y., and Hendershot, L.M. (2002). BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J. Biol. Chem.* 277, 47557-47563.
- Clarke, J., Hounslow, A.M., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (1993). Local breathing and global unfolding in hydrogen exchange of barnase and its relationship to protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9837-9841.
- Cooper, T.G. (1981). Yeast genetics and molecular biology. *Nature* 289, 119-120.

- Craig, W.A. and Ebert, S.C. (1992). Continuous infusion of beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 2577-2583.
- Csermely, P., Miyata, Y., Schnaider, T., and Yahara, I. (1995). Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic reticulum chaperone). *J. Biol. Chem.* 270, 6381-6388.
- D'Aniello, A., D'Onofrio, G., Pischetola, M., D'Aniello, G., Vetere, A., Petrucelli, L., and Fisher, G.H. (1993). Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. *J. Biol. Chem.* 268, 26941-26949.
- Damen, J.E., Liu, L., Ware, M.D., Ermolaeva, M., Majerus, P.W., and Krystal, G. (1998). Multiple forms of the SH2-containing inositol phosphatase, SHIP, are generated by C-terminal truncation. *Blood* 92, 1199-1205.
- Danilczyk, U.G. and Williams, D.B. (2001). The lectin chaperone calnexin utilizes polypeptide-based interactions to associate with many of its substrates in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 25532-25540.
- Das, K.C., Guo, X.L., and White, C.W. (1998). Protein kinase C $\delta$ -dependent induction of manganese superoxide dismutase gene expression by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 273, 34639-34645.
- Dekker, P.J. and Pfanner, N. (1997). Role of mitochondrial GrpE and phosphate in the ATPase cycle of matrix Hsp70. *J. Mol. Biol.* 270, 321-327.
- Deuerling, E. and Bukau, B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 261-277.
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A., and Bukau, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-696.
- DeVries, J.K. and Zubay, G. (1967a). DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 57, 1010-1012.
- Dill, K.A. and Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol* 4, 10-19.
- Dill, K.A., Truskett, T.M., Vlachy, V., and Hribar-Lee, B. (2005). Modeling water, the hydrophobic effect, and ion solvation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34, 173-199.
- Dollins, D.E., Immormino, R.M., and Gewirth, D.T. (2005). Structure of unliganded GRP94, the endoplasmic reticulum Hsp90. Basis for nucleotide-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* 280, 30438-30447.
- Dougan, D.A., Mogk, A., and Bukau, B. (2002). Protein folding and degradation in bacteria: to degrade or not to degrade? That is the question. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1607-1616.
- Dutta, R. and Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 25, 24-28.
- Edman, J.C., Ellis, L., Blacher, R.W., Roth, R.A., and Rutter, W.J. (1985). Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. *Nature* 317, 267-270.

- Eigen, M. (1987). New concepts for dealing with the evolution of nucleic acids. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 307-320.
- Eijsink, V.G., Bjork, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den, B.B., and Vriend, G. (2004). Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.* 113, 105-120.
- Ellgaard, L. and Frickel, E.M. (2003). Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 223-247.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 431-437.
- Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328, 378-379.
- Erbse, A., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2004). Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 617-621.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., and Wallach, D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Feldweg, A.M. and Srivastava, P.K. (1995). Molecular heterogeneity of tumor rejection antigen/heat shock protein GP96. *Int. J. Cancer* 63, 310-314.
- Ferreira, L.R., Norris, K., Smith, T., Hebert, C., and Sauk, J.J. (1994). Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J. Cell Biochem.* 56, 518-526.
- Ferris, J.P., Hill, A.R., Jr., Liu, R., and Orgel, L.E. (1996). Synthesis of long prebiotic oligomers on mineral surfaces. *Nature* 381, 59-61.
- Fewell, S.W., Travers, K.J., Weissman, J.S., and Brodsky, J.L. (2001). The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Genet.* 35, 149-191.
- Fink, S.L., Chang, L.K., Ho, D.Y., and Sapolsky, R.M. (1997). Defective herpes simplex virus vectors expressing the rat brain stress-inducible heat shock protein 72 protect cultured neurons from severe heat shock. *J. Neurochem.* 68, 961-969.
- Fling, S.P. and Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.
- Frand, A.R. and Kaiser, C.A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 4, 469-477.
- Freedman, A.S. and Nadler, L.M. (1991). Cellular interactions within the germinal centre. *Res. Immunol.* 142, 232-236.
- Freeman, B.C., Felts, S.J., Toft, D.O., and Yamamoto, K.R. (2000). The p23 molecular chaperones act at a late step in intracellular receptor action to differentially affect ligand efficacies. *Genes Dev.* 14, 422-434.

- Freeman,B.C. and Morimoto,R.I. (1996). The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J.* 15, 2969-2979.
- Freeman,B.C., Toft,D.O., and Morimoto,R.I. (1996). Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin Cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23. *Science* 274, 1718-1720.
- Frydman,J., Nimmegern,E., Ohtsuka,K., and Hartl,F.U. (1994). Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111-117.
- Fukunaga,B.N., Probst,M.R., Reisz-Porszasz,S., and Hankinson,O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 29270-29278.
- Gao,B., Emoto,Y., Greene,L., and Eisenberg,E. (1993). Nucleotide binding properties of bovine brain uncoating ATPase. *J. Biol. Chem.* 268, 8507-8513.
- Gautschi,M., Mun,A., Ross,S., and Rospert,S. (2002). A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4209-4214.
- Gething,M.J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 465-472.
- Geuze,H.J., Murk,J.L., Stroobants,A.K., Griffith,J.M., Kleijmeer,M.J., Koster,A.J., Verkleij,A.J., Distel,B., and Tabak,H.F. (2003). Involvement of the endoplasmic reticulum in peroxisome formation. *Mol. Biol. Cell* 14, 2900-2907.
- Ghaemmaghami,S., Huh,W.K., Bower,K., Howson,R.W., Belle,A., Dephoure,N., O'Shea,E.K., and Weissman,J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.
- Goto,Y. and Hamaguchi,K. (1982). Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J. Mol. Biol.* 156, 911-926.
- Gottesman,S. and Maurizi,M.R. (2001). Cell biology. Surviving starvation. *Science* 293, 614-615.
- Green,E.D., Baenziger,J.U., and Boime,I. (1985). Cell-free sulfation of human and bovine pituitary hormones. Comparison of the sulfated oligosaccharides of lutropin, follitropin, and thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 260, 15631-15638.
- Greene,L.E., Zinner,R., Naficy,S., and Eisenberg,E. (1995). Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 270, 2967-2973.
- Guba,M., Bosserhoff,A.K., Steinbauer,M., Abels,C., Anthuber,M., Buettner,R., and Jauch,K.W. (2000). Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br. J. Cancer* 83, 1216-1222.
- Guignard,L., Ozawa,K., Pursglove,S.E., Otting,G., and Dixon,N.E. (2002). NMR analysis of in vitro-synthesized proteins without purification: a high-throughput approach. *FEBS Lett.* 524, 159-162.

