



Untersuchungen zu Hitzeschockproteinen in der Hefe *Hansenula polymorpha*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Durchgeführt bei der Rhein Biotech GmbH, Düsseldorf.

vorgelegt von
Pia Bernsmeier
aus Köln

Düsseldorf 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
und der Rhein Biotech GmbH.

Referent: Prof. Dr. C.P. Hollenberg & Prof. Dr. J. F. Ernst
Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Externer Betreuer: Dr. M. Suckow

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2009

Die Erfahrung ist wie eine Laterne im Rücken;
sie beleuchtet stets nur das Stück Weg, das wir bereits hinter uns haben.

Konfuzius

1	Einleitung	1
1.1	Das Hsp70-Chaperon System.....	1
1.1.1	Hsp70-Chaperone.....	1
1.1.2	Die Struktur von Hsp70.....	2
1.1.3	Der molekulare Mechanismus der Hsp70-Funktion	4
1.2	Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Co-Chaperone.....	4
1.2.1	Hsp40-Chaperone.....	4
1.2.2	Die Struktur von Hsp40.....	4
1.2.3	Nukleotidaustauschfaktoren	6
1.2.4	Spezifität der Hsp70/Hsp40 Interaktion	7
1.3	Das Hsp70/Hsp40-System in Hefen und in Säugetieren.....	7
1.3.1	Das Hsp70/Hsp40-System in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.3.2	Hsp70-Proteine in <i>Hansenula polymorpha</i>	9
1.3.2	Das Hsp70/Hsp40-System in Säugetieren	9
1.4	Immunologische Eigenschaften von Hitzeschockproteinen	10
1.4.1	Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation	10
1.4.2	Experimentelle Ansätze für Hsp-vermittelte Vakzin-„Delivery“	12
1.5	Heterologe Genexpression in <i>Hansenula polymorpha</i>.....	13
1.5.1	Regulation des Methanolmetabolismus.....	14
1.5.2	Vorteile von <i>H. polymorpha</i> als Modellorganismus in der Biotechnologie.....	15
1.5.3	<i>H. polymorpha</i> Expressionssysteme der Firma Rhein Biotech GmbH.....	16
1.6	Zielsetzung	17
2	Material & Methoden	18
2.1	Chemikalien, Enzyme und Antikörper	18
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	18
2.1.2	Enzyme und dazugehörige Inkubationspuffer	18
2.1.3	Antikörper.....	18
2.2	Stämme und Medien für Mikroorganismen.....	18
2.2.1	Stämme.....	18
2.2.2	Medien	19
2.3	Zelllinien und Medien zur Anzucht von Zellkulturen	20
2.3.1	Zelllinien.....	20
2.3.2	Medien zur Anzucht von Zellkulturen.....	20
2.4	Mäuse.....	20
2.5	Plasmide	20
2.5.1	Ausgangsplasmide /Grundvektoren.....	20
2.6	Oligonukleotide.....	26
2.7	Methoden zur Kultivierung von Mikroorganismen.....	27
2.7.1	Kultivierung in Schüttelkolben/Röhrchen	27
2.7.2	Kultivierung in Deep Well-Mikrotiterplatten.....	27
2.7.3	2 L Fed-Batch Fermentation	27
2.8	<i>H. polymorpha</i>-Stammgenerierung (Rhein Biotech GmbH, Methodensammlung).....	28
2.8.1	Stammgenerierung in 3 ml-Röhrchen.....	28
2.8.2	Stammgenerierung in der Deep Well-Mikrotiterplatte.....	28

