

**Einfluß niedermolekularer Medienzusätze und sezernierter, ATP-
unabhängiger Chaperone auf die Ausbeute therapeutischer
Proteine im Periplasma von *Escherichia coli***

Dissertation

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Jörg Schöffner

geb. am 5. August 1971 in Sömmerda/Thüringen

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. Rudolph
2. Prof. Dr. Buchner
3. Prof. Dr. Fritz

Halle, den 12.12.2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Problem der Aggregation bei der heterologen Expression eukaryontischer Proteine in <i>E. coli</i>	3
1.2. Die Proteinfaltungsmaschinerien gramnegativer Bakterien	4
1.2.1. Die Chaperonfamilien	4
1.2.2. Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen	9
1.2.3. Proteindisulfid-Isomerasen.....	9
1.2.4. Periplasmatische „Chaperone“	10
1.3. Die Überexpression von molekularen Chaperonen	11
1.4. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material	14
2.1. Geräte, Chemikalien, Enzyme und Antikörper	14
2.2. Oligonukleotide	16
2.3. Plasmide und Vektoren.....	17
2.4. <i>E. coli</i> -Stämme und Medien	17
3. Methoden	18
3.1. Molekularbiologische und proteinchemische Methoden.....	18
3.1.1. Klonierung und Sequenzierung	18
3.1.2. PCR-Amplifikation	18
3.1.3. SDS-PAGE und Western Blot	18
3.1.4. Präparation von periplasmatischen Zellextrakten aus <i>E. coli</i>	19
3.2. Konstruktion der Expressionsplasmide.....	19
3.3. Isolierung von Sphäroplasten und limitierte Proteolyse von DnaJ.....	21
3.4. Sekretion von rPA ins Periplasma von <i>E. coli</i> und Nachweis von rPA.....	22
3.4.1. Enzymatischer Test zur Quantifizierung von rPA in Zellextrakten.....	22
3.4.2. Western Blot-Analysen der rPA-Expression	24
3.4.3. Optimierung der Kultivierungstemperatur und Induktionsdauer.....	24
3.4.4. Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) in Gegenwart von GSH und L-Arginin.....	24
3.4.5. Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Co-Sekretion von rPA und molekularen Chaperonen	25
3.4.6. Kultivierung von <i>E. coli</i> in Gegenwart weiterer niedermolekularer Medienzusätze.....	25
3.5. Expression und Nachweis von scFv-TSH.....	25
3.5.1. Proteinreinigung mittels RPAS-Reinigungssystem.....	25
3.5.2. ELISA zur Quantifizierung von scFv-TSH.....	26
3.5.3. Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Expression von scFv-TSH im Periplasma in Gegenwart von L-Arginin und GSH.....	27
3.5.4. Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Co-Sekretion von scFv-TSH und molekularen Chaperonen.....	28
3.6. Sekretion von Proinsulin ins Periplasma von <i>E. coli</i>	28
3.6.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Co-Sekretion von Proinsulin und molekularen Chaperonen.....	28
3.6.2. ELISA zur Quantifizierung von Proinsulin	28

3.7. Enzymatischer Nachweis von L-Arginin und Glutathion im Kulturmedium.....	29
3.7.1. Nachweis von L-Arginin	29
3.7.2. Nachweis von Glutathion	30
4. Ergebnisse	31
4.1. Konstruktion von Sekretionsvektoren für DnaJ, der J-Domäne und Hsp25 und Nachweis der periplasmatischen Lokalisation der Chaperone	31
4.2. Herstellung eines Zwei-Plasmid-Systems zur Co-Sekretion von Chaperonen und therapeutisch relevanten Humanproteinen.....	33
4.3. Verbesserung der Ausbeute von rPA im Periplasma von <i>E. coli</i> durch Medienzusätze und Co-Sekretion von molekularen Chaperonen.....	38
4.3.1. Konstruktion des Sekretionsvektors pET20b(+)-rPA	38
4.3.2. Einfluß der Kultivierungsbedingungen und niedermolekularer Medienzusätze auf die Expression von rPA	40
4.3.3. Co-Sekretion von rPA und molekularen Chaperonen.....	44
4.3.4. Einfluß von weiteren Medienzusätzen auf die native Ausbeute von rPA im Periplasma	51
4.4. Verbesserung der Ausbeute von scFv-TSH durch Medienzusätze und Co-Sekretion von molekularen Chaperonen	53
4.4.1. Sekretion von scFv-TSH und Zusatz von GSH und L-Arginin zum Kulturmedium.....	53
4.4.2. Einfluß von molekularen Chaperonen auf die Faltung von scFv-TSH im Periplasma von <i>E. coli</i>	58
4.5. Verbesserung der Ausbeute von Proinsulin durch Co-Sekretion von molekularen Chaperonen.....	60
4.6. Bestimmung von L-Arginin und Glutathion im Verlauf der Kultivierung.....	64
5. Diskussion	67
5.1. Die Modellproteine rPA, scFv-TSH und Proinsulin und ihre Sekretion ins Periplasma.....	67
5.2. Verwendung niedermolekularer Zusätze zur Verbesserung der Ausbeute der Modellproteine im Periplasma von <i>E. coli</i>	69
5.3. Co-Sekretion von molekularen Chaperonen – ein Ansatz zur Steigerung der Ausbeute disulfidverbrückter Proteine im Periplasma	71
5.3.1. Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen	71
5.3.2. Co-Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen erhöht die Ausbeute von disulfidverbrückten Modellproteinen.....	72
5.4. Ein Synergismus von Medienzusätzen und Chaperonen	74
5.5. Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der Ausbeute rekombinanter Proteine im Periplasma von <i>E. coli</i>	75
6. Zusammenfassung	77
7. Literaturverzeichnis	79

Abkürzungen

A	Adenin
ABTS	2,2'-Azino-di-[3 ethylbenzthiazolinsulfonat (6)]
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.)
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CNBr	Bromcyan
CPE	Carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10)
Da	Dalton
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure); „Ellman's Reagens“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzymimmuntest)
Fv	variable Domäne des Antikörpermoleküls
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
G/F	Glycin/Phenylalanin
Gly	Glycin
GR	Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2.)
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
Hsc	Heat shock cognate protein („Hitzeschockprotein-Verwandte“)
Hsp	Hitzeschockprotein
IB	inclusion body (Einschlußkörper)
IgG	Immunglobulin G
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
K ₂ P	Plasminogenaktivator-Variante, bestehend aus Kringel-2- und Protease-Domäne
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar
Met	Methionin
min	Minute

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messenger RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid (4-Nitrotetrazoliumchloridblau)
OD	optische Dichte
ODH	Octopin-Dehydrogenase (EC 1.5.1.11)
OMP	outer membrane protein (Außenmembran-Protein)
ox	Oxazolon (4-Ethoxymethylen-2-phenyl-2-oxazolin-5-on)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pNA	para-Nitroanilid
POD	Peroxidase (EC 1.11.1.7.)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PDI	Proteindisulfid-Isomerase (EC 5.3.4.1.)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PPIase	Peptidyl-prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase (EC 5.1.2.8.)
Pro	Prolin
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rPA	Variante K ₂ P (BM 06.022) des gewebspezifischen Plasminogenaktivators
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
sHsp	small heat shock protein (kleines Hitzeschockprotein)
scFv	single-chain Fv (Einzelketten-Antikörperfragment)
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
tPA	tissue-type plasminogen activator (gewebspezifischer Plasminogenaktivator; EC 3.4.21.68)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNB	Thionitrobenzoesäure
TSH	Thyreotropin (Thyroideastimulierendes Hormon)
U	Unit (Einheit)
Val	Valin

1. Einleitung

Seit Jahrtausenden beschäftigt sich die Menschheit mit der Gewinnung therapeutisch wirksamer Moleküle aus verschiedensten Organismen. Die gezielte Suche nach den Ursachen von Krankheiten und Möglichkeiten ihrer effektiven Prävention bzw. Bekämpfung hat durch wissenschaftliche Forschung in den letzten 200 Jahren mehrere technologische Schübe ausgelöst. Das führte u.a. zur Entwicklung der pharmazeutischen Industrie, die heute eine wesentliche Stütze der globalen Wirtschaft darstellt.

Am Anfang der Forschung stand im Vordergrund die Suche und Identifizierung von Naturstoffen, wie z.B. Alkaloiden aus Pflanzen oder Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und deren synthetische Herstellung bzw. Versuche zur Verbesserung der Aktivität durch Strukturveränderungen. Die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technik und der damit verbundene Aufschwung der Molekularbiologie vor etwa 30 Jahren führte zu einer Hinwendung zu größeren Molekülen, den Proteinen. Da Proteine die essentiellen Lebensfunktionen aller Organismen steuern, liegt es nahe, sie als Wirkstoffe bei der Therapie von Krankheiten einzusetzen. Allerdings war der Mensch erst durch die Entwicklung der Gentechnik in der Lage, solche Mengen dieser hochkomplexen Stoffe zu produzieren, die eine Therapie auf der Basis von Proteinwirkstoffen wirtschaftlich machten. Dies zeigt sich z.B. bei der Gewinnung von Insulin, das zur Behandlung des Insulinmangel-Diabetes mellitus benötigt wird: Dieselbe Menge dieses Peptidhormons, die durch Extraktion von 27 t Schweinepankreas (aus 250 000 Schweinen) erhalten wird, kann bei einer 300 m³-Fermentation von *Escherichia coli*-Bakterien, die das humane Insulin-Gen tragen, hergestellt werden (<http://www.phrma.org>, 1998). Bei diesem Beispiel muß angemerkt werden, daß bei der Nutzung des rekombinanten humanen Insulins unerwünschte Nebenwirkungen, die durch die Verwendung von Schweine-Insulin aufgrund seiner unterschiedlichen Primärstruktur auftreten können, entfallen. Die Anwendung der Gentechnik eröffnete jedoch auch völlig neue Perspektiven: die gezielte Veränderung der vorhandenen Proteinstrukturen durch Modifikationen, das sogenannte „Protein Engineering“. Damit können auf der Basis bekannter Moleküle verbesserte Wirkstoffe mit größerer Spezifität oder Aktivität entwickelt werden (Cleland & Craik, 1996).

Proteinwirkstoffe stellen heutzutage einen wesentlichen Teil der verwendeten Therapeutika dar, eine Tatsache, die sich beispielsweise am weltweiten Umsatz von ca. 10 Milliarden US\$ der fünf meistverkauften gentechnisch produzierten Proteine im Jahr 1997 zeigt (Drews, 1998). Es wird erwartet, daß sich der Trend zu biotechnologisch produzierten Wirkstoffen, sogenannten „Biomedicals“, weiter verstärkt.

Mit dem Begriff „Therapeutische Proteine“ werden Proteine zusammengefaßt, die in der medizinischen Therapie oder Diagnostik eingesetzt werden. Dabei handelt es sich

vorwiegend um Hormone, Regulationsfaktoren, Enzyme, Antikörper oder Komponenten der Blutgerinnung. Es werden nicht nur im menschlichen Körper vorkommende Proteine erfaßt, sondern auch durch „Protein Engineering“ hergestellte Derivate und aus fremden Organismen gewonnene Proteinwirkstoffe. Eine Eigenschaft ist ihnen gemeinsam: Sie werden im Körper meist entfernt vom Wirkort produziert, und ihre Freisetzung unterliegt einer komplexen Regulation. Das bedeutet, daß sie vom Synthese- zum Wirkort transportiert werden müssen. Sie verlassen damit die Zelle, in der sie hergestellt wurden. Solche „exportierten“ oder „sekretorischen“ Proteine unterliegen schon am Syntheseort einer Zielsteuerung zum endoplasmatischen Retikulum, in dem die weitere Prozessierung stattfindet (Zapun *et al.*, 1999). Solche Prozessierungen sind z. B. Glykosylierungen zur besseren Löslichkeit und die Bildung von Disulfidbrücken. Untersuchungen zum Disulfidgehalt von Proteinen ergaben, daß nur sekretorische Proteine Disulfidbrücken tragen (Fahey *et al.*, 1977; Thornton, 1981). Während eine korrekte Glykosylierung oft nicht essentiell für die Funktionalität ist, ist die Stabilisierung durch Disulfidbrücken meist unentbehrlich, um die native Struktur und damit die gewünschte Aktivität zu erhalten (Koths, 1995). Eine instabile native Konformation kann aber auch einen schnellen Abbau des Proteinwirkstoffes zur Folge haben und damit die Wirksamkeit eines Protein-Therapeutikums entscheidend herabsetzen.

Wie können nun aber therapeutisch relevante Proteine in hoher Ausbeute in ihrer aktiven Konformation produziert werden, und welche Faktoren beeinflussen diese Prozesse?

Die folgenden Erörterungen konzentrieren sich auf die heterologe Expression in *Escherichia coli*. Daneben gibt es natürlich die Möglichkeit, die gewünschten Proteine in eukaryontischen Organismen zu produzieren. Dies ist dann unabdingbar, wenn eine korrekte posttranslationale Prozessierung, wie z.B. eine Glykosylierung, essentiell für die Aktivität des Proteins ist. Obwohl heute eine Reihe weit entwickelter eukaryontischer Expressionssysteme verfügbar ist, wie z.B. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Sudbery, 1996; Eckart & Bussineau, 1996), in Insektenzellen mit viralen Vektoren (Davies, 1995; Possee, 1997) oder in verschiedenen Säugerzelllinien (z.B. Trill *et al.*, 1995; Saez *et al.*, 1997), so findet noch immer die Expression in *E. coli* die weiteste Verbreitung. Von Vorteil sind hierbei die ausgezeichnete Charakterisierung dieses Organismus (Neidhardt *et al.*, 1996), die abgeschlossene Aufklärung des Genoms (Blattner *et al.*, 1997), die große Zahl an verfügbaren Vektoren als Werkzeuge zur effizienten Manipulation dieses Organismus (Baneyx, 1999), die geringe Gefahr eines Befalls mit humanen Pathogenen und vor allem das schnelle Wachstum der Zellen bei relativ günstigen Fermentationsmedien und die damit verbundene hohe Produktivität. Kostengünstige großtechnische Verfahren zur Kultivierung von *E. coli* sind mittlerweile gut etabliert.

1.1. Das Problem der Aggregation bei der heterologen Expression eukaryontischer Proteine in *E. coli*

Trotz der oben genannten Vorteile einer Nutzung von *E. coli* als Organismus zur rekombinanten Proteinproduktion ist die Ausbeute der rekombinanten Proteine in der nativen Konformation häufig sehr niedrig, und die Suche nach Möglichkeiten zu deren Verbesserung ist mitunter sehr kompliziert. Ein großes Problem bei der rekombinanten Synthese ist die Ablagerung in Aggregaten.

Als Aggregation wird die Zusammenlagerung der entfalteten Polypeptidketten über hydrophobe Bereiche zu Einschlußkörpern („Inclusion Bodies“, kurz: IBs) bezeichnet, die einen großen Teil des Zellvolumens ausmachen können (Bowden *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1982). IB-Bildung tritt häufig bei hohen Translationsraten der rekombinanten mRNA auf, was auf eine Überlastung der zelleigenen Faltungsmaschinerie hindeutet (Rudolph & Lilie, 1996; Lilie *et al.*, 1998). Das so akkumulierte Material ist nicht-nativ und damit inaktiv. IBs können sowohl im Cytosol als auch im Periplasma von *E. coli* auftreten (Georgiou *et al.*, 1986). Sie haben zwar den Vorteil einer einfachen Isolierung, entsprechend einer „Vor-Reinigung“ des jeweiligen Proteins. Dennoch muß für jedes Protein ein spezielles Rückfaltungsprotokoll erarbeitet werden. In Abhängigkeit von der Renaturierbarkeit des jeweiligen Proteins sind die Ausbeuten an nativem Material nach der Rückfaltung mitunter sehr niedrig (Buchner & Rudolph, 1991). Auch unter Kostengesichtspunkten ist die *in vitro*-Faltung von IB-Proteinen oft sehr aufwendig (Rudolph & Lilie, 1996; Lilie *et al.*, 1998). Da jedoch Alternativen zur Gewinnung von Proteinen aus Aggregaten meist nicht ausgearbeitet sind, wird in vielen Prozessen zur Herstellung therapeutischer Proteine eine Renaturierung aus IBs industriell angewendet (Rudolph, 1996).

Bei der heterologen Expression therapeutischer Proteine im Cytosol von *E. coli* kommt das Problem der Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken hinzu. Da dieses Kompartiment ein reduzierendes Milieu besitzt, wird allgemein angenommen, daß die Ausbildung von Inclusion Bodies bei disulfidverbrückten Proteinen nach Synthese im Cytosol unvermeidlich ist (Rudolph & Lilie, 1996; Lilie *et al.*, 1998). Andere direkte Korrelationen zwischen der Neigung eines gegebenen Proteins, als Einschlußkörper auszufallen, und seinen intrinsischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht, Hydrophobizität u.a., konnten bisher nicht gefunden werden (Makrides, 1996; Lilie *et al.*, 1998). Um die Aggregation von Proteinen zu unterdrücken und damit die Ausbeute der nativ gefalteten Spezies zu verbessern, werden verschiedene Ansätze verfolgt. Eine sehr einfach realisierbare Möglichkeit ist die Kultivierung der Bakterien bei suboptimalen Temperaturen, d.h., unterhalb von 37 °C (Schein & Noteborn, 1988) oder die Verwendung niedriger Konzentrationen des Induktors (Kopetzki *et al.*, 1989; Shibui & Nagahari, 1992). Die verlangsamte Protein-Syntheserate führt häufig zur

Bildung des nativen gefalteten Proteins. Auch die Variation weiterer Kulturbedingungen, wie pH oder Medienzusammensetzung (Verwendung von Minimal- oder Komplettmedien oder Variation der Kohlenstoffquelle) führt mitunter zur Steigerung der Ausbeute nativer Proteine (Kopetzki et al, 1989; Jacques *et al.*, 1992).

1.2. Die Proteinfaltungsmaschinerien gramnegativer Bakterien

Als Proteinfaltung ist der Prozeß der Umsetzung der linearen Information der Aminosäuresequenz eines Polypeptides in die definierte dreidimensionale Konformation des nativen Proteins zu verstehen (Anfinsen, 1973). Dieser Prozeß findet normalerweise in der lebenden Zelle statt (*in vivo*-Proteinfaltung), ist jedoch ebenso „im Reagenzglas“ möglich (*in vitro*-Proteinfaltung; Jaenicke, 1998). Ausgangs- und Endpunkt bei der *in vivo*- und *in vitro*-Proteinfaltung sind identisch: eine vollständig entfaltete Polypeptidkette faltet zur nativen dreidimensionalen Struktur. Eine Einschränkung muß an dieser Stelle gemacht werden: Die *in vivo* schrittweise vom Ribosom freigesetzte Polypeptidkette kann co-translational falten, so daß einzelne Domänen schon vor dem Abschluß der Translation vollständig strukturiert sein können (Bergman & Kuehl, 1979; Fedorov & Baldwin, 1995; Komar *et al.*, 1997).

In *E. coli* werden die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte bei der Faltung durch „Faltungshilfsproteine“ katalysiert: die Proteindisulfid-Isomerasen (PDIs), die die Bildung von Disulfidbrücken (Bardwell, 1994; Missiakas & Raina, 1997 a), und die Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, die die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-prolyl-Peptidbindungen katalysieren (Fischer, 1994; Göthel & Marahiel, 1999). Zusätzlich besitzen alle Zellen molekulare Chaperon-Proteine, die zwar nicht direkt die Sekundärstrukturbildung katalysieren, jedoch die Aggregation von Faltungsintermediaten unterdrücken, indem sie hydrophobe Bereiche erkennen und binden und damit letztlich die Effizienz der Proteinfaltung erhöhen (Beissinger & Buchner, 1998).

1.2.1. Die Chaperonfamilien

Der Begriff „molekulares Chaperon“ wurde erstmalig von Laskey *et al.* (1978) benutzt, um die Eigenschaft von Nukleoplasmin, das die *in vivo*-Assemblierung von Nukleosomen aus Histonen und DNA vermittelt, zu beschreiben. Der Chaperonbegriff unterlag in der Folgezeit einigen Erweiterungen. Als molekulare Chaperone werden heute Proteine bezeichnet, die (I) exponierte hydrophobe Oberflächen von nicht-nativen Proteinen erkennen und (II) nichtkovalente Wechselwirkungen mit entfaltenen Proteinen eingehen und sie dadurch vor Aggregation schützen. In vielen Fällen wird die Wechselwirkung des Chaperons mit dem entfaltenen Protein durch ATP-abhängige Konformationsänderungen kontrolliert (Bukau &

Horwich, 1998). Es gibt jedoch auch Chaperone, die unabhängig von ATP diese Funktionen erfüllen können (Beissinger & Buchner, 1998). Molekulare Chaperone werden oft auch als „Hitzeschockproteine“ (Hsps) bezeichnet, da sie durch thermischen Streß induzierbar sind (Yura *et al.*, 1993; Yura & Nakahigashi, 1999). Die Effekte von molekularen Chaperonen auf die *in vivo*- und *in vitro*-Faltung von Proteinen wurden eingehend untersucht (s. Übersichtsartikel von Hartl, 1996; Schwarz *et al.*, 1996; Beissinger & Buchner, 1998; Mayer & Bukau, 1998). Chaperone kommen in allen derzeit bekannten Organismen vor und werden anhand ihrer Molekulargewichte und Sequenzhomologien in Familien eingeteilt (Tabelle 1-1).

Tab. 1-1. Chaperonfamilien und deren Funktionen (nach Bukau & Horwich, 1998). Referenzen für die genannten Aufgaben können dem nachfolgenden Text entnommen werden.

Chaperonfamilie	bekannte zelluläre Aufgaben
Hsp100	ATP-abhängige Disassemblierung oligomerer Komplexe und Auflösung von Proteinaggregaten
Hsp90	ATP-abhängige Faltung/Assoziation von Steroidhormonrezeptoren und Signaltransduktionskinasen
Hsp70 (DnaK)	ATP-abhängige Wechselwirkung mit basischen und hydrophoben Regionen bei der Proteinfaltung
Hsp60 (Chaperonine)	ATP-abhängige Faltung von Proteinen zur nativen Konformation
kleine Hsps (sHsps)	ATP-unabhängige Stabilisierung von Proteinen bei Hitzestreß

Hsp100: Die Hsp100-Familie wurde erst in jüngster Zeit eingehend charakterisiert (Schirmer *et al.*, 1996). Zu dieser Familie gehören die ClpB, ClpA und ClpX-Proteine, die ATP-abhängig arbeiten. ClpA und ClpX vermitteln zusammen mit der Protease-Untereinheit ClpP den proteolytischen Abbau oligomerer bzw. nicht-nativer Proteine (Gottesmann *et al.*, 1997), wobei nicht-native Substrate erkannt und dem Abbau durch ClpP zugeführt werden. ClpB dagegen bindet an Proteinaggregate und vermittelt, zusammen mit den Komponenten des bakteriellen Hsp70-Systems, die Rückfaltung zur nativen Struktur (Goloubinoff *et al.*, 1999; Mogk *et al.*, 1999) bzw. verhindert die Bildung von Protein-Aggregaten (Zolkiewski, 1999).

Hsp90: Auch die Hsp90-Proteine sind ATP-abhängige Chaperone (Panaretou *et al.*, 1998). In Eukaryonten sind Hsp90-Proteine an Signaltransduktionswegen beteiligt, indem sie Komponenten (Kinasen, Rezeptoren u.a.) in Komplexen binden. Diese Komplexe erfahren bei Einwirkung des Signals konformationelle Änderungen (Buchner, 1999). Das Hsp90-Homolog in *E. coli*, HtpG genannt, fungiert *in vivo* als ATP-abhängiges Chaperon (Panaretou

et al., 1998), wobei eine aggregationshemmende Funktion auch unabhängig von ATP festgestellt wurde (Wiech *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 1995).

Hsp70: In *E. coli* existieren zwei Hsp70-Chaperonmaschinerien: das DnaK-System, bestehend aus DnaK (das eigentliche Hsp70-Homolog) und den beiden Co-Chaperonen DnaJ (ein Hsp40-Homolog) und GrpE, sowie das Hsc- (Heat shock cognate) System, bestehend aus Hsc66 und Hsc20 (einem DnaJ-Homolog). Das Hsc-System besitzt funktionelle Ähnlichkeit zum DnaK-System (Vickery *et al.*, 1997), seine Genexpression ist jedoch nicht durch Hitze induzierbar (Kawula & Lelivelt, 1994). Kürzlich wurde ein weiteres Hsp70-Homolog aus *E. coli*, Hsc62, entdeckt und beschrieben (Yoshimune *et al.*, 1998).

Das DnaK-System wurde bezüglich seiner Funktion bei der Protein-Faltung gut untersucht (Abb. 1-1). Das Hsp70-System spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung neu synthetisierter Proteine, bei der Translokation von Proteinen durch zelluläre Membranen, bei der Disassemblierung oligomerer Proteinkomplexe, beim Abbau instabiler Proteine durch Zielsteuerung dieser Moleküle zu Proteasen und bei der Kontrolle von regulatorischen Proteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren (Hartl, 1996; Bukau & Horwich, 1998). Dabei ist die ATPase-Aktivität von Hsp70 essentiell für die Funktion des Proteins bei diesen Prozessen. Charakteristisch für dieses Chaperonsystem ist die Kontrolle der Hsp70-Aktivität durch Co-Chaperone, die ein Gleichgewicht zwischen Substratbindung und Freisetzung vermitteln (Bukau & Horwich, 1998). Sowohl DnaK als auch DnaJ sind in Abwesenheit von ATP in der Lage, Proteine vor Hitzeinaktivierung zu schützen (Skowrya *et al.*, 1990; Langer *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1996).

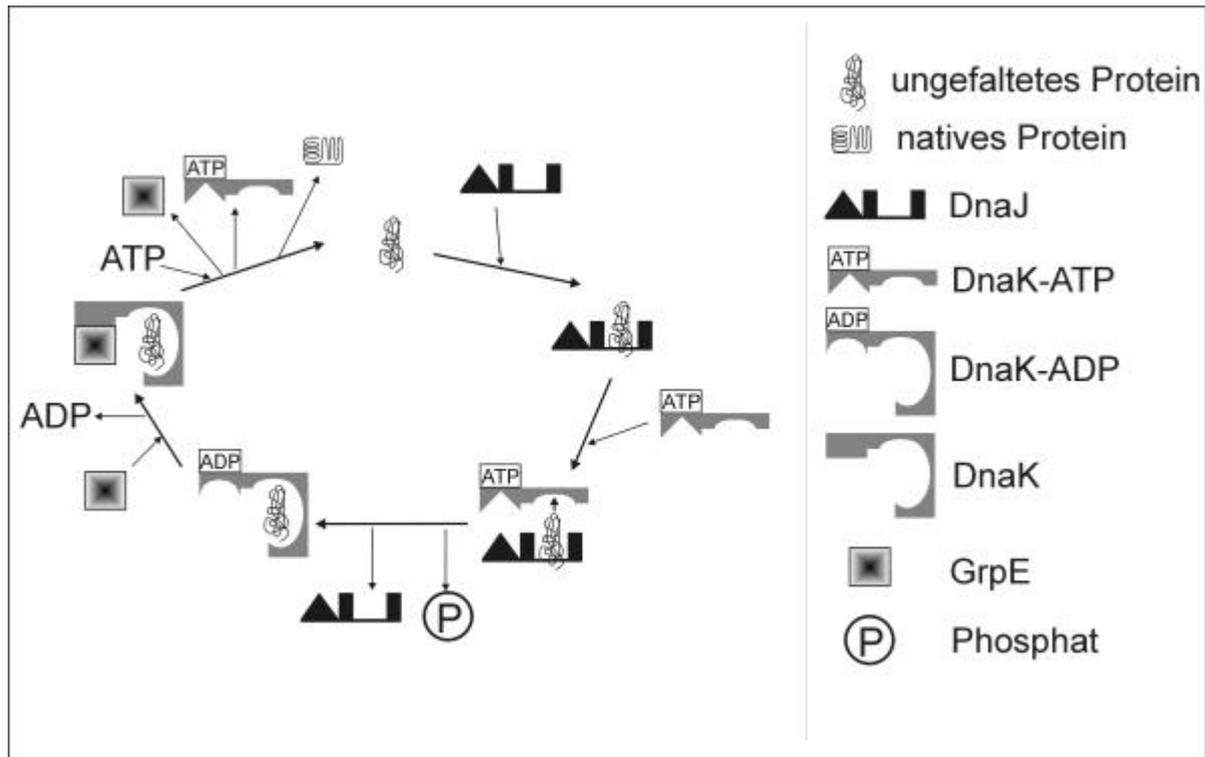


Abb. 1-1. Modell des Chaperonzyklus des DnaK-Systems (nach Mayer & Bukau, 1998). Ausgangspunkt ist das ungefaltete Protein (Substrat) in der Mitte oben. Das von DnaJ gebundene Substrat wird zu DnaK-ATP transferiert. Substrate, die an DnaK-ATP gebunden sind, unterliegen einem schnellen Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht. DnaJ stimuliert die ATPase-Aktivität von DnaK, das Substrat gebunden hat, und es folgt eine Stabilisierung des Substrat-DnaK-Komplexes durch Hydrolyse von ATP. Nach Dissoziation von DnaJ assoziiert GrpE mit dem DnaK-ADP-Substrat-Komplex und löst die Freisetzung von ADP von DnaK aus. Dadurch wird eine erneute Bindung von ATP an DnaK ermöglicht. Substrat und GrpE werden daraufhin wieder von DnaK freigesetzt. Ein alternativer Zyklus berücksichtigt die zusätzliche Möglichkeit, daß zuerst ein DnaK-ATP-Substrat-Komplex gebildet wird und danach mit DnaJ interagiert (Suh *et al.*, 1999).

Hsp60: Das Hsp60-System, auch Chaperonin-System genannt, ist das einzige essentielle Chaperonsystem in *E. coli* (Fayet *et al.*, 1989). Jeweils 14 GroEL- (Hsp60-) Untereinheiten bilden einen Doppelring, dessen apikale „Öffnungen“ von einem Ring aus je 7 GroES- (Hsp10-) Untereinheiten geschlossen werden. Die zentrale Kavität jedes Ringes kann in zwei verschiedenen Stadien vorliegen: Im bindungsaktiven Status ist sie offen zum Einlaß nicht-nativer Proteine und exponiert dabei hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche (Braig *et al.*, 1994; Fenton *et al.*, 1994). Dagegen wird der faltungsaktive Zustand durch die Bindung von ATP an jeweils ein GroEL-Molekül und eines GroES₇-„Deckels“ induziert (Weissman *et al.*, 1995, Mayhew *et al.*, 1996). Dabei wird das Protein vom äußeren Milieu abgeschlossen und die hydrophobe Oberfläche von GroEL durch gravierende Konformationsänderungen in

eine hydrophile Oberfläche geändert (Xu *et al.*, 1997). Nach ATP-Hydrolyse durch GroEL werden GroES und das Substratprotein freigesetzt. Die Lebensdauer des faltungsaktiven Zustandes von ca. 20 s (bei 23 °C) reicht für die Mehrzahl der Proteine aus, um zur nativen Konformation zu falten (Todd *et al.*, 1994). Es wird vermutet, daß die Oberfläche der Kavität mit dem Substratprotein in Wechselwirkung tritt und die Population bestimmter Konformere limitiert, so daß eine produktive Faltung zur erwünschten Struktur gefördert wird (Weissman *et al.*, 1996). Der sehr komplexe Funktionszyklus ist jedoch noch immer nicht vollständig verstanden (Bukau & Horwich, 1998).

sHsps: Als „kleine Hitzeschockproteine“ (sHsps) wird eine Gruppe von relativ heterogenen Proteinen bezeichnet, deren gemeinsame Merkmale ein Molekulargewicht zwischen 15 und 40 kDa und limitierte Homologie zum Augenlinsenprotein α -Kristallin sind (s. Übersichtsartikel von Jakob & Buchner, 1994). Sie bilden große oligomere Komplexe von 16-50 Untereinheiten, deren exakte Stöchiometrie oft nicht genau bekannt ist (Beissinger & Buchner, 1998). sHsps binden ATP-unabhängig nicht-native Proteine, schützen sie dadurch vor Aggregation und erhalten sie in einer rückfaltungskompetenten Form (Horwitz *et al.*, 1992, Jakob *et al.*, 1993, Ehrnsperger *et al.*, 1997, Veinger *et al.*, 1998). Da bislang keine Bindungsstelle für Substrate identifiziert werden konnte, wird angenommen, daß die Wechselwirkung über hydrophobe Bereiche auf der Oberfläche der Oligomere vermittelt wird (Raman *et al.*, 1995; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997). Es wird postuliert, daß sHsps unter Streßbedingungen ein Reservoir an Proteinen erhalten, die mit Hilfe der ATP-abhängigen Chaperonsysteme zur nativen Struktur zurückgelangen, sobald die Zellen keinem Streß mehr ausgesetzt sind (Ehrnsperger *et al.*, 1997). Haslbeck *et al.* (1999) diskutierten dagegen für Hsp26 aus *Saccharomyces cerevisiae*, daß die sHsp-Oligomere nur eine Lagerform darstellen, die bei Hitzestreß dissoziiert und entfaltete Proteine bindet, um danach zu wesentlich größeren Komplexen zu oligomerisieren. In *E. coli* wurden bisher zwei sHsp-Homologe, IbpA und IbpB als „Inclusion Body-assoziierte Proteine“ identifiziert (Allen *et al.*, 1992). Im Falle des IbpB-Proteins konnte eine ähnliche Funktion wie die der eukaryontischen Homologe nachgewiesen werden (Veinger *et al.*, 1998).

SecB: SecB ist ein Homotetramer aus Untereinheiten von 17 kDa, dessen Chaperonfunktion unabhängig von ATP ist (Hardy & Randall, 1991). Es assoziiert mit neusynthetisierten sekretorischen Proteinen und hält sie dadurch entfaltet in einem translokationskompetenten Zustand (Randall & Hardy, 1986; Hartl *et al.*, 1990). Da SecB zudem mit der SecA-Komponente des bakteriellen Translokationsapparates interagiert (Hartl *et al.*, 1990), wurde bisher angenommen, daß es ausschließlich als Helfer bei der Translokation agiert. Kürzlich veröffentlichte Daten von Knoblauch *et al.* (1999) belegen

jedoch, daß SecB nicht zwischen sekretorischen und nicht-sekretorischen Proteinen unterscheidet und deshalb als generelles Chaperon betrachtet werden sollte.

1.2.2. Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Die Peptidyl-Prolyl-Peptidbindung besitzt eine Sonderstellung gegenüber „normalen“ Peptidbindungen. Aufgrund der zyklischen Struktur des Prolins ist die freie Drehbarkeit um die N-C_α-Bindung aufgehoben. Es können somit sowohl *cis*- als auch *trans*-Peptidyl-Prolyl-Peptidbindungen in der nativen Proteinkonformation auftreten. Die energetische Barriere der *cis/trans*-Isomerisierung ist so hoch, daß sie einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Proteinfaltung darstellt.

In vivo sind Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) für die Katalyse der Isomerisierung verantwortlich. Sie werden in drei Familien eingeteilt: Cyclophiline, FK506-bindende Proteine und Parvuline (Göthel & Marahiel, 1999). In *E. coli* sind mindestens neun verschiedene cytoplasmatische und periplasmatische PPIasen bekannt, unter ihnen Triggerfaktor, SurA oder FkpA (s. Übersichtsartikel von Fischer, 1994).

