

**Funktionale Expression des ER-Chaperons Tapasin und
Charakterisierung der Interaktion von Tapasin mit MHC-
Klasse I-Molekülen *in vitro***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stefan Ammer
aus München

Frankfurt 2003
(DF1)

vom Fachbereich 14 (chemisch und pharmazeutische Wissenschaften) der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die zelluläre Immunantwort	3
2.2	MHC-Klasse I-Antigen-Prozessierung und -Präsentation	4
2.3	MHC-Klasse I-Moleküle	5
2.4	Tapasin	7
2.5	Calnexin	9
2.6	Calreticulin	10
2.7	ERp57	11
2.8	Proteindegradation durch das Proteasom	12
2.9	Import von Peptiden ins ER durch den Peptidtransporter TAP	14
3	Motivation	15

4	Material und Methoden.....	17
4.1	Materialien	17
4.1.1	PCR-Primer	17
4.1.2	Plasmide	17
4.1.3	Zellen.....	18
4.1.4	Proteine.....	19
4.1.5	Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien	20
4.1.6	Geräte	21
4.2	Molekularbiologische Methoden	23
4.2.1	DNA-Präparation.....	23
4.2.2	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktions- endonukleasen.....	23
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	24
4.2.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	24
4.2.5	Abbau von überhängenden Enden	24
4.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten	25
4.2.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	25
4.2.8	DNA-Sequenzierung	26
4.2.9	Transformation von <i>E. coli</i>	26
4.2.10	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	27

4.3	Methoden der Proteinexpression in <i>E. coli</i>.....	28
4.3.1	pBAD System	28
4.3.2	pET und pRSET System.....	29
4.3.3	pASK-IBA System	30
4.3.4	pMAL System	30
4.4	Methoden der Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i> ...	31
4.4.1	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> (Lithiumacetat-Methode) ..	31
4.4.2	Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i>	32
4.5	Methoden der Proteinexpression in Insektenzellen ..	32
4.5.1	Herstellung von rekombinanter "bacmid-DNA"	33
4.5.2	Kultivierung von Insektenzellen.....	33
4.5.3	Generierung von rekombinanten Baculoviren	34
4.5.4	Amplifikation von Baculoviren	34
4.5.5	Proteinexpression mittels Baculovirus-Infektion.....	35
4.6	Proteinchemische Methoden	35
4.6.1	Zellaufschluss von <i>E.coli</i>	35
4.6.1.1	Zellaufschluss und Inclusion Bodies-Solubilisierung bei unlöslichem Protein (Tapasin).....	35
4.6.1.2	Zellaufschluss bei unlöslichem Protein (HLA-B*2705-HC, β_2m).....	36
4.6.1.3	Zellaufschluss bei cytoplasmatischem Protein	36
4.6.1.4	Zellaufschluss bei periplasmatischem Protein.....	37
4.6.2	Zellaufschluss von <i>S. cerevisiae</i>	37
4.6.3	Zellaufschluss von Insektenzellen	38
4.6.4	Thrombin-Verdau.....	38

4.6.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
4.6.6	Proteinfärbung	40
4.6.6.1	Coomassiefärbung.....	40
4.6.6.2	Silberfärbung	40
4.6.7	Western-Blotting	41
4.6.7.1	Tank-Blot	41
4.6.7.2	Semidry-Blot	42
4.6.8	Immunchemischer Nachweis.....	42
4.6.9	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode	43
4.6.10	Fällung von Proteinen.....	43
4.6.10.1	TCA/Aceton-Fällung	43
4.6.10.2	NP40-Lyse und Chloroform/Methanol-Extraktion	44
4.6.11	Proteinrückfaltung	44
4.6.11.1	I-Tapasin	44
4.6.11.2	MHC-Klasse I-Molekül HLA-B*2705	45
4.6.12	Generierung von leeren MHC-Klasse I-Molekülen.....	45
4.7	Reinigung von Proteinen.....	46
4.7.1	Immobilisierte Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC)	46
4.7.2	StrepTactin-Affinitätschromatographie	47
4.7.3	Amylose-Affinitätschromatographie.....	47
4.7.4	Gelfiltration.....	48
4.7.4.1	Reinigung isolierter Proteine.....	48
4.7.4.2	MHC-Tapasin-Wechselwirkung.....	48
4.7.5	Ionenaustausch-Chromatographie.....	49

4.8	Biophysikalische Methoden	49
4.8.1	Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie (SPR)	49
4.8.2	Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD).....	50
4.9	Zellbiologische Methoden	50
4.9.1	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	50
5	Ergebnisse	52
5.1	Tapasin	52
5.1.1	Expression und Isolation von I-Tapasin in Insektenzellen.....	52
5.1.1.1	Molekularbiologische Ergebnisse	52
5.1.1.2	Assemblierung von MHC-Klasse I-Molekülen in Insektenzellen	53
5.1.1.3	Expression und Isolation von I-Tapasin aus Insektenzellen.....	55
5.1.2	Expression von I-Tapasin in <i>S. cerevisiae</i>	59
5.1.2.1	Molekularbiologische Ergebnisse	59
5.1.2.2	Expression von I-Tapasin in <i>S. cerevisiae</i>	59
5.1.3	Expression und Isolation von I-Tapasin in <i>E. coli</i>	60
5.1.3.1	Molekularbiologische Ergebnisse	60
5.1.3.2	pASK-IBA-System	61
5.1.3.3	Inclusion Bodies	63
5.1.3.4	Expression als Fusionsprotein	65
5.1.3.5	pBAD-System in Origami(DE3)-Zellen	66
5.1.4	Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie von I-Tapasin.....	69

5.2	Expression, Isolation und funktionale Rückfaltung des MHC-Klasse I-Moleküls HLA-B*2705	71
5.2.1	Schwere Kette des HLA-B*2705 (HLA-B*2705-HC)	71
5.2.1.1	Expression und Isolation von HLA-B*2705-HC	71
5.2.2	β_2 -Mikroglobulin	72
5.2.2.1	Expression und Isolation von β_2m	73
5.2.3	Rückfaltung zum trimeren HLA-B*2705-Komplex	74
5.2.4	Funktionstest des rückgefalteten HLA-B*2705	76
5.3	Wechselwirkung zwischen I-Tapasin und HLA-B*2705	77
5.3.1	Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie (SPR)	77
5.3.2	Fluoreszenz-gekoppelte Gelfiltration	80
5.3.2.1	Peptidaustausch	80
5.3.2.2	Peptidreassoziaton	82
6	Diskussion	86
6.1	Expression von I-Tapasin	86
6.2	HLA-B*2705	92
6.3	MHC-Tapasin-Wechselwirkung	94
6.4	Ausblick	99

7	Literaturverzeichnis	100
8	Anhang.....	110
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	110

1 Zusammenfassung

MHC Klasse I Moleküle liegen im Endoplasmatischen Reticulum (ER) als Dimer bestehend aus einer schweren Kette mit Transmembrandomäne und einem 12 kDa-Protein, dem β_2 -Mikroglobulin vor. Nach der Beladung des MHC-Klasse I-Moleküls mit einem antigenen Peptid, welche vorwiegend im Cytosol durch proteasomalen Abbau generiert und durch den Transportkomplex TAP ins ER transloziert werden, findet der Transport des MHC-Peptid-Komplexes zur Zelloberfläche statt. Dort wird das Antigen cytotoxischen T-Zellen präsentiert. An der Assemblierung und Reifung von MHC-Klasse I-Molekülen sind verschiedene Chaperone beteiligt. Eine wichtige Rolle beim Peptidbeladungsprozess von MHC-Klasse I-Molekülen spielt Tapasin. Dabei handelt es sich um ein 48 kDa, MHC-codiertes Typ I Transmembran-Glycoprotein aus der Immunglobulinsuperfamilie. Es verbrückt den TAP-Komplex mit MHC-Klasse I-Molekülen, hält unbeladene MHC-Klasse I-Moleküle im ER zurück und führt eine Qualitätskontrolle des gebundenen Peptids durch. Bei dieser Peptideditierung werden Peptide wieder selektiv aus der MHC-Bindungstasche entfernt, wenn sie mit einer niedrigen Affinität gebunden sind. Dadurch wird sichergestellt, dass keine leeren oder suboptimal beladenen MHC-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System etabliert, mit dem der Einfluss von Tapasin auf die Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen *in vitro* untersucht werden kann. Dazu wurde ein Verfahren zur heterologen Expression und Reinigung von funktionalem, löslichem Tapasin aus *E. coli*-Zellen aufgestellt. Weiterhin wurden β_2m und die schwere Kette von HLA-B*2705 heterolog in *E. coli*-Zellen exprimiert, isoliert und zusammen mit einem Reporterpeptid zum funktionalen HLA-B*2705 renaturiert. Bei Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen Tapasin und HLA-B*2705-Molekülen konnte mittels der Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie eine direkte Interaktion zwischen Tapasin und unbeladenem HLA-B*2705 gezeigt werden. Detailliertere Untersuchungen zur Rolle von Tapasin bei der Peptidbeladung wurden mittels einer Gelfiltration gekoppelt mit der Fluoreszenzdetektion des Reporterpeptids durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass unbeladene MHC-Klasse I-Moleküle in Anwesenheit von Tapasin stabilisiert werden und in einer Konformation gehalten werden, die eine Assoziation mit Peptid fördert. Weiterhin wurde gezeigt, dass

durch Tapasin die Assoziationsrate für die Peptidbindung erhöht ist. Somit kann in Anwesenheit von Tapasin eine größere Anzahl an Peptiden auf eine stabile und hochaffine Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle überprüft werden. In Experimenten mit bereits beladenen MHC-Klasse I-Molekülen konnte gezeigt werden, dass der neugebildete Komplex auch nach erfolgter Peptidassoziation durch Tapasin stabilisiert wird. Dies ist vermutlich auf eine Erniedrigung der Dissoziationsrate für das Peptid zurückzuführen.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Untersuchungssystem ist die Grundlage zu detaillierten Studien der Rolle von Tapasin bei der Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen geschaffen.

2 Einleitung

2.1 Die zelluläre Immunantwort

Das Immunsystem verfügt über verschiedene Strategien, virale und bakterielle Infektionen sowie Tumorzellen im Körper zu beseitigen. Allgemein unterscheidet man zwei Arten von Abwehrsystemen gegen infektiöse Faktoren. Die angeborene Immunität ist immer vorhanden. Dabei handelt es sich um eine unspezifische Immunabwehr, die nicht von der vorherigen Exposition gegenüber einem bestimmten Erreger abhängig ist. Sie stellt die erste Reaktion auf Pathogene dar. Dagegen wird die adaptive, spezifische Immunantwort erst durch ein Antigen ausgelöst. Sie führt zu einem langanhaltenden Schutz vor einer Erkrankung.

Das adaptive Immunsystem setzt sich aus der humoralen und zellulären Immunantwort zusammen. Die humorale Immunantwort beruht auf löslichen Proteinen, den Antikörpern, die von B-Lymphozyten produziert und sezerniert werden. Die zelluläre Immunantwort wird durch T-Lymphozyten vermittelt, die mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors antigene Peptide im Komplex mit MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) auf Zelloberflächen erkennen.

Viren und einige Bakterien können im Cytosol von Wirtszellen replizieren, während andere Pathogene Körperzellen durch Endocytose infizieren. Um eine angemessene Antwort auf infektiöse Partikel zu produzieren, erkennen T-Zellen die Anwesenheit von infektiösem Material sowohl im Cytosol als auch in endosomalen Vesikeln. Dies geschieht dadurch, dass zwei Klassen von MHC-Molekülen antigene Peptide aus den verschiedenen zellulären Kompartimenten an die Zelloberfläche der infizierten Zelle befördern. MHC-Klasse I-Moleküle transportieren Peptide aus dem Cytosol an die Zelloberfläche, wo der Peptid-MHC-Komplex von cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen erkannt und die infizierte Zelle anschließend lysiert wird. Peptide, die aus endozytierten Proteinen stammen, werden mit Hilfe von MHC-Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert, wodurch CD4⁺-T-Helferzellen stimuliert werden.

2.2 MHC-Klasse I-Antigen-Prozessierung und -Präsentation

In den folgenden Abschnitten wird ausschließlich die Antigenpräsentation über MHC-Klasse I-Moleküle dargestellt. Bei MHC-Klasse I-Molekülen handelt es sich um Heterodimere, bestehend aus einer schweren Kette (*heavy chain*, HC) und dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m). Die neusynthetisierten Untereinheiten von MHC-Klasse I-Molekülen werden cotranslational in das Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) transloziert, wo sie zunächst in einem partiell gefalteten Zustand vorliegen. Erst nach erfolgreicher Assemblierung und Peptidbeladung kommt es zu einer Konformationsänderung und Stabilisierung der MHC-Klasse I-Moleküle, so dass sie über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche gelangen. Dieser Reifungsprozess wird durch die Assoziation mit unterschiedlichen Chaperonen gesteuert (Abb. 1).

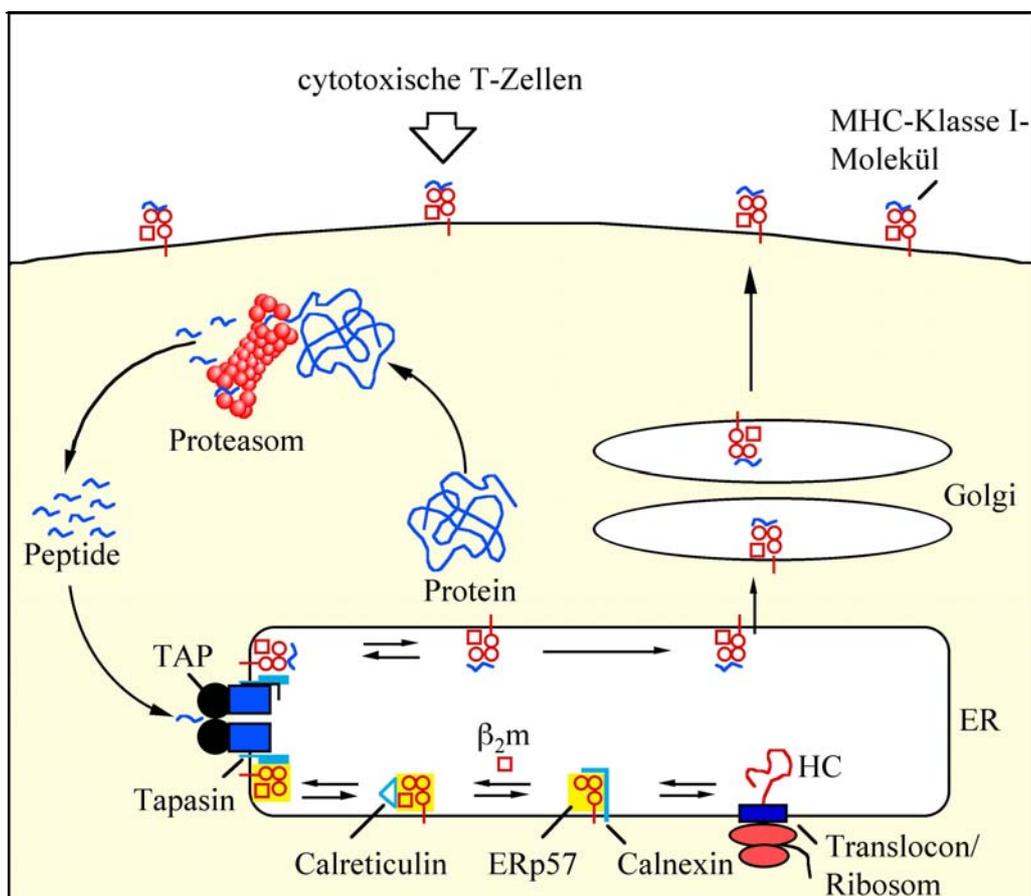


Abb. 1: Schematische Darstellung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation über MHC-Klasse I-Moleküle (Abele & Tampé, 1999)

Die HC wird ins ER transloziert, wo sie zuerst an Calnexin und ERp57 bindet. Durch die Assoziation mit β_2m wird der Austausch von Calnexin durch Calreticulin induziert. Nach der anschließenden Assoziation mit Tapasin, durch die das MHC-Klasse I-Molekül mit dem Transportkomplex TAP (*transporter associated with antigen processing*) verbrückt wird, erfolgt die Peptidbeladung. Die antigenen Peptide stammen vornehmlich von cytosolischen oder nuklären Proteinen, die durch einen multikatalytischen Enzymkomplex, dem Proteasom, degradiert werden. Die Peptide werden durch den TAP-Komplex ins ER transportiert. Die Peptidbeladung findet im sog. Beladungskomplex bestehend aus MHC-HC, β_2m , Calreticulin, Tapasin, ERp57 und TAP statt. Nach der Peptidbeladung zerfällt dieser Komplex und die vollständig assemblierten MHC-Klasse I-Moleküle gelangen über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche. Dort werden die antigenen Peptide $CD8^+$ -Zellen präsentiert.

2.3 MHC-Klasse I-Moleküle

MHC-Klasse I-Moleküle sind Glycoproteine, deren Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Madden *et al.*, 1992) (Abb. 2). Sie bestehen

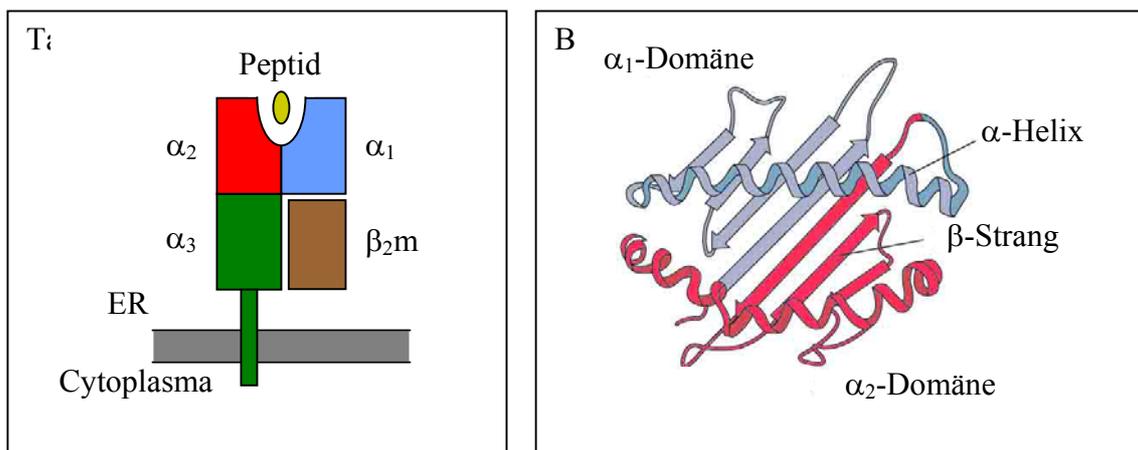


Abb 2: Struktur von MHC-Klasse I-Molekülen. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur. (B) Banddiagramm der Peptidbindungstasche von oben (Janeway & Travers, 1995).

aus zwei Polypeptidketten, einer HC von 45 kDa und dem nicht kovalent verknüpften β_2m mit einem Molekulargewicht von 12 kDa. Die schwere Kette besteht aus drei α -Domänen, wobei α_3 eine Transmembranhelix besitzt. Die α_3 -Domäne und β_2m

weisen eine Immunglobulinfaltung auf. Die α_1 - und α_2 -Domänen bilden einen Spalt, in dem das antigene Peptid gebunden wird. Die Seiten des Spaltes werden von zwei antiparallelen α -Helices begrenzt, während das flache Faltblatt den Boden der Peptidbindungsstelle bildet (Abb. 2B). Peptide, die an MHC-Klasse I-Moleküle binden, sind gewöhnlich acht bis zehn Aminosäuren lang und liegen in einer ausgestreckten Konformation entlang des Peptidbindungsspals vor. Der N- und C-Terminus des Peptids bildet den Verankerungsrest und ist entscheidend für die Bindung an das MHC-Molekül (Falk *et al.*, 1991), während die Sequenz der restlichen Peptidkette sehr variabel ist. Dadurch wird das Repertoire der präsentierten Peptide, die eine Immunantwort auslösen, nicht eingeschränkt.

Im menschlichen Genom werden die schweren Ketten der MHC-Klasse I-Moleküle durch drei Genloci, die sogenannten HLA (*human leukocyte antigen*) -A, -B und -C codiert. Sie sind hoch polymorph mit mehr als 80 Allelen für HLA-A, 180 Allelen für HLA-B und 40 Allelen für HLA-C. Allerdings sind die Sequenzunterschiede der einzelnen Allele in erster Linie auf Aminosäurereste, welche die Peptidbindungstasche bilden bzw. mit den Verankerungsresten der Peptide interagieren, beschränkt. Somit ergibt sich für jedes HLA-Allel ein bestimmtes, bevorzugt gebundenes Peptidrepertoire. Fehlen diese hochaffinen Peptide, kann der Komplex auch mit niedrigaffinem Peptid beladen werden. Allerdings sind solche suboptimal beladenen MHC-Klasse I-Moleküle äußerst instabil.

Einzelne MHC-Klasse I-Allele unterscheiden sie sich nicht nur in Bezug auf ihr spezifisches Peptidrepertoire, sondern auch in ihrer Abhängigkeit vom TAP-Komplex für eine optimale Oberflächenexpression. TAP^{-/-}-Zellen zeigen für einige Allele Varianten einen vollständigen Ausfall dieser Oberflächenexpression, während andere nur geringe Unterschiede zu *wt*-Zellen zeigen (Sadasivan *et al.*, 1996). Das ist darauf zurückzuführen, dass antigene Peptide in erster Linie durch den TAP-Komplex ins ER gelangen. Allerdings existieren auch alternative Wege. So ist z.B. HLA-A2 in der Lage, Signalpeptide, die beim cotranslationalen Transport von Proteinen ins ER abgespalten werden, zu binden. Ähnliches gilt für die Abhängigkeit von anderen Cofaktoren wie Tapasin oder ERp57. In Tpn^{-/-}-Zellen wird z.B. HLA-C1 auf der Oberfläche exprimiert, jedoch mit deutlich reduzierter Effizienz im Vergleich zu *wt*-Zellen (Greenwood *et al.*, 1994).

2.4 Tapasin

Tapasin (Tpn) ist ein 48 kDa Typ I-Membranglycoprotein, welches im MHC-Genlocus codiert ist. Wie viele andere MHC-codierte Proteine wird auch die Expression von Tapasin durch γ -Interferon hochreguliert. Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Tapasinstruktur, wie sie aus Strukturvorhersagen sowie biochemischen Daten und Experimenten mit Deletions- und Punktmutationen hervorgeht. Tapasin besteht aus einem ER-luminalen Teil (Aminosäurereste 1-392), einer α -helikalen Transmembrandomäne (Aminosäurereste 393-417) sowie einem kurzen cytoplasmatischen Teil (Aminosäurereste 418-428), welcher ein ER-Retentionssignal (KKXX) enthält. Im ER-luminalen Bereich befindet sich eine Stelle (Asn233) für N-Glycosylierung. Außerdem besitzt diese Region des Proteins fünf Cysteine. Die beiden membranproximalen Cysteine (Cys362, Cys292) sind über eine Disulfidbrücke verknüpft und damit an der Ausbildung einer Immunglobulin-domäne beteiligt. Deshalb wird Tapasin der Immunglobulin-superfamilie zugerechnet. Eine weitere Disulfidbrücke befindet sich zwischen Cys7 und Cys71. Das Cys95 ist an der Rekrutierung von ERp57 in den Beladungskomplex beteiligt (Dick *et al.*, 2002).

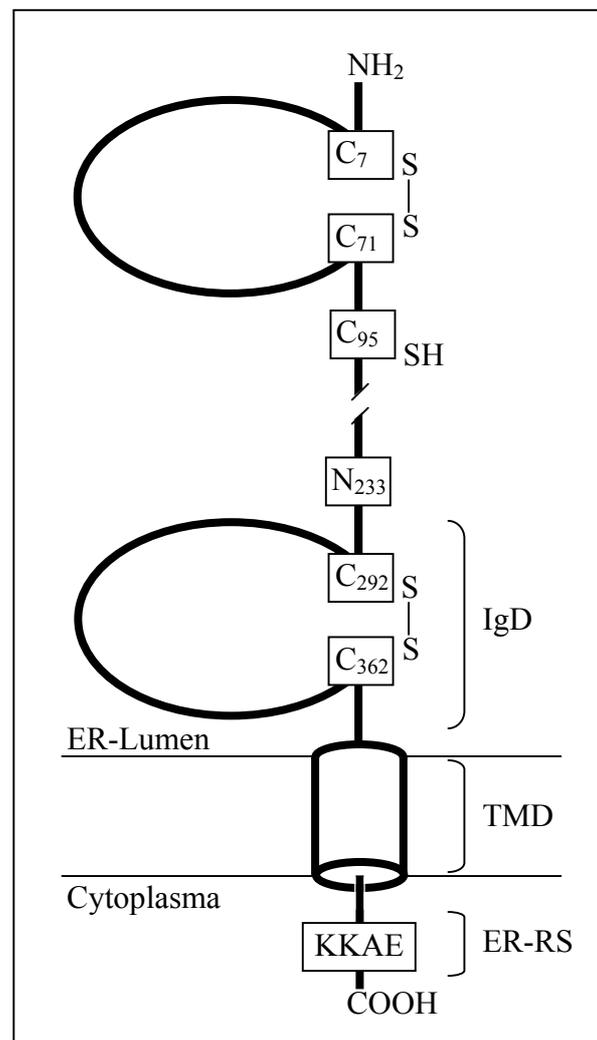


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur von Tapasin,
 IgD = Immunglobulin-domäne,
 TMD = Transmembrandomäne,
 ER-RS = ER-Retentionssignal

Tapasin spielt eine entscheidende Rolle beim Peptidbeladungsprozess von MHC-Klasse I-Molekülen. Tpn^{-/-}-Zellen präsentieren nur sehr wenige MHC-Klasse I-Moleküle an ihrer Oberfläche. Sie liegen größtenteils als instabile Komplexe im ER vor und werden dort sehr schnell abgebaut (Grande III *et al.*, 1997). Entdeckt wurde Tapasin aufgrund von Coimmunpräzipitationsexperimenten. Dabei ergab sich für den Beladungskomplex eine Stöchiometrie von vier Tapasinmolekülen, vier MHC-Klasse I-Molekülen und bis zu zwei Calreticulinmolekülen pro TAP-Komplex. Weitere Proteine konnten bei diesen Experimenten nicht detektiert werden (Ortmann *et al.*, 1997). Coimmunpräzipitationsexperimente lieferten auch den ersten Hinweis auf die Funktion von Tapasin. In $\beta_2m^{-/-}$ -Zellen, welche keine MHC-Klasse I-Moleküle bilden können, war Tapasin mit dem TAP-Komplex assoziiert, während es in TAP^{-/-}-Zellen in Assoziation mit MHC-Molekülen gefunden wurde. Daraus konnte geschlossen werden, dass Tapasin ein Brückenmolekül ist, das diese beiden Interaktionspartner in eine räumliche Nähe bringt (Lehner *et al.*, 1998). Darüberhinaus wurden für Tapasin weitere Funktionen beschrieben. Experimente mit TAP^{-/-}-Zellen, die über eine geringe Konzentration von antigenen Peptiden im ER verfügen, deuten darauf hin, dass MHC-Moleküle in Anwesenheit von Tapasin für einen längeren Zeitraum peptidaufnahmefähig bleiben. Tapasin wirkt somit als Chaperon, welches leere MHC-Moleküle stabilisiert (Grande III *et al.*, 1997). Diese leeren MHC-Moleküle werden zudem im ER zurückgehalten. Vermutlich wird diese Retentionsfunktion hauptsächlich durch das KKXX-Motiv im cytoplasmatischen Teil von Tapasin erfüllt. Allerdings konnte eine Verminderung dieser Retention auch bei Tapasinvarianten mit Mutationen im Transmembranbereich beobachtet werden (Tan *et al.*, 2002). Darüberhinaus spielt Tapasin eine aktive Rolle bei der Peptidbeladung. Untersuchungen zur thermischen Stabilität von MHC-Klasse I-Molekülen haben gezeigt, dass in Abwesenheit von Tapasin ein Großteil der an der Zelloberfläche präsentierten MHC-Moleküle instabil ist. Diese MHC-Komplexe sind mit suboptimalem Peptid beladen. Weiterhin zeigten massenspektrometrische Untersuchungen der präsentierten Peptide, dass die Gesamtmenge an hochaffinen Peptiden, die von Tapasin-defizienten Zellen isoliert werden konnten, drastisch reduziert war (Garbi *et al.*, 2000, Li *et al.*, 1997, Williams *et al.*, 2002, Dick *et al.*, 2002, Grande III & Van Kaer, 2001). Aufgrund dieses qualitativen Einflusses auf die Stabilität der Peptidbindung bezeichnet man Tapasin auch als Peptid-Editor. Der Editierungsschritt erfolgt nach der Peptidbindung. Dabei

werden niedrigaffin gebundene Peptide wieder aus der MHC-Bindungstasche entfernt. Hochaffin gebundene Peptide induzieren eine Konformationsänderung im MHC-Molekül, was die Dissoziation des Beladungskomplexes und den Transport des MHC-Peptid-Komplexes zur Zelloberfläche zur Folge hat. Die molekularen Ursachen dieses Editierungseffekts sind bislang noch nicht geklärt.

Als eine weitere Funktion von Tapasin wird eine Stabilisierung des TAP-Komplex diskutiert. So konnte eine 2,5-3fach erhöhte TAP-Menge in $Tpn^{-/-}$ -Zellen nachgewiesen werden, wenn diese mit Tapasin transfiziert wurden (Lehner *et al.*, 1998). Neben diesem stabilisierenden Effekt wurde ebenfalls in Tapasin-defizienten Zellen ein quantitativer Anstieg des Peptidtransports in Anwesenheit von Tapasin beobachtet. Die Bindungsaffinität von Peptiden an den TAP-Komplex scheint von Tapasin nicht beeinflusst zu werden (Bangia *et al.*, 1999).

Die Wechselwirkungen mit dem TAP-Komplex und MHC-Klasse I-Molekülen konnten unterschiedlichen Bereichen von Tapasin zugeschrieben werden. Eine Tapasinvariante, deren cytoplasmatischer Teil und Transmembrandomäne deletiert waren, erwies sich im Bezug auf die MHC-Wechselwirkung als funktional, war aber nicht mehr in der Lage, mit dem TAP-Komplex zu assoziieren. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die N-terminalen 50 Aminosäurereste sowie Teile der membranproximalen Immunglobulin-domäne entscheidende Bereiche für die MHC-Interaktion darstellen (Bangia *et al.*, 1999, Turnquist *et al.*, 2001, Harris *et al.*, 2001). Deletionen bzw. Mutationen an diesen Stellen führten zu einer drastischen Reduktion oder sogar zum vollständigen Verlust der Peptidbeladungsaktivität. Die Assoziation von Tapasin mit dem TAP-Komplex ist hingegen weniger gut charakterisiert. Die Transmembrandomäne von Tapasin besitzt ein putatives Leuzin-Zipper-Motiv (Leu417, Leu410, Leu403, Leu396), welches die Interaktion mit TAP vermitteln könnte (Tan *et al.*, 2002). Alternativ ist auch eine Wechselwirkung des Lys408, welches sich in der Transmembrandomäne von Tapasin befindet, mit negativ geladenen Transmembranresten von TAP denkbar (Ortmann *et al.*, 1997).

2.5 Calnexin

Calnexin (Cnx) ist ein Lektin-ähnliches 64 kDa Typ I-Membranprotein. Es interagiert mit einer Vielzahl verschiedener Glycoproteine wie z.B. MHC-Klasse I- und II-Molekülen, T-Zell-Rezeptoren und Immunglobulinen während deren Faltung und Reifung im ER. Diese Interaktion erfolgt über partiell getrimmte, monoglycosylierte Formen von N-gekoppelten¹ Oligosacchariden. Wird diese Glycosylierung unterbunden, bleibt auch die Cnx-Assoziation aus (Zhang *et al.*, 1995). Cnx ist das erste Chaperon, mit dem die neusynthetisierte HC im ER interagiert. Dabei übernimmt Cnx eine stabilisierende Funktion und schützt die HC vor Degradation. Zusätzlich wird die HC auch partiell gefaltet und ist somit in der Lage, mit β_2m zu assoziieren. So konnte festgestellt werden, dass die mit Cnx assoziierten schweren Ketten keine, eine oder zwei Disulfidbrücken enthalten. Dies ist vermutlich auf die Rekrutierung von ERp57 durch Cnx zurückzuführen (Lindquist *et al.*, 2001). Bisher konnte nur freie HC mit Cnx assoziiert identifiziert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung von β_2m die Dissoziation von Cnx aus dem Beladungskomplex induziert und Calreticulin das Calnexin als Chaperon ersetzt (Sugita & Brenner, 1994). Untersuchungen an Cnx^{-/-}-Zellen zeigten allerdings, dass Calnexin für die Reifung von MHC-Klasse I-Molekülen nicht essentiell ist und dass seine Funktionen auch von anderen ER-Chaperonen wie z.B. BiP übernommen werden können (Nössner & Parham, 1995).

