

# **Funktionelle Analyse des Zytomegalievirus-Proteins US6**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim  
Fachbereich Chemische und Pharmazeutische  
Wissenschaften (FB 14)  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Christoph Kyritsis  
aus Essen

Frankfurt am Main 2004

# **Funktionelle Analyse des Zytomegalievirus-Proteins US6**



Angefertigt an der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Teile der vorgelegten Arbeit sind veröffentlicht in:

Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. & Tampé, R. (2001) Molecular Mechanism and Structural Aspects of TAP Inhibition by the cytomegalovirus Protein US6. *J. Biol. Chem.* **276**, 48031-48039.

Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R. & Cresswell, P. (2003) Early Phagosomes in Dendritic Cells Form a Cellular Compartment Sufficient for Cross Presentation of Exogenous Antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12889-12894.

Koch, J., Guntrum, R., Heintke, S., Kyritsis, C. & Tampé, R. (2004) Functional Dissection of the Transmembrane Domains of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP). *J. Biol. Chem.* **279**, 10142-10147.

## Danksagung

Ich bedanke mich zunächst bei Prof. Dr. Robert Tampé für die Betreuung der vorliegenden Arbeit und die Möglichkeit diese in seinem Institut durchführen zu können. Bei Prof. Dr. Bernd Ludwig bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Rupert Abele, Dr. Joachim Koch, Dr. Thomas Langer, Stanislav Gorbulev, Silke Hutschenreiter, Renate Guntrum, Susanne Heintke und Kurt Pawlitschko haben mir mit ihrer Kooperation in diesem Projekt geholfen. Durch die Hilfestellung von Dr. Rupert Abele konnten die CD-spektroskopischen Analysen durchgeführt werden. Dr. Thomas Langer führte die Klonierung des Protein G-Fusionskonstruktes durch. Stanislav Gorbulev ist mir mit seiner Kooperation bei der Rekonstitution, den Transport- und den ATP-Hydrolyse-Assays sehr hilfreich gewesen. Silke Hutschenreiter danke ich für die massenspektrometrischen Messungen. Dr. Joachim Koch und Renate Guntrum haben die N-terminalen Deletionsmutanten von TAP generiert. Anne L. Ackerman und Prof. Dr. Peter Cresswell von der Yale University danke ich für ihre Mitarbeit im Rahmen einer Kooperation. Besonderer Dank gebührt insbesondere Jennifer J. Strunk für ihren Beitrag zu diesem Projekt im Rahmen einer Diplomarbeit. Die danke allen Studenten, die mich im Rahmen von Praktika tatkräftig unterstützt haben. Ich bedanke mich auch bei Eckhard Linker für seine exzellente technische Assistenz in der Zellkultur und die Bereitstellung von Insektenzellmaterial.

Ich danke Dr. Lutz Schmitt, Dr. Jacob Piehler, Dr. Rupert Abele, Dr. Joachim Koch, Dr. Chris van der Does, Dr. Dagmar Bauer, Carsten Horn und Min Chen für die zahlreichen Diskussionen und ihre hilfreichen Hinweise. Dr. Lutz Schmitt, Dr. Joachim Koch, Simone Gompf und Dirk Paterok haben mir durch die kritische Lektüre dieser Arbeit sehr geholfen. Ich bedanke mich bei meinen Arbeitskollegen für ein angenehmes Arbeitsklima. Dabei ist insbesondere das Labor 1.22 zu erwähnen, in dem ich in Frankfurt meine Doktorandenzeit verbracht habe.

Ich danke allen meinen Lehrerinnen und Lehrern, die mich während meiner schulischen und universitären Laufbahn unterrichtet, gefördert und motiviert haben. Sie alle haben mein Interesse an den Naturwissenschaften geweckt und zu meinem Werdegang beigetragen.

Zu guter Letzt danke ich besonders meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung und Motivation das Studium erst ermöglicht haben.

*Meinen Eltern,  
Lehrerinnen und Lehrern*

## **A. Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1	Das humane Immunsystem	12
1.2	Die Antigenprozessierung	13
1.3	Inhibition der Antigenprozessierung durch Viren	19
1.4	Frage- und Aufgabenstellung	22
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>24</b>
2.1	Geräte	24
2.2	Computerprogramme	25
2.3	Materialien	25
2.4	Chemikalien	26
2.5	Enzyme	28
2.6	Kits	29
2.7	Plasmide	29
2.8	Peptide	29
2.9	Primer	30
2.10	Antikörper	32
2.11	<i>Escherichia coli</i> Stämme	32
2.12	Zelllinien	33
2.13	Antibiotika	33
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1	Lösungen für molekularbiologische Methoden	34
3.1.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
3.1.3	Reinigung der PCR-Produkte	39
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.1.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	40
3.1.6	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	41
3.1.7	Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten	42
3.1.8	Ortsspezifische Mutagenese	42
3.1.9	Herstellung kompetenter Bakterien	43
3.1.10	Transformation kompetenter Bakterien	44
3.1.11	Plasmid Mini- und Midi-Präparation	44
3.1.12	Restriktionsanalyse von DNA	45

3.2	Biochemische Methoden	45
3.2.1	Mikrosomenpräparation	45
3.2.2	Reinigung von US6 aus <i>inclusion bodies</i>	47
3.2.3	Rückfaltung von US6 aus <i>inclusion bodies</i>	48
3.2.4	Reinigung von MBP-US6 aus dem Periplasma	52
3.2.5	Spaltung von MBP-US6	53
3.2.6	Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Serum	53
3.2.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
3.2.8	Silberfärbung	57
3.2.9	Western-Blot	58
3.2.10	Co-Rekonstitution von TAP und US6	59
3.2.11	Peptidsynthese und Markierung mit Na <sup>125</sup> I	61
3.2.12	Peptidbindungs- und –transport-Assay	61
3.2.13	ATP-Hydrolyse-Assay	63
3.2.14	Nukleotidbindungsassay	64
3.2.15	Degradation von US6 durch Proteasen	65
3.2.16	Gelfiltration	66
3.2.17	<i>Reversed phase</i> Chromatographie	67
3.2.18	Massenspektrometrie (MALDI-TOF)	67
3.2.19	CD-Spektroskopie	68
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>69</b>
4.1	Analyse der klonierten US6-Konstrukte	69
4.2	Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6	70
4.3	Analyse der US6-spezifischen TAP-Inhibition <i>in vitro</i>	80
4.3.1	Inhibition des Peptidtransports durch US6	81
4.3.2	Inhibition der ATP-Hydrolyse-Aktivität durch US6	82
4.3.3	Inhibition der Nukleotidbindung durch US6	83
4.4	Analyse von rückgefaltetem US6	85
4.5	Reinigung und Rückfaltung der US6-Mutanten	89
4.6	Analyse der US6-Mutanten auf ihre inhibitorische Aktivität	92
4.7	Expression und Reinigung von US6-Fusionsproteinen	93
4.8	Analyse von MBP-US6 auf seine inhibitorische Aktivität	98
4.9	Inhibition der Kreuzpräsentation durch US6	99

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
5.1	Expression von US6	105
5.2	Reinigung und Rückfaltung von US6	107
5.3	Inhibition von TAP durch US6	108
5.4	Strukturelle Organisation von US6	111
5.4.1	Sekundärstruktur von US6	111
5.4.2	Analyse des Disulfid-Netzwerkes von US6	112
5.4.3	Struktureller Vergleich verschiedener viraler Inhibitoren	114
5.5	Ausblick	115
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>133</b>
9.1	Plasmidkarten	133
9.1.1	pRSET-B	133
9.1.2	pMal-c2X und pMal-p2X	134
9.1.3	pKMProtG	135
9.2	Nucleotidsequenz des HCMV-Proteins US6	136
9.3	Aminosäuresequenz des HCMV-Proteins US6	136
9.4	Expression der US6-Deletionsmutanten	137
9.5	Reinigung von US6(20-125) aus dem Zytoplasma	139
9.6	Reinigung und Rückfaltung von US6-Deletionsmutanten	140
9.7	Reinigung und Rückfaltung von US6-Punktmutanten	142

## **B. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Antigenprozessierung	14
Abb. 2:	Strukturelle Organisation von TAP	15
Abb. 3:	Virale Inhibitoren von TAP	21
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Primer-Anlagerung	35
Abb. 5:	Schematische Darstellung des Saccharosegradienten	46
Abb. 6:	Restriktionsanalyse der klonierten Konstrukte	70
Abb. 7:	Expression von US6 bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen	71
Abb. 8:	Induktion der Hitzeschockantwort durch Ethanol oder Sorbitol	72



Abb. 9:	Expression von US6 in <i>E. coli</i> Origami(DE3)pLysS	73
Abb. 10:	Rückfaltung von US6 mit Hilfe des <i>FoldIt Protein Refolding Kits</i>	75
Abb. 11:	Rückfaltung von US6 unter Berücksichtigung des <i>redox shufflings</i>	77
Abb. 12:	Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6	79
Abb. 13:	Rekonstitution von rückgefaltetem US6 in Proteoliposomen	80
Abb. 14:	US6 inhibiert den Peptidtransport von TAP	82
Abb. 15:	US6 inhibiert die ATPase-Aktivität von TAP	83
Abb. 16:	US6 inhibiert die ATP-Bindung von TAP	84
Abb. 17:	Massenspektrometrische Analyse von US6(20-146)	85
Abb. 18:	Analyse der Homogenität von US6(20-146)	86
Abb. 19:	CD-spektroskopische Analyse von US6(20-146)	87
Abb. 20:	Analyse von US6(20-146) mittels proteolytischer Degradation	88
Abb. 21:	Heterologe Expression der US6-Deletionsmutanten	90
Abb. 22:	Expression und Rückfaltung von US6-Punktmutanten	91
Abb. 23:	Analyse der Aktivität verschiedener US6-Mutanten	92
Abb. 24:	Schematische Darstellung der US6-Fusionskonstrukte	93
Abb. 25:	Reinigung und Renaturierung von Protein G-US6	94
Abb. 26:	Reinigung von MBP-US6 aus dem Periplasma	96
Abb. 27:	Spaltung des Fusionsproteins MBP-US6 mit Faktor Xa	97
Abb. 28:	Analyse der inhibitorischen Aktivität von MBP-US6	98
Abb. 29:	Interaktion von rekombinantem US6 mit TAP in Phagosomen	100
Abb. 30:	Inhibition der MHC I-vermittelten Kreuzpräsentation	102
Abb. 31:	Einfluß von US6-Mutanten auf die Kreuzpräsentation	104

### C. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zur Amplifikation genutzte Primer	32
Tabelle 2:	Zusammenstellung amplifizierter Konstrukte	37
Tabelle 3:	Einfügen von Mutationen mittels PCR	38
Tabelle 4:	Die Grundlösungen 1-16 des <i>FoldIt Protein Refolding Kits</i>	50
Tabelle 5:	Pipettierschema für die Herstellung von Gelen	56
Tabelle 6:	Pipettierschema für die Durchführung eines Nukleotidbindungsassays	65

## D. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette transporter</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CDAP	1-Cyano-4-dimethylaminopyridin
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CMC	kritische mizellare Konzentration
cpm	<i>counts per minute</i>
DM	n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> auch DNS
DTDP	4,4'-Dithiopyridin
DTNB	5,5-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure)
DTT	Dithio-DL-treithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FeBABE	Eisen (S)-1-[p-(Bromacetamid)benzyl]-EDTA
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSV	Herpes Simplex Virus
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalaktopyranosid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/ Ionisations Massenspektrometrie
MBP	Maltosebindeprotein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NBD	Nukleotidbindungsdomäne

NHS	N-Hydroxysuccinimid
Ni <sup>2+</sup> -IDA	Nickel-Iminodiessigsäure
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP40	Igepal (Detergenz)
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P <sub>i</sub> -Mix	Proteaseninhibitoren-Mix
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
RT	Raumtemperatur
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethylphosphin)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranhelix
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
t-RNA	<i>transfer-ribonucleic acid</i> auch t-RNS
UL	<i>unique long</i>
US	<i>unique short</i>
UV	ultraviolett (Licht)
üN	über Nacht

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Immunsystem

Der menschliche Körper sieht sich jeden Tag einer großen Anzahl von Krankheitserregern gegenüber. Pathogene Partikel oder Organismen können Viren (welche nach strenger Auslegung keine Lebewesen sind), Pro- oder Eukaryoten, Proto- oder Metazoen sein. Diese können extra- bzw. intrazellulär auftreten, einige wechseln die Lokalisation im Laufe ihrer Entwicklung. Diese Organismen nutzen ihren Wirt als Lebensraum, bzw. um sich selbst zu replizieren. Eine Schädigung des Wirtes erfolgt u.a. durch Zerstörung von Zellstrukturen, Nutzung von Ressourcen oder die Ausscheidung von für den Wirt toxischen Stoffwechselprodukten.

Um dieser Gefahr zu begegnen, entwickelte sich bei Vertebraten im Laufe der Evolution das adaptive Immunsystem. Dieses lässt sich in die humorale und die zelluläre Immunität unterteilen. Bei der humoralen Immunantwort werden durch B-Lymphozyten Antikörper produziert, die gegen ein spezifisches Antigen gerichtet sind. Auftretende virale Partikel, Bakterien oder sonstige körperfremde Strukturen werden durch diese Immunglobuline markiert und agglutiniert.

Die zelluläre Immunität ist über T-Lymphozyten vermittelt und richtet sich gegen intrazelluläre Pathogene oder entartete Zellen. Eine wichtige Aufgabe bei diesem Prozess fällt den, zu den Immunglobulinen gehörenden, MHC I (*major histocompatibility complex class I*) Molekülen zu. Jede kernhaltige Zelle im menschlichen Körper präsentiert an ihrer Oberfläche auf MHC I geladene Peptide, die durch die ständige Degradation von Proteinen in der Zelle produziert wurden. Ist eine Zelle z.B. mit einem Virus infiziert oder entartet, werden auch aus den viralen bzw. tumorassoziierten Proteinen Peptide generiert. Nach Präsentation an der Zelloberfläche und Erkennung dieser Peptide durch  $CD8^+$  T-Lymphozyten wird die betreffende Zelle zerstört (Pamer & Cresswell, 1998).

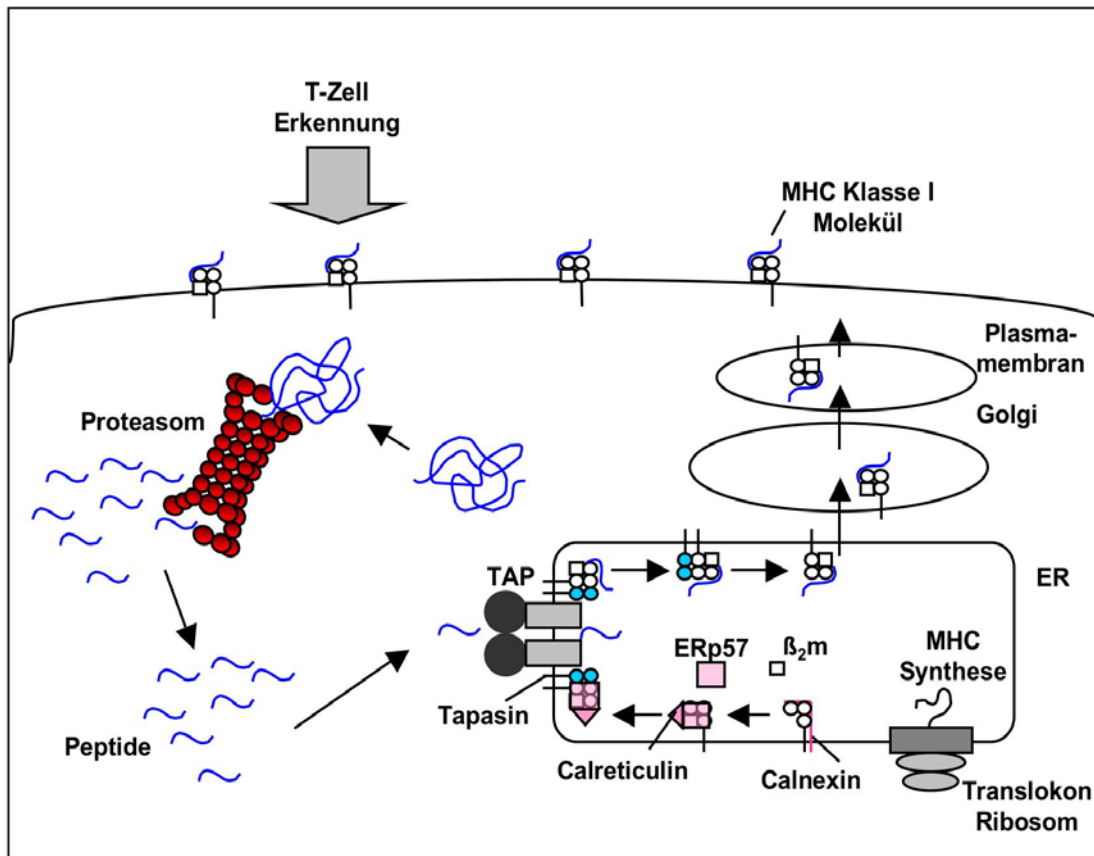
Während intrazelluläre Antigene über MHC I präsentiert werden, ist die Präsentation von exogenen Antigenen größtenteils über MHC II vermittelt. Die kompetentesten Antigen präsentierenden Zellen (APC) sind dendritische Zellen, die an ihrer Oberfläche MHC II-gebundene, extrazelluläre Antigene präsentieren. Über einen alternativen Weg können exogene Antigene durch dendritische

Zellen auch über MHC I präsentiert werden (Mellman & Steinman, 2001). Antigene Strukturen werden durch dendritische Zellen endozytiert und in sogenannte Phagosomen aufgenommen. Nach Vereinigung des Phagosoms mit Lysosomen werden die inkorporierten Proteine degradiert und die daraus resultierenden Peptide auf MHC II geladen. An der Zelloberfläche werden auf MHC II geladene Peptide CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert. Die zu diesen Zellen gehörenden T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) aktivieren nach Erkennung eines antigenen Peptids Makrophagen (T<sub>H</sub>1-Antwort) und B-Lymphozyten (T<sub>H</sub>2-Antwort).

## 1.2 Die Antigenprozessierung

Durch die Antigenprozessierung werden antigene Peptide intrazellulärer Herkunft auf MHC I-Moleküle geladen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert. Diese Peptide stammen zum großen Teil aus der proteolytischen Degradation von Proteinen durch das Proteasom (einen Überblick bietet (Baumeister et al., 1998; Rock & Goldberg, 1999)). Durch Interferon  $\gamma$  wird die Assemblierung des sogenannten Immuno-Proteasoms induziert (Früh et al., 1994; Noda et al., 2000; Tanaka & Kasahara, 1998; Yang et al., 1995). Auf diese Weise werden Peptide generiert, welche bevorzugt für die Antigenprozessierung verwendet werden. Die resultierenden Peptide mit einer Länge von hauptsächlich 8 bis 12 Aminosäuren werden vom *transporter associated with antigen processing* (TAP) vom Zytoplasma in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert (Androlewicz & Cresswell, 1994a; van Endert et al., 1994). Nach erfolgtem Transport der Peptide werden diese auf MHC I-Moleküle übertragen. Die beladenen MHC I-Moleküle verlassen das ER und gelangen über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche.

Von 2000 in der Zelle generierten Peptiden wird im Durchschnitt nur ein einziges über MHC I auf der Zelloberfläche präsentiert (Princiotta et al., 2003). Die generierten Peptide können innerhalb der Zelle nachfolgend auf vielfältige Weise degradiert werden (für einen Überblicksartikel siehe (Yewdell et al., 2003c)). So werden viele der Peptide zum Beispiel im Zytoplasma und ER-Lumen durch Aminopeptidasen N-terminal verkürzt (Brooks et al., 2000).

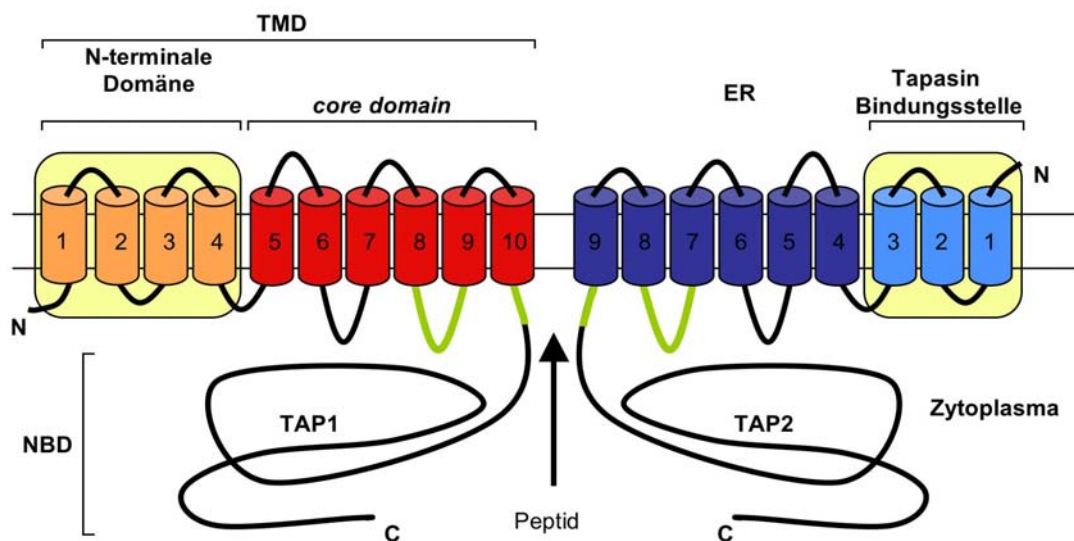


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Antigenprozessierung**

Zytosolische Proteine werden durch das Proteasom degradiert. Die generierten Peptide werden nachfolgend durch TAP aus dem Zytosol in das Lumen des ER transportiert. Nach dem Transport werden die Peptide auf MHC I-Moleküle geladen. TAP und MHC I sind über Tapasin aneinander gekoppelt. Ist MHC I mit Peptid beladen, gelangt es anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Dort werden an MHC I gebundene, antigene Peptide von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt. Nach der Erkennung werden z.B. virusinfizierte bzw. Tumorzellen von diesen T-Zellen zerstört. MHC I-Moleküle gehören zu den Immunglobulinen und bestehen aus einer schweren Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Nach Biosynthese der schweren Kette wird diese durch das Chaperon Calnexin stabilisiert. Das Chaperon ERp57 an der Ausbildung der Disulfidbrücken innerhalb der schweren Kette beteiligt. Nach Oxidation der schweren Kette interagiert diese mit dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Calreticulin löst Calnexin in der Interaktion mit MHC I ab (Abbildung modifiziert aus (Abele & Tampé, 1999) und (Lankat-Buttgereit & Tampé, 1999)).

Der TAP-Peptidbeladungskomplex besteht mit TAP, Tapasin, MHC I, ERp57 und Calreticulin aus mehreren Komponenten (Ortmann et al., 1997). Durch die Anlagerung der Proteine vollzieht sich die Peptidbeladung der MHC I-Moleküle innerhalb eines Komplexes (für einen Überblick über Reifung und Peptidbeladung von MHC I siehe (Paulsson & Wang, 2004)).

TAP gehört zu der Superfamilie der ABC (*ATP Binding Cassette*) Transporter. Mitglieder dieser Familie haben die gleiche strukturelle Organisation, welche aus je zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD) besteht (Higgins, 1992). TAP ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2. Diese Untereinheiten werden auch als *half-size transporter* bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß TAP1 und TAP2 ein funktionales Heterodimer bilden (Meyer et al., 1994; Urlinger et al., 1997). TAP1 hat mit 748 Aminosäuren eine molekulare Masse von 81 kDa, während TAP2 mit 686 Aminosäuren (75 kDa) etwas kleiner ist. TAP1 und TAP2 besitzen jeweils zwei unterschiedliche Domänen. Die N-terminale TMD ist membranständig und für die Peptidbindung zuständig. Die NBD ist im Zytoplasma lokalisiert und bildet die C-terminale Domäne von TAP1 bzw. TAP2. Diese Domäne bindet und hydrolysiert ATP. Die dabei freigesetzte Energie wird dazu genutzt, um das Peptid in das ER zu transportieren.



**Abbildung 2: Strukturelle Organisation von TAP**

TAP ist ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2. Jede Untereinheit ist aus zwei Domänen aufgebaut. Die Transmembrandomänen (TMD) bilden die Translokationspore. Je sechs Helices bilden die sogenannte core domain (rot bei TAP1 und blau bei TAP2). Bereiche, die an der Peptidbindung beteiligt sind, wurden grün hervorgehoben. Im N-terminalen Bereich der TMD sollen sich vier (TAP1) bzw. drei (TAP2) zusätzliche Transmembranhelices befinden (orange bei TAP1 und hellblau bei TAP2). Dieser N-terminale Bereich ist für die Bindung von Tapasin verantwortlich (Abbildung modifiziert aus (Koch et al., 2004)).

Bisher wurden für TAP zwei alternative Topologiemodelle vorgeschlagen. Der Transporter wurde mittels N-terminaler Deletionen von TAP1 bzw. TAP2 und auch durch die anschließende N-terminale Fusion mit dem *green fluorescent protein* (GFP) analysiert (Vos et al., 2000; Vos et al., 1999). Es wurden für TAP1 acht Transmembranhelices (TM) und für TAP2 sieben TM vorhergesagt. Des Weiteren wurde für TAP1 und TAP2 eine sog. *head-head/tail-tail*-Orientierung postuliert. Für die Interaktion der beiden Untereinheiten sind nach diesem Modell die N-terminalen TM 1-6 bei TAP1 und TM 1-5 bei TAP2 verantwortlich. Die Interaktion der beiden Untereinheiten soll mit einer verminderten Mobilität von TAP in der Membran einhergehen. Diese Transmembranhelices sollen auch die Translokationspore bilden. Es wurde für die einzelnen Mutanten jedoch kein Peptidtransport gezeigt.

Das alternative Modell wurde mittels Analyse der Sequenzhomologie zu anderen ABC-Transportern und Hydrophobizitätsplots erstellt. So wurden für die TMD von TAP1 zehn TM und für TAP2 neun dieser Helices vorhergesagt (Tampé et al., 1997). Sechs der C-terminalen Helices bilden die sogenannte *core domain* (TM 5-10 bei TAP1 und TM 4-9 bei TAP2). Die N-terminale Domäne der TMD von TAP1 und TAP2 sind nicht kritisch für den Peptidtransport von TAP (Koch et al., 2004).

An der Peptidbindung sind die TMD von TAP1 und TAP2 gleichermaßen beteiligt (Androlewicz et al., 1994b). Die Bindungsstelle verteilt sich auf die zytosolischen Schleifen zwischen der TM8 und TM9 von TAP1, der TM7 und TM8 von TAP2 und 15 Aminosäuren, welche den TM10 (TAP1) und TM9 (TAP2) C-terminal nachfolgen (Nijenhuis & Hämmerling, 1996b; Nijenhuis et al., 1996a).

Die NBD von humanem TAP1 ist bisher die einzige Domäne des Transporters, deren dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden konnte (Gaudet & Wiley, 2001). Wie die NBD von bakteriellen ABC-Transportern (Chang & Roth, 2001; Hung et al., 1998; Schmitt et al., 2003) bildet die NBD von TAP1 die Form eines „L“. Dabei trägt der längere Arm die Bezeichnung *arm I* und der kürzere Arm wird *arm II* bezeichnet. Im längeren Arm sind die konservierten *Walker A* und *Walker B* Motive lokalisiert, welche für die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell sind (Walker et al., 1982). Der längere Arm enthält noch den sogenannten *D-loop* und *H-loop*, *arm II* hingegen beinhaltet den *C-loop* und *Q-loop* (Diederichs et al., 2000; Gaudet & Wiley, 2001; Hopfner et al., 2000; Hung et al., 1998; Schmitt & Tampé, 2002; Yuan et al., 2001). Eine größere Anzahl von Arbeiten zeigt, daß monomere NBD von ABC-Transportern in



Anwesenheit von ATP miteinander interagieren (Chen et al., 2003a; Fetsch & Davidson, 2002; Horn et al., 2003; Janas et al., 2003; Loo et al., 2002; Moody et al., 2002; Smith et al., 2002). Zwei Moleküle ATP werden durch die *WalkerA/B-Motive* und dem *C-loop* beider NBD gebunden. Es wird außerdem durch Vergleiche von Kristallstrukturen verschiedener NBD angedeutet, daß der *Q-loop* eine Wasserstoffbrücke zum  $\gamma$ -Phosphat des ATP ausbildet (Chen et al., 2003a; Hung et al., 1998; Karpowich et al., 2001; Smith et al., 2002). Die Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse soll durch den C-terminalen Bereich der jeweils anderen NBD beeinflusst sein (Bouabe & Knittler, 2003). Die Rotation des kürzeren Arms in Richtung von *arm I* induziert eine kompaktere Struktur, was die Dimerisierung zulässt. Die Verbindung zur TMD soll durch den *Q-loop* vermittelt sein, welcher mit dem sogenannten *L-loop* in der TMD eines jeden ABC-Transporters in Wechselwirkung steht (Locher et al., 2002).

MHC I-Moleküle gehören zu den Immunglobulinen und bestehen aus der schweren Kette (mit den Domänen  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ ) und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die genannten Domänen enthalten das IgG-Faltungsmotiv, bei dem 7 antiparallele  $\beta$ -Faltblätter ein  $\beta$ -*sandwich* bilden. Dabei wird die Oberseite des  $\beta$ -*sandwichs* durch vier  $\beta$ -Faltblätter und die untere Seite aus den verbleibenden drei  $\beta$ -Faltblättern gebildet. Die schwere Kette enthält eine Transmembrandomäne, welche den MHC in der Membran verankert. Die Peptid-Bindungsstelle wird durch die Domänen  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  gebildet. Der Boden der Bindungstasche wird von jeweils 4 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern pro Domäne gebildet und an zwei Seiten von  $\alpha$ -Helices flankiert. Die Domäne  $\alpha_3$  ist hingegen für die Interaktion zum  $\beta_2$ -Mikroglobulin verantwortlich (Bjorkman et al., 1987; Gorga et al., 1992; Madden et al., 1992).

Tapasin erfüllt im Rahmen der Antigenprozessierung einige Aufgaben. Dieses Typ I Transmembranglykoprotein (48 kDa) ist für die Verbindung zwischen TAP und MHC I verantwortlich. Es erhöht die Stabilität und damit die Lebensdauer von TAP (Bangia et al., 1999; Lehner et al., 1998; Raghuraman et al., 2002). Tapasin hält unbeladene MHC I-Moleküle im ER zurück (Schoenhals et al., 1999) und erleichtert bzw. editiert die Beladung von einigen MHC I-Molekülen (Lauvau et al., 1999; Williams et al., 2002; Zarlino et al., 2003). In Tapasin-defizienten Zellen werden an der Zelloberfläche nur geringe Mengen an Peptid-beladenen MHC I-Molekülen präsentiert (Grande et al., 1997; Lehner et al., 1998). Tapasin besteht aus einer ER-luminalen Domäne, einer

Transmembranhelix und einer kurzen zytoplasmatischen Region am C-Terminus des Proteins (Ortmann et al., 1997; Sadasivan et al., 1996). Die Bindungsstelle zu TAP befindet sich im Bereich der letzten 33 Aminosäuren am C-Terminus. Für die Interaktion zu MHC I ist die ER-luminale Domäne verantwortlich (Antoniou et al., 2003a; Lehner et al., 1998; Tan et al., 2002; Turnquist et al., 2002c).

Tapasin bindet an die TMD von TAP (Raghuraman et al., 2002). Nach Deletion von drei (TAP1 $\Delta$ 2-132) und zwei (TAP2 $\Delta$ 2-89) der vorhergesagten, N-terminalen Transmembranhelices kann keine Bindung von Tapasin an TAP beobachtet werden. TAP1 und TAP2 verfügen in diesem Fall nur noch über jeweils sieben Transmembranhelices (Koch et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, daß TAP fähig ist, vier Moleküle Tapasin zu binden. Es zeigte sich weiterhin, daß Tapasin seinerseits mit jeweils einem MHC I interagiert (Ortmann et al., 1997). TAP1 und TAP2 binden jeweils 2 Unterkomplexe mit den Proteinen Tapasin, MHC I, den ER-ständigen Chaperonen ERp57 und Calreticulin (Antoniou et al., 2002b). Der gesamte Peptidbeladungskomplex mit TAP und allen assoziierten Faktoren weist somit eine Stöchiometrie von 1 x (TAP1/2), 4 x (Tapasin), 4 x (MHC I), 4 x (ERp57) und 4 x (Calreticulin) auf. Dieser Komplex hat ein Molekulargewicht von ca. 1 MDa.

Im Fokus der Forschung ist die Frage, in welcher Weise die NBD und TMD von TAP1 und TAP2 an dem Transportprozess beteiligt sind. So wurden einzelne Domänen untereinander ausgetauscht (Arora et al., 2001; Daumke & Knittler, 2001b) und für die ATP-Hydrolyse bzw. ATP-Bindung kritische Aminosäuren der NBD mutiert (Hewitt & Lehner, 2003a; Karttunen et al., 2001; Knittler et al., 1999; Saveanu et al., 2001).

Bei den erwähnten Arbeiten haben Manipulationen an den NBD schwerwiegende Folgen auf die Aktivität von TAP. Je nach Art der Mutation ist die Hydrolyse oder die Bindung von ATP blockiert. Auch die Peptidbindung ist von Mutationen in den NBD beeinflusst. Für die Peptidbindung scheint die Anwesenheit der TMD von TAP1 und TAP2 erforderlich (Arora et al., 2001). Es wird jedoch auch berichtet, daß Chimärkomplexe mit einer Kombination von zwei TAP1 TMD oder TAP2 TMD eine reduzierte Peptidbindung aufweisen (Daumke & Knittler, 2001b).

Der Peptidtransport durch TAP lässt sich in mehrere Teilschritte unterteilen (van Endert et al., 1994). Das Peptid bindet in einem ATP-unabhängigen und schnellen bimolekularen Assoziationsschritt (Neumann & Tampé, 1999). Der Bindung folgt eine drastische Konformationsänderung von TAP (Neumann et al.,

2002). Für den Transport des gebundenen Peptids ist die Hydrolyse von ATP erforderlich. Bindung von nicht hydrolysierbaren ATP-Analoga oder ADP inhibieren den Peptidtransport (Müller et al., 1994; Russ et al., 1995). Die Bindung von Peptid begünstigt die ATP-Bindung und induziert die Hydrolyse von ATP (Chen et al., 2003; Gorbulev et al., 2001; Karttunen et al., 2001). Für den gesamten Transportprozess ist die ATP-Hydrolyse beider NBD nötig (Chen et al., 2003). Die beiden NBD sollen sich im Verlauf des Zyklus unterschiedlich verhalten. Die erste Hydrolyse wäre für die Translokation des Peptids in das ER-Lumen nötig, die zweite Hydrolyse hingegen würde den Transporter in seinen Ausgangszustand zurückversetzen.

### 1.3 Inhibition der Antigenprozessierung durch Viren

Viren sind intrazelluläre Parasiten, die die Protein- und Polynukleotid-Biosynthese einer infizierten Wirtszelle zur eigenen Reproduktion nutzen. Gleichzeitig muss der Parasit sich des adaptiven Immunsystems des Wirtes erwehren. Einige Viren haben im Laufe der Evolution unter dem Druck des adaptiven Immunsystems Mechanismen entwickelt, um die Antigenprozessierung zu unterlaufen (Bauer & Tampé, 2002; Hewitt, 2003b; Yewdell & Hill, 2002).

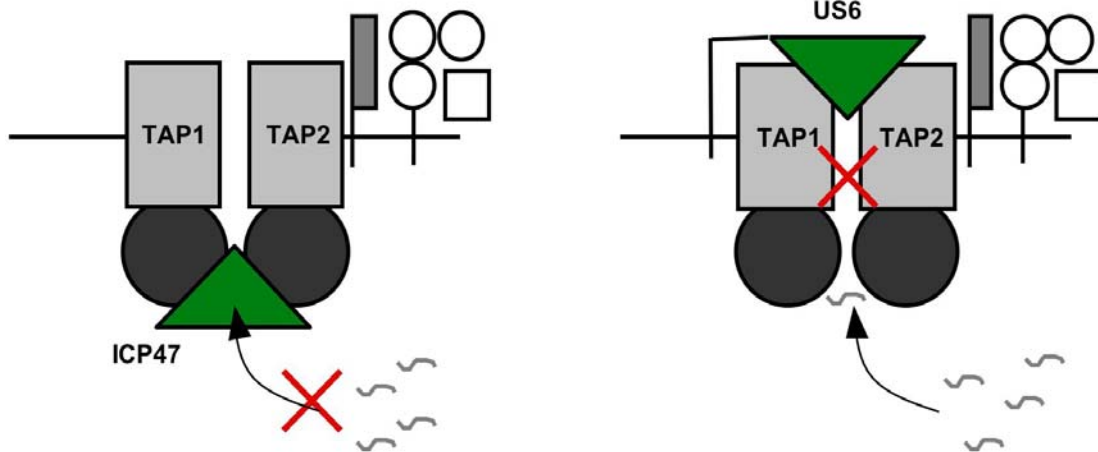
Das zu den  $\beta$ -Herpesviridae gehörende humane Zytomegalievirus (HCMV) ist weltweit in der menschlichen Population verbreitet. Bis zu 80% der menschlichen Bevölkerung sind Träger des Virus. Das Genom des HCMV besteht aus einer doppelsträngigen DNA mit einer Länge von 230 kbp (Chee et al., 1990) und ist in zwei Regionen unterteilt, welche als *unique short* (US) und *unique long* (UL) bezeichnet werden. Umhüllt wird das virale Genom von einer Lipidmembran, der virale Glykoproteine eingelagert sind.

Nach einer meist asymptomatischen Erstinfektion persistiert HCMV lebenslang im Wirt. Das Virus kann auf unterschiedliche Weise übertragen werden. Neben der Übertragung durch Körperflüssigkeiten wie Speichel oder Milch, kann das Virus auch durch die Transplantation von Blut, Rückenmark oder anderen inneren Organen in einen neuen Wirt gelangen. Ausserdem kann der Fötus durch die Mutter über die Placenta infiziert werden. Nach der Übertragung breitet sich das Virus auf die inneren Organe aus. Bei immunkompetenten Individuen stellt das Virus trotz seiner Ausbreitung keine unmittelbare gesundheitliche

Gefahr dar. Bei Patienten mit Immundefizienz wie z.B. nach einer HIV-Infektion oder aber bei Immunsuppression nach Organtransplantationen kann HCMV zu schweren Schädigungen führen. Dabei kommt es aufgrund der starken Vermehrung des Virus zur Schädigung von inneren Organen wie Speicheldrüse, Leber oder Lunge (für einen Überblick siehe (Sweet, 1999)). Weiterhin kann die Infektion des fötalen Zytotrophoblasten mit HCMV während der Schwangerschaft zu einer Antwort des maternalen Immunsystems und daraufhin zum Spontanabort führen (Jun et al., 2000).

HCMV kodiert in der sogenannten *unique short* Region für einige Proteine (US2, US3, US6, US10, US11), von denen bekannt ist, daß diese mit der Antigenprozessierung interferieren. Durch diese Interaktion soll die MHC I-vermittelte Präsentation von antigenen Peptiden inhibiert werden. Dadurch werden infizierte Zellen nicht mehr von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt und zerstört. Die beiden an der Antigenprozessierung beteiligten Proteine MHC I und TAP werden bevorzugt angegriffen. Die Proteine US2 und US11 bewirken die Retro-Translokation von MHC I aus dem ER-Lumen ins Zytoplasma, wo es durch das Proteasom degradiert wird (Wiertz et al., 1996b; Wiertz et al., 1996c). US3 und US10 hingegen halten MHC I-Moleküle im ER-Lumen zurück (Furman et al., 2002; Jones et al., 1996). Hierbei interagiert US3 mit Tapasin und blockiert auf diese Weise die Tapasin-vermittelte Beladung von MHC I mit Peptiden (Park et al., 2004). Das Protein US6 inhibiert den TAP-abhängigen Peptidtransport (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997). Die vom Proteasom generierten Peptide können somit nicht auf MHC I-Moleküle geladen werden.

Die aufgeführten US-Proteine sind Typ I Transmembranglykoproteine mit einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einer kurzen zytosolischen Domäne am C-Terminus. Bisher konnte nur die Kristallstruktur von US2 aufgeklärt werden (Gewurz et al., 2001b). Es zeigte sich, daß das Protein eine sogenannte Immunglobulindomäne ausbildet, bei der zwei Lagen aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern durch eine Disulfidbrücke fixiert werden ( *$\beta$ -sandwich*). Nach Analyse der Sequenzhomologie zwischen den einzelnen US-Proteinen wurde angenommen, daß alle Mitglieder dieser Proteinfamilie die gleiche Faltung aufweisen (Gewurz et al., 2001b).

**Struktur:**

- Zytosolisches, Membran-assoziiertes Protein
- 88 Aminosäuren, 10 kDa
- ICP47(3-34) ist aktive Domäne und bildet *Helix-Loop-Helix* Konformation aus

**Mechanismus:**

- Bindung im Zytoplasma
- Inhibition der Peptidbindung
- Affinität beträgt 50 nM

**Struktur:**

- Typ I Transmembranglykoprotein
- 183 Aminosäuren, 21 kDa
- ER-luminale Domäne ist hinreichend für die inhibitorische Aktivität *in vivo*

**Mechanismus:**

- Bindung im ER-Lumen
- Inhibition des Peptidtransports

**Abbildung 3: Virale Inhibitoren von TAP**

Ein Engpass im Prozess der Antigenprozessierung ist der TAP-abhängige Peptidtransport vom Zytoplasma in das ER-Lumen. Das Herpes Simplex Virus (HSV) und das humane Zytomegalievirus (HCMV) kodieren jeweils einen Faktor, der an diesem Punkt der Antigenprozessierung angreift. Das HSV-kodierte Protein ICP47 (links) bindet im Zytoplasma an TAP und inhibiert die Peptidbindung. Das HCMV-kodierte Protein US6 (rechts) bindet im ER-Lumen an TAP. Im Gegensatz zu ICP47 hat US6 keinen Einfluß auf die Peptidbindung von TAP.

Über die Struktur von US6 ist nur wenig bekannt. Das Protein weist mit 183 Aminosäuren eine molekulare Masse von 21 kDa auf. Die ersten 19 Aminosäuren am N-Terminus sind als Signalsequenz für die Lokalisation des Proteins verantwortlich. Diese Sequenz wird während der Translokation der naszenten Polypeptidkette in das ER-Lumen abgespalten. Weiterhin enthält das Protein in der ER-luminalen Domäne eine Glykosylierungsstelle an der Position Asn52. In der Primärsequenz von US6 befinden sich insgesamt 13 Cysteinreste, von denen 8 Cysteine in der ER-luminalen Domäne lokalisiert sind. Bisher ist noch ungeklärt, in welcher Weise diese Cysteinreste an der Bildung von

Disulfidbrücken beteiligt sind. US6 bindet im ER-Lumen an TAP und inhibiert den TAP-abhängigen Peptidtransport in das ER (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997). Für die Inhibition des Peptidtransports ist die ER-luminale Domäne von US6 (Aminosäuren 20-139) ausreichend (Ahn et al., 1997).

Ein anderer viraler Inhibitor von TAP ist das vom Herpes Simplex Virus (HSV) kodierte Protein ICP47. Im Gegensatz zu US6 inhibiert ICP47 die Peptidbindung an TAP (Ahn et al., 1996a; Tomazin et al., 1996). Die Bindung von ICP47 an TAP ist Spezies-spezifisch mit einer ermittelten Bindungskonstante von 50 nM (Ahn et al., 1996a; Tomazin et al., 1996). ICP47 hat mit 88 Aminosäuren eine molekulare Masse von 10 kDa. Als aktive Domäne wurde die aus 32 Aminosäuren bestehende Sequenz ICP47(3-34) identifiziert (Neumann et al., 1997). Diese Domäne ist in wässriger Lösung ungefaltet und nimmt nach Anlagerung an die Membran eine *Helix-Loop-Helix* Konformation an (Beinert et al., 1997; Pfänder et al., 1999).

