

**Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur
Substratspezifität von Mitgliedern der
Proteindisulfidisomerase-Familie**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Andreas Funkner

geboren am 17.09.1982 in Leipzig (Sachsen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Fischer
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Rudi Glockshuber

Ort und Tag der öffentlichen Verteidigung: Halle (Saale), 10.04.2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.07.2007 - 30.04.2011 an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in der Arbeitsgruppe von Dr. David M. Ferrari durchgeführt.

Literaturverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum (ER)	1
1.1.1. Allgemeine Aufgaben des ER	1
1.1.2. Qualitätskontrolle im ER	2
1.2. ER-Stressantwort	3
1.2.1. Die <i>unfolded protein response</i> (UPR)	3
1.2.2. Die ER-assoziierte Degradation (ERAD)	3
1.3. ER-Faltungshelfer und molekulare Chaperone	5
1.3.1. Hitzeschockproteine (Hsp)	5
1.3.1.1. Immunoglobulin-bindendes Protein (BiP; Grp78)	5
1.3.1.2. Endoplasmin (Grp94; Gp96)	6
1.3.2. Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> -Isomerasen (PPIasen)	6
1.3.3. Calnexin und Calreticulin (Cnx, Crt)	7
1.3.4. Proteindisulfidisomerasen (PDIs)	7
1.3.5. ER-Oxidoreductase 1 (ER-Sulfhydryloxidase; Ero1)	8
1.4. Biochemische Eigenschaften von PDIs	10
1.4.1. Redoxaktivität von PDIs	10
1.4.2. Chaperon- und Anti-Chaperon-Aktivität von PDIs	13
1.5. Substratinteraktion von PDIs	14
1.5.1. PDI-Interaktionspartner	14
1.5.1.1. Substrate von PDIs	14
1.5.1.2. PDI-Multiproteinkomplexe	15
1.5.2. Substratspezifität von PDIs	15
1.5.3. Kontrolle der Substratbindung bei PDIs	18
1.6. Die PDI-Familie	19
1.6.1. Domänen-Aufbau von PDIs	19
1.6.2. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von PDIs	20
1.6.2.1. PDI	20
1.6.2.2. ERp57	23
1.6.2.3. P5	24
1.6.2.4. ERp29	25
1.6.2.5. ERp46	26
1.6.2.6. Weitere ausgewählte PDIs	27
1.7. Die Rolle von PDIs bei der Krankheitspathogenese	29
1.8. PDI-Inhibitoren	30
1.9. Peptid-Arrays	31
1.10. Problemstellung und Ziele dieser Arbeit	33
2. Materialien und Methoden	34
2.1. Materialien	34
2.1.1. Chemikalien	34
2.1.2. Standards und Kits	35
2.1.3. Enzyme und weitere Proteine	35
2.1.4. Medien und Antibiotika	36
2.1.5. Bakterienstämme und Plasmide	37
2.1.6. Oligodesoxynukleotide	39
2.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe für die Proteinmarkierung	39

2.1.8. Antikörper	39
2.1.9. Mäusestämme	40
2.1.10. Puffer und Lösungen	40
2.1.11. Technische Ausrüstung	44
2.2. Methoden.....	47
2.2.1. Gentechnische Methoden	47
2.2.1.1. Herstellung chemokompetenter E. coli-Zellen.....	47
2.2.1.2. Transformation und Kultivierung von E. coli-Zellen.....	47
2.2.1.3. Bestimmung der optischen Dichte	47
2.2.1.4. Plasmidpräparation aus E. coli XL1-Blue.....	48
2.2.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration	48
2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion	48
2.2.1.8. Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittener DNA	49
2.2.1.9. Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden	49
2.2.1.10. Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmide	50
2.2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.2.1.12. Ethanol-Fällung von DNA	50
2.2.1.13. E. coli-Hitzeschock Analyse	51
2.2.2. Allgemeine proteinchemische Methoden.....	51
2.2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
2.2.2.2. Bestimmung freier SH-Gruppen durch Reaktion mit DTNB (Ellman-Test) ..	52
2.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.2.2.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	54
2.2.2.5. Western-Blot	54
2.2.2.6. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen	55
2.2.2.7. Limitierte Proteolyse	55
2.2.2.8. Thrombinspaltung	56
2.2.2.9. Chemische Kopplung mit Dimethyl-adipimidat (DMA)	56
2.2.2.10. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	57
2.2.2.11. Kopplung von Proteinen an eine CNBr-aktivierte Sepharose Matrix.....	58
2.2.2.12. Mikrosomenpräparation aus muriner Leber.....	58
2.2.2.13. Rekombinante Proteinexpression.....	59
2.2.3. Chromatographische Reinigung von PDIs.....	60
2.2.3.1. Ni ²⁺ -Affinitätsreinigung (Ni-NTA).....	60
2.2.3.2. Starke Anionenaustauschchromatographie (MonoQ)	61
2.2.3.3. Glutathion-Affinitätsreinigung (GSH-Agarose) und Thrombinspaltung.....	61
2.2.3.4. Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	61
2.2.4. Bestimmung des Molekulargewichtes von PDIs	62
2.2.4.1. Analytische Gelfiltration	62
2.2.4.2. Analytische Ultrazentrifugation	63
2.2.5. Redox- und Chaperon-Aktivitätstests	63
2.2.5.1. Insulin-Reduktionstest.....	64
2.2.5.2. RNase-Rückfaltungstest	64
2.2.5.3. Citratsynthase-Aggregationstest.....	64
2.2.6. Spektroskopische Methoden	65
2.2.6.1. UV-Vis-Absorptionsspektroskopie	65
2.2.6.2. Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie).....	65
2.2.6.3. Fluoreszenz-Spektroskopie	66
2.2.7. Denaturierungsübergänge.....	67

2.2.8. Protein- und Peptid-Interaktionsstudien.....	68
2.2.8.1. Bindungsstudien mit immobilisierten Proteinen (Far-Western/Dot-Blot-Analyse)	68
2.2.8.2. Bindungsstudien mit immobilisierten Peptiden (Peptid-Array).....	69
2.2.8.3. Bestimmung der Interaktionspartner von PDIs (pull-down Analyse).....	70
2.2.9. 2D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)	71
2.2.9.1. Gießen von diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen	71
2.2.9.2. Passive Rehydrierung.....	71
2.2.9.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)	72
2.2.9.4. Diskontinuierliche SDS-PAGE (zweite Dimension)	72
2.2.10. Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	73
2.2.11. Proteinkristallisation.....	74
2.2.11.1. Ansetzen unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen.....	74
2.2.11.2. Datenmessung und Strukturbildung.....	75
3. Ergebnisse	76
3.1. Klonierung der P5a, -a' und -aa' Konstrukte	76
3.2. Expression und Reinigung von PDIs	76
3.3. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von ERp46.....	77
3.4. Bestimmung der Redox- und Chaperon-Aktivität von PDIs	79
3.4.1. Bestimmung der Reduktase-Aktivität	79
3.4.2. Bestimmung der Oxidase-Aktivität.....	81
3.4.3. Bestimmung der Chaperon-Aktivität	83
3.5. Strukturelle Charakterisierung von ERp46 und P5	85
3.5.1. Spektroskopische Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur.....	86
3.5.2. Strukturelle Untersuchungen mittels Denaturierungsmittel-abhängiger Übergänge	87
3.5.3. Struktureller Vergleich von P5 und ERp46 mittels limitierter Proteolyse.....	90
3.5.4. Proteinkristallisation.....	92
3.5.4.1. Kristallisations-screening von P5 und ERp46.....	92
3.5.4.2. Datensammlung und Strukturlösung des C-terminalen ERp46-Fragmentes ..	94
3.6. Protein-Bindungsstudien (<i>Far-Western</i> Analyse).....	102
3.6.1. Fluoreszenzmarkierung von PDIs	102
3.6.2. Bindung von PDIs an FKBP12.6 und FKBP13	104
3.6.3. Modulierung der Proteininteraktion durch Tyr-haltige Peptide.....	105
3.6.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Proteininteraktion	106
3.6.5. Einfluss des konservierten Trp-Restes auf die Proteininteraktion	107
3.7. Peptid-Bindungsstudien (Peptid-Array Analyse).....	108
3.7.1. Statistische Auswertung der Peptid-Bindungskapazität.....	108
3.7.2. Statistische Auswertung der Peptid-Bindungsselektivität.....	113
3.7.3. Statistische Auswertung der Redundanz der Peptid-Interaktion.....	120
3.7.4. Statistische Auswertung der Sekundärstruktur von gebundenen Peptide	122
3.7.5. Interaktion mit humanen Peptid-Antigenen	123
3.7.6. Einfluss von Detergenzien auf die Peptid-Interaktion	125
3.7.7. Vorhersage von potentiellen Bindungsepitopen auf PDI-Interaktionspartnern ...	126
3.7.7.1. RNaseA-Bindungsepitope	126
3.7.7.2. ERp29-Bindungsepitope	127
3.7.7.3. PDI-Bindungsepitope	128
3.7.7.4. ERp57-Bindungsepitope	131
3.7.7.5. Calnexin-Bindungsepitope	132
3.7.7.6. Ero1 α -Bindungsepitope.....	134

3.7.7.7. BiP-Bindungsepitope	136
3.8. Identifikation von Interaktionspartnern von ERp18 und ERp46 (<i>pull-down</i> Analyse)	137
3.8.1. Identifizierung von ERp18-Interaktionspartnern	137
3.8.2. Vergleichende Analyse der Substratinteraktion von ERp46 und ERp29.....	142
3.9. Identifikation und Charakterisierung von niedermolekularen PDI-Liganden.....	143
3.9.1. <i>In vitro-screening</i> mittels Peptid-Arrays.....	143
3.9.2. Analyse der Bindungsspezifität.....	144
3.9.3. Einfluss auf die katalytische Aktivität	145
4. Diskussion.....	147
4.1. Allgemeine strukturelle und funktionelle Eigenschaften von ERp46 und P5.....	147
4.1.1. Der Domänen-Aufbau bestimmt die Oligomerisierung von ERp46 und P5.....	147
4.1.2. ERp46 und P5 zeigen eine hohe intramolekulare Flexibilität.....	148
4.1.3. Die katalytischen Domänen sind ausreichend für die Redoxaktivität von ERp46 und P5.....	149
4.1.4. Die katalytischen Domänen von ERp46 und P5 besitzen Chaperon-Eigenschaften	150
4.2. Interaktion von PDIs mit Substraten	152
4.2.1. PDIs interagieren mit denaturiertem FKBP13 aber nicht mit FKBP12.6.....	152
4.2.2. Der pH-Wert beeinflusst die Interaktion von PDIs mit Substraten.....	153
4.2.3. ERp18 interagiert mit Komponenten des sekretorischen Weges	155
4.3. Peptid-Bindungsspezifität von PDIs	159
4.3.1. Detergenzien beeinflussen die Peptid-Interaktion von PDIs.....	159
4.3.2. Die einzelnen Domänen von PDIs zeigen einen Aviditäts-Effekt	160
4.3.3. PDIs binden bevorzugt Peptide mit aromatischen Resten und Arginin.....	162
4.3.4. PDIs zeigen eine hohe Redundanz der Peptid-Interaktion.....	163
4.3.5. PDIs zeigen eine Präferenz für β -Stränge in gebundenen Peptiden.....	164
4.3.6. Strukturelle Eigenschaften von PDIs determinieren die Peptid-Bindungsspezifität	165
4.3.7. Die Peptid-Bindungsspezifität bildet die molekulare Grundlage der katalytischen Aktivität und Chaperon-Funktion von PDIs	166
4.3.8. AGR2 bindet an Peptide aus krankheitsassoziierten Proteinen	168
4.4. Vorhersage von Bindungsepitopen auf PDI-Interaktionspartnern	169
4.4.1. PDIs interagieren mit basischen Sequenzbereichen und aromatischen Resten....	169
4.4.2. PDIs binden an funktionelle Bereiche ihrer Interaktionspartner.....	170
4.5. Struktur-Funktions-Beziehung der katalytischen Domänen von ERp46.....	173
4.5.1. Ein flexibler Trp-Rest reguliert die Substrat-Komplementarität der katalytischen Domänen	173
4.5.2. Die katalytischen Cys-Reste der ERp46a'-Domäne liegen bevorzugt im reduzierten Zustand vor.....	177
4.5.3. Die räumliche Anordnung der katalytischen Domänen von ERp46 bildet die Grundlage der effizienten Substratbindung.....	179
4.6. CSB als potentieller PDI-Inhibitor.....	181
4.7. Abschließende Bemerkungen.....	183
5. Zusammenfassung und Ausblick	184
A. Literaturverzeichnis.....	186
B. Abkürzungen	197
C. Anhang.....	199

1. Einleitung

1.1. Proteinfaltung im Endoplasmatischen Retikulum (ER)

1.1.1. Allgemeine Aufgaben des ER

Auf Grund der fundamentalen Notwendigkeit der kontrollierten Proteinfaltung sind viele Bestandteile der „Faltungs-Maschinerie“ phylogenetisch stark konserviert. Im Folgenden wird, soweit nicht anders angegeben, immer vom Säugetier-Modell ausgegangen.

Proteine sind selbstorganisierende Systeme und ihre native Struktur ist unmittelbar in ihrer Aminosäuresequenz kodiert [1]. Das Erreichen der nativen Struktur eines Proteins ist *in vivo* in vielen Fällen komplizierter. Zum einen ist es oft essentiell, dass die Faltung in einem minimalen Zeitfenster abläuft (meist weniger als 1 sec). Zum anderen interagiert quasi jedes Protein während seiner Faltung mit weiteren Proteinen, was wiederum zur Bildung von intermediären oder persistenten Aggregaten führen kann. Darüber hinaus ist es in der Regel essentiell, dass das Protein zum Erreichen seiner biologischen Funktion posttranslationelle Modifikationen erfährt. Als wichtigste posttranslationelle Modifikation zählt neben der N-Glykosylierung auch die korrekte Verknüpfung der Cystein-Reste eines Proteins zu Disulfidbrücken (s. Abschnitt 1.4.1.). Hinzu kommt, dass zahlreiche Proteine nur in oligomerer (oft disulfid-verknüpfter) Form biologisch aktiv sind. Das Einfügen von Disulfidbrücken und die damit verbundene intra- und intermolekulare kovalente Verknüpfung erhöht die Stabilität von Proteinen und deren Oligomeren. Dies ist besonders für sekretorische Proteine von essentieller Bedeutung, da diese nach dem Verlassen der Zelle ihren Kontakt zur Proteinfaltungs- und Modifizierungsmaschinerie verlieren. Das Einfügen von (transienten) Disulfidbrücken verringert zudem die Flexibilität bestimmter Proteinbereiche, was bei der Faltung eine wichtige Rolle spielt. Hinzu kommt, dass Disulfidbrücken innerhalb eines katalytisch aktiven Proteins oft auch regulatorische Funktion besitzen können.

Neben dem Cytosol stellt das ER das wichtigste Kompartiment für die Faltung und posttranslationelle Modifikation von Proteinen dar [2]. Ungefähr ein Drittel aller menschlichen Proteine falten innerhalb des ER [3]. Neben den o.g. posttranslationellen Modifikationen der N-Glykosylierung und Disulfidverknüpfung stellt das ER den einzigen Reaktionsraum für weitere Modifikationen wie beispielsweise die Bildung von Formyl-Glycin und die γ -Carboxylierung von Blutgerinnungsfaktoren dar. Im ER findet zudem der Hauptanteil der Lipidsynthese für Membranen der Zelle statt [3]. Das ER besitzt darüber hinaus eine wichtige Rolle als Calciumspeicher der Zelle. Die Calciumkonzentration des ER

ist signifikant höher als die des Cytosols, wobei zahlreiche ER-Proteine die Fähigkeit zur Bindung von freiem Calcium besitzen [2]. Der pH-Wert des ER wiederum ist ähnlich dem Cytosol und liegt ungefähr im neutralen Bereich [2]. Auf der anderen Seite ist der pH-Wert des Golgi-Apparates signifikant niedriger. Das Redoxpotential des ER wird durch sein molares Verhältnis von oxidiertem (GSSG) zu reduziertem Glutathion (GSH) wiedergegeben und beträgt etwa 1:3. Im Gegensatz dazu ist das Cytosol weitaus reduzierender und das Verhältnis [GSSG]:[GSH] beträgt hier ungefähr 1:60 [2, 4]. Die Bildung von Disulfidbrücken im Cytosol ist ausgeschlossen und findet bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Mitochondrien, extrazellulärer Raum und Periplasma von Gram-negativen Bakterien) nur im ER statt [3].

Die Faltung von (sekretorischen) Proteinen wird im ER durch die Anwesenheit von Chaperonen und Faltungsenzymen unterstützt (s. Abschnitt 1.3.). Zu den Chaperonen zählen u.a. Mitglieder der Hsp70-Familie (BiP und Grp170), J-Domänen-Proteine der Hsp40-Familie und mit Grp94 ein Mitglied der Hsp90-Familie. Hinzu kommen Lektin-Chaperone wie Calnexin (Cnx) und Calreticulin (Crt), welche spezifisch mit Zuckerresten auf glykosylierten Proteinen interagieren [5]. Zu der Klasse der ER-Faltungsenzyme zählen die Protein-disulfidisomerasen (PDIs) sowie die Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), welche die *cis/trans*-Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen katalysieren [5]. ER-Chaperone und Faltungsenzyme interagieren (transient) mit sich faltenden Proteinen und katalysieren langsame Faltungsschritte bzw. verhindern die Bildung von Proteinaggregaten. ER-Chaperone und Faltungsenzyme machen ca. 15-25 % des gesamten löslichen Proteingehaltes einer Zelle aus und erreichen innerhalb des ER Konzentrationen im mM-Bereich [2].

1.1.2. Qualitätskontrolle im ER

Ein Großteil der Proteine, die co- oder posttranslationell ins ER gelangen, verlassen dieses auch wieder über den so genannten sekretorischen Weg mittels COPII-Vesikel (anterograder Transport); (s. Abb. 1). Der sekretorische Weg führt dabei vom ER über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment (ERGIC) zum *cis*-Golgi und anschließend über das *trans*-Golgi-Netzwerk zur Cytoplasmamembran. ER-residente Proteine, oder Proteine, welche ihre native Struktur nicht vollständig erreichen, werden entweder im ER zurückgehalten (ER-Retention) oder ins ER zurücktransportiert (ER-Rückführung). Die Rückführung geschieht mittels COPI-Vesikeln (retrograder Transport). Die Retention oder Rückführung von ER-residenten Proteinen wird über ihre KDEL-Retentions-/Rückführungssignale vermittelt [2].

Die Retention bzw. Rückführung von nicht-nativ gefalteten Proteinen geschieht vermutlich über deren hydrophobe Wechselwirkung mit ER-Chaperonen, wie beispielsweise

BiP und Grp94. Zusätzlich zu nicht-kovalenten Wechselwirkungen trägt die kovalente Bindung von Proteinen und Chaperonen über intermolekulare Disulfidbrücken zur ER-Retention/-Rückführung bei. Ein Beispiel hierfür ist die ERp44-abhängige Retention von IgM in differenzierenden B-Lymphocyten [6-8]. Der Prozess der Erkennung nicht-nativ gefalteter Proteine und deren ER-Retention/-Rückführung wird als ER-Qualitätskontrolle bezeichnet.

Glykosylierte Proteine verfügen über einen zusätzlichen Mechanismus der Qualitätskontrolle, den so genannten Calnexin/Calreticulin-Zyklus (s. Abb. 1); [2]. Glykosylierte Proteine durchlaufen den Cnx/Crt-Zyklus dabei so lange, bis sie ihre native Struktur angenommen haben.

1.2. ER-Stressantwort

1.2.1. Die *unfolded protein response* (UPR)

Die Signaltransduktionswege der *unfolded protein response* (UPR) stellen einen „Sensor“ dar, der auf veränderte Proteinkonzentrationen innerhalb des ER reagiert. Diese Veränderungen in der Proteinkonzentration (beispielsweise bei der Akkumulation von nicht-nativ gefalteten Proteinen) werden über mehrere Schritte an den Zellkern weitergegeben. Dort kommt es zu einer gesteigerten Transkribierung von spezifischen UPR-Zielgenen [9]. Das ER ist dadurch in der Lage sich den veränderten Bedingungen rasch anzupassen, beispielsweise durch Expansion des ER-Lumen, durch die gesteigerte Synthese bestimmter Chaperone oder durch den vermehrten Abbau von fehlgefalteten Proteinen (ERAD; s. Abschnitt 1.2.2.); [2]. Die Reaktion auf den „ER-Stress“ geschieht über drei Signaltransduktionswege: den Ire1/XBP-1-, den ATF6- sowie den PERK-Weg (s. Abb. 1); [9].

1.2.2. Die ER-assozierte Degradation (ERAD)

Proteine, welche trotz Durchlaufen der ER-Qualitätskontrolle nicht ihre native Struktur erreichen, werden proteolytisch abgebaut. Der proteolytische Abbau geschieht dabei nicht im ER selbst. Die fehlgefalteten Proteine werden in diesem Fall durch das Retro-Translokation, bestehend aus den Transmembranproteinen Derlin-1,-2,-3, ins Cytosol zurücktransportiert und dort ubiquitiniert. Anschließend erfolgt der Abbau durch das Proteasom (ER-assozierte Degradation; ERAD) [2]. Die Kopplung der ER-Qualitätskontrolle mit einem effizienten proteolytischen System ist essentiell für die Erkennung und Beseitigung fehlgefalteter Proteine. Auf welche Weise zwischen nativ gefalteten Faltungsintermediaten und nicht-nativ gefalteten Proteinen unterschieden wird, ist unklar. Eine Hauptrolle kommt

jedoch vermutlich den ER-Chaperonen BiP sowie PDI zu [2]. Glykosylierte Proteine, die den Cnx/Crt-Zyklus mehrfach erfolglos durchlaufen, werden demannosyliert (*Mannose-trimming*) und schließlich ebenfalls über ERAD abgebaut. Die Mechanismen der ER-Qualitätskontrolle, ERAD und UPR sind zusammengefasst in Abb. 1 dargestellt.

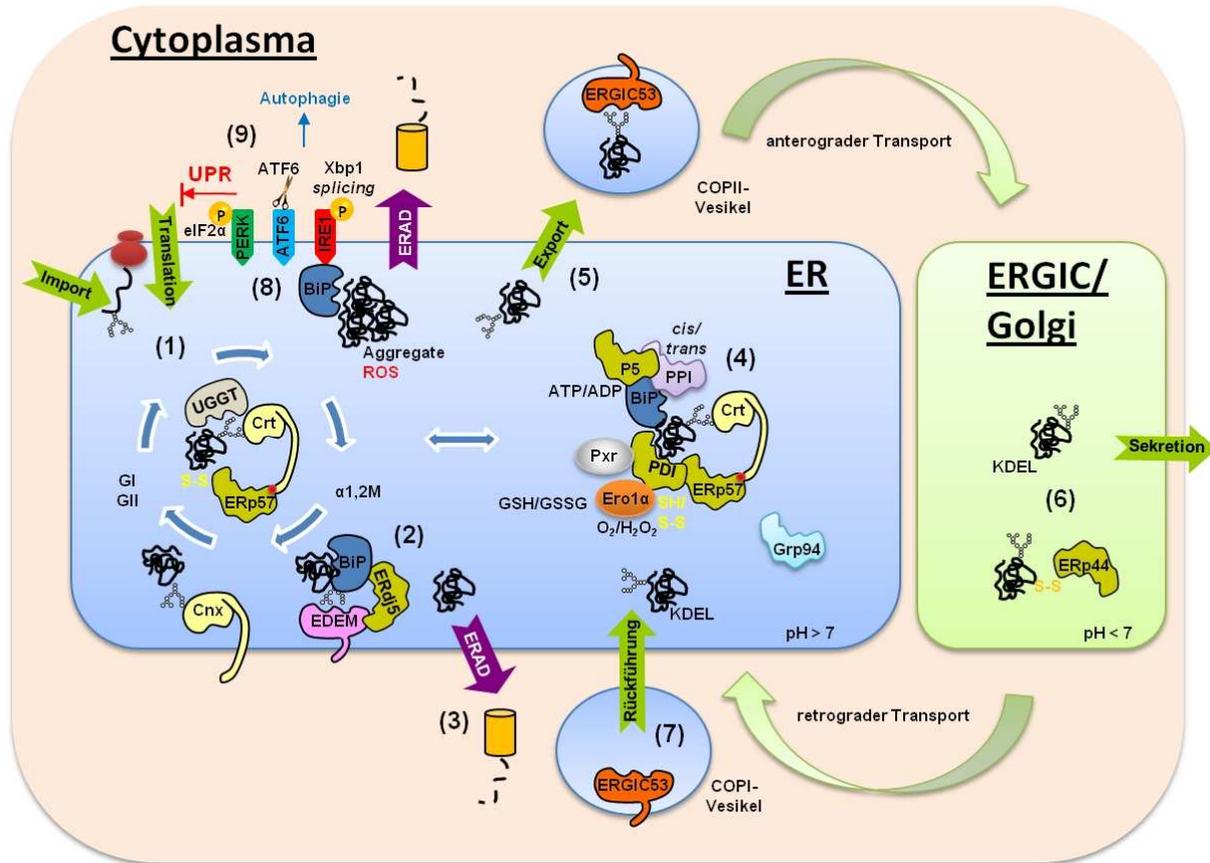


Abbildung 1: ER-Qualitätskontrolle, *Unfolded Protein Response* (UPR) und ER-assoziierte Degradation (ERAD). Neu synthetisierte glykosylierte Proteine falten im ER mit Hilfe der Lektin-Chaperone Cnx und Crt (Calnexin/Calreticulin-Zyklus); (1). Das Glykosylierungsmuster auf der Proteinoberfläche besteht dabei aus mehreren Mannose- sowie drei terminalen Glucose-Resten. Das sekretorische Protein durchläuft die Glucosidase I und -II (GI, GII) katalysierten Glucosylierungs- und Deglucosylierungsschritte mehrfach, bis es seine native Struktur angenommen hat (*trimming*). Cnx und Crt binden solange spezifisch an mono-glucosylierte Proteine, bis der letzte Glucoserest durch GII abgespalten wurde. Das Chaperon UGGT erkennt nicht-nativ gefaltete Proteine, reglucosyliert sie und schleust sie zurück in den Zyklus. ERp57 interagiert mit Cnx/Crt und assistiert bei der oxidativen Proteinfaltung. Demannosylierte Proteine werden von dem Lektin EDEM im Komplex mit BiP und ERdj5 gebunden, was zu deren Retention im ER und anschließendem Abbau führt (2). Nicht-nativ gefaltete Proteine werden über die ERAD im Cytosol ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut (3). Partiiell nativ gefaltete Proteine können auch weitere Zyklen der ER-Qualitätskontrolle bis zum Erreichen ihrer nativen Struktur durchlaufen. Die Proteinfaltung wird im ER durch Multi-Chaperon-Komplexe katalysiert (4). PDIs katalysieren Reduktions-, Oxidations-, und Isomerisierungs-Reaktionen der Cys-Reste bzw. Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins. Oxidationsäquivalente werden durch Ero1 α , Peroxiredoxine (Pxr) oder GSSG bereitgestellt. PPIasen katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolylbindungen in Proteinen. Die Wechselwirkungen von Substratproteinen mit BiP sind dagegen energieabhängig. Nativ gefaltete deglucosylierte Proteine verlassen das ER über den sekretorischen Weg in COPII-Vesikeln durch Interaktion mit dem ERGIC53-Rezeptor (anterograder Transport); (5). Im Golgi bzw. ERGIC kann eine Disulfid-abhängige Retention der Proteine, z.B. durch Interaktion mit ERp44, erfolgen (6). Proteine, welche ein ER-Rückführungssignal enthalten, werden in COPI-Vesikeln ins ER zurücktransportiert (retrograder Transport); (7). Die UPR wird bei ER-Stress über die ATF6-, IRE1- oder PERK-Signaltransduktionswege eingeleitet (8). Die Auslösung aller drei Signaltransduktionswege erfolgt durch die Dissoziation von BiP von der lumenalen

Domäne des jeweiligen transmembranen ER-Rezeptors. Nach Aktivierung von Ire1 bzw. PERK kommt es zur Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung des jeweiligen Rezeptors. Dies führt zur Aktivierung der Endonukleaseaktivität der cytosolischen Domäne von Ire1 bzw. zur Aktivierung der intrinsischen Kinaseaktivität der cytosolischen Domäne von PERK. Als Folge der Aktivierung von Ire1 kommt es zu einem *splicing* der Vorläufer mRNA XBP-1. Das XBP-1 Protein steuert innerhalb des Zellkerns die Transkribierung bestimmter UPR-Zielgene. Die Aktivierung von PERK resultiert in der Phosphorylierung des Transkriptions-Initiierungsfaktors eIF2 α . Phosphorylierter eIF2 α bewirkt die Inhibierung der Proteintranslation. Im Falle des ATF6-Signaltransduktionsweges führt die Dissoziation von BiP zur Translokation des Rezeptors zum Golgi, wo die cytosolische ATF6-Effektordomäne (p50) proteolytisch abgespalten wird. P50 bewirkt im Zellkern die *trans*-Aktivierung von UPR-Zielgenen. Bei Versagen der ER-Qualitätskontrolle und Akkumulation von nicht-nativ gefalteten Proteinen werden die ERAD und/oder Autophagie-Mechanismen eingeleitet (9). Nach [5].

1.3. ER-Faltungshelfer und molekulare Chaperone

1.3.1. Hitzeschockproteine (Hsp)

1.3.1.1. Immunoglobulin-bindendes Protein (BiP; Grp78)

Im ER von Säugern stellen die Klasse der Hitzeschockproteine (Hsp) zusammen mit den Proteindisulfidisomerasen (s. Abschnitt 1.3.4.) hinsichtlich der Menge den Hauptanteil an ER-Chaperonen. Eine wichtige Rolle als ER-Vertreter der Hsp70-Familie spielt dabei das Immunoglobulin-bindende Protein BiP. Das etwa 75 kDa große Protein setzt sich aus zwei Domänen zusammen. Einer N-terminalen Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) mit ATPase-Aktivität sowie einer durch einen flexiblen *linker* verbundenen C-terminalen Domäne mit putativen Substratbindungseigenschaften (SBD), (s. Abb. 65); [10]. Die Hydrolyse von ATP induziert eine Konformationsänderung der NBD, was wiederum zu einer verstärkten Assoziation der SBD mit Substraten führt. Der Austausch von ADP durch ATP führt zur Dissoziation des Substrates. Die Interaktion zwischen NBD und SBD über allosterische Effekte sowie Interaktionen mit Co-Chaperonen und Nukleotid-Austauschfaktoren hängen in hohem Maße von der Konformation der NBD ab [10]. Die Aktivität von BiP wird von Co-Chaperonen der Hsp40-Klasse mit so genannten J-Domänen reguliert. Die Assoziation von BiP mit seinen Co-Chaperonen erfolgt über die NBD und bewirkt eine Stimulierung der ATPase-Aktivität [2]. Ein Mitglied der Hsp40-Familie mit J-Domäne stellt beispielsweise das ebenfalls zur PDI-Familie zählende ER-lokalisierte DnaJ-Homologe ERdj5 dar [11]. Den Hsp70-Proteinen homolog sind die ebenfalls zur Klasse der Hitzeschockproteine gehörenden Hsc70-Mitglieder (Hitzeschockprotein-Verwandte). Als Nukleotid-Austauschfaktor von Hsc70/Hsp70 wirken beispielsweise die Proteine der Bag-Familie (Bcl2-assoziierten Athanogene); [12]. BiP bindet bevorzugt an Peptide mit hydrophoben und aromatischen Aminosäuren [13-15]. BiP wurde außerdem als Bestandteil in mehreren Multiproteinkomplexen nachgewiesen (s. Abschnitt 1.3.2.); [16].

1.3.1.2. Endoplasmin (Grp94; Gp96)

Grp94 mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa stellt den einzigen Vertreter der Klasse der Hsp90-Familie innerhalb des ER dar und ist nach BiP mengenmäßig das zweithäufigste ER-Chaperon in Säugerzellen [2]. Strukturell kann das Protein in drei Domänen gegliedert werden: eine N-terminale regulatorische Domäne mit Nukleotid-Bindungseigenschaft, eine mittlere Domäne sowie eine C-terminale Domäne, welche die Homodimerisierung vermittelt [17]. In Analogie zu BiP bewirken tertiäre und quaternäre Umordnungen eine Regulation der ATP-Hydrolyse sowie Modulierung der Substratbindung.

Grp94 spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung zahlreicher sekretorischer Proteine, so z.B. von Immunoglobulinen, der MHC-Klasse II-Untereinheit, Thyroglobulin, Procollagen und allen Toll-like Rezeptoren. Grp94 besitzt, ebenso wie BiP, die Fähigkeit zur Bindung von Peptiden [18]. Zudem wird eine Beteiligung von Grp94 bei der Bindung und Präsentation von krankheitsassoziierten Peptid-Antigenen angenommen [19]. Hsp90-Inhibitoren repräsentieren einen vielversprechenden Ansatz bei der Entwicklung von Therapien, z.B. gegen Krebs [20].

1.3.2. Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerasen (PPIasen)

Die konformationelle Flexibilität von Polypeptidketten spielt nicht nur bei der Faltung von Proteinen eine wichtige Rolle, sondern ist auch bei der Regulation von katalytischen Aktivitäten, Komplexbildungen und Substratinteraktionen essentiell. Die Verknüpfung von Aminosäuren in Polypeptiden kann auf Grund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung in *cis* oder *trans* vorliegen [21]. Die Gleichgewichtskonstante der *cis/trans*-Isomerisierung einer normalen Peptidbindung in Proteinen favorisiert die *trans*-Konformation mit einem Faktor von etwa 10^3 - 10^4 . Eine Ausnahme bildet dabei die Peptidyl-prolylbindung. In diesem Fall liegen etwa 5-30 % der Peptidbindungen in der *cis*-Konformation vor, die auch überwiegend in nativen Proteinen, wie z.B. RNaseA, gefunden wird [22]. Die Isomerisierung der beiden Konformationen wird durch Mitglieder der Enzymklasse der Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerasen katalysiert [22, 23]. Innerhalb des ER von Säugern kommt mit Cyclophilin B (CyP-22) ein Vertreter der Klasse der Cyclophiline vor. Zudem enthält das ER sechs Mitglieder der Klasse der FK506-bindenden Proteine (FKBPs); [2]. Cyclophilin B wurde in Multiproteinkomplexen in Assoziation mit IgG gefunden, während FKBP23 in Komplexen mit BiP vorkommt [5]. Für FKBP13 wurde eine Interaktion (in denaturierter Form) mit ERp29, einem Mitglied der PDI-Familie, *in vitro* nachgewiesen [24]. Eine Interaktion von PPIasen mit weiteren ER-Chaperonen wird angenommen.

1.3.3. Calnexin und Calreticulin (Cnx, Crt)

Die homologen ER-Chaperone Calnexin und Calreticulin gehören zur Klasse der Lektine. Bei Cnx handelt es sich um ein etwa 65 kDa großes Membran-assoziiertes Protein. Das ca. 45 kDa große Crt kommt dagegen frei im ER-Lumen vor. Beide Chaperone binden spezifische Zuckermodifikationen auf der Oberfläche von glycosylierten Proteinen. *In vitro*-Experimente zeigten eine Selektivität von Cnx für Glc₁Man₉-Zuckermodifikationen. Cnx/Crt sind zudem wichtige Faktoren bei der UPR und ERAD (Calnexin/Calreticulin-Zyklus; s. Abschnitt 1.1.2.); [9]. Zusätzlich zur Interaktion mit Zuckerresten konnte eine Interaktion von Cnx/Crt mit Peptiden nachgewiesen werden, wobei hydrophobe aliphatische Aminosäuren bevorzugt gebunden werden [25-27]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch Crt gebundene Peptide die Immunantwort induzieren können [26]. Mehrere Cofaktoren, wie beispielsweise Ca²⁺ und Zn²⁺, beeinflussen die strukturellen Eigenschaften von Cnx/Crt. Die Assoziation von Cnx/Crt mit Substraten und Co-Chaperonen ist ATP-unabhängig [2]. Crt ist zudem Bestandteil des *peptide-loading-complex* (PLC), (s. Abschnitt 1.6.2.2.); [28].

Mit Ausnahme der transmembranen Domäne von Cnx unterscheiden sich beide Proteine kaum in ihrer Struktur. Sie setzen sich aus einer globulären Domäne (Kopf-Domäne) sowie einer langgestreckten P-Domäne (Schwanz-Domäne) zusammen (s. Abb. 62). Die Kopfdomäne enthält das aktive Zentrum für die Bindung von Zuckerresten und Ca²⁺, die P-Domäne ist wenig strukturiert und reich an Pro- sowie sauren Resten [29, 30]. Das Ende der isolierten P-Domäne assoziiert *in vitro* mit der **b'**-Domäne von ERp57, einem Mitglied der PDI-Familie [31, 32]. Darüber hinaus konnte kürzlich eine Interaktion der Crt/Cnx P-Domäne mit der Peptidyl-prolyl *cis/trans*-Isomerase Cyclophilin B nachgewiesen werden [33]. Direkte Interaktionen von Cnx/Crt mit weiteren ER-Chaperonen wurden bisher nicht nachgewiesen.

1.3.4. Proteindisulfidisomerasen (PDIs)

Innerhalb des ER katalysieren Proteindisulfidisomerasen (PDIs) die Bildung (Oxidation), Auflösung (Reduktion) und Umlagerung (Isomerisierung) von Disulfidbrücken in einem Substratprotein (intramolekulare Disulfidbrücken) oder zwischen mehreren Substratproteinen (intermolekulare Disulfidbrücken). Die Klasse der humanen PDI-Familie stellt mit ihren 20 bekannten Mitgliedern zahlenmäßig den größten Anteil an ER-Chaperonen. Der Namensgeber dieser Klasse von Proteinen, PDI selbst (EC. 5.3.4.1.), wurde als einer der ersten Katalysatoren der Proteinfaltung vor mehr als 40 Jahren entdeckt [34]. Neben seiner Redoxaktivität besitzt PDI zudem die Eigenschaft eines Chaperons, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (s. Abschnitt 1.4.2.); [35, 36]. PDI und einigen seiner Homologen konnten ebenfalls

Peptid-Bindungseigenschaften zugeordnet werden (s. Abschnitt 1.5.2.); [3, 37]. Einige PDIs verfügen darüber hinaus über die Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung und stellen damit einen wichtigen Calcium-Speicher innerhalb des ER dar [2]. Den meisten PDIs gemein ist das Vorhandensein eines C-terminalen KDEL- (oder KDEL-homologen) Rückführungssignals. Obgleich wurden PDIs vereinzelt auch außerhalb des ER, z.B. im ER-Intermediärkompartiment (ERGIC), auf der Zelloberfläche, in Mitochondrien sowie im Zellkern nachgewiesen [7, 38-42].

Die Mitglieder der PDI-Familie variieren in der Zusammensetzung ihrer Domänen (s. Abschnitt 1.6.1.). Nicht alle PDIs besitzen die klassische Redoxaktivität. PDIs, welche die katalytischen Domänen (**a**-Domänen) mit der Konsensussequenz PWCXXC besitzen, sind redox-aktiv. PDIs, die ausschließlich aus nicht-katalytischen Domänen (**b**-Domänen) aufgebaut sind, sind redox-inaktiv (s. Abb. 5); [43]. Die Zuordnung von Proteinen in die PDI-Familie liegt demnach weniger in ihren katalytischen Aktivitäten und Eigenschaften als Chaperone begründet, vielmehr beruht sie auf der gemeinsamen Lokalisation im ER sowie auf Ähnlichkeiten in der Sequenz und Proteinstruktur [44].

PDI stellt zugleich das primäre "Oxidationsmittel" innerhalb des ER dar. Seine Oxidationsäquivalente erhält es dabei durch direkte Interaktion mit der ER-Oxidoreduktase Ero1 α (s. Abschnitt 1.3.5.). *Knockout* von PDIs führt allgemein zur Lethalität des Organismus, meist schon im embryonalen Stadium [45]. PDI spielt eine essentielle Rolle, sowohl bei der Redox-Homeostase als auch bei der ER-Qualitätskontrolle sowie der ERAD. ER-Stress führt zu einem raschen Anstieg des Expressionslevels von PDI. Mitglieder der PDI-Familie sind außerdem bei entwicklungsphysiologischen Vorgängen, der Blutgerinnung oder der Immunantwort beteiligt (s. Abschnitt 1.6.2.). PDIs interagieren mit weiteren ER-Chaperonen und sind Bestandteil von enzymatisch aktiven Multiproteinkomplexen [5].

Im Fokus der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der Proteindisulfidisomerasen steht die Bestimmung ihrer Substratspezifität. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die Charakterisierung der physiologischen Funktion der einzelnen PDIs sowie die Identifizierung ihrer natürlichen Interaktionspartner und Wechselwirkung mit anderen ER-Chaperonen.

1.3.5. ER-Oxidoreduktase 1 (ER-Sulphydryloxidase; Ero1)

Der ständige Export von nativ gefalteten Proteinen aus dem ER führt zu einem Netto-Ausstrom von Oxidationsäquivalenten. Dieser muss von einem entsprechenden Ausstrom von Reduktionsäquivalenten kompensiert werden. Dieser Elektronenfluss und damit die gesamte Redox-Homeostase wird neben PDI maßgeblich durch die ER-Oxidoreduktase 1 (Ero1)

bewerkstelligt [4]. Die Oxidation von Substraten durch PDI führt zur Reduktion des katalytischen CXXC-Motivs. Um weitere Substrate oxidieren zu können, ist es erforderlich, dass das aktive Zentrum von PDI wieder re-oxidiert wird. Dies geschieht durch die etwa 50 kDa große ER-luminale Sulphydryloxidase Ero1. In Analogie zu Ero1p aus *S. cerevisiae*, existieren im ER von Säugerzellen mit Ero1 α und Ero1 β zwei Homologe.

Sowohl Ero1p als auch Ero1 α interagieren direkt mit PDI [46]. Ero1 α besitzt eine Oberflächen-exponierte flexible regulatorische Schleife mit einem CXXXXC-Motiv (*shuttle*-Cysteine). Es wird angenommen, dass PDI eine intermolekulare Disulfidbrücke mit den *shuttle*-Cys von Ero1 α ausbildet und in seiner oxidierten Form wieder abgespalten wird [47, 48]. Das katalytische Zentrum der a'-Domäne von PDI wird hierbei bevorzugt oxidiert [49]. Die reduzierten *shuttle*-Cys wiederum werden über einen internen Dithiol-Disulfid-Austausch durch die Cystine des rigiden katalytischen CXXC-Motivs im aktiven Zentrum von Ero1 re-oxidiert. Die katalytischen Cys geben die Elektronen über den gebundenen Cofaktor (FAD) direkt an molekularen Sauerstoff weiter (s. Abb. 2).

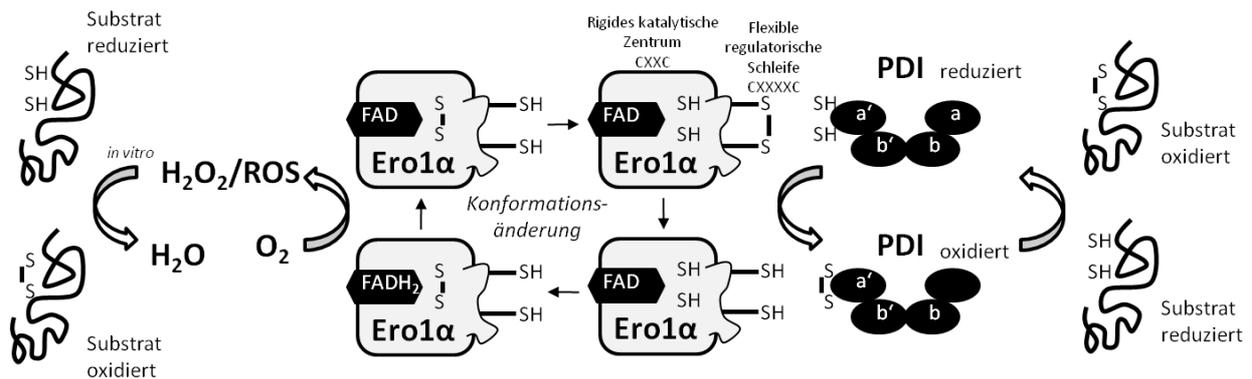


Abbildung 2: Der Elektronenfluss von PDI zu Ero1 α . Nach der Oxidation von Substraten muss das katalytische CXXC-Motiv der katalytischen Domänen von PDI wieder reoxidiert werden. Dies geschieht über das CXXXXC-Motiv in der regulatorischen Schleife von Ero1 α . Die Elektronen werden anschließend an das katalytische CXXC-Zentrum von Ero1 α übertragen und gelangen von dort zum gebundenen Co-Faktor FAD. FADH₂ überträgt die Reduktionsäquivalente schließlich direkt an molekularen Sauerstoff. Die dabei gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie H₂O₂ können in stöchiometrischen Mengen u.U. ebenfalls zur oxidativen Proteinfaltung beitragen. Nach [2].

Im Ergebnis dieses Prozesses kommt es zur Bildung von H₂O₂ und zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Obgleich die entstehenden Produkte potentiell toxisch für die Zelle sind, konnte nachgewiesen werden, dass geringe Mengen an H₂O₂ keinen oxidativen Schaden während der Proteinfaltung verursachen. *In vitro* bewirken stöchiometrische Mengen an H₂O₂ im Vergleich zu GSH/GSSG eine effizientere oxidative Rückfaltung von Modellproteinen [50].

Die Redoxaktivität von Ero1 kann zusätzlich über zwei weitere regulatorische Disulfidbrücken im Protein reguliert werden [51]. Während des Dithiol-Disulfid-Austausches kommt es innerhalb des Proteins zu signifikanten konformationellen Änderungen, die sowohl die flexible regulatorische Schleife als auch benachbarte Bereiche sowie das aktive Zentrum betreffen [52, 53]. Die über die regulatorischen Cys induzierten konformationellen Änderungen in Ero1 α und die dadurch hervorgerufene Modulierung der Redoxaktivität ermöglichen es damit dem Protein auf Änderungen im Disulfid-Export und Thiol-Import ins ER äußerst sensitiv zu reagieren.

Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur PDI, sondern auch ERp57 direkt mit Ero1 α interagieren, wobei die Ero1 α -Affinität von ERp57 im Vergleich zu PDI geringer ist [53]. Kovalente, disulfidverknüpfte Komplexe von weiteren PDIs mit Ero1 α konnten vor kurzem in *pull-down* Experimenten identifiziert werden (s. Abschnitt 1.5.1.); [54]. *Knockout* von Ero1 hat allerdings nur einen geringen Einfluss auf den "Disulfid-Haushalt" des Organismus [55]. Die Interaktion von mehreren PDIs mit der Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKOR) könnte ein weiteres Redox-Relais innerhalb des ER darstellen [56]. *In vivo* wird das bei der Bildung von Disulfidbrücken entstehende H₂O₂ durch die ER-lokalisierte Thioredoxin-Peroxidase Peroxiredoxin-4 (Prx4) metabolisiert. Die katalytische Aktivität von Prx4 hängt von der Reduktion der Disulfidbrücke in dessen aktiven Zentrum ab. Neuste Studien deuten darauf hin, dass mehrere PDI-Familienmitglieder für die Reduktion von Prx4 und damit für dessen *recycling* verantwortlich sind [57-59]. Auf der anderen Seite werden die PDIs durch Prx4 effizient oxidiert. Die Oxidation von PDI durch Prx4 könnte damit, neben der Oxidation durch Ero1 α , einen weiteren alternativen Reaktionsweg für die Bildung von Disulfidbrücken im ER darstellen [60].

1.4. Biochemische Eigenschaften von PDIs

1.4.1. Redoxaktivität von PDIs

PDI und einige seiner Homologen verfügen über die Fähigkeit zur Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbindungen (s. Abschnitt 1.3.4.). Klassische Experimente zur Messung der Redoxaktivität von PDI nutzen beispielsweise reduzierte und denaturierte RNaseA oder Insulin als Substrate [61-63].

Vergleicht man das Redoxpotential von PDI mit anderen bekannten Oxidoreduktasen so zeigt sich, dass es mit ca. -160 mV bis -180 mV eine mittlere Position annimmt (s. Abb. 3); [2, 63]. Die Redoxpotentiale von DsbA aus dem Periplasma von *E. coli* sowie von dem im

Cytoplasma lokalisierten Thioredoxin liegen mit ca. -110 mV bzw. -260 mV deutlich darüber bzw. darunter. Die a- und a'-Domäne von PDI unterscheiden sich mit ihrem Redoxpotential von -188 mV bzw. -152 mV ebenfalls deutlich voneinander [64].

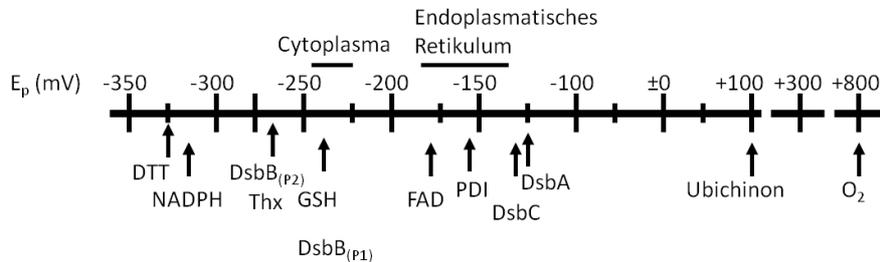


Abbildung 3: Redoxpotentiale von Proteinen und niedermolekularen Verbindungen. Dargestellt sind die ungefähren Dimensionen der Redoxpotentiale (E_p) einiger cytoplasmatischer Proteine sowie Proteine des ER. Zusätzlich sind als Vergleich die Redoxpotentiale einiger niedermolekularer Verbindungen gekennzeichnet. Je negativer die Werte von E_p , desto reduzierender wirkt die jeweilige Verbindung. Das Redoxpotential von PDI liegt bei ca. -160 mV bis -180 mV und nimmt dabei eine mittlere Position ein. Das Redoxpotential von PDI trägt u.a. dazu bei, dass das Enzym sowohl als Reduktase als auch als Oxidase fungieren kann. Nach [63].

Das Redoxpotential von PDI wird maßgeblich durch sein katalytisches Zentrum mit der kanonischen CXXC-Sequenz bestimmt. Auch die zum CXXC-Motiv benachbarten Aminosäuren tragen über elektrostatische Wechselwirkungen zur Beeinflussung des Redoxpotentials bei [63]. Ferner wird die Oxidase-Aktivität von PDIs *in vitro* durch den pH-Wert des Reaktionsmilieus bestimmt [65]. Neben der Beeinflussung des Redoxpotentials des aktiven Zentrums durch direkt benachbarte Reste, können auch in der Primärstruktur weiter entfernte Aminosäuren durch einen räumlich engen Kontakt das Redoxpotential der reaktiven Cys modulieren. Beispielsweise konnten für die konservierten Arg120 der PDIIa-Domäne sowie Arg461 der a'-Domäne eine Modulation des Redoxpotentials der reaktiven Cys nachgewiesen werden [66, 67]. Die Arg-Seitenkette bewegt sich dabei in das aktive Zentrum hinein, was einen direkten Einfluss v.a. auf den pK_a -Wert des C-terminalen Cys hat.

Die reaktive Spezies bei PDI-katalysierten Redoxreaktionen ist das Thiolat-Anion der Cysteine im aktiven Zentrum. Die Bildung von Thiolat-Anionen in inneren hydrophoben Bereichen eines Proteins wird durch die Ausbildung von Salzbrücken mit räumlich benachbarten positiv geladenen Resten (z.B. Arg; s.o.) stark begünstigt. Auf der anderen Seite wirken benachbarte negativ geladene Gruppen der Bildung von Thiolat-Anionen entgegen [63]. Der pK_a -Wert des N-terminalen Cys der katalytisch aktiven Domänen in PDI wird mit 4,4 bis 6,7 angegeben und liegt damit deutlich unter dem normalerweise beobachteten Wert von ca. 8,2. Der pK_a -Wert des C-terminalen Cys ist beträchtlich höher und beträgt etwa 12,8 [63]. Der C-terminale Cys-Rest liegt demnach hauptsächlich in der protonierten Thiol-

Form vor. Während des katalytischen Zyklus der Reoxidation von PDI muss der C-terminale Cys-Rest jedoch als Thiolat-Anion vorliegen. Dies wird durch eine Konformationsänderung in der katalytischen Domäne bewirkt, wodurch der pK_a -Wert auf <7 gesenkt wird [63]. Das Reaktionsschema der PDI-katalysierten Redoxreaktionen ist in Abb. 4 zusammengefasst [3].

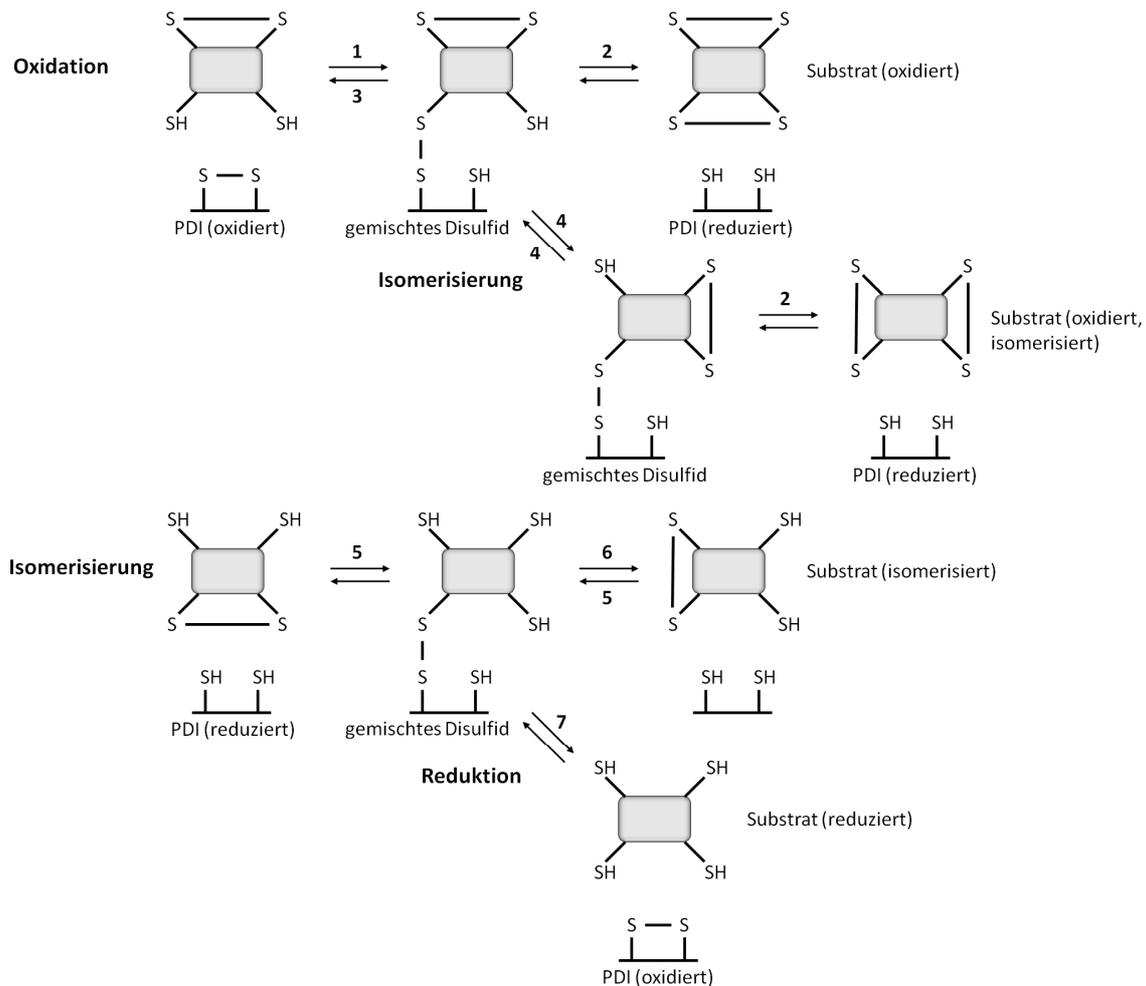


Abbildung 4: Reaktionsschema der PDI-katalysierten Redoxreaktionen. Die Redoxreaktionen gehen von PDI entweder in seiner oxidierten Form (oben), oder in seiner reduzierten Form (unten) aus. Der erste Schritt bei Oxidationsreaktionen erfordert die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke durch nucleophilen Angriff des C-terminalen Cys im reaktiven Zentrum. PDI in seiner oxidierten Form ist dann in der Lage eine intermolekulare Disulfidbrücke durch nucleophilen Angriff des N-terminalen Cys-Restes mit Cys-Resten von Substratproteinen auszubilden (1). Das gemischte Disulfid kann dabei drei unterschiedlichen Reaktionen eingehen. Der nucleophile Angriff eines Substrat-Thiolats führt zur Bildung einer Disulfidbrücke innerhalb des Substrates (2). PDI geht aus dieser Reaktion reduziert hervor. Auf der anderen Seite führt der nucleophile Angriff des C-terminalen Cys der aktiven Seite zur Auflösung des gemischten Disulfides ((3); *escape*-Mechanismus). Der nucleophile Angriff eines Substrat-Thiolats auf die Substrat-Disulfidbrücke hat nach Auflösung des gemischten Disulfides eine Isomerisierung der Disulfidbrücke innerhalb des Substratproteins zur Folge (4). Der nucleophile Angriff von PDI in seiner reduzierten Form erfordert ebenfalls die Aktivierung des N-terminalen Cys-Restes im aktiven Zentrum. Die Auflösung einer Disulfidbrücke im Substrat führt wiederum zur Bildung des gemischten Disulfides (5). Der nucleophile Angriff eines Substrat-Thiolats resultiert in der Isomerisierung der Disulfidbrücke im Substrat, während PDI nach der Reaktion in seiner reduzierten Form vorliegt (6). Der nucleophile Angriff des C-terminalen Cys-Restes im katalytischen Zentrum von PDI führt zu Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke im Enzym. Das Substrat liegt nach der Reaktion im reduzierten Zustand vor, während PDI oxidiert ist (7). Oxidiertes PDI kann durch GSH erneut reduziert werden. Reduziertes PDI kann durch Ero1 α oder GSSG reoxidiert werden (nicht gezeigt). Nach [3].

Je nach Zusammensetzung der Reste des CXXC-Motivs können die verschiedenen PDIs Oxidase-, Reduktase-, Isomerase- oder mehrere Eigenschaften gleichzeitig besitzen. PDIs mit nur einem Cystein im aktiven Zentrum (z.B. CXXS, SXXC) verfügen jedoch ggf. weiterhin über die Fähigkeit zur Ausbildung von gemischte Disulfiden mit ihren Substraten und können ebenfalls direkte Isomerisierungsreaktionen eingehen (s.o.). Die isolierten katalytischen Domänen von PDI können einfache Oxidations- sowie Reduktionsreaktionen eingehen. Für komplexere Isomerisierungsreaktionen wird oft eine lineare Anordnung mehrerer redox-aktiver (und redox-inaktiver) Domänen benötigt [44].

Die Mutation des C-terminalen Cys-Restes der katalytischen CXXC-Sequenz im aktiven Zentrum von PDI zu Ser oder Thr macht einen nucleophilen Angriff auf den N-terminalen Cys-Rest unmöglich. Dies führt zur Stabilisierung der ansonsten kurzlebigen intermolekularen Disulfidbrücke zwischen PDI und seinem Substratprotein. Die auf diese Weise "gefangenen" PDI-Substratkomplexe lassen sich beispielsweise nach einem *pull-down* mittels 2D-SDS-Gelelektrophorese auftrennen und massenspektrometrisch identifizieren (*Cys-trapping*-Methode); [3]. Der C-terminale Cys-Rest wird allerdings für die Bildung der intramolekularen Disulfidbrücke im katalytischen Zentrum sowie für die Auflösung von gemischten Disulfiden (*escape*-Mechanismus) benötigt. Mit der *Cystein-trapping*-Methode können daher keine PDI-Substratkomplexe identifiziert werden, die über Oxidations- sowie direkte Isomerisierungsreaktionen verlaufen (vgl. Abb. 4).

1.4.2. Chaperon- und Anti-Chaperon-Aktivität von PDIs

Das ER enthält zwei Klassen von Faltungshelfern: Proteinfaltungs-Katalysatoren und molekulare Chaperone. PDIs besitzen beide Funktionen zugleich. Sie katalysieren, d.h. beschleunigen die ansonsten langsam ablaufende Bildung von nativen Disulfidbrücken. Auf der anderen Seite wirken PDIs als Chaperone, indem sie der Aggregation von Proteinen ohne Disulfidbrücken entgegenwirken [3]. Die Chaperon-Aktivität von PDI wurde in klassischen *in vitro*-Experimenten durch die Rückfaltung von Modell-Proteinen, wie z.B. Citratsynthase, untersucht. PDI begünstigt die *in vitro*-Renaturierung mehrerer rekombinanter Proteine, wie z.B. des Antikörperfragmentes (F_{ab}), des Tumor Nekrosefaktors α ($TNF\alpha$), des Trypsin-Inhibitors (BPTI) sowie von Proinsulin [68, 69].

Neben der Chaperon-Aktivität konnten für mehrere PDIs auch eine Anti-Chaperon-Aktivität zugeordnet werden, die möglicherweise bei der Entfaltung nativer Proteine und deren retrograden Transport über die ER-Membran eine Rolle spielt [70]. PDI katalysiert *in vivo* die Entfaltung von nativem Cholera-Toxin, während ERp29 das VP1-Hüllprotein des

Polyomavirus bindet und entfaltet [71-73]. Substöchiometrische Mengen an PDI können zudem die Ausbeuten bei der *in vitro*-Renaturierungen von Proteinen verringern [74].

Obwohl die katalytische Redoxaktivität und Chaperon-Aktivität von PDIs oft als zwei unterschiedliche Eigenschaften in der Literatur beschrieben werden, so sind sie doch eng miteinander verknüpft. Für beide Eigenschaften ist die Erkennung und Interaktion des Faltungshelfers mit seinem (nicht-nativen) Substrat essentiell (s. Abschnitt 1.5.). Während der Umordnung von Disulfidbrücken muss gleichzeitig die Aggregation des Substrates verhindert werden. Zudem ist es notwendig, dass PDI während der Faltung auch Disulfidbrücken erreichen kann, die im Inneren des Substratproteins verborgen liegen [3].

1.5. Substratinteraktion von PDIs

1.5.1. PDI-Interaktionspartner

1.5.1.1. Substrate von PDIs

Bereits in früheren Arbeiten konnten vereinzelt Mitgliedern der PDI-Familie mittels *cross-linking* Experimenten sowie durch Co-Immunopräzipitation spezifische Substrate zugeordnet werden (s. Abschnitt 1.6.2.). In jüngster Zeit gewinnt die *pull-down* Methode der Cystein-*trapping*-Mutanten mit nachfolgender Analyse der Interaktionspartner mittels 2D-SDS-PAGE und massenspektrometrischer Identifikation, an Bedeutung (vgl. Abschnitt 1.4.1.); [3]. Damit konnten kürzlich mehrere Substrate der PDI-Familienmitglieder PDI, ERp57, ERp46 und ERp18 identifiziert werden [54]. Obgleich eine gewisse Redundanz hinsichtlich der Substratspezifität existiert, konnten einzelnen PDIs spezifische Substrate zugeordnet werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass ERp18 eine Spezifität gegenüber Pentraxin-3 (PTX3), einer Komponenten der Komplement-Kaskade, besitzt. Auf der anderen Seite zeigt ERp46 eine Spezifität für die Bindung der Thioredoxin-Peroxidase Peroxiredoxin-4 [54]. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass neben PDI auch andere Mitglieder der PDI-Familie mit VKOR assoziieren [56]. Ero1 α stellt nicht nur einen wichtigen Interaktionspartner von PDI, sondern auch von zahlreichen weiteren PDI-Familienmitgliedern dar [54]. Weitere bisher identifizierte PDI-Interaktionspartner sind im Anhang in Tabelle 5 sowie im Abschnitt 1.6.2. aufgeführt.

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Mutation des C-terminalen Cys des aktiven Zentrums (Cystein-*trapping*-Mutation; s. Abschnitt 1.4.1.) nicht nur die Reaktivität des N-terminalen Cys verändert, sondern auch einen Einfluss auf die Substratspezifität haben

kann [67, 75]. Eine Identifizierung von nicht-kovalenten PDI-Substratkomplexen über *pull-down* Experimente wäre demnach anzustreben, scheitert jedoch häufig an der niedrigen Affinität von PDIs zu ihren Substraten (s. Abschnitt 1.5.2.).

1.5.1.2. PDI-Multiproteinkomplexe

Trotz der großen Vielfalt an ER-Chaperonen schenkte man ihrer Interaktion und Kooperation während der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle bisher nur wenig Aufmerksamkeit. Erst in jüngster Zeit wurde zunehmend deutlich, dass die verschiedenen Chaperone innerhalb des ER z.T. die selben Substrate haben und sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität nur wenig voneinander unterscheiden. So konnten eine Reihe von Multiproteinkomplexen identifiziert werden, in denen mehrere Chaperone assoziiert sind. Mit dem Chaperon-Komplex, in welchem BiP, Grp94, P5, PDI, ERdj3, Cyclophilin B, ERp72, Grp170; UGGT und SDF2-L1 bei der Faltung von Immunoglobulinen und Thyroglobulin assoziiert sind, wurde der bisher größte solcher Multiproteinkomplexe gefunden [16, 76]. Die Interaktion von ERdj5 mit BiP sowie die Interaktion von ERp57 mit Cnx/Crt wurden bereits beschrieben (s. Abschnitt 1.3.). Interessanterweise scheinen auch die einzelnen PDIs (z.B. ERp57/ERp27, ERp57/ERp72) miteinander zu interagieren [77]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ähnlich zur Interaktion von ERp57 mit Cnx/Crt, die Substratspezifität von P5 teilweise durch dessen Interaktion mit BiP bestimmt wird [54]. Für das PDI-Familienmitglied PDILT konnte eine Interaktion mit seinem Lektin Calmegin nachgewiesen werden [78].

Inwieweit solche Chaperon-Komplexe statisch sind oder variabel je nach Anwesenheit des Substrates neu entstehen und wieder zerfallen, ist unklar. Auch bleibt die Frage unbeantwortet, ob diese Art von Multiproteinkomplexen innerhalb des ER räumlich lokalisiert sind, oder aber prinzipiell überall im ER entstehen können. Weiterhin könnte auch das umgebende Milieu des ER und nachfolgender Kompartimente einen Einfluss auf die Bildung und Stabilität derartiger Komplexe besitzen. Ebenfalls besteht Unklarheit über den molekularen Mechanismus der Interaktion der einzelnen Chaperone miteinander und ob eine Spezifität bzw. Selektivität für bestimmte Chaperone existiert. Dies erschwert das Verständnis der Wirkungsweise derartiger Chaperon-Komplexe hinsichtlich der Kooperation bei der Substratbindung und -faltung.

1.5.2. Substratspezifität von PDIs

Mit der Entdeckung weiterer neuer Mitglieder der stetig wachsenden Familie der Proteindisulfidisomerasen wurde die Frage aufgeworfen, inwieweit sich die einzelnen PDIs

funktionell voneinander unterscheiden. Während einige PDIs bevorzugt als Oxidase, Reduktase oder Isomerase wirken, besitzen andere PDIs mehrere Redoxaktivitäten gleichzeitig (s. Tabelle 6, Anhang). Zudem konnte die Existenz von mehreren redox-inaktiven PDIs mit der unterschiedlichen katalytischen Aktivität nicht erklärt werden. In jüngster Zeit wird sich daher vermehrt der Charakterisierung der Substratspezifität von PDIs zugewandt.

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Redoxreaktionen durch jedes PDI-Konstrukt katalysiert werden konnten, dass eine oder mehrere katalytische Domänen besitzt [79, 80]. Auf der anderen Seite erfordern Isomerisierungsreaktionen eine lineare Kombination von redox-aktiven Domänen sowie zusätzlich die redox-inaktive **b'**-Domäne. Für Isomerisierungsreaktionen in komplexeren Substraten hingegen war dagegen das gesamte PDI-Protein notwendig [81]. Historische *cross-linking* Experimente mit den Modell-Peptiden Mastoparan und Δ -Somatostatin sowie denaturierten Modell-Proteinen wie beispielsweise RNaseA zeigten, dass die **b'**-Domäne von PDI zwar essentiell und ausreichend für die Bindung von kleineren Peptiden ist, die katalytischen Domänen von PDI jedoch ebenfalls zur Bindung von längeren Peptiden und nicht-nativen Proteinen beitragen. [81-83]. Die **PDIb'**-Domäne wird demnach allgemein als die primäre Substratbindungsdomäne bezeichnet. Zudem konnten Reste innerhalb der **PDIb'**-Domäne identifiziert werden, deren Substitution zur Destabilisierung der Substratinteraktion führt [84]. In der Tat konnte kürzlich in strukturellen Untersuchungen mit **PDI1p**, des **bb'**-Konstruktes von PDI sowie von isolierten **b'**-Domänen-Varianten gezeigt werden, dass die **b'**-Domäne (zusammen mit einem Teil der **b**-Domäne) eine hydrophobe Tasche bildet, die bei der Interaktion mit Peptiden und Proteinen beteiligt ist (s. Abschnitt 1.6.2.1.); [85-88]. Die genaue Funktion und Beteiligung der übrigen Domänen bei der Substratbindung ist bisher unklar. In der **a'**-Domäne von PDI konnte eine putative Bindungsstelle für spezifische Tripeptide identifiziert werden, die jedoch nicht mit der katalytischen CXXC-Sequenz identisch ist [89]. Darüber hinaus trägt die **a'**-Domäne des **PDIb'a'**-Fragmentes zur Bindung des Modell-Peptides Mastoparan bei [90].

Die Bedeutung der Beteiligung von weiteren Domänen, neben der **b'**-Domäne, bei der Substratinteraktion wird dadurch verdeutlicht, indem einige Mitglieder der PDI-Familie keine **b'**-Domäne enthalten (z.B. ERp18, AGR, ERp46; s. Abschnitt 1.6.1.) und trotzdem die Fähigkeit zur Bindung von Substraten besitzen können. Ob diese Substratbindung auf kovalenten, disulfidverknüpften Substratkomplexen beruht, oder ob die einzelnen katalytischen Domänen zur nicht-kovalenten Bindung von Substraten beitragen, blieb bisher ungeklärt. Die **b'**- und **a'**-Domänen von PDI sind zudem essentiell für die Beteiligung von PDI als Untereinheit der Prolyl-4-Hydroxylase [91].

Die Affinität der **b'**-Domäne von PDI für Peptide liegt im Bereich von 0,25 μM , während die katalytischen Domänen eine noch geringere Affinität zeigen [3]. Es wird angenommen, dass die Beteiligung von mehreren schwach bindenden Domänen (mit mehreren Substratbindungsstellen) eine effektivere Substratinteraktion ermöglicht (Aviditätseffekt). Während der Faltung von Substratproteinen würde demnach die Affinität der einzelnen PDI-Domänen zum Substrat abnehmen, bis schlussendlich keine Domäne mehr bindet und das Substrat dissoziieren kann [3]. Obgleich steht ein experimenteller Beweis dieser Hypothese bisher aus. Die Affinität von PDIs zu ihren Substraten ist, wie für Chaperone üblich, sehr gering. Beispielsweise bindet BiP Peptide mit einer Affinität zwischen 10-60 μM . Das Lektin-Chaperon Calreticulin bindet seine Substrate mit einer Affinität von 2 μM , während ERp57 mit etwa 18 μM gebunden wird [3]. Eine niedrige Affinität von Chaperonen zu ihren Substraten ist von Vorteil, da während der Proteinfaltung eine hohe Dynamik hinsichtlich Substratbindung und Substratdissoziation benötigt wird [92]. Derart niedrige Substrataffinitäten machen eine Studie der Chaperon-Substratkomplexe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* äußerst schwierig. Eine kovalente Stabilisierung dieser Komplexe (z.B. mittels *cross-linking* oder *Cystein-trapping*-Mutationen) war deshalb bisher notwendig.

Hinsichtlich des molekularen Mechanismus der Substratbindung durch PDIs sowie der Determinierung ihrer Substratspezifität ist bisher nur wenig bekannt. Durch strukturelle Untersuchungen der Substratbindungstasche in der **b'**-Domäne von PDI wird angenommen, dass hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen bei der Substratbindung beteiligt sind [87, 88]. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Interaktion von PDI mit Peptiden sensitiv gegenüber höheren Konzentrationen an Triton X-100 zu sein scheint [93]. In NMR-Titrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass bestimmte hydrophobe und aromatische Reste innerhalb der Substratbindungstasche der PDI**b'**-Domäne mit Aminosäureresten in Modell-Peptiden interagieren [87, 88]. Die Beteiligung von spezifischen Resten des Substrates während der Bindung ist dagegen unklar. Es wird angenommen, dass multiple und redundante Wechselwirkungen mit dem Substrat bei der Interaktion beteiligt sind [88]. Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass PDI selektiv an Peptid-Antigene bindet und dass die Assoziation mit diesen Peptiden verstärkt unter reduzierenden Bedingungen erfolgt [94].

Im Falle des PDI-Familienmitgliedes PDIp konnte gezeigt werden, dass das Protein eine Bindungselektivität für Peptide mit einzelnen Tyr- oder Trp-Resten, ohne benachbarte negative Ladung aufweist [95]. Der Hydroxyaryl-Gruppe von Tyr wird bei der Bindung in PDIp eine besondere Rolle zugeschrieben [96]. Für ERp29 konnte vor Kurzem eine Präferenz der Bindung an Peptide mit aromatischen Resten sowie basischem Charakter nachgewiesen

werden [24]. Im Falle von ERp57 wird angenommen, dass dessen Substratspezifität hauptsächlich durch seine Co-Chaperone Cnx/Crt bestimmt wird und dass die **b'**-Domäne durch Assoziation mit Crt/Cnx die Fähigkeit zur Substratbindung verloren hat [32, 97].

Eine umfassende und systematische Charakterisierung der Substratspezifität der einzelnen PDIs scheiterte bisher v.a. an der Verfügbarkeit einer ausreichenden Anzahl an Modell-Substraten mit unterschiedlichen putativen Bindungsmotiven. Darüber hinaus existieren bisher keine strukturellen Untersuchungen von PDI-Substratkomplexen. Lediglich die Kristallstruktur des kovalenten ERp57/Tapasin-Komplexes erlaubte erstmals einen Einblick in den Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen eines Mitglieds der PDI-Familie [98].

1.5.3. Kontrolle der Substratbindung bei PDIs

Durch strukturelle Untersuchungen von Mitgliedern der PDI-Familie sowie der isolierten PD**Ib'**-Domäne konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Substraten an das Chaperon nicht willkürlich erfolgt, sondern vielmehr einer feinjustierten Kontrolle unterliegt. Im Falle der Substratbindungsstelle in der PD**Ib'**-Domäne kontrolliert der *x-linker*, welcher die **b'**- mit der **a'**-Domäne verbindet (s. Abschnitt 1.6.2.1.), die Interaktion mit Peptiden [86, 87]. Der *x-linker* bindet in der hydrophoben Substratbindungstasche und wird durch Modell-Peptide aus dieser verdrängt. Es liegt somit ein kompetitives Gleichgewicht zwischen der *x-linker*-gebundenen und Substrat-gebundenen **b'**-Bindungsstelle vor. Die Punktmutation I272A innerhalb der PDI **b'**-Domäne stabilisiert die *x-linker*-gebundene Konformation, obgleich das **bb'x**-Fragment die Eigenschaft zur Substratbindung beibehält [84, 86-88].

Auch für das PDI-Familienmitglied ERp44 konnte eine Abschirmung der hydrophoben Tasche in der **b'**- und **a**-Domäne durch den flexiblen C-terminalen Bereich des Proteins nachgewiesen werden [99]. Die Deletion des C-terminalen Bereiches führte zu einer signifikanten Erhöhung der katalytischen Aktivität des Proteins. Vergleichende strukturelle Analysen von PDI_{1p} und ERp57 deuten auf eine Flexibilität des Abstandes zwischen den katalytischen Domänen hin, was auch die Substratelektivität maßgeblich beeinflussen kann (s. Abschnitt 1.6.2.); [85, 98, 100]. Jüngste Untersuchungen von PDI aus *Humicola insolens* zeigten ein redox-abhängiges Rearrangement der **b'**- und **a'**-Domänen [90]. Die Oxidation des aktiven Zentrums führt zur Exponierung der hydrophoben Substratbindungstasche. Es wird angenommen, dass PDI sein Substrat solange bindet, bis es seine Oxidationsäquivalente auf das Substrat übertragen hat. Danach erfährt die Substratbindungsstelle eine Konformationsänderung und das oxidierte Substrat wird entlassen [90].

1.6. Die PDI-Familie

1.6.1. Domänen-Aufbau von PDIs

Basierend auf früheren Analysen zum Domänenaufbau von PDIs auf Grundlage von Ähnlichkeiten in der Primärsequenz, v.a. um das redox-aktive CXXC-Motiv, konnte die Zusammensetzung der Domänen einzelner PDIs später direkt mittels NMR- und Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden [43]. Die 20 bisher bekannten Mitglieder der humanen Proteindisulfidisomerase-Familie unterscheiden sich in der Anzahl und Zusammensetzung ihrer Thioredoxin (Trx)-ähnlichen Domänen (s. Abb. 5).

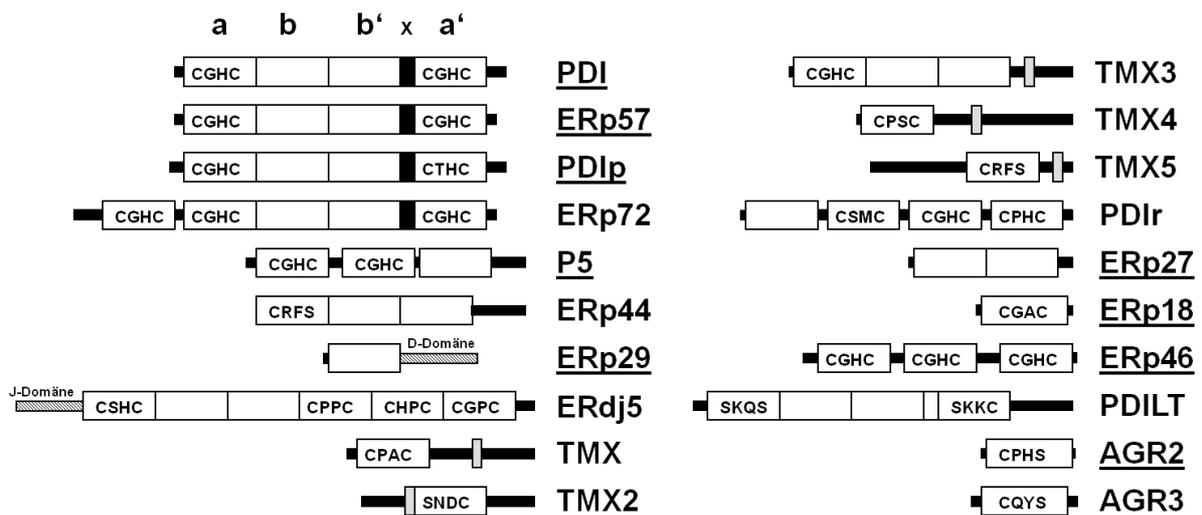


Abbildung 5: Domänen-Aufbau der humanen PDI-Familienmitglieder. Die humane PDI-Familie setzt sich aus bisher 20 bekannten Vertretern zusammen. Die einzelnen Mitglieder unterscheiden sich jeweils in ihrer Zusammensetzung aus redox-aktiven (**a/a'**) und redox-inaktiven (**b/b'**) Domänen mit Trx-ähnlicher Struktur (weiße Rechtecke). Die redox-aktiven Domänen enthalten das katalytische CXXC-Motiv (s. Kennzeichnung). Darüber hinaus verfügen einige Mitglieder der PDI-Familie über einen die **b'**- und **a'**-Domäne verbindenden *x-linker* (schwarz) sowie transmembrane Domänen (grau). ERp29 und ERdj5 besitzen zusätzlich zu ihren Trx-ähnliche Domänen eine **D**- bzw. **J**-Domäne (grau gestrichelt; s. Kennzeichnung). PDIs, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden, sind unterstrichen gekennzeichnet. Nach [3].

Die einzelnen Domänen können die CXXC, CXXS oder SXXC katalytischen Sequenzen enthalten und sind demnach redox-aktiv (**a/a'**-Domänen), oder ihnen fehlt eine derartige Sequenz und sie sind redox-inaktiv (**b/b'**-Domänen); (s. Abschnitt 1.4.1.). Während PDI, PDIp, PDILT, ERp57 alle aus zwei **a**- und zwei **b**-Domänen aufgebaut sind, enthält ERp72 eine zusätzliche **a**-Domäne [43, 98, 101]. ERdj5 stellt den bisher einzigen bekannten Vertreter der PDI-Familie mit einer zusätzlicher N-terminalen **J**-Domäne mit ATPase-Eigenschaft dar [11]. Auf der anderen Seite setzen sich die PDI-Homologen ERp44, P5 und ERp46 aus drei Trx-ähnliche Domänen mit jeweils einer, zwei bzw. drei **a**-Domänen zusammen [43, 99, 102]. Einen ebenfalls atypischen Domänenaufbau besitzen die PDI-

Familienmitglieder ERp27 und ERp29. ERp27 besteht aus zwei redox-inaktiven **b**-Domänen [77]. ERp29 setzt sich aus einer N-terminalen **b**-Domäne sowie einer C-terminalen α -helikalen **D**-Domäne zusammen [24]. Die kleinsten Mitglieder der PDI-Familie ERp18, AGR2 und AGR3 sind dagegen aus nur einer einzigen **a**-Domäne aufgebaut [103, 104]. TMX und TMX2-5 stellen eine besondere Klasse innerhalb der PDI-Familie dar. Sie besitzen zusätzlich zu ihren Trx-ähnlichen Domänen putative Transmembranbereiche [44]. Zusätzlich zur Zusammensetzung ihrer einzelnen Domänen unterscheiden sich die verschiedenen PDIs im Vorhandensein des C-terminalen sauren Bereiches sowie des *x-linkers* und weiteren flexiblen Proteinbereichen. Inwieweit die Domänenzusammensetzung die Substratspezifität und Interaktion mit Co-Chaperonen beeinflusst, blieb bisher spekulativ.

1.6.2. Strukturelle und funktionelle Charakteristika von PDIs

1.6.2.1. PDI

PDI (PDIA1) stellt den ursprünglich ersten entdeckten Vertreter sowie Namensgeber der PDI-Familie dar [34, 105]. PDI besitzt sowohl Oxidase-, Reduktase- als auch Isomerase-Aktivitäten [5]. Obwohl einige putative PDI-Interaktionspartner mittels *cross-linking* und Immunoprecipitations-Experimenten identifiziert werden konnten, wird angenommen, dass das Protein auf Grund seiner breiten Substratspezifität mit einer Vielzahl an ER-Proteinen interagieren kann. Am besten charakterisiert ist die Beteiligung von PDI bei der Faltung von Procollagen. PDI katalysiert während der Assemblierung der Collagen Tripelhelix die Bildung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen bzw. innerhalb der C-Propeptid-Domänen. Als β -Untereinheit des Multiproteinkomplexes Prolyl-4-Hydroxylase ist PDI für die Hydroxylierung von Prolinen innerhalb der Collagen-Sequenz verantwortlich [44]. Zudem bindet PDI nicht assembliertes monomeres C-Propeptid über nicht-kovalente Interaktionen und sorgt damit für dessen Retention im ER. PDI trägt auf diese Weise zur Qualitätskontrolle (s. Abschnitt 1.1.2.) und Retention von unvollständig prozessiertem Procollagen bei [44].

Eine weitere Rolle konnte PDI bei der Regulation einer essentiellen Disulfidbrücke in der Peptid-Bindungstasche von MHC I-Molekülen zugeschrieben werden [106]. Nur in der oxidierten Form bindet MHC I die Peptide, die später als Antigen fungieren. Die Oxidation wird durch PDI katalysiert wenn ausreichend hoch-affine Peptide verfügbar sind. Bei Abwesenheit dieser Peptide erfolgt die Reduktion von MHC I durch PDI. Ohne die Peptid-Bindungsaktivität von PDI liegen die meisten MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche ohne

gebundenes Peptid-Antigen vor [107]. Neuste Untersuchungen deuten ebenso darauf hin, dass PDI eine essentielle Rolle bei der Signalpeptid-vermittelten ERAD spielt [108]. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass PDI selektiv an bestimmte Peptid-Antigene bindet und diese von dem *Transporter-assoziiert-mit-der-Antigenprozessierung* (TAP) an die MHC I-Moleküle überträgt [94]. Zudem ist PDI bei der Faltung von Thyroglobulin beteiligt, mit dem es cotranslationell bis zum Verlassen des ER intermolekulare Disulfidbrücken ausbildet [44]. Kürzlich konnte mit dem HIV-1Glycoprotein 120 (gp120) ein weiterer Interaktionspartner gefunden werden, welcher an PDI über eine intermolekulare Disulfidbrücke bindet [109]. PDI1p aus der Hefe ist essentiell für die Überlebensfähigkeit des Organismus. *Knockout*-Zellen von PDI wurden bisher nicht beschrieben [44].

Basierend auf früheren Sequenzanalysen und nachfolgenden ersten strukturellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Domänen von PDI eine Thioredoxin-ähnliche Struktur mit dem charakteristischen β - α - β - α - β - α -Motiv besitzen (s. Abb 6); [43].

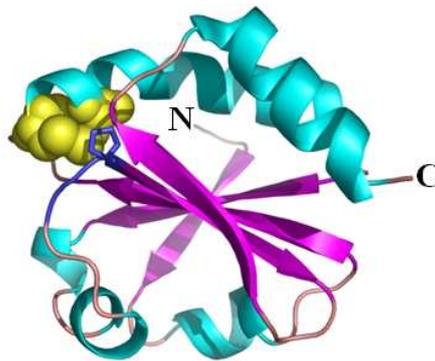


Abbildung 6: Faltung der Thioredoxin (Trx)-Domäne. Thioredoxin besitzt die klassische β - α - β - α - β - α Anordnung seiner Sekundärelemente mit fünf zentral gelegenen β -Faltblättern (lila), die von vier α -Helices (cyan) umgeben sind. Die einzelnen Sekundärelemente sind über flexible Schleifen (rosa) miteinander verbunden. Am Ende der zweiten α -Helix liegt das katalytische CXXC-Motiv (gelbe Kugeln). Die Schleife in räumlicher Nähe des CXXC-Motivs enthält eine konservierte *cis*-Pro-Xaa Peptidbindung (*cis*-Prolin Schleife; blau). Der *cis*-Prolylrest ist als Stäbchenmodell dargestellt; (pdb: 2trx).

Mit PDI1p konnte 2006 die erste vollständige dreidimensionale Struktur von PDI aus *Saccharomyces cerevisiae* aufgeklärt werden [85]. Obwohl Proteinstrukturen von einzelnen (redox-aktiven) Domänen von PDI bereits früher aufgeklärt werden konnten, war es erst mittels der kompletten PDI-Struktur möglich sowohl die katalytische Aktivität als auch die Chaperon-Eigenschaft dieses Proteins exakter zu beschreiben. Wie die Analyse der PDI1p-Struktur zeigte, bildet das Protein die Form eines "U", wobei die **b**- und **b'**-Domänen die Basis bilden und die katalytischen **a**- und **a'**-Domänen an den Enden des "U" liegen. Die aktiven CXXC-Sequenzen der katalytischen Domänen liegen am N-Terminus der zweiten α -Helix und sind jeweils gegenüberliegend nach innen gerichtet (s. Abb. 7).

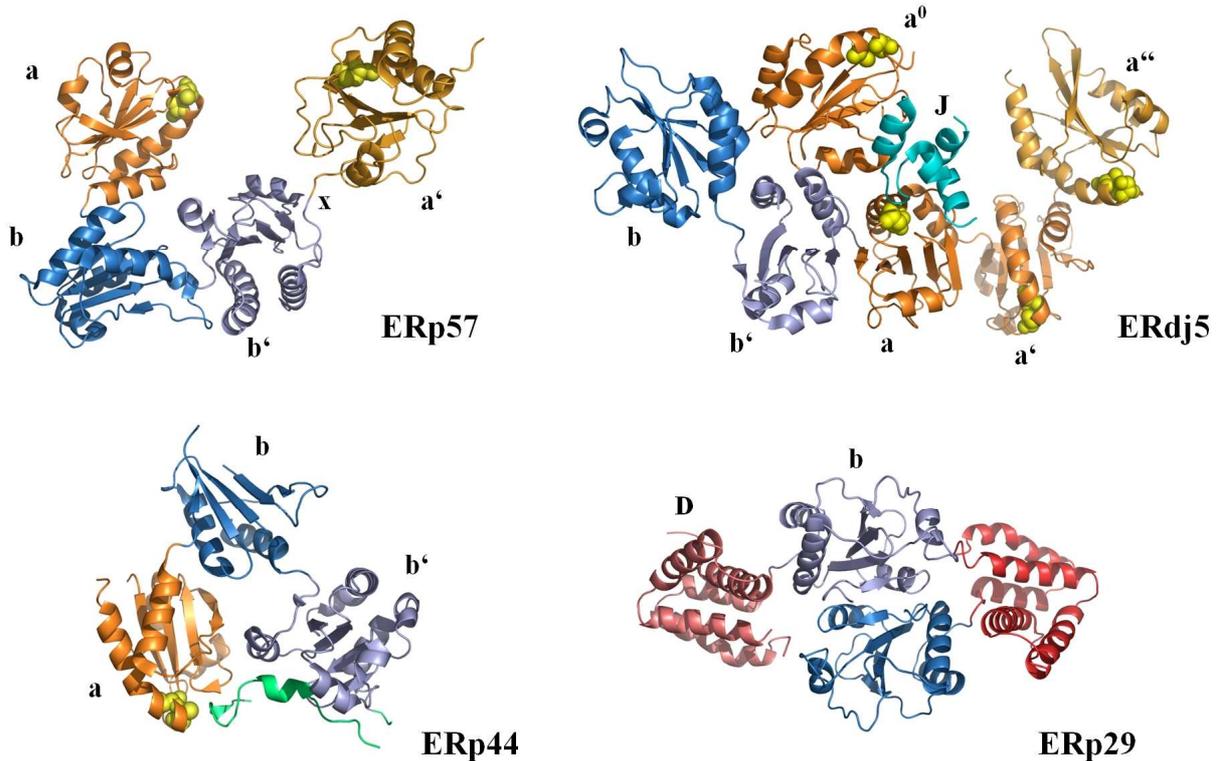


Abbildung 7: Struktureller Aufbau von humanen PDIs. ERp57 (pdb: 3f8u [98]; links oben), ERdj5 (pdb: 3apo [110]; rechts oben), ERp44 (pdb: 2r2j [99]; links unten) und ERp29 (pdb: 2qc7 [24]; rechts unten) sind die bisher einzigen Mitglieder der humanen PDI-Familie mit mehr als einer Trx-ähnlichen Domäne, deren dreidimensionale Struktur vollständig aufgeklärt werden konnte. Die Kristallstruktur von PDI1p (pdb: 2b5e [85]) ähnelt stark der dreidimensionalen Struktur von ERp57 (nicht gezeigt). Die vier Domänen von ERp57 nehmen räumlich die Form eines "U" ein, wobei die **a/a'**-Domänen (orange) an den Enden liegen. Die katalytischen Cys des CXXC-Motivs (gelbe Kugeln) sind dabei nach innen gerichtet. Die **b/b'**-Domänen (blau) bilden eine hydrophobe Basis mit der putativen Substratbindungsstelle in der **b'**-Domäne von PDI. Der ca. 20 Aminosäure-Reste lange **x-linker** in ERp57 verbindet die **b'**- mit der **a'**-Domäne. ERdj5 enthält eine N-terminale **J**-Domäne (cyan), drei katalytische Domänen sowie zwei redox-inaktive Domänen. ERp44 setzt sich aus einer **a**- und zwei **b**-Domänen zusammen. Die Domänenanordnung entspricht in diesem Fall einem "Kleeblatt". ERp29 besitzt zusätzlich zu seiner Trx-ähnlichen **b**-Domäne eine C-terminale **D**-Domäne (rot), bestehend aus fünf α -Helices. ERp29 ist als Dimer gezeigt, wobei die Dimerisierung über die N-terminalen **b**-Domänen (blau) des jeweiligen Monomers vermittelt wird. Der **x-linker** in PDI sowie die C-terminalen Bereiche von ERp44 (grün) können bei der Modulierung der Substratbindung beteiligt sein.