2.6 Calreticulin

Calreticulin (Crt) ist ein lösliches 60 kDa-Homolog von Calnexin. Auch Crt interagiert mit partiell gefalteten Proteinen über monoglycosylierte N-gekoppelte Oligosaccharide¹ (Van Leeuwen & Kearse, 1996). Die Assoziation von Crt an MHC-Klasse I-Moleküle ist von der Anwesenheit von β_2m abhängig (Sadasivan *et al.*, 1996). Desweiteren bindet Crt nur vollständig oxidierte Formen von HC (Farmery *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Crt-assoziierte MHC-Moleküle peptidfrei waren oder zumindest keine

¹ Die Formulierungen "getrimmtes" und "N-gekoppeltes Oligosaccharid" wurde der ins Deutsche übersetzten Ausgabe von "Molecular Biology of the Cell", Alberts *et al.* entnommen.

hochaffinen Peptide gebunden hatten (Li *et al.*, 1999). Die Rekrutierung von Crt scheint von Tapasin beeinflusst zu werden. So konnte bei Untersuchungen mit verkürzten Tpn-Varianten je nach Alloform keine oder nur eine sehr stark reduzierte Crt-MHC-Assoziation festgestellt werden (Bangia *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden mit Tpn^{-/-}-Zellen erhalten (Hughes & Cresswell, 1998, Solheim *et al.*, 1997).

Calreticulin ist ein integraler Bestandteil des Peptidbeladungskomplexes, in dem vermutlich Crt im gleichen stöchiometrischen Verhältnis wie Tapasin und MHC-Moleküle vorliegt. Die Beobachtung, dass nur zwei Calreticulin-Moleküle, aber vier Tapasin-MHC-Komplexe pro TAP-Komplex gefunden wurden, ist vermutlich auf die experimentellen Bedingungen bei diesen Coimmunpräzipitationsexperimenten zurückzuführen. Wahrscheinlich löst sich ein Teil des Calreticulins während der Zellyse und den folgenden Wasch- und Präzipitationsschritten vom Komplex ab und kann dadurch nicht mehr korrekt quantifiziert werden. Ähnliches gilt auch für ERp57.

2.7 ERp57

ERp57, auch als ER60 oder GRP58 bezeichnet, ist eine ER-ständige Protein-Disulfidisomerase (PDI) mit einem Molekulargewicht von 56 kDa. Sie besitzt zwei Thioredoxin-Motive und katalysiert im Zusammenspiel mit anderen Chaperonen die Bildung und Isomerisierung von Disulfidbrücken bei monoglycosylierten Glycoproteinen. Reife MHC-Klasse I-Moleküle besitzen zwei Disulfidbrücken, eine in der α_3 -Domäne, welche die Immunglobulindomäne ausbildet, und eine zweite in der α_2 -Domäne zwischen den Cysteinresten 101 und 164, welche in allen bekannten MHC-Alloformen hochkonserviert sind. Die Cys101-Cys164-Brücke verbindet eine der beiden α -Helices mit der β -Faltblattstruktur, die den Boden des Peptidbindungsspalts bildet, wodurch der eigentliche Spalt entsteht. Mutationen, welche die Ausbildung dieser beiden Disulfidbrücken verhindern, führen zum vollständigen Verlust der MHC-Oberflächenexpression und zur Akkumulation von fehlerhaft gefalteten MHC-Molekülen im ER.

Beim sequenziellen Reifungsprozess von MHC-Klasse I-Molekülen spielt ERp57 an zwei Punkten eine entscheidende Rolle. Einerseits werden naszierende schwere Ketten gemeinsam mit Calnexin vollständig oxidiert. Dies ist Voraussetzung für die anschließende Assoziation mit Calreticulin (Lindquist *et al.*, 1998). Andererseits ist ERp57 integraler Bestandteil des Beladungskomplexes. Bei der *in vitro*-Assemblierung von MHC-Molekülen wurde gezeigt, dass die Ausbildung der Cys101-Cys164-Brücke streng peptidabhängig ist. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Disulfidbrücke während der Peptidbeladung kurzzeitig geöffnet wird. So könnte diese Disulfidbrücke in Abwesenheit von Peptid in der Bindungstasche für reduzierende Agenzien im ER wie z.B. Glutathion zugänglich sein. Für die erneute Ausbildung könnte ERp57 verantwortlich sein.

Auf welche Weise ERp57 während der MHC-Klasse I-Molekül-Reifung rekrutiert wird, ist nicht eindeutig geklärt. So wurden sowohl Cnx-ERp57-Dimere ohne HC als auch Cnx-HC-Dimere ohne ERp57 in Zellen gefunden. Somit könnte ERp57 als Dimer mit Calnexin an naszierende schwere Ketten binden oder als Monomer mit Cnx-HC assoziieren. In jedem Fall ist diese Assoziation oligosaccharidabhängig und folglich durch Cnx vermittelt. Bei der Rekrutierung in den Beladungskomplex bildet sich zwischen Cys57 von ERp57 und Cys95 von Tapasin eine temporäre Disulfidbrücke aus. Mutationen dieser Cysteine verhindern eine Interaktion der beiden Proteine. Allerdings stellt diese Disulfidverbrückung vermutlich nur den initialen Schritt zur Interaktion dar, denn eine Reduktion der Disulfidbrücken nach der ERp57-Tapasin-Assoziation führte zu keinem Verlust von ERp57 aus dem Beladungskomplex (Lindquist *et al.*, 2001, Dick *et al.*, 2002).

2.8 Proteindegradation durch das Proteasom

Sowohl zelleigene als auch zellfremde Polypeptide werden nach Markierung durch Polyubiquitinierung durch einen multikatalytischen Enzymkomplex, das Proteasom, entfaltet und degradiert. Dabei werden einerseits falsch gefaltete Proteine abgebaut. Andererseits wird die Aktivität diverser regulatorischer Proteine wie Transkriptionsfaktoren oder Faktoren zur Zellzykluskontrolle durch den proteasomalen Abbau gesteuert (Glutzer, 1998, Grimm *et al.*, 1997). Das katalytische Zentrum des

Proteasomkomplexes bildet der 20S Partikel, welcher einen Zylinder aus zwei heptameren äußeren Ringen bestehend aus α -Untereinheiten und zwei heptameren inneren Ringen bestehend aus β -Untereinheiten bildet. Das eukaryontische Proteasom verfügt über drei aktive β -Untereinheiten, entsprechend drei unterschiedlichen Spaltungsaktivitäten: Spaltung nach basischen Aminosäuren (Trypsin-ähnliche Aktivität), nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) und sauren oder verzweigten Resten. Durch Stimulation mit γ -Interferon ändert sich die Zusammensetzung des Proteasoms in Säugetieren. Im humanen Proteasom werden die drei spaltungsaktiven Untereinheiten durch MECL1 sowie die im MHC-Genlocus codierten Proteine LMP2 und LMP7 ersetzt (Groettrup *et al.*, 1996, Hisamatsu *et al.*, 1996, Belich *et al.*, 1994). Bei diesem sog. Immunoproteasom ist sowohl die Trypsin- als auch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität induziert (Gaczynska *et al.*, 1994, Ehring *et al.*, 1996). Idealerweise stellen Peptide mit einem basischen oder hydrophoben C-Terminus ein optimales Substrat für den Transportkomplex TAP dar, der diese Peptide ins ER transportiert (Uebel *et al.*, 1997). Jedoch ist die Halbwertszeit eines Peptids im Cytosol, bevor es durch Aminopeptidasen gespalten wird, sehr kurz. Die meisten generierten Peptide werden zu Aminosäuren abgebaut und fließen wieder in die Proteinbiosynthese ein, bevor sie von TAP ins ER transportiert werden. Berechnungen zufolge wird nur ein Peptid von 10^4 degradierten Proteinen an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden (Princiotta *et al.*, 2003).

Das Proteasom kann mit zwei weiteren regulatorischen Untereinheiten assoziieren. Diese 19S (PA700) Untereinheiten werden wie eine Kappe auf beide Enden des Zylinders plaziert und bestehen aus mindestens 20 Untereinheiten, darunter sechs AAA-ATPasen. Alternativ kann auch ein 11S (PA28) Komplex mit dem Proteasom assoziieren. Die Aufgabe dieser Regulatoren besteht in erster Linie in der Entfaltung des abzubauenen Proteins (Coux *et al.*, 1996).

2.9 Import von Peptiden ins ER durch den Peptidtransporter TAP

Die entstehenden antigenen Peptide werden durch den Transporterkomplex TAP, der in der ER-Membran lokalisiert ist, transportiert. TAP gehört zu der Superfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*), die an einer Vielzahl von Transportprozessen in eukaryontischen wie prokaryontischen Zellmembranen beteiligt sind. ABC-Transporter bestehen aus vier Domänen, zwei Transmembrandomänen (TMD), die mehrfach die Membran mit α -Helices durchspannen und die Substratbindungsstelle darstellen, und aus zwei Nukleotidbindedomänen (NBD), die den Transportprozess durch ATP-Hydrolyse energetisieren (Androlewicz *et al.*, 1993). Der heterodimere TAP-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, TAP1 und TAP2, wobei auf jeder Polypeptidkette eine TMD mit einer NBD fusioniert ist. Der TAP-Komplex bindet bevorzugt Peptide mit einer Länge von acht bis sechzehn Aminosäuren, wobei nur Peptide mit einem freiem N- und C-Terminus erkannt werden. Für die Substratspezifität spielen die Positionen eins bis drei sowie der C-Terminus, der idealerweise eine hydrophobe oder basische Aminosäure enthält, eine entscheidende Rolle. Die Positionen vier bis acht sind nicht relevant für die Substratbindung an TAP (Uebel *et al.*, 1997). Diese Merkmale der Peptidbindung durch den TAP-Komplex entsprechen der Substraterkennung von MHC-Klasse I-Molekülen, so dass man ein gleiches Bindungsmotiv zwischen TAP und MHC zugrunde legen kann. Diese Beobachtung deutet auf eine Co-Evolution von TAP-Komplex und MHC-Klasse I-Molekülen hin (Uebel & Tampé, 1999). Jedoch können Peptide, die erfolgreich von TAP ins ER transportiert wurden, im Zuge der Optimierung durch sogenanntes N-terminales Trimmen im ER prozessiert werden (Brouwenstijn *et al.*, 2001, Serwold *et al.*, 2002, York *et al.*, 2002, Saric *et al.*, 2002). Aminopeptidasen spalten längere Peptide im ER zu der optimalen Länge von 8 bis 10 Aminosäuren, die schließlich an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden werden. Es wird auch die Beteiligung von Endopeptidasen wie Furin an diesem Optimierungsprozess diskutiert.

3 Motivation

Wie in der Einleitung beschrieben, setzt sich das adaptive Immunsystem aus zwei Hauptbestandteilen zusammen: der humoralen Immunität, die durch Antikörper vermittelt wird, und der T-Zell-vermittelten Immunität. Beide Systeme benötigen zu ihrer Aktivierung eine Signalkaskade, die durch die Wechselwirkung zwischen einem T-Zell-Rezeptor und einem MHC-Peptid-Komplex an der Zelloberfläche entsteht. Dabei ist der entscheidende Faktor für das Auslösen des Signals das antigene Peptid, das in der Bindungstasche des MHC-Moleküls eingebettet ist. Bei all diesen Wechselwirkungen zwischen T-Zell-Rezeptoren und MHC-Peptid-Komplexen bilden die MHC-Moleküle lediglich einen molekularen Rahmen für die antigenen Peptide. Sie gewährleisten, dass die Peptide an die Zelloberfläche gelangen und dort in einer Form präsentiert werden, die vom entsprechenden T-Zell-Rezeptor erkannt werden kann.

Die Kontrolle der MHC-Beladung mit einem antigenen Peptid ist von zentraler Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Das Peptidrepertoire eines MHC-Allels wird allgemein unterschieden in hochaffin und niedrigaffin bindende Peptide. Diese Einteilung basiert auf den Halbwertszeiten für die Stabilität der MHC-Peptid-Komplexe an der Zelloberfläche. Um ausschließlich hochaffine Peptide an der Zelloberfläche zu präsentieren, findet ein chaperonvermittelter Editierungsprozess im ER an neu beladenen MHC-Peptid-Komplexen statt. Eine fehlerhafte Qualitätskontrolle der Peptidbeladung im ER hat fatale Folgen für die Immunabwehr. MHC-Komplexe, die ihr Antigen auf dem sekretorischen Weg verlieren, können keine Immunantwort mehr hervorrufen. Im Gegensatz dazu erhöhen MHC-Peptid-Komplexe, die ein hochaffines antigenes Peptid tragen, die Wahrscheinlichkeit einer Erkennung durch aktivierte T-Zellen, da das Antigen länger auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Aus diesen Gründen ist der Kontrollmechanismus ein kritischer Prozess, durch den sichergestellt wird, dass nur optimal beladene MHC-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche gelangen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit Tapasin eine neue Komponente des MHC-Klasse I-Beladungskomplexes entdeckt (Ortmann *et al.*, 1997, Li *et al.*, 1997). Es stellte sich heraus, dass Tapasin eine Schlüsselrolle bei der Peptidbeladung spielt. So waren z.B. MHC-Klasse I-Moleküle von Tpn^{-/-}-Zellen instabil infolge einer Beladung mit

suboptimalem Peptid (Grande III *et al.*, 1997). Dieser Defekt konnte durch Transfektion mit *wt*Tapasin oder Tapasinmutanten, deren Transmembrandomäne und cytoplasmatischer Teil deletiert war, kompensiert werden (Lehner *et al.*, 1998). Zum jetzigen Zeitpunkt wurden jedoch alle Untersuchungen zur Funktion von Tapasin mit ganzen Zellen oder Zelllysaten durchgeführt, so dass ein direkter Nachweis der Tapasinaktivität nicht gezeigt wurde. Dies lag in erster Linie daran, dass Versuche, Tapasin bzw. Deletionsvarianten in funktionaler Form zu isolieren, nicht erfolgreich waren (persönliche Mitteilung von P. Cresswell und D. Wiley). Die Herausforderung dieser Doktorarbeit lag in der Etablierung eines heterologen Expressionssystems für *wt*Tapasin und Tapasindeletionsmutanten sowie die Aufstellung eines Reinigungsprotokolls. Darüberhinaus sollte ein *in vitro*-System zur Untersuchung der Tapasin-MHC-Peptid-Wechselwirkung etabliert werden. Die Interaktionspartner von Tapasin, die schwere Kette und das β_2 -Mikroglobulin, aus denen sich ein MHC-Klasse I-Molekül im ER assembliert, sollten ebenfalls heterolog exprimiert und gereinigt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 PCR-Primer

Sämtliche Primer wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

fl-T-Strep	5'- TGA GTG CCC AAG CTT TCA TCC TCC GAA TTG TGG GTG TCG CCA TGA CTC TGC TTT CTT CTT TGA ATC -3'
T-ΔTM-His ₆	5'- CCC CCC AAG CTT TCA GTG GTG GTG GTG GTG GTG ACC TGC TAC CTC CAG GGT GAC -3'
T-ΔTM-His ₁₀	5'- CCC CCC AAG CTT TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG GTG AAT TCG ACA GGC ATA GCG -3'
T-H1	5'- AGG AGG TCG CGG ATC CAT GAA GTC CCT GTC TCT GCT C -3'
T-ΔLS	5'- GGA ATT CCA TAT GGG ACC CGC GGT GAT CGA GTG T -3'
T-ΔLS C7S	5'- GGA ATT CCA TAT GGG ACC CGC GGT GAT CGA GAG TTG GTT CGT GGA G -3'
T-Peri for	5'- TAG TAG GGT CTC CGG CCG GAC CCG CGG TGA TCG AGT GTT GGT TCG TG -3'
T-Peri rev	5'- TAG TAG GGT CTC AGC GCT GAG ACC GTT GCC GCG CGG ATA CAT ACC TGC TAC CTC CAG GGT GAC CTC AGC GCT -3'
T-pMAL for	5'- GGA CCC GCG GTG ATC GAG TGT TGG TTC GTG -3'

4.1.2 Plasmide

pCR2.1	Invitrogen
pMAL-c2x	New England Biolabs
pMAL-p2x	New England Biolabs
pASK-IBA 2	IBA
pET-21a(+)	Novagen
pET-15b	Novagen
pRSET B	Invitrogen

pFastBac 1	Life Technologies
pBAD33	Invitrogen
p425GAL	American Type Culture Collection
pYEP352	American Type Culture Collection

Bakterielle Expressionsvektoren

pCR2.1- <i>wT</i> Tapasin	P. Cresswell, New Haven, USA
pMAL/c2x- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pMAL/p2x- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pASK-IBA 2- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pET-21a(+)- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pET-21a(+)- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin (C7S)	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pET-21a(+)- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -HLA-B*2705-HC	D. Rognan, Illkirch, Frankreich
pET-15b- Δ SS/His ₆ - β ₂ m	D. Rognan, Illkirch, Frankreich
pRSET B- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pRSET B- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin (C7S)	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)
pBAD33- Δ TM/ Δ SS/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.3.1)

Insektenzell-Expressionsvektoren

pFastBac 1- Δ TM/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.1.1)
pFastBac 1- StrepII- <i>wT</i> Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.1.1)

Hefe-Expressionsvektoren

p425GAL- Δ TM/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.2.1)
pYEP352 Δ TM/His ₆ -Tapasin	diese Arbeit (Kapitel 5.1.2.1)

4.1.3 Zellen

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α verwendet. Zur Proteinexpression wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) pLysS, Origami(DE3) und TB1 verwendet. Der *E. coli*-Stamm DH10Bac diente zur

Generierung von rekombinanten Baculoviren. Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm W303-1A wurde zur Proteinexpression verwendet. Die Insektenzelllinie Sf9 stammt aus Ovariengewebe von *Spodoptera frugiperda*-Larven und wurde zur Proteinexpression, Virusamplifikation und Generierung von rekombinanten Baculoviren verwendet. Die Insektenzelllinie HighFive stammt aus der Bauchspeicheldrüse von *Trichoplysia ni-* Larven und wurde ausschliesslich zur Proteinexpression verwendet.

BL21(DE3) pLysS	Novagen F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cm ^R)
DH5α	Life Technologies <i>deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ(lacZYA-argFV169), φ80lacZΔM15, F⁻</i>
DH10Bac	Life Technologies
Origami (DE3)	Novagen <i>Δara-leu 7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 galE galK rspL F' [lac^f(lacI^f)pro] gor522::Tn10(Tc^R) trxB::kann</i> (DE3)
TB1	Life Technologies F ⁻ <i>ara Δ(lac-proAB) [φ80dlac Δ(lacZ)M15] rpsL(Str^R) thi hsdR</i>
W303-1A	MATa <i>ura3-52 leu2-3, 112 his3-11 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
Sf9	Invitrogen
HighFive	Invitrogen

4.1.4 Proteine

Enzyme

Alkalische Phosphatase	Promega
Klenow-Fragment	New England Biolabs
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
	Promega
	MBI Fermentas
RNAse	Sigma
T4 DNA-Ligase	Roche
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Sigma

<i>Pwo</i> Polymerase	Roche
ExTaq Polymerase-Kit	Takara
Heringssperma-DNA	New England Biolabs
Thrombin	Serva

Antikörper

	<u>Epitop</u>	<u>Hersteller</u>
mAb 1E2 (Ratte)	Tapasin	E. Kremmer, München
mAb W6/32 (Maus)	MHC-Klasse I	B. Seliger, Mainz
mAb PentaHis (Maus)	His-Tag	Qiagen
IgG-Peroxidase-Konjugat (Ziege)	Maus-IgG	Sigma
IgG-FITC-Konjugat (Ziege)	Maus-IgG	Sigma

Standards

DNA-Längenstandard X	Roche
Proteinstandard Wide Range	Sigma
Proteinstandard Broad Range	Bio-Rad

4.1.5 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma bezogen.

2,2'-Dithiodiethanol	Fluka
Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30 %/0,8 %)	National Diagnostics
Agar	Life Technologies
Amylose-Resin	New England Biolabs
CELLFECTIN Reagent	Invitrogen
Digitonin	Calbiochem
Grace's-Medium	Invitrogen
Hefe-Extrakt	Life Technologies
Insectin-Plus Liposomen	Life Technologies
NP40	Serva
NTA-Agarose	Qiagen
Serva Blue R	Serva

SF900 II-Medium	Life Technologies
StrepTactin II-Material	IBA
TEMED	Serva
TNM-FH-Medium	Invitrogen
Triton X-100	Serva

Kits

Fold-It-Proteinrückfaltungs-Screen	Hampton Research
Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Qiagen Plasmid-Reinigungs-Kit	Qiagen
QiaEx DNA-Fragment-Isolierung	Qiagen
QiaQuick DNA-Fragment-Isolierung	Qiagen
ECL Immunoblot-Kit	Amersham
SuperECL Immunoblot-Kit	Amersham

Verbrauchsmaterialien

Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
ECL-Hyperfilm	Amersham
Einmal-Gefäße und -Pipetten für die Zellkultur	Nunc, Greiner
Kulturflaschen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Falcon

4.1.6 Geräte

Brutschränke	Heraeus
ÄKTA-HPLC-System	Pharmacia
SMART-HPLC-System	Pharmacia
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Milli Q-Wasserentionierungsanlage	Millipore
PCR-Gerät	Perkin Elmer
Spektralphotometer (UV/Vis)	Bio-Rad
Ultrazentrifuge	Beckman

Rotoren für die Ultrazentrifuge	Beckman Ti60, SW28
Geldokumentationssystem	Agfa
Zentrifugen	Eppendorf (5403)
	Heraeus (2.0RS)
HPLC-Pumpensystem	Jasco
Fluoreszenzdetektor	Shimadzu

4.2 Molekularbiologische Methoden

Alle durchgeführten Arbeiten mit Bakterienstämmen, Zelllinien, Hefen und Viren wurden gemäß dem Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.05.1990 durchgeführt und gehörten zur Sicherheitsstufe S1. Bei Experimenten anfallende, mit Bakterien, Viren und Hefen kontaminierte Lösungen und Gefäße wurden getrennt gesammelt und umgehend durch 30 minütige Hitzesterilisation bei 130°C und 2,5 bar im Autoklaven vernichtet.

4.2.1 DNA-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben entweder mit Hilfe des "QIAprep-spin-Kits" (Mini-Präparation) oder des "Qiagen Plasmid Midi Kits" nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von einer Adsorption des Plasmids an eine Silicagel-Membran unter Hochsalz- und definierten pH-Bedingungen. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser oder Tris-Puffer (10 mM, pH 8) eluiert.

4.2.2 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zu analytischen Zwecken sowie zur Erzeugung kompatibler Enden für Ligationen wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Reaktion wurde jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und bei der empfohlenen Temperatur durchgeführt. Analytische Restriktionen wurden mindestens 1 h, präparative Restriktionen mindestens 4 h und PCR-Produkte über Nacht inkubiert.

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

6x Probenpuffer: 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin,
TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0

Die Auftrennung von DNA erfolgte in horizontalen Agarosegelen, die 0,8-2 % (w/v) Agarose und 1 µg/ml des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid enthielten. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die aufzutrennenden Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese (8 V/cm Gellänge, ca. 60 min) wurde das Gel auf einem Transilluminator (254 nm) analysiert und bei Bedarf fotografiert.

Größe und Menge der einzelnen DNA-Banden konnten anhand von standardisierten Größenmarkern abgeschätzt werden.

4.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Mit Hilfe des "QIAex Gel Extraction Kit" wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Nach dem Ausschneiden des gewünschten DNA-Fragments aus dem Gel unter UV-Licht bei 365 nm erfolgte das weitere Vorgehen nach den Angaben des Herstellers.

4.2.5 Abbau von überhängenden Enden

Die Reaktion beruht auf der Exonuclease-Funktion von DNA-Polymerasen. Durch diese auch als "proofreading" bezeichnete Aktivität werden einzelsträngige oder falschgepaarte DNA-Bereiche abgebaut. Dabei ist darauf zu achten, dass der Ansatz keine Nucleotide enthält.

10 µl DNA-Lösung wurden mit 1,1 µl 10x *Pwo*-Reaktionspuffer und 0,2 µl *Pwo*-Polymerase (5 U/µl) vermischt und 20 min bei 72°C inkubiert.

4.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft. Ligationen von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA wurden bei verschiedenen molaren Vektor/Insert-Verhältnissen (1:3-1:5) durchgeführt. Hierbei wurden ca. 50-100 ng Vektor-DNA in T₄-Ligasepuffer mit der entsprechenden Menge Insert-DNA, 1 mM ATP und 2 U T₄-DNA-Ligase in einem Volumen von 10-20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurden kompetente *E. coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Zur Kontrolle der Ligationseffizienz wurde immer ein Ligationsansatz ohne einzufügendes DNA-Fragment mitgeführt.

4.2.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mittels PCR erfolgte mit dem ExTaq-Polymerase-Kit. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase. Durch die Kombination dieser beiden Enzyme wird eine geringere Fehlerrate als mit der *Taq*-Polymerase allein erreicht. Dies ist auf die korrekturlesende 3' → 5' Exonukleaseaktivität der *Pfu*-Polymerase zurückzuführen. Analytische PCRs wurden mit *Taq*-Polymerase durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz:

Komponenten	Volumen [µl]	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer	10	1 x
10 x dNTP-Lösung	10	10 mM
Forward-Primer	1	0,1 µM
Reverse-Primer	1	0,1 µM
Matrizen-DNA	1	< 1 µg/100 µl
Polymerase	1	2,5 U/100 µl
H ₂ O	ad 100 µl	

Vor dem ersten Zyklus erfolgte eine Denaturierung der Matrizen-DNA für 5 min bei 94°C. Die Hybridisierungstemperatur wurde auf die jeweils verwendeten Primer abgestimmt. Die Elongationsdauer war abhängig von der Länge des Templates und von der verwendeten Polymerase.

Nach Kontrolle der Reaktion durch analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden die Amplifikationsprodukte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

4.2.8 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von einem Sequenzierservice in der Abteilung durchgeführt.

4.2.9 Transformation von *E. coli*

Transformationspuffer: 100 mM CaCl ₂ in bidest. Wasser
--

Kompetente Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit, Fremd-DNA effizient aufzunehmen. Dazu werden die Zellen mit hochkonzentrierten Salzlösungen behandelt, so dass die Plasmamembran der Zellen unter bestimmten Bedingungen für die DNA-Aufnahme durchlässig wird.

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen 5 min bei 4°C und 5.000 rpm abzentrifugiert und in 20 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 90 minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut abzentrifugiert und das Zellpellet in 4 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die so erhaltenen kompetenten Zellen wurden in 150 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot von kompetenten Zellen mit 10-500 ng DNA bzw. mit einem Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach anschließender Hitzeschockbehandlung (42°C, 90 s), bei der die eigentliche

DNA-Aufnahme stattfand, wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium gemischt, 45-60 min unter Schütteln bei 37°C vorinkubiert und auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Nur die Zellen, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, trugen die Resistenz gegen das entsprechende Antibiotikum und wuchsen über Nacht im Brutschrank bei 37°C zu einer Einzelkolonie heran.

4.2.10 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

LB-Medium: 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) NaCl, **LB/Agar-Platten:** LB-Medium, 1,5 % Bacto-Agar

E. coli-Stämme wurden auf LB/Agar-Platten kultiviert. Bei Verwendung von mit Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämmen enthielten die Platten zur Selektion noch zusätzlich das entsprechende Antibiotikum. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden die Bakterien auf Agarmedien ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese konnten bis zu vier Wochen bei 4°C aufbewahrt und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden. Für die Herstellung von Übernachtskulturen wurde LB-Medium (bei Bedarf mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie angeimpft und im Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert. Die Übernachtskulturen dienten entweder zur Isolierung von DNA oder zum Animpfen großvolumiger Flüssigkulturen. Zur Langzeitlagerung wurden 370 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl 87 % Glycerin vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

4.3 Methoden der Proteinexpression in *E. coli*

4.3.1 pBAD System

L-Arabinose-Stammlösung: 0,1 g/ml in H ₂ O (steril filtriert)

Das ursprünglich von Guzman *et al.* (1995) beschriebene pBAD-System verwendet die *E. coli* eigene RNA-Polymerase zur Proteinexpression. Das Fremdgen steht dabei unter der Kontrolle des *araBAD*-Promotors. Dieser wird sowohl positiv als auch negativ vom *araC*-Genprodukt reguliert, welches ebenfalls in pBAD-Vektoren codiert ist. In Abwesenheit von L-Arabinose reprimiert ein AraC-Dimer die Transkriptionsinitiation durch die Ausbildung einer DNA-Schleife in Promotor/Operator-Bereich. Nach der Bindung von L-Arabinose an das AraC-Dimer wird diese Repression aufgehoben. Ein Vorteil dieses Systems liegt in der dosisabhängigen Aktivierung des Promotors. Somit ist es möglich, das Expressionsniveau durch die Menge an zugegebenem Induktor zu regulieren. Dies ist vor allem hilfreich, wenn das Zielprotein als lösliches Protein im Cytosol exprimiert werden soll. Es empfiehlt sich, in Vorversuchen die Induktormenge zu bestimmen, bei der maximale Proteinnengen als lösliche Fraktion und nicht als Inclusion Bodies erzielt werden können. Nachteilig ist, dass die Ausbeuten im allgemeinen geringer sind als z.B im T7-System.

400 ml LB/Tetracyclin/Kanamycin/Chloramphenicol-Medium wurden aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde eine 8 l LB/Tetracyclin/Kanamycin/Chloramphenicol-Kultur angeimpft und bei RT geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 1,2 durch Zugabe von 0,01 % L-Arabinose (Endkonzentration). Die Zellen wurden 3,5 h nach der Induktion durch 20 minütige Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C geerntet. Sie wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

4.3.2 pET und pRSET System

IPTG-Stammlösung: 0,1 g/ml in H₂O (steril filtriert)

Sowohl das pET- als auch das pRSET-System basieren auf der ursprünglich von Studier & Moffatt (1986) beschriebenen Proteinexpression mittels des *T7*-Promotors. Dabei handelt es sich um einen Bakteriophagenpromotor, der ausschließlich von der T7-RNA-Polymerase und nicht von der *E.coli*-RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression kann in Stämmen erfolgen, die die DNA des Phagen λ DE3 in ihr Genom integriert haben (λ DE3-Lysogen). Die Phagen-DNA enthält die codierende Sequenz für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors, welcher durch IPTG aktiviert wird. Durch Induktion mit IPTG wird die T7-RNA-Polymerase exprimiert, was zur Expression des gewünschten Proteins unter der Kontrolle des *T7*-Promotors führt. Der *T7*-Promotor ist einer der stärksten Promotoren, die in Prokaryonten bekannt sind. Dadurch sind die Ausbeuten an Zielprotein in der Regel sehr hoch. Allerdings kann die Faltungsmaschinerie der Zelle durch die Überexpression des heterologen Proteins überlastet werden, so dass das Zielprotein nicht mehr als Monomer in Lösung gehalten werden kann und es zur Aggregatbildung kommt. Somit liegt das heterolog exprimierte Protein meist unlöslich in Inclusion Bodies vor, was das Ausarbeiten einer Rückfaltungsmethode notwendig macht. Ein weiterer Nachteil des T7-Systems ist, dass der Promotor nicht dosisabhängig aktiviert werden kann.

100 ml LB/Ampicillin- bzw. LB/Kanamycin-Medium wurden aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde eine 4 l LB/Ampicillin- bzw. LB/Kanamycin-Kultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 durch Zugabe von 0,24 mM IPTG (Endkonzentration). Die Zellen wurden 3,5 h nach der Induktion durch 20 minütige Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C geerntet. Sie wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

4.3.3 pASK-IBA System

AHT Stammlösung: 2 mg/ml in DMF

Das von Skerra (1994) entwickelte *tetA* System benutzt die *E. coli* eigene RNA-Polymerase zur Expression des Fremdgens. Die Promotor/Operator Region des *tetA*-Resistenzgens kontrolliert die Aktivität der RNA-Polymerase. Die konstitutive Expression des ebenfalls auf dem Expressionsvektor codierten *tet*-Repressorgens gewährleistet die Repression des Promotors in Abwesenheit des Induktors. Zur Induktion der Proteinexpression wird bei diesem System Anhydrotetrazyklin (AHT) verwendet. Es bindet das *tet*-Repressorprotein und erlaubt so die Proteinexpression. Die Nutzung der *E. coli* eigenen RNA-Polymerase und des auf dem Vektor codierten Repressorgens erlauben die Proteinexpression in allen *E. coli* Stämmen.