- Haas,I.G. and Wabl,M. (1983b). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306, 387-389.
- Hamman,B.D., Hendershot,L.M., and Johnson,A.E. (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92, 747-758.
- Hammond,C. and Helenius,A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 126, 41-52.
- Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hanauer,S.B., Cohen,R.D., Becker,R.V., III, Larson,L.R., and Vreeland,M.G. (1998). Advances in the management of Crohn's disease: economic and clinical potential of infliximab. *Clin. Ther.* 20, 1009-1028.
- Harding,H.P., Zhang,Y., and Ron,D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Harrison,C.J., Hayer-Hartl,M., Di Liberto,M., Hartl,F., and Kuriyan,J. (1997). Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276, 431-435.
- Hartl,F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartl,F.U. and Hayer-Hartl,M. (2002a). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.
- Haslbeck,M. (2006). Recombinant expression and in vitro refolding of the yeast small heat shock protein Hsp42. *Int. J. Biol. Macromol.* 38, 107-114.
- Haslbeck,M., Braun,N., Stromer,T., Richter,B., Model,N., Weinkauff,S., and Buchner,J. (2004a). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 23, 638-649.
- Haslbeck,M., Franzmann,T., Weinfurter,D., and Buchner,J. (2005a). Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 842-846.
- Haslbeck,M., Miess,A., Stromer,T., Walter,S., and Buchner,J. (2005b). Disassembling protein aggregates in the yeast cytosol: The cooperation of Hsp26 with Ssa1 and Hsp104. *J. Biol. Chem.*
- Hein,A., Martin,J.P., and Dorries,R. (2001). In vitro activation of feline immunodeficiency virus in ramified microglial cells from asymptotically infected cats. *J. Virol.* 75, 8090-8095.
- Helenius,A. and Aebi,M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-2369.
- Helenius,A., Marquardt,T., and Braakman,I. (1992). The endoplasmic reticulum as a protein-folding compartment. *Trends Cell Biol.* 2, 227-231.

- Herrmann, J.M., Malkus, P., and Schekman, R. (1999). Out of the ER--outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol.* 9, 5-7.
- Herrmann, J.M. and Neupert, W. (2000). What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 331-338.
- Herrmann, J.M., Neupert, W., and Stuart, R.A. (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *EMBO J.* 16, 2217-2226.
- Hoffmann, M., Nemetz, C., Madin, K., and Buchberger, B. (2004). Rapid translation system: a novel cell-free way from gene to protein. *Biotechnol. Annu. Rev.* 10, 1-30.
- Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schonfeld, H.J., Schatz, G., and Azem, A. (1997). Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J.* 16, 1842-1849.
- Hosokawa, N. and Nagata, K. (2000). Procollagen binds to both prolyl 4-hydroxylase/protein disulfide isomerase and HSP47 within the endoplasmic reticulum in the absence of ascorbate. *FEBS Lett.* 466, 19-25.
- Hosokawa, N., Wada, I., Hasegawa, K., Yorihuzi, T., Tremblay, L.O., Herscovics, A., and Nagata, K. (2001). A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep.* 2, 415-422.
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Hammond, J., Hammond, R.W., Bottino, P.J., and Owens, R.A. (1997). Destabilization of potato spindle tuber viroid by mutations in the left terminal loop. *J. Gen. Virol.* 78 ( Pt 6), 1199-1206.
- Huai, Q., Wang, H., Liu, Y., Kim, H.Y., Toft, D., and Ke, H. (2005). Structures of the N-terminal and middle domains of *E. coli* Hsp90 and conformation changes upon ADP binding. *Structure.* 13, 579-590.
- Hurtley, S.M. and Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 277-307.
- Hyun, C.G., Bililign, T., Liao, J., and Thorson, J.S. (2003). The biosynthesis of indolocarbazoles in a heterologous *E. coli* host. *Chembiochem.* 4, 114-117.
- Immormino, R.M., Dollins, D.E., Shaffer, P.L., Soldano, K.L., Walker, M.A., and Gewirth, D.T. (2004). Ligand-induced conformational shift in the N-terminal domain of GRP94, an Hsp90 chaperone. *J. Biol. Chem.* 279, 46162-46171.
- Jackson, A.M., Boutell, J., Cooley, N., and He, M. (2004). Cell-free protein synthesis for proteomics. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2, 308-319.
- Jaenicke, R. (1987). Folding and association of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 49, 117-237.
- Jaenicke, R. (1998). Protein self-organization in vitro and in vivo: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol. Chem.* 379, 237-243.
- Jaenicke, R. and Lilie, H. (2000). Folding and association of oligomeric and multimeric proteins. *Adv. Protein Chem.* 53, 329-401.

- Jaenicke,R. and Seckler,R. (1997a). Protein misassembly in vitro. *Adv. Protein Chem.* 50, 1-59.
- Jakob,U. and Buchner,J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 19, 205-211.
- Jakob,U., Lilie,H., Meyer,I., and Buchner,J. (1995). Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 7288-7294.
- Janeway,C.A., Jr. (2001). How the immune system protects the host from infection. *Microbes. Infect.* 3, 1167-1171.
- Jessop,C.E. and Bulleid,N.J. (2004). Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279, 55341-55347.
- Johansson,T., Oswald,C., Pedersen,A., Tornroth,S., Okvist,M., Karlsson,B.G., Rydstrom,J., and Kregel,U. (2005). X-ray structure of domain I of the proton-pumping membrane protein transhydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 352, 299-312.
- Johnson,A.E. and van Waes,M.A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 799-842.
- Johnson,B.D., Chadli,A., Felts,S.J., Bouhouche,I., Catelli,M.G., and Toft,D.O. (2000). Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains. *J. Biol. Chem.* 275, 32499-32507.
- Kang,H.S. and Welch,W.J. (1991). Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J. Biol. Chem.* 266, 5643-5649.
- Kaufman,H.L., Swartout,B.G., Horig,H., and Lubensky,I. (2002). Combination interleukin-2 and interleukin-12 induces severe gastrointestinal toxicity and epithelial cell apoptosis in mice. *Cytokine* 17, 43-52.
- Keller,E.B. and Zamecnik,P.C. (1956). The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino acids into proteins. *J. Biol. Chem.* 221, 45-59.
- Kiefhaber,T., Rudolph,R., Kohler,H.H., and 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, 825-829.
- Kigawa,T., Muto,Y., and Yokoyama,S. (1995). Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. *J. Biomol. NMR* 6, 129-134.
- Kigawa,T., Yabuki,T., Matsuda,N., Matsuda,T., Nakajima,R., Tanaka,A., and Yokoyama,S. (2004). Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 63-68.
- Kigawa,T., Yabuki,T., Yoshida,Y., Tsutsui,M., Ito,Y., Shibata,T., and Yokoyama,S. (1999). Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Lett.* 442, 15-19.