Die Anordnung und Oberflächeneigenschaften der einzelnen Domänen ähneln der *E. coli*-Proteindisulfidisomerasen DsbC und DsbG [111]. Der C-terminale saure Bereich von PDI scheint nicht mit den aktiven Zentren in Wechselwirkung zu stehen. Ein stabilisierender Effekt auf die **a'**-Domäne und damit auf deren katalytische Aktivität wird angenommen [85]. Konservierte Pro-Reste nahe der aktiven Zentren liegen in *cis*-Konformation vor (*cis*-Prolin Schleife). Weitere Reste in der Nähe des aktiven Zentrums spielen ebenfalls für die Katalyse eine wichtige Rolle (s. Abschnitt 1.4.1.). Kürzlich konnte in Übereinstimmung mit der PDI1p-Struktur gezeigt werden, dass die **b**- und **b'**-Domäne des Proteins eine hydrophobe Tasche bilden, die bei der Substratbindung beteiligt ist [88]. Die Tasche wird hauptsächlich durch die aromatischen und hydrophoben Reste der α_1 - α_3 -Helices der **b'**-Domäne gebildet (s. Abb. 58).

Die Kristallisation von PDI1p bei unterschiedlichen Temperaturen zeigte starke konformationelle Unterschiede, v.a. in den **a/a'**-Domänen des Proteins [100]. Auf der anderen Seite scheinen die **b/b'**-Domänen des Proteins ein starres "Gerüst" zu bilden. Zusätzlich beeinflusst der Redoxzustand des aktiven Zentrums der **a'**-Domäne die Konformation der **b'**- und **a'**-Domäne von PDI (s. Abschnitt 1.5.3.); [90]. Diese außerordentliche Flexibilität erlaubt es PDI wahrscheinlich eine Vielzahl unterschiedlich großer Substrate mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften zu binden. Auf der anderen Seite scheint der räumliche Abstand sowie die Flexibilität der einzelnen Domänen nicht das einzige Kriterium zu sein, durch welches die Substratspezifität von PDI determiniert wird.

PDI bildet *in vitro* Homodimere, wobei die Dimerisierung hauptsächlich durch die **b'**-Domäne vermittelt wird [112]. Der **x-linker** beeinflusst die Dimerisierung des **b'x**-Fragmentes und **b'x** liegt als Monomer vor, wenn der **x-linker** in der putativen Substratbindungstasche gebunden ist [87]. Eine Dimerisierung von PDI1p kann aus dessen Kristallstruktur abgeleitet werden [85, 100]. Der **x-linker** beeinflusst zudem die Peptid-Bindung (s. Abschnitt 1.5.3.).

1.6.2.2. ERp57

Das PDI-Familienmitglied ERp57 (PDIA3) ist das nächststehende Homologe von PDI. Neben PDI selbst, gelten die Eigenschaften von ERp57 als am besten untersucht. ERp57 katalysiert, ebenso wie PDI, jedoch mit geringerer katalytischer Aktivität, Oxidations-, Reduktions- und Isomerisierungs-Reaktionen [113]. Zahlreiche potentielle Substratproteine konnten für ERp57 mittels *cross-linking* und Immunopräzipitations-Experimenten identifiziert werden (s. Tabelle 5, Anhang); [44]. In Analogie zu PDI bildet ERp57 mit dem sekretorischen Protein Thyroglobulin während dessen Faltung gemischte Disulfidbrücken aus (s. Abschnitt 1.6.2.1.). Eine weitere wichtige Rolle spielt ERp57 als Bestandteil des *peptide-loading-complex* (PLC) bei der oxidativen Faltung der schweren Kette des MHC I-Komplexes. In diesem Komplex kommen neben ERp57 und des MHC I-Moleküls auch Crt, Tapasin und TAP vor [44]. ERp57 bindet durch eine intermolekulare Disulfidbrücke kovalent an Tapasin [98, 114]. Neben PDI ist auch ERp57 essentiell für die Präsentation von Antigen-Peptiden durch den MHC I-Komplex auf der Zelloberfläche. Innerhalb des PLC scheint ERp57 neben Tapasin auch (transient) mit weiteren Komponenten zu interagieren [115]. ERp57 konnte, analog zu PDI, auch außerhalb des ER gefunden werden [116]. Es wird vermutet, dass ERp57 eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. *Knockout* von ERp57 in der Maus führt zur Lethalität im embryonalen Stadium [116].

Es wurde angenommen, dass die Interaktion von ERp57 mit Crt/Cnx dessen Substratspezifität bestimmt und ERp57 selbst keinerlei Substratspezifität aufweist [30, 97, 117]. Jedoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass ERp57 auch nicht-glycosylierte Proteine bindet und demnach über die Fähigkeit zur direkten Interaktion mit Substraten zu verfügen scheint [54, 97, 118]. In NMR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Crt/Cnx über die saure P-Domäne an die **b'**-Domäne von ERp57 bindet und dass die Mutation eines einzigen Restes am Ende der P-Domäne (D258) die Interaktion mit ERp57 komplett unterbindet [31, 118]. Auf der anderen Seite sind v.a. die basischen Reste K214, K274 und R282 der ERp57 **b'**-Domäne wichtig für die Interaktion mit Crt/Cnx [116, 119]. Eine Interaktion von ERp57 mit Crt/Cnx über elektrostatische Wechselwirkungen wird daher vermutet.

Die dreidimensionale Struktur und Domänen-Anordnung von ERp57 ähnelt stark der von PDI1p (s. Abb. 7); [85, 98]. Ebenso wie PDI1p bilden die vier Trx-ähnliche Domänen von ERp57 die Form eines "U". Die katalytischen CXXC-Sequenzen befinden sich ebenfalls an den Enden des "U" und sind nach innen gerichtet. Obwohl die Struktur und Oberflächeneigenschaften der katalytischen Domänen von ERp57 stark denen von PDI ähneln, bestehen im Rest des Protein signifikante Unterschiede. So fehlt beispielsweise ERp57 der saure C-terminale Bereich von PDI. Im Gegensatz dazu besitzt ERp57 einen basischen Carboxyterminus [116]. Weitere Unterschiede zwischen ERp57 und PDI bestehen in ihren **b'**-Domänen. Während die putative Substratbindungstasche innerhalb der PDI**b'**-Domäne hauptsächlich einen hydrophoben Charakter besitzt, so besitzen die äquivalenten Bereiche der **b'**-Domäne von ERp57 überwiegend eine negative Ladung [113, 119, 120]. Da der **b'**-Domäne die hydrophobe Tasche fehlt, scheint die Fähigkeit von ERp57 zur Substratbindung stark reduziert zu sein. Über den genauen Beitrag der katalytischen Domänen von ERp57 bei dessen Substratinteraktion ist bisher nur wenig bekannt.

1.6.2.3. P5

Als weiteres gut charakterisiertes Mitglied der PDI-Familie gilt ebenfalls P5 (PDIA6, CaBP1). *In vitro* katalysiert P5 Oxidations-, Reduktions sowie Isomerisierungs-Reaktionen und besitzt die Eigenschaften eines Chaperons und Anti-Chaperons [121-125]. Die katalytische Aktivität von P5 ist jedoch geringer als die von PDI. Mittels *Biacore*-Messungen konnte zudem gezeigt werden, dass P5, ähnlich wie PDI, sowohl an das Modell-Peptid Mastoparan als auch an niedermolekulare Substanzen bindet (s. Abschnitt 1.5.2.); [124, 126]. P5 ist Bestandteil von Multiproteinkomplexen u.a. zusammen mit BiP, PDI, Grp94 und ERp72 [16]. P5 wurde ebenfalls als Bestandteil eines Chaperon-Komplexes gefunden, der mit

dem Transmembranprotein Sec61p assoziiert ist und die Translokation des Prion-Proteins beeinflusst [127]. P5 ist zudem beteiligt an der Prozessierung von Interferon- γ sowie bei der Reifung von Spermatozyten [125, 128]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der nicht-kovalente Komplex mit BiP die Substratbindungsspezifität von P5 bestimmt [54].

Eine weitere interessante Funktion besitzt P5 bei der Erkennung von Oberflächenmarkern von Tumoren durch das Immunsystem (s. Abschnitt 1.7.); [129, 130]. Eine ebenso wichtige Funktion wird P5 auf der Zelloberfläche von Thrombozyten bei Prozessen der Blutgerinnung zugeschrieben [38, 39, 131]. P5 ist weiterhin bei der Embryonalentwicklung beteiligt, indem es bei Vertebraten die rechts-links-Asymmetrie bei der Organentwicklung beeinflusst sowie während der Entwicklung des Zentralnervensystems in *Drosophila melanogaster* vermehrt exprimiert wird [132, 133]. Trotz seines ER-Rückführungssignals wurde P5 auch auf der Zelloberfläche sowie in Mitochondrien detektiert [40].

Strukturell setzt sich P5 vermutlich aus drei Trx-ähnlichen Domänen zusammen. Einer N-terminalen **a**- sowie einer mittleren **a'**-Domäne (s. Abb. 5). Das Vorhandensein einer C-terminalen **b**-Domäne wird vorhergesagt, konnte bisher aber nicht bestätigt werden [43, 134]. P5 besitzt einen C-terminalen sauren Bereich, welcher vermutlich für die Bindung von Ca^{2+} verantwortlich ist. P5 wurde *in vitro* als Dimer und auch als Trimer nachgewiesen [129].

1.6.2.4. ERp29

ERp29 (ERp28) wurde erstmals 1998 aus Lebergewebe isoliert und näher charakterisiert [135]. Es stellt den bisher einzigen bekannten Vertreter der Klasse der PDI-D Proteine innerhalb der humanen PDI-Familie dar. ERp29 setzt sich aus einer N-terminalen **b**-Domäne mit der typischen Trx-ähnlichen Struktur und einer für PDI-D-Proteine typischen C-terminalen **D**-Domäne, bestehend aus 5 α -Helices, zusammen (s. Abb. 7); [24]. Neben ERp27 ist ERp29 das einzige PDI-Familienmitglied ohne eine katalytische Domäne und besitzt daher keine Oxidoreduktase-Aktivität (PDI-D β -Familie); [43, 44]. ERp29 kommt *in vitro* als Homodimer vor [24, 136]. Die Dimerisierung wird hierbei über die N-terminale **b**-Domäne des jeweiligen Monomers vermittelt und ist essentiell für die biologische Funktion des Proteins [137]. ERp29 enthält das KEEL-Rückführungssignal und ist demnach im ER-Lumen lokalisiert [135, 138, 139]. Wind, das ERp29-Orthologe in *Drosophila*, bildet ebenfalls Homodimere und ist mit ERp29 strukturell nahezu identisch [140].

Hinsichtlich der Substratspezifität von ERp29 ist bisher wenig bekannt. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass ERp29 bevorzugt an aromatische Peptide mit basischem Charakter bindet [24]. Gut charakterisiert sind dagegen die Substrat-Bindungseigenschaften

von Wind. Es wurde eine putative Substratbindungstasche in der **b**-Domäne von Wind identifiziert, welche in der Nähe der Dimerisierungsstelle liegt [140, 141]. Die Mutation mehrere konservierter Tyr-Reste verhindert den Transport von Pipe aus dem ER zum Golgi [141]. Neben der **b**-Domäne ist vermutlich auch die **D**-Domäne von Wind bzw. ERp29 (indirekt) bei der Substratbindung beteiligt [136]. Für den effizienten Transport von Pipe aus dem ER benötigt Wind sowohl die **b**-, also auch die **D**-Domäne [140, 141]. Dagegen ist ERp29 nicht in der Lage Wind bei der Prozessierung von Pipe zu ersetzen, obwohl die **D**-Domänen beider Proteine austauschbar sind [136].

Bisherige Experimente deuten auf eine Rolle von ERp29 als "Eskort-Protein" im frühen sekretorischen Weg hin [142]. Es konnte gezeigt werden, dass ERp29 sowohl mit dem Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus interagiert als auch an das Polyomavirus-Hüllprotein VP1 bindet und in diesem eine Konformationsänderung induziert [72]. Im Vergleich zu anderen Gewebeteilen wurden in Thyrozyten größere Mengen an ERp29 gefunden sowie dessen transkriptionelle Hochregulierung durch das Schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) nachgewiesen [143, 144]. Eine Beteiligung von ERp29 bei der Prozessierung von Thyroglobulin wird angenommen [145]. Neuste Untersuchungen mittels *siRNA-knockdown* von ERp29 implizieren eine Bindung an das *gap-junction* Protein Connexin-43 sowie dessen ERp29-abhängigen Transport an die Zelloberfläche [146]. Der Cystische Fibrose-korrelierte transmembrane Leitfähigkeits-Regulator (CFTR) wurde kürzlich als weiterer ERp29-Interaktionspartner identifiziert [147].

ERp29 ist das bisher einzige beschriebene PDI-Familienmitglied, dessen *knockout* nicht zur Lethalität des Organismus führt [148].

1.6.2.5. ERp46

ERp46 (Endo-PDI) ist, ähnlich wie P5 und ERp44, aus drei Trx-ähnlichen Domänen aufgebaut. Im Gegensatz zu den anderen PDI-Familienmitgliedern enthält es jedoch keine redox-inaktiven **b/b'**-Domänen [44, 102, 149, 150]. Ebenso wie ERp72, besitzt ERp46 drei katalytische Domänen (**a**⁰, **a**, **a'**) mit dem CGHC-Motiv. ERp46 besitzt *in vitro* Reduktase-Aktivität [150]. In Hefe-Komplementationsstudien kann ERp46 die Funktionen von PDI substituieren [149]. Unter Sauerstoffmangel ist in Endothelzellen zudem die Expression von ERp46 gesteigert [102]. Des Weiteren wird ERp46 vermehrt in aktivierten, reifen B-Lymphozyten exprimiert. Eine Beteiligung bei der Prozessierung und Assemblierung von Ig-Molekülen wird angenommen [150]. Kürzlich wurde für ERp46 eine differentielle Expression in β -Zellen des Pankreas bei unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen nachgewiesen [151].

In jüngsten Studien konnten erstmals mehrere kovalente ERp46-Interaktionspartner mittels der Cystein-*trapping*-Methode identifiziert werden (s. Tabelle 5, Anhang); [54]. Zudem zeigt ERp46 eine Bindungsspezifität für die Thioredoxin-Peroxidase Peroxiredoxin-4 [54]. *In vitro* ist ERp46 das präferentielle Reduktionsmittel für oxidiertes Peroxiredoxin-4 und fungiert damit vermutlich als ein wichtiger Regulator der Redox-Balance innerhalb des ER [152]. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass ERp46 mit dem Adiponectin-Rezeptor AdipoR1, nicht jedoch mit AdipoR2 interagiert. Eine Beteiligung von ERp46 bei der Adiponectin-Signaltransduktion wird vermutet [153, 154]. Die Beteiligung von ERp46 bei essentiellen Vorgängen des Immunsystems und des Fettstoffwechsels rücken dieses PDI-Familienmitglied zunehmend in den Fokus der aktuellen Forschung auf diesen Gebieten.

Über den genauen Mechanismus der Substratinteraktion der katalytischen Domänen von ERp46 ist bisher wenig bekannt. Peptid-Bindungsstudien sowie Untersuchungen zur Substratspezifität von ERp46 liegen nicht vor. Eine nähere Charakterisierung der oxidativen Eigenschaften sowie Chaperon-Funktion von ERp46 wurden bisher nicht beschrieben.

1.6.2.6. Weitere ausgewählte PDIs

PDIp:

Das PDI-Familienmitglied PDIp (Pankreas-spezifische Proteindisulfidisomerase) wurde in früheren Studien fast ausschließlich im Pankreas sowie unter bestimmten Bedingungen im Gehirn nachgewiesen [44, 155]. Aktuelle Untersuchungen ergaben jedoch eine Expression von PDIp auch in anderen Organen, wobei die Expression in Organen des Verdauungsapparates am höchsten war [156]. PDIp besitzt, wie sein Homolog PDI, den klassischen Domänenaufbau mit zwei redox-aktiven (**a/a'**) und zwei redox-inaktiven (**b/b'**)-Domänen [134]. Über eine kovalente Homodimerisierung von PDIp durch eine intermolekulare Disulfidbrücke wird spekuliert [156, 157].

PDIp wurde im Komplex mit mehreren sekretorischen Proteinen gefunden (s. Tabelle 5, Anhang); [44]. Eine Interaktion von PDIp mit dem Hormon Östrogen konnte ebenfalls kürzlich nachgewiesen werden [158]. PDIp zeigt neben seiner Oxidoreduktase-Aktivität auch die Eigenschaften eines Chaperons [156, 159]. Das **bb'**-Fragment ist hierbei vermutlich für die Substratbindung verantwortlich. PDIp bindet bevorzugt an Peptide mit Tyr- und Trp-Resten sowie niedermolekulare Liganden mit Hydroxyaryl-Gruppen [95, 96]. Unklar ist bisher, ob die Interaktion mit aromatischen Gruppen spezifisch für PDIp ist, oder aber ein allgemeines Merkmal von Mitgliedern der PDI-Familie darstellt.

ERp18:

Einen weiteren Vertreter der PDI-Familie mit atypischem Domänenaufbau stellt das ER-lumenale Protein ERp18 (ERp16) dar [149]. ERp18 setzt sich aus einer einzigen Trx-ähnlichen Domäne mit dem CGAC-katalytischen Zentrum zusammen [160]. Eine *loop*-Insertion in der dreidimensionalen Struktur des Proteins unterscheidet es von den katalytischen Domänen der anderen PDI-Mitglieder [103, 160]. *In vitro* katalysiert ERp18 bevorzugt Oxidations-Reaktionen, obwohl es auch Reduktions- sowie Isomerase-Aktivität zu besitzen scheint [161]. *In vitro* konnte sowohl monomeres als auch dimeres ERp18 nachgewiesen werden, wobei die Dimerisierung vermutlich über den N-terminalen Bereich des Proteins vermittelt wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass ERp18 eine redox-abhängige Konformationsänderung erfährt [103, 161]. Eine Beteiligung von ERp18 bei der zellulären Reaktion auf ER-Stress wird postuliert [161].

ERp18 interagiert mit dem Rezeptor des Gonadotropin-freisetzenden Hormons sowie VKOR und besitzt eine Spezifität gegenüber Pentraxin-3, einer Komponente der Komplementkaskade [54, 56, 162]. Über die Substratbindungseigenschaften von ERp18 ist bisher kaum etwas bekannt. Eine putative hydrophobe Substratbindungstasche in der Nähe des aktiven Zentrum wurde kürzlich beschrieben [103].

ERp27:

ERp29 und ERp27 sind die einzigen Vertreter der humanen PDI-Familie ohne eine katalytisch aktive Domäne [44]. ERp27 besteht aus einer **b**- und **b'**-Domäne, wobei letztere die putative Substratbindungsstelle enthält [77]. ERp27 bindet das Modell-Peptid Δ -Somatostatin. Zudem konnte eine Interaktion von ERp27 mit der **b'**-Domäne von ERp57 nachgewiesen werden [77]. Die biologische Relevanz dieser Interaktion bleibt jedoch unklar.

AGR2:

Der erst kürzlich beschriebene Vertreter der PDI-Familie AGR2 (*Anterior Gradient Homolog 2*) besteht, wie seine Homologen AGR3 und ERp18, aus nur einer Trx-ähnlichen Domäne. AGR2 besitzt die untypische Konsensussequenz CPHS [104, 163]. Über die Substratinteraktion bzw. Substratspezifität von AGR2 ist kaum etwas bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass AGR2 eine intermolekulare Disulfidbrücke mit dem Cysteinereichen Glycoprotein Mucin-2 (MUC2) ausbildet [104]. Eine Interaktion von AGR2 mit dem ATP-bindenden Protein Reptin konnte ebenfalls kürzlich nachgewiesen werden [164].

1.7. Die Rolle von PDIs bei der Krankheitspathogenese

Aktuelle Studien deuten zunehmend auf eine Involvierung von PDIs sowohl in der Entstehung als auch bei dem Verlauf von zahlreichen humanen Erkrankungen hin. Diese Erkrankungen korrelieren oft mit der Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen in der Zelle. Für PDI und ERp57 konnte eine Beteiligung bei der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer oder Parkinson-Erkrankungen, nachgewiesen werden [116, 165, 166]. PDI konnte zudem direkt in den amyloiden Plaques mittels Immunofluoreszenz detektiert werden [166]. In neuronalem Gewebe aus Alzheimer- bzw. Parkinson-Patienten konnte u.a. gezeigt werden, dass bestimmte Cys-Reste in PDI S-nitrosyliert vorliegen [167]. Die S-Nitrosylierung von PDI inhibiert dessen katalytische Aktivität, führt zur Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen und aktiviert die UPR [167]. Im Falle von ERp57 konnte eine direkte Interaktion mit dem Prion-Protein nachgewiesen werden und es wird angenommen, dass ERp57 zusammen mit Crt die Aggregation von β -Amyloid-Proteinen verhindert [168].

Eine weitere wichtige Rolle spielen PDIs bei der Krebsentstehung. In Krebszellen ist die ER-Homeostase durch exogene oder endogene Faktoren bzw. physiologische und/oder pathologische Stimuli (z.B. Nährstoffmangel, oxidativer Stress, DNA-Schädigung, Ca^{2+} -Mangel, Wachstumsfaktoren, etc.) gestört [169]. Die MHC I-verwandten Moleküle A und B (MICA/B) finden sie sich vermehrt auf der Oberfläche von zahlreichen humanen Tumoren, welche dadurch zum Ziel natürlicher Killerzellen werden. Durch die Abschirmung von MIC kann der Tumor vom Immunsystem kaum erkannt werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass P5 bei der Abschirmung von MICA beteiligt ist [129, 130]. Weiterhin konnte P5 die Rolle eines Aktivators in frühen Stadien der Metastase-Bildung zugeschrieben werden [170].

Mit ERp29 ist ein weiteres Mitglied der PDI-Familie bei der Entstehung und Progression von viralen Erkrankungen sowie bei der Krebspathogenese involviert [169]. ERp29 führt zur Entfaltung des Polyomavirus VP1-Hüllproteins und damit zur verstärkten viralen Infektion. Darüber hinaus ist ERp29 bei der Tumorgenese in epithelialen Tumoren sowie bei der Pathogenese von Brustkrebs beteiligt [171-174]. Es wird angenommen, dass die gesteigerte Expression von ERp29 über die Modulierung der ER-Stress-Signalwege zu einer Stagnation des Zellwachstums führt und ERp29 damit die Eigenschaften eines Tumor-Suppressors aufweist [169]. Über die genaue Rolle von ERp29 bei der Krebsentstehung herrscht jedoch noch Unklarheit. Beispielsweise führt der ERp29-*knockdown* in Brustkrebs-Zellen zur verringerten Tumor-Bildung und ERp29 wirkt damit als Onkogen [175]. Neben

ERp29 konnte auch für das kürzlich identifizierte PDI-Familienmitglied AGR2 eine Beteiligung bei der Pathogenese verschiedener Krebsarten nachgewiesen werden [176-178].

Vergleichbar mit der Interaktion von ERp29 mit dem viralen Hüllprotein Py-VP1, interagiert PDI mit HIV1-gp120 [109]. Es wird angenommen, dass PDI auf der Zelloberfläche bei dem Eintritt des Virus mitwirkt. PDI und ERp57 sind ebenfalls bei immunologischen Prozessen beteiligt (s. Abschnitt 1.6.2.2.). Neben P5 hat auch PDI auf der Zelloberfläche einen Einfluss auf die Blutgerinnungskaskade [179].

1.8. PDI-Inhibitoren

PDI interagiert *in vitro* mit mehreren niedermolekularen Substanzen. Zu diesen zählen aromatische Verbindungen mit Hydroxyarylgruppen, (z.B. Bisphenol A), Stoffe mit SH-reaktiven Gruppen (z.B. DTNB), aber auch zahlreiche Antibiotika (z.B. Cyclosporin A, Bacitracin, Vancomycin und Ribostamycin); [96, 109, 126, 180-185]. Zudem konnte gezeigt werden, dass PDI auch an Hormone bzw. deren Vorstufen binden kann. Beispielsweise interagieren PDI und PDIp mit 3,3',5-Triiod-L-Thyronin (T₃) sowie mit β -Östradiol [126, 186-191]. Ebenso wurde die funktionelle Inhibierung von PDI und P5 auf der Oberfläche von Thrombozyten mittels spezifischer Antikörper beschrieben [126]. Mit Vincristin, einem Anti-Krebsmedikament, wurde ein weiterer putativer PDI-Inhibitor identifiziert [126].

Während DTNB über seine reaktive Disulfidbrücke die Redoxaktivität von PDI inhibiert, beeinflussen die Aminoglycosidantibiotika sowie Vancomycin, Bacitracin und Ribostamycin die Chaperon-Aktivität von PDI [126, 181-183]. Dagegen inhibieren Östrogen und Bisphenol A (BPA) die Isomerase-Aktivität von PDI [185, 188]. Die Krebsmedikamente Methotrexat und Temozolomid binden zwar an PDI und P5, inhibieren aber weder deren Redoxaktivität, noch deren Chaperon-Eigenschaften [126]. Zudem können auch Proteine und Peptide als PDI-Inhibitoren fungieren [192]. Kürzlich wurde mit Juniferdin (IC₅₀ ~ 160 nM) ein potenter PDI-Inhibitor identifiziert, der die PDI katalysierte Reduktion von gp120 in der Hüllmembran von HIV-1 inhibiert und den Eintritt des Virus in die Zelle verhindert [193].

Bei der Interaktion von PDIs mit niedermolekularen Inhibitoren sind vermutlich mehrere Domänen beteiligt [126]. Eine Bindung sowohl außerhalb als auch im aktiven Zentrum ist jedoch, basierend auf *in silico*-Modellen, möglich [194]. Es wird angenommen, dass das Aminozucker-Grundgerüst der Aminoglycosidantibiotika für die Bindung an PDIs verantwortlich ist, während bei BPA und seinen Derivaten vermutlich die Phenol-Gruppe das determinierende Interaktionsmerkmal ist [96, 126, 185]. Jüngste Studien deuten darauf hin, dass BPA hauptsächlich an hydrophobe Bereiche innerhalb der PDIIb'-Domäne bindet [195].

Die Dissoziationskonstanten von zahlreichen niedermolekularen Liganden von PDI und P5 wurden mittels *Biacore*-Messungen bestimmt und liegen in der Größenordnung von 10^{-3} M (z.B. Kanamycin) bis 10^{-5} M (z.B. BPA); [126]. Die Spezifität von Bacitracin bei der Inhibierung der PDI-Aktivität wird durch jüngste Untersuchungen jedoch angezweifelt [196].

1.9. Peptid-Arrays

Anfang der 1990er Jahre wurden zwei Methoden für die Herstellung von Peptid-Arrays entwickelt: die SPOT-Methode, bei der eine stufenweise Synthese der Peptide auf ein Filterpapier erfolgt und die Licht-dirigierte, räumlich-koordinierte chemische Synthese (Fotolithographie) [197, 198]. Bei SPOT-Makro-Arrays können 16 Peptide pro cm^2 synthetisiert werden, während die durch digitale Fotolithographie hergestellten Mikro-Arrays eine Peptid-Dichte von bis zu 4.000 Peptide auf $1,5 \text{ cm}^2$ ermöglichen [199]. Der technologische Fortschritt auf dem Gebiet der Peptid-Arrays beruht dabei auf drei bedeutenden Entwicklungen der stufenweise Peptidsynthese: 1. der Etablierung der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) durch Merrifield; 2. der Einführung des Array-Formates durch die "Pin-Methode"; 3. der Entwicklung der SPOT-Synthese [197, 200, 201]. Die SPOT-Methode erlaubt die parallele Synthese von bis zu 2.000 Peptide innerhalb kurzer Zeit [199]. Die Immobilisation von prä-synthetisierten Peptiden erfolgt entweder auf einer flexiblen Matrix (z.B. Cellulose- oder Baumwoll-Membranen) oder auf einer starren Matrix (z.B. Glas oder Gold). Dies hat den Vorteil, dass nach erfolgter Peptidsynthese und Abspaltung von der Synthese-Matrix eine Analyse und Reinigung der synthetisierten Peptide erfolgen kann. Erst nach der Qualitätskontrolle werden die Peptide auf dem Trägermaterial immobilisiert [199].

Starre Matrices, wie beispielsweise Glas, haben den Vorteil, dass sie impermeabel sind und eine glatte Oberfläche besitzen, was die Diffusion und Interaktion des Analyten mit der Oberfläche vermindert. Darüber hinaus ermöglicht die Transparenz von Glas eine leichtere und verbesserte Bildaufnahme z.B. durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sowie ein maschinelles *read-out* der Signale [199]. Heutzutage werden die prä-synthetisierten Peptide oft mit Hilfe von Pipettierrobotern in Volumina unter einem Nanoliter auf das Trägermaterial aufgebracht. Dafür werden spezielle behandelte Oberflächen sowie *printing*-Puffer verwendet, die zur Kopplungseffizienz sowie zur *Spot*-Morphologie beitragen [199]. Zudem beeinflussen alle genannten Herstellungsfaktoren die Spezifität der Interaktion des Analyten mit den immobilisierten Peptiden, was wiederum einen direkten Einfluss auf das Signal/Hintergrund-Verhältnis hat. Auf der anderen Seite erfordern die Trägermaterialien besondere Ansprüche hinsichtlich der chemischen Stabilität. Die funktionellen Gruppen auf

der Oberfläche müssen zudem zugänglich für chemische Modifikationen sein. Aber auch die synthetisierten und immobilisierten Peptide müssen funktionell erhalten bleiben und räumlich so orientiert sein, dass sie eine Interaktion mit ihren Bindungspartnern erlauben [199]. Ein Problem bei der Immobilisierung ist, dass häufig Blockierungs-Lösungen verwendet werden müssen, um eine unspezifische Interaktion des Analyten mit dem Trägermaterial zu verhindern. In der Regel werden dafür Detergenzien oder BSA-basierte Blockierungs-Puffer eingesetzt, die jedoch auch die Zugänglichkeit der Peptide beeinträchtigen können.

Neben Peptid-Arrays kommen auch Protein-Arrays bei Interaktionsstudien zur Anwendung [202]. Protein-Arrays ermöglichen die Immobilisierung von Protein-Domänen oder ganzen Proteinen und damit die Analyse der direkten nativen Protein-Protein-Interaktion. Peptid-Arrays haben auf der anderen Seite den Vorteil, dass die Peptidsynthese heutzutage schnell und kosteneffizient sowie standardisiert erfolgen kann. Zudem sind sie resistenter gegenüber Chemikalien, proteolytischer Degradation sowie unempfindlicher gegenüber Temperaturschwankungen und Solvatationsänderungen. Darüber hinaus zeigen Peptide eine verringerte Dynamik [199]. Protein-Interaktionen treten jedoch über extensive komplementäre Oberflächenstrukturen auf. Es konnte allerdings mehrfach gezeigt werden, dass Peptide weiterhin die Eigenschaften der Proteinfunktion repräsentieren können. Bei Verwendung von überlappenden Peptidsequenzen ist es möglich mittels einer Peptidbibliothek die gesamten Oberflächeneigenschaften (und möglicherweise Funktionalitäten) eines Proteins abzudecken [199]. Derartige funktionelle Peptid-Arrays wurden bereits in mehreren Interaktionsstudien angewandt, z.B. bei der Identifizierung von Antikörper-Epitopen, Protein-Domänen-basierende Interaktionen sowie Untersuchung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen und Enzym-Inhibitor-Interaktionen [199]. Für die Identifizierung von linearen Epitopen wird i.R. eine kurze Sequenz von etwa 8-15 Aminosäuren über die gesamte putative Bindungsstelle verschoben (*frame-shift*); [199]. Je geringer der *frame-shift*, desto exakter kann das Bindungs-Epitop identifiziert werden.

Die Verwendung der Peptid-Array Technologie hat eine gesteigerte Sensitivität sowie Miniaturisierung zur Folge und ermöglicht einen Hochdurchsatz der Interaktionsstudien, z.B. in der industriellen Forschung oder klinischen Anwendung. Darüber hinaus erfordern Peptid-Arrays lediglich geringe Mengen des Analyten, oft nur im pM-Bereich [202]. Obgleich kommt es zur Absättigung der Bindungsstellen auf dem Peptid-Array, ohne dass sich die Konzentration des Analyten durch die Bindung signifikant ändert [199]. Dies erlaubt die Untersuchung von Interaktionen mit niedrigen Bindungsaffinitäten und macht die Peptid-Array Methodik zum Mittel der Wahl bei der Analyse von PDI-Substrat-Wechselwirkungen.

1.10. Problemstellung und Ziele dieser Arbeit

Trotz zunehmender Erkenntnisse hinsichtlich des Katalysemechanismus sowie der Chaperon-Funktion von PDIs, herrscht weitestgehend Unklarheit über die molekularen Grundlagen dieser Prozesse [63, 203]. Bisherige Studien beschäftigten sich v.a. mit der Rolle der **b'**-Domäne bei der PDI-Substratinteraktion [3]. Im Gegensatz zu anderen Thioredoxin-verwandten Proteinen existieren nur wenige Einblicke in den Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen von PDIs. Bisherige Untersuchungen zur Substratspezifität von PDIs scheiterten an der Verfügbarkeit eines geeigneten Analyseverfahrens.

Eine wichtige Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Konzeption einer umfangreichen Peptid-Bibliothek auf Basis der Hochdichte-Peptid-*Array* Technologie. Mittels dieser Methodik sollten die Peptid-Bindungseigenschaften mehrerer humaner PDIs (PDI, ERp57, PDIp, P5, ERp46, ERp18, ERp29, ERp27) untereinander sowie mit PDIs anderer Spezies (PDI1p, DsbA) verglichen werden. Zusätzlich sollte der Beitrag einzelner Domänen auf die Peptid-Bindungsspezifität einiger PDIs näher untersucht werden. Diese Methode sollte zudem die Identifikation potentieller Bindungsepitope auf PDI-Interaktionspartnern erlauben.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die detaillierte Analyse des Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen von PDIs bilden. Als Modell hierfür wurde das aus mehreren redox-aktiven Domänen aufgebaute und bisher weniger gut charakterisierte PDI-Familienmitglied ERp46 gewählt. Basierend auf früheren Arbeiten [24] sollte die Interaktion von ERp46 mit immobilisierten Modell-Proteinen untersucht und mit weiteren PDIs verglichen werden. Darüber hinaus sollte ERp46 sowohl funktionell als auch strukturell näher charakterisiert werden. Weiterhin sollten spezifische Interaktionspartner von ERp46 identifiziert und mit den anderer PDIs verglichen werden.

Das Vorhandensein einer C-terminalen **b**-Domäne in P5 wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [43, 134]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der Beitrag der putativen **b**-Domäne für die katalytische Aktivität, Chaperon-Funktion sowie Protein- und Peptid-Interaktion näher untersucht werden. Die strukturellen Eigenschaften von P5 sollten zudem mit dem ähnlich aufgebauten PDI-Familienmitglied ERp46 verglichen werden.

Im letzten Teil der Arbeit sollten, aufbauend auf bisherigen *in silico*-Studien [142], niedermolekulare PDI-Liganden identifiziert sowie biochemisch charakterisiert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe p.a. von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fermentas (St. Leon-Rot), Fluka (Buchs; Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Des Weiteren wurden folgende Chemikalien verwendet:

Acrylamidlösung („Rotiphorese“; 30 % (w/v))	Roth
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid Hydrochlorid (AEBSF)	AppliChem
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Chaps	Fluka
Coomassie Brilliantblau G250	AppliChem
CybrSafe	Invitrogen
2',3'-Cyclisches Cytidin-monophosphat (cCMP)	Sigma
Dimethyl-adipimidat Hydrochlorid (DMA)	Pierce
Dimethylaminboran	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
N-Dodecyl- β -D-maltopyranosid	Roth
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Dithiotreitol (DTT)	AppliChem
5,5'-Dithio-bis-(2-dithionitrobenzoat), (DTNB; Ellman-Reagenz)	Fluka
Ethylenglycol	Fluka
Formaldehyd (36 % (v/v))	Sigma
Glutathion, reduziert (GSH)	Sigma
Glutathion, oxidiert (GSSG)	Sigma
Guanidin Hydrochlorid (GdmCl)	AppliChem
Glycerin	Sigma
Harnstoff	Appllichem
Thioharnstoff	GE Healthcare
Iodacetamid (IAA)	Sigma

β-Mercaptoethanol	AppliChem
Milbona Milchpulver	Lidl UK
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Cover-Öl	GE Healthcare
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Polyethylenglycol (PEG) 3.350 und 10.000	Sigma
Triton X-100	AppliChem
Tween 20	Sigma

Niedermolekulare Wirkstoffe und putative PDI-Inhibitoren:

Alle zum *screening* verwendeten Komponenten wurden vom *National Cancer Institute* (USA) zur Verfügung gestellt. Die putativen PDI-Inhibitoren wurden von den Firmen VWR, Best West Laboratories, Bio Viotica Naturstoffe, Sigma und Tocris Bioscience in dem höchst möglichen Reinheitsgrad bezogen.

2.1.2. Standards und Kits

1 kb DNA-Leiter	Fermentas
100 bp DNA-Leiter	Fermentas
SDS-PAGE Größenstandards (# SM0441, SM0431, SM0661)	Fermentas
<i>Nucleo Spin Extract II</i> ; DNA Extraktions-Kit	Macherey-Nagel
<i>Nucleo Spin Plasmid</i> ; Plasmid Reinigungs-Kit	Macherey-Nagel
<i>Super Signal West Pico Chemiluminescent</i> ; Western-Blot Detektions-Kit	Thermo Scientific
<i>2-D Quant Kit</i> ; zur Bestimmung der Proteinkonzentration	GE Healthcare
<i>Low molecular weight</i> und <i>high molecular weight</i> Gelfiltration-Kalibrierungs-Kit	GE Healthcare

Bei allen Kits wurden nur die dafür vorgesehenen Puffer bzw. Lösungen verwendet und nach Anleitung des Herstellers verfahren.

2.1.3. Enzyme und weitere Proteine

Für Restriktionsenzyme, Phosphatasen, Ligasen und Polymerasen wurden die vom Hersteller jeweils mitgelieferten bzw. empfohlenen Puffer verwendet und in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

Albumin (BSA); (aus Rinderserum)	Applichem
Alkalische Phosphatase (SAP); (aus Krabbe); (1 U/ μ L)	Fermentas
Calreticulin (aus Rinderleber)	Sigma; D.M. Ferrari
Citratsynthase (aus Schweineherz)	Sigma
DNaseI (aus Rinderpankreas)	Applichem
DsbA (<i>E. coli</i>)	ATGen
ERp29, ERp29b, -D (human, rekombinant)	N. N. Barak
FKBP12.6; FKBP13 (human, rekombinant)	H. Giese
Insulin (aus Rinderpankreas)	Sigma
<i>KpnI</i> (aus <i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8); (20 U/ μ L)	NEB
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Applichem
PD1b'; -b'x; -b'xI272A; PD11p; AGR2 (human, rekombinant)	L. W. Ruddock
Pfu-DNA-Polymerase (2 U/ μ L)	Fermentas
RNase (aus Rinderpankreas)	Sigma
<i>SphI</i> (aus <i>Streptomyces phaeochromogenes</i>); (10 U/ μ L)	NEB
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	Fermentas
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Applichem
Thrombin (aus Rinder Blutplasma)	Sigma
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ L)	Fermentas

2.1.4. Medien und Antibiotika

Medien:

SOC-Medium	18 g/L Trypton; 4,5 g/L Hefeextrakt; 1,8 mL/L NaCl-Stammlösung (5 M NaCl); 2,25 mL/L KCl-Stammlösung (1 M KCl); 9 mL/L MgCl ₂ -Stammlösung (1 M MgCl ₂); 9 mL/L MgSO ₄ -Stammlösung (1 M MgSO ₄); 18 mL/L Glucose-Stammlösung (1 M Glucose)
LB-Medium	10 g/L Trypton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl
LB-Agar:	LB-Medium mit zusätzlich 15 g/L Agar-Agar

Der pH-Wert wurde jeweils mit 1 N NaOH auf 7,0 eingestellt und die Medien anschließend bei 120 °C dampfsterilisiert. Nach Bedarf wurden den Medien nach dem Erkalten Antibiotika im Verhältnis 1:1000 (v/v) zugegeben.

Antibiotika:

Ampicillin 50 mg/mL in ddH₂O

Chloramphenicol 30 mg/mL in EtOH

Kanamycin 100 mg/mL in ddH₂O

Die Antibiotika wurden nach Herstellung steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die entsprechenden Antibiotika (Ampicillin für XL1-Blue; Ampicillin und Chloramphenicol für Rosetta; Ampicillin und Kanamycin für M15) dem Medium im Verhältnis 1:1000 (v/v) zugegeben (LB-Selektivmedium).

IPTG-Lösung:

IPTG-Stammlösung 1 M in ddH₂O

Die IPTG-Stammlösung wurde nach Herstellung steril filtriert und bei -20 °C gelagert. Zur Induktion der Expression wurde IPTG der Bakterienkultur im Verhältnis 1:1000 (v/v) bzw. 1:2000 (v/v) zugegeben.

2.1.5. Bakterienstämme und Plasmide

Stämme:

E. coli XL1-Blue (Stratagene): Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]*.

E. coli Rosetta (DE3) [pLysS] (Novagen): Genotyp Δ (*ara-leu*)7697 Δ *lacX74* Δ *phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac+ lacI q pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (CamR, KanR, StrR, TetR)*.

E. coli BL21 (Novagen): Genotyp *F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) ([lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5])*.

E. coli M15 [pREP4] (Qiagen): Genotyp *NalS, StrS, rifS, lac -, ara -, gal -, mtl -, F -, recA +, uvr +, [pREP4(KanR)]*.

Der Stamm XL1-Blue wurde ausschließlich zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Dieser verbessert durch die vorhandene Endonuklease- und Rekombinations-Defizienz die Qualität von Miniprep-DNA und erhöht die Insert-Stabilität.

Der Rosetta [pLysS] Stamm (λ lysogen mit T7 RNA-Polymerase) wurde für die Überexpression der rekombinanten Proteine aus pET-Vektoren (Novagen) verwendet. Dieser

Stamm wurde speziell für die Expression eukaryotischer Proteine konstruiert. Für Aminosäuren dieser Proteine kodieren Codons, welche in *E. coli* nur selten genutzt werden, auf einem Chloramphenicol-Resistenz Plasmid. Das Gen für die T7 RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Nach Induktion können von der T7 RNA-Polymerase die Zielgene transkribiert werden, welche unter Kontrolle des *T7*-Promotors stehen [204, 205].

Zur Überexpression der rekombinanten Proteine aus pGEX-Vektoren (GE Healthcare), deren Gene unter der Kontrolle des *trp/lac* Hybrid-Promotors (*tac*) stehen, wurde der BL21 Stamm verwendet. Zielgene unter Kontrolle dieses Promotors werden durch die *E. coli*-eigene RNA-Polymerase transkribiert.

Der M15 [pREP4] Stamm wurde gewählt, um Proteine aus pQE-Vektoren (Qiagen) rekombinant zu exprimieren. Zielgene in diese Vektor-Gruppe stehen unter der Kontrolle des *T5*-Promotors, welcher durch die *E. coli*-eigene RNA-Polymerase transkribiert wird. Der *T5*-Repressor liegt in diesem Stamm auf einem gesonderten Plasmid, welches ebenfalls Kanamycin-Resistenz vermittelt.

Plasmide:

Vektor	Besonderheit	Bezugsquelle	Exprimiertes Protein*
pGEX-4T-2	GST- <i>tag</i> ; Thrombin-Schnittstelle	GE Healthcare	GST (Rind)
pGEX-4T-2-P5	GST- <i>tag</i> ; Thrombin-Schnittstelle	D. M. Ferrari; Kramer <i>et al.</i> , 2001	P5 (Ratte)
pET23-PDIs	N-terminaler (His) ₆ - <i>tag</i>	L. W. Ruddock	ERp18; ERp27; ERp57; ERp46; ERp46a ⁰ ; -a; -a'; PDI; PDIIa; -aW35A; PDIp (Mensch)
pET23-BiP	N-terminaler (His) ₆ - <i>tag</i>	L. W. Ruddock	BiP (Mensch)
pQE30-P5a; -a'; -aa'	N-terminaler (His) ₆ - <i>tag</i>	Ergebnis dieser Arbeit	P5a; -a'; -aa' (Ratte)
pQE60-ERp29	C-terminaler (His) ₆ - <i>tag</i>	N. N. Barak; Barak <i>et al.</i> , 2009	ERp29 (Mensch)

*Die Domänengrenzen der jeweiligen Konstrukte sind in Tabelle 7 im Anhang aufgelistet.

Die Aminosäuresequenz des (His)₆-*tag* der exprimierten Proteine (ohne Signalpeptid) aus pET23- bzw. pQE30-Vektoren ist MHHHHHHM bzw. MRGSHHHHHHGSAC.

2.1.6. Oligodesoxynukleotide

Alle Primer wurden in einer Konzentration von 100 μM von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und waren HPLC-gereinigt. Für die Sequenzierung wurden die Standard-Sequenzierprimer für pQE30/60-, pET- und pGEX-Vektoren verwendet.

P5aa':

Forward-Primer: 5'-GCT ATG CAT GCA GTG ATG ATG TCA TCG AGT TAA CG-3'

Reverse-Primer: 5'-GCT ATG GTA CCT TAC AGG GCC CTT GAC ACT ATG TC-3'

P5a:

Forward-Primer: 5'-GCT ATG CAT GCA GTG ATG ATG TCA TCG AGT TAA CG-3'

Reverse-Primer: 5'-GCT ATG GTA CCT TAG AGG GCG GCA TCT ACA AT-3'

P5a':

Forward-Primer: 5'-GCT ATG CAT GCA AGA AGG ACG TGG TCG AGC TGA-3'

Reverse-Primer: 5'-GCT ATG GTA CCT TAC AGG GCC CTT GAC ACT ATG TC-3'

2.1.7. Fluoreszenzfarbstoffe für die Proteinmarkierung

Alle Fluoreszenzfarbstoffe wurden vor der Anwendung in wasserfreiem DMSO bis zu einer Konzentration von 1 nmol/ μL gelöst und im Weiteren bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe:

Fluoreszenzfarbstoff	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ_{max}	MW	Nettoladung
DyLight 488 (Thermo Scientific)	493	518	70.000	1011,20	-1
DyLight 549 (Thermo Scientific)	550	568	150.000	981,85	-3
Atto 550 (ATTO-TEC)	554	576	120.000	ca. 791	+1
Cy3 (GE Healthcare)	550	570	150.000	765,95	-1

$\lambda_{\text{abs/em}}$ = Wellenlänge des Absorptions- bzw. Emissionsmaximums (nm)

ϵ_{max} = Extinktionskoeffizient am Absorptionsmaximum ($\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

MW = Molekulargewicht (g mol^{-1})

2.1.8. Antikörper

Alle im Folgenden verwendeten Antikörper wurden in früheren Arbeiten selbst hergestellt oder von den Firmen Biorad (München), Abcam (Cambridge) oder Jackson ImmunoResearch/Dianova (Suffolk/Hamburg) bezogen.

Primäre Antikörper:

Kaninchen anti-P5 IgG (D. M. Ferrari; Ferrari *et al.*, 1998)

Kaninchen anti-PDI IgG (D. M. Ferrari; Ferrari *et al.*, 1998)

Kaninchen anti-KDEL IgG (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie; Göttingen)

Kaninchen anti-ERp29 IgG (D. M. Ferrari)

Kaninchen anti-GST IgG (D. M. Ferrari)

Kaninchen anti-(His)₆ IgG (Biorad)

Sekundäre Antikörper:

HRP-Ziege anti-IgG Kaninchen (Biorad)

Cy5-Ziege anti-IgG Kaninchen (Jackson ImmunoResearch/Dianova)

2.1.9. Mäusestämme

Verwendet wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6N (Bezugsquelle: Charles River Laboratories, Deutschland). *Knockout*-Mäuse wurden in früheren Arbeiten etabliert und vor Ort weiter gezüchtet und vermehrt [148].

2.1.10. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. Die Zusammensetzung von Puffer und Lösungen, die im Zusammenhang mit Restriktionsenzymen und Kits verwendet wurden, sind in den jeweiligen Produktbeschreibungen zu finden.

Allgemeine Puffer:

TBS	20 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; pH 8,0
PBS	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBE	89 mM Tris-HCl; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,0
Bradfordlösung	100 mg/L Coomassie Brilliant Blau G250; 50 mL/L 95 % Ethanol; 100 mL/L 85 % Phosphorsäure

Standard- und Dialysepuffer:

Sonifizierungspuffer	20 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 8 mM Imidazol; pH 8,0
Denaturierungspuffer	7 M GdmCl in 50 mM Natriumphosphatpuffer; pH 7,4

2. MATERIALIEN UND METHODEN

Standardpuffer A	50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
Standardpuffer B	100 mM Tris-HCl; pH 8,0
Dialysepuffer	PBS; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Citratsynthase- Aggregationspuffer	40 mM HEPES-KOH; pH 7,5
Proteolysepuffer	TBS; 0,01 % (v/v) Triton X-100
Probenpuffer, Ellmans-Test	0,1 M Tris-HCl; 0,5 mg/mL EDTA; pH 8,0
DTNB-Lösung	4 mg/mL DTNB in Probenpuffer, Ellmans-Test

Puffer für (2D)-SDS-Polyacrylamid- und Agarose-Gelelektrophorese:

Coomassielösung	2,5 g/L Coomassie Brilliant Blau G250; 454 ml/L Methanol; 92 mL/L Essigsäure
Entfärberlösung	30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
10 x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris-HCl; 2 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
5 x Probenauftrags- puffer für SDS-PA-Gele	2,5 g SDS; 4 mL Glycerin; 0,25 mL 2 % (w/v) Bromphenolblau;
Sammelgelpuffer	1,56 mL Tris-HCl (2 M pH 6,8); 5 mL 2-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer	0,5 M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8
6 x Probenauftrags- puffer für Agarose-Gele	1,5 M Tris-HCl; 6,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
CybrSafe	s. Herstellerangaben (Fermentas)
RSS-Puffer	1:10000 im Agarosegel
Colloidales Coomassie	10,5 g Harnstoff; 3,81 g Thioharnstoff; 0,5 g Chaps; 125 µL IPG-Puffer; 50 µL 1 % (w/v) Bromphenolblau; ad 25 mL; 0,3 % (w/v) DTT
2D-SDS-PAGE- Äquibrierungspuffer	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blau G-250; 2 % (v/v) Phosphorsäure; 15 % (w/v) Ammoniumsulfat; Mischung: 4 Teile Colloidales Coomassie + 1 Teil Methanol
10 x 2D-SDS-PAGE- Laufpuffer	6 M Harnstoff; 75 mM Tris-HCl pH 8,8; 30 % (v/v) Glycerol; 6 % (w/v) SDS; 2 mL/L 1 % (w/v) Bromphenolblau
Blotpuffer	60,6 g Tris-HCl; 288 g Glycin; 20 g SDS; ad 2 L
PBS-T	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; pH 8,3; 20 % (v/v) Methanol
TBS-T	PBS; 0,05 % (v/v) Tween-20
	TBS; 0,05 % (v/v) Tween-20

Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid) für SDS-PAGE (ausreichend für 4 Gele):

2,5 mL Sammelgelpuffer; 1,3 mL Acrylamid-Lösung
(„Rotiphorese 30 % (w/v)); 6,1 mL ddH₂O;
50 µL 10 % (w/v) APS; 15 µL TEMED

Trenngel (12 % (w/v) Acrylamid) für SDS-PAGE (ausreichend für 4 Gele):

3,9 mL Trenngelpuffer; 6,3 mL Acrylamid-Lösung
(„Rotiphorese 30 % (w/v)); 5,4 mL ddH₂O;
75 µL 10 % (w/v) APS; 11,3 µL TEMED

Trenngel (15 % (w/v) Acrylamid) für SDS-PAGE (ausreichend für 4 Gele):

3,9 mL Trenngelpuffer; 7,8 mL Acrylamid-Lösung
(„Rotiphorese 30 % (w/v)); 3,9 mL ddH₂O;
75 µL 10 % (w/v) APS; 11,3 µL TEMED

Puffer für chromatographische Reinigungsverfahren:

GSTrap Bindepuffer	PBS; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
GSTrap Waschpuffer	PBS; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,1 % (v/v) Triton X-100
GSTrap Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl; 10 mM GSH; 1 mM MgCl ₂ ; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,05 % (v/v) Triton X-100
Ni-NTA Waschpuffer	Sonifizierungspuffer; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 8-16 mM Imidazol
Ni-NTA Elutionspuffer A	20 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 0,01 % (v/v) Triton X-100; 200-500 mM Imidazol; pH 7,5
Ni-NTA Elutionspuffer B	20 mM Tris-HCl; 200 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 75 mM Imidazol; pH 7,5
Gelfiltrationspuffer A	20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,01 % (v/v) Triton X-100; pH 7,4
Gelfiltrationspuffer B	50 mM Natriumphosphat; 150 mM NaCl; 2 mM MgCl ₂ ; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 0,01 % (v/v) Triton X-100; pH 7,0
MonoQ Bindepuffer	20 mM Tris-HCl/bis-Tris; pH abhängig vom pI des Proteins; 0,01 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
MonoQ Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl/bis-Tris; 1 M NaCl; pH abhängig vom pI des Proteins; 0,01 % (v/v) Triton X-100; 0,1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

Puffer für die RNase-Rückfaltung:

Denaturierungspuffer	100 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 6 M GdmCl; 140 mM DTT; pH 8,0
RNase Dialysepuffer	0,1 % (v/v) Essigsäure
Reaktionspuffer	100 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 1 mM GSH; 0,2 mM GSSG; 4,5 mM cCMP; pH 8,0

Puffer für die katalysierte Insulin-Reduktion:

Reaktionspuffer	0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; 2 mM EDTA; pH 6,5
Verdünnungspuffer	50 mM Tris-HCl; pH 8,0

Puffer für *Far-Western* Analysen und Peptid-Arrays:

Äquilibrierungspuffer	4 % (v/v) Methanol in 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ; pH 7,4
Waschpuffer A	20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0,4 % (v/v) Triton X-100; pH 7,0
Waschpuffer B	20 mM HEPES; 150 mM NaCl; pH 7,0
<i>Cross-linking</i> -Puffer A	3 % (w/v) PFA in 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ; pH 7,0
<i>Cross-linking</i> -Puffer B	50 mM HEPES; 50 mM NaCl; 0,4 % (v/v) Triton X-100; pH 8,0
Neutralisierungspuffer	50 mM Ammoniumsulfat in 10 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ; pH 7,4
Blockierungspuffer	TBS; 0,4 % (v/v) Triton X-100
Inkubationspuffer A bzw. B	50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,4 % (v/v) Triton X-100; pH 7,0 bzw. 8,0
Inkubationspuffer C	50 mM bis-Tris; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,4 % (v/v) Triton X-100; pH 6,0
Inkubationspuffer D	20 mM HEPES; 150 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,4 % (v/v) Triton X-100; pH 7,0
<i>Quenching</i> -Puffer A	0,1 M Tris-HCl; pH 8,0
<i>Quenching</i> -Puffer B	0,1 M Glycin; pH 8,0
Markierungspuffer	50 mM HEPES; 25 mM NaCl; 0,01 % (v/v) Triton X-100; pH 8,0

Puffer für *Pull-down* Studien und Mikrosomenpräparation:

Mikrosomenpuffer	3 mM Imidazol; 250 mM Saccharose; pH 7,4
Kopplungspuffer	0,1 M $NaHCO_3$; 0,5 M NaCl; 0,01 % (v/v) Triton X-100; pH 8,3

Waschpuffer C	0,1 M Natriumacetat; 0,5 M NaCl; pH 4,0
Waschpuffer D	0,1 M Tris-HCl; 0,5 M NaCl; pH 8,0
Waschpuffer E	TBS; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT
Waschpuffer F	10 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; pH 7,4
Äquilibrierungspuffer	PBS; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 1 mM DTT

Kristallisationspuffer:

Kristallisationspuffer P5	20 mM HEPES; 10 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂ ; pH 7,4
Kristallisationspuffer ERp46	10 mM HEPES; 10 mM NaCl; pH 7,1

<i>Screening-Puffer (96-well)</i>	<i>JBScreen 1-10 Crystal Screening Kit (Jena Bioscience), Crystal Screen 1 und 2 (Hampton Research), Crystallization basic, extension, low ionic und cryo kit (Sigma-Aldrich), Factorial Solutions (AG Stubbs) Exakte Zusammensetzung s. Herstellerangaben.</i>
<i>Screening-Puffer (24-well)</i>	0,1 M HEPES; 10-25 % (w/v) PEG 10.000; pH 6,6-8,0

Alle oben aufgeführten Puffer für chromatographische Reinigungsverfahren, PDI-Aktivitätstests, spektroskopische Analysen, Peptid-Array Studien sowie Kristallisationspuffer wurden vor Gebrauch durch 0,2 µm-Filter steril filtriert und gegebenenfalls entgast.

2.1.11. Technische Ausrüstung

Geräte, die hier nicht aufgelistet sind, werden im folgenden Methodenteil beschrieben.

Absorptionsspektrophotometer:

Ultrospec 2100 pro	GE Healthcare
Betriebs- und Auswertungssoftware Swift II	Biochrom
Novaspec II	GE Healthcare

Chromatographische Geräte:

ÄKTA FPLC Purification System	GE Healthcare
ÄKTA Explorer mit Pumpe P-900;	
UV-Monitor UV-900; Fraktionskollektor Frac-950;	
pH- und Leitfähigkeitsmonitor pH/C-900	

Betriebs- und Auswertungssoftware Unicorn GE Healthcare

Chromatographiesäulen:

Superdex 200 *prep grade HiLoad* 26/69; 320 mL GE Healthcare

MonoQ HR 5/5; 1 mL GE Healthcare

GSTrap HP; 5 mL GE Healthcare

GSH-Agarose Säule; selbst gepackt Sigma

Ni-NTA-Sepharose Säule; selbst gepackt GE Healthcare

CNBr-aktivierte Sepharose Säule; selbst gepackt GE Healthcare

Gelelektrophoreseapparaturen:

Agarose-Gelelektrophoresekammer B1A OWL Separation Systems

SDS-PA-Gelelektrophoresekammer Mini-Protean 3 Bio Rad

Dual Gel Caster Bio Rad

Electrophoresis Power Supply E835 Consort

Rührwerke und Taumler:

IKA-Combimag RCA IKA-Werke GmbH

Heidolph MR 3001 K Heidolph

GFL 3015/16 Gesellschaft für Labortechnik

Rotator SB3 Stuart Scientific

Roller Mixer SRT2 Stuart Scientific

Thermomixer:

Thermomixer comfort Eppendorf

Schüttler und Inkubatoren:

Unitherm BE67 Uniequip

Certomat BS-1 B. Braun Biotech International

Waagen:

BP 1200 Sartorius

BP 211 D Feinwaage Sartorius

Zentrifugen:

Ultrazentrifuge Sorvall RC M120 GX	Sorvall
Rotor: S120 AT2	Sorvall
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Rotor: 6445 swing out	Heraeus
Eppendorf Centriguge 5415 R	Eppendorf
Sorvall Zentriguge RC 5B Plus	Sorvall
Rotoren: SLA 3000; SLA 1500	Sorvall

Blotapparatur und Detektionseinheit:

Semi-Dry-Blotter Pegasus	Phase
Detektionseinheit Chemi Smart 5000, CCD-Kamera	Vilber Lourmat
Betriebs- und Auswertungssoftware Chemi-Capt 5000	Vilber Lourmat

Sonstige Geräte:

Schlauchpumpe: Peristaltic Pump P-1	GE Healthcare
Ultraschall-Sonifikator: Digital Sonifier W-250 D	Branson
Ultraschallbad Transsonic T310	Flume Technik
Drehschieber-Vakuumpumpe: CVC 2000	Vacuubrand
UV-Transilluminator: Gene Genius Bio imaging System	Syngene
Betriebs- und Auswertungssoftware Gene Snap	Syngene
Mikroskop: MZ 16	Leica
Micro-Array Inkubationsschalen	Beck Kunststofftechnik
PCR-Gerät (<i>thermocycler</i>): T Gradient und T Personal	Biometra
Hochdruckhomogenisator: Polytron	Kinematica
Kristallisationsplatten 96-well; 24-well	Greiner; Qiagen
<i>Plate-Reader</i> : Synergy HT, TR w/injectors	Bio Tek instruments
Betriebs- und Auswertungssoftware Gen5	Bio Tek instruments
UV/Vis Küvetten (QS; Schichtdicke: 1 cm)	Hellma
CD- und Fluoreszenzküvetten (QX und QS; Schichtdicken: 0,1 cm; 1 cm)	Hellma
Nitrocellulose Blot-Membran: Bio Trace NT	Pall Corporation
Blot-Papier: GB005	Whatman
NAP-5 Umpufferungssäulen	GE Healthcare

2.2. Methoden

2.2.1. Gentechnische Methoden

2.2.1.1. Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

5 mL LB-Selektivmedium (Rosetta: Chloramphenicol; M15: Kanamycin; XL1: Ampicillin; BL21: ohne Antibiotikum) wurden mit *E. coli* Zellen des jeweiligen Stammes angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln ü.N. inkubiert (Vorkultur). Im Anschluss wurden 100 mL LB-Selektivmedium 1 % (v/v) mit der Vorkultur angeimpft und für ca. 2 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die OD^{600nm} ca. 0,5 erreicht hatte. Die Zellsuspension wurde auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C und 2700 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet zweimal mit eiskalter CaCl₂-Lösung gewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis inkubiert und danach erneut bei 4 °C und 2700 g sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet erneut in eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde 2 h auf Eis inkubiert, danach mit einfachem Volumen kaltem und sterilem 50 % Glycerin gemischt und ad 200 µL aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2. Transformation und Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Ein 200 µL Aliquot an kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und anschließend 1 µL des jeweiligen Plasmids (1:10) zupipettiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für exakt 90 s bei 42 °C im Wasserbad, danach wurde der Ansatz sofort auf Eis gegeben. Es wurden 800 µL SOC-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und vorsichtig invertiert. Anschließend wurde für 60 min bei 37 °C im Thermostaten bei 600 rpm geschüttelt. 200 µL des der Zellsuspension wurden auf einer LB-Agarplatte mit den jeweiligen Antibiotika unter sterilen Bedingungen ausplattiert und bei 37 °C im Brutraum ü.N. aufbewahrt. Von diesen Platten wurden einzelne Kolonien gepickt und in 100 mL LB-Selektivmedium in Erlenmeyerkolben überführt (Vorkultur). Die Vorkultur wurde wiederum bei 37 °C im Brutraum unter Schütteln bei 185 rpm ü.N. inkubiert.

2.2.1.3. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte der Expressionskultur wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (OD^{600nm}). Bei einer optischen Dichte über 1 wurde

entsprechend verdünnt. Eine Nullprobe wurde vom LB-Medium vor dem Animpfen genommen und deren optische Dichte als Referenz verwendet. Die optische Dichte der Kultur wurde nach einer Stunde, nach zwei Stunden und dann im Abstand von 30 min bestimmt.

2.2.1.4. Plasmidpräparation aus *E. coli* XL1-Blue

Die Plasmidpräparation aus 5 mL XL1 Übernachtskulturen erfolgte mit dem Plasmidpräparationskit *Nucle Spin Plasmid* der Firma Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Man bedient sich dabei dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender selektiver Adsorption der Plasmide an einer Silika-Membran unter hohen Salzkonzentrationen. Lineare RNA und DNA wird vorher abgebaut. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µL ddH₂O. Diese Methode lieferte Mengen von etwa 3 µg Plasmid-DNA.

2.2.1.5. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von aufgereinigter Plasmid- und Insert-DNA erfolgte bei Messung der Absorption bei 260 nm. Dabei entspricht eine Absorption von 1 etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Für eine grobe Abschätzung wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die DNA-Banden mit CybrSafe unter UV-Licht sichtbar gemacht. Anschließend wurde mit Referenz-Banden bekannter DNA-Menge verglichen.

2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach DNA-Menge wurden 5-20 µL Probe mit jeweils 1-4 µL 6 x Probenauftragspuffer für Agarose-Gele gemischt und auf ein 1 % (w/v) Agarosegel in 1 x TBE aufgetragen. Dem Gel wurde vor Erkalten 1:10000 (v/v) Cybr Safe hinzugegeben und gemischt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 45-90 min bei 100-150 Volt. Die DNA-Detektion erfolgte im Anschluss unter UV-Licht.

2.2.1.7. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; nach [206]) bedient man sich der *in vitro*-Amplifikation von geringen Mengen an DNA mittels spezifischer Primer und hitzetoleranter DNA-Polymerasen. Dabei wird die DNA-Menge in mehreren Zyklen exponentiell vervielfältigt. Für Klonierzwecke wurde die Pfu DNA-Polymerase verwendet, da diese im Gegensatz zur Taq DNA-Polymerase eine Korrekturlesefunktion (3'→5' Exonukleaseaktivität) besitzt. Für die Amplifikation der cDNA von P5a, -a' und -aa' aus pGEX-4T-2-P5 wurden folgende Reaktionsansätze gewählt:

Reagenz	Konzentration im Ansatz
<i>Forward-Primer</i> *	2 pM
<i>Reverse-Primer</i> *	2 pM
Taq/Pfu Puffer mit MgSO ₄	1 x
dNTPs	0,2 mM
Taq/Pfu DNA-Polymerase	1 U
<i>template</i> -Vektor-DNA	10-25 ng
ddH ₂ O	ad 50 µL

* s. Abschnitt 2.1.6.

Reaktionsbedingungen der PCR mittels *thermocycler*:

Reaktionsschritt	Temperatur			Zeit
	P5a	P5a'	P5aa'	
1. Initiale Denaturierung	94 °C			3 min
2. Denaturierung	94 °C			50 sec
3. Primer-Hybridisierung	55 °C	58 °C	58 °C	50 sec
4. Polymerisation	72 °C			50 sec (Taq); 100 sec (Pfu)
Wiederholung Schritte 2. – 4. 29 x				
5. Abschließende Polymerisation	72 °C			5 min
6. Reaktionsende	4 °C			Ende

2.2.1.8. Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittener DNA

PCR-Produkte, geschnittene Vektoren und geschnittene Inserts wurden von Enzymen, Primern und dNTPs mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt. Die unter UV-Licht mittels Cybr Safe sichtbar gemachten DNA-Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten. Die Extraktion aus dem Agarose-Gel erfolgte dabei nach Anleitung des Herstellers mit dem *Nucleo Spin Extract II* DNA Extraktions-Kit (Macherey-Nagel). Das Prinzip der Methode beruht, ähnlich wie bei der Plasmid-Präparation, auf der Adsorption der DNA an einer Silika-Membran. Die DNA wurde mit 30 µL ddH₂O eluiert.

2.2.1.9. Analytischer und präparativer Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Plasmiden

Für die enzymatische Spaltung von PCR-Produkten und Ziel-Plasmiden wurden diese mit den jeweiligen Restriktionsenzymen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert.

Gegebenfalls wurde BSA zugegeben. Der Restriktionsverdau erfolgte bei 37 °C im Thermoblock für 3 h. Das verdaute PCR-Produkt wurde im Anschluss mit dem *Nucleo Spin Extract II* DNA-Extraktions-Kit aufgereinigt. Der Restriktionsverdau wurde nach folgendem Schema angesetzt, wobei die Restriktionsenzyme stets zum Schluss zugegeben wurden:

Reagenz	P5a; P5a'; P5aa' (pQE30)
Restriktionsenzym I	10 U <i>SphI</i>
Restriktionsenzym II	10 U <i>KpnI</i>
BSA	1 x
Restriktions-Puffer	1 x NEB 1
DNA	~ 500 ng
ddH ₂ O	ad 10 µL

2.2.1.10. Dephosphorylierung der geschnittenen Plasmide

10 µL des verdauten Vektors wurden mit 1 µL Alkalischer Phosphatase (1 U/µL) und 1,2 µL Dephosphorylierungspuffer (10 x) gemischt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzedenaturierung des Enzyms für 15 min bei 65 °C. Das verdaute Plasmid wurde danach mit dem *Nucleo Spin Extract II* DNA Extraktions-Kit aufgereinigt.

2.2.1.11. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation des geschnittenen und aufgereinigten PCR-Produktes in das jeweilige Plasmid erfolgte in einem molaren Verhältnis von ca. 5:1. Dafür wurden 6 µL des PCR-Produktes mit 2 µL Plasmid-DNA und 1 µL Ligasepuffer + ATP (10 x) gemischt. Dem Reaktionsansatz wurde 1 µL T4 DNA-Ligase (1 U/µL) hinzugefügt und mindestens 2 h bei 16 °C inkubiert. Der gesamte Ligations-Ansatz wurde anschließend in chemokompetente *E.coli* XL1-Blue Zellen transformiert.

2.2.1.12. Ethanol-Fällung von DNA

Für die Aufkonzentrierung und Abtrennung von DNA von Enzymen und freien Nukleotiden, wurde die Ethanol-Fällung angewandt. Mit dieser Methode wird unter sauren Bedingungen die DNA mit zunehmender Konzentration an Ethanol gefällt [207]. Dazu wurde die Probe auf ein Ausgangsvolumen von 50 µL gebracht. Es wurden 5 µL einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 zugegeben und gemischt. Anschließend wurde zur Probe 125 µL eiskalter absoluter Ethanol zugegeben und gemischt. Nach Zentrifugation bei

16.000 g für 15 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet mit 500 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es erfolgte erneut Zentrifugation bei 16.000 g für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das DNA-Pellet bei RT unter dem Abzug getrocknet um Spuren von Ethanol zu beseitigen. Im Anschluss wurde die gefällte DNA in 10 µL ddH₂O aufgenommen. Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma StarSeq (Mainz, Deutschland). Dazu wurden 6 µL der gefällten DNA in ddH₂O (entspricht ca. 400-700 ng DNA) mit 1 µL des spezifischen Sequenzierprimers gemischt.

2.2.1.13. *E. coli*-Hitzeschock Analyse

Um die Chaperon-Eigenschaften von ausgewählten PDIs im lebenden Modellsystem näher zu untersuchen, wurde die modifizierte *E. coli*-Hitzeschock Analyse angewandt [156]. Dazu wurden *E. coli* Rosetta [pLysS] Zellen, welche mit dem entsprechenden Konstrukt bzw. mit dem leeren Vektor (Kontrolle) transfiziert wurden, ü.N. bei 37 °C auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Einzelne Kolone wurden gepickt und jeweils in 100 mL LB-Selektivmedium bis zu einer OD^{600nm} von ca. 0,4 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,5 mM IPTG ü.N. bei 30 °C. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 3.000 g für 20 min zentrifugiert und das Zellpellet sofort in eiskaltem LB-Selektivmedium resuspendiert. Die OD^{600nm} wurde mit eiskaltem LB-Medium auf jeweils ca. 0,2 AU eingestellt. 1 mL-Aliquots der Zellsuspension wurden 0, 20 und 60 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 100 µL mehrerer Verdünnungsreihen auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden zur qualitativen Auswertung der gewachsenen Kolonien gescannt und digitalisiert.

2.2.2. Allgemeine proteinchemische Methoden

2.2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch drei Methoden. Bei der Methode nach Bradford erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption der Probe bei 595 nm [208]. Durch Vergleich der Absorption einer zuvor erstellten Eichgerade mit BSA, konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden. Die Verdünnung der Probe für die Messung betrug 1:100. Das Prinzip der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford beruht dabei auf der Bildung eines blauen Komplexes aus Coomassie Brilliant Blau G250 ($\epsilon^{595\text{nm}} = 47.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Der Bradford-Test wurde ebenfalls für den qualitativen Protein-Nachweis, z.B. in Wasch- und Elutions-

Fraktionen bei der chromatographischen Reinigung verwendet (s. Abschnitt 2.2.3.). Des Weiteren wurde die Proteinkonzentration mittels *2-D Quant Kit* (GE Healthcare) bestimmt. In diesem Fall wurde nach Angabe des Herstellers verfahren.

Die Proteinkonzentration wurde ebenfalls durch spektrophotometrische Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt [209, 210]. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte durch die aus der Primärsequenz des jeweiligen Proteins ermittelten molaren Extinktionskoeffizienten (ProtParam: [211]; s. Tabelle 7, Anhang) nach dem Gesetz von Lambert-Beer berechnet (s. Gl. 1).

Formel 1

$$c_m = \frac{E^{280\text{nm}}}{\epsilon^{280\text{nm}} \times d} \times \text{MW}$$

- Es sind:
- c_m = Massenkonzentration (mg/mL)
 - $E^{280\text{nm}}$ = die bei 280 nm gemessene Extinktion (AU)
 - $\epsilon^{280\text{nm}}$ = Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
 - d = Schichtdicke der Küvette (cm)
 - MW = Molekulargewicht des Proteins (g/mol).

2.2.2.2. Bestimmung freier SH-Gruppen durch Reaktion mit DTNB (Ellman-Test)

Das Prinzip beruht auf der Reaktion von 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), (DTNB; Ellman-Reagenz) mit freien SH-Gruppen des denaturierten Proteins bei $\text{pH} > 8$ unter Bildung von gemischten Disulfiden und des Thionitrobenzoat-Anions, welches wegen seines hohen molaren Extinktionskoeffizienten von $13.600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ bei 410 nm spektroskopisch leicht quantifizierbar ist (s. Abb. 8); [212].

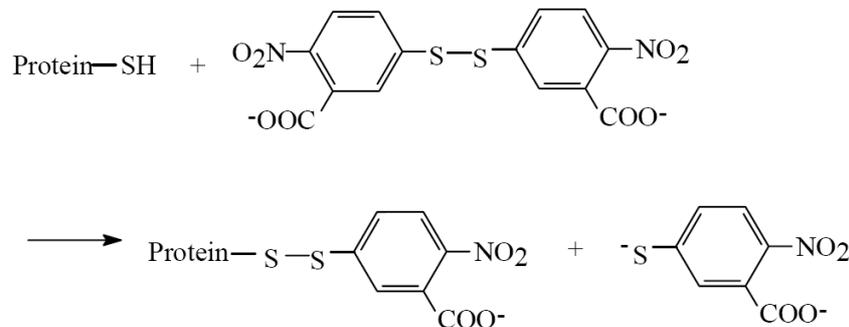


Abbildung 8: Die Modifizierung freier SH-Gruppen im Protein durch DTNB. Reaktionsprodukte sind ein gemischtes Disulfid zwischen dem Protein und der Nitrobenzoylgruppe sowie das wegen seines hohen molaren Extinktionskoeffizienten bei 410 nm leicht quantifizierbare Thionitrobenzoat-Anion.

Es wurden zwei Testansätze pipettiert. Zum einen jeweils 50-300 µg Protein/mL Probenpuffer + 30 µL DTNB-Lösung, zum anderen jeweils 50-300 µg Protein/mL Probenpuffer + 30 µL Probenpuffer. Als Leerwert diente jeweils 1 mL Probenpuffer ohne Protein + 30 µL DTNB-Lösung. Die Testansätze wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Extinktion bei 410 nm bestimmt. Aus der gemessenen und leerwertkorrigierten Extinktion bei 410 nm wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz die molare Konzentration an freien SH-Gruppen berechnet. Das erhaltene Ergebnis wurde schließlich durch die Proteinkonzentration dividiert und daraus die Anzahl an freien SH-Gruppen im denaturierten Protein bestimmt. Aus den jeweiligen Werten der eingesetzten Proteinkonzentrationen wurde das arithmetische Mittel gebildet (s. Gln. 2 und 3).

Formel 2

$$c_{\text{SH}} = \frac{\Delta E_{\text{netto}} \times \text{VF}}{\epsilon^{410\text{nm}} \times d}$$

mit E_0 = Probenpuffer + DNTB

E_1 = Proteinlösung + DNTB

E_2 = Proteinlösung + Probenpuffer

und $\Delta E_{\text{app}} = E_1 - E_2$

$\Delta E_{\text{netto}} = \Delta E_{\text{app}} - E_0$

c_{SH} = Konzentration freier SH-Gruppen im Protein (mol/L)

VF = Verdünnungsfaktor der Probe

$\epsilon^{410\text{nm}}$ = molarer Extinktionskoeffizient von Thionitrobenzoat bei 410 nm ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

folgt:

Formel 3

$$n_{\text{SH}} = \frac{C_{\text{SH}}}{C_{\text{Prot}}}$$

n_{SH} = Anzahl freier SH-Gruppen im Protein

c_{Prot} = Proteinkonzentration (mol/L)

2.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde mit einem 4 % Sammelgel und einem 12 bzw. 15 % Trenngel durchgeführt [213]. Die Proben wurden zusammen mit dem Probenauftragspuffer für 5 min bei 95 °C im Thermoblock erhitzt und anschließend bei 13.000 rpm kurz abzentrifugiert und der Überstand mittels einer Spritze aufs Gel aufgetragen (Molekulargewicht-Standards siehe Materialien). Die Laufbedingungen wurden folgendermaßen gewählt: 150 V; 35 mA pro Gel, ca. 1 h.

Die Färbung von SDS-PA-Gelen erfolgte durch ca. 1 h Inkubation mit Coomassielösung bei RT. Im Anschluss wurden die Gele mit Entfärberlösung bis zum gewünschten Grad entfärbt und danach in Wasser gelagert. Die untere Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei etwa 0,1-2 µg Protein pro Bande.

2.2.2.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Um Proteine aus verdünnter Lösung aufzukonzentrieren, bedient man sich der Präzipitation unter stark sauren Bedingungen [214]. Dazu wurde zur Probe langsam das entsprechende Volumen 30 % (w/v) TCA unter Schütteln zugegeben (s. Gl. 4). Im Anschluss wurde 30 min auf Eis inkubiert und danach 15 min bei 4 °C und 16.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µL kaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 16.000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet unter dem Abzug getrocknet.

Formel 4

$$\text{VolTCA} = \frac{\text{VolProbe}}{\left(\frac{30\%}{8\%}\right) - 1}$$

Es sind:

VolTCA = Volumen an 30 % (w/v) TCA, das zur Probe zugegeben werden muss (die Endkonzentration beträgt 8 % (v/v) TCA)

VolProbe = Volumen der Probe

2.2.2.5. Western-Blot

Für die Proteindetektion mittels Antikörper oder für Protein-Bindungsstudien (*Far-Western* Analysen) wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Dazu wurde eine *semi-dry* Blot-Apparatur verwendet. Die

Gele wurden dazu kurz in Blotpuffer gewaschen und auf zwei Schichten Blot-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurden erneut zwei Schichten Blot-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Das Blot-Papier wurde zuvor ebenfalls in Blotpuffer getränkt. Nach Entfernen restlicher Luftblasen durch Kompression des *sanwich*-Aufbaus, erfolgte der Transfer bei 50 mA pro Gel bei maximal 20 V für 1,5-2 h. Der erfolgreiche Transfer wurde nach Verwendung der Membran mittels Inkubation in Coomassielösung überprüft. Für Proteinbindungsstudien wurde die Membran für mindestens 2 h unter dem Abzug getrocknet. Für die Proteindetektion mittels Antikörper wurde die Membran kurz mit PBS gespült und anschließend mit 5 % (w/v; PBS) Milchsuspension für mindestens 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und der spezifische Primärantikörper 1:1000 (v/v) in 0,5 % (w/v; PBS) Milchsuspension auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei RT unter leichtem Schwenken. Der Überstand wurde abgenommen und die Membran 3 mal 5 min mit PBS bei RT gewaschen. Es erfolgte die Applikation des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers 1:10.000 (v/v) in 0,5 % (w/v; PBS) Milchsuspension. Es wurde erneut 2 h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die Membran 2 mal 5 min mit 0,5 % (w/v; PBS) Milchsuspension gewaschen. Es folgten weitere Waschschrte für 5 mal 10 min mit PBS-T. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz mittels *Super Signal West Pico Chemiluminescent* Western-Blot Detektions-Kit (Thermo Scientific). Das Signal wurde durch eine CCD-Detektionseinheit mit angeschlossener Analysesoftware ausgelesen. Dazu wurde die Membran zwischen 0,5-5 min belichtet.

2.2.2.6. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Die Aufkonzentrierung von verdünnten Proteinlösungen unter nativen Bedingungen erfolgte mit Hilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore) mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 5.000-30.000 Da, je nach Molekulargewicht des jeweiligen Proteins. Die Filtereinheiten wurden dazu bei 3.000 g bis zur gewünschten Konzentration zentrifugiert. Die Aufkonzentrierung erfolgte in der Regel bei 4 °C. Bei Erreichen höherer Konzentrationen (z.B. für Kristallisationszwecke) wurde bei RT aufkonzentriert.

2.2.2.7. Limitierte Proteolyse

Um Aussagen zum Domänenaufbau, insbesondere aber zur Flexibilität bestimmter Bereiche innerhalb eines Proteins, treffen zu können, wurde die limitierte Proteolyse

(modifiziert nach [100]) angewandt. Trypsin spaltet selektiv nach Lys- und Arg-Resten in einem Protein. Dabei werden unstrukturierte Bereiche im Protein schneller abgebaut, als geordnete Strukturen (Protein-Domänen). Für die Proteolyse wurde das jeweilige Protein (P5; ERp46) in kalten Proteolysepuffer überführt. Die Proteinkonzentration betrug nach dem Umpuffern etwa 1 mg/mL. Der Verdau wurde durch Zugabe von Trypsin im Verhältnis Trypsin : P5/ERp46 = 1:100 (w/w) bzw. 1:10 (w/w) gestartet. Es wurde sofort gevortext und der Ansatz auf Eis inkubiert. Der Reaktion wurden Aliquots nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen und zum Abstoppen sofort in SDS-PAGE Ladepuffer überführt und bei 95 °C erhitzt. Das Ergebnis des Verdau wurde im Anschluss mittels SDS-PAGE überprüft.

2.2.2.8. Thrombinspaltung

Im Anschluss an die GSH-Agarose-Affinitätsreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen wurde eine Thrombinspaltung durchgeführt. Thrombin spaltet spezifisch Arginin-Glycin-Bindungen. Das Fusionsprotein wurde hierfür ü.N. bei 4 °C in Dialysepuffer dialysiert. Es folgte die Abspaltung des GST-Teils durch Zugabe von 300 µL Thrombin (1 U/µL) und Inkubation ü.N. bei RT und leichtem Schwenken. Das Ergebnis der Thrombinspaltung wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.9. Chemische Kopplung mit Dimethyl-adipimidat (DMA)

Für die Analyse der Bindung von PDIs an Peptide wurden diese entweder in Lösung (*Dot-Blot* Analyse) oder direkt auf der Membran (*Far-Western* Analyse; Abschnitt 2.2.8.1.) an FKBP12.6 gebunden. Die Quervernetzung der Peptide an das Protein erfolgt durch Reaktion der α -Aminogruppe von Lys-Reste mit dem homo-bifunktionellen Imidoester DMA unter alkalischen Bedingungen (s. Abb. 9).

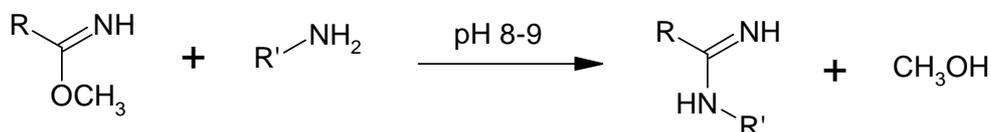


Abbildung 9: Die Quervernetzung von Proteinen und Peptiden durch Imidoester. Bifunktionelle Imidoester reagieren unter alkalischen Bedingungen mit α -Aminogruppen der N-Termini sowie Lys-Reste von Proteinen und Peptiden. Diese werden dadurch miteinander kovalent verknüpft. R = Imidoester mit zweiter funktioneller Gruppe; R' = Protein- bzw. Peptid-Rest mit α -Aminogruppe

Die Membran mit immobilisiertem FKBP12.6 wurde für 4 x 10 min in *Cross-linking*-Puffer B gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden 10 µM Peptid in *Cross-linking*-Puffer B auf die Membran gegeben und 20 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von unmittelbar zuvor in ddH₂O gelöstem DMA bis zu einer Konzentration von 5 mM. Es wurde 30 min bei 20 °C und im Dunkeln unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Reaktion durch Inkubation der Membran für 10 min mit *Quenching*-Puffer A gestoppt. Im Anschluss wurde die Membran 4 x 10 min mit Blockierungspuffer gewaschen. Im weiteren Verlauf wurde verfahren, wie in Abschnitt 2.2.8.1. beschrieben (*Far-Western Analyse*).

2.2.2.10. Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die Detektion von gebundenem Protein in Protein- und Peptid-Interaktionsstudien erfolgte durch Messung der extrinsischen Fluoreszenz. Hierfür wurde das jeweilig Protein mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert (s. Tabelle 9, Anhang). Die Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff beruht dabei auf der Reaktion von α -Aminogruppen des N-Terminus sowie von Lys-Resten des Protein mit dem homo-bifunktionellen *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) unter alkalischen Bedingungen (s. Abb. 10).

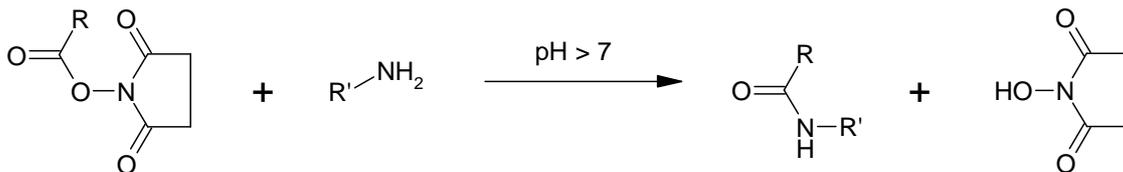


Abbildung 10: Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit NHS-Estern. NHS-Ester reagieren unter alkalischen Bedingungen mit α -Aminogruppen der N-Termini sowie Lys-Reste von Proteinen. Dabei wird das Protein kovalent mit dem Fluorophor verknüpft. R = fluoreszierende Gruppe des NHS-Esters; R' = Protein-Rest mit α -Aminogruppe.

Das Protein wurde in Markierungspuffer umgepuffert und die Konzentration bestimmt. Die Kopplung des Proteins mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte in einem molaren Verhältnis von 5:1. Statistisch ist demnach jedes fünfte Protein einfach fluoreszenzmarkiert. Die Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte für 30 min im Dunkeln auf Eis. Anschließend wurde noch reaktiver Fluoreszenzfarbstoff durch Zugabe von *Quenching*-Puffer B und Inkubation für 10 min im Dunkeln und auf Eis inaktiviert. Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde im Anschluss in den entsprechenden Inkubationspuffer umgepuffert. Vor der Applikation wurde das fluoreszenzmarkierte Protein 10 min bei 16.000 g zentrifugiert um mögliche Aggregate zu entfernen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Kopplung wurde ein Aliquot des fluoreszenzmarkierten Proteins entnommen und auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen. Die Detektion des fluoreszenzmarkierten Proteins erfolgte mittels eines Typhoon Trio Scanners (GE Healthcare) mit 520 nm (DyLight 488) bzw. 580 nm (Cy3; DyLight 549) Emissionsfiltern.

2.2.2.11. Kopplung von Proteinen an eine CNBr-aktivierte Sepharose Matrix

Etwa 1 g CNBr-aktivierte Sepharose (entspricht ca. 4-5 mL Medium) wurden in 50 mL kalter 1 mM HCl für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium mit 1 L kalter 1 mM HCl über einer Fritte gewaschen. Nach Zentrifugation des Mediums bei 50 g wurde der Überstand komplett abgenommen. Auf 2 mL Medium wurden ca. 10 mg des gegen Kopplungspuffer dialysierten Proteins zugegeben. Das Volumen wurde auf 15 mL aufgefüllt und 2 h bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Nach Zentrifugation bei 50 g wurde der Überstand abgenommen und dessen Proteinkonzentration spektrophotometrisch bestimmt. Nach der Kopplung wurde nicht gebundenes Protein durch Waschen des Mediums mit ca. 20 mL Kopplungspuffer entfernt. Im Anschluss erfolgte die Blockierung der noch reaktiven Gruppen durch Inkubation des Mediums mit *Quenching*-Puffer A bei 4 °C ü.N. Danach wurde das Medium je 3-mal abwechselnd mit jeweils ca. 10 mL Waschpuffer D und Waschpuffer C gewaschen. Für nachfolgende Interaktionsanalysen wurde das Medium mit dem gekoppelten Protein in PBS mit 0,1 % (v/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

2.2.2.12. Mikrosomenpräparation aus muriner Leber

Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C bzw. auf Eis und so schnell wie möglich durchgeführt. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt und vor Gebrauch steril filtriert. Die 3-4 Monate alten männlichen Mäuse wurden durch CO₂-Inhalation getötet (gemäß TschG). Im Anschluss erfolgte die Entfernung von Blut aus der Leber durch Perfusion mit PBS + Proteaseinhibitor mittels Schlauchpumpe und Kanüle. Danach wurde die Leber mit einem Skalpell herausgeschnitten und grob zerkleinert. Die zerkleinerte Leber wurde 2-mal mit PBS und anschließend 2-mal mit Mikrosomenpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Leber mit ca. 4 mL Mikrosomenpuffer versetzt und ca. 5-mal für jeweils 10 sec bei Stufe 4 homogenisiert. Das Homogenisat wurde 20 min bei 4.000 g zentrifugiert und der Überstand durch 6 Schichten in Mikrosomenpuffer äquilibrierte Mullbinden filtriert. Das Filtrat wurde in 2 mL aliquotiert und 20 min bei 16.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand unter Vakuum 60 min bei 4 °C und 100.000 g zentrifugiert. Die Mikrosomen wurden anschließend in Mikrosomenpuffer resuspendiert und erneut bei 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und das Zellpellet mit den enthaltenen Mikrosomen in 200 µL PBS resuspendiert. Die Mikrosomen wurden im Anschluss sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -87 °C gelagert.