50 ml LB/Ampicillin-Medium wurden aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde eine 1 l LB/Ampicillin-Kultur angeimpft und bei RT im Schüttler inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte nach Angaben des Herstellers IBA bei Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,5-0,6 durch Zugabe von 200 µg/l AHT (Endkonzentration). Die Zellen wurden 4 h nach der Induktion durch 20 minütige Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C geerntet. Da das gewünschte Protein aus dem Periplasma isoliert werden sollte, wurden die Zellen sofort weiterverarbeitet und nicht eingefroren, da dies eine saubere Trennung von Periplasma und Cytoplasma stark beeinträchtigte.

4.3.4 pMAL System

IPTG-Stammlösung: 0,1 g/ml in H₂O (steril filtriert)

Das pMAL-System basiert auf der ursprünglich von Guan *et al.* (1987) entwickelten Methode, Proteine als Fusionsproteine mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP) zu exprimieren. Dadurch wird eine korrekte Faltung des Zielproteins unterstützt und die Tendenz zur Aggregation verringert. Außerdem kann das Fusionsprotein über eine

Wechselwirkung des MBP mit Amylose in einem Schritt aufgereinigt werden. Die codierende Sequenz wird unmittelbar downstream des MBP-Gens im Vektor inseriert. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den *tac*-Promotor kontrolliert, welcher durch IPTG aktiviert wird. IPTG bindet an den *lac*-Repressor, was zum Dissoziieren des Repressors vom Promotor führt und somit die Transkription des Zielgens induziert. Der *tac*-Promotor ist ein sehr starker Promotor. In induzierten Zellen kann das Zielprotein bis zu etwa 40 % der Gesamtproteinmenge ausmachen. Dabei soll die Bildung von Inclusion Bodies aber durch die Fusion mit MBP verhindert werden.

100 ml LB/0,2 % Glucose/Ampicillin-Medium wurden aus einer Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurde eine 4 l LB/0,2 % Glucose/Ampicillin-Kultur angeimpft und bei RT geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 durch Zugabe von 0,3 mM IPTG (Endkonzentration). Die Zellen wurden 3,5 h nach der Induktion durch 20 minütige Zentrifugation bei 4.000 x g und 4°C geerntet. Zellen für die periplasmatische Expression wurden sofort weiterverarbeitet. Zellen für die cytosolische Expression wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

4.4 Methoden der Proteinexpression in Hefe

4.4.1 Transformation von *S. cerevisiae* (Lithiumacetat-Methode)

<p>Lithiumacetatpuffer: 0,1 M Lithiumacetat in TE-Puffer, TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, PEG-Puffer: 40 % PEG 400 in 0,1 M Lithiumacetat in TE-Puffer, Carrier DNA: Lachssperma DNA, 10 µg/µl</p>
--

Pro Transformation wurden 2 ml einer YPD-Übernachtskultur bei einer OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zur exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,8) bei 30°C kultiviert. Die Zellen wurden 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lithiumacetatpuffer resuspendiert, mit 20 µl Carrier DNA vermischt. Kurz vor der Zugabe wurde diese zum

Denaturieren 2 x 1 min auf 100°C erhitzt und zwischendurch schnell auf Eis abgekühlt. Das Plasmid (10 ng-1 µg) wurde zu den Zellen zugesetzt und 1,2 ml PEG-Puffer zugefügt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C und anschließend 15 min bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 30 s bei 5.000 rpm zentrifugiert und die Zellen in 500 µl H₂O resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen.

4.4.2 Proteinexpression in *S. cerevisiae*

Eine 50 ml Kultur des entsprechenden Minimalmediums wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und für 24 h bei 30°C inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,0 die Kohlenstoffquelle durch Zugabe von 5 ml 20 % Galactose von Glucose zu Galactose gewechselt. Die Zellernte erfolgte nach 4,5 h oder ÜN durch Zentrifugation (10 min, 3.000 rpm, 4°C). Bei der konstitutiv kontrollierten Expression unter der Kontrolle eines *ADH*-Promotors wurde die Hauptkultur bei auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt und bei einer OD₆₀₀ von 1,0 geerntet. Die Zellpellets wurden entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert.

4.5 Methoden der Proteinexpression in Insektenzellen

In dieser Arbeit wurden Sf9-Zellen (*Spodoptera frugiperda*) und HighFive-Zellen (*Trichoplysia ni*) verwendet. Die heterologe Proteinexpression erfolgte durch Infektion mit rekombinanten Baculoviren.

Das in dieser Arbeit verwendete Baculovirussystem ("Bac-To-Bac-System", Life Technologies) basiert auf einer von Luckow *et al.* (1993) beschriebenen Methode. Dabei wird die codierende Sequenz des zu exprimierenden Proteins in einen Transfervektor (pFastBac 1) inseriert. Dieses Konstrukt wird in *E. coli*-Zellen ("DH10Bac") eingebracht, welche die virale DNA ("Bacmid") mit Kanamycinresistenz-Marker und lacZ α -Gen, in der sich die Anheftungsstelle für das Transposon Tn7 befindet, sowie ein Helfer-Plasmid, das für eine Transposase codiert, enthalten. In diesen Zellen kommt es zur Sequenz-spezifischen Transposition, wodurch das

Fremdgen in die virale DNA stabil integriert wird. Die heterologe Bacmid-DNA wird aus *E. coli*-Zellen isoliert und mittels Lipofektion in Insektenzellen gebracht, was zur Bildung des rekombinanten Baculovirus führt. Die Proteinexpression erfolgt durch Infektion von Insektenzellen mit dem rekombinanten Baculovirus. Kontrolliert wird diese heterologe Expression durch den Polyhedrin-Promotor. Dies ist ein sehr starker Promotor, welcher in der späten Phase der Virusinfektion aktiviert wird. Im Bac-To-Bac-System findet die Insertion des Fremdgens in die baculovirale DNA nicht in Insektenzellen sondern in *E.coli* statt, was den Zeit- und Arbeitsaufwand im Vergleich zu anderen Systemen deutlich vermindert.

4.5.1 Herstellung von rekombinanter "bacmid-DNA"

Kanamycinstammlösung: 15 mg/ml in bidest. Wasser (steril filtriert),
Gentamycinstammlösung: 7 mg/ml in bidest. Wasser (steril filtriert),
Tetracyclinstammlösung: 12,5 mg/ml in EtOH, **Bluo-gal-Stammlösung:** 100 mg/ml in bidest. Wasser (steril filtriert), **IPTG-Stammlösung:** 40 mg/ml in bidest. Wasser (steril filtriert),

1 ng DNA wurde zu 100 µl DH10Bac-Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 45 sec) wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium für 4 h bei 37°C geschüttelt, auf LB/Kanamycin/Gentamycin/Tetracyclin/Bluo-gal/IPTG-Platten ausplattiert und mindestens 24 h bei 37°C inkubiert.

4.5.2 Kultivierung von Insektenzellen

Die Insektenzellen wurden in SF900 II-Medium kultiviert, das mit 10 % (w/v) fötalem Kälberserum, 0,1 % Pluronic F-68 und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin supplementiert war. 600 ml einer Insektenzellsuspension wurden in 1,8 l-Fernbachkolben bei 27°C und einer Zelldichte von 0,3 bis 2,5 x 10⁶ Zellen/ml

kultiviert. Um das Absetzen der Zellen zu verhindern, wurde die Suspension mit einer Geschwindigkeit von 60 rpm in einem Schüttelinkubator geschwenkt.

4.5.3 Generierung von rekombinanten Baculoviren

Zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren wurden ausschließlich Sf9-Zellen verwendet. 9×10^5 Zellen wurden in einer 35 mm Vertiefung einer 6-Loch-Platte in SF900 II-Medium mit Penicillin/Streptomycin ausgesät und 1 h bei 27°C inkubiert, bis die Zellen adhärent waren. Gleichzeitig wurden 5 µl Bacmid-DNA und 6 µl CELLFECTIN Reagent in jeweils 100 µl SF900 II-Medium ohne Antibiotika verdünnt. Die beiden Lösungen wurden vereint, 15-45 min bei RT inkubiert und auf 1 ml mit SF900 II-Medium ohne Antibiotika aufgefüllt. Die Zellen wurden mit 2 ml in SF900 II-Medium ohne Antibiotika gewaschen und 5 h mit den DNA-Lipid-Komplexen bei 27°C inkubiert. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden durch SF900 II-Medium ohne Antibiotika ersetzt. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 27°C konnte das Virus aus dem Überstand geerntet werden.

4.5.4 Amplifikation von Baculoviren

Um Baculoviren zu amplifizieren wurden 600 ml einer Zellsuspension ($1,3 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 1,5 ml einer *high titer* Virusstammlösung infiziert. 7-14 Tage *post infectionem* (p.i.) wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 2.000 x g, 4°C). Der virushaltige Überstand wurde bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

4.5.5 Proteinexpression mittels Baculovirus-Infektion

PI-Mix I: 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin, **PI-Mix II:** 1 mM Pepstatin A, 200 μ M Leupeptin, 1 mM E-64, 1 mM Z-Phe-Phe-Diazomethylketon, 100 mM Pefabloc SC, 1 mg/ml α_2 -Makroglobulin

Für die Expression eines Zielproteins wurden 600 ml Insektenzellsuspension ($1,6-2 \times 10^6$ Zellen/ml) bei einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 infiziert. Je nach Protein erfolgte die Ernte nach 2-4 Tagen durch Zentrifugation (10 min, 2.000 x g, 4°C). Die Zellen wurden bei -80°C gelagert, der Überstand bei 4°C. Beim Zusatz von Protease-Inhibitoren zum Kulturmedium wurden 10 ml Insektenzellsuspension ($2,7-3,3 \times 10^4$ Zellen/ml) bei einer MOI von 5 infiziert und mit 1 % PI-Mix I oder PI-Mix II versetzt.

4.6 Proteinchemische Methoden

4.6.1 Zellaufschluss von *E.coli*

4.6.1.1 Zellaufschluss und Inclusion Bodies-Solubilisierung bei unlöslichem Protein (Tapasin)

Aufschlusspuffer 1: 100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0, **Aufschlusspuffer 2:** 60 mM EDTA, 6 % Triton X-100, 1,5 M NaCl, pH 7,0, **Waschpuffer:** 100 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7,0, **Solubilisationspuffer A:** 50 mM NaP, 10 M Urea, 100 mM NaCl, pH 8,5, **Solubilisationspuffer B:** 50 mM NaP, 10 M Urea, 100 mM NaCl, 100 mM DTT, pH 8,5, **Solubilisationspuffer C:** 25 mM Tris, 10 M Urea, pH 8,4

Die aufgetauten Zellen wurden in Aufschlusspuffer 1 (5 ml/g Zellpellet) resuspendiert und durch Inkubation mit Lysozym (5 mg/l Kultur) für 30 min auf Eis und

anschließender Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach Zugabe von 0,5 Vol. Aufschlusspuffer 2 und Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Inclusion Bodies durch Zentrifugation (1 h bei 100.000 x g) pelletiert. Die so erhaltenen Inclusion Bodies wurden nach einem Waschschrift bei -20°C gelagert.

Zur Solubilisation der Inclusion Bodies wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Dabei wurden Puffer mit und ohne DTT verwendet. Die Inclusion Bodies-Pellets wurden mit den entsprechenden Solubilisationspuffern (10 ml/g Pellet) resuspendiert und ÜN bei RT gerührt. Anschließend wurden größere Zelltrümmer durch Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g entfernt. Der Überstand wurde ggf. dialysiert oder so verdünnt, dass die DTT-Konzentration 1 mM und die Urea-Konzentration 6 M nicht überschritt.

4.6.1.2 Zellaufschluss bei unlöslichem Protein (HLA-B*2705-HC, β_2m)

Aufschlusspuffer: 8 M Urea, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % PI-Mix I, pH 7,5,
PI-Mix I: 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Die aufgetauten Zellpellets wurden in Aufschlusspuffer (10-15 ml/l Kultur) resuspendiert und mindestens zwei Stunden bei RT gerührt. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 h bei 100.000 x g) wurde der Überstand direkt zur Reinigung eingesetzt.

4.6.1.3 Zellaufschluss bei cytoplasmatischem Protein

Aufschlusspuffer: 50 mM NaP, 100 mM NaCl, 1 % PI-Mix, pH 8,0, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Die aufgetauten Zellpellets wurden in Aufschlusspuffer (10 ml/l Kultur) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit Lysozym (5 mg/l Kultur) für 30 min auf Eis und anschließender Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 h bei 100.000 x g) wurde der Überstand direkt zur Reinigung eingesetzt.

4.6.1.4 Zellaufschluss bei periplasmatischem Protein

Aufschlusspuffer: 100 mM Tris, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % PI-Mix I, pH 9,0, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Die Zellpellets wurden in vorgekühltem Aufschlusspuffer (10 ml/l Kultur) resuspendiert. Dabei wurde die äußere Membran durch Komplexierung zweiwertiger Kationen mittels EDTA destabilisiert, während die Sphäroblasten durch 500 mM Saccharose vor dem osmotisch bedingten Platzen geschützt sind. Durch Behandlung mit Lysozym (5 mg/l Kultur) wurde die äußere Membran aufgebrochen. Die Sphäroblasten wurden durch Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm) abgetrennt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 15.000 rpm) konnte der Überstand zur Reinigung verwendet werden.

4.6.2 Zellaufschluss von *S. cerevisiae*

Aufschlusspuffer 1: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 % PI-Mix I, pH 8,0,
Aufschlusspuffer 2: 1,85 M NaOH, 7,5 % β -ME, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Das Zellpellet wurde mit H₂O gewaschen. Zum Zellaufschluss wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, eine mechanische und eine chemische Methode. Beim mechanischen Aufschluss wurden die Zellen in Aufschlusspuffer 1 (4 ml/l Kultur) resuspendiert und mit Glasperlen versetzt. Durch wiederholtes (8x) Vortexen wurden die Zellen aufgebrochen. Bei der chemischen Methode wurden die Zellen in Aufschlusspuffer 2 (4 ml/l Kultur) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 3.000 rpm) wurde der Überstand direkt weiterverwendet.

4.6.3 Zellaufschluss von Insektenzellen

Aufschlusspuffer: 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 % Digitonin, pH 8,0, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Die Zellpellets wurden mit PBS gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte durch Resuspendieren in Aufschlusspuffer (5 ml/g Zellen) und Inkubation für 30 min auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 h, 100.000 x g) wurde der Überstand direkt weiterverwendet.

4.6.4 Thrombin-Verdau

Puffer 1: 20 mM Tris, 6 M Urea, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol pH 7,5, **Puffer 2:** 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 30 mM Imidazol pH 8,0, **Puffer 3:** 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8,0, **CaCl₂-Stammlösung:** 10 mM CaCl₂ in bidest. Wasser

Im Falle des β_2 -Mikroglobulins war es notwendig, den His₆-Tag vor der Rückfaltung zu entfernen, da dieser die Assemblierung zum MHC-Klasse I-Molekül stark behinderte. Dazu wurde während der IMAC nach einem Waschschrift mit Puffer 1 ein kontinuierlicher Gradient gegen Puffer 2 angelegt, so dass sich bei der Elution mit Puffer 3 kein Harnstoff mehr in der gereinigten Proteinlösung befand. Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte durch Zugabe von 2,5 mM CaCl₂ (Endkonzentration) sowie Thrombin (40 U/l Kultur). Der Ansatz wurde über Nacht bei 4° C inkubiert.

4.6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer: 1 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS, **Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS, **Acrylamid/Bisacrylamid:** Acrylamid/Bisacrylamidlösung (30/0,8 %), **10 % APS:** 10 % (w/v) Ammoniumperoxydisulfat in Wasser, **TEMED,** **Überschichtungslösung:** 2-Butanol (wassergesättigt), **Elektrophoresepuffer:** 25mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, **Probenauftragspuffer (2x):** 100 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 % SDS, 40 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Herstellung von Standardgelen wurden jeweils 8 Gele in einem Block gegossen. Dazu wurden 70 ml Trenngellösung in die Apparatur gegeben und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Butanol entfernt und der Rest der Apparatur mit Sammelgellösung gefüllt. Zur Ausformung der Taschen wurden Probenkämme mit 12 oder 15 Zähnen verwendet. Pro Tasche ließen sich 40 µl Proben auftragen.

Für Standardgele der Größe 140 x 70 x 0,5 mm ergeben sich folgende Ansätze bezogen auf 8 Gele:

Lösungen	Trenngel 12 %	Sammelgel 5 %
Wasser	25,6 ml	28 ml
Trenngelpuffer	18 ml	-
Sammelgelpuffer	-	5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	28,8 ml	5,4 µl
TEMED	36 µl	32 µl
10 % APS	468 µl	320 µl

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 oder weniger mit dem vierfachen Probenauftragspuffer gemischt und 5-10 min zum Denaturieren der Proteine auf 65°C für Membranproteine oder 95°C für lösliche Proteine erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei 80 V (Sammelgel), anschließend wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolblaubande aus dem Gel lief.

Das Molekulargewicht der Proteinbanden konnte durch den Vergleich mit standardisierten Größenmarkern abgeschätzt werden.

4.6.6 Proteinfärbung

4.6.6.1 Coomassiefärbung

Färbelösung: 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % Serva Blue R

Entfärbelösung: 45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Die Gele wurden 15 min bei 50°C oder 1 h bei RT unter Schütteln gefärbt und anschließend bis zur gewünschten Aufhellung des Hintergrundes entfärbt.

4.6.6.2 Silberfärbung

Fixierlösung: 45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, **Konditioner:** 30 % (v/v) Ethanol, 100 mM NaOAc, 0,2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, pH 6,9, **Färbelösung:** 0,1 % (w/v) Ag_2NO_3 , 0,1 % Formaldehyd, **Entwickler:** 2,5 % (w/v) Na_2CO_3 , 0,2 % Formaldehyd

Alle Schritte wurden auf einem Schüttler bei RT durchgeführt. Die Gele wurden fixiert (mindestens 15 min), für 15 min in Konditioner inkubiert und mit bidest. Wasser (4 x 5 min) gewaschen. Nach 25 min in Färbelösung wurden die Gele entwickelt. Wenn die Banden die gewünschte Intensität aufwiesen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Eisessig gestoppt.

4.6.7 Western-Blotting

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % Methanol,

Nach Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese wurden diese im "Tank-Blot"- oder "semidry-Blot"-Verfahren für immunologische Nachweisreaktionen auf Nitrozellulose-Membranen immobilisiert.

4.6.7.1 Tank-Blot

Gel und Membran wurden zwischen 5 *Whatman*-3MM-Filterpapiere und Schaumgummipolster luftblasenfrei in ein Haltegitter eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Tank-Blot-Apparatur gespannt. Der Transfer erfolgte entweder ÜN bei 18 V oder über 3 h, wobei die Spannung jede Stunde verändert wurde (1. h: 24 V, 2. h: 30 V, 3. h: 50 V).

4.6.7.2 Semidry-Blot

Gel und Membran wurden zwischen 4 mit Transferpuffer getränkte *Whatman-3MM*-Filterpapiere und in eine *Semidry-Blot*-Apparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte über 1-2 h bei 15 V.

4.6.8 Immunchemischer Nachweis

Ponceaulösung: 0,2 % (w/v) Ponceau in 3 % (w/v) Trichloressigsäure, **TBS:** 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 7,7, **TBST:** 0,1 % (v/v) Triton-X 100 in TBS
Blockierungsreagenz: 7 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (w/v) Natriumazid in TBST, **Detektionsreagenz:** ECL-Western Blot Detektionsreagenz 1+2, **Röntgenfilm:** ECL-Hyperfilm, **2. Antikörper:** Anti-Ratte-/Anti-Maus-Antikörper-Peroxidase-Konjugat

Bei dem gewählten ECL-Western-Blotting-Detektionssystem handelt es sich um eine nicht-radioaktive Methode zum Nachweis von immobilisiertem Antigen mit einem Peroxidase gekoppelten Antikörper. Die Chemilumineszenz wird dabei durch eine chemische Reaktion vermittelt. In dieser Reaktion wird Luminol oxidiert und emittiert beim Übergang vom angeregten in den Grundzustand Licht. Durch die Anwesenheit von Enhancern (Phenole) wird die Chemilumineszenz etwa um das 1.000 fache verstärkt.

Die auf die Nitrozellulose-Membran übertragenen Proteinbanden wurden durch Färben mit Ponceaulösung und anschließendes Spülen mit bidest. Wasser sichtbar gemacht. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Blockierungsreagenz für mindestens 1 h abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primäantikörper (der gegen das gewünschte Protein gerichtet war) erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder 1 h bei RT in Blockierungsreagenz. Daraufhin wurde dreimal 5 min mit TBST gewaschen und die Membran anschließend für mindestens 1 h bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST konnten die Proteine mit dem Detektionsreagenz nachgewiesen werden. Dazu wurden die Detektionslösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt. Pro cm² Blotmembran wurden 0,125 ml dieser Lösung

benötigt. Der Blot wurde auf Parafilm gelegt und für 1 min mit dem Detektionsgemisch überschichtet. Anschließend ließ man die Lösung gut abtropfen und legte den Blot in eine Folie, um zu verhindern, dass der im Anschluss aufgelegte Film feucht wurde. Die Expositionszeit betrug zwischen 10 s und 20 min (Mehrfachexpositionen waren möglich). Danach konnte der Film entwickelt und ausgewertet werden.

4.6.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode

Die Proteinkonzentration von Proteinen wurde mit dem *Micro-BCA Protein Assay Reagent Kit* der Firma Pierce durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine im alkalischen Milieu. Cu^{1+} wird durch bicinchonige Säure komplexiert und bildet einen lila-farbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Die Konzentrationsbestimmung wurde in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der zu erwartenden Proteinmenge auf 1-2 μg verdünnt und mit einem geeigneten Puffer auf 150 μl aufgefüllt. Nach Zugabe von 150 μl BCA-Lösung und zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Mischung aus 150 μl des verwendeten Puffers und 150 μl BCA-Lösung. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichgerade von 0,2 bis 2 μg IgG erstellt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.6.10 Fällung von Proteinen

4.6.10.1 TCA/Aceton-Fällung

TCA-Lösung: 50 % (w/v) Trichloressigsäure in Methanol
--

Aus verdünnten Proben wurden Proteine vor dem Gelauftrag mit TCA gefällt, um die Detektion zu erleichtern.

Die Proteinlösung wurde mit 10 % ihres Volumens mit TCA-Lösung versetzt und gevortext. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis und einem Zentrifugationsschritt

(30 min, 15.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet mit 200 µl Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und auf das Gel beladen.

4.6.10.2 NP40-Lyse und Chloroform/Methanol-Extraktion

Lysepuffer: 20 mM NaP, 150 mM NaCl, 1 % PI-Mix I, 1 % NP40, pH 7,5, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden Proteine durch Chloroform-Methanol-Extraktion gefällt. Dabei wurden Zellen in Lysepuffer aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit 4 Volumenteilen Methanol, 1 Volumenteil Chloroform und 3 Volumenteilen Wasser versetzt und gevortext. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 15.000 rpm, 4°C) wurde die obere Phase verworfen. Die untere Phase wurde mit 4 Volumenteilen Methanol versetzt, gevortext und zentrifugiert (5 min, 15.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde bei RT getrocknet, mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und auf das Gel beladen.

4.6.11 Proteinrückfaltung

4.6.11.1 I-Tapasin

Rückfaltungspuffer: 55 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,0055 % PEG 800, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mM GSH, 0,1 mM GSSG, pH 8,5. **Dialysepuffer:** 55 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,5

Die Rückfaltungen erfolgten in Rückfaltungspuffer in einem Volumen von 1-5 ml, die zwischen 5 und 20 µM Tapasin und, wenn angegeben, noch weitere Zusätze enthielten.

Die Ansätze wurden für 2-3 Tage bei 4°C inkubiert und anschließend dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4 h, 100.000 x g) wurden die Ansätze analysiert.

4.6.11.2 MHC-Klasse I-Molekül HLA-B*2705

Rückfaltungspuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 3 mM β -ME, 0,3 mM 2,2'-Dithiodiethanol, pH 8,0, **TBS:** 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0

Ein Rückfaltungsansatz enthielt 10 μ M B*2705-HC, 20 μ M β_2m und 100 μ M Peptid (RRYQKSTEL). Gegebenenfalls wurden noch 5 μ M Fluoreszein-markiertes RRYØKSTEL zugegeben. Die Komponenten wurden gemischt und in Anwesenheit von 6 M Urea mit Rückfaltungspuffer auf 4 ml aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 36–48 h bei 4°C gegen 400 ml Rückfaltungspuffer dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 h, 100.000 x g) konnten die Proteine mittels Ultrafree 10.000-Filtratoren konzentriert werden. Die Trennung von rückgefaltetem MHC und Aggregaten erfolgte durch Gelfiltration (Superdex 200) in TBS.

4.6.12 Generierung von leeren MHC-Klasse I-Molekülen

Das Entfernen von Peptid aus der Bindungstasche von MHC-Klasse I-Molekülen erfolgte mittels eines pH-Sprungs. Dabei wurde die proteinhaltige Lösung durch Zugabe von 100 mM Zitronensäure (160 μ l/ml) auf pH 3 gebracht. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde mittels 1 M Tris-Lösung (700 μ l/ml) wieder auf pH 8 titriert.

4.7 Reinigung von Proteinen

Affinitätsmarkierte Zielproteine wurden entsprechend ihres Affinitäts-Tags mittels IMAC, StrepTactin- bzw. Amylose-Affinitätschromatographie gereinigt. Proteine ohne Affinitäts-Tag wurden mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert. Sowohl zur Verbesserung des Reinheitsgrades als auch als Qualitätskontrolle und zur Analyse wurden ergänzend dazu verschiedene andere chromatographische Techniken verwendet. Die Chromatographien wurden an ÄKTA- und Smart-Systemen (Pharmacia), einem System bestehend aus Pumpeneinheit (Jasco) und Fluoreszenzmonitor (Shimadzu), mittels Gravitationsfluss oder manuell mit einer Spritze durchgeführt.

4.7.1 Immobilisierte Metall-Ionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Puffer 1: entsprechender Aufschlusspuffer mit 0-10 mM Imidazol **Puffer 2:** entsprechender Aufschlusspuffer mit 250 mM Imidazol

Diese Affinitätschromatographie beruht auf der Chelatkomplexbildung von Ni^{2+} mit an Säulenagarose immobilisiertem NTA (*nitrilo triacetic acid*) oder IDA (*imido diacetic acid*) und den an das Protein fusionierten Histidinresten. Das gebundene Protein kann auf verschiedene Arten wieder von der Säule eluiert werden. Durch Erhöhung des pH-Wertes werden die Histidine protoniert und können das Ni^{2+} nicht mehr komplexieren. Bei Zugabe von Imidazol werden die Histidinreste kompetitiv verdrängt. Mit EDTA kann das Ni^{2+} komplexiert und zusammen mit den Proteinen von der Säule eluiert werden.

In dieser Arbeit wurden selbstgepackte NTA-Säulen mit 1 ml-Volumen oder 1 bzw 5 ml HiTrapChelating-Säulen (IDA-Material) verwendet. Nach Beladen der Säule mit NiCl_2 und Äquilibrieren im entsprechenden Puffer wurde die Proteinlösung aufgetragen. Nach mehrmaligem Waschen mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen wurde das His-markierte Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Säule konnte durch Spülen mit 25 mM EDTA regeneriert werden.

4.7.2 StrepTactin-Affinitätschromatographie

Puffer 1: 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0 **Puffer 2:** 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0, **Puffer 3:** 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM HABA, pH 8,0

Diese Affinitätschromatographie beruht auf der Wechselwirkung des StrepTag II (Sequenz: WSHPQFEK) mit dem StrepTactin-Material. Dabei handelt es sich um eine Streptavidinvariante. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Desthiobiotin, wodurch der StrepTag II kompetitiv von der Matrix verdrängt wird (Voss & Skerra, 1997).

Eine 5 ml Säule mit StrepTactin II-Material wurde mit zwei Säulenvolumen Puffer 1 äquilibriert. Nach Beladen der Proteinlösung wurde mit fünf Säulenvolumen Puffer 1 gewaschen und mit zwei Säulenvolumen Puffer 2 eluiert. Das Säulenmaterial wurde mit drei Säulenvolumen Puffer 3 regeneriert.

4.7.3 Amylose-Affinitätschromatographie

Puffer 1: 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 % PI-Mix I, pH 8,0 **Puffer 2:** 25 mM Tris, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 % PI-Mix I, 20 mM Maltose, pH 8,0, **PI-Mix I:** 5 mg/ml AEBSF, 1.000 U/ml Aprotinin, 1 mg/ml Leupeptin, 0,5 mg/ml Pepstatin A, 15 mg/ml Benzamidin

Diese Affinitätschromatographie beruht auf der Fähigkeit von MBP (Maltosebindungsprotein), an Amylose zu binden. Dadurch kann das MBP-Fusionsprotein selektiv von anderen Proteinen getrennt werden.

Eine 2 ml Säule mit Amylose-Resin wurde mit drei Säulenvolumen Puffer 1 äquilibriert. Nach dem Beladen mit der Proteinlösung wurde die Säule mit mindestens fünf Säulenvolumen Puffer 1 gewaschen. Die Elution erfolgte mit zwei Säulenvolumen Puffer 2.

4.7.4 Gelfiltration

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Moleküle entsprechend ihrer Form und Größe aufgetrennt. Sie diente in dieser Arbeit einerseits als finaler Schritt zur Feinreinigung und Qualitätskontrolle der isolierten Proteine. Andererseits wurde mit dieser Methode die MHC-Tapasin-Wechselwirkung untersucht.

4.7.4.1 Reinigung isolierter Proteine

Die Gelfiltrationen wurden an einem ÄKTA- oder Smart-System mit einem entsprechenden Programm durchgeführt. Für präparative Gelfiltrationen wurden Superdex 75 HR 10/30- und Superdex 200 HR 10/30-Säulen mit einem Volumen von 24 ml verwendet, analytische Läufe wurden mit Superdex 75 HR 1/30- und Superose 12 HR 1/30-Säulen mit einem Volumen von 2,4 ml durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Probenvolumen nicht größer als 2 % des Säulenvolumens ist.

4.7.4.2 MHC-Tapasin-Wechselwirkung

Laufpuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0

Die Wechselwirkung zwischen MHC-Klasse I-Molekülen und I-Tapasin wurde mittels einer TOSOH Biosep TSK G3000 SWXL-Gelfiltrationssäule mit vorgeschalteter TSK Guard-Säule SWXL durchgeführt. Dabei wurde ein System bestehend aus Pumpeneinheit (Jasco) und Fluoreszenzmonitor (Shimadzu) verwendet. Bei einem Fluss von 0,5 ml/min wurden zwischen 10 und 100 µl Probe injiziert. Die Chromatographien erfolgten bei 4°C.

4.7.5 Ionenaustausch-Chromatographie

Puffer 1: 20 mM Tris, pH 8,0, **Puffer 2:** 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8,0

Nach der Thrombinspaltung wurden β_2m , abgespaltener His₆-Tag und Thrombin mittels Anionenaustauschchromatographie getrennt. Dabei wurde eine 1 ml RESOURCE Q-Säule verwendet. Sie enthält als funktionelle Gruppe quartäre Ammoniumsalze und ist somit ein starker Anionentauscher.

Um eine Bindung an die Säule zu ermöglichen, war es nötig, die Ionenstärke zu reduzieren. Dazu wurde der Ansatz 1:10 mit Puffer 1 verdünnt. Das Beladen der Säule erfolgte bei einem Fluß von 1 ml/min, die Elution wurde mittels eines Gradienten mit steigender Salzkonzentration (in 30 min bis 500 mM NaCl, in 5 min bis 1 M NaCl) bei 2,5 ml/min durchgeführt. Gespaltene β_2m befand sich vorwiegend im Durchfluss. Dieser wurde mittels Ultrafree 10.000-Filtratoren konzentriert. Die Proteinlösung wurde bei 4°C gelagert.