## 1.4 Frage- und Aufgabenstellung

Im Laufe ihrer Co-Evolution haben sich Parasiten an ihre jeweiligen Wirte angepasst. HCMV infiziert Spezies-spezifisch nur humane Zellen und ist in der Lage lebenslang in seinem Wirtsorganismus zu persistieren. Das von diesem Virus kodierte Protein US6 inhibiert den TAP-Komplex. Dieser virale Faktor stellt eine im Laufe der Evolution entwickelte Anpassung auf die zelluläre Immunantwort dar. Virale Faktoren wie ICP47 oder US6 sind Werkzeuge, mit denen Einblicke in den Prozess der Antigenprozessierung erhalten werden können. Die Aufklärung des Vorgangs der Persistenz von Viren in ihrem menschlichen Wirt kann dazu beitragen, diese Pathogene aus der menschlichen Population zu eliminieren. Weiterhin können virale Modulatoren der Antigenprozessierung von Nutzen für die Transplantationsmedizin sein. Zunächst aber können sie dazu beitragen, unsere Kenntnis über die Funktionsweise von TAP zu erweitern.

Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Ziele verfolgt:

- Heterologe Expression der ER-luminalen Domäne in *E. coli*
- Aufklärung des molekularen Mechanismus der TAP-Inhibition
- Identifikation der aktiven Domäne von US6
- Charakterisierung von für die Inhibition kritischen Aminosäuren
- Identifikation der Interaktionsstellen von US6 und TAP

Alle zuvor durchgeführten Arbeiten zur Inhibition von TAP durch US6 waren Analysen, welche *in vivo* vorgenommen wurden (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997). Dennoch sind nur wenige strukturelle und molekulare Details der TAP-Inhibition aufgeklärt. Mittels heterologer Expression von US6 in *E. coli* könnten hinreichende Proteinmengen produziert werden. Durch den Einsatz von verschiedenen Inhibitionsassays kann die Peptidbindung, der Peptidtransport, die ATP-Bindung und -Hydrolyse von TAP in An- und Abwesenheit des Inhibitors untersucht werden. Nach der Etablierung der *in vitro* Funktionsassays sollen durch Einführung von Mutationen die aktive Domäne und für die Aktivität von US6 kritische Aminosäuren identifiziert werden. Ausserdem können durch biochemische Analysen die strukturellen Eigenschaften von US6 untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Autoklav (5075 ELVC)	Tuttnauer Systec
Automatikpipetten	Eppendorf/Gilson/Abimed
Brutschrank (Kelvitron® t)	Heraeus
CD Spektropolarimeter (J-810)	Jasco
Fermenter (Microferm Fermentor)	New Brunswick Scientific
Filmentwicklungsgerät	AGFA
Heizblock	Eppendorf/HLC
Lumi-Imager	Roche
pH-Meter	WTW
Schüttler für Kulturen (Innova™4330)	New Brunswick Scientific
SDS-Gelelektrophorese-Apparatur	Eigenbau
Semi-Dry-Blotapparatur	Biorad
SMART-HPLC-Apparatur	Amersham Pharmacia
verwendete Säulen:	Amersham Pharmacia
μRPC C8 SC2.1/10	
Superose 6 PC3.2/30	
Superdex G75 PC3.2/30	
Spannungsgeber (z.B. Elite 300 plus)	Biorad/Consort/Eigenbau
Tankblotapparatur	Biorad
Thermocycler	Biometra/Techne Progene
Überkopfschüttler	Snijders
Ultraschallgerät	Branson
UV-Tisch (UVT-20 M/W)	Herolab
Vortex	Bender & Hobein AG
Voyager De Pro Massenspektrometer	Perspektiv Biosciences
Zentrifugen	Sorval/Beckman/
RC-3C Plus, RC-5B	Eppendorf/Heraeus
Coulter Optima TLX Ultrazentrifuge	
L-70 Ultrazentrifuge	
Tischkühlzentrifuge 5417R	
Biofuge 13, Megafuge 1.0 R	



Rotoren	Sorval/Beckman
TLA 120, SS34, SW-28, Ti60, Ti70, Ti80	

## 2.2 Computerprogramme

*CD Deconvolution Software* Version 2.1  
Gerald Böhm, Bioinformatik, Universität Halle

*Grams/AI spectroscopy data processing software* Version 4.14  
Thermo Galactic

## 2.3 Materialien

Amylosematerial	NEB
BioBeads SM2	Biorad
Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH
Nominale Filtrerrate 4-6 kDa	
Wandstärke 25 $\mu$ M,	
Vol/cm: 1,15 ml	
Dowex 1X8	Sigma Chemicals Co.
ECL-Film	Amersham Pharmacia
Zentrifugationskonzentratoren	Milipore
Ultrafree-15, Biomax-10k, NMWL Membran, 15 ml	
Filterpapier	Whatman/Machery-Nagel
Papierrundfilter für mittelf. Niederschläge	
HiTrap Chelating HP, 1 ml und 5 ml	Amersham Pharmacia
HiTrap NHS-aktivierte Sepharose, 1 ml	Amersham Pharmacia
Latexhandschuhe	Carl Roth GmbH
Nickel-NTA-Superflow	Qiagen
Nickel-IDA-Superflow	Amersham Pharmacia
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schüll
Optitran BA-S 83, 0,2 $\mu$ m	
Pasteurpipetten	Merck KGaA

PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf/Carl Roth GmbH
Pipettenspitzen	Greiner
Plastikküvetten	Carl Roth GmbH
Quarzküvetten	Hellm
Reaktionsgefäße	Eppendorf/Carl Roth GmbH
Saran-Film (Frischhaltefolie)	Carl Roth GmbH
Säulenkörper	Biorad
Econo Pack Säulen (25 ml)	
Spritzen	Hamilton
Spritzenfilter	Carl Roth GmbH

## 2.4 Chemikalien

Antifoam A	Sigma Chemicals Co.
30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid	Carl Roth GmbH
Agar	GibroBRL
Agarose	BMA
Ampicillin	Sigma Chemicals Co.
Ammoniumpersulfat	Fluka Chemie GmbH
ATP	Sigma Chemicals Co.
[ $\gamma$ <sup>32</sup> P]-ATP	Amersham Pharmacia
ATP-Agarose,	Sigma Chemicals Co.
Verknüpfung: C8	
Spacer von 9 C-Atomen	
ADP-Agarose,	Sigma Chemicals Co.
Verknüpfung: C8	
Spacer von 9 C-Atomen	
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
BSA	Sigma Chemicals Co./
	Carl Roth GmbH
Calciumacetat	Merck KGaA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
Chloramin T	Riedel-de Hæn
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma Chemicals Co.
D-(+)-Glucose	Sigma Chemicals Co.

Digitonin	Calbiochem
DMSO	Merck KGaA
D-(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH
DTNB	Sigma Chemicals Co.
DTT	Sigma Chemicals Co.
EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Harnstoff	Carl Roth GmbH/Merck KGaA
Hefe-Extrakt	Carl Roth GmbH
Imidazol	Fluka Chemie GmbH
Kaliumacetat	Riedel-de Häen
IPTG	Fermentas/Bio Vedra
Magnesiumacetat	Merck KGaA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA
Maltose	Merck KGaA
Methanol	Merck KGaA
Milchpulver	Fluka Chemie GmbH
Natriumbisulfit	Carl Roth GmbH
Natriumcarbonat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumcitrat	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid	Fluka Chemie GmbH
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Natrium <sup>125</sup> Iodid	Amersham Pharmacia
Nickelsulfat	Carl Roth GmbH
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH
Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH
Polyethylenglycol 3.350	Sigma Chemicals Co.
Ponceau S	Sigma Chemicals Co.

2-Propanol	Carl Roth GmbH
Salzsäure (37%)	Carl Roth GmbH
TEMED	Sigma Chemicals Co.
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH

## 2.5 Enzyme

### Restriktionsendonukleasen:

<i>Bam</i> HI	Fermentas/NEB
<i>Dpn</i> I	Fermentas/NEB
<i>Hind</i> III	Fermentas/NEB
<i>Eco</i> RI	Fermentas/NEB
<i>Nco</i> I	Fermentas/NEB
<i>Nde</i> I	Fermentas/NEB
<i>Xba</i> I	Fermentas/NEB
<i>Xmn</i> I	NEB

### DNA Polymerasen:

<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas/TaKaRa
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase	Roche Diagnostics GmbH

### DNA modifizierende Enzyme:

<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>	Fermentas
T4-Polynukleotidkinase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas

### Proteinasen/Peptidasen:

Proteinase K	Fermentas
Faktor Xa	Amersham Pharmacia Biotech
Trypsin/LysC	Boehringer Ingelheim
Aminopeptidase M	Boehringer Ingelheim
Carboxypeptidase Y	Boehringer Ingelheim

**Sonstige Enzyme:**

Lysozym

Sigma Chemicals Co.

**2.6 Kits**

NucleoSpin® Plasmid Kit

Machery &amp; Nagel

QIAGEN® Plasmid Mini Kit

Qiagen

QIAGEN® Plasmid Midi Kit

Qiagen

QIAquick® PCR Purification Kit

Qiagen

QIAquick® Gel Extraction Kit

Qiagen

Micro BCA Protein Assay

Pierce

FoldIt Protein Refolding Kit

Hampton Research

**2.7 Plasmide**

pcDNA3.0-US6

PD. Dr. Hartmut Hengel

Robert Koch Institut, Berlin

pRSET-B

Invitrogen

pMal-c2X

NEB

pMal-p2X

NEB

pKMProtG

Dr. Thomas Langer

Aventis Pharma GmbH

**2.8 Peptide****Peptidsequenz**

RRYQKSTEL

ERSSRDPKTLTLLSLSPRQQAC

**beschrieben in:**

Meyer et al., 1994

in dieser Arbeit

## 2.9 Primer

Basentriplets, welche wichtig für die gerichtete Mutagenese sind, wurden in Fettdruck hervorgehoben. Alle Primer wurden von MWG Biotech GmbH bezogen. Klonierte Konstrukte wurden bei Scientific Research & Development GmbH sequenziert.

Primer Nr.	Primer Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
1	US6 blunt-fw N-term	GAGCGGTCTTCGCGTGA CCCG	US6-Konstrukt ohne ER- <i>leader</i> -Sequenz
2	US6(Δ1-19) for <i>NcoI</i>	GGAGGTCGCCCCATGGA GCGGTCTTCGCGTGAC	US6-Konstrukt ohne ER- <i>leader</i> -Sequenz
3	US6(Δ1-19) for <i>NdeI</i>	GGAGGTCGCCATATGGA GCGGTCTTCGCGTGAC	US6-Konstrukt ohne ER- <i>leader</i> -Sequenz
4	US6(Δ1-24) for <i>NdeI</i>	GGAGGTCGCCATATGGA CCCGAAAACCCTTCTC	N-terminale US6- Verkürzung
5	US6(Δ1-34) for <i>NdeI</i>	GGAGGTCGCCATATGCG ACAACAAGCTTGTGTT	N-terminale US6- Verkürzung
6	US6(Δ1-39) for <i>NdeI</i>	GGAGGTCGCCATATGGTT CCGAGAACGAAGTCG	N-terminale US6- Verkürzung
7	US6(Δ126- 183) rev <i>EcoRI</i>	TGAGTGCCCCGAATTCTCA GTGATGGTGTGATGGTGTG ATTCATAAGCGTTAACAA	C-terminale US6- Verkürzung + 6xHis- Tag
8	US6(Δ145- 183) rev <i>EcoRI</i>	TGAGTGCCCCAATTCTCA GTGATGGTGTGATGGTGTG TCCGTGTCGTTCTATCAA	C-terminale US6- Verkürzung + 6xHis- Tag
9	US6(Δ147- 183) rev <i>EcoRI</i>	TGAGTGCCCCGAATTCTCA GTGATGGTGTGATGGTGTG GAAGAATCCGTGTCGTT TATCAAGCGAAACGCGTT CCAAACGGCCCCGTCAC AGACGCAGTTATTCATAA G	C-terminale US6- Verkürzung + 6xHis- Tag

Primer Nr.	Primer Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
10	US6 His	TGAGTGCCCTCTAGATCA GTGATGGTGATGGTGATG GAAGAATCCGTGTCGTTCTAT	C-terminale US6-Verkürzung + 6xHis-Tag
11	R138A rev	TGAGTGCCCGAATTCTCA GTGATGGTGATGGTGATG GAAGAATCCGTGTCGTTCTATCAAG <b>GGCAAACGCGTT</b> CCAAAC	Mutageneseprimer
12	W134A rev	TGAGTGCCCGAATTCTCA ATGGTGATGGTGATGGTG GAAGAATCCGTGTCGTTCTATCAAGCGAAACGCGTT <b>CGCAAACGGCCCCGTC</b>	Mutageneseprimer
13	D130A for	GAATAACTGCGTCTGT <b>GC</b> <b>CGGGGCCGTTTGGAAAC</b>	Mutageneseprimer
14	D130A rev	GTTCCAAACGGCCCC <b>GG</b> <b>CACAGACGCAGTTATTC</b>	Mutageneseprimer
15	C129S for	GAATAACTGCGTCT <b>CTGA</b> CGGGGCCGTTTGG	Mutageneseprimer
16	C129S rev	CCAAACGGCCCCGTC <b>AG</b> <b>AGACGCAGTTATTC</b>	Mutageneseprimer
17	C127S for	CGCTTATGAATAACT <b>CCG</b> TCTGTGACGGGGC	Mutageneseprimer
18	C127S rev	GCCCCGTACAGAC <b>GGA</b> GTTATTCATAAGCG	Mutageneseprimer
19	C127/129S rev	TGAGTGCCCGAATTCTCA GTGATGGTGATGGTGATG GAAGAATCCGTGTCGTTCTATCAAGCGAAACGCGTT CCAAACGGCCCCGTC <b>AG</b> <b>AGACGGAGTTATTCATAA</b> G	Mutageneseprimer

Primer Nr.	Primer Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
20	pMal for	AGACTAATTCGAGCTCGA ACAACAACAACA	Sequenzierungsprimer
21	pMal rev	CGCCAGGGTTTTCCCAGT CACGACGTTGTA	Sequenzierungsprimer
22	pRSET-B rev	CTAGTTATTGCTCAGCGG TGG	Sequenzierungsprimer
23	US6(Δ147-183) rev <i>Bam</i> HI	TGAGTGCCCGGATCCTCA GAAGAATCCGTGTCG	C-terminale US6-Verkürzung

**Tabelle 1: Zur Amplifikation genutzte Primer**

Angegeben sind die laufende Primer-Nr., Bezeichnung, Sequenz und Zweck der einzelnen Primer.

## 2.10 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Organismus	beschrieben in
An 9218	anti US6	Kaninchen	In dieser Arbeit
148.3	anti TAP1	Maus	Meyer et al., 1994
429.3	anti TAP2	Maus	van Endert et al., 1994
435.3	anti TAP2	Maus	van Endert et al., 1994
70796-4	anti His <sub>6</sub>	Maus	Novagen
111035003	anti Kaninchen IgG	Ziege	Dianova
A 2554	anti Maus IgG	Ziege	Sigma-Aldrich

## 2.11 *Escherichia coli* Stämme

DH5α	Invitrogen
BL21(DE3)	Stratagene
BL21(DE3)pLysS	Stratagene
Origami(DE3)pLysS	Novagen



## 2.12 Zellinien

<i>Raji (Human Burkitt Lymphoma)</i> -Zellen	ECACC
<i>Sf9 (Spodoptera frugiperda)</i> -Insektenzellen	Invitrogen

## 2.13 Antibiotika

100 mg/ml Ampicillin (1000-fach)

30 mg/ml Chloramphenicol (1000-fach) in Ethanol

15 mg/ml Kanamycin (1000-fach)

1,25 mg/ml Tetracyclin (100-fach) in Ethanol

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Lösungen für molekularbiologische Methoden

**Taq Polymerase Puffer (10-fach):**

200 mM Tris/HCl pH 8,8  
100 mM Kaliumchlorid  
100 mM Ammoniumsulfat  
20 mM Magnesiumsulfat  
1% (w/v) Triton X-100

**Pwo Polymerase Puffer (10-fach):**

100 mM Tris/HCl pH 8,8  
250 mM Kaliumchlorid  
50 mM Ammoniumsulfat  
20 mM Magnesiumsulfat

**NEB Puffer 2 (1-fach):**

10 mM Tris/HCl pH 7,9  
10 mM Magnesiumchlorid  
50 mM Natriumchlorid  
1 mM Dithiothreitol

**NEB Puffer 4 (1-fach):**

20 mM Tris/Acetat pH 7,9  
10 mM Magnesiumacetat  
50 mM Kaliumacetat  
1 mM Dithiothreitol

**T4-DNA Ligase Puffer (1-fach):**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
10 mM Magnesiumchlorid  
10 mM Dithiothreitol  
1 mM ATP  
25 µg/ml Rinderserumalbumin

**alkal. Phosphatase Puffer (10-fach):**

100 mM Tris/HCl pH 7,5  
100 mM Magnesiumchlorid

**sonstige Lösungen:**

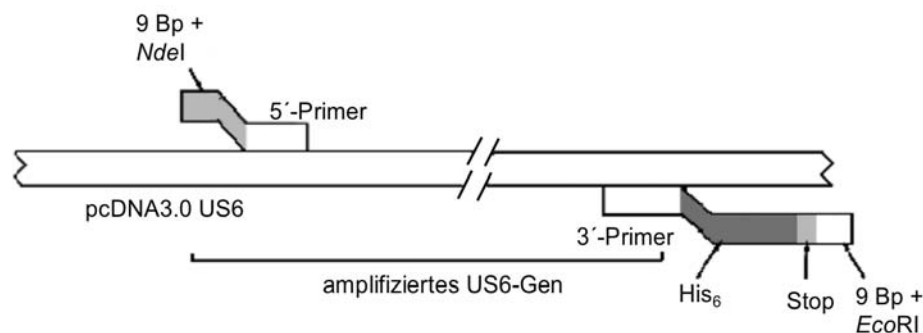
DNA Marker (100 und 1000 Bp)  
2 mM dNTP-Mix

Fermentas  
TaKaRa/Fermentas

### 3.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wird das gewünschte Gen in ausreichender Menge für die anschließenden molekularbiologischen Arbeiten amplifiziert. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe der in 2.9 aufgeführten Primer. Der Primer enthält eine zum Zielgen komplementäre Teilsequenz. Außerdem ist ein Start- oder Stop-Codon und optional eine Nukleotidsequenz vorhanden, welche für einen Affinitätsanhang kodiert (siehe auch Abb. 4). Letzteres ist hilfreich für die spätere Reinigung des Zielproteins aus dem Zellextrakt.

Um in einem Gen eine bestimmte Mutation einzufügen, werden Primer eingesetzt, welche sogenannte *mismatches* enthalten. Auf diese Weise wird das Gen mit gewünschter Mutation mittels PCR amplifiziert und kann anschließend über Restriktionsschnittstellen in das jeweilige Expressionsplasmid kloniert werden. Ist das Zielgen bereits im Expressionsplasmid vorhanden, kann über diese Methode auch der gesamte Vektor mit der gewünschten Mutation amplifiziert werden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primer-Anlagerung**

Im Verlauf der PCR hybridisieren die Primer an den beiden Enden des zu amplifizierenden Gens und ermöglichen so der DNA-Polymerase die Elongation durch den Einbau freier Nukleotide. Die Primer bestehen zum Teil aus einer dem Zielgen komplementären Nukleotidsequenz, aus einem Überhang von 9 Nukleotiden und einer Restriktionsschnittstelle. Hier ist die Hybridisierung des Primers während der Amplifikation von US6(20-146) aus dem Plasmid pcDNA3.0-US6 dargestellt. Über den 3'Primer wird außerdem eine Sequenz, die für sechs Histidine und ein Stopcodon kodiert, in das Konstrukt gebracht.

Der gesamte Prozess lässt sich in drei Teilreaktionen unterteilen. Bei der Denaturierung wird die Matrizen-DNA bei 94°C von der doppelsträngigen in die einzelsträngige Form überführt. Durch Abkühlung wird den sich im Überschuss vorhandenen Primern erlaubt, mit der Matrizen-DNA zu hybridisieren. Zuletzt

erfolgt die Elongation durch die gewählte DNA-Polymerase eines thermophilen Organismus. Je nach gewähltem Ansatz wurden im Rahmen dieser Arbeit die *Pwo* bzw. *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerasen synthetisieren unter Verwendung freier Nukleotide einen neuen Strang vom 5'- in Richtung des 3'-Endes der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz. Die beiden Polymerasen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Fehlerrate (*Taq* Polymerase 1:10<sup>5</sup>; *Pwo* Polymerase 1:10<sup>6</sup>). Kürzere Genabschnitte werden mit der *Taq* Polymerase amplifiziert. Bei Mutageneseansätzen, bei denen der gesamte Vektor vervielfältigt wird, findet die *Pwo* Polymerase Anwendung. Da bei der Reaktion grundsätzlich Fehler auftreten können, ist das PCR-Produkt nach der Klonierung zu sequenzieren.

#### A. Amplifikation und Mutagenese eines einzelnen Gens:

Die Amplifikation und Mutagenese eines einzelnen Gens erfolgte nach dem folgenden Protokoll. Zu beachten ist, daß sich die gerichtete Mutagenese auf den Bereich des 5'- und 3'-Endes eines Gens beschränkt, da hier die jeweiligen Primer hybridisieren.

Matrizen-DNA (1 ng/µl)	2,0 µl
<i>Taq</i> Reaktionspuffer (10-fach)	10,0 µl
<i>forward</i> -Primer (10 pmol/µl)	10,0 µl
<i>reverse</i> -Primer (10 pmol/µl)	10,0 µl
dNTP Mix (2,5 mM)	20,0 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase ( 5 U/µl)	2,0 µl
ad 100 µl MilliQ H <sub>2</sub> O	

#### PCR-Protokoll:

Vorlauf	94°C, 3 min
30 Zyklen:	
Denaturierung	94°C, 1 min
Hybridisierung	55°C, 1 min
Elongation	72°C, 1,5 min
Editierung	72°C, 10 min
Im Anschluß 4°C	

Diese Methode wurde zur Amplifikation folgender Konstrukte genutzt (siehe Tabelle 2). Angegeben sind in folgender Tabelle auch die verwendeten Primer (siehe 2.9), Plasmide die als Matrize dienten und Zielplasmide in die das PCR-Produkt kloniert wurde (siehe 2.7).

<b>Name des Konstrukts</b>	<b>Matrize</b>	<b>Zielplasmid</b>	<b>Primer-Nr. (siehe 2.9)</b>
US6(20-146)	pcDNA3.0-US6	pRSET-B	3, 9
US6(20-146)	pRSET-B-US6(20-146)	pMal-c2X	1, 10
US6(20-146)	pRSET-B-US6(20-146)	pMal-p2X	1, 10
US6(20-146)	pRSET-B-US6(20-146)	pKM ProtG	2, 23
US6(20-144)	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	3, 8
US6(25-144)	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	4, 8
US6(35-144)	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	5, 8
US6(40-144)	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	6, 8
US6(20-125)	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	3, 7
US6(20-146) R138A	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	3, 11
US6(20-146) W134A	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	3, 12
US6(20-146) C127/129S	pRSET-B-US6(20-146)	pRSET-B	3, 19

**Tabelle 2: Zusammenstellung amplifizierter Konstrukte**

Angegeben sind die Konstruktbezeichnung und die Matrizen-DNA. Weiterhin sind die Zielplasmide, und die laufende Nummer der genutzten Primer angegeben.

## B. Mutagenese mittels Amplifikation des gesamten Vektors

Die Mutation wird über zwei Primer erzeugt, die mit beiden DNA-Strängen innerhalb des Gens hybridisieren und in ihrer Mitte eine Fehlpaarung vermitteln. Im Verlauf eines Zyklus wird dann der gesamte Vektor amplifiziert. Diese Methode wurde im Nachhinein gewählt, da auf diese Weise Punktmutationen in kürzerer Zeit hergestellt werden können. In der folgenden Tabelle sind außerdem das Ausgangsplasmid und die verwendeten Primer aufgelistet:

Name des Konstrukts	Ausgangsplasmid	Primer Nr. (siehe 2.9)
US6(20-146) D130A	pRSET-B-US6(20-146)	13, 14
US6(20-146) D130/R138A	pRSET-B-US6(20-146) R138A	13, 14
US6(20-146) C129S	pRSET-B-US6(20-146)	15, 16
US6(20-146) C127S	pRSET-B-US6(20-146)	17, 18

**Tabelle 3: Einfügen von Mutationen mittels PCR**

Angegeben sind die eingeführten Mutationen, die Matrizen-DNA und die laufende Nummer der für die Amplifikation genutzten Primer.

pRSET-B US6(20-146) (100 ng/μl)	0,7 μl
<i>forward</i> -Primer (100 pmol/μl)	0,5 μl
<i>reverse</i> -Primer (100 pmol/μl)	0,5 μl
<i>Pwo</i> Reaktionspuffer (10-fach)	5,0 μl
dNTP Mix (2,5 mM)	5,0 μl
<i>Pwo</i> DNA-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
ad 50 μl mit <i>MiliQ</i> H <sub>2</sub> O	

**PCR-Protokoll:**

Vorlauf	94°C, 1 min
25 Zyklen:	
Denaturierung	94°C, 1 min
Hybridisierung	58°C, 1 min
Elongation	72°C, 7 min
Editierung	72°C, 2 min
Im Anschluss	4°C

**3.1.3 Reinigung der PCR-Produkte**

Nach erfolgreicher PCR ist das Produkt zu reinigen, um es von verbliebenen Primern, Nukleotiden und der DNA-Polymerase zu trennen. Der PCR-Ansatz kann mittels einer Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgen (siehe 3.1.4 und 3.1.5). Alternativ kann das Qiagen *PCR Purification Kit* genutzt werden. Prinzip der Reinigung ist die Bindung der DNA an ein Silika-Material, welche durch erhöhte Salzkonzentration und pH-Wert daraufhin von diesem Material eluiert werden kann (Hamaguchi & Geiduschek, 1962; Vogelstein & Gillespie, 1979). Auf diesem Prinzip beruhen alle genutzten Kits von Qiagen und Macherey & Nagel. Die genaue Durchführung kann den entsprechenden Handbüchern entnommen werden.

**3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese****TAE-Puffer:**

20 mM Tris/Acetat pH 8,0  
1 mM EDTA

**Probenpuffer (10-fach):**

200 mM Tris/Acetat pH 8,0  
10 mM EDTA  
42,5% (v/v) Glycerol  
0,025% (w/v) Bromphenolblau

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe. Dabei wandert die polyanionische DNA in einem angelegten elektischen Feld durch die Matrix des

Agarosegels in Richtung der Anode. Kleinere DNA Fragmente weisen auf ihrem Weg durch die Gelmatrix eine größere Mobilität auf, als DNA mit einer höheren Anzahl an Nukleotidpaaren.

Zur Reinigung von PCR-Produkten mit einer Größe von 300-500 Nukleotiden und zur Analyse eines klonierten Konstrukts (siehe 3.1.12) kommen 2% (w/v) Agarosegele zum Einsatz. Zur Analyse und Präparation von linearisierten Plasmiden (siehe 3.1.6) ist ein 0,7% (w/v) Agarosegel zu wählen. Plasmide weisen eine Größenordnung von einigen Kilobasenpaaren auf und nur ein Gel mit geringerer Agarosekonzentration lässt eine genaue Größenabschätzung zu.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die gewünschte Menge an Agarose abgewogen und im entsprechenden Volumen TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem eine homogene, schlierenfreie Lösung entstanden ist, erfolgt eine Abkühlung auf ca. 50°C. Die Gellauf-Apparatur wird daraufhin mit der Agaroselösung abgedichtet und das Gel luftblasenfrei gegossen. Ein Kamm sorgt für die nötigen Probenaschen im erstarrten Gel. Für den Gellauf werden die betreffenden Proben mit 10-fach Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanten 60-70 mA. Anschließend wird die im Gel befindliche DNA im Ethidiumbromid-Färbebad für 15-20 Minuten unter leichtem Schütteln angefärbt. Die DNA ist daraufhin unter UV-Licht für die Dokumentation bzw. weitere präparative Schritte (siehe 3.1.5) sichtbar.

### **3.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Die angefärbte DNA wird mit einem Skalpell möglichst genau aus dem Agarosegel herausgeschnitten und das Gelstück in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen. Die Extraktion der DNA erfolgt mit Hilfe des Qiagen *Gel Extraction Kits*. Das Gel wird dazu aufgelöst, auf das bereits erwähnte Silika-Material aufgetragen und die DNA von Agarose und Salzen getrennt. Die genaue Durchführung ist dem betreffenden Handbuch von Qiagen zu entnehmen.



### 3.1.6 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Für die erfolgreiche Klonierung des Zielgens in den gewünschten Expressionsvektor müssen sowohl beim Plasmid als auch beim PCR-Produkt komplementäre Enden vorhanden sein. Diese werden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen generiert. Idealerweise sind für das 5'- und 3'-Ende der betreffenden DNA-Fragmente zwei verschiedene Nukleasen einzusetzen. Dies ermöglicht den Einbau des Zielgens in das Plasmid in nur einer Orientierung. Je nach Klonierungsstrategie kommen verschiedene Enzyme zum Einsatz. Generell wurde die DNA nach folgendem Schema behandelt:

Plasmid-DNA (2 µg) oder	
PCR-Produkt (2-5 µg)	
10-fach Nuklease-Puffer	2,0 µl
Nuklease Nr. 1 (10 U/µl)	0,5 µl
Nuklease Nr. 2 (10 U/µl)	0,5 µl
ad 20 µl mit <i>MiliQ</i> H <sub>2</sub> O	

Bei der Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme ist unbedingt darauf zu achten, daß der Nuklease-Puffer für beide Enzyme geeignet ist. Nach dem Restriktionsverdau können linearisierter Vektor und PCR-Produkt mittels des Qiagen *PCR Purification Kits* (siehe 3.1.3) gereinigt werden. Entsteht durch den Verdau eines Plasmids jedoch ein zweites Fragment, welches größer als 30-50 Basenpaare ist, sollte die Reinigung über ein Agarosegel erfolgen (siehe 3.1.4 und 3.1.5). Für die Klonierung der hergestellten Konstrukte wurden folgende Nukleasen verwendet:

- A) Für die in pRSET-B klonierten US6-Konstrukte wurden die Restriktionsenzyme *NdeI* (5') und *EcoRI* (3') genutzt. Der Verdau mit beiden Enzymen kann im NEB-Puffer 2 oder 4 erfolgen.
- B) Für die Klonierung von US6 in die pMal-Vektoren fanden die Enzyme *XmnI* (5') und *XbaI* (3') Verwendung. Geeigneter Puffer war hier der NEB-Puffer 2 mit einem Zusatz von 100 µg/ml Rinderserumalbumin.
- C) US6 wurde in pKMProtG über die Schnittstellen *NcoI* (5') und *BamHI* (3') kloniert. Für die Restriktion wurde der NEB-Puffer 2 genutzt.

Die Restriktion erfolgt in der Regel für ein bis zwei Stunden bei 37°C. Anschließend werden die Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 65°C inaktiviert. Linearisierte Vektoren werden nachfolgend noch mit alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Reinigung des linearisierten, dephosphorylierten Vektors erfolgt wie bereits erwähnt (siehe 3.1.4 und 3.1.5).

Restiktionsansatz des Vektors	20,0 µl
NEB-Puffer 2 (10-fach)	2,0 µl
CIAP (10 U/µl)	1,0 µl
ad 40 µl mit <i>MiliQ</i> H <sub>2</sub> O	

### 3.1.7 Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten

Nach Amplifikation, Restiktionsverdau und Dephosphorylierung werden Plasmid und Insert miteinander ligiert. Dabei wird das Insert mit bis zu einem 5-fachen molaren Überschuß eingesetzt. Die Ligation erfolgt über Nacht (üN) oder über 24 Stunden bei 16°C. Die Ligase wird nach der Ligation für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Im Anschluß wird der Ligationsansatz zur Transformation von *E. coli* DH5α genutzt (siehe 3.1.10). Zur Ligation wurde folgender Ansatz gewählt:

Linearisierter Vektor	80-100 ng
US6-Insert	30-60 ng
T4-Ligase Puffer (10-fach)	4,0 µl
PEG 4000 (50% w/v)	4,0 µl
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	2,0 µl
ad 40 µl mit <i>MiliQ</i> H <sub>2</sub> O	

### 3.1.8 Ortsspezifische Mutagenese

Um eine Mutation mittels PCR in ein bereits kloniertes Gen einzufügen, kann das gesamte Plasmid amplifiziert werden. Dies geschieht mit Hilfe von Primern, welche diese Mutation tragen. Im Anschluss wird das amplifizierte Plasmid gereinigt (3.1.3). Die amplifizierte DNA ist im Gegensatz zur Matrizen-DNA nicht

methyliert. Aufgrund dessen kann die Matrizen-DNA mit der Nuklease *DpnI* vollständig degradiert werden.

Gereinigtes Plasmid	22,0 µl
NEB-Puffer 4	2,5 µl
<i>DpnI</i> (20 U/µl)	0,5 µl

Die Restriktion findet bei 37°C für eine Stunde statt. Nach der Restriktion folgt eine kurze Abkühlung auf Eis und die Transformation in *E. coli* DH5α (siehe 3.1.10).

### 3.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien

#### LB-Medium:

1% (w/v) Natriumchlorid

1% (w/v) Pepton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

pH 7,0 mit Natriumhydroxid einstellen (für Anzucht im Fermenter pH 8,0)

wahlweise Zugabe des entsprechenden Antibiotikums als Selektionsfaktor

für Agarplatten werden 1,5% (w/v) Agar benötigt

#### LB-Komp.: Lösung zur Herstellung von Mg<sup>2+</sup> kompetenten *E. coli*:

10% (w/v) Polyethylenglycol (3000 g/mol)

5% (v/v) Dimethylsulfoxid

20 mM Magnesiumchlorid

in LB-Medium

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wird zunächst 2 ml einer üN-Kultur in LB-Medium mit dem gewünschten *E. coli* Stamm angeimpft. Das Wachstum erfolgt im Schüttelinkubator bei 37°C. Am nächsten Morgen werden 0,5 ml der Vorkultur in 40 ml LB-Medium überimpft. Nach zwei bis drei Stunden Wachstum bei 37°C sollte die optische Dichte (bei 600 nm) etwa 0,3 bis 0,4 betragen. Die Zellen werden daraufhin mittels Zentrifugation bei 1000 g und 4°C geerntet und in eiskaltem LB-Komp.-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird

zu je 200  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.1.10 Transformation kompetenter Bakterien

Zu den gefrorenen Zellen werden entsprechende Ligations- oder PCR-Ansätze (3.1.7 und 3.1.8) pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 90 Sekunden. Nach diesem Hitzeschock wird 1 ml LB-Medium (3.1.9) hinzupipettiert und die Zellen für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bakterien werden anschließend bei 5000 g für 10 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert, in 100  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und auf einer Antibiotikum-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die über  $\bar{u}$ N-Inkubation erfolgt in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die Wahl des Antibiotikums ist abhängig von dem verwendeten Plasmid. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide vermitteln Ampicillinresistenz. Um bei den *E. coli* Expressionsstämmen bestimmte Plasmide zu erhalten, welche für die Expression von Lysozym oder für seltene t-RNA-Moleküle kodieren, wird zusätzlich Chloramphenicol benötigt. Bei dem *E. coli* Stamm Origami(DE3), der die Oxidation von Cysteinresten im Zytoplasma begünstigt, sind Kanamycin und Tetracyclin nötig.

### 3.1.11 Plasmid Mini- und Midi-Präparation

Einzelne Klone auf einer  $\bar{u}$ N bebrüteten LB-Agar-Platte werden in 5 ml LB-Medium (3.1.9) mit entsprechendem Antibiotikum überimpft. Es folgt eine weitere  $\bar{u}$ N-Inkubation. 5 ml  $\bar{u}$ N-Kultur sind ausreichend für eine Plasmid Mini-Präparation, 100 ml werden für eine Midi-Präparation benötigt. Zur Präparation werden die Bakterien mit 5000 g bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert. Die Mini- und Midi-Präparations-Kits sind von Qiagen erhältlich. Die genaue Durchführung kann den entsprechenden Handbüchern entnommen werden.

### 3.1.12 Restriktionsanalyse von DNA

Um die angezogenen Klone daraufhin zu überprüfen, ob sie das gewünschte Insert tragen, wird ihre DNA mit Restriktionsenzymen behandelt. Aus der Restriktion sollte eine bestimmte Anzahl von DNA-Fragmenten mit vorhersagbarer Fragmentgröße resultieren. Am effizientesten ließen sich im Rahmen dieser Arbeit die ausgesuchten Klone durch Doppelverdau analysieren (3.1.6). Es wurden meist die Enzyme eingesetzt, mit denen auch die Klonierung durchgeführt wurde. Aus diesem Verdau resultiert ein Fragment, das dem linearisierten Plasmid entspricht und ein zweites, welches das klonierte Insert ist.

Alle Konstrukte, die in das Plasmid pRSET-B kloniert wurden, lassen sich mit einem *NdeI/EcoRI* Doppelverdau untersuchen. Das Konstrukt pKMProtG-US6 wurde mit *NcoI/BamHI* überprüft. Bei den pMal-Vektoren erfolgte dies über das Enzym *HindIII*, welches einmal im Insert und im Vektor schneidet. Bei jeder der genannten Restriktionen entstehen nur bei vorhandenem Insert zwei Fragmente.

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Mikrosomenpräparation

#### **Cavitationspuffer:**

50 mM Tris/HCl pH 7,4  
250 mM Saccharose  
25 mM Kaliumacetat  
5 mM Magnesiumacetat  
0,5 mM Calciumacetat

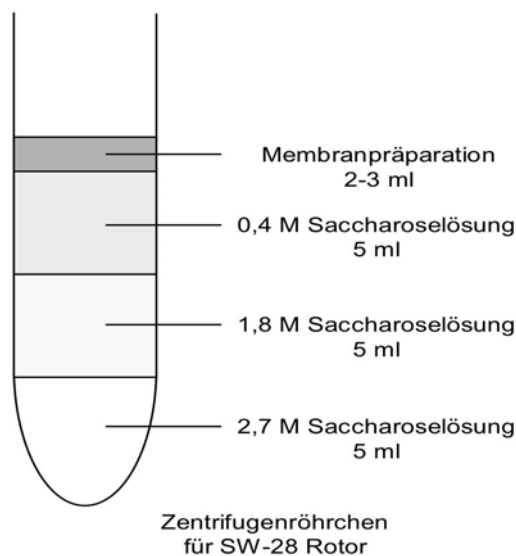
#### **Protease-Inhibitor-Mix:**

15,6 mg/ml Benzamidin  
5 mg/ml AEBSF  
1 mg/ml Leupeptin  
0,5 mg/ml Pepstatin A  
0,1 mg/ml Aprotinin  
in Ethanol

#### **Saccharose-Dichtegradient:**

0,4 M; 1,8 M oder 2,7 M Saccharose  
20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Kaliumacetat  
5 mM Magnesiumacetat

Zellmaterial von  $2 \times 10^9$  *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen werden in TBS (3.2.2) resuspendiert und bei 700 g und 4°C für 8 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden in 5 ml Cavitationspuffer aufgenommen und in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator überführt. Die Homogenisierung der Zellen erfolgt durch 30- bis 40-fache Auf- und Abbewegung des Stempels auf Eis. Nach der Homogenisierung wird die Probe bei 4°C für 4 Minuten bei 100 g und 8 Minuten mit 1000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Membranen werden auf einen Saccharosegradienten überführt. Dieser besteht aus drei übereinander geschichteten Lösungen unterschiedlicher Saccharosekonzentration (0,4 M; 1,8 M und 2,7 M) mit einem Volumen von je 5 ml. Die Lösung mit der höchsten Zuckerkonzentration befindet sich am Boden des Röhrchens. Jeweils 2-3 ml der Membranpräparation werden vorsichtig auf die 0,4 M Saccharoselösung pipettiert.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Saccharosegradienten**

In ein Zentrifugenröhrchen werden je 5 ml der drei Zuckerlösungen mit einer Pipette vorsichtig aufeinander geschichtet. Zum Schluss werden bis zu 3 ml der Membranpräparation auf die 0,4 M Saccharoselösung gegeben.

Es folgt eine  $\mu$ N-Zentrifugation bei 4°C im SW-28 Rotor bei 24000 rpm. Die Mikrosomen befinden sich daraufhin in der Grenzschicht zwischen der 0,4 M und 1,8 M Saccharoselösung. Zelltrümmer, Kerne und Organellen befinden sich in Form eines Pellets am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die Mikrosomen werden vorsichtig abpipettiert, mit dem gleichen Volumen TBS/5 mM  $MgCl_2$  versetzt und bei 4°C für 20 Minuten bei 35000 rpm im Ti-80 Rotor zentrifugiert. Die im Pellet befindlichen Mikrosomen werden in TBS/5 mM  $MgCl_2$  resuspendiert und zu je 200  $\mu$ l aliquotiert. Zur Lagerung werden die Mikrosomen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wird vor dem Einfrieren mit Hilfe des *Micro BCA Protein Assays* bestimmt. Die Proteinkonzentration der Mikrosomenpräparate beträgt durchschnittlich 3-5 mg/ml.

### 3.2.2 Reinigung von US6 aus *inclusion bodies*

**TBS:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid

**Solubilisationspuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid  
10 M Harnstoff

**Waschpuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid  
10 M Harnstoff  
10, 20, 50 oder 100 mM Imidazol

**Elutionspuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid  
10 M Harnstoff  
200 mM Imidazol

Bei Chromatographie unter nativen Bedingungen befindet sich kein Harnstoff in den Lösungen.

Nach der Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS (siehe 3.1.10) werden einzelne Klone von der Agarplatte in 50 ml Ampicillin- und Chloramphenicolhaltiges LB-Medium überführt. Das Medium wird üN bei 37°C bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Diese Vorkultur dient zum Animpfen der Hauptkultur am nächsten Morgen. Die Hauptkultur wird im Verhältnis 1:20 mit der Vorkultur angeimpft und das Wachstum der Bakterien bei 37°C im Laufe der nächsten Stunden photometrisch überwacht. Die Bakteriensuspension sollte bei der Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte von etwa 0,6-0,8 aufweisen. Die Expression von US6 wird daraufhin durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,3 mM induziert. Nach dreistündiger Induktion werden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 g für 20 Minuten bei 4°C geerntet. Das Zellpellet wird mit TBS gewaschen und bei -20°C eingefroren.

Zur Proteinreinigung wird das eingefrorene Zellmaterial bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und mit 35 ml eiskaltem TBS Puffer versetzt. Die Zellyse erfolgt durch Ultraschall (10 Schallimpulse mit einer Dauer von 10 Sekunden unterbrochen durch Ruhepausen von jeweils 5 Sekunden) auf Eis. Die unlöslichen *inclusion bodies* werden daraufhin durch eine Zentrifugation bei 5000 g für 20 Minuten bei 4°C sedimentiert. Es folgen zwei Waschschrte in TBS. Das vorgereinigte Protein wird in 50 ml Solubilisationspuffer bei 50°C für ein bis zwei Stunden unter Rühren

gelöst. Nicht in Lösung gegangene Partikel werden durch Zentrifugation bei 5000 g für 20 Minuten bei 25°C entfernt.

Als letzter Schritt wird eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt. Eine Ni<sup>2+</sup>-NTA- oder Ni<sup>2+</sup>-IDA-Sepharosesäule mit einem Säulenvolumen von 5 ml wird mit 25 ml Solubilisationspuffer äquilibriert. Anschließend wird die Probe über die Säule gegeben. Es folgt je ein Waschschrift mit 25 ml Solubilisationspuffer und mit 25 ml Waschpuffer, welcher 20 mM Imidazol enthält. Das Protein wird mit 30 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Proteinkonzentration im Eluat kann mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt werden. Eine schnelle Methode ist die Messung der optischen Dichte bei 280 nm. Die Konzentration lässt sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (für US6(20-146) ist  $\epsilon_{280} = 13.020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) errechnen. Alternativ lässt sich die Proteinkonzentration mit dem *Micro BCA Protein Assay* bestimmen.

### 3.2.3 Rückfaltung von US6 aus *inclusion bodies*

#### A) Rückfaltung mittels des *FoldIt Protein Refolding Kits*

Zu den ersten Versuchen US6(20-146) zu renaturieren, zählt der *FoldIt Protein Refolding Kit* von Hampton Research. In einer Reihe von Lösungen werden verschiedene Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, chaotrope Agenzien, divalente Kationen, Detergenzien und Redoxäquivalente) abgedeckt. Aus *inclusion bodies* gereinigtes US6 (3.2.2) mit einer Konzentration von 1 mg/ml wird für 5 Minuten bei 95°C in Anwesenheit von 50 mM DTT reduziert und zu den 16 *FoldIt*-Lösungen pipettiert. Die Ansätze wurden gemäß des Pipettierschemas zusammengestellt (siehe Tabelle 4A und 4B auf den Seiten 49 und 50). Das Endvolumen betrug 1 ml. Nach 16 Stunden wurde 1/25 des Ansatzes für eine Analyse herangezogen. Es folgte eine Inkubation des verbliebenden Materials für weitere 32 Stunden bei 4°C. Die gesamte Inkubationszeit belief sich damit auf 48 Stunden. Daraufhin wurden alle Ansätze in gesonderten Dialyseschläuchen gegen 5 l Rückfaltungspuffer 1 (siehe Teil C) üN dialysiert und Präzipitate mittels Zentrifugation bei 120000 g für 1 Stunde bei 4°C entfernt. Das in Lösung befindliche Protein wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 33% (w/v) Trichloressigsäure gefällt und mittels oxidativer SDS-PAGE und Silberfärbung (3.2.7 und 3.2.8) analysiert.