2.2.2.13. Rekombinante Proteinexpression

Die Überexpression der verschiedenen Proteine erfolgte durch Kultivierung der *E. coli*-Zellen in LB-Medium unter Schütteln bei 185 rpm sowie nach untenstehender Tabelle.

Expressionsbedingungen:

Protein	<i>E. coli</i> -Stamm	T _{Wachstum}	T _{Expression}	[IPTG]	OD ^{600nm}	t _{Expression}
P5	BL21	37 °C	30 °C	0,5 mM	0,8-0,9	2,5 h
P5a; -a'; -aa'	M15 [pREP4]	37 °C	30 °C	0,5 mM	0,7-0,8	3 h
ERp29	XL1-Blue	37 °C	37 °C	0,5 mM	0,7	3 h
ERp18	Rosetta (DE3) [pLsysS]	37 °C	37 °C	1 mM	0,4-0,5	4 h
PDI; PD1a; -aW35A; ERp57; ERp27; PD1p; ERp46; ERp46a ⁰ ; -a; -a'; BiP	Rosetta (DE3) [pLsysS]	37 °C	30 °C	0,5 mM	0,4-0,5	ü.N.
GST	BL21	37 °C	37 °C	1 mM	0,8-0,9	3 h

T_{Wachstum} = Temperatur bis zur Induktion

T_{Expression} = Temperatur nach Induktion

[IPTG] = die für die Induktion verwendete IPTG-Konzentration

OD^{600nm} = die bis zur Induktion zu erreichende optische Dichte

t_{Expression} = Expressionsdauer

Die Expressionskultur wurde dazu 1:100 (v/v) mit einer Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Am Ende der Kultivierung wurde 1 mL Probe entnommen und bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 200 µL PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss im Ultraschallbad bei maximaler Amplitude für etwa 15 min. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 20 min bei 4 °C wurden 16 µL des Überstandes abgenommen und mit 4 µL 5 x Ladepuffer gemischt sowie 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Expression wurden die Proben auf ein 12-15 %iges SDS-PA-Gel aufgetragen. Die gesamte Zellsuspension wurde am Ende der Expression 20 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 20 mL PBS/L Expressionskultur auf Eis

resuspendiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Aufreinigung bei -87 °C.

2.2.3. Chromatographische Reinigung von PDIs

Alle folgenden Reinigungsschritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt. Bei der chromatographischen Reinigung von FKBP12.6 und FKBP13 wurde nach bereits publizierten Protokollen verfahren [24].

2.2.3.1. Ni²⁺-Affinitätsreinigung (Ni-NTA)

Die Reinigung der PDIs erfolgte im ersten Schritt über Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Das Prinzip beruht auf der Bindung des Proteins mit N-terminalem Hexahistidin-Fusionsteil ((His)₆-tag) an einer Nickel-Nitrilotriacetat-Agarose-Matrix (Ni-NTA). Dabei bildet das Histidin zusammen mit den NTA-Molekülen und dem Nickel-Ion einen Chelatkomplex. Zunächst wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und das Volumen auf 100 mL/L Zellpellet mit Sonifizierungspuffer aufgefüllt sowie 1 mM AEBSF Proteaseinhibitor/L Zellpellet hinzugefügt. Nach Zugabe von 75 mg Lysozym/L Zellpellet und 20 min Inkubation auf Eis, erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung. Dazu wurden folgende Parameter gewählt: 2 min (20 sec je Puls; 20 sec Pause); 50 % Amplitude. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls auf Eis. Um DNA-Bestandteile im Zellysats abzubauen, wurden eine Spatelspitze DNaseI zugegeben und erneut 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zellysats 40 min bei 11.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Bindung der PDIs mit (His)₆-tag erfolgte im *batch*-Verfahren. Der Überstand des Zellysates wurde auf 50 mL-Reaktionsgefäße aufgeteilt und zu 2 mL Ni-NTA-Sepharose/L Zellpellet gegeben. Das Medium wurde zuvor mit Sonifizierungspuffer äquilibriert. Das Protein wurde 1 h unter Schwenken an das Medium gebunden. Anschließend wurden die Ni-NTA-Sepharose durch Zentrifugation für 5 min bei 50 g sedimentiert und unspezifisch gebundene Proteine durch 1 h Waschen des Mediums mit 50 mL Ni-NTA Waschpuffer/L Zellpellet entfernt. Das gesamte Medium wurde in eine 20 mL-Säule überführt und erneut mit 50 mL Ni-NTA Waschpuffer gewaschen. Im Falle der Reinigung von P5aa' wurden stark gebundene Verunreinigungen zuvor mit mehreren Säulenvolumina Elutionspuffer B entfernt. Die spezifische Elution des Zielproteins erfolgte mit Ni-NTA Elutionspuffer A. Die Elutionsfraktionen wurden im Anschluss per Bradford-Test auf ihren Proteingehalt analysiert. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit/Homogenität überprüft und anschließend entsprechend vereinigt.

2.2.3.2. Starke Anionenaustauschchromatographie (MonoQ)

Als zweiten Reinigungsschritt nach der Ni-NTA-Affinitätsreinigung wurde in der Regel eine MonoQ Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Das Prinzip dieses Reinigungsverfahrens beruht auf der selektiven Bindung von Proteinen an eine Sepharose-Matrix mit gekoppelten Alkylresten mit spezifischen funktionellen Gruppen (quartäre Ammonium-Gruppe). Die Bindungsstärke hängt dabei vom isoelektrischen Punkt (pI) des jeweiligen Proteins ab. Um eine möglichst selektive Bindung des Zielproteins zu gewährleisten wurde der pH-Wert des Bindepuffers so gewählt, dass dieser eine pH-Einheit höher als der pI des Zielproteins ist. Für die Reinigung wurde das Protein zuvor bei 4 °C ü.N. vollständig gegen MonoQ Bindepuffer dialysiert und mit 50 mM DTT reduziert. Die Bindung des Proteins erfolgte an eine MonoQ-Säule HR 5/5 (GE Healthcare) mit 1 mL Säulenvolumen in MonoQ Bindepuffer bei einer Flussrate von 1 mL/min an einer ÄKTA-FPLC-Apparatur. Das gebundene Protein wurde mit mindestens 50 mL Bindepuffer gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte im Anschluss durch einen Stufengradienten mit MonoQ Elutionspuffer. Während der Elution erfolgte die Detektion durch Messung der Leitfähigkeit und Absorption bei 280 nm. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit/Homogenität überprüft und anschließend entsprechend vereinigt.

2.2.3.3. Glutathion-Affinitätsreinigung (GSH-Agarose) und Thrombinspaltung

Der Zellaufschluss erfolgte analog zur Ni²⁺-Affinitätsreinigung (s. Abschnitt 2.2.3.1.). Das Zellpellet wurde in diesem Fall in PBS resuspendiert und aufgeschlossen. Proteine mit Glutathion-S-Transferase-Fusionsteil (GST-tag) wurden in PBS an eine GSH-Agarose Säule (GSTrap; GE Healthcare) mit 5 mL Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1 mL/min mittels einer ÄKTA-FPLC-Apparatur gebunden. Die Säule wurde zuvor in GSTrap-Bindepuffer äquilibriert. Im Anschluss wurde das gebundene Protein mit ca. 50 mL GSTrap Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit GSTrap Elutionspuffer. Detektiert wurde ebenfalls durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit/Homogenität überprüft und anschließend entsprechend vereinigt. Im Falle der Reinigung von P5 wurde im Anschluss eine Thrombinspaltung durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.2.8.).

2.2.3.4. Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Als finalen Reinigungsschritt für alle PDI-Poteine wurde die Gelfiltration angewandt. Dabei macht man sich das Prinzip des unterschiedlichen Diffusionsverhaltens verschieden

großer Moleküle zu Nutzen. Große Moleküle mit einem hohen Molekulargewicht diffundieren nicht in die Hohlräume der Sepharose-Matrix und werden daher kaum zurückgehalten. Kleinere Moleküle diffundieren verstärkt in die Hohlräume der Matrix und werden demnach länger zurückgehalten (innere Diffusion). Dies hat unterschiedliche Retentionszeiten der Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht zur Folge. Für präparative und analytische Zwecke wurde eine Superdex 200 *prep grade HiLoad* 26/60-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 320 mL verwendet. Die Säule wurde zuvor mit Gelfiltrationspuffer A bzw. -B äquilibriert. Eluiert wurde ebenfalls mit Gelfiltrationspuffer A bzw. -B. Pro Lauf wurden maximal 2,5 mL Probe auf die Säule aufgetragen. Gearbeitet wurde bei 4 °C ebenfalls an einer ÄKTA-FPLC-Apparatur mit einer Flussrate von 1 mL/min und einem Maximaldruck von 0,3 MPa. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit/Homogenität überprüft und anschließend entsprechend vereinigt. Im Falle der chromatographischen Reinigung von P5 wurde im Anschluss an die Gelfiltration eine zweite GSH-Agarose Reinigung durchgeführt, um geringe Mengen von nicht gespaltenem Fusionsprotein sowie GST zu entfernen (s. Abschnitt 2.2.3.3.).

2.2.4. Bestimmung des Molekulargewichtes von PDIs

2.2.4.1. Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der Kalibrierungsproteine Aldolase (158.000 Da), Conalbumin (75.000 Da), Ovalbumin (43.000 Da), Carbonsäureanhydrase (29.000 Da) und Ribonuclease A(13.700 Da); (GE Healthcare) wurde eine analytische Gelfiltration bei 4 °C in Gelfiltrationspuffer A durchgeführt. Aus den experimentell ermittelten Elutionsvolumina der jeweiligen Proteine konnte deren spezifischer Verteilungskoeffizient nach Gl. 5 bestimmt werden.

Formel 5

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Mit	K_{av}	=	Verteilungskoeffizient
	V_e	=	experimentelles Elutionsvolumen
	V_0	=	spezifisches Ausschlussvolumen
	V_c	=	geometrisches Säulenvolumen

Die Auftragung des Verteilungskoeffizienten gegen den Logarithmus des bekannten Molekulargewichtes der Kalibrierungsproteine lieferte eine Kalibrierungsgerade. Mit dieser konnte das unbekannte Molekulargewicht der PDIs bestimmt werden. Verwendet wurde eine Superdex 200 *prep grade HiLoad* 26/60-Gelfiltrationssäule. Das geometrische Säulenvolumen beträgt 318 mL. Das Ausschlussvolumen wurde mit 110 mL ermittelt.

2.2.4.2. Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (Optima XL-A Ultrazentrifuge mit Rotor An-60 Ti; Beckman Coulter) wurde von Herrn Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Das Molekulargewicht von ERp46 wurde mittels Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation über die Abhängigkeit der Konzentration vom Abstand zur Rotorachse nach Gl. 6 bestimmt.

Formel 6

$$M_r = \frac{d \ln A}{dr^2} * \frac{2RT}{(1 - v\rho) * \omega^2}$$

mit	M_r	=	Molekulargewicht (g mol^{-1})
	A	=	Absorption bei 280 nm
	r	=	radialer Abstand zur Rotorachse (m)
	R	=	molare Gaskonstante ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)
	T	=	Temperatur (K)
	v	=	partielles spezifisches Volumendes Proteins (mL g^{-1})
	ρ	=	Dichte des Lösungsmittels (g mL^{-1})
	ω	=	Winkelgeschwindigkeit (s^{-2})

Die Messungen wurden in Gelfiltrationspuffer A (ohne Triton X-100 und ohne 2-Mercaptoethanol) mit einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/mL bei 20 °C durchgeführt. Sedimentationsläufe wurden bei 40.000 rpm, Gleichgewichtsläufe bei 12.000 rpm durchgeführt. Die Datenaufnahme sowie -Analyse erfolgte mittels dem Beckman XL-A Analyseprogramm.

2.2.5. Redox- und Chaperon-Aktivitätstests

Alle Aktivitätstests wurden, soweit nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt.

2.2.5.1. Insulin-Reduktionstest

Um die Reduktase-Aktivität von PDIs zu untersuchen, wurde die Fähigkeit zur Reduktion von Insulin herangezogen [61]. Die Reduktion der intermolekularen Disulfidbrücke von Insulin führt zur Präzipitation der freien B-Kette, während die A-Kette nahezu in Lösung verbleibt. Die Präzipitation lässt sich spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 650 nm bestimmen. Zunächst wurde eine Insulin-*stock*-Lösung von 10 mg/mL hergestellt. Dafür wurden 50 mg Insulin in 4 mL Verdünnungspuffer gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl-Lösung auf 2-3 eingestellt und anschließend mit 1 M NaOH-Lösung sofort bis auf pH 8 titriert. Danach wurde mit ddH₂O auf 5 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Insulin-*stock*-Lösung war ohne jegliche Trübung und wurde bei -20 °C gelagert. Für den eigentlichen Insulin-Reduktionstest wurde Insulin aus der *stock*-Lösung auf 1 mg/mL in Reaktionspuffer verdünnt sowie 0,28 µM PDI-Protein hinzugefügt und gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 mM GSH und anschließendem Mischen gestartet. Der Verlauf der Präzipitation wurde über einen Zeitraum von 45 min verfolgt.

2.2.5.2. RNase-Rückfaltungstest

Um die Oxidase-Aktivität von PDIs zu bestimmen, wurde ihr Einfluss auf die oxidative Renaturierung von reduzierter und denaturierter RNaseA untersucht [62]. Das Prinzip beruht auf der RNaseA-katalysierten Spaltung der 2'-3'-cyclischen Phosphodiesterbindung in cCMP. Die Bildung des Reaktionsproduktes CMP kann spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 296 nm verfolgt werden. Hierbei wurden 5 mg RNaseA in Denaturierungspuffer für 4 h bei RT inkubiert. Um den Denaturierungspuffer zu entfernen, wurde die denaturierte und reduzierte RNaseA anschließend in RNase-Dialysepuffer überführt. Für die Reaktion wurden 2-5 µM PDI-Protein sowie 5 µM denaturierte und reduzierte RNaseA in Reaktionspuffer gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 4,5 mM cCMP gestartet. Die Reaktion wurde dabei in einem Zeitraum von 30-45 min verfolgt.

2.2.5.3. Citratsynthase-Aggregationstest

Die Fähigkeit von PDIs die Aggregationsneigung von Modell-Proteinen zu reduzieren wird oft als vereinfachter Test für die Bestimmung ihrer Chaperon-Aktivität herangezogen [215]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PDIs auf die thermisch induzierte Denaturierung von Citratsynthase qualitativ untersucht. Lyophilisierte Citratsynthase wurde bis zu einer Konzentration von 1 mg/mL in Aggregationspuffer gelöst. Die Reaktion wurde

durch Verdünnung der Citratsynthase 1:100 in Aggregationspuffer zusammen mit 0,15-0,25 μM PDI-Protein gestartet. Der gesamte Ansatz wurde bei 43 °C unter konstantem Rühren inkubiert. Der Verlauf der thermischen Denaturierung wurde über ca. 17 min mit einem Fluoromax-2 Fluoreszenzspektrometer (Jobin Yvon, Horiba) durch Messung der Lichtstreuung in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke verfolgt. Als Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden jeweils 500 nm gewählt. Die Spaltbreite betrug 1,5 nm.

2.2.6. Spektroskopische Methoden

2.2.6.1. UV-Vis-Absorptionsspektroskopie

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration sowie zum Nachweis von Mikroaggregaten und Kontaminationen mit Nukleinsäuren ($A^{280\text{nm}}/A^{260\text{nm}} \approx 1,5$) wurden UV-Vis-Spektren von PDIs nach ihrer Reinigung aufgenommen. Aggregate in der Probe wurden zuvor durch Zentrifugation bei 16.000 g bei 4 °C entfernt. Der Wellenlängenbereich der aufgenommenen Spektren betrug dabei 240-340 nm. Es wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Alle Messungen wurden Puffer-korrigiert.

2.2.6.2. Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Optisch aktive Verbindungen, bei denen die links- und rechtsgängigen Komponenten von linear polarisiertem Licht unterschiedlich absorbiert werden, zeigen so genannten Circular dichroismus. Da das Polypeptidrückgrat im Fern-UV-Bereich (170-250 nm) optisch aktiv ist, zeigen unterschiedliche Sekundärstrukturen im Protein auch unterschiedliche Spektren in diesem Wellenlängenbereich. Im Nah-UV-Bereich (260-320 nm) zeigen einige Chromophore des Proteins, wie beispielsweise Tyrosine und Tryptophane, unterschiedliche spektrale Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer unmittelbaren heterogenen Umgebung in einem gefalteten Protein.

Gemessen wurde an einem CD-Spektropolarimeter J-710 (Jasco). Als Probenpuffer wurde Standardpuffer A verwendet. Der Puffer wurde zuvor mit einem 0,2 μm Filter filtriert um Staubpartikel zu entfernen. Die Probe wurde im entsprechenden Puffer verdünnt und 20 min bei 16.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 190-260 nm in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm. Alle Messwerte wurden Puffer-korrigiert. Gemessen wurde bei 20 °C. Die Spektren wurden in 0,5-1,0 nm Wellenlängenschritten, mit einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Bandbreite von 1 nm aufgenommen. Es wurden 20 Akkumulationen vorgenommen. Die

Akkumulationszeit betrug 1 s. Als Proteinkonzentrationen wurden 0,15-0,3 mg/mL eingesetzt. Die Beschleunigerspannung überstieg während den Messungen nie 700 V. Die gemessenen Elliptizitäten (θ) wurden auf die mittlere molekulare Masse der Aminosäuren (MRW) im jeweiligen Protein bezogen (s. Gl. 7):

Formel 7

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\text{MW} \times \theta \times 100}{N \times d \times c}$$

- Mit θ = gemessene Elliptizität (deg)
 $[\theta]_{\text{MRW}}$ = *mean residue weight* Elliptizität (deg cm² dmol⁻¹)
 MW = Molekulares Gewicht des Proteins (g/mol)
 d = Schichtdicke der verwendeten Küvette (cm)
 N = Anzahl der Aminosäuren im Protein
 c = Proteinkonzentration (mg/mL)

2.2.6.3. Fluoreszenz-Spektroskopie

Werden in einem Molekül Elektronen angeregt und fallen diese wieder zurück in ihren energetischen Grundzustand kommt es zur Emittierung von Licht. Diese Eigenschaft von Molekülen wird Fluoreszenz genannt. Die Wellenlänge des emittierten Lichtes ist dabei stets größer als die Anregungswellenlänge. Proteine zeigen nach Anregung im Fern-UV-Bereich ebenfalls Fluoreszenz. Verantwortlich dafür sind die chromophoren Gruppen im Protein. Phe emittieren bei ca. 280 nm, Tyr bei etwa 305 nm und Trp in Abhängigkeit von der Solvent-Exponiertheit zwischen 320 und 360 nm. Je hydrophober die unmittelbare Umgebung eines Trp-Restes im Protein ist, desto mehr ist sein Fluoreszenzmaximum zu niedrigeren Wellenlängen hin verschoben (hypsochromer Effekt). Stark exponierte, an der Proteinoberfläche gelegene Trp-Reste zeigen eine Rotverschiebung (batochromer Effekt). Durch die Abhängigkeit der Lage des Intensitätsmaximums im Emissionsspektrum von Trp von dessen Position im Protein, lassen sich Rückschlüsse auf die unmittelbare Umgebung dieses Trp-Restes ziehen. Damit ist es möglich mittels Fluoreszenzspektroskopie Veränderungen in der Tertiärstruktur eines Proteins, z.B. bei Denaturierungsübergängen, zu beobachten.

Alle Fluoreszenzemissionsspektren wurden mit einem Fluoromax-2 Fluoreszenzspektrometer (Jobin Yvon, Horiba) mit angeschlossenem Wasserbad zur Temperierung der Proben aufgenommen. Als Probenpuffer wurde Standardpuffer A

verwendet. Alle Puffer und Proben wurden vor den Messungen filtriert und zentrifugiert. Gemessen wurde in Fluoreszenzküvetten mit 1 cm Schichtdicke und bei 20 °C. Zur selektiven Anregung von Trp im Protein wurde eine Anregungswellenlänge von 295 nm gewählt. Ansonsten wurde bei 280 nm angeregt. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 305-400 nm bzw. 300-400 nm aufgenommen. Für Einzelspektren wurden 5 Akkumulationen vorgenommen und daraus der Durchschnitt bestimmt. Als Wellenlängenschritte wurden 0,5-1 nm gewählt. Die Akkumulationszeit betrug 0,5 s und die Spaltbreite 5 nm. Als Proteinkonzentrationen wurden, soweit nicht anders angegeben, 0,5-10 µM verwendet. Die gemessenen Intensitäten wurden auf die molare Konzentration normiert.

2.2.7. Denaturierungsübergänge

Die Guanidiniumhydrochlorid induzierte Denaturierung von P5 und ERp46 wurden über Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Die Proteine wurden dazu in Denaturierungspuffer bis zur gewünschten GdmCl-Konzentration verdünnt (20-30 Messpunkte). Die Proben wurden vor der Messung ü.N. bei 20 °C inkubiert. Gemessen wurde bei Anregungswellenlängen von 295 bzw. 280 nm. Zu alle weiteren Einstellungen s. Abschnitt 2.2.6.3. Die Proteinkonzentration betrug, soweit nicht anders angegeben, 5 µM. Die Denaturierungsmittel-abhängigen Übergänge wurden aus den Intensitätsänderungen bei 330 nm für P5 und 325 nm für ERp46 bei einer Anregungswellenlänge von jeweils 295 nm bestimmt. Die Normierung auf den Anteil an denaturiertem Protein erfolgte nach Gl. 8:

Formel 8

$$f_U = \frac{y_F - y}{y_F - y_U}$$

Es ist y das jeweilige Messsignal, y_F das Messsignal der nativen Form und y_U das der denaturierten Form. Der Anteil an denaturiertem Protein ist f_U . Aus den normierten Daten aus Gl. 8 kann mittels Gln. 9-11, unter Annahme eines Zweizustands-Gleichgewichtes, die Änderung der freien Reaktionsenthalpie der Denaturierung in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration berechnet werden (Lineare Extrapolations-Methode); [216, 217]:

Formel 9

$$K = \frac{f_U}{f_F}$$

Formel 10

$$\Delta G = -RT \ln(K)$$

Formel 11

$$\Delta G = \Delta G(\text{H}_2\text{O}) - m[\text{D}]$$

Dabei sind f_U und f_F die Fraktionen an denaturiertem bzw. nativem Protein, $[\text{D}]$ ist die Konzentration an Denaturierungsmittel (mol/L), K ist die Gleichgewichtskonstante, R die allgemeine Gaskonstante ($8,315 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T die absolute Temperatur (K) und ΔG die Enthalpieänderung der Denaturierung bei einer bestimmten Denaturierungsmittelkonzentration (J/mol). Weiterhin beschreibt $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ die Enthalpieänderung der Denaturierung bei 0 M Denaturierungsmittel. Der Faktor m (J/mol/M) ist der Anstieg der Geraden im Graphen ΔG gegen $[\text{D}]$ und beschreibt den Grad der Abhängigkeit von ΔG von $[\text{D}]$.

2.2.8. Protein- und Peptid-Interaktionsstudien

Alle Interaktions- und Bindungsstudien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt.

2.2.8.1. Bindungsstudien mit immobilisierten Proteinen (Far-Western/Dot-Blot-Analyse)

Die Analyse der Interaktion von PDIs mit immobilisierten (denaturierten) Substraten erfolgte mittels modifizierter *Far-Western*-Methode [24, 218-220]. Nach dem elektrophoretischen Transfer von ca. 20 μg FKBP12.6 bzw. FKPP13 auf eine Nitrocellulosemembran und anschließender Trocknung der Membranen (s. Abschnitt 2.2.2.5.), wurde diese 2 x kurz mit Äquilibrierungspuffer gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und kurz mit TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran für 20 min in *Cross-linking*-Puffer A. Nach vollständiger Abnahme des Überstandes wurde die Membran 2 x 10 min in Neutralisierungspuffer gewaschen. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit TBS für jeweils 10 min. Um unspezifische Bindungen an die Membran auszuschließen, wurde diese anschließend für 2 h mit Blockierungspuffer unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde die Membran mit 1 μM fluoreszenzmarkiertem PDI-Protein in Blockierungspuffer für 1 h unter leichtem Schwenken und im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wurde erneut vollständig abgegossen und ungebundenes Protein 2 x 10 min mit TBS von der Membran gewaschen. Die Detektion der gebundenen fluoreszenzmarkierten PDIs erfolgte durch einen *Typhoon Trio Scanner* (GE

Healthcare) mit 520 nm Emissionsfilter bei einer Auflösung von 50 *microns*. Die Quantifikation des gebundenen Proteins erfolgte densitometrisch mit Hilfe der *Image Quant TL* Software (GE Healthcare). Bei der Detektion gebundener fluoreszenzmarkierter PDIs mittels spezifischer Antikörper wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. In diesem Fall wurde verfahren wie bei der Bindungsstudie an immobilisierte Peptide (Peptid-Array; s. Abschnitt 2.2.8.2.).

2.2.8.2. Bindungsstudien mit immobilisierten Peptiden (Peptid-Array)

Die Untersuchung der selektiven Bindung von PDIs an immobilisierte Peptide mit spezifischer Aminosäuresequenz erfolgte durch Verwendung von Peptid-Arrays (JPT Peptide Technologies). Die synthetisierten Peptide wurden dazu vom Hersteller auf einer Glasoberfläche immobilisiert. Die Peptidlänge betrug dabei 13-15 Aminosäuren. Insgesamt enthielt der Peptid-Array 6.754 unterschiedliche Peptide in drei Replikaten (s. Abb. 11).

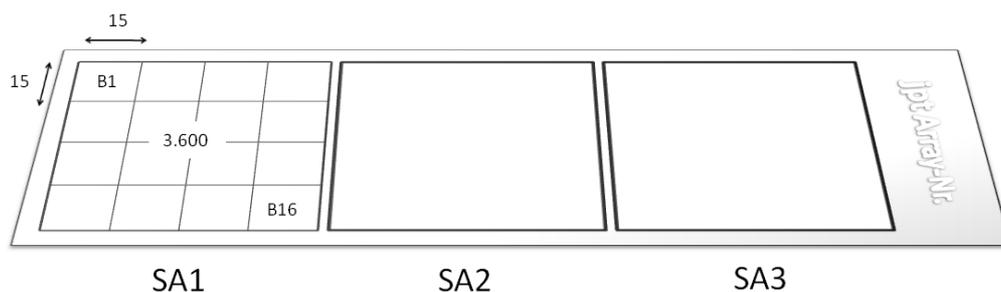


Abbildung 11: Aufbau eines Peptid-Arrays. Der Peptid-Array besteht aus drei identischen Replikaten (SA1-SA3) mit jeweils 16 Blöcken (B1-B16) mit je 225 unterschiedlichen Peptiden. Das entspricht einer Anzahl von 3.600 theoretisch möglichen Peptiden. Die Anzahl der verfügbaren Peptide ist jedoch geringer, da nicht alle Reihen vollständig besetzt sind. Für die Analyse wurden zwei unterschiedliche Peptid-Arrays verwendet. Das entspricht einer theoretischen Anzahl von 7.200 unterschiedlichen Peptiden.

Bei der Auswahl der Peptide wurde von 57 bekannten sowie putativen PDI-Interaktionspartnern und weiteren ER-Proteinen ausgegangen. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen wurden dabei so gewählt, dass sie z.T. mehrfach überlappen. Darüber hinaus enthielt der Peptid-Array bereits in der Literatur beschriebene Modell-Peptide sowie Positiv- und Negativ-Kontrollen (s. Tabelle 10, Anhang). Die Cys-Reste innerhalb der Peptide wurden zu Ser ausgetauscht, um kovalente Bindungen über intermolekulare Disulfidbrücken ausschließen zu können. Ein zweiter Peptid-Array enthielt 130 Peptide in ebenfalls drei Replikaten. Die Auswahl dieser Peptide erfolgte ausgehend von bereits bekannten PDI-Bindungsmotiven. Ein dritter Peptid-Array enthielt ca. 9.000 Peptide von Krankheitsassoziierten Proteinen.

Für die Bindungsanalyse wurden die Peptid-Arrays zunächst mehrmals mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit Waschpuffer A für ca. 20 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Peptid-Arrays mit 0,5 µM fluoreszenzmarkierten PDIs für 2 h in Inkubationspuffer D und unter leichtem Schwenken im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Peptid-Arrays nach vollständigem Abgießen des Überstandes 4 x 5 min mit Waschpuffer A gewaschen um ungebundenes Protein zu entfernen. Es folgten weitere Waschschrte für 4 x 5 min mit Waschpuffer B. Um Salzausfällungen des Puffers auf der Glasoberfläche zu vermeiden, wurde 5 x 10 min mit ddH₂O gewaschen. Alle Waschschrte wurden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt. Die Peptid-Arrays wurden anschließend durch Zentrifugation bei 50 g getrocknet und die Signale mit einem *ArrayWorkx* Scanner (JPT *Peptide Technologies*) mit 532 nm Emissionsfilter und Expositionszeiten von 0,01-0,5 sec ausgelesen.

Die Signalintensitäten wurden mit Hilfe der *GenePix Pro* Software (Molecular Devices) quantifiziert. Die Signalintensitäten der gebundenen Peptide wurden von der Signalintensität des Hintergrundes abgezogen und auf die durchschnittlichen Signalintensitäten der leeren (nicht gebundenen) *spots* normiert. Die normierten Signalintensitäten wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn ihr Wert mindestens um den Faktor **N** über dem Hintergrundsignal lag. Als **N** wurde das Dreifache der Standardabweichung des Hintergrundsignals festgelegt.

Alternativ zur Detektion von fluoreszenzmarkierten Proteinen erfolgte die Detektion über fluoreszenzmarkierte spezifische Antikörper. In diesem Falle wurden die Peptid-Arrays nach Waschen mit Waschpuffer A für 2 x 5 min mit TBS-T äquilibriert. Anschließend wurde mit dem Primärantikörper in TBS-T 1:1000 (v/v) für 1 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und im Folgenden mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ebenfalls in TBS-T 1:1500 (v/v) für 1 h inkubiert. Es folgten weitere Waschschrte für 4 x 10 min mit TBS-T. Um störende Pufferreste zu entfernen wurde die Peptid-Arrays wiederum 5 x 10 min mit ddH₂O gewaschen. Die Detektion erfolgte wie bereits beschrieben.

2.2.8.3. Bestimmung der Interaktionspartner von PDIs (pull-down Analyse)

Die Mikrosomen aus 2 Mäuselebern (s. Abschnitt 2.2.2.12.) wurden zunächst auf Eis aufgetaut und 20 min mit 1 mM DTT auf Eis inkubiert. Für den Aufschluss der mikrosomalen Membranen erfolgte eine 30 min Inkubation mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 bei 4 °C unter konstantem Rühren. Nach Zentrifugation für 20 min bei 16.000 g wurde der Überstand mit

100 μ L in Äquibrierungspuffer gewaschenen „Leer“-CNBr Matrix für 30 min bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Das Gesamtvolumen wurde dazu auf 1 mL mit Äquibrierungspuffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte 1 min Zentrifugation bei 100 g. Der Überstand wurde abgenommen und jeweils zur Hälfte auf je 100 μ L PDI-Protein-CNBr Matrix bzw. GST-CNBr Matrix (Kontrolle) zugegeben (Gesamtvolumen erneut 1 mL). Es wurde für 1 h bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Die Matrices wurden im Anschluss 3-mal mit je 1 mL Waschpuffer E gewaschen. Es erfolgte Zentrifugation bei 100 g für 1 min. Der Überstand wurde nach jedem Waschschrift komplett abgenommen. Im Anschluss erfolgte zweimaliges Waschen mit Waschpuffer F (Niedrigsalz-Waschschrift). Der Überstand wurde erneut komplett abgenommen und gebundenes Protein mit 60-100 μ L 1 x SDS-Probenauftragspuffer (für 1D-SDS-PAGE) bzw. Dige-Lysispuffer (2D-SDS-PAGE) eluiert. Die CNBr-Matrix wurde 1 min bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden anschließend sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und für die weitere Analyse bei -87 °C gelagert.

2.2.9. 2D-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE)

Bei der 2D-SDS-PAGE nutzt man die Trennung von Proteinen sowohl nach ihrer Ladung bzw. isoelektrischem Punkt (1. Dimension) als auch nach ihrer Größe (2. Dimension). Die Auftrennung in der 1. Dimension erfolgt in einem nativen Gel mit entsprechendem pH-Gradienten (meist pH 3-10) unter Anlegen einer hohen Spannung. Alle Geräte wurden vor Gebrauch mit 0,5 % (w/v) SDS sowie 70 % EtOH gereinigt.

2.2.9.1. Gießen von diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen

PA-Gele mit einem Format von 25,5 x 20 cm wurden automatisch mit einer *a2DEoptimizer*-Apparatur (nextgensciences) nach Angaben des Herstellers gegossen. Die Glasplatten wurden hierfür in eine *Ettan DALTwelve*-Gelgießapparatur (GE Healthcare) eingespannt. Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient von 5-15 % (v/v) Polyacrylamid gewählt. Nach dem Gießen der Gele wurden diese mit 0,1 % (w/v) SDS überschichtet, zur vollständigen Polymerisation ü.N. bei RT inkubiert und danach sofort verwendet.

2.2.9.2. Passive Rehydrierung

Um ein diskretes Laufverhalten der einzelnen Proteine unabhängig von der Anzahl der Disulfidbrücken zu gewährleisten, wurden diese alkyliert. Zunächst erfolgte die Reduktion durch Inkubation der Probe mit 15 mM DTT für 15 min auf Eis. Anschließend wurden die

freien Cysteine durch Inkubation der Probe mit 15 mM IAA für 15 min auf Eis alkyliert. Die so behandelten Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von 450 µL mit RSS-Puffer aufgefüllt. Das gesamte Volumen der Proben wurde in einem *Tray* (GE Healthcare) gleichmäßig verteilt. Auf die Proben wurden jeweils 24 cm Gelstreifen (GE Healthcare) luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten aufgelegt und anschließend mit Öl überschichtet. Die kommerziell erhältlichen Gelstreifen enthielten bereits den pH-Gradienten (3-10 nicht linear). Die Rehydrierung erfolgte bei 20 °C ü.N. Im Anschluss wurden die Gelstreifen direkt für die isoelektrische Fokussierung eingesetzt.

2.2.9.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mittels *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare). Die Gelstreifen wurden mit der Gelseite nach oben in die dafür vorgesehene mit Öl gefüllte Kammer des Gerätes überführt. Auf beide Enden der Gelstreifen wurden ca. 1 cm lange in ddH₂O angefeuchtete Papierstreifen gelegt, welche den Kontakt zur Elektrode vermitteln. Die elektrische Fokussierung erfolgte ü.N. mit folgendem Programm (Gesamtdauer ca. 22 h):

Schritt	Spannung	Dauer
1. Entsalzen	150 V	375 Vh (2:30 h)
2. Probenauftrag	300 V	2.700 Vh (9:00 h)
3. Prä-Fokussierung	500 V	500 Vh (1:00 h)
4. Prä-Fokussierung	1.000 V	2.625 Vh (3:30)
5. Fokussierung	10.000 V	16.500 Vh (3:00)
6. Fokussierung	10.000 V	25.000 Vh (2:30)

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen entweder direkt weiterverwendet, oder bei -87 °C gelagert.

2.2.9.4. Diskontinuierliche SDS-PAGE (zweite Dimension)

Die Gelstreifen wurden zunächst in je 10 mL 2D-SDS-PAGE-Äquilibriumspuffer mit 100 mg DTT für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Alkylierung in 10 mL 2D-SDS-PAGE-Äquilibriumspuffer mit 250 mg IAA ebenfalls für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Gelstreifen kurz in ddH₂O abgespült, luftblasenfrei auf das SDS-PA-Gel aufgelegt und mit warmer 0,5 % (w/v) Agarose überschichtet. Die PA-Gele wurden in einer *Ettan DALTwelve*-Gellaufapparatur in 1 x 2D-SDS-PAGE-Laufpuffer der

Elektrophorese unterzogen. Dazu wurden folgende Bedingungen gewählt: 45 min, 2 W/Gel; 4:15 h, 17 W/Gel; bei 24 °C. Nach der Elektrophorese wurden die Gele ca. 20 min in Entfärberlösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung in colloidalem Coomassie unter Schwenken bei RT und ü.N.

Nach der Färbung der Gele wurden diese mit ddH₂O unter leichtem Schwenken bis zum gewünschten Grad entfärbt. Anschließend wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer sterilen abgeschnittenen Pipettenspitze aus dem Gel ausgestochen (*spot-picking*) und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Gelstücke wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -87 °C gelagert.

2.2.10. Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Die massenspektrometrische Identifizierung der ausgestochenen Proteinbanden (*spots*) erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Vor der Messung erfolgte *in situ* der proteolytische Verdau der Protein-Proben mittels spezifischer Proteasen. Soweit nicht anders angegeben, wurde hierfür Trypsin verwendet. Die Analyse erfolgte mittels *time of flight* Massenspektrometrie (TOF MS), über *electrospray ionization* (ESI) mit einem VG Bio-Q Tripel-Quadrupol Massenspektrometer (Fisons Instruments).

Suchparameter	Funktion
Peak-Listenformat	<i>Mascot Generic</i>
Datenbank	NCBIInr
Gesamtanzahl der Sequenzen	10320604
Gesamtanzahl der Reste	3520861843
Anzahl der Sequenzen nach Taxonomie-Filterung	714438
Anzahl der Einträge	6252
Taxonomie-Filter	<i>Mammalia</i>
verwendetes Enzym	Trypsin
max. Anzahl nicht-stattgefundener Spaltungen	2
Modifizierung der Peptide	Carbamidomethyl, Oxidation
Toleranz der Peptid-Masse	0,8 Da
Toleranz der Fragment-Masse	0,6 Da
Werte der Atom-Massen	monoisotopisch
Typ des verwendeten Instrumentes	ESI-QUAD-TOF

Die massenspektrometrischen Ergebnisse wurden mittels einer nicht-redundanten NCBI-Proteindatenbank ausgewertet. Für die Datenbanksuche wurde die MASCOT-Datenbank-Suchmaschine V2.2.06 (Matrix Science) verwendet [221]. Die identifizierten Proteine wurden anschließend mit ihrem Gen-Namen, der Proteingröße sowie der Anzahl der ermittelten Peptidbruchstücke tabellarisch zusammengefasst (s. Abschnitt 3.8.). Für die Identifikation der Proteine wurden die Suchparameter nach obenstehender Tabelle verwendet.

2.2.11. Proteinkristallisation

2.2.11.1. Ansetzen unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen

Für die Kristallisationsansätze von P5-Varianten und ERp46 wurden die Standardkristallisationspuffer *Sigma Cryo Kit*, *Sigma Basic Kit*, *Jena Bioscience 1-10*, *Hampton Research*, *Home Factorial Solutions* und *Molecular Dimensions* verwendet (genaue Zusammensetzung s. Herstellerangaben). Die Kristallisationspuffer wurden in 96-well Platten mit 96 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen pipettiert. Jede der 96 Kristallisationsbedingungen unterschied sich dabei in Zusammensetzung und pH-Wert des Kristallisationspuffers. Es wurden unterschiedliche Puffersubstanzen, Additive und Präzipitierungsreagenzien verwendet. Darüber hinaus enthielten die Kristallisationsansätze z.T. verschiedene Konzentrationen an gebundenen Peptiden sowie niedermolekularen PDI-Inhibitoren. Der Kristallisationspuffer befindet sich in einem Reservoir von 110 μL . Darüber wurden 200 nL eines 1:1 Gemisches von Proteinlösung und Kristallisationspuffer separat mit Hilfe eines Pipettierroboters (Cartesian) platziert. Mit der Zeit stellt sich durch Gasphasendiffusion ein Gleichgewicht hinsichtlich der Zusammensetzung zwischen Reservoir- und Proteinlösung ein. Dabei verringert sich das Volumen der Proteinlösung, so dass es zu einer Aufkonzentrierung kommt (*sitting drop vapour diffusion*).

Für die Kristallisationsansätze wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen verwendet (i.R. 5-40 mg/mL gereinigtes Protein). Die jeweiligen Proteine wurden zuvor ü.N. bei RT in Kristallisationspuffer dialysiert und anschließend bis zur gewünschten Konzentration aufkonzentriert. Danach erfolgte ggf. Zentrifugation für 20 min bei 16.000 g bei RT. Alle Ansätze wurden in der Regel bei 14 °C über mehrere Monate inkubiert. Alternativ erfolgte das Ansetzen der unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen (vorwiegend zum *Fein-screening*) in 24-well Platten. In diesem Falle wurden 2 μL der Proteinlösung mit jeweils 2 μL Kristallisationspuffer gemischt und über einem 1000 μL Reservoir mit Kristallisationspuffer kopfüber luftdicht platziert (*hanging drop vapour*

diffusion). Hierbei wurden einige Platten auch bei RT und/oder 4 °C inkubiert. Der Verlauf der Kristallisation im 96-well Maßstab wurde vollautomatisch mittels eines Platten-*imagers* (OASIS LS31; Veeco) verfolgt und dokumentiert. Zusätzlich erfolgte die Analyse bei ausgewählten Platten manuell unter einem Mikroskop. Die Platten im 24-well Maßstab wurden generell unter dem Mikroskop manuell ausgewertet und dokumentiert. Nicht verbrauchtes Protein wurde bei 4 °C bzw. -20 °C (Glycerol-*stock*) als Rückstellprobe gelagert.

2.2.11.2. Datenmessung und Strukturbildung

Ein Proteinkristall aus dem Kristallisationsansatz von ERp46 im 96-well Format wurde mittels Kryo-Schleife (Hampton Research) aus dem Kristallisationspuffer gehoben und in Kryopuffer (25 % (v/v) Ethylenglycol) überführt. Der Kristall wurde anschließend unter Stickstoffstrom bei -180 °C mit dem Röntgengenerator (Rigaku Micromax 007; $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$; 1 min Belichtungszeit; CCD-Detektor, Rigaku Saturn 944; Abt. Physikalische Biotechnologie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) auf seine Streukraft getestet. Es wurde ü.N. ein erster kompletter Datensatz aufgenommen. Es konnten Röntgenbeugungsreflexe bis $2,8 \text{ \AA}$ beobachtet werden. Der Kristall wurde anschließend in flüssigem Stickstoff bis zur Vermessung am Synchrotron BESSY (Helmholtz-Zentrum Berlin), *Beamline* 14.1 ($\lambda = 0,9184 \text{ \AA}$; 3 sec Belichtungszeit; CCD-Detektor, Rayonics MX-225) gelagert. Die Aufnahme, Auswertung des Datensatzes und Strukturbildung erfolgte durch Herrn Dr. Christoph Parthier (MLU Halle-Wittenberg).

Die Röntgenbeugungsbilder wurden mit dem Programm *Mosflm* [222] integriert. Die Skalierung der Daten erfolgte mit dem Programm *Scala* (CCP4); [223]. Die Datenanalyse mit dem Programm *Phenix.Xtriage* [224] deutete darauf hin, dass der Kristall zu einem gewissen Ausmaß merohedral verzwilligt ist. Die Struktur konnte mittels der Methode des Molekularen Ersatzes (*molecular replacement*) durch Verwendung des NMR-Strukturmodells der dritten Domäne des *Thioredoxin domain-containing protein 5* (pdb: 2diz) berechnet werden. Dazu wurde das Programm *Phaser* [225] verwendet. Mittels der Programme *Coot* [226] und *Refmac5* [227] wurde die Struktur der ERp46a'-Domäne manuell gebaut und konnte durch eine *omit map* sowie durch gewichtete Differenzelektronendichtekarten (2Fo-Fc, 3Fo-2Fc, Fo-Fc) bestätigt werden. Die Verfeinerung mit *Refmac5* erfolgte unter Einbeziehung von TSL-Mobilität (*translation, libration, screw axis*) des Moleküls sowie einer 6 %igen Verzwilligung (Zwillingsoperator: -h, -k, -l). Die Strukturvalidierung erfolgte im Anschluss mit dem Programm *MolProbity* [228]. Die atomaren Koordinaten wurden in der RCSB Protein Datenbank PDB (www.pdb.org; [229]) mit dem PDB Code: 3uj1 hinterlegt.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung der P5a, -a' und -aa' Konstrukte

Die mittels PCR amplifizierte kodierende Sequenzen der **a**- bzw. **a'**-Domäne von P5 sowie des P5**aa'**-Fragmentes wurden in pQE-30 bzw. pQE-60 Vektoren inseriert. Die Größe sowie der korrekte Einbau der jeweiligen Fragmente in die Vektoren wurde durch einen Testverdau überprüft (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich war es möglich, sowohl die isolierte **b**-Domäne von P5 als auch die P5**b**-Domäne als Fusion mit GST sowie als Fusionskonstrukt mit der P5**a'**-Domäne zu klonieren. Eine Expression scheiterte jedoch in allen genannten Fällen. Als mögliche Ursache können evtl. falsch definierte Domänengrenzen angesehen werden (vgl. [43, 134]). Die Sequenzierung der cDNA der klonierten Konstrukte (SeqLab) bestätigte deren Sequenzidentität und korrekten Einbau in den Vektor.

3.2. Expression und Reinigung von PDIs

Die Herstellung der einzelnen Proteine erfolgte rekombinant in *E. coli*. Trotz des Vorhandenseins von mehreren Disulfidbrücken, konnten alle Proteine in löslicher Form exprimiert werden. Die z.T. vorhandenen Redoxaktivitäten bzw. Chaperon-Eigenschaften der heterologen Proteine verhindern vermutlich die Bildung von *inclusion bodies*. Nach mehreren Schritten der Affinitätsreinigung, Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie lagen die Proteine als ca. 95 % homogene Fraktionen vor (s. Abb. 12).

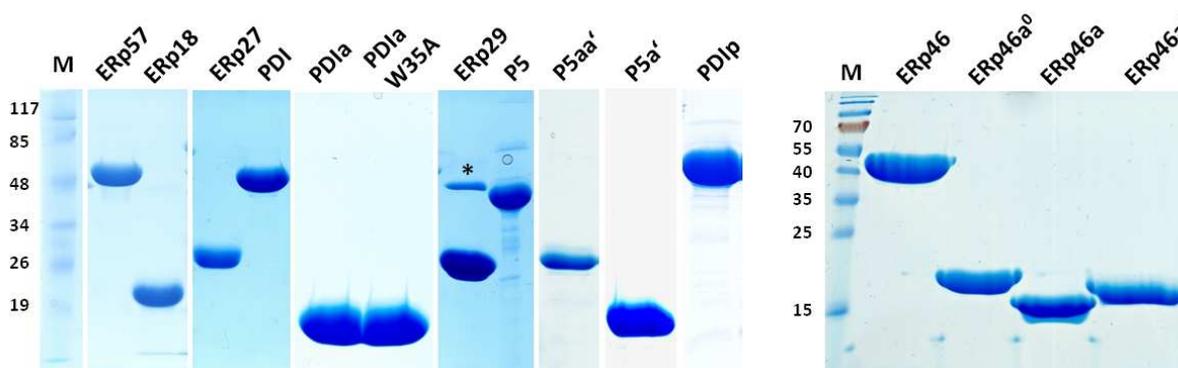


Abbildung 12: Ergebnis der chromatographischen Aufreinigung von PDIs. Die jeweiligen Proteine wurden mittels Ni-NTA- bzw. GSH-Agarose-, MonoQ- sowie Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die SDS-PA-Gele zeigen die aufkonzentrierten Fraktionen der einzelnen Peaks nach Gelfiltration (s. Abb. 79, Anhang). Die theoretischen Größen der verschiedenen Proteine sind Tabelle 7 (Anhang) zu entnehmen. Gereinigtes ERp29 zeigt stets eine putative Dimer-Bande (*). Verwendet wurden jeweils 12 %ige bzw. 15 %ige SDS-PA-Gele unter reduzierenden Bedingungen. M = Größenmarker in kDa.

Alle Proteine (außer ERp29 und PD1a, -aW35A) wurden in einem letzten Reinigungsschritt über eine Gelfiltration gereinigt und zeigten in ihrem Elutionsprofil einen

scharfen Peak, was auf eine homogene Spezies hindeutet (s. Abb. 79, Anhang). Das Elutionsprofil von P5 zeigte dagegen nach der Thrombinspaltung drei Peaks mit unterschiedlichen Retentionsvolumina. Diese enthielten neben P5 auch ungespaltenes GST-P5 Fusionsprotein sowie abgespaltenes GST. Während die P5a'-Domäne sowie das P5aa'-Fragment während der Gelfiltration die ihrem Molekulargewicht entsprechenden Elutionsprofile zeigten, eluierte die P5a-Domäne schon unmittelbar nach dem Ausschlussvolumen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Aggregation oder Oligomerisierung der isolierten P5a-Domäne hin. Ein Grund hierfür liegt vermutlich in den fehlenden intramolekularen, stabilisierenden Kontakten.

Vor der Durchführung von Protein- bzw. Peptid-Bindungsstudien (s. Abschnitt 3.6. ff) sollte eine nähere biochemische und biophysikalische Charakterisierung der verwendeten PDIs, insbesondere von ERp46 und P5, erfolgen (s. Abschnitt 3.3. ff).

3.3. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von ERp46

Für PDI wurden bisher sowohl monomere als auch dimere Spezies nachgewiesen [112]. Über den Oligomerisierungszustand der meisten PDI-Familienmitglieder herrscht indess weitestgehend Unklarheit (s. Tabelle 6, Anhang). In diesem Teil der Arbeit sollte die potentielle Oligomerisierung von ERp46 und ggf. weiterer PDIs untersucht werden.

Die Durchführung einer analytischen Gelfiltration lieferte näherungsweise die theoretischen Oligomerisierungsgrade der jeweiligen PDIs bzw. der einzelnen Domänen (s. Tabelle 8, Anhang). Danach eluieren die P5a'-, ERp46a-, und ERp46a'-Domäne sowie ERp18 als Monomer. Auf der anderen Seite zeigen die PDIs mit mehreren Domänen ein ungewöhnliches Elutionsverhalten. Beispielsweise eluieren P5aa', ERp27, ERp46, ERp57, PDI und PDIp alle tendenziell als Dimere. Darüber hinaus ist im Elutionsprofil von PDI ein zusätzlicher Peak zu erkennen, der einem PDI-Tetramer entspricht (s. Abb. 79, Anhang). P5 eluiert während der analytischen Gelfiltration als Tetramer, was ebenfalls auf die Beteiligung der C-terminalen Domäne bei dessen Oligomerisierung hinweist.

Die Problematik der Ermittlung des Oligomerisierungsgrades von PDIs mittels analytischer Gelfiltration ist am Beispiel von ERp46 aufgezeigt. Aus Tabelle 1 wird ersichtlich, dass die ermittelten Molekulargewichte z.T. signifikante Abweichungen zum theoretischen Molekulargewicht aufweisen (max. 16,9 % Abweichung für ERp46). Während die a- und a'-Domänen von ERp46 nahezu als reine Monomere eluieren (Oligomerisierungsgrad = 1,1), zeigt ERp46 ein ungewöhnliches Elutionsprofil mit der Tendenz zur Dimerisierung (Oligomerisierungsgrad = 1,7); (s. Abb. 13 und Tabelle 1).

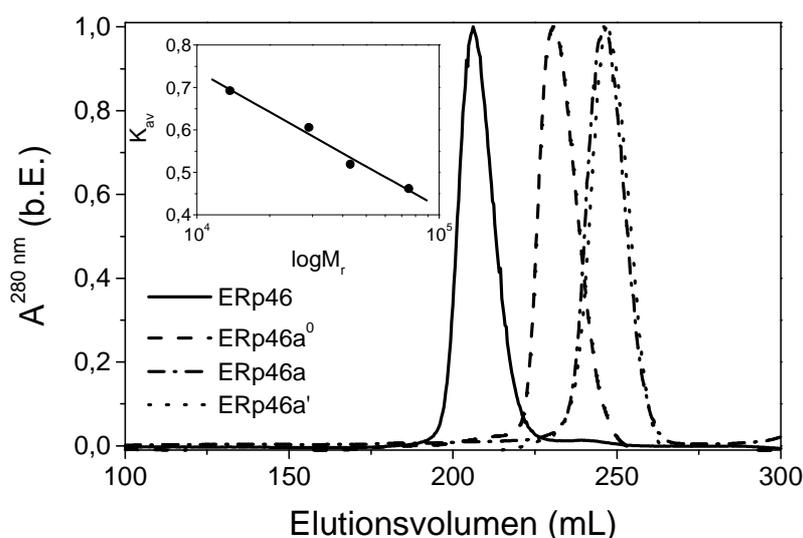


Abbildung 13: Analytische Gelfiltration von ERp46 und den isolierten katalytischen Domänen. Die analytische Gelfiltration von ERp46 (—), der a⁰- (-----), a- (-·-·-) und a'-Domäne (····) wurde mit einer Superdex 200 *prep grade HiLoad 26/60* Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) bei 4 °C in Gelfiltrationspuffer A durchgeführt. Es wurden jeweils 2,5 mL Protein mit einer Konzentration von ca. 1 mg/mL aufgetragen. Mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden (kleine Grafik) konnte über den Verteilungskoeffizienten (K_{av}) das jeweilige Molekulargewicht berechnet werden. Danach eluieren die a- und a'-Domäne von ERp46 als reine Monomere, während die a⁰-Domäne ein anomales Laufverhalten zeigt. ERp46 eluiert ebenfalls weder als reines Monomer, noch als reines Dimer.

Protein	V_e (mL)	K_{av}	MW_{exp} (kDa)	MW_{the} (kDa)	ΔMW (kDa)	Fehler (%)	N
ERp46	205	0,46	73,4	45,4	-7,7	-16,9	1,7
ERp46a ⁰	231	0,58	30,9	18,5	-3,0	-16,2	1,7
ERp46a	247	0,66	17,8	15,9	1,8	11,5	1,1
ERp46a'	247	0,66	17,8	15,6	2,3	14,6	1,1

Tabelle 1: Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von ERp46 und den einzelnen Domänen. Angegeben sind die aus den Elutionsvolumina (V_e) und Verteilungskoeffizienten (K_{av}) von ERp46 bzw. seinen isolierten katalytischen Domänen experimentell ermittelten Molekulargewichte (MW_{exp}). Diese wurden mit den theoretischen Molekulargewichten (MW_{the}) verglichen und die Differenz (ΔMW) berechnet. Die Abweichungen zum theoretischen Molekulargewicht (in %) sind ebenfalls angegeben. Aus dem Verhältnis der experimentellen und theoretisch ermittelten Molekulargewichte wurde der hypothetische Oligomerisierungsgrad (N) berechnet.

Der Grund für das anomale Laufverhalten liegt in der nicht-globulären Struktur von ERp46. Eine Änderung des hydrodynamischen Radius von PDIs mit mehreren Domänen resultiert aus der konformationellen Flexibilität der Moleküle [100]. Ähnlich wie im Falle von PDI kann angenommen werden, dass die drei Domänen von ERp46 räumlich nicht eng gepackt sind, sondern eher eine lineare Anordnung annehmen können. Im Gegensatz zur a- und a'-Domäne von ERp46, zeigt die N-terminale ERp46a⁰-Domäne ebenfalls ein abweichendes Laufverhalten (s. Abb. 13). Der Grund hierfür liegt jedoch vermutlich an den fehlenden Wechselwirkungen mit der a-Domäne in ERp46 (vgl. Abschnitt 3.5.3.). Die

ermittelten Oligomerisierungsgrade stellen demnach nur Näherungen dar und sollten mit Hilfe weiterer Methoden (z.B. MALS, analytische Ultrazentrifugation) verifiziert werden.

Für ERp46 ergab der Gleichgewichtslauf der analytischen Ultrazentrifugation ein Molekulargewicht von 45,8 kDa, was mit dem theoretischen Molekulargewicht von 45,5 kDa gut überein stimmt (s. Abb. 14). Dies entspricht monomerem ERp46. In Sedimentationsläufen wurden keine höher-oligomeren Spezies oder Aggregate festgestellt (Daten nicht gezeigt). Der *s*-Wert von ERp46 wurde zu 3,0 S ermittelt. Der *s*-Wert für ein globuläres Protein dieser Größe sollte bei ca. 3,5 S liegen. Ein kleinerer *s*-Wert für ERp46 bedeutet demnach eine tendenziell gestreckte Konformation. Dies stimmt mit den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration gut überein.

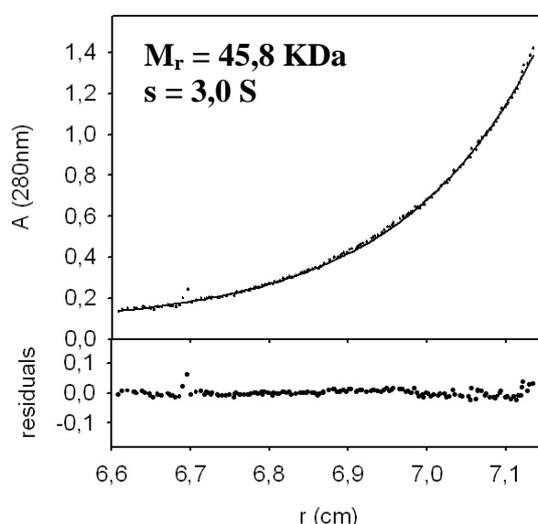


Abbildung 14: Analytische Ultrazentrifugation von ERp46. Gezeigt ist der Gleichgewichtsverlauf bei 12.000 rpm über 45 h bei 20 °C. Als Puffer wurde Gelfiltrationspuffer A ohne Triton X-100 verwendet. Die Proteinkonzentration während der Messung betrug 0,3 mg/mL. Für ERp46 ergibt sich ein Molekulargewicht von 45,8 KDa, was der monomeren Spezies entspricht. Der *s*-Wert wurde zu 3,0 S ermittelt und ist signifikant niedriger als es für ein globuläres Protein dieser Größe erwartet wird. ERp46 nimmt daher vermutlich eine tendenziell gestreckte Konformation ein. Die *residuals* geben die Abweichung während der Messung an. Die Messungen wurden von PD Dr. Hauke Lilie (Abt. Technische Biochemie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3.4. Bestimmung der Redox- und Chaperon-Aktivität von PDIs

3.4.1. Bestimmung der Reduktase-Aktivität

Die *in vitro*-Redoxaktivität von PDI und der meisten anderen PDI-Familienmitglieder ist relativ gut charakterisiert (s. Tabelle 6, Anhang); [63]. Im Folgenden sollte die Redoxaktivität von ERp46 und seiner isolierten katalytischen Domänen näher analysiert und quantitativ mit der weiterer PDIs verglichen werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der vermeintlichen **b**-Domäne von P5 auf dessen Redoxaktivität untersucht werden.

Die Reduktase-Aktivität wurde im Folgenden mittels Insulin-Reduktionstest ermittelt (modifiziert nach [61]). Hierbei nutzt man die Präzipitation der B-Kette von Insulin nach Reduktion. Die Oxidase-Aktivität von PDIs wurde durch den RNase-Rückfaltungstest ermittelt [62]. In diesem Fall wird die oxidative Renaturierung von RNaseA über deren katalytische Aktivität bestimmt. In der Regel stellen die genannten Reaktionen komplexe Mehrstufen-Reaktionskinetiken dar. Es wird indirekt sowohl die Substratbindungseigenschaft, Inhibierung der Aggregation (Chaperon-Funktion) sowie die Redoxaktivität von PDIs in Kombination beobachtet. Auch spielen unterschiedliche Einflüsse auf bestimmte Faltungsintermediate während der Renaturierung eine Rolle. Um die katalytischen Eigenschaften der verschiedenen PDIs näherungsweise untereinander vergleichen zu können, wurde die allgemein gebräuchliche Verzögerungs-Phase (*lag*-Phase) der Reaktion bestimmt [63]. Die Verzögerung ist hierbei die Zeitspanne bis zum Erreichen einer Absorption von 0,1 AU. Die relative Reaktivität wurde aus der reziproken Verzögerungs-Phase, normiert auf die molare Konzentration der aktiven Zentren, bestimmt.

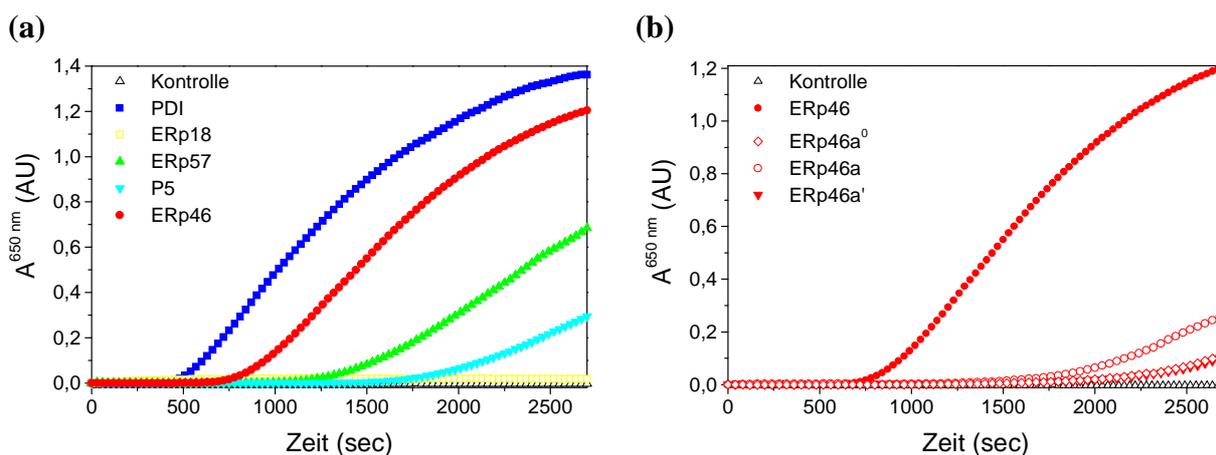


Abbildung 15: In vitro Reduktase-Aktivität von PDIs. Ermittelt wurde die Reduktase-Aktivität von PDIs über die Reduktion der Disulfidbrücke in nativem Insulin. Die Reduktion führt zur Präzipitation der B-Kette, welche durch Messung der Absorption bei 650 nm bestimmt wurde. Die Zeitspanne bis zum Erreichen der Absorption von 0,1 beschreibt die Verzögerung (*lag*-Phase) der Reaktion. (a) PDI (■) katalysiert die Reaktion am schnellsten, während die restlichen PDIs eine verzögerte Reaktion zeigen. Während ERp46 (●) nur eine geringfügige Verzögerung der Insulin-Aggregation aufweist, zeigen ERp57 (▲) und P5 (▼) eine längere Verzögerungs-Phase. ERp18 (□) zeigt im angegebenen Zeitraum keine Reduktions-Aktivität. (b) Auch die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 weisen eine Reduktase-Aktivität auf. Im Gegensatz zum Wildtyp-Protein (●) zeigen die einzelnen katalytischen Domänen von ERp46 jedoch eine stark verzögerte Reaktion. Während die ERp46a⁰- (◇) und ERp46a'-Domäne (▼) identische Verzögerungs-Phasen aufweisen, beginnt die Reaktion im Falle der ERp46a-Domäne (○) signifikant früher. Als Kontrolle (Δ) wurde Insulin ohne Zusatz von PDI-Protein verwendet. Für die Reaktion wurden jeweils 0,28 μM für jedes PDI-Protein eingesetzt.

Wie erwartet besitzen nur PDI, ERp57, ERp46 und P5 Reduktase-Eigenschaften (s. Abb. 15); (vgl. Tabelle 6, Anhang). Hierbei ist auf der Zeitskala die Reduktase-Aktivität von PDI und ERp46 mit einer Verzögerung von 610 sec bzw. 950 sec noch am größten. Auf der anderen Seite zeigen ERp57 und P5 mit 1560 sec bzw. 2150 sec eine deutlich längere

Verzögerung der Insulin-Reduktion. Vergleicht man die auf die molare Konzentration an aktiven Zentren normierte reziproke Verzögerungs-Phase der verschiedenen PDIs, so zeigt sich, dass PDI die höchste relative Reaktivität aufweist. Die Reaktivitäten von ERp57 und ERp46 sind nahezu identisch und betragen ca. 40 % der Reaktivität von PDI. Dagegen ist die relative Reaktivität von P5 mit ca. 30 % der PDI-Reaktivität signifikant niedriger (s. Abb. 16).

Interessanterweise zeigen die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 ebenfalls Reduktase-Eigenschaften. Obwohl die Verzögerungs-Phasen der einzelnen katalytischen Domänen von ERp46 mit 2200 sec-2680 sec erheblich länger ausfallen, sind die normierten Reaktivitäten nahezu identisch mit dem Wildtyp-Protein (s. Abb. 16). Lediglich die ERp46a-Domäne zeigt eine signifikant höhere Reaktivität der Insulin-Reduktion. Die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 sind daher ausreichend für die Reduktion der Disulfidbrücken in nativem Insulin.

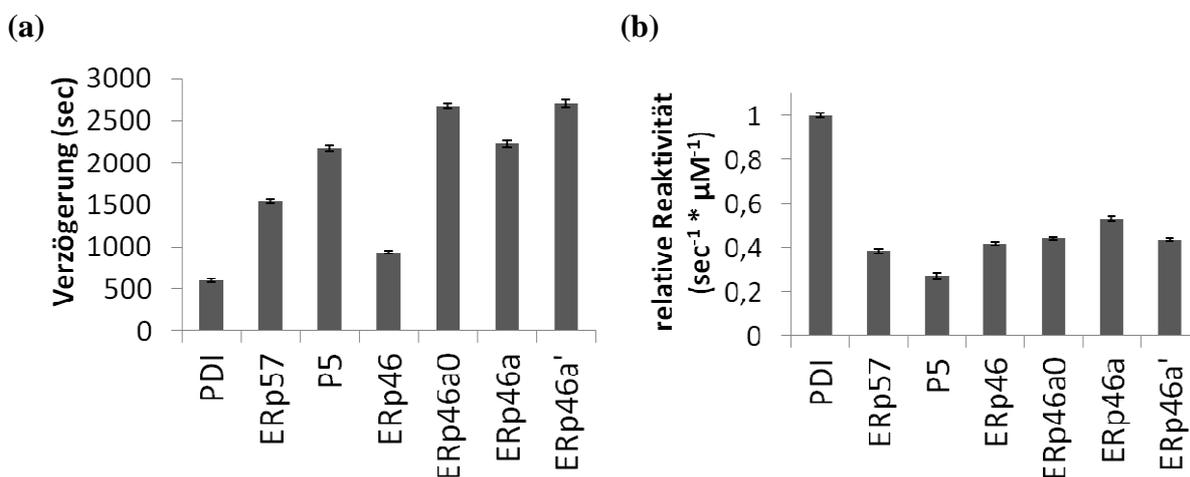


Abbildung 16: Quantitative Auswertung der Reduktase-Eigenschaften von PDIs. (a) Zeigt die quantitative Auswertung der Verzögerung der Insulin-Reduktion aus Abb. 15. PDI und ERp46 zeigen die geringste Verzögerung, während die übrigen PDIs eine deutlich längere Verzögerungs-Phase aufweisen. Die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 katalysieren die Reduktion von Insulin im Vergleich zum Wildtyp-Protein erst deutlich später. (b) Bestimmt man die reziproke Verzögerungs-Phase und normiert auf die molare Konzentration an aktiven Zentren, so ergibt sich die relative Reaktivität des jeweiligen PDI-Proteins. Die redox-aktiven Zentren von PDI zeigen demnach die höchste Reaktivität der Reduktion von Insulin (als 1 festgelegt). Die relativen Reaktivitäten der übrigen PDI-Mitglieder sind deutlich geringer. ERp46 und ERp57 zeigen nahezu eine identische Reaktivität ihrer aktiven Zentren. Die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 zeigen eine ähnliche Reaktivität wie das Wildtyp-Protein. Die Reaktivität der ERp46a-Domäne ist jedoch signifikant größer. ERp18 besitzt im beobachteten Zeitraum keine Reduktase-Aktivität und ist daher nicht mit angegeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei Messungen an.

3.4.2. Bestimmung der Oxidase-Aktivität

Wie erwartet besitzen PDI, ERp57, P5 und ERp18 die Fähigkeit zur oxidativen Renaturierung von RNaseA (s. Abb. 17); (vgl. Tabelle 6, Anhang); [63]. Erstmals konnte auch für ERp46 eine Oxidase-Eigenschaft nachgewiesen werden. Vergleicht man die Oxidase-Aktivität der einzelnen PDIs, so zeigt sich, dass P5, ERp57 und ERp46 mit 460 sec,

530 sec bzw. 560 sec intermediäre Verzögerungs-Phasen aufweisen. Die ERp18-katalysierte oxidative Renaturierung von RNaseA ist um ca. 1090 sec zeitverzögert.

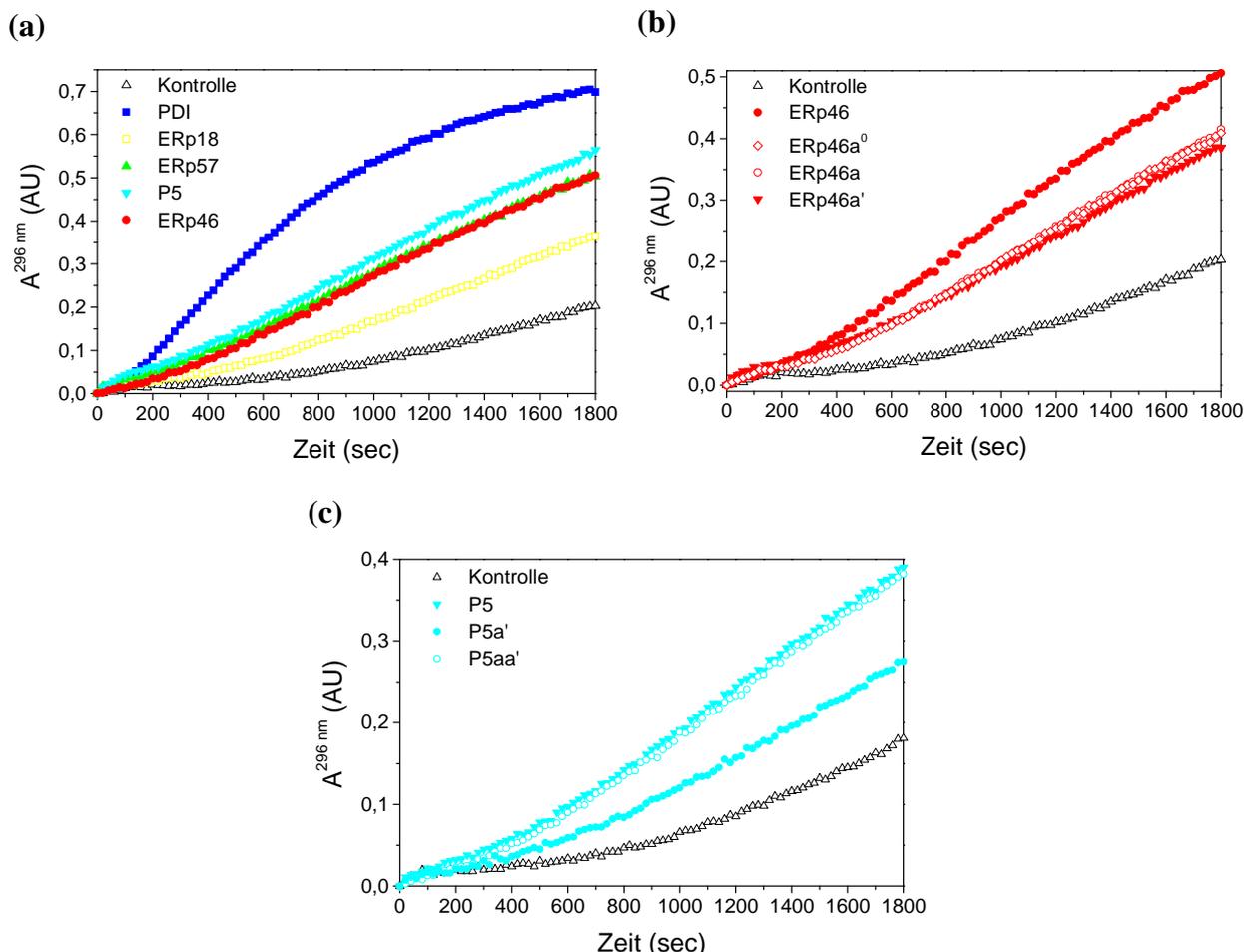


Abbildung 17: In vitro Oxidase-Aktivität von PDIs. Ermittelt wurde die Oxidase-Aktivität von PDI-Familienmitgliedern über die oxidative Renaturierung von reduzierter und denaturierter RNaseA. Native RNaseA wird indirekt über die Hydrolyse des Substrates cCMP zu CMP, durch Messung der Absorption bei 296 nm, nachgewiesen. **(a)** In Analogie zur Reduktion von Insulin, katalysiert PDI (\blacksquare) auch die oxidative Renaturierung von RNaseA am schnellsten. Die übrigen PDIs zeigen eine verzögerte Reaktion. Während ERp46 (\bullet) und ERp57 (\blacktriangle) ähnliche Verzögerungen der Reaktion zeigen, katalysiert P5 (\blacktriangledown) die oxidative Renaturierung von RNaseA ähnlich schneller. Im Gegensatz zur Insulin-Reduktion zeigt ERp18 (\square) deutliche Oxidase-Aktivität. Die Verzögerungs-Phase bis zum Erreichen der Absorption von 0,1 wurde aus den jeweiligen Anstiegen abzüglich der unkatalysierten Reaktion bestimmt. **(b)** Die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 (ERp46a⁰ (\diamond), ERp46a (\circ) und ERp46a' (\blacktriangledown)) zeigen eine deutliche Oxidase-Aktivität. Diese ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp-Protein signifikant verzögert. **(c)** Im Vergleich zum Wildtyp-Protein zeigt die C-terminale Deletionsmutante P5aa' (\circ) eine identische Oxidase-Aktivität. Die isolierte P5a'-Domäne (\bullet) besitzt ebenfalls Oxidase-Aktivität. Die katalytischen Domänen von P5 und ERp46 sind demnach ausreichend für die oxidative Renaturierung von RNaseA. Als Kontrolle (Δ) wurde reduzierte denaturierte RNaseA ohne Zusatz von PDI-Protein verwendet. Für die Reaktion wurden jeweils 2 μM PDI bzw. 5 μM des jeweiligen PDI-Proteins eingesetzt. In **(c)** wurden jeweils 2,5 μM P5 und P5a' bzw. P5aa' verwendet.

Die Berechnung der auf die aktiven Zentren normierten Reaktivitäten der einzelnen PDIs zeigt, dass PDI wiederum die höchste relative Reaktivität aufweist (s. Abb. 18). Im Vergleich dazu besitzen P5, ERp57 und ERp18 nur ca. 21 %, 19 % bzw. 18 % der PDI-Reaktivität. Die relative Reaktivität von ERp46 ist dagegen mit ca. 12 % der PDI-Reaktivität

signifikant niedriger. Obwohl die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 eine längere Verzögerung der Reaktion zeigen, ist ihre relative Reaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein um den Faktor 2,3 erhöht. Ein Grund hierfür könnte in der niedrigeren Affinität und der damit verbundenen höheren Umsatzrate (*turn-over*) für die Bindung und Freisetzung des Substrates liegen. In Analogie dazu besitzen die isolierte P5a'-Domäne sowie die C-terminale Deletionsvariante P5aa' im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine nahezu identische relative Reaktivität bei der oxidativen Renaturierung von RNaseA (s. Abb. 17 und Abb. 18). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die putative **b**-Domäne von P5 nicht für die katalytische Aktivität des Proteins benötigt wird. Die isolierten katalytischen Domänen von P5, ERp46 und ERp18 sind demnach ausreichend, sowohl für die Substratbindung als auch für die Oxidation von Disulfidbrücken.

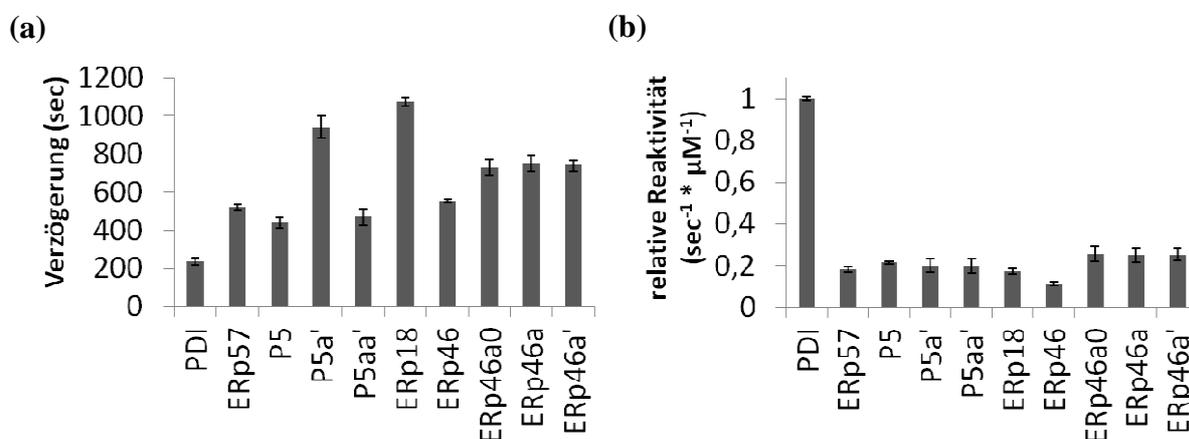


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der Oxidase-Eigenschaften von PDIs. In (a) ist die quantitative Auswertung der Verzögerung der oxidativen Renaturierung von RNaseA aus Abb. 17 dargestellt. PDI besitzt wiederum die niedrigste Verzögerungs-Phase, während bei den übrigen PDI-Mitgliedern, insbesondere bei ERp18, die Reaktion deutlich verlangsamt ist. (b) Der Vergleich der auf die molare Konzentration normierten Verzögerungs-Phase zeigt, dass die Reaktivität der einzelnen PDI-Familienmitglieder im Vergleich zu PDI (mit 1 festgelegt) stark erniedrigt ist. Während ERp57, ERp18 und P5 ähnliche relative Reaktivitäten ihrer aktiven Zentren aufweisen, zeigt ERp46 eine signifikant niedrigere Oxidase-Aktivität. Interessanterweise sind die relativen Reaktivitäten der isolierten katalytischen Domänen von ERp46 um den Faktor 2,3 im Vergleich zum Wildtyp-Protein erhöht. Ein Grund hierfür könnte in der niedrigeren Affinität und der damit verbundenen höheren Umsatzrate für die Bindung und Freisetzung des Substrates liegen. Die P5a'-Domäne sowie das P5aa'-Fragment besitzen die selbe Reaktivität wie das Wildtyp-Protein. Die C-terminale putative P5b-Domäne ist demnach nicht essentiell für die oxidative Renaturierung von RNaseA. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus zwei Messungen an.

Die Verwendung eines redox-inaktiven PDI-Proteins (ERp29) zeigte einen nahezu identischen Reaktionsverlauf wie die Kontroll-Reaktion ohne PDIs (Daten nicht gezeigt).

3.4.3. Bestimmung der Chaperon-Aktivität

Ein klassisches Experiment zur Bestimmung der Chaperon-Eigenschaft von PDI-Familienmitgliedern *in vitro* stellt die Inhibierung der thermalen Aggregation von Modellproteinen ohne Disulfidbrücken dar. In dieser Arbeit wurde die Chaperon-Aktivität

von PDIs über die Inhibierung der Aggregation von hitzedenaturierter Citratsynthase bestimmt [215]. Insbesondere sollte der Beitrag der katalytischen Domänen für die Chaperon-Aktivität von ERp46 näher untersucht und mit weiteren PDIs verglichen werden. Darüber hinaus sollte der Beitrag der P5b-Domäne auf die Chaperon-Eigenschaft analysiert werden.

In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte gezeigt werden, dass PDI und P5 die thermische Aggregation von Citratsynthase inhibieren (s. Abb. 19); (vgl. Tabelle 6, Anhang); [124, 230]. Hierbei inhibiert PDI die Aggregation von Citratsynthase am stärksten. Interessanterweise ist der Effekt des P5aa'-Fragmentes nahezu identisch. Einen intermediären Effekt auf die Unterdrückung der Protein-Aggregation besitzen darüber hinaus auch ERp46, ERp18, und P5. Dagegen bewirkt ERp57 keine Inhibierung der Aggregation von hitzedenaturierter Citratsynthase. Die Inhibierung von Protein-Aggregationen ist jedoch kein alleiniges Merkmal von Chaperonen, da auch andere Proteine (z.B. BSA) die Aggregation von Citratsynthase in geringem Umfang unterdrücken können [231].

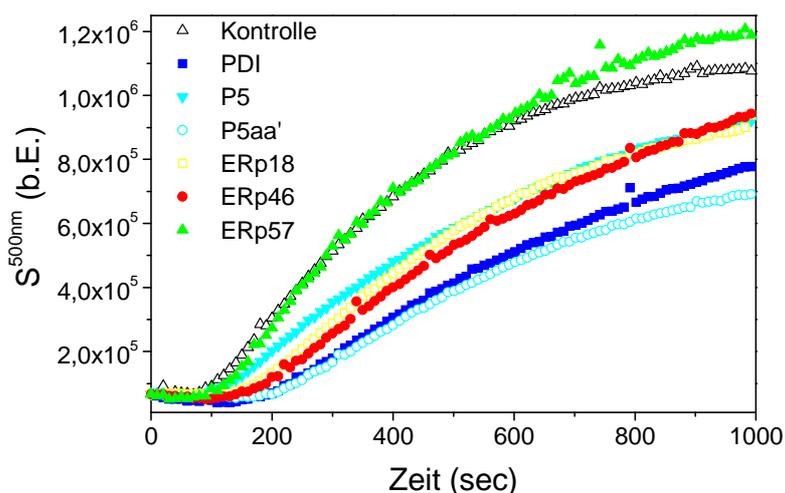


Abbildung 19: *In vitro* Chaperon-Eigenschaften von PDIs. Die Eigenschaften als Chaperon wurden anhand der Inhibierung der Aggregation von thermisch denaturierter Citratsynthase analysiert. PDI (■) und P5aa' (○) zeigen dabei den größten Effekt. ERp46 (●), ERp18 (□) und P5 (▼) verringern die Aggregation in geringerem Maße. ERp57 (▲) zeigt dagegen keinen Chaperon-Effekt. Verwendet wurden 0,15 μ M PDI bzw. 0,25 μ M PDI-Protein. Als Kontrolle (Δ) diente Citratsynthase ohne Zugabe von PDI-Protein. Die Proteinaggregation erfolgte bei 43 °C und wurde über die Messung der Lichtstreuung bei 500 nm bestimmt.

Für das PDI-Homologe PDIp konnte kürzlich ein protektiver Effekt auf die Sensitivität von *E. coli*-Zellen gegenüber Hitzebehandlung nachgewiesen werden [156]. In der vorliegenden Arbeit sollte nunmehr der *in vivo*-Chaperon-Effekt von ERp46 während des Hitzeschocks von *E. coli* untersucht werden. PDIp wurde hierbei als Positivkontrolle, ERp57 als Negativkontrolle verwendet. Wie in Abb. 20 ersichtlich ist, zeigen ERp46-exprimierende Zellen eine signifikant verringerte Sensitivität gegenüber Hitzebehandlung im Vergleich zu

nicht transfizierten Zellen (Kontrolle). Dieser Effekt ist allerdings im Vergleich zu PDIp-exprimierenden Zellen weniger stark ausgeprägt. ERp46 enthält im Gegensatz zu PDIp keine **b/b'**-Domäne, so dass eine mögliche Ursache in der intrinsisch geringeren Chaperon-Aktivität von ERp46 gegenüber PDIp zu sehen ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Citratsynthese-Aggregationstests zeigt ERp57 auch *in vivo* kaum einen Effekt auf die Sensitivität von *E. coli* gegenüber Hitzebehandlung. Dies verdeutlicht ebenfalls die Bedeutung der hydrophoben Substratbindungstasche innerhalb der **b/b'**-Domäne für die Chaperon-Aktivität von PDIs.

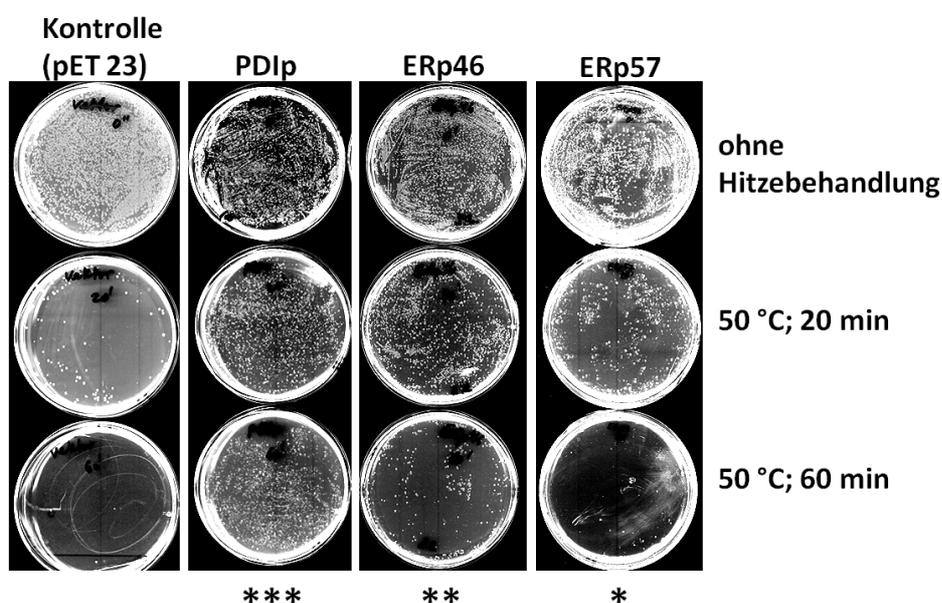


Abbildung 20: *E. coli*-Hitzeschock Analyse. Ebenso wie PDIp, besitzt auch ERp46 *in vivo* Chaperon-Eigenschaften. Diese PDI-Familienmitglieder verringern die Sensitivität von *E. coli*-Zellen gegenüber Hitzebehandlung. Der Effekt ist für PDIp im Vergleich zu ERp46 am stärksten ausgeprägt. Die Expression von ERp57 führt hingegen nur zu einem äußerst geringen Schutz der Zellen gegenüber thermischer Einwirkung, was auf eine geringere Chaperon-Aktivität hindeutet. Als Kontrolle wurden mit dem leeren pET23-Vektor transfizierte Zellen verwendet. Ausplattiert wurden jeweils Aliquots von verschiedenen Verdünnungen der gleichen OD^{600nm} von behandelten bzw. nicht behandelten Zellen. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde anschließend qualitativ ausgewertet. *** = hoher Schutz, ** = geringer Schutz, * = kaum Schutz vor thermischer Einwirkung. Die Expressionsgrade der untersuchten PDIs waren ähnlich (Daten nicht gezeigt).

3.5. Strukturelle Charakterisierung von ERp46 und P5

Bisher existieren nur wenige strukturelle Daten von ERp46 und P5 (s. Tabelle 6, Anhang). Beide Proteine besitzen einen sehr ähnlichen Aufbau hinsichtlich der Zusammensetzung ihrer Trx-homologen Domänen. Während P5 aus zwei **a**-Domänen und einer putativen **b**-Domäne aufgebaut ist, setzt sich ERp46 aus drei katalytischen Domänen zusammen (s. Abb. 5). Im Gegensatz zu P5 sind die drei **a**-Domänen von ERp46 vermutlich über ca. 20 Aminosäurereste lange *linker*-Regionen miteinander verbunden [63].

3.5.1. Spektroskopische Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur

Neben der katalytischen Aktivität dient auch die Bestimmung der Sekundär- und Tertiärstruktur zum Nachweis des nativen Zustandes eines Proteins. Die Sekundärstruktur der verschiedenen PDIs wurde mittels Fern-UV-CD-Messungen bestimmt. Alle Proteine zeigen das klassische CD-Spektrum der Thiofloxin-Faltung mit α -helicalen Elementen sowie β -Faltblättern. Die α -Helices dominieren i.R. das CD-Spektrum des gesamten Proteins. Sie zeigen ein Maximum bei ca. 195 nm und Minima bei 208 und 222 nm. Während die CD-Spektren der meisten PDI-Familienmitglieder sehr ähnlich sind, zeigen P5 und ERp46 eine leicht abweichende Zusammensetzung ihrer Sekundärstrukturelemente (s. Abb. 21).

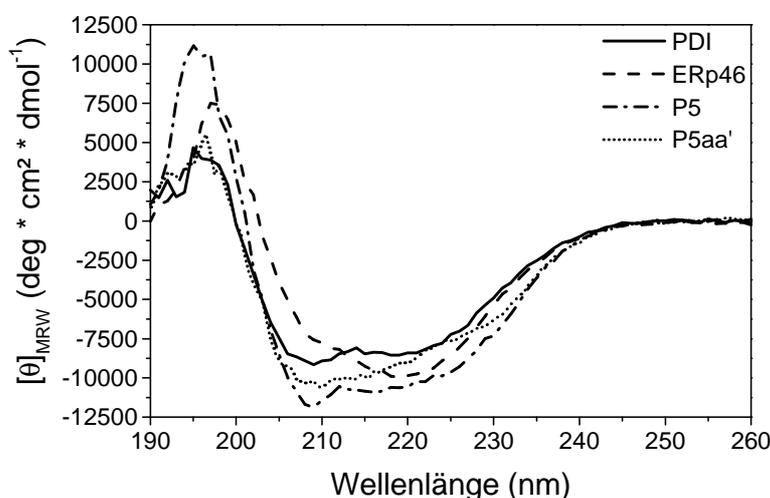


Abbildung 21: Fern-UV-CD-Spektren von ERp46 und P5. Die Analyse der Fern-UV-CD-Spektren von PDIs liefert Aussagen zur Zusammensetzung ihrer Sekundärstrukturelemente. Die meisten der untersuchten Mitglieder der PDI-Familie zeigen ähnliche CD-Spektren, entsprechend den Sekundärstrukturelementen der Trx-Faltung. Im Vergleich zu PDI (—) zeigen die CD-Spektren von ERp46 (----) und P5 (-·-) signifikante Unterschiede. ERp46 zeigt eine Verschiebung seines Minimums hin zu größeren Wellenlängen. P5 zeigt ein stärker ausgeprägtes Maximum bei 195 nm. Das CD-Spektrum des P5aa'-Fragmentes (····) ähnelt dem des Wildtyp-Proteins. Für die Messungen wurden Küvetten mit 0,1 cm Schichtdicke und Proteinkonzentrationen von 0,15-0,30 mg/mL verwendet. Gemessen wurde in Standardpuffer A bei 20 °C. Für alle Spektren wurden 15 Akkumulationen aufgenommen und gegen den Puffer korrigiert.