4.8 Biophysikalische Methoden

4.8.1 Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie (SPR)

Laufpuffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,5

Die SPR ist eine hocheinsensitive, nichtinvasive, sondenfreie Technik, die es ermöglicht, biomolekulare Wechselwirkungsanalysen in Echtzeit durchzuführen. Dazu wurden die untersuchten Proteine über ihren His-Tag an einen NTA-Sensor-Chip immobilisiert und die entsprechenden Interaktionspartner mit einem Fluss von 10 μ l/min auf die Chipoberfläche aufgebracht. Zum Reinigen und Regenerieren der Chipoberfläche wurde eine 5 mM NaOH-Lösung verwendet. Die Beladung der NTA-Gruppen erfolgte mit 1 mM NiCl₂, das Entladen mit 0,5 M EDTA. Es wurden jeweils 20 μ l injiziert. Alle SPR-Messungen wurden an einem BIAcore X (BIAcore) durchgeführt.

4.8.2 Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD)

CD-Puffer: 5 mM NaP, 150 mM NaF, pH 8,0

Die Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD) wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Sekundärstrukturverteilung des aus *E. coli* isolierten I-Tapasin verwendet. Dazu wurde die Proteinlösung gegen CD-Puffer dialysiert und auf eine Konzentration von 50 µg/ml eingestellt. Die Messung wurde mit einer 1 mm-Küvette durchgeführt. Die Scanning-Geschwindigkeit betrug 50 nm/min bei einer Schlitzbreite von 2 nm und einer Auflösung von 0,5 nm. Die Daten von 5 Spektren wurden jeweils gemittelt, wobei das gemittelte Spektrum des CD-Puffers als Hintergrund subtrahiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels der CD Spectra Deconvolution Software Version 2.1 (Gerald Böhm, Universität Halle).

4.9 Zellbiologische Methoden

4.9.1 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Waschpuffer: 20 mM NaP, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Na-azid, pH 7,5, **Blockpuffer:** 3 % (w/v) BSA in Waschpuffer, **Primäre Antikörperlösung:** W6/32-Zellkulturüberstand, 0,1 % (w/v) Na-Azid, **sekundäre Antikörperlösung:** Ziege-anti Maus-IgG-FITC (1:100) in Waschpuffer

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortier-Methode (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) wurde in dieser Arbeit zur Analyse der MHC-Klasse I-Expression auf der Zelloberfläche verwendet. Dazu wird ein primärer Antikörper, der mit dem entsprechenden Oberflächenprotein reagiert, von einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörper erkannt. Aufgrund dieses Fluoreszenzsignals unterscheidet das FACS-Gerät zwischen positiven und negativen Zellen.

100 µl einer Insektenzellsuspension ($0,4 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden bei 4°C 15 min in Waschpuffer und anschließend in Blockpuffer inkubiert. Der Blockpuffer wurde

abgenommen und durch 200 μ l primäre Antikörper-Lösung ersetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 200 μ l Waschpuffer gewaschen und 30 min auf Eis mit der sekundären Antikörperlösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 μ l Waschpuffer wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen übertragen und gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Tapasin

Die in dieser Arbeit generierten Konstrukte codieren entweder für *wt*-Tapasin oder für Tapasinvarianten, bei denen der cytoplasmatische Teil sowie die Transmembrandomäne deletiert waren. Im Folgenden werden diese verkürzten Proteine unabhängig von der Art des fusionierten Affinitätstags einheitlich als lösliches Tapasin ("I-Tapasin") bezeichnet. Als Ausgangsmaterial für sämtliche Klonierungen mit Tapasin diente das Konstrukt pCR2.1-*wt*Tapasin. Dabei wurde das PCR-Produkt der Tapasin-cDNA über "TA-Klonierung" in den Vektor inseriert. Zusätzlich zu den im Vektor befindlichen Restriktionsstellen enthält die cDNA eine *KpnI*-RE-Stelle am 5'-Ende des Inserts (N-Terminus des Proteins) sowie eine *ClaI*-RE-Stelle am 3'-Ende des Inserts (C-Terminus des Proteins). Alle generierten Konstrukte wurden mittels analytischem Restriktionsverdau und nachfolgender Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

5.1.1 I-Tapasin in Insektenzellen

5.1.1.1 Molekularbiologische Ergebnisse

Zur Expression von löslichem Tapasin in Insektenzellen wurde ein Teil der im pCR2.1 inserierten cDNA durch PCR mit den Primern *T-ATM-His₆* und *T-HI* amplifiziert. Dies ergab ein DNA-Fragment von 1,2 kb, welches der Sequenz der Tapasin-cDNA mit Ausnahme der Transmembrandomäne und des cytoplasmatischen Teils entsprach. Zusätzlich wurden durch die Primer ein N-terminaler His₆-Tag sowie RE-Stellen (*Bam*HI am 5'-Ende, *Hind*III am 3'-Ende) für die Klonierung generiert. Für Kontrollexperimente wurde durch PCR mit den Primern *wtT-Strep* und *T-HI* die vollständige Tapasin-cDNA amplifiziert. Dies ergab ein DNA-Fragment von 1,4 kb. Zusätzlich wurden durch die Primer ein N-terminaler Strep-Tag sowie RE-Stellen (*Bam*HI am 5'-Ende, *Hind*III am 3'-Ende) für die Klonierung generiert.

Zur Expression im Baculovirus-System wurden die Fragmente mittels *Bam*HI/*Hind*III-Verdau in den pFastBac 1-Vektor inseriert. Die isolierten und aufgereinigten Konstrukte wurden in DH10Bac-Zellen transformiert. Dort fand die Transposition des Inserts in die virale DNA statt, welche zur Herstellung von rekombinanten Baculoviren mittels Lipofektion verwendet wurde.

5.1.1.2 Assemblierung von MHC-Klasse I-Molekülen in Insektenzellen

Insekten besitzen kein den Säugern vergleichbares adaptives Immunsystem. Daher war die primäre Fragestellung, ob humane MHC-Klasse I-Moleküle in Insektenzellen überhaupt assemblieren und an die Oberfläche transportiert werden. Im humanen System sind dabei verschiedene Chaperone beteiligt, die in Insektenzellen fehlen. Die vorhandenen Chaperone, die ersatzweise verwendet werden, könnten eine falsche Faltung von HC oder β_2m induzieren, so dass die beiden Proteine nicht mehr interagieren können oder abgebaut werden. Weiterhin ist für eine vollständige Assemblierung die Assoziation des HC- β_2m -Dimers mit einem Peptid nötig. In Säugerzellen werden diese Peptide hauptsächlich vom TAP-Komplex ins ER transloziert. Insektenzellen besitzen keinen TAP-Komplex. Aus diesem Grunde wurde für dieses Experiment das HLA-A2 gewählt, da diese Alloform weitgehend unabhängig vom TAP-Komplex ist. Schließlich wäre es auch möglich, dass assemblierte MHC-Klasse I-Moleküle aufgrund von speziesspezifischen Sequenzunterschieden in der Translokationsmaschinerie nicht an die Zelloberfläche gelangen.

Weiterhin sollte in diesem Experiment überprüft werden, ob heterolog in Insektenzellen exprimiertes I-Tapasin in Bezug auf MHC-Klasse I-Assoziation und Förderung der Oberflächenexpression aktiv war. Zu diesem Zweck wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Sf9-Zellen mit verschiedenen rekombinanten Baculoviren coinfiziert. Bei den verwendeten Viren handelte es sich um HLA-A2-HC-BV und β_2m -BV, welche die Untereinheiten des MHC-Klasse I-Moleküls bildeten, sowie I-Tapasin-BV und *wt*Tapasin-BV. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit *wt*BV infiziert wurden. Die Expression der einzelnen Proteine wurde mittels Western Blot überprüft. Für die

FACS-Analyse wurde der W6/32-Antikörper verwendet. Dabei handelt es sich um einen konformationsspezifischen Antikörper, der ausschließlich vollständig assemblierte MHC-Klasse I-Moleküle erkennt. Freies β_2m oder freie HC werden nicht erkannt.

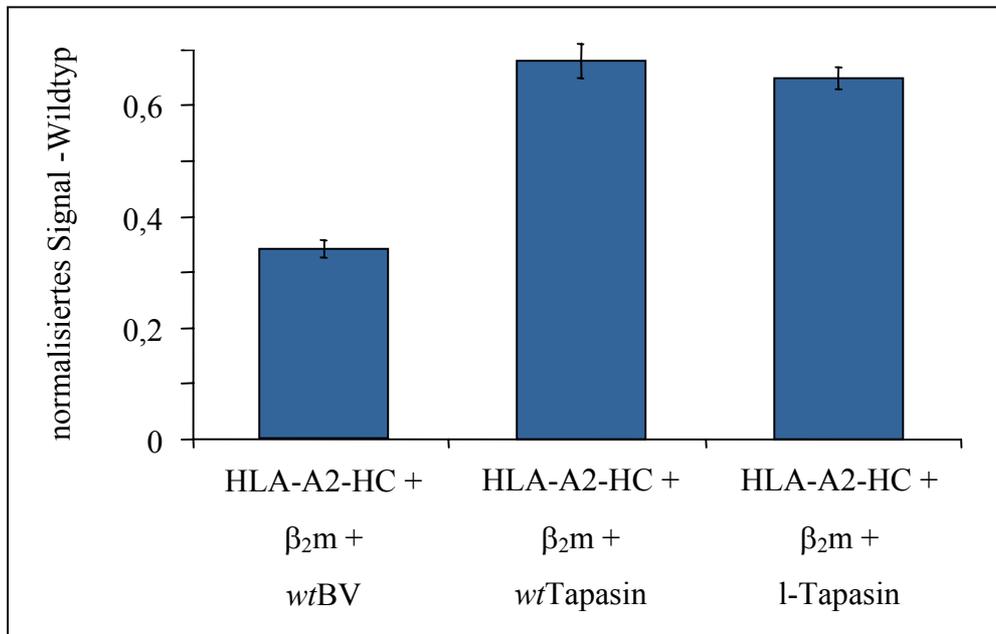


Abb. 4: Sf9-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren für HLA-A2-HC, β_2m , *wtTapasin* und *l-Tapasin* sowie *wtBV* als Kontrolle bei einer MOI von 5 infiziert und 3 Tage bei 27°C inkubiert. 4×10^4 Zellen wurden nach dem Blocken gewaschen und 30 Min bei 4°C mit W6/32-Antikörper inkubiert. Nach nochmaligem Waschen folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C mit FITC-markiertem Ziege-antiMaus-Antikörper. Die Zellen wurden nach einem weiteren Waschschrift analysiert. Für jede Infektion wurde als Kontrolle eine Messung durchgeführt, bei der die Zellen nur mit dem 2. Antikörper inkubiert wurden. Von der Differenz mit und ohne 1. Antikörper wurde der Wert für *wtBV* infizierte Zellen subtrahiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich, dass die Assemblierung und Reifung von β_2m und HLA-A2-HC in Insektenzellen stattfindet (Abb. 4). Somit war sichergestellt, dass das gewählte System zur heterologen Expression von MHC-Klasse I-Molekülen geeignet ist. Weiterhin wurde deutlich, dass sowohl die verkürzte als auch die *wt*-Form von Tapasin in der Lage sind, in gleichem Maße die MHC-Klasse I-Oberflächenexpression zu steigern.

5.1.1.3 Expression und Isolation von I-Tapasin aus Insektenzellen

Tapasin trägt in seinem cytosolischen Teil ein ER-Retentionssignal, welches bei I-Tapasin deletiert ist. Daher wurde vor dem Aufstellen eines Reinigungsprotokolls überprüft, ob I-Tapasin ins Medium sezerniert wird.

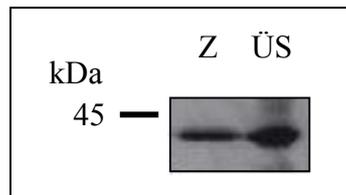


Abb. 5: 1×10^6 Sf9-Zellen wurden in 35 mm Vertiefungen einer 6-Loch-Platte mit rekombinalem BV für I-Tapasin bei einer MOI von 5 infiziert. Nach 3 Tagen bei 27°C wurden Proteine aus den Zellen ("Z") mittels Chloroform-Methanol-Extraktion extrahiert. Proteine aus dem Überstand ("ÜS") wurden durch TCA-Fällung präzipitiert. Die Pellets wurden in SDS-Probenpuffer resuspendiert und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. I-Tapasin wurde im Immunoblot mittels 1E2-Antikörper detektiert.

Die I-Tapasin-Menge im Zellkulturüberstand ist deutlich höher als in den Zellen (Abb. 5). Deshalb wurde zur Proteinreinigung zunächst der Zellkulturüberstand verwendet. Ein weiterer Vorteil war, dass es sich bei sezerniertem I-Tapasin um eine homogene Proteinpopulation von korrekt gefaltetem Protein handelte, das sämtliche Qualitätskontrollmechanismen der Zelle vor und während der Sekretion durchlaufen hatte. I-Tapasin lag in der Zelle in verschiedenen Stadien der Prozessierung und Glycosylierung vor. Die Aufreinigung sollte mittels IMAC erfolgen. Deshalb musste der Zellkulturüberstand nach der Expression dialysiert werden, um Histidin und EDTA aus dem Medium zu entfernen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass I-Tapasin vorwiegend bei 250 mM Imidazol eluiert und dass diese Fraktion keine detektierbaren Kontaminationen enthält (Abb. 6A). Ein kleinerer Teil wird beim Waschschriff mit 40 mM Imidazol eluiert, der aber aufgrund der Verunreinigungen mit anderen Proteinen verworfen wurde. Die erhaltene Proteinausbeute lag bei 90 µg/l Kultur. Als Qualitätskontrolle wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass das aufgereinigte Protein als Aggregat vorlag (Abb. 6B). Wie ein Vergleich im SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte (Abb. 7), war die intermolekulare Verbrückung von

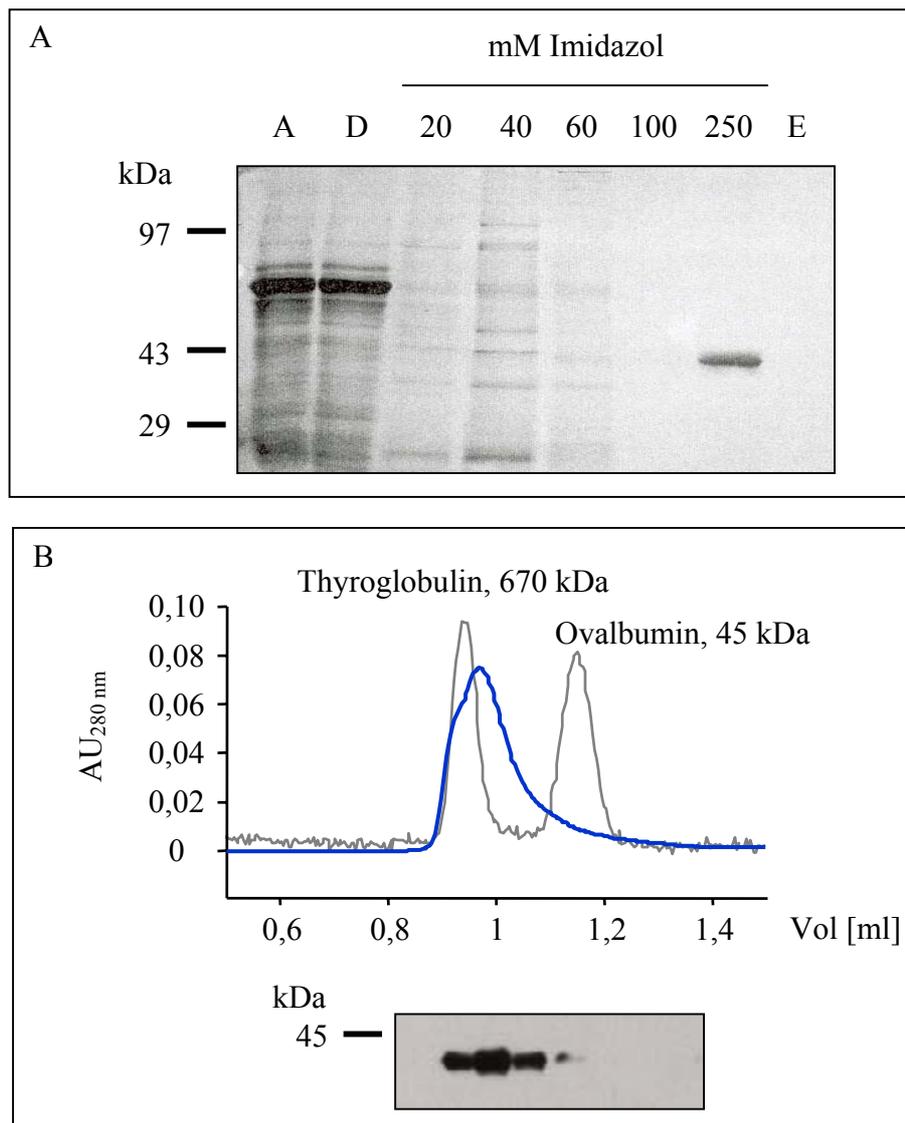


Abb. 6: HighFive-Zellen wurden mit rekombinantem BV für l-Tapasin bei einer MOI von 5 infiziert. Nach 3 Tagen bei 27°C wurde der Zellkulturüberstand gegen 50 mM NaP, 300 mM NaCl, pH 8,0 dialysiert und über eine 1 ml Ni-NTA-Säule aufgereinigt. (A) Die aus der IMAC erhaltenen Fraktionen wurden mittels 12 % SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. A = Auftrag, D = Durchfluss, E = 25 mM EDTA (B) Gelfiltration der Elutionsfraktion (blau) über Superdex 75 HR 1/30 und Immunoblot mit 1E2-Antikörper. Als Referenz (grau) für die Gelfiltration diente Thyroglobulin zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule sowie Ovalbumin, welches mit 45 kDa ein ähnliches Elutionsvolumen wie l-Tapasin haben sollte.

Cysteinen an der Aggregatbildung beteiligt. Unter reduzierenden Bedingungen erschien das l-Tapasin als einzelne Bande bei 42 kDa, was der Größe des Monomers entsprach. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden neben der Monomer-Bande auch Dimer- (84 kDa) und Trimer-Banden (126 kDa) sowie ein sehr breites Signal zu Beginn

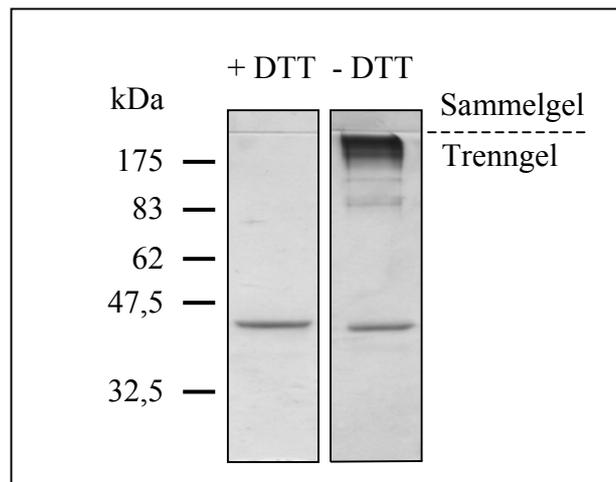


Abb. 7: Die Peak-Fraktion einer Gelfiltration von isoliertem I-Tapasin mittels Superdex 75 HR 1/30 wurde in SDS-Probenpuffer mit ("+ DTT") und ohne ("- DTT") inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels 12 % SDS-PAGE und Silberfärbung

des Trenngels, welches I-Tapasin-Multimere darstellt, detektiert. Das Erscheinen der Monomer-Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte jedoch, dass noch andere Faktoren an der Aggregatbildung beteiligt sein mussten. Dabei handelte es sich vermutlich um hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen, welche durch das SDS aufgelöst wurden.

Im Weiteren wurden verschiedene Versuche unternommen, das I-Tapasin aus dem Überstand sowie aus den Zellen von Sf9- und HighFive-Zellen als Monomer zu reinigen. Zunächst wurden Veränderungen des pH-Werts (pH 5,0, 7,0, 7,5, 8,0) und der Salzkonzentration (0, 50, 100, 200, 250, 500 mM NaCl) sowie der Zusatz von Digitonin (1%) getestet. Weiterhin wurden verschiedene Säulenmaterialien zur Isolation von Histidin-markierten Proteinen (NTA-Agarose, IDA-Sepharose, Talon Metal Affinity Resin), welche mit Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} oder Co^{2+} beladen waren, sowie andere chromatographische Techniken (Anionen- und Kationenaustauschchromatographie, Lentil-Lectin, *wheat germ*-Lectin) verwendet. Dabei konnte aber keine Veränderung am aggregierten Zustand des Proteins erzielt werden. Einzig die Zugabe von PI-Mix I zum Medium während der Kultur erbrachte eine Ausbeute von ca. 5-10 % Monomer im Vergleich zu den Aggregaten (Abb. 8). Dies entsprach einer Monomer-Ausbeute von 4,5-9 $\mu\text{g/l}$ Kultur.

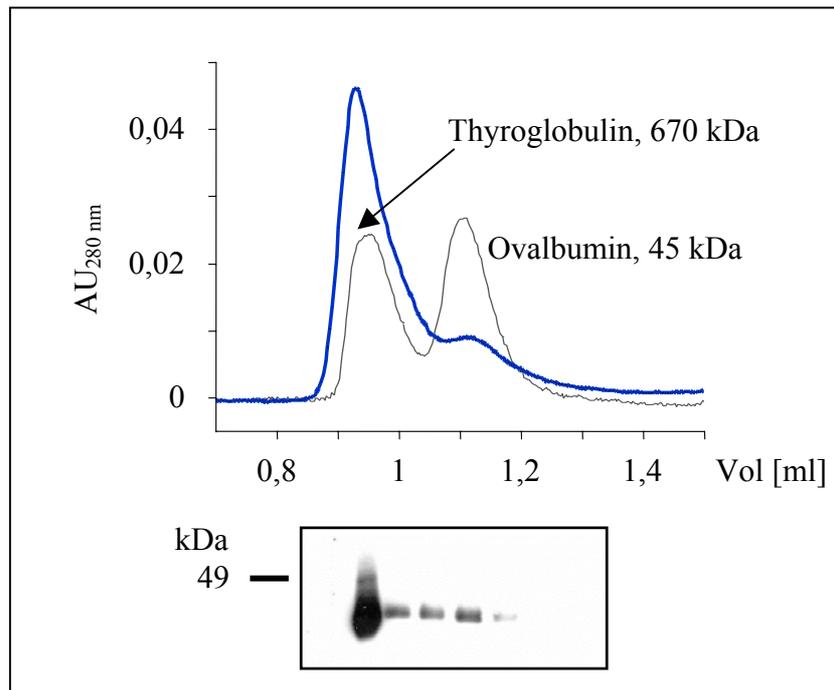


Abb. 8: HighFive-Zellen wurden mit rekombinatem BV für I-Tapasin bei einer MOI von 5 infiziert. Dem Medium wurde 1 % (v/v) PI-Mix I zugegeben. I-Tapasin wurde mittels IMAC aufgereinigt. Die Elutionsfraktion (blau) wurde mittels Gelfiltration mit Superdex 75 HR 1/30 und Immunoblot mit 1E2-Antikörper analysiert. Als Referenz (grau) für die Gelfiltration diente Thyroglobulin zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule sowie Ovalbumin, welches mit 45 kDa ein ähnliches Elutionsvolumen wie I-Tapasin haben sollte.

Es wurden daraufhin die PI-Mix I-Komponenten einzeln und in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen getestet, was aber zu keiner Verbesserung des Monomer-Aggregat-Verhältnisses führte. Zusätzlich wurden weitere Protease-Inhibitoren ("PI-Mix II") eingesetzt, welche bereits in anderen Arbeiten die Degradation von heterolog exprimierten Proteinen in Insektenzellen reduziert hatten (Grosch & Hasilik, 1998, Pyle *et al.*, 1995). Dadurch konnte allerdings die Monomer-Ausbeute an I-Tapasin ebenfalls nicht erhöht werden.

Eine Erklärungsmöglichkeit für den Effekt der Zugabe von Protease-Inhibitoren ist, dass einige Zellen aufgrund der Virusinfektion zum Zeitpunkt der Zell- bzw. Überstanderte bereits lysiert waren und somit Proteasen ins Medium gelangten, welche das I-Tapasin so spalteten, dass einerseits die Struktur nicht mehr aufrechterhalten werden konnte, andererseits aber der entstandene Größenunterschied nicht in einem SDS-PAGE-Gel detektierbar war. Deshalb wurde neben der Zugabe von fötalem Kälberserum zum Medium sowie dem Ernten des Überstands zu einem früheren

Zeitpunkt versucht, I-Tapasin direkt aus den Zellen zu isolieren. Allerdings konnte auch dadurch keine Verbesserung der Monomer-Ausbeute erzielt werden.

5.1.2 I-Tapasin in *S. cerevisiae*

5.1.2.1 Molekularbiologische Ergebnisse

Zur Expression von löslichem Tapasin in *S. cerevisiae* wurde die codierende Sequenz von I-Tapasin mittels eines *Bam*HI/*Hind*III-Verdau aus dem pFastBac 1-Vektor herausgeschnitten und in die Vektoren p425GAL sowie pYEP352 inseriert. Die Konstrukte wurden aus DH5 α -Zellen isoliert, sequenziert und in den Hefe-Stamm W303-1A transformiert.

5.1.2.2 Expression von I-Tapasin in *S. cerevisiae*

Die Expression von I-Tapasin erfolgte in zwei unterschiedlichen Systemen. Im pYEP352-Vektor wird das heterolog exprimierte Protein durch einen konstitutiv aktiven Promotor kontrolliert, während die Transkription im p425GAL-Vektor durch Zugabe von Galactose induziert wird. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Zellen auf verschiedene Weise aufgeschlossen.

Während das I-Tapasin aus Sf9-Zellen durch die starke Überexponierung des Röntgenfilms schon ein sehr breites I-Tapasinsignal lieferte, war in den Proben aus den Hefezellen kein I-Tapasin detektierbar. Auch bei stark verlängerter Exponierung mit einem hochsensitiven Entwicklungsreagens (SuperECL) konnte kein I-Tapasin nachgewiesen werden (Abb. 9).

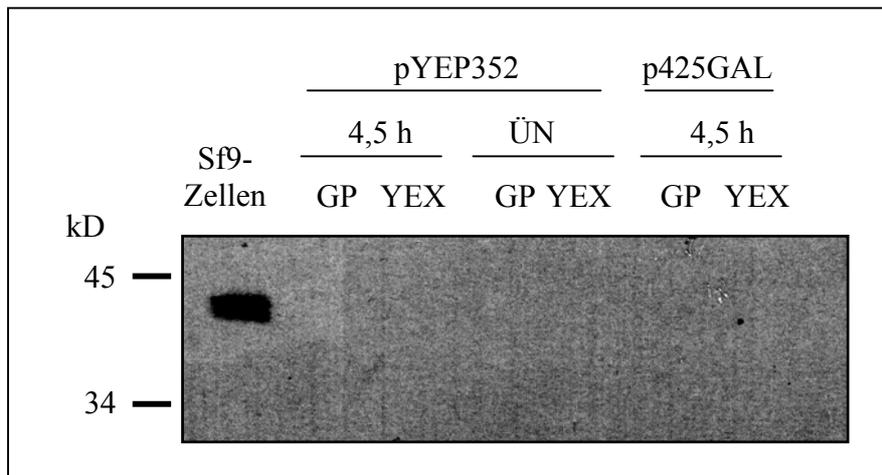


Abb. 9: Die Expression erfolgte in einer 50 ml Hauptkultur. Die Zellen wurden mechanisch mittels Glasperlen ("GP") sowie chemisch mittels NaOH und β -ME ("YEX") aufgeschlossen. Die Proteine wurden durch TCA/Aceton-Fällung präzipitiert und mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western Blot mittels 1E2-Antikörper. Als Kontrolle dienten Sf9-Zellen, welche mit rekombinantem BV für I-Tapasin infiziert waren.

5.1.3 Expression und Isolation von I-Tapasin in *E. coli*

5.1.3.1 Molekularbiologische Ergebnisse

Für die Expression in eukaryontischen Systemen wurden Konstrukte mit Signalsequenz generiert. Sie ist für ein ER-Targeting von Tapasin verantwortlich und wird während der Reifung des Proteins abgespalten. In Prokaryonten wird eine solche Signalsequenz nicht erkannt und dementsprechend auch nicht gespalten. Aus diesem Grund wurden für die Expression in *E. coli* Konstrukte ohne Signalsequenz verwendet (" Δ LS"). Die Inserts wurden in der Regel mittels PCR generiert. Als Vorlage diente dabei der Klon pCR2.1-*wt*Tapasin.

Für die Expression im T7-System wurden PCRs mit den Primern *T- Δ LS* bzw. *T- Δ LS C7S* und *T- Δ TM-*His*₆* durchgeführt. Abgesehen von *His*₆-Tag, Transmembranteil und Signalsequenz führten diese PCRs zu einer *wt*-Form sowie einer Tapasin-Variante, welche statt des Cysteins in Position 7 ein Serin trug ("*C7S*"). Die Fragmente wurden mittels *Hind*III/*Nde*I-Verdau in die Vektoren pRSET A und pET-21a(+) inseriert.

Für die Expression im pASK-IBA 2-System wurde eine PCR mit den Primern *T-Peri forward* und *T-Peri reverse* durchgeführt. Die Fragmente wurden mittels *BsaI*-Verdau in den Vektor pASK-IBA 2 inseriert. Das Konstrukt codiert für ein Protein, welches N-terminal die OmpA-Signalsequenz für eine Translokation ins Periplasma und C-terminal eine Thrombin-Spaltstelle gefolgt von einem Strep-Tag II besitzt.

Für die Expression im pMAL-System wurde eine PCR mit den Primern *T-ΔTM* und *T-pMAL forward* durchgeführt. Da das Insert C-terminal des MBP als Fusionsprotein exprimiert werden sollte, musste die Klonierung im Leserahmen erfolgen. Dazu wurde das Fragment mit *BsaI* verdaut und der Basenüberhang mit *Pwo*-Polymerase entfernt. Anschliessend wurde das 3'-Ende mit *HindIII* gespalten. Die Vektoren pMAL-c2x und pMAL-p2x wurden mit *XmnI* und *HindIII* geschnitten. Vektor und Insert konnten dann ligiert werden. Das Konstrukt trug am 5'-Ende (N-terminal im resultierenden Protein) das MBP-Gen (bei pMAL-p2x mit OmpA-Signalpeptid für Periplasma-Translokation), eine Faktor Xa-Schnittstelle sowie die l-Tapasin-cDNA mit His₆-Tag (C-terminal im resultierenden Protein) am 3'-Ende.

Für die Expression im pBAD-System wurden PCRs mit den Primern *T-ΔTM-His₆* bzw. *T-ΔTM-His₁₀* und *T-ALS* durchgeführt. Die Fragmente wurden mittels *HindIII/NdeI*-Verdau in den Vektor pBAD33 inseriert.

5.1.3.2 pASK-IBA-System

Strukturvorhersagen und Sequenzhomologien ergaben, dass Tapasin mindestens eine Disulfidbrücke besitzen sollte, welche die ER-luminale Immunglobulindomäne begrenzt. Da das Cytoplasma von *E.coli*-Zellen ein stark reduzierendes Milieu besitzt, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass lösliches Protein im Cytoplasma korrekt gefaltet vorliegt. Aus diesem Grund wurde zunächst ein Expressionssystem gewählt, bei dem das l-Tapasin ins Periplasma transloziert wurde. Dort sollte aufgrund des oxidativen Milieus die korrekte Faltung stattfinden.