Interessant in Hinblick auf die Regulation der *in vivo*-Faltung sind die kürzlich gewonnenen Erkenntnisse, daß Triggerfaktor und DnaK-System bei der Faltung neu synthetisierter Polypeptidketten zusammenwirken (Deuerling *et al.*, 1999; Teter *et al.*, 1999). Die Entdeckung, daß Triggerfaktor mit Ribosomen assoziiert ist (Lill *et al.*, 1988; Stoller *et al.*, 1995), wird als Hinweis für diese Funktion angesehen.

1.2.3. Proteindisulfid-Isomerasen

In Wildtyp-*E. coli*-Stämmen können disulfidverbrückte Proteine nur im Periplasma, dem Raum zwischen der inneren und äußeren bakteriellen Membran, aufgrund der dort herrschenden oxidierenden Bedingungen gebildet werden (Wülfing & Plücker, 1994; Missiakas & Raina, 1997 a). Die dafür verantwortlichen Disulfid-Isomerasen werden als Dsb-Proteine bezeichnet, von denen bisher sechs verschiedene Oxidoreduktasen identifiziert und charakterisiert wurden (Andersen *et al.*, 1997). DsbA, ein Enzym, das vorwiegend die Oxidation von Cysteinen katalysiert (Grauschopf *et al.*, 1995), wird von DsbB reoxidiert (Bardwell *et al.*, 1993). DsbB wiederum ist über eine Elektronentransportkette mit Redoxvorgängen des Cytosols verknüpft (Bader *et al.*, 1999). DsbC besitzt Proteindisulfid-Isomerase-Aktivität (Zapun *et al.*, 1995; Rietsch *et al.*, 1996; Sone *et al.*, 1997), die jedoch schwächer als bei eukaryontischen PDIs ist (Zapun *et al.*, 1995). Die weiteren Dsb-Proteine, DsbD, E und G, sind weniger gut untersucht und spielen vermutlich eine Rolle bei der Isomerisierung von Disulfidbrücken (Missiakas & Raina, 1997 a; Andersen, 1997). Es wird

diskutiert, daß ein effizientes Disulfid-Austausch-System in Prokaryonten nicht erforderlich ist, weil bakterielle sezernierte Proteine maximal zwei Disulfidbrücken besitzen (Joly & Swartz, 1994). Untersuchungen zur Faltung eukaryontischer Proteine mit mehr als zwei Disulfidbrücken im Periplasma zeigten, daß die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma von *E. coli* sequenziell, d.h., in der Reihenfolge der Exposition der Cysteine bei der Translokation durch die innere Membran, erfolgt (Joly & Swartz, 1997).

Im Cytoplasma von *E. coli* verhindern die reduzierenden Bedingungen die Bildung von Disulfidbrücken (Derman & Beckwith, 1991). Bakterielle Thioredoxine übernehmen dabei die Aufgabe, eventuell gebildete Disulfidbrücken wieder zu reduzieren (Prinz *et al.*, 1997; Aslund & Beckwith, 1999). Derman *et al.* (1993) selektierten Mutanten, die die Bildung von disulfidverbrückten Proteinen im Cytosol zuließen. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, daß in diesen Mutanten das *trxB*-Gen deletiert war, das für die bakterielle Thioredoxin-Reduktase kodiert (Stewart *et al.*, 1998). Im folgenden wurden $\Delta trxB$ -Stämme für die rekombinante Synthese disulfidverbrückter Proteine, wie z.B. verschiedene Plasminogenaktivator-Varianten, im Cytosol in der nativen Form verwendet (Bessette *et al.*, 1999). Jedoch stehen Untersuchungen zur generellen Anwendung dieser Stämme für die Überexpression rekombinanter disulfidverbrückter Proteine im bakteriellen Cytosol aus.

1.2.4. Periplasmatische „Chaperone“

Bisher konnten „klassische“ molekulare Chaperone im Periplasma nicht gefunden werden, eine Tatsache, die auf die Abwesenheit von ATP zurückgeführt wurde (Wülfing & Plückthun, 1994; Missiakas & Raina, 1997a). Allerdings ist seit wenigen Jahren bekannt, daß bestimmte periplasmatische Proteine, PapC und PapD, die Assemblierung von Pili in einer chaperonähnlichen Weise fördern und deshalb mitunter als „pilus-spezifische“ Chaperone bezeichnet wurden (Oliver, 1996; Sauer *et al.*, 1999).

Einige interessante experimentelle Ansätze führten vor kurzem zur Entdeckung von zwei periplasmatischen Chaperonen. Die Co-Expression einer *E. coli*-Proteinbibliothek und Selektion auf eine verbesserte Ausbeute von periplasmatisch exprimierten Antikörperfragmenten zeigte, daß Skp, ein periplasmatisches 17 kDa-Protein (Holck *et al.*, 1987), die native Ausbeute des Antikörperfragmentes um ein Vielfaches steigert (Bothmann & Plückthun, 1998). Aus weiterführenden Untersuchungen ging hervor, daß Skp als molekulares Chaperon an der Faltung von OMPs (outer membrane proteins) von *Escherichia coli* beteiligt ist (Schäfer *et al.*, 1999). Spiess *et al.* (1999) wiesen für ein weiteres periplasmatisches Protein, die Protease DegP, Chaperon-Funktion nach. Offensichtlich besitzt dieses Protein ein temperaturabhängiges Verhalten. Während die Chaperonfunktion bei niedrigen Temperaturen dominiert, herrscht die Proteaseaktivität bei höheren

Temperaturen (über 30 °C) vor. Diese Ergebnisse können als Indizien für die Existenz „genereller“ molekularer Chaperone im Periplasma von *E. coli* gewertet werden.

1.3. Die Überexpression von molekularen Chaperonen

In jüngster Zeit wurden verschiedene Versuche unternommen, die Ausbeute rekombinanter Proteine in *E. coli* durch gleichzeitige Überexpression von Faltungshelferproteinen, wie molekularen Chaperonen, Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen oder Proteindisulfid-Isomerasen, zu verbessern (Wall & Plückthun, 1995; Cole, 1996; Thomas *et al.*, 1997). Dies beruht auf der Annahme, daß durch massive Überexpression heterologer Gene die bakteriellen Faltungsmaschinerien überlastet sind. Dieser Überlastung sollte die gleichzeitige Bereitstellung von Faltungshelfern in großer Menge entgegenwirken. Dieser Ansatz führte in einigen Fällen zu erheblichen Ausbeutesteigerungen, z.B. bei Ribulosebiphosphat-Carboxylase (RUBISCO; Goloubinoff *et al.*, 1989; Cloney *et al.*, 1993), humaner Procollagenase (Lee & Olins, 1992), neuronaler Stickstoffoxidsynthase (Roman *et al.*, 1995) und der Dihydrofolat-Reduktase (Dale *et al.*, 1994). Es zeigte sich jedoch, daß die Überexpression von Chaperonen nur in spezifischen Fällen zur Ausbeuteverbesserung an nativem Protein führten (Lee & Olins, 1992). In der Regel müssen mehrere Chaperone für das gewünschte rekombinante Protein empirisch getestet werden, um eine optimale Ausbeute zu erhalten. Ein Beispiel dafür sind die Untersuchungen von Yokoyama *et al.* (1998), die zeigten, daß die Menge rekombinant hergestellter Transglutaminase durch GroEL/GroES oder DnaK nicht beeinflusst wird, wohingegen DnaJ oder DnaK und DnaJ die Ausbeute um das 45-fache steigern. Bei der rekombinanten Herstellung der Adrenodoxin-Reduktase konnte hingegen nur die Co-Expression von GroEL/GroES den Anteil korrekt gefalteten Proteins wesentlich erhöhen (Vorrhein *et al.*, 1999). Eingehende Untersuchungen der Effekte durch die Co-Überexpression molekularer Chaperone ergaben, daß der positive Einfluß auf die Ausbeute löslicher Proteine auf der Verhinderung von Aggregatbildungen beruht (Gragerov *et al.*, 1992; Thomas & Baneyx, 1996). Allerdings belegen Experimente zu physiologischen Konsequenzen der Überexpression von DnaK und DnaJ, daß eine extreme Anreicherung von DnaK und DnaJ in der Zelle zur Inhibierung des Wachstums bis hin zum Zelltod führte (Blum *et al.*, 1992).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte bewiesen werden, daß auch die Co-Überexpression von Triggerfaktor, einer PPIase, zusammen mit GroEL/ES bzw. DnaK/DnaJ/GrpE eine Erhöhung der Ausbeute löslicher eukaryontischer Proteine bewirkt (Nishihara *et al.*, 2000).

Während sich die bisher genannten Studien ausschließlich mit der Verbesserung der Ausbeute cytosolisch überexprimierter rekombinanter Proteine beschäftigten, gibt es

mittlerweile einige Berichte zur Ausbeuteverbesserung von ins Periplasma sezernierten Proteinen durch Überexpression von Faltungshelferproteinen (Thomas *et al.*, 1997). An erster Stelle stehen dabei Versuche zur Co-Überexpression von Disulfid-Isomerasen, wie DsbA oder DsbC (Joly *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998), aber auch von eukaryontischer PDI (Ostermeier *et al.*, 1996). Besonders die Co-Expression von DsbC bzw. PDI steigerte die Ausbeute aktiver Proteine, wie Plasminogenaktivator oder Rinder-Pankreas-Trypsininhibitor um ein Vielfaches (Ostermeier *et al.*, 1996; Qiu *et al.*, 1998), ein Indiz für das Fehlen effizienter Enzyme zum Austausch von Disulfidbrücken im Periplasma von *E. coli*. Die Co-Expression der periplasmatischen PPIase SurA erwies sich als ungeeignet, die Faltung von Antikörperfragmenten zu verbessern (Knappik *et al.*, 1993). Weitere Ansätze sind die schon oben angesprochenen Co-Expressionsversuche von Skp (Bothmann & Plückthun, 1998; Hayhurst & Harris, 1999) und die Co-Expression von Chaperonen im Cytosol, um eine Aggregation oder den Abbau sekretorischer Proteine vor ihrer Translokation ins Periplasma zu verhindern (Perez-Perez *et al.*, 1995; Berges *et al.*, 1996). In den letztgenannten Versuchen erwiesen sich vor allem DnaK/DnaJ als geeignet, die Ausbeute sezernierter Proteine in ihrer nativen Konformation zu erhöhen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten neue Möglichkeiten zur Ausbeuteverbesserung funktioneller disulfidverbrückter Modellproteine nach rekombinanter Synthese in *E. coli* untersucht werden. Die Proteine sollten therapeutisch interessant und ihr nativer Zustand durch einen geeigneten Aktivitätstest einfach nachweisbar sein. Aufgrund der Zielstellung, die disulfidverbrückten Proteine *in vivo* herzustellen, sollten diese ins Periplasma sezerniert werden. Zwei Möglichkeiten zur Ausbeuteerhöhung sollten auf ihre Anwendbarkeit hin getestet werden:

- (1) die Co-Sekretion von ATP-unabhängigen molekularen Chaperonen ins Periplasma
- (2) die Veränderung des periplasmatischen Milieus durch Zusatz niedermolekularer Medienzusätze.

Die Co-Expression von Chaperonen im Cytoplasma von *E. coli* erhöhte in vielen Fällen die Ausbeute nativer rekombinanter Proteine in *E. coli* (Thomas *et al.*, 1997). Da im Periplasma kein ATP vorhanden ist, erschien die Co-Sekretion von Chaperon-Proteinen der Hsp100-, Hsp90-, Hsp70- und Hsp60-Familie nicht als sinnvoll. Unsere Arbeitshypothese war, daß Chaperone, wie DnaJ oder sHsps, die ATP-unabhängig die Aggregation von Proteinen unterdrücken (Langer *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1996; Ehrnsperger *et al.*, 1997), auch im Periplasma einen positiven Einfluß auf die Faltungseffizienz von rekombinanten Proteinen haben können.

Das von uns angestrebte Co-Sekretionssystem sollte beliebige Kombinationen von Chaperonen und rekombinanten therapeutischen Proteinen zulassen. Die Gene der Chaperone und Modellproteine sollten deshalb auf separaten Plasmidvektoren lokalisiert sein. Da Untersuchungen einer grundsätzlichen Anwendbarkeit der Co-Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen im Vordergrund dieser Arbeit standen, sollte das Expressionssystem vor allem kompatibel zu den kommerziell verfügbaren Sekretionsvektoren zur Herstellung rekombinanter Proteine sein.

Da disulfidverbrückte eukaryontische Proteine, im Gegensatz zu *E. coli*-eigenen Proteinen, meist mehr als zwei Disulfidbrücken in ihrer nativen Konformation tragen, ist die Bildung korrekter Disulfid-Bindungen im Periplasma meist ineffizient (Joly & Swartz, 1997). Die Ursache ist vor allem das im Vergleich zum eukaryontischen endoplasmatischen Retikulum wesentlich stärker oxidierende Milieu (Wunderlich & Glockshuber, 1993 b) und unzureichende Disulfid-Isomerase-Aktivitäten, die normalerweise eine Korrektur falsch gebildeter Brücken ermöglichen. Dadurch werden mehrfach disulfidverbrückte Proteine entweder nicht richtig gefaltet, aggregieren oder werden von periplasmatischen Proteasen abgebaut. Eine Korrektur falsch gebildeter Disulfidbrücken sollte durch den Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH), eines artifiziellen Disulfid-Austausch-Systems ermöglicht werden (Wunderlich & Glockshuber, 1993 a).

Daneben eröffnet die Erkenntnis, daß Stoffe bis zu einem Molekulargewicht von ca. 600 Da frei ins Periplasma diffundieren können, weitere Möglichkeiten, die Ausbeute rekombinanter Proteine in diesem Kompartiment positiv zu beeinflussen. Bei der Faltung von Proteinen *in vitro* treten meist unerwünschte Aggregatbildungen auf, die die Ausbeute der gefalteten Proteine erheblich senken (De Bernandez Clark *et al.*, 1999). Der Zusatz bestimmter niedermolekularer Reagenzien, wie z. B. L-Arginin, Formamid oder Harnstoff, in hohen Konzentrationen kann aggregationsanfällige Faltungsintermediate *in vitro* erheblich stabilisieren und damit die Ausbeute nativ gefalteter Proteine steigern (Rudolph *et al.*, 1997). Es ist bekannt, daß Stoffe mit Molekulargewichten kleiner als 600 Da frei ins Periplasma diffundieren können (Decad & Nikaido, 1976). Es war deshalb von großem Interesse, den Einfluß derartiger Reagenzien als Medienzusätze auf die Ausbeute der verwendeten Modellproteine zu analysieren.

2. Material

2.1. Geräte, Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Geräte:

<i>B. Braun Biotech (Melsungen):</i>	Certomat BS-T-Schüttelinkubator
<i>Beckman (München):</i>	Avanti J-20- und Avanti J-25-Zentrifuge
<i>Bio-Rad (München):</i>	Gene-Pulser
<i>Biometra (Göttingen):</i>	Personal Cyclers, Trio-Thermoblock
<i>Dynatech (Denkendorf):</i>	Mikrotiterplatten-Lesegeräte MR 7000, DIAS
<i>Eppendorf (Hamburg):</i>	Mikrozentrifuge, Thermoschüttler
<i>Greiner (Frickenhäusen):</i>	Petrischalen, Mikrotiterplatten
<i>Heraeus (Hanau):</i>	Biofuge Pico, Biofuge Fresco
<i>Hybaid-AGS (Heidelberg):</i>	Omn-E Thermocycler
<i>Infors (Bottmingen, Schweiz):</i>	Multitron-Schüttelinkubator
<i>LiCor (Lincoln, NE):</i>	LiCor 4000 DNA Sequenzierer
<i>MicroCoat (Penzberg):</i>	Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten
<i>New Brunswick (Nürtingen):</i>	Innova 4300-Schüttelinkubator

Chemikalien und Kits:

<i>Amersham Pharmacia (Freiburg):</i>	HiTrap-Anti-E-Tag-Säule, RPAS Reinigungsmodul
<i>Amresco (Solon, OH., USA):</i>	Triton X-100
<i>AppliChem (Darmstadt):</i>	EDTA, GSH, IPTG, Kaliumdihydrogenphosphat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat
<i>Bachem GmbH (Heidelberg):</i>	H-Val-Leu-Lys-pNA
<i>Beckton-Dickinson (Heidelberg):</i>	TryptonPepton, Hefeextrakt
<i>Bio-Rad (München):</i>	Nitrozellulose
<i>Fluka-Chemica (Neu-Ulm):</i>	Acetamid, Coomassie Brilliantblau R, Formamid, Iso-propanol, Kanamycin, Magnesiumchlorid, Methylharnstoff, N-Ethylharnstoff, Ponceau S, Trichloressigsäure, Tween-20
<i>ICN (Meckenheim):</i>	Agarose, L-Arginin*HCl, SDS
<i>Intas (Göttingen):</i>	X-Ray XBP-Medizinische Röntgenfilme
<i>Nestlé (Frankfurt):</i>	Glücksklee Milchpulver
<i>Pierce (Rockford, IL., USA):</i>	ImmunoPure TMB Substrat
<i>Promega (Mannheim):</i>	WIZARD PCR Preps

<i>Qiagen (Hilden):</i>	QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIA Prep Spin, QIA Filter Plasmid Midi Kit
<i>Roche Diagnostics (Mannheim):</i>	BCIP-Lösung, Blocking Reagent (für ELISA), Coating Reagent (für ELISA), NBT-Lösung, Enzymun-Test Insulin
<i>Roth GmbH (Karlsruhe):</i>	Agar-Agar, Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumsulfat, Borsäure, Zelluloseacetat-Spritzenfilter (0,2 µm), Ethanol, Glycin, Kochsalz, Methanol, Salzsäure, Schwefelsäure, Tris, Tween-80
<i>Sigma (Deisenhofen):</i>	Ampicillin, Bromphenolblau, Glycerin, Mercaptoethanol, Mineralöl, Polymyxin-B-Sulfat

Enzyme und Antikörper:

<i>Amersham Pharmacia (Freiburg):</i>	Esel-Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugat, Schaf-Anti-Maus-IgG-POD-Konjugat, Anti-E-Tag-POD-Konjugat
<i>Epicentre (Madison, WIS., USA)</i>	SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit LC (für 25-41 cm Gele)
<i>Gibco-BRL (Eggenstein):</i>	T4-DNA-Ligase
<i>Haemochrom GmbH (Essen):</i>	Fibrinogen-Fragmente, Plasminogen
<i>Hybaid-AGS (Heidelberg):</i>	Restriktionsendonukleasen, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
<i>Roche Diagnostics (Mannheim):</i>	Restriktionsendonukleasen, Soybean-Trypsin-Inhibitor, Streptavidin-AP-Konjugat, Trypsin
<i>Sigma (Deisenhofen):</i>	Octopin-Dehydrogenase, Glutathion-Reduktase, Proinsulin
<i>Stratagene (Heidelberg):</i>	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
<i>USB (Cleveland OH., USA):</i>	Shrimp alkaline phosphatase

Folgende Antiseren bzw. Proteinproben wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von: Dr. Jaroslaw Marszalek (Universität Gdansk): Anti-DnaJ-Antiserum aus Kaninchen und gereinigtes DnaJ, Prof. Dr. Johannes Buchner (Universität München): Anti-Hsp25-Antiserum aus Kaninchen und gereinigtes Hsp25, Dr. Ulrich Kohnert und Dr. Ulrich Opitz (Roche Diagnostics, Penzberg): Biotin-markierter Anti-tPA-Antikörper und gereinigtes rPA, Dr. Ulrike Fiedler (TU Dresden): Anti-c-myc-Antiserum aus Maus und Dr. Alfred Engel (Roche Diagnostics, Penzberg): TSH-Biotin-Konjugat.

2.2. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco BRL bezogen:

FwDnaJ: 5' -GGG AAT TCC AGC TAA GCA AGA TTA TTA CGA G- 3'

RvDnaJ: 5' -GGG GAT CCT TAG CGG GTC AGG TCG TC- 3'

Folgende Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech bezogen:

FwHsp25: 5' -CCG AAT TCT CAC CGA GCG CCG CGT GCC CTT CTC GCT
GCT G- 3'

RvHsp25: 5' -CGG ATC CTA CTT GGC TCC AGA CTG TTC- 3'

FwompAChap: 5' -GAA GAT CTT AGG CGT ATC ACG AGG CCC TTT GG- 3'

RvompAChap: 5' -GAA GAT CTC CGG TTT CCA GCG CAG AAT GGT GA- 3'

FwQCJDom: 5' -GGC GGA CGT GGT CGT TAA TAG GCG GCG CGC GGT
GCT G- 3'

RvQCJDom: 5' -CAG CAC CGC GCG CCG CCT ATT AAC GAC CAC GTC
CGC C- 3'

FwScFvox: 5' -GAA GAT CTG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GC- 3'

RvScFvox: 5' -GTT CAC GTC GTT GCT CAG TTA CTA TGC GGC CCC ATT
CAG- 3'

Fwlpp: 5' -CTG AAT GGG GCC GCA TAG TAA CTG AGC AAC GAC
GTG AAC- 3'

FwrPA: 5' -GCC ATG CCA TGG CTT ACC AAG GAA ACA GTG ACT
GC- 3'

RvrPA: 5' -CGC GGA TCC TCA CGG TCG CAT GTT GTC ACG AAT- 3'

Von der Firma MWG Biotech bezogene IRD-800 markierte Primer:

T7Prom: 5' -CGA AAT TAA TAC GAC TCA- 3'

T7Term: 5' -GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G- 3'

Omp1: 5' -ACT CTA GAT AAC GAG GGC- 3'

Omp2: 5' -CGA GCT GCG TCA TCT TTA GC- 3'

HEN1: 5' -CAA TTT CAC ACA GGA AAC AGC- 3'

HEN2: 5' -GGA GGT GGC TCT GGC GGT- 3'

rPA: 5' -GGC GCA CTC CCG TTC TGG- 3'

2.3. Plasmide und Vektoren

pPL-dnaJ-23	Amp ^r (Dr. Thomas Langer, Universität München)
pA27fd7	Amp ^r (Dr. Ulrich Kohnert, Roche Diagnostics, Penzberg)
pCANTAB-TSH	Amp ^r (Dr. Alfred Engel, Roche Diagnostics, Penzberg)
pET20b(+)	Amp ^r (Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach)
pET20b(+)-PI	Amp ^r (Jeannette Winter, Universität Halle-Wittenberg)
pHEN-ScFv-Ox	Amp ^r (Dr. Ulrike Fiedler, TU Dresden)
pIN III ompA3	Amp ^r (Dr. Masayori Inouye, UMDC New Jersey, USA)
pMC111M1	Amp ^r (Prof. Dr. Matthias Gaestel, Universität Halle-Wittenberg)
pUBS520	Kan ^r (Dr. Ulrich Brinkmann, Epidauros Biotechnology, Bernried)

2.4. *E. coli*-Stämme und Medien

<i>E. coli</i> XLI/blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^r ΔM15(lacZ) Tn10 (tet^r)</i>]
<i>E. coli</i> BL21(DE3) (Calbiochem-Novabiochem)	<i>E. coli</i> B F' <i>dcm ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal λ</i> (DE3)
<i>E. coli</i> C600 (Calbiochem-Novabiochem)	F' <i>e14⁻ (McrA⁻) hsdR (r_k⁻m_k⁺) supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 mcrB</i>
<i>E. coli</i> N4830 (Zylicz <i>et al.</i> , 1985)	F' <i>e14⁻ (McrA⁻) hsdR (r_k⁻m_k⁺) supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 mcrB dnaJ259 pPL-dnaJ-23</i>

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 0,5 % NaCl) bei den im Methodenteil angegebenen Bedingungen. Dabei wurden die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin in Endkonzentrationen von 100 bzw. 50 µg/ml eingesetzt.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische und proteinchemische Methoden

3.1.1. Klonierung und Sequenzierung

Standardmethoden, wie Restriktionsspaltungen, Plasmidisolierungen, Klonierungen, gelelektrophoretische Trennungen von DNA, wurden, wie in Ausubel *et al.* (1987-97) beschrieben, durchgeführt. DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mittels WIZARD Prep oder QIAquick Gel Extraction Kit eluiert. Plasmid-DNA zur Klonierung und Sequenzierung wurde mit dem QIA Prep Spin Kit, bzw. Mengen größer als 10 µg, mit dem QIA Filter Midi Kit isoliert. Die *E. coli* Stämme XLI/blue und BL21(DE3) wurden durch Elektroporation mit einem „Gene Pulser“ nach Anleitung des Herstellers transformiert. Nach erfolgter Klonierung wurden die kodierenden Bereiche der Plasmide stets sequenziert. Die Plasmid-DNA wurde dabei nach Sanger *et al.* (1977) unter Verwendung von IRD-800-markierten Oligonukleotiden mit dem SequiTherm Excel II DNA Sequencing Kit LC (für 25-41 cm Gele) auf einem LiCor DNA-Sequencer 4000 sequenziert.

3.1.2. PCR-Amplifikation

Die Amplifikation von DNA mit spezifischen Oligonukleotiden zur Klonierung, also die Einführung neuer Restriktionsschnittstellen, erfolgte unter Nutzung der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986). Folgendes Protokoll wurde mit dem „Personal Cycler“ oder dem „Trio-Thermoblock“ genutzt: 1. Denaturierung bei 95°C, 5 min, 2. Anlagerung der Primer bei 38-55°C, 1 min, 3. Polymerase-Reaktion bei 72 °C, 1-5 min, 4. Denaturierung bei 95°C, 1min. Der Zyklus (2.-4.) wurde 30 mal wiederholt. Zur Amplifikation von Fragmenten <1000 bp wurde *Taq*-DNA-Polymerase und bei Fragmenten >1000 bp rekombinante *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. PCR-Fragmente wurden mit WIZARD PCR Preps oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

3.1.3. SDS-PAGE und Western Blot

Proteine aus Zellextrakten wurden mittels SDS-PAGE (Laemmli *et al.*, 1970) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau angefärbt. Zum spezifischen Nachweis rekombinanter Proteine wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proben auf Nitrozellulosemembranen übertragen (Khyse-Anderson, 1984; Towbin *et al.*, 1979). Die Membranen wurden mit 5 % Glücksklee Milchpulver in TBS (10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) über Nacht gesättigt

und im folgenden 2 h mit primärem Antiserum in 1:200-1:5000-Verdünnungen in TBS mit 5 % Milchpulver für 2 h dekoriert. Nach drei Waschschritten für jeweils 5 min in TBS wurde mit einem sekundären Antikörper-POD-Konjugat (1:2500) in TBS-5 % Milchpulver für 1,5 h inkubiert und danach wiederum 5 x mit TBS-Puffer gewaschen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels ECL-Western-Blotting-Detection-Kit nach Exposition auf Röntgenfilmen.

Als primäre Antiseren bzw. Antikörper wurden verwendet: Anti-DnaJ-Antiserum zur Detektion von DnaJ und der J-Domäne; Anti-Hsp25-Antiserum zum Nachweis von Hsp25, Anti-c-myc-Tag-Antiserum zur Detektion von scFv-ox; Anti-rPA-Antiserum zum Nachweis von rPA; Anti-E-Tag-Antikörper zur Detektion von scFv-TSH.

3.1.4. Präparation von periplasmatischen Zellextrakten aus *E. coli*

1 ml-Zellproben aus *E. coli*-Kulturen wurden nach einer modifizierten Vorschrift nach Jacobi *et al.* (1997) in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen fraktioniert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl Fraktionierungspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 5mM EDTA und 1 mg/ml Polymyxin-B-Sulfat, pH 7,5) versetzt, 1 h bei 10 °C auf einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 1200 rpm geschüttelt und dann 15 min bei 14 000 rpm in einer auf 8 °C gekühlten Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert, so daß eine Fraktion mit den löslichen periplasmatischen Proteinen (Überstand) entstand.

3.2. Konstruktion der Expressionsplasmide

pIN III ompA3-dnaJ: Der für DnaJ kodierende Bereich wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer FwDnaJ und RvDnaJ aus genomischer DNA des Stammes *E. coli* C600 amplifiziert. Das so erhaltene 1,1 kb-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *BamHI* in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 (Ghayreb *et al.*, 1984) kloniert. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten DnaJ unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz anstelle von Met mit den Resten Gly-Ile-Pro beginnt. Diese Änderung des N-Terminus ist durch die Klonierungsstellen des Vektors vorgegeben. Die Expression von dnaJ befindet sich unter Kontrolle des *lac-lpp*-Promotors, der mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactosid) induziert wird.

pUBS520-dnaJ: Mittels PCR wurde mit den Primern FwompChap und RvompChap aus dem Plasmid pIN III ompA3-dnaJ der Bereich amplifiziert, der für das *lac-lpp* Operon, die Signalsequenz, das dnaJ-Gen und die Terminator-Region des Operons kodiert. Das PCR-

Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*II geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert (Brinkmann *et al.*, 1989).

pUBS520-J-Domäne: Unter Verwendung des QuikChange-Mutagenese-Systems wurden mit den Primern FwQCJDom und RvQCJDom im Plasmid pIN III ompA3-dnaJ nach dem Nucleotid 324 zwei Stop-Codons eingefügt, so daß nur noch die ersten 108 Aminosäuren exprimiert werden.

pIN III ompA3-hsp25: Der für Hsp25 kodierende Bereich wurde mittels PCR aus dem Plasmid pMC111M1 amplifiziert. Dazu wurden die Primer FwHsp25 und RvHsp25 verwendet. Das so erhaltene 650 bp-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI in das Expressionsplasmid pIN III ompA3 kloniert. Die Sequenz des periplasmatisch exprimierten Hsp25 unterscheidet sich von dem Wildtyp-Protein dahingehend, daß die Polypeptidsequenz anstelle von Met mit den Resten Gly-Ile-Leu beginnt. Diese Änderung des N-Terminus ist durch die Klonierungsstellen des Vektors bedingt.

pUBS520-hsp25: Mittels PCR wurde unter Verwendung der Primer FwompChap und RvompChap aus dem Plasmid pIN III ompA3-hsp25 der Abschnitt amplifiziert, der für das lac-lpp Operon, die Signalsequenz, das hsp25-Gen und die Terminator-Region des Operons kodiert. Das PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*II geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI linearisierten Vektor pUBS520 kloniert.

pUBS520-scFv-ox: Unter Verwendung der Primer FwScFvox und RvScFvox wurde mittels PCR aus dem Plasmid pHEN-ScFv-Ox (Fiedler & Conrad, 1995) der Bereich amplifiziert, der für den lac-Promotor, die Signalsequenz pelB aus *Erwinia carotovora* und das scFv-ox-Gen kodiert. In einer zweiten PCR wurde mit den Primern Fwlpp und RvompChap das Segment aus dem Plasmid pIN III ompA3 amplifiziert, das für den lpp-Terminator kodiert. In einer anschließenden PCR wurden die beiden Fragmente mit Hilfe der Primer FwScFvox und RvompChap fusioniert. Das derart entstandene PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease *Bgl*II geschnitten und in den mit der Restriktionsendonuclease *Bam*HI linearisierten Vektor pUBS520 ligiert.

pET20b(+)-rPA: Mit Hilfe der PCR-Methode wurde unter Verwendung der Primer FwrPA und RvrPA die Sequenz, die für eine N-terminal verkürzte Version des gewebsspezifischen Plasminogenaktivators (BM 06.022 bzw. rPA) kodiert, aus dem Plasmidvektor pA27fd7

amplifiziert (Kohnert *et al.*, 1992). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonucleasen *NcoI* und *BamHI* gespalten und in den Plasmidvektor pET20b(+) kloniert. Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein, welches aus der Signalsequenz von PelB (PectatlyaseB aus *Erwinia carotovora*) und rPA besteht und die Sekretion von rPA ins Periplasma vermittelt. In diesem Plasmid wird die cDNA für rPA unter Kontrolle des T7-Promotors exprimiert, wobei die T7-RNA-Polymerase im Stamm *E. coli* BL21(DE3) der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors unterliegt (Studier & Moffatt, 1986). Die Induktion erfolgt durch Zugabe von 1 mM IPTG. Periplasmatisch exprimiertes rPA unterscheidet sich von BM 06.022 insofern, daß die zweite Aminosäure, Serin, gegen Alanin ausgetauscht wurde. Diese Änderung des N-Terminus ist durch die Vektorsequenzen bedingt.

3.3. Isolierung von Sphäroplasten und limitierte Proteolyse von DnaJ

Um die periplasmatische Lokalisierung und korrekte Faltung von DnaJ, das mittels pIN III ompA3-dnaJ ins Periplasma sezerniert wurde, zu überprüfen, wurden Sphäroplasten präpariert. Dazu wurden aus einer Vorkultur von *E. coli* XLI/blue-Zellen mit pIN III ompA3-dnaJ eine 1:50-Verdünnung in LB-Medium mit Ampicillin angeimpft, bei 37 °C und 200 rpm angezogen und nach 2,75 h (OD_{600} ca. 0,5) mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h Wachstum in Anwesenheit des Induktors wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Als Kontrolle wurde ein *E. coli*-Stamm N4830 mit pPL-dnaJ-23, einem Plasmid zur intrazellulären Überexpression von DnaJ, nach Vorschrift kultiviert und 3 h induziert (Langer, 1993). Aus den nach Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden Sphäroplasten präpariert (Thorstenson *et al.*, 1997). Die als Pellet anfallenden Sphäroplasten wurden in 30 µl 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 100 mM NaCl resuspendiert. Als Kontrolle wurden Sphäroplasten in demselben Puffer mit zusätzlich 0,1 % Triton X-100, aufgenommen. Für die anschließende limitierte Proteolyse mit Trypsin wurden 15 µl der jeweiligen Sphäroplastenpräparation (mit bzw. ohne Triton X-100) mit 25 µg/ml Trypsin bei 20 °C inkubiert. Nach 0, 5 und 30 Minuten wurden Proben genommen und mit 0,8 mg/ml Soybean-Trypsin-Inhibitor versetzt. In einem Kontrollversuch wurden 2 µg gereinigtes DnaJ mit 6 µg/ml Trypsin in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 100 mM NaCl gemischt, bei 20 °C inkubiert und die Proteolyse zu den oben bezeichneten Zeitpunkten beendet. Die Proteolyseprodukte wurden durch SDS-PAGE nach Laemmli *et al.* (1970) aufgetrennt. Durch Trypsinolyse entstandene DnaJ-Fragmente wurden mittels Western Blot detektiert (s. 3.1.3.).

3.4. Sekretion von rPA ins Periplasma von *E. coli* und Nachweis von rPA

3.4.1. Enzymatischer Test zur Quantifizierung von rPA in Zellextrakten

Zur Bestimmung der Menge an nativ gefaltetem rPA wurden Zellextrakte in einem abgewandelten indirekten, gekoppelten Enzymtest nach Verheijen *et al.* (1982 a) getestet (Abb. 3-1):

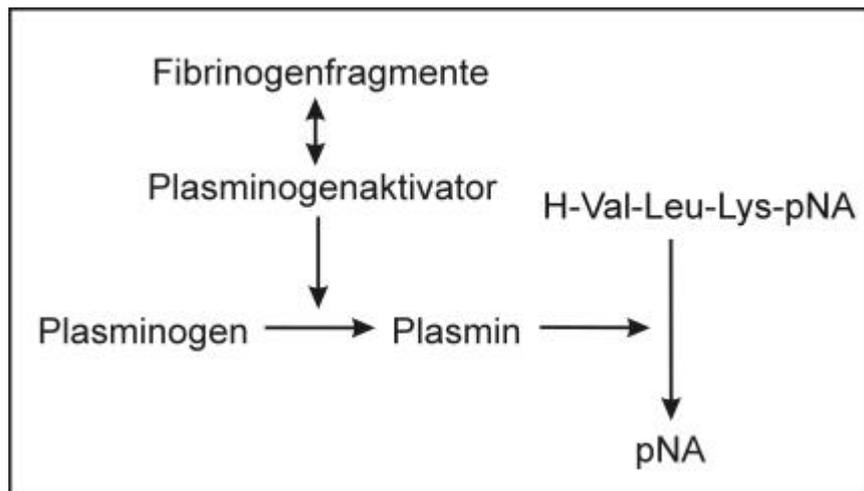


Abb. 3-1. Prinzip des gekoppelten enzymatischen Tests zur Bestimmung von gewebsspezifischem Plasminogenaktivator. tPA setzt spezifisch inaktives Plasminogen in die aktive Protease Plasmin um. Plasmin wiederum spaltet das chromogene Substrat und setzt p-Nitroanilin (pNA) frei, das durch Messung der Absorption bei 405 nm detektiert werden kann. Cyanogenbromid-gespaltene Fibrinogenfragmente aktivieren tPA um ein Vielfaches, was zu einer beträchtlichen Beschleunigung der folgenden Reaktionen führt (Verheijen *et al.*, 1982 b; Kohnert *et al.*, 1992).