- Kim,D.M. and Swartz,J.R. (1999). Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 180-188.
- Kim,K.S. and Lee,A.S. (1986). The effect of extracellular Ca<sup>2+</sup> and temperature on the induction of the heat-shock and glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140, 881-887.
- Kim,P.S., Bierzynski,A., and Baldwin,R.L. (1982). A competing salt-bridge suppresses helix formation by the isolated C-peptide carboxylate of ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* 162, 187-199.
- Kleinschmidt,M., Rudolph,R., and Lilie,H. (2003). Design of a modular immunotoxin connected by polyionic adapter peptides. *J. Mol. Biol.* 327, 445-452.
- Knarr,G., Gething,M.J., Modrow,S., and Buchner,J. (1995). BiP binding sequences in antibodies. *J. Biol. Chem.* 270, 27589-27594.
- Knarr,G., Modrow,S., Todd,A., Gething,M.J., and Buchner,J. (1999). BiP-binding sequences in HIV gp160. Implications for the binding specificity of bip. *J. Biol. Chem.* 274, 29850-29857.
- Kobayashi,Y., Murata,M., Minami,H., Yamamoto,S., Kagaya,Y., Hobo,T., Yamamoto,A., and Hattori,T. (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 44, 939-949.
- Kornberg,A., Scott,J.F., and Bertsch,L.L. (1978). ATP utilization by rep protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork. *J. Biol. Chem.* 253, 3298-3304.
- Kostova,Z. and Wolf,D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22, 2309-2317.
- Kroll,J. (2002). Molecular chaperones and the process of cellular immortalization in vitro. *Biogerontology.* 3, 183-185.
- Kuczynska-Wisnik,D., Kedzierska,S., Matuszewska,E., Lund,P., Taylor,A., Lipinska,B., and Laskowska,E. (2002). The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured in vivo during extreme heat shock. *Microbiology* 148, 1757-1765.
- Kung,H.F., Redfield,B., Treadwell,B.V., Eskin,B., Spears,C., and Weissbach,H. (1977a). DNA-directed in vitro synthesis of beta-galactosidase. Studies with purified factors. *J. Biol. Chem.* 252, 6889-6894.
- Kung,J.T., Brooks,S.B., Jakway,J.P., Leonard,L.L., and Talmage,D.W. (1977b). Suppression of in vitro cytotoxic response by macrophages due to induced arginase. *J. Exp. Med.* 146, 665-672.
- Kuwajima,K., Mitani,M., and Sugai,S. (1989). Characterization of the critical state in protein folding. Effects of guanidine hydrochloride and specific Ca<sup>2+</sup> binding on the folding kinetics of alpha-lactalbumin. *J. Mol. Biol.* 206, 547-561.

- Kuznetsov, G., Chen, L.B., and Nigam, S.K. (1997). Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, 3057-3063.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laue, T.M. and Stafford, W.F., III (1999). Modern applications of analytical ultracentrifugation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 75-100.
- Leconte, A.M., Chen, L., and Romesberg, F.E. (2005). Polymerase evolution: efforts toward expansion of the genetic code. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12470-12471.
- Lee, A.S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem. Sci.* 26, 504-510.
- Lesk, A.M. and Chothia, C. (1982). Evolution of proteins formed by beta-sheets. II. The core of the immunoglobulin domains. *J. Mol. Biol.* 160, 325-342.
- Levinthal, M. and Schiff, J.A. (1968). Studies of Sulfate Utilization by Algae. 5. Identification of Thiosulfate as a Major Acid-Volatile Product Formed by a Cell-Free Sulfate-Reducing System From *Chlorella*. *Plant Physiol* 43, 555-562.
- Li, Z. and Srivastava, P.K. (1993). Tumor rejection antigen gp96/grp94 is an ATPase: implications for protein folding and antigen presentation. *EMBO J.* 12, 3143-3151.
- Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., and 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, 2874-2878.
- Lievremont, J.P., Rizzuto, R., Hendershot, L., and Meldolesi, J. (1997). BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* 272, 30873-30879.
- Lilie, H., Jaenicke, R., and Buchner, J. (1995a). Characterization of a quaternary-structured folding intermediate of an antibody Fab-fragment. *Protein Sci.* 4, 917-924.
- Lilie, H., McLaughlin, S., Freedman, R., and Buchner, J. (1994). Influence of protein disulfide isomerase (PDI) on antibody folding in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 14290-14296.
- Lilie, H., Rudolph, R., and Buchner, J. (1995b). Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure. *J. Mol. Biol.* 248, 190-201.
- Lin, Y. (1979). Environmental regulation of gene expression. In vitro translation of winter flounder antifreeze messenger RNA. *J. Biol. Chem.* 254, 1422-1426.
- Linderoth, N.A., Popowicz, A., and Sastry, S. (2000). Identification of the peptide-binding site in the heat shock chaperone/tumor rejection antigen gp96 (Grp94). *J. Biol. Chem.* 275, 5472-5477.
- Linderoth, N.A., Simon, M.N., Hainfeld, J.F., and Sastry, S. (2001). Binding of antigenic peptide to the endoplasmic reticulum-resident protein gp96/GRP94 heat shock chaperone