Es stellte sich heraus, dass l-Tapasin überwiegend unlöslich als Inclusion Bodies vorlag (Abb. 10). Die Periplasmafraktion wurde über StrepTactin II-Agarose aufgereinigt und mittels Gelfiltration auf Aggregatbildung untersucht. Etwa 5-10 % des aufgereinigten Proteins lagen als Monomer vor. Das entsprach einer Ausbeute von etwa 1-2 µg/l

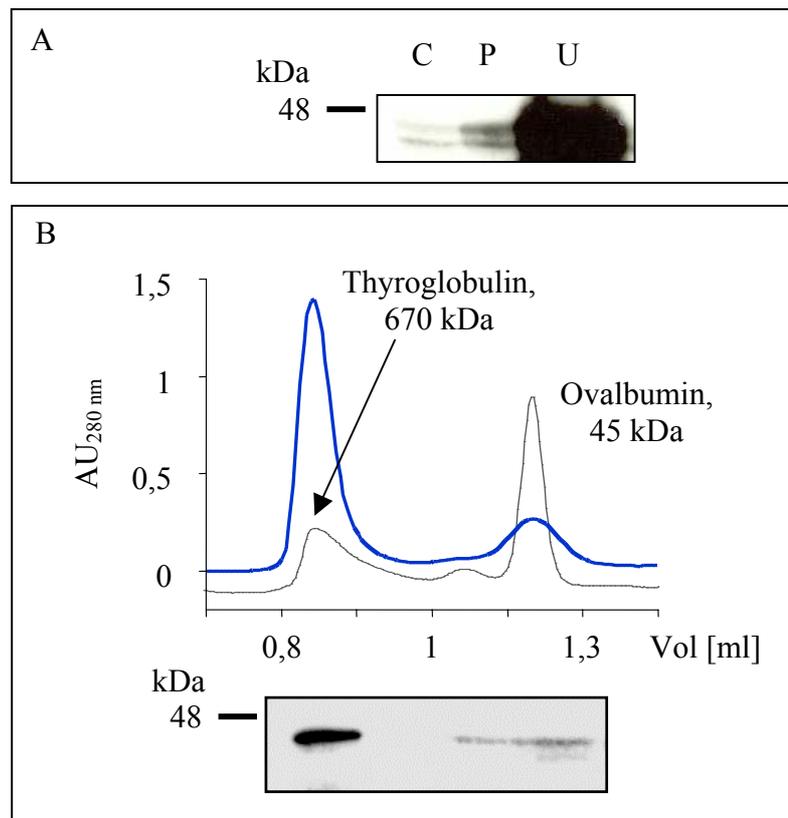


Abb. 10: 1 l TG-1-Zellen wurden als Hauptkultur angeimpft, bei 30°C inkubiert und bei einer OD₅₅₀ von 0,6 (wie vom Hersteller empfohlen) durch Zugabe von 200 µg/l AHT für 4 h induziert, geerntet und sofort aufgeschlossen. (A) Die unlösliche ("U") sowie cyto- ("C") und periplasmatische ("P") Zellfraktion wurden mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. I-Tapasin wurde im Immunoblot mit dem 1E2-Antikörper nachgewiesen. (B) Gelfiltration mit Superose 12 HR 1/30 der Elutionsfraktion (blau) nach der Aufreinigung mittels IMAC und Immunoblot mit 1E2-Antikörper. Als Referenz (grau) für die Gelfiltration diente Thyroglobulin zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule sowie Ovalbumin, welches mit 45 kDa ein ähnliches Elutionsvolumen wie I-Tapasin haben sollte.

Kultur. Monomeres I-Tapasin erschien im Western Blot als Doppelbande. Dies ist vermutlich auf nichtquantitatives Prozessieren der Periplasma-Translokationssequenz zurückzuführen.

5.1.3.3 Inclusion Bodies

Inclusion Bodies oder Einschlusskörper treten oft auf, wenn ein sehr starkes Expressionssystem verwendet wird. Durch die extrem hohe Überexpression des Zielproteins wird der Faltungsapparat der Zelle überfordert. Das führt dazu, dass das heterolog exprimierte Protein aggregiert und Inclusion Bodies bildet. Der Vorteil eines solchen Systems allerdings liegt in den größeren Proteinmengen. Zudem sind die Proteinaggregate für Proteasen unzugänglich und somit vor proteolytischem Abbau geschützt.

Aufgrund der schlechten Ausbeute und der Tatsache, dass der Großteil des l-Tapasin als unlösliche Fraktion im Cytoplasma vorlag, wurde eine Reinigung aus Inclusion Bodies mittels des T7-Systems gewählt. Dabei mussten die Aggregate durch ein denaturierendes Agens gelöst und anschließend rückgefaltet werden, wodurch die Reinigung wesentlich vereinfacht werden sollte. Bei völlig entfaltetem Protein sollte der His₆-Tag frei zugänglich sein. In gefaltetem Protein ist es möglich, dass die Wechselwirkung eines Affinitäts-Tags mit der entsprechenden Matrix konformationsbedingt behindert wird.

Die Solubilisierung der Inclusion Bodies erfolgte auf zwei unterschiedliche Arten: in An- und Abwesenheit eines Reduktionsmittels. Aus den solubilisierten Inclusion Bodies wurde das l-Tapasin mittels IMAC isoliert. Dabei wurden Ausbeuten von 2-5 mg/l Kultur erzielt. Die anschließende Rückfaltung des denaturierten l-Tapasins erfolgte unter verschiedenen Bedingungen. Zum einen wurde ein Kit ("Fold-It-Screen" von Hampton Research) verwendet, zum anderen wurden Protokolle, mit denen bereits andere Proteine mit Immunglobulindomänen erfolgreich rückgefaltet werden konnten, angewandt und modifiziert. Zu den variierten Parametern zählten das gewählte Puffersystem, pH-Wert, Salzkonzentration und GSH:GSSG-Verhältnis als Redox-System. Desweiteren wurde der Einfluss verschiedener Zusätze wie bivalenter Kationen, PEG, DTT, Sucrose, Guanidinium-HCl, Detergenzien und Peptide getestet.

Es stellte sich heraus, dass nach der Aufreinigung und Rückfaltung in Abwesenheit von Detergenz nur Aggregate gebildet wurden, welche durch Zentrifugation bei 40.000 x g für 4 h pelletiert werden konnten. Von den getesteten Detergenzien erwies sich 1 % Digitonin mit einer Ausbeute von 180 µg/l Kultur am effektivsten. Dabei wurde im SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine zweite Bande, welche knapp

unterhalb des vollständig reduzierten l-Tapasin lief, detektiert (Abb. 11A). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Rückfaltung zumindest teilweise erfolgte. Allerdings zeigte sich in der anschließenden Gelfiltration, dass auch das nichtpelletierte l-Tapasin als Aggregat vorlag (Abb. 11B).

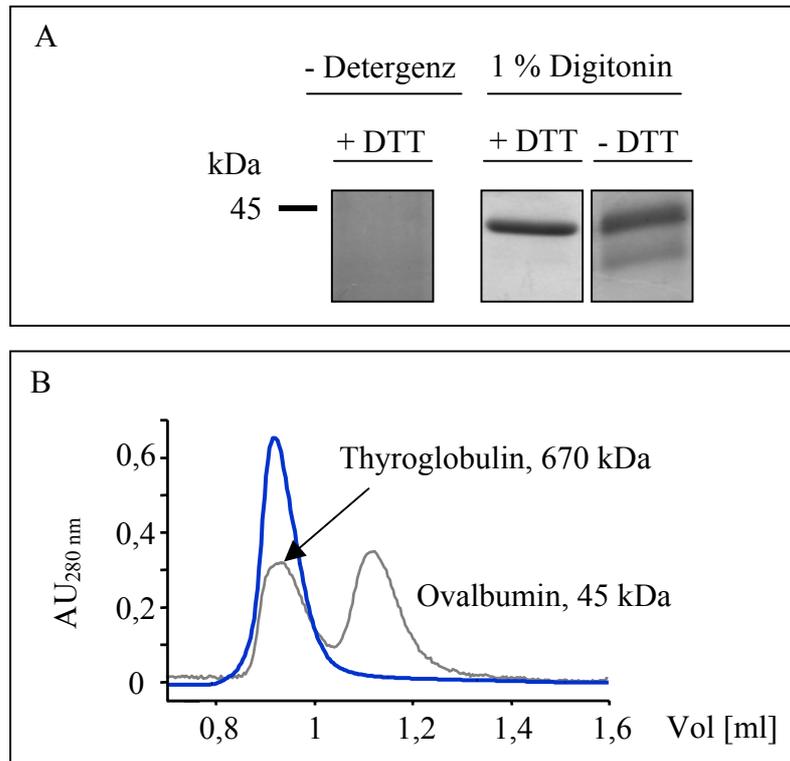


Abb. 11: Inclusion Bodies wurden aus BL21(DE3)-Zellen isoliert und in Solubilisationspuffer C resuspendiert. Nach einer Aufreinigung mittels IMAC erfolgte die Rückfaltung von 50 μ M l-Tapasin in Rückfaltungspuffer durch Inkubation für 48 h bei 4°C. Wenn angegeben enthielt der Ansatz zusätzlich noch 1 % Digitonin. Die Proben wurden ÜN gegen Dialysepuffer dialysiert und 4 h bei 100.000 x g zentrifugiert. (A) Nach TCA/Aceton-Fällung wurden die Proben mittels 12 % SDS-PAGE und Silberfärbung unter reduzierenden (" +DTT") und nicht-reduzierenden Bedingungen (" -DTT") analysiert. (B) Gelfiltration mittels Superdex 75 HR 1/30 des Rückfaltungsansatzes mit 1 % Digitonin (blau). Als Referenz (grau) für die Gelfiltration diente Thyroglobulin zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule sowie Ovalbumin, welches mit 45 kDa ein ähnliches Elutionsvolumen wie l-Tapasin haben sollte.

5.1.3.4 Expression als Fusionsprotein

In allen bisher getesteten Expressionssystemen konnte das l-Tapasin nur in Form von Aggregaten isoliert werden. Aus diesem Grunde wurde das pMAL-System gewählt. In diesem System wird das Zielprotein C-terminal des *E.coli* eigenen Maltose-Bindungsproteins (MBP) als Fusionsprotein exprimiert. Dabei kann die korrekte Faltung des MBP eine korrekte Faltung des Fusionspartners unterstützen und somit die Aggregationstendenz reduzieren.

Die Expression im pMAL-System wurde mit zwei Vektoren durchgeführt, welche das Fusionsprotein im Cytoplasma oder im Periplasma lokalisierten. Da in beiden Fällen identische Resultate erzielt wurden, sind hier exemplarisch nur Ergebnisse der cytoplasmatischen Expression gezeigt.

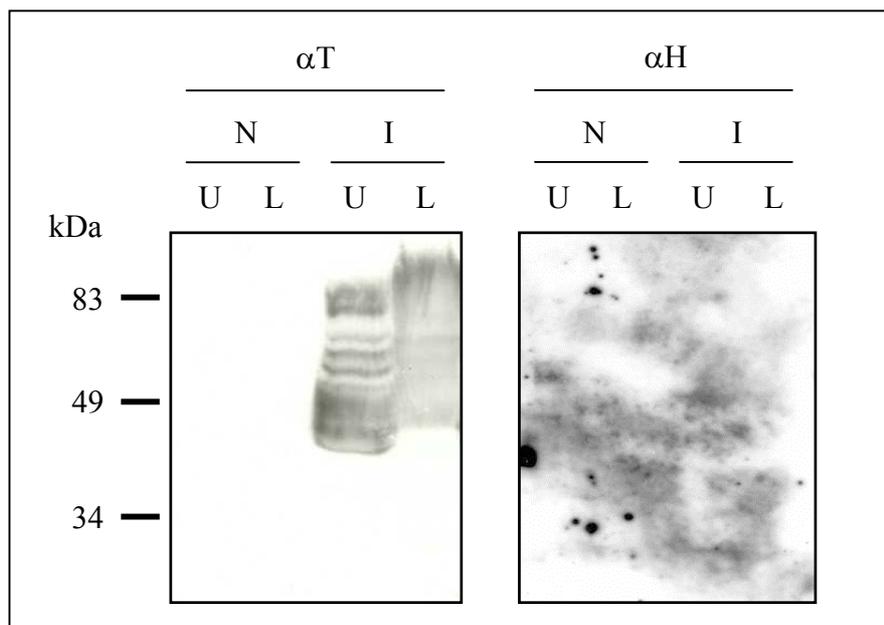


Abb. 12: 15 ml TB1-Zellen wurden als Hauptkultur angeimpft, bei 30°C inkubiert und bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von 0,3 mM IPTG für 3 h induziert. Die unlösliche ("U") und die lösliche ("L") Zellfraktion wurden mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt. l-Tapasin wurde im Immunoblot mit dem 1E2-Antikörper (" αT ") und dem PentaHis-Antikörper (" αH ") nachgewiesen. Als Induktionskontrolle wurde vor der Induktion eine Probe entnommen. Für den Zellaufschluss von induzierten ("I") und nichtinduzierten Zellen ("N") wurden gleiche Zellmengen verwendet.

Nach dem Zellaufschluss wurden die Proteine im SDS-PAGE getrennt und mit α Tapasin- und α HisTag-Antikörpern im Western Blot detektiert (Abb. 12). Ein Antikörper gegen das MBP stand leider nicht zur Verfügung. Mit dem α Tapasin-Antikörper ist sowohl im Pellet (Inclusion Bodies) als auch im Überstand (lösliche Fraktion) ein Muster von mehreren Banden im Bereich von ca. 40 bis 90 kDa zu erkennen. Dagegen konnten mit dem α HisTag-Antikörper selbst bei starker Überexponierung des Films keine Banden nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Fusionsprotein schrittweise vom C-Terminus gespalten wird. Der α Tapasin-Antikörper erkennt das Tapasin so lange, bis sein N-terminales Epitop erreicht ist und nur noch das MBP (41 kDa) selbst übrigbleibt. Zuerst geht dabei der C-terminale His₆-Tag verloren, so dass der α HisTag-Antikörper keinerlei Signale liefert. Diese Vermutung wurde durch Ergebnisse aus IMAC- und Amylose-Resin-Experimenten unterstützt. Versuche, die Degradation durch eine Optimierung der Induktormenge sowie eine frühere Zellernte zu unterdrücken, waren nicht erfolgreich. Ebenfalls konnte durch die Verwendung von Protease-defizienten Stämmen oder den Zusatz von Protease-Inhibitoren keine Verbesserung erzielt werden.

5.1.3.5 pBAD-System in Origami(DE3)-Zellen

Das reduzierende Milieu im Cytosol von *E. coli* wird durch die Aktivität zweier separater Stoffwechselsysteme aufrechterhalten: des Thioredoxin- und des Glutaredoxinsystems. Beide Systeme verwenden NADPH als Reduktionsmittel, arbeiten aber ansonsten unabhängig voneinander und tragen in unterschiedlichem Maße zur Reduktion von spontan gebildeten Disulfidbrücken bei. Das *E. coli*-Cytosol enthält zwei Thioredoxine und drei Glutaredoxine. *In vivo* liegen diese Proteine in reduzierter Form vor. Allerdings konnte in *in vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass sie in ihrer oxidierten Form die Bildung von Disulfidbrücken katalysieren können (Rietsch & Beckwith, 1998; Aslund & Beckwith, 1999). Ein *E. coli*-Stamm, bei dem aufgrund von Mutationen die Reduktion der Thioredoxine und Glutaredoxine unterdrückt war, erwies sich als äußerst effizient in der Bildung von cytosolischen Disulfidbrücken (Bessette *et al.*, 1999). Solche Zellen werden als "Origami(DE3)"-Stämme vertrieben.

Um eine optimale Expression von l-Tapasin im Cytoplasma zu gewährleisten, wurde das pBAD-System gewählt. Dabei ist es möglich, das Transkriptionsniveau des Zielgens durch die Menge an Induktor zu regulieren. Somit kann die Induktormenge evaluiert werden, die zu maximalen Ausbeuten an löslichem Protein im Cytoplasma ohne die Bildung von Inclusion Bodies führt.

In Vorversuchen zur Induktormenge und zum Induktionszeitpunkt lieferten die hier angegebenen Bedingungen die höchsten Ausbeuten an cytoplasmatischem l-Tapasin. Die Aufreinigung mittels IMAC ergab in der Elutionsfraktion neben dem l-Tapasin noch weitere Proteine, welche einer Größe zwischen ca. 30 und 60 kDa entsprachen (Abb. 13A). Diese Proteine wurden im Western Blot weder vom α Tapasin- noch vom α HisTag-Antikörper erkannt (Abb. 13B). Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich bei den Kontaminanten um *E.coli* eigene Proteine und nicht um Degradationsprodukte des l-Tapasin handelte.

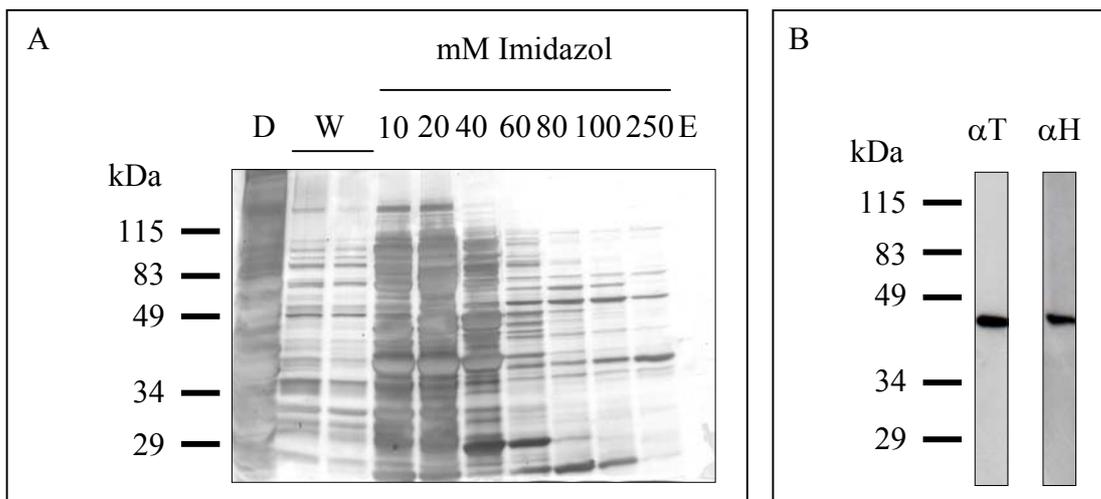


Abb. 13: 4 l Origami (DE3)-Zellen wurden als Hauptkultur angeimpft, bei RT inkubiert und bei einer OD_{600} von 1,2 durch Zugabe von 0,01 % L-Arabinose für 3,5 h induziert. Nach dem Zellaufschluss wurde die cytoplasmatische Zellfraktion für die Reinigung verwendet. Die Reinigungen erfolgten manuell über eine 5 ml Ni-IDA-Säule. (A) 12 % SDS-PAGE und Silberfärbung der aus der 1. IMAC erhaltenen Fraktionen. D = Durchfluss, W = Waschschritt, E = 25 mM EDTA (B) Immunoblot mit 1E2 (" α T")- bzw. PentaHis (" α H")-Antikörper der Elutionsfraktion der 1. IMAC.

Im Folgenden wurden verschiedene Versuche unternommen, um die Kontaminanten vom l-Tapasin zu trennen. Am effektivsten erwies sich dabei eine zweite IMAC

(Abb. 14A). Die kontaminierenden Proteine eluierten größtenteils schon bei 40 mM Imidazol, während der Hauptteil an l-Tapasin erst bei 250 mM Imidazol eluierte.

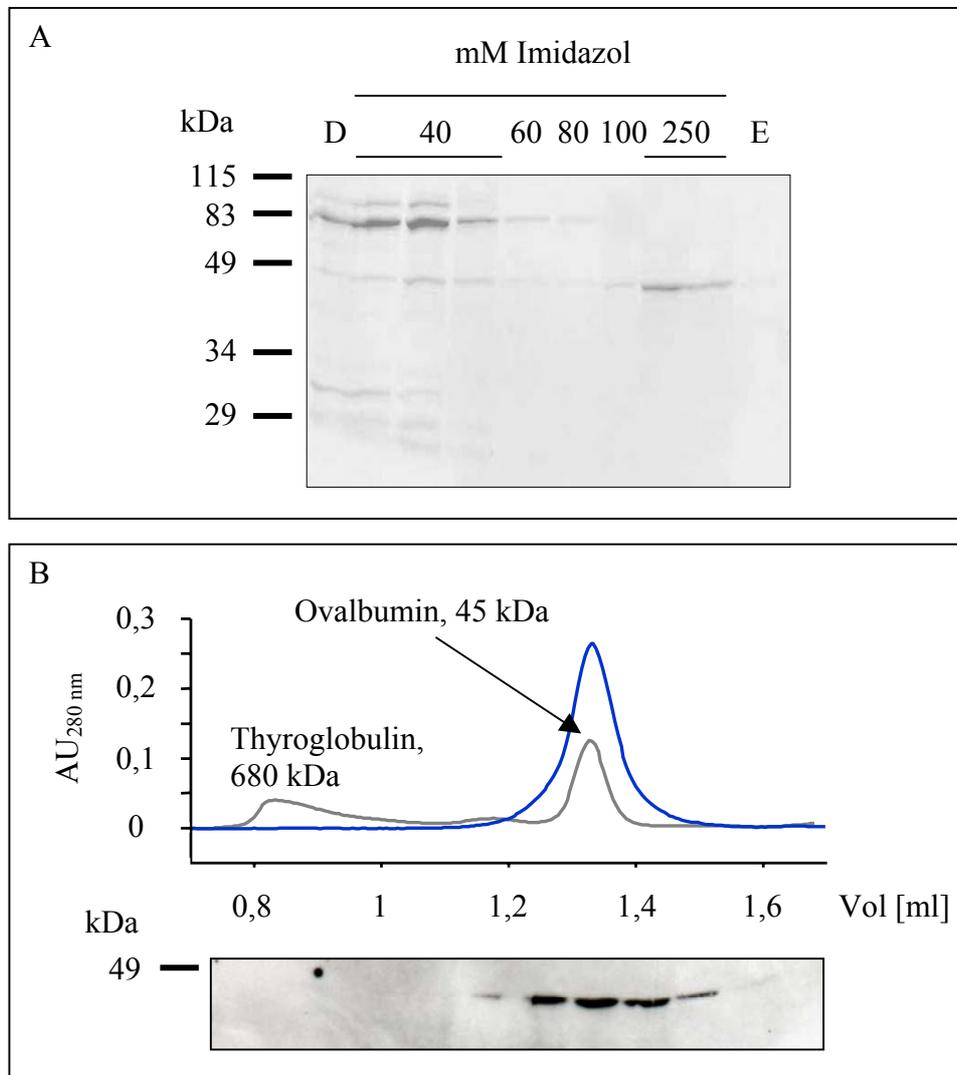


Abb. 14: Die Elutionsfraktion der 1. IMAC wurde ÜN gegen 50 mM NaP, 100 mM NaCl, pH 8,0 dialysiert. Nach Zugabe von 5 mM Imidazol wurde eine 2. IMAC analog zu der in Abb. 13 gezeigten durchgeführt. (A) Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels 15 % SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. D = Durchfluss, E = 25 mM EDTA (B) Gelfiltration der Elutionsfraktion (blau) der 2. IMAC mit Superose 12 HR 1/30 und Immunoblot der Gelfiltrationsfraktionen mit 1E2-Antikörper. Als Referenz (grau) für die Gelfiltration diente Thyroglobulin zur Bestimmung des Ausschlussvolumens der Säule sowie Ovalbumin, welches mit 45 kDa ein ähnliches Elutionsvolumen wie l-Tapasin haben sollte

In einer Gelfiltration zeigte sich, dass die Elutionsfraktion der 2. IMAC keinerlei Aggregate enthielt (Abb. 14B). Die Ausbeuten an gereinigtem, monomerem Protein

lagen bei 150 µg/l Kultur. Dabei waren die Verluste an I-Tapasin vor allem bei der 1. IMAC sehr hoch. Sie wurden noch stärker, wenn die Säule vor der Elution mit größerem Puffervolumen gewaschen wurde. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt generiert, welches einen His-Tag bestehend aus 10 Histidinen trug und deshalb stärker an die Matrix binden sollte. Dies führte allerdings zu keiner Veränderung des Reinigungsprofils.

5.1.4 Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie von I-Tapasin

Mit Hilfe der Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie (CD) können Sekundärstrukturmerkmale wie α -Helix, β -Faltblatt und ungeordnete Strukturen eines Proteins in Lösung anteilig bestimmt werden. Dabei wird die optische Aktivität im fernen UV-Bereich (170 – 250 nm) gemessen. Diese Methode basiert darauf, dass optisch aktive Moleküle aufgrund ihrer Asymmetrie unterschiedliche Refraktärindizes und molare Absorptionskoeffizienten für links- und rechtspolarisiertes Licht besitzen. Trifft linear polarisiertes Licht (also die Überlagerung von links- und rechtspolarisiertem Licht gleicher Amplitude) auf eine optisch aktive Substanz, wird eine der beiden Lichtkomponenten aufgrund des unterschiedlichen Refraktärindex stärker gebremst als die andere. Somit kommt es zu einer Phasenverschiebung der beiden Wellen, wodurch der Lichtstrahl in einem anderen Winkel ausgestrahlt wird als er eingestrahlt wurde. Aus dieser Rotation sowie der Absorptiondifferenz zwischen rechts- und linkspolarisiertem Licht ergibt sich ein für das entsprechende Protein unter den gewählten Bedingungen charakteristisches Spektrum. Durch den Vergleich mit CD-Spektren von Proteinen bekannter Struktur können Sekundärstrukturmerkmale des untersuchten Proteins anteilig bestimmt werden.

Mittels Zirkular Dichroismus (CD)-Spektroskopie sollte überprüft werden, ob das I-Tapasin, welches als Monomer aus Origami(DE3)-Zellen gereinigt wurde, in einer spezifischen Faltung vorlag. Dabei wurden zunächst Messungen bei 4°C für den gefalteten Zustand sowie 80°C für den entfalteten Zustand durchgeführt.

Die Messung bei 4°C ergab einen α -helikalen Anteil von 17,9 %, einen β -Faltblatt-Anteil von 54,7 % (parallel 5,3 %, antiparallel 29,6 %, Turn 19,8 %) und einen ungefalteten Anteil von 31,6 %. Ein Vergleich der Spektren bei 4°C und 80°C zeigte

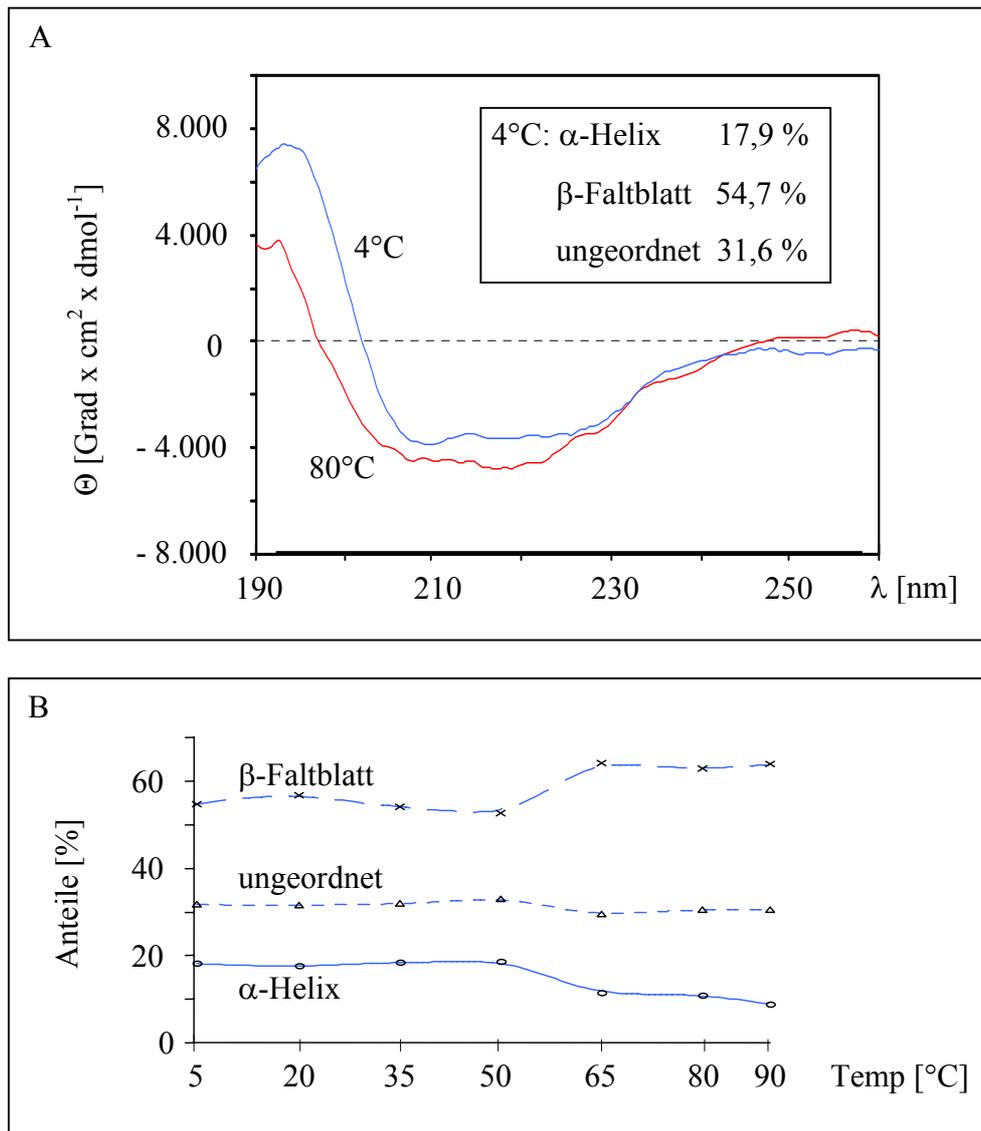


Abb. 15: Aufgereinigtes l-Tapasin wurde dreimal gegen CD-Puffer dialysiert und auf eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Zur Auswertung wurden 5 Spektren gemittelt, wobei jeweils das CD-Puffer-Spektrum als Hintergrund subtrahiert wurde. (A) CD-Spektren von 190 bis 260 nm bei 4°C und 80°C sowie die Sekundärstrukturverteilung bei 4°C. (B) Sekundärstrukturverteilung zwischen 5°C und 90°C.

eine Umorganisation der Sekundärstruktur, was auf eine Konformationsänderung aufgrund der Hitzedenaturierung hindeutete (Abb. 15A). Aus diesem Grund wurden Spektren in Intervallen von 15°C aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass l-Tapasin in seiner Sekundärstruktur bis 50°C stabil ist. Die Umorganisation findet zwischen 50°C und 65°C statt (Abb. 15B). Dabei steigt der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen, während sich der Anteil an α -Helix und in geringerem Maße auch der ungefaltete Anteil

verringert. Zwischen 65°C und 90°C finden keine weiteren Veränderungen der Sekundärstruktur statt.

5.2 Expression, Isolation und funktionale Rückfaltung des MHC-Klasse I-Moleküls HLA-B*2705

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten MHC-Klasse I-Molekül handelte es sich um das HLA-B*2705-Allel. Im Folgenden wird der trimere Komplex bestehend aus schwerer Kette (HC), β_2 -Mikroglobulin (β_2m) und Peptid als "HLA-B*2705" bezeichnet. Der Begriff "leeres" oder "unbeladenes" HLA-B*2705 kennzeichnet den dimeren Komplex bestehend aus schwerer Kette und β_2m in Abwesenheit von Peptid. In Bezug auf die schwere Kette ohne β_2m und Peptid wird die Bezeichnung "HLA-B*2705-HC" verwendet.

5.2.1 Schwere Kette des HLA-B*2705 (HLA-B*2705-HC)

Als Grundlage für die Arbeiten mit der schweren Kette von HLA-B*2705 diente das Konstrukt pET-24(+)-HLA-B*2705-HC. Dabei wurde die codierende Region für die Aminosäuren 1 bis 274 durch PCR amplifiziert und mittels *NdeI/XhoI*-Verdau in den Vektor pET-24a(+) inseriert. Beim heterolog exprimierten Protein waren die Signalsequenz sowie die Transmembrandomäne deletiert. N-terminal war ein His₆-Tag fusioniert. Das theoretische Molekulargewicht des löslichen Proteins betrug 33 kDa.

5.2.1.1 Expression und Isolation von HLA-B*2705-HC

Die Expression erfolgte in BL21(DE3)-Zellen. Nach dem Zellaufschluss und der Isolierung von Inclusion Bodies wurde die denaturierte HLA-B*2705-HC mittels IMAC in Anwesenheit von Urea aufgereinigt.

Durch zwei Waschschriffe mit 30 und 60 mM Imidazol wurden Proteine, die unspezifisch an das IDA-Material gebunden waren, entfernt. Die HLA-B*2705-HC wurde mit 250 mM Imidazol eluiert (Abb. 16). Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels Millipore Ultrafree 15-Konzentratoren auf mindestens 1,5 mg/ml eingestellt. Die Ausbeute betrug 4 mg/l Kultur.