Für den Test wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gefüllt mit je

- 120 μ l 75 mM Tris/HCl, pH 7,5 und 0,12 % Tween-80 (im folgenden auch „Tris/Tweenpuffer“ genannt)
- 20 μ l 0,6 mg/ml CNBr-gespaltene Fibrinogenfragmente (stimulierte Reaktion) bzw. 20 μ l Tris/Tweenpuffer (unstimulierte Reaktion)
- 50 μ l des chromogenen Substrates H-Val-Leu-Lys-pNA (1,375 mg/ml in 0,1 M Glycin)
- 10 μ l einer 0,75 mg/ml Plasminogen-Lösung
- und 50 μ l der löslichen Periplasmafraktionen.

Dabei wurde mit dem Gemisch aus Plasminogen und chromogenem Substrat die Reaktion gestartet. Die Absorption wurde bei 405 nm in Zeitabständen von 5-10 min mit einem „MR7000-Microplatereader“ bei 30 °C gemessen. Als Standard wurde gereinigtes rPA

in einem Konzentrationsbereich von 10-0,1 ng/ml in o.g. Tris/Tweenpuffer mitgeführt. Die Kinetik wurde ca. 15 h verfolgt.

Durch Auftragung der Extinktion bei 405 nm (bis zu einer maximalen Extinktion von 1) gegen das Quadrat der Reaktionszeit wurde durch lineare Regression die Steigung $\Delta E/t^2$ ermittelt, die proportional der Menge an aktivem rPA in der Probe ist. Um eine Aussage über die native Struktur des exprimierten rPA zu erhalten, wurde jede Probe parallel mit Fibrinogenfragmenten versetzt (s. oben). Der in diesem Parallelansatz ermittelte Anstieg der quadratischen Auftragung wird durch den Anstieg $\Delta E/t^2$ der Reaktion ohne Fibrinogenfragmente geteilt und ergibt den sogenannten „Stimulationsfaktor“ (Hesse, 1986; Abb.3-2).

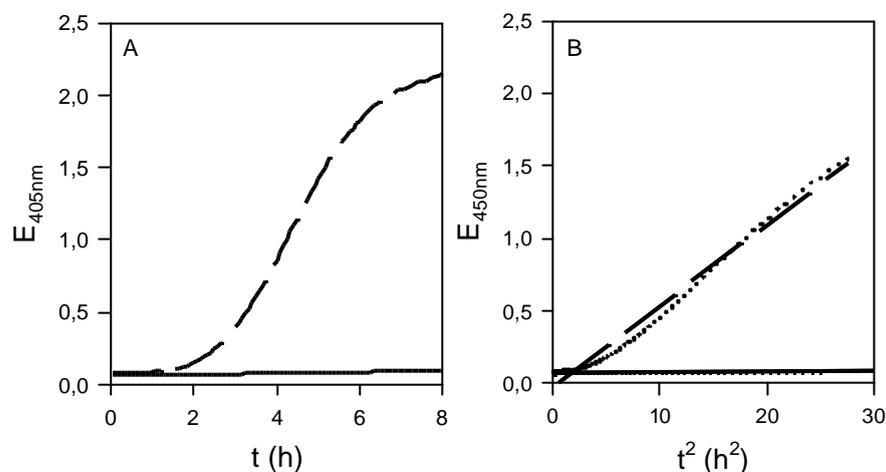


Abb. 3-2. Beispiel eines Tests zur rPA-Bestimmung mit quadratischer Auftragung bei Verwendung von 2 ng/ml rPA-Standard im Reaktionsansatz. A: Verlauf der Kinetik bei 405 nm in Gegenwart (gestrichelte Linie) bzw. in Abwesenheit (durchgezogene Linie) von Fibrinogenfragmenten. B: quadratische Auftragung der Werte (gepunktete Linie) und lineare Regression der Messungswerte (Linien) aus (A)

Um den Einfluß der in bakteriellen Fraktionen vorhandenen Proteasen, Inhibitoren und anderen Störfaktoren auf die Aktivität von rPA zu ermitteln, wurde gereinigtes rPA in periplasmatische bzw. restliche Proteinfractionen von BL21(DE3)-pET20b(+)/pUBS520 verdünnt und die Aktivität inkl. Stimulationsfaktor von rPA bestimmt. Nach Zugabe von periplasmatischen Zellextrakten wurde eine Inhibierung der rPA-Aktivität um den Faktor 1,45 beobachtet. Diese Inhibierung wurde bei allen Bestimmungen der rPA-Aktivität in Extrakten berücksichtigt. Ermittelte rPA-Konzentrationen in Zellextrakten wurden stets auf Zellsuspensionen von 1 ml $OD_{600} = 1$ normiert.

3.4.2. Western Blot-Analysen der rPA-Expression

Stationäre Übernachtskulturen von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die pET20b(+)-rPA und pUBS520 enthielten, und von *E. coli* C600-Zellen, die pA27fd7 und pUBS520 enthielten (cytosolische Expression von rPA), wurden im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin verdünnt und bei 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden beide Kulturen mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C und 170 rpm weitergeschüttelt. Nach 2 und 3 h wurden Proben entnommen. Zur Bestimmung der Expression von rPA wurden die Zellextrakte einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen (s. 3.1.3.). Der Western Blot wurde abweichend vom Standardprotokoll aus 3.1.3. dekoriert: Nachdem 2 h Inkubation der Nitrozellulosemembran mit TBS-5 % Milchpulver-Lösung und Anti-tPA-Biotin-Konjugat (1:1000), wurde der Blot 3 x 5 min mit TBS gespült. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit TBS-Puffer, der 0,1 % Streptavidin-AP-Konjugat enthielt. Nach weiterem 5-maligen Spülen der Membran mit TBS für jeweils 5 min wurde ein weiterer 5-minütiger Spülschritt mit AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9,5) durchgeführt. Zur Anfärbung wurde die Membran anschließend mit AP-Puffer, der 100 µl NBT- und 83 µl BCIP-Lösung enthielt, inkubiert und nach ausreichender Anfärbung der rPA-Banden die Farbreaktion mit bidest. Wasser abgestoppt.

3.4.3. Kultivierung von *E. coli* zur Optimierung der Kultivierungstemperatur und Induktionsdauer

Stationäre Übernachtskulturen von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die entweder pET20b(+)-rPA und pUBS520 oder pET20b(+) und pUBS520 enthielten (Kontrollkultur), wurden 1:50 in 20 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin verdünnt und bei 20, 24, 30 oder 37 °C und 170 rpm geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 wurden die Kulturen mit 1mM IPTG induziert und bei 170 rpm und der entsprechenden Temperatur weiter kultiviert. Nach 4, 6 oder (bei Kultivierungen bei 20 und 24 °C) 20 h wurden Proben entnommen, Periplasmafraktionierungen durchgeführt (s. 3.1.4.) und die Menge rPA in der löslichen Periplasmafraktion im enzymatischen Test (s. 3.4.1.) bestimmt.

3.4.4. Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) in Gegenwart von GSH und L-Arginin

Übernachtskulturen von *E. coli* BL21(DE3), die entweder pET20b(+)-rPA und pUBS520 oder pET20b(+) und pUBS520 enthielten (Kontrollkultur), wurden im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin verdünnt und bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden jeweils 5 ml der Kultur zu je 10 ml LB-Medium mit

o.g. Mengen Ampicillin und Kanamycin und verschiedenen Konzentrationen von GSH (0-10 mM) und L-Arginin*HCl (0-0,4 M) gegeben und mit jeweils 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden weitere 21 h bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurden 1 ml-Proben genommen und eine Periplasmafraktionierung durchgeführt (s. 3.1.4.). Die lösliche Periplasmafraktion wurde auf ihren Gehalt an funktionellem Plasminogenaktivator untersucht (s. 3.4.1.). In separaten Tests wurde statt L-Arginin*HCl L-Arginin*H₂SO₄ bzw. L-Arginin*H₃PO₄ im Kulturmedium eingesetzt.

Ganzzellextrakte wurden zur SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blotting verwendet und die Nitrozellulosemembranen mit Antiseren gegen die Chaperone dekoriert (s. 3.1.3.).

3.4.5. Kultivierung von *E. coli* zur Co-Sekretion von rPA und molekularen Chaperonen

Für die Co-Sekretion von DnaJ, der J-Domäne von DnaJ, Hsp25 und scFv-ox wurde *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-rPA mit pUBS520-dnaJ, pUBS520-J-Domäne, pUBS520-hsp25 bzw. pUBS520-scFv-ox transformiert. Die Zellen wurden, wie unter 3.4.4. beschrieben, kultiviert und natives rPA mittels Enzymtest (s. 3.4.1.) quantifiziert. Daneben wurden Proben für anschließende Western Blots genommen, durch die die Chaperone bzw. scFv-ox immunologisch nachgewiesen wurden (s. 3.1.3.).

3.4.6. Kultivierung von *E. coli* in Gegenwart weiterer niedermolekularer Medienzusätze

Übernachtulturen von *E. coli* BL21(DE3), die pET20b(+)-rPA und pUBS520-pIN-dnaJ enthielten (Co-Sekretion von DnaJ), wurde wie unter 3.4.4. kultiviert. Zusätzlich zu 5mM GSH wurden verschiedene niedermolekulare faltungsverbessernde Stoffe (Rudolph *et al.*, 1997) dem Kulturmedium zugesetzt. Eine Kontrollkultur wurde in LB mit 5 mM GSH ohne weitere Zusätze kultiviert. Die faltungsverbessernden Stoffe und die getesteten Konzentrationen sind in Tabelle 4-4 zusammengefaßt. Periplasmafraktionierung und Enzymtest für tPA-Aktivität wurden wie in 3.1.4. und 3.4.1. ausgeführt.

3.5. Expression und Nachweis von scFv-TSH

3.5.1. Proteinreinigung mittels RPAS-Reinigungssystem

E. coli BL21(DE3), die pUBS520 und pCANTAB-TSH enthielten, wurden bei 37 °C und 170 rpm in 1,3 x LB-Medium mit Ampicillin bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Dann wurde L-Arginin bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M und 1 mM IPTG zugesetzt. Nach weiteren 14 h Wachstum bei 24 °C und 170 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt

und der Überstand mit 50 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 10 000 g wurde das Pellet in 30 ml Bindungspuffer (200 mM Natriumphosphat, pH 7,0) aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 5 °C über Nacht gegen 3 l Bindungspuffer dialysiert. Das Dialysat wurde dann mit einem 0,45 µm-Zelluloseacetat-Spritzenfilter filtriert und auf eine HiTrap-Anti-E-Tag-Säule aufgetragen. Die weiteren Schritte erfolgten nach der Vorschrift des Herstellers des RPAS-Reinigungsmoduls. Je 20 µl der Elutionsfraktionen der HiTrap wurden einer SDS-PAGE und Western Blotting (s. 3.1.3.) unterzogen.

3.5.2. ELISA zur Quantifizierung von scFv-TSH

Die ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)-Methode dient der sensitiven Bestimmung von Antigen- bzw. Antikörperkonzentrationen. Dabei werden Proteine an inerten Oberflächen, beispielsweise Polystyren, immobilisiert. Mittels Antikörpern wird das Antigen gebunden, und in einer folgenden Farbreaktion, z.B. mit Peroxidase, wird die Antigenkonzentration, meist unter Zuhilfenahme eines internen Standards, bestimmt. Im hier beschriebenen Test wird jedoch nicht die Konzentration des Antigens gemessen, sondern die Konzentration des Antikörpers, scFv-TSH. Dabei wird dessen Eigenschaft, Thyreotropin (TSH) zu binden, ausgenutzt (Abb. 3-3).

Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit je 70 ng/ml TSH-Biotin in Coating Reagent bei Raumtemperatur über Nacht beschichtet. Nach dreimaligem Spülen mit PBS-Puffer (8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl) und 0,5 % Tween-20 wurden die Kavitäten mit jeweils 100 µl Blocking Reagent 1,5 h bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurde die Blocklösung abgegossen und die Kavitäten der Platte mit jeweils 100 µl einer 1:1 Verdünnung von Periplasmafraktion bzw. Medienprobe mit Blocking Reagent gefüllt und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Spülen mit PBS/Tween und eine einstündige Inkubation mit Anti-E-Tag-POD-Konjugat (1:6000-Verdünnung) in Blocking Reagent. Nach nochmaligem Spülen mit PBS/Tween wurde die Peroxidase-Reaktion mittels „ImmunoPure TMB Substrat“ durchgeführt. Nach einer halben Stunde wurde mit je 100 µl 2 M H_2SO_4 pro Kavität abgestoppt und die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Die Extinktionswerte wurden mit den entsprechenden Werten, die mit einem Stamm ohne pCANTAB-TSH erhalten worden waren, korrigiert. Alle Werte wurden 3-fach bestimmt und auf Bakterienkulturen einer einheitlichen OD normiert. Das unter 3.5.1. gereinigte scFv-TSH diente dabei als Standard. Das Prinzip des ELISA ist in Abb. 3-3 beschrieben:

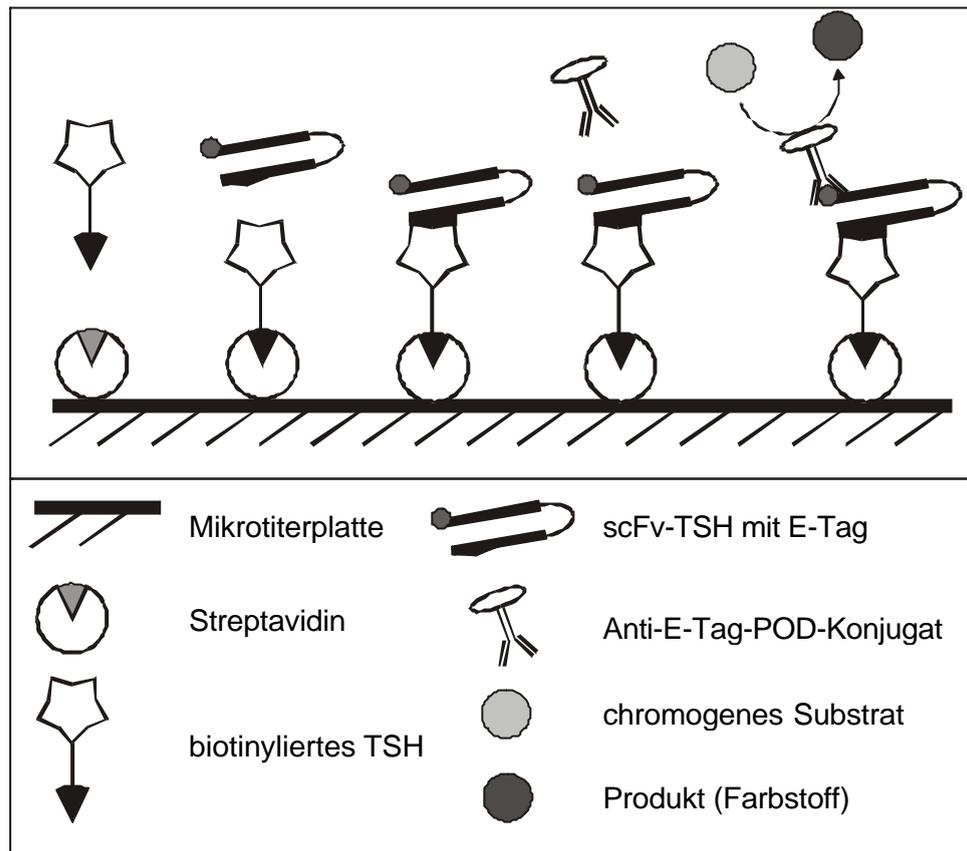


Abb. 3-3. Streptavidin-beschichtete Kavitäten werden mit Biotin-TSH-Konjugat beschichtet und dann mit Zellextrakten von *E. coli*-Zellen, die scFv-TSH überexprimieren, inkubiert. Funktionelles scFv-TSH bindet spezifisch TSH und wird im nächsten Schritt von Anti-E-Tag-POD-Konjugat erkannt und gebunden. Für die folgende Reaktion wird TMB-Substrat zugesetzt, das durch die Peroxidase-Reaktion oxidiert und dessen Umsatz durch Extinktionsmessung bei 450 nm bestimmt wird.

3.5.3. Kultivierung von *E. coli* zur Sekretion von scFv-TSH ins Periplasma in Gegenwart von L-Arginin und GSH

Eine Übernachtskultur von *E. coli* BL21(DE3) mit pCANTAB-TSH und pUBS520 wurde im Verhältnis 1:50 in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin verdünnt und bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt. Nach 3 h Wachstum wurden je 5 ml der Kultur zu je 10 ml LB-Medium mit den Antibiotika und 0 - 10 mM GSH und 0 - 0,4 M L-Arginin*HCl gegeben. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurden die Zellen weitere 21 h bei 24 °C und 170 rpm geschüttelt und nach Bestimmung der OD_{600} 1 ml-Proben entnommen. Die Zellproben wurden nach 3.1.4. fraktioniert. Für die Analyse auf scFv-TSH im Medienüberstand wurden Proben von je 1 ml Kultur abzentrifugiert und der Überstand verwendet. Zur Untersuchung der Proben auf funktionelles ScFv-TSH wurde der in Abb. 3-3 dargestellte ELISA-Test (s. 3.5.2.)

durchgeführt. Ganzzelextrakte wurden auch für SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot (s. 3.1.3.) verwendet.

3.5.4. Kultivierung von *E. coli* zur Co-Sekretion von scFv-TSH und molekularen Chaperonen

E. coli BL21(DE3)-pCANTAB-TSH wurde mit pUBS520-dnaJ, pUBS520-J-Domäne, pUBS520-hsp25 bzw. pUBS520-scFv-ox transformiert. Transformanten wurden, wie unter 3.5.3. beschrieben, kultiviert und die produzierte Menge an scFv-TSH mittels ELISA quantifiziert (s. 3.5.2.).

3.6. Sekretion von Proinsulin ins Periplasma von *E. coli*

3.6.1. Kultivierung von *E. coli* zur Co-Sekretion von Proinsulin und molekularen Chaperonen

Die Expression und Detektion von nativem Proinsulin wurde von Jeannette Winter durchgeführt: *E. coli* BL21(DE3), die mit pET20b(+)-PI und den in 3.4.5. verwendeten Co-Sekretionsplasmiden transformiert worden waren, wurden bei 25 °C bis zu einer OD₅₀₀ von 1 kultiviert. Die Ansätze wurden dann auf das doppelte Volumen verdünnt, wobei 0 oder 0,4 M L-Arginin und 1 mM IPTG zugesetzt wurden. Die Zellen wurden nach weiteren 6 h Kultivierung geerntet und der periplasmatische Extrakt nach dem Protokoll von Kang & Yoon (1994) präpariert.

3.6.2. ELISA zur Quantifizierung von Proinsulin

Die Quantifizierung von funktionellem Proinsulin erfolgte mit Hilfe des „Enzymun-Test Insulin“. Es handelt sich hierbei um einen Sandwich-ELISA, dessen Prinzip in der Abb. 3-4 dargestellt ist. Als Standard wurde gereinigtes Proinsulin verwendet und die erhaltenen Proinsulin-Konzentrationen auf Bakterienkulturen einer einheitlichen OD normiert.

Ganzzelextrakte wurden zur SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blotting verwendet. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Antiseren gegen DnaJ und Hsp25 bzw. scFv-ox dekoriert (s. 3.1.3.).

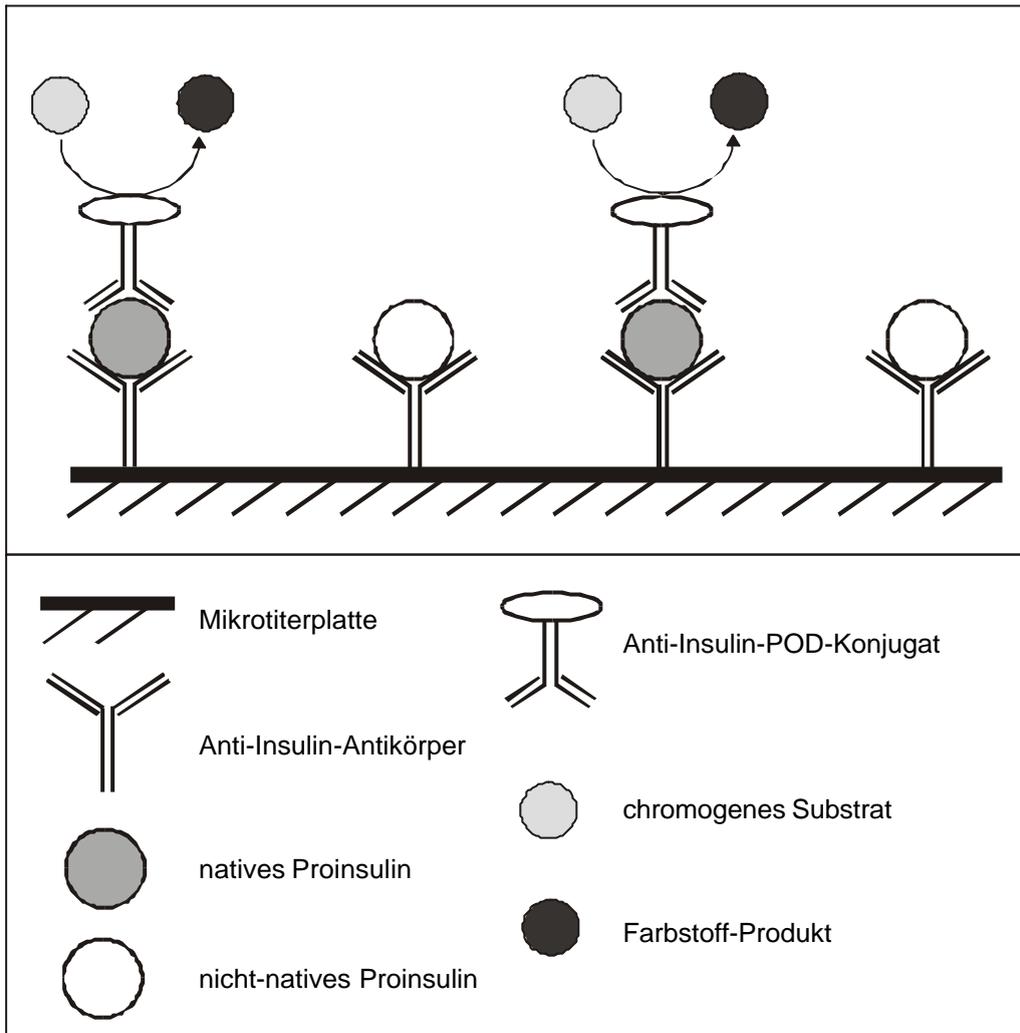


Abb. 34. Prinzip des „Enzymun-Test Insulin“. Im periplasmatischen Zellextrakt enthaltenes Proinsulin wird vom immobilisierten Anti-Insulin-Antikörper gebunden. Das sekundäre Antikörperkonjugat Anti-Insulin-POD erkennt nur natives Proinsulin. Die gekoppelte Peroxidase katalysiert dann die Detektionsreaktion mit ABTS-Farbstoff. Die Extinktion bei 405 nm ist direkt proportional zur Menge nativen Proinsulins.

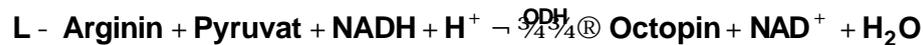
3.7. Enzymatischer Nachweis von L-Arginin und Glutathion im Kulturmedium

Bei einer üblichen Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-rPA/pUBS520-dnaJ (s. 3.4.5.) in Gegenwart von L-Arginin und GSH wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und der nach Zentrifugation enthaltene Medien-Überstand eingefroren. Vor der Messung wurden die Proben 1:100 in LB verdünnt.

3.7.1. Nachweis von L-Arginin

Die Bestimmung des L-Arginin-Gehaltes in Medienproben wurde nach Gäde (1989) durchgeführt. Die dort aufgeführten Mengen an Enzym, Puffer usw. wurden auf den

Mikrotiterplattenmaßstab übertragen und die Messung mit einem MR7000-Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 340 nm durchgeführt. Der Test basiert auf folgender Reaktion:

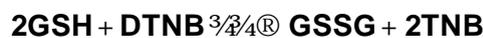


L-Arginin wird dabei mit Pyruvat, unter Oxidation von NADH, durch die Octopin-Dehydrogenase zu Octopin umgewandelt. Die Menge an entstandenem NAD^+ ist bei vollständiger Reaktion proportional zum vorhandenen Arginin. Eine Eichreihe von 0-6 mM L-Arginin in LB diente als Standard.

3.7.2. Nachweis von Glutathion

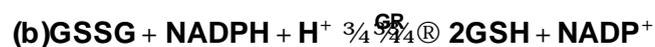
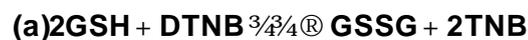
Die Bestimmung des Gehaltes an Glutathion wurde nach Griffith (1989) mit einem MR7000-Mikrotiterplatten-Lesegerät durchgeführt. Zur Bestimmung des Gehaltes an reduziertem Glutathion wurde der Test leicht abgewandelt, d.h., es wurde die Extinktionsdifferenz bei 405 nm bei Zugabe von DTNB (ohne Zugabe von Glutathion-Reduktase) gemessen. Für beide Verfahren wurde eine Eichreihe von Glutathion im Bereich von 0-0,2 mM (verdünnt in LB) zur Normierung verwendet.

Die Bestimmung von reduziertem Glutathion basiert auf der Oxidation der reduzierten Cysteine durch DTNB nach folgender Reaktion (Ellman, 1959):



Dabei wird DTNB oxidiert und es entsteht TNB, dessen Produktion durch Messung der Extinktion bei 405 nm verfolgt werden kann.

Die Bestimmung der Gesamt-Glutathion-Konzentration (Summe aus reduziertem und oxidiertem Glutathion) erfolgt auf Basis der folgenden Enzymreaktion:



In diesen gekoppelten Reaktionen wird reduziertes Glutathion mittels DTNB oxidiert, und es entsteht TNB, dessen Produktion durch Messung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden kann. Oxidiertes Glutathion (GSSG) wird unter Oxidation von NADPH mit Hilfe der Glutathion-Reduktase (GR) in GSH umgewandelt. Letztlich entsteht TNB unter Verbrauch von NADPH mit einer Geschwindigkeit, die direkt proportional zur Glutathion-Konzentration (GSH + GSSG) ist.

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion von Sekretionsvektoren für DnaJ, der J-Domäne und Hsp25 und Nachweis der periplasmatischen Lokalisation der Chaperone

Ziel der Arbeit war es, native Humanproteine in hoher Ausbeute in *E. coli* zu gewinnen. Deshalb sollte die Co-Sekretion von molekularen Chaperon-Proteinen auf eine mögliche Ausbeutesteigerung hin getestet werden. In jüngster Zeit wurde oft die Co-Expression von molekularen Chaperonen und anderen Faltungshelfer-Proteinen, wie Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen oder Proteindisulfid-Isomerasen genutzt, um die lösliche Ausbeute rekombinanter aggregationsanfälliger Proteine zu verbessern (s. Übersichtsartikel von Thomas *et al.*, 1997). Dabei wurden entweder einzelne Chaperone oder ganze Chaperon-Systeme mit mehreren Komponenten neben dem gewünschten Protein co-überexprimiert. Fast ausschließlich wurden bislang die Faltungshelfer im bakteriellen Cytosol co-exprimiert, selbst wenn damit die Ausbeute periplasmatisch exprimierter Proteine verbessert werden sollte (Perez-Perez *et al.*, 1995; Berges *et al.*, 1996). Nur in wenigen Publikationen wurde bisher von einer Co-Sekretion von Faltungshelfer-Proteinen berichtet. Hier wurden jedoch keine klassischen molekularen Chaperone genutzt, sondern Proteindisulfid-Isomerasen, wie DsbA oder DsbC (Joly *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998), eukaryontische PDIs (Ostermeier *et al.*, 1996) oder die bakterielle PPlase SurA (Knappik *et al.*, 1993). Eine Sekretion ATP-abhängiger Chaperone wurde bislang nicht in Betracht gezogen, da im Periplasma kein ATP vorhanden ist (Wülfing & Plückthun, 1994).

In dieser Arbeit sollten nun molekulare Chaperone, wie DnaJ, ein Hsp40-Homolog, und Hsp25, ein kleines Hitzeschockprotein aus der Maus (Gaestel *et al.*, 1989), co-sezerniert werden. Für diese Chaperone war gezeigt worden, daß sie auch ATP-unabhängig aggregationshemmend wirken (Langer *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1996; Ehrnsperger *et al.*, 1997). Zur periplasmatischen Lokalisierung sollten zunächst Sekretionskonstrukte hergestellt werden.

Die genaue Klonierungsstrategie für die Expressionsplasmide wurde unter 3.2. beschrieben. Die kodierenden Bereiche von DnaJ und Hsp25 wurden in pIN III ompA3 (Ghayreb *et al.*, 1984) integriert. Damit befand sich die Expression der Gene unter Kontrolle des lac-*lpp*-Promotors, der mit IPTG induzierbar ist. Die Sekretion ins Periplasma wird durch die OmpA-Signalsequenz vermittelt (Ghayreb *et al.*, 1984). Um Aufschluß über die zelluläre Lokalisation zu erhalten, wurden Periplasmaextraktionen durchgeführt (s. 3.1.4.). Erstaunlicherweise wurde kein DnaJ in der löslichen Periplasmafraktion detektiert (Daten nicht gezeigt). Da von Bardwell *et al.* (1986) nachgewiesen wurde, daß DnaJ an Membranen bindet, wurde angenommen, daß DnaJ an der periplasmatischen Seite der inneren Membran

lokalisiert ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden Sphäroplasten präpariert und einer limitierten Proteolyse mit Trypsin unterzogen. Falls DnaJ ins Periplasma sezerniert wird und an der inneren Membran lokalisiert ist, so sollte es einer Trypsinolyse zugänglich sein. Die bei der Proteolyse entstandenen Proteinfragmente wurden mittels Western Blot-Analysen detektiert (Fig. 4-1). Dabei wurde zur Kontrolle gereinigtes DnaJ und Sphäroplasten eines *E. coli*-Stammes N4830, der durch das Plasmid pPL-dnaJ-23 DnaJ im Cytosol überproduziert, untersucht. In Sphäroplasten von *E. coli* N4830 sollte DnaJ vor einem Abbau durch Trypsin geschützt sein. Als weitere Kontrolle wurden Sphäroplasten von N4830 mit 0,1 % Triton X-100 behandelt, um die Sphäroplasten zu öffnen und einen tryptischen Verdau des cytosolischen DnaJ zu erhalten.

Abb. 4-1 zeigt, daß gereinigtes DnaJ schnell von Trypsin abgebaut und dabei ein bestimmtes Abbaumuster erhalten wird. Auch DnaJ, das mit pIN III ompA3 exprimiert wurde, war in der Sphäroplasten-Präparation für Trypsin zugänglich und wurde nach 30 min fast vollständig in kleinere Fragmente umgesetzt. Dagegen war Protein, das intrazellulär akkumuliert wurde, nahezu komplett vor tryptischem Abbau geschützt. Erst eine Lyse der Sphäroplasten durch Triton X-100 machte intrazelluläres DnaJ zugänglich für eine Trypsinolyse. Die limitierte Proteolyse ist ein Mittel zu Studien von strukturellen Änderungen in Proteinen bei Faltungsprozessen (Zettlmeißl *et al.*, 1983, Fontana *et al.*, 1997) und kann Aufschlüsse über den Konformationszustand von Proteinen geben (Polverino de Lareto *et al.*, 1995). Die ähnlichen Bandenmuster von periplasmatischem und gereinigtem DnaJ sind ein Indiz dafür, daß DnaJ auch im oxidierenden Periplasma zur nativen Konformation faltet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Hsp25 mit pIN III ompA3-hsp25 exprimiert wurde. Da nur eine 25 kDa-Bande zu erkennen war, ist anzunehmen, daß das Protein vollständig prozessiert vorlag. Das katalytische Zentrum der Signalpeptidase lep ist im Periplasma lokalisiert (Dalbey *et al.*, 1997). Die Abspaltung von Signalpeptiden kann somit erst nach der Translokation der Polypeptidkette ins Periplasma stattfinden. Das Auftreten einer 25 kDa-Bande wurde deshalb als ein Hinweis für die periplasmatische Lokalisation von Hsp25 betrachtet. Wie im Fall der Sekretion von DnaJ konnte auch hier kein Protein in der löslichen Periplasmafraktion nachgewiesen werden. Dies kann auf eine Bindung des sezernierten Hsp25 an Membranen oder aggregierte Proteine hindeuten. Der Antikörper zur Detektion von Hsp25 erwies sich als zu unspezifisch für einen entsprechenden Test zur nativen Faltung von Hsp25 im Periplasma (s. Abb. 4-4).

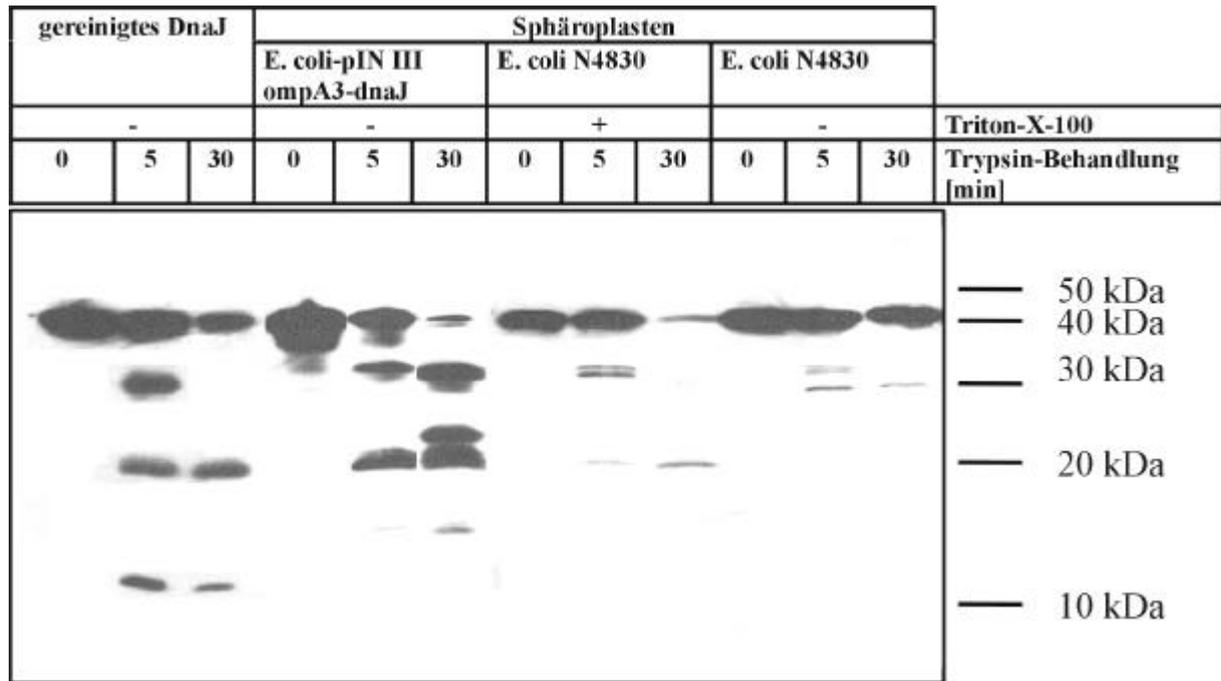


Abb. 4-1. Nachweis der Lokalisation und nativen Faltung von DnaJ mittels Western Blot-Analysen. Sphäroplasten der angezeigten Stämme bzw. gereinigtes DnaJ-Protein wurden einer limitierten Proteolyse mit 25 µg/ml (Sphäroplasten) bzw. 6 µg/ml (gereinigtes DnaJ) Trypsin unterzogen. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach SDS-PAGE und Transfer auf Nitrozellulosemembranen immunologisch untersucht. Proteinfragmente, die spezifisch mit Antiserum gegen DnaJ reagierten, wurden mit Hilfe eines sekundären Anti-Kaninchen-IgG-POD-Konjugates und ECL-Reaktion detektiert.