Das Maximum von P5 bei 195 nm und das Minimum bei 208 nm sind stärker ausgeprägt. Dies deutet neben einer hohen Beteiligung von α -helicalen Elementen auch auf einen signifikanten Beitrag von β -Faltblättern in der Struktur hin. Die CD-Spektren von P5 und des P5aa'-Fragmentes unterscheidet sich kaum voneinander. Das Maximum und Minimum sind bei P5aa' weniger stark ausgeprägt. Man kann davon ausgehen, dass die C-terminale Domäne von P5 ebenfalls eine Trx-ähnliche Faltung aufweist, wobei der Anteil an β -Faltblättern hier trotzdem höher zu sein scheint. Auf der anderen Seite besitzt ERp46 eine geringe Verschiebung seines Maximums zu 198 nm hin. Das Minimum liegt deutlich

verschoben bei 220 nm. ERp46 weist demnach vermutlich einen höheren Anteil an α -helicalen Sekundärstrukturelementen auf. Das geringer ausgeprägte Minimum bei 208 nm ist ein Indiz für das Vorhandensein von ungeordneten *loop*-Regionen in der ERp46-Struktur. Das CD-Spektrum von ERp46 ähnelt darüber hinaus stark dem von Thioredoxin (nicht gezeigt).

Die Analyse der Fluoreszenzemissionsspektren von PDIs gibt Aufschluss über ihre Tertiärstruktur (s. Abb. 80, Anhang). Über die genaue Lage der einzelnen Trp-Reste innerhalb der dreidimensionalen Struktur des jeweiligen Proteins kann jedoch kaum eine Aussage getroffen werden, da die meisten PDIs mehrere Trp-Reste enthalten, die alle zur Fluoreszenzemission beitragen. Zur genaueren Analyse der Tertiärstruktur von ERp46 und P5 waren deshalb weitere biochemische und biophysikalische Methoden erforderlich.

3.5.2. Strukturelle Untersuchungen mittels Denaturierungsmittel-abhängiger Übergänge

Im Hinblick auf folgende Kristallisationsversuche sollten ERp46 und P5 in ihrer Stabilität näher charakterisiert werden. ERp46 enthält 8 Trp, welche eine intrinsische Fluoreszenz mit einem durchschnittlichen Emissionsmaximum bei 333 nm zeigen (s. Abb. 22). Das Emissionsmaximum wird während der GdmCl-induzierten Denaturierung zu höheren Wellenlängen hin verschoben und liegt bei vollständig denaturiertem ERp46 bei 358 nm. Gleichzeitig erhöht sich die Fluoreszenzintensität in denaturiertem ERp46, was mit einem verringerten *quench*-Effekt erklärt werden kann.

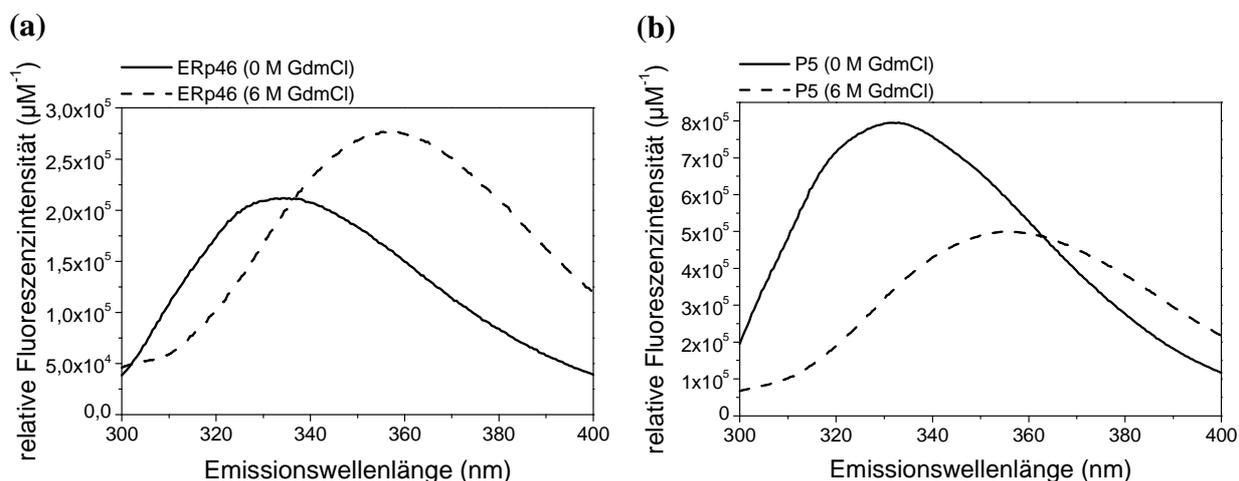


Abbildung 22: Fluoreszenzemissionsspektren von nativem und denaturiertem ERp46 und P5. Gezeigt sind die Fluoreszenzemissionsspektren von nativem (—) und in 6 M GdmCl denaturiertem (----) ERp46 (a) und P5 (b). Die intrinsische Trp-Fluoreszenz von ERp46 unterliegt im nativen Zustand einem *quench*-Effekt. Während der Denaturierung kommt es zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Bei P5 kann der umgekehrte Fall beobachtet werden. Das Emissionsmaximum von nativem ERp46 liegt bei ca. 333 nm, das Emissionsmaximum von P5 bei ca. 331 nm. Die vollständig denaturierten Proteine besitzen ein Emissionsmaximum bei ca. 358 nm. Verwendet wurden jeweils 5 μM P5 bzw. ERp46. Gemessen wurde in Standardpuffer A bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und bei 20 °C.

P5 enthält 10 Trp-Reste, die eine Fluoreszenz mit einem durchschnittlichen Emissionsmaximum bei 331 nm zeigen (Abb. 22). Während der GdmCl-induzierten Denaturierung kommt es zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums hin zu größeren Wellenlängen. Vollständig denaturiertes P5 zeigt ein Emissionsmaximum bei 358 nm. Im Gegensatz zu ERp46 zeigt P5 im nativen Zustand keinen ausgeprägten *quench*-Effekt und die Fluoreszenzintensität ist in denaturiertem P5 verringert.

Um einen genaueren Einblick in die strukturelle Umgebung der Trp-Reste innerhalb einer einzelnen katalytischen Domäne von ERp46 zu erlangen, wurden Fluoreszenzspektren der C-terminalen ERp46a'-Domäne aufgenommen. Jede der drei katalytischen Domänen von ERp46 enthält zwei konservierte Trp (s. Abb. 81, Anhang). Einer dieser Trp befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum CGHC-Motiv, während der andere Trp-Rest innerhalb der Primärsequenz weiter entfernt liegt. Allgemein wird angenommen, dass die Fluoreszenz des Trp-Restes im aktiven Zentrum durch die Disulfidbrücke einem *quenching*-Effekt unterliegt [66, 232]. Das Fluoreszenzspektrum von nativem ERp46a' zeigt zwei eigenständige Emissionsmaxima bei 316 nm bzw. 325 nm (s. Abb. 23).

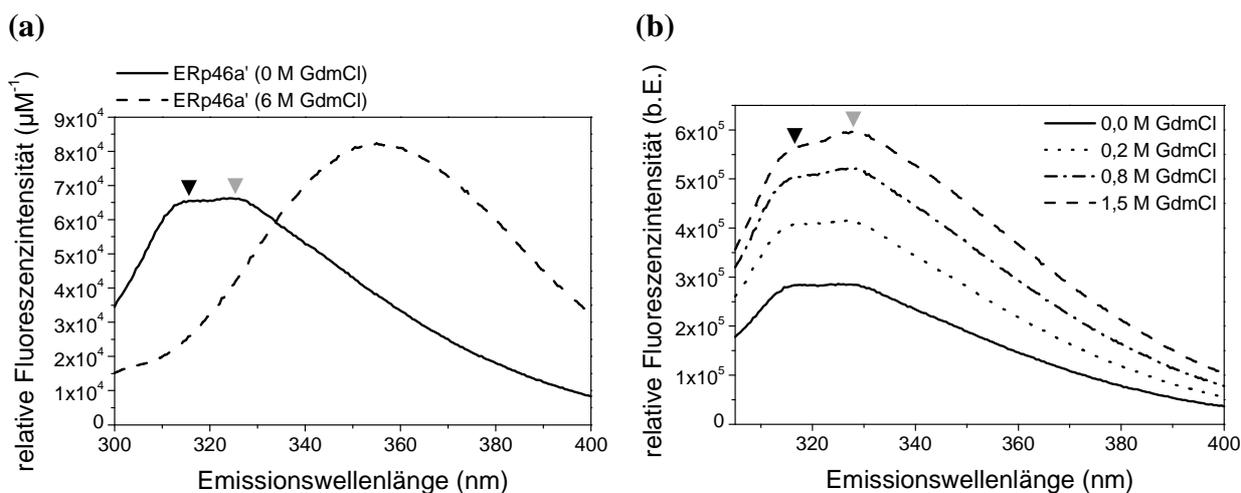


Abbildung 23: Fluoreszenzemissionsspektren von nativer und denaturierter ERp46a'-Domäne. (a) Die ERp46a'-Domäne zeigt im nativen Zustand (—) im Fluoreszenzemissionsspektrum zwei Emissionsmaxima bei 316 bzw. 325 nm. Die Denaturierung in 6 M GdmCl (-----) führt zur Zunahme der Fluoreszenzintensität und zu einem Emissionsmaximum bei ca. 358 nm. (b) Die beiden Emissionsmaxima werden vermutlich durch die zwei Trp-Reste innerhalb der ERp46a'-Domäne hervorgerufen. Einer der Trp-Reste liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum CGHC-Motiv, während der andere Trp-Rest im hydrophoben Inneren verborgen ist. Die Inkubation mit geringer GdmCl-Konzentration im Bereich von 0,0-1,5 M führt zu einer Dislokation des putativen *quencher* und damit zu einer Zunahme der intrinsischen Fluoreszenzintensität. Die Fluoreszenzintensität des Emissionsmaximums bei 325 nm (grauer Pfeil) erhöht sich bei Denaturierung stärker als das Emissionsmaximum bei 316 nm (schwarzer Pfeil). Verwendet wurden 5 μ M ERp46. Gemessen wurde in Standardpuffer A bei einer Anregungswellenlänge von 280 bzw. 295 nm und bei 20 °C. [GdmCl] = 0 M (—), 0,2 M (····), 0,8 M (-·-·-) und 1,5 M (-----).

Die ausgeprägte Blauverschiebung des Emissionsmaximums deutet darauf hin, dass die beiden Trp-Reste vollkommen bzw. partiell vom Lösungsmittel ausgeschlossen sind.

Ähnliche Beobachtungen wurden im Fluoreszenzspektrum der PD1a-Domäne gemacht, welche ebenfalls zwei Trp enthält (Daten nicht gezeigt). In Analogie zu PDI kann angenommen werden, dass auch der Trp-Rest des WCGHC-Motivs in ERp46a' ein Emissionsmaximum bei ca. 325-330 nm zeigt (vgl. [233]). Das Emissionsmaximum bei 316 nm ist daher vermutlich auf den Trp-Rest im hydrophoben Inneren der ERp46a'-Domäne zurückzuführen (vgl. Abb. 30). Die intrinsische Trp-Fluoreszenz unterliegt im nativen Zustand der ERp46a'-Domäne einem noch stärkeren *quench*-Effekt, als im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die GdmCl-induzierte Denaturierung führt zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Ungewöhnlich ist, dass dieser Effekt schon bei relativ geringer GdmCl-Konzentration im Bereich von 0,0-1,5 M GdmCl auftritt. Die Fluoreszenzintensität erhöht sich in diesem Bereich um den Faktor von ca. zwei, ohne eine Verschiebung der Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums (s. Abb. 23). Es kann geschlussfolgert werden, dass es bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen zu einer lokalen strukturellen Änderung in der Nähe der beiden Trp innerhalb der a'-Domäne kommt. Dies führt vermutlich zu einer räumlichen Dislokation des putativen *quencher*. Die Disulfidbrücke kann als *quencher* ausgeschlossen werden, da es zu keiner Änderung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit 1 mM DTT kommt (Daten nicht gezeigt).

Schon während der Proteinexpression und -reinigung zeigte sich, dass P5 bei höheren Konzentrationen, schwankenden Temperaturen sowie sehr niedrigen und hohen Ionenstärken des Puffers zur Aggregation neigt. Dagegen war ERp46 relativ unempfindlich gegenüber den genannten Bedingungen. Die intrinsisch geringere Stabilität von P5 gegenüber ERp46 spiegelt sich auch in den GdmCl-induzierten Denaturierungsübergängen wider (s. Abb. 24). P5 zeigt eine geringere Kooperativität während der Entfaltung als sein Homologes ERp46. Auch der Übergangsmittelpunkt ($[GdmCl]_{1/2}$) liegt im Falle von P5 bei einer geringfügig niedrigeren GdmCl-Konzentration. Die tendenziell geringere Stabilität von P5 im Vergleich zu ERp46 zeigt sich auch in dessen höherer freien Enthalpieänderung der Denaturierung unter nativen Bedingungen ($\Delta G(H_2O)$). Die m-Werte beider Proteine sind ähnlich, was auf vergleichbare Oberflächenänderungen während der Denaturierung hindeutet. Diese Ähnlichkeiten während der Denaturierung sind nicht überraschend, da bekanntermaßen beide Proteine aus drei Trx-ähnlichen Domänen bestehen. Die geringen Unterschiede können beispielsweise mit einer unterschiedlichen intra- sowie intermolekularen Assoziation der einzelnen Domänen erklärt werden. Der Übergangsmittelpunkt der Denaturierung bei 1,5 M bzw. 1,8 M GdmCl entspricht etwa dem einer einzelnen Trx-Domäne von PDI (s. Abb. 24); (vgl. [160, 234]).

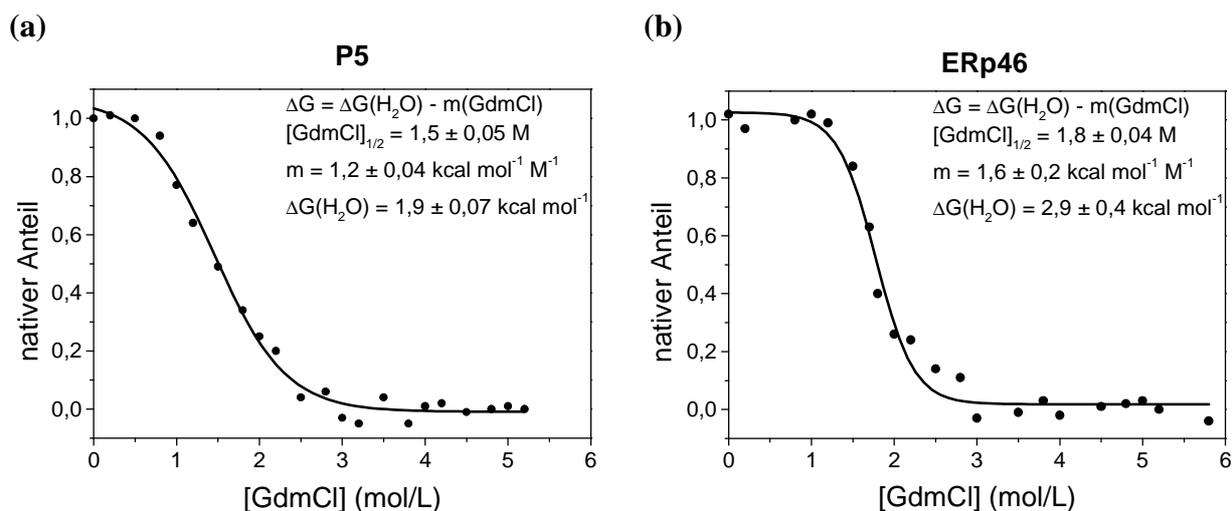


Abbildung 24: Denaturierungsübergänge von P5 und ERp46. Die GdmCl-induzierte Denaturierung von P5 (a) und ERp46 (b) erfolgt kooperativ nach einem Zweizustandsmodell. Beide Proteine zeigen einen einzigen Übergangsmittelpunkt bei ~1,5 bzw. 1,8 M GdmCl. Dieser entspricht der Entfaltung einer einzigen Trx-ähnlichen Domäne von PDI. P5 zeigt eine geringere Kooperativität der Entfaltung sowie eine geringere thermodynamische Stabilität als ERp46. Der *fit* der Messwerte erfolgte sigmoidal unter Annahme eines Zweizustandsmodells. Die GdmCl-induzierten Denaturierungen beider Proteine waren vollkommen reversibel (Daten nicht gezeigt). Die Denaturierungsübergänge wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und bei 20 °C ermittelt. Die thermodynamischen Parameter der Denaturierungsübergänge ($[GdmCl]_{1/2}$, m und $\Delta G(H_2O)$) sind im jeweiligen Graphen als Einschub angegeben.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Trx-ähnlichen Domänen von P5 und ERp46 simultan bzw. unabhängig voneinander entfalten und keinen intramolekularen, stabilisierenden Effekt aufweisen. Dagegen konnte für PDI auch eine stufenweise Entfaltung seiner einzelnen Domänen beobachtet werden [234]. Die $\Delta G(H_2O)$ -Werte beider Proteine sind allerdings niedriger als die der isolierten PDIa-Domäne [160]. Die isolierte ERp46a'-Domäne zeigt dagegen eine vergleichbare Denaturierungskurve wie das Wildtyp-Protein mit einer lokalen Entfaltung bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

3.5.3. Struktureller Vergleich von P5 und ERp46 mittels limitierter Proteolyse

Strukturelle Eigenschaften eines Protein lassen sich auch durch dessen partielle Proteolyse, z.B. mit Trypsin, gewinnen. Dabei werden durch die Protease hauptsächlich unstrukturierte Regionen innerhalb des Proteins zuerst abgebaut. Die Trx-ähnlichen Domänen von PDIs sind gegenüber proteolytischem Abbau über kurze Zeit relativ stabil (vgl. [100]). Um die mittels analytischer Gelfiltration identifizierte intramolekulare Flexibilität von ERp46 und P5 näher zu charakterisieren, sollten unstrukturierte Bereiche in den Proteinen durch limitierte Proteolyse identifiziert werden.

Wie in Abb. 25 gezeigt, wird P5 schon nach kurzer Zeit durch Trypsin in drei markante Fragmente abgebaut. Wie mittels spezifischer α -KDEL Antikörper durch Western-

Blot nachgewiesen werden konnte, handelt es sich bei den entstandenen Fragmenten neben dem intakten Protein um die N-terminale **a**-Domäne sowie das **a'****b**-Fragment von P5. Daraus kann abgeleitet werden, dass die **a**-Domäne mit dem Rest des Proteins vermutlich über einen flexiblen *linker* verknüpft ist und dass das **a'****b**-Fragment eine kompaktere (proteolytisch stabile) Einheit bildet. Dies stimmt zudem mit der Tatsache überein, dass sich die P5**b**-Domäne nicht isoliert exprimieren lässt.

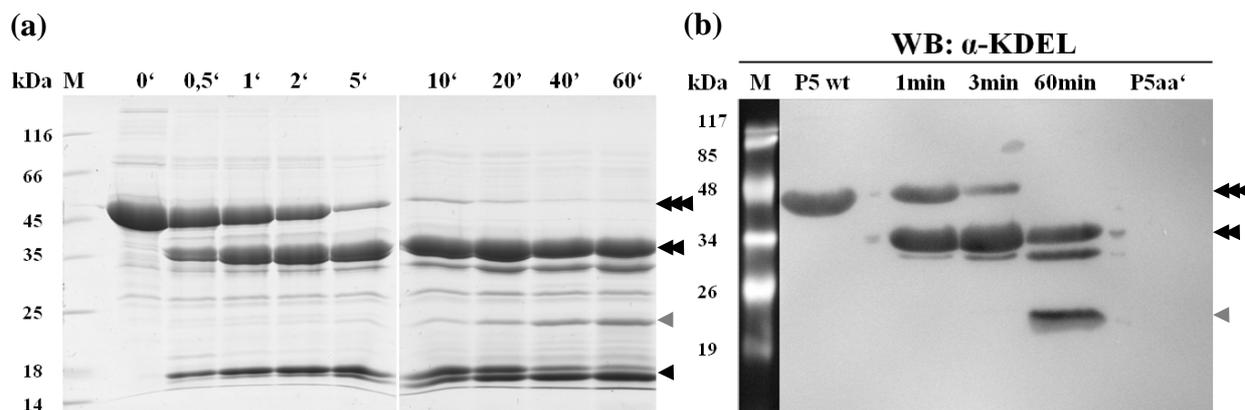


Abbildung 25: Limitierte Proteolyse von P5. Gezeigt ist der Verdau von P5 durch Trypsin **(a)**. Bereits nach kurzer Zeit wird das gesamte Protein (Dreifachpfeil) zu einem stabilen ca. 35 kDa großen Fragment (Doppelpfeil) abgebaut. Zusätzlich entsteht ein ca. 16 kDa großes Fragment (schwarzer Einfachpfeil). Der Nachweis des C-terminalen Proteinbereiches mittels α -KDEL Antikörper **(b)** lässt vermuten, dass P5 durch Trypsin in seine **a**-Domäne und das **a'****b**-Fragment gespalten wird. Ein weiteres Fragment mit einer Größe von ca. 23 kDa (grauer Einfachpfeil) stellt vermutlich die **b**-Domäne mit einem Teil der **a'**-Domäne dar (rechts). Das N-terminale **aa'**-Fragment von P5 wird durch die Antikörper wie erwartet nicht erkannt. Der tryptische Verdau von P5 erfolgte durch Inkubation auf Eis mit einem Verhältnis Trypsin:P5 von 1:100 (w/w). 12 %iges SDS-PA.

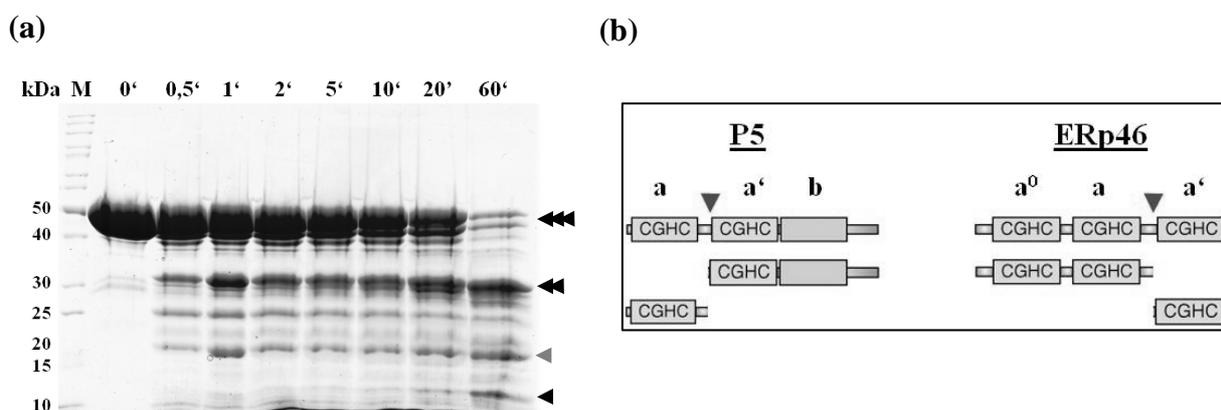


Abbildung 26: Limitierte Proteolyse von ERp46. **(a)** Gezeigt ist der Verdau von ERp46 (Dreifachpfeil) durch Trypsin. ERp46 ist gegenüber tryptischen Verdau wesentlich stabiler als P5. Nach 20 min sind immer noch signifikante Mengen von nicht-abgebautem Protein erkennbar. Erst nach längerer Inkubation mit Trypsin wird ERp46 vollständig zu einem ca. 32 kDa großen Fragment (Doppelpfeil) abgebaut. Dieses ist jedoch weniger stabil als das P5**a'****b**-Fragment. Die einzelne **a'**-Domäne bei ca. 12 kDa (schwarzer Einfachpfeil) ist kaum nachweisbar. Darüber hinaus ist ein Fragment mit einer Größe von ca. 18 kDa (grauer Einfachpfeil) zu erkennen. Der tryptische Verdau von ERp46 erfolgte durch Inkubation auf Eis mit einem Verhältnis Trypsin:ERp46 von 1:10 (w/w). Die Inkubation mit einem Verhältnis Trypsin:ERp46 von 1:100 (w/w) zeigte auch nach einstündiger Inkubation auf Eis nahezu keinen Proteinabbau. Die Ergebnisse der limitierten Proteolyse sind schematisch in **(b)** zusammengefasst. Der Pfeil symbolisiert die präferentielle Trypsin-Schnittstelle.

Demgegenüber zeigt sich ERp46, trotz nahezu identischem Domänen-Aufbau, gegenüber proteolytischem Abbau relativ stabil (s. Abb. 26). Die längeren putativen *linker*-Regionen, welche die einzelnen katalytischen Domänen verbinden, scheinen gegenüber tryptischen Verdau bemerkenswert stabil. Erst nach längerer Inkubation mit höheren Konzentrationen an Trypsin wird ERp46 zu einem **a⁰a**-Fragment abgebaut. Dieses ist jedoch im Vergleich zum **P5a'b**-Fragment proteolytisch weniger stabil. Darüber hinaus wird die abgespaltene **a'**-Domäne von ERp46 rasch abgebaut (s. Abb. 26; vgl. Abb. 27, Abschnitt 3.5.4.1.). Alle *linker*-Regionen in P5 und ERp46 enthalten potentielle Trypsin-Schnittstellen. In der *linker*-Region, welche die **a**- und **a'**-Domäne in ERp46 verbindet, sind mehrere potentielle Trypsin-Schnittstellen angereichert. Eine präferentielle tryptische Proteolyse dieser Bereiche wäre demnach denkbar.

Die durch spektroskopische Charakterisierungen, Ermittlung der thermodynamischen Proteinstabilität sowie durch limitierte Proteolyse in Kombination gewonnenen Ergebnisse zeigen signifikante strukturelle Unterschiede zwischen ERp46 und P5, trotz der vorhergesagten Ähnlichkeiten in ihrem Domänen-Aufbau. Die hier ermittelten Proteineigenschaften wurden darüber hinaus bei der Planung von folgenden Kristallisationsversuchen von P5 und ERp46 mit einbezogen (s. Abschnitt 3.5.4.).

3.5.4. Proteinkristallisation

3.5.4.1. Kristallisations-screening von P5 und ERp46

Während des Kristallisations-*screening* von P5 kam es im Durchschnitt bei ca. 50 % der Kristallisationsbedingungen innerhalb der ersten Tage zur Präzipitatbildung bzw. zum Auftreten so genannter Sphäroliten. Dabei handelt es sich um amorphe "Quasi-Proteinkristalle" ohne geordnete molekulare Struktur. Demgegenüber zeigte ERp46 während der Kristallisationsversuche mit durchschnittlich ca. 30 % Aggregation bei den einzelnen Bedingungen eine geringere Tendenz zur Präzipitatbildung. Das Kristallisations-*screening* von ERp46 lieferte nach etwa 30 Tagen einen einzigen Proteinkristall (s. Abb. 27). Dieser konnte auf sein Streuvermögen hin getestet werden. Erste Messungen mittels Haus-eigenem Röntgengenerator ergaben eine Auflösung von ca. 3,1 Å. Der ERp46-Kristall wurde bis zur weiteren Vermessung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Eine Analyse der für die Kristallisation von ERp46 verwendeten Originalprobe mittels SDS-PAGE zeigte neben der ERp46-Bande zwei markante Abbaubanden (s. Abb. 27). Eine Analyse der Probe mittels Western-Blot, mit gegen den C-Terminus gerichteten α -KDEL-

sowie gegen den N-Terminus gerichteten α -(His)₆-Antikörpern, deutet auf eine proteolytische Spaltung des Proteins hin (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde ERp46 in die C-terminale a'-Domäne und das a⁰a-Fragment gespalten. Die für die Kristallisation verwendete Originalprobe wurde anschließend über zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Eine Degradation des Proteins aufgrund von Kontamination mit Proteasen ist daher wahrscheinlich.

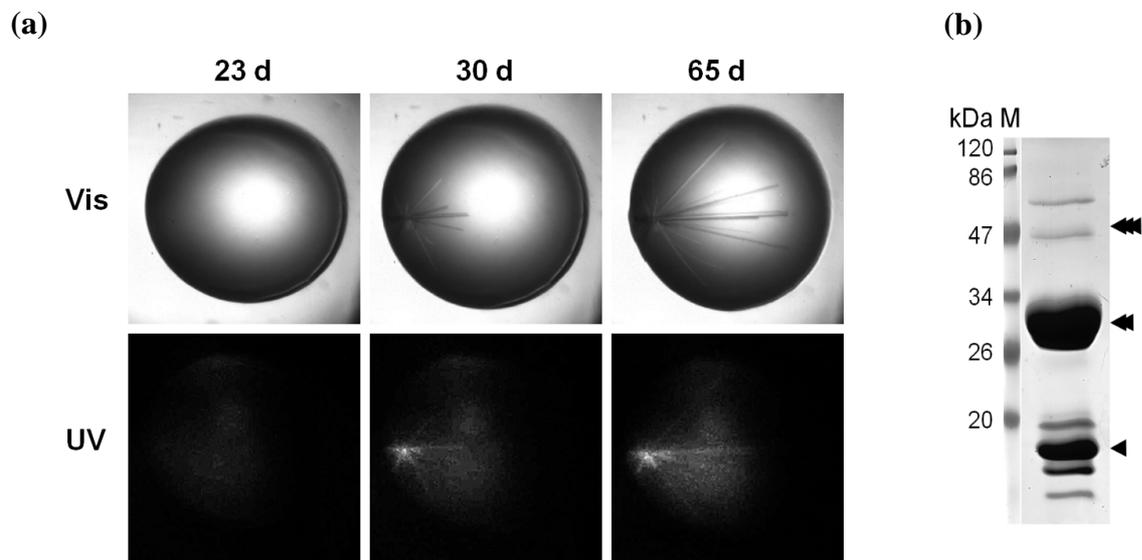


Abbildung 27: Kristallisation von ERp46. (a) Das Kristallisations-*screening* von ERp46 im 96-*well* Maßstab lieferte erste Kristalle nach ca. einem Monat. Die Größe und Qualität des Kristalls war ausreichend für die Aufnahme von Beugungsdaten. Die Kristalle von ERp46 konnten ebenfalls im 24-*well* Maßstab unter identischen Bedingungen mit der selben Proteincharge reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Die stäbchenförmigen Kristalle zeigten jedoch starke Verwachsungen und waren für eine Vermessung ungeeignet. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte in allen Fällen bei 14 °C nach dem *sitting-drop* (96-*well*) bzw. *hanging-drop* (24-*well*) Verfahren. Kristallisationsbedingungen: 20 mg/mL ERp46; 0,1 M HEPES (pH 7,5); 20 % (w/v) PEG 10.000 (Hampton Research). Gezeigt sind jeweils die automatisch aufgenommenen Bilder der Kristallisationstropfen sowie ihre UV-Absorption bei 220 nm. Proteinkristalle zeigen dabei helle Umrisse. Unterhalb der Bilder ist jeweils die Anzahl der Tage nach Ansetzten der Kristallisation eingefügt. (b) Die bei 4 °C über zwei Wochen gelagerte Rückstellprobe des ERp46-Kristallisations-*screening* zeigt neben geringen Mengen intaktem ERp46 (Dreifachpfeil) auch eine Abbaubande bei ca. 30 kDa (Doppelpfeil) und ca. 15 kDa (Einfachpfeil). Die Western-Blot-Analyse mit α -KDEL sowie α -(His)₆-Antikörpern deutet darauf hin, dass das Protein während der Kristallisation in das a⁰a-Fragment sowie die a'-Domäne gespalten wurde (Daten nicht gezeigt). Die Degradation rührt wahrscheinlich von Kontaminationen mit Proteasen her. Beide Fragmente blieben jedoch bei 4 °C über mehrere Wochen hin stabil. 12 %iges SDS-PA-Gel.

Die primäre Kristallisationsbedingung ließ sich in dem identischen Kristallisationspuffer und in leicht modifizierten Puffersystemen in 24-*well* Platten mit hängendem Tropfen bei gleicher Temperatur und gleicher Proteinkonzentration sowie Proteinreinigungscharge wiederholen (Daten nicht gezeigt). Die Kristalle wuchsen bereits nach ca. 10 Tagen, zeigten jedoch eine sehr starke Verwachsung. Eine weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen gelang nicht.

3.5.4.2. Datensammlung und Strukturlösung des C-terminalen ERp46-Fragmentes

Folgende Aufnahmen des Proteinkristalls lieferten einen Datensatz mit einer verbesserten Auflösung von 2,65 Å unter Synchrotronstrahlung (BESSY, *beamline* 14.1; Berlin). Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte durch Dr. Christoph Parthier (Abt. Physikalische Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg).

Datenprozessierung	ERp46a'
Strahlenquelle	BESSY BL14.1
Wellenlänge (Å)	0,91840
Auflösungsbereich (Å)	55 – 2,65 (2,79 – 2,65)
Raumgruppe	P3 ₂ 21
a ; b ; c (Å)	63,6 ; 63,6; 68,7
α; β; γ (°)	90; 90; 120
R _{merge} (%) ^A	7,7 (41,4)
Vollständigkeit (%)	98,9 (99,0)
Multiplizität	3,7 (3,7)
<I/σ(I)>	12,0 (3,5)
Wilson B-Faktor (Å ²)	61,2
Strukturverfeinerung	
Anzahl Reflexe (<i>working set</i> / <i>test set</i>)	4602 / 239
R _{work} (%) ^B	22,9
R _{free} (%) ^C	25,9
Anzahl Atome	
Protein	772
Wasser	23
Mittlere B-Faktoren (Å ²)	
Protein	55,3
Wasser	49,1
Abweichung von Idealwerten (RMSD)	
Bindungslängen (Å)	0,018
Bindungswinkel (°)	1,79
Ramachandran-Analyse	
in bevorzugten Bereichen (%)	91 (95,8)
in noch erlaubten Bereichen (%)	4 (4,2)
in nicht-erlaubten Bereichen (%)	0 (0)
PDB-Code	3uj1

Tabelle 2: Statistische Werte der Datensammlung und Strukturlösung der ERp46a'-Domäne. Es sind die Werte der Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung der ERp46a'-Domäne zusammenfassend dargestellt. Die ERp46a'-Domäne kristallisierte in der trigonalen Raumgruppe P3₂21. Die Werte aus der Datenprozessierung für die äußere Auflösungsschale (2,79-2,65 Å) sind in Klammern angegeben. ^AR_{merge} = Σ|I(I) - <I(I)>| / Σ(I); ^BR_{cryst} = Σ||Fo| - |Fc|| / Σ|Fo|; ^CDer Freie R-Faktor wurde wie der R_{cryst} berechnet. Der Faktor basiert auf dem Test-Set, bestehend aus 5 % der Daten, die nicht im *Refinement* verwendet wurden.

Das C-terminale ERp46-Fragment kristallisierte in der trigonalen Raumgruppe P3₂21 mit einem Molekül pro asymmetrischer Einheit. Die Statistik der Datensammlung, der Strukturlösung und -verfeinerung ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Das Strukturmodell

konnte bis zu einem R-Faktor von 0,24 und einem Freien R-Faktor von 0,26 optimiert werden. Eine weitere Verbesserung des Freien R-Faktors gelang, vermutlich auf Grund der Heterogenität des Proteinkristalls, nicht. Trotz des erhöhten Freien R-Faktors zeigt das finale Strukturmodell eine gute Übereinstimmung mit der Elektronendichte (s. Abb. 32). Die Struktur wurde in der RCSB Proteindatenbank unter dem PDB-Code 3uj1 hinterlegt.

Das finale Strukturmodell des C-terminalen ERp46-Fragmentes bestätigte, dass es sich hierbei um die a' -Domäne handelte (vgl. Abschnitt 3.5.3.). In Übereinstimmung mit den Daten der analytischen Gelfiltration liegt die ERp46 a' -Domäne als Monomer in der Elementarzelle vor. Das kristallisierte Fragment enthält 105 Aminosäuren und umfasst die Reste V324 bis A428 der ERp46 a' -Domäne, wobei das C-terminale KDEL-Retentionssignal nicht in der Elektronendichte enthalten war (s. Abb. 28). Ebenso zeigen die Reste K366-A372, welche die Schleife zwischen $\alpha 2$ und $\beta 3$ bilden, keine Elektronendichte. Dies deutet auf eine gewisse Unordnung dieser Schleifen-Region hin.

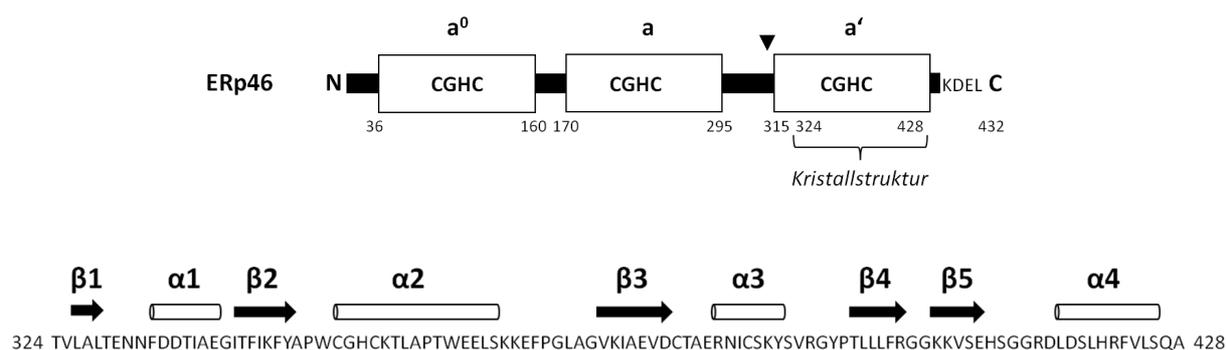


Abbildung 28: Domänenanordnung von ERp46 und Zuordnung der Sekundärstrukturelemente der kristallisierten a' -Domäne. ERp46 besteht aus drei Trx-ähnlichen Domänen mit jeweils einer katalytischen CGHC-Sequenz (Abb. oben). Im Gegensatz zu den übrigen PDI-Familienmitgliedern, jedoch ähnlich zu ERp72, sind die drei redox-aktiven Domänen über längere flexible *linker*-Regionen miteinander verbunden. Die Länge dieser *linker*-Regionen beträgt ca. 10 bis 20 Aminosäuren, wobei der *linker*, welcher die a - und a' -Domänen verbindet am längsten ist und vermehrt Trypsin-Schnittstellen aufweist (Pfeil). Die gelöste Kristallstruktur umfasst 105 Reste. Die Kristallstruktur der ERp46 a' -Domäne zeigt eine Zusammensetzung des Proteins aus vier α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$; weiße Zylinder) sowie fünf β -Faltblättern ($\beta 1$ - $\beta 5$; schwarze Pfeile) mit der Reihenfolge $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ (Abb. unten). Dies entspricht der klassischen Anordnung der Sekundärstrukturelemente einer Trx-ähnlichen Faltung. Die katalytische CGHC-Sequenz (unterstrichen) befindet sich am N-terminalen Ende der $\alpha 2$ -Helix. Die Nummerierung der Reste erfolgte ab dem ersten Methionin der Signalsequenz.

Die Zuordnung der Sekundärstrukturelemente lieferte 4 α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) sowie 5 β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 5$) mit einer Thiothoxin (Trx)-typischen Reihenfolge von $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ (s. Abb. 28). Die $\alpha 2$ -Helix ist die längste aller enthaltenen α -Helices, an deren N-terminalen Ende sich die reaktiven Cys-Reste der katalytischen WCGHC-Konsensussequenz befinden. Die ERp46 a' -Domäne enthält zudem zwei konservierte Pro-Reste (P358 und P397) mit einer *cis*-Peptidyl-prolyl-Bindung. P358 befindet sich in der $\alpha 2$ -Helix und führt zu einem

charakteristischen Abknicken in der Mitte dieser Helix. P397 befindet sich dagegen in einer konservierten Schleife unterhalb des aktiven Zentrums (*cis*-Prolin Schleife; s. Abb. 30). Beide Pro-Reste finden sich ebenfalls in den redox-aktiven Domänen weiterer Mitgliedern der PDI-Familie (s. Abb. 81, Anhang). Weitere z.T. konservierte Reste innerhalb der Primärstruktur der ERp46a'-Domäne sind neben R415 auch K344 und E378 (s. Abb. 81, Anhang). Während R415 in einer flexiblen Schleife zwischen $\beta 5$ und $\alpha 4$ liegt, befinden sich K344 und E378 in hydrophoben Bereichen des Proteins innerhalb von $\beta 2$ bzw. $\beta 3$ (s. Abb. 30). Es konnte gezeigt werden, dass im Falle von PDI alle drei Reste einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Proteins besitzen [66, 67, 235, 236]. Des Weiteren enthält die a'-Domäne von ERp46 zwei charakteristische Cys-Reste (C381 und C388) innerhalb eines CX₆C-Motivs, welches neben der a⁰ und a'-Domäne von ERp46 sonst nur in der Primärsequenz der a-Domäne von ERp57 und PDI1p sowie in der a'-Domäne von PDIr zu finden ist (s. Abb. 81, Anhang).

Die Tertiärstruktur der ERp46a'-Domäne zeigt die charakteristische Trx-ähnliche Faltung mit fünf zentralen antiparallelen β -Faltblättern, die von vier α -Helices umgeben sind (s. Abb. 29). Während die β -Faltblätter hauptsächlich im hydrophoben Inneren des Proteins lokalisiert sind, befinden sich die α -Helices v.a. in lösungsmittlexponierten Bereichen des Proteins.

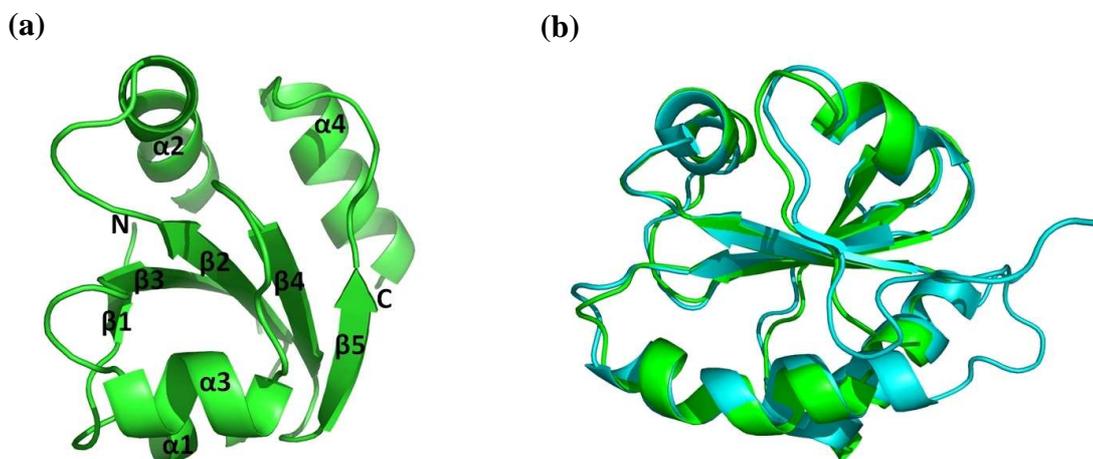


Abbildung 29: Tertiärstruktur der ERp46a'-Domäne und Vergleich mit der NMR-Struktur. Die Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne zeigt den typischen Trx-ähnlichen Aufbau der Tertiärstruktur (a). Die fünf antiparallelen β -Faltblätter ($\beta 1$ - $\beta 5$) befinden sich hauptsächlich im hydrophoben Inneren des Proteins, während die vier α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) v.a. in äußeren lösungsmittlexponierten Bereichen lokalisiert sind. N bezeichnet den N-Terminus, C den C-Terminus des Proteins. Eine Überlagerung der Kristallstruktur (grün) mit der in der Proteindatenbank hinterlegten NMR-Struktur (hellblau; pdb: 2diz) der ERp46a'-Domäne zeigt erwartungsgemäß eine starke Übereinstimmung (b). Unterschiede bestehen hauptsächlich in den verschiedenen Schleifen-Regionen. Diese und folgende Abbildungen der Proteinstruktur wurden mit dem Programm Pymol V0.98, DeLano Scientific, 2005 dargestellt.

Für die dritte Domäne des *Thioredoxin-Domänen-enthaltenden-Proteins 5* wurde bereits eine NMR-Struktur in der Proteindatenbank hinterlegt (pdb: 2diz). Diese Struktur

wurde bisher jedoch in keiner Fachzeitschrift näher beschrieben und auch sonst nirgends veröffentlicht. Ein direkter Vergleich der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne mit der NMR-Struktur zeigt wie erwartet eine starke Übereinstimmung (s. Abb. 29). Die Überlagerung beider Strukturen liefert eine Standardabweichung von ca. 1,2 Å über alle C α -Atome. Konformationelle Unterschiede bestehen lediglich in den flexiblen Schleifen. Eine genauere Analyse der Konformation der einzelnen Reste in der Nähe zum aktiven Zentrum zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Kristallstruktur und NMR-Struktur (s. Abb. 30).

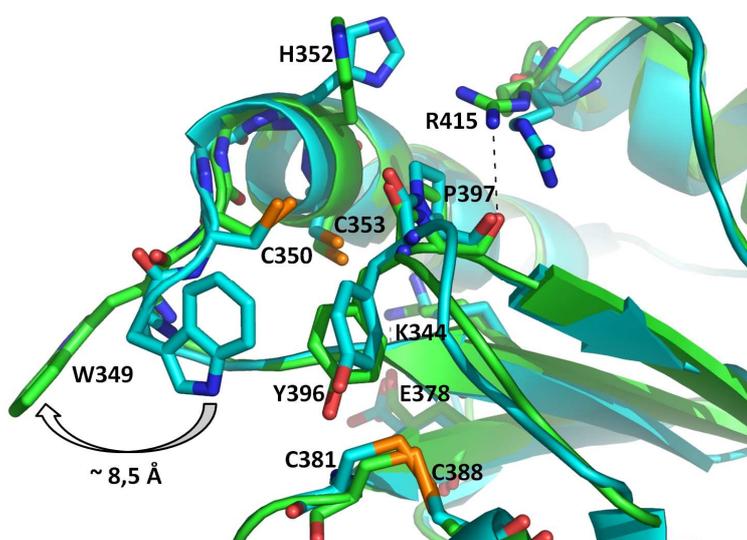


Abbildung 30: Konformationelle Unterschiede in der Nähe des aktiven Zentrums. Die Überlagerung der Kristallstruktur (grün) mit der NMR-Struktur (hellblau; pdb: 2diz) der ERp46a'-Domäne zeigt signifikante Unterschiede in der Konformation der Reste in der Nähe zum aktiven Zentrum. Am deutlichsten ist die unterschiedliche Konformation der Seitenkette von W349 ausgeprägt. Dieser konservierte Trp-Rest liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-terminalen reaktiven Cys-Rest (C353). Die räumliche Dislokation des flexiblen Trp-Restes beträgt ca. 8,5 Å (gemessen am Stickstoffatom des Indol-Ringes). Das "Hinausschwenken" von W349 (Pfeil) führt zu einer erhöhten Lösungsmittel exponiertheit von C350. Die beiden reaktiven Cys-Reste des aktiven Zentrums (C350 und C353) liegen reduziert vor. Dagegen bilden die nicht-katalytischen Cys-Reste (C381 und C388) eine Disulfidbrücke aus. Diese befindet sich räumlich gesehen unterhalb des aktiven Zentrums. P397 liegt in der *cis*-Konformation vor und befindet sich zusammen mit Y396 in einer Schleifen-Region direkt unterhalb des aktiven Zentrums. Die beiden geladenen Reste K344 und E378 befinden sich im hydrophoben Inneren des Proteins in der Nähe zum C-terminalen reaktiven Cys-Rest (C353). Im Gegensatz zur **a**-Domäne von ERp72 kann R415 keine Salzbrücke mit K344 ausbilden (vgl. [237]). Stattdessen bildet R415 mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P397 eine Wasserstoffbrücke aus (gestrichelte Linie).

Am auffälligsten sind die unterschiedlichen Konformationen des Trp-Restes (W349) in unmittelbarer Nachbarschaft des N-terminalen katalytischen Cys-Restes (C350). Der Torsionswinkel (χ_1) von W349 beträgt in der Kristallstruktur -67° (*gauche*⁻) und in der NMR-Struktur $+53^\circ$ (*gauche*⁺). In der NMR-Struktur der ERp46a'-Domäne liegt W349 in räumlicher Nähe zu Y396 und schirmt hierdurch C350 partiell ab ("geschlossene Konformation"). Demgegenüber zeigt die Seitenkette von W349 in der Kristallstruktur der

ERp46a'-Domäne eine räumliche Dislokation von ca. 8,5 Å. In diesem Fall befindet sich W349 nicht in räumlicher Nähe zu Y396. Als Resultat dieser unterschiedlichen Seitenketten-Konformation ist C350 stärker lösungsmittlexponiert ("offene Konformation"). Es kann angenommen werden, dass W349 als eine Art "flexibler Deckel" fungiert und auf diese Weise die Zugänglichkeit des reaktiven N-terminalen Cys-Restes beeinflusst (s. Abb. 31).

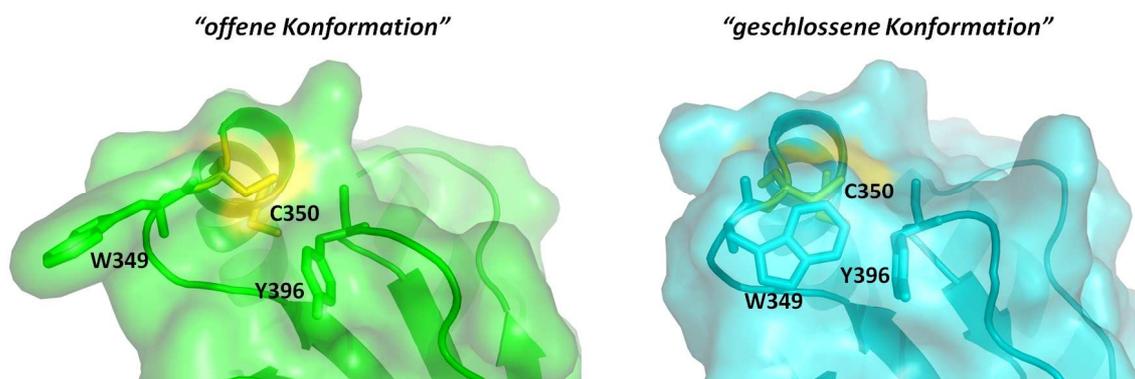


Abbildung 31: Abschirmung des N-terminalen reaktiven Cys-Restes durch den flexiblen Trp-Rest. Der flexible Trp-Rest (W349) befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum N-terminalen reaktiven Cys-Rest (C350). In der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne befindet sich W349 nicht in der Nähe von Y396, sondern ragt aus der Proteinoberfläche hinaus (grün; Abb. links). Hierdurch ist C350 (gelb) stark lösungsmittlexponiert. Im Gegensatz dazu befindet sich W349 in der NMR-Struktur (pdb: 2diz) in der Nähe zu Y396 (hellblau; Abb. rechts). Als Resultat ist C350 weniger stark lösungsmittlexponiert. Es kann angenommen werden, dass W350 als eine Art „Deckel“ fungiert, wodurch die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums maßgeblich beeinflusst wird. W349, C350, C353 und Y396 sind jeweils als Stäbchen-Modell gezeigt.

Neben dem konservierten Trp-Rest zeigt auch H352 eine unterschiedliche Konformation seiner Seitenkette. Der Torsionswinkel (χ_1) beträgt in der Kristallstruktur -65° (*gauche*⁻), während in der NMR-Struktur -160° (*trans*⁻) gemessen werden konnten.

Darüber hinaus zeigt auch R415 eine geringfügig unterschiedliche Konformation seiner flexiblen Seitenkette (s. Abb. 30). In früheren *in silico* Studien wurde angenommen, dass dieser konservierte Arg-Rest innerhalb der flexiblen Schleife in räumliche Nähe des aktiven Zentrums gelangen kann und dadurch den pK_a -Wert des C-terminalen reaktiven Cys-Restes beeinflusst [66, 67]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieser konservierte Arg-Rest der **a**-Domäne von ERp72 in den hydrophoben Bereich in der Nähe des katalytischen Zentrums inseriert und mit einem konservierten Glu-Rest eine Salzbrücke ausbildet [237]. Im Falle der ERp46a'-Domäne bildet R415 jedoch eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P397 aus (s. Abb. 30). Zudem ist der bei den redox-aktiven Domänen der meisten PDI-Familienmitglieder konservierte Glu-Rest in der **a'**-Domäne von ERp46 durch einen Lys-Rest (K344) substituiert (s. Abb. 81, Anhang). Die Ausbildung einer Salzbrücke von K344 mit R415 ist nicht möglich. Es kann daher angenommen werden, dass die

Beeinflussung des pK_a -Wertes von C353 des aktiven Zentrums durch elektrostatische Interaktion mit R415 im Falle der a'-Domäne von ERp46 vermutlich keine Rolle spielt. Interessanterweise ist auch der ansonsten konservierte Lys-Rest in der Nähe des aktiven Zentrums in der ERp46a'-Domäne durch einen Glu-Rest (E378) substituiert. In der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne können K344 und E378 eine Salzbrücke ausbilden (s. Abb. 30).

In der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne liegen die beiden Cys-Reste des aktiven Zentrums in der reduzierten Form vor. Es ist keine einheitliche Elektronendichte zwischen den beiden Resten zu erkennen (s. Abb. 32). Der Abstand zwischen den beiden Schwefelatomen beträgt ca. 3,5 Å und ist damit größer als der erwartete Abstand von ca. 2,1 Å innerhalb einer Disulfidbrücke.

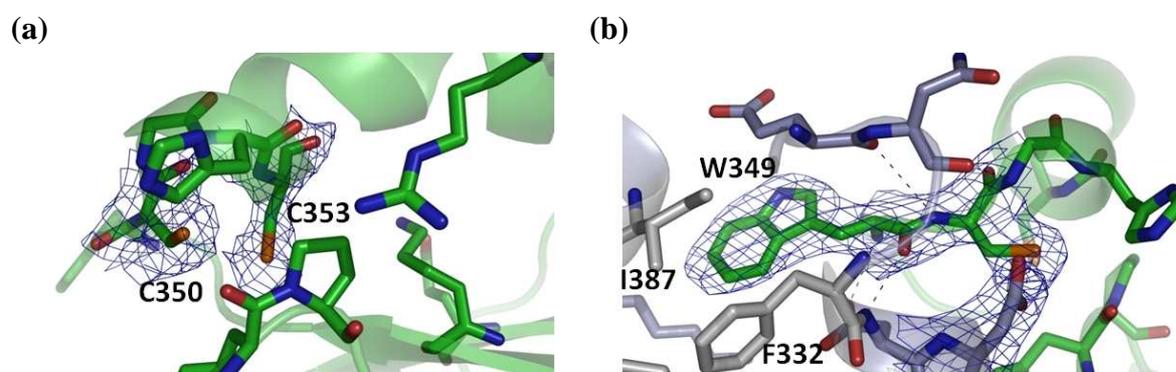


Abbildung 32: Elektronendichte von Aminosäureresten des aktiven Zentrums. In (a) ist die Elektronendichte der reaktiven Cys des aktiven Zentrums gezeigt. C350 und C353 liegen vorwiegend im reduzierten Zustand vor. Es ist keine einheitliche Elektronendichte zwischen beiden S_γ -Atomen erkennbar. In (b) ist die Elektronendichte von W349 innerhalb der hydrophoben Tasche des Symmetrie-verwandten Moleküls gezeigt. Die Seitenkette von W349 ist gut in der hydrophoben Tasche fixiert und die Elektronendichte ist wohl definiert. Die ERp46a'-Domäne ist jeweils in grün dargestellt, während das Symmetrie-verwandte Molekül in hellblau hervorgehoben ist. Die Elektronendichte der verschiedenen Reste stammt aus der $2F_o - F_c$ Differenzelektronendichtekarte.

Ebenso deutet auch die NMR-Struktur auf eine Reduktion der reaktiven Cys-Reste hin. Es wird zudem angenommen, dass die reduzierte Form der katalytischen Cys-Reste zu einer verminderten konformationellen Flexibilität des gesamten Proteins führt, was einen positiven Effekt auf die Kristallisation haben könnte [103]. Auf der anderen Seite liegen die beiden nicht-katalytischen Cys-Reste (C381 und C388) sowohl in der Kristallstruktur als auch in der NMR-Struktur (pdb: 2diz) in der oxidierten Form vor (s. Abb. 30). Der Abstand zwischen den beiden Schwefelatomen beträgt in diesem Fall ca. 2,0 Å. Mittels Ellman-Test konnte eine durchschnittliche Anzahl von 5,6 freien Cys-Resten in nativem sowie denaturiertem ERp46 berechnet werden. Der Vergleich der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne mit publizierten Strukturen von redox-aktiven Domänen weiterer PDI-

Familienmitglieder deutet jedoch nicht auf einen strukturellen Beitrag dieser Disulfidbrücke hin. Redox-aktive Domänen, die keine derartige Disulfidbrücke aufweisen zeigen trotzdem eine ähnliche Tertiärstruktur (nicht gezeigt).

Innerhalb des Kristalls kommt es zu Kontakten der ERp46a'-Domäne mit Symmetrie-
verwandten Molekülen. Während die meisten Kontaktflächen i.R. gering sind und vermutlich auf der Packung bzw. Anordnung innerhalb des Kristalls beruhen, kommt es in der Nähe zum aktiven Zentrum zu einer signifikanten Interaktion zwischen den beiden Symmetrie-
verwandten Molekülen (s. Abb. 33).

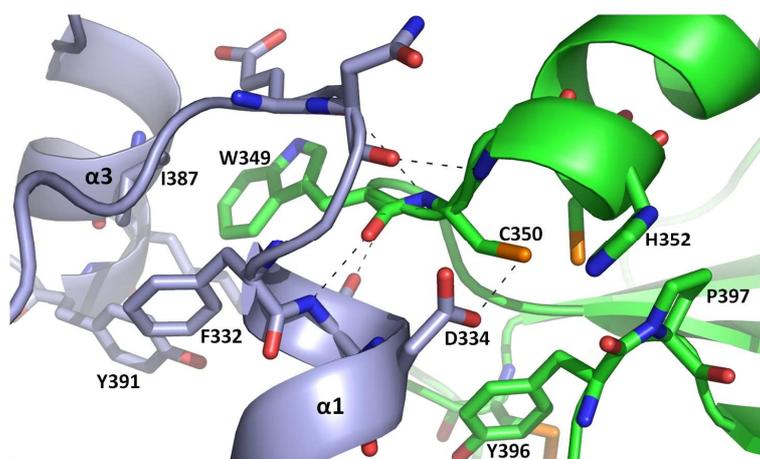


Abbildung 33: Interaktion mit Symmetrie-verwandten Molekülen in der Nähe des aktiven Zentrums. In der Nähe zum aktiven Zentrum interagiert die ERp46a'-Domäne (grün) innerhalb des Kristalls mit einem Symmetrie-verwandten Molekül (blau). Diese Interaktion beruht hauptsächlich auf der Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) der Aminosäureseitenketten sowie des Polypeptidrückgrates. V.a. die $\alpha 1$ -Helix mit den benachbarten Schleifen-Regionen trägt zu dieser Interaktion bei. Ein Asp-Rest innerhalb der $\alpha 1$ -Helix des Symmetrie-verwandten Moleküls bildet eine Wasserstoffbrücke mit C350 aus. W349 ist in eine hydrophobe Tasche innerhalb des Symmetrie-verwandten Moleküls integriert. Die hydrophobe Tasche wird hauptsächlich durch Reste der $\alpha 3$ -Helix gebildet. Erst die Dislokation von W349 ermöglicht die Zugänglichkeit von C350 durch die Reste der $\alpha 1$ -Helix des Symmetrie-verwandten Moleküls. Reste in der Nähe des jeweiligen Symmetrie-verwandten Moleküls sind als Stäbchen-Modell gezeigt.

Die Interaktionsfläche ist relativ gering und beträgt ca. 500 \AA^2 (PISA V1.18; [238]). Neben elektrostatischen Wechselwirkungen beruht die Interaktion v.a. auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäureseitenketten sowie dem Polypeptidrückgrat. Hierbei interagieren die Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums hauptsächlich mit Resten der $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Helix sowie benachbarter Schleifen-Regionen innerhalb des Symmetrie-verwandten Moleküls (s. Abb. 33). Reste der *cis*-Prolin Schleife tragen dagegen in geringerem Umfang zur Interaktion bei.

Interessanterweise kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen einem Asp-Rest (D334) und dem N-terminalen reaktiven C350 (s. Abb. 33). Der Abstand zwischen D334 der $\alpha 1$ -Helix und C350 beträgt ca. $2,6 \text{ \AA}$. Die Zugänglichkeit von C350 und die

Interaktion mit den Resten der α 1-Helix wird maßgeblich durch die Konformation des flexiblen Trp-Restes bestimmt. Obwohl H352 ca. 4,4 Å von D334 der α 1-Helix entfernt ist, könnte eine konformationelle Änderung von H352 ebenfalls leicht zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke führen. Eine Beteiligung von H352 bei Protonentransfer-Reaktionen wäre demnach denkbar. Neben W349 trägt auch der Gly-Rest des CGHC-Motivs (G351) durch das Fehlen einer Seitenkette zur verbesserten Zugänglichkeit von C350 bei.

Während die Interaktion mit Resten der α 1-Helix hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt, liegt W349 in einer hydrophoben Tasche innerhalb des Symmetrie-verwandten Moleküls integriert (s. Abb. 34). Die hydrophobe Tasche wird hierbei v.a. durch die Reste F332, I387 und Y391 gebildet. Durch die Interaktion von W349 mit der hydrophoben Tasche wird dessen konformationelle Flexibilität eingeschränkt, was an der wohldefinierten Elektronendichte von W349 zu erkennen ist (s. Abb 32). Demnach fungiert W349 nicht nur als "flexibler Deckel" sondern möglicherweise auch als eine Art "Greifarm", indem er in hydrophobe Bereiche des Symmetrie-verwandten Moleküls integriert und dadurch die Interaktion stabilisiert.

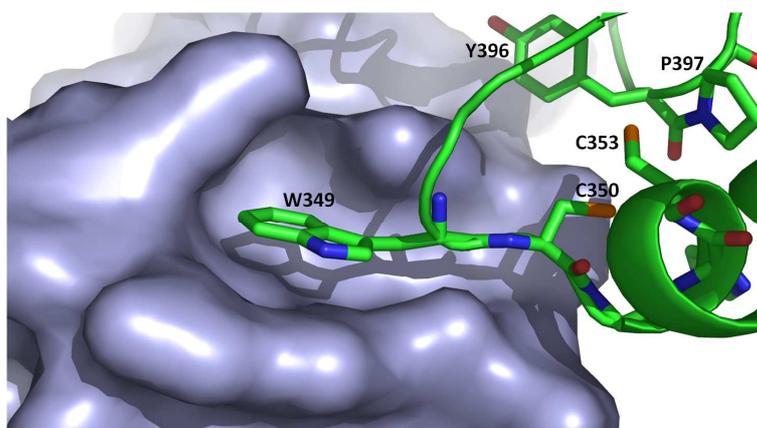


Abbildung 34: Insertion des flexiblen Trp-Restes in die hydrophobe Tasche von Symmetrie-verwandten Molekülen. Die Dislokation der Seitenkette von W349 führt zur Exposition von C350. Darüber hinaus inseriert W349 in eine hydrophobe Tasche innerhalb des Symmetrie-verwandten Moleküls (blau). Auf diese Weise wird die Interaktion durch hydrophobe Wechselwirkungen zusätzlich stabilisiert. W349 fungiert demnach nicht nur als flexibler „Deckel“, sondern besitzt auch die Funktion eines „Greifarms“. Hierdurch können hydrophobe Reste, welche partiell im Inneren des Symmetrie-verwandten Moleküls liegen für C350 zugänglich gemacht werden. Reste in der Nähe des aktiven Zentrums sind als Stäbchen-Modell gezeigt.

Die Analyse der Ladungsverteilung auf der Oberfläche der ERp46a'-Domäne zeigt neben einem kleinen hydrophoben Bereich in der Nähe des aktiven Zentrums v.a. basische Reste (s. Abb. 35). Diese Bereiche interagieren demnach hauptsächlich mit sauren Resten der α 1-Helix sowie benachbarter Schleifen-Regionen des Symmetrie-verwandten Moleküls. Derartige

elektrostatische Wechselwirkungen scheinen jedoch für die Bindungsspezifität eine untergeordnete Rolle zu spielen (s. Abschnitt 3.7.2.).

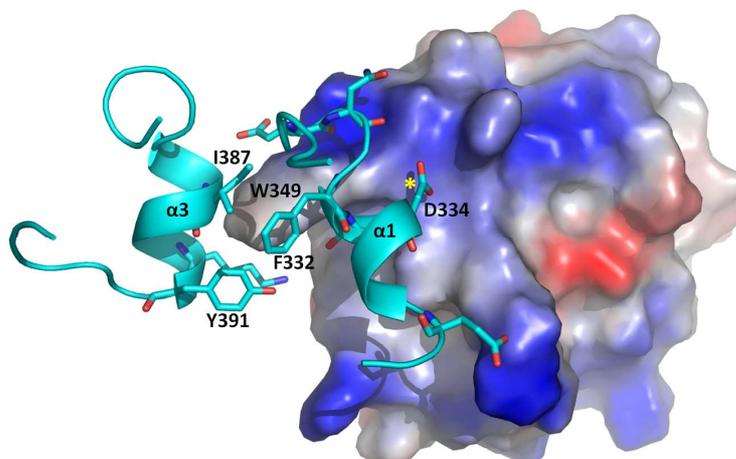


Abbildung 35: Ladungsverteilung der Oberfläche in der Nähe des aktiven Zentrums. Das elektrostatische Oberflächenpotential der ERp46a'-Domäne zeigt, dass neben einer kleinen hydrophoben Oberfläche (weiß) v.a. basische Reste (blau) in der Nähe des aktiven Zentrums liegen. Dementsprechend zeigen die interagierenden Reste des Symmetrie-verwandten Moleküls (cyan) hauptsächlich eine negative Ladung. Während die Reste der $\alpha 1$ -Helix und benachbarter Schleifen-Regionen hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen zur Interaktion beitragen, bilden die Reste F332, I387 und Y391 eine hydrophobe Tasche, in die W349 des Symmetrie-verwandten Moleküls inseriert. Negativ geladene Reste (rot) kommen weniger stark gehäuft auf der Oberfläche der ERp46a'-Domäne vor. D334 innerhalb der $\alpha 1$ -Helix des Symmetrie-verwandten Moleküls, welcher eine Wasserstoffbrücke mit C350 ausbildet ist zusätzlich mit einem gelben Stern markiert.

3.6. Protein-Bindungsstudien (*Far-Western Analyse*)

3.6.1. Fluoreszenzmarkierung von PDIs

Die Bindungsaffinitäten von PDIs für ihre Substrate sind, wie für Chaperone üblich, naturgemäß äußerst schwach und liegen bestenfalls im μM -Bereich (s. Abschnitt 1.5.2.). Für die Analyse der schwachen PDI-Substratinteraktion in Lösung werden häufig *cross-linking*-Strategien angewandt, um das Chaperon physisch mit seinem Bindungspartner zu koppeln. Die chemische Kopplung mittels *cross-linker* erfordert jedoch in der Regel höhere Proteinkonzentrationen sowie geeignete Kopplungspuffer. Zudem können die Proteineigenschaften durch das *cross-linking*-Verfahren verändert werden.

In dieser Arbeit wurde daher für die Analyse von PDI-Substratinteraktionen die Immobilisierung eines Bindungspartners gewählt. Die Immobilisierung führt zu einer höheren lokalen Konzentration des Liganden. Darüber hinaus wird der lösliche Bindungspartner durch Interaktion mit dem immobilisierten Liganden aus der Lösung entfernt, was wiederum eine Verschiebung des Gleichgewichtes und damit eine verstärkte Bindung zur Folge hat. Die Immobilisierung des Substrates führt jedoch häufig, falls keine folgenden

Renaturierungsschritte angewandt werden, zu dessen Denaturierung. Die Detektion der PDI-Substratinteraktion erfolgte anschließend entweder mittels spezifischer Antikörper, oder durch direkte Markierung des PDI-Proteins mit Fluoreszenzfarbstoffen. Letzteres hat den Vorteil eines geringeren Hintergrundsignals. Zudem ist die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen durch Fluoreszenzmarkierung äußerst sensitiv. Die Fluoreszenzmarkierung von PDIs erfolgte mittels Fluoreszenzfarbstoffen mit reaktiver NHS-Ester-Gruppe an die Aminogruppen bzw. N-Termini der Proteine (s. Abschnitt 2.2.2.10.). Statistisch wurde jedes fünfte Protein einfach fluoreszenzmarkiert ("Minimal-Prinzip").

Die Effizienz der Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff ist abhängig von der Größe des jeweiligen Proteins sowie der Anzahl und Zugänglichkeit seiner Lys-Reste. Für die Fluoreszenzmarkierung der unterschiedlichen PDIs wurde jedoch für eine bessere Reproduzierbarkeit stets das gleiche Verhältnis von Protein/Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung ist im Allgemeinen für alle untersuchten PDI-Mitglieder ähnlich (s. Abb. 36).

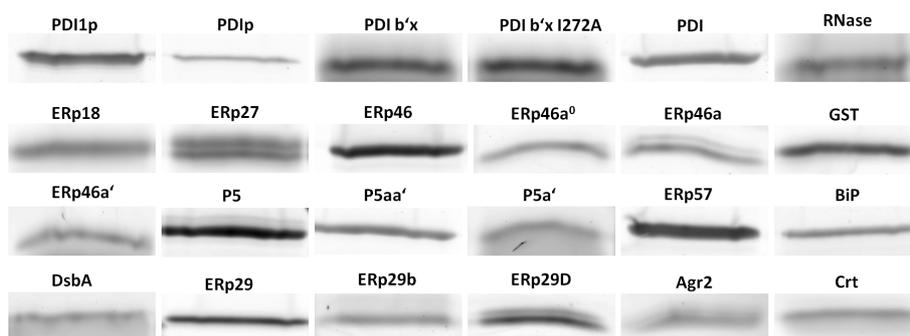


Abbildung 36: Effizienz der Fluoreszenzmarkierung von PDIs. Die verschiedenen PDI-Mitglieder wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert. 1 μ M bzw. 0,5 μ M des markierten Proteins wurden in *Far-Western* Analysen bzw. für *Peptid-Array* Analysen eingesetzt. Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde stets ein Aliquot des jeweiligen fluoreszenzmarkierten PDI-Proteins auf ein SDS-PA aufgetragen und mittels eines *Typhoon Trio* Scanners (GE Healthcare) mit 520 nm (DyLight 488) bzw. 580 nm (Cy3; DyLight 549) Emissionsfiltern gescannt. Die Effizienz der Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff ist abhängig von der Größe und Anzahl der Lys-Reste des Proteins. Die Unterschiede in der Markierungseffizienz zwischen den einzelnen PDI-Mitgliedern sind gering.

Die Unterschiede in der Fluoreszenzmarkierung fallen nicht ins Gewicht, da die Auswertung der Bindungseigenschaften v.a. innerhalb des jeweiligen Proteins vorgenommen wird (s. folgende Abschnitte). Vergleiche der Bindungseigenschaften zwischen den einzelnen PDIs erfolgen immer auf Grundlage von (internen) normierten Werten bzw. Kontrollen. Darüber hinaus erfolgte die Inkubation der fluoreszenzmarkierten PDIs mit den immobilisierten Peptiden bzw. Proteinen unter gesättigten Bedingungen, d.h. mit einem molaren Überschuss an PDI-Protein.

Für folgende Bindungsstudien ist ebenfalls wichtig, dass die Proteineigenschaften durch die Fluoreszenzmarkierung keine signifikante Änderung erfahren. Es konnte gezeigt werden, dass die Kopplung mit Fluoreszenzfarbstoffen zu keiner strukturellen Veränderung der PDIs führt (s. Abb. 80, Anhang). Die Analyse der katalytischen Eigenschaften von fluoreszenzmarkierten PDIs zeigt ebenso keine Änderung (s. Abb. 80, Anhang). Der Fluoreszenzfarbstoff beeinflusst demnach nicht die Protein-Eigenschaften.

3.6.2. Bindung von PDIs an FKBP12.6 und FKBP13

Für ERp29 konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Bindung an immobilisiertes (denaturiertes) FKBP13, nicht jedoch an das Homologe FKBP12.6 erfolgt [24]. Dies ist umso bemerkenswerter als beide Proteine nur geringe Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Die Analyse der Interaktion weiterer Mitglieder der PDI-Familie mit den Modellproteinen FKBP13/12.6, sollte Aufschluss über ein mögliches generelles Bindungsverhalten dieser Proteinklasse geben. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten PDIs immobilisiertes FKBP13 binden, während mit FKBP12.6 nahezu keine Interaktion nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 37).

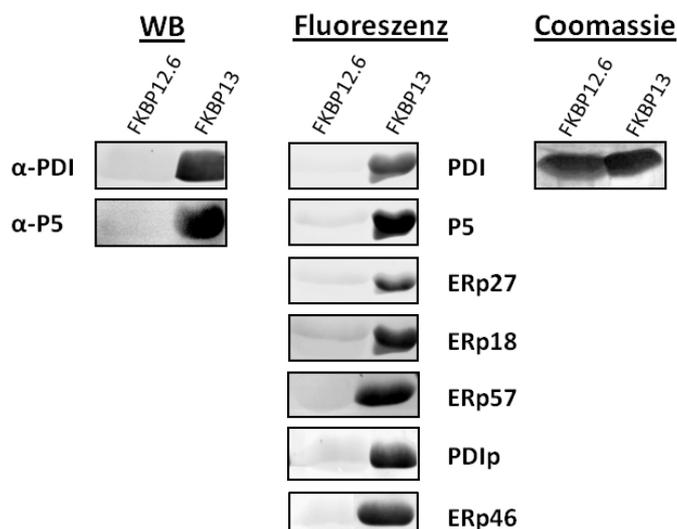


Abbildung 37: Far-Western Analyse der Interaktion von PDIs mit immobilisierten Proteinen. Fluoreszenzmarkierte PDIs binden alle an immobilisiertes (denaturiertes) FKBP13. Dagegen ist nahezu keine Bindung an immobilisiertes FKBP12.6 detektierbar (Mitte). Die Bindungseigenschaft ist unabhängig von dem Fluoreszenzfarbstoff da auch nicht-fluoreszenzmarkierte PDIs (z.B. PDI und P5) an FKBP13 binden, während FKBP12.6 nicht gebunden wird (links). Die Detektion erfolgte in diesem Fall mittels spezifischer Antikörper gegen PDI bzw. P5. Die unterschiedliche Bindung an FKBP13/12.6 kommt nicht durch Unterschiede im Transfer auf die Nitrozellulosemembran zustande. Beide Proteine werden nahezu gleich gut immobilisiert (rechts). Es wurden jeweils ca. 20 µg FKBP13/12.6 auf eine 15 %ige SDS-PA aufgetragen und mittels Western-Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Konzentration der fluoreszenzmarkierten PDIs betrug 1 µM.

Die Interaktion ist spezifisch und wird nicht durch den Fluoreszenzfarbstoff beeinflusst, da fluoreszenzmarkierte RNaseA keine Bindung aufweist. Ebenso bindet auch die fluoreszenzmarkierte **D**-Domäne von ERp29 weder FKBP12.6 noch FKBP13 [24]. Darüber hinaus lässt sich ein nahezu identisches Bindungsverhalten für nicht-fluoreszenzmarkiertes PDI und P5 auch mittels spezifischer Antikörper nachweisen (s. Abb. 37). Die Unterschiede in der Bindung an FKBP13/12.6 treten auch nicht auf Grund unterschiedlicher Immobilisierung der jeweiligen Proteine auf (s. Abb. 37).

Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die Bindung von PDIs an FKBP13, nicht aber an FKBP12.6, eine charakteristische Eigenschaft aller PDI-Familienmitglieder ist. Ein Nachweis der Bindung von PDIs an natives FKBP13 in Lösung mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) scheiterte jedoch, wahrscheinlich auf Grund der geringen Bindungsaffinitäten (Daten nicht gezeigt).

3.6.3. Modulierung der Proteininteraktion durch Tyr-haltige Peptide

Aus vorangegangenen Bindungsstudien mit ERp29 war bekannt, dass dessen Bindung bevorzugt an Peptide mit aromatischen Resten sowie basischem Charakter erfolgt [24]. Es sollte nunmehr untersucht werden, ob diese Bindungseigenschaft auch für weitere Mitglieder der PDI-Familie zutrifft und ob dadurch zwischen der Bindung an FKBP13/12.6 diskriminiert wird. Dazu wurde ein basisches Peptid mit Tyr-Resten an immobilisiertes FKBP12.6 mittels *cross-linking* kovalent verknüpft (s. Abschnitt 2.2.2.9.). Als Kontrolle diente ein entsprechendes Peptid, in denen die Tyr-Reste mit Ala-Resten substituiert wurden.

Wie gezeigt werden konnte, ermöglicht die kovalente Bindung des Tyr-enthaltenden Peptids auf der Oberfläche von FKBP12.6 die Interaktion mit PDIs. Auf der anderen Seite führt das *cross-linking* mit dem Ala-enthaltenden basischen Kontrollpeptid zu keiner signifikanten Bindung durch PDIs (s. Abb. 38).

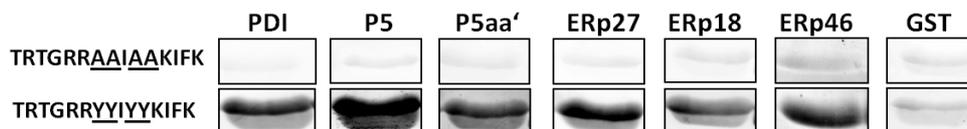


Abbildung 38: Bindung von PDIs an Peptide mit Tyr-Resten. Die kovalente Verknüpfung des TRTGRRYYIYYKIFK-Peptids an FKBP12.6 mittels *cross-linking* führt zur Bindung durch PDIs. Die Verknüpfung mit dem TRTGRRAAIAAKIFK-Kontroll-Peptid hat jedoch nahezu keine Bindung zur Folge. Es wurden ca. 20 µg FKBP12.6 auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und mit 10 µM Peptid sowie 5 mM *cross-linker* inkubiert. Die Detektion der gebundenen PDIs erfolgte mittels Fluoreszenz. GST diente als Kontrolle. Es zeigt keine signifikant verstärkte Bindung an FKBP12.6 nach Verknüpfung mit Tyr-haltigen Peptiden. PDIs ohne **b**-Domäne zeigen zudem eine schwächere Bindung. Verwendet wurden jeweils 1 µM fluoreszenzmarkiertes PDI-Protein bzw. GST.

Es kann somit angenommen werden, dass aromatische Aminosäuren, v.a. aber Tyr-Reste, bei der Interaktion von PDIs mit ihren Substraten eine wichtige Rolle spielen. Der reine hydrophobe Charakter reicht auf der anderen Seite nicht als determinierendes Bindungsmerkmal aus. Auf dieser Grundlage, und zur genaueren Charakterisierung des Bindungsmotives, wurden im Folgenden Interaktionsstudien mittels Peptid-Arrays durchgeführt (s. Abschnitt 3.7.).

3.6.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Proteininteraktion

Es ist bekannt, dass *in vitro* die katalytische Aktivität von PDIs in hohem Maße vom pH-Wert des umgeben Milieus abhängt [65]. Es sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob auch die Substrat-Bindungseigenschaften von PDIs vom pH-Wert beeinflusst werden. Mit Hilfe der *Far-Western* Methodik konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PDIs mit immobilisiertem FKBP13 durch den pH-Wert des Puffers während der Inkubation beeinflusst wird (s. Abb. 39).

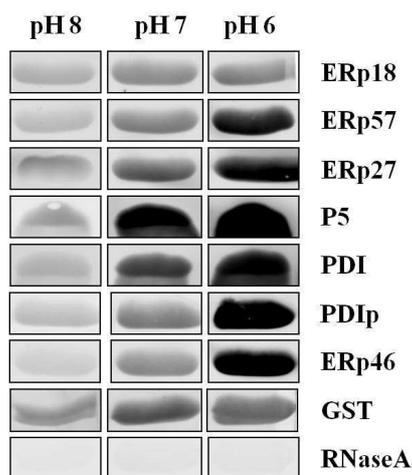


Abbildung 39: Einfluss des pH-Wertes auf die PDI-Substratinteraktion. Die Bindung von fluoreszenzmarkierten PDIs an immobilisiertes FKBP13 wurde bei pH-Werten von 6-8 mittels *Far-Western* Analyse untersucht. Während ERp18 nahezu keine pH-Abhängigkeit zeigt, binden ERp46 und die übrigen PDIs bevorzugt unter sauren Bedingungen. Die Bindung kommt nicht durch den Fluoreszenzfarbstoff selbst zu Stande, da fluoreszenzmarkierte RNase A nicht bindet (Negativkontrolle). Die bevorzugte Bindung an Substrate unter sauren Bedingungen scheint zudem ein charakteristisches Merkmal von Mitgliedern der PDI-Familie zu sein, da die Protein-Interaktion von GST keine pH-Abhängigkeit zeigt (Positivkontrolle). Verwendet wurden jeweils 1 μ M fluoreszenzmarkiertes PDI-Protein bzw. RNase A und GST.

Darüber hinaus ist die pH-Abhängigkeit der Proteininteraktion für die unterschiedlichen PDIs verschieden. Während der Einfluss des pH-Wertes bei der Proteinbindung für ERp18 nur sehr gering ist, zeigen andere PDIs, wie beispielsweise ERp57, PDI, P5 und PDIp eine stärkere pH-Abhängigkeit ihrer Proteinbindungseigenschaften (s. Abb. 39). In allen Fällen wird die

Interaktion durch einen niedrigeren pH-Wert verstärkt. Am deutlichsten tritt dieser Effekt bei ERp46 auf. Hier erfolgt die Bindung bei pH 6 am stärksten.

Der Einfluss des isoelektrischen Punktes (pI) des jeweiligen Proteins scheint nur gering. Obwohl alle PDIs i.R. einen sauren pI besitzen (s. Tabelle. 7, Anhang), ist die pH-Abhängigkeit ihrer Proteinbindung verschieden. Auch der Fluoreszenzfarbstoff hat keinen Einfluss auf die Substratinteraktion, da die Proteineigenschaften kaum beeinflusst werden (s. Abb. 80, Anhang). Der Fluoreszenzfarbstoff ist darüber hinaus für längere Zeit im pH-Bereich 6-8 stabil. Die pH-Abhängigkeit der Substratbindung von nicht fluoreszenzmarkierten PDIs konnte z.T. auch durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Alle Membranen wurden zudem vor der Messung des Fluoreszenzsignals mit TBS (pH 8) gewaschen, so dass eine pH-Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen werden kann. Obgleich verdeutlicht dies die Irreversibilität der Interaktion von PDIs mit immobilisierten (denaturierten) Substraten. Die Proteine sind darüber hinaus in dem für die Bindungsstudien verwendeten pH-Wert stabil (Daten nicht gezeigt). Sie zeigen in diesem pH-Bereich ebenfalls ihre charakteristischen katalytischen Eigenschaften [65].

Der pH-Wert von ca. 6-8 bewegt sich im Bereich der physiologischen Grenzen und stellt deshalb keine extreme Veränderung des Reaktionsraumes für Proteine dar. Auch der Protonierungsgrad der einzelnen geladenen Aminosäurereste innerhalb des Proteins wird in diesem pH-Bereich nicht signifikant beeinflusst. Am ehesten wird der Protonierungsgrad von His-Resten beeinflusst. Diese sind bei pH 6, im Gegensatz zu pH 8, positiv geladen. Der N-terminale (His)₆-tag der rekombinanten Proteine spielt bei dem beobachteten Effekt keine Rolle, da ERp18 ebenfalls einen (His)₆-tag enthält, während P5 keinen (His)₆-tag besitzt.

Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass nicht nur die katalytische Aktivität von PDIs, sondern auch deren Substratinteraktion (und evtl. Chaperon-Aktivität) durch den pH-Wert des umgebenden Reaktionsraumes bestimmt wird.

3.6.5. Einfluss des konservierten Trp-Restes auf die Proteininteraktion

Aus früheren Mutationsanalysen war bekannt, dass der konservierte Trp-Rest in unmittelbarer Nachbarschaft zum CXXC-Motiv einen signifikanten Einfluss auf die katalytische Aktivität von Thioredoxin und PDI besitzt [85, 239, 240]. Auf Grundlage der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen strukturellen Ergebnisse der C-terminalen katalytischen Domäne von ERp46 (s. Abschnitt 3.5.4.2.), sollte der Einfluss des konservierten Trp auf die Interaktion mit immobilisierten Proteinen näher untersucht werden.

Für die PDIIa-Domäne konnte gezeigt werden, dass die Substitution des konservierten Trp-Restes mit Ala die Interaktion mit immobilisierter RNaseA um ca. 60 % reduziert (s. Abb. 40). Die PDIIa-Domäne zeigt 22 % der Proteininteraktion des Wildtyp-Proteins, während die PDIIaW35A-Variante nur 9 % der Proteinbindung von PDI zeigt. Die Ergebnisse der *Far-Western* Analyse deuten demnach auf eine Beteiligung des konservierten Trp bei der Interaktion der katalytischen Domänen mit (denaturierten) Proteinen hin. Darüber hinaus zeigt die isolierte PDIIa-Domäne im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine deutlich geringere Proteinbindung, was auf einen Aviditäts-Effekt der einzelnen Domänen bei der Protein-Interaktion hindeutet (vgl. Abschnitt 3.7.1.).

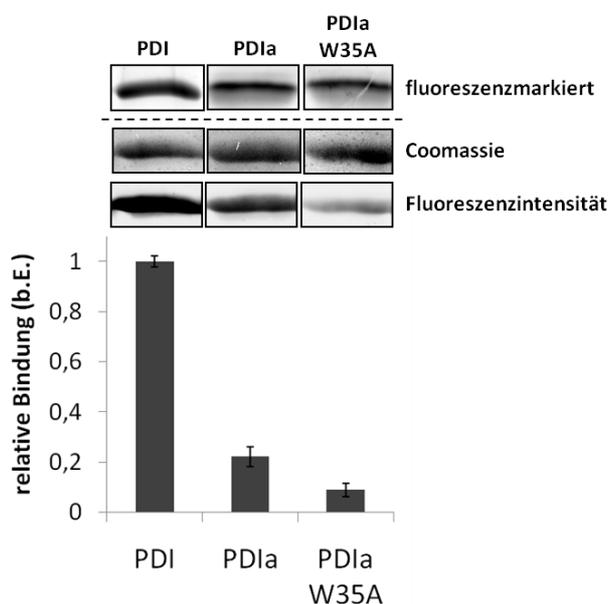


Abbildung 40: Einfluss des konservierten Trp-Restes auf die Interaktion mit immobilisiertem Protein. 1 μ M fluoreszenzmarkiertes PDI, PDIIa und PDIIaW35A wurden mit 5, 10 und 20 μ g auf immobilisierter RNaseA inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proteine wurde densitometrisch ausgewertet und auf die Signalintensität von PDI normiert (mit 1 festgelegt). Die isolierte **a**-Domäne von PDI zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine deutlich reduzierte Proteininteraktion. Die Interaktion der PDIIaW35A-Variante mit immobilisierter RNaseA ist im Vergleich zu PDIIa um ca. 60 % reduziert. Dies weist auf eine Beteiligung des konservierten Trp-Restes bei der Interaktion mit (denaturierten) Proteinen hin. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei unterschiedlichen RNaseA-Konzentrationen an. Die Immobilisierung bzw. der elektrophoretische Transfer der RNaseA auf die Nitrocellulosemembran erfolgte nahezu identisch (Coomassie). Alle drei Proteine waren zudem ähnlich fluoreszenzmarkiert. Die Abb. zeigt jeweils die 10 μ g Protein-Bande.

3.7. Peptid-Bindungsstudien (Peptid-Array Analyse)

3.7.1. Statistische Auswertung der Peptid-Bindungs Kapazität

Für einige wenige PDI-Familienmitglieder konnte gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden besitzen (s. Tabelle 6, Anhang); [3, 241]. Die Analyse der Bindung an Peptide kann als vereinfachtes Modell zur Untersuchung der Substratinteraktion angesehen werden. Bisherige Untersuchungen zur Peptid-

Bindungsselektivität erfolgten mit einer limitierten Anzahl an Modell-Peptiden über *cross-linking* Experimente. Umfassende und vergleichende Analysen der Peptid-Bindungsselektivität von mehreren Mitgliedern der PDI-Familie liegen bisher nicht vor. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die selektive Bindung von 8 fluoreszenzmarkierten, humanen PDIs sowie PDI1p (Hefe-PDI) und DsbA an mehrere tausend Peptide mittels der Peptid-Array Methodik untersucht (s. Abschnitt 2.2.8.2.). Damit sollten Rückschlüsse auf die Substratbindungsspezifität gezogen werden.

PDI und andere ER-Chaperone besitzen die Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden [14, 26, 83]. Es konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Array Methodik zur Analyse der Interaktion mit Peptiden geeignet ist. Fluoreszenzmarkiertes PDI sowie die ER-Chaperone BiP und Calreticulin interagieren mit einer großen Anzahl an immobilisierten Peptiden (s. Abb. 41). Diese Interaktion ist spezifisch für ER-Chaperone, da die verwendeten Kontroll-Proteine (RNaseA und GST) keine, oder nur eine geringe Peptid-Bindung zeigen.

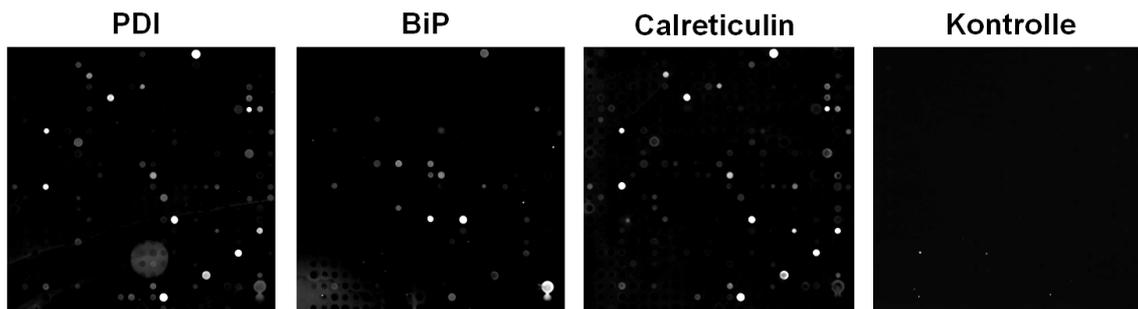


Abbildung 41: Peptid-Bindungseigenschaften von ER-Chaperonen. Neben PDI weisen auch die andere ER-Chaperone BiP und Calreticulin signifikante Peptid-Bindungskapazitäten auf. Die Abbildung zeigt qualitativ einen identischen Ausschnitt der Signalintensitäten der fluoreszenzmarkierten ER-Chaperone an gebundene Peptide. Es bestehen signifikante Unterschiede im Bindungsmuster sowie in der Bindungsaffinität. Als Kontrolle wurde fluoreszenzmarkierte RNaseA eingesetzt. Die Proteinkonzentration während der Inkubation betrug 0,5 μ M. Verwendet wurde ein kommerzieller Peptid-Array mit ca. 9.000 Peptiden aus humanen krankheitsassoziierten Proteinen.