- occurs in higher order complexes. Essential role of some aromatic amino acid residues in the peptide-binding site. *J. Biol. Chem.* 276, 11049-11054.
- Lindquist,S. and Craig,E.A. (1988a). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Lindquist,S. and Craig,E.A. (1988b). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- Littlefield,J.W., Keller,E.B., GROSS,J., and Zamecnik,P.C. (1955). Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 217, 111-123.
- Lorenz,P., Ruschpler,P., Koczan,D., Stiehl,P., and Thiesen,H.J. (2003). From transcriptome to proteome: differentially expressed proteins identified in synovial tissue of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an initial screen with a panel of 791 antibodies. *Proteomics.* 3, 991-1002.
- Lorimer,G.H. (1996). A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding in vivo. *FASEB J.* 10, 5-9.
- Lorimer,G.H. (2001). A personal account of chaperonin history. *Plant Physiol* 125, 38-41.
- Ma,Y., Brewer,J.W., Diehl,J.A., and Hendershot,L.M. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* 318, 1351-1365.
- Marquart,K.H. (1984). An unusual form of endoplasmic reticulum in mononuclear cells of a giant cell tumor of bone. *Ultrastruct. Pathol.* 7, 161-165.
- Martin,J. and Hartl,F.U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 41-52.
- Mason,J.M., Cliff,M.J., Sessions,R.B., and Clarke,A.R. (2005). Low energy pathways and non-native interactions: the influence of artificial disulfide bridges on the mechanism of folding. *J. Biol. Chem.* 280, 40494-40499.
- Mason,J.M., Gibbs,N., Sessions,R.B., and Clarke,A.R. (2002). The influence of intramolecular bridges on the dynamics of a protein folding reaction. *Biochemistry* 41, 12093-12099.
- Matthaei,J.H. and Nirenberg,M.W. (1961). Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 47, 1580-1588.
- Matuszewska,M., Kuczynska-Wisnik,D., Laskowska,E., and Liberek,K. (2005). The small heat shock protein IbpA of *Escherichia coli* cooperates with IbpB in stabilization of thermally aggregated proteins in a disaggregation competent state. *J. Biol. Chem.* 280, 12292-12298.
- Mayer,M., Frey,S., Koivunen,P., Myllyharju,J., and Buchner,J. (2004). Influence of the oxidoreductase ER57 on the folding of an antibody fab fragment. *J. Mol. Biol.* 341, 1077-1084.
- Mayer,M., Kies,U., Kammermeier,R., and Buchner,J. (2000). BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 29421-29425.

- Mayhew, M., da Silva, A.C., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Hartl, F.U. (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379, 420-426.
- Mazzarella, R.A. and Green, M. (1987). ERp99, an abundant, conserved glycoprotein of the endoplasmic reticulum, is homologous to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) and the 94-kDa glucose regulated protein (GRP94). *J. Biol. Chem.* 262, 8875-8883.
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995). The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* 249, 126-137.
- McIntosh, L.P. and Dahlquist, F.W. (1990). Biosynthetic incorporation of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C for assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Q. Rev. Biophys.* 23, 1-38.
- Melnick, J. and Argon, Y. (1995). Molecular chaperones and the biosynthesis of antigen receptors. *Immunol. Today* 16, 243-250.
- Melnick, J., Aviel, S., and Argon, Y. (1992). The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* 267, 21303-21306.
- Melnick, J., Dul, J.L., and Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.
- Meng, X., Devin, J., Sullivan, W.P., Toft, D., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1996). Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: dimer disruption does not impede "in vivo" interaction with estrogen receptor. *J. Cell Sci.* 109 ( Pt 7), 1677-1687.
- Milenic, D.E., Garmestani, K., Brady, E.D., Albert, P.S., Ma, D., Abdulla, A., and Brechbiel, M.W. (2004). Targeting of HER2 antigen for the treatment of disseminated peritoneal disease. *Clin. Cancer Res.* 10, 7834-7841.
- Miller, M.J., Xuong, N.H., and Geiduschek, E.P. (1982). Quantitative analysis of the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 151, 311-327.
- Miller, S.L. (1953). A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117, 528-529.
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I. (1994). The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo. *Mol. Cell Biol.* 14, 1459-1464.
- Miyata, Y. and Yahara, I. (1992). The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.* 267, 7042-7047.
- Mogk, A. and Bukau, B. (2004b). Molecular chaperones: structure of a protein disaggregase. *Curr. Biol.* 14, R78-R80.
- Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwulbecke, S., Vierling, E., and Bukau, B. (2003a). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Molecular Microbiology* 50, 585-595.

- Mogk,A., Schlieker,C., Friedrich,K.L., Schofeld,H.J., Vierling,E., and Bukau,B. (2003b). Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *Journal of Biological Chemistry* 278, 31033-31042.
- Morgan,A., Jones,N.D., Nesbitt,A.M., Chaplin,L., Bodmer,M.W., and Emtage,J.S. (1995). The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology* 86, 319-324.
- Morimoto,T., Ide,T., Ihara,Y., Tamura,A., and Kirino,T. (1996). Transient ischemia depletes free ubiquitin in the gerbil hippocampal CA1 neurons. *Am. J. Pathol.* 148, 249-257.
- Mullis,K.B. and Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Munro,S. and Pelham,H.R. (1987). A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48, 899-907.
- Muresan,Z. and Arvan,P. (1997). Thyroglobulin transport along the secretory pathway. Investigation of the role of molecular chaperone, GRP94, in protein export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 272, 26095-26102.
- Muresan,Z. and Arvan,P. (1998). Enhanced binding to the molecular chaperone BiP slows thyroglobulin export from the endoplasmic reticulum. *Mol. Endocrinol.* 12, 458-467.
- Nadeau,K., Das,A., and Walsh,C.T. (1993). Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 268, 1479-1487.
- Nair,S.C., Toran,E.J., Rimerman,R.A., Hjermstad,S., Smithgall,T.E., and Smith,D.F. (1996). A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress. Chaperones.* 1, 237-250.
- Nakano,H., Kawarasaki,Y., and Yamane,T. (2004). Cell-free protein synthesis systems: increasing their performance and applications. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 90, 135-149.
- Neckers,L.M. (1999). aHIF: the missing link between HIF-1 and VHL? *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 106-107.
- Nigam,S.K., Goldberg,A.L., Ho,S., Rohde,M.F., Bush,K.T., and Sherman,M.Y. (1994). A set of endoplasmic reticulum proteins possessing properties of molecular chaperones includes Ca(2+)-binding proteins and members of the thioredoxin superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 1744-1749.
- Nirenberg,M. (2004). Historical review: Deciphering the genetic code--a personal account. *Trends Biochem. Sci.* 29, 46-54.
- Nirenberg,M.W. and Matthaei,J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 47, 1588-1602.