4.2. Herstellung eines Zwei-Plasmid-Systems zur Co-Sekretion von Chaperonen und therapeutisch relevanten Humanproteinen

Um eine effiziente Co-Sekretion von molekularen Chaperonen und gewünschten disulfidverbrückten Proteinen zu erreichen, wurde ein Zwei-Plasmid-System konstruiert. Dabei wurden die kodierenden Bereiche der therapeutisch relevanten Humanproteine in Multicopy-Plasmide mit einem ColE1-Replikationsursprung integriert (Polisky, 1988). Durch die hohe Kopienzahl und geeignete, starke Promotoren, wie z.B. den T7- (Studier & Moffatt, 1986) oder den lac-Promotor (Gronenborn, 1976), kann eine hohe Transkriptionsrate erzielt werden, die wiederum eine hohe Translationsleistung ermöglicht. Das Plasmid, das für das zu sezernierende molekulare Chaperon kodiert, muß einen kompatiblen Replikationsursprung besitzen, damit es zusammen mit dem ColE1-Plasmid in einer Zelle propagiert werden kann. Ein dafür geeigneter Kandidat war das Plasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989, Abb. 4-2). Es enthält einen p15A-Replikationsursprung und kann damit neben Plasmiden mit dem ColE1-Ursprung in einer bakteriellen Zelle repliziert werden. Auf diesem Plasmid sind die Gene für den Lac^f-Repressor und die tRNA^{AGA/AGG}_{Arg} kodiert.

Durch Verwendung dieses Plasmids kann das häufige Problem der Expression von Genen mit einer andersartigen Codon-Auswahl in *E. coli* (Ernst, 1988) behoben werden. So ist beispielsweise bekannt, daß sich die Codon-Nutzung eukaryontischer grundsätzlich von der prokaryontischer Gene unterscheidet. Die Konsequenz ist eine ineffiziente Translation eukaryontischer Gene in *E. coli* durch t-RNA-Limitationen. Besonders gravierend ist dies bei den Arginin-Codons AGA und AGG, die in *E. coli* mit der geringen Häufigkeit von 1,4 bzw. 2,1 pro 1000 (Kane, 1995), beim Menschen jedoch mit einer Häufigkeit von 11,2 bzw. 11,1 vorkommen (Nakamura *et al.*, 1999). Gerade die Expression von Genen mit diesen Arginin-Codons in *E. coli* führt häufig zu einer verringerten Translationsgeschwindigkeit und damit einer geringeren Ausbeute des gewünschten Proteins (Sørensen *et al.*, 1989), zu verkürzten Translationsprodukten (Misra & Reeves, 1985), dem Einbau falscher Aminosäuren (Parker *et al.*, 1983) bis hin zu Verschiebungen des Leserahmens (Spanjaard & Van Duin, 1988) oder der Inhibierung des Zellwachstums (Zahn, 1996) führen. Brinkmann *et al.* (1989) konnten zeigen, daß die Co-Expression der tRNA für die Codons AGA/AGG mit Plasmid pUBS520 zu einer wesentlichen Verbesserung der Translationseffizienz humaner Proteine in *E. coli* führt. Das Plasmid pUBS520 wurde deshalb ausgewählt, um die Sekretionskonstrukte für die molekularen Chaperone zu integrieren.

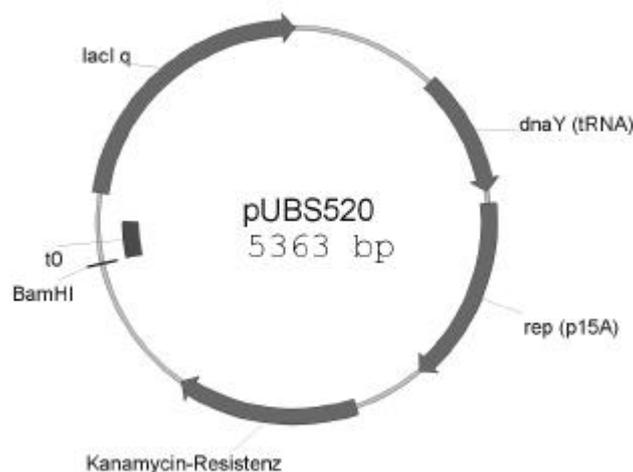


Abb. 42. Schematische Darstellung des Plasmids pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989). pUBS520 ist ein Derivat von pACYC177 (Chang & Cohen, 1978). Von pACYC177 ist das Gen für die Kanamycin-Resistenz und der p15A-Replikationsursprung erhalten. Zusätzlich trägt pUBS520 den lacI^q-Repressor und das dnaY-Gen, das die tRNA^{AGA/AGG}_{Arg} kodiert (Garcia *et al.*, 1986).

Die DNA-Abschnitte der Plasmide pIN III ompA3-dnaJ und pIN III ompA3-hsp25, die für den lac-Ipp-Promotor, die Signalsequenz, das Chaperon-Protein und den Ipp-Terminator kodieren, wurden in die *Bam*HI-Restriktionsstelle von pUBS520 integriert (s. 3.2.). Damit konnte ein Sekretionskonstrukt für DnaJ und Hsp25 hergestellt werden, das kompatibel zu

allen Plasmiden mit einem ColE1-Replikationsursprung ist. Ein Schema zur Konstruktion des Co-Sekretionssystems ist in Abb. 4-3 dargestellt.

Durch Einführung von Stop-Codons mittels ortsspezifischer Mutagenese des Plasmides pUBS520-dnaJ wurde zusätzlich ein Sekretionskonstrukt für den N-terminalen Bereich von DnaJ hergestellt (s. 3.2.). Dieser Bereich enthält die J-Domäne (Kelley, 1998) und eine glycin-/phenylalaninreiche-(G/F-reiche) Domäne und umfaßt 108 Aminosäuren. Dieses Konstrukt war ursprünglich als Negativ-Kontrolle gedacht, da für die J-Domäne bislang keine Chaperon-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Wall *et al.*, 1994; Szabo *et al.*, 1996).

Da die J-Domäne mit einem vom Sekretionskonstrukt für DnaJ durch Mutagenese abgeleiteten Vektor ins Periplasma sezerniert wird, ist anzunehmen, daß auch dieses Polypeptid wie DnaJ ins Periplasma gelangt. Auch die J-Domäne konnte nicht in löslichen Periplasmafraktionen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), ist jedoch mittels Western Blot-Analysen bakterieller Ganzzellextrakten unter Verwendung von Anti-DnaJ-Antiserum detektierbar (s. Abb. 44). Das hier ermittelte Molekulargewicht von ca. 12 kDa deutet auf eine korrekte Prozessierung der Signalsequenz hin, ein Indiz für eine periplasmatische Lokalisation. Aufgrund des geringen Molekulargewichts der J-Domäne erschienen limitierte Proteolyse-Experimente, wie sie bei DnaJ durchgeführt wurden, nicht sinnvoll.

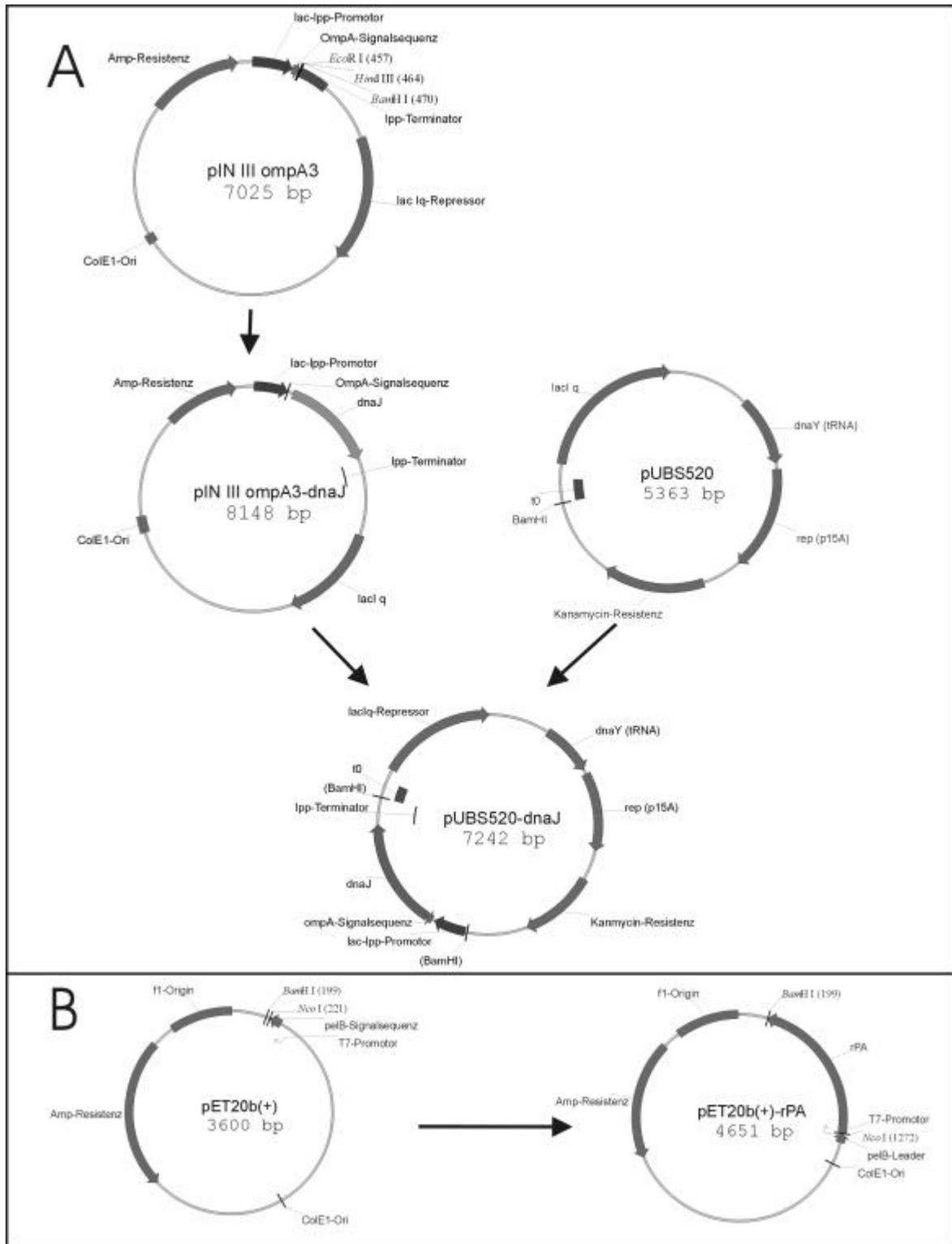


Abb. 4-3. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das Zwei-Plasmid-Co-Sekretionssystem (s. auch 3.2.). A: Konstruktion der Co-Sekretionsplasmide für molekulare Chaperone auf der Basis von pIN III ompA3 (Ghayreb *et al.*, 1984) und pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) am Beispiel von pUBS520-dnaJ. B: Konstruktion eines Plasmids zur Sekretion des Modellproteins am Beispiel von pET20b(+)-rPA.

Um sicherzustellen, daß die gemessenen Effekte durch die Co-Sekretion von Chaperonen tatsächlich chaperon-bedingt sind und nicht auf einen unspezifischen Einfluß der Co-Sekretion eines beliebigen Proteins beruhen, wurde ein weiteres Plasmid konstruiert. Dieses Plasmid vermittelt die Sekretion des Antikörperfragmentes scFv-ox, das gegen das Hapten Oxazolone gerichtet ist (Fiedler & Conrad, 1995). Dazu wurde der kodierende Bereich für die PelB-Signalsequenz (PectatlyaseB aus *Erwinia carotovora*; Lei *et al.*, 1987) und scFv-ox zusammen mit dem Promotor amplifiziert und mit dem lpp-Terminator aus pIN III ompA3 mittels PCR fusioniert (s. 3.2.). Das entstandene Konstrukt wurde in pUBS520 integriert. Die Synthese von scFv-ox und der Chaperone wurde mittels Western Blot-Analysen von bakteriellen Rohextrakten überprüft (Abb. 4-4).

Mit diesem Experiment konnte die Synthese der Chaperone bzw. scFv-ox bei Nutzung der pUBS520-Konstrukte nachgewiesen werden. Die sehr deutlich zu erkennende Bande des endogenen DnaJ-Proteins bei der Analyse der J-Domänen-Expression ist darauf zurückzuführen, daß das Antiserum die J-Domäne wesentlich schlechter als das vollständige DnaJ-Protein erkennt. Der nächste Schritt sollte den Einfluß der Co-Sekretion dieser Proteine auf die Ausbeute ausgewählter Modellproteine untersuchen.

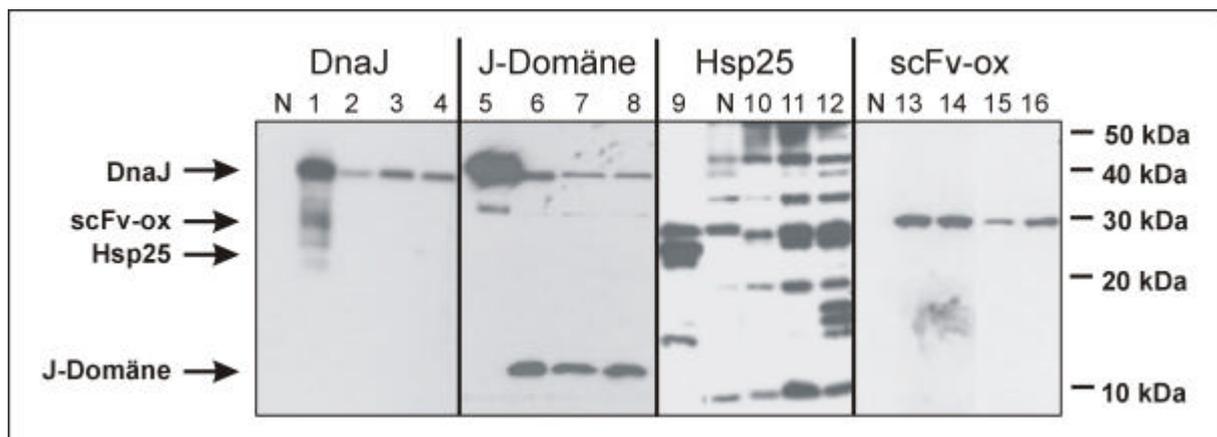


Abb. 4-4. Überexpression molekularer Chaperone. Dargestellt sind Western Blots von bakteriellen Rohextrakten von Zellen, die die oben angezeigten pUBS520-basierten Sekretionskonstrukte trugen. Pro Bahn wurde ein Proteinextrakt von 200 µl Zellsuspension einer optischen Dichte OD_{600} von 1, aufgetragen. „N“ kennzeichnet jeweils die Negativkontrolle eines *E. coli*-Zellextraktes mit unverändertem pUBS520-Plasmid. Spur 1: cytosolisch exprimiertes DnaJ (Positivkontrolle), Spur 2-4: exprimiertes DnaJ (pUBS520-dnaJ) 1, 2 und 4 h nach Induktion, Spur 5: cytosolisch exprimiertes DnaJ (Positivkontrolle), Spur 6-8: exprimierte J-Domäne (pUBS520-J-Domäne) 1, 2, 4 h nach Induktion, Spur 9: Positivkontrolle (teil-gereinigtes Hsp25), Spur 10-12: exprimiertes Hsp25 (pUBS520-hsp25) 1, 2 und 4 h nach Induktion, Spur 13-15: exprimiertes scFv-ox (pUBS520-scFv-ox) 1, 2 und 4 h nach Induktion, Spur 16: Positivkontrolle (scFv-ox).

4.3. Verbesserung der Ausbeute von rPA im Periplasma von *E. coli* durch Medienzusätze und Co-Sekretion von molekularen Chaperonen

4.3.1. Konstruktion des Sekretionsvektors pET20b(+)-rPA und Nachweis der Expression

In den ersten Experimenten zur Sekretion von therapeutischen Humanproteinen sollte eine Variante des gewebspezifischen Plasminogenaktivators, rPA (auch als BM 06.022 bezeichnet; Martin *et al.*, 1991), als Modell verwendet werden. Der gewebspezifische Plasminogenaktivator (tissue-type plasminogen activator – tPA) ist eine Multidomänen-Serinprotease aus der Trypsin-Familie (Patthy, 1985) und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fibrinolyse, die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin, einer Protease, die Fibringerinnsel auflöst (Wiman & Collen, 1978). Humanes tPA hat ein Molekulargewicht von 59 kDa und besteht aus 5 Domänen: einer Finger-, einer Wachstumsfaktor-, einer Protease- und zwei Kringeldomänen (Ny *et al.*, 1984). tPA ist schon als einkettige Zymogenform aktiv. Nach Spaltung der Peptidbindung zwischen Arg₂₇₅ und Ile₂₇₆ durch Plasmin wird tPA in die wesentlich aktivere Zweikettenform (two-chain-tPA) umgewandelt (Pennica *et al.*, 1983). Die Regulation der verschiedenen Plasminogenaktivatoren ist sehr komplex (Irigoyen *et al.*, 1999). So wird z.B. die Aktivität von tPA in Gegenwart von Fibrinogenfragmenten um ein Vielfaches erhöht (Verheijen *et al.*, 1982 b). Diese Stimulierung erfolgt durch spezifische Interaktion der Finger- und der Kringel-2-Domäne mit Fibrin bzw. Fibrinogenfragmenten (van Zonneveld *et al.*, 1986; Verheijen *et al.*, 1986). Aufgrund der immensen Bedeutung dieses Proteins als Therapeutikum zur Behandlung von Infarkten gibt es in der Literatur viele Berichte zur rekombinanten Herstellung in *E. coli*, *Aspergillus nidulans*, Melanoma-Zelllinien und in der Milch transgener Tiere, wie Mäusen oder Ziegen (Hoylaerts *et al.*, 1982; Pennica *et al.*, 1983; Dodd *et al.*, 1986; Gordon *et al.*, 1987; Upshall *et al.*, 1987; Sarmientos *et al.*, 1989; Obukowicz *et al.*, 1990; Denman *et al.*, 1991; Rudolph *et al.*, 1992; Qiu *et al.*, 1998).

Die hier untersuchte tPA-Variante rPA war das erste in Deutschland entwickelte und gentechnisch hergestellte Protein-Therapeutikum. Es wurde von der ehemaligen Firma Boehringer Mannheim als „Retepase“ zur Behandlung von Infarkten auf den Markt gebracht. rPA/Retepase wird rekombinant aus IBs gewonnen und zur nativen Konformation zurückgefaltet (Stern *et al.*, 1993). In dieser Variante fehlen die N-terminalen drei Domänen des vollständigen Enzyms. Es enthält somit nur die zweite Kringel- und die Protease-Domäne, die die enzymatische Aktivität zur Aktivierung von Plasminogen trägt (Abb. 4-5). Solche Varianten werden daher auch K₂P genannt. Das Protein besitzt sowohl die enzymatische Aktivität zur Plasminogenaktivierung als auch die spezifische Stimulierung

durch Fibrin(ogen). rPA trägt in seiner nativen Form neun Disulfidbrücken, ohne deren richtige Verknüpfung keine Aktivität meßbar ist (Obukowicz *et al.*, 1990; Abb. 4-5).

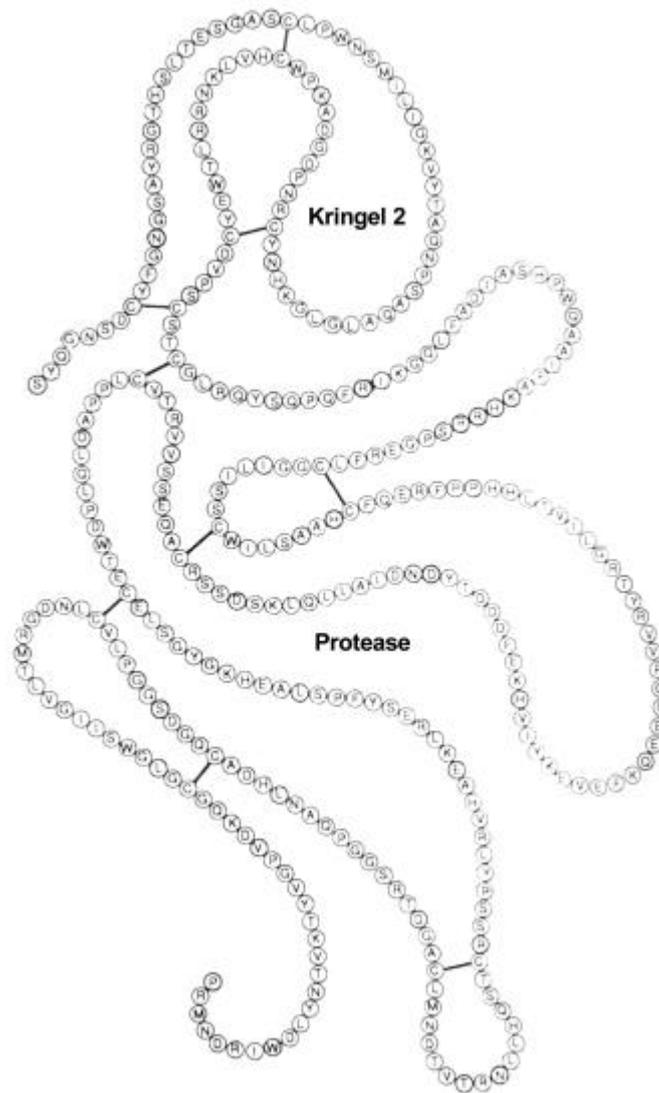


Abb. 45. Schematische Darstellung der Struktur der tPA-Variante K₂P (rPA) auf Basis der Struktur aus Keyt *et al.* (1996). Disulfidbrücken sind als Striche dargestellt.

Zur Expression und Sekretion von rPA wurde der Plasmidvektor pET20b(+) genutzt (s. 3.2. und Abb. 43). pET20b(+) kodiert die pelB-Signalsequenz (Pectatylase B aus *Erwinia carotovora*; Lei *et al.*, 1987), die die Sekretion des nachfolgenden Genprodukts vermittelt. Die Expression der rekombinanten Gene steht unter Kontrolle des T7-Promotors (Studier & Moffatt, 1986). Die Expression von rPA wurde zuerst in Western Blot-Analysen bakterieller Rohextrakte kontrolliert (Abb. 4-6, s. auch 3.1.3. und 3.4.2.).

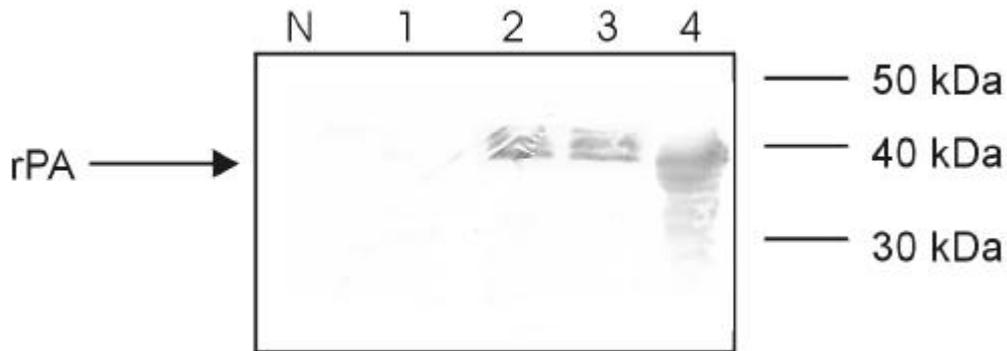


Abb. 46. Western Blot bakterieller Ganzzellextrakte aus Stämmen, die für rPA kodierende Plasmide tragen. Pro Bahn wurde ein Extrakt, entsprechend 200 μ l Zellsuspension einer optischen Dichte OD_{600} von 1 aufgetragen. N: Negativ-Kontrolle (*E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pET20b(+), 2 h induziert; Bahn 1-3: *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pET20b(+) (periplasmatische Expression von rPA) uninduziert, 2 und 4 h nach Induktion; Bahn 4: *E. coli* C600-pUBS520/pA27fd7 (Kohnert *et al.*, (1992); cytosolische Expression von rPA), 4 h induziert.

In Abb. 4-6 ist zu erkennen, daß nur eine sehr schwache Expression von rPA durch das Sekretionskonstrukt pET20b(+)-rPA erreicht wird. Die Tatsache, daß eine Doppelbande detektiert wird, ist ein Hinweis auf eine fehlende Translokation oder eine unvollständige Prozessierung der Signalsequenz (2 kDa) durch die Signalpeptidase lep. Die Proteinbande mit niedrigerem Molekulargewicht wandert auf dem SDS-Gel wie die stärkste Bande in Bahn 4, entsprechend einem Molekulargewicht von rPA von 39 kDa (Abb. 4-6), ein Hinweis für die richtige Prozessierung dieser Bande. In dieser Bahn ist Extrakt des Stammes, der rPA im Cytosol in Einschlußkörpern ablagert (C600-pA27fd7; Kohnert *et al.*, 1992) aufgetragen. Wie aus dem Western Blot ersichtlich ist, werden bei cytosolischer Expression wesentlich größere Mengen des Proteins synthetisiert. Allerdings ist anhand des „Verschmierens“ der im Blot detektierten Bande hin zu niedrigeren Molekulargewichten proteolytischer Abbau zu vermuten.

4.3.2. Einfluß der Kultivierungsbedingungen und niedermolekularer Medienzusätze auf die Expression von rPA

Der Nachweis eines Proteins durch Western Blot-Analysen ermöglicht keine Aussage über die Konformation dieses Proteins. rPA besitzt, wie im vorigen Kapitel beschrieben, enzymatische Aktivität, die als Kriterium zur Bestimmung der Menge aktiven Proteins verwendet werden kann. Deshalb sollte nun die Aktivität von rPA in periplasmatischen Extrakten getestet werden.

Funktionelles rPA wurde in einem gekoppelten enzymatischen Test nach Verheijen *et al.* (1982 a) bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Aktivierung von Plasminogen durch die enzymatische Spaltung durch tPA. Das so entstandene Plasmin umgesetzt wird. Plasmin spaltet in der gekoppelten Reaktion ein chromogenes Substrat und setzt p-Nitroanilin frei. Diese Farbreaktion kann durch Bestimmung der Absorption bei 405 nm verfolgt werden (s. 3.4.1. und Abb. 3-1). Die Auswertung erfolgte mittels quadratischer Auftragung und Vergleich mit einer Standard-Reihe von rPA im Bereich von 1-10 ng/ml. Der Einfluß von periplasmatischen Extrakten auf die Aktivität von gereinigtem rPA wurde bestimmt und bei der Berechnung der Menge an aktivem rPA in den Periplasma-Extrakten berücksichtigt (s. 3.4.1.).

Um zuerst die optimalen Kultivierungsbedingungen zu ermitteln, wurden Bakterien, die pET20b(+)-rPA und pUBS520 trugen, bei verschiedenen Temperaturen in LB-Medium bei 170 rpm kultiviert und vier Stunden nach Induktion geerntet (s. 3.4.3.). Die rPA-Aktivität in den periplasmatischen Fraktionen wurde nach Verheijen *et al.* (1982 a) bestimmt.

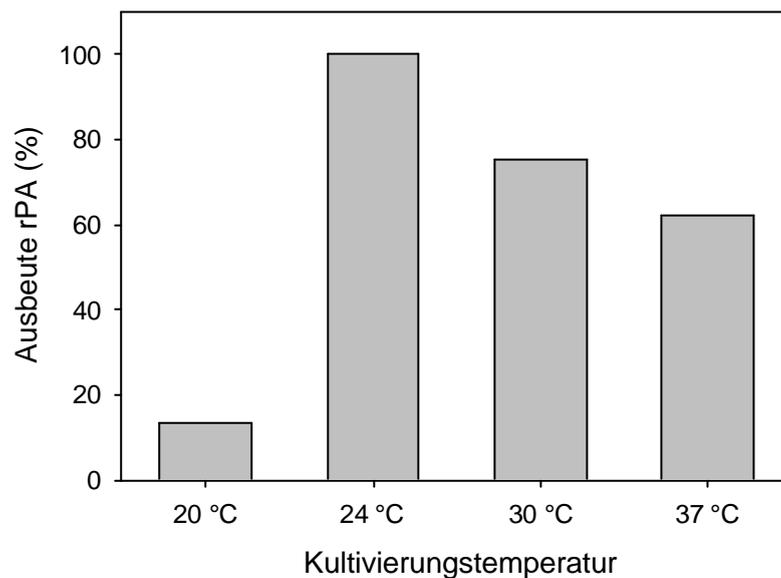


Abb. 4-7. Effekt der Kultivierungstemperatur auf die Ausbeute von rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3). Die Ausbeuten wurden auf die maximale Ausbeute/OD₆₀₀ (100%) normiert.

Für die rPA-Expression wurde eine optimale Kultivierungstemperatur von 24 °C bestimmt (Abb. 4-7). Danach wurde die Induktionszeit variiert. Dabei zeigte sich, daß die Verlängerung der Induktionszeit auf bis zu 20 h zu einer Steigerung der rPA-Ausbeute um 25-50 % führte (Daten nicht gezeigt). Die verlängerte Induktionszeit erwies sich bei Nutzung der im weiteren beschriebenen Medienzusätze aufgrund des durch die Medienzusätze verzögerten Wachstums der Zellen besonders günstig. Bei hohen Konzentrationen von Medienzusätzen

erreichten die Kulturen nach 48 h Induktion beispielsweise nur eine optische Dichte von 1 (Daten nicht gezeigt).

Negativproben einer Kultur eines Stammes mit pET20b(+)- und pUBS520-Vektoren ohne Insert zeigte im Enzymtest eine Aktivität von 0,001 ng/ml, die durch die Zugabe von Fibrinogenfragmenten inhibiert wurde. Diese Werte deuten auf eine geringe Aktivität von *E. coli*-Proteasen hin.

Da die äußere Membran von *E. coli* keine Diffusionsbarriere für niedermolekulare Stoffe darstellt (Decad & Nikaido, 1976), kann das periplasmatische Milieu durch Zusatz solcher Additive zum Kulturmedium beeinflusst werden. Wunderlich & Glockshuber (1993 a) zeigten, daß durch Zugabe von reduziertem Glutathion zum Kulturmedium die Ausbeute an sezerniertem funktionellen α -Amylase/Trypsin-Inhibitor wesentlich verbessert werden kann. Somit sollte im folgenden geklärt werden, ob der Zusatz von 0-10 mM GSH zum Zeitpunkt der Induktion einen Einfluß auf die Ausbeute von nativem rPA besitzt. *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pET20b(+)-rPA und pUBS520, wurden dazu bei 24 °C kultiviert und 20 h nach Induktion geerntet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 4-8 zusammengefaßt.

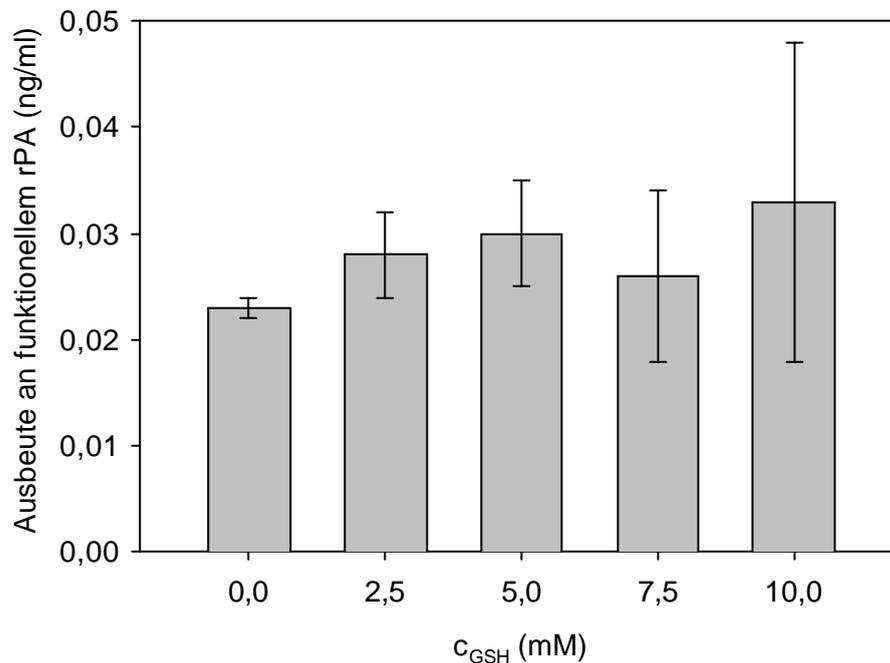


Abb. 48. Einfluß der GSH-Konzentration im Kulturmedium auf die Ausbeute von funktionellem rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3). Natives rPA wurde mittels Aktivitätstest nach Verheijen *et al.* (1982 a) in der löslichen Periplasmafraktion bestimmt und auf Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Die Zugabe von GSH in den getesteten Konzentrationen führte zu keinen signifikanten Unterschieden an funktionellem rPA. Die Ausbeuteverbesserung gegenüber der Kultivierung ohne GSH, die mit $0,023 \pm 0,002$ ng/ml bestimmt wurde, betrug nur $1,42 \pm 0,6$ bei 10 mM GSH. Während der Stimulationfaktor, der durch Zusatz der Fibrinogenfragmente erzielt wurde, ohne Zusatz von GSH und bei Zugabe von 5 mM GSH zum Kulturmedium mit 35 bzw. 30 vollständige native Faltung des sezernierten rPA zeigte, wurde bei 10 mM GSH nur ein Faktor von 15 erhalten. Dies deutet auf eine unvollständige Faltung des Modellproteins bei dieser GSH-Konzentration hin. Damit zeigten diese Ergebnisse keine deutliche Verbesserung der Ausbeute von nativem rPA durch GSH-Zugabe.

Es sollten weitere Stoffe auf ihre Eigenschaft hin getestet werden, die Ausbeute an funktionellem rPA zu verbessern. Aus *in vitro*-Proteinfaltungsversuchen ist eine Reihe aggregationshemmender bzw. faltungsfördernder Verbindungen bekannt (De Bernandez Clark *et al.*, 1999). Als besonders günstig erwies sich dabei oftmals L-Arginin in Konzentrationen von 0,4 - 1 M (Buchner & Rudolph, 1991; Lin & Traugh, 1993; Rudolph *et al.*, 1997). Deshalb wurde in einem weiteren Experiment 0 - 0,4 M L-Arginin zum Induktionszeitpunkt dem Kulturmedium zugesetzt (Abb. 4-9).