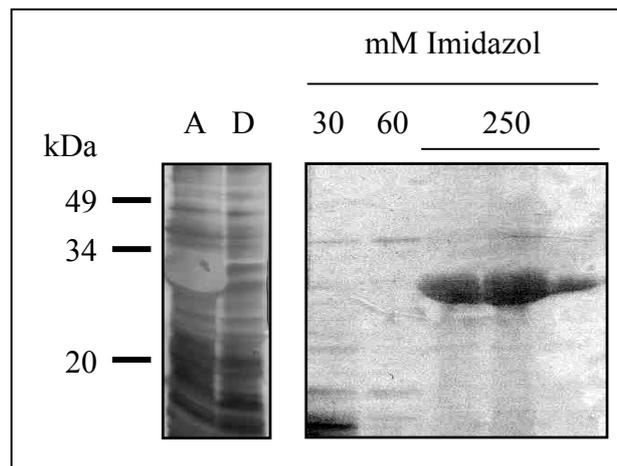


Abb. 16: 2 l BL21(DE3)-Zellen wurden als Hauptkultur angeimpft, bei 37°C inkubiert und bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von 0,25 mM IPTG für 3,5 h induziert. Der Zellaufschluss und die Solubilisierung der Inclusion Bodies erfolgte durch Zugabe von 8 M Urea und Rühren bei RT. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde für die Reinigung mittels einer 5 ml Ni-IDA-Säule verwendet. (A) 12 % SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der aus der IMAC erhaltenen Fraktionen. A = Auftrag, D = Durchfluss

5.2.2 β_2 -Mikroglobulin

Als Grundlage für die Arbeiten mit β_2 -Mikroglobulin (β_2m) diente das Konstrukt pET-15b- β_2m . Dabei wurde die codierende Region durch PCR amplifiziert und mittels *NdeI/BamHI*-Verdau in den Vektor pET-15b inseriert. Beim heterolog exprimierten Protein war die Signalsequenz deletiert. N-terminal waren eine Thrombin-Schnittstelle und ein His₆-Tag eingeführt. Das theoretische Molekulargewicht des rekombinanten β_2m betrug 14 kDa.

5.2.2.1 Expression und Isolation von β_2m

Die Expression erfolgte in BL21(DE3)-Zellen. Nach dem Zellaufschluss und der Isolierung von Inclusion Bodies wurde das denaturierte β_2m durch IMAC in Anwesenheit von Urea aufgereinigt.

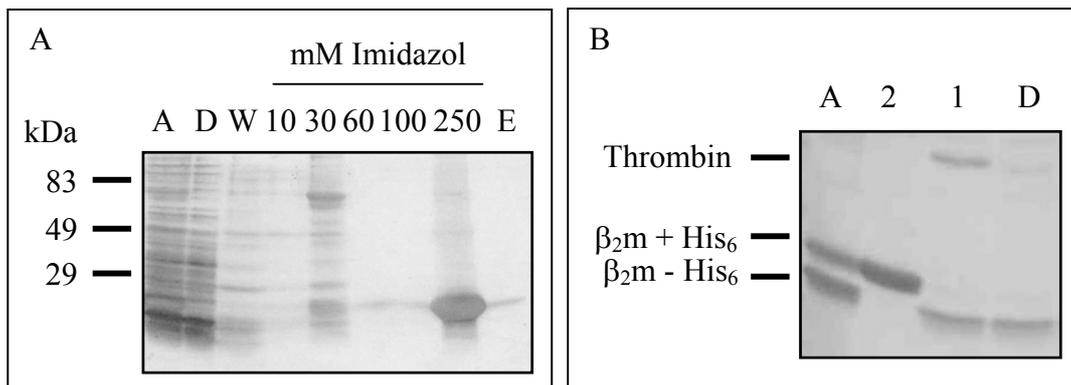


Abb. 17: 2 l BL21(DE3)-Zellen wurden als Hauptkultur angeimpft, bei 37°C inkubiert und bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von 0,25 mM IPTG für 3,5 h induziert. Der Zellaufschluss und die Solubilisierung der Inclusion Bodies erfolgte durch Zugabe von 8 M Urea und Rühren bei RT. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde für die Reinigung mittels einer 5 ml Ni-IDA-Säule verwendet. Der Elutionsfraktion der IMAC wurden 2,5 mM $CaCl_2$ und 40 U/ml Thrombin zugesetzt. Die Thrombinspaltung wurde ÜN bei 4°C inkubiert und durch Anionenaustauschchromatographie analysiert (A) 15 % SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der aus der IMAC erhaltenen Fraktionen. (B) 15 % SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der aus der Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Fraktionen. A = Auftrag, D = Durchfluss, W = Waschschrift, E = 25 mM EDTA, 1 = 1. Peak, 2 = 2. Peak

Durch mehrere Waschschrte wurden Proteine, die unspezifisch an das IDA-Material gebunden waren, entfernt. Das β_2m wurde mit 250 mM Imidazol eluiert (Abb. 17A). Im anschließenden Thrombin-Verdau wurde der His₆-Tag entfernt. Die Trennung von β_2m und Thrombin erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie. Dabei wurden drei proteinhaltige Fraktionen erhalten: der Durchfluss sowie zwei separate Peaks während der Elution durch einen Salzgradienten (Abb. 17B). Durch Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE konnte festgestellt werden, dass die Abspaltung des Affinitätstags nicht vollständig war und die β_2m -Lösung als heterogenes Gemisch vorlag. Allerdings war es möglich, die beiden β_2m -Populationen zu trennen. Während β_2m mit His₆-Tag quantitativ an das Säulenmaterial gebunden wurde, befand sich gespaltenes Protein

größtenteils im Durchfluss. Ein Teil eluierte gleichzeitig mit Thrombin, weshalb diese Fraktionen verworfen wurden. Mittels Millipore Ultrafree 15-Konzentratoren wurde der Durchfluss auf mindestens 3 mg/ml konzentriert. Die Ausbeute betrug 6 mg/l Kultur.

5.2.3 Rückfaltung zum trimeren HLA-B*2705-Komplex

Assemblierte MHC-Klasse I-Moleküle bestehen aus einer schweren Kette, dem β_2 -Mikroglobulin und dem antigenen Peptid. Die in dieser Arbeit verwendeten MHC-Klasse I-Moleküle wurden durch Rückfaltung der aufgereinigten Komponenten gewonnen. Als Peptid wurde die Sequenz H-Arg-Arg-Tyr-Gln-Lys-Ser-Thr-Glu-Leu-OH (RRYQKSTEL) gewählt. Diese Sequenz konnte aus nativen HLA-B*2705-Molekülen auf der Oberfläche von B-Zellen isoliert werden und stellt somit ein natürliches, hochaffin bindendes Peptid dar. Es stammt aus dem Histon H3.3 (Rammensee *et al.*, 1995). Da für folgende Experimente eine Fluoreszenz-Detektion des HLA-B*2705 wichtig war, wurden die Rückfaltungen mit einem Gemisch aus unmarkiertem RRYQKSTEL und Fluoreszein-markiertem Peptid, jeweils im Verhältnis 20:1, durchgeführt. Bei dem markierten Peptid handelte es sich um RRYCKSTEL, wobei das Cystein mit Iodacetamid-Fluoreszein gekoppelt wurde. Dieser Cysteinbaustein wird im weiteren Verlauf der Arbeit als \emptyset bezeichnet. RRY \emptyset KSTEL wurde gewählt, weil sich das Fluoreszein-Molekül an Position vier im Peptid befand. Die Röntgenstrukturanalyse von HLA-B*2705, welches mit RRYQKSTEL assoziiert ist, ergab, dass die Seitenkette des Glutamins aus der Bindungstasche herausragt (Madden *et al.*, 1992). Daher kann eine sterische Behinderung der Peptidassoziation durch das Fluoreszein ausgeschlossen werden. Ausserdem war durch die Modifikation des Peptids keiner der für eine stabile Bindung kritischen Ankerreste betroffen. Somit sollte die Rückfaltungseffizienz oder die Stabilität des HLA-B*2705 nicht beeinflusst werden.

Das Chromatogramm lieferte bei einer Absorption von 280 nm vier Proteinpeaks sowie zwei Peptidpeaks bei einer Absorption von 492 nm (Abb. 18A). Wie im SDS-PAGE deutlich wurde, entsprechen die ersten beiden Peaks HLA-B*2705-HC-Aggregaten. Der Peak bei 17 ml enthielt ausschließlich β_2 m. Assemblierte MHC-Klasse I-Moleküle, bestehend aus HLA-B*2705-HC, β_2 m sowie Fluoreszenz-markiertem Peptid, eluierten

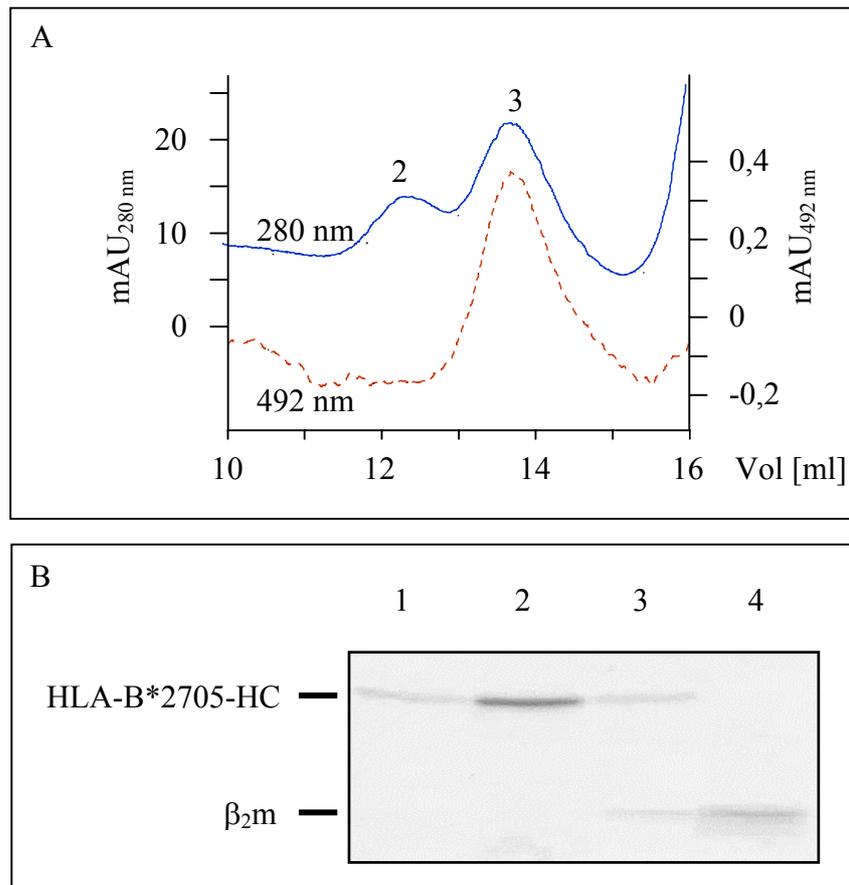


Abb. 18: 10 μM HLA-B*2705-HC, 20 μM $\beta_2\text{m}$, 100 μM RRYQKSTEL und 5 μM RRYØKSTEL wurden gemischt und gegen Rückfaltungspuffer 48 h bei 4°C dialysiert. Nach einem Ultrazentrifugationsschritt wurde der Ansatz auf ein Volumen von höchstens 500 μl konzentriert. Die Analyse erfolgte durch (A) Gelfiltration mittels HiLoad Superdex 200 prep grade sowie (B) SDS-PAGE der erhaltenen Fraktionen und Coomassie-Färbung. 1 = 1. Peak, 2 = 2. Peak, 3 = 3. Peak, 4 = 4. Peak

bei ca. 14,5 ml (Abb. 18B). Dabei wurde eine Ausbeute von ca. 30 μg assembliertem trimerem HLA-B*2705/ml Rückfaltungsansatz erhalten. Dies entspricht einer Rückfaltungseffizienz von ca. 10 %.

5.2.4 Funktionstest des rückgefalteten HLA-B*2705

Eine Methode zur Überprüfung der Funktionalität von isolierten MHC-Klasse I-Molekülen ist der sog. "pH-Sprung" (Shields *et al.*, 1998), welcher ebenfalls zur Herstellung von leeren MHC-Molekülen verwendet wird. Dabei wird der Proteinkomplex für kurze Zeit auf pH 3 gebracht und anschließend wieder auf pH 7-8 zurücktitriert. Die so behandelten MHC-Moleküle werden in ihrer Struktur gerade so stark destabilisiert, dass das Peptid die Bindungstasche verlässt. Andererseits bleibt der HC- β_2m -Komplex kurzzeitig als Dimer stabil und kann anschließend wieder mit Peptid reassoziieren.

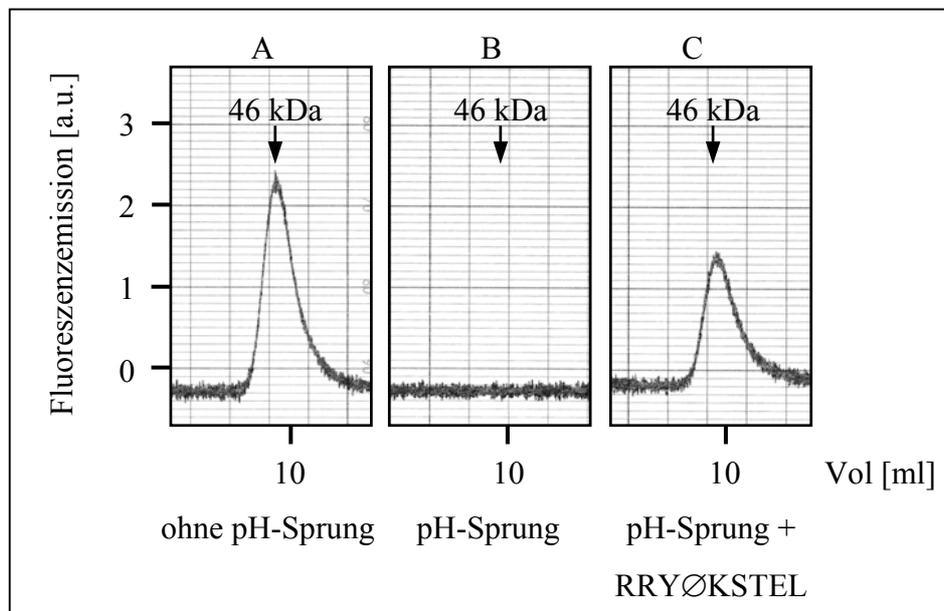


Abb. 19: 2 μg HLA-B*2705 wurden in 100 μl Volumen mit 1,25 μl 1 M Zitronensäure versetzt, 2 min auf Eis inkubiert und mit 6,4 μl 1 M Tris gemischt. 20 μl der Lösung wurden durch Gelfiltration mittels TOSOH Biosep TSK-G 3000 Säule aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Exzitation bei 485 nm und durch Emission bei 520 nm. Die in der Abbildung gezeigten Chromatogramme repräsentieren das Fluoreszenzsignal des trimeren HLA-B*2705. (A) Als Kontrolle dienten 20 μl derselben Probe vor dem pH-Sprung. (B) Messung nach dem pH-Sprung. (C) Messung nach dem pH-Sprung und anschließender Inkubation mit einem 2.000 fachen Überschuss RRYØKSTEL für 2 h bei RT.

In dieser Arbeit wurde eine Gelfiltration gekoppelt mit Fluoreszenz-Detektion des Reporterpeptids zur Auswertung verwendet. Da die Rückfaltung in Anwesenheit von Fluoreszenz-markiertem Peptid stattfand, konnte anhand der Position des

Fluoreszenzsignals einer unbehandelten Probe das Elutionsvolumen für HLA-B*2705 ermittelt werden. Nach dem pH-Sprung wurden freies Peptid und das HC- β_2 m-Dimer durch die Gelfiltration getrennt, so dass der HC- β_2 m-Komplex aufgrund des Fehlens von Peptid kein Fluoreszenzsignal mehr lieferte.

Wie erwartet lieferte HLA-B*2705 vor dem pH-Sprung ein deutliches Fluoreszenzsignal bei einem Elutionsvolumen V_e von ca. 10 ml, was gut mit dem berechneten Molekulargewicht des trimeren HLA-B*2705-Komplexes von 46 kDa korrelierte (Abb. 19A). Nach dem pH-Sprung konnte selbst bei maximaler Detektionsempfindlichkeit kein Signal erhalten werden (Abb. 19B). Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Probe direkt nach dem pH-Sprung analysiert oder erst noch 1 h auf Eis inkubiert wurde (nicht gezeigt). Die Funktionalität des leeren Komplexes konnte durch Inkubation mit einem Überschuss an Fluoreszenz-markiertem Peptid gezeigt werden. Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal zeigt, dass der peptidfreie Komplex nach dem pH-Sprung in der Lage ist, erneut mit Peptid zu assoziieren (Abb. 19C).

5.3 Wechselwirkung zwischen I-Tapasin und HLA-B*2705

5.3.1 Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie (SPR)

Eine häufig verwendete Methode für die Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen ist die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR). Dabei wird ein Interaktionspartner auf einer Chip-Oberfläche immobilisiert, während der zweite Interaktionspartner unter Fluss über die Oberfläche geleitet wird.

Die SPR-Technik beruht auf dem Phänomen der totalen internen Reflexion sowie der Anregung von Oberflächenplasmonen. An der Grenzfläche zweier optisch unterschiedlicher Medien wird ein Lichtstrahl totalreflektiert, wenn er oberhalb eines Grenzwinkels eingestrahlt wird. Dabei dringt eine elektromagnetische Welle bis zu einer Tiefe von ca. 100 nm in das optisch dünnere Medium ein. Eine solche evaneszente Welle zerfällt exponentiell mit dem Abstand von der Grenzoberfläche.

Oberflächen-Plasmonen-Resonanz tritt auf, wenn die Grenzfläche von zwei optisch verschiedenene Medien mit einer dünnen Schicht leitenden Metalls beschichtet ist. Sie basiert darauf, dass Licht an dieser Metalloberfläche kollektive Schwingungen der Elektronen, sog. Plasmonen, erzeugt. Diese Schwingungen absorbieren einen Teil der eingestrahnten Lichtenergie, was zu einer charakteristischen Erniedrigung des reflektierten Lichts führt. Die Intensitätsverringerng ist vom eingestrahnten Lichtwinkel, dem sog. Resonanzwinkel, abhängig. Ändert sich nun der Brechungsindex eines Mediums, verschiebt sich der Resonanzwinkel. Diese Winkelverschiebung kann als Resonanzsignal gemessen werden. Da verschiedene Proteine sehr ähnliche Brechungsindices besitzen, ist eine Veränderung des Brechungsindexes einer Proteinlösung direkt auf eine Konzentrationsänderung übertragbar. Aufgrund der geringen Eindringtiefe der evaneszenten Welle repräsentiert das Resonanzsignal eine Konzentrationsänderung unmittelbar auf der Chipoberfläche. Somit stellt die SPR-Technik letztlich einen Massendetektor dar.

Bei den hier dargestellten Experimenten sollte untersucht werden, ob das aus *E. coli* isolierte I-Tapasin mit rückgefaltetem HLA-B*2705 interagiert (Abb. 20). Dazu wurden beladene und leere HLA-B*2705-Moleküle, welche mittels des in Abschnitt 4.6.12 beschriebenen pH-Sprungs generiert wurden, auf einem Chip immobilisiert. Anschließend wurde I-Tapasin über die Chipoberfläche geleitet. Die Messungen wurden mit einem NTA-Sensor-Chip durchgeführt. Dabei besteht die Chipoberfläche aus NTA-Gruppen, so dass nach einer Beladung mit zweiwertigen Kationen (in dieser Arbeit wurde Ni^{2+} verwendet) Histidin-affinitätsmarkierte Proteine immobilisiert werden können. Das hat den Vorteil, dass die Proteine eine einheitliche Anordnung besitzen. Im Falle von HLA-B*2705 erfolgt die Immobilisierung über den C-terminalen His₆-Tag, während der N-terminale Bereich der Peptidbindungstasche von der Chipoberfläche abgewandt ist. Somit kann die I-Tapasin-HLA-B*2705-Wechselwirkung ohne sterische Restriktionen durch die Chipoberfläche stattfinden.

Es stellte sich heraus, dass I-Tapasin an leere HLA-B*2705-Moleküle bindet. Bei beladenem HLA-B*2705 konnte in diesen Experimenten aufgrund der starken Bindung des His₆-Tags am C-Terminus von I-Tapasin an die NTA-Gruppen der Chipoberfläche keine Wechselwirkung detektiert werden. Quantitative oder kinetische Aussagen dieser peptidabhängigen Assoziation waren ebenfalls aufgrund der starken Bindung von I-Tapasin an die Chipoberfläche nicht möglich. Bei den Experimenten mit leerem HLA-

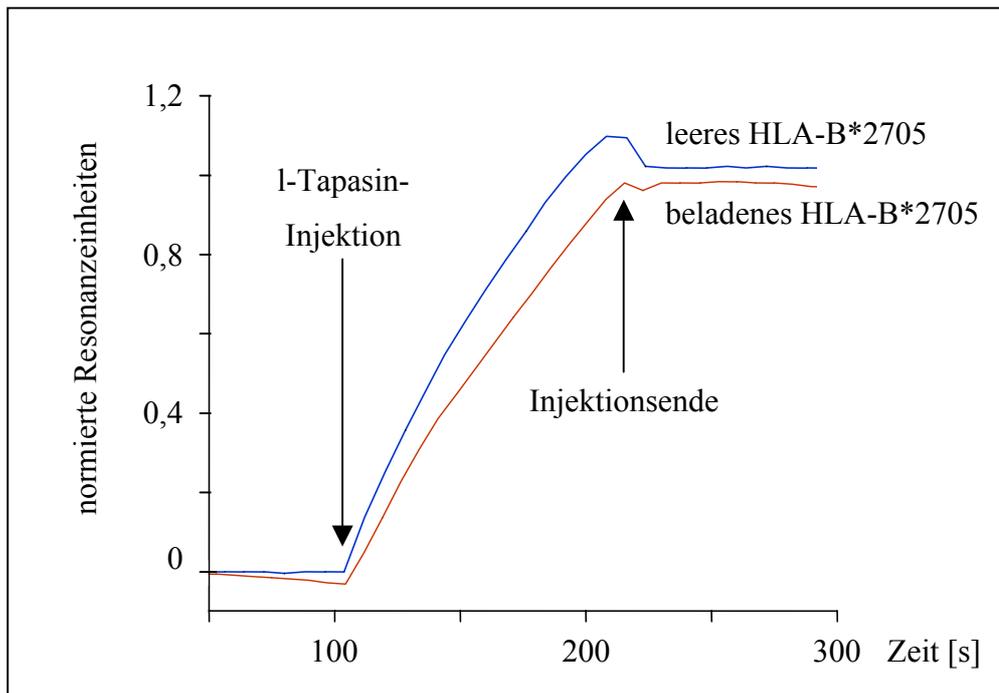


Abb. 20: Rückgefaltetes HLA-B*2705 wurde auf eine Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ eingestellt und auf zwei Aliquots verteilt. Bei einem Aliquot wurde das gebundene Peptid mittels pH-Sprung (Kapitel 4.6.12) aus dem HLA-B*2705 entfernt. Das andere Aliquot blieb unbehandelt. $20 \mu\text{l}$ beider Lösungen wurden auf einem NTA-Sensor-Chip immobilisiert. Nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurden $20 \mu\text{l}$ $0,5 \mu\text{M}$ I-Tapasin bei einem Fluss von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ über die Chip-Oberfläche geleitet. Die Normierung der Resonanzeinheiten erfolgte durch Subtraktion der pufferbedingten Brechungsindexänderung sowie unter Einbeziehung der Proteinkonzentration.

B*2705 war mehr als 90 % des gebundenen I-Tapasins über die His₆-Tag-NTA-Wechselwirkung assoziiert. Diese Wechselwirkung ist sehr stabil und unterliegt einer sehr langsamen Dissoziationsratenkonstante, was zunächst zu einem stabilen Signal führt. Dies ergab sich aus Vorexperimenten mit I-Tapasin und HLA-B*2705 (nicht gezeigt) und wird in Abb. 20 durch das stabile Plateau nach Injektionsende wiedergegeben. Die Kurve von I-Tapasin an leeres HLA-B*2705 beinhaltet aber noch eine zweite Bindungskomponente. Diese zeigt eine Dissoziationsratenkonstante, die sehr schnell auf das Niveau der His₆-Tag-NTA-Wechselwirkung abfällt. Da sie nicht auftritt, wenn beladenes HLA-B*2705 immobilisiert wurde, kann es sich dabei nur um eine Assoziation von I-Tapasin mit leerem HLA-B*2705 handeln. Diese qualitative Aussage wurde in fünf unabhängigen Experimenten bestätigt.

Daraufhin wurden verschiedene Strategien zur Eliminierung oder Reduktion der His₆-Tag-NTA-Wechselwirkung von I-Tapasin verfolgt. Versuche, den His₆-Tag mittels

Carboxypeptidase zu entfernen, waren leider nicht erfolgreich. Ebenfalls zeigte ein wiederholtes Injizieren von HLA-B*2705, was zum quantitativen Absättigen der freien NTA-Gruppen auf der Chipoberfläche führen sollte, keine Verbesserung. Auch die Verwendung von imidazolhaltigem Laufpuffer konnte die His₆-Tag vermittelte Assoziation von I-Tapasin an die Chipoberfläche nicht reduzieren, ohne dass die Immobilisierung des HLA-B*2705 beeinträchtigt wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines Chips mit anderer Oberfläche gewesen. BIAcore bietet verschiedene andere Chipoberflächen an, bei denen Proteine über primäre Aminogruppen immobilisiert werden können. Allerdings ist es dabei nicht möglich, Proteine in einer bestimmten Orientierung anzuordnen. Die Bindung erfolgt meist an mehreren Stellen des zu immobilisierenden Proteins, was eine statistische Verteilung des HLA-B*2705 auf der Oberfläche bewirkt. Somit könnten entscheidende Bereiche für das I-Tapasin schlechter oder gar nicht mehr zugänglich sein, was quantitative Aussagen über die Wechselwirkung mit I-Tapasin oder eine kinetische Auswertung ebenfalls unmöglich macht.

Der kurze Abfall des Signals am Injektionsende, welcher in der Kurve mit beladenem HLA-B*2705 besonders deutlich zu sehen ist, kam durch das kurze Stoppen und erneute Starten der Gerätepumpe zustande und war bei sämtlichen Messungen zu beobachten.

5.3.2 Fluoreszenz-gekoppelte Gelfiltration

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden mit der in Kapitel 5.2.4 dargestellten Anordnung einer Gelfiltration mit anschließender Fluoreszenzdetektion des Reporterpeptids durchgeführt.

5.3.2.1 Peptidaustausch

Ziel dieser Messungen war es, den Einfluss von Tapasin auf den Austausch von bereits gebundenem Peptid in der MHC-Bindungstasche zu verfolgen. Hierzu wurden in Anwesenheit von Fluoreszenz-markiertem Peptid rückgefaltete HLA-B*2705-Moleküle

mit einem Überschuss an unmarkiertem Peptid über einen bestimmten Zeitraum mit und ohne I-Tapasin inkubiert. I-Tapasin wurde dabei in äquimolaren Mengen zum HLA-B*2705 zugegeben. Unmarkiertes Peptid wurde in einem 400 fachen Überschuss in Bezug auf die Menge an Peptid, welches in der Bindungstasche des HLA-B*2705 gebunden vorlag, zugesetzt².

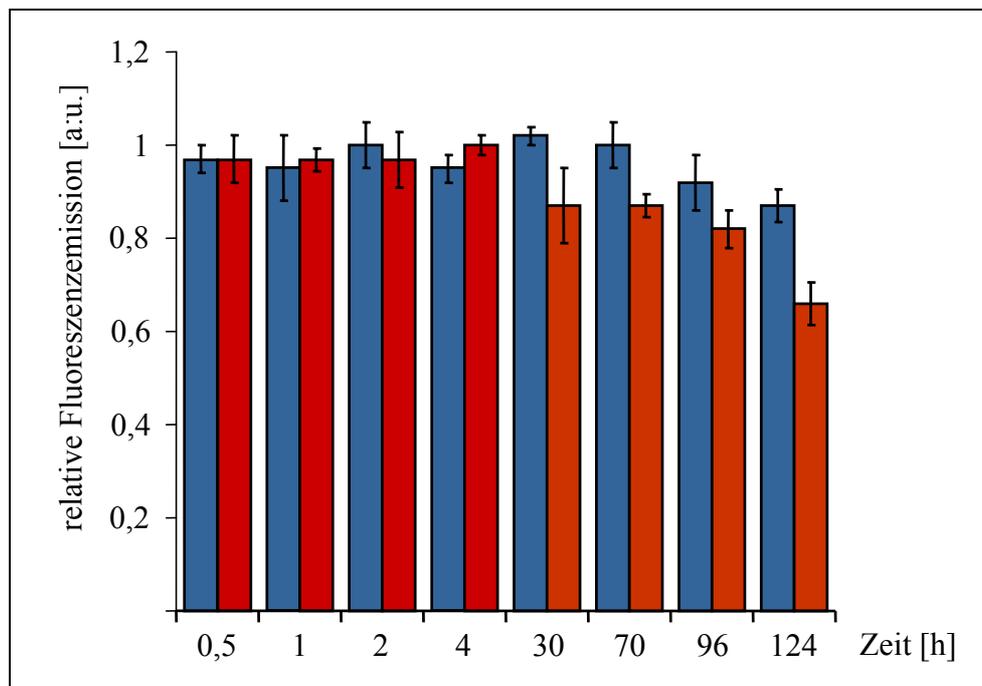


Abb. 21: 0,5 μM HLA-B*2705 wurde mit 5 μM RRYQKSTEL und entweder 0,5 μM I-Tapasin (blau) oder Puffer (rot) vermischt und bei RT inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils Proben entnommen und durch Gelfiltration mittels TOSOH Biosep TSK-G 3000 Säule mit vorgeschalteter TSK Guard Säule analysiert. Die Detektion erfolgte durch Exzitation bei 485 nm und durch Emission bei 520 nm. Das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde als Bezugspunkt für die folgenden Werte gleich 1 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen.

Aus dem in Abb. 21 dargestellten Experiment geht hervor, dass das rückgefaltete HLA-B*2705 bis zu 4 h stabil ist. Erst ab 30 h beginnen die Fluoreszenzsignale abzunehmen. Nach fünf Tagen haben aber immer noch 66% der MHC-Moleküle ihr ursprüngliches Peptid gebunden. Durch Zugabe von I-Tapasin wird die Stabilität des Komplexes

² Im assemblierten HLA-B*2705-Komplex liegen HLA-B*2705-HC, $\beta_2\text{m}$ und Peptid im Verhältnis 1:1:1 vor. Aufgrund des bekannten Molekulargewichtes der Komplexuntereinheiten kann die Konzentration der einzelnen Komponenten berechnet werden. In der hier verwendeten 0,5 μM HLA-B*2705-Lösung ergab sich für das Peptid eine Konzentration von 12,5 nM. Somit stellt die Zugabe von 5 μM Peptid einen 400 fachen Überschuss dar.

erhöht. In Anwesenheit von I-Tapasin ist das HLA-B*2705 auch nach drei Tagen noch stabil. Erst am fünften Tag kann eine deutliche Abnahme registriert werden, wobei aber immer noch 87 % der Komplexe mit dem ursprünglich gebundenen Peptid assoziiert sind. Somit konnte gezeigt werden, dass die Dissoziationsrate für das Peptid durch Tapasin erniedrigt wird und infolgedessen auch optimal beladene HLA-B*2705-Moleküle durch Tapasin stabilisiert werden.

5.3.2.2 Peptidreassoziatio

Ziel dieser Messungen war es, den Einfluss von Tapasin bei der Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen zu verfolgen. Hierzu wurden leere HLA-B*2705-Moleküle mittels des in Kapitel 4.6.12 beschriebenen pH-Sprungs generiert und mit einem Überschuss an Fluoreszenz-markiertem Peptid mit und ohne I-Tapasin inkubiert. Das I-Tapasin wurde dabei in äquimolaren Mengen zum HLA-B*2705 zugegeben. Fluoreszenz-markiertes Peptid wurde in einem 2.000 fachen Überschuss in Bezug auf die Menge an Peptid, welches in der Bindungstasche des HLA-B*2705 gebunden vorlag, zugesetzt³.

Um eine bessere zeitliche Auflösung zu erhalten, wurden die Messungen zunächst bei RT durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Peptid an die MHC-Moleküle in Anwesenheit von Tapasin deutlich schneller erfolgt (Abb. 22). Nach 2,5 h Inkubation bei RT wurde mit I-Tapasin die 2,2 fache Menge an reassoziertem HLA-B*2705 detektiert als ohne I-Tapasin. Dieser Effekt ist tapasinspezifisch, was die Kontrolle mit der TAP1-NBD deutlich macht.