Ogleich das Peptid-Bindungsmuster der verschiedenen PDI-Familienmitglieder sehr ähnlich erscheint, lieferte die statistische Analyse signifikante Unterschiede hinsichtlich der Peptid-Bindungseigenschaften zwischen den einzelnen PDIs. Die Bindung der PDIs an die immobilisierten Peptide erfolgt äußerst selektiv. Nur ein geringer Bruchteil der auf dem Peptid-Array vorhandenen Peptide wird auch tatsächlich gebunden. An den Großteil der Peptide findet dagegen keine Bindung statt. Die Peptid-Interaktion erfolgte stets unter sättigenden Bedingungen, d.h. mit einem molaren Überschuss an fluoreszenzmarkierten PDIs im Vergleich zur molaren Konzentration der immobilisierten Peptide.

Nach Abzug des Hintergrundsignals kann aus den normierten Fluoreszenzintensitäten die relative Anzahl an gebundenen Peptiden bestimmt werden (s. Abb. 42). Danach binden die untersuchten PDIs durchschnittlich nur ca. 12 % aller vorhandenen Peptide. Die PDI-Familienmitglieder ERp29, PDI und P5 liegen mit jeweils 20 %, 17 % bzw. 14 % gebundener Peptide über dem Durchschnitt und zeigen damit die größte Peptid-Bindungskapazität. Die übrigen PDIs verfügen dagegen über eine geringere Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden. Die geringste Peptid-Bindungskapazität zeigt ERp57 mit nur ca. 7 % aller gebundenen Peptide (s. Abb. 42).

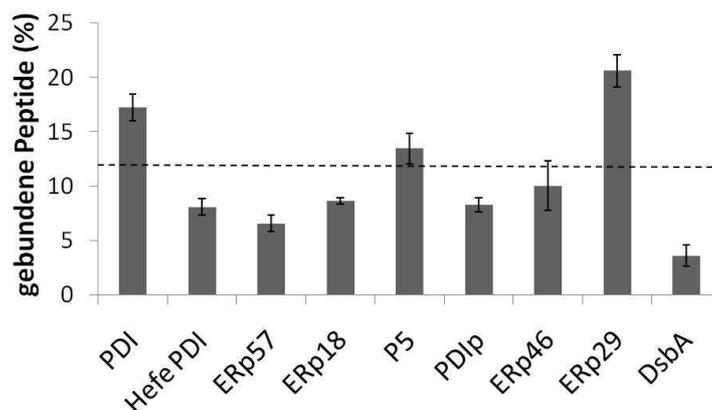


Abbildung 42: Peptid-Bindungskapazität von PDIs. Die Signalstärken der einzelnen Peptide wurden jeweils vom Hintergrundsignal abgezogen und auf die durchschnittliche Signalintensität der leeren (nicht gebundenen) *spots* normiert (s. Tabelle 9, Anhang). Die normierten Signalintensitäten wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn ihr Wert mindestens um den Faktor N über dem Hintergrundsignal lag. Als N wurde das Dreifache der Standardabweichung des Hintergrundsignals festgelegt. Die Peptid-Bindungskapazität der einzelnen PDIs wurde aus dem prozentualen Anteil der jeweils gebundenen Peptide aus dem gesamten Peptid-*pool* (6.754 unterschiedliche Peptide) berechnet. Durchschnittlich wurden ca. 12 % aller auf dem *Array* vorhandenen Peptide gebunden (gestrichelte Linie). ERp29, PDI und P5 zeigen eine überdurchschnittlich hohe Peptid-Bindungskapazität. ERp57 zeigt mit ca. 7 % gebundener Peptide die niedrigste Peptid-Bindungskapazität aller humanen PDIs. Die Peptid-Bindungskapazität der *E. coli* Oxidoreduktase DsbA ist mit ca. 4 % gebundener Peptide signifikant niedriger. RNaseA und GST, welche als Negativkontrollen gewählt wurden, zeigten ebenfalls eine sehr niedrige Peptid-Bindungskapazität (s. Abb. 41). Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen i.R. 0,5 μM fluoreszenzmarkiertes PDI-Protein. Hefe PDI und ERp29 wurden mit einer Konzentration von 0,05 μM eingesetzt. Die Konzentration von ERp46 und DsbA betrug 0,1 μM . Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung aus drei Replikaten ($n=3$) an.

Die unterschiedliche Fähigkeit von PDIs zur Bindung von Peptiden lässt damit indirekt Rückschlüsse auf die Größe ihres Substratspektrums zu. Die Unterschiede in den Peptid-Bindungseigenschaften der einzelnen PDIs resultieren vermutlich direkt aus dem unterschiedlichen Domänen-Aufbau sowie aus den molekularen Eigenschaften der Substratbindungsstellen. Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen erstmals, dass ERp57 zwar die geringste Peptid-Bindungskapazität aller untersuchten PDI-Familienmitglieder aufweist, aber trotzdem generell zur Peptid-Bindung befähigt ist. Eine Interaktion von ERp57 mit Crt/Cnx wird für dessen Interaktion mit Peptiden *per se* nicht benötigt. Interessanterweise zeigt auch

PDIp im Vergleich zu PDI, trotz der strukturellen Ähnlichkeit mit ca. 8 % gebundener Peptide eine geringere Peptid-Bindungskapazität. Signifikante Unterschiede in der Peptid-Bindung bestehen auch zwischen PDI und PDI1p (Hefe PDI), obgleich die Eigenschaften von Hefe PDI in früheren Studien häufig als Modell für PDI aus Säugern herangezogen wurden. Die Oxidoreduktase DsbA aus *E. coli* bindet ca. 4 % aller vorhandenen Peptide und verfügt damit, verglichen mit den meisten eukaryotischen PDIs, über eine äußerst geringe Peptid-Bindungskapazität. Das aus einer einzigen **a**-Domäne aufgebaute PDI-Familienmitglied ERp18 zeigt mit ca. 9 % gebundener Peptide ebenfalls eine relativ geringe Peptid-Bindungskapazität. Als Negativkontrolle für die Peptid-Bindungsstudien wurde fluoreszenzmarkierte RNaseA gewählt. Hierbei ist jedoch nahezu keine Interaktion mit Peptiden nachweisbar und die Signalstärken sind sehr gering (vgl. Abb. 41). Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen jedoch die Tatsache, dass die Fähigkeit zur Peptid-Bindung scheinbar eine allgemeine Eigenschaft aller untersuchten Proteine mit Trx-ähnlichen Domänen darstellt. Obwohl die einzelnen PDIs im Durchschnitt nur ca. 12 % aller vorhandenen Peptide binden, interagiert die Gesamtheit aller untersuchten PDIs (*PDI-pool*) mit ca. 40 % aller auf dem Peptid-Array enthaltenen Peptide (Daten nicht gezeigt).

Der direkte Vergleich des Beitrages der einzelnen Domänen eines PDI-Proteins zu dessen Peptid-Bindungskapazität zeigt deutliche Unterschiede (s. Abb. 43). Beispielsweise interagiert die einzelne **a'**-Domäne von P5 nur mit einer geringen Anzahl an Peptiden. Auf der anderen Seite binden beide redox-aktiven Domänen des P5**aa'**-Konstruktes nahezu die gleiche Anzahl an Peptiden wie das Wildtyp-Protein. Die C-terminale Domäne von P5 beeinflusst demnach nicht die Peptid-Bindungskapazität. Im Gegensatz zur reinen katalytischen Aktivität reicht die einzelne redox-aktive Domäne von P5 vermutlich nicht für die Interaktion mit dem vollen Substratspektrum des Wildtyp-Proteins aus. Das **b'x**-Fragment von PDI bindet immerhin ca. 70 % der Anzahl der Peptide des Wildtyp-Proteins. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass die PDI**b'**-Domäne die wichtigste Substratbindungsstelle enthält [83]. Neben der PDI**b'**-Domäne sind jedoch auch die katalytischen Domänen für die Interaktion von PDI mit seinem gesamten Peptid-*pool* essentiell. Die **b**-Domäne von ERp29 zeigt ca. 40 % der Bindungskapazität des Wildtyp-Proteins. Die ERp29**b**-Domäne enthält vermutlich eine essentielle Substratbindungsstelle (vgl. [24, 136]). Die isolierte **D**-Domäne interagiert dagegen nur mit einer geringen Anzahl an Peptiden, ist jedoch im Kontext des Wildtyp-Proteins vermutlich an der Peptid-Interaktion beteiligt. Die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 besitzen im Vergleich zum Wildtyp-Protein ebenfalls eine verringerte Peptid-Bindungskapazität. Die einzelne ERp46**a**-Domäne zeigt allerdings mit ca. 40 % der

Anzahl der gebundenen Peptide des Wildtyp-Proteins eine signifikant größere Peptid-Bindungskapazität als die **a**⁰- und **a**'-Domäne (s. Abb. 43).

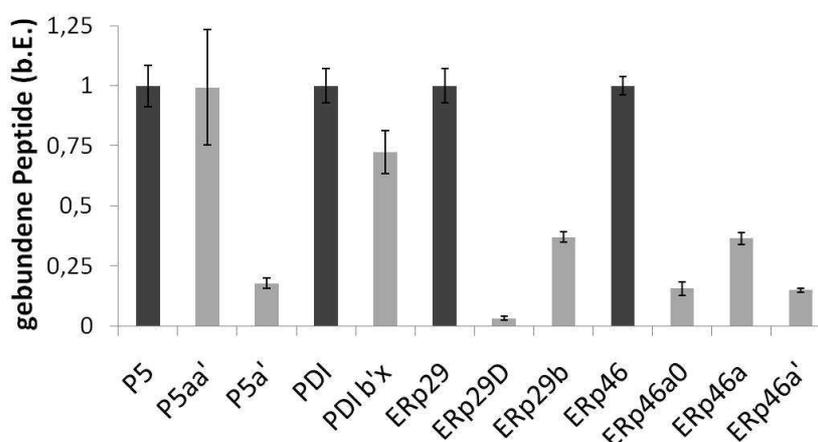


Abbildung 43: Beitrag individueller Domänen zur Peptid-Bindungskapazität. Gezeigt sind die relativen Peptid-Bindungskapazitäten von PDIs und ihren isolierten Domänen. Die einzelnen Domänen bzw. Fragmente von PDI, ERp46, P5 und ERp29 tragen in unterschiedlichem Maße zur Peptid-Bindungskapazität bei. Das P5aa'-Fragment bindet nahezu die gleiche Anzahl an Peptiden wie das Wildtyp-Protein. Die PDIb'x-Domäne bindet ca. 70 % der Peptid-Anzahl des Wildtyp-Proteins. Die ERp29b-Domäne bindet ca. 40 % der Peptid-Anzahl des Wildtyp-Proteins. Die isolierte **D**-Domäne von ERp29 interagiert dagegen nur mit einer sehr geringen Anzahl an Peptiden. Im Vergleich zum ERp46-Wildtyp Protein interagieren die isolierten katalytischen Domänen mit einer signifikant niedrigeren Anzahl an Peptiden. Es kann geschlossen werden, dass die einzelnen Domänen von PDIs kumulativ bei der Peptid-Bindung beteiligt sind und somit einen Aviditäts-Effekt zeigen. Die Anzahl der gebundenen Peptide der individuellen Domänen (graue Balken) wurde auf die Anzahl der gebundenen Peptide des jeweiligen Wildtyp-Proteins (schwarze Balken; mit 1 festgelegt) normiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3).

Es kann geschlossen werden, dass die effiziente Bindung von PDIs an Peptide (und Proteine) kumulative Interaktionen der einzelnen Trx-ähnlichen Domänen erfordert (Aviditäts-Effekt). Es konnte erstmals gezeigt werden, dass neben der **b**'-Domäne auch die isolierten katalytischen Domänen zur Interaktion mit Peptiden fähig sind. Entgegen früheren Annahmen ist für die Peptid-Interaktion die **b**'-Domäne *per se* nicht essentiell [81, 83]. Die relativen Bindungskapazitäten der einzelnen Domänen der verschiedenen PDIs sagen allerdings nichts über deren Beitrag zur Peptid-Bindungsselektivität aus.

Das PDIb'x-Fragment besitzt durch das Fehlen der übrigen Domänen eine signifikant geringere Peptid-Bindungskapazität als das Wildtyp-Protein (s. Abb. 43). Wider Erwarten ist die Peptid-Bindungskapazität von **b**'x trotzdem relativ hoch und auch die **b**'x I272A Mutante zeigt nur eine wenig niedrigere Peptid-Bindungskapazität (Daten nicht gezeigt). Der **x-linker** vermag demnach kaum die Bindung an die immobilisierten Peptide zu unterbinden. Vermutlich liegt ein Gleichgewicht zwischen **x-linker** gebundener und freier Substratbindungstasche vor (vgl. [87] und [232]). Die freie Substratbindungstasche kann an

das immobilisierte Peptid binden und wird dadurch aus der Lösung (und damit aus dem Gleichgewicht) entfernt.

Die einzelnen ER-Chaperone beeinflussen zudem ihre jeweiligen Peptid-Bindungskapazitäten gegenseitig. Wie gezeigt werden konnte, verringert die gemeinsame Inkubation von ERp57 mit Calreticulin dessen Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden (s. Abb. 44). Als mögliche Ursache können kompetitierende Effekte zwischen den Peptid-Bindungseigenschaften der beiden Proteine angesehen werden. Auch eine Inhibierung der Peptid-Bindung von ERp57 durch direkte Interaktion mit Calreticulin ist denkbar. Nach diesem Modell würden die Peptid- sowie Calreticulin-Interaktionsstellen innerhalb von ERp57 z.T. überlappen. Ein vergleichbarer Effekt mit dem ER-Chaperon BiP konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

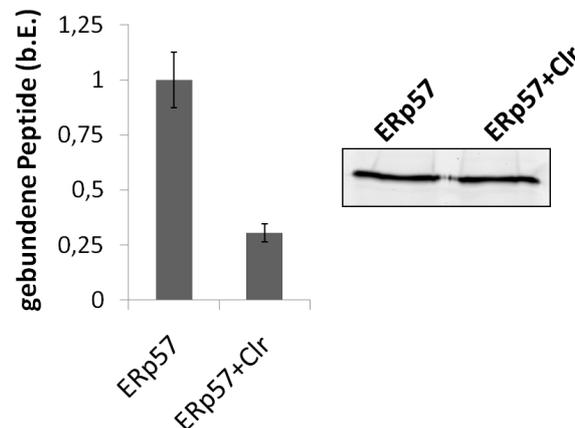


Abbildung 44: Einfluss der gemeinsamen Inkubation von ERp57 und Calreticulin auf die Peptid-Bindungskapazität. Die gemeinsame Inkubation von fluoreszenzmarkiertem ERp57 und nicht markiertem Crt hat einen negativen Effekt auf die Fähigkeit von ERp57 zur Interaktion mit Peptiden (Diagramm links). Der Grund hierfür liegt vermutlich in kompetitierenden Effekten bzw. in der Bildung des ERp57-Crt-Komplexes. Mittels spezifischer α -Crt Antikörper konnten zudem geringe Mengen an Peptid-gebundenem Crt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eingesetzt wurden jeweils 0,2 μ M ERp57 bzw. Crt. Die Fluoreszenzmarkierung von ERp57 in beiden Ansätzen ist identisch (Abb. rechts). Normiert wurde auf die Anzahl an gebundenen Peptiden von ERp57 ohne Crt (mit 1 festgelegt). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3).

3.7.2. Statistische Auswertung der Peptid-Bindungsselektivität

Neben der relativ unspezifischen Bestimmung der Peptid-Bindungskapazitäten der unterschiedlichen PDI-Familienmitglieder, sollten auch deren Peptid-Bindungsselektivitäten näher untersucht werden. Die statistische Auswertung des Aminosäure-pools aller gebundenen Peptide zeigt allgemein eine signifikante Anreicherung von aromatischen Aminosäuren (s. Abb. 45). Die bevorzugte Bindung von Aminosäuren mit aromatischem Charakter erfolgt spezifisch, da aliphatische Aminosäuren mit hydrophoben Resten nur in geringem Maße angereichert sind.

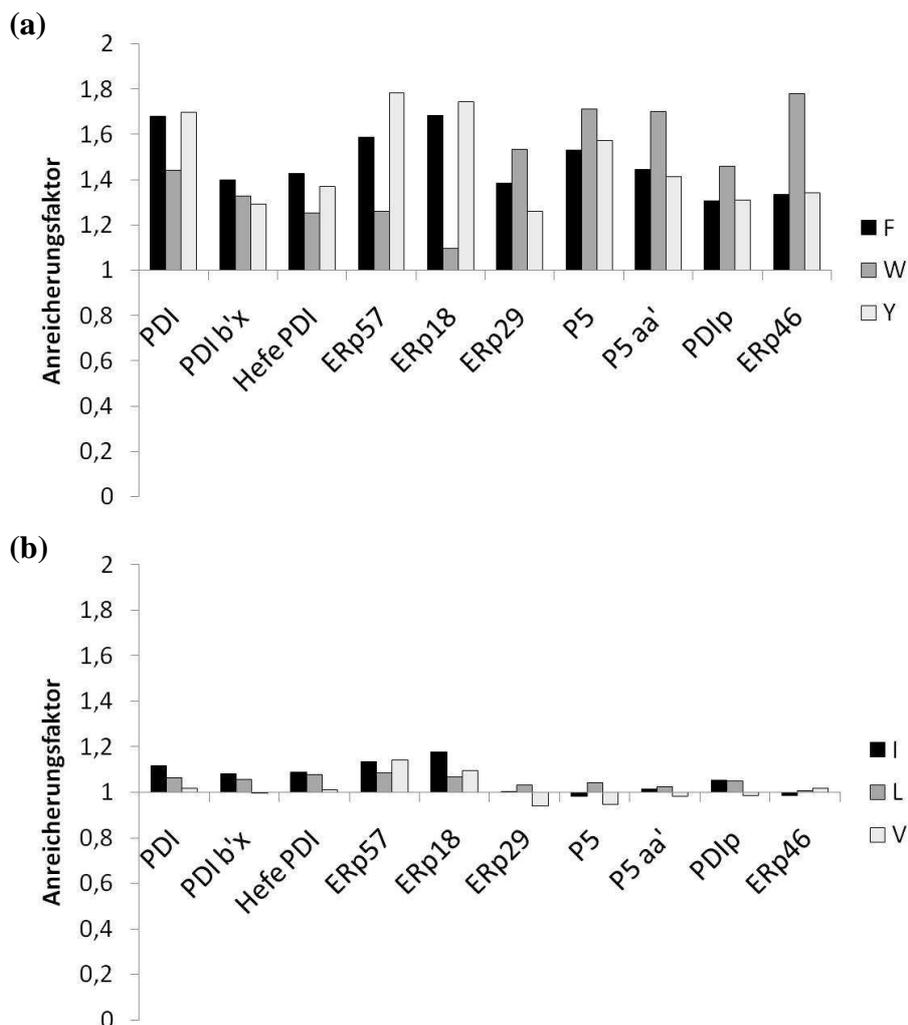


Abbildung 45: Bindung an Peptide mit hydrophoben und aromatischen Aminosäuren. Die von den unterschiedlichen PDIs gebundenen Peptide enthalten bevorzugt Aminosäuren mit aromatischen Resten (a). Die bevorzugte Interaktion mit Peptiden mit aromatischen Resten ist ein spezifischer Effekt, da Peptide mit länger-kettigen aliphatischen Resten kaum bevorzugt gebunden werden (b). Die untersuchten PDI-Familienmitglieder zeigen zudem eine unterschiedliche Präferenz für die einzelnen aromatischen Reste. Der Anreicherungsfaktor berechnet sich aus dem Anteil der gebundenen Peptide mit den jeweiligen Aminosäuren im Verhältnis zum Anteil der Peptide mit den jeweiligen Aminosäuren des gesamten Peptid-pools (im Folgenden mit 1 festgelegt; ein Anreicherungsfaktor von 1 bedeutet keine Präferenz für die jeweilige Aminosäure). Die Aminosäuren sind in der Legende in der Einbuchstaben-Abkürzung angegeben.

Wie aus Abb. 45 ersichtlich wird, bestehen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen aromatischen Aminosäuren, nicht nur bei einem einzelnen PDI-Protein, sondern auch zwischen den verschiedenen PDI-Familienmitgliedern. Während PDI Peptide mit Tyr und Phe mit annähernd gleicher Präferenz bindet, werden Peptide mit Trp weniger stark bevorzugt. Die Spezifität für Phe und v.a. Tyr liegt hierbei vermutlich nicht in der PDI b'-Domäne begründet. Das b'x-Fragment bindet Peptide mit allen drei aromatischen Aminosäuren mit annähernd gleicher Präferenz. PDI aus der Hefe zeigt eine ähnliche Verteilung seiner Präferenz für aromatische Aminosäuren wie PDI. Dagegen ist die Präferenz

für Peptide mit Trp für Erp57 und v.a. Erp18 viel geringer ausgeprägt. Erp18 bindet Peptide nahezu unabhängig von der Anwesenheit von Trp. Die putative **b**-Domäne von P5 hat, verglichen mit dem Wildtyp-Protein, nur einen geringen Effekt auf die Präferenz für aromatische Aminosäuren. Auf der anderen Seite binden sowohl P5 als auch Erp29, PDIp und am deutlichsten Erp46 bevorzugt Peptide mit Trp-Resten. Vergleicht man die Präferenz für Peptide mit den länger-kettigen aliphatischen und hydrophoben Aminosäuren, so fällt auf, dass diese kaum im gebundenen Peptid-*pool* angereichert sind. Lediglich ERp57 und Erp18 zeigen im Vergleich zu den restlichen PDI-Mitgliedern eine signifikant höhere Präferenz für Peptide mit Ile, Leu und Val (s. Abb. 45). Vergleicht man die Ladung der gebundenen Peptide, so ist mit Ausnahme von ERp29, eine präferentielle Bindung an positiv geladene Peptide zu erkennen (s. Abb. 46). Alle untersuchten PDIs zeigen zudem eine deutliche Präferenz für Peptide, welche Arg- und His-Reste enthalten (s. Abb. 47).

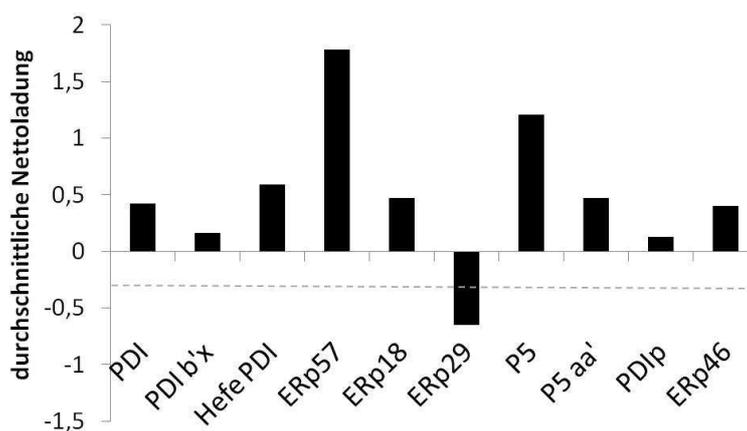


Abbildung 46: Ladung der von PDIs gebundenen Peptide. Angegeben ist die durchschnittliche Nettoladung der durch die verschiedenen PDIs gebundenen Peptide. Allgemein werden Peptide mit einer positiven Nettoladung gebunden. Insbesondere ERp57 und auch P5 binden hauptsächlich Peptide mit einer positiven Ladung. Dagegen interagiert ERp29 auch mit Peptiden mit einer durchschnittlich negativen Nettoladung. Die gestrichelte Linie gibt die durchschnittliche Nettoladung aller auf dem Peptid-Array vorhandenen Peptide an.

Eine Analyse der Ladung der zu den aromatischen Aminosäuren direkt benachbarten Reste zeigt eine Präferenz von positiv geladenen Resten für alle untersuchten PDIs (s. Abb. 47). Ausnahmen bilden ERp29 und in geringerem Maße auch PDI, ERp18 und P5. Diese PDI-Familienmitglieder binden auch präferentiell an Peptide mit aromatischen Aminosäuren, welche als benachbarte Reste negativ geladene Aminosäuren enthalten (s. Abb. 47). In allen Fällen wird jedoch Arg als direkt benachbarte Aminosäure favorisiert. Das PDIb'x-Fragment zeigt im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nahezu keine Präferenz für Peptide mit aromatischen Aminosäuren mit benachbarter negativer Ladung. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die PDIb'-Domäne v.a. die Bindungsspezifität für aromatische Aminosäuren

bestimmt, während die übrigen Domänen einen Ladungseffekt bei der Peptid-Interaktion zeigen. Ein gemeinsamer Beitrag der einzelnen Domänen für die Peptid-Bindungsselektivität ist wahrscheinlich. Dieser Effekt ist für P5 und das aa'-Fragment weniger stark ausgeprägt (s. Abb. 47). Im Gegensatz dazu zeigen die übrigen PDIs fast ausschließlich eine Präferenz für aromatische Aminosäuren mit positiv geladenen benachbarten Resten. Am stärksten ist dieser Effekt für ERp57 ausgeprägt. ERp57 bindet nahezu ausschließlich an positiv geladene Peptide. Im Unterschied zu PDI zeigen Hefe PDI sowie PDIp nahezu keine Präferenz für aromatische Aminosäuren mit benachbarten negativ geladenen Resten (vgl. [95]).

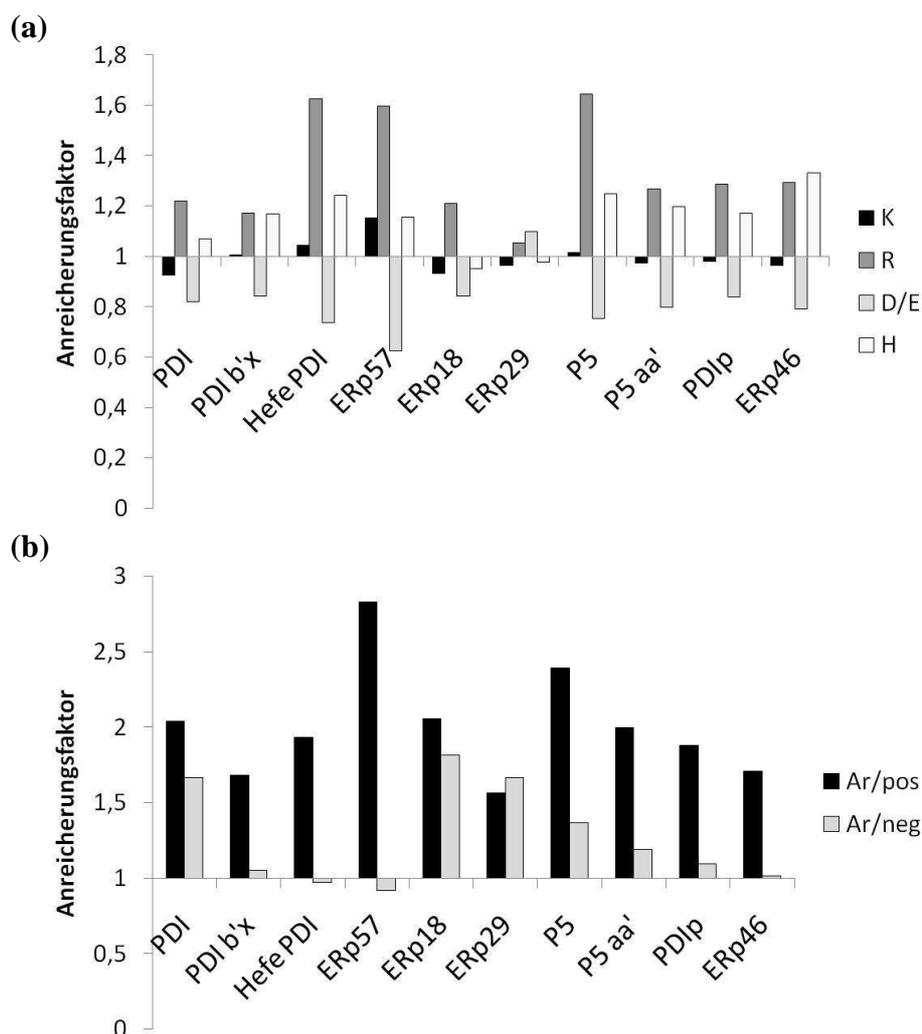


Abbildung 47: Einfluss der Aminosäureladung auf die Interaktion mit Peptiden. Alle untersuchten PDIs binden präferentiell an Peptide mit positiv geladenen Resten. Peptide mit negativ geladenen Aminosäuren werden dagegen nicht bevorzugt (a). Lediglich ERp29 zeigt eine geringe Präferenz für negativ geladene Aminosäuren. Darüber hinaus ist eine deutliche Präferenz für Peptide mit Arg und His erkennbar. Die Analyse der zu den aromatischen Aminosäuren (Ar) direkt benachbarten Reste zeigt, dass positive Aminosäuren (pos) allgemein bevorzugt werden (b). ERp57 bindet fast ausschließlich positiv geladene Peptide sowie Peptide mit aromatischen Resten, denen positiv geladene Aminosäuren benachbart sind. ERp29, PDI und ERp18 zeigen dagegen auch eine Präferenz für Peptide mit aromatischen Aminosäuren mit benachbarten negativ geladenen Resten (neg). Das PDIB'x-Fragment zeigt im Vergleich zum Wildtyp-Protein nahezu keine Präferenz für aromatische Aminosäuren mit benachbarten sauren Reste. Im Gegensatz zu PDI binden auch Hefe PDI sowie PDIp nicht an Peptide, denen zur aromatischen Aminosäure negativ geladene Reste benachbart sind.

Eine nähere Untersuchung der zu den aromatischen Aminosäuren benachbarten Reste zeigt einen differentiellen Einfluss auf die Präferenz der Peptid-Bindung (s. Abb. 48). Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten PDIs diejenigen Peptide bevorzugt binden, die eine aromatische Aminosäure mit benachbartem hydrophoben Rest enthalten (s. Abb. 48). Dabei steigt die Präferenz für Peptide allgemein mit der Reihenfolge $Ar/Hy_k < Ar/Hy_l < Ar/Ar$ (Ar = aromatischer Rest, Hy_k = kurzkettiger hydrophober Rest (Ala), Hy_l = langkettiger hydrophober Rest (Val, Ile, Leu)). Darüber hinaus binden ERp57 und ERp18 Peptide mit Trp nur dann, wenn die benachbarte Aminosäure ein zweiter Aromat ist (Daten nicht gezeigt).

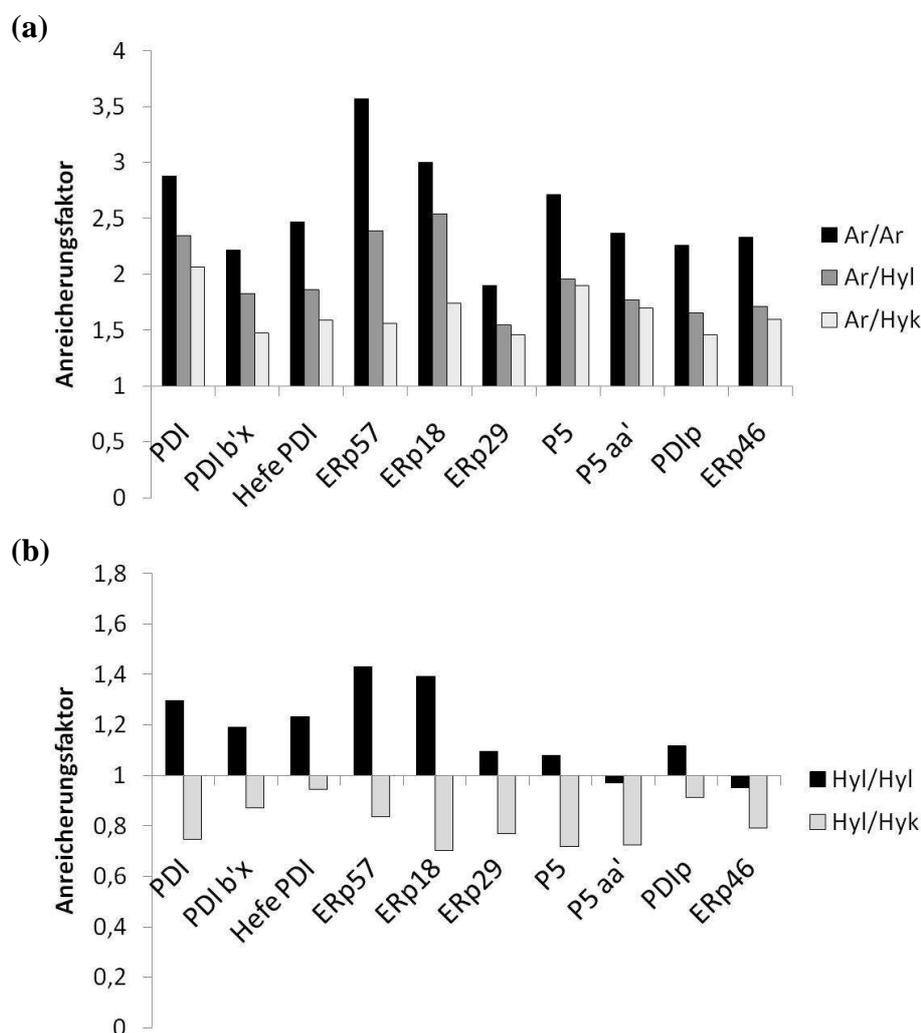


Abbildung 48: Einfluss benachbarter hydrophober und aromatischer Reste auf die Peptid-Interaktion. Alle untersuchten PDIs binden diejenigen Peptide bevorzugt, die eine aromatische Aminosäure mit benachbartem hydrophoben Rest enthalten. Dabei steigt die Präferenz für Peptide allgemein mit der Reihenfolge $Ar/Hy_k < Ar/Hy_l < Ar/Ar$ (Ar = aromatischer Rest, Hy_k = kurzkettiger hydrophober Rest, Hy_l = langkettiger hydrophober Rest); (a). Im Falle von ERp57 und ERp18 ist für die Peptid-Bindung ein zweiter zu Trp benachbarter aromatischer Rest erforderlich (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren sind zwei benachbarte langkettige hydrophobe Aminosäuren für die präferentielle Interaktion mit Peptiden ausreichend (b). Lediglich ERp46 sowie das P5aa'-Fragment zeigen keinerlei Präferenz für Peptide mit zwei benachbarten hydrophoben Aminosäuren. Eine langkettige Aminosäure mit einem benachbarten Ala-Rest reicht allerdings für alle untersuchten PDI-Familienmitglieder nicht zur Peptid-Bindung aus.

Ferner konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten PDIs an Peptide mit zwei benachbarten langkettigen hydrophoben Aminosäuren binden (Hy₁/Hy₁); (s. Abb. 48). Peptide mit einem Hy₁/Hy_k-Motiv werden dagegen nicht bevorzugt gebunden. Im Vergleich zum P5 Wildtyp-Protein zeigt das aa'-Fragment keine Präferenz für Peptide mit langkettigen aliphatischen Aminosäuren. Eine interessante Ausnahme bildet auch ERp46, welches keinerlei Präferenz für Peptide mit benachbarten hydrophoben aliphatischen Resten aufweist.

Die Bedeutung der aromatischen Reste für die Peptid-Interaktion von PDIs wird besonders dann deutlich, wenn der Austausch von einzelnen aromatischen Aminosäuren zu Alanin zum Verlust bzw. zur starken Reduktion der Peptid-Interaktion führt (s. Abb. 49).

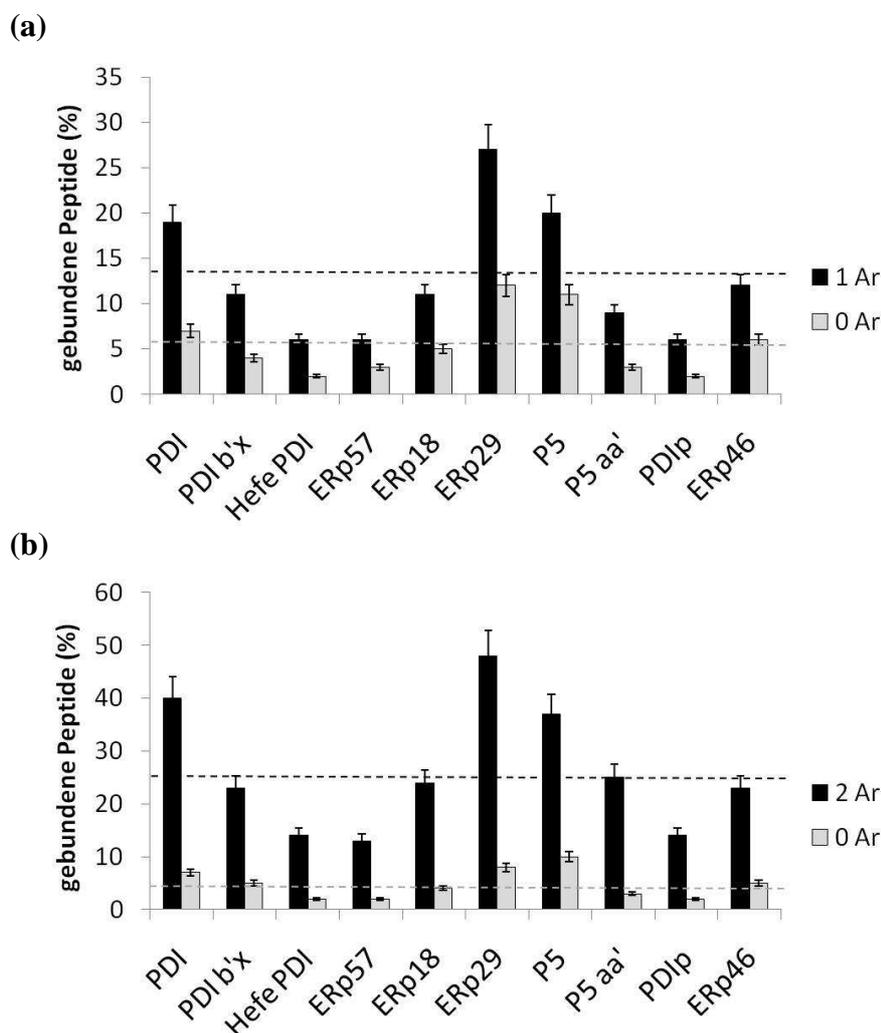


Abbildung 49: Bedeutung aromatischer Aminosäuren für die Peptid-Interaktion. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der durch die verschiedenen PDIs gebundenen Peptide mit einem (a) bzw. zwei (b) aromatischen Resten (Ar). Von den untersuchten PDIs werden durchschnittlich ca. 13 % der Peptide mit einem aromatischen Rest gebunden (schwarze gestrichelte Linie); (a). Bei Vorhandensein von zwei Aromaten steigt der Anteil der gebundenen Peptide auf durchschnittlich ca. 26 % (schwarze gestrichelte Linie); (b). Die Substitution der einzelnen aromatischen Reste mit Ala führt zu einer deutlichen Verringerung des Anteils der gebundenen Peptide auf jeweils ca. 4-6 % (graue gestrichelte Linie). Die mit Ala substituierten Peptide sind in ihrer Aminosäuresequenz ansonsten mit den unsubstituierten Peptiden identisch. Insgesamt wurden 2.362 Peptide mit einem und 2.137 Peptide mit zwei aromatischen Resten (bzw. ihre Ala-substituierten Analoga) analysiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3).

Die untersuchten PDIs binden im Durchschnitt ca. 13 % aller vorhandenen Peptide mit einem einzelnen aromatischen Rest. Die Substitution dieser aromatischen Reste mit Ala führt zu einer signifikanten Verminderung des Anteils der gebundenen Peptide, jedoch nicht zum vollständigen Verlust der Peptid-Interaktion. Auf der anderen Seite ist aus Abb. 49 ebenfalls ersichtlich, dass zwei aromatische Reste die Interaktion mit Peptiden gegenüber einem aromatischen Rest signifikant erhöhen. In diesem Fall werden ca. 26 % aller vorhandenen Peptide mit zwei aromatischen Aminosäuren gebunden. Die Substitution der beiden aromatischen Aminosäuren mit Ala verringert den Anteil der gebundenen Peptide auf ca. 5 %. Dieser Effekt wird bei Peptiden mit drei oder mehr aromatischen Aminosäuren noch deutlicher (Daten nicht gezeigt). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass einzelne aromatische Aminosäuren ein wichtiges, jedoch weder ein essentielles, noch ein ausreichendes Merkmal der Peptid-Interaktion von PDIs darstellen.

Die Wichtigkeit der aromatischen Reste spiegelt sich auch in der unterschiedlich starken Interaktion von PDI und seinen Homologen mit den häufig verwendeten Modell-Peptiden Mastoparan und Δ -Somatostatin wider (s. Abb. 50; vgl. [88, 93]).

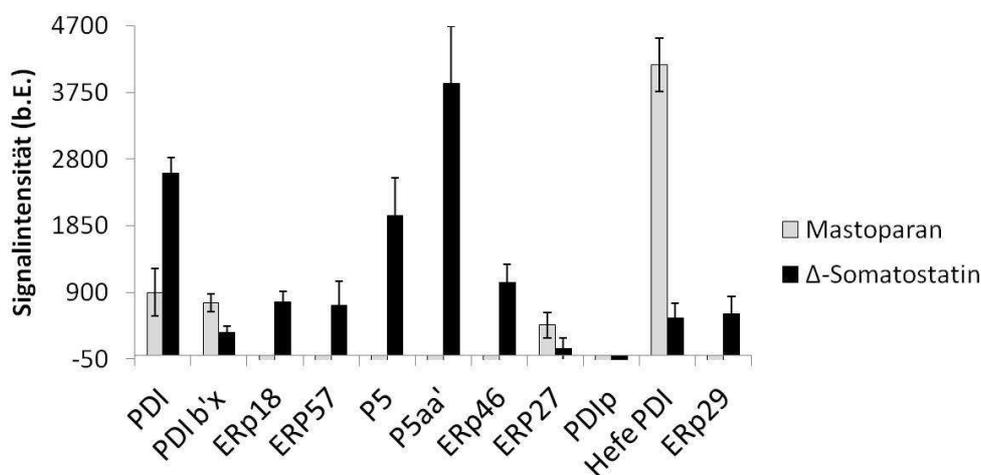


Abbildung 50: Interaktion von PDIs mit Modell-Peptiden. Die meisten PDI-Familienmitglieder zeigen eine stärkere Bindung an Δ -Somatostatin (RKAGSKNFFWKTFTS) als an Mastoparan (INLKALAALAKKIL). Nur Hefe PDI (PDI1p) bindet Mastoparan stärker. Die stärkere Interaktion der untersuchten PDIs mit Δ -Somatostatin liegt wahrscheinlich an dem Fehlen von aromatischen Aminosäuren im Mastoparan-Peptid. Die y-Achse wurde zur besseren Veranschaulichung bei einem Wert von -50 abgeschnitten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3).

Im Gegensatz zu Somatostatin enthält Mastoparan keinerlei aromatische Reste. Die meisten der untersuchten PDIs zeigen daher eine stärkere Interaktion mit Δ -Somatostatin im Vergleich zu Mastoparan. Eine interessante Ausnahme bildet PDI1p aus der Hefe. In diesem Fall wird Mastoparan bevorzugt gebunden. Dies liegt vermutlich u.a. an der geringen Präferenz von Hefe PDI für LA/AL-Motive, wie sie in Mastoparan vorkommen (Daten nicht

gezeigt). Im Gegensatz zu früheren *cross-linking* Studien zeigt PDIp keine signifikante Bindung, weder an Mastoparan, noch an Somatostatin, was vermutlich in dem Fehlen von Tyr-Resten innerhalb des Peptides begründet ist (vgl. [95]). Darüber hinaus zeigen auch ERp46, ERp18, ERp57 sowie P5 und sein aa'-Fragment keine Bindung an Mastoparan. PDI, die PDIB'x-Domäne, ERp27 sowie Hefe PDI binden sowohl an Mastoparan als auch an Δ -Somatostatin. Die allgemein geringere Affinität von PDI und PDIB'x zu Mastoparan im Vergleich zu Δ -Somatostatin stimmt mit bisherigen Interaktionsstudien überein [88]. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen konnten in vorhergehenden Arbeiten mittels *Biacore*-Analyse eine schwache Interaktion von P5 mit Mastoparan detektiert werden [124].

Die beobachteten Unterschiede liegen vermutlich an den verschiedenen Nachweisverfahren (*cross-linking*, *Biacore*, *Peptid-Array*). Auch die verwendeten Detergenzien können einen Einfluss auf die Peptid-Interaktion haben (s. Abschnitt. 3.7.6.).

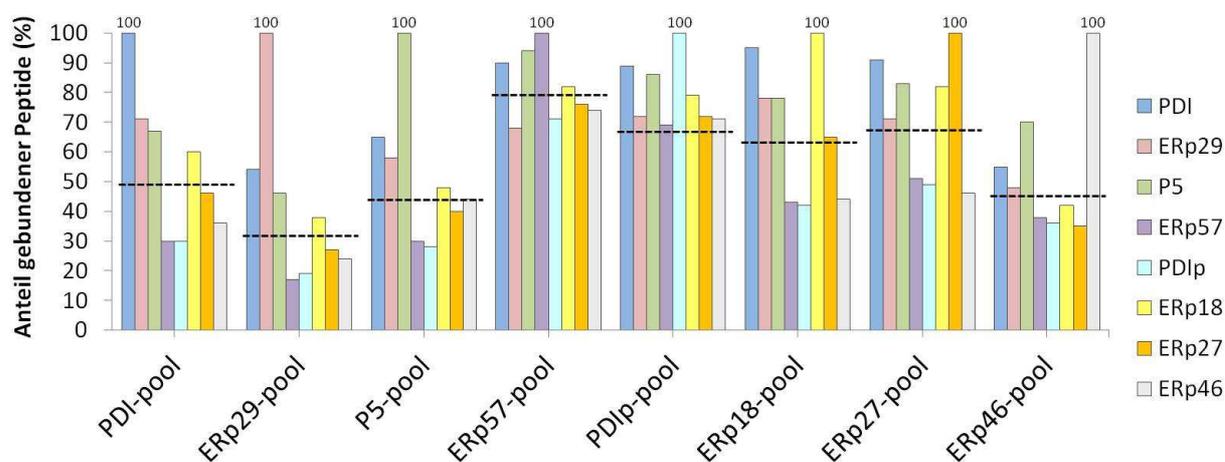
3.7.3. Statistische Auswertung der Redundanz der Peptid-Interaktion

Die Analyse der Schnittmengen der von den einzelnen PDIs gemeinsam gebundenen Peptide zeigt, dass die Peptid-Bindungsselektivitäten z.T. überlappen. Diese Redundanz in der Peptid-Interaktion wird auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit der verschiedenen PDI-Familienmitglieder erwartet. Allerdings konnten zwischen den jeweiligen PDIs signifikante Unterschiede im Grad der Überlappung ihrer Peptid-Interaktionen nachgewiesen werden (s. Abb. 51). Beispielsweise werden im Durchschnitt ca. 50 % aller mit PDI interagierenden Peptide (*PDI-pool*) auch von den anderen PDI-Familienmitgliedern gebunden. Dagegen werden durchschnittlich nur ca. 30 % des ERp29-*pools* auch von weiteren PDIs gebunden. Im Falle von ERp57 tritt die höchste beobachtete Redundanz bei der Peptid-Interaktion auf. Hier werden durchschnittlich ca. 80 % der von ERp57 gebundenen Peptide auch von anderen PDIs gebunden. Neben PDI und ERp29 zeigen auch die Homologen P5 und ERp46 im Vergleich zu den andern PDI-Mitgliedern eine signifikant niedrigere Überlappung in ihrer Peptid-Bindung (durchschnittlich ca. 45 % bzw. 48 % des gebundenen Peptid-*pools*).

Das Ausmaß der Überlappung bzw. Redundanz bei der Interaktion mit Peptiden gibt neben den Peptid-Bindungskapazitäten indirekt einen Aufschluss über das Substratspektrum bzw. die Substratselektivität der jeweiligen PDIs. Je größer die Redundanz, desto geringer ist das spezifische Substratspektrum und desto höher ist vermutlich die Substratselektivität. Umgekehrt, je geringer die Redundanz, desto breiter ist vermutlich das spezifische Substratspektrum und desto geringer wäre die Substratselektivität des einzelnen PDI-Proteins. Danach würden ERp29 und in geringerem Maße PDI, P5 und auch ERp46, potentiell ein

signifikant größeres Substratspektrum aufweisen. Dagegen interagieren PDIp, ERp18, ERp27 und insbesondere ERp57 vermutlich mit einer geringeren Anzahl an spezifischen Substraten.

(a)



(b)

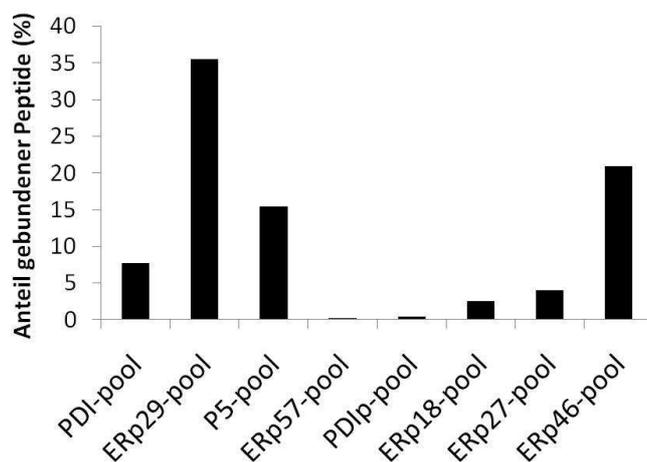


Abbildung 51: Redundanz der Peptid-Interaktion. Die einzelnen PDI-Familienmitglieder zeigen unterschiedliche Überlappungen in ihren jeweils gebundenen Peptid-pools (a). ERp57 weist mit durchschnittlich 80 % seines Peptid-pools die höchste Redundanz in der Peptid-Interaktion auf. Die von ERp29 gebundenen Peptide werden dagegen nur zu durchschnittlich 30 % auch von anderen PDIs gebunden. Die einzelnen PDIs zeigen hierbei unterschiedliche Redundanzen. PDI bindet beispielsweise ca. 95 % der von ERp18 gebundenen Peptide aber nur ca. 50 % der von ERp46 gebundenen Peptide. Eine hohe Redundanz der Peptid-Interaktion deutet auf ein enges Substratspektrum hin. Die Gesamtheit aller durch das jeweilige PDI-Protein gebundenen Peptide wird als PDI-pool bezeichnet. Die gestrichelten Linien geben die durchschnittliche Redundanz aller PDIs für den jeweiligen PDI-pool an. Die mit "100" gekennzeichneten Balken zeigen eine theoretische Redundanz von 100 % (Kontrolle für das jeweilige PDI-Protein). Farbkodierung s. Legende rechts. Der Anteil der Peptide, die ausschließlich durch ein bestimmtes PDI-Familienmitglied gebunden werden gibt indirekt einen Aufschluss über dessen Bindungsspezifität (b). Ca. 35 % aller von ERp29 gebundenen Peptide werden ausschließlich von ERp29 gebunden. Neben ERp29 zeigen auch ERp46 und P5 mit 20 % bzw. 15 % einen signifikant größeren Anteil an singular gebundenen Peptiden. Der Anteil von ausschließlich durch PDI gebundenen Peptide beträgt hingegen lediglich 8 %. Normiert wurde auf die Gesamtanzahl an gebundenen Peptiden des jeweiligen PDI-Proteins.

Betrachtet man den Beitrag zur Redundanz der Peptid-Interaktion für die einzelnen PDIs genauer, so zeigt sich, dass z.B. ERp57 und PDIp nur einen geringem Anteil der Peptid-pools der anderen PDI-Mitglieder binden. Auf der anderen Seite bindet beispielsweise PDI ca.

90 % der von ERp57, PDIp und ERp27 gebundenen Peptide und sogar mehr als 95 % des ERp18-*pools*. Im Falle von P5, ERp29 und ERp46 fällt der Anteil an gemeinsam mit PDI gebundenen Peptiden geringer aus. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass P5 mit rund 70 % des ERp46-*pools* überlappt. Demgegenüber interagiert ERp46 nur mit ca. 45 % der Peptide des P5-*pools*. Trotz der geringen Peptid-Bindungskapazität und des potentiell geringen Substratspektrums zeigt ERp57 einen unerwartet hohen Anteil der Redundanz bei der Peptid-Bindung der anderen PDIs. ERp57 interagiert beispielsweise immerhin noch mit knapp 30 % der Peptide des gesamten PDI-*pools*.

Untersucht man den prozentualen Anteil der Peptide, die ausschließlich von einem einzigen PDI-Protein gebunden werden, zeigt sich, dass ERp29 mit ca. 35 % seines gebundenen Peptid-*pools* den größten Anteil aufweist (s. Abb. 51). Der Anteil dieser singular gebundenen Peptide am Gesamt-*pool* gibt ebenfalls einen Aufschluss über die mögliche Substratbindungsselektivität und das potentielle Substratspektrum. Neben ERp29 zeigen auch ERp46 und P5 mit ca. 20 % bzw. 15 % singular gebundener Peptide einen erhöhten Anteil am Gesamt-*pool*. Demgegenüber zeigen nur ca. 8 % aller durch PDI gebundenen Peptide ausschließlich eine Interaktion mit PDI. Die übrigen untersuchten PDIs zeigen signifikant niedrigere Anteile an singular gebundenen Peptiden. ERp57 und auch PDIp binden nahezu keine Peptide, welche nicht auch durch andere PDIs gebunden werden könnten (s. Abb. 51).

3.7.4. Statistische Auswertung der Sekundärstruktur von gebundenen Peptide

Die spezifische Interaktion von PDIs mit Peptiden kann maßgeblich von der Konformation des Peptid-Rückgrates beeinflusst werden. Die Sekundärstruktur von Peptiden hängt u.a. von deren Länge und Orientierung, den benachbarten Reste sowie von der Immobilisierungsart ab. Aber auch verwendete Detergenzien können die Sekundärstruktur von Peptiden beeinflussen. Die im Folgenden ermittelten bevorzugten Sekundärstrukturen der gebundenen Peptide können erheblich variieren und sollten daher nur als Näherungen angesehen werden. Verglichen wurde der Anteil der Sekundärstrukturen des gebundenen Peptid-*pools* für jedes Protein mit dem Anteil der Sekundärstrukturen der Peptide in der gesamten Peptid-Bibliothek. Der Sekundärstrukturanteil der Peptide wurde mit den Programmen GOR3/4 (<http://pbil.ibcp.fr>; [242, 243]) bioinformatisch ermittelt.

Alle untersuchten PDIs zeigen eine signifikante Anreicherung von β -Strängen in den gebundenen Peptiden (s. Abb. 52). Unstrukturierte Bereiche (*random coil*) sowie α -helicale Elemente sind dagegen nicht angereichert. Die Präferenz für bestimmte Sekundärstrukturelemente variiert zwischen den einzelnen PDIs in geringem Maße. ERp29

zeigt z.B. im Vergleich zu den übrigen PDIs eine geringere Anreicherung von β -Strängen in seinen gebundenen Peptiden. Die Peptide, welche von allen PDIs am stärksten gebunden werden, besitzen zudem einen deutlich höheren Anteil von β -Strängen (Daten nicht gezeigt).

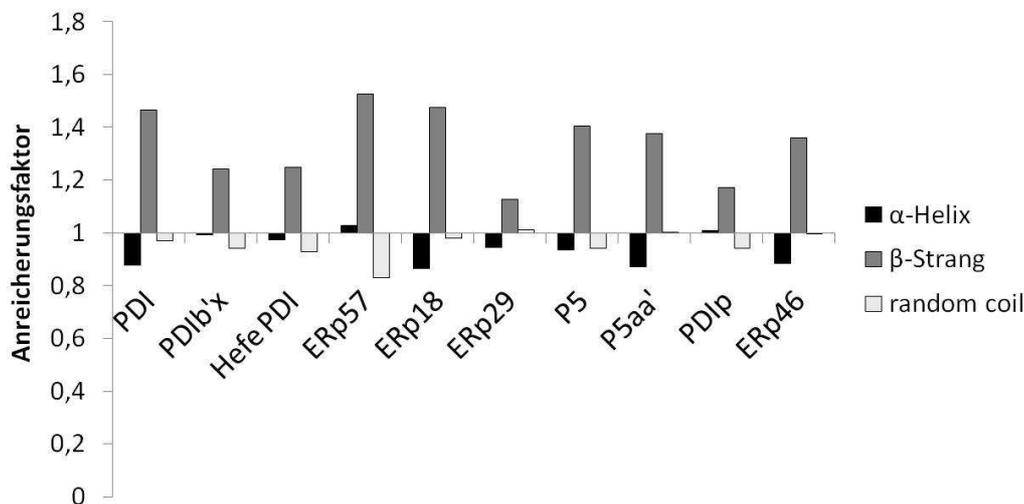


Abbildung 52: Einfluss der Sekundärstruktur von Peptiden auf die Peptid-Interaktion. Alle analysierten PDIs zeigen eine statistische Anreicherung von β -Strängen in ihren gebundenen Peptiden. Unstrukturierte Bereiche (*random coil*) sowie α -Helices sind dagegen nicht angereichert. Zwischen den einzelnen PDIs sind geringe Unterschiede erkennbar. ERp29 und PD1p zeigen die geringste Präferenz für β -Stränge. Das PD1b'x-Fragment zeigt eine geringere Anreicherung von β -Strängen sowie eine geringere Abreicherung von α -helicalen Bereichen im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelemente in den Peptiden wurde mit den Programmen GOR3/4 [242, 243] ermittelt.

Die erhaltenen Resultate implizieren ein Zusammenwirken von spezifischen Aminosäuren (aromatische/basische Reste) und ihrer räumlichen Position bzw. Orientierung bei der Peptid-Interaktion von PDIs. Es sollte jedoch hervorgehoben werden, dass die hier ermittelte Präferenz für β -Stränge nicht bedeutet, dass α -helicale Bereiche und ungeordnete Schleifen-Regionen von PDIs in keinem Fall gebunden werden (vgl. Abschnitt 3.7.7.). Ebenso ist auch eine Anpassung von PDIs an verschiedene Sekundärstrukturen in ihren Substraten durch einen *induced-fit* Mechanismus denkbar.

Die Abreicherung von α -Helices in den gebundenen Peptid-*pools* der jeweiligen PDIs resultiert nicht aus der fehlenden Erkennung von α -Helices durch das verwendete Programm. Beispielsweise wird die α -helicale Sekundärstruktur eines Peptids aus der B-Kette von humanem Insulin (SHLVEALYLVC) korrekt erkannt (vgl. pdb: 1ben [244]).

3.7.5. Interaktion mit humanen Peptid-Antigenen

Neben den bisher erwähnten PDI-Familienmitgliedern zeigt AGR2 hinsichtlich der Interaktion mit Peptiden einige Besonderheiten. AGR2 weist im Vergleich zu den anderen PDIs eine erhöhte Peptid-Bindungs Kapazität auf (Daten nicht gezeigt). Zudem bindet AGR2,

ebenso wie ERp29, bevorzugt an Peptide mit sauren Resten. Basische Peptide werden dagegen nicht favorisiert (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnte durch Verwendung von Peptid-Arrays, welche ca. 9.000 Peptide von humanen krankheitsassoziierten Proteinen tragen, gezeigt werden, dass AGR2 im Gegensatz zu anderen ER-Chaperonen derartige Peptid-Antigene statistisch häufiger erkennt (s. Abb. 53).

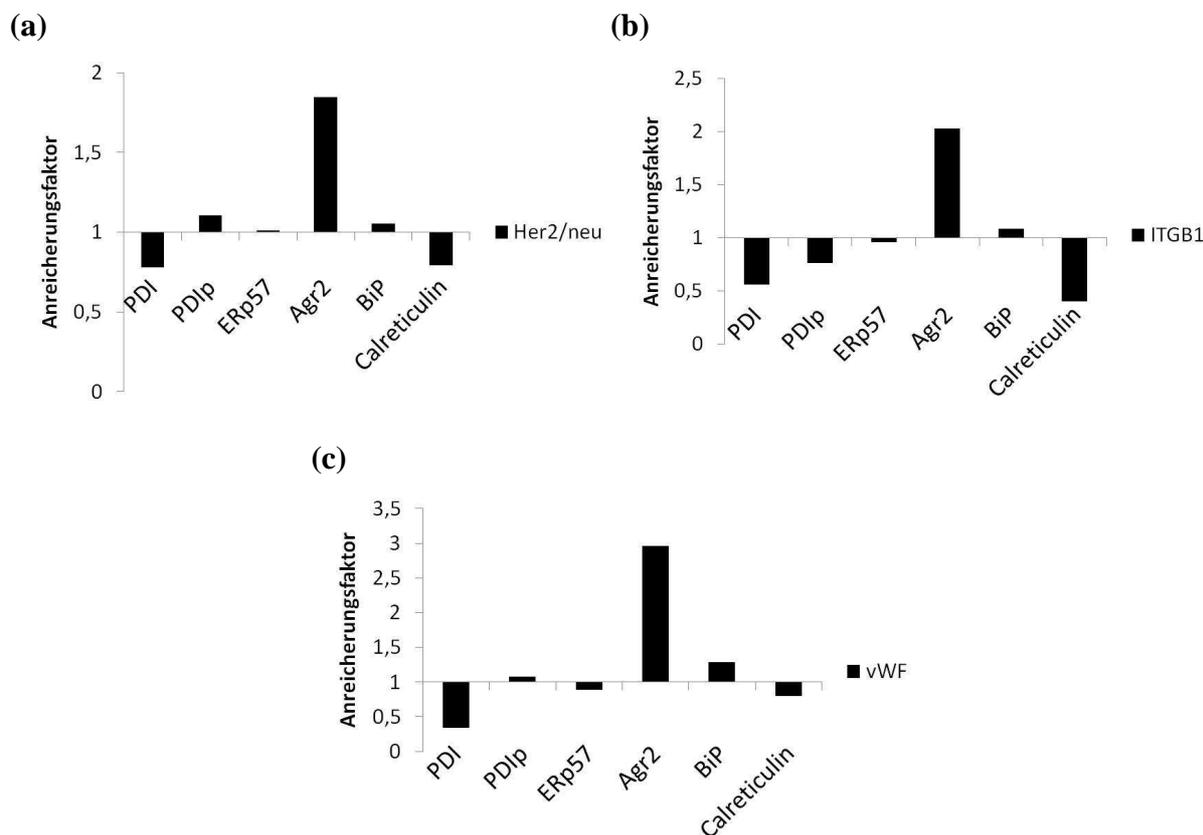


Abbildung 53: Interaktion von AGR2 mit krankheitsassoziierten Peptid-Antigenen. Mittels eines weiteren Peptid-Arrays mit 9.218 unterschiedlichen Peptiden von humanen, krankheitsassoziierten Proteinen konnte gezeigt werden, dass AGR2 das einzige untersuchte ER-Chaperon ist, welches bevorzugt an solche Peptide bindet. Beispielsweise konnte für AGR2 eine Präferenz für Peptide des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (Her2/neu; (a)), des Integrin- β_1 (ITGB1) Proteins (b), sowie des von Willebrand-Faktors (vWF; (c)) nachgewiesen werden. Die anderen ER-Chaperone zeigen dagegen keine derartige Präferenz für diese Peptide.

AGR2 scheint demnach als einziges untersuchtes PDI-Familienmitglied eine Rolle bei der spezifischen Interaktion mit solchen krankheitsassoziierten Proteinen zu spielen (s. Abschnitt 1.7.). Beispielsweise interagiert AGR2 überdurchschnittlich häufig mit Peptiden des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (Her2/neu), welcher verstärkt in Brustzellkarzinomen exprimiert wird. Darüber hinaus konnte eine bevorzugte Interaktion von AGR2 mit Peptiden des von Willebrand-Faktors (vWF) sowie des Integrin- β_1 (ITGB1) Proteins gefunden werden (s. Abb. 53). Beide Proteine können ebenfalls bei der Progression von malignen Tumoren beteiligt sein (s. Abschnitt 4.3.8.). Die anderen untersuchten ER-Chaperone zeigen dagegen keine bevorzugte Interaktion mit derartigen Peptiden.

3.7.6. Einfluss von Detergenzien auf die Peptid-Interaktion

Es ist bekannt, dass Detergenzien mit der Fähigkeit von PDI, Peptide zu binden, interferieren [83, 93]. Die Verwendung von Detergenzien bei den Peptid-Bindungsstudien mittels Peptid-Arrays erwies sich zur Blockierung unspezifischer Bindungen der Proteine an die Glasoberfläche als essentiell. Um bei der Analyse der Peptid-Interaktion unspezifische Effekte durch die Verwendung von Detergenzien ausschließen zu können, wurden sowohl unterschiedliche Konzentrationen (0,05-0,5 % (v/v)) als auch verschiedene Arten an Detergenzien (Triton X-100, Tween-20 und Chaps) eingesetzt. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Detergenzkonzentration zu einer Verminderung der Signalstärke (Fluoreszenzintensität) der gebundenen Peptide führte. Parallel dazu erhöhte sich das Hintergrundsignal durch unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Proteine an die Glasoberfläche des Peptid-Arrays. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis unterschied sich jedoch bei den einzelnen untersuchten PDIs deutlich.

Um eine Variabilität während der Versuche zu minimieren und um die erhaltenen Ergebnisse der jeweiligen PDIs untereinander vergleichbar zu gestalten, wurde im Inkubationspuffer einheitlich 0,4 % (v/v) Triton X-100 eingesetzt. Diese Konzentration erwies sich hinsichtlich des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses als optimal. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Konzentration sowie die Art des verwendeten Detergenz zwar die Signalintensität verändert, jedoch die Peptid-Bindungsselektivität der untersuchten PDIs nur geringfügig beeinflusst (s. Abb. 54).

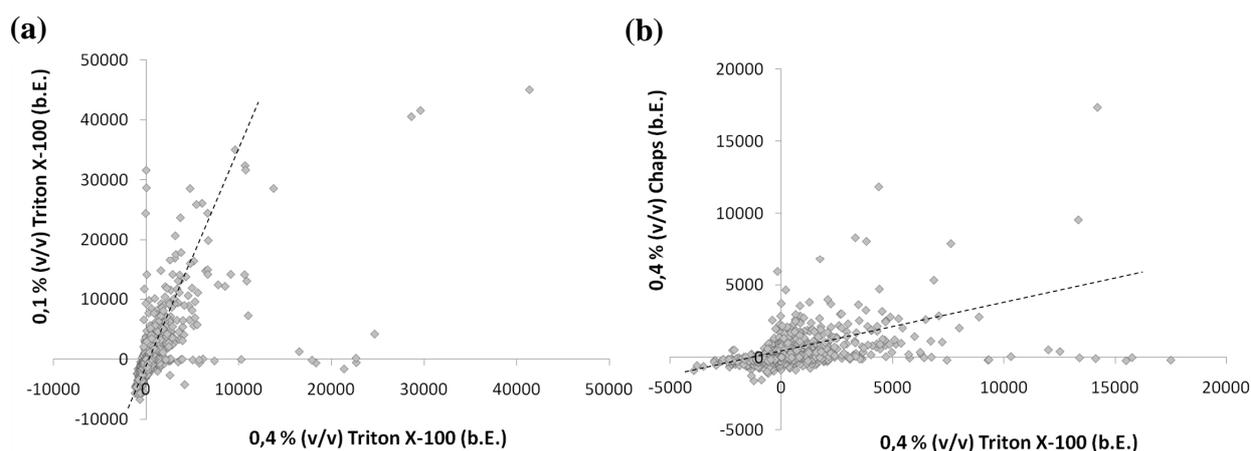


Abbildung 54: Einfluss von Detergenzien auf die Peptid-Interaktion. Sowohl die Konzentration (a) als auch die Art des verwendeten Detergenz (b) haben einen signifikanten Einfluss auf die Peptid-Bindungsselektivität von PDIs. Analysiert wurde die Peptid-Interaktion von fluoreszenzmarkiertem ERp29 mittels Peptid-Arrays. Die Verwendung von 0,1 % (v/v) Triton X-100 erhöht die Signalintensität im Vergleich zu 0,4 % (v/v) Triton X-100 (a). Die Verwendung von Chaps als Detergenz führt dagegen zu einer im Vergleich zu Triton X-100 niedrigeren Signalintensität (b). Die Signalstärken der einzelnen gebundenen Peptide streuen um einen festgelegten Mittelwert (gestrichelte Linie). Nur einzelne gebundene Peptide mit hohen Signalintensitäten weichen beträchtlich vom Mittelwert ab. Die Verwendung von α PDI-Antikörpern lieferte ein ähnliches Bild, wurde aber auf Grund einer signifikanten Anzahl an unspezifischen Bindungen durch den Antikörper in folgenden Versuchen nicht weiter berücksichtigt.

3.7.7. Vorhersage von potentiellen Bindungsepitopen auf PDI-Interaktionspartnern (*hot-spot* Analyse)

Der für die Peptid-Interaktionsstudien verwendete Peptid-Array enthielt z.T. überlappende Peptidsequenzen von 57 unterschiedlichen ER-Proteinen sowie putativen PDI-Interaktionspartnern (s. Tabelle 10, Anhang). Die von den meisten PDIs am stärksten gebundenen und überlappenden Peptidsequenzen (*hot-spots*) können direkt auf die dreidimensionale Struktur des jeweiligen Proteins übertragen werden. Damit ist es möglich, eine Kartierung der gebundenen Peptidsequenzen (Primärsequenz) auf der dreidimensionalen Proteinstruktur (Sekundär- und Tertiärstruktur) vorzunehmen. Dies erlaubt eine Vorhersage der Bindungsepitope auf den PDI-Interaktionspartnern. Im Folgenden wurden nur Proteine ausgewählt, für die bereits eine Interaktion mit PDI-Familienmitgliedern beschrieben wurde.

3.7.7.1. RNaseA-Bindungsepitope

In *Far-Western* Analysen konnte eine Interaktion von mehreren PDIs mit immobilisierter denaturierter RNaseA nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.6.5.). Des Weiteren wurde RNaseA als Modell-Protein für die Analyse der Oxidase-Aktivität von PDI-Familienmitgliedern verwendet. RNaseA enthält vier Disulfidbrücken. Die Übertragung der gebundenen Peptid-Sequenzen auf die dreidimensionale Struktur von RNaseA zeigt, dass hauptsächlich die Sequenzen der flexiblen Schleifen in der Nähe der beiden Disulfidbrücken C126-C184 und C140-C195 gebunden werden (s. Abb. 55).

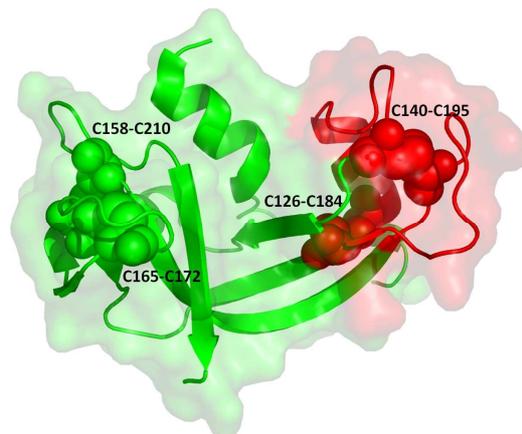


Abbildung 55: RNaseA-Bindungsepitope. Die durch die meisten PDIs gebundenen Peptid-Sequenzen befinden sich in räumlicher Nähe der beiden Disulfidbrücken C126-C184 und C140-C195 (in rot dargestellt). Dies betrifft hauptsächlich die ungeordneten Schleifen-Regionen, welche aromatische und basische Reste enthalten (s. Abb. 76). Dagegen werden Sequenzen in der Nähe der beiden Disulfidbrücken C158-C210 sowie C165-C172 nicht gebunden (in grün dargestellt). Die vier Disulfidbrücken sind markiert und jeweils als Kugel-Modell dargestellt. pdb: 1dza [245].

Diese Sequenzbereiche enthalten aromatische und basische Aminosäuren (s. Abb. 76). Im Gegensatz dazu, erfolgt keinerlei Interaktion mit Sequenzen in der Nähe der beiden anderen Disulfidbrücken des Proteins. Es kann angenommen werden, dass nicht die Cysteine/Disulfidbrücken selbst erkannt werden, sondern die Interaktion maßgeblich durch die räumlich benachbarten Aminosäuresequenzen bestimmt wird.

3.7.7.2. ERp29-Bindungsepitope

Die Kartierung der von den PDIs gebundenen Peptidsequenzen auf der dreidimensionalen Struktur des PDI-Familienmitgliedes ERp29 zeigt, dass ausschließlich Peptide gebunden werden, die von der N-terminalen **b**-Domäne stammen (s. Abb. 56). Eine signifikante Bindung an Peptide, welche der **D**-Domäne entstammen, konnte nicht beobachtet werden. Die meisten der erkannten Sequenzen befinden sich auf der Proteinoberfläche bzw. sind partiell im hydrophoben Inneren integriert.

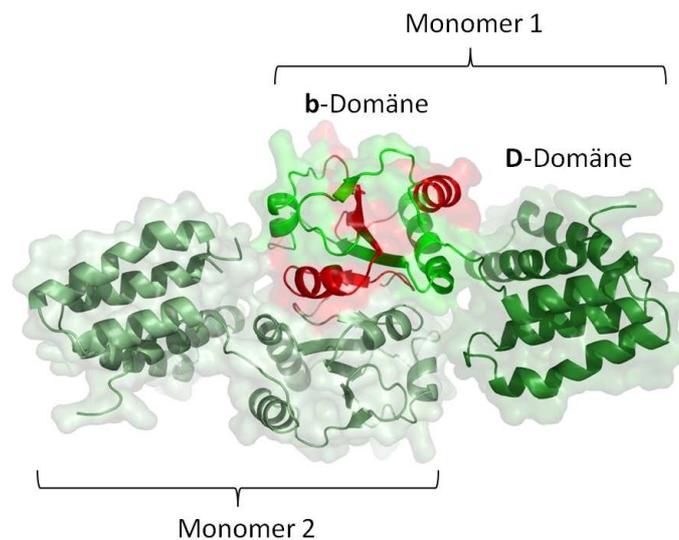


Abbildung 56: ERp29-Bindungsepitope. Dargestellt wurden diejenigen Reste auf der Proteinoberfläche von ERp29, welche mittels Peptid-Array Bindungsstudien in den Peptiden identifiziert wurden, die mit den meisten untersuchten PDIs interagieren. Die gebundenen Peptidsequenzen entstammen alle aus der N-terminalen **b**-Domäne von ERp29. Dagegen wurden keine Peptide gebunden, welche aus der C-terminalen **D**-Domäne stammen. Die von den untersuchten PDIs gebundenen Sequenzen beinhalten u.a. die Dimerisierungs- und putative Oligomerisierungsstelle von ERp29 sowie die potentielle Substratbindungsstelle (*Tyr-Cluster*) in der **b**-Domäne. Jedes ERp29-Monomer ist jeweils in grün bzw. hellgrün dargestellt. Die **D**-Domäne des Monomer 1 ist in dunkelgrün dargestellt. Die von den PDIs gebundenen Sequenzen sind in rot markiert. pdb: 2qc7 [24].

Die **b**-Domäne von ERp29 ist verantwortlich für die Homodimerisierung des Proteins und ausreichend für die Interaktion mit Peptiden [24, 136]. Die potentielle Substratbindungsstelle innerhalb der **b**-Domäne von ERp29 wird in räumlicher Nähe zu einem charakteristischen *Tyr-Cluster* vermutet. Diese beinhaltet u.a. die hydrophoben Reste Pro65, Gln70, Tyr64, und Tyr66 des *Tyr-Clusters* sowie Phe73 und Tyr115. Bei der Dimerisierung

sind die Reste Gly37, Leu39, Asp42, Lys48, und Lys52 der **b**-Domäne involviert. Daneben wurde über eine Beteiligung der Reste Asp71, Phe118, Arg122, Asp123, Trp144, Gly67, Glu68, Gly97, und Asp98 bei der Multimerisierung von ERp29 spekuliert [24, 136, 246].

Die meisten der untersuchten PDIs interagieren bevorzugt mit den Sequenzen der **b**-Domäne von ERp29, welche potentiell bei der Substratbindung beteiligt sind (*Tyr-Cluster*), oder bei der Dimerisierung und Oligomerisierung des Proteins eine Rolle spielen (s. Abb. 57). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass bestimmte Bereiche innerhalb der **b**-Domäne nicht nur für die Homodimerisierung von ERp29 sowie für dessen Substratbindung verantwortlich sind, sondern möglicherweise auch bei der Interaktion mit anderen PDIs (und evtl. auch weiteren ER-Chaperonen) beteiligt sind. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass ERp29 in *pull-down* Experimenten in Komplexen zusammen mit BiP, Calreticulin und wahrscheinlich auch mit PDI sowie ERp57 gefunden werden konnte [142]; (s. Tabelle 5, Anhang).

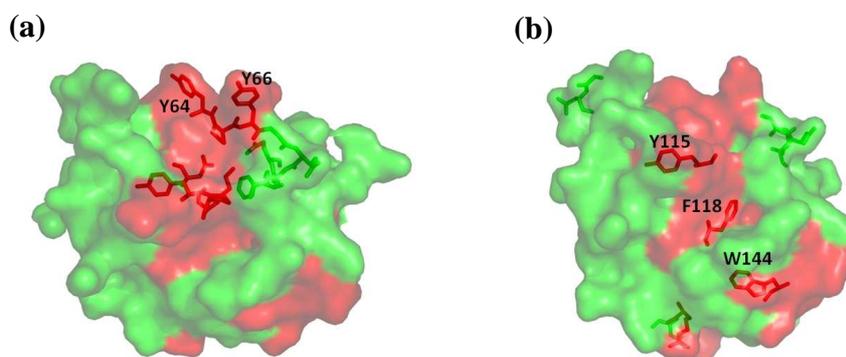


Abbildung 57: Gebundene Sequenzen der ERp29 b-Domäne. Die meisten PDIs zeigen eine verstärkte Interaktion mit Peptiden, welche der **b**-Domäne von ERp29 entstammen. Die gebundenen Sequenzen (rot) liegen hauptsächlich im Bereich der putativen Substratbindungstasche (*Tyr-Cluster* [24]; **(a)**) und überlappen mit der beschriebenen Dimerisierungs- und Oligomerisierungsstelle von ERp29 [24, 136, 246]; **(b)**. Die Reste, welche die Substratbindungstasche bzw. Oligomerisierungsstelle bilden, sind als Stabmodell dargestellt. Nicht gebundene Reste sind in grün dargestellt. Die Positionen der wichtigsten Aminosäuren sind zusätzlich angegeben. pdb: 2qc7 [24].

3.7.7.3. PDI-Bindungsepitope

Es ist bekannt, dass die **b'**-Domäne (zusammen mit einem Teil der **b**-Domäne) die wichtigste Substratbindungsstelle von PDI darstellt, dass aber auch die redox-aktiven Domänen zur Substratinteraktion beitragen können [83, 87, 88]. Es wird zudem angenommen, dass die **b'**-Domäne mit ihrer Substratbindungsstelle zur Homodimerisierung von PDI beiträgt [112]. Die Übertragung der von den verschiedenen PDIs gebundenen Peptidsequenzen auf die dreidimensionale Struktur von PDI zeigt, dass sowohl Bereiche im hydrophoben Inneren als auch Reste auf der Oberfläche des Proteins gebunden werden. Dies betrifft hauptsächlich die Reste in unmittelbarer Nachbarschaft zum katalytischen Zentrum in beiden redox-aktiven

Domänen (s. Abb. 58). Es werden v.a. die Sequenzen gebunden, die sich N-terminal zum CGHC-Motiv der α 2-Helix befinden, oder der *cis*-Prolin Schleife zugeordnet werden können.

Neben den katalytischen Zentren der **a**- und **a'**-Domäne interagieren die untersuchten PDIs mit Resten auf der Oberfläche der **b**- und **b'**-Domäne von PDI. Hierbei werden hauptsächlich Sequenzabschnitte gebunden, die in der Kontaktstelle zwischen der **b**- und **b'**-Domäne liegen. Des Weiteren erfolgt jedoch nur eine geringe Überlappung mit Sequenzbereichen, welche die Substratbindungsstelle (mit den Resten F223, F232, H239, L241, F243, I284, F287, F288, L303) in der **b'**-Domäne beinhalten [86, 87, 120]. Die meisten PDIs interagieren verstärkt mit den Resten auf der von der Substratbindungstasche räumlich gesehen gegenüberliegenden Seite des **bb'**-Fragmentes. Es kann angenommen werden, dass diese Regionen eine alternative Rolle bei der Oligomerisierung von PDI spielen. In Analogie zur Interaktion von ERp57 mit Calreticulin, könnten jene Reste auch bei der Interaktion von PDI mit anderen ER-Chaperonen beteiligt sein.

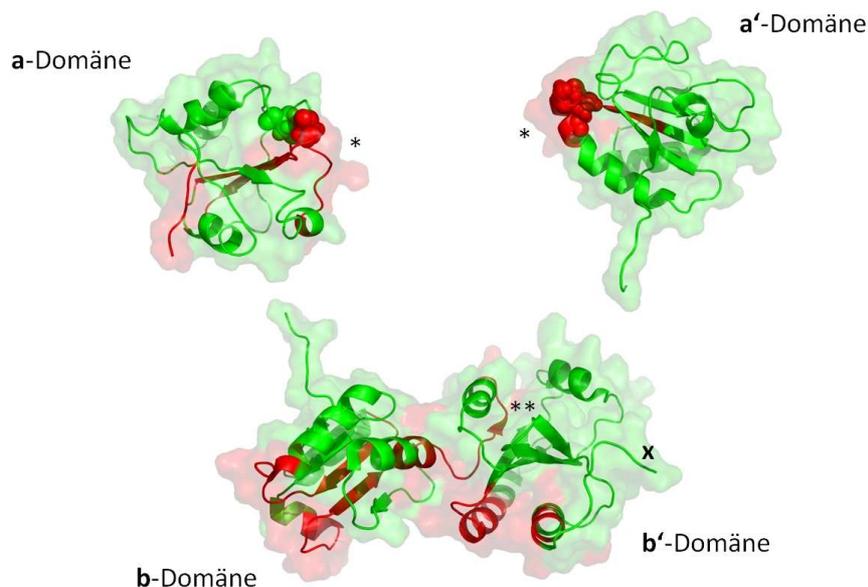


Abbildung 58: PDI-Bindungsepitope. Die analysierten PDIs zeigen eine verstärkte Bindung an Peptide, welche den redox-aktiven Domänen von PDI entstammen und in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum (*) liegen. Zusätzlich werden Sequenzbereiche der **b**- und **b'**-Domäne von PDI gebunden. Ein Großteil der hydrophoben Bereiche innerhalb der **b'**-Domäne, welche die Substratbindungstasche (**) bilden, werden nicht gebunden. Es findet auch keine Interaktion mit Sequenzbereichen des **x-linkers** (x) statt. Gebundene Peptidsequenzen sind in rot, nicht gebundene Peptidsequenzen sind in grün gekennzeichnet. Die Cys des aktiven Zentrums sind als Kugel-Modell dargestellt. pdb(a): 1mek [247]; pdb(a'): 1x5c; pdb(bb'): 2k18 [88].

Betrachtet man die Ladungsverteilung auf der Oberfläche der **b'**-Domäne von PDI zeigt sich, dass v.a. basische Sequenzabschnitte gebunden werden. Eine Interaktion mit negativ geladenen Bereichen des **x-linkers** findet dagegen nicht statt (s. Abb. 59).

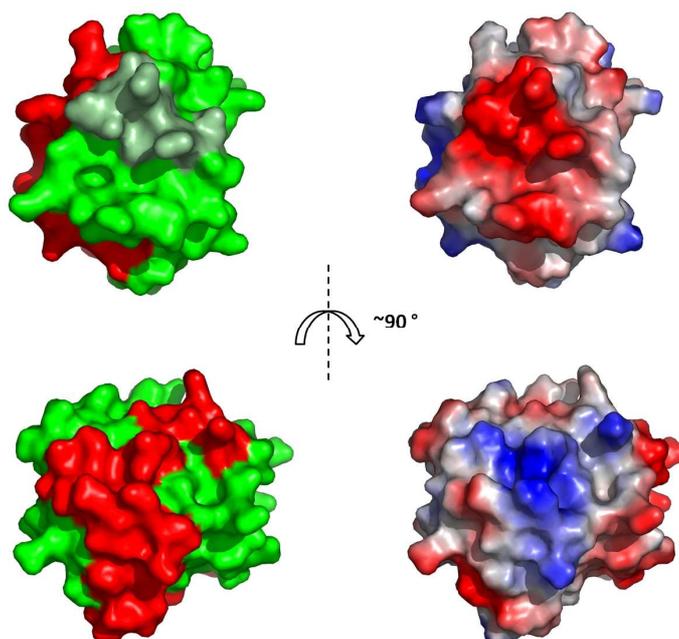


Abbildung 59: Ladungsverteilung der gebundenen Sequenzen der b'-Domäne von PDI. Alle untersuchten PDIs zeigen allgemein eine verstärkte Interaktion mit Sequenzbereichen der b'-Domäne von PDI, die eine positive Ladung tragen (Abb. unten). Dagegen werden negativ geladene Peptide der b'-Domäne kaum gebunden (Abb. oben). Hervorzuheben ist, dass der *x-linker* (Abb. oben; dunkelgrün) eine stark negative Ladung trägt. Peptide, welche die Sequenz des *x-linkers* enthalten werden demnach von keinem der PDI-Familienmitglieder gebunden. Eine Ausnahme bildet ERp29, welches mit Teilen der *x-linker* Region interagiert (Daten nicht gezeigt). In der Abb. links sind die von den PDIs gebundenen Sequenzbereiche in rot dargestellt. Die Abb. rechts zeigt das dazugehörige qualitativ ermittelte elektrostatische Oberflächenpotentiale der b'-Domäne von PDI (negatives Potential = rot; positives Potential = blau). Die Abb. unten ist um ca. 90° gegenüber der oberen Abb. gedreht dargestellt. pdb(b'): 3bj5 [86].

Die Sequenz des *x-linkers* wird von keinem der untersuchten PDIs gebunden. Auch PDI selbst, sowie die b'-Domäne und das b'x-Fragment zeigen keinerlei Affinität für diese Region. Eine Ausnahme bildet ERp29, das mit Sequenzabschnitten des *x-linkers* interagiert (Daten nicht gezeigt). Eine genauere Analyse der Aminosäuresequenz des C-terminalen Bereiches des *x-linkers* (MSQELPEDWD) lässt erkennen, dass diese kaum hydrophobe Reste enthält. Auf der anderen Seite zeigt der *x-linker* eine stark negative Ladung, was die präferentielle Interaktion mit ERp29 erklären würde. Das von den negativen Resten umgebene Trp347 alleine reicht vermutlich nicht für eine Interaktion mit PDIs aus.

Die fehlende Interaktion von PDI sowie des b'x-Fragmentes mit dem *x-linker* in Peptid-Bindungsstudien lässt vermuten, dass die Peptide, welche die Sequenz des *x-linkers* enthalten nicht ausreichen, um den diesen aus der Substratbindungstasche der b'-Domäne zu verdrängen. Demnach wären hauptsächlich positiv geladene Peptide in der Lage, den *x-linker* aus der Substratbindungstasche der b'-Domäne zu verdrängen. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass für Peptid-Interaktionsstudien mit dem b'x-Fragment bisher nur die positiv geladenen Peptide Δ -Somatostatin und Mastoparan verwendet wurden [87]. Ebenso wäre

denkbar, dass die kovalente Assoziation des *x-linkers* mit der **b'**-Domäne dessen Flexibilität einschränkt bzw. dass der *x-linker* durch Interaktion mit Bereichen der **b'**-Domäne in eine Konformation gezwungen wird, die eine Bindung der hydrophoben Reste an die Substratbindungstasche ermöglicht.

3.7.7.4. ERp57-Bindungsepitope

Die von den verschiedenen PDIs gebundenen Epitope auf der Oberfläche von ERp57 zeigen in ihrer Gesamtheit starke Ähnlichkeit zu den gebundenen Sequenzbereichen der PDI-Oberfläche (vgl. Abb. 58). Es werden hauptsächlich Peptidsequenzen gebunden, die in räumlicher Nähe zu den aktiven Zentren der beiden redox-aktiven Domänen liegen. Im Gegensatz zu PDI werden bei ERp57 fast ausschließlich Sequenzbereiche der katalytischen PWCGHC-Konsensussequenz sowie benachbarte Reste der **a'**-Domäne gebunden (s. Abb. 60). Dagegen werden hauptsächlich Sequenzen der *cis*-Prolin Schleife erkannt, welche aus der **a**-Domäne von ERp57 abgeleitet sind (vgl. Abb. 58).

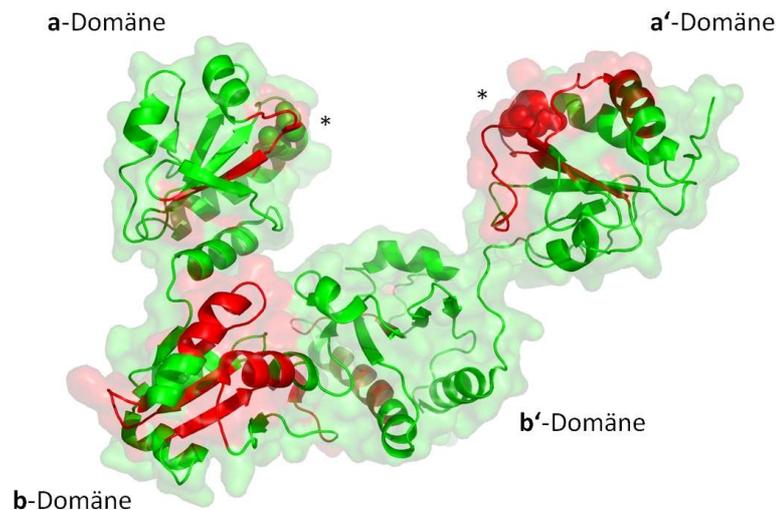


Abbildung 60: ERp57-Bindungsepitope. Nur wenige der von den verschiedenen PDIs gebundenen Sequenzbereiche lassen sich der **a**-Domäne von ERp57 zuordnen. Ein Großteil der gebundenen Peptide entstammt der **a'**-Domäne. Hierbei werden insbesondere die Reste des aktiven Zentrums (*) mit dem PWCGHC-Motiv sowie die dazu räumlich benachbarten hydrophoben Bereiche gebunden. Das PWCGHC-Motiv der **a**-Domäne wird hingegen nicht gebunden. Neben Sequenzbereichen der redox-aktiven Domänen werden, in Analogie zu PDI, auch Peptide des ERp57 **bb'**-Fragmentes gebunden. Gebundene Peptidsequenzen sind in rot gekennzeichnet. Die Cys des aktiven Zentrums sind als Kugel-Modell dargestellt. pdb: 3f8u [98].