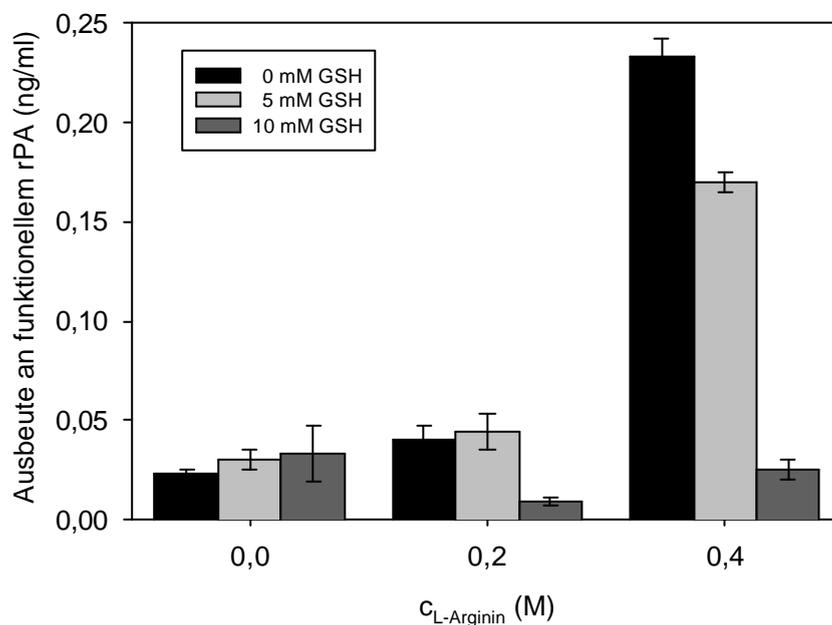


Abb. 49. Einfluß von L-Arginin und GSH im Kulturmedium auf die Ausbeute von funktionellem rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3). Natives rPA wurde mittels Aktivitätstest nach Verheijen *et al.* (1982 a) in der löslichen Periplasmafraktion bestimmt und auf Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Bei Zusatz von 0,4 M L-Arginin in Abwesenheit von GSH wurde eine optimale Ausbeute von 0,233 ng/ml, entsprechend einer Ausbeutesteigerung um das 10-fache, gemessen. Auffällig war besonders der positive Einfluß des Einsatzes von L-Arginin in Konzentrationen über 0,2 M. Bei L-Arginin-Konzentrationen über 0,4 M war das Bakterienwachstum stark inhibiert. Deshalb mußte auf Versuche mit höheren L-Arginin-Konzentrationen verzichtet werden.

4.3.3. Co-Sekretion von rPA und molekularen Chaperonen

Als nächstes sollte der Effekt von co-sezernierten Chaperonen auf die Ausbeute von nativem rPA ermittelt werden (s. 3.4.5.). Dazu wurde das unter 4.2. beschriebene Zwei-Plasmid-System eingesetzt. Dabei wurde in den ersten Versuchen auf einen Zusatz von niedermolekularen Additiven verzichtet (Abb. 4-10).

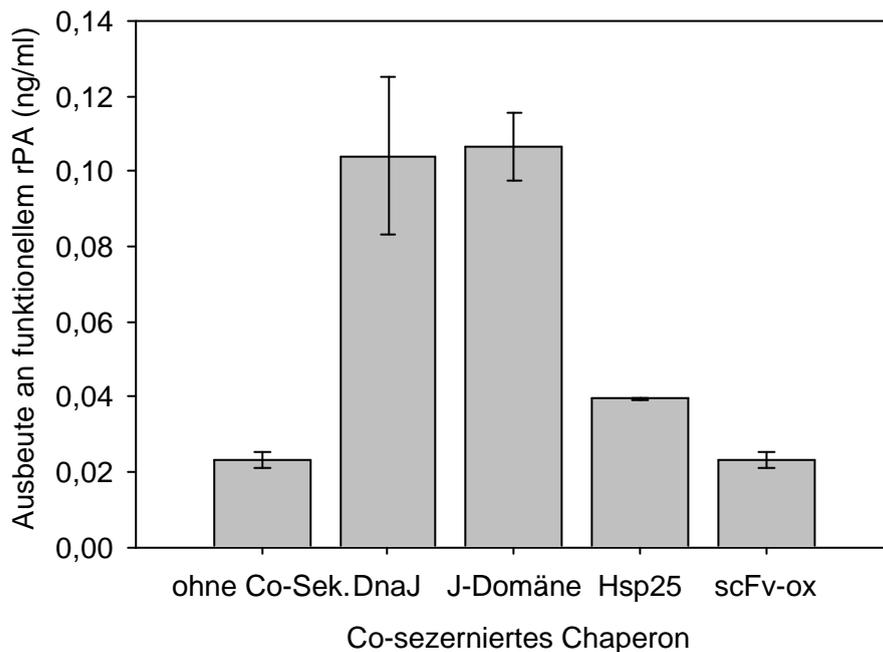


Abb 410. Einfluß der Co-Sekretion verschiedener Chaperonproteine bzw. scFv-ox (Kontrolle) auf die Ausbeute von funktionellem rPA im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3). Die Bestimmung von rPA erfolgte wie oben.

Es zeigte sich, daß besonders co-sezerniertes DnaJ und JDomäne einen positiven Einfluß auf die Ausbeute von rPA haben und zu Ausbeutesteigerungen um das 4,5-fache führen. Dagegen hatte die Co-Sekretion von Hsp25 mit einer 1,7-fachen Steigerung einen

wesentlich geringeren Effekt. Bei Co-Sekretion der Negativ-Kontrolle scFv-ox wurde kein meßbarer Effekt gegenüber einer Kultur mit leerem pUBS520 ohne Insert festgestellt.

In weiteren Versuchen sollte der Effekt von Chaperonproteinen in Anwesenheit der unter 4.1. verwendeten niedermolekularen Additive GSH und L-Arginin untersucht werden. Wiederum wurde reduziertem Glutathion im Bereich von 0-10 mM und L-Arginin im Bereich von 0 - 0,4 M dem Kulturmedium zugesetzt.

Die Co-Überexpression der molekularen Chaperone bzw. von scFv-ox wurde parallel zu den Aktivitätsbestimmungen von rPA in Western Blots analysiert. Dazu wurden Rohextrakte der Kultivierungen in Gegenwart von L-Arginin und GSH präpariert (s. 3.4.4.).

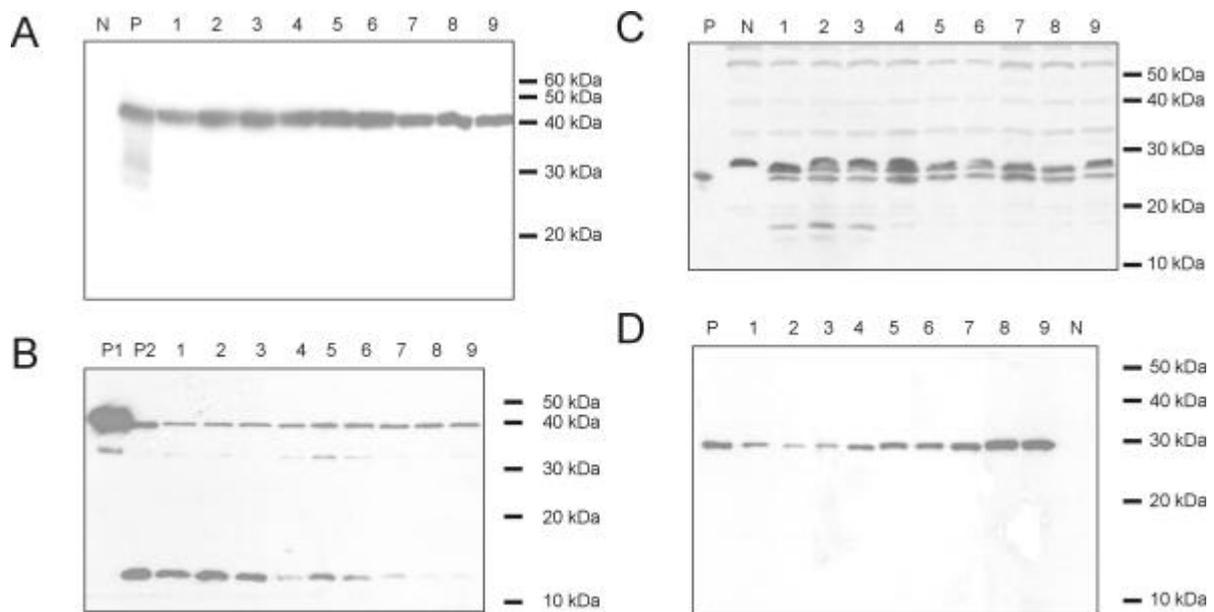


Abb. 411. Western Blot-Analysen bakterieller Rohextrakte aus den Versuchen zur Co-Sekretion von molekularen Chaperonen bzw. scFv-ox und rPA. Pro Bahn wurde das Äquivalent von 200 µl Bakterien einer Kultur von $OD_{600} = 1$ aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit Antiseren gegen die entsprechenden Chaperone bzw. scFv-ox detektiert und mit Hilfe eines sekundären Antikörper-POD-Konjugats und dem ECL-System sichtbar gemacht (s. 3.4.4. und 3.1.3.). Folgende Chaperone wurden dargestellt: A DnaJ; B J-Domäne; C Hsp25; D scFv-ox. P bezeichnet jeweils eine Bahn, in der eine Probe des Chaperons aufgetragen wurde (Positivkontrolle; im Fall von Hsp25 ist es teil-gereinigtes Protein, sonst sind es bakterielle Ganzzellextrakte; im Fall der J-Domäne entspricht P1 dem vollständigen DnaJ und P2 der J-Domäne), N einem Rohextrakt eines Stammes, der kein Chaperon co-sezerniert (Negativkontrolle). In den anderen Bahnen wurden Rohextrakte aus Kultivierungen aufgetragen, bei denen die jeweiligen Chaperone bzw. scFv-ox co-sezerniert und verschiedene Konzentrationen GSH und L-Arginin dem Kulturmedium zugesetzt wurden: 1: 0 mM GSH, 0 M L-Arginin; 2: 5 mM GSH, 0 M L-Arginin; 3: 10 mM GSH, 0 M L-Arginin; 4: 0 mM GSH, 0,2 M L-Arginin; 5: 5 mM GSH, 0,2 M L-Arginin; 6: 10 mM GSH, 0,2 M L-Arginin; 7: 0 mM GSH, 0,4 M L-Arginin; 8: 5 mM GSH, 0,4 M L-Arginin; 9: 10 mM GSH, 0,4 M L-Arginin.

Anhand dieser Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß trotz vergleichbarer Mengen bakterieller Extrakte pro Bahn sehr unterschiedliche Mengen der co-sezernierten molekularen Chaperone in Abhängigkeit des Zusatzes von GSH bzw. L-Arginin vorhanden waren. Im Falle von DnaJ bzw. Hsp25 ist ungefähr die gleiche Menge dieser Chaperone über den gesamten Konzentrationsbereich der Medienzusätze festzustellen (Abb. 4-11, A und C). Dagegen nimmt die Menge der J-Domäne zu höheren L-Arginin- und GSH-Konzentrationen im Kulturmedium stetig ab (Abb. 4-11, B). Ein anderer Verlauf ist bei der Co-Sekretion von scFv-ox zu beobachten. Hier wird mit zunehmender Konzentration von L-Arginin im Medium mehr scFv-ox in den Western Blots detektiert (Abb. 4-11, D). Allerdings lassen diese Experimente keinen exakten Rückschluß auf die Menge an Chaperon-Protein im Periplasma der Zellen zu, da hier ausschließlich Ganzzellextrakte verwendet wurden. Da außer scFv-ox keines dieser Proteine in der löslichen Periplasmafraktion detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), konnte die lösliche Periplasmafraktion nicht verwendet werden, um die Chaperon-Menge in diesem Kompartiment zu vergleichen. Da jedoch keines der Proteine in der unprozessierten Form vorlag (s. Abb 4-4 und Abb. 4-11), kann davon ausgegangen werden, daß sie vorwiegend im Periplasma vorliegen. Bei den Hsp25-Experimenten kann allerdings aufgrund des relativ unspezifischen Antikörpers die Existenz einer unprozessierten Form nicht völlig ausgeschlossen werden.

Durch Zusatz von GSH und L-Arginin bei gleichzeitiger Co-Sekretion von molekularen Chaperonen wurden erhebliche Steigerungen der Ausbeute an funktionellem rPA erreicht (Abb. 4-12 und Tabelle 4-1).

Den größten Einfluß auf die Ausbeute von rPA hatte die Co-Sekretion von DnaJ und der J-Domäne, die ähnliche Werte lieferten. Bei optimalen Kulturbedingungen (5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin) konnte eine Verbesserung der Ausbeute um das 170- (DnaJ) bzw. 190-fache (J-Domäne) gegenüber einer Kultivierung ohne Zusätze und Co-Sekretion erreicht werden. Auch die Co-Sekretion von Hsp25 brachte eine erhebliche Ausbeute-Steigerung um das 120-fache in Anwesenheit von 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin. Die Co-Sekretion von scFv-ox, die als Negativ-Kontrolle diente, erbrachte dagegen nur eine ca. 30-fache Verbesserung der Ausbeute von aktivem rPA.

Tabelle 4-1. Zusammenfassung der Ausbeuten von funktionellem rPA bei verschiedenen Konzentrationen GSH und L-Arginin im Kulturmedium bzw. bei Co-Sekretion verschiedener molekularer Chaperone und scFv. Natives rPA wurde mittels Aktivitätstest nach Verheijen *et al.* (1982 a) in der löslichen Periplasmafraktion bestimmt und auf Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Co-sezerniertes Chaperon	C _{GSH} (mM)	C _{L-Arg} (M)	Ausbeute rPA (ng/ml)	Verbesserungs- faktor gegenüber der Ausbeute ohne Zusätze und Co- Sekretion	Stimula- tions- faktor	OD ₆₀₀ bei Zell- ernte
kein Chaperon (pUBS520)	0	0	0,023 ± 0,002	1,0 ± 0,1	35	5,28
	5	0	0,030 ± 0,005	1,3 ± 0,2	29	4,85
	10	0	0,033 ± 0,014	1,44 ± 0,6	15	4,52
	0	0,2	0,040 ± 0,007	1,72 ± 0,3	25	5,37
	5	0,2	0,044 ± 0,009	1,91 ± 0,4	20	5,05
	10	0,2	0,009 ± 0,002	0,40 ± 0,1	3	4,71
	0	0,4	0,233 ± 0,009	10,05 ± 0,4	26	3,07
	5	0,4	0,170 ± 0,005	7,34 ± 0,2	23	3,47
	10	0,4	0,025 ± 0,005	1,10 ± 0,2	15	3,51
DnaJ	0	0	0,104 ± 0,021	4,5 ± 0,9	35	4,41
	5	0	0,197 ± 0,021	8,5 ± 0,9	29	4,31
	10	0	0,171 ± 0,039	7,4 ± 1,7	25	3,71
	0	0,2	0,215 ± 0,081	9,3 ± 3,5	29	5,47
	5	0,2	0,729 ± 0,150	31,5 ± 6,5	27	5,05
	10	0,2	0,400 ± 0,111	17,3 ± 4,8	28	4,67
	0	0,4	1,127 ± 0,301	48,7 ± 13,0	27	2,81
	5	0,4	3,977 ± 1,000	171,8 ± 43,2	18	1,85
	10	0,4	2,361 ± 0,801	102,0 ± 34,6	19	2,12
J-Domäne	0	0	0,106 ± 0,009	4,6 ± 0,4	17	4,28
	5	0	0,340 ± 0,007	14,7 ± 0,3	16	3,49
	10	0	0,313 ± 0,007	13,5 ± 0,3	16	3,08
	0	0,2	0,336 ± 0,044	14,5 ± 1,9	13	4,09
	5	0,2	0,625 ± 0,213	27,0 ± 9,2	17	3,14
	10	0,2	0,493 ± 0,150	21,3 ± 6,5	11	3,04
	0	0,4	1,442 ± 0,079	62,3 ± 3,4	12	1,06
	5	0,4	4,399 ± 0,164	190,0 ± 7,1	15	0,96
	10	0,4	1,898 ± 0,831	82,0 ± 35,9	17	1,12

Tabelle 4-1. Zusammenfassung der Ausbeuten von funktionellem rPA bei verschiedenen Konzentrationen GSH und L-Arginin im Kulturmedium bzw. bei Co-Sekretion verschiedener molekularer Chaperone und scFv. (Fortsetzung)

Co-sezerniertes Chaperon	C _{GSH} (mM)	C _{L-Arg} (M)	Ausbeute rPA (ng/ml)	Verbesserungs- faktor gegenüber der Ausbeute ohne Zusätze und Co- Sekretion	Stimula- tions- faktor	OD ₆₀₀ bei Zell- ernte
Hsp25	0	0	0,039 ± 0,000	1,7 ± 0,0	23	5,50
	5	0	0,053 ± 0,002	2,3 ± 0,1	27	4,81
	10	0	0,063 ± 0,002	2,7 ± 0,1	21	4,15
	0	0,2	0,118 ± 0,000	5,1 ± 0,0	11	5,19
	5	0,2	0,141 ± 0,002	6,1 ± 0,1	17	4,56
	10	0,2	0,111 ± 0,000	4,8 ± 0,0	13	4,39
	0	0,4	1,366 ± 0,245	59,0 ± 10,6	18	1,47
	5	0,4	2,850 ± 0,213	123,1 ± 9,2	17	1,44
	10	0,4	1,725 ± 0,093	74,5 ± 4,0	18	1,89
scFv-ox	0	0	0,023 ± 0,002	1,0 ± 0,1	8	4,97
	5	0	0,042 ± 0,002	1,8 ± 0,1	13	4,23
	10	0	0,079 ± 0,016	3,4 ± 0,7	10	4,13
	0	0,2	0,056 ± 0,014	2,4 ± 0,6	9	5,17
	5	0,2	0,144 ± 0,049	6,2 ± 2,1	8	3,76
	10	0,2	0,183 ± 0,044	7,9 ± 1,9	5	3,11
	0	0,4	0,396 ± 0,058	17,1 ± 2,5	12	1,98
	5	0,4	0,713 ± 0,113	30,8 ± 4,9	10	1,21
	10	0,4	0,523 ± 0,148	22,6 ± 6,4	8	1,47

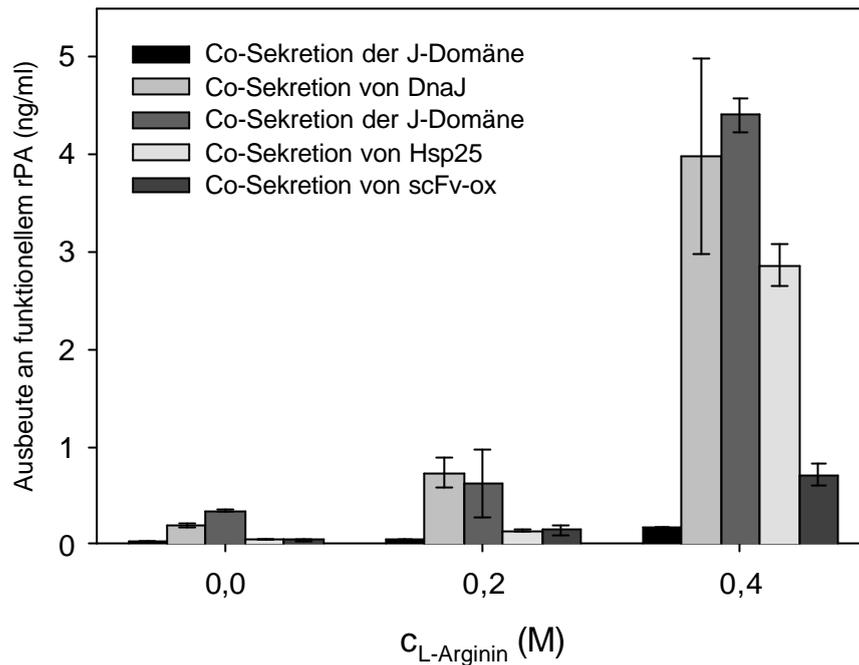


Abb. 4-12. Einfluß der Co-Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen auf die Ausbeute von funktionellem rPA bei Zusatz von 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium. Die Bestimmung von rPA erfolgte wie oben. Als „Kontrolle“ wurde ein *E. coli*-Stamm bezeichnet, der rPA ohne co-sezernierte Chaperone produziert.

Aus der Tabelle 4-1 gehen außerdem die ermittelten Stimulationsfaktoren (Kohnert *et al.*, 1992) hervor. Eine Stimulation der rPA-Aktivität durch Fibrinogenfragmente um das 25-35-fache ist für das native Enzym bekannt (Kohnert *et al.*, 1992; Stern *et al.*, 1993). Auch in dieser Arbeit wurden vergleichbare Stimulationsfaktoren ermittelt, wenn keine Additive dem Kulturmedium zugesetzt und keine Co-Sekretion stattfand. Bei Co-Sekretion von DnaJ ohne Medienadditive wurde eine Stimulation um das 35-fache erreicht. Mit steigender Konzentration von L-Arginin und GSH sank der Stimulationsfaktor ab. Sehr niedrige Stimulationen wurden bei Co-Sekretion von Hsp25 und der J-Domäne gemessen, die niedrigsten jedoch bei Co-Sekretion von scFv-ox. Weiterhin ist ein deutlicher Einfluß der Medienzusätze GSH und L-Arginin auf die erreichte Zelldichte bei der Kultivierung festzustellen (s. Tab. 4-1). Besonders bei den Co-Sekretions-Experimenten sank die OD_{600} auf Werte bis 1 ab, während ohne Medienzusätze eine OD_{600} von etwa 5 bestimmt wurde. Da die Zelldichte direkt in die Berechnungen der Ausbeute an aktivem rPA eingeht (s. 3.4.1.), relativieren sich die Ausbeuteverbesserungen zum Teil, sind jedoch auch dann beträchtlich. So kann bei optimalen Bedingungen unter Co-Sekretion von DnaJ eine Verbesserung um das 60-fache, bei Hsp25 und der J-Domäne um das 35-fache festgestellt werden (Tab. 4-2).

Tab. 42. Ausbeuten von funktionellem rPA, bei 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin im Kulturmedium bzw. bei Co-Sekretion verschiedener molekularer Chaperone und scFv-ox. Die angegebenen Verbesserungsfaktoren wurden auf die Kultivierung ohne Co-Sekretion von Chaperonen und ohne Medienzusätze ($0,121 \pm 0,011$ ng/ml) bezogen.

Co-sezerniertes Chaperon	L-Arginin bei der Kultivierung (M)	Ausbeute rPA (ng/ml Kultur)	Verbesserungsfaktor
kein Chaperon	0	$0,146 \pm 0,024$	$1,21 \pm 0,20$
	0,2	$0,222 \pm 0,045$	$1,83 \pm 0,37$
	0,4	$0,590 \pm 0,017$	$4,88 \pm 0,14$
DnaJ	0	$0,849 \pm 0,091$	$7,02 \pm 0,75$
	0,2	$3,681 \pm 0,758$	$30,42 \pm 6,26$
	0,4	$7,357 \pm 1,850$	$60,80 \pm 15,29$
J-Domäne	0	$1,187 \pm 0,024$	$9,81 \pm 0,20$
	0,2	$1,963 \pm 0,669$	$16,22 \pm 0,55$
	0,4	$4,223 \pm 0,157$	$34,90 \pm 1,30$
Hsp25	0	$0,255 \pm 0,010$	$2,11 \pm 0,08$
	0,2	$0,643 \pm 0,010$	$5,31 \pm 0,08$
	0,4	$4,104 \pm 0,307$	$34,21 \pm 2,54$
scFv-ox	0	$0,178 \pm 0,008$	$1,47 \pm 0,07$
	0,2	$0,541 \pm 0,184$	$4,47 \pm 1,52$
	0,4	$0,863 \pm 0,137$	$7,13 \pm 1,13$

Um einen Effekt der erhöhten Chlorid-Konzentration im Kulturmedium auf das Zellwachstum durch die Verwendung von L-Arginin*HCl zu bestimmen, wurde L-Arginin, das anstelle von HCl mit H_2SO_4 bzw. H_3PO_4 auf pH 6 eingestellt wurde, verwendet (Tab. 4-3).

Tabelle 4-3. Einfluß verschiedener titrierter L-Arginin-Basen als Medienzusätze auf die Expression von nativem rPA bei Co-Sekretion von DnaJ im Periplasma von *E. coli*. Die Expression mit 0,4 M L-Arg*HCl und 5 mM GSH wurde als Referenzwert mit 100% angesetzt.

Arginin-Base	c _{L-Arginin} (M)	c _{GSH} (mM)	Expression von rPA (bezogen auf 1ml OD ₆₀₀ =1) (%)	Stimula- tions- faktor	OD ₆₀₀ bei Zellernte	Expression von rPA (bezogen auf 1ml Zellkultur) (%)
L-Arginin*HCl	0,4	0	27,7	27	2,81	42,1
L-Arginin*HCl	0,4	5	100,0	18	1,85	100,0
L-Arginin*H ₂ SO ₄	0,4	0	23,7	26	3,12	40,0
L-Arginin*H ₂ SO ₄	0,4	5	55,1	20	3,12	93,0
L-Arginin*H ₃ PO ₄	0,4	0	31,9	27	2,25	38,8
L-Arginin*H ₃ PO ₄	0,4	5	82,3	17	2,03	90,3

Im Falle von L-Arginin*H₂SO₄ wurden zwar höhere Zelldichten, jedoch auch niedrigere rPA-Ausbeuten im Periplasma beobachtet. Bezogen auf 1 ml Zellkultur ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den rPA-Ausbeuten bei Verwendung der oben getesteten L-Argininsalzen.

4.3.4. Einfluß von weiteren Medienzusätzen auf die native Ausbeute von rPA im Periplasma

Eine eingehende Untersuchung verschiedener niedermolekularer Reagenzien als Zusätze bei der *in vitro*-Rückfaltung von denaturiertem tPA zeigte, daß eine Reihe von Harnstoffderivaten und Amiden einen positiven Einfluß auf die Ausbeute an funktionellem Plasminogenaktivator haben (Rudolph *et al.*, 1997). Einige dieser Stoffe sollten auch im Rahmen dieser Arbeit als Medienzusätze bei der Kultivierung von *E. coli* verwendet werden, wobei ihr eventueller Einfluß auf die Ausbeute an nativem rPA im Vordergrund der Betrachtung stand. Dabei wurde der Stamm BL21(DE3)-pET20b(+)/pUBS520-dnaJ verwendet, mit dem in den o.g. Untersuchungen sehr hohe Ausbeuten an funktionellem rPA erreicht worden waren. Zuerst wurde untersucht, ob die Zellen Methylharnstoff, Ethylharnstoff, Acetamid, Formamid und Methylformamid in Konzentrationen von 0,3-1 M im Kulturmedium tolerieren können. Es zeigte sich dabei, daß bis zu 1 M Formamid und Acetamid, jedoch nur bis zu 0,6 M Methylharnstoff, Ethylharnstoff oder Methylformamid ein Wachstum der *E. coli*-Zellen über OD₆₀₀ = 1,5 zulassen (Daten nicht gezeigt). Im folgenden Experiment wurden diese Zusätze und L-Arginin als Vergleich zusammen mit 5 mM GSH im

Kulturmedium verwendet und die Ausbeute an funktionellem rPA in der löslichen Periplasmafraktion untersucht. Die Ergebnisse wurden in Abb. 4-13 und Tabelle 4-4 zusammengefaßt.

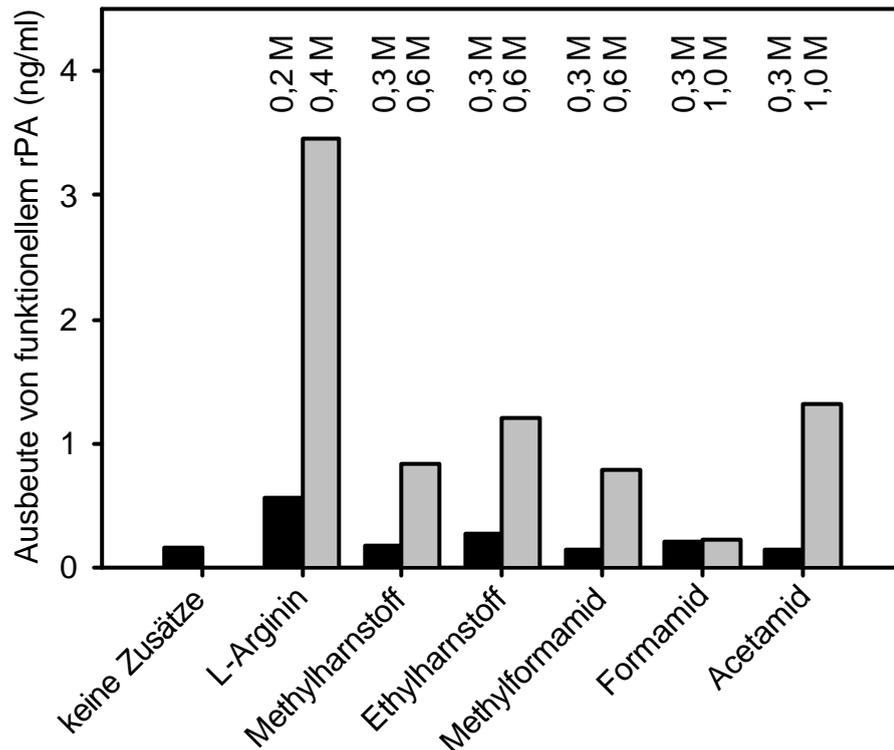


Abb. 4-13. Einfluß verschiedener Medienzusätze in den angegebenen Konzentrationen auf die Ausbeute von funktionellem rPA im Periplasma von *E. coli* bei Co-Sekretion von DnaJ und 5 mM GSH im Kulturmedium. Die jeweiligen Konzentrationen der Zusätze im Medium sind angegeben. Die Bestimmung von rPA erfolgte wie oben.

Es zeigte sich, daß außer Formamid, das keinen signifikanten Einfluß auf die rPA-Ausbeute hatte, auch Methylharnstoff, Ethylharnstoff, Acetamid und Methylformamid die Ausbeute an nativem rPA gegenüber der Kontrolle um das 5- bis 9-fache steigerten, wenn sie in Konzentrationen von 0,6-1 M eingesetzt wurden. Allerdings ist L-Arginin für die Faltung von rPA der bei weitem effektivste Medienzusatz. Die native Faltung, die mit Hilfe des Stimulationsfaktors bestimmt werden kann, wird dabei kaum durch die individuellen Zusätze beeinflusst, sinkt aber, wie schon bei Zusatz von L-Arginin (s. 4.3.2.) festgestellt wurde, mit steigender Konzentration der eingesetzten Reagenzien (Tab. 4-4).

Tabelle 4-4. Ausbeute von funktionellem rPA bei der Co-Sekretion mit DnaJ und Verwendung verschiedener Medienzusätze. Bei allen Kultivierungen wurden 5 mM GSH dem Medium zugesetzt. Die Ausbeuten wurden auf Kulturen einer einheitlichen OD normiert.

Medienzusatz	Konzentration (M)	Ausbeute rPA (ng/ml)	Stimulationsfaktor	OD ₆₀₀ bei Zell-ernte
kein Zusatz	-	0,153	25	4,52
L-Arginin	0,2	0,560	21	4,24
	0,4	3,450	17	2,01
Methylharnstoff	0,3	0,168	24	4,67
	0,6	0,830	22	4,59
Ethylharnstoff	0,3	0,266	24	5,01
	0,6	1,209	15	4,83
Methylformamid	0,3	0,141	15	4,21
	0,6	0,790	17	1,52
Formamid	0,3	0,208	15	4,96
	1	0,219	17	4,71
Acetamid	0,3	0,150	17	4,25
	1	1,321	20	4,29

4.4. Verbesserung der Ausbeute von scFv-TSH durch Medienzusätze und Co-Sekretion von molekularen Chaperonen

4.4.1. Sekretion von scFv-TSH und Zusatz von GSH und L-Arginin zum Kulturmedium

Als weiteres Modellprotein für die Faltung im Periplasma wurde ein bei der Firma Roche Diagnostics entwickeltes Einzelketten-Antikörperfragment getestet, das auf der Basis eines chimären Antikörpers (Kaluzs & Lenz, 1997) entwickelt wurde und gegen das Hormon Thyreotropin (TSH) gerichtet ist (scFv-TSH).

Antikörper haben eine große Bedeutung für die medizinische Diagnostik und Therapie. Seit Einführung der Hybridoma-Technik (Köhler & Milstein, 1975) ist es möglich, Antikörper beliebiger Spezifität in großen Mengen herzustellen. Seit Jahrzehnten werden mittels gentechnischer Methoden verschiedenste Antikörper-Varianten produziert, die spezifisch an die unterschiedlichen Erfordernisse in der medizinischen Praxis angepaßt sind („Antibody

engineering“; Hudson, 1998; Dall’Acqua & Carter, 1998). Die Reduktion des Antikörpermoleküls auf die antigenbindenden Bereiche der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) führte zur Entwicklung der sogenannten „single-chain Fv“ (Einzelketten-Antikörperfragmente, scFv; s. Abb. 4-14), bei denen beide Ketten durch ein flexibles Verbindungssegment von ca. 15 Aminosäureresten verbunden sind (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). scFvs besitzen oft die volle Antigenerkennung wie komplette Antikörpermoleküle (Bhat *et al.*, 1990), sind jedoch wesentlich kürzer und lassen sich leicht in *E. coli* produzieren. Einzelketten-Antikörperfragmente zeigen aufgrund ihrer geringen Größe eine gute Tumorpenetration (Yokota *et al.*, 1992) und eröffnen damit neue Möglichkeiten zur Krebsdiagnostik bzw. -therapie. So befinden sich scFvs, die mit Immunotoxinen gekoppelt wurden, bereits in klinischen Tests als mögliche Krebstherapeutika (Berkower, 1996; Reiter *et al.*, 1996).