## A

Nr. des Puffers	pH-Wert/Puffer	Salz	PEG 3350	Guanidin-HCl	divalente Kationen	polare und unpolare Add.
1	55 mM Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%		1,1 mM EDTA	
2	55 mM MES pH 6,5	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl		550 mM	2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	
3	55 mM MES pH 6,5	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl	0,055%	550 mM	1,1 mM EDTA	440 mM Sucrose 550 mM Arginin
4	55 mM Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl			2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	440 mM Sucrose 550 mM Arginin
5	55 mM MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl			2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	440 mM Sucrose
6	55 mM Tris pH 8,2	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl	0,055%	550 mM	1,1 mM EDTA	440 mM Sucrose
7	55 mM Tris pH 8,2	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl		550 mM	2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	550 mM Arginin
8	55 mM MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%		1,1 mM EDTA	550 mM Arginin
9	55 mM MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	550 mM	2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	440 mM Sucrose
10	55 mM Tris pH 8,2	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl			1,1 mM EDTA	440 mM Sucrose
11	55 mM Tris pH 8,2	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl	0,055%		2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	550 mM Arginin
12	55 mM MES pH 6,5	264 mM NaCl 11 mM KCl		550 mM	1,1 mM EDTA	550 mM Arginin
13	55 mM Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl		550 mM	1,1 mM EDTA	
14	55 mM MES pH 6,5	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl	0,055%		2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	
15	55 mM MES pH 6,5	10,5 mM NaCl 0,4 mM KCl			1,1 mM EDTA	440 mM Sucrose 550 mM Arginin
16	55 mM Tris pH 8,2	264 mM NaCl 11 mM KCl	0,055%	550 mM	2,2 mM MgCl <sub>2</sub> 2,2 mM CaCl <sub>2</sub>	440 mM Sucrose 550 mM Arginin

**B**

Nr. des Puffers	Volumen Puffer	0,1 M DTT	0,1 M GSH	0,1 M GSSG	Proteinlösung	[Protein]
1	950 µl	10 µl			50 µl	0,1 mg/ml
2	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	0,1 mg/ml
3	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	0,1 mg/ml
4	950 µl	10 µl			50 µl	0,1 mg/ml
5	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	1mg/ml
6	950 µl	10 µl			50 µl	1mg/ml
7	950 µl	10 µl			50 µl	1mg/ml
8	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	1mg/ml
9	950 µl	10 µl			50 µl	0,1 mg/ml
10	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	0,1 mg/ml
11	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	0,1 mg/ml
12	950 µl	10 µl			50 µl	0,1 mg/ml
13	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	1mg/ml
14	950 µl	10 µl			50 µl	1mg/ml
15	950 µl	10 µl			50 µl	1mg/ml
16	950 µl		10 µl	10 µl	50 µl	1mg/ml

**Tabelle 4A und 4B: Die Grundlösungen 1-16 des *FoldIt Protein Refolding Kits***

Die Lösungen decken unterschiedliche Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, chaotrope, polare und unpolare Additiva, divalente Kationen) ab, die ein Protein zur nativen Faltung benötigen könnte. Anwesenheit von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) soll die Bildung von Disulfidbrücken begünstigen, falls diese für die Struktur des betreffenden Proteins essentiell sind. In Anwesenheit von DTT soll die Bildung von Disulfidbrücken verhindert werden.

**B) redox shuffling****Inkubationspuffer:**

20 mM Natriumphosphat pH 8,0

120 mM Natriumchlorid

2 mM EDTA

1 M Arginin

Das Protein wird nach der Reinigung mit 100 mM DTT für 5 Minuten bei 95°C reduziert. Die Proteinkonzentration betrug 2,8 mg/ml. Nach Reduktion werden je 80 µg des Proteins auf mehrere Ansätze mit jeweils verschiedenen Konzentrationen an GSH und GSSG in Inkubationspuffer verteilt. Die Konzentration an GSH variiert zwischen 0,2-10 mM und die von GSSG zwischen 0,2-1 mM. Auf diese Weise ist im Gegensatz zum zuvor genutzten *screen* gewährleistet, daß jeder Ansatz über ein unterschiedliches Redoxpotential verfügt.

Es folgt eine Inkubation für 48 Stunden bei 4°C und eine anschließende üN-Dialyse gegen Rückfaltungspuffer 1 (siehe Teil C). Präzipitate wurden mittels Zentrifugation bei 120000 g für eine Stunde bei 4°C entfernt. Ein Fünftel des Überstandes wird für eine Stunde mit Jodacetamid in einer Endkonzentration von 300 mM bei 4°C inkubiert und danach mit dem gleichen Volumen 33% (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Es folgt eine Zentrifugation für eine Stunde bei 4°C und 23000 g. Die Proben wurden mittels oxidativer SDS-PAGE (siehe 3.2.7) analysiert. Zur Detektion des Proteins wird eine Silberfärbung des Gels durchgeführt (siehe 3.2.8).

**C) Rückfaltung unter nicht reduzierenden Bedingungen****Rückfaltungspuffer 1:**

20 mM Tris/ HCl pH 7,5

150 mM Natriumchlorid

**Rückfaltungspuffer 2:**

20 mM Natriumphosphat pH 6,5

Für die Proteinrückfaltung werden 5 l Rückfaltungspuffer angesetzt (wahlweise Puffer 1 oder 2). Der Dialyseschlauch wird für 30 Minuten bei RT im betreffenden Rückfaltungspuffer inkubiert. Das Eluat aus der Metallchelate-Affinitätschromatographie (3.2.2) wird in den Schlauch gefüllt. Es ist darauf zu achten, dass der Schlauch zu Anfang der Dialyse nicht zu sehr gefüllt ist. Die Dialyse erfolgt üN

unter Rühren bei 4°C. Präzipitiertes Protein wird am nächsten Tag durch Ultrazentrifugation bei 120000 g für eine Stunde bei 4°C entfernt. Mit Zentrifugationskonzentratoren wird die Konzentration des Proteins bei 3000 g auf eine Endkonzentration von 1-2 mg/ml gebracht.

### 3.2.4 Reinigung von MBP-US6 aus dem Periplasma

**Periplasma-Präparationspuffer:**

100 mM Tris/HCl pH 7,5  
500 mM Saccharose  
1 mM EDTA

**Dialysepuffer:**

50 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid

Die Proteinexpression wird bis auf die Wachstumstemperatur von 25°C wie unter 3.2.2 durchgeführt. Das geerntete Zellmaterial aus einer 1 l Kultur wird in 10 ml Periplasma-Präparationspuffer auf Eis resuspendiert. Lysozym wird in einer Endkonzentration von 200 µg/ml zugesetzt und dieser Ansatz für 20 Minuten bei 4°C unter leichtem Rühren inkubiert. Die Sphäroblasten werden mittels Zentrifugation für 15 Minuten bei 5000 g sedimentiert. Der Überstand wird für 30 Minuten bei 120000 g erneut zentrifugiert und  $\text{üN}$  bei 4°C gegen 5 Liter Dialysepuffer dialysiert.

Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgt über zwei Chromatographieschritte. Zunächst wird eine Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt (3.2.2). Eine  $\text{Ni}^{2+}$ IDA-Sepharosesäule mit einem Säulenvolumen von 5 ml ist mit 25 ml TBS zu äquilibrieren. Danach folgt der Auftrag des dialysierten Periplasmas. Bei den nachfolgenden Waschschrritten wird die Imidazolkonzentration im Waschpuffer stufenweise erhöht und Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml aufgefangen. Als Stufengradient werden je 25 ml Waschpuffer mit Imidazol in einer Endkonzentration von jeweils 0 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM bzw. 200 mM gewählt (3.2.2). Für die zweite Chromatographie werden die letzten elf Fraktionen aus der Metallchelate-Affinitätschromatographie vereinigt. Diese Fraktionen werden auf 5 ml mit TBS äquilibriertem Amylosematerial aufgetragen. Gewaschen wird anschließend mit 25 ml TBS. Die Elution erfolgt mit 30 ml des gleichen Puffers, welcher zusätzlich 20 mM Maltose enthält. Auch bei dieser Chromatographie werden Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml aufgefangen. Das Eluat wird anschließend mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren eingeeengt.

### 3.2.5 Spaltung von MBP-US6

Ein ml proteinhaltiger Lösung ( $c \approx 1$  mg/ml) wird mit 20 Einheiten Faktor Xa und Calciumchlorid in einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Es folgt eine 1h-Inkubation bei 4°C. Am nächsten Morgen werden eventuell vorhandene Präzipitate durch Zentrifugation bei 120000 g für 1 Stunde bei 4°C entfernt.

### 3.2.6 Affinitätsreinigung von Antikörpern aus Serum

**Bindungspuffer:**

200 mM NaHCO<sub>3</sub>/NaOH pH 8,3  
500 mM Natriumchlorid

**Sättigungspuffer:**

500 mM Ethanolamin/HCl pH 8,3  
500 mM Natriumchlorid

**Stop-Puffer:**

100 mM Natriumacetat pH 4,0  
500 mM Natriumchlorid

**Lagerungspuffer:**

50 mM Natriumphosphat pH 7,0  
0,1% (w/v) Natriumazid

**Elutionspuffer:**

50 mM Natriumcitrat pH 3,0

Der gegen die N-terminale Aminosäuresequenz 20-39 von US6 gerichtete Kaninchenantikörper kann durch Affinitätschromatographie mit NHS-aktivierter Sepharose aus Serum gereinigt werden. Dabei sind zwei voneinander getrennte Prozeduren zu erwähnen. Dies ist die kovalente Kopplung des Epitops an das Säulenmaterial und die anschließende Reinigung des Antikörpers über sein kovalent gekoppeltes Antigen.

#### A) Kopplung des Antigens an das Säulenmaterial

Eine 1 ml HiTrap<sup>TM</sup> NHS-aktivierte Sepharosesäule wird zuerst mit 5 ml eiskalter 1 mM HCl-Lösung gewaschen. Zehn Milligramm des Peptids werden in 1 ml Bindungspuffer gelöst und auf die Säule gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 4°C für eine halbe Stunde. Anschließend wird mit 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Nun folgt die Absättigung nicht besetzter Bindungsstellen auf dem Säulenmaterial. Es werden in dreimaliger Abfolge je 5 ml Sättigungs- und Stop-Puffer über die

Säule gegeben und zwischen jedem Waschschrift eine Inkubation von 15 Minuten bei 4°C eingehalten. Für die nachfolgende Affinitätsreinigung ist die Säule mit 5 ml TBS (3.2.2) zu waschen. Für eine Langzeitlagerung der Säule wird jedoch der Lagerungspuffer verwendet.

#### B) Reinigung des anti-US6-Antikörpers aus Serum

Nach der Äquilibrierung der Säule mit TBS wird aufeinanderfolgend fünf Mal je 1 ml Serum auf diese aufgetragen und für eine halbe Stunde bei RT inkubiert. Es folgt ein Waschschrift mit 5 ml TBS Puffer. Die gebundenen Antikörper werden mit Elutionspuffer in 5 Fraktion von je 1 ml eluiert. Die Elution vom Säulenmaterial erfolgt durch die Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 3. Jede Fraktion wird mit 125 µl 1 M Natriumcarbonat neutralisiert und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt. Die Lagerung des Antikörpers erfolgt bei 4°C.

### 3.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**Probenpuffer (5-fach):**

250 mM Tris/HCl pH 8,0  
 21,25% (w/v) Glycerol  
 7,5% (w/v) SDS  
 2,5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 0,025% (w/v) Bromphenolblau

**Laufpuffer (10-fach):**

250 mM Tris  
 1,9 M Glycin  
 1% (w/v) SDS  
 pH 8,3

**Trenngelpuffer:**

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

**Sammelgelpuffer:**

0,5 M Tris/HCl pH 6,8  
 0,4% (w/v) SDS

**Coomassie Färbelösung:**

0,5% (w/v) Coomassie R250  
 Brilliant Blue  
 in Entfärbelösung

**Coomassie Entfärbelösung:**

40% (v/v) Methanol  
 10% (v/v) Essigsäure

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der analytischen Trennung von Proteinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat lagert sich an die Proteinmoleküle der zu untersuchenden Probe an. Dabei werden die Proteine denaturiert und deren Eigenladung vollständig überdeckt. Die nun negativ geladenen Proteine wandern in dem angelegten elektrischen Feld durch die Matrix des Polyacrylamidgeles in Richtung der Anode. Die elektrische Mobilität der einzelnen Proteine ist hierbei von deren Größe abhängig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Die Gele werden in einer nach unten und zu den Seiten verschlossenen Kammer aus Plexiglas gegossen. Vor dem Verschließen der Kammer sind sorgfältig gereinigte Glasplatten (10,5 x 10 cm) und die dazugehörigen Zwischenstücke aus Teflon aufeinander zu schichten. Nun folgt die Zusammenstellung der Lösungen für Sammel- und Trenngel (siehe nachfolgende Tabelle). Die Polymerisationsreaktion wird durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet.

Das Trenngel wird luftblasenfrei bis 2,5 cm unter den Rand der Glasplatten gegossen und mit 0,5 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. eine Stunde bei RT) wird das Isopropanol vollständig entfernt. Erst jetzt wird die Polymerisation des Sammelgels durch Zugabe von APS und TEMED gestartet. Das Trenngel ist möglichst zügig mit dieser Lösung zu überschichten. Auch hier wird nachfolgend möglichst wenig Isopropanol aufgetragen. Jetzt folgt das Einsetzen der gewünschten Teflonkämme in das noch nicht polymerisierte Sammelgel.

Die einzelnen Proben werden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer versetzt. Dieser enthält wahlweise Reduktionsäquivalente wie DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Reduktion von vorhandenen Disulfidbrücken. Anschließend folgt eine Inkubation bei 65°C für 5 Minuten und der Auftrag in die Probenaschen des Gels. Nach Auftragen der Proben wird zuerst eine Spannung von konstanten 100 V angelegt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingelaufen sind, kann die Spannung auf 160-200 V erhöht werden.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel</b>		
	5 %	10 %	12 %	15 %
30% Acrylamid/ Bisacrylamid	6,8 ml	24 ml	29 ml	36 ml
Sammelgelpuffer		18 ml	18 ml	18 ml
Trenngelpuffer	5 ml			
H <sub>2</sub> O	28 ml	30 ml	25 ml	18 ml
10% APS	320 $\mu$ l	470 $\mu$ l	470 $\mu$ l	470 $\mu$ l
TEMED	32 $\mu$ l	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l

**Tabelle 5: Pipettierschema für die Herstellung von Gelen**

Die angegebenen Mengen reichen für die Herstellung von acht Gelen (10,5 x 10 cm).



Ist die Elektrophorese abgeschlossen, wird das Gel für eine halbe Stunde im Coomassie-Färbebad gefärbt und anschließend im Entfärber bis zum gewünschten Entfärbungsgrad unter leichtem Schütteln inkubiert. Alternativ kann eine Silberfärbung zur Detektion der Proteine im Gel durchgeführt werden (3.2.8). Die Proteine können aber auch durch Western-Blot zum Zwecke einer Immundetektion auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert werden (3.2.9).

### 3.2.8 Silberfärbung

**Fixierlösung:**

30% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

**Thiosulfatpuffer:**

0,1 M Natriumacetat/Eisessig pH 6,0

30% (v/v) Ethanol

1 mg/ml Natriumthiosulfat

frisch zusetzen

**Silberlösung:**

0,1% (w/v) Silbernitrat

0,1% (v/v) Formaldehyd

frisch ansetzen

**Entwickler:**

2,5% (w/v) Natriumcarbonat

0,2% (v/v) Formaldehyd

frisch ansetzen

Das Gel wird nach der SDS-PAGE (siehe 3.2.7) für mindestens 15 Minuten in 50 ml Fixierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Es folgt eine erneute Inkubation mit 50 ml Thiosulfatpuffer für 15 Minuten. Danach wird das Gel 4-mal für je 5 Minuten mit Wasser gewaschen und für 25 Minuten in 50 ml Silberlösung inkubiert. Um die Färbung abzuschließen, wird das Gel einmal in Wasser und zweimal in Entwickler gewaschen und dann so lange in 100 ml Entwicklerlösung inkubiert, bis der gewünschte Färbegrad erreicht ist. Die Färbereaktion wird durch Zugabe von 1 ml Eisessig gestoppt und das Gel für die Dokumentation gewässert.

### 3.2.9 Western-Blot

**Transferpuffer (10-fach):**

250 mM Tris  
1,9 M Glycin

**Transferpuffer (1-fach):**

100 ml Transferpuffer (10-fach)  
200 ml Methanol  
ad 1000 ml mit *MiliQ* H<sub>2</sub>O

**PBS:**

20 mM Natriumphosphat pH 8,0  
120 mM Natriumchlorid

**Blockpuffer:**

20 mM Natriumphosphat pH 8,0  
100 mM Natriumchlorid  
7% (w/v) Magermilchpulver

**Entwicklerlösung 1:**

300 mM Tris/HCl pH 8,0  
5 mM Luminol  
1 mM Cumarinsäure

**Entwicklerlösung 2:**

300 mM Tris/HCl pH 8,0  
0,05% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Stripping Puffer:**

60 mM Tris/HCl pH 6,8  
2% (w/v) SDS  
100 mM β-Mercaptoethanol

**Ponceau S-Färbelösung:**

3% (v/v) Essigsäure  
0,5% (w/v) Ponceau S

Nach der SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Auf einer mit Blotpuffer getränkten Lage Filterpapier (0,5 mm Dicke) wird erst die Membran und danach das Gel aufgelegt. Luftblasen sind sorgfältig zu entfernen. Den Abschluß bildet eine weitere Lage in Puffer getränktem Filterpapier. Während des Transfers ist auf die Orientierung von Gel und Membran zu achten, damit die in Richtung Anode wandernden Proteine auf der Nitrocellulosemembran immobilisiert werden können. Der Transfer kann wahlweise im Tank bei konstanten 18 V üN oder in der *semi dry*-Apparatur für eine Stunde bei konstanten 100 mA pro Gel (10 x 10 cm) erfolgen.

Nach erfolgtem Elektrotransfer wird die Membran kurz mit *MiliQ* H<sub>2</sub>O gespült und für 5-10 Minuten in Ponceau S-Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Nitrocellulose kann bis zum gewünschten Entfärbegrad in destilliertem Wasser

entfärbt werden. Auf diese Weise können die auf der Membran immobilisierten Proteine dokumentiert werden.

Die Membran wird daraufhin mit PBS vollkommen entfärbt und für eine Stunde in Blockpuffer bei RT unter Schütteln inkubiert. Es folgt eine Inkubation für eine Stunde mit dem ersten Antikörper in PBS bei RT ( $\alpha$ US6 1:2000,  $\alpha$ His<sub>6</sub> 1:10000,  $\alpha$ TAP1 und  $\alpha$ TAP2 je 1:20). Die Membran wird danach 3 Mal für je zehn Minuten mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt ist die Membran mit dem Zweitantikörper ( $\alpha$ Kaninchen IgG oder  $\alpha$ Maus IgG 1:20000) analog zum Erstantikörper zu inkubieren. Nach dieser Inkubation wird die Nitrozellulose dreimalig für 10 Minuten in PBS gewaschen.

Für die Entwicklung des Blots sind die Entwicklerlösungen 1 und 2 zu gleichen Teilen zu mischen und auf die Membran zu geben. Je 5 ml von jeder Lösung sind ausreichend für die Entwicklung von bis zu drei Membranen (je 10 x 10 cm). Der Ansatz wird für ca. eine Minute leicht geschwenkt und die resultierende Chemilumineszenz mit Hilfe des Lumi-Imagers dokumentiert. Wahlweise kann die Membran auch in eine transparente Folie verpackt werden, um in einer Entwicklerkassette einen Film aufzulegen. Die Entwicklung erfolgt in einer Filmentwicklungsmaschine. Die Dauer der Belichtung hängt von der Stärke des vorhandenen Signals ab und kann sich im Rahmen von wenigen Sekunden bis hin zu einem Zeitrahmen von 10 Minuten bewegen.

### 3.2.10 Co-Rekonstitution von TAP und US6

#### **Puffer A:**

20 mM Tris/HCl pH 7,4  
145 mM Natriumchlorid  
2 mM Kaliumchlorid  
2 mM Magnesiumchlorid  
0,5 mM Mangan(II)chlorid  
20% (w/v) Glycerin

#### **Gelfiltrationspuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,4  
145 mM Natriumchlorid  
2 mM Kaliumchlorid  
2 mM Magnesiumchlorid  
0,5 mM Mangan(II)chlorid  
20% (w/v) Glycerin  
2,4 mM n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid

Aus *Raji*-Zellen präparierte Mikrosomen werden in Puffer A resuspendiert. Die Mikrosomen werden anschließend solubilisiert, indem das Detergenz n-Decyl- $\beta$ -D-Maltopyranosid (DM) bis zum Erreichen eines  $\rho$ -Faktors von 2 zugegeben wird. Der  $\rho$ -Faktor ist durch folgende Formel definiert:

$$\rho = \frac{[DM] - CMC}{[Lipid]} \quad (\text{Gleichung 1})$$

**Gleichung 1: Berechnung des  $\rho$ -Faktors.** CMC beschreibt die kritische Mizellare Konzentration, in die Formel geht ausserdem noch die DM- und Lipidkonzentration ein.

Die kritische Mizellare Konzentration (CMC) beträgt für DM 1,6 mM. Vor der Solubilisation wird die Proteinkonzentration gemessen. Es wird angenommen, daß das Protein-Lipid Verhältnis in Mikrosomen einem Wert von eins entspricht. Nach der Zugabe von DM wird der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 100000 g für eine Stunde bei 4°C.

Zur Anreicherung von solubiliertem TAP wird eine Gelfiltration mit einer Superose 6 PC3.2/30 Säule durchgeführt. Als Laufpuffer wird Gelfiltrationspuffer (Puffer A mit 2,4 mM DM) verwendet. Die TAP-haltigen Fraktionen werden vereinigt, mit rekombinantem US6 und unilamellaren Liposomen gemischt. In diesem Ansatz haben TAP bzw. US6 eine Konzentration von 1-3 nM bzw. 20  $\mu$ M. Die Liposomenzusammensetzung besteht aus 23% (w/v) Cholesterin, 10% (w/v) Phosphatidylsäure und 67% (w/v) Phosphatidylcholin in Puffer A mit einer Lipidkonzentration von 8 mg/ml.

Die Rekonstitution erfolgt mit Hilfe von BioBeads SM2. Diese werden zuvor in Puffer A mit 0,1% dialysiertem Rinderserumalbumin gewaschen. Um das Detergenz zu entfernen, werden die BioBeads zu der Mischung aus solubiliertem TAP, US6 und Liposomen gegeben. Der Ansatz ist bei 2000 g für 2 Minuten bei 4°C zu zentrifugieren. Der Überstand wird von den pelletierten BioBeads separiert und mit frischen BioBeads versetzt. Diese Prozedur wird insgesamt vier Mal wiederholt. Der Überstand enthält die gewünschten Proteoliposomen. Diese werden durch Zentrifugation bei 23000 g für 15 Minuten und 4°C sedimentiert. Die Proteoliposomen werden anschließend für die Messung von Peptidbindung, Peptidtransport und ATP-Hydrolyse von TAP verwendet.

### 3.2.11 Peptidsynthese und Markierung mit Na<sup>125</sup>I

**Iodierungspuffer:**

20 mM Natriumphosphat pH 6,8  
120 mM Natriumchlorid  
25 mM Kaliumchlorid

**Stopplösung:**

2,6 mM Natriummetabisulfit  
in Iodierungspuffer

Die Synthese des Peptids und dessen Markierung mit dem radioaktiven Iodisotop <sup>125</sup>I wurden zuvor beschrieben (Meyer et al., 1994; Uebel et al., 1995). Die verwendeten Peptide wurden an der Festphase unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenchemie synthetisiert. Das Peptid RRYQKSTEL wird in 50 µl Iodierungspuffer auf eine Endkonzentration von 1,5 nM gebracht und sowohl mit 10 µl ChloraminT als auch mit 1 µl Natriumiodidlösung (100 µCi) versetzt. Es folgt eine Inkubation für 5 Minuten bei RT. Das Peptid wird am vorhandenen Tyrosinrest iodiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl Stopplösung und 100 µl PBS (3.2.9) beendet. Zur Reinigung des iodierten Peptids wird eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. 10 mg Dowex werden zweimal mit je 1 ml PBS/0,1 mg/ml Rinderserumalbumin gewaschen und damit äquilibriert. Es folgt jeweils eine Zentrifugation bei 23000 g für 30 Sekunden. Der Iodierungsansatz wird auf das Ionenaustauschmaterial gegeben und gut vermischt. Anschließend wird für 5 Minuten bei RT inkubiert und der Ansatz nochmals zentrifugiert. Der Durchfluß enthält das iodierte Peptid und wird für die nachfolgenden Versuche genutzt.

### 3.2.12 Peptidbindungs- und -transport-Assay

Die Messung der Peptidbindung, des Peptidtransportes und der ATP-Hydrolyse von TAP erfolgen mit Hilfe des Peptids RRYQKSTEL. Zur Messung der Peptidbindung in An- und Abwesenheit von US6 werden 50 µl Proteoliposomen in 100 µl Puffer A (3.2.10) mit 100 nM bzw. 200 nM <sup>125</sup>I-markiertem Peptid RRYQKSTEL für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktion ist durch Zugabe von 350 µl eiskaltem Puffer A zu beenden. Die Liposomen werden bei 23000 g für 8 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet ist mit 600 µl Puffer A zu resuspendieren, es wird erneut zentrifugiert. Der Überstand ist restlos zu entfernen und die Menge an gebundenem Peptid im γ-Zähler zu quantifizieren.

Zur Bestimmung der Anzahl der Bindungsplätze ( $B_{\max}$ ) und der Bindungskonstante ( $K_d$ ) findet Gleichung 2 Anwendung. Die Anzahl an Bindungsplätzen gibt die Zahl der eingesetzten TAP-Moleküle wieder. Diese muss bestimmt werden, um bei allen Assays von den gleichen Grundvoraussetzungen ausgehen zu können.

$$B = \frac{B_{\max} \times [L]}{K_d + [L]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

**Gleichung 2: Bestimmung der Anzahl an Bindungsplätzen ( $B_{\max}$ ) und der Bindungskonstante ( $K_d$ ).**  $B_{\max}$  und  $K_d$  in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration  $[L]$  und des an TAP gebundenen Peptids ( $B$ ).

Zur Messung des Peptidtransports in An- und Abwesenheit von US6 werden 50  $\mu\text{l}$  Proteoliposomen in 100  $\mu\text{l}$  Puffer A mit 1  $\mu\text{M}$  markiertem Peptid für zwei Minuten bei 32°C inkubiert. Die Inkubation erfolgt in An- und Abwesenheit von 3 mM ATP. Die Konzentration von TAP im Assay beträgt 1-3 nM, die Konzentration von US6 20  $\mu\text{M}$ . Die Reaktion wird durch Inkubation für 15 Minuten auf Eis mit 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem Puffer A, welcher nicht markiertes Peptid in einer Konzentration von 9  $\mu\text{M}$  enthält, gestoppt. Es folgt eine Zentrifugation bei 23000 g für 8 Minuten bei 4°C. Das Pellet ist in 600  $\mu\text{l}$  Puffer A zu resuspendieren und erneut zu zentrifugieren. Nach Entnahme des Überstandes wird die durch den Peptidtransport resultierende Radioaktivität im  $\gamma$ -Zähler vermessen.

### 3.2.13 ATP-Hydrolyse-Assay

**Inkubationspuffer:**

1,8 mM Ouabain  
9 mM Natriumazid  
3 mM ATP/ [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (73 fM; 6,7  $\mu$ Ci)  
in Puffer A (siehe 3.2.10)

**Reagenz A:**

2,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1% (w/v) Ammoniummolybdat

**Reagenz B:**

Reagenz A mit Isobutanol,  
Cyclohexan und Aceton in einem  
Verhältnis von 0,1:5:5:1

Für die Messung der ATP-Hydrolyse von TAP werden zunächst 30  $\mu$ l Inkubationspuffer mit 1  $\mu$ M Peptid RRYQKSTEL für 2 Minuten bei 32°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20  $\mu$ l Proteoliposomensuspension gestartet und der Ansatz für 4 Minuten bei 32°C inkubiert. Die Konzentration an TAP in den Liposomen beträgt 1-3 nM. Die Inkubation wird sowohl bei Anwesenheit als auch bei Abwesenheit von 20  $\mu$ M US6 durchgeführt.

Die Reaktion wird mit 1,5 ml Reagenz A gestoppt. Es werden zusätzlich 15  $\mu$ l 20 mM Phosphorsäure und 3 ml Reagenz B hinzugefügt. Es folgt ein intensives Vermischen für 30 Sekunden und eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Die organische Phase wird von der wässrigen mittels Zentrifugation bei 23000 g für 30 Sekunden bei 4°C separiert. Die obere organische Phase enthält das freigesetzte radioaktiv-markierte, anorganische Phosphat. Aufgrund der Komplexbildung von Molybdat mit anorganischem Phosphat ist eine deutliche Gelbfärbung erkennbar. Vorsichtig werden 1 ml dieser Phase abpipettiert und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit vermischt. Die enthaltene Radioaktivität ist im  $\beta$ -Zähler zu quantifizieren. Das erhaltene Ergebnis ist auf das Ursprungsvolumen zu beziehen (Faktor 3), wodurch man die Gesamtmenge an freigesetztem anorganischem Phosphat erhält. Die Menge an durch Spontanhydrolyse freigesetztem Phosphat wird durch die Zugabe von Inkubationspuffer statt Proteoliposomen zum Reaktionsansatz bestimmt. Um die Menge an eingesetztem radioaktiven ATP zu ermitteln, werden 10  $\mu$ l des mit ATP versetzten Inkubationspuffers direkt in Szintillatorflüssigkeit gegeben und vermessen.

### 3.2.14 Nukleotidbindungsassay

**Solubilisationspuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid  
5 mM Magnesiumchlorid  
0,5 mM Mangan(II)chlorid  
20% (w/v) Glycerin  
1% (w/v) Digitonin

**Waschpuffer:**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
150 mM Natriumchlorid  
5 mM Magnesiumchlorid  
0,5 mM Mangan(II)chlorid  
20% (w/v) Glycerin  
0,1% (w/v) Digitonin

**Elutionspuffer:**

7 mM ATP  
in Waschpuffer

Für jeden Ansatz werden 100  $\mu$ l Mikrosomensuspension (3.2.1) in 0,5 ml Digitonin-freiem Waschpuffer aufgetaut und gewaschen. Es folgt eine Zentrifugation für 8 Minuten bei 23000 g und 4°C. Das Pellet ist in 100  $\mu$ l Solubilisationpuffer zu resuspendieren und für 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei 4°C zu inkubieren. Anschließend wird für eine Stunde bei 120000 g und 4°C zentrifugiert. Solubilisiertes TAP befindet sich nun im Überstand und kann für nachfolgende Nukleotidbindungsstudien verwendet werden. Für einen Inhibitionsassay werden mehrere Ansätze mit ansteigender Konzentration an US6 angesetzt (siehe Tabelle 5). Jeder Ansatz wird für 45 Minuten bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In dieser Zeit sind 50 mg ATP- oder ADP-Agarose in 1 ml Waschpuffer zu quellen und dreimalig zu waschen. Bei jedem Waschschrift wird die Agarose bei 30 g für 30 Sekunden bei 4°C zu zentrifugiert. Nach dem Waschen wird die Agarose mit Waschpuffer auf ein Endvolumen von 1 ml gebracht und nach Ablauf der Inkubationszeit je 100  $\mu$ l zu jedem Ansatz pipettiert. Es folgt eine weitere Inkubation von 45 Minuten unter den gleichen Bedingungen. Die Agarose wird anschließend dreimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 50  $\mu$ l Elutionspuffer. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wird bei 20000 g für 10 Minuten zentrifugiert und 40  $\mu$ l des Eluats mit SDS-Probenpuffer versetzt. Zur Auswertung des Versuchs werden jeweils 20  $\mu$ l des Eluats für eine SDS-PAGE (3.2.7) eingesetzt und anschließend ein Western-Blot mit einer Detektion von TAP durchgeführt (3.2.9).



	0 $\mu$ M US6	1 $\mu$ M US6	5 $\mu$ M US6	10 $\mu$ M US6	20 $\mu$ M US6
solubilisierete Mikrosomen	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
US6-Lösung (1 mg/ml)		5,3 $\mu$ l	26,6 $\mu$ l	53,2 $\mu$ l	106,4 $\mu$ l
Rückf.-puffer (aus 3.2.3)	106,4 $\mu$ l	101,1 $\mu$ l	79,8 $\mu$ l	53,2 $\mu$ l	
Waschpuffer	243,6 $\mu$ l	243,6 $\mu$ l	243,6 $\mu$ l	243,6 $\mu$ l	243,6 $\mu$ l
	Bei Verwendung von Rückfaltungspuffer 2 ist zusätzlich der pH mit 10-fach TBS/5 mM MgCl <sub>2</sub> zu neutralisieren.				

**Tabelle 6: Pipettierschema für die Durchführung eines Nukleotidbindungsassays**

Ein Inhibitionsassay mit ansteigenden Konzentrationen an US6 kann nach beispielhaftem Schema durchgeführt werden.

### 3.2.15 Degradation von US6 durch Proteasen

#### Restriktionspuffer K:

20 mM Tris/HCl pH 7,5

120 mM Kaliumchlorid

1 mM EDTA

100  $\mu$ g/ml Proteinase K

wahlweise 1% (v/v) Igepal (NP40)

Nach der Rückfaltung (3.2.3) wird US6 in Anwesenheit von Endo- und Exoproteasen bis zu 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Für die Degradation werden jeweils 0,25 mg US6(20-146) in PBS mit 0,2 U Exopeptidase oder 3  $\mu$ g Endoprotease versetzt. Das Endvolumen jedes Ansatzes beträgt 300  $\mu$ l. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten werden Aliquots von 10-20  $\mu$ l entnommen und die Degradation durch Zugabe von Protease-Inhibitor-Mix und SDS-haltigem Probenpuffer gestoppt. Die Proben werden mittels SDS-PAGE, Western-Blot und Massenspektrometrie (3.2.7, 3.2.9 und 3.2.18) untersucht.

Liposomen mit rekonstituiertem TAP und US6 werden in Restriktionspuffer K resuspendiert und Proteinase K in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wird die Restriktion durch Zugabe von 3 mM PMSF gestoppt. Anschließend wird für 10 Minuten bei 23000 g und 4°C zentrifugiert und das resultierende Pellet mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (3.2.7 und 3.2.9).

### **3.2.16 Gelfiltration**

#### **Gelfiltrationspuffer:**

20 mM Natriumphosphat pH 7.5

120 mM Kaliumchlorid

1 mM EDTA

Die analytische Gelfiltration wird bei 4°C mit einer Superdex G75 Gelfiltrationssäule in Verbindung mit einer Smart HPLC Apparatur von Amersham Pharmacia durchgeführt. Die Säule wird vor dem Lauf mit 5 ml Gelfiltrationspuffer äquilibriert und anschließend bis zu 500 µg US6(20-146) aufgetragen. Der Säulenlauf wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 40 µl pro Minute in Gelfiltrationspuffer durchgeführt, das Volumen der gesammelten Fraktionen beträgt 60 µl. Getrennt wird hierbei aufgrund unterschiedlicher Molekülgröße. Kleine Moleküle verbleiben eine längere Zeit in der Gelmatrix als Proteine mit höherem Molekulargewicht. Hochmolekulare Aggregate wandern gar nicht in die Matrix ein und erscheinen im sogenannten Ausschlussvolumen der Säule. Der optimale Separationsbereich der eingesetzten Säule liegt bei einem Molekulargewicht von 3-70 kDa. Aggregate bzw. Proteinkomplexe mit einer molekularen Masse größer als 100 kDa laufen bei der eingesetzten Säule im Ausschlussvolumen. Kalibriert wird die Säule mit Thyroglobulin (669 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Lysozym (14,3 kDa).

### 3.2.17 *Reversed phase* Chromatographie

**Puffer 1:**

0,1% (w/v) Trifluoressigsäure

10% (v/v) Acetonitril

**Puffer 2:**

0,1% (w/v) Trifluoressigsäure

50 % (v/v) Acetonitril

US6 wird nach der Rückfaltung mittels *reversed phase* Chromatographie auf dessen Reinheit überprüft. Prinzip dieser Trennmethode ist die hydrophobe Wechselwirkung des Proteins mit dem Säulenmaterial in polarer, wässriger Lösung. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um ein Kieselgel, welches mit langkettigen Kohlenwasserstoffen verestert ist. Der hydrophobe Charakter der stationären Phase steigt mit der Länge der Kohlenwasserstoffketten. Für die Auftrennung von US6 wurde Säulenmaterial verwendet, welches Octylreste (C8) an dessen Oberfläche aufweist.

Für eine Trennung werden bis zu 500 µg US6(20-146) auf eine µRCP C8 SC2. 1/10 Säule gegeben. Die Chromatographie wird bei 4°C mit einer Smart HPLC von Amersham Pharmacia durchgeführt. Nach dem Auftrag des Proteins wird mit den Puffern 1 und 2 ein linearer Gradient von 10-50% (v/v) Acetonitril angelegt und das Eluat in Fraktionen aufgefangen. Die aufgefangenen Fraktionen haben ein Volumen von 60 µl. Während des Säulenlaufs beträgt die Fließgeschwindigkeit 40 µl/ml.

### 3.2.18 Massenspektrometrie (MALDI-TOF)

**MALDI-Puffer:**

67% (v/v) Acetonitril

0,1% (w/v) Trichloressigsäure

**Matrix-Puffer:**

67% (v/v) Acetonitril

0,1% (w/v) Trichloressigsäure

100 mM Sinapinsäure

Prinzip der Messmethode ist die Ionisierung der in einer Matrix befindlichen Probe mit einem Laserstrahl. Das geladene Molekül wird daraufhin in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Zeit, die das betreffende Molekül benötigt um die Wegstrecke zum Detektor zurück zu legen, gibt Auskunft über dessen Molekulargewicht oder Ladung. Prinzipiell gilt, dass je kleiner oder je stärker ein Molekül geladen ist, desto größer ist dessen Geschwindigkeit. Weist ein Molekül

die doppelte Ladung auf, bewegt es sich auch doppelt so schnell im Feld und erscheint im Spektrogramm bei dem halben Molekulargewicht. So ist es möglich, daß neben der wirklichen Masse eines Proteins z.B. auch Signale auftreten, die auf die halbe der wirklichen Masse hindeuten.

Für die massenspektrometrische Messungen wird rückgefaltetes US6 üN gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert und eventuell vorhandene Aggregate mittels Zentrifugation bei 120000 g für 1 Stunde bei 4°C entfernt. Die massenspektrometrisch zu untersuchende Probe sollte möglichst frei von Puffer-substanzen, Salz oder Detergenz sein. Das wässrige Lösungsmittel wird unter Vakuum evaporisiert und der Rückstand in MALDI-Puffer aufgenommen. Die Lösung sollte eine Proteinkonzentration von 1-10 µM aufweisen. 5 µl Matrix-Puffer werden mit dem gleichen Volumen an Proteinpräparat auf einen Träger gebracht und vereinigt. Das molare Verhältnis zwischen Matrix und Probe sollte  $10^4$ - $10^5$  betragen. Nach Verdampfen des Lösemittels werden die Proben in einem *Voyager De Pro* Massenspektrometer analysiert und mit der *Grams software* ausgewertet.

### 3.2.19 CD-Spektroskopie

#### CD-Puffer:

5 mM Natriumphosphat pH 7,4

150 mM Natriumfluorid

Prinzip dieser Methode ist die Wechselwirkung von zirkular polarisiertem Licht mit der biologischen Probe. Rückgefaltetes US6 wird üN gegen CD-Puffer dialysiert und auf eine Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml eingestellt. Die Spektren werden in einer Quarzküvette mit 1 mm Weglänge bei einer Temperatur von 15°C aufgenommen. Die Aufnahmegeschwindigkeit beträgt 60 nm/sec, die Zeitkonstante 0,5 Sekunden und die Bandbreite 2 nm. Fünf Spektren werden gemittelt, wobei diese eine Auflösung von 0,5 nm haben. Die Abgleichspektren gegen den CD-Puffer werden vom Proteinspektrum subtrahiert und der jeweilige Sekundärstrukturanteil mit der *CD Spectra Deconvolution Software* Version 2.1 analysiert.

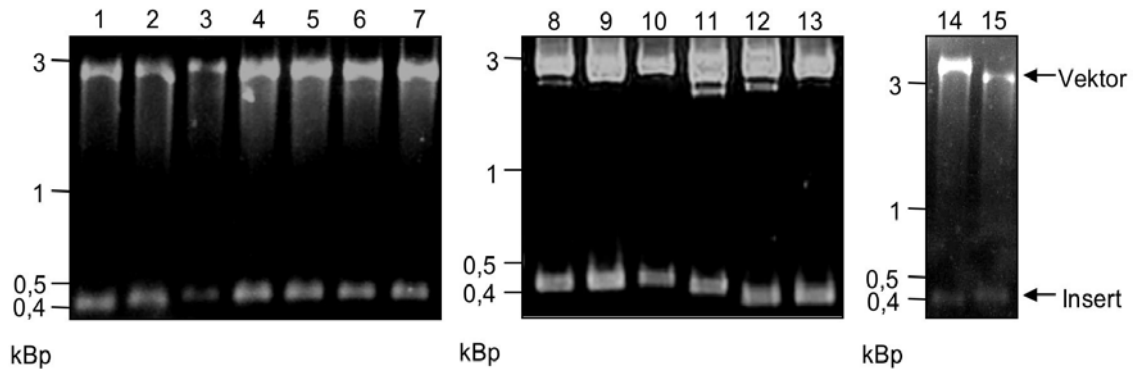
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der klonierten US6-Konstrukte

Um US6(20-146) heterolog in *E. coli* exprimieren zu können, wurde der für diese Domäne kodierende Genabschnitt mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid pRSET-B kloniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem sowohl Deletions- als auch Punktmutanten in den Expressionsvektor pRSET-B kloniert. Bei den Deletionen handelt es sich um die Konstrukte US6(20-144), US6(20-125), US6(25-144), US6(35-144) und US6(40-144). Die Punktmutationen C127S, C129S, C127/129S, D130A, W134A, R138A und D130/R138A wurden in das Konstrukt US6(20-146) eingeführt. Weiterhin wurden Fusionen konstruiert, in denen das Maltosebindeprotein aus *E. coli* bzw. die N-terminale Domäne von Protein G mit US6(20-146) vereinigt wurden.

Nach Verdau der pRSET-US6-Konstrukte entstehen zwei Fragmente. Der Vektor hat eine Größe von ca. 2,8 kBp und ist in einem 2% (w/v) Agarosegel bei annähernd 3 kBp zu finden. Die Größen der einzelnen Konstrukte betragen je nach N- und C-terminaler Verkürzung zwischen 417 Basenpaaren für US6(20-146) und 354 Basenpaaren für US6(20-125). Die Größen der Verkürzungen US6(20-144), US6(25-144), US6(35-144) und US6(40-144) betragen dementsprechend 411, 396, 366 und 351 Bp. Die einzelnen Punktmutanten weisen die gleiche Anzahl an Basenpaaren wie das Wildtypkonstrukt US6(20-146) auf.

Ligationsprodukte des Vektors pMal-p2X mit US6(20-146) wurden nicht analog zur Klonierungsstrategie mit den Restriktionsenzymen *XmnI* und *EcoRI* verdaut, da durch die Ligation die Schnittstelle für *XmnI* zerstört wird. Statt dessen findet eine Restriktion mit *HindIII* statt. Auch hier entstehen durch den Verdau zwei Fragmente, da sich eine Schnittstelle innerhalb des Inserts befindet und die andere innerhalb des Expressionsvektors. Die durch die Restriktion freigesetzten Fragmente haben eine Größe von 6,7 kBp und 370 Bp. Die Restriktion des Vektors pKMProtG-US6(20-146) mit *NcoI* und *BamHI* setzt wiederum zwei Fragmente frei. Die Fragmente haben entsprechend Vektor und Insert eine Größe von 5,2 kBp und 417 Bp. Die getesteten Plasmide wurden nach der Restriktion sequenziert und die positiven Klone für die Proteinexpression eingesetzt.