Derselbe Effekt konnte auch bei Inkubation bei 37°C beobachtet werden. Allerdings verlief bei dieser Temperatur die Reassoziatio

³ Im assemblierten HLA-B*2705-Komplex liegen HLA-B*2705-HC, β_2m und Peptid im Verhältnis 1:1:1 vor. Aufgrund des bekannten Molekulargewichtes der Komplexuntereinheiten kann die Konzentration der einzelnen Komponenten berechnet werden. In der hier verwendeten 0,5 μ M HLA-B*2705-Lösung ergab sich für das Peptid eine Konzentration von 12,5 nM. Somit stellt die Zugabe von 24 μ M Peptid einen 2.000 fachen Überschuss dar.

darauf zurückzuführen, dass durch Tapasin die Assoziationsrate der Peptidbindung gesteigert ist.

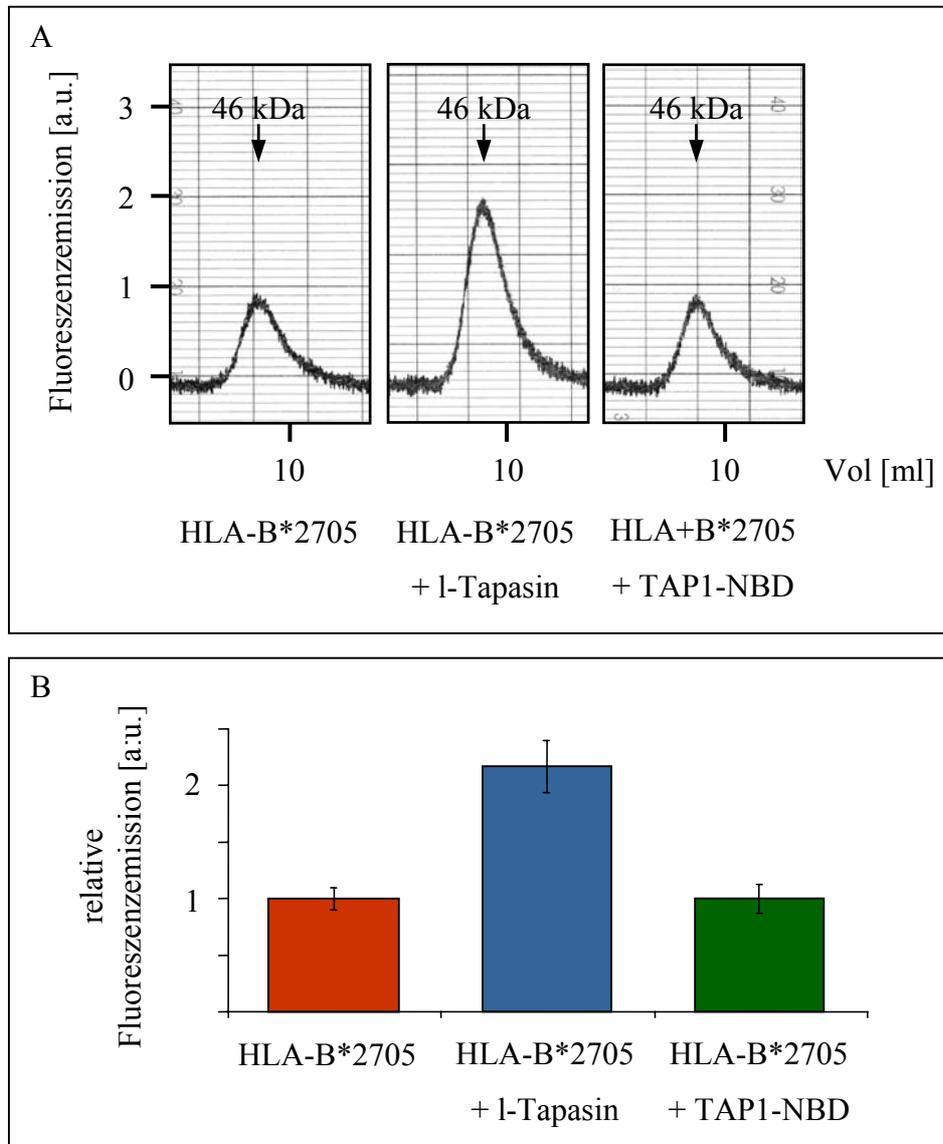


Abb. 22: 0,5 μM rückgefaltetes HLA-B*2705 wurde mit 24 μM RRYØKSTEL und entweder 0,5 μM I-Tapasin oder Puffer oder 0,5 μM TAP1-NBD als Kontrolle vermischt und bei RT inkubiert. Nach 2,5 h wurden die Proben durch Gelfiltration mittels TOSOH Biosep TSK-G 3000 Säule mit vorgeschalteter TSK Guard Säule analysiert. Die Detektion erfolgte durch Exzitation bei 485 nm und durch Emission bei 520 nm. (A) Originaldaten eines Experiments. Die in der Abbildung gezeigten Chromatogramme repräsentieren das Fluoreszenzsignal des trimeren HLA-B*2705. (B) Auswertung von drei unabhängigen Messungen. Das Fluoreszenzsignal von HLA-B*2705 ohne I-Tapasin wurde als Bezugspunkt gleich 1 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der drei Messungen.

Schon nach 30 - 60 Minuten befand sich die Reaktion in einem Gleichgewicht, so dass keine Veränderung des Fluoreszenzsignals mehr festgestellt werden konnte. Dabei stellte sich heraus, dass mit l-Tapasin eine größere Menge an reassoziertem HLA-

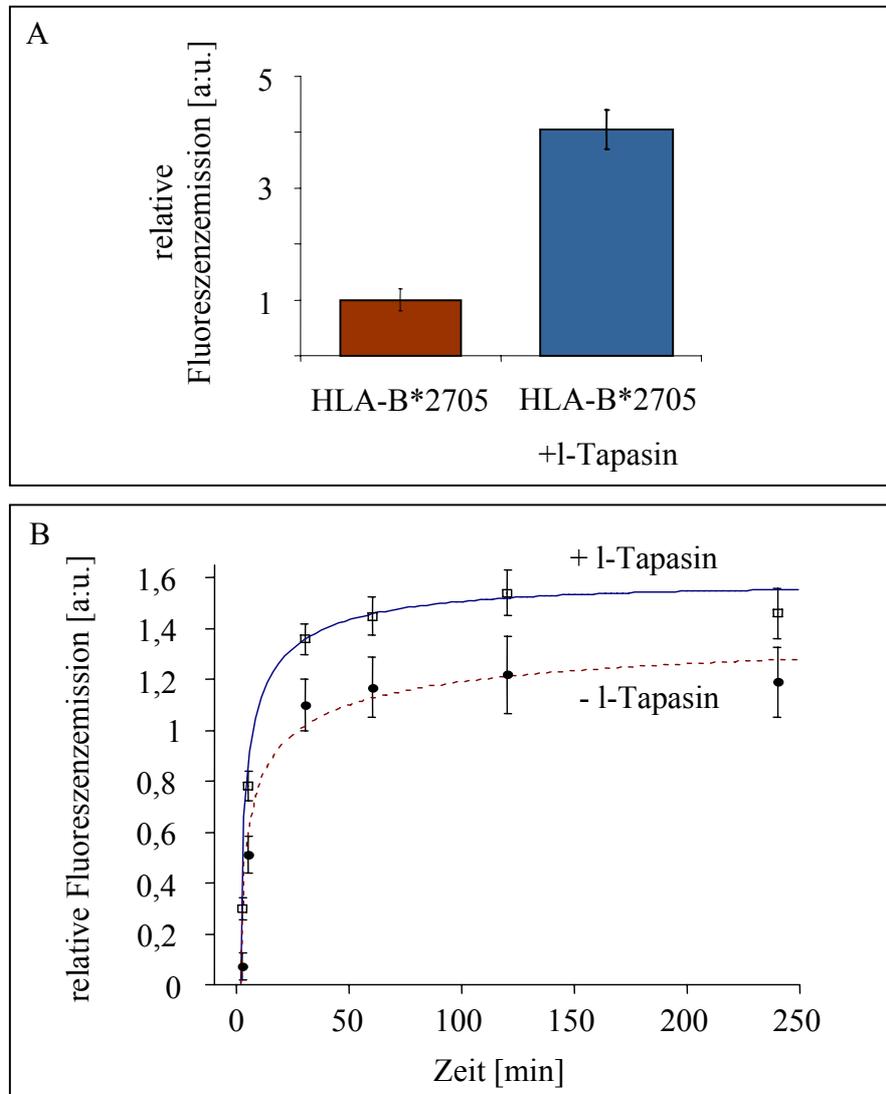


Abb. 23: 0,5 μM HLA-B*2705 wurde mit 24 μM RRYØKSTEL und entweder 0,5 μM l-Tapasin oder Puffer vermischt und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und durch Gelfiltration mittels TOSOH Biosep TSK-G 3000 Säule mit vorgeschalteter TSK Guard Säule analysiert. Die Detektion erfolgte durch Exzitation bei 485 nm und durch Emission bei 520 nm. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen. (A) Reassoziations nach 2,5 min. Das Fluoreszenzsignal von HLA-B*2705 ohne l-Tapasin wurde als Bezugspunkt gleich 1 gesetzt. (B) Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Reassoziations bis zu 4 h. Das Fluoreszenzsignal von HLA-B*2705 vor dem pH-Sprung wurde als Bezugspunkt für die folgenden Werte gleich 1 gesetzt.

B*2705 erreicht wurde (Abb. 23B). Daraus ergab sich, dass I-Tapasin unbeladene HLA-B*2705-Moleküle stabilisiert, wodurch sie länger in einer Peptid-empfindlichen Konformation gehalten werden und somit die Wahrscheinlichkeit einer Peptidassoziation steigt. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf der in Kapitel 5.3.2.1 beschriebenen Stabilisierung von bereits reassozierten HLA-B*2705-Molekülen beruht, wurde ein Kontrollexperiment analog zu den in Abb. 21 dargestellten Messungen durchgeführt. Dabei wurden wieder in Anwesenheit von Fluoreszenzmarkiertem Peptid rückgefaltete HLA-B*2705-Moleküle mit einem Überschuss an unmarkiertem Peptid in An- und Abwesenheit von I-Tapasin inkubiert, wobei HLA-B*2705-Moleküle und I-Tapasin in äquimolarem Verhältnis vorlagen. Im Gegensatz zu den in Abb. 21 gezeigten Daten erfolgte die Inkubation hier allerdings nicht bei RT sondern bei 37°C. Nach 4 h war wie auch bei RT kein Unterschied zwischen den Werten mit und ohne I-Tapasin zu erkennen (Abb. 24).

Somit konnte gezeigt werden, dass Tapasin nicht nur die Peptidassoziationsrate erhöht sondern auch unbeladene HLA-B*2705-Moleküle stabilisiert.

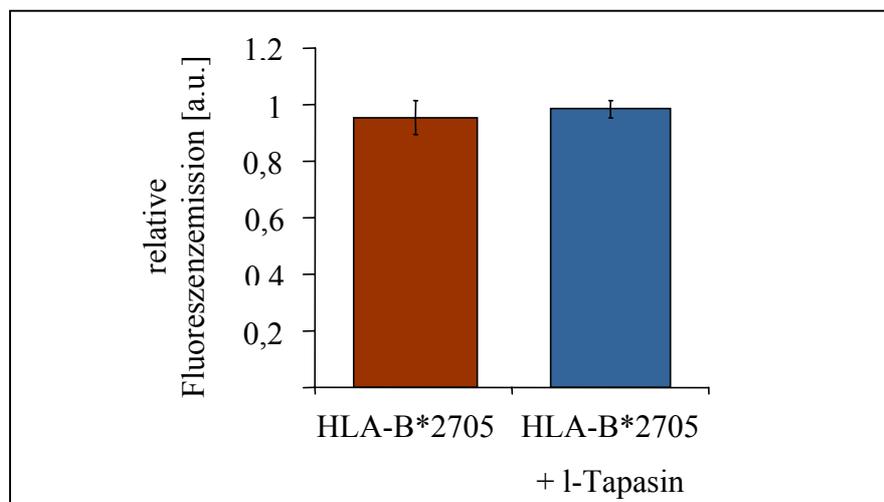


Abb. 24: 0,5 μ M HLA-B*2705 wurde mit 5 μ M RRYQKSTEL und entweder 0,5 μ M I-Tapasin (blau) oder Puffer (rot) vermischt und bei 37°C inkubiert. Die Analyse erfolgte durch Gelfiltration mittels TOSOH Biosep TSK-G 3000 Säule mit vorgeschalteter TSK Guard Säule. Die Detektion erfolgte durch Exzitation bei 485 nm und durch Emission bei 520 nm. Das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt $t=0$ wurde als Bezugspunkt gleich 1 gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Messungen.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die heterologe Expression und Reinigung der löslichen Domäne des ER-Chaperons Tapasins zu etablieren und eine Methode zu entwickeln, mit der der Einfluss von Tapasin auf die Beladung von MHC-Klasse I-Molekülen mit Peptid *in vitro* untersucht werden kann. Dazu war es notwendig, die einzelnen Komponenten in funktionaler Form zu isolieren. Die Reinigung der ER-luminalen Domäne von MHC-Klasse I-HC und β_2m sowie deren funktionale Renaturierung zu assemblierten löslichen MHC-Klasse I-Molekülen war bereits für verschiedene Alloformen publiziert. Die Isolation dieser Konstrukte konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden. Für die Aufreinigung von funktionalem Tapasin stand noch kein Verfahren zur Verfügung. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert.

6.1 Expression von I-Tapasin

Die Wahl eines Expressionssystems für die heterologe Expression von humanen Proteinen ist sehr oft eine Kompromisslösung zwischen Ausbeute und Funktionalität. Sehr hohe Ausbeuten werden bei der Expression als Inclusion Bodies in *E. coli* erzielt. Dabei kann der Anteil des heterolog exprimierten Proteins bis zu 50 % des Gesamtzellproteins betragen, was einer Ausbeute von ca. 75 mg/l Kultur entspricht (Sambrook *et al.*, 1998). Allerdings führt die hohe Expressionsrate zur Überlastung der Faltungsmaschinerie. Somit liegt das Zielprotein als Aggregat vor, was das Etablieren eines Verfahrens zur funktionalen Renaturierung erforderlich macht. Dies kann insbesondere bei Proteinen mit Disulfidbrücken zu erheblichen Problemen führen. Das höchste Maß an Funktionalität wird bei einer homologen Expression erreicht, im Falle von humanem Tapasin also in humanen Zellen. Bei solch homologen Expressionen konnten aber bisher nur relativ geringe Ausbeuten erzielt werden (Harthun *et al.*, 1997, Teifel *et al.*, 1996, He *et al.*, 1998).

Eine gute Relation von Ausbeute und Funktionalität kann das Insektenzellsystem bieten. Die Ausbeuten sind allerdings sehr stark abhängig von den Kulturparametern (z.B.

Flüssig- oder Adhärenzkultur, Zusammensetzung des Mediums, Titer der Virusstammlösung, etc.) sowie von den Eigenschaften des zu exprimierenden Proteins. Als Richtwert gilt für das Baculovirussystem bis zu 50 mg/l Kultur (Hegedus *et al.*, 1999). Insektenzellen bieten gegenüber anderen heterologen Expressionssystemen den Vorteil, dass sie phylogenetisch eng mit Säugerzellen verwandt sind. Diese Verwandtschaft betrifft nicht nur den allgemeinen Aufbau der Zellen, sondern gilt in mancher Hinsicht auch auf molekularer Ebene. So zeigte sich, dass humane Proteine im ER durch insektenzelleigene Chaperone gefaltet werden können (Smith *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel ist die korrekte Lokalisation humaner Proteine mit den entsprechenden humanen Signalsequenzen im Insektenzell-ER (Altmann *et al.*, 1999). Zudem werden in Insektenzellen posttranslationale Modifikationen durchgeführt. Heterolog exprimierte Proteine werden proteolytisch prozessiert, gefaltet und glycosyliert (Luckow, 1995). Insbesondere die Bildung von Disulfidbrücken war entscheidend für die Verwendung eines Insektenzellexpressionssystems. Ein weiterer Vorteil im Falle von Tapasin war das Fehlen eines adaptiven Immunsystems in Insektenzellen. Somit war es möglich, diverse Kontroll- und Vorexperimente mit Tapasin und MHC-Klasse I-Molekülen durchzuführen, ohne dabei eine Hintergrundaktivität berücksichtigen zu müssen. Ein solches Vorexperiment ist in Abb. 4 dargestellt. Es handelt sich dabei um eine FACS-Analyse von Insektenzellen, die entweder HLA-A2 alleine oder zusammen mit I-Tapasin oder *wT*Tapasin exprimieren. Die Detektion von MHC-Klasse I-Molekülen erfolgte mit einem Antikörper, der nur vollständig assemblierte MHC-Moleküle erkennt. In diesen Experimenten wurde also die Oberflächenexpression von HLA-A2 in An- und Abwesenheit von *wT*Tapasin bzw. I-Tapasin untersucht. HLA-A2 wurde einerseits verwendet, weil diese allele Variante weitgehend unabhängig von TAP ist, das in Insektenzellen nicht vorhanden ist. Zum anderen existierte zu diesem Zeitpunkt bereits eine Publikation, in der die Expression von HLA-A2 in humanen Zellen in Abhängigkeit von Tapasin untersucht wurde (Lewis *et al.*, 1998a). Lewis *et al.* zeigten, dass in Tapasin-defizienten Zellen nur halb so viele HLA-A2-Moleküle stabil mit Peptid assoziiert wurden wie in Zellen, die Tapasin exprimierten. Somit konnte durch einen Vergleich von Human- und Insektenzellen überprüft werden, inwieweit sich das Insektenzellsystem für Untersuchungen zur Reifung und Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen eignete. Eine wichtige Erkenntnis aus dem in Abb. 4 gezeigten Experiment war, dass die Assemblierung von

MHC-Klasse I-Molekülen in Insektenzellen korrekt erfolgte. Insektenzelleigene Chaperone konnten das Fehlen humaner Chaperone kompensieren, wodurch die Coexpression von humanem Calnexin oder Calreticulin nicht notwendig war. Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl *wt*Tapasin als auch I-Tapasin in gleichem Maße die Oberflächenexpression von HLA-A2 erhöhen. Somit war I-Tapasin in Bezug auf die MHC-Wechselwirkung vollständig funktional. Die Coexpression von Tapasin in Insektenzellen führte ebenso wie in Humanzellen zu einer zweifachen Erhöhung der HLA-A2-Menge an der Zelloberfläche. Dadurch war sichergestellt, dass sich Insektenzellen für die heterologe Expression von funktionalem I-Tapasin eignen. Die Reinigung führte zu einer Ausbeute von 90 µg/l Kultur, was für Interaktionsstudien ausreichend gewesen wäre. Eine Gelfiltration zeigte allerdings, dass das aufgereinigte I-Tapasin als Aggregat vorlag. Wie ein Vergleich des gereinigten I-Tapasins im SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte, war eine der Ursachen für die Aggregatbildung die intermolekulare Verbrückung von Cysteinen. Aber auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen erschien ein Teil des I-Tapasins als Monomer, was vermutlich auf die denaturierende Wirkung und das Lösen von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen durch das SDS zurückzuführen ist. Von den daraufhin unternommenen Versuchen, diese Aggregation zu verhindern, war einzig die Zugabe eines Proteaseinhibitor-Cocktails zum Kulturmedium erfolgversprechend. Allerdings lag der Großteil an I-Tapasin immer noch als Aggregat vor. Die Ausbeute an monomerem I-Tapasin betrug 4,5-9 µg/l Kultur, was nicht mehr ausreichend für weitere Experimente war.

Der Effekt durch die Zugabe der Proteaseinhibitoren könnte zwei Ursachen haben. Zum einen lysierten aufgrund der Virusinfektion vermutlich einige Zellen, so dass Proteasen ins Medium gelangten, welche das I-Tapasin spalteten. Andererseits ist bekannt, dass Insektenzellen verschiedene Proteasen ins Kulturmedium sezernieren (Brömme & Okamoto, 1995, Lanier *et al.*, 1996). Die im Medium nachgewiesene Proteaseaktivität wird dabei durch eine Virusinfektion erhöht (Grosch & Hasilik, 1998). Durch Zugabe unterschiedlicher Proteaseinhibitoren in unterschiedlichen Kombinationen kann die Degradation rekombinant exprimierter Proteine reduziert werden. Allerdings ist die Stärke dieser Reduktion bei den einzelnen getesteten heterolog exprimierten Proteinen stark unterschiedlich, so dass letztendlich keine allgemein gültige Rezeptur eines

Proteaseinhibitor-Cocktails aufgestellt werden kann (Grosch & Hasilik, 1998, Pyle *et al.*, 1995).

Erstaunlicherweise zeigte aggregiertes und monomeres I-Tapasin im SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen keinerlei Größenunterschiede. Somit konnte der durch die Protease(n) entfernte Teil nicht sehr groß sein. Da die Aufreinigung mittels des C-terminalen His₆-Tags noch gut funktionierte und auch ein α His-Tag-Antikörper, der ein Epitop aus fünf Histidinen erkennt, noch deutliche Signale lieferte, konnte davon ausgegangen werden, dass der C-Terminus intakt war und der N-Terminus Angriffspunkt der Protease(n) war. I-Tapasin konnte aber ebenfalls mit einem α Tapasin-Antikörper, welcher mittels einer Sequenz vom N-Terminus von Tapasin (Aminosäuren 2-24 des reifen Proteins) generiert worden war, detektiert werden. Das exakte Epitop dieses α Tapasin-Antikörpers war jedoch nicht bekannt. Somit war es möglich, dass trotz des Fehlens einzelner N-terminaler Aminosäuren das Epitop und dadurch die Detektion durch den α Tapasin-Antikörper nicht beeinträchtigt war. Zum Zeitpunkt der hier dargestellten Untersuchungen lagen noch keine experimentellen Daten bezüglich der Struktur von Tapasin vor. *In silico* durchgeführte Strukturvorhersagen ergaben eine Disulfidbrücke zwischen Cys362 und Cys295 als Teil der Immunglobulindomäne. Über den Zustand der verbleibenden drei Cysteine der ER-luminalen Domäne sowie deren Verbrückung untereinander wurden hingegen mit verschiedenen Programmen widersprüchliche Vorhersagen erhalten. Mittlerweile liegen experimentelle Daten vor, die auf eine zweite Disulfidbrücke zwischen Cys7 und Cys71 hindeuten (Dick *et al.*, 2002). Diese Disulfidbrücke könnte von einer I-Tapasinvariante, deren sieben N-terminale Aminosäurereste des reifen Proteins deletiert sind, nicht mehr ausgebildet werden. Ein solches Protein besäße somit zwei freie Cysteine, die zur Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zur Verfügung stehen. Ausserdem würde das Fehlen der zweiten Disulfidbrücke zu weiteren strukturellen Veränderungen führen, welche eine Aggregation über hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen fördern könnten.

Die in dieser Arbeit getesteten Proteaseinhibitoren wurden in anderen Arbeiten bereits erfolgreich zum Schutz vor Degradation eingesetzt (Grosch & Hasilik, 1998, Pyle *et al.*, 1995). Im Falle von I-Tapasin konnte durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren lediglich eine maximale Monomerausbeute von 5-10 % im Vergleich zur Gesamtmenge an exprimiertem I-Tapasin erzielt werden. Dies könnte an einer unvollständigen

Inhibition von Proteasen liegen. Allerdings kann eine Beteiligung anderer Faktoren an der Aggregation von I-Tapasin nicht ausgeschlossen werden.

Die Glycosylierung von Proteinen erfüllt verschiedene Funktionen in der Zelle. Eine davon ist das Abschirmen von hydrophoben Bereichen im Protein, um eine Aggregation in der Zelle zu verhindern. Da beim Insektenzellsystem das I-Tapasin nur aggregiert gereinigt werden konnte, wurde *Saccharomyces cerevisiae* als weiteres eukaryontisches Expressionssystem getestet. Es wurden zwei häufig verwendete, gut etablierte Multicopy-Plasmide benutzt. Dabei wurde das I-Tapasin sowohl konstitutiv als auch induzierbar exprimiert. Für den in Abb. 9 gezeigten Western Blot wurden gleiche Volumina Insektenzellkultur und Hefekultur verwendet, um einen direkten Vergleich zwischen beiden Systemen zu erhalten. Während die als Positivkontrolle verwendete I-Tapasinbande aus den Insektenzellen aufgrund der starken Überexponierung des Röntgenfilms schon ein sehr deutliches Signal lieferte, konnten bei den Proben aus der Hefe keine Banden detektiert werden. Eine Sequenzanalyse ergab, dass die hier generierten DNA-Konstrukte keinerlei Fehler oder Mutationen aufwiesen. Außerdem wurden die verwendeten Plasmide bei der heterologen Expression anderer Proteine bereits erfolgreich eingesetzt. Somit lag der Schluss nahe, dass das Expressionsniveau von I-Tapasin in der Hefe sehr niedrig war. Da die Ausbeute im Insektenzellsystem schon gering war, erschien eine Optimierung der I-Tapasinexpression in der Hefe wenig sinnvoll.

Aufgrund der schlechten Ausbeuten, die mit den getesteten eukaryontischen Expressionssystemen erzielt wurden, wurde ein prokaryontisches System gewählt. Dabei können in der Regel höhere Ausbeuten erzielt werden. Am besten etabliert ist die Expression in *Escherichia coli*.

Um die Ausbildung von Disulfidbrücken zu gewährleisten, wurde das I-Tapasin mit einer Signalsequenz für die Translokation ins Periplasma fusioniert. Aufgrund des dort herrschenden oxidierenden Milieus sowie der Anwesenheit verschiedener Protein-Disulfidisomerasen können Disulfidbrücken gebildet werden (Qiu *et al.*, 1998, Missiakas & Raina, 1997). Für die vom Hersteller IBA empfohlenen Expressionsbedingungen stellte sich heraus, dass das I-Tapasin ausschließlich als Inclusion Bodies vorlag. Durch Erniedrigung der Wachstumstemperatur sowie einer Titration der zugegebenen Induktormenge konnte erreicht werden, dass ein Teil des I-Tapasins ins Periplasma transloziert wurde. Eine nach der Aufreinigung durchgeführte

Gelfiltration zeigte jedoch, dass der Großteil des periplasmatischen I-Tapasins ebenfalls aggregiert war. Lediglich 5-10 % lagen als monomeres Protein vor. Dies ergab eine Monomerausbeute von etwa 1-2 µg/l Kultur. Somit stellte die periplasmatische Expression keinerlei Verbesserung zum Insektenzellsystem dar.

In allen bisher getesteten Expressionssystemen war einerseits die Ausbeute relativ gering und andererseits lag das I-Tapasin größtenteils als Aggregat vor. Aus diesem Grund wurde die Expression unter Bedingungen durchgeführt, die auf die Ausbildung von Inclusion Bodies abzielte. Dadurch ist es möglich, hohe Proteinausbeuten zu erreichen. Um natives Protein zu erhalten ist es allerdings notwendig, ein Renaturierungsverfahren zu etablieren. Es stellte sich heraus, dass eine funktionale Rückfaltung von I-Tapasin mit den angewandten Bedingungen ebenfalls nur Aggregate lieferte.

Eine Strategie zur Reduktion der Aggregationstendenz eines Proteins ist dessen Expression als Fusionsprotein. Dabei wird die codierende Sequenz eines zelleigenen Proteins mit der codierenden Sequenz des heterolog zu exprimierenden Proteins verknüpft. Der Vorteil der Expression als Fusionsprotein liegt darin, dass durch die korrekte Faltung des Fusionspartners (z.B. MBP) eine korrekte Faltung des heterolog exprimierten Proteins unterstützt werden kann (Zhang *et al.*, 1998, Forrer & Jaussi, 1998). Die molekulare Ursache dieses Effekts ist nicht eindeutig geklärt. Es ist denkbar, dass Chaperone, welche für eine korrekte Faltung des Fusionspartners notwendig sind, in der Nähe des heterolog exprimierten Proteins rekrutiert werden (Thomas & Baneyx, 1999). Allerdings kann für manche Fusionspartner wie z.B. MBP eine direkte Wechselwirkung mit dem "Passagierprotein" nicht ausgeschlossen werden. In diesem Fall würde sich der Fusionspartner wie ein intramolekulares Chaperon verhalten (Shinde & Inouye, 1996, Sachdev & Chirgwin, 1998). Das MBP als Fusionspartner wurde gewählt, weil dadurch einerseits eine Aufreinigung mittels Amylose-Resin in einem Schritt ermöglicht wird. Andererseits konnte bei einem systematischen Vergleich von mehreren häufig verwendeten Fusionspartnern festgestellt werden, dass die Ausbeuten an löslichem Protein durch eine Fusion mit MBP am höchsten waren (Kapust & Waugh, 1999). In dem in Abb. 12 dargestellten Experiment stellte sich allerdings heraus, dass das an MBP fusionierte I-Tapasin abgebaut wurde. Veränderungen der Induktions- und Zellerntebedingungen sowie die Verwendung

Protease-defizienter Bakterienstämme und der Zusatz von Protease-Inhibitoren konnten diese Degradation nicht verhindern oder reduzieren.

Als nächste Strategie wurde die Expression von I-Tapasin in Origami(DE3)-Zellen durchgeführt. Das Cytoplasma von *E. coli*-Zellen besitzt ein stark reduzierendes Milieu. Es wird durch die Aktivität zweier Systeme, des Thioredoxin- und des Glutaredoxin-Systems aufrechterhalten. Origami(DE3)-Zellen tragen eine Doppelmutation, die beide Systeme ausschaltet. Das Cytoplasma hat nun tendenziell oxidierende Eigenschaften und unterstützt folglich die Bildung von Disulfidbrücken und somit die korrekte Faltung von Proteinen.

Die Expression von I-Tapasin im Origami(DE3)-Stamm erfolgte mittels eines pBAD-Vektors (Fa. Invitrogen). Dabei ist die Transkription durch den *araBAD*-Promotor kontrolliert, welcher den Vorteil einer dosisabhängigen Expression bietet (Guzman *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde die Induktormenge optimiert, so dass die *E. coli*-Faltungsmaschinerie nicht überlastet wird und die Bildung von Inclusion Bodies unterbleibt.

Mit der Kombination dieser beiden Systeme gelang es, lösliches, monomeres I-Tapasin in ausreichenden Mengen zu isolieren. Die Ausbeuten von 150 µg/l Kultur lagen weit über denen der anderen getesteten Expressionssysteme.

6.2 HLA-B*2705

Einzelne MHC-Klasse I-Allele weisen bezüglich der Peptidbeladung sehr große Unterschiede in ihrer Abhängigkeit von Tapasin auf. Während einige HLA-Alloformen in *Tpn*^{-/-}-Zellen kaum mehr an der Zelloberfläche präsentiert werden, zeigen andere nur eine geringe Reduktion im Vergleich zu *Tpn*^{-/-}-Zellen, die mit Tapasin transfiziert wurden (Greenwood *et al.*, 1994, Grandea III *et al.*, 1997, Ortmann *et al.*, 1997, Lewis & Elliot, 1998b). Durch einen direkten Vergleich von drei HLA-B-Allelen wurde gezeigt, dass HLA-B*4402 sehr stark von Tapasin abhängig ist, wohingegen HLA-B*2705 auch in Abwesenheit von Tapasin eine sehr hohe Oberflächenexpression besaß. HLA-B8-Moleküle zeigten in diesen Studien eine mittlere Abhängigkeit von Tapasin (Peh *et al.*, 1998). Basierend auf diesen Ergebnissen war die ursprüngliche Hypothese, dass manche HLA-Alloformen wie z.B. HLA-B*2705 auch in Abwesenheit von

Tapasin mit hochaffinem Peptid beladen werden können und die Peptid-Editierungsfunktion von Tapasin auf einzelne MHC-Allele unterschiedlich starke Auswirkungen hatte. Durch weitere Untersuchungen der HLA-B*2705-Moleküle in An- und Abwesenheit von Tapasin in den Zellen konnten jedoch Unterschiede der beladenen Peptide festgestellt werden. So konnte beobachtet werden, dass ein HLA-B*2705-restringiertes virales Peptid in Abwesenheit von Tapasin cytotoxischen T-Zellen erst mit einiger Verzögerung präsentiert wurde. In Tpn^{-/-}-Zellen waren die HLA-B*2705-Moleküle thermisch instabil, zeigten eine kürzere Halbwertszeit auf der Zelloberfläche und waren mit einem unterschiedlichen Peptidrepertoire beladen als in Tapasin-positiven Zellen (Purcell *et al.*, 2000, Purcell *et al.*, 2001, Tan *et al.*, 2002). Somit unterlag auch die Beladung von HLA-B*2705 mit Peptid einer Qualitätskontrolle durch Tapasin. Allerdings kann HLA-B*2705 auch in Abwesenheit von Tapasin durch Peptid stabilisiert werden, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. Dies war das Hauptkriterium, warum für die Etablierung eines *in vitro*-Systems, das die Wechselwirkung von Tapasin mit MHC-Klasse I-Molekülen untersucht, das HLA-B*2705-Allel ausgewählt wurde. Dadurch war einerseits sichergestellt, dass auch suboptimal beladene HLA-B*2705-Moleküle zumindest für einen gewissen Zeitraum stabil waren und nicht zerfallen. Andererseits wurde diese suboptimale Peptidbeladung durch Tapasin editiert. Weitere Kriterien ergaben sich aus den Anforderungen für das Untersuchungssystem. So war es notwendig, dass das gebundene Peptid klar definiert werden kann und keine heterogene Mischung aus unterschiedlichen Peptiden, welche mit unterschiedlichen Affinitäten assoziiert waren, vorliegt. Zusätzlich waren Messungen mit Fluoreszenzdetektion vorgesehen. Somit musste eine Möglichkeit bestehen, das HLA-B*2705 mit Fluoreszenz-markiertem Peptid zu beladen. Daher wurden β_2m und HC aus *E. coli*-Inclusion Bodies isoliert. Anschliessend erfolgte eine funktionale Rückfaltung der denaturierten Proteine in Anwesenheit eines Reporterpeptids.