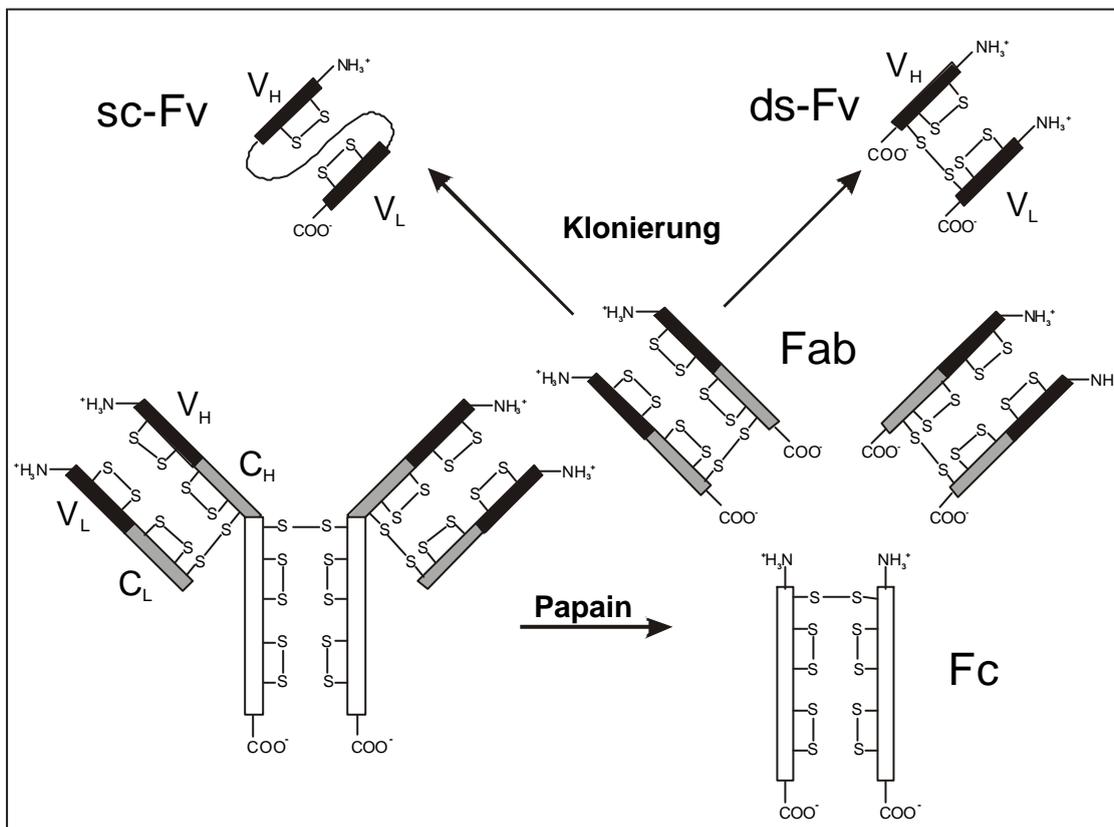


Abb. 4-14. Schematische Darstellung der Derivate (oben) von vollständigen Antikörpermolekülen (unten rechts). Mittels Spaltung durch Papain kann der Fc-Teil eines Antikörpers von den antigenbindenden Fab-Fragmenten getrennt werden. Diese Fab-Moleküle bestehen aus den konstanten Domänen der schweren und leichten Kette (C_H bzw. C_L), die nicht an der Antigenerkennung beteiligt sind, und den variablen Domänen dieser Ketten (V_H und V_L). Da nur letztere das Epitop erkennen, konnten noch kleinere Antikörpervarianten hergestellt werden, die nur aus den über einen Peptidlinker (scFv) oder einer künstlich eingeführten Disulfidbrücke (ds-Fv) verbundenen variablen Domänen bestehen.

Die kodierende DNA für scFv-TSH wurde in Plasmidvektor pCANTAB-5 inseriert und von Dr. Alfred Engel (Roche Diagnostics) zur Verfügung gestellt. Funktionelles scFv-TSH wurde in einem Enzymimmun-Test (ELISA) anhand der spezifischen Bindung an das Antigen Thyreotropin nachgewiesen (s. 3.5.2.).

Um einen Proteinstandard für die späteren ELISA-Tests zu erhalten, wurde zunächst scFv mit Hilfe des RPAS-Reinigungsmoduls, welches eine Affinitätschromatografie mit Anti-E-Tag-Material darstellt, aus dem Kulturmedienüberstand gereinigt. Die Ausbeute war sehr gering und konnte nur mittels Western Blotting detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte für die folgenden Experimente eine Standard-Aktivität im ELISA definiert werden, die hier als „Einheit“ bezeichnet wurde. Eine „Einheit“ scFv-TSH hat dieselbe Bindungskapazität wie 1 µl der o.g. Referenzpräparation. Um den Einfluß des Periplasma-Extraktionspuffers und des LB-Mediums auf den ELISA-Test zu berücksichtigen, wurde gereinigtes scFv-TSH in Extraktionspuffer und LB verdünnt und das erhaltene Signal im ELISA mit einer scFv-Probe in PBS-Puffer verglichen. Dabei wurden Faktoren von 1,96 (Polymyxinsulfatpuffer) und 1,73 (LB-Medium) ermittelt, die in die Berechnung der Mengen an sezerniertem scFv-TSH bei den folgenden Expressionstests einbezogen wurden.

Die Expression von scFv-TSH wurde in Western Blots von Ganzzellextrakten getestet (Abb. 4-15). Dabei wurde festgestellt, daß das Expressionsprodukt unvollständig prozessiert wurde: Ein Teil des vom Antikörper erkannten Proteins hat ein um etwa 2 kDa größeres Molekulargewicht. Dies deutet auf eine unvollständige Translokation von scFv-TSH hin, da die PelB-Signalsequenz ein Molekulargewicht von ca. 2 kDa besitzt.

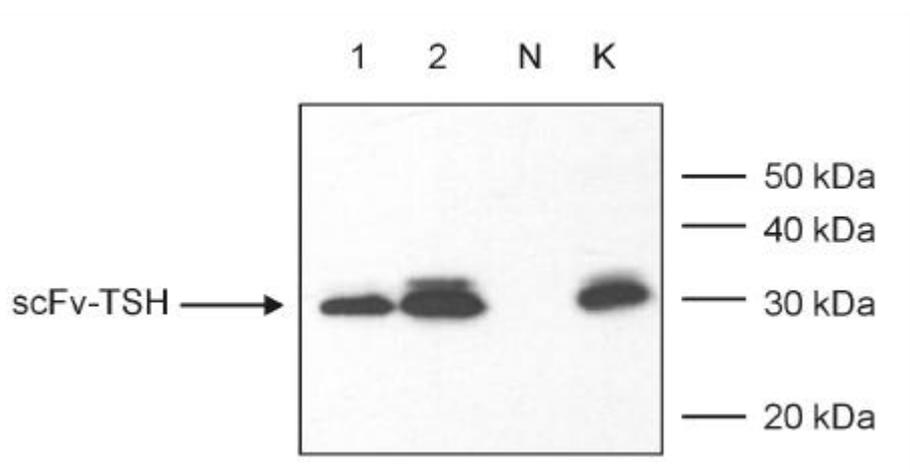


Abb. 4-15. Nachweis der Expression von scFv-TSH im Western Blot. In Bahn 1 und 2 wurden Ganzzellextrakte von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pCANTAB-TSH 4 h (1) bzw. 20 h (2) nach Induktion aufgetragen. N kennzeichnet die Negativkontrolle eines Ganzzellextraktes von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pET20b(+) und K die Positivkontrolle eines Ammoniumsulfat-präzipitierten Kulturüberstandes vor der weiteren Reinigung mit RPAS-System (s. 3.5.1.).

In den darauffolgenden Versuchen wurde wiederum GSH und L-Arginin in den oben beschriebenen Konzentrationen (0-10 mM GSH bzw. 0-0,4 M L-Arginin) dem Kulturmedium zugesetzt und die Ausbeute an nativem scFv-TSH im ELISA bestimmt (s. 3.5.3.). Auch hier konnte gezeigt werden, daß der Zusatz von L-Arginin einen positiven Einfluß auf die Ausbeute von funktionellem Antikörperfragment hatte (Abb. 4-16; Tabelle 4-5).

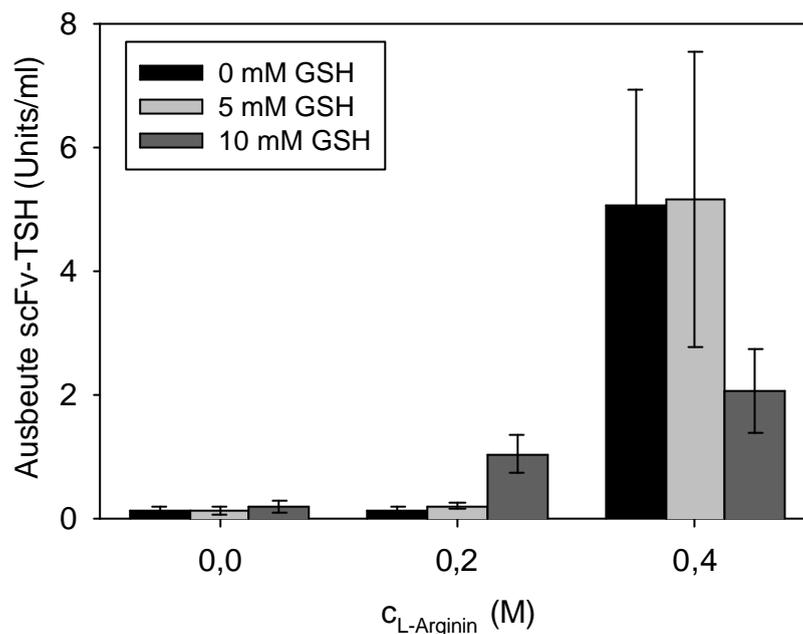


Abb. 4-16. Einfluß von L-Arginin und GSH im Kulturmedium auf die Ausbeute von scFv-TSH im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pCANTAB-TSH. Die Bestimmung von scFv-TSH erfolgte mittels ELISA. Die erhaltenen Werte wurden auf einen scFv-TSH-Standard (1 U) normiert und Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Durch Zusatz von L-Arginin zum Kulturmedium wurde, wie schon bei der Sekretion von rPA zu beobachten war, die Ausbeute von funktionellem scFv erheblich gesteigert. Unter optimalen Kulturbedingungen (5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin) entsprach das einer Verbesserung der Ausbeute um den Faktor 44 gegenüber dem Ausgangswert ohne Medienzusätze. Der Zusatz von GSH allein ergab keine signifikante Erhöhung der scFv-TSH-Ausbeute. Wenn man jedoch die mit zunehmender Konzentration an L-Arginin sinkenden Zelldichten in die Betrachtung der Ausbeuten einbezieht (s. Tab. 4-5), so wird deutlich, daß die Verbesserung der Ausbeute von scFv-TSH, bezogen auf das Kulturvolumen, geringer ausfällt, nämlich ca. 18-fach (5 mM GSH, 0,4 M L-Arginin) gegenüber einer Kultivierung ohne Medienzusätze.

Da Antikörperfragmente, die mittels pCANTAB sezerniert werden, laut Angaben des Herstellers teilweise auch in das Kulturmedium sezerniert werden, wurde auch der Medienüberstand auf den Gehalt an funktionellem scFv-TSH untersucht (Abb. 4-17; Tabelle 4-5).

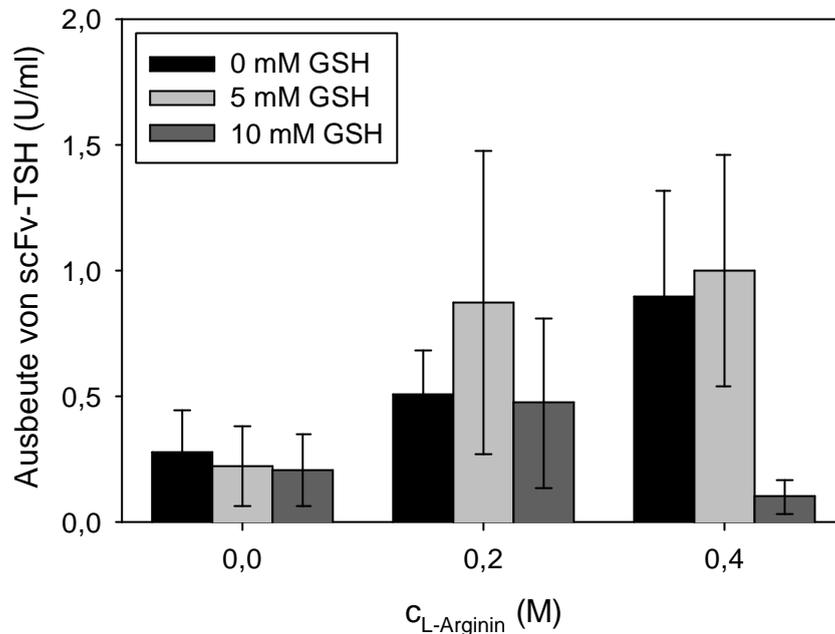


Abb. 4-17. Einfluß von L-Arginin und GSH im Kulturmedium auf die Ausbeute von scFv-TSH im Medienüberstand von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pCANTAB-TSH. Die Bestimmung von scFv-TSH erfolgte mittels ELISA. Die erhaltenen Werte wurden auf einen scFv-TSH-Standard (1 U) normiert und auf Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Die Ausbeuten im Medienüberstand wurden auf das Kulturvolumen bezogen, womit die Zelldichten nicht in die Betrachtung eingehen. Hier ist ein ähnlicher Trend wie bei der Messung der Ausbeute von scFv-TSH in der löslichen Periplasmafraktion zu beobachten. Eine optimale Ausbeute des Antikörperfragments wurde bei Anwesenheit von 0,4 M L-Arginin und 5 mM GSH im Medium erreicht. Die Steigerung der Ausbeute durch den Zusatz von L-Arginin war wiederum wesentlich größer als nach Zusatz von GSH allein. Insgesamt wurde eine Ausbeuteverbesserung um den Faktor 4 gegenüber einer Kultivierung ohne Medienzusätze erzielt.

Tabelle 45. Zusammenfassung der Ergebnisse der Expressionstests von scFv-TSH im Periplasma und im Medienüberstand von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520/pCANTAB-TSH.

Medienzusätze		Ausbeute scFv-TSH im Periplasma (U/mg)	Ausbeute scFv-TSH im Kulturmedium (U/ml)	OD ₆₀₀ bei Zellernte
C _{GSH} (mM)	C _{L-Arginin} (M)			
0	0	0,118 ± 0,087	0,281 ± 0,164	4,73
5	0	0,137 ± 0,063	0,226 ± 0,157	4,52
10	0	0,194 ± 0,108	0,211 ± 0,141	4,51
0	0,2	0,131 ± 0,760	0,509 ± 0,178	4,54
5	0,2	0,201 ± 0,041	0,875 ± 0,605	4,43
10	0,2	1,048 ± 0,302	0,477 ± 0,338	4,17
0	0,4	5,056 ± 1,871	0,897 ± 0,422	1,43
5	0,4	5,153 ± 2,377	1,003 ± 0,463	1,90
10	0,4	2,064 ± 0,669	0,103 ± 0,067	1,58

4.4.2. Einfluß von molekularen Chaperonen auf die Faltung von scFv-TSH im Periplasma von *E. coli*

Weitere Experimente sollten den Einfluß einer Co-Sekretion von molekularen Chaperonen auf die Ausbeute an funktionellem scFv-TSH untersuchen. Das Plasmid pCANTAB-TSH wurde hierzu in BL21(DE3) mit den pUBS520-Konstrukten co-transformiert und die Ausbeute an funktionellem scFv-TSH im Periplasma mittels ELISA bestimmt (s. 3.5.4.). Die Ergebnisse wurden in den Abb. 4-18 und 4-19 zusammengefaßt.

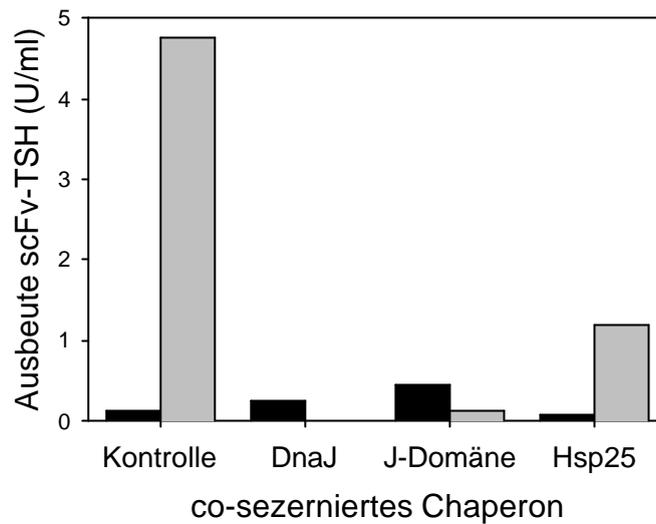


Abb. 418. Einfluß der Co-Sekretion von molekularen Chaperonen auf die Ausbeute von funktionellem scFv-TSH im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3) in Abwesenheit von Medienzusätzen (schwarze Balken) bzw. bei Zusatz von 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium (graue Balken). Als Kontrolle diente ein Stamm, in welchem keine Co-Sekretion von Chaperonen stattfand. scFv-TSH wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ausbeutebestimmung erfolgte wie oben.

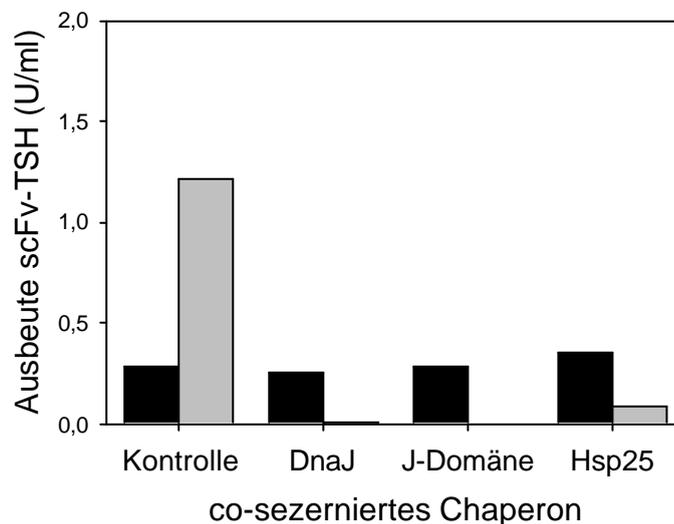


Abb. 419. Einfluß der Co-Sekretion von molekularen Chaperonen auf die Ausbeute von funktionellem scFv-TSH im Medium in Abwesenheit von Medienzusätzen (schwarze Balken) bzw. bei Zusatz von 5 mM GSH und 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium (graue Balken). Kontrollen und Ausbeuteberechnungen wurden wie bei Abb. 4-18 durchgeführt.

Die Co-Sekretion von molekularen Chaperonen erwies sich in diesen Experimenten als ungeeignet, um die Ausbeute von scFv-TSH im Periplasma oder dem Kulturmedium zu verbessern. Die geringen Steigerungen der Ausbeute bei Co-Sekretion von DnaJ und der J-Domäne in Abwesenheit von Medienzusätzen lagen im Bereich des Meßfehlers der ELISA-Bestimmungen. Bei Zusatz optimaler Mengen an GSH und L-Arginin (s. oben) dagegen zeigte sich deutlich, daß die co-sezernierten Chaperone eine signifikante Senkung der Ausbeute von funktionellem scFv-TSH zur Folge hatten.

4.5. Verbesserung der Ausbeute von Proinsulin durch Co-Sekretion von molekularen Chaperonen

Eines der am frühesten entdeckten Peptidhormone ist Insulin (Banting & Best, 1922). Dieses sehr gut untersuchte Molekül spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Stoffwechsels in Säugetieren. Es wird heute vor allem zur Behandlung von Insulinmangel-Diabetes mellitus eingesetzt. Insulin besteht aus zwei Polypeptidketten (A und B), die über Disulfidbrücken verknüpft sind. In den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas wird dieses Hormon in einer Pro-Form, dem Proinsulin, synthetisiert. Proinsulin, das 1967 von Steiner *et al.* entdeckt wurde, enthält zusätzlich die C-Kette, die die beiden anderen Polypeptidketten verbindet (Abb. 4-20). Die *in vitro*-Umwandlung von Proinsulin in das reife Hormon Insulin ist ebenfalls schon seit vielen Jahren erforscht (Kemmler *et al.*, 1971). Es wird angenommen, daß die C-Kette die Assoziation von A- und B-Kette erleichtert und damit die Faltung von Proinsulin unterstützt. Insulin war eines der ersten am Markt eingeführten, rekombinant hergestellten Therapeutika (Bienz-Tadmor, 1993).

Aufgrund dessen, daß Proinsulin bzw. Insulin sehr gut charakterisiert sind, gibt es auch viele Versuche zur heterologen Expression dieser Moleküle im Periplasma von *E. coli* in der nativen Form (z.B.: Talmadge *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 1981; Stahl & Christiansen, 1988; Kang & Yoon, 1994).

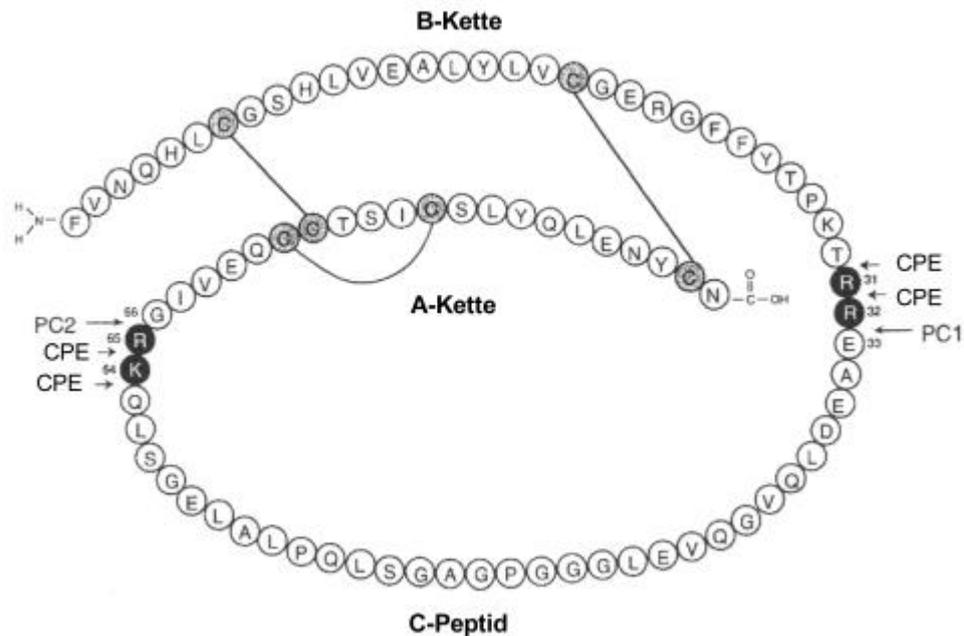


Abb. 4-20. Schematische Darstellung des Proinsulin-Moleküls (nach Mackin, 1998). Die grau dargestellten Cysteine sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Die Abspaltung des C-Peptids wird durch zwei Proteasen vom Furin/PC-Typ katalysiert (PC1 und PC2; Bennett *et al.*, 1992; Bailyes *et al.*, 1992). Die endständigen basischen Aminosäuren der A- und B-Kette (schwarz dargestellt) werden danach von Carboxypeptidase E (CPE) abgespalten. Es entsteht reifes Insulin, bestehend aus zwei Polypeptidketten mit 30 bzw. 21 Aminosäuren, die über zwei interkettene Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Die native Strukturbildung von Proinsulin sollte als weiteres Modellsystem im Kontext der Co-Sekretion von molekularen Chaperonen und verschiedenen Medienzusätzen untersucht werden. Die Proinsulin-cDNA aus pRK5-Proinsulin (Stahl & Christiansen, 1988) wurde von Jeannette Winter in pET20b(+) kloniert. Proinsulin wird mit Hilfe der PelB-Signalsequenz (Lei *et al.*, 1987) ins Periplasma sezerniert. Die Proinsulin-cDNA war schon auf die Codon-Nutzung von *E. coli* optimiert, d.h., sie enthielt keine seltenen Arginin-Codons. Der Vorteil von pUBS520 ist damit bei der Expression dieses Gens nicht gegeben. Aus den Ausbeuten von Proinsulin bei den Stämmen mit und ohne pUBS520 geht hervor, daß das Plasmid wahrscheinlich eine metabolische Belastung des bakteriellen Organismus darstellt (Tab 4-6). Die Ausbeute sinkt bei Anwesenheit von pUBS520 von ca. 9 auf 2ng/ml. Ein Stamm mit pUBS520 mußte jedoch als Negativ-Kontrolle für den Vergleich der Ausbeuten in An- und Abwesenheit von Chaperonen untersucht werden. Die Kultivierung und Bestimmung der Ausbeute an nativem Proinsulin mittels ELISA (s. 3.6.1. und 3.6.2.) wurde von Jeannette Winter durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Abb. 4-21 und Tabelle 4-6 zusammengefaßt.

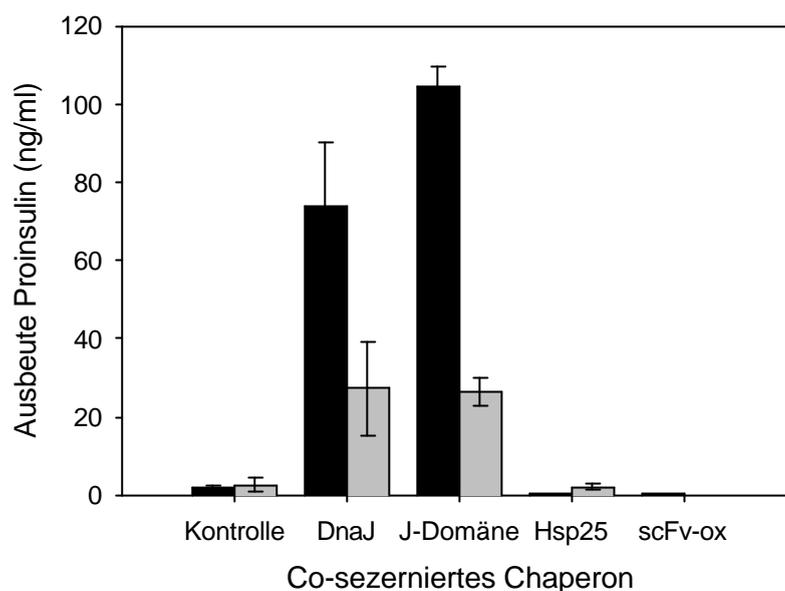


Abb. 421. Einfluß der Co-Sekretion von molekularen Chaperonen auf die Ausbeute von Proinsulin im Periplasma von *E. coli* BL21(DE3) in Abwesenheit von Medienzusätzen (schwarze Balken) bzw. bei Zusatz von 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium (graue Balken). Natives Proinsulin wurde mittels ELISA detektiert. Als Kontrolle wurden Bakterien, die pET20b(+)-PI und pUBS520 enthielten, untersucht. Die Ausbeute wurde auf Kulturen einer einheitlichen optischen Dichte bezogen.

Tabelle 4-6. Ausbeute von nativem Proinsulin im Periplasma von *E. coli* bei Co-Sekretion verschiedener molekularer Chaperone und Zusatz von 0 – 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium.

Co-sezerniertes Chaperon	c _L -Arginin (M)	OD ₅₀₀ bei Zellernte	Ausbeute von Proinsulin (ng/ml)
keine Co-Sekretion (ohne pUBS520)	0	4,86	9,607 ± 1,045
	0,4	3,03	4,2205 ± 2,221
keine Co-Sekretion (pUBS520)	0	5,82	2,035 ± 0,523
	0,4	4,13	2,649 ± 1,688
DnaJ	0	5,15	74,119 ± 16,194
	0,4	3,11	27,290 ± 12,026
J-Domäne	0	4,62	104,729 ± 4,751
	0,4	2,88	26,485 ± 3,740
Hsp25	0	5,38	0,300 ± 0,000
	0,4	2,35	2,091 ± 0,911
scFv-ox	0	5,47	0,300 ± 0,000
	0,4	4,06	0,000 ± 0,000

Hier zeigt sich ein starker Einfluß des co-sezernierten DnaJ und der J-Domäne auf die Proinsulin-Ausbeute. Während bei Co-Sekretion von Hsp25 und scFv-ox die Ausbeute von nativem Proinsulin dem Kontrollwert entsprach, wurde bei Co-Sekretion von DnaJ bzw. der J-Domäne eine bis zu 50-fache Ausbeutesteigerung gegenüber der Kontrolle ohne Co-Sekretion von Chaperonen erreicht (Abb. 4-21). Somit ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der Ausbeuteverbesserung von rPA durch Co-Sekretion von DnaJ und der J-Domäne. Beide Proteine haben einen ähnlich starken ausbeutesteigernden Effekt auf die Modellproteine rPA und Proinsulin.

Auch bei der Sekretion von Proinsulin wurde der Effekt von L-Arginin im Kulturmedium auf die Ausbeute von nativem Proinsulin getestet. Im Gegensatz zur Sekretion von rPA und scFv-TSH wurde eine starke Reduzierung der Ausbeute bei Zusatz von 0,4 M L-Arginin zum Medium beobachtet (Tab. 4-6).

Parallel zu den ELISA-Tests wurden Rohextrakte der Kultivierungen mittels Western Blot-Analysen auf Anwesenheit der co-sezernierten Chaperone bzw. scFv-ox getestet. Das Ergebnis zeigt Abb. 4-22.

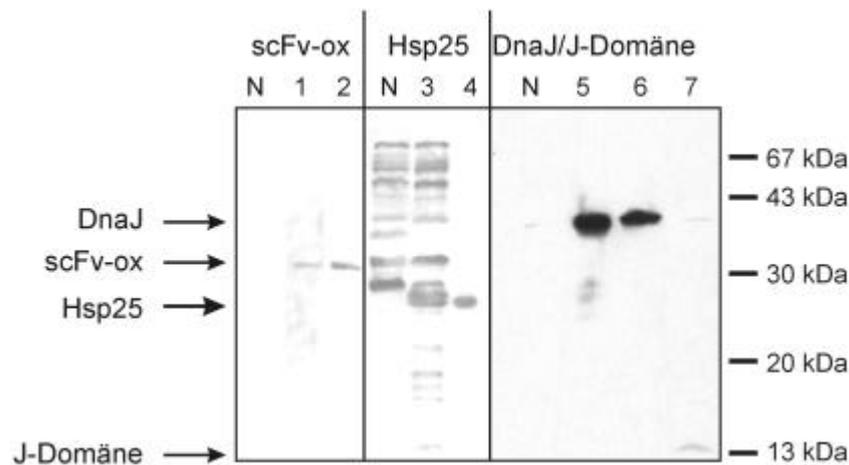


Abb. 4-22. Nachweis der Co-Überexpression der molekularen Chaperone bei den Versuchen zur Proinsulin-Sekretion in Ganzzellextrakten. Pro Bahn wurde das Äquivalent von 200 μ l Bakterien einer Kultur von $OD_{600} = 1$ aufgetragen. N bezeichnet jeweils die Negativkontrolle eines Zellextraktes von *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)/pUBS520, 4 h nach Induktion. Weiterhin wurden aufgetragen: Bahn 1: *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-PI/pUBS520-scFv-ox, 6 h nach Induktion., Bahn 2: *E. coli* BL21(DE3)-pHEN-scFv-ox (Positivkontrolle), Bahn 3: *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-PI/pUBS520-hsp25, Bahn 4: 2 μ g gereinigtes Hsp25 (Positivkontrolle), Bahn 5: *E. coli* N4830-pPL-dnaJ-23, 3 h nach Induktion (Positivkontrolle), Bahn 6: *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-PI/pUBS520-dnaJ, 6 h nach Induktion, Bahn 7: *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-PI/pUBS520-J-Domäne, 6 h nach Induktion.

Auch im Falle der Co-Sekretion von Proinsulin und DnaJ, Hsp25 und der J-Domäne bzw. scFv-ox konnte die Überexpression der Chaperonproteine nachgewiesen werden. Während DnaJ und scFv-ox spezifisch nachweisbar waren, zeigte sich, daß der Hsp25-Antikörper auch eine Vielzahl endogener bakterieller Proteine erkennt. Die Expression der J-Domäne war schlecht detektierbar.

4.6. Bestimmung von L-Arginin und Glutathion im Verlauf der Kultivierung

Da sich die Kultivierungen der *E. coli*-Zellen über relativ lange Zeiträume von 10-24 h erstreckten, bestand die Möglichkeit, daß die dem Medium zugesetzten Stoffe in dieser Zeit zersetzt oder metabolisiert werden. Dies hätte zur Folge, daß die zum Zeitpunkt der Induktion bestehenden Kulturbedingungen sich ändern, eine Tatsache, die eine Nachtitration von Medienzusätzen für den Erhalt einer optimalen Ausbeute notwendig machen würde.

Dazu wurden die Konzentrationen von L-Arginin und GSH im Verlauf einer typischen Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520-dnaJ/pET20b(+)-rPA mittels enzymatischer Tests (s. 3.7.) bestimmt (Abb. 4-23 und 4-24).

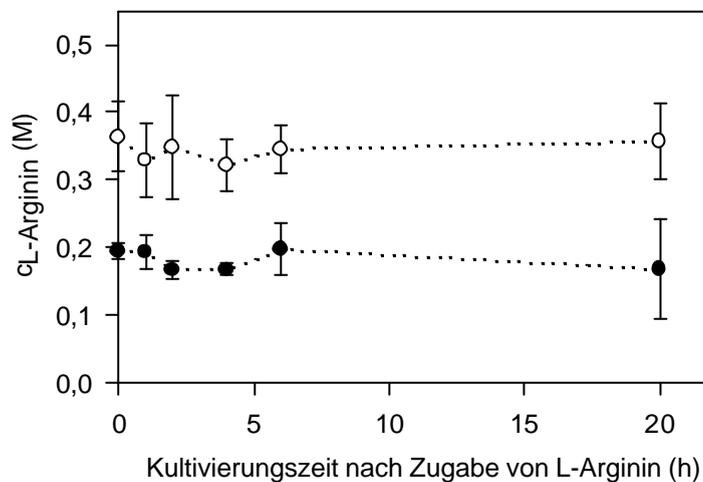


Abb. 423. Konzentration von L-Arginin im Kulturmedium bei der Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520-dnaJ/pET20b(+)-rPA nach Zugabe von 0,2 bzw. 0,4 mM zum Zeitpunkt der Induktion. Weiße Kreise: nach Zugabe von 0,4 mM L-Arginin; schwarze Kreise: nach Zugabe von 0,2 mM L-Arginin. Die Bestimmung von L-Arginin erfolgte mittels Enzymtest nach Gäde (1989).

Wie aus Abb. 4-23 ersichtlich ist, verändert sich die Konzentration von L-Arginin im Verlauf einer Kultivierung praktisch nicht. Ein Abbau durch die Bakterien während einer Kultivierung bis zu 20 h findet somit nur in äußerst geringem Umfang oder gar nicht statt.

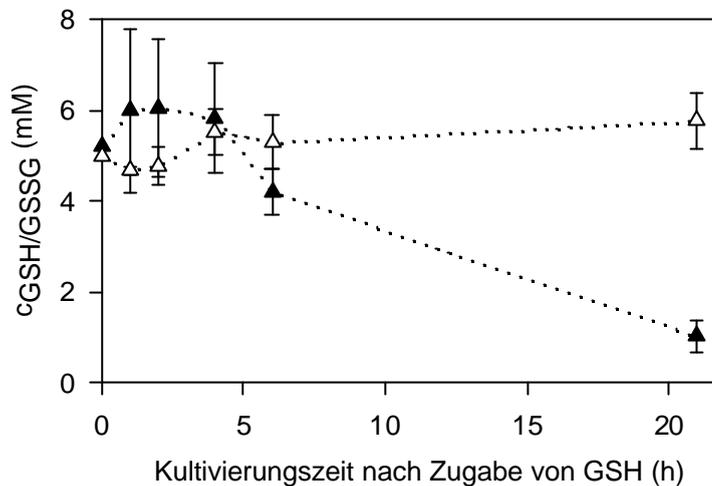


Abb. 4-24. Konzentration von reduziertem Glutathion (schwarze Dreiecke) bzw. von Gesamt-Glutathion (reduziert und oxidiert; weiße Dreiecke) im Kulturmedium bei Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3)-pUBS520-dnaJ/pET20b(+)-rPA nach Zugabe von 5 mM reduziertem Glutathion zum Zeitpunkt der Induktion. Die Bestimmung von L-Arginin erfolgte mittels Enzymtest nach Griffith (1989).