- O'Brien,M.C. and McKay,D.B. (1995). How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. I. Potassium is required for optimal ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 270, 2247-2250.
- Obermann,W.M., Sondermann,H., Russo,A.A., Pavletich,N.P., and Hartl,F.U. (1998). In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J. Cell Biol.* 143, 901-910.
- Oliver,J.D., Roderick,H.L., Llewellyn,D.H., and High,S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* 10, 2573-2582.
- Oppermann,H., Levinson,W., and Bishop,J.M. (1981). A cellular protein that associates with the transforming protein of Rous sarcoma virus is also a heat-shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 1067-1071.
- Owen,O.E. (1999). Audiovisual memoirs of Leaders in American Medicine. Russel V. Lee, M.D. Pharos Alpha. Omega. Alpha. Honor. Med. Soc. 62, 46-47.
- Ozawa,K., Dixon,N.E., and Otting,G. (2005). Cell-free synthesis of <sup>15</sup>N-labeled proteins for NMR studies. *IUBMB. Life* 57, 615-622.
- Panaretou,B., Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J.* 17, 4829-4836.
- Parodi,A.J. (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* 348 Pt 1, 1-13.
- Paulus,M., Haslbeck,M., and Watzele,M. (2004). RNA stem-loop enhanced expression of previously non-expressible genes. *Nucleic Acids Res.* 32, e78.
- Pearl,L.H. and Prodromou,C. (2006). Structure and mechanism of the hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 271-294.
- Perdew,G.H. (1992). Chemical cross-linking of the cytosolic and nuclear forms of the Ah receptor in hepatoma cell line 1c1c7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 55-62.
- Pfund,C., Lopez-Hoyo,N., Ziegelhoffer,T., Schilke,B.A., Lopez-Buesa,P., Walter,W.A., Wiedmann,M., and Craig,E.A. (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J.* 17, 3981-3989.
- Pratt,W.B. and Toft,D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306-360.
- Prodromou,C., Panaretou,B., Chohan,S., Siligardi,G., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Roe,S.M., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* 19, 4383-4392.
- Prodromou,C., Roe,S.M., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1997). Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* 90, 65-75.

- Qu,D., Mazarella,R.A., and Green,M. (1994). Analysis of the structure and synthesis of GRP94, an abundant stress protein of the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol.* 13, 117-124.
- Ramachandran,N., Hainsworth,E., Demirkan,G., and LaBaer,J. (2006). On-chip protein synthesis for making microarrays. *Methods Mol. Biol.* 328, 1-14.
- Ramm,K., Gehrig,P., and Pluckthun,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.
- Randow,F. and Seed,B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat. Cell Biol.* 3, 891-896.
- Richter,K. and Buchner,J. (2001). Hsp90: chaperoning signal transduction. *J. Cell Physiol* 188, 281-290.
- Richter,K., Meinschmidt,B., and Buchner J. (2005). Hsp90: From Dispensable Heat Shock Protein to Global Player. In *Protein Folding Handbook*, J.Buchner and T.Kiefhaber, eds. (Weinheim: Wiley-VCH), pp. 768-857.
- Roe,S.M., Prodromou,C., O'Brien,R., Ladbury,J.E., Piper,P.W., and Pearl,L.H. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* 42, 260-266.
- Ross,J.B., Szabo,A.G., and Hogue,C.W. (1997). Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: fluorescence spectroscopy of protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Methods Enzymol.* 278, 151-190.
- Rosser,M.F. and Nicchitta,C.V. (2000). Ligand interactions in the adenosine nucleotide-binding domain of the Hsp90 chaperone, GRP94. I. Evidence for allosteric regulation of ligand binding. *J. Biol. Chem.* 275, 22798-22805.
- Rudiger,S., Germeroth,L., Schneider-Mergener,J., and Bukau,B. (1997). Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO J.* 16, 1501-1507.
- Rudolph,R., Siebendritt,R., Nessler,G., Sharma,A.K., and Jaenicke,R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 4625-4629.
- Sastry,S. and Linderth,N. (1999). Molecular mechanisms of peptide loading by the tumor rejection antigen/heat shock chaperone gp96 (GRP94). *J. Biol. Chem.* 274, 12023-12035.
- Scandurro,A.B., Rondon,I.J., Wilson,R.B., Tenenbaum,S.A., Garry,R.F., and Beckman,B.S. (1997). Interaction of erythropoietin RNA binding protein with erythropoietin RNA requires an association with heat shock protein 70. *Kidney Int.* 51, 579-584.
- Scheibel,T., Neuhofen,S., Weikl,T., Mayr,C., Reinstein,J., Vogel,P.D., and Buchner,J. (1997). ATP-binding properties of human Hsp90. *J. Biol. Chem.* 272, 18608-18613.
- Scheibel,T., Weikl,T., and Buchner,J. (1998). Two chaperone sites in Hsp90 differing in substrate specificity and ATP dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 1495-1499.

- Schirmer, E.C., Ware, D.M., Queitsch, C., Kowal, A.S., and Lindquist, S.L. (2001). Subunit interactions influence the biochemical and biological properties of Hsp104. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 914-919.
- Schmid, E., Zitzelsberger, H., Braselmann, H., Gray, J.W., and Bauchinger, M. (1992). Radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. *Int. J. Radiat. Biol.* 62, 673-678.
- Schmid, F.X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* 22, 4690-4696.
- Schmid, J. and Chambers, D.A. (1989). Molecular characterization of plasminogen activator in human supragingival plaque. *Arch. Oral Biol.* 34, 17-21.
- Schmid, S.L., Braell, W.A., and Rothman, J.E. (1985). ATP catalyzes the sequestration of clathrin during enzymatic uncoating. *J. Biol. Chem.* 260, 10057-10062.
- Schumacher, R.J., Hansen, W.J., Freeman, B.C., Alnemri, E., Litwack, G., and Toft, D.O. (1996). Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry* 35, 14889-14898.
- Schumacher, R.J., Hurst, R., Sullivan, W.P., McMahon, N.J., Toft, D.O., and Matts, R.L. (1994). ATP-dependent chaperoning activity of reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 269, 9493-9499.
- Scott, L.G., Geierstanger, B.H., Williamson, J.R., and Hennig, M. (2004). Enzymatic synthesis and 19F NMR studies of 2-fluoro-adenine-substituted RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11776-11777.
- Scott, S.M. and Szczepiorkowski, Z.M. (2005). Rituximab for TTP. *Am. J. Hematol.* 80, 87-88.
- Sevier, C.S. and Kaiser, C.A. (2006). Disulfide transfer between two conserved cysteine pairs imparts selectivity to protein oxidation by Ero1. *Mol. Biol. Cell* 17, 2256-2266.
- Shen, Y. and Hendershot, L.M. (2005). ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol. Biol. Cell* 16, 40-50.
- Siekevitz, P. and Zamecnik, P.C. (1981). Ribosomes and protein synthesis. *J. Cell Biol.* 91, 53s-65s.
- Singh-Jasuja, H., Toes, R.E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S.P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H.G., Arnold-Schild, D., and Schild, H. (2000). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* 191, 1965-1974.
- Sitia, R. and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426, 891-894.
- Soldano, K.L., Jivan, A., Nicchitta, C.V., and Gewirth, D.T. (2003). Structure of the N-terminal domain of GRP94. Basis for ligand specificity and regulation. *J. Biol. Chem.* 278, 48330-48338.