6.3 MHC-Tapasin-Wechselwirkung

Bis zum jetzigen Zeitpunkt war die Funktion von Tapasin lediglich durch *in vivo*-Experimente charakterisiert. Diese Experimente basierten in erster Linie auf Untersuchungen von $Tpn^{-/-}$ -Zellen, Mutagenesestudien und Coimmunpräzipitationsexperimenten. Bislang existierte noch keine Möglichkeit, die Wechselwirkung von Tapasin mit MHC-Klasse I-Molekülen *in vitro* nachzuweisen. Dies lag vor allem daran, dass die Isolierung von Tapasin oder Tapasinvarianten mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden war. In dieser Arbeit konnte durch zahlreiche Optimierungsversuche erstmals die ER-luminale Domäne von Tapasin in seiner nativen Konformation isoliert werden. Dadurch wurden *in vitro*-Studien der Tapasin-MHC-Interaktion ermöglicht.

Zunächst wurde zur Untersuchung der Tapasin-MHC-Wechselwirkung die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie verwendet. Dazu wurde jeweils unbeladenes HLA-B*2705 sowie mit dem Peptid RRYQKSTEL beladenes HLA-B*2705 auf einer Chipoberfläche immobilisiert. Anschließend wurde I-Tapasin über die Chipoberfläche geleitet. Da es sich bei RRYQKSTEL um ein hochaffin bindendes Peptid handelt, sollte I-Tapasin entsprechend der Peptid-Editing-Theorie stärker an das leere MHC-Molekül binden. Bei dem bereits optimal beladenen sollte keine oder zumindest eine deutlich geringere Assoziation festzustellen sein. Die hier durchgeführten Experimente haben einen solch qualitativen Unterschied bestätigt. Aufgrund der hohen Wechselwirkung von I-Tapasin mit der Chipoberfläche waren jedoch quantitative Aussagen nicht möglich.

Detailliertere Untersuchungen zum Mechanismus der Wechselwirkung von Tapasin mit MHC-Klasse I-Molekülen erfolgten mittels Gelfiltration und anschließender Fluoreszenzdetektion des Reporterpeptids RRYØKSTEL. Durch Coimmunpräzipitationsexperimente konnte festgestellt werden, dass nach der Dissoziation vom TAP-Komplex peptidbeladene MHC-Moleküle das ER nicht unmittelbar verlassen (Li *et al.*, 1999, Marguet *et al.*, 1999). Da alle bisherigen Daten darauf hindeuten, dass die ER-Retention hauptsächlich durch Tapasin vermittelt wird, wurde eine Assoziation von bereits optimal beladenen MHC-Moleküle mit Tapasin vermutet. Weiterhin stellte sich in Untersuchungen zur Stabilität von MHC-Klasse I-Molekülen heraus, dass hochaffin beladene HLA-B*2705-Komplexe eine Entfaltung in zwei Schritten zeigen. Im ersten Schritt löst sich das Peptid von HLA-B*2705 ab. Erst in einem zweiten Schritt entfalten

und dissoziieren HC und β_2m (Reinelt *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb überprüft, ob und in welchem Maß I-Tapasin diesen ersten Schritt der Peptiddissoziation von optimal beladenen MHC-Molekülen beeinflusst. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung eines I-Tapasin-Moleküls mit einem bereits optimal beladenen HLA-B*2705-Molekül einer sehr schnellen Dissoziationsrate unterliegt und nur sehr kurzlebig ist. Deshalb wurde eine Versuchsanordnung gewählt, bei der keine räumliche Trennung der Interaktionspartner stattfindet. Dadurch kann die Wechselwirkung von HLA-B*2705 und I-Tapasin wiederholt stattfinden, wodurch der zu beobachtende Effekt verstärkt werden sollte. In den in Abb. 21 dargestellten Experimenten wurden MHC-Moleküle mit Fluoreszenzmarkiertem Peptid rückgefaltet und mit einem Überschuss an unmarkiertem Peptid in An- und Abwesenheit von I-Tapasin inkubiert. HLA-B*2705 und I-Tapasin wurden dabei in äquimolaren Mengen eingesetzt, da dieses Verhältnis auch *in vivo* im ER festgestellt wurde (Ortmann *et al.*, 1997). Um eine bessere zeitliche Auflösung zu erhalten, wurden diese Experimente bei Raumtemperatur durchgeführt. Es zeigte sich, dass HLA-B*2705 in Anwesenheit von I-Tapasin über einen längeren Zeitraum stabil ist als in Abwesenheit von I-Tapasin, was auf eine Erniedrigung der Dissoziationsrate für das Peptid zurückzuführen ist. Aufgrund der Versuchsanordnung kann ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt darauf beruht, dass einzelne HLA-B*2705-Komplexe ihr Fluoreszenz-markiertes Peptid verlieren und durch I-Tapasin länger in einer Peptid-empfindlichen Konformation gehalten werden. Dadurch würde ein Zerfall in β_2m und HC verzögert, so dass die Wahrscheinlichkeit für eine erneute Bindung von Peptid steigt. Durch den Überschuss an unmarkiertem Peptid ist allerdings gewährleistet, dass solch reassozierte Komplexe kein Fluoreszenz-markiertes Peptid gebunden haben. Die Stabilitätserhöhung kann ebenfalls nicht darauf zurückgeführt werden, dass beim Verlassen der Bindungstasche das Fluoreszenz-markierte Peptid von I-Tapasin gebunden wird. Dadurch könnte trotz des Überschusses an unmarkiertem Peptid in der Lösung die Reassoziierung von Fluoreszenz-markiertem Peptid bevorzugt stattfinden. Eine solche Peptidbindungsaktivität wurde für Tapasin schon vermutet (Li *et al.*, 1997). Dies ist aber ebenfalls auszuschließen, da bei einer Inkubation von I-Tapasin mit RRYØKSTEL keinerlei Hinweise auf eine solche Interaktion festgestellt werden konnten.

Mit der in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Oberflächen-Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie konnte diese Wechselwirkung nicht nachgewiesen werden. Dies lag einerseits an der starken Bindung von I-Tapasin an die Chipoberfläche. Andererseits stellt die Flusskammer des SPR-Geräts ein offenes System dar. I-Tapasin, welches von beladenem HLA-B*2705 dissoziiert, wird durch den fließenden Puffer von der Chipoberfläche entfernt und kann nicht mehr reassoziieren. Somit entfällt die Verstärkung des Effekts aufgrund des hier gewählten geschlossenen Systems.

Mit derselben Technik wurde auch der Einfluss von I-Tapasin auf die Peptidassoziation von unbeladenen MHC-Klasse I-Molekülen untersucht. Aufgrund bisheriger Daten konnte davon ausgegangen werden, dass I-Tapasin dabei einen assoziationsfördernden Einfluss hat. Die molekulare Ursache für diesen Effekt war bislang nicht bekannt. Tapasin könnte in erster Linie eine stabilisierende Wirkung haben, wodurch der Zerfall von MHC-Molekülen in β_2m und HC verzögert wird und leere MHC-Moleküle länger in einer Peptid-empfindlichen Konformation gehalten werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich aufgrund der Anwesenheit von Tapasin die Assoziationsrate der Peptidbindung ändert. Durch die hier durchgeführten Untersuchungen sollte also die Frage geklärt werden, ob in Anwesenheit von Tapasin Peptid schneller an leere MHC-Moleküle bindet oder ob mehr MHC-Moleküle zur Peptidassoziation zur Verfügung stehen.

In der in Abb. 22 und 23 dargestellten Versuchsanordnung wurde das Peptid aus rückgefalteten HLA-B*2705-Molekülen mittels eines pH-Sprungs entfernt. Die daraus resultierenden leeren MHC-Moleküle wurden mit einem Überschuss an Fluoreszenzmarkiertem Peptid in An- und Abwesenheit von I-Tapasin inkubiert. Anschließend wurde der zeitliche Verlauf der erneuten Peptidassoziation analysiert. Als Reporterpeptid wurde RRYØKSTEL verwendet. Da den leeren MHC-Molekülen ausschließlich hochaffin bindendes Peptid zur Assoziation zur Verfügung stand, konnte davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung von I-Tapasin und HLA-B*2705 nur sehr kurzlebig war und die Peptidbeladung sehr schnell stattfand. Als Vorexperiment wurden daher erste Untersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Dadurch sollte der Reaktionsverlauf verzögert werden. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von I-Tapasin nach 2,5 h mehr als doppelt so viele MHC-Moleküle mit Peptid beladen waren. Wie das Kontrollexperiment mit der TAP1-NBD zeigt, war diese Steigerung der Beladungseffizienz auf die Anwesenheit von I-Tapasin zurückzuführen. Somit konnte

der positive Effekt von Tapasin bei der Peptidbeladung durch die hier vorgestellten *in vitro*-Studien eindeutig bestätigt werden. Um die Ursache dieses Effekts aufzuklären, wurde die Reaktion bei 37°C durchgeführt und zeitlich verfolgt. Es stellte sich heraus, dass durch I-Tapasin sowohl mehr MHC-Moleküle beladen werden als auch eine schnellere Peptidassoziation erfolgt. Wie erwartet, verlief die Reaktion bei 37°C deutlich schneller als bei Raumtemperatur. Nach 30-60 Minuten war ein Gleichgewicht erreicht, so dass alle verfügbaren MHC-Moleküle Peptid gebunden hatten. Dabei war die Anzahl solch verfügbarer MHC-Moleküle in Anwesenheit von I-Tapasin deutlich höher als in Abwesenheit von I-Tapasin. Dies deutet darauf hin, dass leere MHC-Moleküle durch Tapasin stabilisiert und in einer Peptid-empfindlichen Konformation gehalten werden. In einem Kontrollexperiment wurden analog zu den Experimenten in Abb. 21 mit Fluoreszenz-markiertem Peptid beladene HLA-B*2705-Moleküle mit einem Überschuss an unmarkiertem Peptid mit und ohne I-Tapasin vermischt und diesmal bei 37° C inkubiert. Dabei war wie auch bei Raumtemperatur nach 4 Stunden kein Unterschied zwischen den Werten mit und ohne I-Tapasin erkennbar. Somit kann ausgeschlossen werden, dass dem beobachteten Effekt eine Stabilisierung von bereits beladenen MHC-Molekülen zugrunde liegt.

Ein Vergleich der Anfangswerte zeigte allerdings auch, dass die Peptidassoziation einer schnelleren Kinetik unterlag. Nach 2,5 Minuten waren in Anwesenheit von I-Tapasin viermal mehr HLA-B*2705-Moleküle mit Peptid beladen als in Abwesenheit von I-Tapasin. Somit hat Tapasin auch einen deutlichen Einfluss auf die Assoziationsrate. Durch die Wirkung von Tapasin binden Peptide schneller an MHC-Moleküle. Mit diesen Experimenten konnten zwei wichtige Funktionen von Tapasin definiert werden. Einerseits wird die Assoziation von Peptid an MHC-Klasse I-Moleküle durch Tapasin beschleunigt. Andererseits werden leere MHC-Moleküle durch Tapasin stabilisiert.

Aus bereits publizierten Daten sowie den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen ergibt sich folgendes Modell für die Rolle von Tapasin bei der Peptidbeladung von MHC-Molekülen (Abb. 25): Leere MHC-Moleküle sind zunächst mit Tapasin und TAP assoziiert (Calreticulin und ERp57 sind hier nicht dargestellt). Dabei ist Tapasin für die Stabilisierung der MHC-Moleküle verantwortlich und verhindert einen frühzeitigen Zerfall in β_2m und HC. Zudem werden die MHC-Moleküle durch Tapasin in einer Konformation gehalten, die die Assoziation mit Peptid fördert. Anschließend erfolgt die Peptidbindung, bei der zunächst nicht zwischen hochaffinen und niedrigaffinen

Peptiden unterschieden wird. Jedes Peptid kann gebunden werden, soweit es dem Repertoire des jeweiligen MHC-Allels entspricht. In diesem Stadium der Peptidbeladung sorgt Tapasin durch eine Erhöhung der Assoziationsrate für eine schnelle Assoziation des Peptids mit dem MHC-Molekül. Im anschließenden

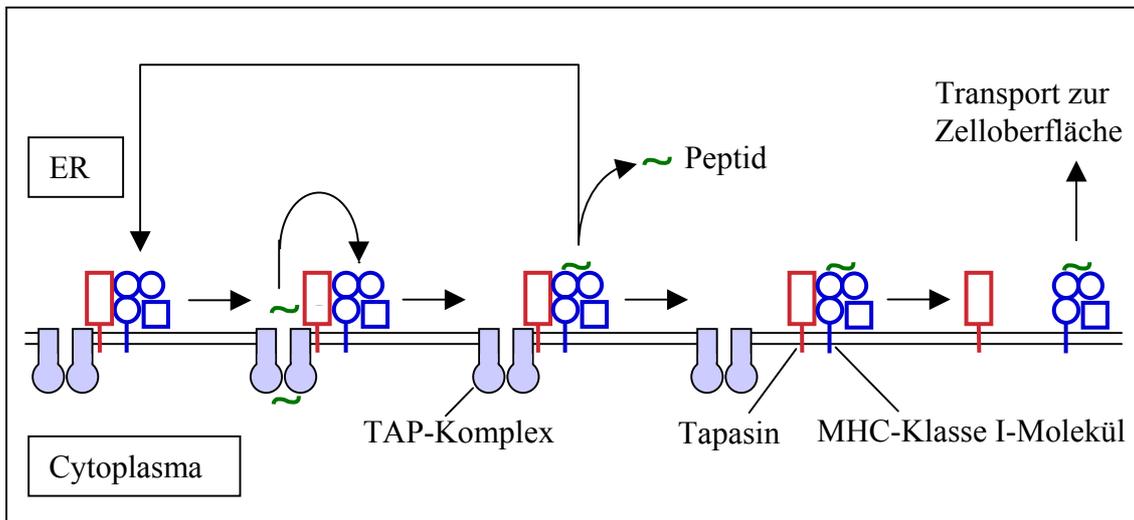


Abb. 25: Modell der Tapasinfunktionen bei der Peptidbeladung von MHC-Klasse I-Molekülen

Editierungsschritt wird die Stabilität des neugebildeten MHC-Peptid-Komplexes überprüft. Ist das Peptid mit einer niedrigen Affinität gebunden, verlässt es die Bindungstasche wieder und der Beladungsprozess beginnt von neuem. Bei diesen nicht erfolgreichen Peptidbeladungen erhöht Tapasin aufgrund der oben beschriebenen Funktionen die Durchsatzrate von Peptiden. Dadurch werden in Anwesenheit von Tapasin in einem bestimmten Zeitraum mehr Peptide als in Abwesenheit von Tapasin auf eine hochaffine Bindung überprüft. Nach der Assoziation mit einem hochaffinen Peptid erfolgt eine Konformationsänderung im MHC-Molekül, wodurch die Dissoziation des Beladungskomplexes induziert wird. Diese Dissoziation erfolgt sequenziell. Zuerst löst sich TAP aus dem Beladungskomplex, während Tapasin mit dem neubeladenen MHC-Molekül assoziiert bleibt. Tapasin stabilisiert dabei den neugebildeten MHC-Komplex durch eine Erniedrigung der Dissoziationsrate für das Peptid. Anschließend trennt sich die Verbindung von Tapasin und MHC-Molekül, wodurch die ER-Retentionsfunktion von Tapasin aufgehoben wird und das MHC-Molekül über den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche transportiert wird.

6.4 Ausblick

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde ein System zur heterologen und funktionalen Expression von I-Tapasin sowie zur *in vitro*-Untersuchung der Wechselwirkung zwischen MHC-Molekülen und I-Tapasin aufgebaut. Dadurch bietet sich die Möglichkeit, diese Wechselwirkung im Detail zu beobachten. Messungen zur Stabilisierung von leeren und beladenen MHC-Molekülen sowie zur Peptid-Editierungsfunktion können damit durchgeführt werden. So wäre es möglich, MHC-Moleküle mit niedrigaffinem Peptid zu beladen. Nach Zugabe von hochaffinem Peptid könnte dabei der Peptidaustausch verfolgt werden. Dabei ist die Verwendung von HLA-B*2705 von Vorteil, da dieses Allel auch mit niedrigaffinem Peptid eine gewisse Stabilität aufweist. Weiterhin kann die Abhängigkeit anderer MHC-Allele von Tapasin beim Prozess der Peptidbeladung untersucht werden. Durch gezielte Mutationen sowohl des MHC-Moleküls als auch von Tapasin könnten die Kontaktpunkte dieser beiden Proteine ermittelt werden. Schließlich wäre auch denkbar, detaillierte Untersuchungen zur Struktur von Tapasin durchzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- Abele, R., Tampé, R. (1999), Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 405-419
- Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I.B., Marz, L. (1999), Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16, 109-23
- Androlewicz, M.J., Anderson, K.S., Cresswell, P. (1993), Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9130-9134
- Aslund, F., Beckwith, J. (1999), The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181, 1375-1379
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998), Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252
- Bangia, N., Lehner, P.J., Hughes, E.A., Surmann, M., 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
- Benjamin, R., Madrigal, J., Parham, P. (1991), Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable cells. *Nature* 351, 74-77
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G. (1999), Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13703-3708
- Brömme, D., Okamoto, K. (1995), The Baculovirus cysteine protease has a cathepsin B-like S2-subsite specificity. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 376, 611-615

- Brouwenstijn, N., Serwold, T., Shastri, N. (2001), MHC class I molecules can direct proteolytic cleavage of antigenic precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 15, 95-104
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A.L. (1996), Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 801-847
- Dick, T.B., Bangia, N., Peaper, D.R., Cresswell, P. (2002), Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 16, 87-98
- Ehring, B., Meyer, T.H., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Tampé, R. (1996), Effects of major-histocompatibility-complex-encoded subunits on the peptidase and proteolytic activities of human 20S proteasomes. Cleavage of proteins and antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 235, 404-415
- Falk, K., Rotzsche, O., Stevanovic, S., Yjung, G., Rammensee, H.-G. (1991), Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296
- Farmery, M.R., Allen, S., Allen A.J., Bulleid, N.J. (2000), The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J. Biol. Chem.* 275, 14933-14938
- Forrer, P., Jaussi, R. (1998), High-level expression of heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage lambda head protein D. *Gene* 244, 45-52
- Gaczynska, M., Rock, K.L., Spies, T., Goldberg, A.L. (1994), Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9213-9217

- Garbi, N., Tan, P., Diehl, A.D., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Momburg, F., Hämmerling G.J. (2000), Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat. Immunol.* 1, 234-238
- Glotzer, M., Mussay, A.W., Kirschner, M.W. (1998), Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 394, 132-138
- Grande III, A.G., Lehner, P.J., Cresswell, P., Spies, T. (1997), Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics* 46, 477-483
- Grande III, A.G., Van Kaer, L. (2001), Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol.* 22, 194-199
- Greenwood, R., Shimizu, Y., Sekhon, G.S. DeMars, R. (1994), Novel allele-specific, post-translational reduction in HLA class I surface expression in a mutant human B cell line. *J. Immunol.* 153, 5525-5536
- Grimm, L.M., Goldberg, A.L., Poirier, G.G., Schwatz, L.M., Osborne, B.A. (1996), Proteasomes play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15, 3835-3844
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R., Kloetzel, P.-M. (1996), A third interferon- γ -induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur. J. Immunol.* 26, 863-869
- Grosch, H.W., Hasilik, A. (1998), Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in Baculovirus expression systems. *BioTechniques* 24, 930-934
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., Inouye, H. (1987), Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67, 21-30

- Guzman, L.M., Belin D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995), Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121-4130
- Harris, M.R., Lybarger, L., Myers, N.B., Hilbert, C., Solheim, J.C., Hansen, T.H., Yu, Y.Y. (2001), Interactions of HLA-B27 with the peptide loading complex is revealed by heavy chain mutations. *Int. Immunol.* 13, 1275-1282
- Harthun, S., Matischak, K., Friedl, P. (1997), Determination of recombinant proteins in animal cell culture supernatants by near-infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* 251, 73-78.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1998), A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 2509-2514.
- Hegedus, H.H., Pfeifer, T.A., Theilmann, D.A., Kennard, M.L., Gabathuler, R., Jefferies, W.A., Grigliatti, T.A. (1999), Differences in the expression and localisation of human melanotransferrin in lepidopteran and dipteran insect cell lines. *Protein Expression and Purification* 15, 296-307
- Hisamatu, H., Shimbara, N., Saito, Y., Kristensen, P., Hendil, K.B., Fujiwara, T., Takahashi, E., Tanahasi, N., Tamura, T., Ichihara, H., Tanaka, K. (1996), Newlx identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon- γ . *J. Exp. Med.* 183, 1807-1816
- Hughes, E.A., Cresswell, P. (1998), The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I-peptide loading complex. *Curr. Biol.* 8, 709-712
- Janeway, A.C., Travers, P. (1995), Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*

- Kapust R.B., Waugh, D.S. (1999), *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668-1674
- Lanier, L.M., Slack, J.M., Volkmann, L.E. (1996), Actin binding and proteolysis by the Baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. *Virology* 216, 380-388
- Lehner, P.J., Surman, M.J., Cresswell, P. (1998), Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line 0.220. *Immunity* 8, 221-231
- Lewis, J.W., Elliot, T. (1998b), Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr. Biol.* 8, 717-720
- Lewis, J.W., Sewell, A., Price, D., Elliot, T. (1998a), HLA-A*0201 presents TAP-dependent peptide epitopes to cytotoxic T lymphocytes in the absence of tapasin, *Eur. J. Immunol.* 28, 3214-3220
- Li, S., Paulsson, K.M., Sjögren, H.O., Wang, P. (1999), Peptide-bound major histocompatibility complex class I molecules associate with tapasin before dissociation from transporter associated with antigen processing. *J. Biol. Chem.* 274, 8649-8654
- Li, S., Sjögren, H.O., Hellman, U., Petterson, H.F., Wang, P. (1997), Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8708-8713
- Lindquist, J.A., Hämmerling, G.J., Trowsdale, J. (2001), ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *FASEB J.* 15, 1448-1450

- Lindquist, J.A., Jensen, O.N., Mann, M., Hämmerling, G.J., (1998), ER-60: a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *EMBO J.* 17, 2186-2195
- Luckow, V.A. (1995), in *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides* (Eds.: Shuler, M.L., Wood, H.A., Granados, R.R., Hammer, D.A.), John Wiley and Sons, New York, Seiten 51-90
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., Olins, P.O. (1993), Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli.*, *J. Virol.* 67, 4566-4579
- Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., 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, 1035-1038
- Marguet, D., Spiliotis, E.T., Pentcheva, T., Lebowitz, M., Schneck, J., Edidin, M. (1999), Lateral diffusion of GFP-tagged H-2L^d molecules and of GFP-TAP1 reports on the assembly and retention of these molecules in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 11, 231-240
- Missiakas, D., Raina, S. (1997), Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471
- Nössner, E., Parham, P. (1995), Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med.* 181, 327-337
- Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampé, R., Spies, T., Trowsdale, J. (1997), A critical role for tapasin in the assembly of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-1309

- Peh, C.A., Burrows, S.R., Barnden, M., Khanna, R., Cresswell, P., Moss, D.J., McCluskey, J. (1998), HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 8, 531-542
- Princiotta, M.F., Finzi, D., Qian, S.B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. (2003), Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354
- Purcell, A.W., Gorman, J.J., Garcia-Peydro, M., Paradela, A., Burrows, S.R., Talbo, G.H., Laham, N., Peh, C.A., Reynolds, E.C., Lopez De Castrp, J.A., McCluskey, J. (2001), Quantitative and qualitative influence of tapasin on the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* 166, 1016-1027
- Purcell, A.W., Kelly, A.J., Peh, C.A., Dudek, N.L., McCluskey, J. (2000), Endogenous and exogenous factors contributing to the surface expression of HLA-B27 on mutant APC. *Hum. Immunol.* 61, 120-130
- Pyle, L.E., Barton, P., Fujiwara, Y., Mitchell, A., Fidge, N. (1995), Secretion of viologically active human proapolipoprotein A-I in a baculovirus-insect cell system: protection from degradation by protease inhibitors. *J. Lipid Res.* 36, 2355-2361
- Qiu, J., Swartz, J.R., Georgiou, G. (1998), Expression of active human tissue type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4891-4896
- Rammensee, H.-G., Friede, T., Stevanovic, S. (1995), MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228
- Rietsch, A., Beckwith, J. (1998), The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* 32, 163-84

- Sachdev, D., Chirgwin, J.M. (1998), Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 933-937
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., 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
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, 7.3
- Saric, T., Chang, S.C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L. (2002), An IFN- γ induced aminopeptidase in the ER, ERAAP, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3, 1169-1176
- Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N. (2002), ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-483
- Shields, M.J., Kubota, R., Hodgson, W., Jacobson, S., Biddison, W.E., Ribaldo, R.K. (1998), The effect of human β_2 -microglobulin on major histocompatibility complex I peptide loading and the engineering of a high affinity variant. *J. Biol. Chem.* 273, 28010-28018
- Shinde, U., Inouye, M. (1996), Propeptide-mediated folding in subtilisin: the intramolecular chaperone concept. *Adv. Exp. Med. Biol.* 379, 147-154
- Skerra, A. (1994), Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131-135

- Smith, M.H., Nuara, A.A., Egen, J.G., Sirjani, D.B., Lam, K.S., Grimes, W.J. (1998), Baculoviral expressed HLA class I chains used to screen a synthetic peptide library for allele-specific peptide binding motifs. *Mol. Immunol.* 35, 1033-1043
- Solheim, J.C., Harris, M.R., Kindle, C.S., Hansen, T.H. (1997), Prominence of β_2 -microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interaction of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J. Immunol.* 158, 2236-2241
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986), Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-30
- Sugita, M., Brenner, M.B. (1994), An unstable β_2 -microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and is then stabilized by binding peptide. *J. Exp. Med.* 180, 2163-2171
- Tan, P., Kropshofer, H., Mandelboim, O., Bulbuc, N., Hämmerling, G.J., Momburg, F. (2002), Recruitment of MHC class I molecules by tapasin in the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading. *J. Immunol.* 168, 1950-1960
- Teifel, M., Heine, L.T., Milbredt, S., Friedl, P. (1996). Optimization of transfection of human endothelial cells, *Endothelium* 5, 21-35.
- Thomas, J.G., Baneyx, F. (1999), 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
- Turnquist, H.R., Vargas, S.E., Reber, A.J., McIlhaney, M.M., Li, S., Wang, P., Sanderson, S.D., Gubler, B., van Endert, P., Solheim, J.C. (2001), A region of tapasin that affects L^d binding and assembly. *J. Immunol.* 167, 4443-4449

- Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Tampé, R. (1997), Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 8976-8981
- Uebel, S., Tampé, R. (1999), Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 203-208
- Van Leeuwen, J.E., Kears, K.P. (1996), Deglycosylation of N-linked glycans is an important step in the dissociation of calreticulin-class I-TAP complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13997-14001
- Voss, S., Skerra, A. (1997), Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982
- Williams, A.P., Chen, A.P., Purcell, A.W., McCluskey, J., Elliot, T. (2002), Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16, 509-520
- York, I.A., Chang, S.C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., Rock, K.L. (2002), The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3, 1177-1184
- Zhang, Q., Tecotr, M., Salter, R.D. (1995), Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J. Biol. Chem.* 270, 3944-3948
- Zhang, Y., Olsen, D.R., Nguyen, K.B., Olsen, P.S., Rhodes, E.T., Mascarenhas, D. (1998), Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 12, 150-165

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracyclin
AU	Absorptionseinheiten (<i>absorption units</i>)
a.u.	<i>arbitrary units</i>
β_2m	β_2 -Mikroglobulin
β -ME	β -Mercaptoethanol
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Baculovirus
C	Cytidin
CD	<i>circular dichroism</i>
cDNA	komplementäre DNA
Δ SS	Deletion der Signalsequenz
Δ TM	Deletion der Transmembrandomäne
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
HABA	4'-Hxdroxy-benzolazo-2-benzoesäure
HC	schwere Kette (<i>heavy chain</i>) des MHC-Klasse I-Moleküls
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

His ₁₀	10xHistidin-Tag
His ₆	6xHistidin-Tag
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IB	Inclusion Bodies
IDA	Iminodiacetic acid
Ig	Immunglobulin
IMAC	immobilisierte Metall-Chelat-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
mAU	milli Absorptionseinheiten
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MHC	Major histocompatibility complex
NTA	Nitrilotriacetic acid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI-Mix	Protease-Inhibitor-Mix
RE	Restriktionsenzym
RT	Raumtemperatur (23-25°C)
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	Insektenzelllinie (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
T	Thymin
t	Zeit (<i>time</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin

U Enzymeinheiten (*Units*)
ÜN über Nacht

Lebenslauf

Name	Stefan Ammer
Geburtsdatum	11. August 1969
Geburtsort	München
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
<hr/>	
Schulbildung	Grundschule am Ravensburger Ring, München Wittelsbacher Gymnasium, München Juni 1989 Abitur
<hr/>	
Studium	Studium der Diplom-Biologie an der Julius Maximilians- Universität Würzburg Mai 1993 Vordiplom Oktober 1996 Diplom
<hr/>	
Diplomarbeit	Oktober 1996 – Oktober 1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. M. J. Lohse am Institut für Pharmakologie des Klinikums der Julius Maximilians- Universität Würzburg "Mechanismen der Aktivitätsregulierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren"
Doktorarbeit	Seit März 1997 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Tampé am Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried, an der Phillips-Universität Marburg und an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt "Funktionale Expression des ER-Chaperons Tapasin und Charakterisierung der Interaktion von Tapasin mit MHC- Klasse I-Molekülen <i>in vitro</i> "

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Tampé für die intensive Betreuung und Förderung sowie die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tampé danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt den Münchner Doktoranden Kurt Pawlitschko, Ulf Rädler, Lars Neumann, Stephan Übel, Anja Jestel und Stefanie Urlinger für die herzliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe und die vielen netten Abende und Wochenenden.

Herzlicher Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Marburg und Frankfurt für ihre Kollegialität und Unterstützung. Insbesondere danke ich Lutz Schmitt für seine ständige Diskussionsbereitschaft und kreativen Anmerkungen vor allem in der Endphase der Arbeit. Herzlicher Dank auch an Jacob Piehler und Rupert Abele für ihre Vorschläge und Hilfsbereitschaft. Eva Janas und Min Chen danke ich für die zahlreichen Übernachtungen in Frankfurt. Silke Hutschenreiter und Carsten Horn danke ich dafür, dass sie meist auch für kurzfristige Entscheidungen an ÄKTA- oder SMART-System zu haben waren. Stanislav Gorbulev danke ich für die Hilfe am Rechner. Besonderer Dank gilt Eckhard Linker für die Unterstützung in der Zellkultur.

Besonders bedanken für das Korrekturlesen möchte ich mich bei Eva, Nicki, Silke, Anja, Ulf und Kurt.

Der grösste Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht haben.

Eidesstattliche Erklärung

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

Frankfurt am Main, den 5. Juni 2003

Stefan Ammer