Analog zu PDI, werden auch diejenigen Sequenzbereiche bevorzugt gebunden, welche dem **bb'**-Fragment von ERp57 zugeordnet werden können. Hierbei werden hauptsächlich die basischen Reste auf der Oberfläche der **b'**-Domäne gebunden, die auch bei der Interaktion von ERp57 mit Calnexin bzw. Calreticulin beteiligt sind (s. Abb. 61); [31, 116, 119]. Es kann

daher angenommen werden, dass diejenigen Bereiche der **b'**-Domäne, die für die Interaktion von ERp57 mit Crt/Cnx verantwortlich sind, auch bei der Interaktion mit weiteren PDIs beteiligt sind. Obwohl sich die **bb'**-Fragmente von PDI und ERp57 in ihrer Aminosäuresequenz signifikant voneinander unterscheiden, zeigen die von den verschiedenen PDIs gebundenen Sequenzbereiche bemerkenswerte räumliche Übereinstimmungen (vgl. Abb. 58 und Abb. 60). Dies betrifft v.a. die zur Substratbindungstasche auf der räumlich gegenüberliegenden Seite gelegenen Sequenzabschnitte des **bb'**-Fragmentes. Dies lässt vermuten, dass die Aminosäuresequenzen jener Bereiche des **bb'**-Fragmentes evolutionär für eine Interaktion mit ER-Chaperonen optimiert wurden.

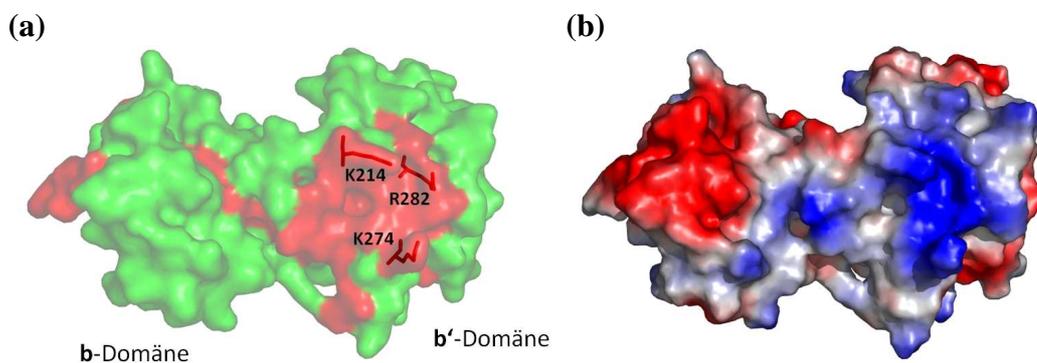


Abbildung 61: Ladungsverteilung der gebundenen Sequenzen des **bb'-Fragmentes von ERp57.** Die von den PDIs gebundenen Peptidsequenzen entfallen hauptsächlich auf die basischen Reste der **b'**-Domäne (K214, K274 und R282; Stäbchen-Modell), welche bei der Interaktion mit Calreticulin beteiligt sind (a). In Analogie zur **b'**-Domäne von PDI werden negativ geladene Sequenzen nicht gebunden. In (c) ist das elektrostatische Oberflächenpotential des **bb'**-Fragmentes (negatives Potential = rot; positives Potential = blau) gezeigt. Die gebundenen Peptidsequenzen sind in rot gekennzeichnet. pdb: 3f8u [98].

3.7.7.5. Calnexin-Bindungsepitope

Die Übertragung der durch die verschiedenen PDIs gebundenen Peptidsequenzen auf die dreidimensionale Struktur von Calnexin zeigt, dass verstärkt die Bereiche der globulären Domäne gebunden werden, welche die Glucose-Bindestelle (mit den Resten E217, Y186, M189, K167, E426 und Y165) enthalten (s. Abb. 62); [29]. Zudem interagieren die PDIs mit Sequenzen, welche die labile Disulfidbrücke enthalten. Diese befindet sich räumlich gesehen unterhalb der Glucose-Bindestelle der globulären Domäne und trägt ebenfalls zur Substratbindung bei (s. Abb. 62); [88]. Auf der gegenüberliegenden Seite der globulären Domäne wird ein zweiter hydrophober Sequenzbereich gebunden. Dieser beinhaltet in der Struktur von Calnexin u.a. die Ca^{2+} -Bindestelle. Die Bindung von Ca^{2+} hat einen Einfluss auf die Konformation des gesamten Proteins [248].

Neben Peptiden der globulären Domäne von Calnexin werden von den untersuchten PDIs auch Sequenzbereiche des proximalen Teils des sogenannten P-Arms gebunden (s. Abb.

62). Die Interaktion mit diesen Peptiden ist jedoch relativ schwach. Der P-Arm setzt sich v.a. aus unstrukturierten Bereichen zusammen und ist reich an Pro-Resten. Wie aus Abb. 63 ersichtlich ist, interagieren die meisten der untersuchten PDIs mit den proximalen Bereichen des P-Arms, die ein positives elektrostatisches Potential tragen. Dagegen interagiert ERp29 mit Peptidsequenzen des proximalen sowie des distalen P-Arms, welche stark negative Ladungen tragen. ERp29 bindet zudem verstärkt diejenigen negativ geladenen Sequenzbereiche der Spitze des P-Arms, die auch bei der Interaktion von Calreticulin mit ERp57 beteiligt sind (s. Abb. 63); [31].

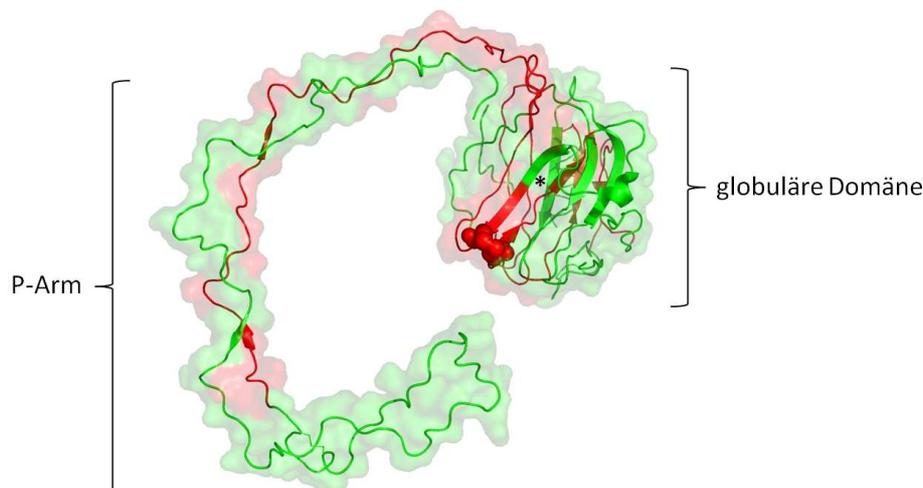


Abbildung 62: Calnexin-Bindungsepitope. Die Kartierung der von den verschiedenen PDIs gebundenen Peptide auf der dreidimensionalen Struktur der lumenalen Domänen von Calnexin lässt erkennen, dass verstärkt Sequenzbereiche der globulären Domäne in unmittelbarer Nachbarschaft zur Glucose-Bindestelle (*) gebunden werden. Darüber hinaus tritt eine Bindung an Sequenzbereiche v.a. des proximalen Abschnittes der P-Arms auf. Die Interaktion der PDIs mit Peptiden, welche dem P-Arm von Calnexin entstammen ist jedoch relativ schwach. ERp57 bindet dagegen ausschließlich an Sequenzbereiche der globulären Domäne. Die Oberfläche aller gebundenen Sequenzen ist in rot wiedergegeben. Die labile Disulfidbrücke direkt unterhalb der Glucose-Bindestelle ist als Kugel-Modell dargestellt. pdb: 1jhn [29].

Entgegen den Erwartungen bindet ERp57 ausschließlich an die globuläre Domäne, insbesondere an Reste in Nachbarschaft der Glucose-Bindestelle. Eine Bindung von Sequenzbereichen des distalen Abschnittes des P-Arms, welcher bei der Interaktion von ERp57 mit Calreticulin beteiligt ist, tritt nicht auf. Die fehlende Interaktion von ERp57 mit diesen Bereichen lässt vermuten, dass 1. Die Interaktion von ERp57 mit der P-Domäne von Calreticulin auf der Existenz von multiplen niedrig-affinen Kontaktstellen zwischen beiden Proteinen beruht, die nur von strukturell intaktem Calreticulin bereitgestellt werden können. 2. ERp57 nur in Kooperation mit weiteren Chaperonen und/oder Cofaktoren (z.B. Ca^{2+}) mit Calreticulin interagiert. Dies geschieht möglicherweise nur in Anwesenheit von entfaltenen (glykosylierten) Substraten. 3. ERp57 an die N-terminale globuläre Domäne von Calreticulin

über hydrophobe Wechselwirkungen bindet, was wiederum zu konformationellen Änderungen innerhalb des Proteins führt und eine Interaktion mit dem P-Arm über elektrostatische Wechselwirkungen erlaubt. Des Weiteren wird vermutet, dass die globuläre Domäne von Cnx/Crt eine Polypeptid-Interaktionsstelle in der Nähe zur Glucose-Bindestelle enthält [248, 249]. Eine präferentielle Interaktion von PDIs mit diesem Bereich wäre ebenfalls denkbar.

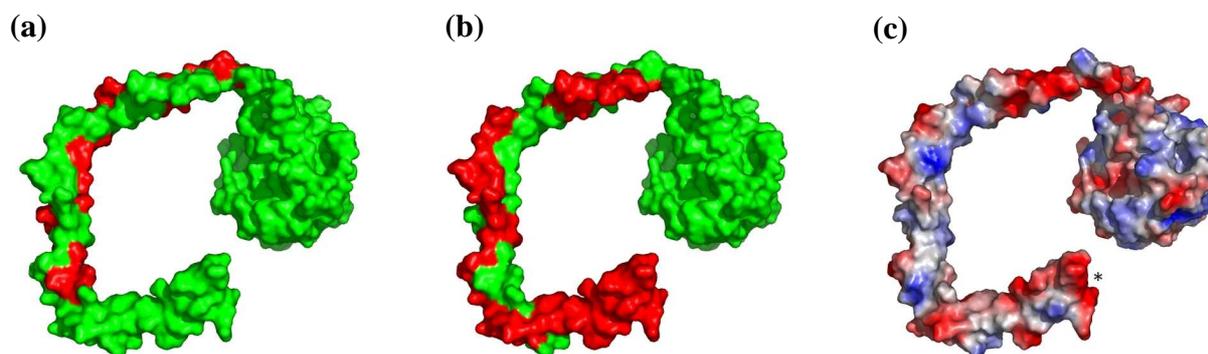


Abbildung 63: Ladungsverteilung der gebundenen Sequenzen des P-Arms von Calnexin. Nahezu alle untersuchten PDIs binden an proximale Bereiche des P-Arms von Cnx, welche ein positives elektrostatisches Potential tragen (a); (c). Die Interaktion mit diesen Peptiden ist jedoch relativ schwach. Dagegen interagiert ERp29 verstärkt mit Sequenzen der proximalen und distalen Bereiche des P-Arms (b). Die von ERp29 gebundenen Peptide besitzen i.R. eine negative Ladung (c). Die Reste des äußeren distalen Endes des P-Arms, welche von ERp29 gebunden werden, zeigen ebenfalls ein stark negatives elektrostatisches Potential und sind bei der Interaktion von Cnx/Crt mit der **b'**-Domäne von ERp57 beteiligt (*); [31]. Die von den PDIs gebundenen Sequenzbereiche sind jeweils in rot dargestellt. In (c) ist das elektrostatische Oberflächenpotential des P-Arms (negatives Potential = rot; positives Potential = blau) gezeigt. pdb: 1jhn [29].

3.7.7.6. *Ero1 α* -Bindungssepitope

Es konnte in neusten Studien gezeigt werden, dass *Ero1 α* in disulfidverknüpften Komplexen mit mehreren PDI-Familienmitgliedern und anderen ER-Chaperonen vorkommt (s. Tabelle 5, Anhang); [54]. Des Weiteren wurde eine direkte Interaktion von PDI mit *Ero1 α* *in vitro* nachgewiesen und es konnte gezeigt werden dass diese Interaktion hauptsächlich von der **b'**-Domäne von PDI vermittelt wird [46, 53]. Kürzlich wurde mittels *in silico*-Studien eine Interaktion der PD**Ib'**-Domäne mit einer β -*hairpin* Schleife von *Ero1 α* postuliert [250].

In Peptid-Bindungsstudien konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass alle untersuchten PDIs mit Sequenzen interagieren, die spezifischen Bereichen auf der Oberfläche von *Ero1 α* zugeordnet werden können (s. Abb. 64). Dies betrifft insbesondere die basischen Sequenzbereiche die räumlich unterhalb der regulatorischen Schleife liegen und für die ein Einfluss bei der Interaktion von PDI und ERp57 mit *Ero1 α* nachgewiesen werden konnte [53]. Des Weiteren interagieren alle PDIs verstärkt mit den hydrophoben Bereichen, welche die Nukleotid-Bindetasche (FAD/FADH₂-Bindetasche) bilden. Darüber hinaus konnte eine Interaktion mit den Sequenzbereichen nachgewiesen werden, die das CXXCXXC-Motiv

des katalytischen Zentrums enthalten bzw. zu diesem räumlich benachbart sind. Obgleich angenommen wird, dass PDI mit den Cys-Resten der regulatorischen Schleife (*shuttle*-Cysteine) intermolekulare Disulfidbrücken ausbildet und durch diese indirekt Oxidationsäquivalente auf PDI übertragen werden, konnte in der vorliegenden Arbeit keinerlei signifikante Interaktion der untersuchten PDIs mit Peptiden nachgewiesen werden, welche die *shuttle*-Cysteine der regulatorischen Schleife enthalten (vgl. [47, 48]).

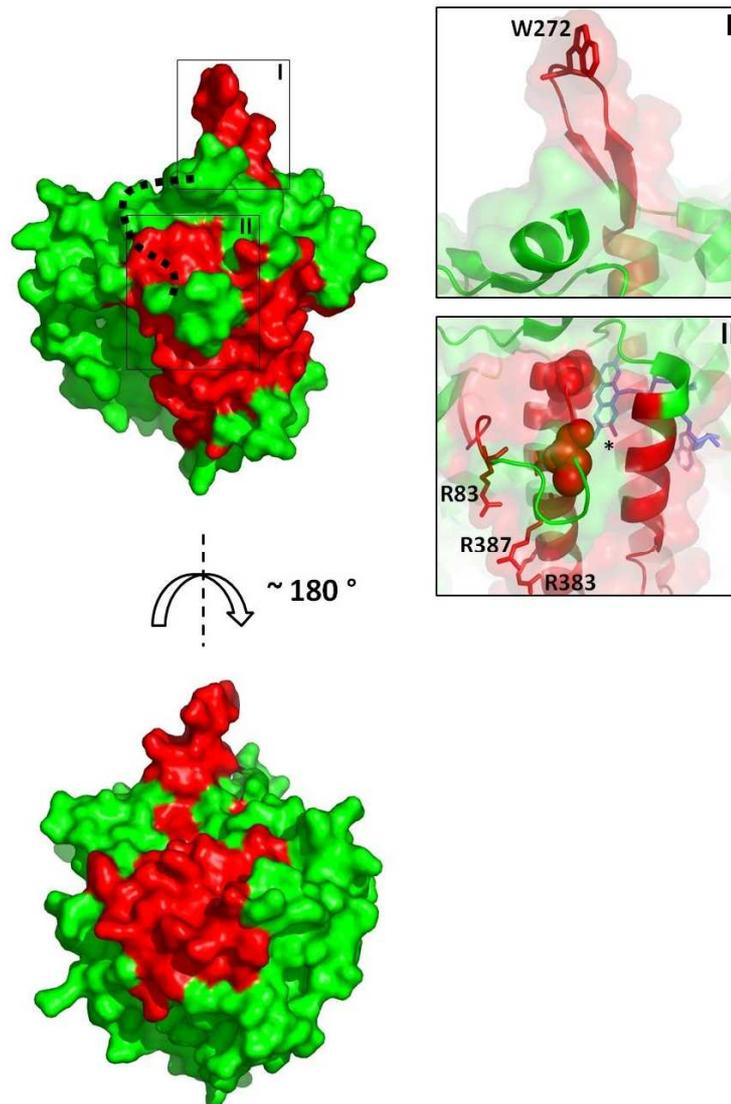


Abbildung 64: Ero1 α -Bindungsepitope. Gezeigt ist die dreidimensionale Struktur der Oberfläche von Ero1 α . Die untersuchten PDIs binden verstärkt an Peptide, welche die basischen Sequenzbereiche unterhalb der regulatorischen Schleife in der Nähe des aktiven Zentrums enthalten (II). Zusätzlich werden die Sequenzen einer hervorstehenden β -hairpin Schleife gebunden (I). Die Sequenzen weiterer gebundener Peptide lassen sich weiteren Bereichen auf der räumlich gegenüber liegenden Seite des Proteins zuordnen (Abb. unten). Die untere Abb. ist um ca. 180° im Vergleich zur oberen Abbildung gedreht. Die gebundenen Sequenzen wurden in rot dargestellt. Der FAD/FADH₂-Cofaktor ist in Abb. II in blau als Stäbchen-Modell gezeigt. Es konnte keine Interaktion mit Peptidsequenzen nachgewiesen werden, die der regulatorischen Schleife (unterbrochene Linie) entstammen. Die basischen Reste in der Nähe des aktiven Zentrums (II) sowie der konservierte Trp-Rest der β -hairpin Schleife (I) sind zusätzlich als Stäbchen-Modell hervorgehoben. Die Cys des CXXCXXC-Motivs des katalytischen Zentrums (*) sind in Abb. II als Kugel-Modell dargestellt. pdb: 3ahq [53].

Die hier erhaltenen Resultate implizieren, dass PDIs direkt mit den Cys-Resten des aktiven Zentrums interagieren können und durch diese oxidiert werden. Da die Cys-Reste des aktiven Zentrums von Ero1 α partiell in hydrophobe Bereiche des Proteins integriert und daher nicht zugänglich sind, ist eine konformationelle Strukturänderung dieser Regionen für eine Inteteraktion mit PDI notwendig. Eine derartige Konformationsänderung wurde bereits angenommen [46, 49, 51, 53]. Die Peptid-Bindungsstudien lassen ebenfalls vermuten, dass neben PDI auch weitere PDI-Familienmitglieder mit Ero1 α interagieren könnten.

3.7.7.7. BiP-Bindungsepitope

In *pull-down* Experimenten konnte eine Interaktion von PDIs mit BiP nachgewiesen werden [54]. Mittels der Peptid-Array Analyse sollten in der vorliegenden Arbeit mögliche Sequenzbereiche in der dreidimensionalen Struktur von BiP identifiziert werden, die bei der Interaktion mit PDIs beteiligt sein könnten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen PDIs eine starke Interaktion mit Peptiden zeigen, welche der N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) von BiP entstammen (s. Abb. 65).

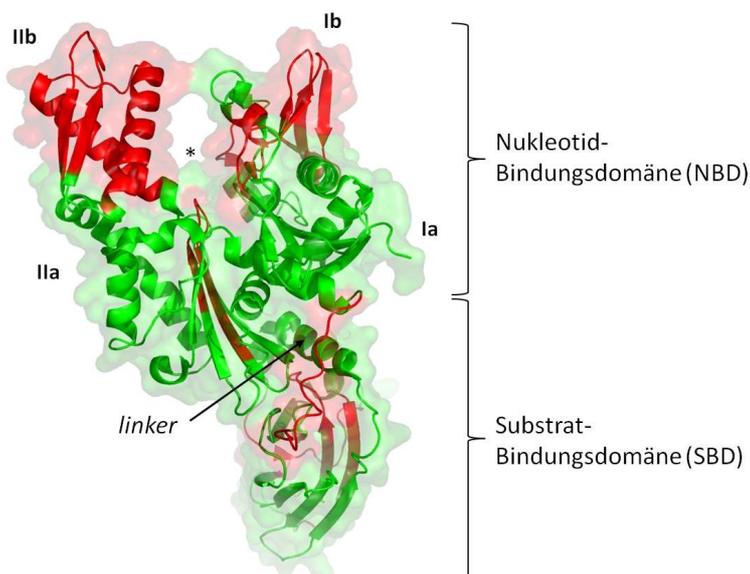


Abbildung 65: BiP-Bindungsepitope. Die von den PDIs gebundenen Sequenzbereiche entfallen v.a. auf die N-terminale Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD). Diese enthält die ATP/ADP Bindungstasche (*). Es werden hauptsächlich Sequenzbereiche der NBD gebunden, die mit den Sub-Domänen Ib und IIb überlappen. Diese Bereiche sind bei der Interaktion von BiP mit Co-Chaperonen bzw. Nukleotid-Austauschfaktoren beteiligt. Zudem werden Peptide gebunden, deren Sequenzen der C-terminalen Substrat-Bindungsdomäne (SBD) sowie der *linker*-Region zugeordnet werden können. Gebundene Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Gezeigt ist die dreidimensionale Struktur des Hitzeschock-verwandten (*heat shock cognate*) Proteins Hsc70. pdb: 1yuw [251].

Die NBD enthält die ATP/ADP-Bindestelle. Innerhalb der NBD werden v.a. die Reste der Sub-Domänen Ib und IIb gebunden. Diese Regionen sind u.a. bei der Interaktion von BiP

mit seinen Nukleotid-Austauschfaktoren und Co-Chaperonen beteiligt (s. Abschnitt 1.3.1.1.). Neben gebundenen Sequenzbereichen der NBD findet eine signifikante Interaktion der PDIs mit Peptiden statt, die der C-terminalen SBD sowie der *linker*-Region zwischen beiden Domänen entstammen (s. Abb. 65). Für die *linker*-Region ist bekannt, dass durch dessen Konformation die Interaktion von BiP mit Substraten beeinflusst wird [10]. Die Interaktion von BiP mit Co-Chaperonen und Nukleotid-Austauschfaktoren hängt zudem in hohem Maße von der Konformation der NBD ab [10]. Es wäre denkbar, dass eine Interaktion von PDIs mit den entsprechenden Regionen der NBD ebenfalls einen Einfluss auf den ATP/ADP-Austausch und damit auf die Substratinteraktion von BiP haben könnte.

3.8. Identifikation von Interaktionspartnern von ERp18 und ERp46 (*pull-down* Analyse)

3.8.1. Identifizierung von ERp18-Interaktionspartnern

Über die natürlichen Interaktionspartner der verschiedenen Mitglieder der PDI-Familie ist bisher nur wenig bekannt. Vor Kurzem konnten mehrere Interaktionspartner u.a. von ERp57, ERp46, P5 und ERp18 identifiziert werden [54]. In diesen Studien wurden allerdings ausschließlich kovalente disulfidverknüpfte PDI-Interaktionspartner mittels *Cystein-trapping*-Mutanten analysiert (s. Abschnitt 1.4.1.). In der vorliegenden Arbeit sollten daher auch nicht-kovalente Interaktionspartner von ausgewählten PDIs mittels *pull-down* Analysen identifiziert werden. Im Speziellen sollte die Substratinteraktion der katalytischen Domänen von ERp46 näher untersucht werden. Neben ERp46 wurde auch ERp18 für die *pull-down* Analysen ausgewählt, da es sich lediglich aus einer einzigen *trx*-ähnlichen katalytischen Domäne zusammensetzt. Störende "Nebeneffekte" von zusätzlichen Domänen sollten damit vermieden werden. Die identifizierten Interaktionspartner beider Proteine sollten im Anschluss miteinander verglichen werden.

Für die *pull-down* Analysen wurden Mikrosomenpräparationen aus murinen Lebergeweben verwendet (s. Abschnitt 2.2.2.12). In diesen sollten die ER-Proteine in angereicherter Form vorliegen. Die Mikrosomen wurden unter reduzierenden Bedingungen durch Detergenzien aufgeschlossen und mit an CNBr-Sepharose immobilisierten PDIs inkubiert. Die Immobilisierung führt wiederum zu einer Erhöhung der Bindungsstärke durch lokal höhere Protein-Konzentrationen. Nach mehreren Waschschritten der Matrix konnten die gebundenen Proteine unter denaturierenden Bedingungen eluiert werden. Die Waschschrritte wurden für eine ausreichend spezifische Bindung, bei gleichzeitiger möglichst geringer Kontamination mit unspezifisch interagierenden Proteinen, optimiert. Als Kontrolle für

unspezifische Bindungen wurde stets immobilisiertes GST verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse der gebundenen Proteine mittels diskontinuierlicher 2D-PAGE (s. Abb. 66).

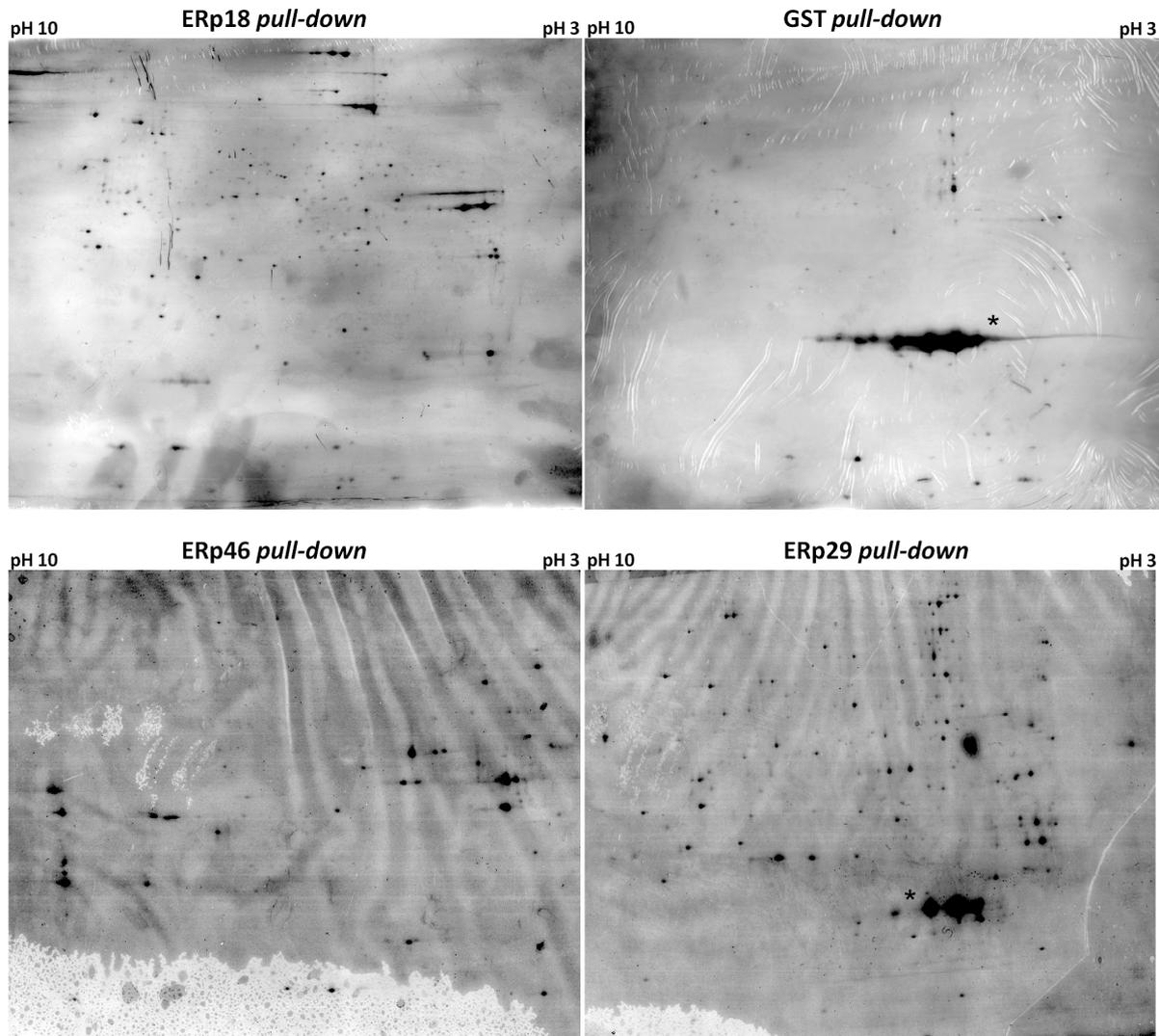


Abbildung 66: ERp18- und ERp46-pull-down. Mikrosomale Proteine aus muriner Leber wurden mit immobilisiertem ERp18, ERp46, ERp29 bzw. GST inkubiert. Es konnten 34 spezifische Protein-*spots* für ERp18 bzw. 23 spezifische *spots* für ERp46 mittels *pull-down* Analyse und nachfolgender Auftrennung der eluierten Proteine im 2D-SDS-PA-Gel identifiziert werden. Identische *spots*, welche durch GST gebundene Proteine darstellen, kamen für die weitere Analyse nicht in Betracht. Die für ERp18 und ERp46 als einzigartig identifizierten *spots* wurden anschließend aus dem Gel gepickt und massenspektrometrisch analysiert. Im Vergleich zur GST-Kontrolle konnten für ERp18 und ERp46 weitaus mehr Protein-*spots* gefunden werden, was auf eine Spezifität der Proteinbindung hindeutet. Verwendet wurden diskontinuierliche Gele (25,5 cm x 20 cm) mit einem PA-Gradienten von 5-15 % (v/v) und einem nicht-linearen pH-Bereich von 3-10. Die Färbung der Protein-*spots* erfolgte mittels kolloidalem Coomassie. Die Gele wurden anschließend in ddH₂O bis zum gewünschten Grad entfärbt und für die Auswertung digitalisiert. Die mit (*) gekennzeichneten Protein-*spots* stellen dimeres GST bzw. ERp29 dar. Für ERp18 und ERp46 konnten keine dimeren Proteine detektiert werden.

Durch Vergleich der *spot*-Muster zwischen den PDIs und der GST-Kontrolle wurden identische *spots* für die weitere Analyse ausgeschlossen. Mit dieser Methode konnten für ERp18 34 spezifische *spots* und für ERp46 23 spezifische *spots* identifiziert werden. Für

ERp29 konnten in früheren Arbeiten 72 spezifische *spots* detektiert werden. Die unterschiedliche Anzahl an gebundenen Proteinen spiegelt die verschiedenen Substrat-Bindungskapazitäten der jeweiligen PDIs wider. Im Vergleich zur GST-Kontrolle binden PDIs an eine größere Anzahl mikrosomaler Proteine. Die identifizierten *spots* wurden anschließend aus dem Gel herausgetrennt und massenspektrometrisch analysiert (durchgeführt in der Arbeitsgruppe Dr. H. Urlaub; Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie; Göttingen). Die Proteine wurden proteolytisch verdaut und die Peptidsequenz durch Bestimmung der molekularen Massen der Bruchstücke identifiziert. Die Peptide wurden im Folgenden mittels einer Datenbankanalyse (MASCOT) nach ihrem Vorkommen in Proteinen untersucht. Durch die Analyse konnten sowohl Proteine des ER-Lumens als auch sekretorische Proteine identifiziert werden. Membranproteine lassen sich dagegen auf Grund ihres hydrophoben Charakters durch die verwendete Methode nur schwer identifizieren. Einige der für ERp18 und ERp46 identifizierten Interaktionspartner sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 gezeigt. Die identifizierten Proteine wurden anschließend hinsichtlich ihrer Funktion sowie zellulären Lokalisation geordnet (s. Abb. 67 und Tabelle 3).

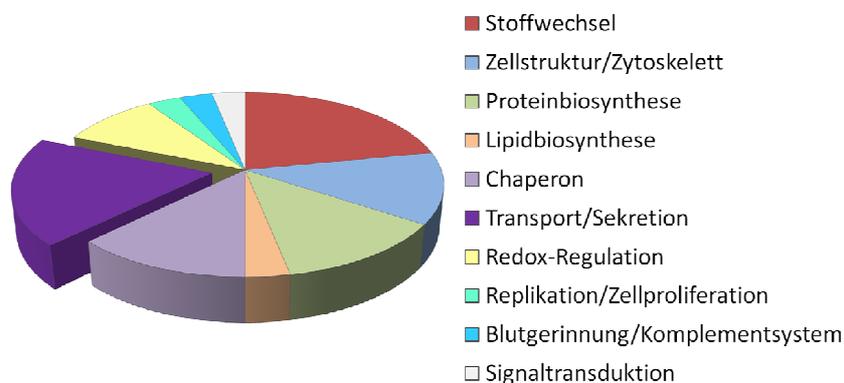


Abbildung 67: Klassifizierung der mit ERp18 interagierenden Proteine. Die mittels pull-down Analyse identifizierten Interaktionspartner von ERp18 wurden entsprechend ihrer Funktion innerhalb der Zelle (s. Legende rechts) untergliedert. Für ERp18 konnten 34 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Ein Großteil entfällt auf Proteine des Stoffwechsels, der Proteinbiosynthese und Komponenten des Zytoskeletts. Des Weiteren konnten mehrere Proteine des sekretorischen Weges (Transport/Sekretion) als Interaktionspartner von ERp18 identifiziert werden (herausgenommener Abschnitt im Diagramm).

Ein Großteil der gefundenen Proteine entstammt dem ER/Golgi-Netzwerk bzw. ist Membran-assoziiert (Proteine des intrazellulären Membransystems). Darüber hinaus wurden sekretorische und mitochondriale Proteine sowie Proteine des Zellkerns gefunden. Ein geringer Teil der identifizierten Proteine konnte dem Cytoplasma zugeordnet werden. In diesem Fall handelt es sich vermutlich um Proteine, die auch mit Membranproteinen

assoziiert vorliegen können und bei der Mikrosomenpräparation innerhalb der Mikrosomen eingeschlossen wurden. Derartige Kontaminationen wurden im Weiteren nicht berücksichtigt.

Protein-Name	Gen-Name	UniProt-Nummer	N (Peptide)	Lokalisation	Allgemeine Funktion
Östradiol-1/-beta-Dehydrogenase	<i>Akr1c6</i>	P70694	12	ER	Lipidbiosynthese
Chaperonin-enthaltendes Tcp1, Untereinheit 6a (Zeta), (Gamma)	<i>Cct6a</i> , <i>mCG</i> <i>8828</i>	Q52KG9, Q3U4U6	18	Cytoplasma, Mitochondrien	Chaperon
DnaJ (Hsp40)-Homologe, Subfamilie A-Mitglied 1	<i>mCG</i> <i>9817</i>	Q5NTY0	5	Cytoplasma, Membran	Chaperon
Poly(rC)-bindendes Protein 1	<i>Pcbp1</i>	P60335	8	Nucleus, Cytoplasma	Proteinbiosynthese, Chaperon
SEC23A, SEC23B, SEC13-ähnliche 1 Isoform b	<i>Sec23a</i> , <i>Sec23b</i>	Q01405, A2ANA0	136	ER, Golgi	Transport, Sekretion
Dynamamin-ähnliches Protein	<i>Dnm2</i>	Q3T9X3	72	ER, Golgi	Transport, Sekretion
Vesikel-fusionierende ATPase	<i>Nsf</i>	P46460	16	ER, Golgi	Transport, Sekretion
Peroxiredoxin 1	<i>Prdx1</i>	P35700	24	ER, Mitochondrien	Redox-Regulation
Aldehyd-Dehydrogenase 16-Familienmitglied A1, Isoform a	<i>Aldh16a1</i>	Q571I9	12	ER	Stoffwechsel, Redox-Regulation
Plasminogen	<i>Plg</i>	P20918	34	sekretiert	Blutgerinnung, Komplementsystem
Elongationsfaktor-1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	P10126	21	Cytoplasma	Proteinbiosynthese
ATP-abhängige RNA-Helicase DDX1	<i>Ddx1</i>	Q91VR5	28	Cytoplasma*, Nucleus	Replikation, Zellproliferation

Tabelle 3: Identifizierte Interaktionspartner von ERp18. In der Tabelle sind einige der mittels *pull-down* Analyse gefundenen Interaktionspartner von ERp18 beispielhaft zusammengefasst. Insgesamt konnten 31 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Proteine, welche dem ER/Golgi-Netzwerk entstammen bzw. Membran-assoziiert sind (Proteine des intrazellulären Membransystems). Darüber hinaus wurden sekretorische und mitochondriale Proteine sowie Proteine des Zellkerns gefunden. Ein geringer Teil der identifizierten Proteine konnte dem Cytoplasma zugeordnet werden. In diesem Fall handelt es sich vermutlich um Proteine, die auch mit Membranproteinen assoziiert vorliegen können und bei der Mikrosomenpräparation innerhalb der Mikrosomen eingeschlossen wurden. Die ATP-abhängige RNA-Helicase DDX1 kommt verstärkt bei Zellstress in cytoplasmatischen Granula (*) vor. Die Tabelle zeigt sowohl die Protein-Namen als auch die dazugehörigen eindeutigen Gen-Bezeichnungen. Des Weiteren sind die Zugangsnummern (UniProt-Nr.) sowie die Anzahl der identifizierten Peptide (N(Peptide)) angegeben. Die Angaben zur Lokalisation und Funktion der Proteine wurden größtenteils der *Swiss-Prot*-Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot/>, Release 55.4) entnommen.

Eine genauere Analyse der gebundenen Proteine zeigt, dass ERp18 v.a. mit Proteinen des sekretorischen Weges interagiert (s. Tabelle 3). ERp18 interagiert mit den vesikulären Transportproteinen SEC13 und SEC23. Des Weiteren wurde ein Dynamamin-verwandtes Protein sowie eine Vesikel-fusionierende ATPase als Interaktionspartner von ERp18 identifiziert. SEC23- und SEC13- Proteine kommen in der Hülle der sekretorischen (exozytotischen) Vesikeln, den so genannten COPII-Vesikeln, vor. Dynamamin und Vesikel-fusionierende

ATPasen spielen eine Rolle bei der (z.T. ATP-abhängigen) Vesikel-Fusionierung mit anderen Zellkompartimenten und der Zellmembran. Hervorgehoben werden sollte ebenfalls die Interaktion von ERp18 mit der mitochondrialen Peroxidase Peroxiredoxin 1. Eine Isoform konnte ebenfalls innerhalb des ER gefunden werden. Es ist bekannt, dass Peroxiredoxine nicht nur eine Rolle bei der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie z.B. H₂O₂, in der Zelle spielen, sondern darüber hinaus bei der oxidativen Proteinfaltung beteiligt sind [57, 152]. Kürzlich konnte eine Interaktion von Peroxiredoxin auch für weitere PDI-Familienmitglieder, wie beispielsweise P5, nachgewiesen werden [54].

Im Falle von ERp18 konnte kürzlich auch eine kovalente Interaktion mit dem Pentraxin-verwandten Protein PTX3, einer Komponente der Komplement-Kaskade, gefunden werden [54]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Bindung von ERp18 an Plasminogen nachgewiesen werden. Plasmin spielt nicht nur eine Rolle bei der Auflösung von Fibrin-Polymeren in Blutgerinnseln, sondern hat auch eine Bedeutung als proteolytischer Aktivator von verschiedenen Zymogenen des Komplementsystems, wie z.B. den Faktoren C1 und C5. Der Nachweis von Plasminogen als Resultat von Kontaminationen mit Blut während der Mikrosomenpräparation, kann ausgeschlossen werden. Das Lebergewebe wurde perfundiert und mehrmals gespült. Des Weiteren wurden alle Mikrosomenpräparationen für die jeweiligen *pull-down* Studien unter identischen Bedingungen durchgeführt. Plasminogen konnte jedoch nicht als Bindungspartner von ERp29 und ERp46 identifiziert werden, was auf eine spezifische Interaktion mit ERp18 hindeutet.

Darüber hinaus interagiert ERp18 nur mit einer vergleichsweise geringen Zahl an Co-Chaperonen (s. Tabelle 3). Bemerkenswert ist, dass ebenfalls eine große Anzahl an Proteinen identifiziert wurden, welche Komponenten des Zytoskeletts darstellen (s. Abb. 67). Ob es sich hierbei um eingeschlossene cytosolische Kontaminationen handelt ist unklar. Denkbar wäre auch eine spezifische Interaktion dieser Proteine mit Vesikeln des sekretorischen Weges während ihres Transports zwischen den Zellkompartimenten. Die ATP-abhängige RNA-Helicase DDX1 kommt verstärkt bei Zellstress in cytoplasmatischen Granula vor. Auf der anderen Seite wurde keine Interaktion von ERp18 mit redox-regulatorischen Proteinen wie Ero1 α , weiteren Peroxiredoxinen und PDIs gefunden. Auch einige spezifische ERp18-Interaktionspartner, die in einer aktuellen Studie identifiziert wurden, konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (vgl. [54]). Hierbei handelte es sich jedoch um Interaktionspartner, welche mit ERp18 kovalent über Disulfidbrücken verknüpft sind (*Cystein-trapping* Methode). Dagegen erfolgte der *pull-down* in der vorliegenden Arbeit unter reduzierenden Bedingungen, so dass eine Bindung durch Disulfidbrücken ausgeschlossen werden kann.

3.8.2. Vergleichende Analyse der Substratinteraktion von ERp46 und ERp29

Im Gegensatz zur ERp18 wurden für ERp46 hauptsächlich Translationsfaktoren (z.B. Elongationsfaktor 1 α), Chaperone (z.B. DnaJ (Hsp40)-Homologe) aber auch vesikuläre Proteine (z.B. SEC23A) als Interaktionspartner identifiziert. Diese Proteine konnten u.a. auch als spezifische Interaktionspartner von ERp29 gefunden werden, was wiederum auf eine gewisse Redundanz bei der Substratinteraktion hindeutet (Daten nicht gezeigt). Im Unterschied zu ERp18 konnte für ERp46 und ERp29 eine Interaktion mit BiP nachgewiesen werden. ERp46 bindet darüber hinaus auch an das hsc71-Homologe (s. Tabelle 4).

Protein-Name	Gen-Name	UniProt-Nummer	N (Peptide)	Lokalisation	Allgemeine Funktion
Elongationsfaktor-1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>	P10126	24	Cytoplasma	Proteinbiosynthese
BiP	<i>Hspa5</i>	P20029	54	ER	Chaperon
Hsp71-verwandtes Protein (hsc71)	<i>Hspa8</i>	P63017	28	Cytoplasma, Melanosomen	Chaperon
SEC23A	<i>Sec23a</i>	Q01405	15	ER, Golgi	Transport, Sekretion
DnaJ (Hsp40)-Homologe, Subfamilie A-Mitglied 1	<i>mCG9817</i>	Q5NTY0	5	Cytoplasma, Membran	Chaperon
Peroxisomale Sarcosin-Oxidase	<i>Pipox</i>	Q9D826	6	Peroxisomen	Stoffwechsel, Redox-Regulation
4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase	<i>Hpd</i>	P49429	2	Cytoplasma, Membran	Stoffwechsel, Redox-Regulation
ATP-abhängige RNA-Helicase DDX1	<i>Ddx1</i>	Q91VR5	28	Cytoplasma*, Nucleus	Replikation, Zellproliferation
<i>Major vault protein</i>	<i>Mvp</i>	Q922X6	44	Kernpore, Cytoplasma	Signaltransduktion, Transport

Tabelle 4: Identifizierte Interaktionspartner von ERp46. *Pull-down* Analysen zeigen eine spezifische Interaktion von ERp46 mit 24 mikrosomalen Proteinen. Dies sind v.a. Proteine des Stoffwechsels und der Redox-Regulation, aber auch verschiedene Chaperone. Im Gegensatz zu ERp18 konnte nur SEC23A als potentieller Bindungspartner von ERp46 identifiziert werden. Eine Interaktion von ERp46 mit Peroxiredoxin-4, welche in neusten Studien beschrieben wurde, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (vgl. [54]). Dies beruht vermutlich auf der Anwendung von reduzierenden Bedingungen während des *pull-down*. Die Tabelle zeigt sowohl die Protein-Namen als auch die dazugehörigen eindeutigen Gen-Bezeichnungen. Des Weiteren sind die Zugangsnummern (UniProt-Nr.) sowie die Anzahl der identifizierten Peptide (N(Peptide)) angegeben. Die Angaben zur Lokalisation und Funktion der Proteine wurden größtenteils der *Swiss-Prot*-Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot/>, Release 55.4; [211]) entnommen. Zu (*) s. Tabelle 3.

In früheren *pull-down* Studien konnte gezeigt werden, dass ERp29 auch mit den ER-Chaperonen Calreticulin und weiteren PDIs interagiert [142]. ERp18 und ERp46 zeigen dagegen in *pull-down* Studien der vorliegenden Arbeit keine Interaktion mit Crt. Die alleinige Bindung von ERp29 an Crt lässt sich in Analogie zu den Ergebnissen der Peptid-Bindungsanalysen interpretieren. In diesem Fall ist ERp29 das einzige PDI-Familienmitglied, das an die stark sauren Bereiche des P-Arms von Crt bindet. Diese verstärkte Assoziation über elektrostatische Wechselwirkungen macht den ERp29-Crt Komplex vermutlich stabiler. Die schwächeren hydrophoben Wechselwirkungen mit der Crt Kopf-Domäne und den anderen

PDI reicht wahrscheinlich nicht für den Nachweis mittels *pull-down* Analysen aus. Auch im Falle von ERp46 beruht die fehlende Interaktion mit Ero1 α und Peroxiredoxin vermutlich auf den reduzierenden Bedingungen, unter denen der *pull-down* durchgeführt wurde (vgl. [54]).

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass durch ein optimiertes *pull-down* Verfahren mit immobilisierten PDIs auch deren nicht-kovalent interagierende Substrate identifiziert werden können. Diese Methode macht eine kovalente Verknüpfung der PDI-Interaktionspartner z.B. mittels *cross-linking* oder Cystein-*trapping*-Mutationen überflüssig. Zusätzlich verdeutlichen die hier gewonnenen Ergebnisse die vorhandene Redundanz in der Substratbindung von PDIs, zeigen auf der anderen Seite aber auch eindeutige Unterschiede in deren Substratspezifität.

3.9. Identifikation und Charakterisierung von niedermolekularen PDI-Liganden

3.9.1. *In vitro*-screening mittels Peptid-Arrays

Für ERp29 konnten kürzlich durch *in silico*-Analysen mehrere tausend niedermolekulare Substanzen identifiziert werden, die potentielle Liganden des Proteins darstellen. Folgende *in vitro screening*-Experimente von etwa 200 dieser Substanzen mittels Peptid-Arrays, zeigten eine mögliche Inhibierung der Peptid-Bindung von ERp29 durch fünf der getesteten Substanzen [142]. Mit *Chicago Sky Blue* (CSB; s. Abb. 69) konnte im Rahmen dieser Arbeit eine strukturell homologe Verbindung identifiziert werden, welche eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufweist und die Bindung von PDI an Modell-Peptide ebenfalls inhibiert (s. Abb. 68).

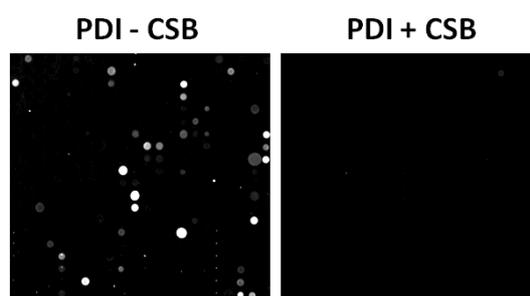
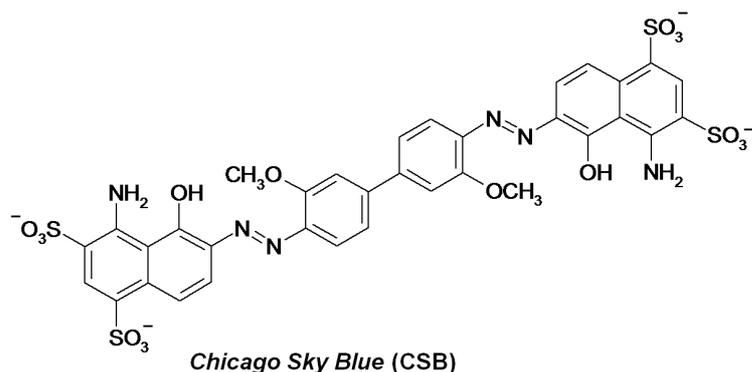


Abbildung 68: Inhibierung der Peptid-Interaktion von PDI durch CSB. Durch *in vitro screening*-Experimente mittels Peptid-Arrays konnte CSB als potentieller PDI-Inhibitor identifiziert werden. Im Vergleich zur Kontrolle (PDI ohne CSB, links) verringert die Zugabe von CSB die Fähigkeit von PDI zur Interaktion mit Peptiden (rechts). Die Inhibierung der Peptid-Bindung ist exemplarisch für PDI gezeigt, konnte jedoch auch für weitere PDIs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es wurden jeweils 0,5 μM fluoreszenzmarkiertes PDI sowie 1 μM CSB verwendet. Die Peptid-Arrays wurden nach der Inkubation, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, mehrfach gewaschen. Eine Präzipitation des Proteins durch CSB trat nicht auf. Der Grad der Inhibierung der Peptid-Interaktion konnte jedoch nur qualitativ bestimmt werden, da Kontroll-Experimente eine signifikante Signalverminderung der Fluoreszenzintensität (*quench*-Effekt) durch CSB ab einer Konzentration von ca. 10 μM zeigten (Daten nicht gezeigt). Der Peptid-Array enthielt 130 Modell-Peptide, für die eine Bindung an ERp29 beschrieben wurde.

Die chemische Struktur von CSB setzt sich aus einem aromatischen, polycyclischen Grundgerüst mit mehreren funktionellen Gruppen zusammen (s. Abb. 69). Damit zeigt CSB die charakteristischen strukturellen Eigenschaften von bisher identifizierten niedermolekularen PDI-Inhibitoren [126]. Die chemischen Substanzen wurden vom *National Cancer Institute* (NCI, USA) in Form von 96-well Aliquots zur Verfügung gestellt. CSB wurde kommerziell erworben.



Tetra-Natrium-6,6'-[(3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4-amino-5-hydroxynaphthalen-1,3-disulfonat]

Abbildung 69: Chemische Struktur des potentiellen PDI-Inhibitors *Chicago Sky Blue* (CSB). CSB (Protamin Sky Blue; Direct Blue; Evans Blue) gehört zur Klasse der Azofarbstoffe und setzt sich molekular aus einem polycyclischen aromatischen Grundgerüst (Naphthyl- und Biphenyl-Rest) mit Amino-, Hydroxy- und Sulfonsäure-Gruppen zusammen. Darüber hinaus enthält CSB zwei Methoxy-Gruppen. Die Gesamtladung des Moleküls beträgt -4. Das Azobenzidin-Grundgerüst kann jedoch innerhalb des Organismus zu cancerogenen aromatischen Aminen metabolisiert werden.

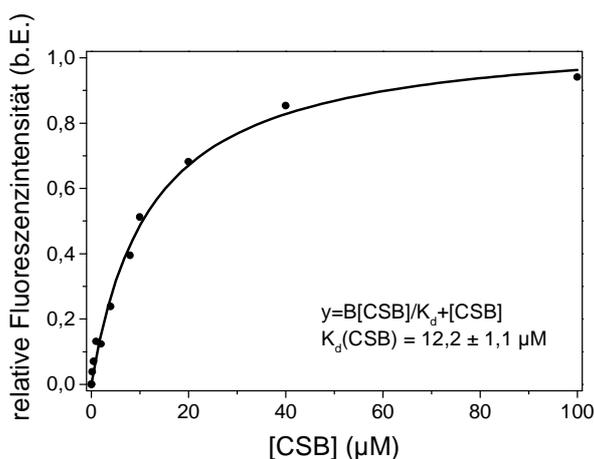
Nachfolgende Kontroll-Experimente zeigten eine signifikante Signalverminderung der Fluoreszenzintensität (*quench*-Effekt) durch CSB ab einer Konzentration von ca. 10 μM (Daten nicht gezeigt). Da für die Inhibierungsstudien die Substanzen mit einer Konzentration von nur 1 μM eingesetzt wurden, spielt der *quench*-Effekt für die qualitativ getroffenen Aussagen vermutlich keine Rolle. Eine quantitative Auswertung der Inhibierung der Peptid-Bindung von PDIs ist mit dieser Methode daher nicht möglich.

3.9.2. Analyse der Bindungsspezifität

Es sollte nunmehr eine direkte Interaktion von CSB mit PDIs nachgewiesen werden. Die Analyse der Bindung von CSB an PDI mittels Fluoreszenzspektroskopie zeigte eine moderate bis schwache Interaktion. Die apparenten Dissoziationskonstante lag bei ca. 12,2 μM (s. Abb. 70). Die realen Dissoziationskonstanten konnten jedoch nicht ermittelt werden, da CSB auf Grund der geringen Löslichkeit nicht im Überschuss eingesetzt werden konnte. Auch die Verwendung höherer Proteinkonzentrationen scheitert am Auftreten von PDI-CSB-Aggregaten.

Für CSB konnte zudem eine direkte Interaktion mit PDIs durch Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Hierbei wurden die verschiedenen PDIs an eine CSB-Sepharose-Matrix gebunden (s. Abb. 70). Die Stärke der Bindung an CSB variiert bei den einzelnen PDIs und hängt vermutlich von deren Oberflächeneigenschaften ab. Über die genaue Spezifität der Interaktion kann nur spekuliert werden, da für eine Vielzahl an niedermolekularen und hydrophoben Substanzen eine Bindung an PDI detektiert werden konnte (s. Abschnitt 1.8.).

(a)



(b)

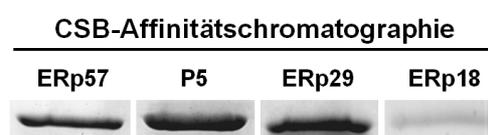


Abbildung 70: Interaktion von CSB mit PDIs. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde die Interaktion von CSB mit PDI analysiert (a). Die Interaktion ist relativ schwach mit einer apparenten Dissoziationskonstante von ca. 12,2 µM. Die reale Gleichgewichtskonstante konnte jedoch auf Grund von Löslichkeitsproblemen mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Für die Fluoreszenzmessungen wurden jeweils 2 µM PDI und verschiedene CSB-Konzentrationen eingesetzt. Gemessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm. Der *fit* der Messwerte erfolgte durch eine hyperbolische Funktion unter Annahme einer Sättigung der Bindung. Die verschiedenen PDIs binden zudem direkt an CNBr-Sepharose gekoppeltes CSB (b). Die Stärke der Bindung an CSB variiert bei den einzelnen PDIs und hängt vermutlich von deren Oberflächeneigenschaften ab. Die einzelne a-Domäne von ERp18 bindet CSB am schwächsten. Für die jeweiligen PDIs wurden identische Proteinmengen eingesetzt. Die CSB-Sepharose-Matrix wurde mehrfach, wie unter Materialien und Methoden beschrieben, gewaschen. Eluiert wurde mittels SDS-Ladepuffer. Die Proben wurden anschließend auf ein 12 %iges SDS-PA-Gel aufgetragen und mittels Coomassie detektiert.

3.9.3. Einfluss auf die katalytische Aktivität

Um den Einfluss von CSB auf die katalytische Aktivität von PDI zu untersuchen, wurde der RNase-Rückfaltungstest angewandt. Hierbei zeigt CSB eine konzentrationsabhängige Inhibierung der PDI-katalysierten oxidativen Rückfaltung von RNase A (s. Abb. 71). Bei einer Konzentration von ca. 50 µM CSB beträgt die Renaturierungsausbeute noch ca. 18 %. Die halbmaximale Inhibierung der katalytischen Aktivität von PDI durch CSB (IC₅₀-Wert) beträgt ca. 26 µM (s. Abb. 71). CSB stellt somit einen moderaten bis schwachen Inhibitor für die Oxidase-Aktivität von PDI dar. Der Einfluss von CSB auf die Reduktase-Aktivität von PDI konnte nicht untersucht werden, da CSB im Insulin-Reduktionstest zur Präzipitation von Insulin und/oder PDI führt. Auf der anderen Seite konnte unter den

Bedingungen der RNase-Renaturierung keine Präzipitation beobachtet werden und die gemessene Proteinkonzentration änderte sich nicht (Daten nicht gezeigt). Der pH-Wert bei 50 μM CSB änderte sich im Reaktionsansatz ebenfalls kaum. Die eigentliche, durch RNase A katalysierte Reaktion der Spaltung von cCMP zu CMP, wird durch CSB ebenfalls nicht negativ beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

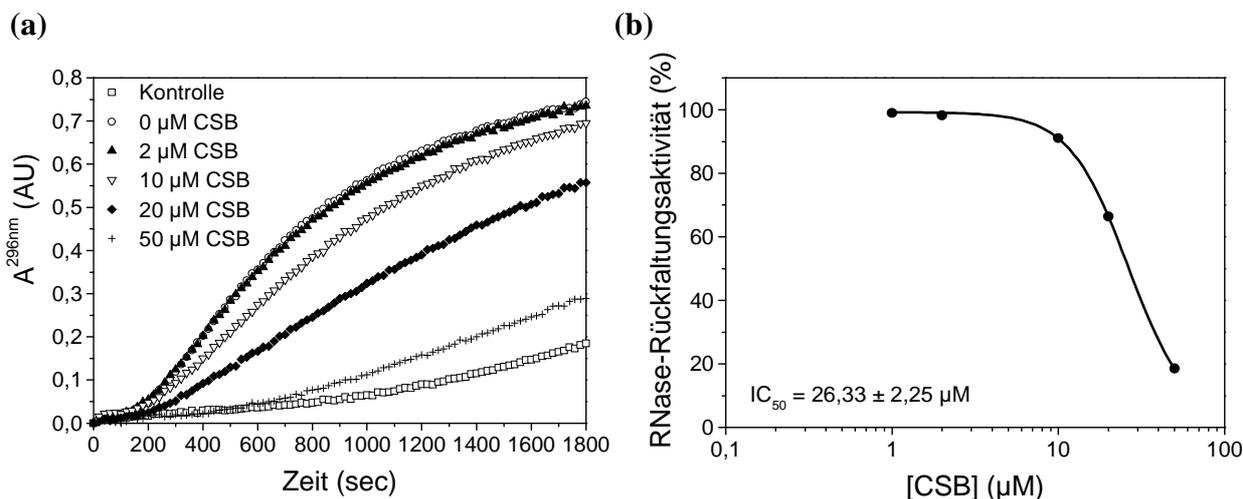


Abbildung 71: Inhibierung der katalytischen Aktivität von PDI. Die PDI-katalysierte oxidative Renaturierung von reduzierter, denaturierter RNase A kann durch steigende Konzentrationen an *Chicago Sky Blue* inhibiert werden (a). Bei einer Konzentration von ca. 50 μM CSB beträgt die katalytische Aktivität von PDI nur noch etwa 18 % im Vergleich zur Kontrolle (b). Der IC_{50} -Wert liegt mit ca. 26 μM relativ hoch. Der *fit* der Messwerte erfolgte durch sigmoidale Anpassung. Aufgetragen wurden die maximalen RNase-Aktivitäten nach 30 min. Verwendet wurden 2 μM PDI und 5 μM denaturierte und reduzierte RNase A. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test zeigte keinerlei Änderung bei den unterschiedlichen CSB-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Eine Präzipitation konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

Über den genauen Mechanismus der Inhibierung der oxidativen RNase-Renaturierung durch CSB kann jedoch keine Aussagen getroffen werden, da die Reaktion einen Mehrstufenprozess darstellt, an dem sowohl die katalytische Aktivität als auch die Chaperon-Eigenschaft von PDI beteiligt sind. CSB könnte zudem einen Effekt auf die unkatalysierte Renaturierung von RNase A besitzen, in dem beispielsweise bestimmte Faltungsintermediate durch den hydrophoben Inhibitor stabilisiert werden. Auf welche Weise CSB mit PDI interagiert bleibt ebenfalls ungeklärt. Eine Bindung an hydrophobe Bereiche des Proteins ist auf Grund der hydrophoben Eigenschaften von CSB wahrscheinlich. Die Bindung von CSB in der Nähe des katalytischen CXXC-Motivs ist ebenfalls denkbar. Eine kovalente Bindung von CSB an das Protein kann allerdings ausgeschlossen werden, da die PDIs unter denaturierenden Bedingungen von der CSB-Sepharose-Matrix eluiert werden konnten.

Die direkte Analyse der Beeinflussung der Chaperon-Eigenschaft von PDI durch CSB mittels Citratsynthase-Aggregationstest konnte nicht erfolgen, da CSB selbst die thermale Aggregation von Citratsynthase inhibiert.

4. Diskussion

Die Bedeutung von PDIs bei der Proteinfaltung und ER-Qualitätskontrolle macht sie zum Gegenstand aktueller Forschung auf diesem Gebiet. Die Bestimmung der molekularen Grundlagen der Substratinteraktion von PDIs sollte ihre katalytische Aktivität und Chaperon-Funktion besser erklären. Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Substratspezifität von 8 verschiedenen PDIs mittels der Hochdichte-Peptid-Array Methode, *Far-Western* Interaktionsstudien sowie nicht-kovalenter *pull-down* Analyse. Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die strukturelle und funktionelle Analyse des bisher weniger gut charakterisierten PDI-Familienmitgliedes ERp46 sowie die Bestimmung des Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen. Die strukturellen Eigenschaften von ERp46 sollten zudem mit dem PDI-Homologen P5 verglichen werden. Darüber hinaus sollte der Beitrag der putativen **b**-Domäne von P5 auf dessen Struktur und Funktion näher untersucht werden.

4.1. Allgemeine strukturelle und funktionelle Eigenschaften von ERp46 und P5

4.1.1. Der Domänen-Aufbau bestimmt die Oligomerisierung von ERp46 und P5

Der Oligomerisierungsgrad von PDI wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert, da sowohl monomere als auch dimere und tetramere Formen nachgewiesen wurden [234, 252-255]. In jüngsten Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass PDI in Lösung ein Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Spezies aufweist, wobei angenommen wird, dass die **b'**-Domäne für die Dimerisierung von PDI verantwortlich ist [112]. Darüber hinaus wurde ein Modell etabliert, bei dem der *x-linker* sowohl die Substratbindung als auch die Dimerisierung von PDI beeinflusst [86, 87, 112]. Die Kristallstruktur von PDI_{1p} aus *Saccharomyces cerevisiae* impliziert ebenso eine Dimerisierung, die v.a. über die **b**- und **b'**-Domänen vermittelt wird [85, 100]. Neben PDI konnte auch für ERp29 eine Homodimerisierung über seine N-terminale **b**-Domäne nachgewiesen werden [24, 136, 246]. Für das PDI-Familienmitglied ERp18 wurden bisher sowohl monomere als auch dimere Formen beschrieben [160, 161]. P5 wurde in früheren Studien als Monomer und Trimer nachgewiesen [129]. Für PDIL2;3, einem P5-Orthologen aus *Oryza sativa*, konnten auch Tetramere nachgewiesen werden [256]. Über den Oligomerisierungszustand der restlichen PDI-Familienmitglieder herrscht indes weitestgehend Unklarheit (s. Tabelle 6, Anhang).

Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von ERp46 mittels analytischer Gelfiltration deutete auf eine Dimerisierung des Proteins hin (s. Abb. 13 und Tabelle 1, Anhang). Dagegen eluierte P5 als Tetramer. Die Abweichungen zum jeweiligen theoretischen Oligomerisierungsgrad waren jedoch relativ hoch (max. 17 % Abweichung; s. Abschnitt 3.3.). Wie mittels analytischer Ultrazentrifugation am Beispiel von ERp46 gezeigt werden konnte, liegt der Grund für die beobachtete Abweichung in der nicht-globulären Struktur des Proteins. Der für ERp46 ermittelte *s*-Wert von 3,0 S deutet auf eine tendenziell gestreckte Konformation des Proteins hin. Wie die Bestimmung des Molekulargewichtes zeigte, liegt ERp46 als reines Monomer vor. Mittels analytischer Gelfiltration konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 und P5 als Monomere vorliegen. Dies stimmt mit bisherigen Untersuchungen der isolierten katalytischen Domänen von PDI überein, die ebenfalls als Monomere vorliegen [112]. Es kann daher postuliert werden, dass die katalytischen Domänen von PDIs nicht bei der Dimerisierung beteiligt sind.

Obwohl angenommen wird, dass P5 einen ähnlichen Domänen-Aufbau wie ERp46 besitzt (s. Abb. 5), zeigen beide Proteine ein unterschiedliches Laufverhalten während der analytischen Gelfiltration (s. Abb. 79, Anhang). Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Beteiligung der C-terminalen **b**-Domäne von P5 bei dessen Oligomerisierung. Daneben könnten auch Unterschiede in der Flexibilität der einzelnen Domänen für das verschiedene Laufverhalten beider Proteine verantwortlich sein (vgl. Abschnitt 4.1.2.). Das Vorliegen von ERp46-Monomeren wird dadurch bestätigt, dass in *pull-down* Experimenten keine ERp46-*spots* in den 2D-PA-Gelen massenspektrometrisch identifiziert werden konnten (s. Abschnitt 3.8.). Darüber hinaus deuten die Daten aus der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne ebenfalls auf keine physiologisch relevante Homodimerisierung hin. Ein Einfluss der Proteinkonzentration sowie der Lösungsmitelegenschaften (pH-Wert, Ionenstärke, Detergenzien) auf die Oligomerisierung von ERp46 und P5 wäre jedoch denkbar. Chaperone und Faltungsenzyme liegen innerhalb des ER in konzentrierter Form vor. Die lokale Proteinkonzentration könnte daher *in vivo* einen signifikanten Einfluss auf die Oligomerisierung von PDIs und damit auf deren Funktion haben.

4.1.2. ERp46 und P5 zeigen eine hohe intramolekulare Flexibilität

Für PDI1p aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte in strukturellen Untersuchungen gezeigt werden, dass das Protein eine starke intrinsische Flexibilität aufweist [85, 100]. Während das **bb'**-Fragment eine relativ starre Einheit bildet, zeigen die beiden katalytischen Domänen unterschiedliche räumliche Anordnungen. Im Falle von humaner PDI weist die **a'**-

Domäne im Vergleich zum übrigen Teil des Proteins die größte konformationelle Flexibilität auf. Die Flexibilität wird hierbei durch den *x-linker* vermittelt [232]. Die konformationelle Flexibilität des *x-linker* beeinflusst darüber hinaus direkt die Interaktion von PDI mit Peptiden [87, 232]. Für die PDI-Familienmitglieder ERp57, ERp72 und ERp29 wurden ebenfalls flexible Bereiche beschrieben [24, 98, 101, 237]. Es wird angenommen, dass die intramolekulare Flexibilität der einzelnen Domänen die Interaktion von PDIs mit ihren Substraten maßgeblich beeinflusst.

Über die intramolekulare Flexibilität von ERp46 und P5 gibt es bisher noch keine genauen Erkenntnisse. Die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration sowie analytischen Ultrazentrifugation deuten jedoch auf eine konformationelle Flexibilität zwischen den einzelnen Domänen von ERp46 und P5 hin. Beide Proteine zeigen die Eigenschaften eines nicht-globulären Proteins (vgl. Abschnitt 4.5.3.) Mittels limitierter Proteolyse konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass der ca. 20 Aminosäurereste lange *linker* zwischen der **a**- und der C-terminalen **a'**-Domäne von ERp46 die höchste Protease-Sensitivität aufweist (s. Abschnitt 3.5.3.). Im Gegensatz dazu zeigt bei P5 der *linker* zwischen N-terminaler **a**-Domäne und der **a'**-Domäne eine erhöhte Protease-Sensitivität. Dies wiederum ist ein Indiz für eine erhöhte Flexibilität der jeweiligen Bereiche. Die intramolekulare Flexibilität bildet zudem die strukturelle Grundlage der beobachteten kumulativen Peptid-Bindung der katalytischen Domänen von ERp46 und P5 (s. Abschnitt 3.7.1.).

4.1.3. Die katalytischen Domänen sind ausreichend für die Redoxaktivität von ERp46 und P5

Die katalytische Aktivität der verschiedenen Mitglieder der PDI-Familie beruht auf dem Vorhandensein von reaktiven Cys-Resten (CXXC-Motiv) in ihren redox-aktiven Domänen (s. Abschnitt 1.4.1.). Die Aminosäuren zwischen den beiden reaktiven Cys-Resten des CXXC-Motivs sowie die Reste in unmittelbarer räumlicher Umgebung zum aktiven Zentrum beeinflussen die Redoxaktivität von PDIs [63, 66, 67]. Während die Redoxaktivität der meisten PDIs mehr oder weniger ausführlich in der Literatur beschrieben wurde, herrscht noch weitestgehend Unklarheit über die durch ERp46 katalysierten Reaktionen [63]; (s. Tabelle 6, Anhang). Des Weiteren blieb der Einfluss der **b**-Domäne von P5 auf dessen katalytische Aktivität noch ungeklärt.

Für ERp46 wurde bisher nur seine *in vitro* Reduktase-Aktivität beschrieben [150]. In der vorliegenden Arbeit konnte ERp46 auch erstmals die Eigenschaft einer Thiol-Oxidase zugeordnet werden (s. Abschnitt 3.4.2.). Dies ist jedoch nicht unerwartet, da ERp46 ebenso

wie PDI, das CGHC-Motiv in seinen katalytischen Domänen enthält. In dieser Arbeit konnte allerdings demonstriert werden, dass ERp46, verglichen mit anderen PDIs, bevorzugt die Reduktion von Disulfidbrücken katalysiert. Dies stimmt mit kürzlich publizierten Daten überein, worin gezeigt wurde, dass ERp46 neben PDI das bevorzugte Reduktionsmittel von Peroxiredoxin-4 ist und damit eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von H₂O₂ und der damit verbundenen Verringerung von oxidativem Stress spielt [57, 152].

In Analogie zu PDI zeigen auch die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 sowohl Reduktase- als auch Oxidase-Aktivität (vgl. [80]). Die auf die molare Konzentration an aktiven Zentren bezogene relative Reduktase-Aktivität der isolierten katalytischen Domänen von ERp46 entspricht der des Wildtyp-Proteins. Interessanterweise sind die relativen Oxidase-Aktivitäten der isolierten katalytischen Domänen von ERp46 sogar höher als die des Wildtyp-Proteins. Eine Erklärung hierfür ist schwierig, da die katalysierte Renaturierung von reduzierter und denaturierter RNaseA ein Mehrstufenprozess darstellt und sowohl die katalytische als auch die Chaperon-Funktion von ERp46 einbezieht. Eine mögliche Erklärung könnte in der niedrigeren Affinität der isolierten katalytischen Domänen gegenüber denaturierter RNaseA gesehen werden. Dies könnte in einer erhöhten Umsatzrate (*turnover*) der Substratbindung und -freisetzung begründet liegen. Ein ähnlicher Effekt tritt auch bei den isolierten katalytischen Domänen von PDI auf (vgl. [80].)

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das P5^{aa'}-Fragment die volle katalytische Aktivität des Wildtyp-Proteins aufweist. Des Weiteren besitzt auch die isolierte P5^{a'}-Domäne katalytische Eigenschaften. Die putative **b**-Domäne von P5 ist demnach nicht essentiell für dessen katalytische Aktivität.

Die hier erhaltenen Daten zeigen erstmals, dass die isolierten katalytischen Domänen von ERp46 und P5 ausreichend für deren Redoxaktivität sind. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf einen kumulativen Effekt der einzelnen katalytischen Domänen bei Redox-Reaktionen hin. Da die Katalyse von Redox-Reaktionen auch die Interaktion mit dem (denaturierten) Substrat erfordert, implizieren die Ergebnisse auch das Vorhandensein von diskreten Substrat-Bindungsstellen innerhalb der einzelnen katalytischen Domänen von ERp46 bzw. P5. (s. Abschnitt 4.5.3.). Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen aus den Peptid-Interaktionsstudien überein (s. Abschnitt 3.7.1.).

4.1.4. Die katalytischen Domänen von ERp46 und P5 besitzen Chaperon-Eigenschaften

Neben der Redoxaktivität konnten den meisten PDI-Familienmitgliedern auch Chaperon-Eigenschaften zugeordnet werden (s. Tabelle 6, Anhang); [3, 5, 241, 248]. In dieser

Arbeit wurde der Einfluss der katalytischen Domänen auf die Chaperon-Aktivität von ERp46 sowie P5 während der Aggregation thermisch denaturierter Citratsynthase untersucht und mit weiteren PDIs verglichen [215].

Es konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass P5 *in vitro* Chaperon-Eigenschaften aufweist [124]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals demonstriert werden, dass die **b**-Domäne von P5 nicht zwangsläufig für die Chaperon-Funktion benötigt wird. Die Chaperon-Aktivität von P5 ist, im Vergleich zu PDI, allerdings niedriger (s. Abschnitt. 3.4.3.). Interessanterweise zeigt das P5 $\alpha\alpha'$ -Frgament einen ähnlich starken Effekt wie PDI. Es kann angenommen werden, dass die P5 \mathbf{b} -Domäne die Substratinteraktion der katalytischen Domänen moduliert. Ebenso könnten auch die hydrophoben, exponierten Oberflächen des P5 $\alpha\alpha'$ -Fragmentes verstärkt an partiell denaturierte Citratsynthase binden und damit deren Aggregation verhindern.

Wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, besitzen neben P5 auch die katalytischen Domänen von ERp46 *in vitro* Chaperon-Eigenschaften (s. Abschnitt. 3.4.3.). In früheren Studien konnte für ERp46 eine Verringerung der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress auch *in vivo* nachgewiesen werden [102, 257]. In Analogie dazu konnte in der vorliegenden Arbeit nun erstmals gezeigt werden, dass ERp46 neben seiner Funktion als Oxidoreduktase auch einen Effekt auf die Sensitivität von *E. coli*-Zellen gegenüber Hitzebehandlung besitzt (s. Abschnitt 3.4.3.). Die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse lassen jedoch lediglich eine qualitative Aussage hinsichtlich des *in vivo*-Chaperon-Effektes von PDIs zu, da auch der Expressionsgrad sowie die Toxizität der heterologen Proteine einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Zudem wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte nur die Gesamtzellzahl erfasst.

ERp57 besitzt im Gegensatz zu PDI veränderte Oberflächeneigenschaften und diejenigen hydrophoben Bereiche innerhalb der **b'-Domäne, welche für die Substratinteraktion bei PDI eine wichtige Rolle spielen, enthalten in ERp57 hauptsächlich geladene Reste [113, 116]. Dem übereinstimmend zeigte ERp57 in der vorliegenden Arbeit keinerlei Chaperon-Funktion, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (s. Abschnitt 3.4.3.). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass v.a. die **b'-Domäne mit ihrer hydrophoben Substratbindungsstelle einen "Anti-Aggregationseffekt" aufweist. Die katalytischen Domänen von ERp57 reichen demnach nicht für eine Chaperon-Funktion aus. Dagegen konnte in dieser Arbeit auch für ERp18 erstmals ein Chaperon-Effekt *in vitro* nachgewiesen werden.****

Am Beispiel der Chaperon-Eigenschaften von ERp46, P5 $\alpha\alpha'$ und ERp18 konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass auch die katalytischen Domänen von PDIs

mit hydrophoben Sequenzen in denaturierten Substraten interagieren können. Dies impliziert wiederum diskrete Substrat-Bindungsstellen innerhalb der katalytischen Domänen und zeigt erstmals, dass die **b'**-Domäne für die Chaperon-Funktion von PDIs *per se* nicht notwendig ist.

4.2. Interaktion von PDIs mit Substraten

4.2.1. PDIs interagieren mit denaturiertem FKBP13 aber nicht mit FKBP12.6

Allgemein wird angenommen, dass Peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerasen (PPIasen) innerhalb des ER mit weiteren Chaperonen interagieren [5]. Obwohl für die ER-PPIase FKBP13 bisher *in vivo* keine Interaktionspartner gefunden wurden, konnte kürzlich *in vitro* gezeigt werden, dass ERp29 an immobilisiertes (denaturiertes) FKBP13 bindet [24]. Auf der anderen Seite konnte für das cytosolische Homologe FKBP12.6 nahezu keine Interaktion mit ERp29 nachgewiesen werden. Die Analyse der Interaktion weiterer Mitglieder der PDI-Familie mit den Modell-Proteinen FKBP12.6/13 sollte Aufschluss über ein mögliches generelles Bindungsverhalten dieser Proteinklasse geben.

Wie gezeigt wurde, interagieren alle der untersuchten PDIs mit immobilisiertem FKBP13, während nur eine geringe Interaktion mit immobilisiertem FKBP12.6 detektierbar war (s. Abschnitt. 3.6.2.). Die **b'**-Domäne ist für die Interaktion mit FKBP13 nicht essentiell, da PDIs, die ausschließlich redox-aktive Domänen enthalten (z.B. ERp46, ERp18, P5aa') ebenfalls mit FKBP13 interagieren. Dagegen ist die **b**-Domäne von ERp29 essentiell und ausreichend für die Interaktion mit immobilisiertem FKBP13. Die isolierte C-terminale **D**-Domäne zeigt dagegen keinerlei Interaktion [24].

Das unterschiedliche Bindungsverhalten der untersuchten PDIs gegenüber FKBP12.6/13 ist umso bemerkenswerter, da beide Proteine nur geringe Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass diejenigen Peptide von ERp29 bevorzugt gebunden werden, die ein -(F,Y)-(F,Y)-Motiv oder -(F,Y)-X-(F,Y)-Motiv in ihrer Sequenz enthalten [24]. Sowohl FKBP12.6 als auch FKBP13 enthalten ein -(F)-X-(F)-Motiv (mit X = Val in FKBP13 bzw. Lys in FKBP12.6). Das -(F)-X-(F)-Motiv alleine kann demnach nicht das determinierende Bindungsmerkmal sein. Es kann daher angenommen werden, dass das entsprechende Erkennungsmotiv innerhalb der immobilisierten (und partiell denaturierten) Proteine nicht zugänglich ist, oder dass weitere räumlich benachbarte Reste die Bindung beeinflussen. In der Tat zeigt ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von FKBP12.6 (pdb: 1c9h) und FKBP13 (pdb: 2pbc) Unterschiede in räumlicher Nähe zum -(F)-X-(F)-Motiv. Die entsprechende Oberfläche ist im

Falle von FKBP12.6 stark polar. Dagegen befinden sich bei FKBP13 in räumlicher Nähe zum -(F)-X-(F)-Motiv hauptsächlich hydrophobe Reste (nicht gezeigt). Ebenso bestehen Unterschiede in den N- und C-terminalen Bereichen beider Proteinen. Interessanterweise führt die chemische Quervernetzung (*cross-linking*) von FKBP12.6 mit einem Peptid, welches mehrere Tyr-Reste enthält, zur Interaktion mit PDIs. Die Kopplung einer Erkennungssequenz an ein zuvor nicht gebundenes Protein erlaubt somit die Interaktion mit PDIs.

Im Gegensatz zur *Far-Western* Analyse konnte mittels ITC keine signifikante Interaktion von PDIs mit FKBP13 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Grund hierfür sind vermutlich die geringen Substrat-Bindungsaffinitäten von PDI-Chaperonen (s. Abschnitt 1.5.). Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen jedoch die Vorteile von Bindungsstudien mit immobilisierten Substraten: Als Ergebnis der hohen lokalen Konzentration der immobilisierten Bindungspartner erlauben sie die Untersuchung von Interaktionen, die in löslicher Form auf Grund der niedrigen Bindungsstärke nicht auftreten. Darüber hinaus werden Löslichkeitsprobleme der Proteine vermieden.

In *pull-down* Studien konnten PPIasen bereits als Komponenten von Multi-Chaperonkomplexen (u.a. mit BiP und PDI) nachgewiesen werden (s. Tabelle 5, Anhang). Darüber hinaus konnte kürzlich eine direkte Interaktion von Cyclophilin B mit Crt/Cnx gezeigt werden [33]. Es ist daher wahrscheinlich, dass PPIasen als wichtiger Bestandteil der ER-Faltungsmaschinerie in Komplexen mit weiteren ER-Chaperonen bei der Proteinfaltung beteiligt sind. Für die weitere Charakterisierung der FKBP13-PDI-Interaktion sowie deren physiologische Relevanz werden umfassendere Studien notwendig sein.

4.2.2. Der pH-Wert beeinflusst die Interaktion von PDIs mit Substraten

Es ist bekannt, dass die katalytische Aktivität von PDIs in hohem Maße durch den pH-Wert des Reaktionsmediums bestimmt wird [65, 258]. Auch DsbA aus *E. coli* zeigt eine pH-Abhängigkeit seiner Oxidase-Aktivität [259]. In dieser Arbeit sollte nunmehr untersucht werden, ob auch die Substratinteraktion von PDIs *in vitro* durch den pH beeinflusst wird.

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion eines Großteils der untersuchten PDIs mit immobilisiertem FKBP13 in hohem Maße vom pH-Wert des Inkubationspuffers abhängig ist (s. Abschnitt 3.6.4.). Die meisten PDIs binden bevorzugt unter leicht sauren Bedingungen. Den geringsten pH-Effekt zeigte ERp18, der größte Effekt trat bei ERp46 auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich um einen spezifischen Effekt handelt, da weder die Proteineigenschaften, noch die Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes durch den pH-Wert signifikant beeinflusst wurden (s. Abb. 80, Anhang). Alle untersuchten PDIs besitzen einen

sauren pI (s. Tabelle 7, Anhang), so dass die beobachteten Unterschiede hierdurch nicht erklärt werden können.

Der für die Bindungsstudien verwendete pH-Wert im Bereich von 6-8 bewegt sich innerhalb der physiologisch relevanten Grenzen. Der Protonierungszustand der geladenen Reste des Proteins sollte in diesem pH-Bereich nicht beeinflusst werden. Denkbar wäre jedoch eine Beeinflussung des Protonierungszustandes von His-Resten innerhalb des untersuchten pH-Bereiches. Nachgewiesen werden konnte bereits die Beteiligung eines konservierten His-Restes in PDIp bei der Interaktion mit Tyr-Resten von Liganden [191]. Eine Modulierung der Interaktion durch eine Veränderung des Protonierungszustandes des His-Restes wäre demnach denkbar.

Es ist bekannt, dass der pH-Wert bei Proteininteraktionsstudien mittels *Far-Western* Analyse einen signifikanten Einfluss auf die Bindungsstärke haben kann [220]. Generell ist die Protein-Protein-Interaktion ein pH-abhängiger Prozess und die Bindungsstärke hängt von dem lokalen pH-Wert ab. Derartige Effekte sind allerdings relativ komplex und nur schwer zu quantifizieren. Des Weiteren kann auch über einen pH-abhängigen Effekt des Oligomerisierungsgrades von PDIs spekuliert werden. ERp18 tritt als Monomer auf, wodurch dieser Effekt für ERp18 keine Rolle spielt.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PDI mit Thyroglobulin in FRTL5-Zellen vom pH-Wert abhängt [260]. Die Interaktion war hierbei unter sauren Bedingungen stärker und das pH-Optimum der Interaktion lag bei ca. pH 6 [260]. Die Thiol-unabhängige Interaktion von PDI mit Collagen-X während dessen intrazellulären Assemblierung ist ebenfalls abhängig vom pH-Wert. In diesem Fall ist die Interaktion jedoch unter basischen Bedingungen verstärkt und die Dissoziation des PDI-Collagen-Komplexes erfolgt unter sauren Bedingungen [36]. Kürzlich wurde zudem eine Zunahme der Bindungsaffinität von PDI zu Ero1 α bei pH<8 nachgewiesen [261]. Die BPA-Bindungsaktivität von PDI ist unter sauren Bedingungen verstärkt [195].

Es kann angenommen werden, dass in Analogie zur pH-abhängigen Bindung von KDEL an seinen Rezeptor, auch die Substratinteraktion von PDIs vom pH-Wert des Reaktionsmilieus beeinflusst wird [262]. Auch in prokaryotischen Systemen konnte eine pH-abhängige Interaktion von Chaperonen mit Substraten nachgewiesen werden. Beispielsweise interagiert das bakterielle Chaperon HdeA im Periplasma stabil mit denaturierten Proteinen bei niedrigem pH, wodurch deren Aggregation inhibiert wird [263]. Bei neutralem pH dissoziiert das nativ-gefaltete Substrat vom Chaperon ab. Neben der Regulation der Chaperon-Aktivität durch ATP/ADP-Bindungszyklen oder Veränderungen der

Redoxbedingungen, könnte auch der pH-Wert des Reaktionsraumes einen bedeutenden Einfluss auf die Chaperon-Substrat-Interaktion haben. Eine pH-abhängige Sortierung der Chaperon-Substrate für die Sekretion bzw. Rückführung ins ER wäre denkbar (s. Abb. 72). Für die Klärung der physiologischen Relevanz der hier beobachteten pH-abhängigen Interaktion von PDI-Chaperonen mit ihren potentiellen Substraten müssten in Zukunft *in vivo*-Versuche durchgeführt werden. Anbieten würden sich beispielsweise Co-Lokalisations-Experimente in Zellkultur mit spezifischen Antikörpern, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, die eine pH-abhängige Fluoreszenzemission zeigen.

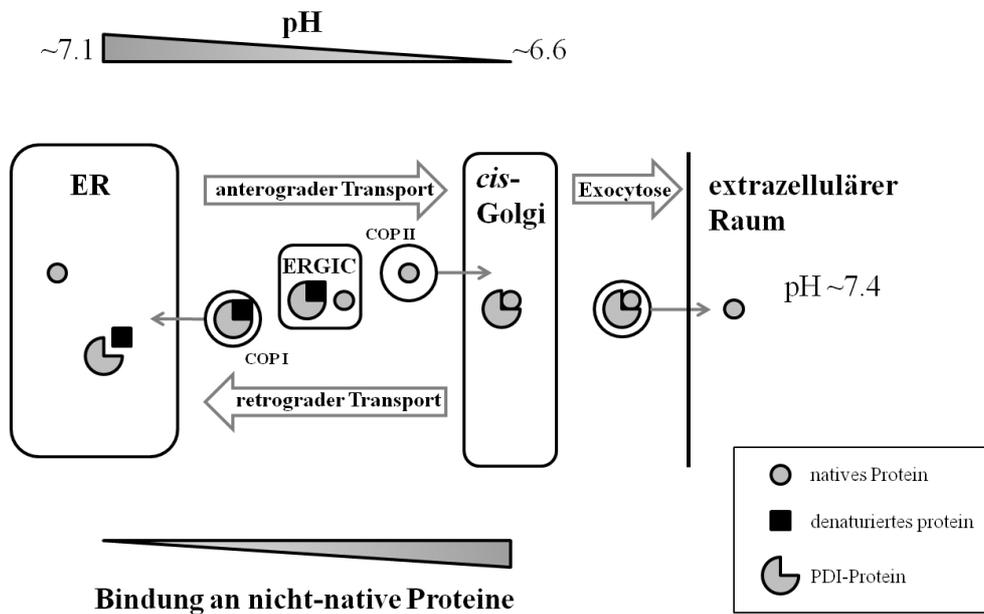


Abbildung 72: Schema der postulierten pH-abhängigen Eskort- bzw. Rückfunktions-Funktion. PDIs (und möglicherweise auch andere ER-Chaperone) binden im ER unter neutralen Bedingungen an nicht-native Substrate. Während des sekretorischen Weges vom ER über das ER-Intermediärkompartiment (ERGIC) nimmt der pH ab und es verstärkt sich die Chaperon-Substrat-Interaktion. Nicht-native Substrate dissoziieren nicht vom Chaperon ab, sondern werden gemeinsam mit dem Chaperon (möglicherweise über den KDEL-Rezeptor vermittelt) zurück ins ER transportiert (Rückfunktions-Funktion). Alternativ wäre denkbar, dass auch native Substrate von Chaperonen gebunden werden und mit diesen über den sekretorischen Weg (bei saurem pH) über den Golgi bis zur Zellmembran transportiert werden. Dort erfolgt (bei neutralem pH) die Ablösung vom Chaperon und die Sekretion in den extrazellulären Raum (Eskort-Funktion). Während der Interaktion des Substrates mit seinem Chaperon werden Aggregationen verhindert. Der pH-Wert könnte demnach, neben dem ATP/ADP-Austausch, eine regulatorische Funktion hinsichtlich der Chaperon-Substrat-Interaktion besitzen.

4.2.3. ERp18 interagiert mit Komponenten des sekretorischen Weges

Die Identifizierung von natürlichen Interaktionspartnern und die daraus abzuleitende Substratspezifität der verschiedenen PDI-Familienmitgliedern liegt im Fokus aktueller Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet. Die Bindung von PDI-Chaperonen an ihre Interaktionspartner ist bekanntermaßen äußerst schwach und die Labilität dieser nicht-kovalenten Proteinkomplexe erschwert deren Nachweis enorm.

Kürzlich konnten mittels der *Cystein-trapping* Methodik spezifische Interaktionspartner mehrerer PDIs identifiziert werden [54, 97]. Obgleich die *Cystein-trapping* Methode die Identifikation von bisher unzugänglichen Interaktionspartnern von PDIs ermöglicht, sollten die erhaltenen Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Die *Cystein-trapping* Methode erlaubt ausschließlich den Nachweis von Substraten, die als gemischte Disulfid-Intermediate vorkommen. Nicht-kovalente Komplexe, welche nicht Bestandteil des Reaktionsmechanismus sind, können auf diesem Wege nicht detektiert werden. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die Mutation des C-terminalen Cys-Restes von PDIs zu einer Veränderung der Substratspezifität führen kann [63, 75].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte *pull-down* Methode zur Identifikation von nicht-kovalenten Interaktionspartnern von ERp46 und ERp18 angewandt (s. Abschnitt 2.2.8.3.). ERp18 wurde gewählt, da das Protein nur aus einer einzigen redox-aktiven Domäne aufgebaut ist. Dadurch sollte es möglich sein, die spezifische Substratinteraktion der isolierten katalytischen Domänen zu analysieren, ohne Berücksichtigung des Beitrages der redox-inaktiven Domänen. Die identifizierten ERp18-Interaktionspartner sollten im Anschluss mit Substraten weiterer PDIs, wie z.B. ERp46 und ERp29, verglichen werden. Für die *pull-down* Analyse wurden die PDIs an einer CNBr-aktivierten Sepharose Matrix immobilisiert, was zu höheren lokalen Protein-konzentrationen und damit zu einer verstärkten Bindung der potentiellen Interaktionspartner führt. Die Auftrennung der gebundenen Proteine erfolgte über 2D-PAGE mit nachfolgender massenspektrometrischen Identifizierung und Auswertung mit Hilfe einer Proteindatenbank.