**Abbildung 6: Restriktionsanalyse der klonierten Konstrukte**

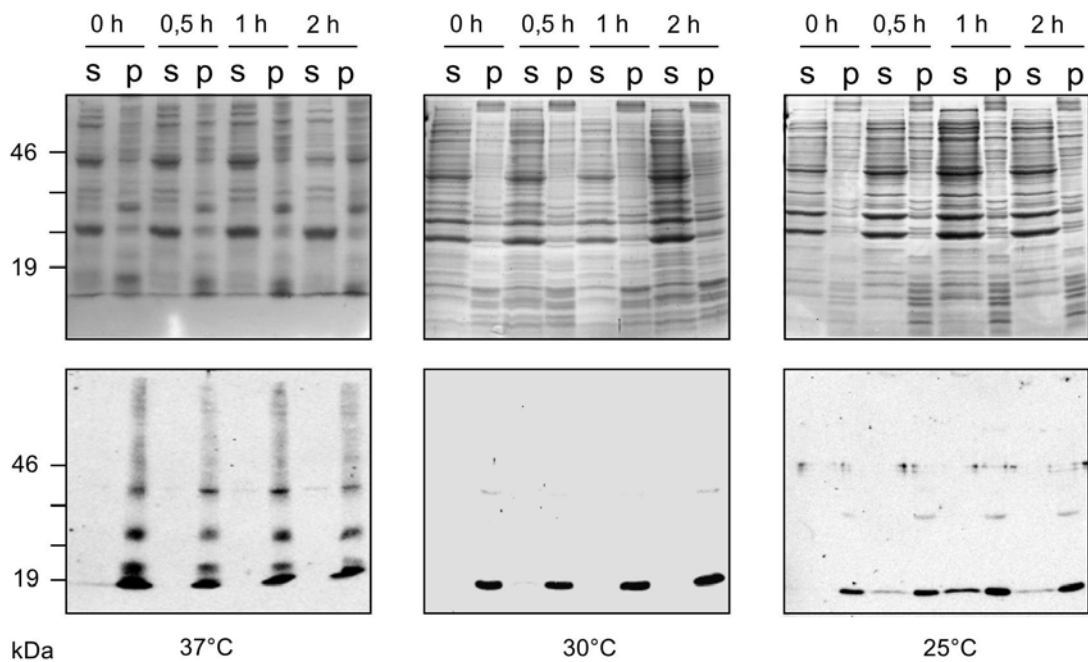
Nach Klonierung der einzelnen Konstrukte werden diese mittels Restriktion durch zwei Enzyme und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.1.4 und 3.1.12). Die Agarosekonzentration im Gel beträgt 2%. Nach Beendigung der Elektrophorese wird die DNA mit Ethidiumbromid angefärbt. Bei vollständiger Restriktion werden dabei zwei Fragmente freigesetzt. Das größere entspricht dem Expressionsvektor, während das kleinere Fragment dem klonierten Konstrukt entspricht. Die Konstrukte 1-13 wurden mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* verdaut. Dabei handelt es sich um folgende in den Vektor pRSET-B klonierten Konstrukte: US6(20-146) C127S (1), C129S (2), C127/129S (3), D130A (4), W134A (5), R138A (6), D130/R138A (7), US6(20-146) als Wildtypprotein (8), US6(20-144) (9), US6(25-144) (10), US6(35-144) (11), US6(40-144) (12) und US6(20-125) (13). Bei den letzten beiden Konstrukten handelt es sich um Fusionen von US6(20-146) mit MBP (14) bzw. der N-terminalen Domäne von Protein G (15). Das Fusionskonstrukt Protein G-US6 wurde über Restriktion mit *NcoI* und *BamHI* analysiert, die MBP-US6 Fusion mittels Restriktion mit *HindIII*.

## 4.2 Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6

Die Expression von US6 in *E. coli* wird durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert, was zur Akkumulation des Proteins in *inclusion bodies* führt. Exprimiert wurde die ER-luminale Domäne bestehend aus der Aminosäuresequenz 20-146. Das Konstrukt enthält außerdem acht Cysteinreste und die Glykosylierungsstelle an Position Asn52. In *E. coli* findet jedoch keine Glykosylierung statt. Deletiert wurden bei diesem US6-Konstrukt die Signalsequenz, die Transmembranhelix und der zytosolische Bereich am C-Terminus.

Durch Variation der Anzuchttemperatur oder Dauer der Induktion kann versucht werden einen Teil des Proteins vor der Akkumulation in *inclusion bodies* zu bewahren. Durch Reduzierung der Anzuchtstemperatur wird die Stoffwechselrate der kultivierten Bakterien erniedrigt. Damit verlangsamt sich auch die

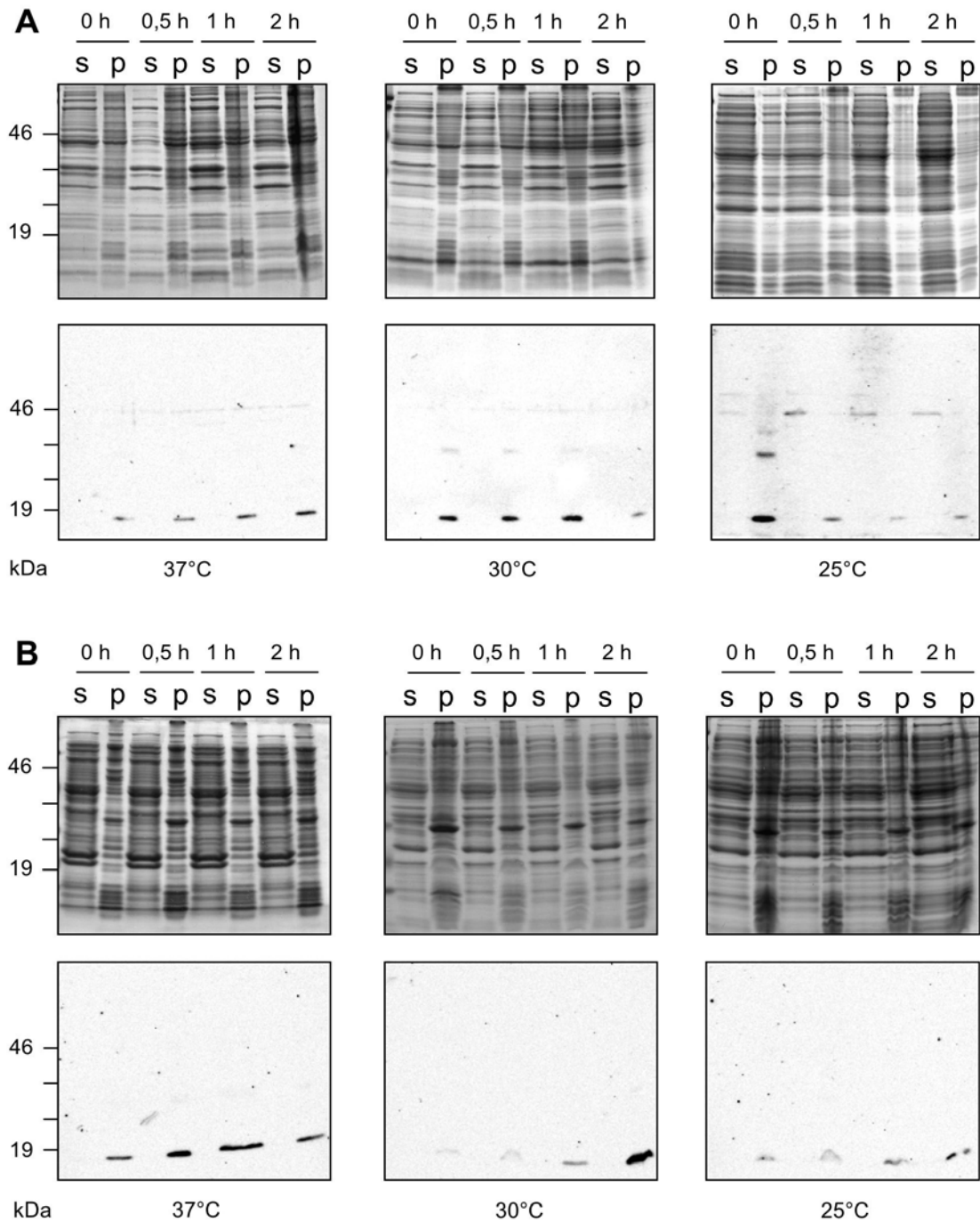
Expressionsrate. Dadurch fallen geringere Mengen an heterolog exprimiertem Protein anfallen, welches durch die zelleigenen Chaperone in die korrekte Faltung gebracht werden muß.



**Abbildung 7: Expression von US6 bei unterschiedlichen Anzuchttemperaturen**

Die Expression von US6 in *E. coli* ist unter der Kontrolle des T7-Promoters. Es kann jedoch vorkommen, daß geringe Mengen an heterologem Protein ohne Induktion mit IPTG produziert werden. Vor bzw. 0,5 h, 1 h und 2 h nach Induktion wurden Stichproben entnommen, um sie mittels SDS-PAGE (oben) und Western-Blot (unten) zu untersuchen (3.2.7 und 3.2.9). Die lösliche Fraktion (s) wurde von der unlöslichen Fraktion (p) durch Zentrifugation getrennt. Es zeigte sich, daß bei einer Anzuchttemperatur von 37°C und 30°C das exprimierte Protein vollständig in *inclusion bodies* akkumuliert. Bei 25°C ist ein Teil von US6 nach einer Stunde Induktion in der löslichen Fraktion deutlich mit einem Antikörper zu detektieren. Das Signal wird jedoch nach einer weiteren Stunde wieder schwächer, was die Degradation des Proteins vermuten lässt.

Der Zusatz von Ethanol induziert die Expression von Hitzeschockproteinen wie die des DnaK/DnaJ- oder des GroEL/GroES-Systems. (Thomas & Baneyx, 1996). Alternativ kann der Kultur Sorbitol zugesetzt werden (Barth et al., 2000). Auch Sorbitol induziert die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen. Das Wachstum der Zellen ist unter den gegebenen Stressbedingungen verlangsamt und die akkumulierte Substanz kann zudem eine stabilisierende Wirkung auf exprimierte Proteine haben.



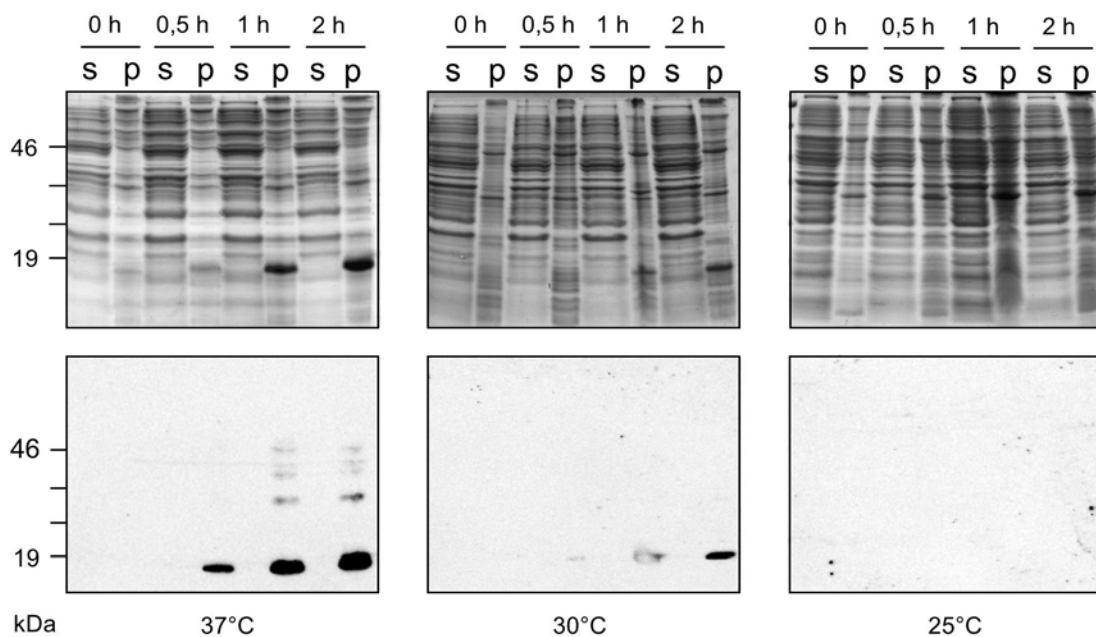
**Abbildung 8: Induktion der Hitzeschockantwort durch Ethanol oder Sorbitol**

Die Zellen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (37°C, 30°C und 25°C) kultiviert und durch Zugabe von IPTG die Expression induziert. Vor bzw. 0,5 h, 1 h und 2 h nach Induktion wurden Proben entnommen. Lösliche (s) und unlösliche Fraktion (p) wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. A) 2% (v/v) Ethanol wurde zum Zeitpunkt der Induktion zugesetzt. Die hier beschriebenen Experimente wurden mit *E. coli* BL21(DE3) an Stelle von BL21(DE3)pLysS durchgeführt. Der durch Zugabe von Ethanol induzierte Stress führte bei Bakterien des pLysS-Stammes zur Lyse. Es zeigte sich, daß die Induktion des Hitzeschocks nicht zu der Expression von löslichem US6 führte. Die Gesamtmenge an exprimiertem US6 nahm im Vergleich



zur Proteinexpression ohne Induktion der Hitzeschockantwort ab. B) Effekt von Sorbitol auf die Expression von US6(20-146). Bakterien reagieren auf osmotischen Stress mit der Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen. Im folgenden Versuch wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS in Anwesenheit von 0,3 M NaCl und 1 M Sorbitol kultiviert (Barth et al., 2000). Es zeigte sich, daß die Expression von US6(20-146) zur Akkumulation in Form von *inclusion bodies* führt. Im Western-Blot ist zu erkennen, daß bei Erniedrigung der Anzuchttemperatur die Gesamtmenge an exprimiertem US6 abnahm.

Aufgrund eines Defekts im Thioredoxin- und Gluthationstoffwechsel weist der *E. coli* Stamm Origami(DE3)pLysS ein oxidatives Redoxpotential im Zytoplasma auf (Bessette et al., 1999; Mössner et al., 1999; Prinz et al., 1997). Heterolog exprimierte Proteine mit Cysteinresten werden im Zytoplasma des Expressionswirtes nicht mehr fortwährend durch Thioredoxin, Gluthation oder Glutaredoxin reduziert. Dies führt zur Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des Zielproteins. Durch Expression in Origami(DE3)pLysS, könnte die Bildung von Cysteinbrücken die Aggregation von US6 verhindern.



**Abbildung 9: Expression von US6 in *E. coli* Origami(DE3)pLysS**

*E. coli* Origami(DE3)pLysS wurde bei 37°C, 30°C und 25°C kultiviert und die Expression von US6(20-146) durch Zugabe von IPTG induziert. Die Dauer der Expression und die Zeitpunkte der Probenentnahme erfolgte wie bei den vorherigen Versuchen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (3.2.7 und 3.2.9). Es zeigte sich, daß die Expression von US6 zur Akkumulation in *inclusion bodies* führt (p). Erniedrigung der Anzuchttemperatur bewirkt, daß die Expressionsrate abnimmt und bei 25°C gar keine Expression von US6 nachgewiesen werden kann. Bei 37°C ist im Coomassie gefärbten Gel die Überexpression des Proteins zu erkennen (links oben), während bei 25°C selbst nach Western-Blot und Immunodetektion mit einem US6-spezifischen Antikörper kein Signal erkennbar ist.

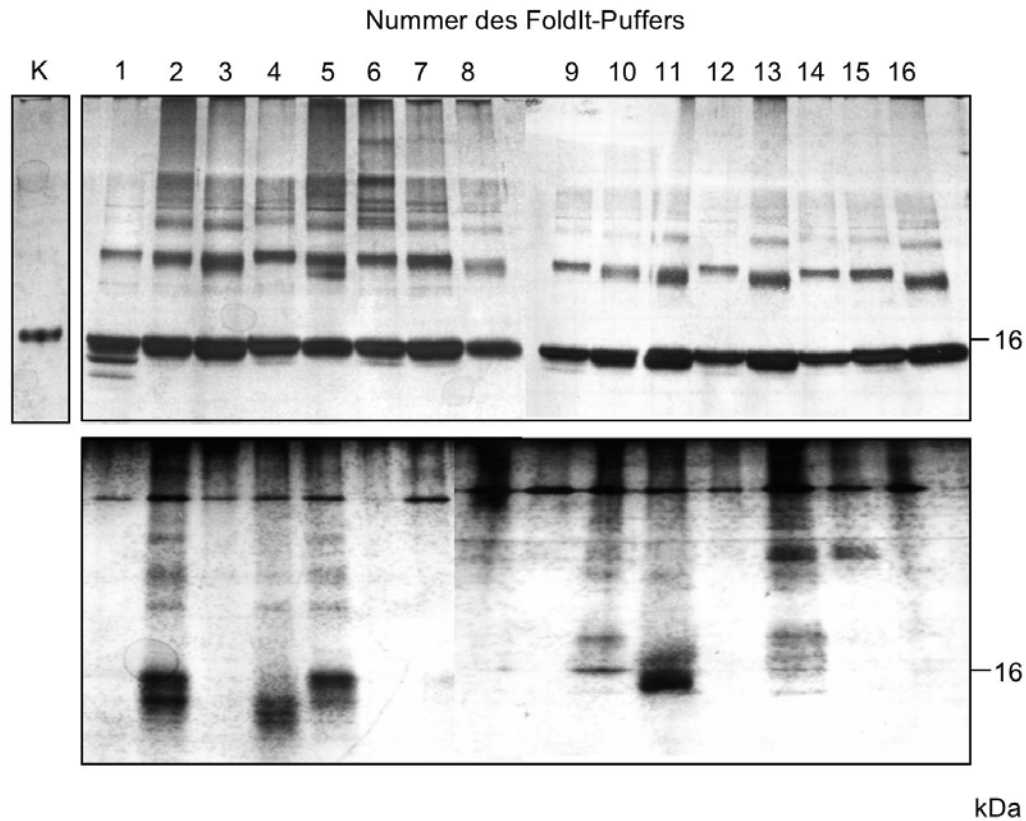
Es zeigte sich jedoch, daß das Protein unter den getesteten Expressionsbedingungen in *inclusion bodies* akkumuliert oder nur in geringem Maße löslich ist. Aus diesem Grund musste US6 aus *inclusion bodies* gereinigt (3.2.2) und *in vitro* renaturiert werden (3.2.3). Die Reinigung von Protein aus *inclusion bodies* kann durchaus vorteilhaft sein, da das Protein in dieser Form eine Reinheit von bis zu 80% aufweist. Aufgrund der hohen Dichte der *inclusion bodies* lassen sich diese mittels Zentrifugation vom Zytosol trennen. Die gewaschenen *inclusion bodies* werden in Solubilisationspuffer aufgenommen und der Inhibitor mittels Metallchelataffinitätschromatographie aus dem Solubilisat gereinigt. Die Solubilisierung des aggregierten Proteins erfolgt in Anwesenheit von 10 M Harnstoff. Das Protein bindet über C-terminale Oligohistidine an das Säulenmaterial. Verbleibende Kontaminationen aus dem Expressionswirt *E. coli* werden mit 20 mM Imidazol von der Säule gewaschen. Das Zielprotein eluiert bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol. Die US6-haltigen Elutionsfraktionen werden im nächsten Schritt für Rückfaltungsversuche eingesetzt.

Das Protein wird rückgefaltet, indem der Harnstoff aus der Lösung entfernt wird. Dies kann durch Verdünnung oder Dialyse der Lösung oder aber auf einer Säulenmatrix erreicht werden. Bei der *in vitro* Renaturierung von Protein gibt es eine Fülle von Protokollen, bei denen Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, divalente Kationen, Detergenzien, chaotrope Substanzen wie Arginin, Additiva wie Glycerin oder Saccharose, oder das sog. *redox shuffling* berücksichtigt werden müssen. (Armstrong et al., 1999; Pecorari et al., 1999; Piehler & Schreiber, 1999). Zu den ersten Versuchen US6(20-146) zu renaturieren, zählt der *FoldIt Protein Folding Kit* von Hampton Research. In einer Reihe von Lösungen (1-16, Zusammensetzung siehe 3.2.3) werden die für die Rückfaltung relevanten Bedingungen abgedeckt.

Allen Ansätzen ist gemein, daß ein großer Teil des renaturierten Proteins noch immer in Form kovalent verknüpfter, hochmolekularer Aggregate vorliegt. Die Oligomerisierung lässt sich schon nach 16 Stunden Inkubation beobachten und tritt verstärkt nach der Dialyse auf. Im Gel weisen diese Aggregate eine geringe elektrophoretische Mobilität auf. Desweiteren sind die detektierten Banden im Gel nicht scharf fokussiert. Dies weist darauf hin, daß die analysierten Proben keine Monodispersität besitzen.

Es zeigte sich, daß sich die grössten Mengen an löslichem Protein nach Rückfaltung in den Ansätzen mit den Nummern 2, 5 und 11 befanden (siehe nächste Abbildung). Diese Ansätze unterscheiden sich bezüglich des pH-Wertes,

der Ionenstärke und verschiedenener Zusätze. Das *redox shuffling* und die Anwesenheit zweiwertiger Kationen tritt bei diesen Ansätzen gemeinsam auf. Auch scheint die Anwesenheit chaotroper, polarer oder unpolarer Additiva wichtig zu sein.



**Abbildung 10: Rückfaltung von US6 mit Hilfe des *FoldIt Protein Refolding Kits***

Die größten Mengen an löslichem Protein befinden sich in den Ansätzen 2, 5 und 11. Untersucht wurden Aliquots nach 16 Stunden (oben) und nach 48 Stunden Inkubation mit anschließender  $\text{üN}$ -Dialyse gegen Rückfaltungspuffer 1 (unten). Die Analyse erfolgte mittels oxidativer SDS-PAGE und Silberfärbung. Das gereinigte Protein vor Inkubation ist links oben gezeigt (K).

Eine Gegenüberstellung der einzelnen Inkubationspuffer sieht wie folgt aus:

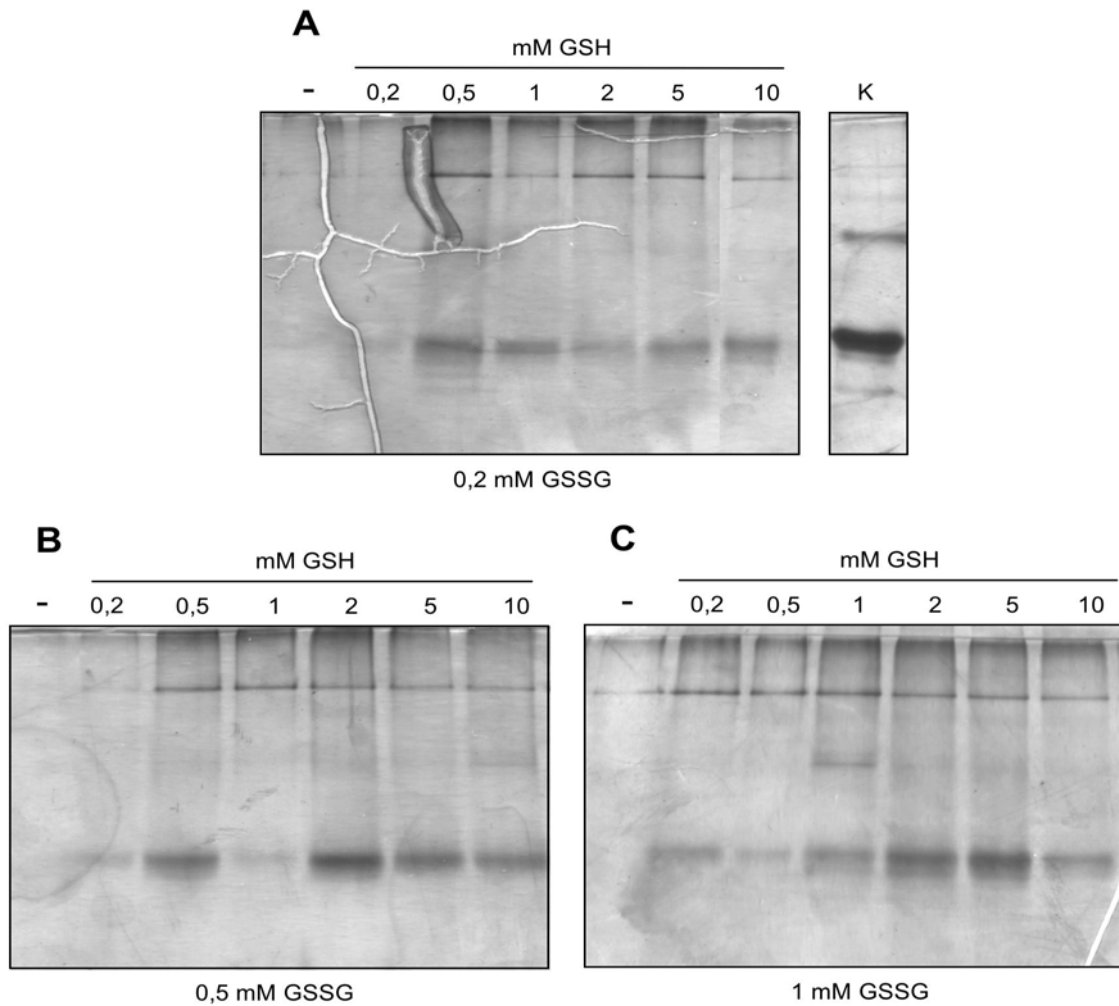
**Ansatz 2:** 55 mM MES pH 5,5; 10,5 mM NaCl und 0,4 mM KCl; 550 mM Guanidin-HCl; je 2,2 mM  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ ; je 1 mM GSH und GSSG

**Ansatz 5:** 55 mM MES pH 5,5; 264 mM NaCl und 11 mM KCl; 440 mM Sucrose; je 2,2 mM  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ ; je 1 mM GSH und GSSG

**Ansatz 11:** 55 mM Tris pH 8,2; 10,5 mM NaCl und 0,4 mM KCl; 0,055% PEG 3350; 550 mM Arginin; je 2,2 mM  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ ; je 1 mM GSH und GSSG

Daraus wird ersichtlich, daß für die Rückfaltung des reduzierten Proteins die Bildung von Disulfidbrücken wichtig zu sein scheint. Desweiteren müssen Additiva anwesend sein, die das ungefaltete Protein in Lösung halten bis die richtige Disulfidstruktur gebildet werden kann. Diese erhöhen die Viskosität der Lösung, haben einen Effekt auf die Hydrathülle von Proteinen (Sucrose bzw. PEG) oder wirken chaotrop (Guanidin-HCl oder Arginin). Für die weitere Vorgehensweise wurde das sogenannte *redox shuffling* in die Rückfaltungsprozedur einbezogen (Pecorari et al., 1999). Diese Prozedur zeichnet sich durch unterschiedliche Konzentrationen an reduziertem (GSH) und oxidiertem Gluthation (GSSG) aus. Auf diese Weise werden verschiedene Redoxpotentiale geschaffen, bei denen sich Disulfidbrücken innerhalb des Proteins bilden sollen. Weiterhin scheint ein höherer pH-Wert ratsam, da hierbei das chemische Gleichgewicht auf Seiten der Bildung und des Austauschs von Disulfiden liegt.

Es zeigte sich, daß das rückgefaltete Protein unter allen Bedingungen im Gel nicht als einheitliche, scharf fokussierte Bande erkennbar ist. Dies lässt auf mehrere Faltungsisomere bezüglich der Disulfide schließen. Je nach eingesetztem Redoxpotential sind auch Unterschiede in Bezug auf die erhaltene Menge an Protein erkennbar. Jedoch neigt das Protein bei allen getesteten Bedingungen sehr stark zur Aggregation, was sich auch im Gel zeigt. Das Protein neigt zu Oligomerisierung und es tendiert dazu, die Probentasche oder das Sammelgel nicht zu verlassen. Dies deutet auf hochmolekulare, über intermolekulare Disulfidbrücken verknüpfte Aggregate hin. Die Konzentration mittels Zentrifugalkonzentratoren erwies sich als sehr zeitaufwendig. Der Verlust durch Anlagerung an die Membran der Konzentratoreinheit betrug mindestens 80%. CD-spektroskopische Messungen zeigten ein ungefaltetes Protein (siehe 4.4).



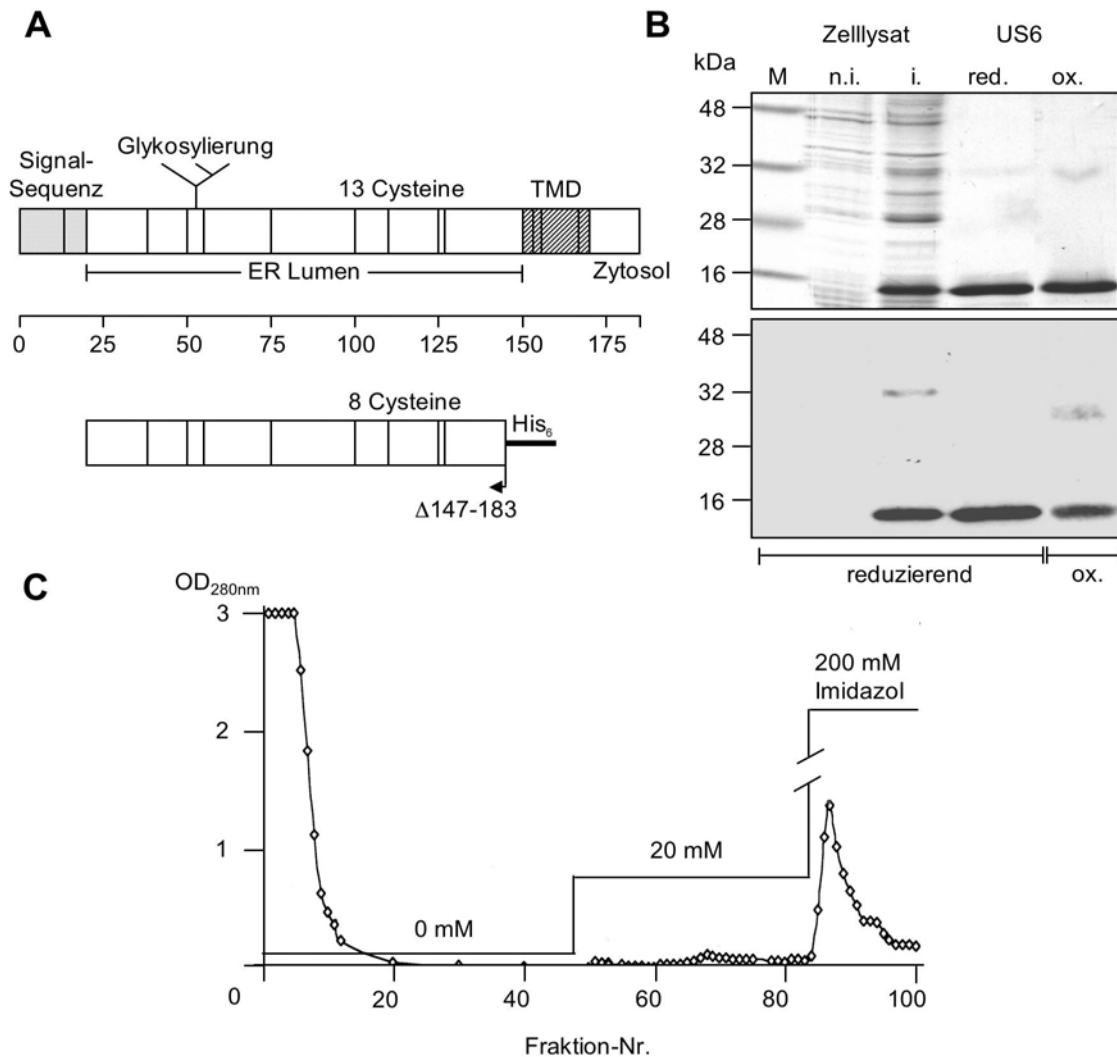
**Abbildung 11: Rückfaltung von US6 unter Berücksichtigung des *redox shufflings***

Die ER-luminale Domäne von US6 enthält 8 Cysteinreste. Diese Cysteine könnten ein für die Struktur des Proteins wichtiges Disulfiden-Netzwerk bilden. Aus diesem Grund wird ein *redox shuffling* durchgeführt, bei dem sich dieses Netzwerk ausbilden soll. Nach der Reinigung von US6(20-146) aus *inclusion bodies* wird das Protein mit DTT reduziert (K). Nach der Reduktion wird das Protein auf mehrere Ansätze mit reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) verteilt. Die Konzentration an GSH variiert zwischen 0,2-10 mM und die von GSSG zwischen 0,2 und 1 mM. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass jeder Ansatz über ein anderes Redoxpotential verfügt. Nach der Rückfaltung wurden die Proben mittels SDS-Page und Silberfärbung analysiert. Es zeigte sich, daß das rückgefaltete Protein unter allen getesteten Bedingungen nicht als einheitliche und scharf fokussierte Bande zu erkennen ist. Im Gel sind Oligomere und Aggregate erkennbar, die auch in Anwesenheit von SDS nur eine geringe elektrophoretische Mobilität aufweisen.

Es zeigte sich, dass der Redoxzustand des Proteins nicht verändert werden darf. Im Falle von US6(20-146) kann der pH-Wert zwischen 6,5 und 8,0 schwanken und die Ionenstärke spielt für die Rückfaltung des Proteins eine untergeordnete Rolle (0-150 mM NaCl). Durch die Dialyse in Rückfaltungspuffer 1 oder 2 ohne *redox shuffling*-Prozedur wurde US6 gewonnen, welches aufgrund der Ausbeute und seiner Stabilität Studien zur TAP-Inhibition zuließ.

Von *inclusion bodies* ausgehend lassen sich aus einem Liter Bakterienkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1,5 bis zu 10 mg US6(20-146) reinigen. Durch die üN-Dialyse von 30-50 ml des Eluats gegen 5 Liter Rückfaltungspuffer 1 oder 2 üN, können bis zu 3 mg Protein rückgefaltet werden. Die Proteinkonzentration im Eluat vor Dialyse beträgt 0,2-0,5 mg/ml. Während der Solubilisation der *inclusion bodies* und der Dialyse wird das Protein nicht mit Reduktionsäquivalenten in Verbindung gebracht. Als Maß für die Rückfaltungseffizienz gilt zunächst die Menge an in Lösung verbliebenem Protein und später auch dessen inhibitorische Aktivität in verschiedenen Inhibitionsassays.

Präzipitate werden mittels Zentrifugation bei 120000 g entfernt und die Proteinkonzentration mittels Zentrifugalkonzentratoren auf eine für die nachfolgenden Versuche geeignete Konzentration erhöht. Das Protein ist bei einer Konzentration von 1 mg/ml bei 4°C in Rückfaltungspuffer 1 für eine Woche und in Rückfaltungspuffer 2 für 10 Tage stabil. Das Protein lässt sich auch auf eine Konzentration von 20 mg/ml bringen, jedoch verringert sich hierbei die Haltbarkeit drastisch auf 2-3 Tage. Das Protein erscheint in der SDS-PAGE und im Western-Blot sowohl unter reduzierenden als auch unter oxidierenden Bedingungen größtenteils als monomeres Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 16 kDa. Weiterhin ist zu bemerken, daß das reduzierte US6 im Western-Blot besser durch den Antikörper erkannt wird, als die oxidierte Form des Proteins. Innerhalb des Epitops befindet sich das Cystein an Position 39. Unter oxidativen Bedingungen kann das Cystein in einem Netzwerk von Disulfiden eingebunden sein, was die Zugänglichkeit des Epitops für den Antikörper einschränken könnte. Es ist zu erkennen, daß unter oxidativen Bedingungen ein kleiner Anteil des Proteins als Dimer vorliegt. Der Anteil des Dimers am Gesamtprotein variiert zwischen verschiedenen Präparationen. Die dem Dimer entsprechende Bande hat ein diffuses Erscheinungsbild und lässt sich nicht zu einer scharfen, einheitlichen Bande fokussieren. Die dem Monomer entsprechende Bande ist unter oxidativen Bedingungen weniger fokussiert, als unter reduzierenden Bedingungen.

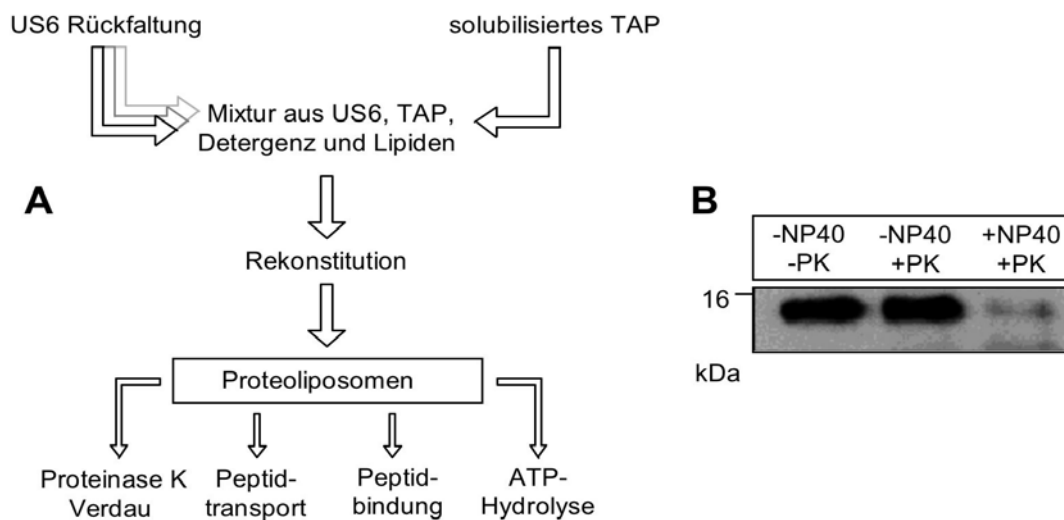


**Abbildung 12: Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6**

A) US6 ist ein Typ I Transmembranglykoprotein. Es besteht aus einer Signalsequenz, der ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einem zytosolischen Bereich am C-Terminus. Das Protein enthält 13 Cysteinreste und wird in der humanen Wirtszelle an der Position Asn52 glykosyliert. Die ER-luminale Domäne von US6 bestehend aus der Aminosäuresequenz 20-146 wurde heterolog in *E. coli* exprimiert. Das Konstrukt besitzt 8 Cysteinreste, eine N-Glykosylierung an Asn52 findet in *E. coli* nicht statt. B) Die Expression in *E. coli* wird durch Zugabe von IPTG induziert. Im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (n.i.) erscheint bei induzierten Zellen (i.) nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung ein überexprimiertes Protein bei ca. 16 kDa (oben). Dieses Protein lässt sich mit einem US6-spezifischen Antikörper detektieren (unten). Nach Reinigung und Rückfaltung erscheint US6 unter oxidativen und reduzierenden Bedingungen als monomeres Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 16 kDa (US6 red. und ox.). US6 wird unter oxidativen Bedingungen von dem Antikörper weniger gut erkannt als unter reduzierenden Bedingungen. C) US6 wird aus *inclusion bodies* mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Auftrag des solubilisierten Proteins auf das Säulenmaterial lassen sich Verunreinigungen in einem Stufengradienten mit einer Imidazolkonzentration von 20 mM entfernen. Wie im Chromatogramm durch die Absorption bei 280 nm gezeigt, wird US6 mit 200 mM Imidazol eluiert. Das Protein wird daraufhin mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Dialyse rückgefaltet.

### 4.3 Analyse der US6-spezifischen TAP-Inhibition *in vitro*

Um die Aktivität von rückgefaltetem US6 zu überprüfen, wurde das Protein zusammen mit TAP in Proteoliposomen rekonstituiert (siehe 3.2.10). Nach der Rekonstitution können Peptidtransport und ATP-Hydrolyse in An- und Abwesenheit von US6(20-146) analysiert werden. Die Vorgehensweise ist auch in Abbildung 13 dargestellt. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Nukleotid-bindungsdomänen von TAP ausserhalb der Liposomen lokalisiert sind und der ER-luminale Teil von TAP sich im Lumen der Liposomen befindet (Gorbulev et al., 2001). US6 interagiert im ER-Lumen mit TAP. Dementsprechend muß US6 sich im Inneren der Liposomen befinden, um seine inhibitorische Aktivität zu entfalten.



**Abbildung 13: Rekonstitution von rückgefaltetem US6 in Proteoliposomen**

A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Analyse der Inhibition von TAP durch US6 *in vitro*. Nach der Renaturierung von US6(20-146) wird der Inhibitor zusammen mit angereicherterem TAP in Proteoliposomen rekonstituiert (Durchführung siehe 3.2.10). Nach Rekonstitution wird die Lokalisation von US6 in Proteoliposomen überprüft und der Einfluß von US6 auf Peptidbindung, Peptidtransport und ATP-Hydrolyse von TAP analysiert. B) Proteinase K Verdauung zur Lokalisation von US6(20-146) nach der Rekonstitution. Proteoliposomen ohne Proteinase K Verdauung zeigen im Western-Blot ein US6-spezifisches Signal, was die Anwesenheit von US6 zeigt. Inkubation der Proteoliposomen mit Proteinase K hat kein Effekt auf das US6-spezifische Signal. Werden die Liposomen während des Verdaus mit 1% NP40 solubilisiert, ist US6 für die Protease zugänglich und wird proteolytisch abgebaut.

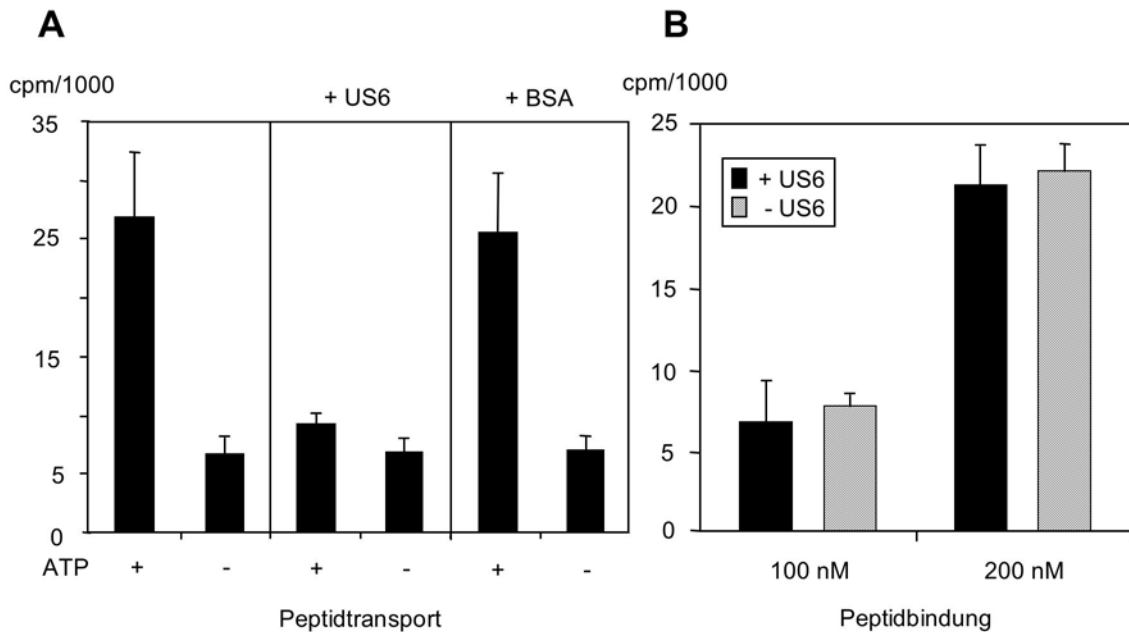


Die Lokalisation von US6 nach Rekonstitution in Proteoliposomen wurde mittels Degradation durch Proteinase K gezeigt. Befindet sich US6 im Lumen der Proteoliposomen, ist es vor proteolytischem Abbau geschützt. US6 lässt sich anschließend im Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper detektieren. Werden die Liposomen jedoch durch Zugabe des Detergenz Igepal (NP40) in einer Enkonzentration von 1% solubilisiert, hat das die Freisetzung von US6 und den proteolytischen Abbau des Inhibitors durch Proteinase K zur Folge. Dadurch wird das US6-spezifische Signal im Western-Blot deutlich schwächer.

#### **4.3.1 Inhibition des Peptidtransports durch US6**

Um den Einfluß von US6(20-146) auf die Peptidbindung und den Peptidtransport durch TAP *in vitro* zu analysieren, werden an den Proteoliposomen Peptidbindungs- und Peptidtransport-Assays mit radioaktiv markiertem Peptid durchgeführt (Durchführung siehe 3.2.12). Zu diesem Zweck werden zwei verschiedene Ansätze gewählt, welche sich in der An- bzw. Abwesenheit von 20  $\mu$ M US6 während der Rekonstitution unterscheiden.