- Sparrer,H. and Buchner,J. (1997). How GroES regulates binding of nonnative protein to GroEL. *J. Biol. Chem.* 272, 14080-14086.
- Spirin,A.S. (2002a). Omnipotent RNA. *FEBS Lett.* 530, 4-8.
- Spirin,A.S. (2002b). Ribosome as a molecular machine. *FEBS Lett.* 514, 2-10.
- Spirin,A.S. (2004). High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* 22, 538-545.
- Spirin,A.S., Baranov,V.I., Ryabova,L.A., Ovodov,S.Y., and Alakhov,Y.B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242, 1162-1164.
- Srivastava,P.K. (1996). Do human cancers express shared protective antigens? or the necessity of remembrance of things past. *Semin. Immunol.* 8, 295-302.
- Stancato,L.F., Chow,Y.H., Hutchison,K.A., Perdew,G.H., Jove,R., and Pratt,W.B. (1993). Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 268, 21711-21716.
- Staunton,D., Schlinkert,R., Zanetti,G., Colebrook,S.A., and Campbell,I.D. (2006). Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR. *Magn Reson. Chem.* 44 Spec No, S2-S9.
- Stebbins,C.E., Russo,A.A., Schneider,C., Rosen,N., Hartl,F.U., and Pavletich,N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.
- Tamura,K., Okuhira,M., Amano,H., Inokuma,K., Hirata,T., Mikoshiba,I., and Hashimoto,K. (1997). Pharmacologic profiles of KRH-594, a novel nonpeptide angiotensin II-receptor antagonist. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 30, 607-615.
- Teter,S.A., Houry,W.A., Ang,D., Tradler,T., Rockabrand,D., Fischer,G., Blum,P., Georgopoulos,C., and Hartl,F.U. (1999). Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* 97, 755-765.
- Thiessen,K.M., Thorne,M.C., Maul,P.R., Prohl,G., and Wheeler,H.S. (1999). Modelling radionuclide distribution and transport in the environment. *Environ. Pollut.* 100, 151-177.
- Tissieres,A. and WATSON,J.D. (1958). Ribonucleoprotein particles from Escherichia coli. *Nature* 182, 778-780.
- Tissieres,A. and WATSON,J.D. (1962). Breakdown of messenger RNA during in vitro amino acid incorporation into proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 48, 1061-1069.
- Towbin,H., Staehelin,T., and 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, 4350-4354.
- Tsai,B. and Rapoport,T.A. (2002). Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1. *J. Cell Biol.* 159, 207-216.

Tu, B.P. and Weissman, J.S. (2002). The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 10, 983-994.

Udono, H., Levey, D.L., and Srivastava, P.K. (1994). Cellular requirements for tumor-specific immunity elicited by heat shock proteins: tumor rejection antigen gp96 primes CD8<sup>+</sup> T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 3077-3081.

Van Montfort, R., Slingsby, C., and Vierling, E. (2002). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.* 59, 105-156.

Vinci, F., Catharino, S., Frey, S., Buchner, J., Marino, G., Pucci, P., and Ruoppolo, M. (2004). Hierarchical formation of disulfide bonds in the immunoglobulin Fc fragment is assisted by protein-disulfide isomerase. *J. Biol. Chem.* 279, 15059-15066.

Voges, D., Watzele, M., Nemetz, C., Wizemann, S., and Buchberger, B. (2004). Analyzing and enhancing mRNA translational efficiency in an *Escherichia coli* in vitro expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 601-614.

Wachtershauser, G. (1994). Life in a ligand sphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4283-4287.

Walter, S. (2002). Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1589-1597.

Walter, S. and Buchner, J. (2002a). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 41, 1098-1113.

Wartmann, M. and Davis, R.J. (1994). The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J. Biol. Chem.* 269, 6695-6701.

Wearsch, P.A. and Nicchitta, C.V. (1996). Endoplasmic reticulum chaperone GRP94 subunit assembly is regulated through a defined oligomerization domain. *Biochemistry* 35, 16760-16769.

Wearsch, P.A. and Nicchitta, C.V. (1997). Interaction of endoplasmic reticulum chaperone GRP94 with peptide substrates is adenine nucleotide-independent. *J. Biol. Chem.* 272, 5152-5156.

Wegele, H., Haslbeck, M., Reinstein, J., and Buchner, J. (2003). Sti1 is a novel activator of the Ssa proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 25970-25976.

Wegele, H., Muller, L., and Buchner, J. (2004). Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 151, 1-44.

Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E.U., Dougan, D.A., Tsai, F.T., Mogk, A., and Bukau, B. (2004). Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* 119, 653-665.

Weikl, T., Muschler, P., Richter, K., Veit, T., Reinstein, J., and Buchner, J. (2000). C-terminal regions of Hsp90 are important for trapping the nucleotide during the ATPase cycle. *J. Mol. Biol.* 303, 583-592.