Bei den identifizierten ERp18-Interaktionspartnern handelte es sich hauptsächlich um ER-lumenale Proteine, Proteine der zellulären Proteinsynthese-Maschinerie sowie sekretorische Protein. Ein geringerer Teil stellte cytoplasmatische bzw. nukleäre Proteine sowie Bestandteile des Zytoskeletts dar. Etwa 20 % der gefundenen Proteine konnten als Kontaminationen mitochondrialer und peroxisomaler Proteine identifiziert werden. Derartige Kontaminationen sind auf Grund der Mikrosomenpräparation zu erwarten, da sich sowohl mitochondriale als auch peroxisomale Bestandteile in engem Kontakt mit Teilen des ER befinden. Auf der anderen Seite sind nicht alle identifizierten Interaktionspartner als Kontaminationen anzusehen, da z.B. ER-Membran-assoziierte Proteine auch eine cytoplasmatische Lokalisation besitzen können. Ihre Assoziation kann u.U. so fest sein, dass sie durch die Waschschrte während der Mikrosomenpräparation nicht vollständig entfernt werden können. Dies kann beispielsweise Translokon- bzw. Ribosomen-assoziierte Proteine betreffen. Die bevorzugte Interaktion von ERp18 mit den sekretorischen Transportproteinen

Dynamin, SEC23A/B und SEC13-Isoformen lässt vermuten, dass ERp18 möglicherweise eine wichtige Rolle als Eskort-Chaperon bei dem anterograden Transport von sekretorischen (Membran-) Proteinen spielt (s. Abb. 73).

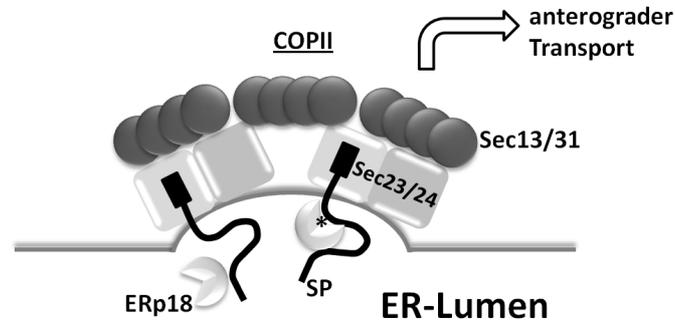


Abbildung 73: Mögliche Beteiligung von ERp18 als Eskort-Chaperon innerhalb des sekretorischen Weges. Mittels *pull-down* Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass ERp18 spezifisch an die vesikulären Transportproteine Sec13 und Sec23/24 bindet. Sec13 und Sec23/24 sind essentielle Bestandteile des COPII-Komplexes, welcher sekretorische Proteine sowie Membranproteine über den anterograden Transportweg zum Golgi und schließlich zur Plasmamembran transportiert. Die Abschnürung des Transportvesikels (COPII-Vesikel) beginnt nach der vollständigen Assemblierung des COPII-Komplexes. Initiiert wird die Bildung des COPII-Vesikels vermutlich durch Rekrutierung der Sec13/31 Hetero-Tetramere. Sec23/24 binden an spezifische Erkennungssequenzen (Sortierungs-Signalsequenzen) der sekretorischen Proteine. ERp18 könnte ebenso selektiv an bestimmte Signalsequenzen (*) der sekretorischen Proteine binden und über seine Redox- sowie Chaperon-Funktion bei deren Faltung während des Transportes zum Golgi beteiligt sein, oder aber eine Interaktion mit weiteren Proteinen verhindern (Eskort Funktion). Darüber hinaus wäre denkbar, dass die Interaktion von ERp18 mit den transportierten Proteinen deren Rückführung vom Golgi zum ER bestimmt. Proteine, die nicht mit ERp18 interagieren, könnten sekretiert werden (Sortierungs-Funktion). Des Weiteren könnte ERp18 auch bei der Faltung von membranständigen Rezeptoren auf der Plasmamembran beteiligt sein. Nach [264].

Als Eskort-Chaperon könnte ERp18 auch bei der Faltung und Assemblierung von extrazellulären und membranständigen Proteinen beteiligt sein. Interessanterweise konnte für ERp18 kürzlich eine Beteiligung bei der Expression des Rezeptors des Gonadotropin-freisetzenden Hormons auf der Plasmamembran nachgewiesen werden [162]. Eine Beteiligung von ERp18 bei der "Sortierung" von Proteinen bei der Exo- bzw. Endocytose wäre ebenso denkbar.

Neben den vesikulären Transportproteinen konnte u.a. auch eine Interaktion von ERp18 mit Plasminogen, ebenfalls ein sekretiertes Protein, nachgewiesen werden. Plasminogen spielt eine essentielle Rolle bei der Fibrinolyse auf der Oberfläche von Endothelzellen der Blutgefäße. Darüber hinaus ist Plasminogen bzw. Plasmin als Akutphasenprotein auch bei der proteolytischen Aktivierung der Faktoren C1, C5 und C7 des Komplementsystems beteiligt [265, 266]. Zudem spielt Plasminogen bei Entzündungsprozessen sowie der Invasion von Tumoren eine entscheidende Rolle [267]. In Anbetracht der Tatsache, dass für mehrere PDIs eine Beteiligung bei immunologischen Prozessen

nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 1.7.), kann angenommen werden, dass auch ERp18 bei derartigen Vorgängen involviert ist. Interessanterweise konnte kürzlich eine Interaktion von ERp18 mit dem Pentraxin-verwandten Protein (PTX3), ebenfalls einer Komponente der Komplement-Kaskade, gezeigt werden [54].

In früheren Studien wurden sowohl PDI als auch P5 auf der Zelloberfläche von Endothelzellen und Thrombozyten nachgewiesen und eine Beteiligung bei Prozessen der Blutgerinnung wird angenommen [38, 39, 268-270]. In der vorliegenden Arbeit konnte zudem eine präferentielle Interaktion von AGR2 mit Peptiden des von Willebrand-Faktors (vWF) nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.7.5.). Der vWF spielt als Trägerprotein für Gerinnungsfaktoren ebenfalls eine essentielle Rolle bei Prozessen der Hämostasis. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten daher auf eine generelle Beteiligung von PDIs bei immunologischen Prozessen hin.

Im Gegensatz zu anderen PDIs konnte in dieser Arbeit mittels *pull-down* keine Interaktion von ERp18 mit weiteren ER-Chaperonen nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte in den fehlenden **b/b'**-Domänen gesehen werden, die bei der Bindung von Co-Chaperonen beteiligt sind. Redox-regulatorische Proteine, welche mittels der *Cysteine-trapping* Methode als Interaktionspartner von ERp18 identifiziert wurden, konnten in dieser Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen werden (vgl. [54, 271]). Dies macht die fundamentalen Unterschiede beider Methoden deutlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionsstudien allerdings unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, so dass kovalente disulfidverknüpfte ERp18-Substrat-Komplexe nicht detektiert werden konnten. Des Weiteren wurde für die *pull-down* Studien Triton X-100 als Detergenz verwendet, was die Protein-Protein-Interaktion abschwächt.

Mittels der 2D-PAGE Analyse von Mikrosomenpräparationen aus Lebergewebe konnten ca. 2.000 verschiedene *spots* detektiert werden [149]. Dies übersteigt die Anzahl der beispielsweise für ERp18 (34 Protein-*spots*) identifizierten Proteine beträchtlich. Daraus kann zum Einen abgeleitet werden, dass die Interaktion von ERp18 mit seinen Substraten äußerst selektiv erfolgt und die Substrat-Affinitäten sehr gering sind. Zum Anderen zeigt dies die Effizienz der verwendeten *pull-down* Methode mit immobilisierten PDIs. Der Großteil der unspezifischen Bindungspartner konnte durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Auf der anderen Seite wird vermutlich auch ein signifikanter Anteil an schwach bindenden spezifischen Interaktionspartnern durch den Waschprozess entfernt. Neben der *Cysteine-trapping* Methode stellt die *pull-down* Analyse mit immobilisierten PDIs und nachfolgender 2D-PAGE jedoch ein effizientes Nachweisverfahren zur Identifizierung schwach bindender

PDI-Interaktionspartner dar. Darüber hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von ERp18 und ERp46 erstmals gezeigt werden, dass die katalytischen Domänen von PDIs auch zur nicht-kovalenten Interaktion mit Substratproteinen fähig sind.

4.3. Peptid-Bindungsspezifität von PDIs

Bisherige Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Substratinteraktion von PDIs beschränkten sich hauptsächlich auf Interaktionsstudien mit wenigen Modell-Peptiden [82]. Bei den verwendeten Modell-Peptiden (z.B. Somatostatin, Δ -Somatostatin, Mastoparan, Glucocorticoidrezeptor-Fragment, bovines Trypsininhibitor-Fragment) handelte es sich i.R. um Peptidhormone bzw. Protein-Fragmente. ^{125}I -radioaktiv markierte Derivate dieser Peptide wurden in *cross-linking* Experimenten mit PDI-Fragmenten eingesetzt [83]. Neben der *cross-linking* Methode wurden auch Interaktionsstudien mit Modell-Peptiden mittels *Biacore*-Verfahren durchgeführt [124]. Obwohl diese sensitiven Methoden die Detektion der Peptid-Interaktion von PDIs erlaubten, scheiterte eine umfangreiche Analyse der Peptid-Bindungsspezifität an der Verfügbarkeit einer ausreichend großen Zahl an verschiedenartigen Peptiden.

In dieser Arbeit wurde erstmals die selektive Interaktion von 8 verschiedenen PDIs sowie einzelner Domänen an 6.754 unterschiedliche Peptide mittels der Peptid-Array Analyse untersucht. Der Peptid-Array enthielt neben den bekannten Modell-Peptiden auch z.T. überlappende Peptidsequenzen von 57 sekretorischen Proteinen sowie ER-Chaperonen und potentiellen PDI-Interaktionspartnern (s. Tabelle 10, Anhang). Darüber hinaus enthielt der Peptid-Array Kontroll-Peptide, in denen einzelne Aminosäuren selektiv ausgetauscht wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden eine inhärente Eigenschaft aller analysierten Mitglieder der PDI-Familie ist.

4.3.1. Detergenzien beeinflussen die Peptid-Interaktion von PDIs

In der vorliegenden Arbeit erwies sich die Verwendung von Triton X-100 für die Blockierung von unspezifischen Bindungen der Proteine an die Glasoberfläche der Peptid-Arrays als essentiell. Bei Triton X-100 handelt es sich um ein amphiphatisches sowie nicht-ionisches Detergenz. Es ist aus früheren Studien bekannt, dass Triton X-100 mit der katalytischen Aktivität und Substratinteraktion von PDI interferiert [83, 93]. Diese Interaktionsstudien beruhten jedoch auf der Verwendung von chemischen *cross-linkern* und radioaktiv markierten Peptiden für die Detektion. Die Peptid-Interaktion der PDIb'-Domäne ist oberhalb von 0,1 % (w/v) Triton X-100 signifikant reduziert und Konzentrationen von

1 % (w/v) Triton X-100 führen nahezu zum kompletten Verlust der Peptid-Bindung [83, 93]. Die Bindung von PDI an Δ -Somatostatin konnte allerdings noch bis zu einer Konzentration von 0,3 % (w/v) Triton X-100 eindeutig detektiert werden [93].

Diese Konzentration an Detergenz ist vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentration von $\sim 0,35$ % (w/v) Triton X-100. Obgleich diese Konzentration weit oberhalb der kritischen Mizellenbildungskonzentration (CMC) von ca. 0,02 % (w/v); (entsprechend ca. 0,3 mM) liegt und obwohl Triton X-100 präferentiell mit hydrophoben Peptiden interagiert, zeigten sich nur geringe Unterschiede in der Peptid-Bindungsselektivität. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass Triton X-100 in der für die Peptid-Interaktionsstudien eingesetzten Konzentration von 0,4 % (v/v) die Peptid-Bindungseigenschaften der untersuchten PDIs kaum beeinflusst. Obgleich verringerte sich die Signalintensität bei steigender Konzentrationen an Triton X-100, was zum Verlust von schwach bindenden Peptiden führen kann. Ferner kann davon ausgegangen werden, dass durch die Verwendung von Triton X-100 mit einer Konzentration oberhalb der CMC die effektive Proteinkonzentration verringert wird. Eine Denaturierung der Proteine bei einer Konzentration von 0,4 % (v/v) Triton X-100 ist nicht wahrscheinlich.

4.3.2. Die einzelnen Domänen von PDIs zeigen einen Aviditäts-Effekt

Die statistische Auswertung der Peptid-Bindungskapazität, d.h. des Anteils gebundener Peptide, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen PDIs (s. Abschnitt 3.7.1.). In Analogie zu den Ergebnissen der *pull-down* Analyse wird nur ein Bruchteil aller vorhandenen Peptide gebunden, was wiederum auf eine spezifische und selektive Interaktion hindeutet. Beispielsweise ist die Peptid-Bindungskapazität von ERp57 (ca. 7 % des gesamten Peptid-pools) deutlich niedriger als die von ERp29 oder PDI (ca. 20 % bzw. 17 % des gesamten Peptid-pools). Obwohl ERp57 die niedrigste Peptid-Bindungskapazität aller untersuchten PDIs aufweist, zeigen die hier erhaltenen Ergebnisse erstmals, dass ERp57 eine intrinsische Peptid-Bindungseigenschaft aufweist und dass Calreticulin, entgegen bisherigen Annahmen, nicht *per se* für die Substratbindung von ERp57 benötigt wird (vgl. [32, 97]). Diese Ergebnisse werden durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit bestätigt, in der nachgewiesen wurde, dass ERp57 auch unabhängig von der Interaktion mit Crt/Cnx zur Assemblierung des MHC I-Komplexes beiträgt [118].

Die unterschiedliche Fähigkeit zur Interaktion mit Peptiden resultiert vermutlich direkt aus der verschiedenen Domänen-Zusammensetzung der jeweiligen PDIs, wobei die einzelnen Domänen sowohl unterschiedliche Bindungsaffinitäten als auch -selektivitäten aufweisen

können. Für ERp57 wird angenommen, dass die Substratinteraktion hauptsächlich durch die beiden katalytischen Domänen determiniert wird und dass die Bindung durch kumulative Protein-Protein-Interaktionen stabilisiert wird [98]. Das Fehlen einer hydrophoben Substratbindungstasche innerhalb der **b'**-Domäne von ERp57 resultiert vermutlich in einer im Vergleich zu PDI niedrigeren Affinität zu Peptiden. Dies wird durch die Analyse des Beitrages zur Peptid-Bindungskapazität der einzelnen Domänen bestätigt (s. Abschnitt 3.7.1.). Die PD**Ib'**-Domäne interagiert mit ca. 70 % der Anzahl an Peptiden des Wildtyp-Proteins. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die **b'**-Domäne von PDI tatsächlich die wichtigste Peptid-Bindungsstelle enthält, dass jedoch auch die restlichen Domänen zur Peptid-Interaktion beitragen (vgl. [81, 83]). Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen konnte in dieser Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die **b'**-Domäne für die Peptid-Interaktion nicht unbedingt notwendig ist. Dies stimmt mit neusten Untersuchungen zu PDI-katalysierten Isomerisierungsreaktionen überein. Hierbei wird die PD**Ib'**-Domäne nicht für die Isomerisierung von Disulfidbrücken in Proinsulin benötigt [69].

Dass die **b'**-Domäne für die Peptid-Interaktion nicht essentiell ist, zeigt sich auch bei PDI-Mitgliedern, welche ausschließlich aus katalytischen Domänen aufgebaut sind (z.B. ERp18 und ERp46). In Analogie zur Redoxaktivität trägt die **b**-Domäne von P5 auch nicht zur Peptid-Bindungskapazität bei. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, enthält die **b**-Domäne von ERp29 die wichtigste Peptid-Bindungsstelle (vgl. [24, 136, 141]). Die isolierte **D**-Domäne zeigt dagegen nahezu keine Peptid-Bindungseigenschaft. Im Gegensatz zu bisherigen Annahmen trägt die **D**-Domäne jedoch im Kontext des Wildtyp-Proteins zur Peptid-Bindung bei. Dies wird durch die signifikant niedrigere Peptid-Bindungskapazität der ERp29**b**-Domäne im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich. Ähnliche Effekte treten auch bei den isolierten katalytischen Domänen von ERp46 auf. Das aus einer Trx-ähnlichen Domäne aufgebaute DsbA aus *E. coli* zeigt ebenfalls eine geringe Peptid-Bindungskapazität.

Die hier erhaltenen Resultate implizieren, dass die einzelnen Domänen von PDIs kumulativ zur Peptid-Bindung beitragen, was eine effizientere Interaktion ermöglicht (Aviditäts-Effekt). Gleichzeitig hat dies einen Einfluss auf die Peptid-Bindungsselektivität (s. Abschnitt 4.3.3. ff). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erstmals einen wichtigen experimentellen Hinweis auf die physiologische Relevanz des multiplen Domänen-Aufbaus vieler PDI-Familienmitglieder. Die Resultate deuten zudem auf diskrete Substrat-Bindungsstellen innerhalb der katalytischen Domänen von PDIs hin. Dies stimmt mit jüngsten strukturellen Untersuchungen überein, in denen ebenfalls eine essentielle Beteiligung der katalytischen Domänen bei der Substratinteraktion vorhergesagt wurde [90, 98, 101, 237].

4.3.3. PDIs binden bevorzugt Peptide mit aromatischen Resten und Arginin

Die statistische Auswertung der Peptid-Bindungsselektivität der verschiedenen PDIs zeigt eine Anreicherung von aromatischen Resten in gebundenen Peptiden (s. Abschnitt 3.7.2.). Daneben werden Peptide, welche Arg- und His-Reste enthalten, ebenfalls bevorzugt gebunden. Eine signifikante Anreicherung von hydrophoben Aminosäuren in den gebundenen Peptiden konnte nicht beobachtet werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass allgemein basische Peptide verstärkt von PDIs gebunden werden. Eine bemerkenswerte Ausnahme bildet ERp29, das ebenfalls saure Peptide bevorzugt bindet. Des Weiteren hat die Ladung der zu den aromatischen Resten direkt benachbarten Aminosäure einen differentiellen Einfluss auf die Peptid-Interaktion von PDIs. Während z.B. PDI auch Peptide bevorzugt bindet, welche eine zum aromatischen Rest negativ geladene Aminosäure enthalten, interagiert PDIp bevorzugt mit Peptiden, die aromatische Reste mit positiv geladenen benachbarten Aminosäuren enthalten. Dies stimmt mit bisherigen Untersuchungen zur Peptid-Bindungsspezifität von PDIp überein [95]. Signifikante Unterschiede bestehen auch in der Peptid-Bindungsselektivität zwischen humaner PDI und PDI1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe-PDI), obwohl v.a. die strukturellen Eigenschaften von PDI1p bisher häufig als Modell für PDIs aus Säugern herangezogen wurden [85].

Ogleich in früheren Studien zur Peptid-Bindungsspezifität von PDIp und ERp29 eine Präferenz für aromatische Reste nachgewiesen werden konnte, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals, dass die bevorzugte Bindung von Peptiden mit aromatischen Aminosäureresten ein generelles Merkmal der Mitglieder der PDI-Familie ist (vgl. [24, 95, 96]). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die untersuchten PDIs unterschiedliche Selektivitäten gegenüber den verschiedenen aromatischen Resten sowie deren benachbarten Aminosäurereste aufweisen. Obwohl eine statistische Anreicherung von zwei benachbarten langkettigen aliphatischen Resten in gebundenen Peptiden nachgewiesen werden konnte, scheint der reine hydrophobe Charakter der Peptide, entgegen bisherigen Vermutungen, nicht das determinierende Interaktionsmerkmal für PDIs zu sein (vgl. [93, 94]).

Die Bedeutung der aromatischen Reste für die Peptid-Interaktion zeigt sich auch bei Peptiden, in denen einzelne aromatische Reste gegen Alanin ausgetauscht wurden. In diesem Fall wird die Interaktion von PDIs mit den entsprechenden Peptiden signifikant reduziert, jedoch nicht komplett unterbunden. Die absolute Anzahl der aromatischen Reste innerhalb eines Peptids bestimmt zusätzlich die PDI-Bindungsaffinität. Ogleich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass aromatische Reste zwar ein wichtiges, aber nicht essentielles Interaktionsmerkmal von PDIs darstellen. Darüber hinaus scheinen auch Wechselwirkungen

mit dem Polypeptidrückgrat über Wasserstoffbrückenbindungen einen entscheidenden Beitrag zur Peptid-Bindung zu besitzen. Strukturelle Untersuchungen bestätigen diese Annahme (s. Abschnitt 3.5.4.2.). Entgegen früheren Untersuchungen sind die alleinigen Wechselwirkungen von PDIs mit dem Polypeptidrückgrat der Peptide nicht das wichtigste Spezifitätsmerkmal bei der Peptid-Interaktion (vgl. [37]). Die Präferenz für Arg-Reste in den von PDIs gebundenen Peptiden spiegelt vermutlich weniger einen Ladungseffekt bei der Interaktion wider. Vielmehr ist bekannt, dass die Guanidino-Gruppe der Seitenkette von Arginin über planare π -Elektronen-Wechselwirkungen (*planar stacking*) mit den aromatischen Seitenketten von Aminosäuren interagieren kann [272]. His-Reste können einen ähnlichen Effekt zeigen.

Für die ER-Chaperone Calreticulin und BiP konnten ebenfalls Peptid-Bindungseigenschaften nachgewiesen werden [14, 15, 27]. Während die Bindung von Calreticulin an Peptide mit deren Hydrophobizität korreliert, zeigt BiP eine Spezifität für aromatische und hydrophobe Reste in alternierender Position. Interessanterweise zeigen nicht nur PDIs eine Spezifität für aromatische Reste und positiv geladene Peptide. Auch für weitere Chaperone, wie beispielsweise hsp90, die bakteriellen hsp40- und hsp70-Orthologen DnaJ, DnaK und *trigger*-Faktor aus *E. coli* sowie für die bakteriellen Chaperone SecB, SurA und ClpB konnte eine generelle Spezifität für aromatische Reste mit benachbarter positiver Ladung in Peptiden nachgewiesen werden [273-282]. Dies ist umso bemerkenswerter, da diese Proteine nicht nur unterschiedlichen Spezies entstammen, sondern auch unterschiedliche Funktionen bzw. Aufgaben in der Zelle wahrnehmen. Es kann angenommen werden, dass die Erkennung von aromatischen sowie positiv geladenen Resten ein allgemeines, funktionelles Merkmal von molekularen Chaperonen dargestellt. Die Bedeutung dieser Interaktionsmerkmale ergibt sich ebenfalls aus ihrer starken phylogenetischen Konservierung.

4.3.4. PDIs zeigen eine hohe Redundanz der Peptid-Interaktion

In dieser Arbeit konnte mittels Peptid-Array Analyse eine hohe Redundanz hinsichtlich der Interaktion von PDIs mit Peptiden nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.7.3.). Beispielsweise werden durchschnittlich ca. 50 % aller mit PDI interagierenden Peptide auch von anderen PDI-Familienmitgliedern gebunden. ERp29 bindet sogar knapp 70 % aller Peptide, die auch von PDI gebunden werden. Obwohl eine Überlappung des gebundenen Substrat-*pools* zwischen den einzelnen PDIs erwartet wurde, ist die hier beobachtete Redundanz in der Peptid-Interaktion unerwartet hoch. Das Ausmaß der Redundanz der Peptid-Interaktion eines jeden PDIs gibt indirekt auch einen Aufschluss über dessen Substratspektrum bzw. die Substratspezifität. Demnach hätte ERp29 das größte

Substratspektrum und die geringste Substratspezifität, während ERp57 potentiell das geringste Substratspektrum und eine höhere Substratspezifität aufweisen würde.

Die hier erhaltenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die verschiedenen PDIs auch *in vivo* eine erhebliche Überlappung in ihrem Substratspektrum aufweisen. Diese Vermutung wird durch jüngste *in vitro*-Untersuchungen zum Substratspektrum mehrerer PDIs bestätigt [54, 271]. Gleichzeitig implizieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Substratproteine existieren, die für ihre optimale Faltung mehrere PDIs gleichzeitig als Chaperone benötigen. Auf der anderen Seite könnte der Ausfall eines bestimmten PDIs auch durch andere PDI-Familienmitglieder leichter kompensiert werden. Obgleich *in vitro*-Untersuchungen diese Annahme generell bestätigen, führt der *knockout* von PDIs, bis auf wenige Ausnahmen, zur Lethalität des betroffenen Organismus (s. Abschnitt 1.3.4.).

4.3.5. PDIs zeigen eine Präferenz für β -Stränge in gebundenen Peptiden

Die Struktur eines Peptides, d.h. die räumliche Anordnung der Aminosäureseitenketten und der Verlauf des Peptidrückgrates, ist ein wichtiger Aspekt, der bei einer spezifischen Bindung von PDIs an Peptide (und Proteine) eine Rolle spielen kann.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, interagieren die analysierten PDIs bevorzugt mit Peptiden, die Anteile an β -Strängen aufweisen (s. Abschnitt 3.7.4.). Dem gegenüber sind unstrukturierte Sequenzen (*random coil*) sowie α -helicale Elemente in den gebundenen Peptiden nicht angereichert. Dies steht im Widerspruch zu bisherigen Annahmen, wo vermutet wurde, dass PDI v.a. unstrukturierte (nicht-native) Sequenzen in Substratproteinen erkennt und bindet [3]. Die präferentielle Interaktion von PDIs mit Peptiden, welche β -Stränge enthalten, steht allerdings weder im Widerspruch zu ihrer Chaperon-Funktion (s. Abschnitt 3.4.3.), noch zur Interaktion von PDIs mit nativen Strukturen in Substratproteinen (s. Abschnitt 3.7.7.). Die bevorzugte Interaktion von PDIs mit Peptiden, die β -Stränge enthalten, spiegelt sich auch in der stärkeren Interaktion mit Δ -Somatostatin im Vergleich zu Mastoparan wider. Die Ermittlung der theoretischen Sekundärstruktur beider Modell-Peptide mit den Programmen GOR3/4 [242, 243] zeigt, dass Δ -Somatostatin β -Stränge enthält, während Mastoparan einen α -helicalen Anteil aufweist.

Es sollte jedoch hervorgehoben werden, dass die beobachtete statistische Präferenz für β -Stränge keinesfalls bedeutet, dass nicht auch andere Sekundärstrukturelemente von PDIs gebunden werden (vgl. Abschnitt 3.7.7.). Die hier erhaltenen Resultate implizieren jedoch ein Zusammenwirken von spezifischen Aminosäureresten sowie ihrer räumlichen Position bzw. Orientierung bei der Peptid-Interaktion von PDIs.

4.3.6. Strukturelle Eigenschaften von PDIs determinieren die Peptid-Bindungsspezifität

Bisher existieren keine strukturellen Daten von PDIs in nicht-kovalenten Komplexen mit ihren Substraten. Lediglich die kürzlich publizierte Kristallstruktur des kovalenten ERp57-Tapsin-Komplexes erlaubte erstmals Einblicke in den Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen eines humanen PDI-Familienmitgliedes [98, 203]. Die Kristall- bzw. NMR-Strukturen von ERp44 und des **b'****x**- sowie **bb'**-Fragmentes von PDI zeigen das Vorhandensein einer hydrophoben Substratbindungsstelle innerhalb der jeweiligen **b'**-Domäne [86, 88, 99]. Diese strukturellen Daten geben einen Hinweis auf den möglichen Substratinteraktionsmechanismus von PDIs. Im Falle von ERp44 faltet der C-terminale Teil des Proteins in die potentielle Substratbindungsstelle der **b'**- und **a**-Domäne zurück [99]. Bei dem PDI**b'****x**-Fragment bindet der **x-linker** in der Substratbindetasche der **b'**-Domäne [86]. In einer kürzlich publizierten *in silico*-Studie zur Ero1 α -Bindungsspezifität von PDI wird angenommen, dass die **b'**-Domäne mit der flexiblen β -*hairpin* Schleife von Ero1 α interagiert (vgl. Abb. 64); [250].

Eine vergleichende strukturelle Analyse zeigt, dass v.a. aromatische Reste bei der Interaktion mit der **b'**-Domäne von PDI bzw. ERp44 beteiligt sind (s. Abb. 74). Die Bindung erfolgt vermutlich in allen Fällen über π -Elektronen Wechselwirkungen (*stacking*-Interaktionen) zwischen den aromatischen Seitenketten [203, 250]. Dies stimmt mit der in dieser Arbeit ermittelten Peptid-Bindungsspezifität von PDIs, insbesondere der präferentiellen Interaktion mit aromatischen Resten und Arginin, gut überein. Bestätigt wird dies auch durch die Kristallstruktur der ERp46**a'**-Domäne, in der es ebenfalls zu Wechselwirkungen des konservierten Trp-Restes des aktiven Zentrums mit aromatischen Seitenketten des Symmetrie-verwandten Moleküls kommt (s. Abb. 74). Interessanterweise liegen die aromatischen Seitenketten des gebundenen Symmetrie-verwandten Moleküls von ERp46**a'** in nahezu identischer räumlicher Position wie die aromatischen Reste in einem durch Thioredoxin gebundenen Substrat-Peptid (s. Abb. 74); [283]. Neben hydrophoben Wechselwirkungen tragen v.a. Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Polypeptidrückgrat zur Substratinteraktion der katalytischen Domänen von ERp57 und ERp46 bei (vgl. Abb. 33).

Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die räumliche Position der aromatischen Seitenketten, neben Wechselwirkungen mit dem Polypeptidrückgrat, die Interaktion von PDIs mit Peptiden (und Substratproteinen) maßgeblich bestimmt. Die strukturellen Daten erlauben damit eine Rationalisierung der in dieser Arbeit ermittelten Peptid-Bindungsspezifität von Mitgliedern der PDI-Familie und ihrer einzelnen Domänen.

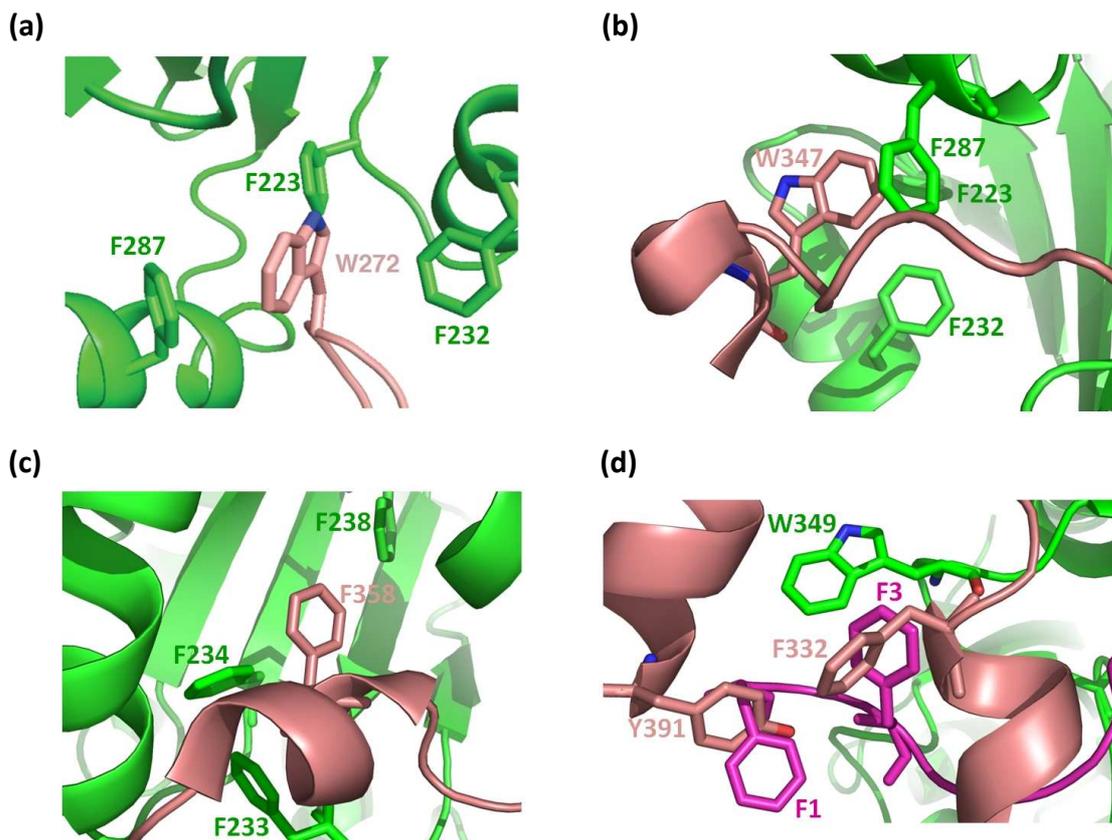


Abbildung 74: Strukturelle Verifizierung der Peptid-Bindungsspezifität von PDIs. Die beobachtete Peptid-Bindungsspezifität von PDIs und ihren einzelnen Domänen kann durch strukturelle Daten bestätigt werden. Die **b'**-Domäne von PDI interagiert mit der β -hairpin Schleife von Ero1 α über *stacking*-Interaktionen der aromatischen Seitenketten (a); (Modell; [250]). Ähnliche Wechselwirkungen treten bei der intramolekularen Interaktion des **x-linkers** mit der **b'**-Domäne von PDI (b); (pdb: 3bj5; [86]) sowie des C-terminalen Abschnittes von ERp44 mit dessen **b'**-Domäne auf (c); (pdb: 2r2j; [99]). Ebenso kommt es in der Kristallstruktur der **a'**-Domäne von ERp46 (s. Abschnitt 3.5.4.2.) zu intermolekularen Wechselwirkungen mit aromatischen Resten des Symmetrie-verwandten Moleküls (d). Die Interaktion erfolgt hierbei über *stacking*-Interaktionen mit dem konservierten Trp-Rest des aktiven Zentrums (W349). Bemerkenswert ist, dass in der überlagerten Struktur von humanem Thioredoxin (pdb: 1mdi; [283]) ein spezifisch gebundenes Peptid aus NF- κ B eine nahezu identische räumliche Position der aromatischen Reste aufweist. Dies deutet auf die Wichtigkeit der räumlichen Position von aromatischen Seitenketten bei der Substratinteraktion hin und erklärt die in dieser Arbeit ermittelte Peptid-Bindungsspezifität der verschiedenen PDIs. Die **b'**-Domänen von PDI und ERp44 bzw. die **a'**-Domäne von ERp46 sind jeweils in grün dargestellt. Die gebundenen Sequenzen der β -hairpin Schleife von Ero1 α , des **x-linkers** von PDI und des C-terminalen Teil von ERp44 sowie des Symmetrie-verwandten Moleküls von ERp46a' sind jeweils in rosa dargestellt. Die überlagerten Reste des durch Thioredoxin gebundenen Peptides aus NF- κ B sind in magenta hervorgehoben. Thioredoxin ist nicht gezeigt.

4.3.7. Die Peptid-Bindungsspezifität bildet die molekulare Grundlage der katalytischen Aktivität und Chaperon-Funktion von PDIs

Obwohl die katalytische Aktivität und Chaperon-Funktion von PDIs bereits seit z.T. mehreren Jahrzehnten untersucht wurden, herrscht über die molekularen Grundlagen bisher weitestgehend Unklarheit. Eine Hauptursache ist das fehlende Wissen über die exakten strukturellen Merkmale in Proteinen, die durch PDIs erkannt und gebunden werden. Die in dieser Arbeit ermittelte Peptid-Bindungsspezifität von PDIs erlaubt die Etablierung eines Modelles, in der die Substraterkennung unmittelbar mit der Redoxaktivität verknüpft ist.

Danach binden PDIs in ihren Substratproteinen an Regionen mit basischen und aromatischen Aminosäureresten. Anschließend erfolgt das *Scannen* von benachbarten Sequenzbereichen auf das Vorhandensein von Cys-Resten bzw. Disulfidbrücken. Diese könnten dann oxidiert bzw. reduziert oder isomerisiert werden. Dieser postulierte Mechanismus wäre dem weiterer Chaperone, wie z.B. dem des *trigger*-Faktors aus *E. coli*, ähnlich (vgl. [281]). Da aromatische Reste bevorzugt im hydrophoben Inneren von Proteinen lokalisiert sind, könnte die präferentielle Interaktion von PDIs mit diesen Resten auch die Zugänglichkeit zu partiell verborgenen (nicht-nativen) Disulfidbrücken erlauben (vgl. [63, 84]). Die Resultate dieser Arbeit implizieren ebenfalls, dass die Cys-Reste in Substratproteinen durch PDIs nicht direkt erkannt werden, sondern dass die Interaktion (und die Katalyse) durch die unmittelbar benachbarten Sequenzen bestimmt wird. Diese Annahme wird durch neuste Untersuchungen bestätigt, in denen gezeigt werden konnte, dass PDI und PDIp auch mit nativen Disulfidbrücken in RNase Redox-Reaktionen eingehen können [284]. Der native bzw. nicht-native Zustand einer Disulfidbrücke ist demnach nicht der determinierende Faktor der Erkennung durch PDIs.

Ein Hauptmerkmal der Aggregation von Proteinen ist die Bildung von intermolekularen β -Faltblättern (*cross-beta* Aggregate); [285]. Dies stimmt mit der hier beobachteten präferentiellen Interaktion von PDIs mit Peptiden, welche β -Stränge enthalten, gut überein (s. Abschnitt 3.7.4.). Dies wiederum legt die Vermutung nahe, dass die bevorzugte Interaktion von PDIs mit β -Faltblättern ein wichtiges Kriterium hinsichtlich ihrer Funktion als molekulare Chaperone darstellt. PDI-Chaperone könnten demnach aggregationsanfällige Regionen innerhalb von Proteinen, respektive β -Stränge, erkennen und hierdurch eine Aggregation verhindern. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass aggregationsanfällige Regionen in Proteinen häufig von s.g. *gatekeeper*-Sequenzen flankiert werden, die den Faltungsprozess von Proteinen steuern [285]. Eine Assoziation dieser Bereiche wird durch sterische oder ladungsabhängige Abstoßungen verhindert. Es konnte gezeigt werden, dass *gatekeeper*-Sequenzen bevorzugt positiv geladene Reste in der Nähe von aggregationsanfälligen Regionen enthalten [285]. In Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Peptid-Bindungsspezifität von PDIs kann spekuliert werden, dass auch PDIs in ihrer Funktion als Chaperone spezifisch mit solchen *gatekeeper*-Sequenzen interagieren und somit die Aggregation bestimmter Regionen in Proteinen unterdrücken.

Ein klassisches Beispiel ist hierbei die Aggregation von α 1-Antitrypsin, die zu schwerwiegenden Funktionsstörungen v.a. der Leber führt [286]. α 1-Antitrypsin hat mehrere aggregationsanfällige Regionen, die im hydrophoben Inneren des Proteins lokalisiert sind und

sich den zentralen β -Faltblättern zuordnen lassen. Interessanterweise interagieren die in dieser Arbeit untersuchten PDIs mit mehreren Sequenzbereichen von α 1-Antitrypsin, insbesondere der zentralen β -Faltblätter des Proteins (s. Abb. 75). Diese β -Faltblattstrukturen enthalten hydrophobe und aromatische Sequenzabschnitte, welche durch meist positiv geladene Reste unterbrochen werden. Dies unterstützt ebenfalls die Annahme der spezifischen Erkennung derartiger Sequenzen durch PDIs und erklärt ihre Wirkungsweise als molekulare Chaperone.

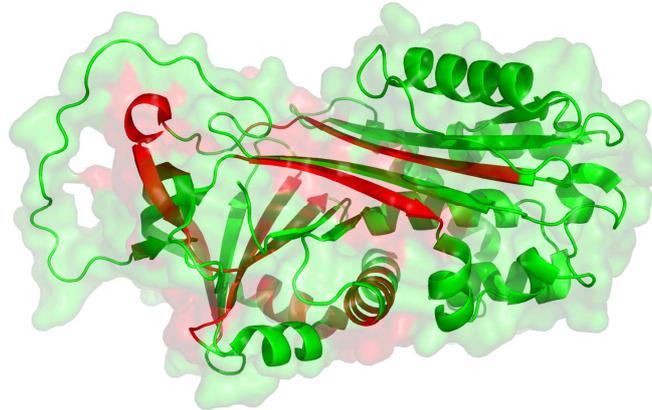


Abbildung 75: Interaktion von PDIs mit aggregationsanfälligen Sequenzen in α 1-Antitrypsin. Die untersuchten PDIs binden verstärkt an Peptidsequenzen, die den zentralen β -Faltblättern des Proteins zugeordnet werden können. Für einige dieser Bereiche ist bekannt, dass die Ausbildung von intermolekularen β -Faltblättern zur Aggregation des Proteins führt. Diese Bereiche enthalten ebenfalls mehrere positiv geladene Sequenzen (*gatekeeper*). PDIs könnten in ihrer Funktion als molekulare Chaperone durch Interaktion mit diesen Bereichen einer Aggregation entgegenwirken. Die gebundenen Sequenzen sind in rot dargestellt. Gezeigt ist das murine α 1-Antitrypsin-Homologe Serpin A3N (pdb: 1yxa).

4.3.8. AGR2 bindet an Peptide aus krankheitsassoziierten Proteinen

AGR2 stellt vermutlich ein hinsichtlich der Substratinteraktion spezialisiertes Mitglied der PDI-Familie dar. Im Gegensatz zu anderen PDIs, sind in dem durch AGR2 gebundenen Peptid-*pool* Peptide aus humanen krankheitsassoziierten Proteinen statistisch angereichert. In dieser Arbeit konnte u.a. eine präferentielle Interaktion von AGR2 mit Peptiden des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (Her2/neu) sowie mit Peptiden des von Willebrand-Faktors (vWF) und Integrin β 1 (ITGB1) nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.7.5.). Der vWF beeinflusst die Adhärenz von Thrombozyten an das subendotheliale Gewebe während der Blutgerinnung. Hohe Plasmakonzentrationen des vWF wurden in Patienten mit unterschiedlichen Krebs-Erkrankungen nachgewiesen, wobei dieser Effekt vermutlich mit der Tumor-assoziierten Angiogenese bei metastatischen Prozessen zusammenhängt [287-289]. Integrine, wie z.B. ITGB1, vermitteln Zell-Zell-Kontakte und sind bei der Zellmigration beteiligt. ITGB1 besitzt einen positiven Einfluss auf die Invasion von Tumorzellen in umliegende Gewebe [290]. Des Weiteren besteht ein pathologischer Zusammenhang

zwischen der ITGB-Expression und dem TGF β -Signalweg [291]. In Übereinstimmung mit der Interaktion von AGR2 mit Peptid-Antigenen von Her2/neu, wurde in aktuellen Untersuchungen eine Beteiligung von AGR2 bei der Pathogenese verschiedener Krebsarten, v.a. bei Mammakarzinomen, nachgewiesen [176-178]. Her2/neu wird verstärkt auf der Oberfläche von Brustzellkarzinomen exprimiert und aktuelle Therapieformen beruhen auf der spezifischen Blockierung dieses Rezeptors [292].

4.4. Vorhersage von Bindungsepitopen auf PDI-Interaktionspartnern

Der in dieser Arbeit verwendete Peptid-Array enthielt die überlappenden Sequenzen von mehreren PDI-Interaktionspartnern (s. Tabelle 10, Anhang). Die Kartierung der von den verschiedenen PDIs gebundenen Peptide auf der dreidimensionalen Struktur von PDI-Interaktionspartnern ermöglichte die Vorhersage von potentiellen Bindungsepitopen. Die in dieser Arbeit identifizierten Bindungsepitope geben allerdings lediglich Hinweise auf mögliche Interaktionen. Inwieweit diese Interaktionen auch im Kontext des nativen Proteins sowohl *in vitro* als auch *in vivo* relevant sind, kann mittels der Peptid-Array Methodik nicht geklärt werden. Ebenso können keine Aussagen über mögliche Bindungsaffinitäten sowie über die Lebensdauer solcher Komplexe getroffen werden. Weiterführende Interaktionsstudien, beispielsweise mittels *crosslinking*, *Biacore*, FRET-Untersuchungen, NMR- oder aber auch Co-Kristallisationsversuche könnten die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen und vertiefen.

4.4.1. PDIs interagieren mit basischen Sequenzbereichen und aromatischen Resten

In Analogie zu der ermittelten Peptid-Bindungsspezifität zeigen auch die durch die verschiedenen PDIs gebundenen Epitope auf ihren Interaktionspartnern eine Anreicherung von aromatischen sowie positiv geladenen Resten (s. Abschnitt 3.7.7.). Die z.B. auf der **b**-Domäne von ERp29 gebundenen Bereiche enthalten mehrere *Cluster* von aromatischen Aminosäureresten. Eine Ähnliche Anreicherung von aromatischen Resten zeigt sich auch in den durch die verschiedenen PDIs gebundenen Sequenzbereichen der globulären Domäne von Calnexin sowie der potentiellen Substratbindungsstelle von Grp94 und BiP. Die Präferenz für basische Reste zeigt sich z.B. in den gebundenen Sequenzbereichen der **b'**-Domäne von PDI und ERp57, des P-Arms von Calnexin sowie in Bereichen von Ero1 α . Eine Ausnahme bildet dabei ERp29, welches ebenfalls mit negativ geladenen Epitopen interagiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Spezifität von PDIs für Sequenzen mit aromatischen und positiv geladenen Resten nicht nur auf die Primärstruktur innerhalb von Peptiden beschränkt ist, sondern sich auch in der Tertiärstruktur von Proteinen widerspiegelt.

4.4.2. PDIs binden an funktionelle Bereiche ihrer Interaktionspartner

Die durch PDIs gebundenen Sequenzbereiche in $\alpha 1$ -Antitrypsin sind hauptsächlich im hydrophoben Inneren des Proteins lokalisiert (s. Abb. 75). $\alpha 1$ -Antitrypsin repräsentiert damit ein Substratprotein, für dessen Interaktion mit PDIs vermutlich deren Chaperon-Eigenschaft verantwortlich ist. Auf der anderen Seite konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch Sequenzbereiche durch PDIs gebunden werden, die auf der Oberfläche lokalisiert sind. Diese Bereiche auf Proteinen repräsentieren vermutlich funktionelle Wechselwirkungen. Eine Diskriminierung zwischen funktionellen Interaktionen und Chaperon-Wechselwirkungen ist jedoch schwierig, da bekanntermaßen jedes Protein während seiner Translokation ins ER zu Beginn im ungefalteten Zustand vorliegt und damit potentiell mit PDIs interagieren kann. Die hier identifizierten potentiellen Bindungsepitope implizieren eine funktionelle Interaktion von PDIs, die über einfache Chaperon-Wechselwirkungen hinausgeht (s. Abschnitt 3.7.7.).

ERp29-Bindungsepitope:

Beispielsweise interagieren die untersuchten PDIs mit Sequenzbereichen auf der **b**-Domäne von ERp29, die auch bei der Dimerisierung und Substratbindung beteiligt sind [24, 136, 246]. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass ERp29 in Komplexen mit PDIs und anderen ER-Chaperonen gefunden wurde (s. Abschnitt 1.5.1.2.). Eine Interaktion von ERp29 mit PDIs konnte bereits mittels *pull-down* Interaktionsstudien nachgewiesen werden [142].

PDI- und ERp57-Bindungsepitope:

Die untersuchten PDIs zeigen eine Interaktion mit Sequenzbereichen, welche in räumlicher Nähe zu den aktiven Zentren der redox-aktiven Domänen von PDI und ERp57 liegen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Reste in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum vermutlich evolutionär für eine optimierte Protein-Protein-Interaktion selektiert wurden. Die homologen Bereiche der katalytischen Domänen von ERp57 sind darüber hinaus bei der Interaktion mit Tapasin beteiligt [98]. Die gebundenen Sequenzen innerhalb des PDI**bb'**-Fragmentes beschränken sich dagegen auf die Bereiche, die räumlich gesehen auf der gegenüberliegenden Seite der Substratbindungstasche liegen. Die homologen Bereiche des **bb'**-Fragmentes von ERp57 enthalten mehrere Arg-Reste, die bei der Interaktion mit Crt/Cnx beteiligt sind [119]. Dies stimmt mit früheren Studien überein, in denen gezeigt werden konnte, dass ERp57 kompetitiv an Crt und PDI bindet [293]. Es kann daher angenommen werden, dass auch die Heterooligomerisierung von PDIs durch Interaktion mit den entsprechenden Bereichen des **bb'**-Fragmentes stattfindet.

Calnexin-Bindungsepitope:

Im Falle von Cnx interagieren die verschiedenen PDIs verstärkt mit Sequenzbereichen der globulären Domäne, insbesondere mit Resten in der Nähe der Glucose-Bindestelle. Entgegen den Erwartungen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keinerlei signifikante Interaktion von ERp57 mit Peptiden des P-Arms von Cnx nachgewiesen werden (vgl. [30, 31, 116, 119, 248]). Daraus kann geschlossen werden, dass für die Interaktion von ERp57 mit dem P-Arm von Cnx das intakte Protein notwendig ist. Ebenso wäre denkbar, dass die Haupt-Interaktionsstelle von ERp57 tatsächlich innerhalb der globulären Domäne von Cnx liegt und dass die Interaktion mit dem P-Arm sekundär auftritt und eher einen stabilisierenden Effekt besitzt. Des Weiteren könnten auch intramolekulare Konformationsänderungen von Cnx dazu führen, dass der distale Teil des P-Arms in räumliche Nähe zur **b**- bzw. **b'**-Domäne von ERp57 gelangt und die Bindung dadurch stabilisiert wird. In der Tat konnte bereits durch elektronenmikroskopische Untersuchungen die Flexibilität des P-Arms nachgewiesen werden [248]. Darüber hinaus wird angenommen, dass die globuläre Domäne von Cnx eine Polypeptid-Interaktionsstelle besitzt, die in räumlicher Nähe zur Glucose-Bindetasche liegt [248, 294]. Die Überlappung der putativen Polypeptid-Bindetasche von Crt mit der ERp57-Interaktionsstelle stimmt mit der in dieser Arbeit beobachteten kompetitiven Peptid-Interaktion von ERp57 und Crt überein (s. Abschnitt 3.7.1.).

Ero1 α -Bindungsepitope:

Kürzlich konnten für einige PDIs eine direkte Interaktion mit Ero1 α nachgewiesen werden [53, 54]. Neben der PDIA'-Domäne ist für die nicht-kovalente Assoziation von PDI mit Ero1 α hauptsächlich die **b'**-Domäne verantwortlich [46, 48, 53, 250]. In Übereinstimmung mit neusten Studien konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion von PDIs mit Sequenzbereichen von Ero1 α detektiert werden, welche bei der nicht-kovalenten Assoziation mit PDI und ERp57 beteiligt sind (vgl. [53, 250]). Dies betrifft hauptsächlich die basischen Sequenzen direkt unterhalb der regulatorischen Schleife sowie die Reste der β -*hairpin* Schleife. Obgleich konnte auch ein weiterer Bereich auf der Oberfläche von Ero1 α identifiziert werden, der möglicherweise bei der Interaktion mit PDIs beteiligt ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen einer kürzlich publizierten Arbeit überein, in der die Deletion der β -*hairpin* Schleife von Ero1 α zwar die Interaktion mit PDI signifikant reduziert, jedoch nicht völlig aufhebt [250]. PDIs interagieren darüber hinaus mit Sequenzen, die das katalytische CXXCXXC-Motiv enthalten. Entgegen den Erwartungen konnte in dieser Arbeit keine signifikante Bindung der verschiedenen PDIs an Peptide detektiert werden, die mit den Cys-

Resten der regulatorischen Schleife (*shuttle*-Cysteine) von Ero1 α überlappen (vgl. [46-48]). Es kann spekuliert werden, dass PDIs auch direkt mit den Cys-Resten des aktiven Zentrums von Ero1 α interagieren können. Dies erfordert eine konformationelle Strukturänderung der Regionen in der Nähe zum katalytischen Zentrum, insbesondere der Reste der regulatorischen Schleife. Derartige Konformationsänderungen wurden bereits postuliert [46, 51, 53, 295]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zudem darauf hin, dass hauptsächlich nicht-kovalente Interaktionen zwischen den verschiedenen PDIs und Ero1 α für die Stabilität des Komplexes verantwortlich sind. Dies stimmt mit neusten Studien überein, in denen nachgewiesen wurde, dass die Interaktion von Ero1 α mit PDI-Mutanten, in denen das CXXC-Motiv durch AXXA ersetzt wurde, vermutlich auf reversiblen nicht-kovalenten Assoziationen beruht [53].

BiP-Bindungsepitope:

In früheren Studie wurde BiP zusammen mit mehreren PDIs als Bestandteil von Multiproteinkomplexen identifiziert [16]. Das PDI-Familienmitglied ERdj5 fungiert darüber hinaus als Co-Chaperon von BiP [11]. Für P5 wurde ebenfalls kürzlich eine Interaktion mit BiP vorausgesagt [54]. In Peptid-Interaktionsstudien konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die untersuchten PDIs verstärkt an Sequenzbereiche binden, die sich den Sub-Domänen Ib und IIb der Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) von BiP zuordnen lassen. Diese Sequenzbereiche sind ebenfalls bei der Interaktion der NBD von BiP mit seinen Co-Chaperonen und Nukleotid-Austauschfaktoren beteiligt (s. Abb. 76); [10, 296-298]. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass neben ERdj5 auch andere PDIs als Co-Chaperone direkt mit BiP interagieren. Die Interaktion von PDIs mit BiP könnte einen Einfluss auf dessen Substrataffinität sowie Substratspezifität haben.

RNaseA-Bindungsepitope:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDIs mit (denaturierter) RNaseA interagieren (s. Abschnitt 3.6.5.). Zudem dient RNaseA als klassisches Modell-Protein für die Bestimmung der katalytischen Eigenschaften von PDIs [63]. RNaseA enthält vier Disulfidbrücken. Die verschiedenen PDIs interagieren mit Sequenzen eines begrenzten Bereiches des Proteins, der zwei charakteristische Disulfidbrücken enthält. Sequenzbereiche des restlichen Teils von RNaseA, welcher die beiden anderen Disulfidbrücken enthält, werden dagegen nicht gebunden. Interessanterweise enthalten die gebundenen Sequenzen sowohl aromatische Reste als auch zwei konservierte Arg-Reste, die für die Interaktion von RNase mit dem RNase-Inhibitor verantwortlich sind (s. Abb. 76); [299].

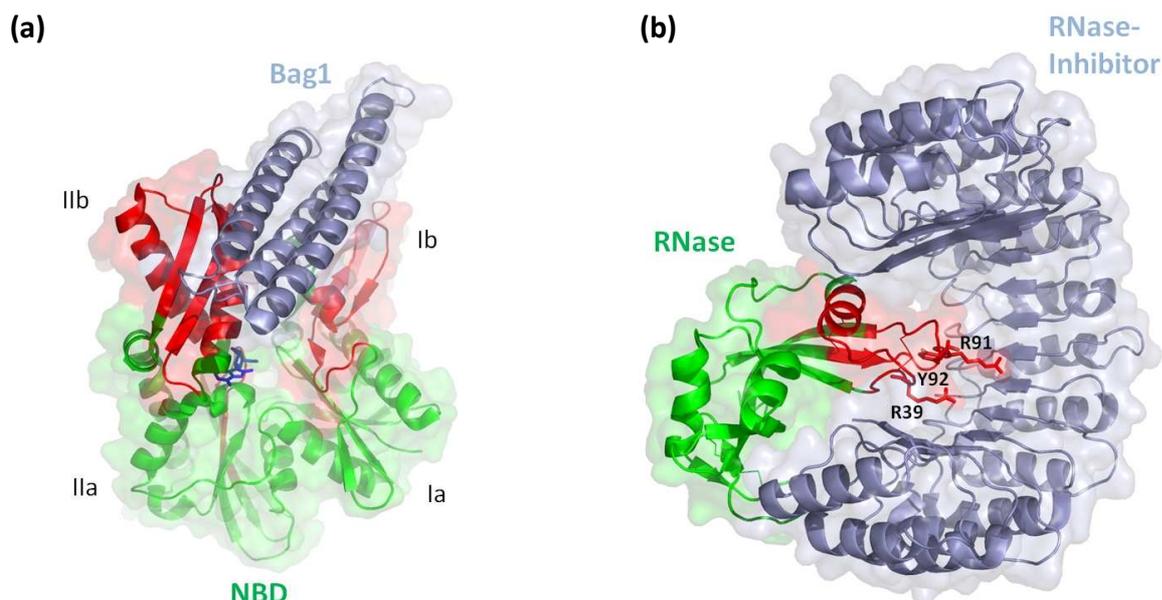


Abbildung 76: Funktionelle BiP- und RNase-Bindungsepitope. PDIs interagieren mit denjenigen Sequenzbereichen der Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) von BiP, die auch bei der Interaktion mit Nukleotid-Austauschfaktoren, wie z.B. Bag1, beteiligt sind (a). Im Falle von RNaseA werden von PDIs diejenigen Sequenzbereiche gebunden, die z.T. bei der Bindung des RNase-Inhibitors beteiligt sind (b). Diese Bereiche enthalten aromatische und basische Reste, die für eine Interaktion von RNase mit dem RNase-Inhibitor essentiell sind [299]. ADP, R91, R39 und Y92 sind als Stäbchenmodell dargestellt. Gebundene Sequenzen sind in rot hervorgehoben. Bag1 sowie der RNase-Inhibitor sind jeweils in blau dargestellt. pdb(RNase): 1dza; [245]; pdb(hsc70/Bag1): 1hx1; [296].

4.5. Struktur-Funktions-Beziehung der katalytischen Domänen von ERp46

4.5.1. Ein flexibler Trp-Rest reguliert die Substrat-Komplementarität der katalytischen Domänen

Es wurde angenommen, dass die **b'**-Domäne von PDI die wichtigste Substratbindungsstelle des Proteins enthält [83]. Bisherige strukturelle Untersuchungen zur Substratinteraktion von PDIs beschränkten sich demnach hauptsächlich auf den Beitrag der **b'**-Domäne [86-88, 99, 101, 119, 203]. ERp46 stellt das einzige Mitglied der humanen PDI-Familie dar, welches ausschließlich aus mehreren katalytischen Domänen aufgebaut ist. Die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur des Proteins sollte es erlauben, Aussagen zum molekularen Mechanismus der Substratinteraktion von redox-aktiven Domänen zu treffen.

Mehrere Reste in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums der katalytischen Domänen von PDIs sind stark konserviert (s. Abb. 81, Anhang); [44, 241]. Im Falle der **a'**-Domäne von ERp46 betrifft dies v.a. die Reste in direkter Nachbarschaft der beiden reaktiven Cys-Reste (W349, G351 und H352) sowie Reste der räumlich benachbarten Schleife (G395, Y396 und P397; *cis*-Prolin Schleife). Die Überlagerung der in dieser Arbeit ermittelten Kristallstruktur der ERp46**a'**-Domäne mit dessen NMR-Struktur (pdb: 2diz, unveröffentlicht) zeigte

signifikante konformationelle Unterschiede in der Nähe des aktiven Zentrums (s. Abschnitt 3.5.4.2.). Am auffälligsten ist die unterschiedliche Konformation der Seitenkette von W349. Die unterschiedliche Konformation der Indol-Seitenkette von W349 führt unmittelbar zu einer unterschiedlichen Lösungsmittelzugänglichkeit des N-terminalen reaktiven Cys-Restes (C350). Es kann daher spekuliert werden, dass die Seitenkette von W349 als eine Art "Deckel" fungiert und eine "offene Konformation" sowie eine "geschlossene Konformation" annehmen kann. In Analogie hierzu wurde bereits in der Kristallstruktur von PDI1p (pdb: 2b5e) eine geringfügig unterschiedliche Konformation der Seitenkette des Trp-Restes im aktiven Zentrum der katalytischen Domänen beobachtet [85]. Die Autoren nahmen an, dass die Seitenkette von W405 innerhalb der **a'**-Domäne eine größere Flexibilität aufweist, als die rigidere Seitenkette von W60 in der **a**-Domäne. Obgleich ist die Elektronendichte der Seitenkette von W405 weniger gut aufgelöst und W405 ist in keinerlei intermolekularen Wechselwirkungen mit weiteren Resten involviert. Demgegenüber ist die Elektronendichte der Seitenkette von W349 in der Kristallstruktur der ERp46**a'**-Domäne gut definiert.

In Übereinstimmung dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Seitenkette von W349 in einer hydrophoben Tasche eines Symmetrie-verwandten Moleküls integriert liegt. Neben hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Resten kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Polypeptidrückgrat des Symmetrie-verwandten Moleküls. Obwohl die beobachtete Interaktion vermutlich durch die Packung der Moleküle innerhalb des Kristalls hervorgerufen wird, kann angenommen werden, dass die Kristallstruktur der ERp46**a'**-Domäne einen Substrat-gebundenen Zustand des Proteins widerspiegelt. Dies wird durch die strukturelle Ähnlichkeit mit weiteren Thioredoxin-Substrat-Komplexen bestätigt (s. Abb. 77 und Abschnitt 4.3.6.). Die berechnete Interaktionsfläche zwischen beiden Molekülen liegt mit ca. 500 Å² beträchtlich unterhalb des normalerweise beobachteten Bereiches von 1.400-3.000 Å² [300]. Vermutlich wird die Interaktion durch die Anordnung der Moleküle innerhalb des Kristalls stabilisiert. Die Interaktionsfläche zwischen den beiden Symmetrie-verwandten Molekülen in der ERp46**a'**-Kristallstruktur korreliert jedoch relativ gut mit den Interaktionsflächen zwischen den einzelnen katalytischen Domänen von ERp57 mit Tapasin (~ 750 Å²), DsbA mit SigA-Peptid (~ 760 Å²) sowie Thioredoxin mit dem NF-κB-Peptid (~ 670 Å²); [98, 283, 301]. Bei einer kumulativen Substratinteraktion aller drei katalytischen Domänen von ERp46 würde sich eine theoretische Interaktionsfläche von ca. 1.500 Å² ergeben (vgl. Abschnitt 4.5.3.).

Die Kristallstruktur der **a'**-Domäne von ERp46 demonstriert damit erstmals die Bedeutung der konformationellen Flexibilität des konservierten Trp-Restes im aktiven

Zentrums der katalytischen Domänen für die Substratinteraktion von PDIs. Bestätigt werden die strukturellen Ergebnisse dieser Arbeit durch frühere Mutagenese-Studien an Thioredoxin und PDI1p. Darin konnte gezeigt werden, dass die Substitution des konservierten Trp-Restes durch Ala oder durch polare Reste die katalytischen Eigenschaften des Enzyms signifikant beeinflusst [85, 239]. In Korrelation hierzu konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Verringerung der Interaktion der PDIaW35A-Variante mit immobilisierter, denaturierter RNaseA im Vergleich zum Wildtyp-Protein nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.6.5.).

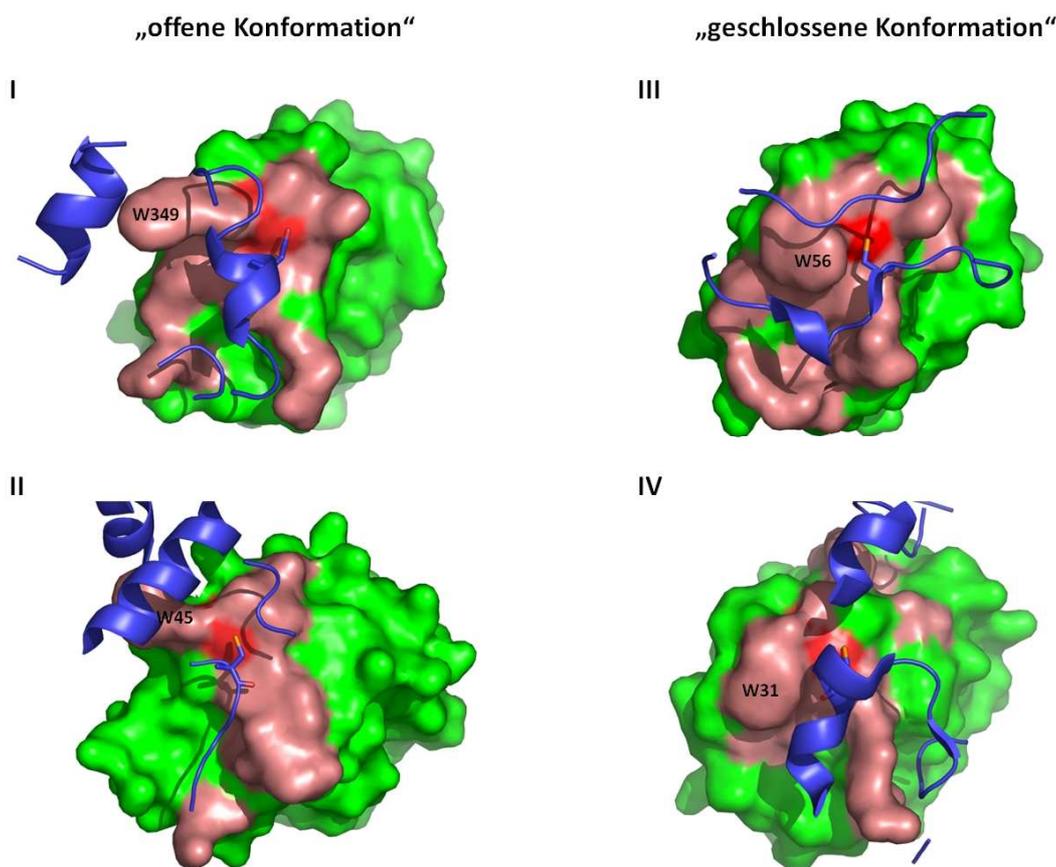


Abbildung 77: Substrat-Komplementarität der katalytischen Domänen von Trx-verwandten Proteinen. Die Mitglieder der Trx-Familie zeigen bemerkenswerte Übereinstimmungen in ihrem Substratinteraktionsmechanismus. Die strukturelle Komplementarität zu ihren Substraten wird maßgeblich über den konservierten und flexiblen Trp-Rest des aktiven Zentrums bestimmt. Dieser kann eine "offene Konformation" (links) oder eine "geschlossene Konformation" (rechts) annehmen. In der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne (I) sowie in der Struktur des Komplexes der Thioredoxin-Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (II); (pdb: 2puk; [302]) nimmt die Seitenkette des konservierten Trp-Restes (W349 bzw. W45) die "offene Konformation" an. Die Seitenkette des Trp-Restes inseriert jeweils in eine hydrophobe Tasche, die v.a. durch aromatische Reste der benachbarten α -Helices des Substratproteins bzw. des Symmetrie-verwandten Proteins (blau) gebildet wird. Hierdurch wird die Protein-Protein-Interaktion stabilisiert und der Zugang zum N-terminalen reaktiven Cys-Rest (rot) ermöglicht. Im Falle des ERp57-Tapasin-Komplexes (III); (pdb: 3f8u; [98]) sowie des Komplexes von Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase (IV); (pdb: 1f6m; [303]), nimmt der flexible Trp-Rest (W56 bzw. W31) jeweils die "geschlossene Konformation" ein. Eine Stabilisierung der Interaktion durch Insertion in eine hydrophobe Tasche tritt hier nicht auf. Stattdessen kommt es zu lokalen Wechselwirkungen, v.a. über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Polypeptidrückgrat des Substrates. Neben den Resten der PWCGHC-Konsensussequenz tragen v.a. die Reste der *cis*-Prolin Schleife zur Substratinteraktion bei. Interagierende Reste sind jeweils in rosa hervorgehoben. Die Cys-Reste der Substratproteine bzw. der Asp-Rest des Symmetrie-verwandten Moleküls der ERp46a'-Domäne (D334) sind jeweils als Stäbchen-Modell dargestellt.

Eine genauere Analyse der Reste auf der Oberfläche der ERp46a'-Domäne, die bei der Interaktion mit dem Symmetrie-verwandten Molekül beteiligt sind, zeigt bemerkenswerte Übereinstimmungen mit den interagierenden Resten in anderen Enzym-Substrat-Komplexen von Mitgliedern der Thioredoxin-Familie (s. Abb. 77). Dies sind beispielsweise die Komplexe von ERp57-Tapasin, Thioredoxin-BASI, DsbA-DsbB, Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase und Thioredoxin-Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase [98, 302-305]. In diesen Komplexen tragen hauptsächlich die Reste des CXXC-Motivs und ihre unmittelbar benachbarten Reste sowie die Reste der *cis*-Prolin Schleife zur Interaktion mit den Substraten bei (s. Abb. 77). In Übereinstimmung hierzu sagen neuste Studien eine essentielle Beteiligung der Reste des CXXC-Motivs sowie der *cis*-Prolin Schleife bei der Substratinteraktion von Trx-verwandten Proteinen vorher [306, 307].

Der konservierte Trp-Rest in unmittelbarer Nachbarschaft des CXXC-Motivs nimmt in den meisten bekannten Strukturen von Trx-verwandten Proteinen die "geschlossene Konformation" an. In der Kristallstruktur des Komplexes von Thioredoxin-Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (pdb: 2puk; [302]) nimmt der konservierte Trp-Rest dagegen die "offene Konformation" an. Hierbei ragt die Trp-Seitenkette aus Thioredoxin heraus und inseriert in eine hydrophobe Tasche, die durch Reste der Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase gebildet wird [302]. Dieser Interaktionsmechanismus ist dem der ERp46a'-Domäne mit seinem Symmetrie-verwandten Molekül sehr ähnlich. Demgegenüber nimmt der konservierte Trp-Rest in der Kristallstruktur des Thioredoxin-Thioredoxin-Reduktase-Komplexes (pdb: 1f6m; [303]) die "geschlossene Konformation" an. Dieser Interaktionsmechanismus ähnelt wiederum stark dem des ERp57-Tapasin-Komplexes (pdb: 3f8u; [98]); (s. Abb. 77). Eine ähnliche Konformationsänderung des konservierten Trp-Restes konnte kürzlich auch in der Kristallstruktur von humanem Thioredoxin beobachtet werden (pdb: 3e3e; [308]). In diesem Fall trägt die Trp-Seitenkette allerdings nicht zu signifikanten intermolekularen Wechselwirkungen mit dem Symmetrie-verwandten Molekül bei.

Neben dem konservierten Trp-Rest zeigt auch der His-Rest des CGHC-Motivs im Vergleich zur NMR-Struktur der ERp46a'-Domäne geringe konformationelle Unterschiede seiner Seitenkette. Derartige Konformationsänderungen wurden ebenfalls bei der Seitenkette des His-Restes des CPHC-Motivs in DsbA aus *E. coli* beobachtet [301]. Eine Beteiligung dieses His-Restes bei der Substratinteraktion wird angenommen. Interessanterweise nimmt D334 des Symmetrie-verwandten Moleküls in der ERp46a'-Kristallstruktur eine nahezu identische Position ein wie C95 von Tapasin im ERp57-Tapasin-Komplex und wie T369 des C-terminalen Teils von ERp44 in der ERp44-Kristallstruktur (vgl. Abb. 77); [98, 99].

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass PDIs nicht nur eine hohe konformationelle Flexibilität zwischen ihren einzelnen Domänen, sondern auch innerhalb ihrer katalytischen Domänen aufweisen. Dies erlaubt eine Anpassung an strukturell heterogene Substrate (*induced-fit* Mechanismus) und erklärt die beobachtete niedrige Substratspezifität von ERp46 und weiteren Mitgliedern der PDI-Familie. Aus vergleichenden strukturellen Untersuchungen kann darüber hinaus geschlussfolgert werden, dass der Substratinteraktionsmechanismus innerhalb der Thioredoxin-Familie ähnlich ist. Die starke Konservierung des flexiblen Trp-Restes im aktiven Zentrum der verschiedenen Mitglieder der Trx-Familie deutet zudem auf dessen Bedeutung bei der Abschirmung des reaktiven N-terminalen Cys-Restes sowie auf dessen Funktion als hydrophobe Plattform bei Protein-Protein-Interaktionen hin.

4.5.2. Die katalytischen Cys-Reste der ERp46a'-Domäne liegen bevorzugt im reduzierten Zustand vor

Ein weiterer wichtiger Aspekt, der aus der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne abgeleitet werden konnte, betrifft deren Redox-Zustand (s. Abschnitt 3.5.4.2.). Die beiden katalytischen Cys-Reste des aktiven Zentrums liegen in der reduzierten Form vor. Dies stimmt mit den Daten der NMR-Struktur überein. In der Literatur finden sich widersprüchliche Informationen hinsichtlich des präferentiellen Redox-Zustandes der katalytischen Cys-Reste des aktiven Zentrums. Beispielsweise deutet die Kristallstruktur von PDI1p (pdb: 2b5e; [85]) auf einen oxidierten Zustand der katalytischen Cys-Reste in der **a**-Domäne hin, wohingegen die Cys-Reste im aktiven Zentrum der **a'**-Domäne die oxidierte Form annehmen. Auf der anderen Seite liegen die Cys-Reste der **a'**-Domäne in der Kristallstruktur von ERp57 (pdb: 3f8u; [98]) eindeutig in der oxidierten Form vor. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die katalytischen Cys-Reste in ERp18 (pdb: 1sen; 2k8v; [103]) sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand vorliegen können. Die reaktiven Cys-Reste der beiden N-terminalen katalytischen Domänen von ERp72 (pdb: 3idv; [237]) liegen in der Kristallstruktur im reduzierten Zustand vor.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Proteinreinigung von ERp46 unter reduzierenden Bedingungen. Vor der Anionenaustauschchromatografie wurde die Probe mit DTT reduziert. Die folgenden Reinigungsschritte wurden in Anwesenheit von 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol durchgeführt. Dagegen erfolgte die Kristallisation selbst ohne die Anwesenheit von Reduktionsmitteln. Darüber hinaus lässt die lange Zeitspanne bis zur Kristallbildung vermuten, dass sich das Redoxgleichgewicht mit dem Sauerstoff der Atmosphäre eingestellt hat. Es kann daher angenommen werden, dass die reduzierte Form der

katalytischen Cys-Reste den physiologisch relevanten Zustand des aktiven Zentrums der ERp46a'-Domäne darstellt. Dies stimmt mit der beobachteten präferentiellen Reduktase-Aktivität von ERp46 und seinen isolierten katalytischen Domänen überein (s. Abschnitt 3.4.1.). Interessanterweise liegen die beiden nicht-katalytischen Cys-Reste in der ERp46a'-Kristallstruktur eindeutig in der oxidierten Form vor. Eine strukturelle Beteiligung dieser Disulfidbrücke ist nicht wahrscheinlich, da die redox-aktiven Domänen von verschiedenen PDIs ohne eine derartige Disulfidbrücke trotzdem ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen annehmen. Obgleich liegt die nicht-katalytische Disulfidbrücke in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums und es wurde angenommen, dass hierdurch der oxidierte Zustand der reaktiven Cys-Reste des aktiven Zentrums destabilisiert werden kann [64].

Ein weiterer interessanter Bezug ergibt sich aus dem Austausch der Ladung der beiden konservierten geladenen Reste in der Nähe des C-terminalen reaktiven Cys-Restes. In den redox-aktiven Domänen der meisten PDIs befindet sich in $\beta 2$ ein Glu-Rest, direkt unterhalb des C-terminalen reaktiven Cys-Restes (vgl. Abb. 30). Lediglich in der a'-Domäne von PDIp sowie in der a- und a'-Domäne von ERp46 ist dieser Rest zu Lys substituiert (s. Abb. 81, Anhang). Es wird angenommen, dass ein konservierter Arg-Rest innerhalb der flexiblen Schleifen-Region der katalytischen Domänen von PDI in räumliche Nähe zum C-terminalen Cys-Rest gelangen kann und dadurch dessen pK_a -Wert signifikant beeinflusst [66, 67]. Die Dislokation des homologen Arg-Restes in die Nähe des C-terminalen katalytischen Cys-Restes wird in der Kristallstruktur der a-Domäne von ERp72 (pdb: 3idv; [237]) durch eine Salzbrücke mit dem konservierten Glu-Rest begünstigt.

In der Kristallstrukturstruktur der ERp46a'-Domäne bildet der homologe Arg-Rest (R415) eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom von P397 der *cis*-Prolin Schleife. Es ist nicht anzunehmen, dass R415 in der a'-Domäne von ERp46 in die Nähe des aktiven Zentrums gelangen kann, da eine Salzbrücke mit K344 nicht möglich ist. Entgegen bisherigen Vermutungen kann angenommen werden, dass die Beeinflussung des pK_a -Wertes des C-terminalen katalytischen Cys-Restes durch Dislokation des konservierten Arg-Restes kein allgemeines Merkmal der redox-aktiven Domänen von PDIs darstellt (vgl. [63]). Obwohl der Abstand von K344 und C353 mit 6,8 Å zu groß für einen direkten polaren Kontakt ist, würde die Flexibilität der Seitenkette von K344 eine Annäherung auf ca. 3 Å erlauben (Daten nicht gezeigt). Eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität (insbesondere der Reaktivität des C-terminalen Cys-Restes des aktiven Zentrums) durch K344 innerhalb der a'-Domäne von ERp46 ist daher anzunehmen. Obwohl die Mutation von E47 und K81 in der a-Domäne von PDI einen Einfluss auf die katalytische Aktivität zur Folge hat, konnte keine direkte

Beeinflussung der pK_a -Werte der reaktiven Cys-Restes nachgewiesen werden (Lappi *et al.*, unveröffentlichte Daten). Basierend auf der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne kann angenommen werden, dass durch die unmittelbare Nachbarschaft der positiven Ladung von K344 die negative Ladung (deprotonierte Form) von C353 stabilisiert wird. Dies würde ebenfalls den nukleophilen Angriff von C535 auf das gemischte (intermolekulare) Disulfid von C350 begünstigen, wodurch der Reduktions-Reaktionsweg präferiert würde (vgl. Abb. 4). Dies würde die präferentiell katalysierte Reduktion durch ERp46 erklären.

4.5.3. Die räumliche Anordnung der katalytischen Domänen von ERp46 bildet die Grundlage der effizienten Substratbindung

Mittels analytischer Gelfiltration und limitierter Proteolyse konnte gezeigt werden, dass ERp46 eine hohe inter-Domänen Flexibilität aufweist (s. Abschnitt 3.3. und 3.5.3.). Die nicht-globuläre Form von ERp46 wurde ebenfalls durch analytische Ultrazentrifugation bestimmt. Der für ERp46 ermittelte s -Wert von 3,0 S liegt unter dem für ein globuläres Protein erwarteten s -Wert von ca. 3,5 S. Der kleinere s -Wert deutet demnach auf eine gestreckte Konformation hin. Versucht man aus den gemessenen s -Werten und dem ermittelten Molekulargewicht die Form von ERp46 zu berechnen, so erhält man ein Ellipsoid mit den Achsenlängen von ca. 5-10:1. Dieser Wert sollte allerdings nur als qualitativ angesehen werden, da man für eine exakte Berechnung den Hydratationsgrad des Proteins benötigt. Dieser Wert liegt durchschnittlich bei ca. 0,3 g Wasser pro 1g Protein mit relativ hohen Schwankungsbreiten [309]. Darüber hinaus kann dieser Wert bei chaperonartigen Proteinen deutlich vom Durchschnittswert abweichen.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die katalytischen Domänen von ERp46 synergetisch bei der Peptid-Interaktion beteiligt sind (s. Abschnitt 3.7.1.). D.h., die simultane Bindung mehrerer katalytischer Domänen von ERp46 stabilisiert die Interaktion mit Peptiden/Proteinen (Aviditäts-Effekt). Anhand der Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne konnte eine potentielle Substratbindungstasche in der Nähe des aktiven Zentrums identifiziert werden (vgl. Abb. 35). Die Interaktionsfläche der ERp46a'-Domäne mit dem Symmetrieverwandten Molekül ist allerdings relativ gering. Für eine effiziente Substratbindung durch ERp46 müssten demnach alle drei katalytischen Domänen beteiligt sein. Eine räumliche Ausrichtung der drei Substratbindungsstellen in ungefähr die selbe Richtung wäre hierfür notwendig. Kumulative, stabilisierende Wechselwirkungen der katalytischen Domänen mit Substratproteinen wurden auch für ERp57 und ERp72 vorhergesagt, konnten jedoch bisher nicht experimentell bestätigt werden (vgl. [98, 237]).

Ein Vergleich der Primärsequenz sowie des Domänen-Aufbaus von ERp46 mit weiteren PDIs zeigt eine große Übereinstimmung in der Zusammensetzung und Länge mit der *linker*-Region des a^0a -Fragmentes von ERp72 (pdb: 3idv; [237]). Für ERp72 konnte ebenfalls eine hohe Flexibilität dieser *linker*-Regionen vorhergesagt werden [101, 237]. Die drei Trx-ähnlichen Domänen von ERp44 sind räumlich in Form eines Kleeblattes angeordnet (pdb: 2r2j; [99]). Der Aufbau und die Länge der *linker*-Regionen in ERp46 sollten dagegen eine größere Flexibilität der einzelnen Domänen erlauben. Aus den hier ermittelten funktionellen und strukturellen Eigenschaften von ERp46 kann ein dreidimensionales Modell des Proteins erstellt werden: Hierfür wurde die a -Domäne des a^0a -Fragmentes von ERp72 mit der N-terminalen a -Domäne von ERp44 überlagert. Die relative räumliche Position der C-terminalen a' -Domäne von ERp46 wurde durch Überlagerung der ERp46a'-Kristallstruktur mit der ERp44b'-Domäne modelliert. Danach ergibt sich eine gestreckte "V-förmige" räumliche Struktur von ERp46 (s. Abb. 78).

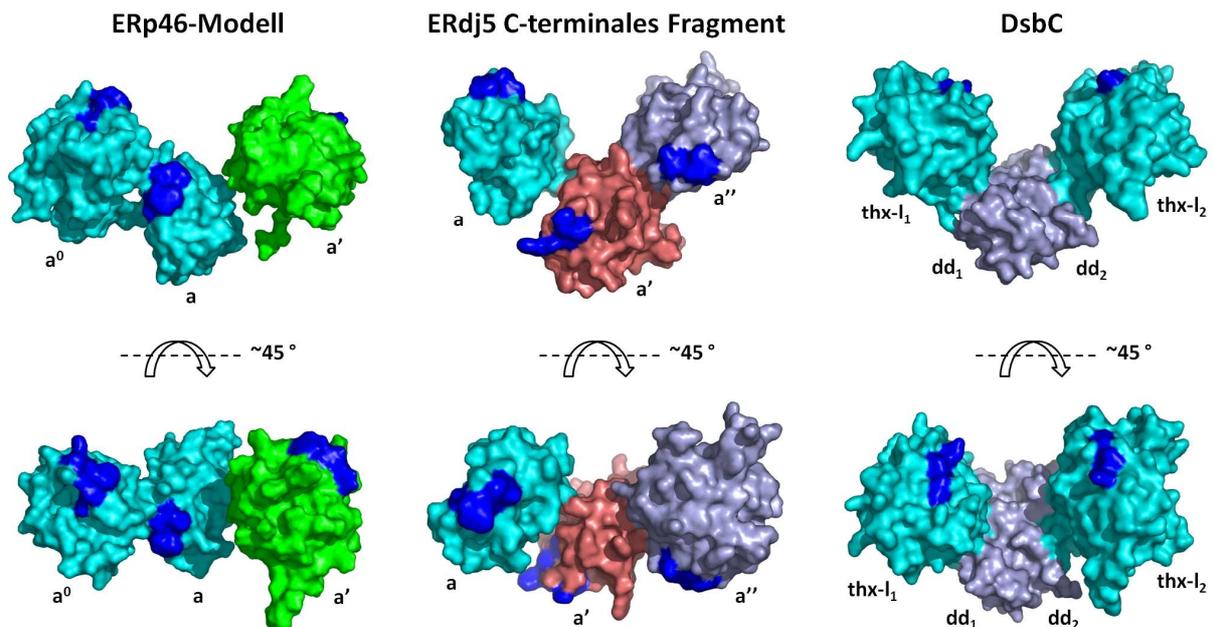


Abbildung 78: Strukturmodell von ERp46. Basierend auf den in dieser Arbeit ermittelten strukturellen und funktionellen Eigenschaften von ERp46 sowie der hohen Sequenzidentität mit der *linker*-Region des ERp72 a^0a -Fragmentes (pdb: 3idv; [237]) wurde die räumliche Anordnung der drei katalytischen Domänen von ERp46 modelliert (links). Hierfür wurde die a -Domäne des ERp72 a^0a -Fragmentes (cyan) mit der a -Domäne von ERp44 (pdb: 2r2j; [99]) überlagert. Die Kristallstruktur der ERp46a'-Domäne (grün) wurde mit der b'-Domäne von ERp44 überlagert. Das Strukturmodell von ERp46 zeigt die Form eines gestreckten "V". Die hydrophoben Substratbindungsstellen (dunkelblau) aller drei katalytischen Domänen zeigen ungefähr die selbe räumliche Ausrichtung. Dies ermöglicht die simultane Bindung von Substraten. Interessanterweise zeigen das C-terminale $aa'a''$ -Fragment von ERdj5 (pdb: 3apo; [110]); (Mitte) sowie das Homodimer der *E. coli*-Disulfidisomerase DsbC (pdb: 1eej; [310]); (rechts) eine vergleichbare räumliche Anordnung der einzelnen Domänen. Es kann angenommen werden, dass die Größe der gebildeten Kavität auf Grund der flexiblen *linker*-Regionen variiert und sich an die Größe des Substratproteins anpasst. Die katalytischen Domänen des $aa'a''$ -Fragmentes von ERdj5 sind in cyan, rot und hellblau dargestellt. Die Trx-ähnlichen Domänen der beiden DsbC-Monomeren (trx-l₁, trx-l₂) sind in cyan, die jeweiligen Dimerisierungs-Domänen (dd₁, dd₂) sind in hellblau dargestellt. Die untere Darstellung ist jeweils um ca. 45° im Vergleich zur oberen Abbildung gedreht.

Die hydrophoben Substratbindungsstellen der katalytischen Domänen zeigen ungefähr die selbe räumliche Ausrichtung. Die Kavität zwischen den Domänen ist zudem groß genug um eine effiziente Interaktion mit Substraten zu erlauben. Die Distanz zwischen den beiden N-terminalen Cys-Resten der **a**⁰- und **a**'-Domäne von ERp46 beträgt in dem Modell ca. 56 Å. Aufgrund der potentiellen Flexibilität der einzelnen *linker*-Regionen ist jedoch anzunehmen, dass dieser Abstand beträchtlich variieren kann. In der Kristallstruktur von ERp57 (pdb: 3f8u) beträgt der entsprechende Abstand zwischen den beiden redox-aktiven Domänen ca. 34 Å, während im Falle von PDI1p (pdb: 2b5e) ein Abstand von ca. 27 Å zwischen der **a**- und **a**'-Domäne gemessen werden kann [85, 98]. Es ist anzunehmen, dass der Abstand zwischen den redox-aktiven Domänen einen Einfluss auf die Substratinteraktion hat, wobei die intrinsische Flexibilität zwischen den Domänen vermutlich ein breites Substratspektrum erlaubt.

Interessanterweise zeigt das C-terminale **aa'a'**-Fragment der kürzlich publizierten Kristallstruktur von ERdj5 (pdb: 3apo; [110]) eine starke Ähnlichkeit hinsichtlich der räumlichen Anordnung seiner katalytischen Domänen. Dieser Bereich des Proteins ist bei der Interaktion von ERdj5 mit EDEM1 beteiligt [110]. Eine vergleichbare räumliche Ausrichtung der einzelnen Trx-ähnlichen Domänen lässt sich auch in der dreidimensionalen Struktur der *E. coli*-Disulfidisomerase DsbC (pdb: 1eej; [310]) wiederfinden (s. Abb. 78). Dies wiederum impliziert einen ähnlichen Substratinteraktionsmechanismus von Trx-verwandten Proteinen unterschiedlicher Spezies aber mit einem vergleichbaren Domänen-Aufbau.

4.6. CSB als potentieller PDI-Inhibitor

Basierend auf der dreidimensionalen Struktur von ERp29 konnten durch *in silico*-Analysen mehrere tausend niedermolekulare Substanzen identifiziert werden, die potentielle Liganden des Proteins darstellen [142]. Mittels *in vitro screening*-Experimenten konnten fünf Substanzen identifiziert werden, welche die Peptid-Interaktion von ERp29 potentiell inhibierten [142]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit *Chicago Sky Blue* (CSB) eine kommerziell erhältliche Substanz gefunden werden, die eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Puffersystemen aufweist und die Peptid-Interaktion von PDI ebenfalls inhibiert (s. Abschnitt 3.9.1.). Mittels Fluoreszenzspektroskopie sowie Affinitätschromatographie konnte in dieser Arbeit eine direkte Interaktion von CSB mit mehreren PDIs nachgewiesen werden. Über die Spezifität dieser Interaktion sowie die Beteiligung der verschiedenen Domänen von PDIs bei der Bindung an CSB konnte jedoch keine genaue Aussage getroffen werden. Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass der PDI-Inhibitor BPA mit den hydrophoben Bereichen der PD**Ib**'-Domäne wechselwirkt [195].

CSB gehört zur Klasse der Azofarbstoffe und setzt sich aus einem polycyclischen aromatischen Grundgerüst mit Amino-, Hydroxy-, Methoxy-, sowie Sulfonsäure-Gruppen zusammen. Interessanterweise bestehen nahezu alle bisher gefundenen potentielle Inhibitoren von PDIs aus aromatischen Grundgerüsten mit Hydroxy- (z.B. Bisphenol A) und Aminofunktionen (z.B. Ribostamycin). Auch Hormone, die als mögliche PDI-Inhibitoren identifiziert wurden, bestehen i.R. aus einem polyzyklischen (aromatischen) Grundgerüst mit einer oder mehreren Hydroxy-Gruppen (z.B. β -Östradiol); [126]. Es kann daher angenommen werden, dass die aromatischen Gruppen nicht nur in Peptiden, sondern auch in niedermolekularen PDI-Liganden ein wichtiges Interaktionsmerkmal darstellen. Die verschiedenen hydrophilen funktionellen Gruppen sind vermutlich für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureseitenketten des Proteins essentiell.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass CSB die Oxidase-Aktivität von PDI inhibiert. Da CBS keine reaktiven Sulfhydryl-Gruppen in seiner Struktur aufweist kann angenommen werden, dass der inhibitorische Effekt auf einer Konkurrenz zwischen Substrat- und Inhibitor-Bindung beruht (vgl. [196]). Wahrscheinlich erfolgt die Bindung von CSB an PDI über hydrophobe Wechselwirkungen. Die apparente Dissoziationskonstante von CSB ($\sim 12 \mu\text{M}$) liegt innerhalb des relativ großen Bereiches bereits publizierter Dissoziationskonstanten von PDI-Inhibitoren (s. Abschnitt 1.8.); [126]. Neuere Untersuchungen verdeutlichen jedoch die Problematik der Bestimmung der Affinität und Selektivität potentieller PDI-Inhibitoren [196].

Erste *in vivo*-Untersuchungen mit immortalisierten murinen Fibroblasten deuten auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit von ERp29-wt und -ko Zellen gegenüber Behandlung mit CSB hin (Hirsch *et al.*, unveröffentlichte Daten). Über mögliche Ursachen des differentiellen Einflusses von CSB auf das Zellwachstum bzw. die Zellproliferation von ERp29-wt und -ko Zellen kann jedoch nur spekuliert werden. Weiterführende *in vivo*-Studien sollten in Zukunft angestrebt werden. Es wird angenommen, dass ERp29 bei der Pathogenese verschiedener Krebserkrankungen involviert ist [169, 171-175]. Somit könnte CSB als mögliche Leitstruktur für die Identifizierung weiterer (ERp29)-Inhibitoren dienen.