Das Peptid wird ATP-abhängig in das Lumen der Liposomen transportiert. In Anwesenheit von ADP ist nur ein Hintergrundsignal messbar. In Anwesenheit von US6 wird der Peptidtransport vollständig inhibiert. Das messbare Signal unterscheidet sich nicht von der Negativkontrolle mit ADP. Die Co-Rekonstitution des TAP-Komplexes mit 20  $\mu$ M Rinderserumalbumin hat keinen Effekt auf die Transportrate. Wurde US6 nach der Rekonstitution zu den Proteoliposomen gegeben, hatte dies keinen Einfluß auf den Peptidtransport von TAP (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde der Einfluß von US6 auf die Peptidbindung von TAP untersucht. Der Inhibitor hat bei den im Assay gewählten halbmaximalen und saturierenden Peptidkonzentrationen keinen Effekt auf die Peptidbindung von TAP. Radioaktiv markiertes Peptid kann mit einem 400-fachen Überschuß an nicht markiertem Peptid verdrängt werden (Daten nicht gezeigt).



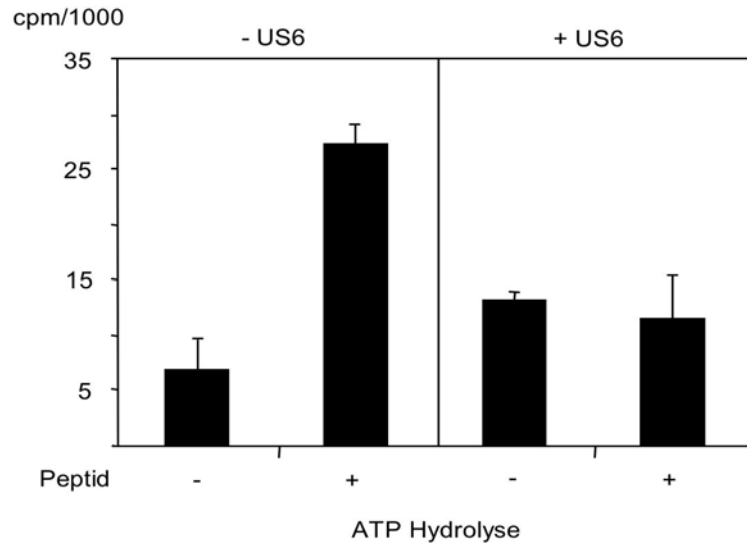
**Abbildung 14: US6 inhibiert den Peptidtransport von TAP**

TAP wurde in An- und Abwesenheit von US6(20-146) in Proteoliposomen rekonstituiert. Nachfolgend wurde der Transport und die Bindung von radioaktiv markiertem Peptid durch TAP analysiert. A) TAP transportiert in Abhängigkeit von ATP Peptide in das Lumen der Liposomen. In Abwesenheit von ATP liegt die messbare Radioaktivität auf Hintergrundniveau. In Anwesenheit von 20  $\mu$ M US6 wird der Peptidtransport blockiert (+US6). Rekonstitution von TAP in Anwesenheit von 20  $\mu$ M Rinderserumalbumin zeigt keinen Effekt auf die Transportaktivität (+BSA). B) Die Peptidbindung von TAP wurde bei Peptidkonzentrationen von 100 nM und 200 nM analysiert. Es zeigte sich, daß die Anwesenheit von US6 keinen Effekt auf die Peptidbindung von TAP hat.

#### 4.3.2 Inhibition der ATP-Hydrolyse-Aktivität durch US6

Nachdem gezeigt werden konnte, daß US6(20-146) den TAP-abhängigen Peptidtransport hemmt, wurde die ATPase-Aktivität des TAP-Komplexes in An- bzw. Abwesenheit von US6 studiert (Durchführung siehe 3.2.13).

In Abwesenheit von Peptid liegt die messbare Radioaktivität auf Hintergrundniveau. Die ATP-Hydrolyse von TAP wird durch die Anwesenheit des Peptids RRYQKSTEL stimuliert. Die messbare Radioaktivität steigt von 7500 cpm auf ca. 27000 cpm. In Anwesenheit von US6 lässt sich die messbare Radioaktivität durch Zugabe des Peptids nicht über das Hintergrundniveau steigern. Somit kann gezeigt werden, daß auch die Peptid-stimulierte ATPase-Aktivität von TAP durch US6(20-146) inhibiert wird.



**Abbildung 15: US6 inhibiert die ATPase-Aktivität von TAP**

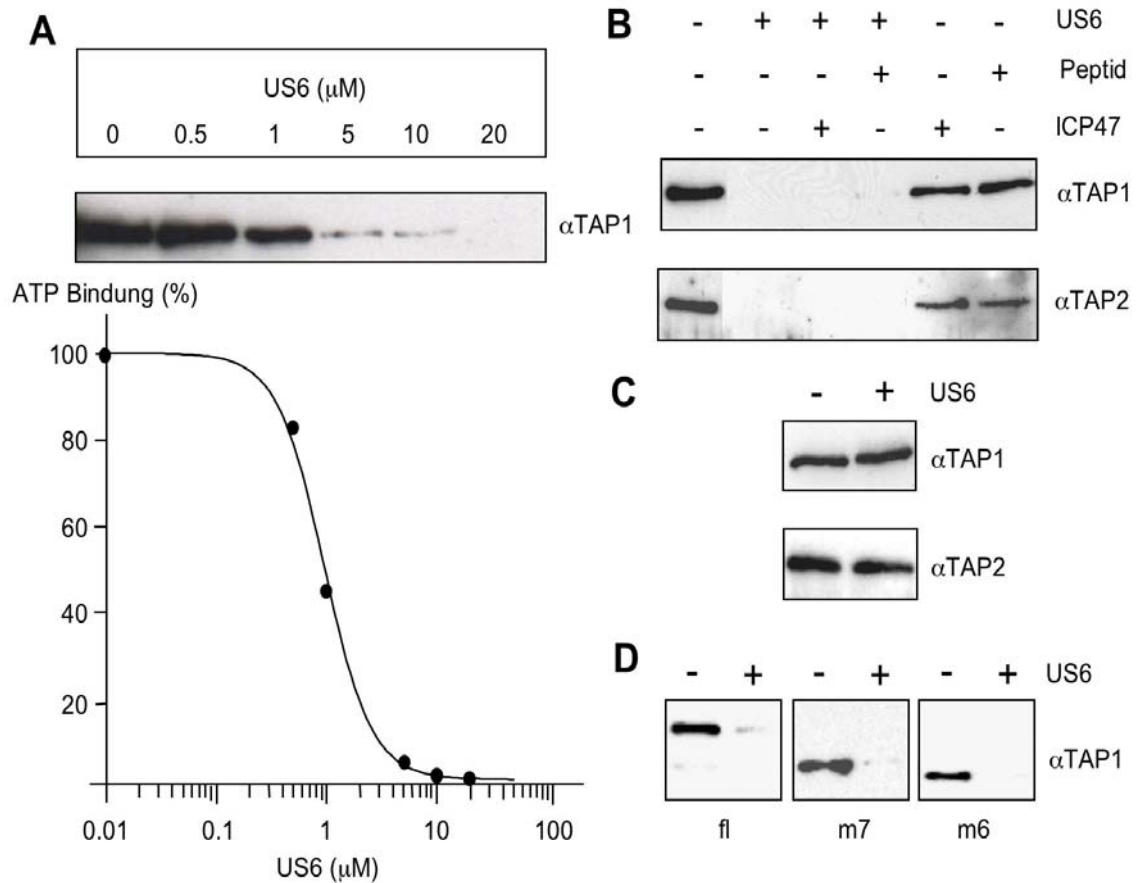
Der Transporter wurde in An- und Abwesenheit von US6(20-146) in Proteoliposomen rekonstituiert. Nachfolgend wurde die durch die Hydrolyse von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  freigesetzte Menge an radioaktivem Phosphat analysiert. In Abwesenheit von US6 lässt sich die ATP-Hydrolyse durch Zugabe von Peptid stimulieren. Die gemessene Radioaktivität steigt von 7500 auf 27000 cpm um den Faktor 3 (-US6). In Anwesenheit von US6 lässt sich die ATP-Hydrolyse von TAP durch Peptidzugabe nicht stimulieren. Die gemessene Radioaktivität verbleibt auf Hintergrundniveau (+US6).

### 4.3.3 Inhibition der Nukleotidbindung durch US6

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß US6 die ATPase-Aktivität von TAP inhibiert, wurde der Einfluß des Inhibitors auf die Nukleotidbindung von TAP untersucht. Mikrosomen aus TAP exprimierenden *Sf9*-Insektenzellen wurden mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert und ein Nukleotidbindungsassay in An- und Abwesenheit von US6(20-146) durchgeführt (siehe 3.2.14). Dabei wird die Bindung von solubilisiertem TAP an ATP- und ADP-Agarose analysiert. Es zeigte sich, daß die ATP-Bindung von TAP dosisabhängig durch US6 blockiert wird. Die maximal eingesetzte Konzentration an US6 betrug 20  $\mu\text{M}$ . Die halbmaximale Inhibition liegt bei einer Inhibitorkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ .

Weder ICP47 noch das eingesetzte Peptid weisen einen negativen Effekt auf die ATP-Bindung von TAP auf. Weiterhin hat die Anwesenheit des Herpes Simplex Proteins ICP47 oder des Peptids RRYQKSTEL keinen Effekt auf die US6-spezifische Inhibition von TAP.

Im Gegensatz zur ATP-Bindung hat US6 keinen Einfluß auf die Bindung von ADP. Sowohl in An- als auch Abwesenheit von US6(20-146) bindet TAP an die ADP-Agarose und lässt sich mit dem TAP1-spezifischen, monoklonalen Antikörper 148.3 in den Eluatsfraktionen nachweisen.



**Abbildung 16: US6 inhibiert die ATP-Bindung von TAP**

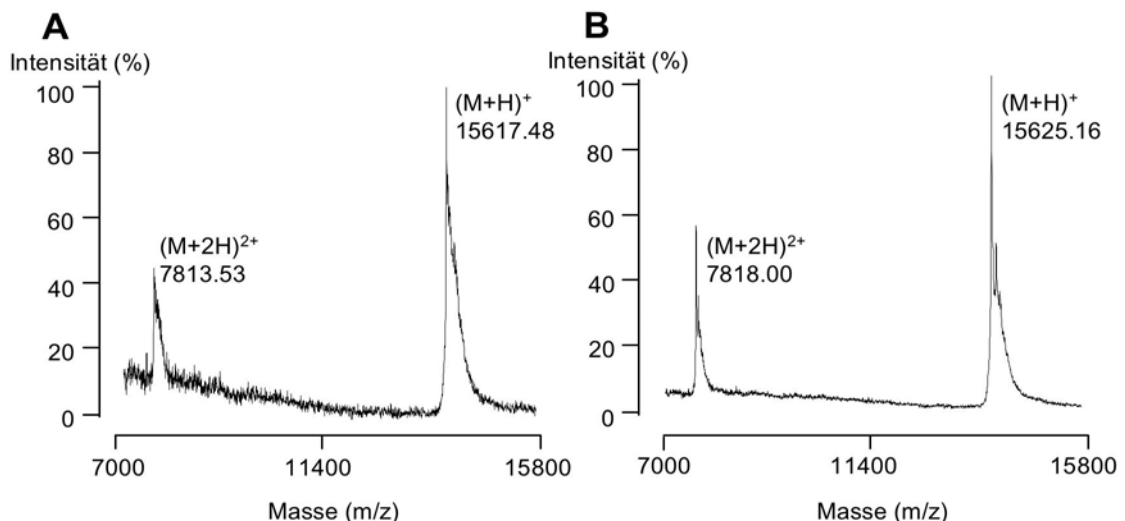
A) Die Bindung von ATP an TAP wird durch die Anwesenheit von US6 blockiert. Die halbmaximale Inhibition ist bei einer US6-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  erreicht. B) Der inhibitorische Effekt von US6(20-146) ist durch die Anwesenheit von ICP47 oder Peptid nicht beeinflusst. Weder ICP47 noch Peptid haben einen negativen Effekt auf die ATP-Bindung. C) US6(20-146) hat keinen Effekt auf die ADP-Bindung von TAP. Der Transporter bindet sowohl in An- als auch in Abwesenheit von US6 an die ADP-Agarose und lässt sich in den Eluatsfraktionen nachweisen. D) N-terminale Deletionsmutanten von TAP, welche nur noch über sieben (m7) bzw. sechs (m6) Transmembranhelices verfügen, werden ebenfalls von US6(20-146) inhibiert. Diese Mutanten binden wie der Wildtyp (fl) in Anwesenheit von US6 nicht an die ATP-Agarose.

Um die Bereiche innerhalb der Transmembrandomäne von TAP einzugrenzen, die kritisch für die Interaktion zu US6 sind, wurden Inhibitionsstudien mit verkürzten TAP-Konstrukten durchgeführt. In früheren Arbeiten wurden für die TMD von TAP1 10 TM und für TAP2 9 TM vorhergesagt (Tampé et al., 1997). Bei den für diese

Versuche verwendeten Konstrukten handelt es sich um N-terminale Verkürzungen, bei denen TAP1 und TAP2 jeweils nur noch sieben (m7TAP; TAP1 $\Delta$ 2-132 TAP2 $\Delta$ 2-89) bzw. sechs (m6TAP; TAP1 $\Delta$ 2-166 TAP2 $\Delta$ 2-122) der vorhergesagten Transmembranhelices besitzen (Koch et al., 2004). Es zeigte sich, daß bei beiden TAP-Deletionsmutanten die Bindung an die ATP-Agarose durch US6(20-146) blockiert wurde.

#### 4.4 Analyse von rückgefaltetem US6

US6(20-146) hat eine theoretische molekulare Masse von 15.622 Da. Massenspektrometrische Untersuchungen zeigten für das rückgefaltete Protein eine Masse von 15.617 Da bzw. 15.625 Da für die einfach protonierte Spezies des oxidierten bzw. reduzierten Proteins. Die theoretische und die experimentell ermittelte Masse von US6 stimmen im Rahmen des Fehlers miteinander überein.

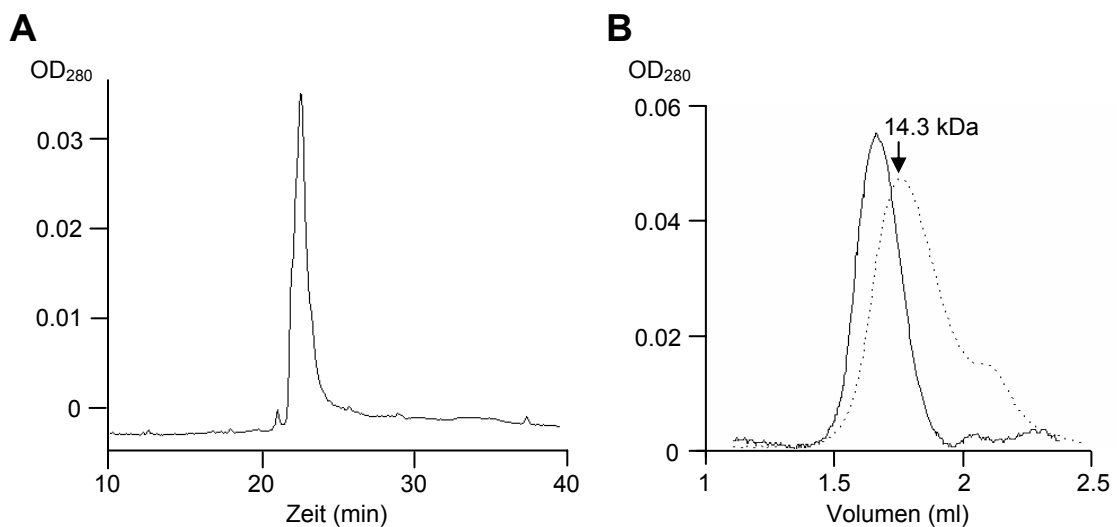


**Abbildung 17: Massenspektrometrische Analyse von US6(20-146)**

Die theoretische molekulare Masse für die rückgefaltete ER-luminale Domäne von US6 beträgt 15.622 Da. US6(20-146) wurde im oxidierten und reduzierten (200 mM DTT bei 50°C für 5 Minuten) Zustand vermessen. Die ermittelte molekulare Durchschnittsmasse für das oxidierte Protein (A) beträgt 15.617 Da und für das reduzierte Protein (B) 15.625 Da. Die experimentell ermittelte Durchschnittsmasse von US6(20-146) stimmt im Rahmen des Fehlers (0,05%) mit der theoretischen Masse überein.

Durch Gelfiltration mit einer Superdex G75 Gelfiltrationssäule kann gezeigt werden, daß US6 ein ähnliches Elutionsprofil wie Lysozym mit einer molekularen Masse von 14,3 kDa aufweist. Es ist kein US6(20-146) im Ausschlussvolumen zu finden. Das renaturierte Protein neigt jedoch zur Adsorption an Oberflächen und Membranen (z.B. vollständig an Oberflächen von Sterilfiltern). So findet sich nach der Gelfiltration nur ca. 10% des eingesetzten Proteins in den Elutionsfraktionen wieder. Es scheint, daß das Protein mit dem Säulenmaterial interagiert und auf diesem verbleibt.

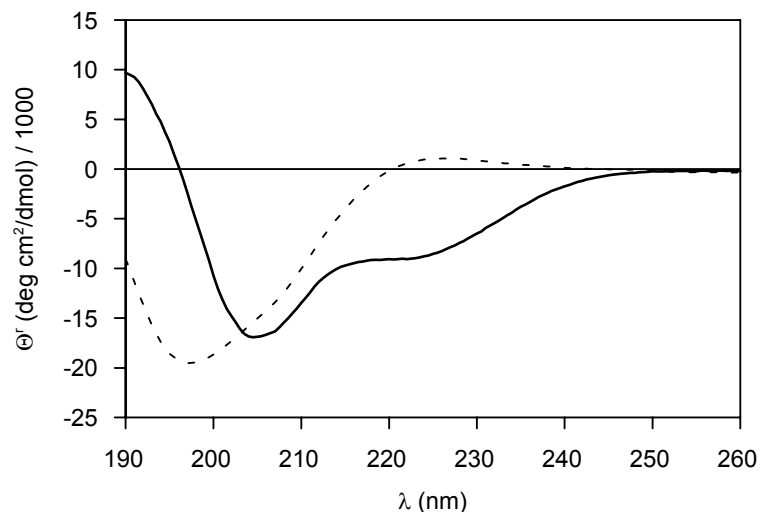
Das Elutionsprofil in der *reversed phase* Chromatographie mit einem einzelnen *peak* läßt auf Reinheit des Proteins schließen. In einem angelegten linearen Gradienten von 10-50% (v/v) Acetonitril eluiert das Protein bei 34% (v/v) Acetonitril. Es kann aber aufgrund des Elutionsprofils nicht ausgeschlossen werden, daß sich nicht doch mehrere Isomere mit unterschiedlichem Disulfid-Netzwerk in der Probe befinden. Diese Isomere würden in diesem Fall ein ähnliches Elutionsverhalten aufweisen



**Abbildung 18: Analyse der Homogenität von US6(20-146)**

A) Elutionsprofil nach *reversed phase* Chromatographie. US6(20-146) wurde auf eine  $\mu$ RCP C8 SC2.1/10 Säule aufgetragen und ein Gradient von 10-50% (v/v) Acetonitril in 0,1% (w/v) Trifluoressigsäure angelegt. Das Protein eluiert bei 34% (v/v) Acetonitril in einem singulären *Peak* von der Säule. B) Elutionsprofil nach Gelfiltration mit Superdex G75. Es wurden bis zu 500  $\mu$ g des rückgefalteten Proteins auf die Säule aufgetragen. Der Lauf wird mit Gelfiltrationspuffer bei 4°C mit einer Laufgeschwindigkeit von 40  $\mu$ l pro Minute durchgeführt. Aufgefangen werden Fraktionen mit einem Volumen von 60  $\mu$ l. Als Referenz wurde Lysozym (14,3 kDa) aufgetragen. US6(20-146) (durchgezogene Linie) eluiert in der gleichen Größenordnung wie Lysozym (gepunktete Linie) von der Gelfiltrationssäule. Dies deutet darauf hin, daß das eluierte US6 in Lösung ein monomeres Protein ist.

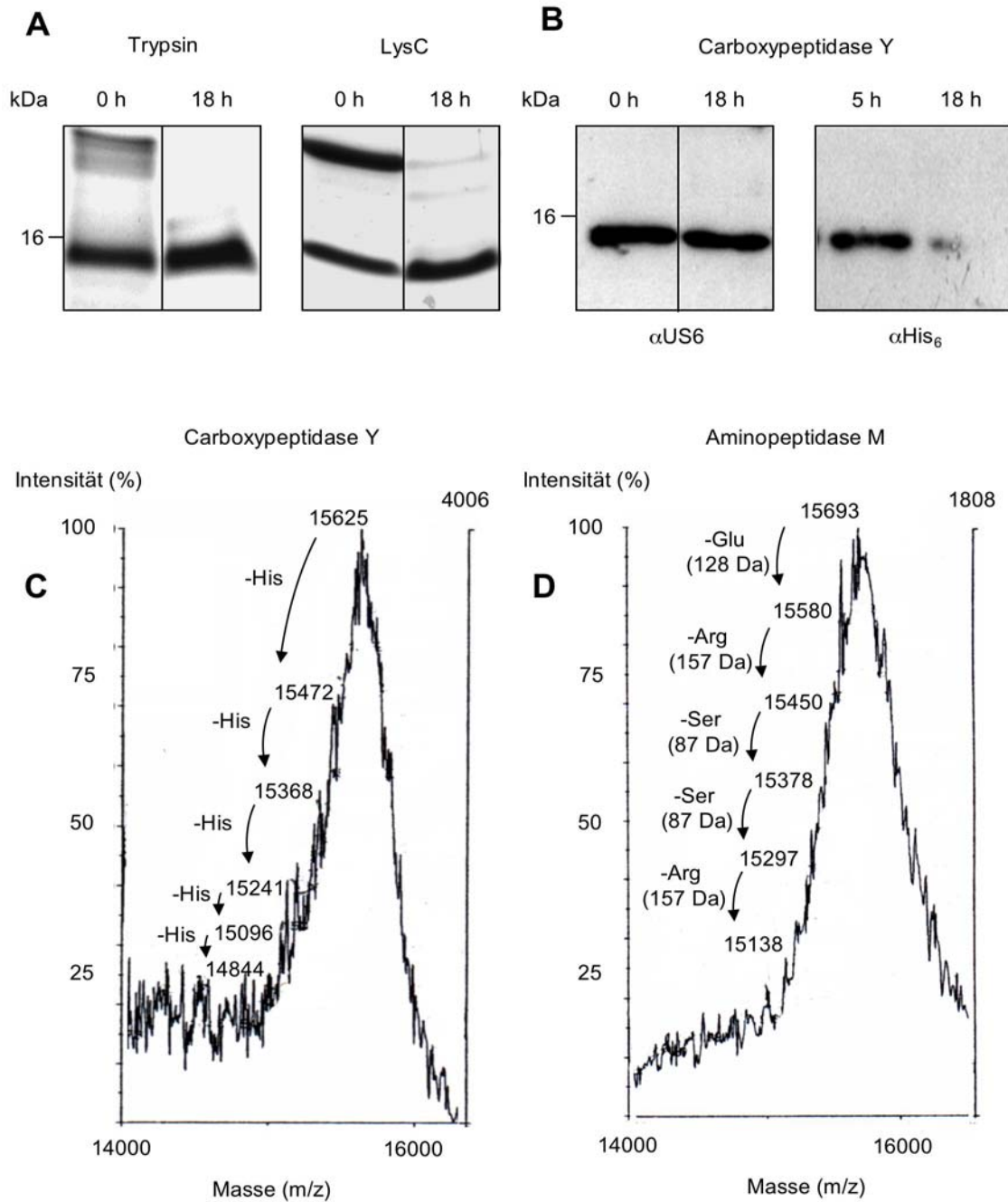
Weiterhin wurden mit dem *in vitro* renaturiertem US6(20-146) CD-spektroskopische Messungen durchgeführt, um Aufschluß über die Sekundärstruktur des Proteins zu erhalten. Die CD-Spektren deuten auf  $19\pm 5\%$   $\alpha$ -helikalen Anteil,  $20\pm 6\%$  antiparallele und  $5\pm 1\%$  parallele  $\beta$ -Faltblätter,  $27\pm 2\%$   $\beta$ -Schleifen und  $33\pm 1\%$  ungeordnete Bereiche. Dabei handelt es sich um renaturiertes Protein, welches vor und während der Rückfaltung nicht reduziert wurde. In einem alternativen Ansatz wird das Protein vor oder während der Rückfaltung reduziert. Anschließend wurden auch hier CD-spektroskopische Untersuchungen vorgenommen. Die erhaltenen CD-Spektren zeigen in diesem Fall ein unstrukturiertes Protein.



**Abbildung 19: CD-spektroskopische Analyse von US6(20-146)**

Rückgefaltetes US6 wird einer CD-spektroskopischen Analyse unterzogen (3.2.19). Das Protein weist Spektren auf, die auf Sekundärstruktur schließen lassen (durchgehende Linie). Der kalkulierte Anteil an Sekundärstruktur enthält  $19\pm 5\%$   $\alpha$ -Helix,  $20\pm 6\%$  antiparallele und  $5\pm 1\%$  parallele  $\beta$ -Faltblätter,  $27\pm 2\%$   $\beta$ -Schleifen und  $33\pm 1\%$  ungeordnete Bereiche. Wird das Protein vor oder während der Rückfaltung reduziert, ist es nach der Renaturierung unstrukturiert (gestrichelte Linie).

Bei globulären Proteinen können Schnittstellen bestimmter Proteasen aufgrund der Proteinfaltung verdeckt sein. Deshalb wurde US6(20-146) in mehreren Ansätzen mit verschiedenen Endo- und Exoproteasen inkubiert (3.2.15). Zu bestimmten Zeitpunkten werden den Ansätzen Aliquots entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.



**Abbildung 20: Analyse von US6(20-146) mittels proteolytischer Degradation**

Proteine mit einer globulären Faltung sind weniger sensitiv gegenüber proteolytischer Degradation als Proteine mit einer Vielzahl flexibler Bereiche. A) Proteolytischer Verdau von US6 mit Trypsin und LysC. US6 wird bei 4°C in Anwesenheit von Trypsin oder LysC bis zu 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Reaktion gestoppt und mittels oxidativer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion erfolgt mittels Coomassie-Färbung. In der Probe vorhandenes Dimer wird durch Trypsin bzw. LysC degradiert, während monomeres US6 der Proteolyse widersteht. B) Proteolytischer Abbau des C-terminalen Anhangs aus sechs Histidinresten. US6(20-146) wird für 18 Stunden mit Carboxypeptidase Y bei 4°C inkubiert. Aus dem Ansatz entnommene Proben werden mittels reduzierender SDS-PAGE und anschließender Immundetektion untersucht. Die Detektion des Proteins erfolgt sowohl mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von US6 (An9218), als auch mit



einem Antikörper gegen den C-terminalen Affinitätsanhang. Das Protein kann mit dem Antikörper An9218 vor bzw. nach der Inkubation mit Carboxypeptidase Y detektiert werden. US6 ist nach der Proteolyse mit Carboxypeptidase Y mit einem Antikörper gegen den Affinitätsanhang nur schwach nachweisbar. C) Massenspektrometrische Untersuchungen nach der Degradation mit Carboxypeptidase Y. Im Spektrum lassen sich neben dem intakten Protein auch die, um mehrere Histidinreste verkürzten, Degradationsprodukte erkennen. D) Massenspektrometrische Untersuchung nach Degradation von US6(20-146) mit Aminopeptidase M. Die Messung deutet darauf hin, daß durch die Degradation mit Aminopeptidase N-terminale Aminosäuren entfernt werden können.

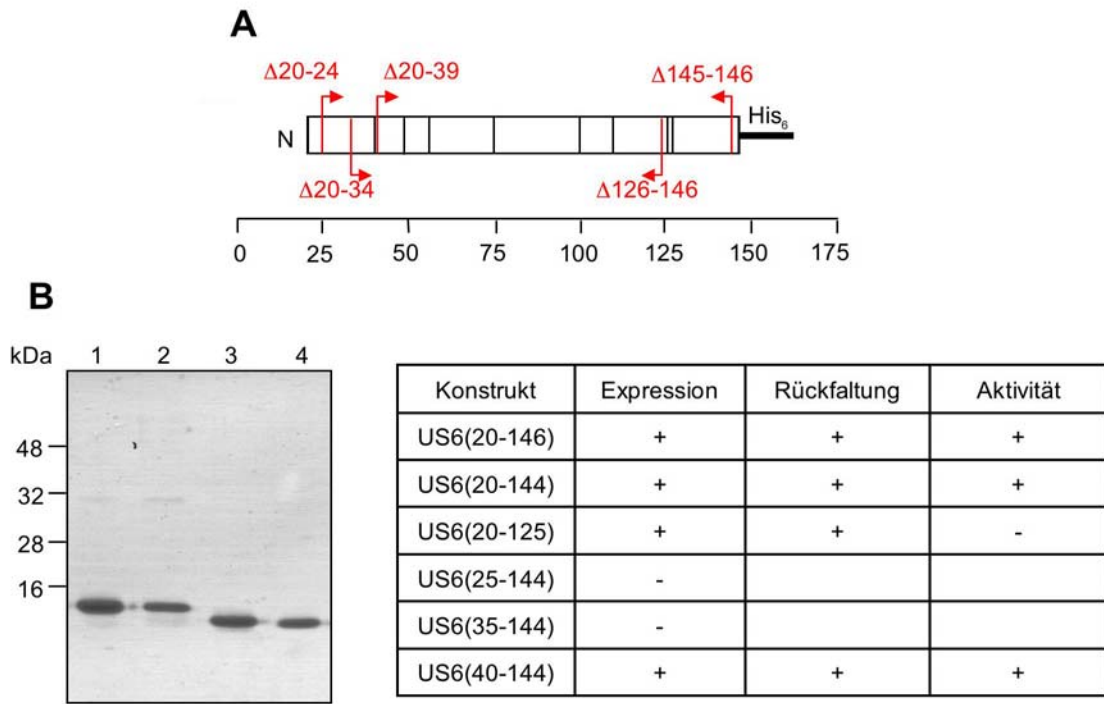
Endoproteasen wie Trypsin oder LysC bauen vorhandenes Dimer (siehe 4.2) vollkommen ab. In einem oxidativen Gel anfärbbares Dimer ist nach einer üN-Inkubation nicht mehr zu detektieren. Das monomere Protein hingegen scheint proteolytisch nicht abgebaut zu werden. In dem Gel lassen sich vor und nach der Proteolyse äquivalente Mengen an monomerem Protein anfärben.

Massenspektrometrische Analysen deuten darauf hin, daß Exopeptidasen schrittweise Aminosäuren am N- und C-Terminus des Proteins entfernen. Im Spektrum lassen sich neben dem intakten Protein auch die um ein bis mehrere Aminosäuren verkürzten Degradationsprodukte erkennen. Durch die Aminopeptidase M lässt sich eine Degradation von bis zu 5 N-terminalen Aminosäuren ( $E_{20}RSSR_{24}$ ) feststellen. Dementsprechend verringert sich im Rahmen des Fehlers die molekulare Durchschnittsmasse des Proteins um die Masse der jeweils entfernten Aminosäure. Durch die Carboxypeptidase Y wird der C-terminale Affinitätsanhang entfernt. Mit jedem entfernten Histidinrest verringert sich im Rahmen des Fehlers entsprechend die molekulare Durchschnittsmasse des Proteins. Dies kann neben der Massenspektrometrie auch mittels Immundetektion gezeigt werden. Nach der üN-Inkubation mit Carboxypeptidase Y ist monomeres US6(20-146) nicht mehr mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Affinitätsanhang. Dies zeigt, daß dieses Epitop durch die proteolytische Degradation zerstört wird.

#### **4.5 Reinigung und Rückfaltung der US6-Mutanten**

Um die aktive Domäne von US6 zu identifizieren und eventuell lösliches US6 zu erhalten, wurden sowohl C-terminale als auch N-terminale Deletionen eingeführt. Interessant hierbei ist bei dem Konstrukt US6(40-144), daß durch die Deletion der 20 N-terminalen Aminosäuren 20-39 das Cystein an der Position 39 ebenfalls entfernt worden ist. Diese Aminosäure kann an der Ausbildung eines

intramolekularen Disulfid-Netzwerks beteiligt sein. Die Deletion kann Aufschluss über den Beitrag dieser Aminosäure zur Struktur und Funktion von US6 erbringen. Namentlich wurden auf diese Weise die Konstrukte US6(20-144), US6(20-125), US6(25-144), US6(35-144) und US6(40-144) generiert.

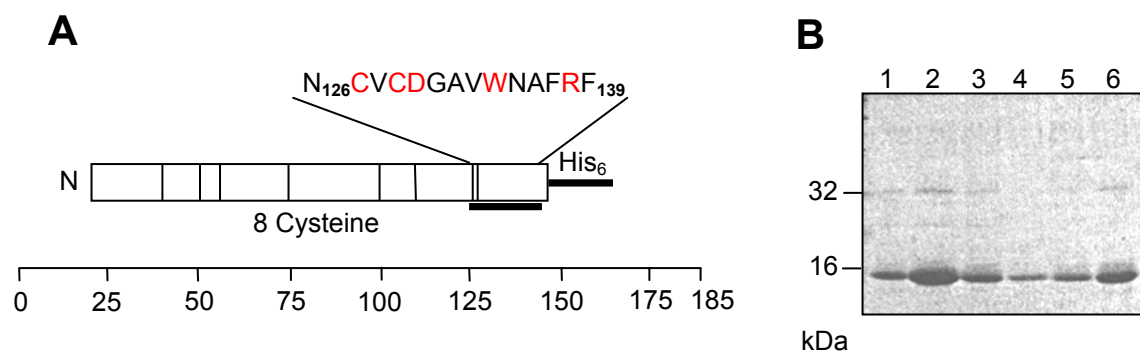


**Abbildung 21: Heterologe Expression der US6-Deletionsmutanten**

A) Schematische Darstellung der ER-luminalen Domäne von US6. Rot angedeutet sind die deletierten Aminosäurereste. N-terminal wurden die ersten 5, 15 und 20 Aminosäuren deletiert. C-terminal wurden die letzten 2 und 21 Aminosäuren entfernt. B) Rückfaltung von Deletionsmutanten. Die Konstrukte US6(20-146) (1), US6(20-144) (2), US6(20-125) (3) und US6(40-144) (4) wurden aus *inclusion bodies* gereinigt und renaturiert. Die erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Proteine im Gel mittels Coomassiefärbung detektiert. Die Konstrukte US6(20-146) und US6(20-144) erscheinen im oxidativen Gel als monomere Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 16 kDa. Die Konstrukte US6(20-125) und US6(40-144) weisen entsprechend den Deletionen am N- und C-Terminus eine größere elektrophoretische Mobilität auf. Sie zeigen ein apparantes Molekulargewicht von etwa 14 kDa. Abschließend wird in Form einer Tabelle ein Vergleich zwischen den generierten Verkürzungen gezogen. Die Konstrukte US6(25-144) und US6(35-144) lassen sich in *E. coli* nicht exprimieren. Die Mutanten US6(20-146), US6(20-144), US6(20-125) und US6(40-144) können in *E. coli* exprimiert und renaturiert werden, wobei US6(20-125) nach der Rückfaltung keine inhibitorische Aktivität aufweist (siehe 4.6).

Es zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Konstrukten US6(20-144), US6(20-125) und US6(40-144) (siehe 9.4) die beiden Varianten US6(25-144) und US6(35-144) von den Zellen nicht exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Nach der Expression bei 37°C liegen alle Deletionsmutanten in Form von *inclusion bodies* vor. Ein Teil des Konstrukts US6(20-125) erscheint in der löslichen, zytoplasmatischen Fraktion, lässt sich jedoch nicht aus dieser reinigen (siehe 9.5). Daher wurde diese Mutante wie die anderen exprimierten Konstrukte aus *inclusion bodies* gereinigt und renaturiert.

In früheren Studien wurde gezeigt, daß die ER-luminalen Domäne hinreichend für die inhibitorische Aktivität des Proteins ist (Ahn et al., 1997). Parallel zu dieser Arbeit wurde durch *in vivo*-Studien nachgewiesen, daß die C-terminale Region dieser Domäne ein für die Funktion kritischer Bereich ist (Hewitt et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden parallel zur Deletion der Aminosäuresequenz N<sub>126</sub>CVCDGAVWNAFRF<sub>139</sub> auch Punktmutationen in diese Region eingeführt und die betreffenden Mutanten in *E. coli* heterolog exprimiert.



**Abbildung 22: Expression und Rückfaltung von US6-Punktmutanten**

A) Schematische Darstellung der exprimierten Punktmutanten. Die mutierten Aminosäurereste sind rot hervorgehoben. B) Analyse der exprimierten Punktmutanten. Nach Rückfaltung der Konstrukte wurden diese mittels oxidativer SDS-PAGE analysiert (Durchführung siehe 3.2.2, 3.2.3 und 3.2.7). Die Proteine im Gel wurden mittels Coomassie-Färbung detektiert. Alle Konstrukte zeigen ein apparentes Molekulargewicht von ca. 16 kDa und erscheinen im SDS-haltigen Gel zum größten Teil als monomeres Protein. Es ist ausserdem eine kleine Fraktion als Dimer bei ca. 32 kDa zu erkennen. Das Gel stellt eine Auswahl folgender Konstrukte dar: US6(20-146) Wildtyp (1), C127S (2), C129S (3), D130A (4), W134A (5) und R138A (6).

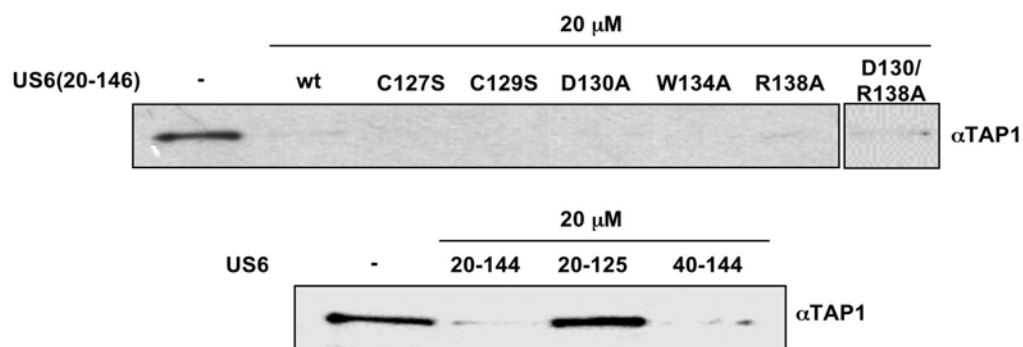
Es wurden folgende Punktmutationen eingeführt: C127S, C129S, C127/129S, D130A, W134A, R138A und D130/R138A. Mit der Mutagenese von US6(20-146) wurde auch eine zweite Zielsetzungen verfolgt. So besteht die Möglichkeit, daß die

Mutationen zur Expression von löslichem US6 führt. Das Protein könnte dann als lösliches Protein aus dem Zytoplasma von *E. coli* gereinigt werden.

Es zeigte sich jedoch, daß nach Expression bei 37°C alle Punktmutanten in Form von *inclusion bodies* vorliegen. Zudem weist die Mutante C127/129S eine so geringe Expressionsrate auf, daß von einer Reinigung dieser Mutante abgesehen wurde (Daten nicht gezeigt). Expression, Reinigung und Renaturierung der Punktmutanten erfolgte analog zu der des Wildtypproteins (Durchführung siehe 3.2.2 und 3.2.3).

#### 4.6 Analyse der US6-Mutanten auf ihre inhibitorische Aktivität

Nach Reinigung und Rückfaltung der US6-Mutanten wurden diese auf ihre inhibitorische Aktivität hin überprüft. Für die nachfolgende Analyse wurde ein Nukleotidbindungsassay (siehe 3.2.14) durchgeführt.



**Abbildung 23: Analyse der Aktivität verschiedener US6-Mutanten**

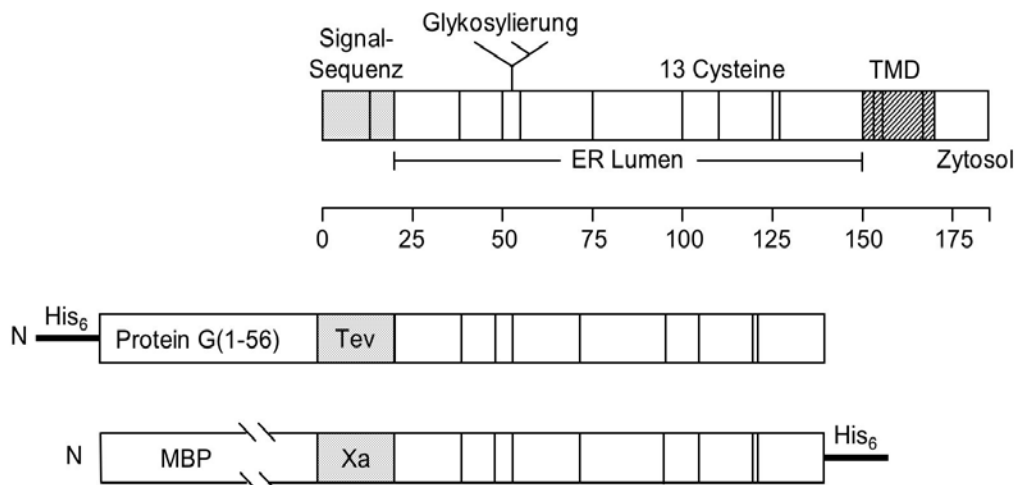
Die getesteten US6-Mutanten wurden aus *inclusion bodies* gereinigt und rückgefaltet. Deren inhibitorische Aktivität wurde mit dem Nukleotidbindungsassay untersucht. Die Elutionsfraktionen wurden mittels Western-Blot gegen TAP1 analysiert. Sowohl in Anwesenheit des Wildtypproteins als auch bei allen Punktmutanten ist die ATP-Bindung von TAP inhibiert. In Abwesenheit von US6 bindet TAP an die ATP-Agarose und lässt sich durch Zugabe von ATP spezifisch von der Säule eluieren. Bei den Deletionsmutanten inhibieren zusätzlich die Konstrukte US6(20-144) und US6(40-144) die ATP-Bindung von TAP. Die Mutante US6(20-125) hat keinen Einfluß auf die ATP-Bindung des Transporters.

Es zeigte sich, daß alle eingesetzten Punktmutanten die ATP-Bindung von TAP inhibieren. Während TAP in Abwesenheit von US6 an die ATP-Agarose bindet, ist in Anwesenheit jeder der getesteten US6-Varianten kein TAP in den Eluatsfraktionen detektierbar. Von den generierten Deletionsmutanten ließen sich

die Konstrukte US6(20-144), US6(40-144) und US6(20-125) einsetzen. Hier zeigte sich, daß die Konstrukte (20-144) und US6(40-144) die ATP-Bindung von TAP blockieren. Das Konstrukt US6(20-125) hatte jedoch keinen Einfluß auf die ATP-Bindung des Transporters.

#### 4.7 Expression und Reinigung der US6-Fusionskonstrukte

Um die Löslichkeit eines heterolog exprimierten Proteins zu erhöhen, kann dieses mit einem Fusionspartner vereinigt werden. Dieser Partner weist in diesen Fällen eine gute Faltungseffizienz im Expressionwirt auf und ist auch in höheren Konzentrationen in der löslichen Fraktion vorzufinden. In der Literatur sind Beispiele für Fusionen von Proteinen beschrieben, bei denen anschließend die Struktur aufgeklärt werden konnte (Chao et al., 2003; Zhou et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Maltosebindeprotein (MBP) aus *E. coli* und die N-terminale Domäne von Protein G als Fusionspartner für die ER-luminale Domäne von US6 gewählt.