Bei der Konzentration des Gesamt-Glutathion, der Summe aus reduzierter und oxidiertes Spezies, kann festgestellt werden, daß auch hier kein erkennbarer Abbau stattfindet, da keine nennenswerte Änderung gemessen wurde (Abb. 4-24). Ein anderes Bild ergab sich allerdings bei Betrachtung des Anteils von reduziertem Glutathion. In diesem Fall ging die Konzentration im Verlauf der 20-stündigen Kultivierung auf 20 % der eingesetzten Menge zurück. Ein bakterieller Abbau kann ausgeschlossen werden, da die Menge an Glutathion (oxidiert und reduziert), wie oben gezeigt, nicht sank. Die Ursache für die Abnahme von GSH ist zum einen in der Oxidation von GSH zu GSSG durch Luftsauerstoff und zum anderen durch oxidative metabolische Vorgänge der Bakterien zu suchen. In einem parallelen Test, bei dem die „Zersetzung“ von 5mM GSH in LB-Medium in Abwesenheit von Bakterien im Schüttelkolben bestimmt wurde, konnte ebenfalls ein signifikantes Absinken des Anteils von reduziertem Glutathion bis auf etwa 35-40% der Ausgangsmenge nach 24 h bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Da dieser Abfall allerdings wesentlich langsamer erfolgte, ist ein Teil der Oxidation von GSH somit, wie schon oben erwähnt, auf die Atmungsaktivität der kultivierten Bakterien zurückzuführen. In jedem Fall ist zu beobachten, daß wenige Stunden

nach Zugabe von GSH ein Redoxsystem, bestehend aus reduziertem und oxidiertem Glutathion, im Kulturmedium vorhanden ist. Dieses Redoxsystem kann damit, wie in *in vitro*-Proteinfaltungsversuchen gezeigt, einen effizienten Austausch der gebildeten Disulfidbrücken katalysieren (Saxena & Wetlaufer, 1970; Ahmed *et al.*, 1975).

5. Diskussion

Obwohl das bakterielle Periplasma das einzige zelluläre Kompartiment ist, das die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen zuläßt, wird es bislang wenig für die Gewinnung rekombinanter Proteine genutzt. Als Gründe für die relativ geringe Nutzung dieses Kompartiments werden die gegenüber einer Expression im Cytosol meist niedrigen Ausbeuten angeführt. Niedrige Ausbeuten können durch mehrere Faktoren bedingt sein: (I) Die Translokation ins Periplasma kann ein limitierender Faktor sein (Hockney, 1994; Makrides, 1996). (II) In diesem Kompartiment tritt mitunter starker proteolytischer Abbau auf (Wülfing & Plückthun, 1994; Missiakas & Raina, 1997 b). (III) Desweiteren wurde beobachtet, daß nicht jede Signalsequenz zur effizienten Translokation eines gegebenen Proteins geeignet ist und somit oft mehrere Expressionskonstrukte hergestellt werden müssen, um eine optimale Signalsequenz zu finden (Kareem *et al.*, 1992; Voss *et al.*, 1994, Swartz, 1996).

In dieser Arbeit sollten zwei Strategien zur Verbesserung der Ausbeute an nativem Protein im Periplasma anhand von drei therapeutisch interessanten Modellproteinen untersucht werden. Zum einen sollten molekulare Chaperone als Faltungshelfer ins Periplasma sezerniert und zum anderen das periplasmatische Milieu durch die Zugabe niedermolekularer Reagenzien, die bei der Faltung von Proteinen *in vitro* ausbeutesteigernd wirken, gezielt beeinflusst werden.

5.1. Die Modellproteine rPA, scFv-TSH und Proinsulin und ihre Sekretion ins Periplasma

Das erste hier verwendete Modellprotein, eine Variante des gewebsspezifischen Plasminogenaktivators, rPA, besitzt neun nichtsequenzielle Disulfidbrücken (Abb. 5-1). Durch rPA prozessiertes Plasmin ist in der Lage, Fibringerinnsel aufzulösen. Dabei spielen sowohl die Kringel- als auch die Protease-Domäne von rPA eine wichtige Rolle. Die Wechselwirkung der Kringel-Domäne mit Fibrin bewirkt dabei eine Aktivierung der Proteaseaktivität um ein Vielfaches (Verheijen *et al.*, 1986). Diese Aktivierung kann in enzymatischen Aktivitätstests durch die Zugabe von Fibrinogenfragmenten erreicht werden (Verheijen *et al.*, 1982 b; s. 3.4.1.) und wird durch einen Stimulationsfaktor ausgedrückt. Nur wenn beide Domänen in ihrer nativen Konformation vorliegen, sind sowohl Aktivität als auch Aktivierbarkeit detektierbar. Ohne die native Disulfidverbrückung ist rPA inaktiv (Obukowicz *et al.*, 1990). Somit stellt dieses Protein ein ideales Modell für die Versuche zur periplasmatischen Expression dar.

Das zweite Modellprotein, scFv-TSH, trägt zwei sequenzielle Disulfidbrücken (Abb. 5-1), die jeweils in einer der beiden variablen Antikörperdomänen lokalisiert sind. Charakteristisch

für dieses Protein ist die spezifische Bindung an Thyreotropin, das in ELISA-Tests nachgewiesen werden kann und so die native Konformation anzeigt (s. 3.5.2.).

Proinsulin, das kleinste der verwendeten Modellproteine, besitzt im nativen Zustand drei nichtsequenzielle Disulfidbrücken (Abb. 5-1). Die native Faltung von Proinsulin kann mittels Sandwich-ELISA detektiert werden (s. 3.6.2.), wobei der sekundäre Antikörper spezifisch das native Proinsulin erkennt.

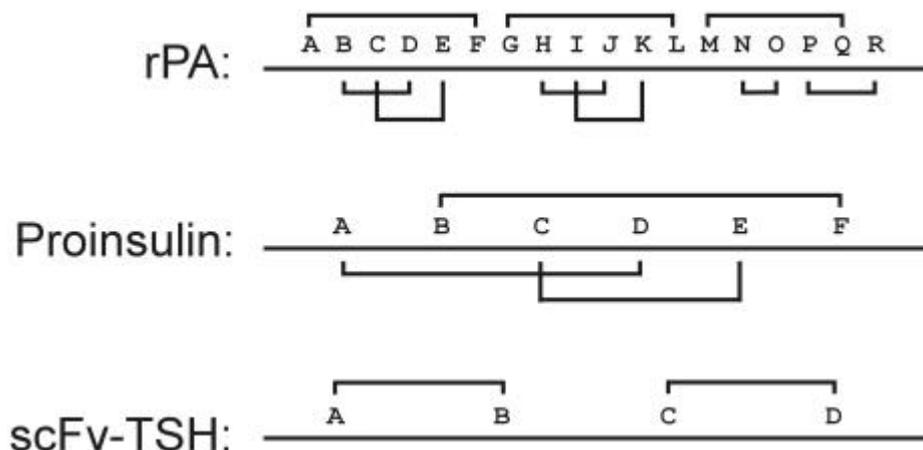


Fig. 5-1. Schematische Darstellung der Disulfidverbrückung der Modellproteine rPA, Proinsulin und scFv-TSH.

Um eine hohe Genexpression zu erreichen, wurden die kodierenden DNA-Abschnitte für rPA und Proinsulin in einen Plasmidvektor der pET-Serie der Firma Novagen kloniert. In diesen Vektoren unterliegt die Transkription des Zielgens der Kontrolle des viralen T7-Promotors, der sehr hohe Transkriptionsraten ermöglicht (Studier & Moffatt, 1988). Zur Sekretion von scFv-TSH wurde ein Sekretionskonstrukt mit dem *lac*-Promotor verwendet. In Western Blot-Experimenten wurde die rekombinante Synthese von rPA und scFv-TSH nachgewiesen (Abb. 4-6, 4-15). Proinsulin wurde ausschließlich mittels ELISA detektiert. Die Kultivierungstemperatur wurde bei den Versuchen zur Expression von rPA optimiert. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine Senkung der Kultivierungstemperatur auf 24 °C zu den höchsten Ausbeuten führte. In der Literatur wurde schon häufiger berichtet, daß eine solche Temperaturerniedrigung zu besseren Faltungsausbeuten rekombinanter Proteine führt (Schein & Noteborn, 1988, Kopetzki *et al.*, 1989). Es zeigte sich allerdings, daß auch nach dieser Optimierung nur sehr geringe Mengen der Proteine hergestellt wurden. Bei rPA und scFv-TSH stellte sich heraus, daß diese Proteine unvollständig prozessiert wurden. Eine unvollständige Prozessierung durch die bakteriellen Signalpeptidasen wird häufig bei der Sekretion heterologer Proteine beobachtet (Hockney, 1994; Makrides, 1996). Die geringe Menge von rPA oder scFv-TSH in bakteriellen Extrakten wird möglicherweise durch proteolytischen Abbau bedingt. So ist beispielsweise bekannt, daß falsch gefaltete Proteine

im Periplasma die Induktion von Proteasen bewirken (Missiakas & Raina, 1997 b; Betton *et al.*, 1998; Yura & Nakahigashi, 1999). Allerdings könnte auch ein „Verstopfen“ der Translokationsapparate durch die hohe Konzentration translozierender Polypeptide proteolytischen Abbau der Modellproteine nach sich ziehen (Wild *et al.*, 1993; Hockney, 1994).

Das oft beobachtete Phänomen der Ausbeuteverbesserung komplexer eukaryontischer Proteine durch Kultivierung unterhalb des Temperaturoptimums von *E. coli* (Schein & Noteborn, 1988; Kopetzki *et al.*, 1989) wurde auch hier beobachtet. Allerdings war die rPA-Aktivität in periplasmatischen Extrakten selbst bei für rPA optimaler Kultivierungstemperatur und Induktionszeit sehr niedrig (Tab. 4-1). Auch die Aktivität von scFv bzw. die Ausbeute von nativem Proinsulin, die mit den verwendeten Sekretionskonstrukten erhalten wurden, lagen nahe der Nachweisgrenze (Tab. 4-5 und 4-6). Diese geringen Ausbeuten an nativen, sezernierten Proteinen stellten die Ausgangssituation für die Versuche zur Verbesserung der Menge an nativen rekombinanten Proteinen dar.

5.2. Verwendung niedermolekularer Zusätze zur Ausbeuteverbesserung der Modellproteine im Periplasma von *E. coli*

Da Stoffe, die ein Molekulargewicht von weniger als 600 Da besitzen, durch die Poren der äußeren Membran von *E. coli* frei diffundieren können (Decad & Nikaido, 1976), sollte der Zusatz von faltungsfördernden bzw. aggregationshemmenden Stoffen die Faltung sezernierter Proteine verbessern. Wie Wunderlich & Glockshuber (1993 a) zeigten, wirken Thiolreagenzien im Kulturmedium bei sezernierten Proteinen tatsächlich ausbeutesteigernd. Ziel dieser Untersuchungen war es, das stark oxidierende Milieu im Periplasma, in dem Disulfid-Austauschreaktionen oft nur sehr ineffektiv stattfinden, hin zu den eher „mild oxidierenden“ Bedingungen des eukaryontischen endoplasmatischen Retikulums zu verändern. Dabei wurde sowohl reduziertes als auch oxidiertes Glutathion eingesetzt, da diese Redoxsubstanzen Disulfid-Austausch-Reaktionen auch *in vivo* katalysieren (Freedman, 1989).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von reduziertem Glutathion allein genügt, um ein Disulfid-Austauschsystem im Kulturmedium und damit auch im Periplasma zu schaffen, da GSH durch Oxidation in GSSG umgewandelt wird und so nach einiger Zeit ein Disulfid-Austauschsystem aus GSH und GSSG entsteht. Im Falle des komplex disulfidverbrückten Modellproteins rPA bewirkte der Zusatz von GSH eine geringfügige Steigerung der Ausbeute (Abb. 4-8). Dagegen hatte GSH keinen Einfluß auf die Faltung von scFv-TSH im Periplasma (Abb. 4-16). Eine Ursache für die unterschiedlichen Effekte von GSH könnte in der Anordnung der Disulfidbrücken der beiden Proteine liegen. Im

Gegensatz zu rPA sind die Disulfidbrücken bei scFv-TSH sequenziell angeordnet. In Untersuchungen von Joly & Swartz (1997) konnte nachgewiesen werden, daß die Ausbildung der Disulfidbrücken von sezernierten Proteinen in *E. coli* sequenziell erfolgt. Durch Zusatz des Disulfid-Austausch-Systems GSH/GSSG wird wahrscheinlich eine Korrektur von falsch gebildeten Verbrückungen in rPA durch Isomerisierung, einhergehend mit einer 50%igen Ausbeutesteigerung, erleichtert. Joly & Swartz (1997) zeigten, daß auch durch Co-Überexpression der bakteriellen Disulfid-Isomerase DsbC die Ausbeute von nichtsequenziell disulfidverbrückten eukaryontischen Proteinen im Periplasma verbessert werden kann. Ein effizienterer Austausch falsch gebildeter Disulfidbrücken kann somit sowohl durch Medienzusätze als auch durch zusätzliche Bereitstellung von Disulfid-Isomerasen erreicht werden.

In den Experimenten zum Effekt von niedermolekularen faltungsverbessernden Medienzusätzen zeigte sich, daß besonders die Zugabe von 0,4 M L-Arginin zum Kulturmedium die Mengen an nativem rPA oder scFv-TSH erheblich, d.h., um das bis zu 10- bzw. 40-fache, steigerte. Hingegen erbrachte der Zusatz von L-Arginin keine Verbesserung der Proinsulin-Ausbeute. Im Falle von rPA konnte für eine Reihe weiterer Medienzusätze, besonders für Ethylharnstoff oder Acetamid, ein ausbeutesteigernder Effekt nachgewiesen werden, der jedoch deutlich hinter dem „L-Arginin-Effekt“ zurückblieb. Aus *in vitro*-Proteinfaltungsstudien ist für diese Zusätze bekannt, daß sie die Aggregation von Faltungsintermediaten hemmen und dadurch die native Ausbeute verbessern (Rudolph *et al.*, 1997; De Bernandez Clark *et al.*, 1999). Besonders L-Arginin erwies sich dabei als „niedermolekulares Chaperon“. Es ist somit anzunehmen, daß L-Arginin auch die Aggregation von rekombinanten Proteinen im Periplasma unterdrückt und so eine erhöhte Faltungsausbeute dieser Proteine erzielt wird.

Auch im Periplasma kann es zur Aggregation von Proteinen, also IB-Bildung, kommen (Georgiou *et al.*, 1986). Die Anhäufung von Proteinaggregaten im Periplasma löst die σ^E -abhängige Hitzeschockreaktion aus, in deren Folge die Expression periplasmatischer Proteasen, wie DegP oder FkpA, hochreguliert wird (Missiakas & Raina, 1997 b; Yura & Nakahigashi, 1999). Durch Zugabe von z. B. L-Arginin werden diese Prozesse aufgrund einer erhöhten Faltungsausbeute möglicherweise inhibiert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß L-Arginin während des gesamten Fermentationsprozesses nicht sigifikant abgebaut wird und so eine einmalige Zugabe dieses Stoffes ausreichend ist. Das ist nicht überraschend, da L-Arginin als Kohlenstoff- oder Energiequelle wenig geeignet ist (McFall & Newman, 1996).

Bei diesen Betrachtungen darf jedoch der negative Einfluß dieser Zusätze auf das Wachstum der Zellen nicht außer acht gelassen werden. Durch den Einsatz von Stämmen, die eine hohe Resistenz gegenüber osmotischem Streß besitzen, sollten höhere Zelldichten

bei gleicher Ausbeute zu erreichen sein. Es ist anzunehmen, daß mit derartigen Stämmen eine weitere Ausbeutesteigerung durch Verwendung von L-Arginin-Konzentrationen, wie sie auch bei der *in vitro*-Proteinfaltung eingesetzt werden, erhalten werden können. Der hier verwendete Stamm BL21(DE3) ist für eine Kultivierung in Gegenwart hoher L-Arginin-Konzentrationen nur bedingt geeignet. Eine Selektion von L-Arginin-resistenten Zellen dieses Stammes war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, sollte jedoch in zukünftigen Studien zur periplasmatischen Expression von eukaryontischen Proteinen in Gegenwart von L-Arginin berücksichtigt werden. Eine andere Möglichkeit zur Verbesserung der Osmo-Toleranz der Bakterien bestünde im Zusatz von osmo-protektiven Stoffen, wie Prolin, Glycin-Betain, Cholin u.a. zum Kulturmedium (Ingraham & Marr, 1996). Derartige Zusätze könnten eine höhere Zelldichte und damit eine höhere Produktausbeute zulassen.

Interessanterweise konnte bei der Sekretion von rPA nachgewiesen werden, daß auch andere Medienzusätze einen positiven Einfluß auf die Ausbeute dieses Proteins im Periplasma haben können. Es erscheint daher sinnvoll, bei ähnlichen Versuchen mit anderen rekombinanten Proteinen immer eine ganze Reihe verschiedener Zusätze zu testen, um die optimale Kombination von niedermolekularem Faltungshelfer und gewünschtem Protein zu ermitteln.

5.3. Co-Sekretion von molekularen Chaperonen – ein Ansatz zur Steigerung der Ausbeute disulfidverbrückter Proteine im Periplasma

5.3.1. Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen

Die Co-Überexpression von molekularen Chaperonen hat in vielen Fällen zur Verbesserung der löslichen Ausbeute rekombinanter Proteine in *E. coli* geführt (Thomas *et al.*, 1997). Jedoch blieb dieser Ansatz bisher auf eine cytosolische Expression beschränkt, da die bakteriellen Chaperonmaschinerien ATP benötigen, das im Periplasma nicht vorhanden ist (Miller, 1996).

Hier sollten zwei ATP-unabhängige Chaperone, DnaJ und Hsp25, auf ihre Fähigkeit, die Aggregation sezernierter Proteine zu unterdrücken, untersucht werden. Es konnte nachgewiesen werden, daß beide Proteine mit Hilfe der OmpA-Signalsequenz ins Periplasma sezerniert werden. Aufgrund des sehr spezifischen DnaJ-Antikörpers konnten genauere Studien zum Faltungszustand und der Lokalisation dieses Proteins durchgeführt werden (Abb. 4-1). Dabei wurde gezeigt, daß sezerniertes DnaJ membran-assoziiert vorlag und nativ gefaltet war (Fontana *et al.*, 1997). Unklar ist, ob das Zink-Finger-Motiv unter den oxidierenden periplasmatischen Bedingungen funktionell ist und die Cysteine dieser Domäne durch Disulfidbrücken verbunden sind. Untersuchungen zu Hsp33, einem cytosolischen

Chaperon aus *E. coli*, dessen Aktivität abhängig vom Redoxzustand ist, ergaben, daß die Zink-Finger-Domäne dieses Proteins unter oxidierenden Bedingungen das gebundene Zinkion freisetzt und Disulfidbrücken ausgebildet werden (Jakob *et al.*, 1999). Es ist zu vermuten, daß dies auch bei DnaJ der Fall ist. Dies könnte auch die Ursache für das Auftreten einiger zusätzlicher Proteolyse-Fragmente im Vergleich zum gereinigten Protein sein. Welche Konsequenzen eine Disulfidverbrückung für die Chaperonaktivität hat, konnte hier jedoch nicht geklärt werden.

Leider konnten Experimente zum Faltungszustand von Hsp25 nicht durchgeführt werden, da das zur Verfügung stehende Antiserum relativ unspezifisch war und mit vielen bakteriellen Proteinen reagierte. Anhand des Laufverhaltens in der SDS-PAGE läßt sich jedoch zumindest die korrekte Abspaltung der Signalsequenz erkennen, eine Tatsache, die auf eine periplasmatische Lokalisation hindeutet. Ob auch im Periplasma Hsp25-Oligomere, wie sie für kleine Hitzeschockproteine charakteristisch sind (Behlke *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998; Haslbeck *et al.*, 1999), gebildet werden, kann aus den vorliegenden Daten nicht bestimmt werden.

5.3.2. Co-Sekretion von ATP-unabhängigen Chaperonen erhöht die Ausbeute von disulfidverbrückten Modellproteinen

Die Co-Sekretion von DnaJ oder der J-Domäne von DnaJ steigerte die Menge von rPA oder Proinsulin um das 5- bzw. 30-fache, hatte jedoch keinen Effekt auf die Ausbeute von scFv-TSH. Dagegen hatte die Co-Sekretion von Hsp25 nur im Falle von rPA einen positiven Einfluß auf die Ausbeute.

Worauf beruht nun der positive Effekt der Co-Sekretion von DnaJ und Hsp25 auf die Ausbeute von nativem rPA oder Proinsulin? Falls DnaJ und Hsp25 als Chaperone aktiv sind, dann müssen diese Proteine auch im Periplasma in der nativen Konformation vorliegen. Die native Struktur konnte im Falle von DnaJ nachgewiesen werden (Abb. 4-1). Aus den experimentellen Daten lassen sich mehrere Indizien für einen spezifischen Chaperon-Effekt, also eine Inhibierung von Aggregationsreaktionen im Periplasma und damit eine verbesserte Faltungsausbeute, gewinnen.

- (1) So konnte beispielsweise durch die Co-Sekretion von scFv-ox, einem Antikörperfragment ohne Chaperonaktivität, das als Negativ-Kontrolle für unspezifische Effekte einer Co-Sekretion eines beliebigen Proteins diente, gezeigt werden, daß die Sekretion eines zweiten heterologen Proteins zu keiner nennenswerten Ausbeutesteigerung führt.
- (2) Weiterhin ist bekannt, daß Proteine zur Faltung spezifische Chaperone benötigen, d. h., nicht jedes Chaperon kann die Faltung eines gegebenen Proteins fördern (Wall & Plückthun, 1995; Schwarz *et al.*, 1996; Beissinger & Buchner, 1998). In der vorliegenden

Arbeit konnte gezeigt werden, daß DnaJ oder die J-Domäne nicht zur Ausbeuteverbesserung von scFv-TSH beitragen bzw. Hsp25 keine Ausbeutesteigerung von Proinsulin und scFv-TSH bewirkt. Diese Spezifität und die Ergebnisse der Co-Sekretion von scFv-ox als Negativ-Kontrolle deuten auf einen Chaperoneffekt von DnaJ und Hsp25 hin, der die Ausbeuten der Modellproteine rPA und Proinsulin verbessert. Die von Chaperon-Proteinen unabhängige Faltung von ScFv könnte auf der sequenziellen Anordnung der Disulfidbrücken beruhen. Korrekte, während der Translokation gebildete Disulfidbrücken tragen wahrscheinlich wesentlich zur Faltung bei.

Überraschend war, daß die Sekretion der beiden N-terminalen Domänen von DnaJ, der J-Domäne und der G/F-reichen Domäne einen ähnlichen ausbeutesteigernden Effekt bei den beiden Modellproteinen rPA und Proinsulin hatte. Dieses Fragment von DnaJ stimuliert zwar die ATPase-Aktivität von DnaK, besitzt jedoch nach Untersuchungen von Wall *et al.* (1994) und Szabo *et al.* (1996) keine Chaperonaktivität. Weiterhin ist bekannt, daß die J-Domäne ausreichend ist, um DnaK hoch-affin an entfaltetes σ^{32} -Protein zu binden, eine Eigenschaft, die der ATPase-Stimulation durch die J-Domäne zugeschrieben wird (Mayer *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 1999). Die G/F-reiche Domäne, die in dem hier verwendeten Fragment zusätzlich enthalten ist, ist an der Stimulierung der Substratbindung an DnaK beteiligt (Wall *et al.*, 1995). Ob die J-Domäne tatsächlich eine Hemmung der Aggregation von Faltungsintermediaten von rPA *in vitro* bewirkt, wird derzeit von Maren Oehlmann in der Arbeitsgruppe untersucht.

Bei der Interpretation der Chaperon-Effekte auf die Ausbeuteverbesserung sezernierter Proteine sollte auch ein potentieller Einfluß von cytosolisch akkumulierten Chaperonen angesprochen werden. Es ist anzunehmen, daß nicht alle Chaperonpolypeptide, die mit dem Co-Sekretionssystem produziert werden, vollständig ins Periplasma transloziert werden. Vielleicht reichert sich auch ein Teil im Cytoplasma an. Es ist vorstellbar, daß diese Proteine, falls sie im Cytosol zur nativen Konformation falten, an der Stabilisierung von rPA-Molekülen in diesem Kompartiment mitwirken können und so einen Abbau verhindern bzw. die Polypeptidketten in einer translokationskompetenten Form erhalten und so die Akkumulation aktiven Proteins im Periplasma verbessern. Perez-Perez *et al.* (1995) wiesen beispielsweise nach, daß die DnaK/DnaJ-Überexpression im Cytoplasma einen positiven Einfluß auf die Ausbeute von granulocystenstimulierendem Faktor im Periplasma hat. Andererseits ist eine native Faltung von Proteinen mit Signalsequenzen im Cytosol relativ unwahrscheinlich, da bekanntlich die meisten Vorläuferproteine von SecB gebunden werden und in einem entfalteten Zustand zum Translokationsapparat transportiert werden (Driessen *et al.*, 1998). Somit bleibt der Effekt der J-Domäne unverstanden. Durch Überexpression der J-Domäne oder von DnaJ im Cytosol von *E. coli* könnte ein Einfluß auf die Ausbeute von nativem rPA untersucht werden. Falls dies zu einer Ausbeuteverbesserung periplasmatischer Proteine

führen sollte, wäre ein Effekt dieser Chaperone im Cytosol für die hier beobachteten Ergebnisse naheliegend.

Wie auch bei den Medienzusätzen läßt sich aus diesen Daten ablesen, daß der Chaperon-Bedarf eines gegebenen rekombinanten Proteins durchaus spezifisch ist und daher zuerst die „optimale Kombination“ von Chaperon und rekombinantem Protein ermittelt werden muß.

5.4. Ein Synergismus von Medienzusätzen und Chaperonen

Bei der Sekretion von rPA wurde ein interessantes Phänomen beobachtet: Die Co-Sekretion von DnaJ oder Hsp25 steigerte die Ausbeute dieses Modellproteins um einen Faktor von 4,5 bzw. 1,7. Die Zugabe von 0,4 M L-Arginin oder 5 mM GSH ergab eine Ausbeuteerhöhung um das 10- bzw. 1,3-fache. Bei Co-Sekretion von DnaJ und zusätzlicher Zugabe von 0,4 M L-Arginin und 5 mM GSH zum Kulturmedium jedoch stieg die Ausbeute auf das 170-fache, ein Vielfaches der Einzelfaktoren. Bei Co-Sekretion der J-Domäne konnte sogar ein Faktor von 190 erreicht werden. Extremere fällt die Berechnung bei Betrachtung des Effekts von Hsp25 aus. Hier wäre nach Multiplikation der separaten Beiträge des Chaperons und der Medienzusätze eine 22-fache Ausbeutesteigerung zu erwarten. Allerdings wurde eine Verbesserung um das 120-fache gemessen. Die Ergebnisse sprechen für eine synergistische Wirkung von Chaperonen und L-Arginin. Chaperone und Zusätze bewirken *in vitro* eine Inhibierung der Aggregatbildung (Langer *et al.*, 1992; Schröder *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1996; Ehrnsperger *et al.*, 1997; De Bernandez Clark, 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die durch Western Blots nachgewiesenen Chaperonmengen in Abhängigkeit von der Konzentration von L-Arginin und GSH im Kulturmedium (Abb. 4-11). Dabei ergab sich im Falle von DnaJ und Hsp25 eine nahezu konstante Menge dieser Proteine bei allen getesteten Konzentrationen von L-Arginin und GSH. Dagegen nahm die detektierte Menge der J-Domäne mit steigenden Konzentrationen dieser Medienzusätze ab und die der Negativ-Kontrolle scFv-ox zu. Eine Erklärung für diesen Effekt kann aus den vorliegenden Daten nicht gegeben werden. Es ist jedoch zu vermuten, daß die Medienzusätze L-Arginin und GSH einen Einfluß auf die Faltung der Chaperone haben und diese Unterschiede darauf zurückzuführen sind.

Unerwartet war der Abfall des Stimulationsfaktors bei hohen Konzentrationen von Medienzusätzen bzw. bei Co-Sekretion von Hsp25, der J-Domäne und besonders scFv-ox. Dies deutete auf eine unvollständige Faltung von rPA hin (Verheijen *et al.*, 1986). Allerdings ist auch vorstellbar, daß L-Arginin die für die Stimulation verantwortliche Kringeldomäne abschirmt und so eine Interaktion mit den Fibrinogenfragmenten verhindert wird. Dasselbe kann auch für die co-sezernierten Chaperone gelten. Falls sie mit der Kringeldomäne

interagieren, so könnte die Protease-Domäne aktiv sein und eine Stimulation durch sterische Hinderung der Kringel-Domäne durch die Chaperone unterbleiben. Eine Erhöhung der unspezifischen Aktivität von periplasmatischen Extrakten von Zellen durch Zusatz von GSH und L-Arginin zum Kulturmedium wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit kann das Absinken des Stimulationsfaktors nicht auf eine erhöhte unspezifische Aktivität in den Extrakten zurückgeführt werden. Ob die verringerte Aktivierung des produzierten rPA durch Fibrinogenfragmente auf eine unvollständige Faltung des Proteins oder eine Abschirmung der für die Aktivierung verantwortlichen Bereiche der Proteinoberfläche durch Medienzusätze oder Chaperone zurückzuführen ist, ist derzeit unklar.

Leider sind die erreichten Ausbeuten von rPA oder Proinsulin selbst unter optimalen Bedingungen relativ niedrig. Jedoch zeigen Literaturdaten zur Sekretion von Proinsulin ins Periplasma bedeutend niedrigere Ausbeuten an sezerniertem Proinsulin (Chan *et al.*, 1981). Kang & Yoon (1994) erzielten durch Variation der Länge des GPeptids eine Proinsulin-Menge im Periplasma von 58 µg/ml Zellkultur. Demgegenüber stehen 0,5 µg/ml, die in dieser Arbeit maximal erreicht wurden.

In Untersuchungen zur Sekretion einer tPA-Variante von Obukowicz *et al.* (1990) wurde eine Ausbeute von bis zu 20 ng/ml Kultur angegeben. Dabei war jedoch nur ein Bruchteil des sezernierten Proteins aktiv. Qiu *et al.* (1998) nutzten zusätzlich die Co-Sekretion der bakteriellen Disulfid-Isomerase DsbC und erhielten 180 µg/l aktives (vollständiges) tPA nach Hochzelldichte-Fermentation und zweistufigem Reinigungsprozeß. Allerdings können diese Literaturdaten aufgrund der unterschiedlichen Kultivierungsmethoden nicht direkt mit den hier erzielten Ergebnissen verglichen werden. Die Ausbeuten liegen jedoch zumindest in einer vergleichbaren Größenordnung. Kürzlich wurde die intrazelluläre Produktion einer disulfidverbrückten K₂P-Variante von tPA beschrieben. Da in der Publikation nur relative Steigerungsfaktoren angegeben sind, ist ein Vergleich mit den hier beschriebenen Daten unmöglich (Bessette *et al.*, 1999).

5.5. Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der Ausbeute rekombinanter Proteine im Periplasma von *E. coli*

Die hier vorliegende Untersuchung befaßte sich mit ausgewählten Möglichkeiten zur Verbesserung der Ausbeute sezernierter Proteine. Das periplasmatische Milieu sollte dahingehend verändert werden, daß eukaryontische Proteine mit multiplen Disulfidbrücken effizienter zu ihrer nativen Konformation falten können. Die Untersuchungen beschränkten sich auf zwei Chaperone, DnaJ und Hsp25. Eine Erweiterung der Studien auf andere Chaperon-Proteine wäre ein erster Ansatz, das hier etablierte System zu optimieren. Geeignete Kandidaten sollten wiederum ATP-unabhängig sein. Im vorigen Jahr wurde ein

neues cytosolisches Hitzeschockprotein aus *E. coli*, Hsp33, eingehend charakterisiert. Die Chaperon-Aktivität von Hsp33 zeigt eine interessante Abhängigkeit von den jeweiligen Redoxbedingungen (Jakob *et al.*, 1999). Da die Chaperon-Aktivität nur unter oxidierenden Bedingungen vorhanden ist, wird angenommen, daß dieses Protein zum Schutz vor oxidativem Streß produziert wird. Die Eigenschaft, unter oxidierenden Bedingungen als Chaperon zu fungieren, prädestiniert Hsp33 geradezu für eine Anwendung in dem in dieser Arbeit etablierten Co-Sekretionssystem. In der Arbeitsgruppe laufen bereits entsprechende Versuche dazu.

Ein Fragment von GroEL, das in Abwesenheit von ATP die Rückfaltung von Rhodanese und Cyclophilin A vermittelt, ist das von Zahn *et al.* (1996) publizierte „GroEL-Minichaperon“. Auch das Minichaperon könnte eine faltungsfördernde Wirkung im Periplasma besitzen, da es an entfaltete Polypeptidketten bindet und die Aggregation von Faltungsintermediaten unterdrückt (Zahn *et al.*, 1996). Als weitere Kandidaten sind das vermutliche periplasmatische Chaperon Skp, dessen Co-Sekretion die Ausbeute von Antikörperfragmenten verbessert (Bothmann & Plückthun, 1998; Hayhurst & Harris, 1999), oder DsbC, das als Disulfid-Isomerase die Ausbeute von heterologen disulfidverbrückten Proteinen erhöht (Qiu *et al.*, 1998; Joly *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998), zu nennen.

Auch die Palette der Medienzusätze könnte erweitert werden. Bei der Stabilisierung von Proteintherapeutika werden insbesondere Mono-, Di- und Polysaccharide, Glycerin oder Polyethylenglykol eingesetzt (Carpenter *et al.*, 1999). Die Verwendung derartiger Substanzen als Kulturmedienzusätze könnte ebenso positive Effekte auf die Ausbeute sezernierter Proteine haben, wie sie schon für Glycin-Betain oder Sorbitol gezeigt wurden (Blackwell & Horgan, 1991). Ein „Screening“ nach optimalen Medienzusätzen sollte am Anfang eines jeden Versuches zur Sekretion von disulfidverbrückten Proteinen stehen, um den optimalen Zusatz für jedes individuelle Protein zu ermitteln.

Medienzusätze und Sekretion von Faltungshelferproteinen sind jedoch nur zwei mögliche Ansätze zur Ausbeutesteigerung. Daneben sind weitere Optimierungen möglich. Da in dieser Arbeit zwei der drei Modellproteine mit Hilfe des pET-Systems der Firma Novagen exprimiert wurden, mußte ein Stamm mit einer T7-RNA-Polymerase verwendet werden. Durch gezielte Stammwahl bzw. Stammverbesserung sollten weitere Steigerungen der Ausbeute möglich sein.

Diese Arbeit zeigt, daß trotz der sehr guten Charakterisierung von *E. coli* eine gezielte Veränderung der Expressionsbedingungen durch „rationales Design“ zur optimalen Synthese eines gewünschten rekombinanten Proteins nicht möglich ist. Diese Optimierung ist bislang das Ergebnis von empirischen Versuch- und Irrtum-Ansätzen. Die hier aufgezeigten Möglichkeiten stellen nur ein Puzzlestück bei der Ergründung der Mechanismen dar, die zur Faltung eines Polypeptides zur nativen Konformation in *E. coli* führen.

6. Zusammenfassung

Die Anwendung der rekombinanten DNA-Technik erlaubt es, große Mengen von Proteinen herzustellen, die für die medizinische Therapie und Diagnostik interessant sind (sogenannte „Biomedicals“). Dabei werden diese Proteine in gentechnologisch veränderten Organismen produziert. Häufig besitzen therapeutische Proteine für ihre Stabilität essentielle Disulfidbrücken. Die Bildung der nativen Disulfidkonfiguration rekombinant hergestellter Proteine stellt eine große Herausforderung der biotechnologischen Forschung dar. In dieser Arbeit sollten anhand von drei Modellproteinen Möglichkeiten zur Verbesserung der Ausbeute von nativen therapeutisch relevanten Proteinen in *E. coli*, dem bisher am besten charakterisierten Mikroorganismus, untersucht werden. Die Bildung von Disulfidbrücken ist in Wildtyp-*E. coli* Stämmen nur im oxidierenden Milieu des Periplasmas möglich.