- Welch, W.J. and Feramisco, J.R. (1982). Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 14949-14959.
- Whitelaw, M.L., Gottlicher, M., Gustafsson, J.A., and Poellinger, L. (1993). Definition of a novel ligand binding domain of a nuclear bHLH receptor: co-localization of ligand and hsp90 binding activities within the regulable inactivation domain of the dioxin receptor. *EMBO J.* 12, 4169-4179.
- Wickner, S., Maurizi, M.R., and Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286, 1888-1893.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* 358, 169-170.
- Wilkinson, B., Xiao, R., and Gilbert, H.F. (2005). A structural disulfide of yeast protein-disulfide isomerase destabilizes the active site disulfide of the N-terminal thioredoxin domain. *J. Biol. Chem.* 280, 11483-11487.
- Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 119, 615-623.
- Williams, W.V., Guy, H.R., Cohen, J.A., Weiner, D.B., and Greene, M.I. (1988). Molecular and immunologic analyses of a functional internal image formed by an anti-receptor antibody. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 139, 659-675.
- Winter, J. and Jakob, U. (2004). Beyond transcription--new mechanisms for the regulation of molecular chaperones. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39, 297-317.
- Yee, A., Pardee, K., Christendat, D., Savchenko, A., Edwards, A.M., and Arrowsmith, C.H. (2003). Structural proteomics: toward high-throughput structural biology as a tool in functional genomics. *Acc. Chem. Res.* 36, 183-189.
- Yin, G. and Swartz, J.R. (2004a). Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 188-195.
- Yin, G. and Swartz, J.R. (2004b). Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 188-195.
- Yokota, A., Izutani, K., Takai, M., Kubo, Y., Noda, Y., Koumoto, Y., Tachibana, H., and Segawa, S. (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.
- Zarucki-Schulz, T., Jerez, C., Goldberg, G., Kung, H.F., Huang, K.H., Brot, N., and Weissbach, H. (1979). DNA-directed in vitro synthesis of proteins involved in bacterial transcription and translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 6115-6119.
- Zhang, Y., Baig, E., and Williams, D.B. (2006). Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules. *J. Biol. Chem.* 281, 14622-14631.
- Zhao, Q., Chae, Y.K., and Markley, J.L. (2002). NMR solution structure of ATTp, an *Arabidopsis thaliana* trypsin inhibitor. *Biochemistry* 41, 12284-12296.

Zhu,X., Zhao,X., Burkholder,W.F., Gragerov,A., Ogata,C.M., Gottesman,M.E., and Hendrickson,W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272, 1606-1614.

Zubay,G. (1973). In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu. Rev. Genet.* 7, 267-287.

*Bücher und Dissertationen:*

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.; Joseph Sambrook und David W. Russell von Cold Spring Harbor Laboratory Press (Januar 2001)

The Origin of Life. Oparin, A. I. New York, MacMillan (1938)

The physical basis of life Bernal, J. D., London, Routledge and Kegan Paul (1951)

Genetik takeover and the mineral origins of life Cairns-Smith, A. G., Cambridge, University Press (1982)

Bioanalytik, F. Lottspeich und H. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag (1998)

Der ATPase-Zyklus von Hsp90 und die Struktur-Funktions-Beziehung seines Partnerproteins p23, Martina Weigl, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2000

Expressionsanalysen des monoklonalen Antikörper Mak33 in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions-/ Translationssystem, Stephan Frey, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2002

Expression und Faltung von Antikörpern im Cytoplasma von *E. coli* und Einfluss von Faltungshelfern auf die Antikörperfaltung *in vitro*, Marcus Mayer, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2003

Die ATP-Hydrolyse des molekularen Chaperons Hsp90 und ihre Regulation durch Co-Chaperone, Klaus Richter, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2003

Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorprotein p53 und dem molekularen Chaperon Hsp90, Lin Müller, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2003

Folding and association of antibody domains, Matthias Feige, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2005

Substratbindung und Substratprozessierung durch das molekulare Chaperon Hsp104, Ben Bösl, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München, 2006

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Proteinsynthese.....	- 3 -
Abbildung 2: Die Struktur eines IgG Antikörpers.....	- 9 -
Abbildung 3: Vergleich eines Batch und zweier kontinuierlicher in vitro Transkriptions- / Translationssysteme.....	- 14 -
Abbildung 4: Die 5 Chaperonfamilien.....	- 22 -
Abbildung 5: Schematische Domänenstruktur von Hsp90 und seinen Homologen.....	- 24 -
Abbildung 6: Kristallstruktur von Hsp90.....	- 27 -
Abbildung 7: Kristallstruktur des N-terminalen Bereich von Grp94 im Komplex mit NECA.....	- 30 -
Abbildung 8: Der funktionelle Zyklus von Hsp70- Chaperonen.....	- 33 -
Abbildung 9: Kristallstruktur von Hsp70.....	- 33 -
Abbildung 10: Schematischer Überblick der Antikörpersynthese und der Rolle von BiP und PDI in diesem Prozess.....	- 35 -
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise des RTS500.....	- 56 -
Abbildung 12: Ergebnis der Amplifikationen des LK- und SK- Konstrukts während der 2-Stufen PCR.....	- 80 -
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Expressionskonstrukte von LK und SK.....	- 81 -
Abbildung 14: Analyse von LK und SK mittels Westernblot nach Expression im RTS100 HY.....	- 82 -
Abbildung 15: Schematische Darstellung der zirkulären Topo- Antikörperkonstrukte, die für die RTS- Applikationen eingesetzt wurden.....	- 83 -
Abbildung 16: Westernblot nach Expression der Antikörperfragmente im RTS500 HY ...	- 84 -
Abbildung 17: Coexpression von leichter und schwerer Kette im RTS500 HY.....	- 85 -
Abbildung 18: Einfluss von Disulfidisomerasen auf die Aktivität von MAK33.....	- 87 -
Abbildung 19: Aktivitätsmessung einer RTS100 HY Reaktion mit unterschiedlichen Konzentrationen von schwerer zu leichter Kette.....	- 88 -
Abbildung 20: Zugabe von Grp94 und BiP in das RTS, und deren Einfluss auf die Aktivität von MAK33.....	- 90 -
Abbildung 21: Einfluss verschiedener Gluthationkonzentrationen auf die Aktivität von MAK33.....	- 91 -
Abbildung 22: Nicht reduzierende SDS-PAGE und Westernblot zur Klärung des Oligomerisierungszustand.....	- 92 -
Abbildung 23: Analytische Gelfiltration von im RTS und in Zellkultur synthetisiertem MAK33.....	- 93 -
Abbildung 24: Vergleichende Fluoreszenzspektroskopie von im RTS und in Zellkultur hergestellten MAK33.....	- 94 -
Abbildung 25: Komplexierung von BiP (A) bzw. DnaK (B) und C <sub>H</sub> 3-CAM.....	- 96 -
Abbildung 26: Faltungs- und Assemblierungsmodell des im RTS hergestellten MAK33.....	- 101 -
Abbildung 27: Spontane Rückfaltung von Fab.....	- 103 -
Abbildung 28: Einfluss von PDI und BiP und die Rückfaltung von reduziertem Fab.....	- 104 -
Abbildung 29: SDS-PAGE nach Gelfiltration der beiden LyTOR-Varianten.....	- 106 -
Abbildung 30: Analytische Gelfiltration der beiden LyTOR- Varianten.....	- 106 -
Abbildung 31: Einfluss von LyTOR wt und mt auf die Rückfaltung von reduziertem Fab.....	- 107 -
Abbildung 32: Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von reduziertem Fab.....	- 108 -
Abbildung 33: Einfluss von smERp1 auf die Rückfaltung von Fab.....	- 109 -
Abbildung 34: Einfluss von Cnx auf die Rückfaltung von Fab.....	- 110 -