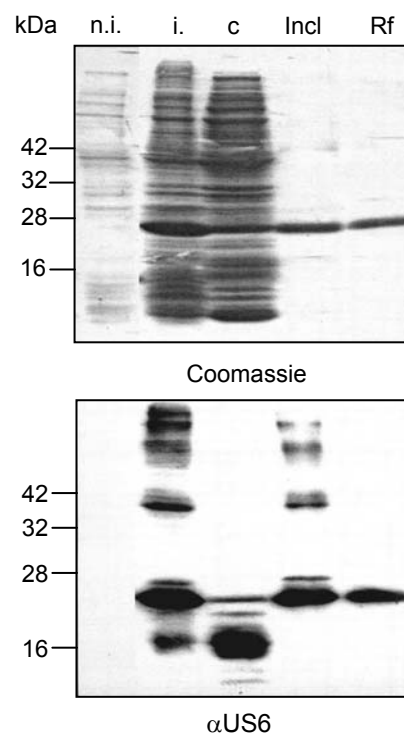
**Abbildung 24: Schematische Darstellung der US6-Fusionskonstrukte**

Die ER-luminale Domäne von US6 wurde C-terminal an das Maltosebindeprotein aus *E. coli* bzw. mit der N-terminalen Domäne von Protein G fusioniert. Das Konstrukt US6(20-146) ist mit dem jeweiligen Fusionspartner durch einen *linker* verbunden, welcher die Erkennungs- bzw. Schnittstelle einer spezifischen Protease enthält. In diesem Fall ist das für die Fusion mit Protein G die *Tev*-Protease und für MBP der Gerinnungsfaktor *Xa*. Beide Fusionsproteine haben einen Anhang von sechs Histidinresten zum Zweck der Reinigung. Bei Protein G-US6 ist dieser am N-Terminus, bei MBP-US6 C-terminal lokalisiert.

Es wurden verschiedene Expressionsstrategien verfolgt. Einerseits wurde das Fusionskonstrukt Protein G-US6(20-146) zytoplasmatisch exprimiert. Zum anderen wurde MBP-US6 mit einer OmpA-Signalsequenz versehen, damit dieses nach der Expression ins Periplasma sezerniert wird. Vorteil dieser Expressionsmethode ist das oxidative Redoxpotential des Periplasmas und die damit verbundene Ausbildung von Disulfiden. Die Gesamtausbeute an exprimiertem Protein ist im Vergleich zur zytoplasmatischen Expression geringer, da der gesamte Prozess durch den Transport über die Zellmembran in das Periplasma limitiert wird.

#### Abbildung 25: Reinigung und Renaturierung von Protein G-US6

Nach Induktion der Expression des Fusionskonstruktes erscheint im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE eine dominante Bande bei einem apparenten Molekulargewicht von ca 26 KDa. Dieses Protein ist mit einem US6-spezifischen Antikörper nur in induziertem Zellmaterial detektierbar (i.). Ein Teil des exprimierten Fusionsproteins liegt löslich im Zytoplasma vor. Dieses Protein wird im Zytoplasma jedoch wieder degradiert (c). Vor proteolytischem Abbau geschützt scheint das Fusionskonstrukt nur in Form von *inclusion bodies* zu sein (Incl). Degradationsprodukte können in dieser Fraktion nicht detektiert werden. Das Protein lässt sich aus der unlöslichen Fraktion reinigen und renaturieren (Rf).



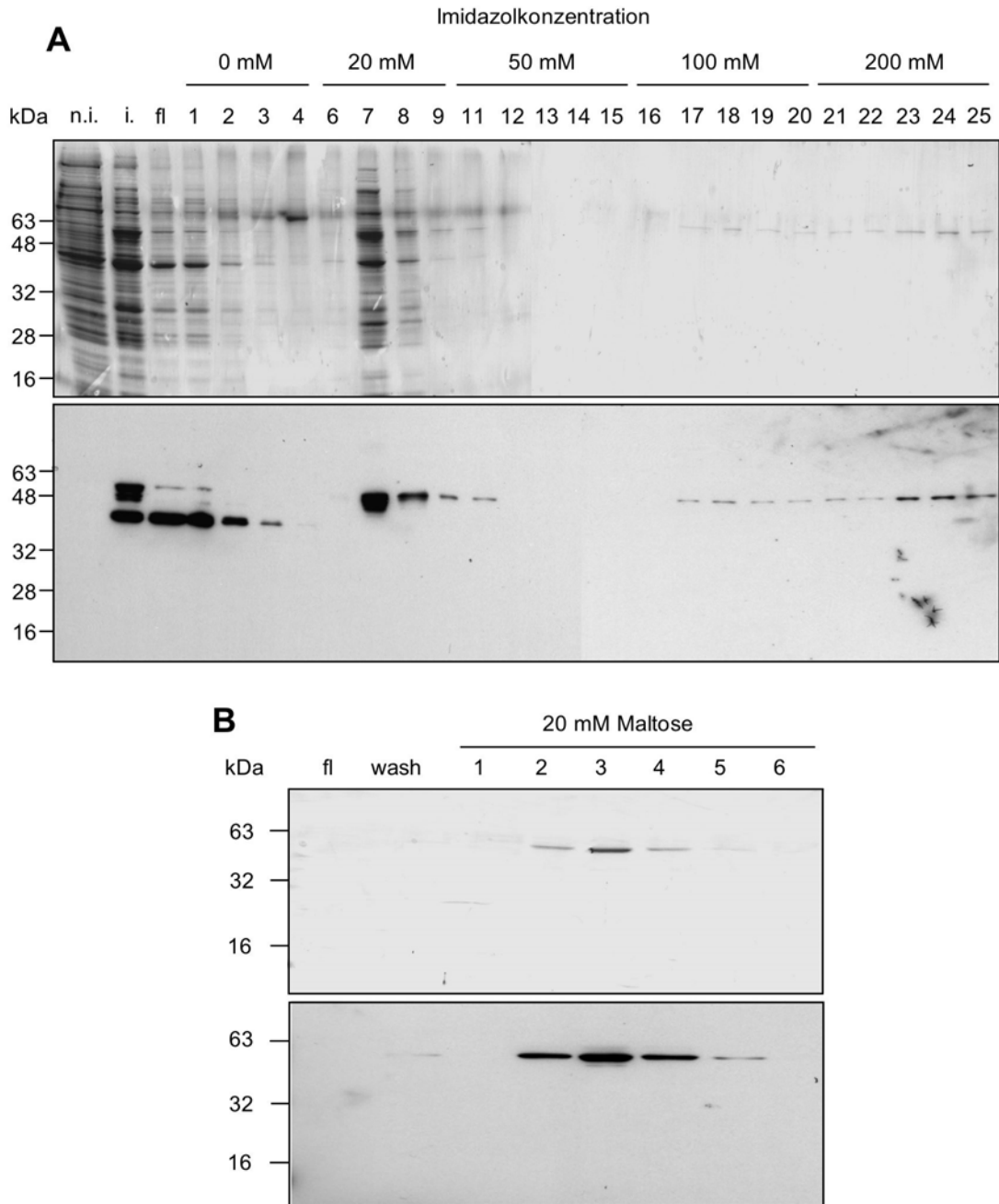
Es zeigte sich, daß das Fusionskonstrukt Protein G-US6 im Zytoplasma zum Teil löslich auftritt. Diese lösliche Fraktion des Fusionproteins wird jedoch wieder degradiert. Vor proteolytischem Abbau geschützt ist nur das Fusionsprotein, welches in Form unlöslicher *inclusion bodies* vorliegt. Protein G-US6 lässt sich aus *inclusion bodies* auf die gleiche Weise reinigen und renaturieren wie US6(20-146). Jedoch wurde diese Expressionsmethode wieder aufgegeben, da diese gegenüber der Expression des Konstrukts US6(20-146) keinen Vorteil bietet. Das Protein muss auch in diesem Fall aus *inclusion bodies* gewonnen werden und der

Gesamtanteil von US6 an heterolog exprimiertem Protein ist aufgrund des Fusionspartners geringer.

Das Fusionsprotein MBP-US6(20-146) wird nach Induktion der Expression mit IPTG in das Periplasma sezerniert. Auch in diesem Kompartiment ist das Protein der Degradation ausgesetzt. Dennoch wurde versucht, das Protein aus dem Periplasma zu reinigen (Durchführung siehe 3.2.4).

Die Reinigung erfolgt über zwei Chromatographieschritte. Einer Metallchelat-Affinitätschromatographie folgt die Elution von einem Amylosematerial. Der zweite Chromatographieschritt soll eine abschließende Reinigung und Ankonzentrierung des Proteins bewirken. Das gereinigte Protein wurde daraufhin mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Aus 10 l Kultur in einem Fermenter wurden auf diese Weise weniger als 1 mg Protein gereinigt. Das gereinigte Fusionsprotein weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 60 kDa auf. MBP-US6 wird nach dessen Expression wieder degradiert. Im Western-Blot können mit einem US6-spezifischen Antikörper Degradationsprodukte mit einem apparenten Molekulargewicht von 45-60 kDa nachgewiesen werden. Die meisten Degradationsprodukte binden nicht an das Säulenmaterial oder eluieren schon bei einer Konzentrationen von 20 mM Imidazol. Protein, welches bei höheren Imidazolkonzentrationen von 100 bzw. 200 mM eluiert, wird über das Amylosematerial gegeben. Dieses bindet fast vollständig an das Säulenmaterial und lässt sich spezifisch mit Maltose wieder von diesem eluieren.

Durch die Degradation des Fusionsproteins konnte dieses nur schwach an die  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-Säule binden. Der Histidinanhang befindet sich am C-Terminus. Die Maltosebindung des N-terminalen Fusionspartners war hingegen durch die Degradation nicht beeinflusst. Das Fusionsprotein scheint somit vom C-Terminus ausgehend degradiert zu werden.



**Abbildung 26: Reinigung von MBP-US6 aus dem Periplasma**

Das Fusionskonstrukt MBP-US6 wurde in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert und aus dem Periplasma gereinigt. Die Reinigung erfolgte über Metallchelate-Affinitätschromatographie und anschließend über die Bindung des Proteins an einem Amylosematerial. Die einzelnen Schritte wurden mittels SDS-PAGE (jeweils oben) und Western-Blot (jeweils unten) analysiert. A) Erster Reinigungsschritt über Metallchelate-Affinitätschromatographie. Nach Induktion der Proteinexpression kann MBP-US6 im Zelllysat nachgewiesen werden (i.). Ein großer Teil des Proteins liegt jedoch degradiert vor, welcher sich nach Auftrag des Periplasmas im Durchfluß (fl) befindet oder in Waschschritten bei 10 bzw. 20 mM Imidazol von der Säule eluiert (Fraktionen 1-9). Nicht degradiertes Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 60 kDa eluiert bei Imidazolkonzentrationen von 100-200 mM (Fraktionen 16-25). B) Zweiter Reinigungsschritt über ein

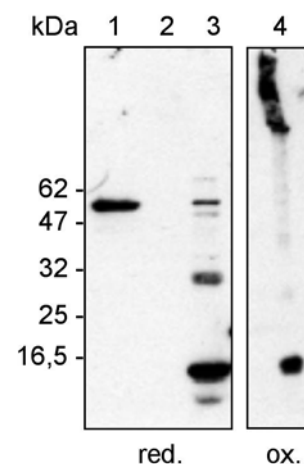


Amylosematerial. Die Eluatsfraktionen 16-25 wurden vereinigt und über ein Amylosematerial gegeben. Das Protein bindet fast vollständig an das Säulenmaterial und lässt sich spezifisch durch Maltose wieder von diesem eluieren.

Das gereinigte Fusionsprotein wurde daraufhin mit Faktor Xa gespalten. Nach Abspaltung des Maltosebindeproteins von US6 zeigte sich jedoch, daß US6 präzipitiert. Aus diesem Grund wurde nur das Fusionsprotein auf seine inhibitorische Aktivität hin überprüft (siehe 4.8). Unabhängig davon wurde diese Expressionsstrategie verworfen, da auf diese Weise kein lösliches US6 erhalten werden konnte.

#### **Abbildung 27: Spaltung des Fusionsproteins MBP-US6 mit Faktor Xa**

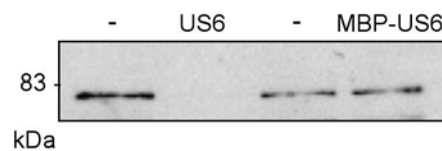
Gereinigtes MBP-US6 wird mittels Faktor Xa gespalten, um US6 aus dem Fusionsprotein freizusetzen. Das ungespaltete Protein weist ein apparentes Molekulargewicht von 60 kDa auf und lässt sich mit einem US6-spezifischen Antikörper detektieren (1). Nach Spaltung des Fusionsproteins wird die lösliche von der unlöslichen Fraktion durch Ultrazentrifugation separiert und mittels Western-Blot analysiert. Nach der Spaltung kann US6 nicht in der löslichen Phase detektiert werden (2). US6 befindet sich in der unlöslichen Fraktion, die unter reduzierenden und oxidativen Bedingungen analysiert wurde (3 und 4). Das Protein erscheint zum Teil als monomeres Protein mit einem apparentem Molekulargewicht von ca. 16 kDa. Eine Oligomerisierung und Bildung größerer Aggregate tritt ebenfalls auf.



## 4.8 Analyse von MBP-US6 auf seine inhibitorische Aktivität

Da das abgespaltene US6 unlöslich war, wurde nur mit dem Fusionsprotein MBP-US6 ein Nukleotidbindungsassay durchgeführt (siehe 3.2.14). Die Eluatsfraktionen werden nachfolgend mittels Western-Blot und Detektion mit dem TAP1-spezifischen Antikörper 148.3 analysiert.

Im Gegensatz zu dem aus *inclusion bodies* renaturierten US6(20-146), kann das Fusionsprotein die ATP-Bindung von TAP nicht inhibieren. Während in Anwesenheit von US6(20-146) TAP nicht mehr an die ATP-Agarose bindet, kann der Transporter bei Anwesenheit von MBP-US6(20-146) in der Eluatsfraktion nachgewiesen werden.



**Abbildung 28: Analyse der inhibitorischen Aktivität von MBP-US6**

Das aus dem Periplasma gereinigte Fusionsprotein MBP-US6(20-146) wurde mittels des Nukleotidbindungsassays auf dessen inhibitorische Aktivität hin getestet. Die Elutionsfraktionen wurden mittels Detektion mit einem anti-TAP1-Antikörper analysiert. In Anwesenheit von US6(20-146) bindet TAP nicht an die ATP-Agarose. Das Fusionsprotein hat hingegen keinen Einfluß auf die ATP-Bindung von TAP.

## 4.9 Inhibition der Kreuzpräsentation durch US6

Dendrische Zellen nehmen antigene Strukturen aus ihrer Umgebung endozytotisch auf und schließen diese in Phagosomen ein. Endozytierte Proteine werden nach der Verschmelzung des Phagosoms mit Lysosomen proteolytisch abgebaut und die resultierenden Peptide auf MHC II geladen. An der Zelloberfläche werden die gebildeten MHC II-Peptid-Komplexe CD<sup>4+</sup> T-Lymphozyten präsentiert.

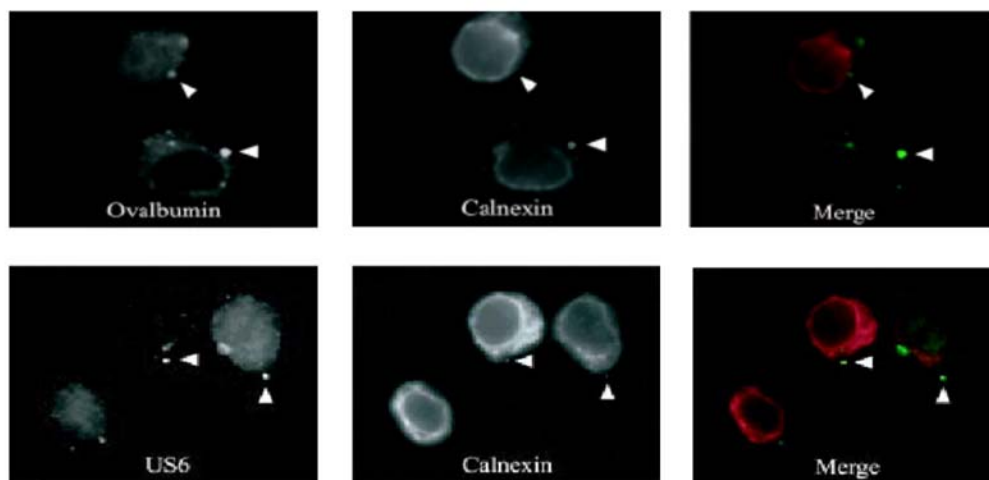
Alternativ können die generierten Peptide an der Oberfläche dendritischer Zellen auch über MHC I präsentiert werden (Ackerman & Cresswell, 2003a; Guermonprez et al., 2003; Houde et al., 2003; Robson et al., 2003; Utsugi-Kobukai et al., 2003). Dieser Prozess soll TAP-abhängig sein. (Houde et al., 2003; Robson et al., 2003; Utsugi-Kobukai et al., 2003). Im Rahmen einer Kooperation mit Anne L. Ackerman und Prof. Dr. Peter Cresswell (Yale University) wurde heterolog exprimiertes US6 eingesetzt, um diese Theorie zu überprüfen. In diesen Experimenten konnte somit die inhibitorische Aktivität von heterolog exprimiertem US6 auch *in vivo* analysiert werden.

Für die durchgeführten Arbeiten wurden humane KG-1-Zellen verwendet (Koeffler & Golde, 1978). Diese sind Myelomzellen, welche hämatopoetischen Vorläuferzellen entstammen. KG-1-Zellen können sich durch Stimulation zu Makrophagen und dendritischen Zellen entwickeln. Die eingesetzten KG-1-Zellen wurden mit dem murinen MHC I-Molekül H2-K<sup>b</sup> transfiziert. Die transfizierten KG-1-Zellen wurden mit rekombinantem US6 vorbehandelt, damit diese den Inhibitor endozytieren. Gleichzeitig wurden die Zellen mit Ovalbumin (OVA) bzw. Rinderserumalbumin (BSA) inkubiert. OVA und BSA werden in den dendritischen Zellen nach deren Aufnahme aus dem Medium der Antigenprozessierung zugeführt.

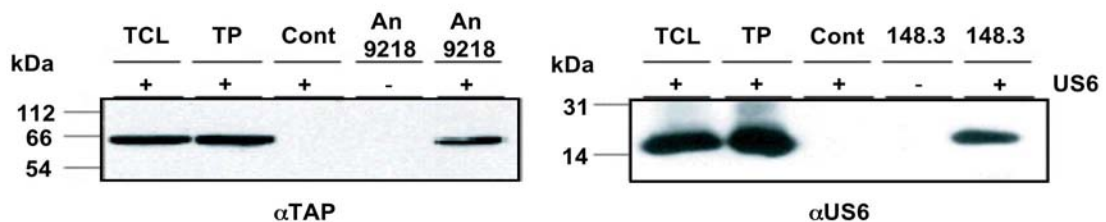
Es wird angenommen, daß die gebildeten Phagosomen mit ER-Vesikeln fusionieren, welche ER-Faktoren wie die ER-Proteinfaltungsmaschinerie oder den TAP-Komplex enthalten. Antigene Proteine sollen über den Sec61-Komplex aus den Phagosomen in das Zytoplasma gelangen. Dort werden diese durch das Proteasom degradiert und die resultierenden Peptide über TAP zurück in das Phagosom transportiert. Diese Peptide werden daraufhin auf MHC I-Moleküle geladen und an der Zelloberfläche präsentiert (Ackerman et al., 2003b; Guermonprez et al., 2003).

Es zeigte sich, dass heterolog exprimiertes US6 ebenfalls von dendritischen Zellen endozytotisch inkorporiert und in Phagosomen eingeschlossen wird. Nach der Fusion des Phagosoms mit ER-Vesikeln interagiert US6 mit TAP. Mittels indirekter Immunfluoreszenz konnte die Co-Lokalisation von US6 und OVA in Phagosomen nachgewiesen werden. Neben diesen Proteinen wurde unter anderem auch das ER-ständige Chaperon Calnexin in Phagosomen detektiert. Weiterführend wurde durch Immunpräzipitation mit US6- und TAP1-spezifischen Antikörpern die Interaktion von US6(20-146) mit TAP gezeigt.

### A



### B



**Abbildung 29: Interaktion von rekombinantem US6 mit TAP in Phagosomen**

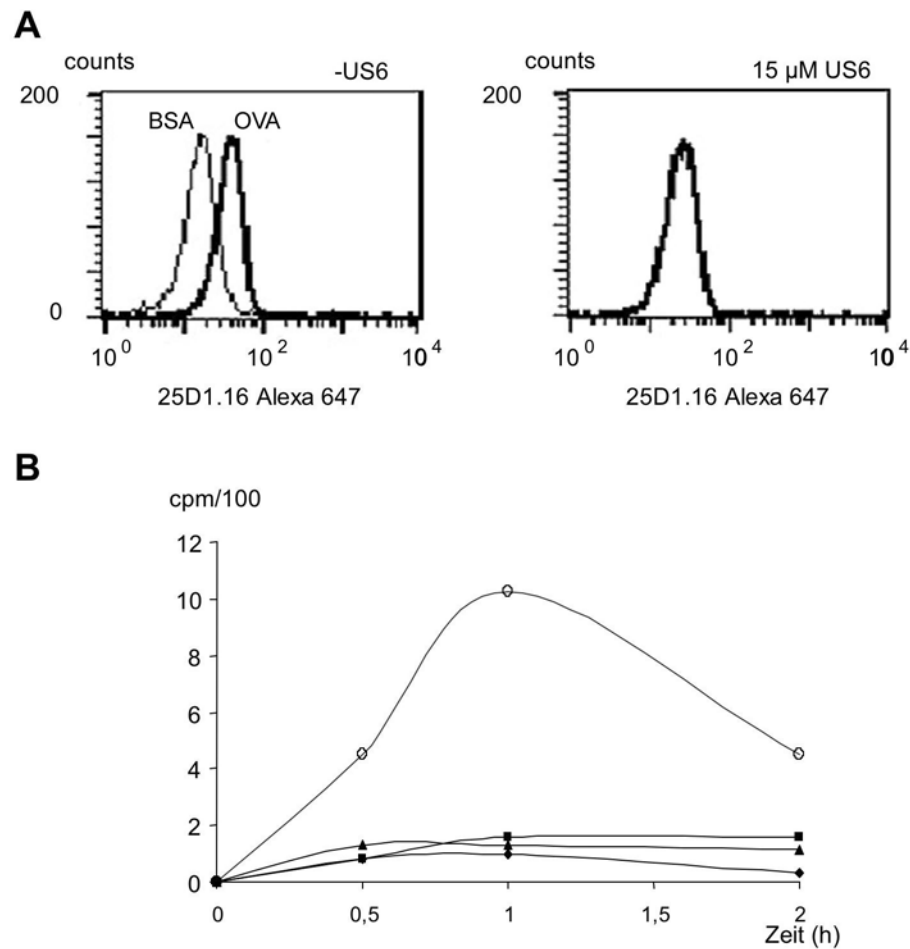
US6(20-146) und Ovalbumin (OVA) werden von dendritischen Zellen inkorporiert und in Phagosomen eingeschlossen. In diesem Kompartiment interagiert der Inhibitor mit TAP. A) Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Co-Lokalisation von US6, OVA und dem ER-ständigen Chaperon Calnexin gezeigt. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit US6(20-146) und OVA inkubiert und anschließend fixiert. Die Proben wurden daraufhin mit spezifischen Antikörpern gegen US6 bzw. Calnexin (Diedrich et al., 2001) inkubiert. Die Detektion der Erstantikörper erfolgte über einen Alexa Fluor 488-konjugiertem Zweitantikörper. Zur Visualisierung von inkorporiertem OVA wurde dieses zuvor mit Fluoreszein konjugiert. Die Immunfluoreszenz wurde durchgeführt nach (Ackerman &

Cresswell, 2003a; Hammond et al., 1998). B) Assoziation von rekombinantem US6 mit TAP. Mittels Immunpräzipitation mit einem US6- (links) bzw. TAP1-spezifischen Antikörper (rechts) wurde die Interaktion von US6(20-146) mit TAP gezeigt. Nach der Immunpräzipitation wurden die Proben mittels Western-Blot gegen US6 (An 9218) und TAP1 (148.3) analysiert. US6 und TAP konnten sowohl in ganzen Zellen (TCL) als auch in Phagosomen (TP) nachgewiesen werden. Mit einem Kontrollserum konnte weder US6 noch TAP präzipitiert werden (Cont.). Eine Co-Präzipitation beider Proteine ist nur in Anwesenheit von US6 nachzuweisen (+). Die Präparation der Phagosomen ist beschrieben in (Desjardins et al., 1994; Gagnon et al., 2002), die nachfolgende Immunpräzipitation wurde durchgeführt nach (Ackerman & Cresswell, 2003a).

Die Präsentation des MHC I-gebundenen Peptids an der Zelloberfläche wurde mittels FACS-Analyse überprüft (Ackerman & Cresswell, 2003a; Ackerman et al., 2003b). Die Detektion erfolgte über den monoklonalen und Alexa-Fluor-647-konjugiertem Antikörper 25D1.16, der gegen SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-Komplexe gerichtet ist (Porgador et al., 1997). In Anwesenheit von US6(20-146) wird die Kreuzpräsentation inhibiert. Die Aufnahme von BSA führt nicht zur Präsentation des Peptids SIINFEKL auf der Oberfläche der dendritischen Zellen.

Es konnte gezeigt werden, daß rekombinantes US6 die MHC I-vermittelte Kreuzpräsentation des Peptids OVA(S<sub>257</sub>IIINFEKL<sub>264</sub>) inhibiert. Nachfolgend wurde der Einfluß des Inhibitors auf die Prozessierung des Peptids nef7X (HIV-1 nef(68-87)) analysiert. Dieses Peptid besteht aus 21 Aminosäuren und enthält das sogenannte nef7B-Epitop (<http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/Nef.html>). Dieses Epitop wird durch die Antigenprozessierung aus dem Peptid freigesetzt. Das Peptid nef7X wurde mit <sup>125</sup>I radioaktiv markiert und bei 37°C mit dendritischen Zellen inkubiert. Dieses wird von den Zellen aufgenommen und nach der Translokation in das Zytoplasma durch das Proteasom degradiert. Das resultierende nef7B-Epitop wird durch TAP in die Phagosomen transportiert und auf MHC I-Moleküle geladen. Das transportierte und auf MHC I geladene Peptid lässt sich zusammen mit dem MHC-Molekül immunpräzipitieren. Die Menge an gebundenem Peptid wurde daraufhin mit Hilfe eines  $\gamma$ -Zählers bestimmt. In Anwesenheit von US6(20-146) kann kein radioaktiv markiertes Peptid immunpräzipitiert werden. Dies deutet darauf hin, daß US6 den TAP-abhängigen Peptidtransport in die Phagosomen inhibiert. Lactacystin ist ein Inhibitor des Proteasoms. Die Anwesenheit dieses Inhibitors blockiert ebenfalls die Beladung von MHC I mit nef7B. Dies zeigt, daß die Kreuzpräsentation auch abhängig von der Degradation der aufgenommenen Proteine durch das Proteasom ist. In einem Kontrollansatz wurden HLA-A3<sup>+</sup> Epstein-Barr transformierte B-Zellen mit nef7X

inkubiert. Die B-Zellen zeigen keine Beladung von MHC I mit dem exogenen nef7B-Epitop.

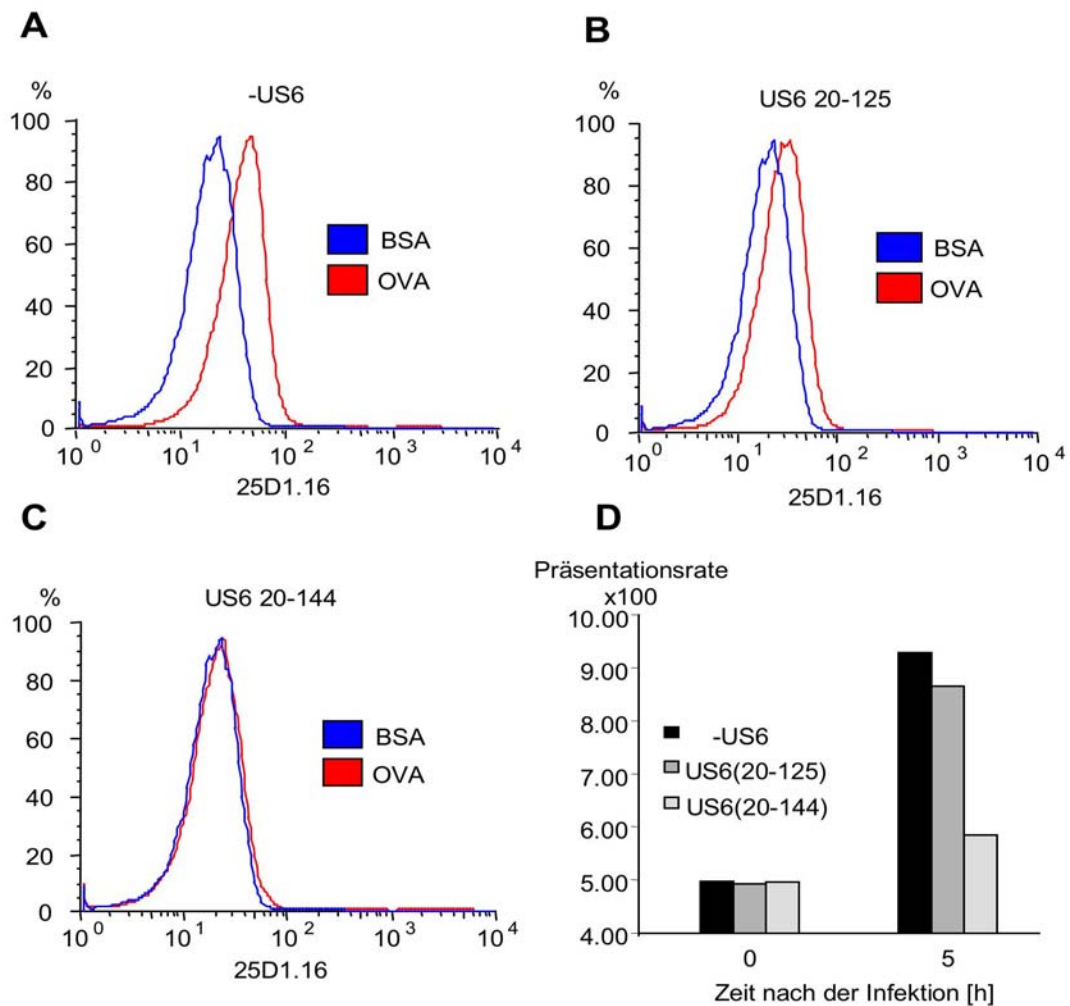


**Abbildung 30: Inhibition der MHC I-vermittelten Kreuzpräsentation**

Die exogenen Proteine werden von dendritischen Zellen endozytiert. Nach deren Prozessierung wird das antigene Peptid auf der Zelloberfläche präsentiert. A) Die MHC I-vermittelte Kreuzpräsentation wurde mittels FACS analysiert. Für die Kreuzpräsentation wurden die dendritischen Zellen mit OVA oder BSA inkubiert. In Abwesenheit von US6 (links) wird das Peptid SIINFEKL auf den Zellen präsentiert (dicke Linie). Nach der Prozessierung von BSA können keine SIINFEKL-H2-K<sup>b</sup>-Komplexe auf der Zelloberfläche detektiert werden (dünne Linie). In Anwesenheit von US6 wird die Kreuzpräsentation des Peptids blockiert (rechts). B) Analyse des Einflusses von US6 auf den Transport des Epitops nef7B in das Lumen von Phagosomen. Das radioaktiv markierte Epitop lässt sich zusammen mit MHC I immunpräzipitieren und anschließend detektieren (○). B-Zellen zeigen keine MHC I-vermittelte Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen (■). In Anwesenheit von US6(20-146) werden aufgrund der Inhibition von TAP keine Peptide auf MHC I geladen (▲). Durch die Anwesenheit von Lactacystin wird die Generierung des Epitops nef7B blockiert (◆).

Im Rahmen der Kooperation wurden die Verkürzungsmutanten US6(20-125) und US6(20-144) sowohl als rückgefaltetes Protein als auch in Form von *inclusion bodies* getestet. Der Einfluß der eingesetzten Deletionsmutanten auf die Kreuzpräsentation wurde mittels FACS-Analyse untersucht. In Anwesenheit von US6(20-144) lässt sich das Peptid SIINFEKL nicht mehr auf der Zelloberfläche detektieren. Die Präsentation des Peptids scheint somit durch US6(20-144) inhibiert zu werden. Im Vergleich dazu hat die Deletionsmutante US6(20-125) nur minimalen Einfluss auf die Präsentation des Peptids SIINFEKL.

In weiteren Experimenten wurde die Anzahl der präsentierten Peptide auf die Anzahl der präsentierten MHC I-Moleküle bezogen. Die Anzahl der auf der Zelloberfläche exponierten MHC I wurde mit dem H2-K<sup>b</sup>-spezifischen Antikörper 28-8-6S untersucht (Ozato & Sachs, 1981). Es zeigte sich auch hier, daß US6(20-144) die MHC I vermittelte Präsentation von SIINFEKL inhibiert. Im Vergleich zu der Gesamtanzahl an präsentierten H2-K<sup>b</sup> sinkt in Anwesenheit des Inhibitors der mit dem Peptid SIINFEKL beladene Anteil um ca. 85%. Im Vergleich hierzu hat die C-terminal verkürzte Variante US6(20-125) nur einen minimalen Effekt auf die Antigenpräsentation.



**Abbildung 31: Einfluß von US6-Mutanten auf die Kreuzpräsentation**

Der Einfluß der Mutanten US6(20-144) und US6(20-125) auf die Kreuzpräsentation wurde mittels FACS-Analyse untersucht. Diese Deletionsmutanten wurden den dendritischen Zellen sowohl als rückgefaltetes Protein als auch in Form von *inclusion bodies* dargeboten. A-C) Die Deletionsmutanten wurden den dendritischen Zellen in Form solubilisierter *inclusion bodies* angeboten. Endozytisiertes OVA wird von den Zellen degradiert und das prozessierte Peptid SIINFEKL auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Aufnahme und Prozessierung von BSA führt nicht zur Präsentation des Peptids SIINFEKL. Die Anwesenheit von US6(20-144) blockiert die Kreuzpräsentation. US6(20-125) hat nur einen minimalen Effekt auf die Präsentation des Peptids. D) Veränderte Darstellungsweise der Inhibitionsstudien. Für diese Versuche wurde rückgefaltetes US6(20-144) und US6(20-125) eingesetzt. Die Menge an präsentiertem SIINFEKL wurde auf die Anzahl an exponierten MHC I-Moleküle bezogen. In Anwesenheit von rückgefaltetem US6(20-144) nimmt die Präsentation des Peptids SIINFEKL bezogen auf die Gesamtmenge an präsentiertem MHC I um ca. 85% ab. Die Deletionsmutante US6(20-125) hat im Vergleich nur einen minimalen Effekt.



## 5 Diskussion

### 5.1 Expression von US6

Sowohl zur *in vitro* Analyse des molekularen Mechanismus der TAP-Inhibition als auch zur Strukturanalyse von US6 werden ausreichende Mengen an Protein benötigt. In vorangegangenen Versuchen zeigte sich, daß die Expression in Hela-Zellen ungeeignet war, da die geringen Ausbeuten an US6 die gewünschten Analysen *in vitro* nicht zuließen (Daten nicht gezeigt). Die Säugezellkultur ist zeitaufwendiger und kostspieliger. Nachfolgend wurde versucht US6 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder in Sf9-Insektenzellen heterolog zu exprimieren. Es zeigte sich jedoch, daß in *S. cerevisiae* keinerlei Expression von US6 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). In Insektenzellen wird US6 dagegen in hohen Mengen produziert. Mittels Co-Expression von US6 mit TAP in Insektenzellen konnte auch gezeigt werden, daß heterolog exprimiertes US6 den TAP-abhängigen Peptidtransport in Insektenzellmikrosomen inhibiert (Kyritsis et al., 2001). Das Protein lässt sich aber nicht aus Insektenzellen reinigen. Nach Solubilisierung des Zellmaterials befinden sich nur bei Anwesenheit von mindestens 50 mM DTT oder Jodacetamid nennenswerte Mengen an US6 in der löslichen Fraktion (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurde die ER-luminale Domäne heterolog in *E. coli* exprimiert. Entsprechend dem in Sf9-Insektenzellen exprimierten Konstrukt wurde das Konstrukt US6(20-146) gewählt. *E. coli* ist ein Bakterium und hat somit kein ER. Deshalb wurde die Signalsequenz bestehend aus den ersten 19 Aminosäuren am N-Terminus deletiert. Die Expression des Konstrukts US6(20-146) führt zur Akkumulation in Form von *inclusion bodies* (siehe 4.2). Durch Variation der Anzuchtbedingungen wurde versucht den Stoffwechsel des Expressionswirts dahingehend zu beeinflussen, daß dieser lösliches Protein produziert. Weiterhin wurde zur Expression des Proteins der *E. coli* Stamm Origami(DE3)pLysS genutzt, welcher im Zytoplasma die Bildung von Disulfidbrücken begünstigen soll.

Wird die Anzuchttemperatur verringert, so erscheint eine Stunde nach Induktion ein kleiner Teil des Proteins in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas (4.2). Dieses Protein scheint jedoch nach einer weiteren Stunde Induktion wieder degradiert worden zu sein. Weiterhin ist zu beobachten, daß die Gesamtmenge an exprimiertem US6(20-146) bei der geringeren Anzuchttemperatur abnimmt. Da die

erhaltene Menge an löslichem US6 zu gering erschien, wurde davon abgesehen US6(20-146) aus dem Zytoplasma zu reinigen. Keine der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Bedingungen führte dazu, hinreichende Mengen an löslichem US6(20-146) zu erhalten. Aus diesem Grund wurde das Protein aus *inclusion bodies* gereinigt und renaturiert. Es zeigte sich, daß US6 nach der Rückfaltung instabil ist und zur Aggregation tendiert. Das Protein konnte dennoch für nachfolgende Inhibitionsstudien eingesetzt werden.

Mit Ausnahme von US6(20-125) verhalten sich die exprimierten Punkt- und Deletionsmutanten wie das Konstrukt US6(20-146). Die Expression der einzelnen Mutanten führt ebenfalls zur Akkumulation in *inclusion bodies*. Um die inhibitorische Aktivität dieser Mutanten zu überprüfen, wurden auch diese aus *inclusion bodies* gereinigt und renaturiert. Bei einer Anzuchtstemperatur von 25°C befinden sich bis zu 20% des exprimierten US6(20-125) in der löslichen Fraktion. Obwohl es sich bei dem *E. coli* Stamm BL21 um einen Protease-defizienten Stamm handelt (Studier & Moffatt, 1986), wird in *E. coli* BL21(DE3)pLysS produziertes, lösliches US6(20-125) wieder degradiert. Das Protein lässt sich aus der zytoplasmatischen Fraktion nicht reinigen. Ein Großteil des exprimierten Proteins bindet nicht oder nur schwach an das Säulenmaterial. Entweder ist der C-terminale Affinitätsanhang aus sechs Histidinresten aufgrund der Proteinfaltung nicht zugänglich, oder der C-Terminus wurde wie bei dem Fusionsprotein MBP-US6 proteolytisch abgebaut (siehe 4.7). Ist letzteres der Fall, sollte zusätzlich ein abspaltbarer Affinitätsanhang an den N-Terminus kloniert werden. Auf diese Weise ließe sich die Deletionsmutante US6(20-125) eventuell reinigen.

Um lösliches Protein zu erhalten, wurden außerdem Fusionskonstrukte von MBP bzw. einer Domäne von Protein G mit US6(20-146) konstruiert (siehe 4.7). Es zeigte sich, daß US6 innerhalb der Proteinfusion sowohl im Zytoplasma als auch im Periplasma in der löslichen Fraktion erscheint. Jedoch wird lösliches US6(20-146) sowohl im Zytoplasma als auch im Periplasma nach der Expression teilweise wieder degradiert. Wird das Fusionskonstrukt MBP-US6 aus dem Periplasma gereinigt, aggregiert US6(20-146) nach dessen Abspaltung (siehe 4.7).

## 5.2 Reinigung und Rückfaltung von US6

Bei der *in vitro* Renaturierung ist eine Vielzahl von Faktoren zu beachten, die wichtig für die korrekte Proteinfaltung sind (Armstrong et al., 1999; Pecorari et al., 1999; Piehler & Schreiber, 1999). Da exprimiertes US6(20-146) über 8 Cysteine verfügt, die an einem Netzwerk von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten, wurde zunächst das *redox shuffling* mit in die Rückfaltungsprozedur einbezogen. Das *redox shuffling* zeichnet sich durch die Variation des Redoxpotentials in Lösung aus, bei dem die Bildung verschiedener Disulfidbrücken begünstigt wird. *E. coli* soll in seinem Zytoplasma nicht zur Bildung von Disulfidbrücken fähig sein. Deshalb wurde US6(20-146) unter reduzierenden Bedingungen aus *inclusion bodies* solubilisiert und das gereinigte und reduzierte Protein den verschiedenen Rückfaltungsansätzen zugeführt (4.2). Das nach den Rückfaltungsversuchen erhaltene Protein tendiert zu starker Aggregation. CD-spektroskopische Messungen ließen ausserdem auf ein ungefaltetes Protein schließen (siehe 4.4). Aus diesem Grund wurde das Protein in Abwesenheit von Reduktionsmitteln gereinigt und renaturiert. Auf diese Weise ließen sich aus anfänglich bis zu 10 mg Protein pro Liter Kultur in Form von *inclusion bodies* bis zu 3 mg renaturiertes US6(20-146) produzieren (siehe 4.2).

Das periplasmatisch exprimierte Fusionsprotein MBP-US6(20-146) konnte als lösliches Protein gereinigt werden (siehe 4.7). Im Periplasma ist aufgrund des dort herrschenden oxidativen Milieus die Bildung von Disulfiden begünstigt. Allerdings wird US6 nach der Expression im Periplasma zum Teil wieder degradiert. Weiterhin aggregiert und präzipitiert US6 nach der Abspaltung von MBP. Die Degradation kann durch Missfaltung des Proteins oder zumindest durch eine erhöhte Flexibilität der Proteinstruktur erklärt werden. Wobei die Struktur durch die vier zu erwartenden Disulfidbrücken eher von kompakter Natur sein sollte. Es besteht die Möglichkeit, daß im Periplasma nicht die richtigen Cysteine miteinander verknüpft werden. Alternativ kann aber auch die korrekte Faltung durch den N-terminalen Fusionspartner gestört sein.

Die Glykosylierung eines ER-ständigen Proteins ist essentiell für die Erkennung durch die ER-ständigen Chaperone Calnexin und Calreticulin (Ellgaard & Helenius, 2001; Ellgaard & Helenius, 2003). Das Protein wurde in früheren Arbeiten in seiner glykosylierten Form analysiert (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997). Möglicherweise ist die Glykosylierung von US6 essentiell für die Faltung und

der damit verbundenen Stabilität des Proteins *in vivo*. *E. coli* weist diese ER-ständige Faltungsmaschinerie nicht auf, die im Fall von US6 aber essentiell für die Faltung *in vivo* sein kann.

### 5.3 Inhibition von TAP durch US6

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Inhibition von TAP durch US6 aufgeklärt und im Detail analysiert. Der virale Inhibitor interferiert nicht mit der Peptidbindung des Transporters. Die Bindung von ADP scheint ebenfalls nicht beeinflusst zu sein, wohingegen die ATP-Bindung von TAP durch US6 blockiert wird. Durch die Inhibition der ATP-Bindung kann keine nachfolgende ATP-Hydrolyse stattfinden.

In früheren Arbeiten wurde berichtet, daß die NBD von TAP1 ATP besser bindet als die NBD von TAP2 (Müller et al., 1994; Russ et al., 1995), während beide NBD eine äquivalente ADP-Bindung aufweisen (Alberts et al., 2001). Eine mögliche Erklärung wäre, daß im Grundzustand innerhalb der NBD von TAP2 ATP oder ADP fest gebunden ist (*occluded state*). Bei der NBD von TAP1 werden hingegen fortlaufend Nukleotide ausgetauscht (*open state*). Durch die Bindung von US6 an TAP wird die Konformation der NBD von TAP1 dahingehend verändert, daß diese kein ATP mehr binden kann (Hewitt et al., 2001). Die NBD geht somit in den sogenannten *occluded state* über.

Die Inhibition durch ICP47 unterscheidet sich von der durch US6 hervorgerufenen Hemmung von TAP. Das zytosolische Protein bindet an die Membran und bildet dort erst seine Struktur aus. Nach der Anlagerung an die ER-Membran bindet ICP47 mit einem  $K_D$  von 50 nM an TAP und inhibiert die Peptidbindung des Transporters (Ahn et al., 1996a; Beinert et al., 1997; Neumann et al., 1997; Pfänder et al., 1999; Tomazin et al., 1996). Die Nukleotidbindung von TAP wird dadurch nicht beeinflusst (Ahn et al., 1996a). Trotz der unterschiedlichen Inhibitionsmechanismen wird die Peptid-induzierte ATPase-Aktivität von TAP auch durch ICP47 blockiert (Gorbulev et al., 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für *in vitro* eine halbmaximale Inhibition von TAP bei einer US6-Konzentration von 1  $\mu$ M ermittelt. Dieser Wert bezieht sich auf die Gesamtmenge an eingesetztem Inhibitor. Der ermittelte Wert kann jedoch kleiner sein, da nicht geklärt ist wie groß der Anteil des aktiven Proteins an dieser Gesamtmenge ist.