1. Aufgrund der Durchlässigkeit der äußeren bakteriellen Membran, die die freie Diffusion von Stoffen bis 600 Da ins Periplasma ermöglicht, können niedermolekulare Zusätze im Kulturmedium die Faltung von ins Periplasma sezernierten Proteinen beeinflussen. Dabei erwies sich insbesondere L-Arginin, das die Aggregation bei der *in vitro*-Proteinfaltung inhibiert, als effektiver Zusatz zur Steigerung der Ausbeute von nativem rPA und scFv-TSH. Es konnten Steigerungen um das 10- bis 40-fache durch Zugabe von 0,4 M L-Arginin zum Medium erzielt werden. L-Arginin wird im Verlauf der Fermentation nicht von *E. coli* metabolisiert. Die Verwendung anderer faltungsverbessernder Substanzen, wie z.B. alkylierten Harnstoffderivaten oder Acetamid, führte im Falle der Sekretion von rPA ebenfalls zu beträchtlichen Ausbeutesteigerungen. Reduziertes Glutathion kann eingesetzt werden, um als artifizielles Disulfid-Austauschsystem zu fungieren, da es im Laufe der Fermentation teilweise in die oxidierte Form überführt wird. Jedoch war der ausbeutesteigernde Effekt von reduziertem Glutathion nicht so groß wie der von L-Arginin. Die Ausbeute von nativem Proinsulin konnte nicht durch L-Arginin- oder GSH-Zusatz erhöht werden.
2. Durch Co-Sekretion der ATP-unabhängigen Chaperone DnaJ und Hsp25 sowie dem N-terminalen Fragment von DnaJ, der J-Domäne, wurde die Ausbeute von funktionellem rPA um das bis zu 5-fache gesteigert. Die Menge von nativem Proinsulin wurde durch Co-Sekretion von DnaJ oder der J-Domäne um einen Faktor von 35 bzw. 50 verbessert. Dagegen hatte die Co-Sekretion dieser molekularen Chaperone keinen positiven Einfluß auf die Ausbeute von scFv-TSH. Der beobachtete ausbeutesteigernde Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Chaperonfunktion von DnaJ und Hsp25 zurückzuführen, da (I) nachgewiesen werden konnte, daß DnaJ im Periplasma zur nativen Konformation faltet, (II) ein als Kontrolle co-sezerniertes „Nicht-Chaperon“ zu keiner Ausbeuteverbesserung führte und (III) ein spezifischer Chaperonbedarf für die genutzten Modellproteine festgestellt werden konnte. Allerdings konnte aus den vorhandenen

Literaturdaten keine Erklärung für den Effekt der J-Domäne abgeleitet werden. Ein Zusammenhang zwischen der Anordnung der Disulfidbrücken im Protein und dem Chaperonbedarf wird vermutet.

3. Die Verwendung von faltungsverbessernden Medienzusätzen und co-sezernierten Chaperonen wirkte im Falle von rPA synergistisch auf die Ausbeute. Es wurden Steigerungen um das bis zu 190-fache gegenüber der Ausgangssituation erreicht.

7. Literaturverzeichnis

- Ahmed, A. K., Schaffer, S. W. & Wetlaufer, D. B. (1975). Nonenzymatic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J. Biol. Chem.* 250, 8477-8482
- Allen, S. P., Polazzi, J. O., Gierse, J. K. & Easton, A. M. (1992). Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 6938-6947
- Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D. & Raina, S. (1997). A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsBC redox proteins. *Mol. Microbiol.* 26, 121-132
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 361-386
- Aslund, F. & Beckwith, J. (1999). The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181, 1375-1379
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K (Hrsg., 1987-1997): *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley & Sons, Cambridge
- Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. & Bardwell, J. C. A. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* 98, 217-227
- Baillyes, E. M., Shennan, K. I. J., Seal, A. J., Smeekens, S. P., Steiner, D. F., Hutton, J. C. & Docherty, K. (1992). A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem. J.* 285, 391-394
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 411-421
- Banting, F. G. & Best, C. H. (1922). The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 7, 251-266
- Bardwell, J.C. A., Tilly, K., Craig, E., King, J., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1986). The nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K12 *dnaj*⁺ gene. *J. Biol. Chem.* 261, 1782-1785
- Bardwell, J. C. A., Lee, J.-O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. & Beckwith, J. (1993). A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1038-1042
- Bardwell, J. C. A. (1994). Building bridges: disulphide bond formation in the cell. *Mol. Microbiol.* 14, 199-205
- Behlke, J., Lutsch, G., Gaestel, M. & Bielka, H. (1991). Supramolecular structure of the recombinant murine small heat shock protein Hsp25. *FEBS Lett.* 288, 119-122
- Beissinger, M. & Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259
- Bennett, D. L., Baillyes, E. M., Nielsen, E., Guest, P. C., Rutherford, N. G., Arden, S. D. & Hutton, J. C. (1992). Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryotic subtilisin family. *J. Biol. Chem.* 267, 15229-15236
- Berges, H., Joseph-Liauzun, E. & Fayet, O. (1996). Combined effects of the signal sequence and the major chaperone proteins on the export of human cytokines in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 55-60
- Bergman, L. W. & Kuehl, W. M. (1979). Co-translational modification of nascent immunoglobulin heavy and light chains. *J. Supramol. Struct.* 11, 9-24
- Berkower, I. (1996). The promise and the pitfalls of monoclonal antibody therapeutics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 622-628

- Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13703-13708
- Betton, J.-M., Sassoon, N., Hofnung, M. & Laurent, M. (1998). Degradation versus Aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273, 8897-8902
- Bhat, T. N., Bentley, G.A., Fischmann, T. O., Boulot, G. & Poljak, R. J. (1990). Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments on antibody D1.3 binding. *Nature* 347, 483-485
- Bienz-Tadmor, B. (1993) Biopharmaceuticals go to market: patterns of worldwide development. *Bio/Technology* 11, 168-172
- Bird, R.E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G. S. & Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426
- Blackwell, J. R. & Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed protein in an active form. *FEBS Lett.* 295, 10-12
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453-1462
- Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J. & Krska, J. (1992). Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 7436-7444
- Bothmann, H. & Plückthun, A. (1998). Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nat. Biotechnol.* 16, 376-380
- Bowden, G., Paredes, A. & Georgiou, G. (1991). Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9, 725-730
- Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D. C., Joachimiak, A., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1994). The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2,8 Å. *Nature* 371, 578-586
- Brinkmann, U., Mattes, R. E. & Buckel, P. (1989). High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85, 109-114
- Buchner, J. & Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant F_{ab}-fragments produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 9, 157-162
- Buchner, J. (1999). Hsp90 & Co. – a holding for folding. *TIBS* 24, 136-141
- Bukau, B. & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366
- Carpenter, J. F., Kendrick, B. S., Chang, B. S., Manning, M. C. & Randolph, T. W. (1999). Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics. *Meth. Enzymol.* 309, 236-255
- Chan, S. J., Weiss, J., Konrad, M., White, T., Bahl, C., Yu, S.-D., Marks, D. & Steiner, D. F. (1981). Biosynthesis and periplasmic segregation of human proinsulin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5401-5405
- Chang, A. C. Y. & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic mini-plasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156
- Cleland, J. L. & Craik, C. S. (Hrsg.; 1996). Protein engineering – principles and practice. John Wiley & Sons, New York

- Cloney, L. P., Bekkaoui, D. R. & Hemmingsen, S. M. (1993). Co-expression of plastid chaperonin genes and a synthetic plant rubisco operon in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* 23, 1285-1290
- Cole, P. A. (1996). Chaperone-assisted protein expression. *Structure* 4, 239-242
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. & van Dijl, J. M. (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* 6, 1129-1138
- Dale, G. E., Schönfeld, H.-J., Langen, H. & Stieger, M. (1994). Increased solubility of trimethoprim-resistant type S1 DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Prot. Engin.* 7, 925-931
- Dall'Acqua, W. & Carter, P. (1998). Antibody engineering. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 433-450
- Davies, A. H. (1995). Advances in the use of recombinant baculoviruses for the expression of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 543-547
- De Bernandez Clark, E., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Meth. Enzymol.* 309, 217-236
- Decad, G. M. & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of gram-negative bacteria: molecular-sieving function of cell wall. *J. Bacteriol.* 128, 325-336
- Denman, J., Hayes, M., O'Day, C., Edmunds, T., Bartlett, C., Hirani, S., Ebert, K. M., Gordon, K. & McPherson, J. M. (1991): Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Bio/Technology* 9, 839-843
- Derman, A. I. & Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* 173, 7719-7722
- Derman, A. I., Prinz, W. A., Belin, D. & Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262, 1744-1749
- Deuerling, E., Schulze-Specking, A., Tomoyasu, T., Mogk, A. & Bukau, B. (1999). Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-696
- Dodd, I., Jalalpour, S., Southwick, W., Newsome, P., Browne, M. J. & Robinson, J. H. (1986). Large scale, rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator. *FEBS Lett.* 209, 13-17
- Drews, J. (1998). Die verspielte Zukunft. Birkhäuser Verlag, Basel
- Driessen, A. J. M., Fekkes, P. & van der Wolk, J. P. W. (1998). The sec system. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 216-222
- Eckart, M. R. & Bussineau, C. M. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 525-530
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- Ehrnsperger, M., Gräber, S., Gaestel, M. & Buchner, J. (1997). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221-229
- Ernst, J. F. (1988). Codon usage and gene expression. *TIBTECH* 6, 196-199
- Fahey, R. C., Hunt, J. C. & Windham, G. C. (1977). On the cysteine and cystine content of proteins. *J. Mol. Evol.* 10, 155-160

- Fayet, O., Ziegelhoffer, T. & Georgopoulos, C. (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.* 171, 1379-1385
- Fedorov, A. N. & Baldwin, T. O. (1995). Contribution of cotranslational folding to the rate of formation of native protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1227-1231
- Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. & Horwich, A. L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371, 614-619
- Fiedler, U. & Conrad, U. (1995). High-level production and long-term storage of engineered antibodies in transgenic tobacco seeds. *Bio/Technology* 13, 1090-1093
- Fischer, G. (1994). Über Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.* 106, 1479-1501
- Fontana, A., Polverino de Laureto, P., de Filippis, V., Scaramella, E. & Zamboni, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Design* 2, R17-R26
- Freedman, R. B. (1989). Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* 57, 1069-1072
- Gäde, G. (1989). L-Arginine and Arginine Phosphate, In: *Methods of Enzymatic Analysis Vol. VIII (Metabolites 3)*. Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), VCH Weinheim, 425-432
- Gaestel, M., Gross, B., Benndorf, R., Strauß, M., Schunk, W.-H., Kraft, R., Otto, A., Böhm, H., Stahl, J., Drabsch, H. & Bielka, H. (1989). Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the 25-kDa growth-related protein of Ehrlich ascites tumor and its homology to mammalian stress proteins. *Eur. J. Biochem.* 179, 209-213
- Garcia, G. M., Mar, P. K., Mullin, D. A., Walker, J. R. & Prather, N. E. (1986). The *E. coli dnaY* gene encodes an arginine transfer RNA. *Cell* 45, 453-459
- Georgiou, G., Telford, J. N., Shuler, M., L. & Wilson D. B. (1986). Localization of inclusion bodies in *Escherichia coli* overproducing β -lactamase or alkaline phosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1157-1161
- Ghayreb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y & Inouye, M. (1984). Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 3, 2437-2442
- Göthel, S. F. & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 423-436
- Goloubinoff, P., Gatenby, A. A. & Lorimer, G. H. (1989). GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 337, 44-47
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Ben Zvi, A. P., Tomoyasu, T. & Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732-13737
- Gordon, K., Lee, E., Vitale, J. A., Smith, A. E., Westphal, H. & Hennighausen, L. (1987). Production of human tissue-type plasminogen activator in transgenic mouse milk. *Bio/Technology* 5, 1183-1186
- Gottesmann, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* 11, 815-823
- Gragerov, A., Nudler, E., Kommissarova, N., Gaitanaris, G. A., Gottesman, M. E. & Nikiforov, V. (1992). Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10341-10344

- Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. & Bardwell, J. C. A. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947-955
- Greene, M. K., Maskos, K. & Landry, S. L. (1999). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6108-6113
- Griffith, O.W. (1989). Glutathione and Glutathione Disulphide, *In: Methods of Enzymatic Analysis Vol. VIII (Metabolites 3)*. Bergmeyer, H.U. (Hrsg.), VCH Weinheim, 521-529
- Gronenborn, B. (1976). Overproduction of phage λ repressor under control of the *lac* promoter of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 148, 243-250
- Hardy, S. J. S. & Randall, L. L. (1991). A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science* 251, 439-443
- Hartl, F. U., Lecker, S., Schiebel, E., Hendrick, J. P. & Wickner, W. (1990). The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* 63, 269-279
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580
- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Saibil, H. R. & Buchner, J. (1999). Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 18, 6744-6751
- Hayhurst, A. & Harris, W. J. (1999). *Escherichia coli* Skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Prot. Expr. Purif.* 15, 336-343
- Hesse, F. (1986). Reaktivierung und Reinigung von rekombinantem „Tissue-type“ Plasminogenaktivator aus *E. coli*. Dissertation, Universität Regensburg, 48 ff.
- Hockney, R. C. (1994). Recent developments in heterologous protein folding in *Escherichia coli*. *TIBTECH* 12, 456-463
- Holck, A., Lossius, I., Aasland, R & Kleppe, K. (1987). Purification and characterization of the 17K protein, a DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys. Acta* 914, 49-54
- Horwitz, J. (1992). α -crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10449-10453
- Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R. & Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator: role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912-2919
- <http://www.phrma.org> – Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (1998). Biomedicine – promises for health. <http://www.phrma.org/pdf/publications/brochure/biomed/biomed.pdf>
- Hudson, P. J. (1998). Recombinant antibody fragments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 395-402
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett, H. M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., Crea, R. & Opperman, H. (1988). Protein engineering of antibody sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879-5883
- Ingraham, J. L. & Marr, A. G. (1996). Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. *In: Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.). Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.* ASM Press, Washington, 1570-1578
- Irigoyen, J. P., Munos-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M. & Nagamine, Y. (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 104-132

- Jaenicke, R. (1998). Protein self-organization *in vitro* and *in vivo*: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol. Chem.* 379, 237-243
- Jacobi, A., Huber-Wunderlich, M., Hennecke, J. & Glockshuber, R. (1997) Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J. Biol. Chem.* 272, 21692-21699
- Jacques, N., Guillerez, J. & Dreyfus, M. (1992). Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNAs. *J. Mol. Biol.* 226, 597-608
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K. & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 268, 1517-1520
- Jakob, U. & Buchner, J. (1994). Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *TIBS* 19, 205-211
- Jakob, U., Lilie, H., Meyer, I. & Buchner, J. (1995). Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase – implications for heat-shock *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 270, 7288-7294
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. & Bardwell, J. C. A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341-352
- Joly, J. C. & Swartz, J. R. (1994). Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 33, 4231-4236
- Joly, J. C. & Swartz, J. R. (1997). *In vitro* and *in vivo* redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry* 36, 10067-10072
- Joly, J. C., Leung, W. S. & Swartz, J. R. (1998). Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2773-2777
- Kaluza, B. & Lenz, H. (1997). Diagnostic test using chimeric antibodies. US Patent No. 5,614,367 (Boehringer Mannheim)
- Kane, J. F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 494-500
- Kang, Y. & Yoon, J. (1994) Effect of modification of connecting peptide of proinsulin on its export. *J. Biotechnol.* 36, 45-54
- Kareem, B. N., Rokkones, E., Høgset, A., Holmgren, E. & Gautvik, K. M. (1992). A method for the evaluation of the efficiency of signal sequences for secretion and correct N-terminal processing of human parathyroid hormone produced in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* 204, 26-33
- Kawula, T. H. & Lelivelt, M. J. (1994). Mutations in a gene encoding a new hsp70 suppress rapid DNA inversion and *bgl* activation, but not *proU* derepression in *hns1* mutant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 610-619
- Kelley, W. L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *TIBS* 23, 222-227
- Kemmler, W., Peterson, J. D. & Steiner, D. F. (1971). Studies on the conversion of proinsulin to insulin. *J. Biol. Chem.* 246, 6786-6791
- Keyt, B. A., Paoni, N. F. & Bennett, W. F. (1996). Site-directed mutagenesis of tissue-type plasminogen activator. *In: Cleland, J. L. & Craik, C. S. (Hrsg.) Protein Engineering.* John Wiley & Sons, New York, 435-466

- Khyse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-207
- Kim, K. K., Kim, R. & Kim, S.-H. (1998). Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature* 394, 595-599
- Knappik, A., Krebber, C. & Plückthun, A. (1993). The effect of folding catalysts on the *in vivo* folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 11, 77-83
- Knoblauch, N. T. M., Rüdiger, S., Schönfeld, H.-J., Driessen, A. J. M., Schneider-Mergener, J. & Bukau, B. (1999). Substrate specificity of the SecB Chaperone. *J. Biol. Chem.* 274, 34219-34225
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497
- Kohnert, U., Rudolph, R., Verheijen, J. H., Weening-Verhoeff, E. J. D., Stern, A., Opitz, U., Martin, U., Lill, H., Prinz, H., Lechner, M., Kresse, G.-B., Buckel, P. & Fischer, S. (1992). Biochemical properties of the kringle-2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. *Protein Eng.* 5, 93-100
- Komar, A. A., Kommer, A., Krashennikov, I. A. & Spirin, A. S. (1997). Cotranslational folding of globin. *J. Biol. Chem.* 272, 276-284
- Kopetzki, E., Schumacher, G. & Buckel, P. (1989). Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast α -glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol. Gen. Genet.* 216, 149-155
- Koths, K. (1995). Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges (1995). *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 681-687
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Langer, T. Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. & Hartl, F. U. (1992). Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683-689
- Langer, T. (1993) Untersuchungen zum Mechanismus der Chaperone-vermittelten Faltung von Proteinen. Dissertation, Universität München, S. 17ff.
- Laskey, R. A., Honda, B. M., Mills, A. D. & Finch J. T. (1978). Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* 275, 416-420
- Lee, S., & Olins, P. O. (1992). Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 2849-2852
- Lee, G. J., Roseman, A. M., Saibil, H. R. & Vierling, E. (1997). A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *EMBO J.* 16, 659-671
- Lei, S.-P., Lin, H.-C., Wang, S.-W, Callaway, J. & Wilcox, G. (1987). Characterization of the *Erwinia carotovora* *peb* gene and its product pectate lyase. *J. Bacteriol.* 169, 4379-4383.
- Lilie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 497-501
- Lill, R., Crooke, E., Guthrie, B. & Wickner, W. (1988). The „trigger factor cycle“ includes ribosomes, presecretory proteins, and the plasma membrane. *Cell* 54, 1013-1018

- Lin, W.-J. & Traugh, J. A. (1993). Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in *Escherichia coli*: purification and characterization of the reconstituted holoenzyme. *Prot. Expr. Purif.* 4, 256-264
- Mackin, R. B. (1998). Proinsulin: recent observations and controversies. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 696-702
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538
- Martin, U., Fischer, S., Kohnert, U., Opitz, U., Rudolph, R., Sponer, G., Stern, A. & Strein, K. (1991). Thrombolysis with an *Escherichia coli*-produced recombinant plasminogen activator (BM 06.022) in the rabbit model of jugular vein thrombolysis. *Thromb. Haemostas.* 65, 560-564
- Mayer, M. P. & Bukau, B. (1998). Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanism of action. *Biol. Chem.* 379, 261-268
- Mayer, M. P., Laufen, T., Paal, K., McCarty, J. S. & Bukau, B. (1999). Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 289, 1131-1144
- Mayhew, M., da Silva, A. C. R., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Hartl, F. U. (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379, 420-426
- McFall, E. & Newman, E. B. (1996). Amino acids as carbon sources. *In*: Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, 358-379
- Miller, C. G. (1996). Protein degradation and proteolytic modification. *In*: Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, 938-954
- Misra, R. & Reeves, P. (1985). Intermediates in the synthesis of TolC protein include an incomplete peptide stalled at a rare Arg codon. *Eur. J. Biochem.* 152, 151-155
- Missiakas, D. & Raina, S. (1997 a). Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471
- Missiakas, D. & Raina, S. (1997 b). Protein misfolding in the cell envelope of *Escherichia coli*: new signaling pathways. *TIBS* 22, 59-63
- Mogk, A., Tomoyasu, T., Goloubinoff, P., Rüdiger, S., Röder, D., Langen, H. & Bukau, B. (1999). Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. *EMBO J.* 18, 6934-6949
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt. 1, 263-273
- Nakamura, Y., Kanenko, T., Miyajima, N. & Tabata, S. (1999). Extension of CyanoBase. CyanoMutants: repository of mutant information on *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Nucl. Acids Res.* 27, 66-69 und <http://www.kazusa.or.jp/codon/>
- Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.; 1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington

- Nishihara K., Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.* 66, 884-889
- Ny, T., Elgh, F. & Lund, B. (1984). The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5355-5359
- Obukowicz, M. G., Gustavson, M. E., Junger, K. D., Leimgruber, R. M., Wittwer, A. J., Wun, T.-C., Warren, T. G., Bishop, B. F., Mathis, K. J., McPherson, D. T., Siegel, N. R., Jennings, M. G., Brightwell, B. B., Diaz-Collier, J. A., Bell, L. D., Craik, C. S. & Tacon, W. C. (1990). Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 29, 9737-9745
- Oliver, D. B. (1996). Periplasm. *In*: Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, 88-103
- Ostermeier, M., De Sutter, K. & Georgiou, G. (1996). Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli dsbA* mutants and increases the yield of a heterologous protein with disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 271, 10616-10622
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. (1998). ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone *in vivo*. *EMBO J.* 17, 4829-4836
- Parker, J., Johnston, T. C., Borgia, P. T., Holtz, G., Remaut, E & Fiers, W. (1983). Codon usage and mistranslation: *in vivo* basal level misreading of the MS2 coat protein message. *J. Biol. Chem.* 258, 10007-10012
- Patthy, L. (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* 41, 657-663
- Pennica, D., Holmes, W. E., Kohr, W. J., Harkins, R. N., Vehar, G. A., Ward, C. A., Bennett, W. F., Yelverton, E., Seeburg, P. H., Heyneker, H. L., Goeddel, D. V. & Collen, D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator in *E. coli*. *Nature* 301, 214-221
- Perez-Perez, J., Martinez-Caja, C., Barbero, J. L & Gutierrez, J. (1995). DnaK/DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 524-529
- Polisky, B. (1988). ColE1 replication control circuitry: sense from antisense. *Cell* 55, 929-932
- Polverino de Laureto, P., de Filippis, V., di Bello, M., Zambonin, M. & Fontana, A. (1995). Probing the molten globule state of α -lactalbumin by limited proteolysis. *Biochemistry* 34, 12596-12604
- Possee, R. D. (1997). Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 569-572
- Prinz, W. A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661-15667
- Qiu, J., Swartz, J. R. & Georgiou, G. (1998). Expression of active human tissue-type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4891-4896
- Raman, B., Ramakrishna, T. & Rao, C. M. (1995). Temperature dependent chaperone-like activity of alpha-crystallin. *FEBS Lett.* 365, 133-136
- Randall, L. L. & Hardy, S. J. S. (1986). Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study *in vivo* of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell* 46, 921-928

- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B. & Pastan, I. (1996). Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnol.* 14, 1239-1245
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N. & Beckwith, J. (1996). An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13048-13053
- Roman, L. J., Sheta, E. A., Martasek, P., Gross, S. S., Liu, Q. & Siler Masters, B. S. (1995). High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8428-8432
- Rudolph, R., Opitz, U., Hesse, F., Rießland, R. & Fischer, S. (1992). Reactivation of microbially produced human tissue-type plasminogen activator. *In: North, K. (Hrsg.) Biotechnology International*. Century Press, London, 321-325.
- Rudolph, R. (1996). Successful protein folding on an industrial scale. *In: Cleland, J. L. & Craik, C. S. (Hrsg.) Protein Engineering – principles and practice*. John Wiley & Sons, New York, 283-298
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996). *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56
- Rudolph, R., Fischer, S. & Mattes, R. (1997) Process for the activating of gene-technologically produced, heterologous, disulphide bridge-containing eukaryotic proteins after expression in prokaryotes. US Patent No. 5,593,865 (Boehringer Mannheim)
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1997). Folding Proteins. *In Protein Function: A practical approach* (Creighton, T. E., ed.), Oxford University Press, Oxford, 57-99
- Saez, E., No., D., West, A. & Evans, R. M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 608-616
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- Sarmientos, P., Duchesne, M., Deneffe, P., Boiziau, J., Fromage, N., Delporte, N., Parker, F., Lelievre, Y., Mayaux, J.-F. & Cartwright, T. (1989). Synthesis and purification of active human tissue-type plasminogen activator from *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 7, 495-501
- Sauer, F. G., Fütterer, K., Pinker, J. S., Dodson, K. W., Hultgren, S. J. & Waksman, G. (1999). Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285, 1058-1066
- Saxena, V. P. & Wetlaufer, D. B. (1970). Formation of three-dimensional structure in proteins: rapid nonenzymatic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry* 9, 5015-5023
- Schäfer, U., Beck, K. & Müller, M. (1999). Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 24567-24574
- Schein, C. H. & Noteborn, M. H. M. (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology* 3, 151-154
- Schirmer, E. C., Glover, J. R., Singer, M. A. & Lindquist, S. (1996). Hsp100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *TIBS* 21, 289-296
- Schmidt, A. M., Bloß, I. & Skerra, A. (1998). Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*: positive influences of *dsbC* coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Prot. Engin.* 11, 601-607
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F. U. & Bukau, B. (1993). DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.* 12, 4137-4144
- Schwarz, E., Lilie, H. & Rudolph, R. (1996). The effect of molecular chaperones on *in vivo* and *in vitro* folding processes. *Biol. Chem.* 377, 411-416

- Shibui, T. & Nagahari, K. (1992). Secretion of a functional Fab fragment in *Escherichia coli* and the influence of culture conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 352-357
- Skowrya, D., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1990). The *E. coli* dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 61, 939-944
- Sone, M., Akiyama, Y. & Ito, K. (1997). Differential *in vivo* roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 272, 10349-10352
- Sørensen, M. A., Kurland, C. G. & Pedersen, S. (1989). Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 207, 265-377
- Spanjaard, R. A. & Van Duin, J. (1988). Translation of the sequence AGG-AGG yields 50% ribosomal frameshift. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7967-7971
- Spieß, C., Beil, A. & Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347
- Stahl, S.J. & Christiansen, L. (1988). Selection for signal sequence mutations that enhance production of secreted human proinsulin by *Escherichia coli*. *Gene* 71, 147-156
- Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L. & Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157, 697-700
- Stern, A., Kohnert, U., Rudolph, R., Fischer, S. & Martin, U. (1993). Thrombolytically active non-glycosylated protein. US-Patent No. 5,223,256
- Stewart, E. J., Aslund, F. & Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 17, 5543-5550
- Stoller, G., Rücknagel, K. P., Nierhaus, K.-H., Schmid, F. X., Fischer, G. & Rahfeld, J. U. (1995). A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO J.* 14, 4939-4948
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Sudbery, P. E. (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7,517-524
- Suh, W.-C., Lu, C. Z. & Gross, C. A. (1999). Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J. Biol. Chem.* 274, 30534-30539
- Swartz, J. R. (1996). *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Hrsg.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, 1693-1711
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. & Flanagan, J. (1996). A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* 15, 408-417
- Talmadge, K., Stahl, S. & Gilbert, W. (1980) Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3369-3373
- Teter, S. A., Houry, W. A., Ang, D., Tradler, T., Rockabrand, D., Fischer, G., Blum, P., Georgopoulos, C. & Hartl, F. U. (1999). Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* 97, 755-765
- Thomas, J. G. & Baneyx, F. (1996). Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing heat-shock proteins. *J. Biol. Chem.* 271, 11141-11147

- Thomas, J. G., Ayling, A. & Baneyx, F. (1997). Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66, 197-238
- Thornton, J. M. (1981). Disulphide bridges in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 151, 261-287
- Thorstenson, Y., Zhang, Y., Olson, P.S. & Mascarenhas, D. (1997). Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *J. Bacteriol.* 179, 5333-5339
- Todd, M. J., Viitanen, P. V. & Lorimer, G. H. (1994). Dynamics of the chaperonin ATPase cycle: implications for facilitated protein folding. *Science* 265, 659-666
- Towbin H, Staehelin, T & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Trill, J. J., Shatzman, A. R. & Ganguly, S. (1995). Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 553-560
- Upshall, A., Kumar, A. A., Bailey, M. C., Parker, M. D., Favreau, M. A., Lewison, K. P., Joseph, M. L., Maraganore, J. M. & McKnight, G. L. (1987). Secretion of active human tissue-type plasminogen activator from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Bio/Technology* 5, 1301-1304
- van Zonneveld, A.-J., Veerman, H. & Pannekoek, H. (1986). On the interaction of the finger and the kringle-2 domain of tissue-type plasminogen activator with fibrin. *J. Biol. Chem.* 261, 14214-14218
- Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J. & Goloubinoff, P. (1998). The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J. Biol. Chem.* 273, 11032-11037
- Verheijen, J. H., Mullaart, E., Chang, G. T. G., Kluft, C. & Wijngaards, G. A. (1982 a). Simple, Sensitive Spectrophotometric Assay for Extrinsic (Tissue-Type) Plasminogen Activator Applicable to Measurements in Plasma. *Thromb. Haemostas.* 48, 266-269
- Verheijen, J. H., Nieuwenhuizen, W. & Wijngaards, G. (1982 b). Activation of plasminogen by tissue activator is increased specifically in the presence of certain soluble fibrin(ogen) fragments. *Thromb. Res.* 27, 377-385
- Verheijen, J. H., Caspers, M. P. M., Chang, G. T. G., de Munk, G. A. W., Pouwels, P. H. & Enger-Valk, B. E. (1986): Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin. *EMBO J.* 5, 3525-3530
- Vickery, L. E., Silberg, J. J. & Ta, D. T. (1997). Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Prot. Sci.* 6, 1047-1056
- Vonrhein, C., Schmidt, U., Ziegler, G. A., Schweiger, S., Hanukoglu, I. & Schulz, G. E. (1999). Chaperone-assisted expression of authentic bovine adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 443, 167-169
- Voss, T., Falkner, E., Ahorn, H., Krystek, E., Maurer-Fogy, I., Bodo, G. & Hauptmann, R. (1994). Periplasmic expression of human interferon- $\alpha 2c$ in *Escherichia coli* results in a correctly folded molecule. *Biochem. J.* 298, 719-725
- Wall, D., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1994). The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for ? replication. *J. Biol. Chem.* 269, 5446-5451
- Wall, D., Zylicz, M. & Georgopoulos, C. (1995). The conserved G/F motif of the DnaJ chaperone is necessary for the activation of the substrate binding properties of the DnaK chaperone. *J. Biol. Chem.* 270, 2139-2144

- Wall, G. J. & Plückthun, A. (1995). Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 507-516
- Weissman, J. S., Hohl, C. M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H. R., Fenton, W. A. & Horwich, A. L. (1995). Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* 83, 577-588
- Weissman, J. S., Rye, H. S., Fenton, W. A., Beechem, J. M. & Horwich, A. L. (1996). Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* 84, 481-490
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. & Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature* 358, 169-170
- Wild, J., Walter, W. A., Gross, C. A. & Altman, E. (1993). Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* 175, 3992-3997
- Williams, D. C., van Frank, R. M., Muth, W. L. & Burnett, J. P. (1982). Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* 215, 687-689
- Wiman, B. & Collen, D. (1978). Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 272, 549-555
- Wülfing, C. & Plückthun, A. (1994). Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 12, 685-692
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993 a). *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J. Biol. Chem.* 268, 24547-24550
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993 b). Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Prot. Sci.* 2, 717-726
- Xu, Z., Horwich, A. L. & Sigler, P. B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* 388, 741-750
- Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. & Schlom, J. (1992). Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* 52, 3402-3408
- Yokoyama, K., Kikuchi, Y. & Yasueda, H. (1998). Overproduction of DnaJ in *Escherichia coli* improves *in vivo* solubility of recombinant fish-derived transglutaminase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 1205-1210
- Yoshimune, K., Yoshimura, T. & Esaki, N. (1998). Hsc62, a new DnaK homologue of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 115-118
- Yura, T., Nagai, H. & Mori, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 321-350
- Yura, T. & Nakahigashi, K. (1999). Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 153-158
- Zahn, K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *J. Bacteriol.* 178, 2926-2933
- Zahn, R., Buckle, A. M., Perrett, S., Johnson, C. M., Corrales, F. J., Golbik, R. & Fersht, A. R. (1996). Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15024-15029
- Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. & Creighton, T. E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 34, 5075-5089

-
- Zapun, A., Jakob, C. A., Thomas, D. Y., & Bergeron, J. J. M. (1999). Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* 7, R173-R182
- Zettlmeißl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1983). Limited proteolysis as a tool to study the kinetics of protein folding: conformational rearrangements in acid-dissociated lactic dehydrogenase as determined by pepsin digestion. *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 161-168
- Zolkiewski, M. (1999). ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. *J. Biol. Chem.* 274, 28083-28086
- Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S. & Georgopoulos, C. (1985). Purification and properties of the *dnaJ* replication protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 7591-7598

Danksagung

Prof. Dr. Rainer Rudolph möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Projekts, die überaus hilfreichen Diskussionen und das große Interesse am Fortgang der Arbeiten danken.

Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die gute Betreuung und die Einführung in die Molekularbiologie.

Jeannette Winter bin ich dankbar für die Durchführung der Experimente zur Proinsulin-Sekretion.

Tanja Lisse gilt mein Dank für die vielen kleinen praktischen Tips und Diskussionen.

Dr. Ulrike Fiedler danke ich für Ihre Ratschläge und die hilfreichen Diskussionen.

Bert Kadereit half mir mit großer Einsatzbereitschaft bei den Bestimmungen von L-Arginin und GSH.

Allen Mitarbeitern im Labor 514/262 gilt mein Dank für die sehr gute Laboratmosphäre.

Prof. Dr. Matthias Gaestel, Dr. Jaroslaw Marszalek, Prof. Dr. Jim Bardwell, Prof. Dr. Johannes Buchner, Prof. Dr. Masayori Inouye, Dr. Alfred Engel, Dr. Ulrich Brinkmann, Dr. Ulrich Kohnert bin ich für die Bereitstellung von Plasmiden, Antikörpern und Proteinstandards zu Dank verpflichtet.

Der schnell wachsenden Arbeitsgruppe Proteintechnologie möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre danken.

Meiner Frau Ines bin ich für die Hilfe bei den Grafiken dankbar.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Unterstützung in den Studienjahren.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, im März 2000

Jörg Schöffner

Lebenslauf:

Name: Jörg Schöffner
Geburtstag: 5. August 1971
Geburtsort: Sömmerda/Thüringen
Familienstand: verheiratet mit Ines Schöffner, geb. Pannenberg

Schulbildung:

1978-1986 Besuch der Allgemeinbildenden Polytechnischen Oberschule in Beierfeld/Erzgebirge
1986-1990 Besuch der Spezialechule mathematisch-naturwissenschaftlich-technischer Richtung in Chemnitz mit Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife

Wehrersatzdienst:

1990-1991 Zivildienst bei der Gemeindeverwaltung in Beierfeld

Studienzeiten:

1991-1996 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Okt. 1995-
Aug. 1996 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema: „Untersuchungen zur Cofaktor-Wechselwirkung von Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis*“ in der Arbeitsgruppe Enzymologie am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. Hübner
seit Sep. 1996 Anfertigung der Promotionsarbeit am Institut für Biotechnologie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Schwarz
Titel der Doktorarbeit:
„Einfluß niedermolekularer Medienzusätze und sezernierter, ATP-unabhängiger Chaperone auf die Ausbeute therapeutischer Proteine im Periplasma von *Escherichia coli*“