---

Abbildung 35: Immunopräzipitation von ERp57 und Cnx.....	- 112 -
Abbildung 36: FernUV- CD Spektroskopie von GRP und Auswertung mittels CDNN ...	- 118 -
Abbildung 37: CD- Temperaturübergang von Grp94.....	- 119 -
Abbildung 38: Gleichgewichtszentrifugation von Grp94.....	- 120 -
Abbildung 39: HPLC von Grp94 in nukleotid-gebundener und -ungebundener Form .....	- 121 -
Abbildung 40: Fluoreszenzspektroskopie von Grp94.....	- 122 -
Abbildung 41: Einfluss von Grp94 auf die Citratsynthaseinaktivierung.....	- 124 -
Abbildung 42: Radioaktiver ATPase Assay von Grp94 im Vergleich mit Hsp82 .....	- 127 -
Abbildung 43: Chemische Strukturen von Radicicol und Geldanamycin .....	- 128 -
Abbildung 44: Inhibierung der ATPase von Grp94 durch Radicicol und Geldanamycin.-	- 129 -
Abbildung 45: Die chemische Struktur von NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenosin) ...	- 130 -
Abbildung 46: Untersuchung des NECA -Einfluss auf die ATPase von Grp94 .....	- 131 -
Abbildung 47: $K_M$ - Wert Bestimmung von Grp94 .....	- 133 -
Abbildung 48: Single- Turn- Over- Bestimmung von Grp94 im Vergleich mit Hsp82 ....	- 134 -
Abbildung 49: Fluoreszenztitration von Grp94 für ADP .....	- 136 -
Abbildung 50: Modell für den ATP-Reaktionszyklus von Grp94.....	- 140 -

Floss T., Uez N., Frey S. and Wurst W., Genotyping gene trap mutant mice by real time PCR. Technical Tips Online (Trends in Genetics), 2002

Mayer, M., Frey, S., Koivunen, P., Myllyharju, J., and Buchner, J. (2004). Influence of the oxidoreductase ER57 on the folding of an antibody Fab fragment. *J. Mol. Biol.* 341, 1077-1084.

Vinci F, Catharino S, Frey S, Buchner J, Marino G, Pucci P, Ruoppolo M. (2004) Hierarchical formation of disulfide bonds in the immunoglobulin Fc fragment is assisted by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem.* 279(15):15059-66

Haslbeck, M., Frey, S., Buchner, J., (2006). (im Druck) Protein production in the test tube: *In vitro* transcription/ translation systems in protein expression and folding

*Diese Arbeit wurde von September 2002 bis September 2006 am Department Chemie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner angefertigt.*

*Herrn Prof. Dr. Johannes Buchner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu dürfen, weiter für die interessante Themenstellung, und schließlich für die intensive Betreuung während der gesamten Arbeit und die vielen Anregungen, Ideen und die Geduld, die zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen haben.*

*Mein besonderer Dank gilt Herrn Martin Hessling, Herrn Titus Franzmann, Frau Birgit Meinschmidt, Herrn Dr. Fabio Falson, Herrn Daniel Weinfurter, Herrn Matthias Feige, Herrn Dr. Benjamin Bösl, Herrn Dr. Harald Wegele, Herrn Dr. Marcus Mayer, Dr. Klaus Richter und Herrn Dr. Martin Haslbeck für die praktische Unterstützung, die vielen hilfreichen Anregungen und die praktische Unterstützung und die stete Aufmunterung, Probleme aller Art zu lösen.*

*Danke auch an unsere Systemadministratoren Titus Franzmann, Dr. Lin Müller und Sebastian Wandinger, ohne die ich am Computer diverse Male verzweifelt wäre.*

*Vielen Dank unseren Technischen Assistentinnen Frau Bettina Richter, Frau Ioana Schuster, Frau Susanne Quedzuweit und Frau Anja Osterauer, ohne die der Laborbetrieb einige Male ins Wanken geraten wäre.*

*Nicht zu vergessen ist unsere Lehrstuhlsekretärin Frau Susanne Hilber, ohne die ich einige Male über bürokratische Hürden gestolpert wäre.*

*Weiterhin danke ich Dr. Jochen Reinstein, für die Unterstützungen im Zusammenhang mit Grp94 und den vielen fruchtbaren Diskussionen.*

*Vielen Dank meinen Bacheloretten, Tatiana Krebs und Larissa Keller, sowie den etlichen Praktikantinnen und Praktikanten, für die dynamische Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Anregungen.*

*Einen Dank an das gesamte Team und die Lehrstuhl-Fussballmannschaft, die vielen ungenannten, für die kameradschaftliche und dynamische Zusammenarbeit zu jeder Zeit und an jedem Ort.*

*Vielen Dank an Birgit Meinschmidt, Titus Franzmann, Martin Hessling, Daniel Weinfurter, Ottmar Hainzl, Fabio Falson und Ben Bösl, die mir auch den grauesten Tag im Labor versüßt haben.*

*Für die Durchsicht dieser Arbeit möchte ich Martin Hessling, Matthias Feige und Dr. Martin Haslbeck danken.*

*Ein ganz großes Dankeschön an meine liebe Frau Alexandra, die mir sehr viel Liebe, Verständnis und Geduld entgegengebracht hat, um unter anderem diese Arbeit zu vervollständigen.*

*Vielen Dank an meine Eltern, Annetraut und Harald, und meine Oma Helga, die mir dieses Studium und die Doktorarbeit erst ermöglichten, mich immer wieder mit viel Liebe aufgebaut haben und mir über so manch finanziellen Engpass hinweghelfen.*

*Weiterhin möchte ich auch meinen Schwiegereltern, Magarethe und Ernst, Arthur und Rodica, sowie den angeheirateten Geschwistern Patrick und Gregor, und dessen Freundin Joanna, für die Aufmerksamkeit und Aufmunterung während dieser Arbeit danken.*

*Zum Schluss möchte ich mich bei all meinen Freunden v.a. bei Peter, Ralph, Chrissi, Chica, Philipp, Marc, Stephan, Yvonne, Julia und meinem Bruder Christian (und unserem Kater Puschkin und seiner Frau Myrte) bedanken, die mir privat halfen die seelische und körperliche Ausgeglichenheit zu bewahren.*

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst  
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt  
und auch nicht veröffentlicht

Garching, im September 2006