US6 bindet im ER-Lumen an TAP (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997) und modifiziert über die Membran hinweg die Nukleotidbindung der zytosolischen NBD. Möglicherweise bindet US6 nur an die kurzen ER-luminalen Schleifen zwischen den Transmembranhelices von TAP. Inhibitionsstudien mit N-terminalen Deletionsmutanten (siehe 4.3.3) deuten darauf hin, daß US6 in diesem Fall an die ER-luminalen Schleifen der *core domain* von TAP bindet. Auf Seiten von US6 ist die C-terminale Region der ER-luminalen Domäne für die Inhibition essentiell (4.6 und (Ahn et al., 1997; Hewitt et al., 2001)). In diesem für die Inhibition wichtigen Bereich befinden sich geladene Aminosäuren. Die Interaktion zwischen TAP und US6 könnte über elektrostatische Wechselwirkungen von geladenen Aminosäuren vermittelt werden. Aus diesem Grund wurden mittels gerichteter Mutagenese die C-terminalen Aminosäuren Asp130 und Arg138 von US6(20-146) gegen Alanin ersetzt. Die Substitution hatte jedoch keinen Einfluß auf die inhibitorische Aktivität von US6. Auch der gleichzeitige Austausch beider Aminosäuren, wodurch eine Doppelmutante erzeugt wurde, brachte keine Änderung. Elektrostatische Wechselwirkungen können in diesem Fall nicht der entscheidende Faktor sein. Die Aminosäuren Cys127, Cys129 und W134 wurden ebenfalls mittels gerichteter Mutagenese ausgetauscht. Es zeigte sich, daß auch diese nicht essentiell für die inhibitorische Aktivität sind (siehe 4.6).

Dies legt die Vermutung nahe, daß dieser gesamte Bereich selbst eine Struktur einnimmt, die essentiell für die Inhibition ist. Alternativ könnte die C-terminale Region eine für die Funktion essentielle Struktur in einem anderen Teil des Inhibitors induzieren. Durch die Deletion des C-Terminus der ER-luminalen Domäne wird die Struktur des Proteins modifiziert. US6(20-146) und US6(20-144) sind nach oxidativer SDS-PAGE und Western-Blot mit einem His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörper schlecht detektierbar. Unter Beibehaltung des Disulfid-Netzwerks ist somit der C-terminale Affinitätsanhang für den Antikörper weniger erreichbar. Dieser Effekt tritt bei der Deletionsmutante US6(20-125) nicht auf (siehe 9.6).

Parallel zu den C-terminalen Deletionen wurden auch Verkürzungen am N-Terminus des Inhibitors durchgeführt. Die Deletion der ersten 20 Aminosäuren hatte keinen Effekt auf die inhibitorische Aktivität von US6 (siehe 4.6). Dieser Befund wurde in parallelen Arbeiten *in vivo* ebenfalls beobachtet (Hewitt et al., 2001). In der gleichen Arbeit wurden weitere 20 Aminosäuren deletiert. Dies hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Aktivität des Inhibitors. Es wurde aber die Vermutung geäußert, daß die Verkürzung am N-Terminus einen negativen Effekt auf die Stabilität von US6 hat. Dies kann damit zusammenhängen, daß hierbei

auch die Glykosylierungsstelle Asn52 entfernt wurde und somit von ER-ständigen Chaperonen nicht mehr erkannt wird. Neben der Glykosylierungsstelle wurden auch die Cysteine an den Positionen 39, 50 und 57 entfernt. Dies deutet darauf hin, daß diese Cysteine die Struktur des Proteins unterstützen, aber nicht unmittelbar essentiell für dessen inhibitorische Aktivität sind. Somit bleiben nur noch die drei Cysteine an den Positionen 75, 101 und 110 übrig. In dem voraussichtlich erwarteten Disulfid-Netzwerk (9.8) bilden die Cysteine 75 und 101 eine Disulfidbrücke. Diese wäre in diesem Fall die einzige für die inhibitorische Aktivität essentielle Disulfidbrücke.

Neben der Analyse von US6 *in vitro* konnte im Rahmen dieser Arbeit das Protein auch durch in einem *in vivo* System getestet werden. Dabei handelt es sich um die MHC I-vermittelte Kreuzpräsentation von exogenen Peptiden auf der Oberfläche von dendritischen Zellen. Bei diesem Zelltyp werden antigene Proteine endozytiert und die aus proteolytischer Degradation resultierenden Peptide über MHC II auf der Zelloberfläche präsentiert. Es konnte aber auch eine Präsentation des selben exogenen Antigens über MHC I gezeigt werden (Ackerman & Cresswell, 2003a; Guermonprez et al., 2003; Robson et al., 2003; Utsugi-Kobukai et al., 2003).

Nach der Aufnahme des antigenen Materials wird dieses innerhalb der Zelle in Phagosomen eingeschlossen. Diese Phagosomen können daraufhin mit ER-Vesikeln fusionieren. Diese Vesikel enthalten die ER-Proteinfaltungsmaschinerie und auch den TAP-Komplex. Nach der Retrotranslokation über den Sec61-Komplex können Antigene in das Zytoplasma gelangen. Diese werden daraufhin vom Proteasom degradiert und die resultierenden Peptide durch TAP zurück in das Phagosom transportiert. Nach dem Peptidtransport werden die betreffenden Peptide auf MHC I geladen, welche nun ihre Reise an die Zelloberfläche antreten (Ackerman et al., 2003b; Guermonprez et al., 2003). Von dendritischen Zellen endozytiertes US6(20-146) interagiert mit TAP. Die Co-Lokalisation von US6(20-146) mit Calnexin und die direkte Interaktion mit TAP wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation nachgewiesen. US6 inhibiert den TAP-abhängigen Peptidtransport und damit die MHC I-vermittelte Kreuzpräsentation an der Zelloberfläche.

Nach der Aufnahme von US6(20-144) in Form von *inclusion bodies* durch dendritische Zellen, wird die Kreuzpräsentation ebenfalls inhibiert (siehe 4.9). Es scheint, daß die ER-luminale Domäne von US6 in Form von *inclusion bodies* durch

ER-ständige Chaperone in die native Form gebracht wird. Im Vergleich dazu zeigt die Deletionsmutante US6(20-125) keine inhibitorische Aktivität (siehe 4.9).

Durch die Faltungsmaschinerie des ER können die Proteine als *inclusion bodies* eingesetzt werden. Dieser Umstand hat den Effekt, daß für die Identifizierung kritischer Aminosäuren die Rückfaltung der Mutanten aus *inclusion bodies* umgangen werden kann.

## 5.4 Strukturelle Organisation von US6

### 5.4.1 Sekundärstruktur von US6

Globuläre Proteine sind möglicherweise gegen die proteolytische Degradation bestimmter Proteasen geschützt, weil deren Proteinstruktur potentielle Schnittstellen verdeckt. So wird z.B. monomeres US6(20-146) nach der Renaturierung *in vitro* nicht durch Proteasen wie Trypsin oder LysC proteolytisch degradiert (siehe 4.4). Dies deutet darauf hin, daß für diese Endoproteasen mögliche Erkennungs- und Schnittstellen durch die Proteinfaltung unzugänglich sind. Das neben dem Monomer vorhandene Dimer von US6 wird hingegen vollständig degradiert. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Fehlfaltung des Dimers hin, bei der freie Cysteinreste erst zu einer Dimerisierung führen.

Amino- und Carboxypeptidasen entfernen nur wenige Aminosäuren am N- bzw. C-Terminus (siehe 4.4). Die Carboxypeptidase Y entfernt nur die C-terminalen Histidine. Ein weiterer Abbau kann aufgrund der Phenylalanine an den Positionen 145 und 146 nicht stattfinden. Im Fall der Aminopeptidase M werden nur fünf Aminosäuren am N-Terminus entfernt. Der proteolytische Abbau könnte in diesem Fall durch globuläre Strukturen behindert sein.

CD-spektroskopische Messungen deuten für US6(20-146) auf ein gefaltetes Protein (siehe 4.4). Das Protein enthält sowohl 20%  $\alpha$ -helikale als auch 25%  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Es wurde auch festgestellt, daß ein Drittel des Proteins unstrukturiert ist. Durch das Disulfid-Netzwerk wäre eine weniger flexible Struktur zu vermuten. Doch ist hierbei zu beachten, daß der kalkulierte Anteil an Sekundärstruktur einen Durchschnittsanteil anzeigt. Es zeigte sich, daß nach der Rückfaltung von US6 mehrere Isomere auftreten können. Der Anteil an unstrukturiertem Protein kann auf ein missgefaltetes Isomer zurückgehen. Zur

Klärung dieser Frage, müssen die einzelnen Isomere voneinander separiert und auf ihre Aktivität getestet werden. Daraufhin kann die Proteinstruktur des aktiven Isomers untersucht werden.

#### 5.4.2 Analyse des Disulfid-Netzwerkes von US6

Das Netzwerk aus Disulfidbrücken ist ein wichtiger Bestandteil der Proteinstruktur von US6. Von Interesse ist hierbei unter anderem, welche Cysteinreste miteinander verknüpft sind und somit das Disulfid-Netzwerk ausbilden. Das rückgefaltete Protein wurden mit Ellman's Reagenz 5,5-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) (Ellman & Lysko, 1979; Ellman, 1959) auf freie Cysteinreste getestet. Es konnte auch unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) kein freies Cystein festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Um das Reagenz auf dessen Reaktionsfähigkeit zu überprüfen, wurde ein Standard aus Cystein und reduziertem Gluthation mitgeführt. Daher liegt der Schluss nahe, daß alle Cysteinreste an Disulfidbrücken beteiligt sind. Es zeigte sich jedoch, daß auch bei den Cysteinmutanten C127S und C129S mit Ellman's Reagenz kein freies Cystein detektierbar ist (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich nicht ausschließen, daß die potentiell freien Thiole trotz denaturierenden Bedingungen für DTNB aufgrund sterischer oder elektrostatischer Hinderung nicht erreichbar sind (Riener et al., 2002). Alternativ wurde das kleinere und amphipathische Reagenz 4,4'-Dithiodipyridin (DTDP) eingesetzt (Grassetti & Murray, 1967; Riener et al., 2002). Aber auch mit dieser Substanz konnte bei US6 kein freies Thiol nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine weitere Möglichkeit freie Thiole insbesondere bei den Cysteinmutanten zu detektieren, wäre Cystamin als kleines Molekül zwischen DTNB und dem Proteinthiol einzusetzen (Riener et al., 2002; Singh et al., 1993). Mittels Massenspektrometrie wurde die Masse von reduziertem und oxidiertem US6(20-146) ermittelt. Es zeigte sich, daß die Durchschnittsmasse des Proteins sich nach der Reduktion um 8 Da erhöht. Dies liefert einen Hinweis, daß durch die Reduktion von vier Disulfidbrücken acht Wasserstoffatome addiert werden. Die Massendifferenz liegt jedoch im Rahmen der Messungenauigkeit des Spektrometers und ist somit kein Beweis, sondern kann nur als Hinweis erachtet werden.

Oxidative Redoxbedingungen, welche ausgebildete Disulfidbrücken erhalten, machen sich auch bei der Immundetektion des Proteins bemerkbar. Zur Detektion



von US6 wurden Antikörper verwendet, welche gegen die N-terminale Sequenz Asp20-Cys39 bzw. gegen den C-terminalen Anhang aus sechs Histidinresten gerichtet sind. Wurde die Gelelektrophorese unter oxidativen Bedingungen durchgeführt, war das nach dem Western-Blot mit einem US6-spezifischen Antikörpern erhaltene Signal schwächer als unter reduzierenden Bedingungen (siehe 4.2 und 9.6). Im Falle des N-terminalen Epitops scheint die Beteiligung von Cys39 am Disulfid-Netzwerk die Zugänglichkeit für den Antikörper einzuschränken. Für den C-terminalen Bereich des Proteins ist der von den Cysteinen 127 und 129 ausgehende Effekt weitaus stärker zu beobachten. Der Histidinanhang wird von dem betreffenden Antikörper im oxidierten Protein in geringerem Maße erkannt. Die Ausbildung der Disulfidbrücken hat aber keine Auswirkung auf die Reinigung des Proteins und auch nicht auf den proteolytischen Verdau mit Carboxypeptidase Y. Der Histidinanhang scheint durch die Proteinstruktur nur teilweise verdeckt zu sein.

Eine Ausnahme bildet die Deletionsmutante US6(20-125), bei der der für die Funktion wichtige C-Terminus deletiert worden ist. Das Protein lässt sich durch den anti-His<sub>6</sub>-Antikörper sowohl unter reduzierenden als auch oxidierenden Bedingungen gleichermaßen detektieren (9.6). Insofern ist dies ein weiterer Hinweis darauf, daß mit der Deletion dieses Bereichs die Struktur des Proteins modifiziert wurde.

US6 scheint nach der Rückfaltung aus mehreren Disulfid-Isomeren zu bestehen. Dies kann schon aufgrund des Elutionsprofils nach der *reversed phase* Chromatographie (4.4) vermutet werden. Nach Durchführung einer oxidativen SDS-PAGE ist zumindest ein Dimer im Gel detektierbar. Weiterhin erscheinen die angefärbten Proteinbanden unter oxidativen Bedingungen diffuser und weniger fokussiert als unter reduzierenden Bedingungen, was auf mehrere Isomere mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität hinweist (siehe 4.2, 9.6 und 9.7). Es wurde versucht, das Netzwerk aus Cysteinbrücken zu analysieren. Hierbei zeigte sich, daß nach der Rückfaltung verschiedene Disulfidisomere auftreten können. Ein häufig beobachtetes Isomer zeigt ein Disulfid-Netzwerk mit den Cysteinbrücken Cys39-Cys50, Cys57-Cys110, Cys75-Cys101 und Cys127-Cys129 (9.8). Es ist jedoch noch unklar, ob es sich bei diesem Isomer um die aktive Spezies des Proteins handelt. Um das Disulfid-Netzwerk der aktiven Isoform von US6 zu charakterisieren, müssen an dieser Stelle weitere Analysen vorgenommen werden (siehe 9.8).

### 5.4.3 Struktureller Vergleich verschiedener viraler Inhibitoren

Es wurden bisher fünf Proteine beschrieben, welche mit der Antigenprozessierung interferieren und in der *unique short* Region des HCMV-Genoms kodiert sind. Diese Proteine sind Typ I Transmembranglykoproteine mit einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einem zytosolischen C-Terminus. Die Proteinstruktur der ER-luminalen Domäne von US2 konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gelöst werden (Gewurz et al., 2001b). Demzufolge bildet diese Domäne eine Immunglobulindomäne vom H-Subtyp aus, welche aus sieben antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht (diese werden alphabetisch A bis G benannt). Zu erwähnen ist noch, daß das vierte  $\beta$ -Faltblatt aus zwei kleineren (C' und D) gebildet wird. Diese Faltblätter formen zwei aufeinander liegende Lagen, welche zusätzlich durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an den Positionen 52 und 133 zusammengehalten werden. Aufgrund von Sequenzvergleichen von US2 mit anderen Mitgliedern der US-Proteinfamilie einschließlich US6 wurde die Vermutung geäußert, daß diese die gleiche Faltung ausbilden (Gewurz et al., 2001b).

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß US6 eine andere Faltung als US2 aufweist. Zunächst konnte mittels CD-Spektroskopie gezeigt werden, daß bei US6(20-146) der  $\alpha$ -helikale Anteil an der gesamten Sekundärstruktur des Proteins etwa 20% beträgt (siehe 4.4). Dieser Befund ist mit einer Immunglobulindomäne dieser Größe nicht in Einklang zu bringen. Desweiteren wurde aufgrund des Sequenzhomologievergleichs vermutet, daß das Cystein an Position 127 mit dem Cystein 39 eine für die Struktur essentielle Disulfidbrücke formt. Durch Deletionen oder Punktmutationen (US6(40-144); US6(20-146)C127S) wurden unter anderem diese Cysteine aus dem Protein entfernt. Diese Mutationen haben die inhibitorische Aktivität *in vitro* nicht beeinträchtigt (4.6). Weder das Cys39 noch das Cys127 scheinen an dieser essentiellen Disulfidbrücke beteiligt zu sein.

Aufgrund der Sequenzvergleiche wurde weiterhin angenommen, daß die Position Asn52 innerhalb der Struktur verdeckt sei. Diese Aminosäure ist jedoch die Position, welche im ER N-glykosidisch modifiziert wird. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß US6 als Glykoprotein vorliegt (Ahn et al., 1997; Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997). Diese Aminosäure kann somit gar nicht im Inneren der Struktur verborgen liegen.

Ein weiteres mit der Antigenprozessierung interferierendes, virales Protein ist ICP47. Dieses Protein weist mit seinem *Helix-loop-Helix*-Motiv (Beinert et al., 1997; Pfänder et al., 1999) eine einfachere strukturelle Organisation auf als US6. Dieses Strukturmotiv entspricht den Aminosäuren 3-34, welche auch die aktive Domäne von ICP47 bilden (Neumann et al., 1997). Daher ist anzunehmen, daß US6 strukturell anders organisiert ist als US2 oder ICP47. Mittels NMR und der Röntgenbeugung von Proteinkristallen sollte versucht werden die molekulare Proteinstruktur von US6(20-146) zu analysieren. Für die weitere Strukturaufklärung sollte jedoch zunächst die aktive Isoform von US6(20-146) ermittelt werden.

## 5.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien gaben Aufschluss über den molekularen Mechanismus der TAP-Inhibition durch US6. Es wurden einige Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz von TAP und US6 identifiziert, die für die Inhibition des Peptidtransports von Bedeutung sind. Auf Seiten von TAP scheinen die ER-luminalen Schleifen der sogenannten *core domain* innerhalb der TMD für die Interaktion mit US6 essentiell zu sein. Um die Art der Interaktion zu ermitteln müssten Mutationen in diese Bereiche eingeführt werden. Dabei wäre allerdings zu achten, daß die Funktion des Transporters nicht durch diese Manipulation beeinträchtigt wird.

Kürzlich konnte funktionales TAP generiert werden, welches über keine Cysteinreste mehr verfügt (Heintke et al., 2003). In nachfolgenden Arbeiten könnte versucht werden, Cysteinreste in die ER-luminalen Schleifen der *core domain* einzufügen. Die Zugänglichkeit dieser Cysteine für Thiol-spezifische Agenzien sollte nach Bindung von US6 eingeschränkt sein.

Chemische Proteasen können dazu genutzt werden, um Aminosäuren zu identifizieren, die sich in unmittelbarer Nähe von Interaktionsstellen befinden. Auf diese Weise wurde in einer anderen Arbeit Protein-Interaktionsstellen identifiziert (Datwyler & Meares, 2000). Die chemische Protease Eisen (S)-1-[p-(Bromacetamid)benzyl]-EDTA (FeBABE) kann über Cysteine oder über 2-Iminothiolan mit freien Aminogruppen (Owens et al., 1998; Traviglia et al., 1999) innerhalb von US6 bzw. TAP verknüpft werden. Nach der Bindung von US6 an TAP fungiert der Metallkomplex als chemische Protease und könnte die Polypeptidketten von TAP1, TAP2 oder US6 spalten. Nach Immunpräzipitation

können die Degradationsprodukte mittels SDS-PAGE separiert und durch MALDI und Edman-Abbau identifiziert werden.

Zusätzlich wäre noch die Art der Interaktion auf Seiten von US6 zu analysieren. Bisher konnte auf Seiten der ER-luminalen Domäne von US6 nur die C-terminale Region Asn126-Leu139 als für die Funktion essentiell identifiziert werden. Bisher gibt es mehr Hinweise, welche Elemente der ER-luminalen Domäne von US6 nicht essentiell für die Funktion sind. Dazu gehört die N-terminale Region von US6 bis einschließlich der Aminosäure Ala60 und die einzelnen C-terminalen Aminosäuren Cys127, Cys129, D130, W134 und R138. Die genannten Aminosäuren befinden sich alle in der C-terminalen Region der ER-luminalen Region von US6. Die Aktivität des Inhibitors ist somit nicht von diesen Aminosäuren abhängig.

Um den Bereich, der kritisch für die Aktivität des Inhibitors ist zu identifizieren, sollten zunächst weitere Deletionen eingeführt werden. Hierzu können jeweils C-terminale Verkürzungen von je fünf Aminosäuren analysiert werden. Auf diese Weise würden drei neue Deletionsmutanten konstruiert: US6(20-140), US6(20-135), US6(20-130). Tritt bei einer der Deletionsmutanten der Verlust der Aktivität auf, so wären maximal noch vier weitere Konstrukte zu erzeugen, um die kritische Sequenz am C-Terminus auf die Aminosäure einzugrenzen. Punktmutationen in diesem Bereich hatten bisher keine Auswirkungen auf die Aktivität von US6. Es besteht die Möglichkeit, daß bisher nicht die richtigen Aminosäuren ausgetauscht wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden geladene Aminosäuren, Cysteine bzw. Tryptophan gegen Serin bzw. Alanin ersetzt. Die für die Funktion kritische C-terminale Region enthält einige hydrophobe Aminosäuren (Val128, V133, F137 und F139). Im Gegensatz zur bisherigen Strategie können auch hydrophobe gegen zusätzliche geladene Aminosäuren ausgetauscht werden. Dies sollte aber erst nach den weiterführenden Deletion am C-Terminus in Betracht gezogen werden.

Ist die für die Funktion kritische Primärsequenz von US6 eingegrenzt, kann auch eine zufallsgerichtete Mutagenese oder ein sog. *alanine scanning*-Ansatz durchgeführt werden. Dabei kann statistisch jede beliebige Position ausgetauscht und eine komplette Mutantenbibliothek erstellt werden. Diese Methoden werden daraufhin mit einem sog. *phage display* oder auch einer Enzymreaktion kombiniert, um die Aktivität der betreffenden Mutanten zu ermitteln (siehe hierzu (Morrison & Weiss, 2001; Tarun et al., 1998; Weiss et al., 2000)). Auf diese Weise ließen sich Aminosäurereste innerhalb der aktiven Domäne ermitteln, die kritisch für die Funktion sind.

Von Interesse ist die statistische Mutagenese aller Aminosäurepositionen auch in Kombination einer Proteinfusion mit dem sog. *green fluorescent protein* (GFP) (Waldo, 2003). Hierzu wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit das Konstrukt US6(20-146) in den Expressionsvektor pWaldo kloniert (Daten nicht gezeigt). Hierbei folgt der ER-luminalen Domäne von US6 C-terminal das Protein GFP und dient damit als Faltungssensor. Nur wenn sich eine US6-Mutante nach der heterologen Expression in einem gefalteten und löslichen Zustand befindet, nimmt auch GFP seine native Form an. In diesem Fall ist die Fluoreszenz des GFP messbar (Kawasaki & Inagaki, 2001; Waldo, 2003; Wurth et al., 2002). Diese Vorgehensweise kann eine Alternative zur Rückfaltung von US6 aus *inclusion bodies* sein.

## 6 Zusammenfassung

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) gehört zur Familie der  $\beta$ -Herpesviridae. Bis zu 80% menschlichen Bevölkerung sind weltweit mit dem Virus infiziert. Nach einer meist asymptomatischen Erstinfektion persistiert HCMV lebenslang in seinem Wirtsorganismus. Im Laufe der Evolution wurden von einigen Herpesviren verschiedene Strategien entwickelt, um der Antigenprozessierung und damit der zellulären Immunantwort zu entgehen. Das HCMV-Protein US6 blockiert die Antigenpräsentation via MHC I. US6 ist ein ER-ständiges Typ I Transmembranglykoprotein bestehend aus einer Signalsequenz, einer ER-luminalen Domäne, einer Transmembranhelix und einem kurzen zytoplasmatischen C-Terminus. US6 inhibiert den TAP-abhängigen Peptidtransport aus dem Zytoplasma in das ER-Lumen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ER-luminale Domäne von US6 bestehend aus der Primärsequenz 20-146 heterolog in *E. coli* exprimiert und aus *inclusion bodies* rückgefaltet. Das rückgefaltete Protein erwies sich als Monomer (15,6 kDa). Die in der ER-luminalen Domäne befindlichen acht Cysteine bilden ein intramolekulares Netzwerk aus vier Disulfidbrücken. Zur Aufklärung des molekularen Inhibitionsmechanismus von US6(20-146) wurden verschiedene *in vitro* TAP-Funktions-Assays angewendet. Die Bindung von US6 an die ER-luminalen Bereiche von TAP blockiert die ATP-Bindung in den zytoplasmatischen NBD des Transporters. Die Peptid- und ADP-Bindung von TAP ist nicht beeinflusst, durch die Inhibition der ATP-Bindung wird jedoch die Peptid-induzierte ATP-Hydrolyse unterbunden. Für die Inhibitionsreaktion konnte ein halbmaximaler Inhibitionskoeffizient ( $IC_{50}$ ) von 1  $\mu$ M ermittelt werden.

Für die inhibitorische Aktivität von US6 sind die C-terminalen Aminosäuren 126-139 der ER-luminalen Domäne von US6 verantwortlich. Die innerhalb dieser Region befindlichen Aminosäuren Cys127, Cys129, D130, W134 und R138 wurden gegen Serin bzw. Alanin ersetzt. Dies hatte keine Auswirkung auf die Aktivität von US6(20-146). Auch ist der N-Terminus von US6 nicht essentiell für die Aktivität.

## 7 Summary

The human cytomegalovirus (HCMV) belongs to the  $\beta$ -herpesviridae. After an asymptomatic primary infection HCMV persists lifelong in the human host. Up to 80% of the human population is infected. During evolution several herpes viruses developed different strategies to evade the human immune response. The HCMV-encoded protein US6 interferes with the antigen processing pathway. The inhibitor is a type I transmembrane protein consisting of a leader sequence, ER-luminal domain, transmembrane helix and a short cytoplasmic tail at the C-terminus. US6 inhibits the TAP-dependant peptide transport from the cytoplasm into the lumen of the ER.

Within this PhD thesis the ER luminal domain of US6 consisting of the amino acid residues Asn20-Phe146 was heterologously expressed in *E. coli* and refolded from inclusion bodies. After refolding US6(20-146) is a monomeric protein with a molecular mass of 15,6 kDa. A network of four intramolecular disulfide bonds is formed by eight cysteines within the ER luminal domain of US6. To analyze the molecular mechanism of TAP inhibition several *in vitro* assays were applied. Binding of US6(20-146) to the short ER-luminal loops within the TMD of TAP inhibits ATP-binding to the cytoplasmic NBD of TAP. However, binding of ADP and peptide is not affected. Inhibition of ATP binding blocks peptide-induced ATP hydrolysis of TAP. As a consequence no energy can be provided to drive the transport process. The  $IC_{50}$  of the inhibition process was determined as 1  $\mu$ M.

The C-terminal region Asn126-Leu139 of the ER luminal domain of US6 is critical for its function. Single amino acids within this region (Cys127, Cys129, D130, W134 and R138) were mutated to serine or alanine. Mutation of these residues had no effect on the activity of US6(20-146). In addition it was shown that the N-terminus is not essential for function.

## 8 Literatur

- Abele, R. and Tampé, R. (1999) Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta*, **1461**, 405-419.
- Ackerman, A.L. and Cresswell, P. (2003a) Regulation of MHC class I transport in human dendritic cells and the dendritic-like cell line KG-1. *J Immunol*, **170**, 4178-4188.
- Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampé, R. and Cresswell, P. (2003b) Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12889-12894.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y. and Fruh, K. (1997) The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*, **6**, 613-621.
- Ahn, K., Meyer, T.H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P.A., Fruh, K. and Tampé, R. (1996a) Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *Embo J*, **15**, 3247-3255.
- Alberts, P., Daumke, O., Deverson, E.V., Howard, J.C. and Knittler, M.R. (2001) Distinct functional properties of the TAP subunits coordinate the nucleotide-dependent transport cycle. *Curr Biol*, **11**, 242-251.
- Androlewicz, M.J. and Cresswell, P. (1994a) Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity*, **1**, 7-14.
- Androlewicz, M.J., Ortmann, B., van Ender, P.M., Spies, T. and Cresswell, P. (1994b) Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/beta 2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP1 and TAP2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12716-12720.
- Antoniou, A.N., Ford, S., Pilley, E.S., Blake, N. and Powis, S.J. (2002b) Interactions formed by individually expressed TAP1 and TAP2 polypeptide subunits. *Immunology*, **106**, 182-189.
- Antoniou, A.N., Powis, S.J. and Elliott, T. (2003a) Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol*, **15**, 75-81.



- Armstrong, N., de Lencastre, A. and Gouaux, E. (1999) A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci*, **8**, 1475-1483.
- Arora, S., Lapinski, P.E. and Raghavan, M. (2001) Use of chimeric proteins to investigate the role of transporter associated with antigen processing (TAP) structural domains in peptide binding and translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7241-7246.
- Bangia, N., Lehner, P.J., Hughes, E.A., Surman, M. and Cresswell, P. (1999) The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur J Immunol*, **29**, 1858-1870.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E.A. and Engert, A. (2000) Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1572-1579.
- Bauer, D. and Tampé, R. (2002) Herpes viral proteins blocking the transporter associated with antigen processing TAP--from genes to function and structure. *Curr Top Microbiol Immunol*, **269**, 87-99.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemüller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Beinert, D., Neumann, L., Uebel, S. and Tampé, R. (1997) Structure of the viral TAP-inhibitor ICP47 induced by membrane association. *Biochemistry*, **36**, 4694-4700.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13703-13708.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1987) The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, **329**, 512-518.
- Bouabe, H. and Knittler, M.R. (2003) The distinct nucleotide binding states of the transporter associated with antigen processing (TAP) are regulated by the nonhomologous C-terminal tails of TAP1 and TAP2. *Eur J Biochem*, **270**, 4531-4546.
- Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B. and Rivett, A.J. (2000) Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, **352 Pt 3**, 611-615.

- Chang, G. and Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, **293**, 1793-1800.
- Chao, J.A., Prasad, G.S., White, S.A., Stout, C.D. and Williamson, J.R. (2003) Inherent protein structural flexibility at the RNA-binding interface of L30e. *J Mol Biol*, **326**, 999-1004.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A. and et al. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol*, **154**, 125-169.
- Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L. and Quiocho, F.A. (2003a) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, **12**, 651-661.
- Chen, M., Abele, R. and Tampé, R. (2003) Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem*, **278**, 29686-29692.
- Datwyler, S.A. and Meares, C.F. (2000) Protein-protein interactions mapped by artificial proteases: where sigma factors bind to RNA polymerase. *Trends Biochem Sci*, **25**, 408-414.
- Daumke, O. and Knittler, M.R. (2001b) Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains. *Eur J Biochem*, **268**, 4776-4786.
- Desjardins, M., Celis, J.E., van Meer, G., Dieplinger, H., Jahraus, A., Griffiths, G. and Huber, L.A. (1994) Molecular characterization of phagosomes. *J Biol Chem*, **269**, 32194-32200.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G., Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vonrhein, C., Boos, W. and Welte, W. (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *Embo J*, **19**, 5951-5961.
- Diedrich, G., Bangia, N., Pan, M. and Cresswell, P. (2001) A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol*, **166**, 1703-1709.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 431-437.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 181-191.

- Ellman, G. and Lysko, H. (1979) A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem*, **93**, 98-102.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **82**, 70-77.
- Fetsch, E.E. and Davidson, A.L. (2002) Vanadate-catalyzed photocleavage of the signature motif of an ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9685-9690.
- Früh, K., Gossen, M., Wang, K., Bujard, H., Peterson, P.A. and Yang, Y. (1994) Displacement of housekeeping proteasome subunits by MHC-encoded LMPs: a newly discovered mechanism for modulating the multicatalytic proteinase complex. *Embo J*, **13**, 3236-3244.
- Furman, M.H., Dey, N., Tortorella, D. and Ploegh, H.L. (2002) The human cytomegalovirus US10 gene product delays trafficking of major histocompatibility complex class I molecules. *J Virol*, **76**, 11753-11756.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J. and Desjardins, M. (2002) Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell*, **110**, 119-131.
- Gaudet, R. and Wiley, D.C. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *Embo J*, **20**, 4964-4972.
- Gewurz, B.E., Gaudet, R., Tortorella, D., Wang, E.W., Ploegh, H.L. and Wiley, D.C. (2001b) Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6794-6799.
- Gorbulev, S., Abele, R. and Tampé, R. (2001) Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3732-3737.
- Gorga, J.C., Madden, D.R., Prendergast, J.K., Wiley, D.C. and Strominger, J.L. (1992) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the human major histocompatibility antigen HLA-B27. *Proteins*, **12**, 87-90.
- Grande, A.G., 3rd, Lehner, P.J., Cresswell, P. and Spies, T. (1997) Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics*, **46**, 477-483.
- Grassetti, D.R. and Murray, J.F., Jr. (1967) Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys*, **119**, 41-49.

- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003) ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, **425**, 397-402.
- Hamaguchi, K. and Geiduschek, E.P. (1962) The Effect of Electrolytes on the Stability of the Deoxyribonucleate Helix. *J Am Chem Soc*, **84**, 1329-1338.
- Hammond, C., Denzin, L.K., Pan, M., Griffith, J.M., Geuze, H.J. and Cresswell, P. (1998) The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol*, **161**, 3282-3291.
- Heintke, S., Chen, M., Ritz, U., Lankat-Buttgereit, B., Koch, J., Abele, R., Seliger, B. and Tampé, R. (2003) Functional cysteine-less subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) by de novo gene assembly. *FEBS Lett*, **533**, 42-46.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H. and Momburg, F. (1997) A Viral ER-Resident Glycoprotein Inactivates the MHC-Encoded Peptide Transporter. *Immunity*, **6**, 623-632.
- Hewitt, E.W. (2003b) The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*, **110**, 163-169.
- Hewitt, E.W., Gupta, S.S. and Lehner, P.J. (2001) The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *Embo J*, **20**, 387-396.
- Hewitt, E.W. and Lehner, P.J. (2003a) The ABC-transporter signature motif is required for peptide translocation but not peptide binding by TAP. *Eur J Immunol*, **33**, 422-427.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 67-113.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P. and Tainer, J.A. (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, **101**, 789-800.
- Horn, C., Bremer, E. and Schmitt, L. (2003) Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, **334**, 403-419.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M.F., Thibault, P., Sacks, D. and Desjardins, M. (2003)

- Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature*, **425**, 402-406.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C. and Tampé, R. (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem*, **278**, 26862-26869.
- Jones, T.R., Wiertz, E.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A. and Ploegh, H.L. (1996) Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11327-11333.
- Jun, Y., Kim, E., Jin, M., Sung, H.C., Han, H., Geraghty, D.E. and Ahn, K. (2000) Human cytomegalovirus gene products US3 and US6 down-regulate trophoblast class I MHC molecules. *J Immunol*, **164**, 805-811.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure (Camb)*, **9**, 571-586.
- Karttunen, J.T., Lehner, P.J., Gupta, S.S., Hewitt, E.W. and Cresswell, P. (2001) Distinct functions and cooperative interaction of the subunits of the transporter associated with antigen processing (TAP). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7431-7436.
- Kawasaki, M. and Inagaki, F. (2001) Random PCR-based screening for soluble domains using green fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 842-844.
- Knittler, M.R., Alberts, P., Deverson, E.V. and Howard, J.C. (1999) Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr Biol*, **9**, 999-1008.
- Koch, J., Guntrum, R., Heintke, S., Kyritsis, C. and Tampé, R. (2004) Functional dissection of the transmembrane domains of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem*, **279**, 10142-10147.
- Koeffler, H.P. and Golde, D.W. (1978) Acute myelogenous leukemia: a human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science*, **200**, 1153-1154.

- Kyritsis, C., Gorbulev, S., Hutschenreiter, S., Pawlitschko, K., Abele, R. and Tampé, R. (2001) Molecular mechanism and structural aspects of transporter associated with antigen processing inhibition by the cytomegalovirus protein US6. *J Biol Chem*, **276**, 48031-48039.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lankat-Buttgereit, B. and Tampé, R. (1999) The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function. *FEBS Lett*, **464**, 108-112.
- Lauvau, G., Gubler, B., Cohen, H., Daniel, S., Caillat-Zucman, S. and van Endert, P.M. (1999) Tapasin enhances assembly of transporters associated with antigen processing-dependent and -independent peptides with HLA-A2 and HLA-B27 expressed in insect cells. *J Biol Chem*, **274**, 31349-31358.
- Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W. and Cresswell, P. (1997) The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 6904-6909.
- Lehner, P.J., Surman, M.J. and Cresswell, P. (1998) Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity*, **8**, 221-231.
- Locher, K.P., Lee, A.T. and Rees, D.C. (2002) The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C. and Clarke, D.M. (2002) The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J Biol Chem*, **277**, 41303-41306.
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. (1992) The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, **70**, 1035-1048.
- Melcher, K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. *Anal Biochem*, **277**, 109-120.
- Mellman, I. and Steinman, R.M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, **106**, 255-258.
- Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. and Tampé, R. (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett*, **351**, 443-447.

- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F. and Thomas, P.J. (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem*, **277**, 21111-21114.
- Morrison, K.L. and Weiss, G.A. (2001) Combinatorial alanine-scanning. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 302-307.
- Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R. and Aslund, F. (1999) Importance of redox potential for the in vivo function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 25254-25259.
- Müller, K.M., Ebensperger, C. and Tampé, R. (1994) Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem*, **269**, 14032-14037.
- Neumann, L., Abele, R. and Tampé, R. (2002) Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol*, **324**, 965-973.
- Neumann, L., Kraas, W., Uebel, S., Jung, G. and Tampé, R. (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J Mol Biol*, **272**, 484-492.
- Neumann, L. and Tampé, R. (1999) Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transport complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J Mol Biol*, **294**, 1203-1213.
- Nijenhuis, M. and Hämmerling, G.J. (1996b) Multiple regions of the transporter associated with antigen processing (TAP) contribute to its peptide binding site. *J Immunol*, **157**, 5467-5477.
- Nijenhuis, M., Schmitt, S., Armandola, E.A., Obst, R., Brunner, J. and Hämmerling, G.J. (1996a) Identification of a contact region for peptide on the TAP1 chain of the transporter associated with antigen processing. *J Immunol*, **156**, 2186-2195.
- Noda, C., Tanahashi, N., Shimbara, N., Hendil, K.B. and Tanaka, K. (2000) Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 348-354.
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampé, R., Spies, T., Trowsdale, J. and Cresswell, P. (1997) A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*, **277**, 1306-1309.

- Owens, J.T., Miyake, R., Murakami, K., Chmura, A.J., Fujita, N., Ishihama, A. and Meares, C.F. (1998) Mapping the sigma70 subunit contact sites on Escherichia coli RNA polymerase with a sigma70-conjugated chemical protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6021-6026.
- Ozato, K. and Sachs, D.H. (1981) Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. III. Hybridoma antibodies reacting to antigens of the H-2b haplotype reveal genetic control of isotype expression. *J Immunol*, **126**, 317-321.
- Pamer, E. and Cresswell, P. (1998) Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol*, **16**, 323-358.
- Park, B., Kim, Y., Shin, J., Lee, S., Cho, K., Fruh, K. and Ahn, K. (2004) Human cytomegalovirus inhibits tapasin-dependent Peptide loading and optimization of the MHC class I Peptide cargo for immune evasion. *Immunity*, **20**, 71-85.
- Paulsson, K.M. and Wang, P. (2004) Quality control of MHC class I maturation. *Faseb J*, **18**, 31-38.
- Pecorari, F., Tissot, A.C. and Plückthun, A. (1999) Folding, heterodimeric association and specific peptide recognition of a murine alphabeta T-cell receptor expressed in Escherichia coli. *J Mol Biol*, **285**, 1831-1843.
- Pfänder, R., Neumann, L., Zweckstetter, M., Seger, C., Holak, T.A. and Tampé, R. (1999) Structure of the active domain of the herpes simplex virus protein ICP47 in water/sodium dodecyl sulfate solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry*, **38**, 13692-13698.
- Piehler, J. and Schreiber, G. (1999) Biophysical analysis of the interaction of human ifnar2 expressed in E. coli with IFNalpha2. *J Mol Biol*, **289**, 57-67.
- Porgador, A., Yewdell, J.W., Deng, Y., Bennink, J.R. and Germain, R.N. (1997) Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity*, **6**, 715-726.
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgerit, F., Bennink, J.R. and Yewdell, J.W. (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*, **18**, 343-354.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J Biol Chem*, **272**, 15661-15667.
- Qi, J., Wu, J., Somkuti, G.A. and Watson, J.T. (2001) Determination of the disulfide structure of sillucin, a highly knotted, cysteine-rich peptide, by cyanylation/cleavage mass mapping. *Biochemistry*, **40**, 4531-4538.



- Raghuraman, G., Lapinski, P.E. and Raghavan, M. (2002) Tapasin interacts with the membrane-spanning domains of both TAP subunits and enhances the structural stability of TAP1 x TAP2 Complexes. *J Biol Chem*, **277**, 41786-41794.
- Riener, C.K., Kada, G. and Gruber, H.J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal Bioanal Chem*, **373**, 266-276.
- Robson, N.C., Beacock-Sharp, H., Donachie, A.M. and Mowat, A.M. (2003) Dendritic cell maturation enhances CD8+ T-cell responses to exogenous antigen via a proteasome-independent mechanism of major histocompatibility complex class I loading. *Immunology*, **109**, 374-383.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, **17**, 739-779.
- Russ, G., Esquivel, F., Yewdell, J.W., Cresswell, P., Spies, T. and Bennink, J.R. (1995) Assembly, intracellular localization, and nucleotide binding properties of the human peptide transporters TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Biol Chem*, **270**, 21312-21318.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. and Cresswell, P. (1996) Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*, **5**, 103-114.
- Saveanu, L., Daniel, S. and van Endert, P.M. (2001) Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem*, **276**, 22107-22113.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B. and Stubbs, M.T. (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol*, **330**, 333-342.
- Schmitt, L. and Tampé, R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 754-760.
- Schoenhals, G.J., Krishna, R.M., Grandea, A.G., 3rd, Spies, T., Peterson, P.A., Yang, Y. and Fruh, K. (1999) Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells. *Embo J*, **18**, 743-753.