Interessanterweise wurde CSB bereits in *screening*-Untersuchungen durch das *National Cancer Institute* (NCI) als potenter Inhibitor der HIV-Aktivität identifiziert. Die Inhibierung beruht hierbei auf der Verhinderung der gp120-CD4 Interaktion [311, 312]. Für die Anwendung als potentielles Krebs- sowie antivirales Therapeutikum in lebenden Organismen wären jedoch Substanzen mit einer verbesserten Löslichkeit, inhibitorischen Effizienz und Selektivität sowie verringerter Cytotoxizität von Nöten.

4.7. Abschließende Bemerkungen

Trotz der enormen Fortschritte, die in den letzten Jahren hinsichtlich der Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften sowie Chaperon-Funktion von PDIs gemacht wurden, herrscht über die molekularen Mechanismen der PDI-Substrat-Wechselwirkungen bisher weitestgehend Unklarheit. Die Bestimmung der Peptid-Bindungsspezifität von mehreren Mitgliedern der PDI-Familie in dieser Arbeit, gibt erstmals einen umfassenden Einblick in die determinierenden Faktoren der Substrat-Erkennung. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den publizierten Peptid-Bindungseigenschaften von PDIp, ERp29 und Wind, dem ERp29-Orthologen aus *Drosophila melanogaster*, gut überein [24, 95, 141]. Interessanterweise zeigen auch BiP und Calreticulin sowie mehrere bakterielle Chaperone ähnliche Peptid-Bindungsspezifitäten [14, 15, 27, 273-282]. Die Analyse der Interaktion von PDIs mit den Modell-Peptiden Mastoparan und Δ -Somatostatin zeigt ebenfalls weitestgehende Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten [82]. Die Bestimmung von potentiellen Bindungssequenzen auf PDI-Interaktionspartnern zeigt bemerkenswerte Übereinstimmungen mit kürzlich publizierten Ergebnissen [53, 250]. Darüber hinaus bestätigen strukturelle Daten dieser sowie früherer Arbeiten, die hier beobachtete Peptid-Bindungsspezifität von PDIs [86, 98, 99, 250].

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Peptid-Bindungseigenschaften der verschiedenen PDIs auf spezifischen Wechselwirkungen beruhen und kein Artefakt der verwendeten Peptid-Array Methodik darstellen. Auf der anderen Seite können durch die Verwendung einer Peptid-Bibliothek dieser Größe falsch-positive Interaktionen nicht ausgeschlossen werden. V.a. die Verwendung von Triton X-100 kann auch zum Verlust von schwach bindenden Peptiden führen. Darüber hinaus erschweren die unterschiedlichen Peptid-Bindungsaffinitäten der verschiedenen PDIs sowie deren unspezifische Wechselwirkungen mit der Glasoberfläche der Peptid-Arrays die Anwendung einheitlicher Inkubationsbedingungen. Die in dieser Arbeit ermittelten Peptid-Interaktionen sollten daher, beispielsweise durch Bestimmung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten in Lösung, näher charakterisiert werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Aktuelle Peptid-Bindungsstudien mittels NMR deuten jedoch auf eine spezifische Protein-Peptid-Interaktion hin.

Für die Bestimmung weiterer spezifischer Bindungsmuster, Ladungseffekte und Positionseffekte einzelner Reste in den gebundenen Peptiden, wird z.Z. eine umfassende *Software* entwickelt, welche eine exakte statistische Auswertung aller Daten erlaubt (Ferrari, unveröffentlichte Daten).

5. Zusammenfassung und Ausblick

PDI's katalysieren die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Disulfidbrücken in Substratproteinen [63]. Die 20 bisher bekannten Mitglieder der humanen PDI-Familie unterscheiden sich hauptsächlich in der Zusammensetzung ihrer Thioredoxin-ähnlichen Domänen [203]. PDI's können sich aus katalytischen (**a**-)Domänen und/oder nicht-katalytischen (**b**-)Domänen zusammensetzen. Unterschiede in den katalysierten Reaktionen sowie unterschiedliche Substratspezifitäten werden angenommen [63]. Hinsichtlich des molekularen Mechanismus der Substratinteraktion von PDI's herrscht bisher weitestgehend Unklarheit. In früheren Studien wurde das Hauptaugenmerk auf die **b'**-Domäne gelegt, welche die wichtigste Substratbindungsstelle in PDI darstellt [83]. Über den Substratinteraktionsmechanismus der katalytischen Domänen von humanen PDI's existieren dagegen nur wenige Erkenntnisse. Bisherige Untersuchungen zur Substratspezifität von PDI's scheiterten an der Verfügbarkeit eines geeigneten Analyseverfahrens.

Mit Hilfe einer umfangreichen Peptid-Bibliothek auf Basis der Hochdichte-Peptid-*Array* Technologie konnten erstmals die Peptid-Bindungseigenschaften mehrerer PDI's systematisch charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen PDI's sowohl in ihrer Peptid-Bindungskapazität als auch in ihrer Peptid-Bindungsselektivität signifikant voneinander unterscheiden. Diese Unterschiede resultieren unmittelbar aus der unterschiedlichen Domänen-Zusammensetzung der einzelnen PDI's. Es wurde zudem eine hohe Redundanz hinsichtlich der Peptid-Interaktion beobachtet, was auf eine geringe Substratspezifität hinweist. Mit Ausnahme von ERp29 interagieren alle untersuchten PDI's präferentiell mit Peptiden, die eine positive Gesamtladung besitzen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten sowohl auf eine Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Polypeptidrückgrat als auch auf Wechselwirkungen mit den Seitenketten aromatischer Reste und Arginin bei der Substratinteraktion von PDI's hin. Wie gezeigt werden konnte, interagieren PDI's bevorzugt mit β -Faltblattstrukturen. Die Erkennung von Cys-Reste bzw. Disulfidbrücken durch PDI's wird durch deren unmittelbar benachbarten Sequenzbereiche determiniert. Die hier ermittelte Peptid-Bindungsspezifität bildet daher die molekulare Grundlage der katalytischen Aktivität sowie Chaperon-Funktion von PDI's. Durch Verwendung von Peptid-*Arrays* mit überlappenden Peptidsequenzen von mehreren PDI-Interaktionspartnern wurden zudem deren potentielle Bindungs epitope identifiziert.

Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass PDI's, welche ausschließlich aus katalytischen Domänen aufgebaut sind, ebenfalls mit einer großen Anzahl

an Peptiden interagieren können und dass die **b'**-Domäne *per se* nicht essentiell für die Peptid- und Substrat-Bindung ist. Dementsprechend konnte für ERp57 erstmals eine direkte Interaktion mit Peptiden, unabhängig von dessen Assoziation mit Crt/Cnx, nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte erstmals experimentell demonstriert werden, dass die einzelnen (katalytischen) Domänen von verschiedenen PDIs kumulativ zur Peptid-Interaktion beitragen (Aviditäts-Effekt). Funktionelle und strukturelle Daten deuten darauf hin, dass die räumliche Anordnung und Flexibilität der katalytischen Domänen von ERp46 dessen Substratinteraktion maßgeblich bestimmt. Die Kristallstruktur der **a'**-Domäne von ERp46 zeigt zudem eine konformationelle Flexibilität innerhalb des aktiven Zentrums und erlaubt einen strukturellen Einblick in den Mechanismus der Substrat-Komplementarität der katalytischen Domänen von PDIs. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der molekulare Mechanismus der Substratinteraktion innerhalb der Thioredoxin-Superfamilie stark konserviert ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die **b**-Domäne von P5 keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität sowie Peptid-Bindungskapazität hat. Obgleich P5 und ERp46 einen ähnlichen Domänen-Aufbau besitzen, konnten strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden. Die Anwendung einer nicht-kovalenten *pull-down* Methodik erlaubte des Weiteren die Identifikation mehrerer spezifischer Interaktionspartner von ERp18 und ERp46. Eine Beteiligung von ERp18 als Eskort-Chaperon innerhalb des sekretorischen Weges wird angenommen. Basierend auf *in silico screening*-Experimenten konnte in dieser Arbeit mit *Chicago Sky Blue* eine niedermolekulare Verbindung gefunden werden, die mit PDI interagiert und die Oxidase-Aktivität inhibiert.

Weiterführende Experimente sollten einen tieferen Einblick in den molekularen Mechanismus der Substratinteraktion von PDIs zum Ziele haben. V.a. der Austausch einzelner Domänen verschiedener PDIs (*domain-swapping*) und dessen Einfluss auf die Substratspezifität sollte näher untersucht werden. Mutagenese-Studien könnten dazu beitragen, die hier identifizierten potentiellen Bindungs epitope auf PDI-Interaktionspartnern zu verifizieren und einzugrenzen. Darüber hinaus bleibt die Identifikation des natürlichen Substrat-*pools* eines jeden PDIs (z.B. mittels modifizierter *pull-down* Analysen) eines der wichtigsten Ziele. Obwohl in jüngster Zeit bedeutende Fortschritte in der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur verschiedener PDIs gemacht werden konnten, fehlen bisher strukturelle Daten von PDI-Substratkomplexen. Die Cystein-*trapping* Methodik wäre hierbei ein Mittel der Wahl. Genaue Erkenntnisse über die molekulare Wirkungsweise der heterogenen Klasse der PDI-Familie würde die Entwicklung von maßgeschneiderten Medikamenten im Kampf gegen zahlreiche humane Erkrankungen maßgeblich erleichtern.

A. Literaturverzeichnis

1. Anfinsen, C.B., Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973. **181**(96): p. 223-30.
2. van Anken, E. and I. Braakman, Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. **40**(4): p. 191-228.
3. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, Substrate recognition by the protein disulfide isomerases. *Febs J*, 2007. **274**(20): p. 5223-34.
4. Appenzeller-Herzog, C., Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 6): p. 847-55.
5. Maattanen, P., et al., Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol*, 2010.
6. Anelli, T., et al., Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *Embo J*, 2003. **22**(19): p. 5015-22.
7. Anelli, T., et al., Sequential steps and checkpoints in the early exocytic compartment during secretory IgM biogenesis. *Embo J*, 2007. **26**(19): p. 4177-88.
8. Anelli, T. and R. Sitia, Protein quality control in the early secretory pathway. *Embo J*, 2008. **27**(2): p. 315-27.
9. van Anken, E. and I. Braakman, Endoplasmic reticulum stress and the making of a professional secretory cell. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005. **40**(5): p. 269-83.
10. Wisniewska, M., et al., Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8625.
11. Ushioda, R., et al., ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science*, 2008. **321**(5888): p. 569-72.
12. Takayama, S., Z. Xie, and J.C. Reed, An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem*, 1999. **274**(2): p. 781-6.
13. Flynn, G.C., T.G. Chappell, and J.E. Rothman, Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science*, 1989. **245**(4916): p. 385-90.
14. Flynn, G.C., et al., Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 1991. **353**(6346): p. 726-30.
15. Blond-Elguindi, S., et al., Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 717-28.
16. Meunier, L., et al., A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4456-69.
17. Dollins, D.E., et al., Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. *Mol Cell*, 2007. **28**(1): p. 41-56.
18. Nieland, T.J., et al., Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 6135-9.
19. Nicchitta, C.V., D.M. Carrick, and J.C. Baker-Lepain, The messenger and the message: gp96 (GRP94)-peptide interactions in cellular immunity. *Cell Stress Chaperones*, 2004. **9**(4): p. 325-31.
20. Sharp, S. and P. Workman, Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status. *Adv Cancer Res*, 2006. **95**: p. 323-48.
21. Fischer, G. and F.X. Schmid, The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. *Biochemistry*, 1990. **29**(9): p. 2205-12.
22. Schmid, F.X., Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1993. **22**: p. 123-42.
23. Schmid, F.X., et al., Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv Protein Chem*, 1993. **44**: p. 25-66.
24. Barak, N.N., et al., Crystal structure and functional analysis of the protein disulfide isomerase-related protein ERp29. *J Mol Biol*, 2009. **385**(5): p. 1630-42.
25. Spee, P., J. Subjeck, and J. Neefjes, Identification of novel peptide binding proteins in the endoplasmic reticulum: ERp72, calnexin, and grp170. *Biochemistry*, 1999. **38**(32): p. 10559-66.
26. Basu, S. and P.K. Srivastava, Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med*, 1999. **189**(5): p. 797-802.
27. Sandhu, N., et al., Peptide binding specificity of the chaperone calreticulin. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1774**(6): p. 701-13.
28. Elliott, T. and J. Neefjes, The complex route to MHC class I-peptide complexes. *Cell*, 2006. **127**(2): p. 249-51.
29. Schrag, J.D., et al., The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, 2001. **8**(3): p. 633-44.

30. Ellgaard, L. and E.M. Frickel, Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys*, 2003. **39**(3): p. 223-47.
31. Frickel, E.M., et al., TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(4): p. 1954-9.
32. Russell, S.J., et al., The primary substrate binding site in the b' domain of ERp57 is adapted for endoplasmic reticulum lectin association. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 18861-9.
33. Kozlov, G., et al., Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. *J Biol Chem*, 2010.
34. Givol, D., R.F. Goldberger, and C.B. Anfinsen, Oxidation and Disulfide Interchange in the Reactivation of Reduced Ribonuclease. *J Biol Chem*, 1964. **239**: p. PC3114-16.
35. Cai, H., C.C. Wang, and C.L. Tsou, Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. *J Biol Chem*, 1994. **269**(40): p. 24550-2.
36. McLaughlin, S.H. and N.J. Bulleid, Thiol-independent interaction of protein disulphide isomerase with type X collagen during intra-cellular folding and assembly. *Biochem J*, 1998. **331** (Pt 3): p. 793-800.
37. Noiva, R., et al., Peptide binding by protein disulfide isomerase, a resident protein of the endoplasmic reticulum lumen. *J Biol Chem*, 1991. **266**(29): p. 19645-9.
38. Jordan, P.A., et al., A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1500-7.
39. Jordan, P.A. and J.M. Gibbins, Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(3-4): p. 312-24.
40. Kimura, T., et al., Evidence for mitochondrial localization of P5, a member of the protein disulphide isomerase family. *J Biochem*, 2008. **144**(2): p. 187-96.
41. Coppari, S., et al., Nuclear localization and DNA interaction of protein disulfide isomerase ERp57 in mammalian cells. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(2): p. 325-33.
42. Turano, C., et al., Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, 2002. **193**(2): p. 154-63.
43. Ferrari, D.M. and H.D. Soling, The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 1): p. 1-10.
44. Appenzeller-Herzog, C. and L. Ellgaard, The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1783**(4): p. 535-48.
45. Garbi, N., et al., Impaired assembly of the major histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol*, 2006. **7**(1): p. 93-102.
46. Benham, A.M., et al., The CXXCXXC motif determines the folding, structure and stability of human Ero1-Lalpha. *Embo J*, 2000. **19**(17): p. 4493-502.
47. Bertoli, G., et al., Two conserved cysteine triads in human Ero1alpha cooperate for efficient disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2004. **279**(29): p. 30047-52.
48. Wang, L., et al., Reconstitution of human Ero1-Lalpha/protein-disulfide isomerase oxidative folding pathway in vitro. Position-dependent differences in role between the a and a' domains of protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 2009. **284**(1): p. 199-206.
49. Chambers, J.E., et al., The reduction potential of the active site disulfides of human protein disulfide isomerase Limit oxidation of the enzyme by Ero1{alpha}. *J Biol Chem*, 2010.
50. Karala, A.R., et al., Efficient peroxide-mediated oxidative refolding of a protein at physiological pH and implications for oxidative folding in the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(5): p. 963-70.
51. Sevier, C.S. and C.A. Kaiser, Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(5-6): p. 797-811.
52. Gross, E., et al., Structure of Ero1p, source of disulfide bonds for oxidative protein folding in the cell. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 601-10.
53. Inaba, K., et al., Crystal structures of human Ero1alpha reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *Embo J*, 2010.
54. Jessop, C.E., et al., Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 23): p. 4287-95.
55. Appenzeller-Herzog, C., et al., Disulphide production by Ero1alpha-PDI relay is rapid and effectively regulated. *Embo J*, 2010.
56. Schulman, S., et al., Vitamin K epoxide reductase prefers ER membrane-anchored thioredoxin-like redox partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(34): p. 15027-32.
57. Tavender, T.J. and N.J. Bulleid, Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H2O2 produced during disulphide formation. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 15): p. 2672-9.
58. Tavender, T.J. and N.J. Bulleid, Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(8): p. 1177-87.
59. Tavender, T.J., J.J. Springate, and N.J. Bulleid, Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, 2010.

60. Zito, E., et al., Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol Cell*, 2010. **40**(5): p. 787-97.
61. Holmgren, A., Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydroipoamide. *J Biol Chem*, 1979. **254**(19): p. 9627-32.
62. Lyles, M.M. and H.F. Gilbert, Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochemistry*, 1991. **30**(3): p. 613-9.
63. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(11): p. 2807-50.
64. Wilkinson, B., R. Xiao, and H.F. Gilbert, A structural disulfide of yeast protein-disulfide isomerase destabilizes the active site disulfide of the N-terminal thioredoxin domain. *J Biol Chem*, 2005. **280**(12): p. 11483-7.
65. Alanen, H.I., et al., pH dependence of the peptide thiol-disulfide oxidase activity of six members of the human protein disulfide isomerase family. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(3-4): p. 283-91.
66. Lappi, A.K., et al., A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulphide isomerases. *J Mol Biol*, 2004. **335**(1): p. 283-95.
67. Karala, A.R., A.K. Lappi, and L.W. Ruddock, Modulation of an active-site cysteine pKa allows PDI to act as a catalyst of both disulfide bond formation and isomerization. *J Mol Biol*, 2010. **396**(4): p. 883-92.
68. Buchner, J. and L. Moroder, *Oxidative Folding of Peptides and Proteins*. RSC Publishing, 2009.
69. Winter, J., et al., Protein disulfide isomerase (PDI) isomerizes non-native disulfide bonds in human proinsulin independent of its peptide binding activity. *Protein Sci*, 2011.
70. Puig, A., et al., The role of the thiol/disulfide centers and peptide binding site in the chaperone and anti-chaperone activities of protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 1994. **269**(29): p. 19128-35.
71. Tsai, B., et al., Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell*, 2001. **104**(6): p. 937-48.
72. Magnuson, B., et al., ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol Cell*, 2005. **20**(2): p. 289-300.
73. Rainey-Barger, E.K., S. Mkrtchian, and B. Tsai, The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection. *J Virol*, 2009. **83**(3): p. 1483-91.
74. Puig, A. and H.F. Gilbert, Protein disulfide isomerase exhibits chaperone and anti-chaperone activity in the oxidative refolding of lysozyme. *J Biol Chem*, 1994. **269**(10): p. 7764-71.
75. Saaranen, M.J., et al., The C-terminal active site cysteine of *Escherichia coli* glutaredoxin 1 determines the glutathione specificity of the second step of peptide deglutathionylation. *Antioxid Redox Signal*, 2009. **11**(8): p. 1819-28.
76. Kuznetsov, G., L.B. Chen, and S.K. Nigam, Multiple molecular chaperones complex with misfolded large oligomeric glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1997. **272**(5): p. 3057-63.
77. Alanen, H.I., et al., ERp27, a new non-catalytic endoplasmic reticulum-located human protein disulfide isomerase family member, interacts with ERp57. *J Biol Chem*, 2006. **281**(44): p. 33727-38.
78. van Lith, M., et al., A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(8): p. 2795-804.
79. Darby, N.J. and T.E. Creighton, Characterization of the active site cysteine residues of the thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 1995. **34**(51): p. 16770-80.
80. Darby, N.J. and T.E. Creighton, Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 1995. **34**(37): p. 11725-35.
81. Freedman, R.B., P. Klappa, and L.W. Ruddock, Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Rep*, 2002. **3**(2): p. 136-40.
82. Freedman, R.B., P. Klappa, and L.W. Ruddock, Model peptide substrates and ligands in analysis of action of mammalian protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol*, 2002. **348**: p. 342-54.
83. Klappa, P., et al., The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. *Embo J*, 1998. **17**(4): p. 927-35.
84. Pirneskoski, A., et al., Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 2004. **279**(11): p. 10374-81.
85. Tian, G., et al., The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell*, 2006. **124**(1): p. 61-73.
86. Nguyen, V.D., et al., Alternative conformations of the x region of human protein disulphide-isomerase modulate exposure of the substrate binding b' domain. *J Mol Biol*, 2008. **383**(5): p. 1144-55.
87. Byrne, L.J., et al., Mapping of the ligand-binding site on the b' domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region. *Biochem J*, 2009. **423**(2): p. 209-17.
88. Denisov, A.Y., et al., Solution structure of the bb' domains of human protein disulfide isomerase. *Febs J*, 2009. **276**(5): p. 1440-9.

89. Noiva, R., R.B. Freedman, and W.J. Lennarz, Peptide binding to protein disulfide isomerase occurs at a site distinct from the active sites. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19210-7.
90. Serve, O., et al., Redox-dependent domain rearrangement of protein disulfide isomerase coupled with exposure of its substrate-binding hydrophobic surface. *J Mol Biol*, 2009.
91. Pirneskoski, A., et al., Domains b' and a' of protein disulfide isomerase fulfill the minimum requirement for function as a subunit of prolyl 4-hydroxylase. The N-terminal domains a and b enhances this function and can be substituted in part by those of ERp57. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p. 11287-93.
92. Snapp, E.L., et al., Monitoring chaperone engagement of substrates in the endoplasmic reticulum of live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(17): p. 6536-41.
93. Klappa, P., H.C. Hawkins, and R.B. Freedman, Interactions between protein disulphide isomerase and peptides. *Eur J Biochem*, 1997. **248**(1): p. 37-42.
94. Cho, K., et al., Redox-regulated peptide transfer from the transporter associated with antigen processing to MHC class I molecules by protein disulfide isomerase. *Antioxid Redox Signal*, 2011.
95. Ruddock, L.W., R.B. Freedman, and P. Klappa, Specificity in substrate binding by protein folding catalysts: tyrosine and tryptophan residues are the recognition motifs for the binding of peptides to the pancreas-specific protein disulfide isomerase PDIp. *Protein Sci*, 2000. **9**(4): p. 758-64.
96. Klappa, P., et al., The pancreas-specific protein disulphide-isomerase PDIp interacts with a hydroxyaryyl group in ligands. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 3): p. 553-9.
97. Jessop, C.E., et al., Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin. *J Biol Chem*, 2009. **284**(4): p. 2194-202.
98. Dong, G., et al., Insights into MHC class I peptide loading from the structure of the tapasin-ERp57 thiol oxidoreductase heterodimer. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 21-32.
99. Wang, L., et al., Crystal structure of human ERp44 shows a dynamic functional modulation by its carboxy-terminal tail. *EMBO Rep*, 2008. **9**(7): p. 642-7.
100. Tian, G., et al., The catalytic activity of protein-disulfide isomerase requires a conformationally flexible molecule. *J Biol Chem*, 2008. **283**(48): p. 33630-40.
101. Kozlov, G., et al., Structure of the noncatalytic domains and global fold of the protein disulfide isomerase ERp72. *Structure*, 2009. **17**(5): p. 651-9.
102. Sullivan, D.C., et al., EndoPDI, a novel protein-disulfide isomerase-like protein that is preferentially expressed in endothelial cells acts as a stress survival factor. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 47079-88.
103. Rowe, M.L., et al., Solution structure and dynamics of ERp18, a small endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Biochemistry*, 2009. **48**(21): p. 4596-606.
104. Park, S.W., et al., The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(17): p. 6950-5.
105. Goldberger, R.F., C.J. Epstein, and C.B. Anfinsen, Purification and Properties of a Microsomal Enzyme System Catalyzing the Reactivation of Reduced Ribonuclease and Lysozyme. *J Biol Chem*, 1964. **239**: p. 1406-10.
106. Park, B., et al., Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell*, 2006. **127**(2): p. 369-82.
107. Lammert, E., et al., Protein disulfide isomerase is the dominant acceptor for peptides translocated into the endoplasmic reticulum. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(7): p. 1685-90.
108. Lee, S.O., et al., Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation. *Embo J*, 2010. **29**(2): p. 363-75.
109. Wang, Z., et al., Snapshot of the interaction between HIV envelope glycoprotein 120 and protein disulfide isomerase. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010. **42**(5): p. 358-62.
110. Hagiwara, M., et al., Structural basis of an ERAD pathway mediated by the ER-resident protein disulfide reductase ERdj5. *Mol Cell*, 2011. **41**(4): p. 432-44.
111. Gruber, C.W., et al., Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(8): p. 455-64.
112. Wallis, A.K., et al., The ligand-binding b' domain of human protein disulphide-isomerase mediates homodimerization. *Protein Sci*, 2009. **18**(12): p. 2569-77.
113. Maattanen, P., et al., ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(6): p. 881-9.
114. Peaper, D.R., P.A. Wearsch, and P. Cresswell, Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *Embo J*, 2005. **24**(20): p. 3613-23.
115. Wearsch, P.A. and P. Cresswell, Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol*, 2007. **8**(8): p. 873-81.
116. Coe, H. and M. Michalak, ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010.
117. Jessop, C.E., et al., ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *Embo J*, 2007. **26**(1): p. 28-40.

118. Zhang, Y., et al., ERp57 does not require interactions with calnexin and calreticulin to promote assembly of class I histocompatibility molecules, and it enhances peptide loading independently of its redox activity. *J Biol Chem*, 2009. **284**(15): p. 10160-73.
119. Kozlov, G., et al., Crystal structure of the bb' domains of the protein disulfide isomerase ERp57. *Structure*, 2006. **14**(8): p. 1331-9.
120. Kozlov, G., et al., A structural overview of the PDI family of proteins. *Febs J*, 2010.
121. Fullekrug, J., et al., CaBP1, a calcium binding protein of the thioredoxin family, is a resident KDEL protein of the ER and not of the intermediate compartment. *J Cell Sci*, 1994. **107** (Pt 10): p. 2719-27.
122. Rupp, K., et al., Effects of CaBP2, the rat analog of ERp72, and of CaBP1 on the refolding of denatured reduced proteins. Comparison with protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 1994. **269**(4): p. 2501-7.
123. Kramer, B., et al., Functional roles and efficiencies of the thioredoxin boxes of calcium-binding proteins 1 and 2 in protein folding. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 1): p. 83-95.
124. Kikuchi, M., et al., Functional analysis of human P5, a protein disulfide isomerase homologue. *J Biochem*, 2002. **132**(3): p. 451-5.
125. Akama, K., et al., Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(6): p. 1272-1284.
126. Horibe, T., M. Kikuchi, and K. Kawakami, Interaction of human protein disulfide isomerase and human P5 with drug compounds: Analysis using biosensor technology. *Process Biochemistry*, 2008. **43**: p. 1330-1337.
127. Stockton, J.D., M.C. Merkert, and K.V. Kellaris, A complex of chaperones and disulfide isomerases occludes the cytosolic face of the translocation protein Sec61p and affects translocation of the prion protein. *Biochemistry*, 2003. **42**(44): p. 12821-34.
128. Vandenbroeck, K., E. Martens, and I. Alloza, Multi-chaperone complexes regulate the folding of interferon-gamma in the endoplasmic reticulum. *Cytokine*, 2006. **33**(5): p. 264-73.
129. Kaiser, B.K., et al., Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 482-6.
130. Wang, X., et al., An six-amino acid motif in the alpha3 domain of MICA is the cancer therapeutic target to inhibit shedding. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **387**(3): p. 476-81.
131. Holbrook, L.M., et al., Platelets release novel thiol isomerase enzymes which are recruited to the cell surface following activation. *Br J Haematol*, 2010. **148**(4): p. 627-37.
132. Li, Y., M. Musacchio, and R. Finkelstein, A homologue of the calcium-binding disulfide isomerase CaBP1 is expressed in the developing CNS of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet*, 1998. **23**(2): p. 104-10.
133. Hoshijima, K., J.E. Metherall, and D.J. Grunwald, A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. *Genes Dev*, 2002. **16**(19): p. 2518-29.
134. Alanen, H.I., et al., Defining the domain boundaries of the human protein disulfide isomerases. *Antioxid Redox Signal*, 2003. **5**(4): p. 367-74.
135. Ferrari, D.M., et al., ERp28, a human endoplasmic-reticulum-luminal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif. *Eur J Biochem*, 1998. **255**(3): p. 570-9.
136. Lippert, U., et al., Conserved structural and functional properties of D-domain containing redox-active and -inactive protein disulfide isomerase-related protein chaperones. *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11213-20.
137. Rainey-Barger, E.K., S. Mkrтчian, and B. Tsai, Dimerization of ERp29, a PDI-like protein, is essential for its diverse functions. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(4): p. 1253-60.
138. Hubbard, M.J., N.J. McHugh, and D.L. Carne, Isolation of ERp29, a novel endoplasmic reticulum protein, from rat enamel cells. Evidence for a unique role in secretory-protein synthesis. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(7): p. 1945-57.
139. Mkrтчian, S., et al., Oligomerization properties of ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein. *FEBS Lett*, 1998. **431**(3): p. 322-6.
140. Ma, Q., et al., Crystal structure and functional analysis of *Drosophila* Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein. *J Biol Chem*, 2003. **278**(45): p. 44600-7.
141. Barnewitz, K., et al., Mapping of a substrate binding site in the protein disulfide isomerase-related chaperone wind based on protein function and crystal structure. *J Biol Chem*, 2004. **279**(38): p. 39829-37.
142. Barak, N.N., Protein-Disulfid-Isomerase-verwandtes ERp29 - Leitstrukturfundung und Bindungsmotivcharakterisierung. Dissertation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011.
143. Arvan, P., et al., Intracellular protein transport to the thyrocyte plasma membrane: potential implications for thyroid physiology. *Thyroid*, 1997. **7**(1): p. 89-105.
144. Kwon, O.Y., et al., TSH regulates a gene expression encoding ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein, in the thyrocytes of FRTL-5 cells. *FEBS Lett*, 2000. **475**(1): p. 27-30.

145. Baryshev, M., E. Sargsyan, and S. Mkrtychian, ERp29 is an essential endoplasmic reticulum factor regulating secretion of thyroglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(2): p. 617-24.
146. Das, S., et al., ERp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(10): p. 2593-604.
147. Suaud, et al., ERp29: A luminal chaperone that facilitates CFTR trafficking in response to 4-Phenylbutyrate. *Febs J*, 2008.
148. Guo, C., Generation of Endoplasmic Reticulum Protein 28 (ERp28) Knock Out Mice and Structural and Functional Analysis of its Drosophila Homologue, Wind. Dissertation; Georg-August-Universität Göttingen, 2003.
149. Knoblach, B., et al., ERp19 and ERp46, new members of the thioredoxin family of endoplasmic reticulum proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2003. **2**(10): p. 1104-19.
150. Wrammert, J., E. Kallberg, and T. Leanderson, Identification of a novel thioredoxin-related protein, PC-TRP, which is preferentially expressed in plasma cells. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(1): p. 137-46.
151. Alberti, A., et al., ERp46 is reduced by high glucose and regulates insulin content in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(3): p. E812-21.
152. Tavender, T.J., J.J. Springate, and N.J. Bulleid, Recycling of peroxiredoxin IV provides a novel pathway for disulphide formation in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, 2010. **29**(24): p. 4185-97.
153. Charlton, H.K., et al., ERp46 binds to AdipoR1, but not AdipoR2, and modulates adiponectin signalling. *Biochem Biophys Res Commun*. **392**(2): p. 234-9.
154. Heiker, J.T., D. Kosel, and A.G. Beck-Sickinger, Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem*, 2010. **391**(9): p. 1005-18.
155. Desilva, M.G., et al., Characterization and chromosomal localization of a new protein disulfide isomerase, PDIp, highly expressed in human pancreas. *DNA Cell Biol*, 1996. **15**(1): p. 9-16.
156. Fu, X.M. and B.T. Zhu, Human pancreas-specific protein disulfide isomerase (PDIp) can function as a chaperone independently of its enzymatic activity by forming stable complexes with denatured substrate proteins. *Biochem J*, 2010.
157. Fu, X. and B.T. Zhu, Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is redox-regulated through formation of an inter-subunit disulfide bond. *Arch Biochem Biophys*, 2009. **485**(1): p. 1-9.
158. Fu, X.M. and B.T. Zhu, Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2009. **115**(1-2): p. 20-9.
159. Elliott, J.G., et al., In vitro characterisation of the interaction between newly synthesised proteins and a pancreatic isoform of protein disulphide isomerase. *Eur J Biochem*, 1998. **252**(3): p. 372-7.
160. Alanen, H.I., et al., Functional characterization of ERp18, a new endoplasmic reticulum-located thioredoxin superfamily member. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 28912-20.
161. Jeong, W., et al., ERp16, an endoplasmic reticulum-resident thiol-disulfide oxidoreductase: biochemical properties and role in apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 2008. **283**(37): p. 25557-66.
162. Lucca-Junior, W., J.A. Janovick, and P.M. Conn, Participation of the endoplasmic reticulum protein chaperone thio-oxidoreductase in gonadotropin-releasing hormone receptor expression at the plasma membrane. *Braz J Med Biol Res*, 2009. **42**(2): p. 164-7.
163. Persson, S., et al., Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family. *Mol Phylogenet Evol*, 2005. **36**(3): p. 734-40.
164. Maslon, M.M., et al., A Divergent Substrate-Binding Loop within the Pro-oncogenic Protein Anterior Gradient-2 Forms a Docking Site for Reptin. *J Mol Biol*, 2010.
165. Ni, M. and A.S. Lee, ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*, 2007. **581**(19): p. 3641-51.
166. Honjo, Y., et al., Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Res*, 2010. **1349**: p. 90-6.
167. Uehara, T., et al., S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 2006. **441**(7092): p. 513-7.
168. Hetz, C., et al., The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, 2005. **25**(11): p. 2793-802.
169. Zhang, D. and D.R. Richardson, Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29): The emerging role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010.
170. Gumireddy, K., et al., In vivo selection for metastasis promoting genes in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(16): p. 6696-701.
171. Bambang, I.F., et al., Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(11): p. 1964-74.

172. Bambang, I.F., et al., Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal-epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells. *Lab Invest*, 2009. **89**(11): p. 1229-42.
173. Zhang, D. and T.C. Putti, Over-expression of ERp29 attenuates doxorubicin-induced cell apoptosis through up-regulation of Hsp27 in breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 2010.
174. Shnyder, S.D., J.E. Mangum, and M.J. Hubbard, Triplex profiling of functionally distinct chaperones (ERp29/PDI/BiP) reveals marked heterogeneity of the endoplasmic reticulum proteome in cancer. *J Proteome Res*, 2008. **7**(8): p. 3364-72.
175. Mkrtchian, S., et al., ERp29, an endoplasmic reticulum secretion factor is involved in the growth of breast tumor xenografts. *Mol Carcinog*, 2008. **47**(11): p. 886-92.
176. Bu, H., et al., The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection. *Prostate*, 2010.
177. Hrstka, R., et al., The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4838-47.
178. Vanderlaag, K.E., et al., Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin. *Breast Cancer Res*, 2010. **12**(3): p. R32.
179. Cho, J., et al., A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest*, 2008. **118**(3): p. 1123-31.
180. Okada, K., et al., Inhibitory effects of environmental chemicals on protein disulfide isomerase in vitro. *Osaka City Med J*, 2005. **51**(2): p. 51-63.
181. Ryser, H.J., et al., Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(10): p. 4559-63.
182. Horibe, T., et al., Ribostamycin inhibits the chaperone activity of protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **289**(5): p. 967-72.
183. Horibe, T., et al., The chaperone activity of protein disulfide isomerase is affected by cyclophilin B and cyclosporin A in vitro. *J Biochem*, 2002. **132**(3): p. 401-7.
184. Hiroi, T., et al., Bisphenol A binds to protein disulfide isomerase and inhibits its enzymatic and hormone-binding activities. *Endocrinology*, 2006. **147**(6): p. 2773-80.
185. Hashimoto, S., K. Okada, and S. Imaoka, Interaction between bisphenol derivatives and protein disulphide isomerase (PDI) and inhibition of PDI functions: requirement of chemical structure for binding to PDI. *J Biochem*, 2008. **144**(3): p. 335-42.
186. Obata, T., T. Fukuda, and S.Y. Cheng, Antibodies against the human cellular 3,3',5-triiodo-L-thyronine-binding protein (p 58). *FEBS Lett*, 1988. **230**(1-2): p. 9-12.
187. Obata, T., et al., Thyroid hormone down-regulates p55, a thyroid hormone-binding protein that is homologous to protein disulfide isomerase and the beta-subunit of prolyl-4-hydroxylase. *J Biol Chem*, 1988. **263**(2): p. 782-5.
188. Tsibris, J.C., et al., Selective inhibition of protein disulfide isomerase by estrogens. *J Biol Chem*, 1989. **264**(24): p. 13967-70.
189. Guthapfel, R., P. Gueguen, and E. Quemeneur, ATP binding and hydrolysis by the multifunctional protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*, 1996. **271**(5): p. 2663-6.
190. Primm, T.P. and H.F. Gilbert, Hormone binding by protein disulfide isomerase, a high capacity hormone reservoir of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 281-6.
191. Fu, X.M., P. Wang, and B.T. Zhu, Characterization of the Estradiol-Binding Site Structure of PDIp: Indispensable Role of the Hydrogen Bond between His278 and Estradiol 3-Hydroxyl Group. *Biochemistry*, 2010.
192. Morjana, N.A. and H.F. Gilbert, Effect of protein and peptide inhibitors on the activity of protein disulfide isomerase. *Biochemistry*, 1991. **30**(20): p. 4985-90.
193. Khan, M.M., et al., Discovery of a small molecule PDI inhibitor that inhibits reduction of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *ACS Chem Biol*, 2010.
194. Gowthaman, U., M. Jayakanthan, and D. Sundar, Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computational screening of inhibitors to HIV-1 entry. *BMC Bioinformatics*, 2008. **9 Suppl 12**: p. S14.
195. Hashimoto, S., et al., The binding site of bisphenol A to protein disulfide isomerase (PDI). *J Biochem*, 2011.
196. Karala, A.R. and L.W. Ruddock, Bacitracin is not a specific inhibitor of protein disulfide isomerase. *Febs J*, 2010.
197. Frank, R., The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods*, 2002. **267**(1): p. 13-26.
198. Fodor, S.P., et al., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991. **251**(4995): p. 767-73.

199. Tapia, V.E., B. Ay, and R. Volkmer, Exploring and profiling protein function with peptide arrays. *Methods Mol Biol*, 2009. **570**: p. 3-17.
200. Merrifield, R.B., Solid-Phase Peptide Syntheses. *Endeavour*, 1965. **24**: p. 3-7.
201. Geysen, H.M., R.H. Meloen, and S.J. Barteling, Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(13): p. 3998-4002.
202. MacBeath, G. and S.L. Schreiber, Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, 2000. **289**(5485): p. 1760-3.
203. Kozlov, G., et al., A structural overview of the PDI family of proteins. *Febs J*, 2010. **277**(19): p. 3924-36.
204. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 1986. **189**(1): p. 113-30.
205. Studier, F.W., et al., Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 1990. **185**: p. 60-89.
206. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987. **155**: p. 335-50.
207. Hengen, P.N., Carriers for precipitating nucleic acids. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(6): p. 224-5.
208. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
209. Wetlaufer, D.B., J.T. Edsall, and B.R. Hollingworth, Ultraviolet difference spectra of tyrosine groups in proteins and amino acids. *J Biol Chem*, 1958. **233**(6): p. 1421-8.
210. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, 1989. **182**(2): p. 319-26.
211. Wilkins, M.R., et al., Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol*, 1999. **112**: p. 531-52.
212. Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959. **82**(1): p. 70-7.
213. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
214. Bennett, T.P., Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature*, 1967. **213**(5081): p. 1131-2.
215. Shao, F., et al., DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13349-52.
216. Santoro, M.M. and D.W. Bolen, Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 1988. **27**(21): p. 8063-8.
217. Bolen, D.W. and M.M. Santoro, Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, 1988. **27**(21): p. 8069-74.
218. Edmondson, D.G. and S.Y. Roth, Identification of protein interactions by far Western analysis. *Curr Protoc Cell Biol*, 2001. **Chapter 17**: p. Unit 17 2.
219. Hall, R.A., Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot. *Methods Mol Biol*, 2004. **261**: p. 167-74.
220. Wu, Y., Q. Li, and X.Z. Chen, Detecting protein-protein interactions by Far western blotting. *Nat Protoc*, 2007. **2**(12): p. 3278-84.
221. Perkins, D.N., et al., Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 1999. **20**(18): p. 3551-67.
222. Powell, H.R., The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. **55**(Pt 10): p. 1690-5.
223. Collaborative Computational Project, N., The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
224. Adams, P.D., et al., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **66**(Pt 2): p. 213-21.
225. McCoy, A.J., et al., Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
226. Emsley, P., et al., Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
227. Murshudov, G.N., et al., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011. **67**(Pt 4): p. 355-67.
228. Chen, V.B., et al., MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. **66**(Pt 1): p. 12-21.
229. Berman, H.M., et al., The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(1): p. 235-42.
230. Primm, T.P., K.W. Walker, and H.F. Gilbert, Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide-isomerase. *J Biol Chem*, 1996. **271**(52): p. 33664-9.

231. Marini, I., et al., Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with alpha-crystallin. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(24): p. 3092-9.
232. Wang, C., et al., Plasticity of human protein disulfide isomerase: evidence for mobility around the x-linker region and its functional significance. *J Biol Chem*, 2010.
233. Townsend, D.M., et al., Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res*, 2009. **69**(19): p. 7626-34.
234. Morjana, N.A., B.J. McKeone, and H.F. Gilbert, Guanidine hydrochloride stabilization of a partially unfolded intermediate during the reversible denaturation of protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(6): p. 2107-11.
235. Dyson, H.J., et al., Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in *Escherichia coli* thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry*, 1997. **36**(9): p. 2622-36.
236. Narzi, D., et al., Evidence for proton shuffling in a thioredoxin-like protein during catalysis. *J Mol Biol*, 2008. **382**(4): p. 978-86.
237. Kozlov, G., et al., Structure of the Catalytic a(0)a Fragment of the Protein Disulfide Isomerase ERp72. *J Mol Biol*, 2010.
238. Krissinel, E. and K. Henrick, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol*, 2007. **372**(3): p. 774-97.
239. Krause, G. and A. Holmgren, Substitution of the conserved tryptophan 31 in *Escherichia coli* thioredoxin by site-directed mutagenesis and structure-function analysis. *J Biol Chem*, 1991. **266**(7): p. 4056-66.
240. Lu, X., H.F. Gilbert, and J.W. Harper, Conserved residues flanking the thiol/disulfide centers of protein disulfide isomerase are not essential for catalysis of thiol/disulfide exchange. *Biochemistry*, 1992. **31**(17): p. 4205-10.
241. Ellgaard, L. and L.W. Ruddock, The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep*, 2005. **6**(1): p. 28-32.
242. Combet, C., et al., NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(3): p. 147-50.
243. Gibrat, J.F., J. Garnier, and B. Robson, Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J Mol Biol*, 1987. **198**(3): p. 425-43.
244. Smith, G.D., E. Ciszak, and W. Pangborn, A novel complex of a phenolic derivative with insulin: structural features related to the T-->R transition. *Protein Sci*, 1996. **5**(8): p. 1502-11.
245. Pous, J., et al., Three-dimensional structure of a human pancreatic ribonuclease variant, a step forward in the design of cytotoxic ribonucleases. *J Mol Biol*, 2000. **303**(1): p. 49-60.
246. Liepinsh, E., et al., Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer. *Structure*, 2001. **9**(6): p. 457-71.
247. Kemmink, J., et al., Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 1996. **35**(24): p. 7684-91.
248. Rutkevich, L.A. and D.B. Williams, Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 2010.
249. Kozlov, G., et al., Structural basis of carbohydrate recognition by calreticulin. *J Biol Chem*, 2010.
250. Masui, S., et al., Molecular bases of cyclic and specific disulfide interchange between human Ero1 {alpha} and PDI. *J Biol Chem*, 2011.
251. Jiang, J., et al., Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol Cell*, 2005. **20**(4): p. 513-24.
252. Freedman, R.B., B.E. Brockway, and N. Lambert, Protein disulphide-isomerase and the formation of native disulphide bonds. *Biochem Soc Trans*, 1984. **12**(6): p. 929-32.
253. Lambert, N. and R.B. Freedman, Structural properties of homogeneous protein disulphide-isomerase from bovine liver purified by a rapid high-yielding procedure. *Biochem J*, 1983. **213**(1): p. 225-34.
254. Solovyov, A. and H.F. Gilbert, Zinc-dependent dimerization of the folding catalyst, protein disulfide isomerase. *Protein Sci*, 2004. **13**(7): p. 1902-7.
255. Yu, X.C., C.C. Wang, and C.L. Tsou, Association and dissociation of protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1207**(1): p. 109-13.
256. Onda, Y., et al., Distinct Roles of Protein Disulfide Isomerase and P5 Sulfhydryl Oxidoreductases in Multiple Pathways for Oxidation of Structurally Diverse Storage Proteins in Rice. *Plant Cell*, 2011.
257. Lee, H.W., et al., Involvement of thioredoxin domain-containing 5 in resistance to nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(5): p. 872-80.
258. Wang, Y.H. and M. Narayan, pH dependence of the isomerase activity of protein disulfide isomerase: insights into its functional relevance. *Protein J*, 2008. **27**(3): p. 181-5.

259. Ruddock, L.W., T.R. Hirst, and R.B. Freedman, pH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol:disulphide oxidoreductase) and protein disulphide-isomerase: studies with a novel simple peptide substrate. *Biochem J*, 1996. **315** (Pt 3): p. 1001-5.
260. Mezghrani, A., et al., Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J Biol Chem*, 2000. **275**(3): p. 1920-9.
261. Araki, K. and K. Nagata, Functional in vitro analysis of ERO1 and protein-disulfide isomerase (PDI) pathway. *J Biol Chem*, 2011.
262. Wilson, D.W., M.J. Lewis, and H.R. Pelham, pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem*, 1993. **268**(10): p. 7465-8.
263. Tapley, T.L., et al., Protein refolding by pH-triggered chaperone binding and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(3): p. 1071-6.
264. Lee, M.C., et al., Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004. **20**: p. 87-123.
265. Christiansen, V.J., P.J. Sims, and K.K. Hamilton, Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(1): p. 164-71.
266. Reinartz, J., G. Hansch, and M. Kramer, Complement component C7 is a plasminogen-binding protein. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**(2): p. 844-850.
267. Kramer, M.D., G.M. Hansch, and K.O. Rother, Complement and plasminogen: pathways in inflammation. *Behring Inst Mitt*, 1992(91): p. 145-56.
268. Popescu, N.I., C. Lupu, and F. Lupu, Role of PDI in regulating tissue factor: FVIIa activity. *Thromb Res*, 2009. **125 Suppl 1**: p. S38-41.
269. Popescu, N.I., C. Lupu, and F. Lupu, Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood*, 2010. **116**(6): p. 993-1001.
270. Ahamed, J., et al., Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(38): p. 13932-7.
271. Rutkevich, L.A., et al., Functional Relationship between Protein Disulfide Isomerase Family Members during the Oxidative Folding of Human Secretory Proteins. *Mol Biol Cell*, 2010.
272. Flocco, M.M. and S.L. Mowbray, Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. *J Mol Biol*, 1994. **235**(2): p. 709-17.
273. Xu, W., et al., Surface charge and hydrophobicity determine ErbB2 binding to the Hsp90 chaperone complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(2): p. 120-6.
274. Rudiger, S., J. Schneider-Mergener, and B. Bukau, Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. *Embo J*, 2001. **20**(5): p. 1042-50.
275. Rudiger, S., A. Buchberger, and B. Bukau, Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, 1997. **4**(5): p. 342-9.
276. Rudiger, S., et al., Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J*, 1997. **16**(7): p. 1501-7.
277. Knoblauch, N.T., et al., Substrate specificity of the SecB chaperone. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 34219-25.
278. Xu, X., et al., The periplasmic bacterial molecular chaperone SurA adapts its structure to bind peptides in different conformations to assert a sequence preference for aromatic residues. *J Mol Biol*, 2007. **373**(2): p. 367-81.
279. Bitto, E. and D.B. McKay, The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *J Biol Chem*, 2003. **278**(49): p. 49316-22.
280. Alcock, F.H., et al., Conserved substrate binding by chaperones in the bacterial periplasm and the mitochondrial intermembrane space. *Biochem J*, 2008. **409**(2): p. 377-87.
281. Patzelt, H., et al., Binding specificity of Escherichia coli trigger factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(25): p. 14244-9.
282. Schlieker, C., et al., Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(7): p. 607-15.
283. Qin, J., et al., Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B. *Structure*, 1995. **3**(3): p. 289-97.
284. Fu, X.M. and B.T. Zhu, Both PDI and PDIP Can Attack the Native Disulfide Bonds in Thermally-Unfolded RNase and Form Stable Disulfide-Linked Complexes. *Biochim Biophys Acta*, 2011.
285. Reumers, J., F. Rousseau, and J. Schymkowitz, Multiple evolutionary mechanisms reduce protein aggregation. *The Open Biological Journal*, 2009. **2**: p. 176-184.
286. Knaupp, A.S. and S.P. Bottomley, Serpin polymerization and its role in disease--the molecular basis of alpha1-antitrypsin deficiency. *IUBMB Life*, 2009. **61**(1): p. 1-5.
287. Rohsig, L.M., et al., von Willebrand factor antigen levels in plasma of patients with malignant breast disease. *Braz J Med Biol Res*, 2001. **34**(9): p. 1125-9.

288. Damin, D.C., et al., Von Willebrand factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*, 2002. **17**(1): p. 42-5.
289. Martini, F., et al., Plasma von Willebrand factor antigen levels in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res*, 2005. **25**(1B): p. 403-7.
290. Mierke, C.T., et al., Integrin alpha5beta1 facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 3): p. 369-83.
291. Margadant, C. and A. Sonnenberg, Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*, 2011. **11**(2): p. 97-105.
292. Olayioye, M.A., Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res*, 2001. **3**(6): p. 385-9.
293. Kimura, T., et al., ERp57 binds competitively to protein disulfide isomerase and calreticulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **331**(1): p. 224-30.
294. Brockmeier, A., U. Brockmeier, and D.B. Williams, Distinct contributions of the lectin and arm domains of calnexin to its molecular chaperone function. *J Biol Chem*, 2009. **284**(6): p. 3433-44.
295. Chambers, J.E., et al., The reduction potential of the active site disulfides of human protein disulfide isomerase limits oxidation of the enzyme by Ero1alpha. *J Biol Chem*, 2010. **285**(38): p. 29200-7.
296. Sondermann, H., et al., Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 2001. **291**(5508): p. 1553-7.
297. Arakawa, A., et al., The C-terminal BAG domain of BAG5 induces conformational changes of the Hsp70 nucleotide-binding domain for ADP-ATP exchange. *Structure*, 2010. **18**(3): p. 309-19.
298. Xu, Z., et al., Structural basis of nucleotide exchange and client binding by the Hsp70 cochaperone Bag2. *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(12): p. 1309-17.
299. Johnson, R.J., et al., Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein. *J Mol Biol*, 2007. **368**(2): p. 434-49.
300. Reichmann, D., et al., The molecular architecture of protein-protein binding sites. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(1): p. 67-76.
301. Paxman, J.J., et al., The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes. *J Biol Chem*, 2009. **284**(26): p. 17835-45.
302. Dai, S., et al., Structural snapshots along the reaction pathway of ferredoxin-thioredoxin reductase. *Nature*, 2007. **448**(7149): p. 92-6.
303. Lennon, B.W., C.H. Williams, Jr., and M.L. Ludwig, Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science*, 2000. **289**(5482): p. 1190-4.
304. Maeda, K., et al., Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. *Structure*, 2006. **14**(11): p. 1701-10.
305. Inaba, K., et al., Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, 2006. **127**(4): p. 789-801.
306. Lin, T.Y., Protein-protein interaction as a powering source of oxidoreductive reactivity. *Mol Biosyst*, 2011. **6**(8): p. 1454-62.
307. Ren, G., et al., Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J Biol Chem*, 2009. **284**(15): p. 10150-9.
308. Hall, G. and J. Emsley, Structure of human thioredoxin exhibits a large conformational change. *Protein Sci*, 2010. **19**(9): p. 1807-11.
309. Haggis, G.H., T.J. Buchanan, and J.B. Hasted, Estimation of protein hydration by dielectric measurements at microwave frequencies. *Nature*, 1951. **167**(4250): p. 607-8.
310. McCarthy, A.A., et al., Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(3): p. 196-9.
311. Clanton, D.J., et al., Sulfonic acid dyes: inhibition of the human immunodeficiency virus and mechanism of action. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1992. **5**(8): p. 771-81.
312. Yin, H. and A.D. Hamilton, Strategies for targeting protein-protein interactions with synthetic agents. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005. **44**(27): p. 4130-63.
313. Thompson, J.D., T.J. Gibson, and D.G. Higgins, Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2002. **Chapter 2**: p. Unit 2 3.

B. Abkürzungen

Einige der unten aufgeführten Abkürzungen werden zum besseren Verständnis zusätzlich im jeweiligen Kapitel erklärt. Hier nicht aufgeführte Abkürzungen werden in den jeweiligen Kapiteln im Zusammenhang erläutert. Weiterhin wurden allgemein gebräuchliche Abkürzungen verwendet. Abkürzungen, welche für diverse Chemikalien verwendet wurden, sind in Abschnitt 2.1.1. zu finden.

a/a'	katalytische (redox-aktive) Domänen
A	Absorption
b/b'	nicht-katalytische (redox-inaktive) Domänen
b. E.	beliebige Einheiten
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein</i>
BPA	Bisphenol A
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Crt	Calreticulin
Cnx	Calnexin
CSB	<i>Chicago Sky Blue</i>
D	denaturiert / entfaltet
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDEM	<i>ER-degradation enhancing mannosidase-like</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
ERGIC	ER/Golgi-intermediäres Kompartiment
FKBP	FK506-bindendes Protein
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GdmCl	Guanidiniumchlorid
[GdmHCl] _{1/2}	[GdmHCl]-Übergangsmittelpunkt
Grp	Glucose-reguliertes Protein
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
ko	<i>knockout</i>
LB	Luria-Bertani
M	Marker / Protein-Größenstandard
MW/M _r	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cutt-off</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OD	optische Dichte
PA	Polyacrylamid

B. ABKÜRZUNGEN

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphat-NaCl
PDB	Protein-Datenbank
PDI(s)	Proteindisulfidisomerase(n); PDI-Protein(e)
PPIase(n)	Peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> -Isomerase(n)
RNaseA	Ribonuclease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Borat-NaCl
Trx	Thioredoxin
UGGT	UDP-Glucose:Glycoprotein-Glucosyltransferase
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
Vis	sichtbare Wellenlängenbereich
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil
wt	Wildtyp

Für Aminosäuren und deren Reste wurden folgende Abkürzungen verwendet:

<u>Ein-Buchstaben-Code</u>	<u>Drei-Buchstaben-Code</u>	<u>Aminosäure</u>
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
X	Xaa	unbekannte/beliebige Aminosäure
Y	Tyr	Tyrosin

C. Anhang

PDI	Putative Substrate/Interaktionspartner
PDI (PDIA1)	ERp57, Ero1 α , Collagen-Prolyl-4-Hydroxylase, Collagen (IV), VKOR5, Cholera Toxin, Clusterin, Pentraxin 3, SFGP E110, Thyroglobulin, Fibrillin, gp12015, Sec61 α , Laminin, IgM, IFN- γ , MHC I (α 2), NAD(P)H-Oxidase, Grp94, ERp72, BiP, P5, Galectin-9, Hedgehog
PDIp (PDIA2)	Ero1 α , Prolactin, Präprocecropin, Hedgehog-Protein
PDILT	Calmegein
ERp57 (PDIA3)*	PDI, LDL-Rezeptor, Glycosyltransferase, Melanotransferrin, Adam 17, Adam 10, Lysyl-Oxidase 2, Clusterin, Discoidin, Fibulin, Putatives Fibrillin, Agrin, A1 Plexin A1, Integrine (α 2, α 6, β 1, β 5), Laminin γ 2, LDL-Rezeptor, Collagen α 1 (VI), Integrine (α 3, β 2), Laminin (β 1, γ 1), Laminin β 3, Lysyl-Hydroxylase 2, Ero1 α , Calnexin/Calreticulin, Tapasin, VP14, α 1-Antitrypsin-NHK, MHC I (α 2), Thyroglobulin, STAT312, SFGP p62, Tyrosinase, Hemagglutinin, SERCA 2b, Prion-Protein, ERp72, ERp27
ERp72 (PDIA4)	ERp57, IgG, Ero1 α , LDL-Rezeptor, HCG β 9, Thyroglobulin, Laminin, IFN- γ , Matrilin-3, Thrombospondin, HLA-DR, BiP, Grp94, Cyclophilin B, NADPH-Oxidase 1, PDI, P5, ERdj3, Grp170, Cholera Toxin, Apolipoprotein B
ERp44	Ero1 α , IP3R3, IgM, IL-12, FGE2, ERGIC-53, Adiponectin
PDIr (PDIA5)	Ero1 α
ERp46	Ero1 α , Lysyl-Hydroxylase 2, Laminin β 3, Laminine (β 1, γ 1), Integrine (α 3, β 2, β 1), Collagen α 1(VI), LDL-Rezeptor, Laminin β 2, Collagen α 1(IV), Collagen α 2(IV), Adiponectin-Rezeptor, ERAP16, ERAP2, EDEM3, LTBP17, PNP18, Aspartyl/Asparagin- β -Hydroxylase, Nidogen-1, Peroxiredoxin-4, Pentraxin 3
P5 (PDIA6)	ERp72, Grp94, BiP, PDI, MICA1, IFN- γ , IgG, Ero1 α , Integrin β 1, LDL-Rezeptor, Pentraxin 3, Peroxiredoxin-4, α 1-Antitrypsin-NHK11
ERdj5	BiP, EDEM1, α 1-Antitrypsin-NHK
ERp18	Ero1 α , Lysyl-hydroxylase 2, Laminin β 3, Laminin γ 2, ER Glucosidase II (α), Pentraxin 3, VKOR, GFH-R13
AGR2	MUC2, Reptin
AGR3	
TMX	VKOR, Ero1 α
TMX2	
TMX3	
TMX4	VKOR, ERp57, Calnexin
TMX5	
ERp27	ERp57
ERp29	Thyroglobulin, FKBP13, Connexin, Py-VP1, Hepatitis B-OA14, BiP, CFTR-F508, α 1-Antitrypsin-NHK

Tabelle 5: Potentielle Substrate und Interaktionspartner von PDIs. Zusammengefasst sind die wichtigsten bisher bekannten potentiellen Substrate bzw. Interaktionspartner von Mitgliedern der PDI-Familie. Die Interaktionspartner wurden sowohl in kovalenter als auch in nicht-kovalenter Assoziation mit den jeweiligen PDIs gefunden. Einige Interaktionen kommen wahrscheinlich nicht durch direkte Bindung mit dem Substrat zustande, sondern beruhen auf der Assoziation von PDIs in Multiproteinkomplexen. (Erläuterung: ¹MHC Klasse I verwandtes Molekül A, ²Formylglycin-bildendes Enzym, ³Inositol-3-phosphat Rezeptor, ⁴Hauptkapsid-Protein VP1 des Simian Virus, ⁵Vitamin K-Epoxidreductase, ⁶ER-assoziiertes Protein, ⁷Latent-transforierender Wachstumsfaktor-beta bindendes Protein 1, ⁸Polycystische Nierenkankheits-assoziiertes Protein 1, ⁹humanes Choriongonadotropin- β , ¹⁰Semliki-Forest-Virus-Glycoprotein E1, ¹¹Null-Honkong-Variante, ¹²Signal Transduktor und Aktivator der Transkription 3, ¹³Gonadotropin freisetzendes Hormon-Rezeptor, ¹⁴Hepatitis B-Oberflächenantigen, ¹⁵HIV-1 Hüllglycoprotein 120, *z.T. in Kooperation mit Cnx/Crt). Quellen s. Literaturverzeichnis.

PDI's	UniProt- Nummer	PDB Eintrag	Redox-/ Chaperon- Aktivität	Oligo- meri- sierung
PDI (PDIA1)	P07237	a=1mek; b=1bjx; bb'=2k18; b'=3bj5, a'=1x5c; PDI1p=2b5e	O, R, I, C, P	1n, 2n, 4n
PDIp (PDIA2)	Q13087	-	O, R, C, P	1n, 2n
PDILT	Q8N807	-	?, C; P	?
ERp57 (PDIA3)	P30101	abb'a'=3f8u; a=2alb; bb'=2h8l; a'=2dmm	O, R, I, C, P	?
ERp72 (PDIA4)	P13667	⁰ a a=3idv; a ⁰ =2dj1, a=2dj2; bb'=3ec3; a'=2dj3	O, R, I	?
ERp44	Q9BS26	abb'=2r2j	O, I, C	?
PDIr (PDIA5)	Q14554	-	O, R, I, C	?
ERp46	Q8NBS9	a'=2diz; 3uj1	O, R, C, P	1n
P5 (PDIA6)	Q15084	a'=2dml; a'=1x5d	O, R, I, C, P	1n, 3n
ERdj5	Q8IXB1	3apo=Ja ⁰ b1b2aa'a''; 3apq = Ja ⁰ ; 3aps = a''	R, C	?
ERp18	O95881	a=1sen; 2k8v	O, C, P	1n, 2n
AGR2	O95994	-	?, P	?
AGR3	Q8TD06	-	O	?
TMX	Q9H3N1	a=1x5e	R, I	?
TMX2	Q9Y320	a=2dj0	?	?
TMX3	FLJ20793	-	O	?
TMX4	Q9H1E5	-	?	?
TMX5	-	-	?	?
ERp27	Q96DN0	b=214c	C, P	?
ERp29	P30040	b=1g7e; D=1g7d; bD=2qc7	C, P	2n

Tabelle 6: Strukturelle und Funktionelle Daten von humanen PDI's. Angegeben sind die UniProt- und PDB-Zugangsnummern, der Domänen-Aufbau, die Oligomerisierung sowie die katalytische bzw. Chaperon-Aktivität der 20 bisher bekannten humanen PDI-Familienmitglieder *in vitro*. O = Oxidase; R = Reduktase; I = Isomerase; C = Chaperon-Aktivität; ? = unbekannte katalytische Aktivität. C' = keine Chaperon-Aktivität; P = direkte Peptid-Interaktion nachgewiesen. Überdies bedeuten 1n = Monomer; 2n = Dimer; 3n = Trimer usw. Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals gewonnenen Erkenntnisse sind zusätzlich in rot hervorgehoben.

Protein	Domänengrenzen	MW (g/mol)	$\epsilon^{280\text{nm}}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	pI
GST	M1-S238	27.377	42.860	6,3
P5	L20-L440	46.193	72.880	5,0
P5a'	K159-L266	13.596	20.970	6,4
P5aa'	S24-L266	28.135	43.430	7,1
PDI	D18-L508	56.248	45.380	4,8
PDIa	D18-G134	14.103	19.940	6,5
PDIa W35A	D18-G134	13.988	14.440	6,5
ERp57	S25-L505	55.219	44.810	6,0
PDIp	Q22-L525	56.798	43.890	4,9
ERp18	H27-L172	17.771	16.960	5,7
ERp46	R33-L432	45.414	68.870	5,6
ERp46a ⁰	R33-Q189	18.430	29.450	5,7
ERp46a	G190-G322	15.985	23.950	6,0
ERp46a'	R296-A428	15.562	15.470	6,1
ERp27	E26-L273	30.480	18.450	4,6
ERp29	L33-L262	27.180	27.390	7,0
BiP	E19-L654	71.433	30.370	5,2

Tabelle 7: Biochemische Parameter der rekombinant hergestellten Proteine. Angegeben sind die mittels ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>; [211]) bestimmten Molekulargewichte (MW), molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{280\text{nm}}$ sowie pI-Werte der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten und gereinigten Proteine. Für die nicht in dieser Arbeit selbst hergestellten Proteine s. z.B. Referenzen [24, 65, 66, 86, 134]. Für alle anderen Proteine s. Herstellerangaben. Die in *E. coli* rekombinant hergestellten PDI's besitzen die Aminosäuresequenzen der humanen Proteine. Im Falle von P5 wurde die Sequenz des murinen Proteins verwendet. Die P5a-Domäne aggregierte während der Reinigung (nicht angegeben). Bis auf P5, welches einen N-terminalen GST-tag enthält, besitzen die übrigen Proteine alle einen N- bzw. C-terminalen (His)₆-tag.

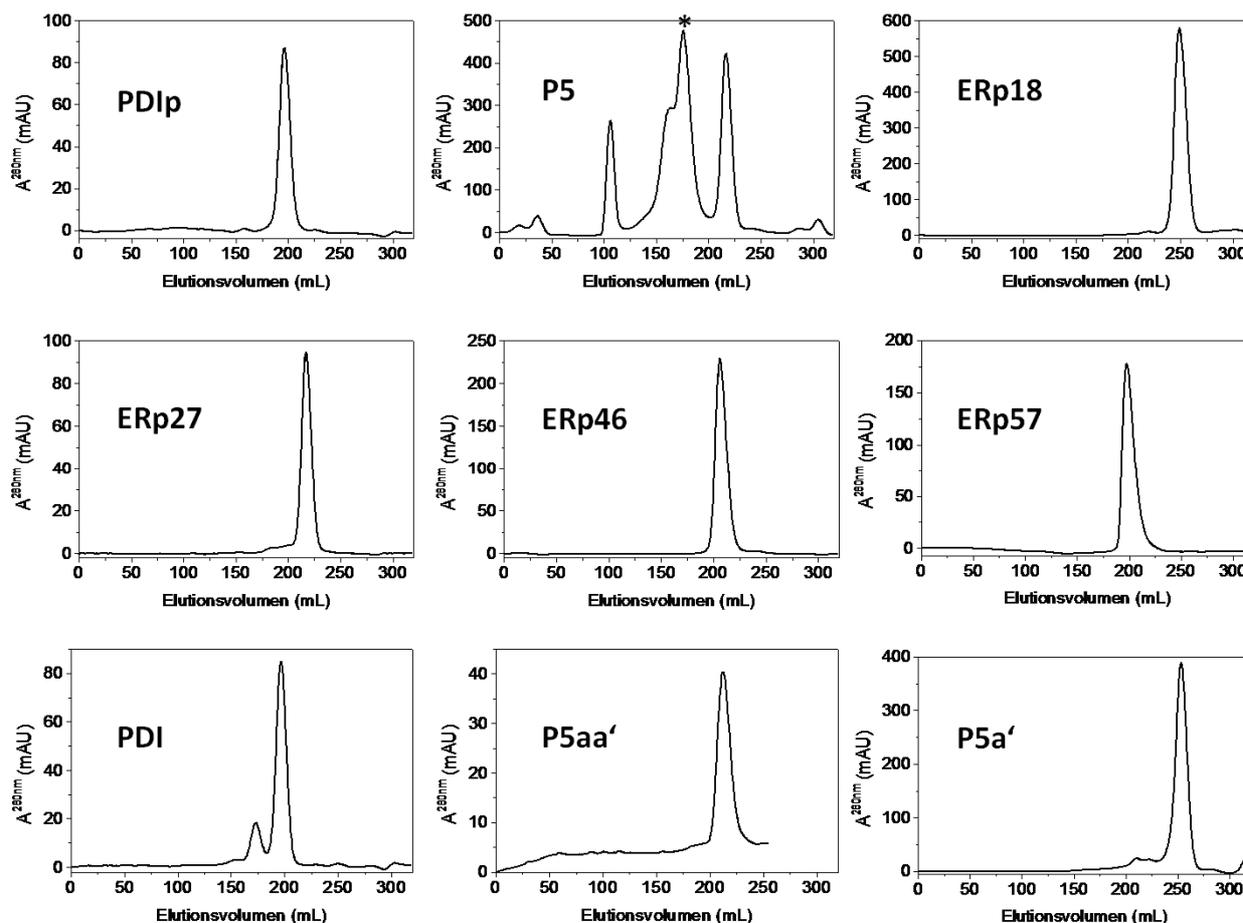


Abbildung 79: Elutionsprofile der Gelfiltration von PDIs. Die meisten PDIs eluieren als ein homogener Peak. PDI zeigt einen zusätzlichen Peak mit geringerer Intensität und liegt sowohl als Dimer als auch als Tetramer vor. P5 zeigt nach der Thrombinspaltung vier Peaks. Während der erste Peak kurz nach dem Ausschlussvolumen eluiert und vermutlich Aggregate darstellt, enthält der zweite Peak ungespaltene GST-Fusionsproteine. Der dritte Peak enthält P5 (*), während im letzten Peak abgespaltenes GST zu finden ist. Die P5a-Domäne eluiert als Aggregate kurz nach dem Ausschlussvolumen (nicht gezeigt). Verwendet wurde eine Superdex 200 *prep grade HiLoad* 26/60-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) mit ca. 320 mL Säulenvolumen und einer Flussrate von 1 mL/min. Der Laufpuffer enthielt 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol sowie 0,01 % (v/v) Triton X-100.

Protein	V_e (mL)	K_{av}	MW_{exp} (kDa)	MW_{the} (kDa)	ΔMW (kDa)	Fehler (%)	N
ERp18	248	0,66	17,2	17,8	-0,6	-3,1	1,0
ERp27	216	0,51	51,7	30,5	-4,6	-15,2	1,7
ERp46	205	0,46	75,4	45,4	-7,7	-16,9	1,7
ERp57	197	0,42	99,2	55,2	-5,6	-10,2	1,8
PDI(1)	173	0,30	226,0	56,2	0,3	0,5	4,0
PDI(2)	196	0,41	102,6	56,2	-4,9	-8,8	1,8
PDIp	196	0,41	102,6	56,8	-5,5	-9,6	1,8
P5	177	0,32	197,0	46,2	3,1	6,6	4,3
P5aa'	212	0,49	59,3	28,1	1,5	5,3	2,1
P5a'	253	0,69	14,5	13,6	0,9	6,7	1,1

Tabelle 8: Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von PDIs mittels analytischer Gelfiltration. Aus den Elutionsvolumina (V_e) und Verteilungskoeffizienten (K_{av}) wurde das Molekulargewicht (MW_{exp}) des jeweiligen Proteins ermittelt. Diese wurden mit den theoretischen Molekulargewichten (MW_{the}) verglichen und die Differenz (ΔMW) sowie die Abweichungen zum theoretischen Molekulargewicht (in %) berechnet. Das Verhältnis von experimentellen und theoretisch ermittelten Molekulargewicht ergibt den hypothetischen Oligomerisierungsgrad (N). PDI zeigt zwei *Peaks* mit unterschiedlichem Laufverhalten (PDI(1) und PDI(2)).

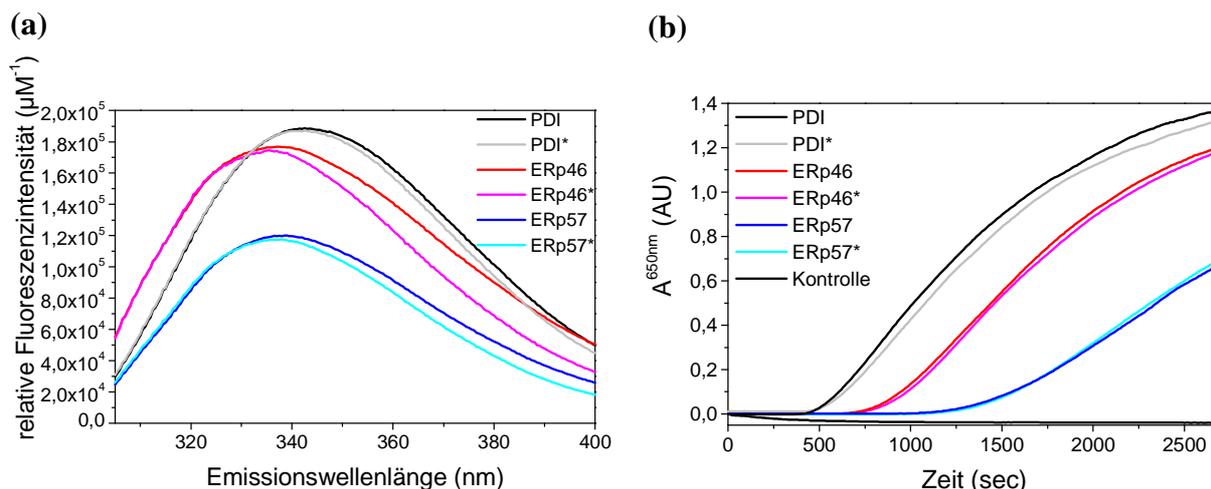


Abbildung 80: Beeinflussung der Proteineigenschaften von PDIs durch den Fluoreszenzfarbstoff. Die Minimalkopplung von PDIs mittels Fluoreszenzfarbstoffen mit NHS-Estern als reaktive Gruppe führt nur zu einer geringen hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums im Fluoreszenzspektrum (a). Die Proteinstruktur wird demnach durch den Fluoreszenzfarbstoff kaum beeinflusst. Darüber hinaus kommt es durch die Fluoreszenzmarkierung zu keiner signifikanten Änderung der Reduktase-Aktivität von PDIs, wie mittels Insulin-Reduktionstest gezeigt werden konnte (b). PDI (—/—), ERp46 (—/—), ERp57 (—/—). Fluoreszenzmarkierte Proteine sind mit (*) gekennzeichnet. Konzentrationen der PDIs s. vorherige Abbildungen.

PDI-Protein	<i>cutoff</i> (min) (AU)	<i>cutoff</i> (max) (AU)	Konzentration (µM)	Fluoreszenzfarbstoff
PDI	435	50.000	0,5	Atto550
PDIB'x	655	50.000	0,5	Atto550
PDIB'x I272A	503	50.000	0,5	Atto550
PDIP	835	50.000	0,5	DyLight549
ERp57	553	50.000	0,5	DyLight549
P5	242	50.000	0,5	DyLight549
P5aa'	587	50.000	0,5	DyLight549
ERp27	134	50.000	0,5	DyLight549
ERp18	301	50.000	0,5	DyLight549
ERp46	778	50.000	0,1	DyLight549
ERp46a ⁰	500	50.000	0,1	DyLight549
ERp46a	500	50.000	0,1	DyLight549
ERp46a'	500	50.000	0,1	DyLight549
PDIP	968	50.000	0,05	Atto550
ERp29	833	50.000	0,05	DyLight549
ERp29b	500	50.000	0,05	DyLight549
ERp29D	100	50.000	0,05	DyLight549
DsbA	300	50.000	0,1	DyLight549
GST	97	50.000	0,5	DyLight549
RNaseA	200	50.000	0,5	DyLight549

Tabelle 9: Parameter der Peptid-Bindungsstudien. Die Peptid-Bindungsstudien wurden mit fluoreszenzmarkierten PDIs durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff sowie die Konzentration für die einzelnen Proteine wurden hinsichtlich der Protein-Stabilität und des Signal-Hintergrund-Verhältnisses optimiert. Die auf identische Weise aufgenommenen Signalintensitäten der gebundenen Peptide wurden vom Hintergrundsignal abgezogen und auf die Signalintensität der leeren Kontroll-spots normiert. Die Signale wurden als statistisch relevant betrachtet, wenn ihr Wert mindestens um den Faktor N über dem Hintergrundsignal lag. Mit N wurde das Dreifache der Standardabweichung des Hintergrundsignals definiert. Daraus ergab sich die für die Auswertung berücksichtigte minimale Signalintensität (*cutoff*). Die maximale Signalintensität erreichte bei einem Wert von ca. 50.000 ihre Sättigung.

Protein	Originalsequenz (UniProt-Nummer)
4-1BB Rezeptor	P20334
α 1-Antitrypsin	NM_011458
Amyloid-Vorläuferprotein	P12023
ATF6	NP_001074773
BiP	P20029
Calnexin	P35564
Calreticulin	P14211
Ceruloplasmin	Q61147
Chymase I	XP_001476387
Derlin1	Q99J56
Derlin2	Q8BNI4
Derlin3	Q9D8K3
EGF-Rezeptor	AAG28045
Erlin2	Q8BFZ9
Ero1 α	Q8R180
ERp29	P57759
ERp57	P27773
Fas-Ligand	P41047
Fibrinogen- γ Polypeptid	Q8VCM7
FKBP12.6	P68106
FKBP13	P26885
Grp94	P08113
GST	aus pGEX-6P3 (GE Healthcare)
Histamin-H1-Rezeptor	NP_032311
Haptoglobin	Q61646
HBsAg	
Hemopexin	Q91X72
ICAM1	P13597
IFN- γ	P01580
Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor	P11881
Integrin- α	P11688
Ire1- α	Q9EQY0
Lysozym	NP_038618
Mastoparan	Sequenz: INLKALAALAKKIL
<i>Mesoderm development candidate 2</i>	31543247
Matrix-Metalloproteinase-14	P53690
Murinoglobulin-1	P28665
Notch-1 (extrazelluläre Domäne)	Q01705
PDI	P09103
PERK Kinase	Q9Z2B5
Pipe	Q86BJ3
RNaseA	P07998
Sec61 α	P61620
Sec62	EDL34969
Sec63	Q80YG4
Δ -Somatostatin	Sequenz: RKAGSKNFFWKTFTS
St3gal5	Q88829
TGF β	Q64729
TGH	Q8VCT4
TLR-1	Q9EPQ1
TNF α	P06804
TNF-R2	P25119
Transferrin	Q921I1
UGGT	Q6P5E4
VKOR-c1	Q6TEK5
Vp1	P03090
VSVG	P04882
IgG	Kontrolle

Tabelle 10: Zusammensetzung des Peptid-Arrays. Der verwendete Peptid-Array enthielt die z.T. überlappenden Peptid-Sequenzen von 57 verschiedenen Proteinen. Darunter waren potentielle PDI-Interaktionspartner sowie sekretorische Proteine und Kontroll-Proteine/Peptide. Der Peptid-Array wurde in Zusammenarbeit mit der Firma JPT Peptide Technologies GmbH entwickelt.

Erp46a'	-----TVLALTENFDDTIAEG---ITFLKFFYAP-WCGHC	KTLPAPTWEELSKKEFPGLA---GVKIAVVD-C	
Erp46a	-----LYELSASFELHVAQG---DHFTKFFAP-WCGHC	KALAPTWEQLALG-LEHSE---TVKIGKVD-C	
Erp46a0	-----SKHLYTADMFTHGIOSA---AHFVMFFAP-WCGHC	ORLQPTWNLDGDKYNSMEDA---KVYVAKVD-C	
Thx	-----MVKQIESKTAFQALDAAG-DKLVVVVFSAT-WCGPC	KMIKPFHSLSEKYS-----NVIFLVVDV-	
Erp18	SDGHMGLGKGFGDHIIHWR-TLEDGKKEAALAS-G--LPLMVI	IHKSWCGAC	KALKPKFAESTE-ISELSH---NFMVNL-ED
PDIa	-----DIVLVLRKSNFAEALAA---IHKYLLVFFYAP-WCGHC	KALAPEYAKAAGKL-KAEGS--EIRLAKVD-A	
PDIa'	-----DKQFPVKVLVGKNFEDVAFDE--KKNVFFVFFYAP-WCGHC	KQLAPIWDLKGETY-KDHE---NIVIAKMD-S	
PDIpa	-----GILVLSRHTLGLALRE--HPALLVFFYAP-WCGHC	QALAPEYSKAAAVL-AAES--MVVTLAKVD-G	
PDIpa'	-----PVKTLVGKNFEQVAFD--ETKNVFFVFFYAP-WCTHC	KEMAPAWELAEKY-QDHE--D-I I I A L D-A	
Erp44a	-----LDTENIDEILNNAD---VALVNFYAD-WCRFS	QMLHPIFEEASDVIKKEEFPNENQVVFARVD-C	
Erp57a	-----SDVLELTDNDFESRISDTGSAGLMLVFFAP-WCGHC	KRLAPEYEAATRL----KG-IVPLAKVD-C	
Erp57a'	-RYLKSEPIPESENDGPKVVAENFDEIVNNE--NKDVLV	FFYAP-WCGHC	KNLEPKYKELGKLSKDP----NIVIAKMD-A
Erp72a0	----FDDI,FKKFNKNGVI,VI,NDANFDNFVADK---D'TVLI	FFYAP-WCGHC	KQFAPRYEKTANTII-KD--KDPPTVAKTD-A
Erp72a	-----VTLVLTKENFDEVVDA--DIIILVFFYAP-WCGHC	KKLAPYEKAAKELSKR---SPPIPLAKVD-A	
Erp72a'	-----PVKVVVVGKTFDSIVMDP--KKDVLVFFYAP-WCGHC	KQLEPVYNSLAKKY-KGQ-KG--LVIAKMD-A	
P5a	-----AVNGLYSSSDVIELTPSNFNREVIQS--DSLWL	VFFYAP-WCGHC	QRLTPEWKAATAL-KD----VVKVGAVD-A
P5a'	-----DVIELTDDSDKNVLDL--EDVMMVFFYAP-WCGHC	KNLEPEWAAAASEV-KEQTKG-KVKLAAVD-A	
PDIra0	-----VVHLDSEKDFRLLKKE--EKPLLMFFYAP-WCSMC	KRMPHFQKAATQL-RGH--A-VLAGMNVY-S	
PDIra	-----SVYHLTDEDFDQFVKE--HSSVLVMFHAP-WCGHC	KMKPEFEKAAEAL-HGEADS-SGVLAAVD-A	
PDIra'	-----VLHLVGD-NFRETLLK--KKHTLVMFFYAP-WCFHC	KKVI PHFTATADAF-KDDRKI-ACAAV-CV-K	
TMX	-----NVRVITDENWRELL-EG---DWMVFFYAP-WCPAC	QNLQPEWESFAEWGEDLE----VNIKVDV-	
AGR2	---PQTI,SRGWGDDITWVQTYE,FAI,YKSKT,SN---KPLMT	I,HHI,DE-C,PHS	QAI,KKVFAFNKE,I,QKIAE,----QFV,I,N,I,VYF,
AGR3	---HNGLGKGFGDHIIHWR-TLE-LFYAQK-SK---KPLMVI	I,HHLED-COYS	QALKKVFAQNEEIQEMAQN---KFIML,N,LMHE

Erp46a'	TAERNI	SKYSVGRG	-TLLLFR-GGKKVSEHS---GGR	-----DLDSLHRFVLSQA-----KDEL		
Erp46a	TQHYFL	SGNQVRGY	-TTLI,WFDR-DGKKVDQYK---GKR	-----DI,FSI,RFYVFSQI,Q-----		
Erp46a0	TAHSDV	SAQGVGRG	-TTLKLFK-PGQEAUVYQ---GPR	-----DFQTLLENWMLQTLN-----		
Thx	DDAQDV	ASEAEVKA-M	TFQFFK-KGQKVGESF---GA	-----NKEKL-EATINELV-----		
Erp18	EEEPKDE	DFSPDGGYI	RI,LF,LD,PSG-KVHPEI	INENGNPSYKYFYVSAEQV	VQGMKEA,ERL,TGDAFRK,KHLEDEL	
PDIa	TEESDLA	QQYGVGRG	-TTLKFFR-NGDTASPKYR-AG-R	-----EADDIVNWLKKTGPAA-----		
PDIa'	TAN--EVEAV	KVHSEF-TL	KFF-PASADRTVIDY--NGER	-----TLDGFKKFLESQDQAG-----		
PDIpa	PAQ-RELA	EAFGVTEY	-TLKFF-RNGNRTHPEEY--TGR	-----DAEGTAEWLRRRVG-----		
PDIpa'	TAN--EL-DA	FAVHGF-TL	KYF-PAGPGRKVIKY--KSTR	-----DLETFSKFLDNGGV-----		
Erp44a	DQHS	DI,QR,YRISKY	-TTLKLF-NGMMKR-EYR--GGR	-----SVKALADYIRQQKSDP-----		
Erp57a	TANTNT	KNKYGVSGY	-TTLKIFR-DGEEAG--AYD--GPR	-----TADGIVSHLKKQAGPASV-----		
Erp57a'	TAN-DVP	SPYEVGRF-TI	YFS-PANKKLNPKKYE--GGR	-----ELSDFISYLQREAT-----		
Erp72a0	TSASVLA	SRFDVSCY-TT	KILK---KCQAVD-YE--CSR	-----TQEEIVAKVREVSQPDWTPPEVET-----		
Erp72a	TAETDLA	KRFDVSGY-TL	KIF---RGRPYD-Y--NGPR	-----EKYGIVDYMIQSGP-----		
Erp72a'	TANDVPS	DRYKVEGF-TI	-YFAPSGDKKNPVKFE--GGR	-----DLEHLSKF-IEEHATKLSRT-----KEEL		
P5a	DKHHS	LGGQYVQGF-TT	KIFG-SNKNRPED-YQ--GGR	-----TGEAIVDAALSALR-----		
P5a'	TVNQVLA	SRYGIRGF-TT	KIFG-KGES-PVD-YD--GGR	-----TRSDIVSRALDLFSDNA-PPPELLE----		
PDIra0	SEFENI	KEEYSVRGF-TT	ICYFE-KGRF-LFQ-YD-NYGS	-----TAEDTVEWLKKNPQP-----		
PDIra	TVNKALA	ERFHISEF-TL	KYFK-NGEK--YA-VP-VL-R	-----TKKKFLEWMQNPEA-----		
PDIra'	DKNQDL	QQEAVKGY-TT	FHYH-YGKF-AEK-YD-SD-R	-----TELGFNTYIRALRE-----		
TMX	TEQPLG	SRFIITA-L	TI-YHC-KDG--EFRY--QGR	-----TKKDFINFISDKEWKSIEPVSSWF-----		
AGR2	T---TDK	HLSPDCQYV	RI,FMFV,PSL-TVRADIT	CRYSN	ILYAYEPADTALLLDN-MKKALKL-----KTEL	
AGR3	T---TDK	NLS	PDGQVYV	RI,FMFV,PSL-TVRADIA	GRYSN	ILYTYEPRDLPLLIEN-MKKALRLI-----QSEL

Abbildung 81: Sequenzvergleich der katalytischen Domänen von PDIs. Die Aminosäuresequenz der drei katalytischen Domänen von Erp46 (a⁰, a, a') wurde mit den Sequenzen der katalytischen Domänen weiterer PDI-Familienmitglieder sowie Thioredoxin (Trx) verglichen. Das alignment erfolgte manuell nach [66] sowie mittels CLUSTAL W [313]. Gelb = katalytisches CXXC-Motiv; cyan = konservierter flexibler Trp-Rest; dunkelgrün = nicht-katalytische Disulfidbrücke; blau = konservierter flexibler Arg-Rest; rot/magenta = konservierte geladene Reste in Nähe des aktiven Zentrums; grau = hydrophobe substituierte Reste; hellgrün = konserviertes cis-Prolin. Die konservierten geladenen Reste in der Nähe des C-terminalen katalytischen Cys-Restes sind bei der Erp46a'-Domäne ladungsvertauscht. Die zusätzliche nicht-katalytische Disulfidbrücke kommt neben den katalytischen Domänen von Erp46 noch in der a-Domäne von Erp57 sowie in der a'-Domäne von PDIr vor.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Halle (Saale), 10.11.2011

Andreas Funkner

Lebenslauf

Andreas Funkner

An der Schäferei 8, 04425 Taucha

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 17.09.1982
Geburtsort: Leipzig
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

1989-1993 Ernst-Schneller-Oberschule, Leipzig
1993-2001 53. Gymnasium, Leipzig; Geschwister-Scholl-Gymnasium, Taucha
2001 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehr- und Zivildienst

07/2001-05/2002 Zivildienst; VRA e.V., Leipzig

Universitätsausbildung

10/2002-06/2007 Studium der Biochemie; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2006-06/2007 Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abt. Physikalische Biotechnologie unter Leitung von Prof. Milton T. Stubbs
07/2007 Abschluss: Diplom-Biochemiker
07/2007-09/2011 Promotionsstudium; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/2007-04/2011 Dissertation an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung unter Leitung von Prof. Gunter Fischer, in der Nachwuchsforschergruppe von Dr. David M. Ferrari

Berufserfahrung

seit 11/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Process Development; Scil Proteins GmbH, Halle (Saale)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danke ich Dr. David M. Ferrari für die Vergabe dieses zwar anspruchsvollen, aber dennoch sehr interessanten Themas. Weiterhin danke ich ihm für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Peptid-Array Daten sowie für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes. Bei Prof. Dr. Gunter Fischer möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, meine Promotionsarbeit an der Max-Planck-Forschungsstelle durchführen zu dürfen. Zudem bedanke ich mich für die Übernahme des Gutachtens zu dieser Arbeit. Ebenso danke ich Prof. Dr. Mike Schutkowski und Prof. Dr. Rudi Glockshuber für die Übernahme der Gutachten zu dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Mike Schutkowski und der Firma JPT Peptide Technologies GmbH für die Überlassung der Peptid-Microarrays bedanken, welche ein unverzichtbares Werkzeug für die Peptid-Interaktionsstudien darstellten. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Lloyd W. Ruddock von der Universität von Oulu in Finnland für die Überlassung zahlreicher PDI-Expressionskonstrukte sowie für seine wertvollen Hinweise zur Thematik dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Dr. Christoph Parthier für die viele Arbeit danken, die er in die Auswertung der Kristallstruktur investiert hat. Ich danke ihm und Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die Ratschläge bei den zahllosen Kristallisationsversuchen. Dem Helmholtz-Zentrum Berlin danke ich für die Synchrotron-Messzeiten.

Dr. Henning Urlaub vom Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen danke ich für die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Analysen. Bei PD Dr. Hauke Lilie möchte ich mich für die Durchführung und Auswertung der analytischen Ultrazentrifugationsläufe bedanken. PD Dr. Günther Jahreis möchte ich für die Synthese der Peptide sowie für die Durchsicht dieses Manuskriptes und seine nützlichen Hinweise danken. Dem National Cancer Institute, USA danke ich für die Überlassung der zum screening verwendeten niedermolekularen Substanzen.

Mein besonderer Dank gilt Natalya (Natascha) Gyrych für ihre unverzichtbare Hilfe im Labor, v.a. bei der Expression und Reinigung unserer geliebten PDIs. Allen ehemaligen Mitarbeitern der "AG Ferrari" möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit während meiner Doktorarbeit danken.

Bei der Max-Planck-Gesellschaft möchte ich mich an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Am meisten danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern für ihre Unterstützung, die sie mir während meiner fast neun Jahre in Halle zukommen ließen. Ich möchte ihnen dafür danken, dass sie mir immer den Rücken frei gehalten haben, um mich voll auf meine Arbeit konzentrieren zu können. Trotz der schwierigen Zeit, die wir gemeinsam durchmachen mussten, habt ihr immer an mich geglaubt. Dafür danke ich euch unendlich! Zu Letzt möchte ich auch meinen Großeltern für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken. Leider war es euch nicht vergönnt, den Abschluss dieser Arbeit noch mitzerleben.

Euch allen ein herzliches Dankeschön!