- Singh, R., Blattler, W.A. and Collinson, A.R. (1993) An amplified assay for thiols based on reactivation of papain. *Anal Biochem*, **213**, 49-56.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, **10**, 139-149.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-130.
- Sweet, C. (1999) The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev*, **23**, 457-482.
- Tampé, R., Urlinger, S., Pawlitschko, K. and Uebel, S. (1997) From Bacteria to Man. In Holland, B. (ed.), *Unusual Secretory Pathways*. Springer, New York, pp. 115-136.
- Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hämmerling, G.J. and Momburg, F. (2002) Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J Immunol*, **168**, 1950-1960.
- Tanaka, K. and Kasahara, M. (1998) The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev*, **163**, 161-176.
- Tarun, A.S., Lee, J.S. and Theologis, A. (1998) Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9796-9801.
- Thomas, J.G. and Baneyx, F. (1996) Protein folding in the cytoplasm of *Escherichia coli*: requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES molecular chaperone machines. *Mol Microbiol*, **21**, 1185-1196.
- Tomazin, R., Hill, A.B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P., Ploegh, H.L., Andrews, D.W. and Johnson, D.C. (1996) Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *Embo J*, **15**, 3256-3266.
- Traviglia, S.L., Datwyler, S.A. and Meares, C.F. (1999) Mapping protein-protein interactions with a library of tethered cutting reagents: the binding site of sigma 70 on *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochemistry*, **38**, 4259-4265.
- Turnquist, H.R., Vargas, S.E., Schenk, E.L., McIlhaney, M.M., Reber, A.J. and Solheim, J.C. (2002c) The interface between tapasin and MHC class I:

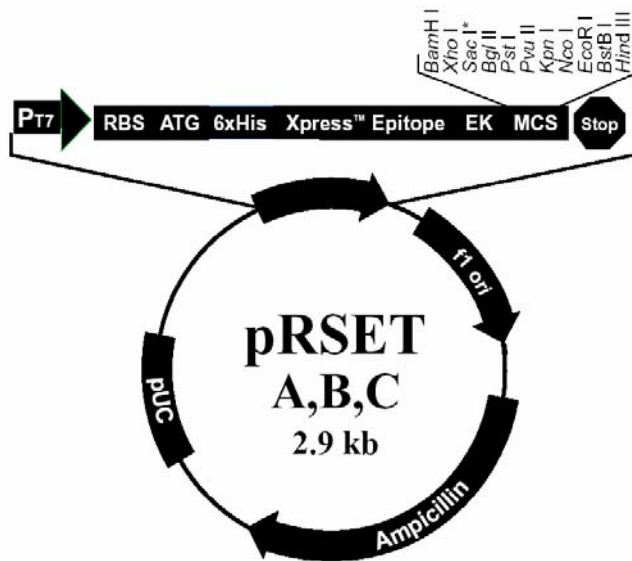
- identification of amino acid residues in both proteins that influence their interaction. *Immunol Res*, **25**, 261-269.
- Uebel, S., Meyer, T.H., Kraas, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmuller, K.H. and Tampé, R. (1995) Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J Biol Chem*, **270**, 18512-18516.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T.H., Uebel, S. and Tampé, R. (1997) Intracellular location, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur J Biochem*, **245**, 266-272.
- Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M. and Minami, M. (2003) MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol Lett*, **89**, 125-131.
- van Endert, P.M., Tampé, R., Meyer, T.H., Tisch, R., Bach, J.F. and McDevitt, H.O. (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity*, **1**, 491-500.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-619.
- Vos, J.C., Reits, E.A., Wojcik-Jacobs, E. and Neefjes, J. (2000) Head-head/tail-tail relative orientation of the pore-forming domains of the heterodimeric ABC transporter TAP. *Curr Biol*, **10**, 1-7.
- Vos, J.C., Spee, P., Momburg, F. and Neefjes, J. (1999) Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol*, **163**, 6679-6685.
- Waldo, G.S. (2003) Improving protein folding efficiency by directed evolution using the GFP folding reporter. *Methods Mol Biol*, **230**, 343-359.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.
- Weiss, G.A., Watanabe, C.K., Zhong, A., Goddard, A. and Sidhu, S.S. (2000) Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8950-8954.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996b) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I

- heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, **84**, 769-779.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996c) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438.
- Williams, A.P., Peh, C.A., Purcell, A.W., McCluskey, J. and Elliott, T. (2002) Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity*, **16**, 509-520.
- Wu, J. and Watson, J.T. (1997) A novel methodology for assignment of disulfide bond pairings in proteins. *Protein Sci*, **6**, 391-398.
- Wurth, C., Guimard, N.K. and Hecht, M.H. (2002) Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis. *J Mol Biol*, **319**, 1279-1290.
- Yang, Y., Fruh, K., Ahn, K. and Peterson, P.A. (1995) In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*, **270**, 27687-27694.
- Yewdell, J.W. and Hill, A.B. (2002) Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol*, **3**, 1019-1025.
- Yewdell, J.W., Reits, E. and Neefjes, J. (2003c) Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol*, **3**, 952-961.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem*, **276**, 32313-32321.
- Zarling, A.L., Luckey, C.J., Marto, J.A., White, F.M., Brame, C.J., Evans, A.M., Lehner, P.J., Cresswell, P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Engelhard, V.H. (2003) Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC Peptide binding. *J Immunol*, **171**, 5287-5295.
- Zhou, P., Lugovskoy, A.A. and Wagner, G. (2001) A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins. *J Biomol NMR*, **20**, 11-14.

## 9 Anhang

### 9.1 Plasmidkarten

#### 9.1.1 pRSET-B



2897 Nukleotide

T7 Promoter: 20-39

His<sub>6</sub> Sequenz: 112-129

T7 *gene 10 leader*: 133-162

Anti-Xpress Epitop: 169-192

*Multiple cloning site*: 202-248

T7 Transkriptionsterminator:

256-385

pRSET *reverse priming site*: 295-

385

f1 Origin: 465-911

*bla* Promoter: 943-1047

Ampicillin (*bla*) Resistenz Gen:

1042-1902

pUC Origin: 916-2852

```

                T7 promoter                                     RBS
21  AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA

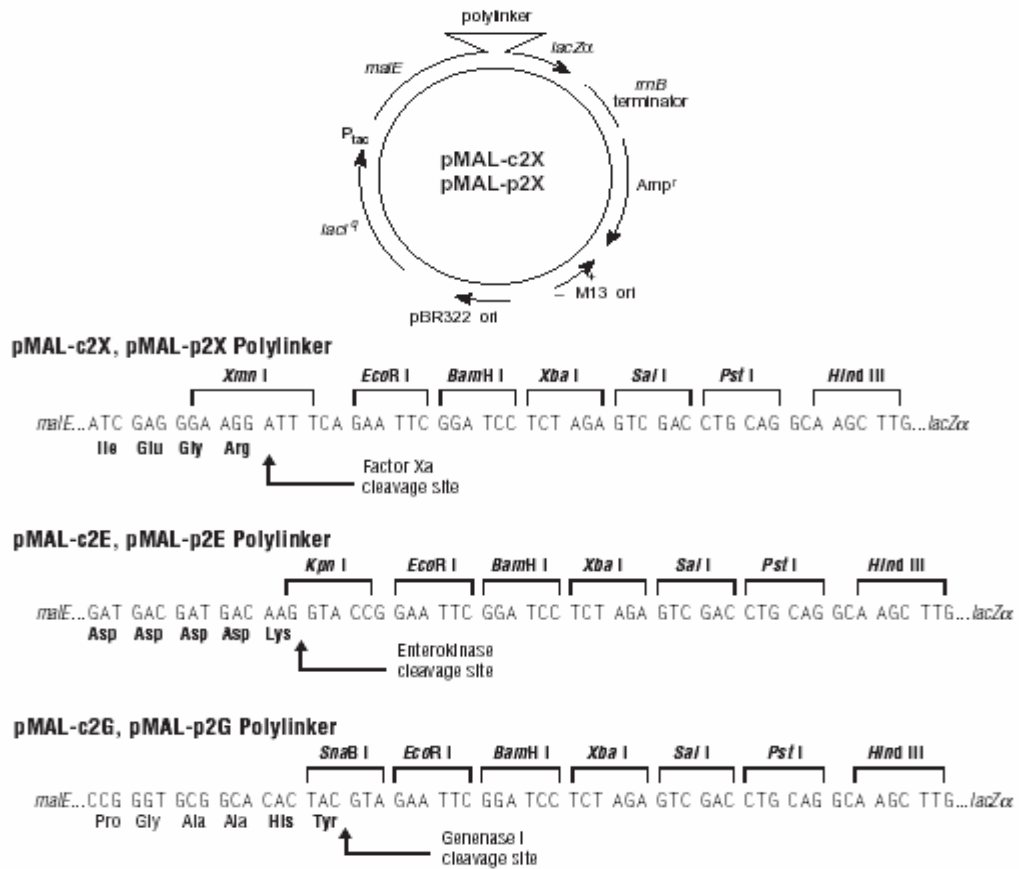
                Polyhistidine (6xHis) region
91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
    Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

                T7 gene 10 leader                               Xpress™ Epitope      BamHI      XhoI SacI
148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CCG AGC TCG
    Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Pro Ser Ser
                EK recognition site      EK cleavage site

    BglII      PstI PvuII KpnI NcoI EcoRI BstBI HindIII
205 AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT TGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC
    Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala ***

                pRSET reverse priming site
261 GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA
    
```

## 9.1.2 pMal-c2X und pMal-p2X



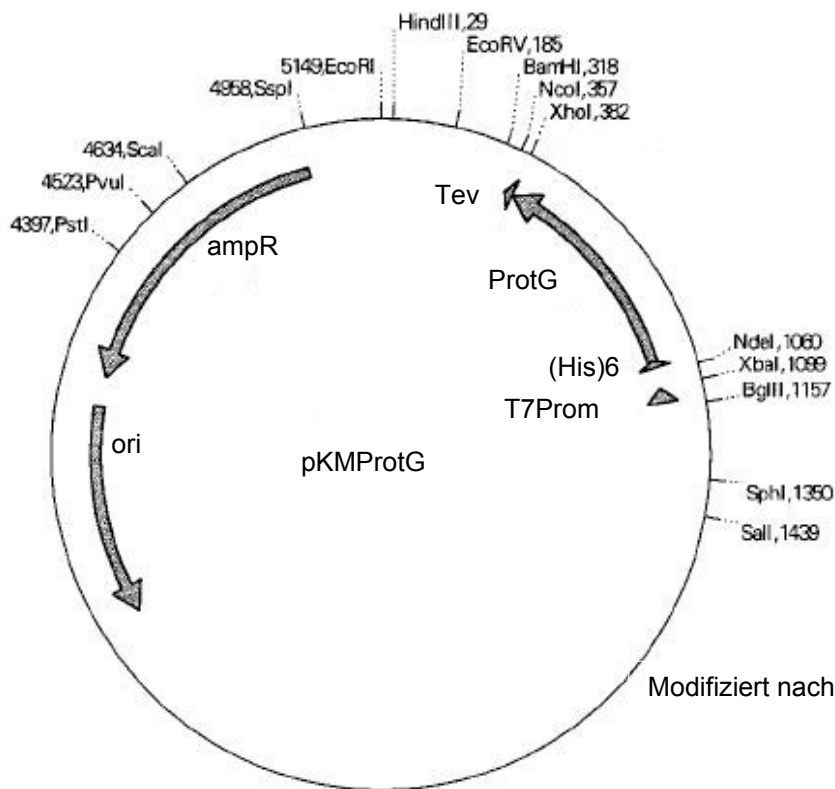
### pMal-c2X

### pMal-p2X

lacI promoter	1-46	lacI Promoter	15-46
lacI Start Codon	81	lacI Start Codon	81
lacI Terminator	1161	lacI Stop Codon	1161
P <sub>tac</sub> DNA Fragment	1205	P <sub>tac</sub> DNA Fragment	1205
P <sub>tac</sub> Promoter	1406-1433	P <sub>tac</sub> Promoter	1406-1433
malE DNA Fragment	1478	malE DNA Fragment	1478
malE Start Codon	1528	malE Start Codon	1528
malE Primer	2587-2610	malE Signalsequenz	1528-1605
Start Linker, Faktor Xa	2629	malE Primer	2662-2685
Start lacZ-α Sequenz	2745	Start Linker, Faktor Xa	2704
M13/pUC Seq.-Primer	2756-2779	Start lacZ-α Sequenz	2810
Start rrnB Terminator	2901	Start rrnB Terminator	2976
Stop codon für lacZ-α	2914	Stop codon for lacZ-α	2989
rrnB T1T2	3104-3307	rrnB T1T2	3179-3382
Start pBR322 Sequenz	3327	Start pBR322 Sequenz	3402
Amp <sup>r</sup> Start Codon	3418	Amp <sup>r</sup> Start Codon	3493
Amp <sup>r</sup> Stop Codon	4276	Amp <sup>r</sup> Stop Codon	4351
M13 origin (+ -)	4320-4833	M13 origin (+ -)	4395-4908

pBR322 Origin	4944-5532	pBR322 Origin	5019-5607
rop Stop Codon	5962	rop Stop Codon	6037
rop Start Codon	6151	rop Start Codon	6226

### 9.1.3 pKMProtG



## 9.2 Nucleotidsequenz des HCMV-Proteins US6

5´ ATGGATCTCTTGATTTCGTCTCGGTTTTCTGTTGATGTGTGCGTTGCCGACCCCCGGTGA  
 GCGGTCTTCGCGTGACCCGAAAACCCTTCTCTCTCTGTCTCCGCGACAACAAGCTTGTGTT  
 CCGAGAACGAAGTCGCACAGACCCGTTTGTTACAACGATACAGGGGACTGCACAGATGCAG  
 ATGATAGCTGGAAACAGCTGGGTGAGGACTTTGCGCACCAATGCTTGCAGGCGGGCGAAAAA  
 GAGGCCTAAAACGCACAAATCCCGTCCGAACGATAGGAACCTTGAGGGTAGGCTGACCTGT  
 CAACGAGTCCGTCGGCTACTGCCCTGTGATTTGGATATTCATCCTAGCCACCGGTTGTTAA  
 CGCTTATGAATAACTGCGTCTGTGACGGGGCCGTTTGGAACGCGTTTCGCTTGATAGAACG  
 ACACGGATTCTTCGCTGTGACTTTGTATTTATGTTGCGGGATTACCCTGCTGGTTGTTATT  
 CTAGCATTGCTGTGCAGCATAACATACGAATCGACTGGACGTGGGATTCGACGTTGTGGCT  
 CCTGA-3´

## 9.3 Aminosäuresequenz des HCMV-Proteins US6

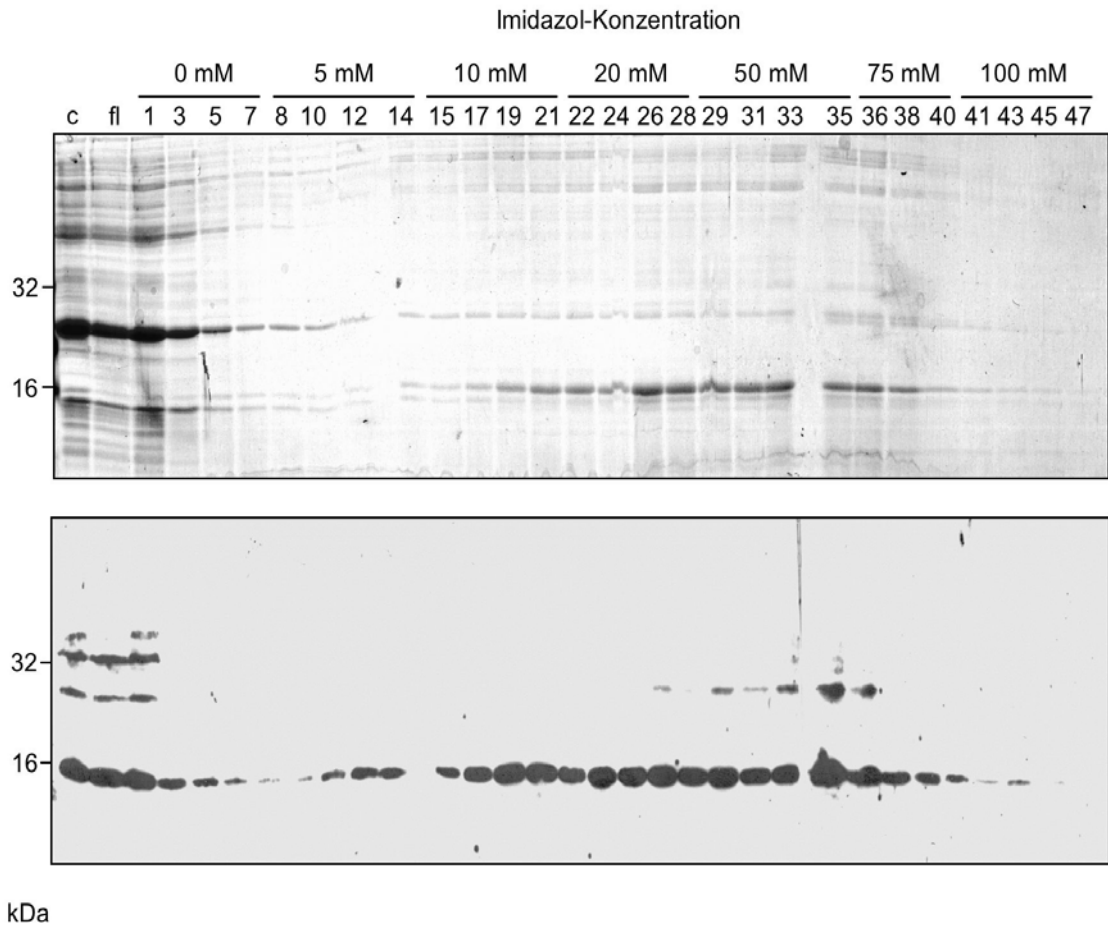
	10	20	30	40	50
MDLLI	RLGFL	LMCALPTPGE	RSSRDPK	TLLSLS	PRQKSHRPVC
	60	70	80	90	100
YNDTGD	CTDA	DDSWKQLGED	FAHQCLQAAK	KRPKTHKSRP	NDRNLEGR
	110	120	130	140	150
CQVR	RLLPC	DLDIHPSHRL	LTLMN	NCVCD	GAVWNAFRLI
	160	170	180		
YLCCG	ITLLV	VILALLCSIT	YESTGRGIRR	CGS	





**Heterologe Expression der US6-Deletionsmutanten in *E. coli*.** Die Konstrukte US6(20-146), US6(20-144), US6(20-125) und US6(40-144) wurden mittels PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pRSET-B kloniert. Zur Expression wurde auch hier *E. coli* BL21(DE3)pLysS gewählt. Eine Auswahl verschiedener Klone wurde bei 37°C kultiviert und die Expression der Deletionsmutanten durch Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Vor und drei Stunden nach Induktion wurden den Kulturen jeweils ein Aliquot entnommen und mittels SDS-PAGE (jeweils links) und Western-Blot (jeweils rechts) analysiert. Im Vergleich zu den nicht induzierten Proben (-) erscheint bei einer Überexpression nach Induktion (+) ein durch Coomassie detektierbares Protein mit einem apparenten molekularen Gewicht von etwa 16 kDa. Dieses ist bei den mit den Konstrukten US6(20-146) und US6(20-144) transformierten Zellen am deutlichsten erkennbar. Die Deletionsmutante US6(40-144) und US6(20-125) scheinen schwächer exprimiert zu werden. Die apparente molekulare Masse schwankt entsprechend der N- und C-terminalen Deletionen. Alle Mutanten konnten mittels Immundetektion nachgewiesen werden. Die Proteine US6(20-146), US6(20-144) und US6(20-125) wurden mit dem US6-spezifischen Antikörper An9218 detektiert. Bei der Deletionsmutante US6(40-144) musste der C-terminale Histidinanhang mit einem Antikörper nachgewiesen werden. Bei dieser Mutante fehlt das N-terminale Epitop gegen das der US6-spezifische Antikörper gerichtet ist. Bei den Deletionsmutanten US6(25-144) und US6(35-144) konnte jedoch keine Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

## 9.5 Reinigung von US6(20-125) aus dem Zytoplasma



### Chromatographiepuffer:

20 mM Tris/HCl pH 8,25

150 mM NaCl

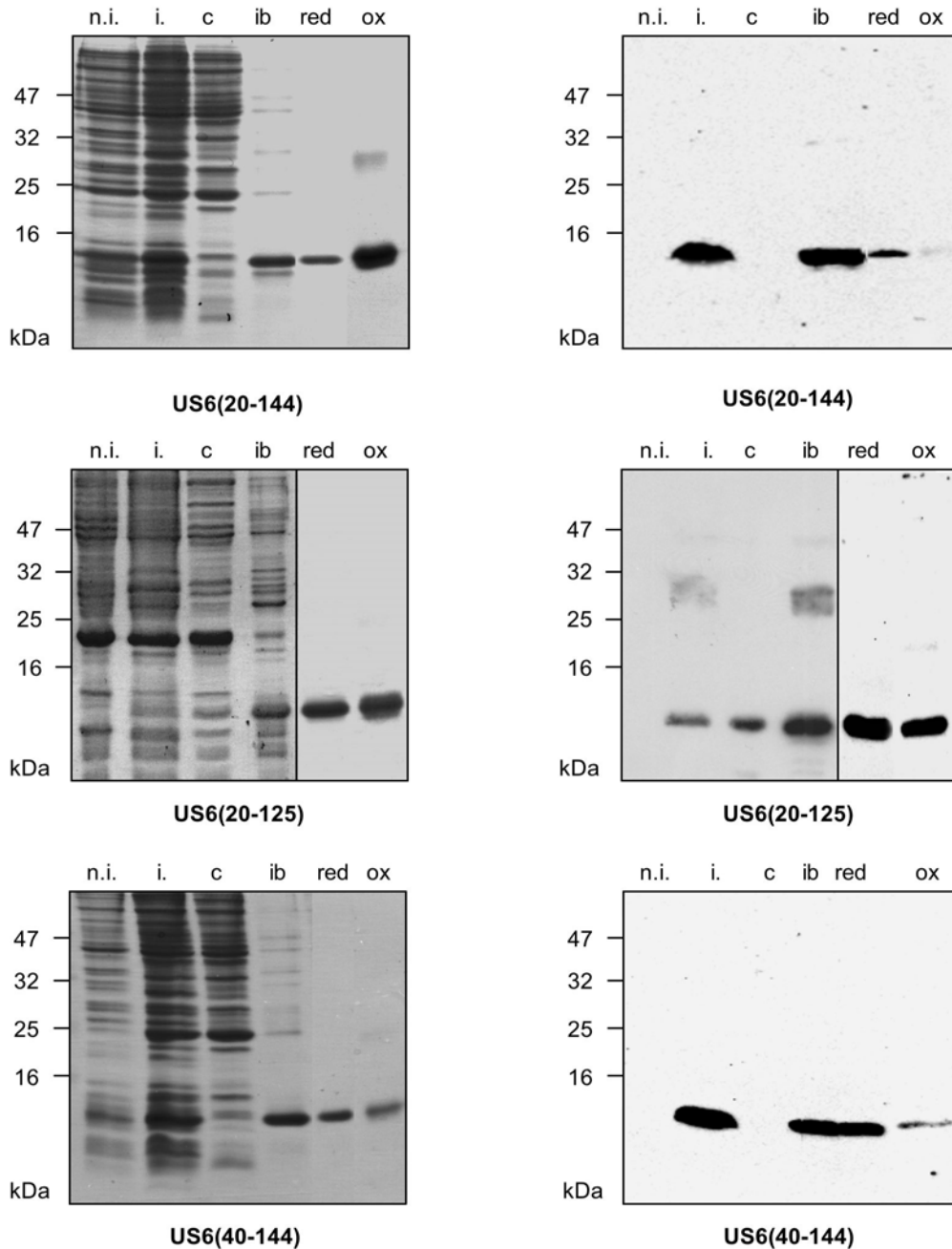
unterschiedliche Konzentrationen

an Imidazol

**Reinigung von US6(20-125) aus dem Zytoplasma von *E. coli*.** Das Konstrukt US6(20-125) ist teilweise in der löslichen Fraktion des Zytoplasmas zu finden. Dieses Konstrukt sollte über die C-terminale Sequenz aus sechs Histidinresten mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie aus dem Zytoplasma gereinigt werden. Das Zytoplasma (c) wurde auf 5 ml mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladener IDA-Sepharose gegeben. Nach Durchlauf der Probe wurde die Säule mit einem Stufengradienten bis 100 mM Imidazol gewaschen. Die aufgefingenen Fraktionen haben ein Volumen von je 1,5 ml. Die gesammelten Fraktionen werden mittels SDS-PAGE und anschließend Western-Blot analysiert. Die Proteine im Gel wurden mittels Coomassie Färbung detektiert (oben), US6(20-125) mit einem US6-spezifischen Antikörper (unten). Auffällig ist, daß das Konstrukt US6(20-125) nicht bzw. zum Zweck einer Reinigung schlecht an das Säulenmaterial bindet. Der großer Teil des aufgetragenen Proteins (c) befindet sich im Durchfluß (fl). Mit steigender Konzentration an Imidazol wird das Protein kontinuierlich aus dem Säulenmaterial gewaschen und findet sich in nahezu jeder Fraktion. Der

größte Anteil des an das Säulenmaterial gebundenen Inhibitors eluiert bei Imidazolkonzentrationen zwischen 20 und 75 mM. Zusammen mit US6(20-125) eluieren jedoch auch *E. coli* Proteine. Dies zeigt, daß sich US6(20-125) nicht mit Hilfe dieser Methode aus dem Zytoplasma reinigen lässt.

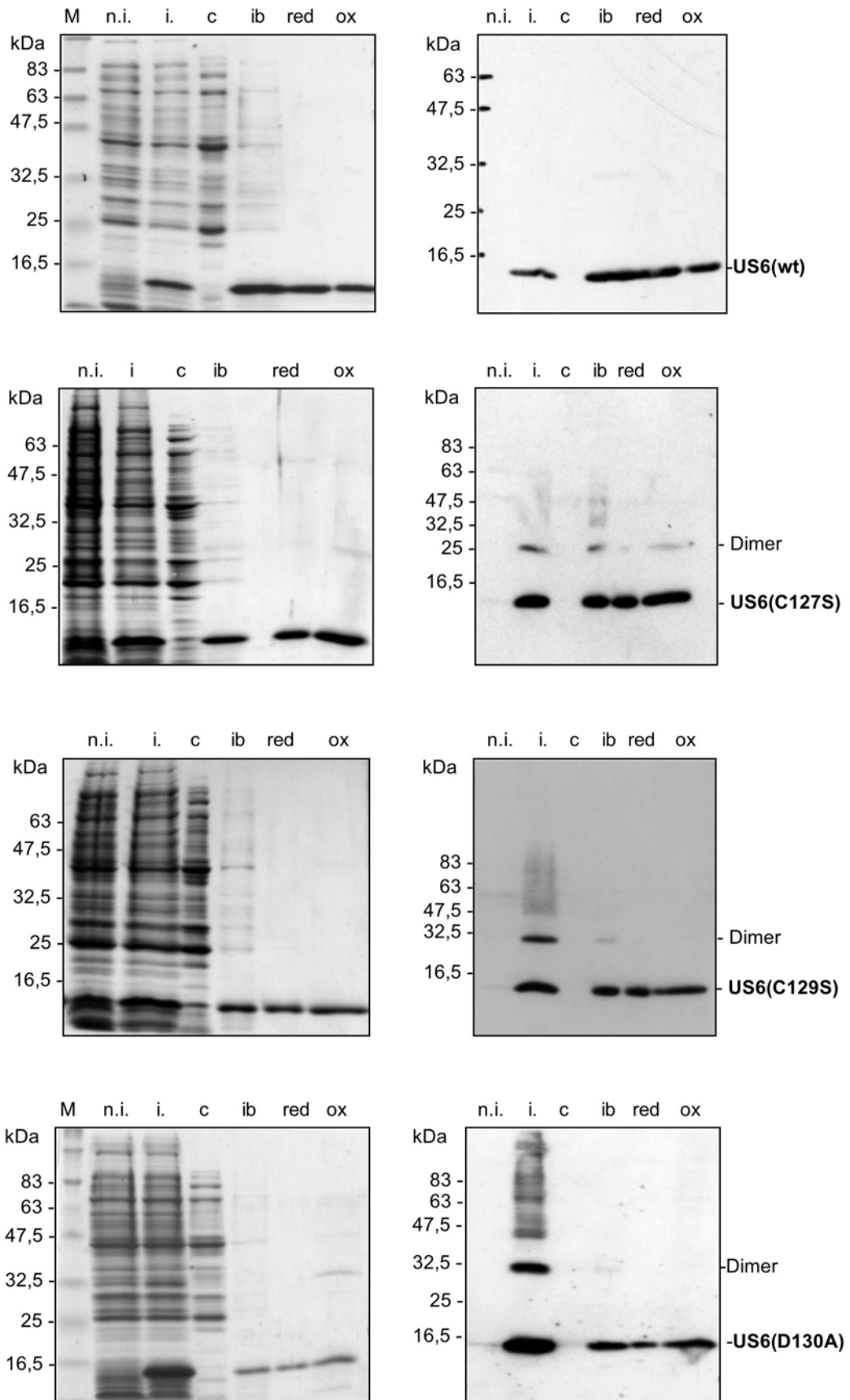
## 9.6 Reinigung und Rückfaltung von US6-Deletionsmutanten

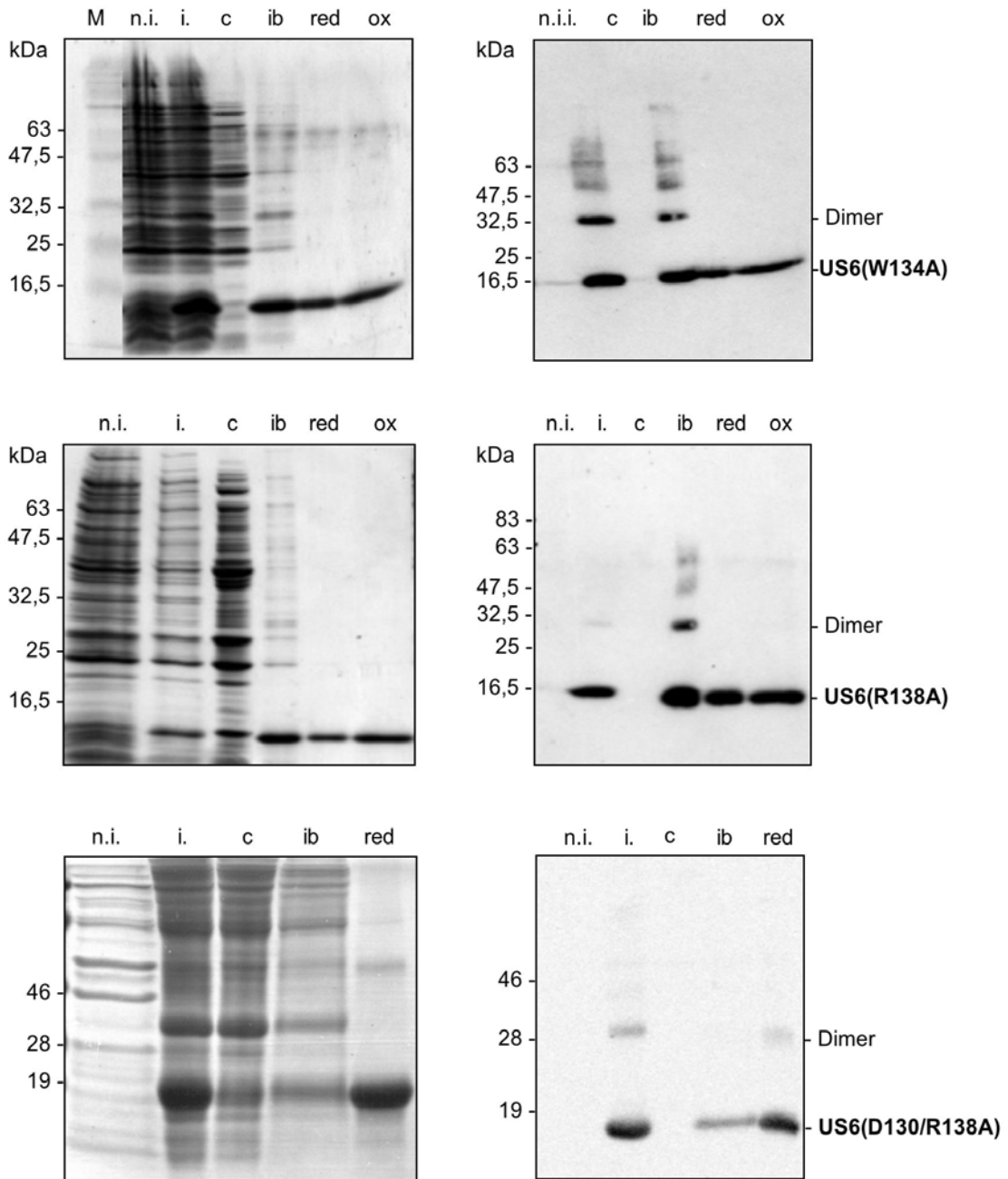


**Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6-Punktmutanten.** Die Deletionsmutanten wurden auf die gleiche Weise wie US6(20-146) exprimiert und daraufhin aus *inclusion bodies* gereinigt und rückgefaltet. Die Expression, Reinigung und Rückfaltung der Mutanten wurde anschließend mittels SDS-PAGE (links) und Western-Blot (rechts) untersucht. Nach der Elektrophorese wurden im Gel vorhandene Proteine mit Coomassie angefärbt. Zur Immundetektion

der US6-Deletionsmutanten wurde ein Antikörper gegen den C-terminalen Histidinanhang verwendet. Die Expression der Mutanten wird durch die Zugabe von 0,3 mM IPTG induziert. Im Vergleich zur nicht induzierten Probe (n.i.) erscheint nach der Induktion (i.) ein Protein bei einem apparenten Molekulargewicht von 12,5-16 kDa. Die Unterschiede bei der beobachteten molekularen Masse gehen auf die N- und C-terminalen Deletionen zurück. Wie schon vorher beobachtet, weist das Protein US6(20-125) von allen Deletionsmutanten die geringste Expressionsrate auf (siehe 9.4). Die Deletionsmutanten lassen sich alle nach der Induktion mit einem Antikörper nachweisen. Die Expression der Deletionsmutanten bei 37°C zur Akkumulation in Form von *inclusion bodies* (ib). Einzig bei der Mutante US6(20-125) sind bis zu 20% des exprimierten Proteins in der löslichen Fraktion vorzufinden (c). Es wurde versucht diesen Teil des Proteins zu reinigen, was jedoch nicht möglich war (siehe 9.5). Aus diesem Grund wurde US6(20-125) ebenfalls aus *inclusion bodies* gereinigt. Nach der Rückfaltung der Deletionsmutanten wurden die Proteine jeweils unter oxidativen und reduzierenden Bedingungen (ox. und red.) gelelektrophoretisch analysiert. Zu bemerken ist, daß der Histidinanhang am C-Terminus von US6(20-146) und US6(40-144) durch einen spezifischen Antikörper nur dann erkannt wird, wenn das Protein vorher reduziert wurde (red.). Unter oxidativen Bedingungen, konnten die Mutanten US6(20-144) und US6(40-144) im nachfolgenden Western-Blot mit dem Antikörper nur schlecht detektiert werden. Das Protein US6(20-125) bildet hier wieder die Ausnahme. Es wird durch den Antikörper sowohl in seiner reduzierten als auch oxidierten Form erkannt.

## 9.7 Reinigung und Rückfaltung von US6-Punktmutanten



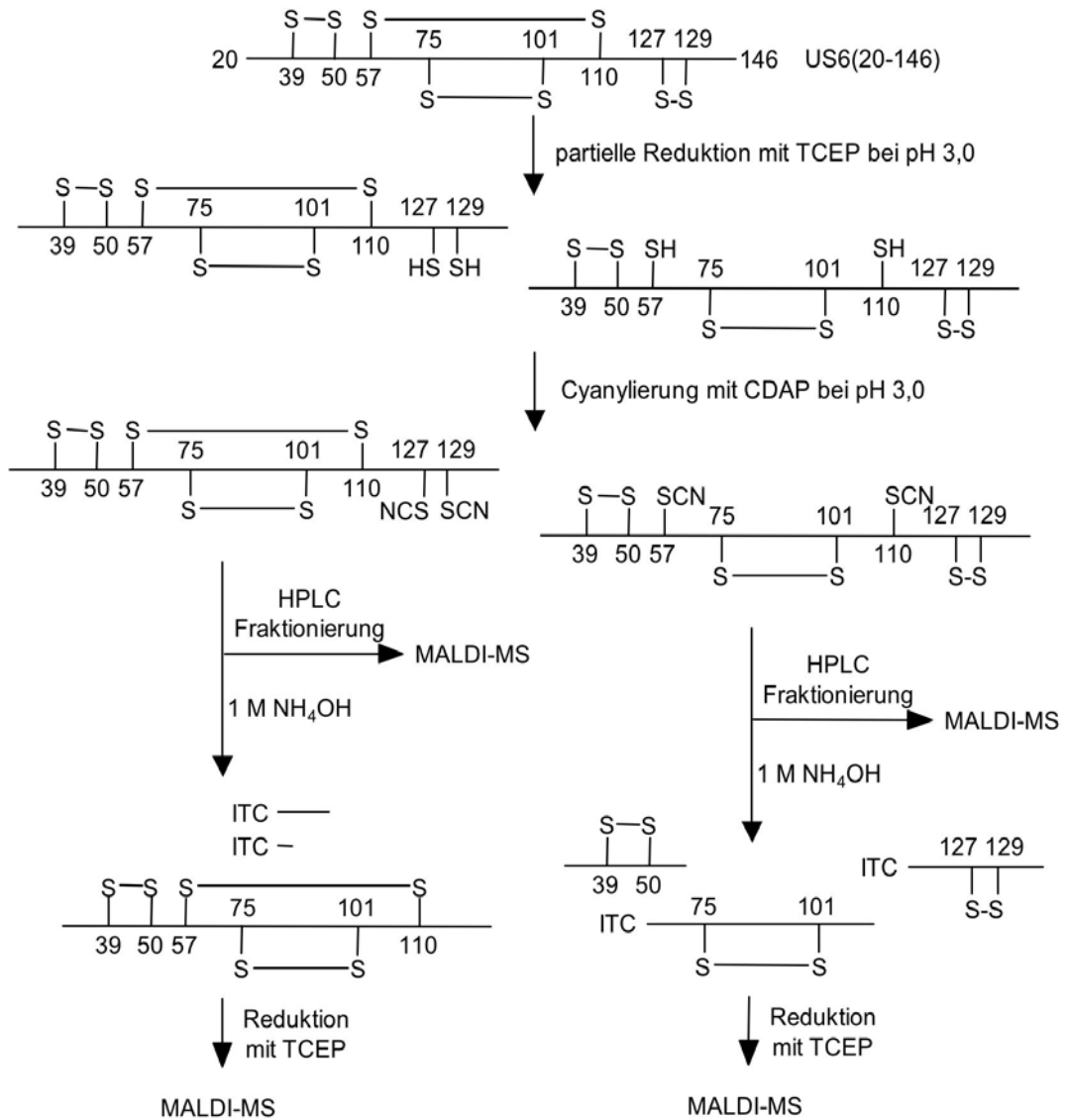


**Expression, Reinigung und Rückfaltung von US6-Mutanten.** Heterologe Expression bei 37°C führt bei den Punktmutanten wie beim Wildtypkonstrukt zur Akkumulation in *inclusion bodies*. Als Expressionswirt für die Mutanten wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS gewählt. Die Konstrukte wurden mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt und durch Dialyse gegen Rückfaltungspuffer 2 renaturiert (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Präzipitate wurden durch Zentrifugation bei 120000 g für 1 Stunde bei 4°C entfernt und die Proteine mit einem Zentrifugalkonzentrator konzentriert. Anschließend wurde die Reinigung und Renaturierung mittels reduzierender (red.) und oxidativer (ox.) SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Die Anfärbung der Gele erfolgt mittels Coomassie-Färbung (links), die Detektion der Mutanten nach Western-Blot mit einem US6-spezifischen Antikörper (jeweils rechts). Nach Induktion der Expression mit 0,3 mM IPTG erscheint das überexprimierte Protein bei einem apparenten Molekulargewicht von ca. 16 kDa (i.). Vor Induktion ist die Bande nicht zu erkennen und auch im Western-Blot erscheint kein US6-spezifisches Signal (n.i.).

Es zeigt sich, daß die eingeführten Mutationen bei der gewählten Expressionsbedingung nicht zu einer besseren Löslichkeit der Konstrukte beitragen. In der zytosolischen Fraktion ist US6 nicht zu detektieren (c). Dagegen findet sich das gesamte Protein in der unlöslichen Fraktion (ib). Nach Reinigung und Rückfaltung erscheinen alle Konstrukte sowohl unter reduzierenden und oxidativen Bedingungen größtenteils als monomeres Protein mit dem schon erwähnten apparenten Molekulargewicht von ca. 16 kDa (für R138/D130A nur unter reduzierenden Bedingungen gezeigt). Anschließend wurde mit diesen Konstrukten ein Nukleotidbindungsassay durchgeführt, um deren inhibitorische Aktivität an TAP zu analysieren.



## 9.8 Charakterisierung des Disulfidnetzwerks von US6



### Puffer 1:

100 mM Natriumcitrat pH 3,0  
6 M Guanidinhydrochlorid  
500 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin

### Puffer 2:

100 mM Natriumcitrat pH 3,0  
1,25 M 1-Cyano-4-dimethylaminopyridin

### Puffer 3:

200 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin

### Puffer 4:

67% (v/v) Acetonitril  
0,1% (v/v) Trifluoressigsäure

**Das Disulfid-Netzwerk in der ER-luminalen Domäne von US6.** Schematische Darstellung zur Bestimmung eines Netzwerks aus Cysteinbrücken (modifiziert aus (Qi et al., 2001; Wu & Watson, 1997)). Das in *E. coli* heterolog exprimierte Protein wurde aus *inclusion bodies* gereinigt und *in vitro* renaturiert (Durchführung siehe 3.2.2 und 3.2.3). Parallel zur Aktivitätsbestimmung (siehe 3.2.14)

wurde US6 über *reversed phase* Chromatographie gereinigt (siehe 3.2.17) und die proteinhaltigen Fraktionen im Vakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde in 30  $\mu$ l Puffer 1 aufgenommen und üN bei 40°C inkubiert. Für die Cyanylierung des partiell reduzierten Proteins wurde die Probe mit 20  $\mu$ l Puffer 2 versetzt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine weitere *reversed phase* Chromatographie. Aliquots der einzelnen proteinhaltigen Fraktionen werden mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe 3.2.18). Der verbleibende Rest der Proben wurde im Vakuum getrocknet.

Der Rückstand wurde daraufhin in 1 M Ammoniak-Lösung aufgenommen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Dadurch werden die reduzierten und cyanylierten Proteine gespalten. Überschüssiges Ammonium wurde mittels Trocknung der Probe im Vakuum entfernt. Es folgte die Aufnahme der Pellets in 10  $\mu$ l Wasser und die anschließende massenspektrometrische Untersuchung von entnommenen Aliquots.

Die verbliebene Probe wurde mit dem gleichen Volumen Puffer 3 versetzt, für 4 Stunden bei 40°C inkubiert und anschliessend mit 20  $\mu$ l Puffer 4 verdünnt. Das vollständig reduzierte Protein wurde ebenfalls massenspektrometrisch untersucht.

Das für die Bestimmung eingesetzte Protein bestand aus mehreren Disulfidisomeren. Das in dem Schema gezeigte Netzwerk wurde am häufigsten beobachtet. Die Versuche deuten darauf hin, daß die acht in der ER-luminalen Domäne vorkommenden Cysteine vier intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Bei dem dargestellten Netzwerk bilden folgende Cysteine Disulfidbrücken aus: Cys39-Cys50, Cys57-Cys110, Cys75-Cys101, Cys127-Cys129. Es ist jedoch nicht sichergestellt, daß es sich bei diesem Isomer um die aktive Form handelt. Aus diesem Grunde soll versucht werden, alle Isomere des *in vitro* renaturierten Proteins mittels *reversed phase* Chromatographie zu separieren und nochmals gesondert rückzufalten. Diese Isomere sind daraufhin auf ihre Aktivität zu testen. Im folgenden Schritt kann von der aktiven Form das Disulfid-Netzwerk analysiert werden.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, daß es im Zuge der Reduktion des Proteins zu ungewünschten Spaltungen kommt. Unmittelbar nach der Reduktion mit TCEP waren Fragmente des Inhibitors mittels MALDI nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Das Protein lässt sich jedoch unmittelbar an Methioninresten mit Bromcyan spezifisch spalten. US6(20-146) enthält bereits ein Methionin an Position 124. Ist der Cysteinrest an Position 127 mit dem Cystein 129 über ein Disulfid verknüpft, entstehen bei einer Spaltung des Proteins zwei Fragmente. Mittels gerichteter Mutagenese kann zwischen jeder der vermuteten Disulfidbrücken eine Position gegen Methionin ausgetauscht werden. Wenn die an bestimmten Positionen eingeführten Mutationen keinen Einfluß auf die Aktivität des Proteins haben, können auf diese Weise die Disulfidbrücken des Netzwerks bestimmt werden.

## Lebenslauf:

Christoph Kyritsis  
Fabriciusstr. 16  
65933 Frankfurt/Main  
Deutschland

geb. am 16 Oktober 1972  
in Essen, Deutschland

## Nationalität

Deutsch

## Schulbildung

St. Barbara Kath. Grundschule, Essen	1979-1983
Gustav-Heinemann Gesamtschule, Essen	1983-1992

## Universitäre Ausbildung

Studium der Biologie an der Ruhr-Universität, Bochum	1992-1999
--	-----------

<b>Diplomarbeit</b> im Fachbereich Biologie	05/1998-05/1999
---	-----------------

Institut für Biochemie der Pflanzen  
unter der Betreuung von Prof. Dr. R. J. Berzborn  
Thema der Arbeit:

*„Sind Antikörper gegen Untereinheiten der  
photosynthetischen ATP-Synthase Rotationsblocker?“*

<b>Promotion</b> an der Philipps-Universität, Marburg	07/1999-04/2004
---	-----------------

und der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt  
unter der Betreuung von Prof. Dr. R. Tampé

Thema der Arbeit:

*„Funktionelle Analyse des Zytomegalievirus-Proteins US6“*

## Auszeichnungen

„*Young Investigator Award*“ für die beste Posterpräsentation

„*Characterization of the viral TAP-inhibitor gpUS6*“

3<sup>rd</sup> FEBS Advanced Lecture Course

„*ATP Binding Cassette Transporters: From Genetic Disease to Multi Drug  
Resistance*“

3-10 März 2001, Gosau, Austria