2.9	Bestimmung der Optischen Dichte (OD) von Kulturen	28
2.10	Präparation von Nukleinsäuren	29
2.10.1	Präparation von genomischer DNA aus Hefe	29
2.10.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	29
2.11	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	30
2.11.1	Bestimmung der Konzentration mittels Spektralphotometrie	30
2.11.2	DNA-Konzentrationsabschätzung aus Agarosegelen	30
2.12	DNA-Sequenzierung	30
2.13	Transformation und Herstellung elektrokompetenter Zellen	30
2.13.1	Herstellung elektrokompetenter <i>H. polymorpha</i> -Zellen	30
2.13.2	Transformation von <i>H. polymorpha</i> -Zellen mittels Elektroporation	31
2.13.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	31
2.14	Enzymatische Modifikationen von DNA	31
2.14.1	Restriktion von DNA	31
2.14.2	DNA-Ligation	31
2.14.3	Entsalzen von Ligationsansätzen	31
2.14.4	T4-Polymerase-Reaktion	31
2.14.5	Kinase Reaktion	32
2.15	Auftrennung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten	32
2.15.1	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.15.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	32
2.16	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.16.1	Amplifizierung von DNA-Fragmenten	33
2.16.2	PCR-Mutagenese	33
2.17	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>H. polymorpha</i>	34
2.17.1	Im 3 ml-Maßstab mittels Glaskugeln	34
2.17.2	Im Deep Well-Platten-Maßstab mittels Glaskugeln	34
2.17.3	Herstellung von Proteinextrakten mittels Hochdruckhomogenisation	34
2.18	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
2.19	Protein-Charakterisierung mittels Reverse Phase (RP) – HPLC	35
2.20	Protein-Charakterisierung mittels Size Exclusion Chromatographie (SEC) – Lightscatter	36
2.21	Auftrennung und Nachweis von Proteinen	36
2.21.1	Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2.21.1.1	Denaturierende /reduzierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.21.1.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.21.2	Nachweis von Proteinen	37
2.21.2.1	Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie-Brilliant-Blue	37
2.21.2.2	Färben von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels Ponceau-S	37
2.22	Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine („Western-Blot-Analyse“)	37
2.22.1	Semidry-Blotting	37
2.22.2	Detektion filtergebundener Proteine	38
2.23	Affinitätschromatographie-Systeme	38
2.23.1	Affinitätschromatographie mittels Streptactin-Matrix	38
2.23.1.1	Affinitätschromatographie mittels Streptactin Spin Columns	38
2.23.2.2	Affinitätschromatographie mittels selbstgepackten Streptactin-Sepharose-Säulen	39
2.23.2.3	Affinitätschromatographie mittels Streptactin Superflow-Matrix	39

2.23.2	IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose.....	39
2.24	Konzentrierung und Pufferwechsel von Proteinlösungen	40
2.24.1	Konzentrierung von Proteinlösungen.....	40
2.24.2	Dialyse	40
2.25	Bestimmung von bakteriellem Endotoxin mittels Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Methodensammlung Rhein Biotech GmbH)	40
2.26	Immunpräzipitation.....	41
2.26.1	Immunpräzipitation mit löslichen Fraktionen aus <i>H. polymorpha</i>	41
2.26.2	(Hot)-Co-Präzipitation von Proteinkomplexen aus Säugetierzellen (Methodensammlung R. Schirmbeck)	42
2.27	Immunisierung von Mäusen (Methodensammlung R. Schirmbeck)	42
2.28	Bestimmung der Antikörperantwort (Methodensammlung R. Schirmbeck)	43
2.28.1	Titerbestimmung mittels ELISA	43
2.29	Bestimmung der CTL-Antwort (Methodensammlung R. Schirmbeck).....	43
2.29.1	Präparation von Milzzellen aus der Maus.....	43
2.29.2	Bestimmung der CTL-Frequenz	43
2.30	Transiente Transfektion von Zellen mit DNA (Methodensammlung R. Schirmbeck).....	44
2.31	Bioinformatik.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Analyse der Interaktion der DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ aus SV 40 mit Hsp70 in <i>H. polymorpha</i>	45
3.2	Suche nach DnaJ-ähnlichen Domänen in <i>H. polymorpha</i> mit Hilfe von Homologie-Vergleichen.....	47
3.3	Konstruktion von <i>H. polymorpha</i> Expressionsplasmiden für Fusionsproteine mit DnaJ-ähnlichen Domänen.....	48
3.4	Analysen zur Assoziation von ORF12-, -16- und -313-DnaJ-Domänen mit <i>H. polymorpha</i> Hsp70-Chaperonen <i>in vivo</i>.....	49
3.4.1	Interaktion von co-exprimierten Hsp70-Chaperonen und Fusionsproteinen mit einer DnaJ-ähnlichen Domäne aus <i>H. polymorpha</i>	51
3.4.1.1	Konstruktion von Stämmen mit erhöhter Hsp70-Genexpression für die Co-Expression mit dem ORF313-Fusionsprotein	51
3.4.1.2	Analysen zur Assoziation des ORF313-Fusionsproteins mit Hsp70-Proteinen in <i>H. polymorpha</i> Stämmen mit erhöhter Genexpression von Hsp70-1 oder Hsp70-2.....	52
3.5	Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit der DnaJ-ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins ist unabhängig vom fusionierten Zielprotein.....	54
3.6	Analysen zur Interaktion von ST-ORF313-GFP und heterologem Hsp70-1-H6 nach Aufreinigung über Streptactin-Sephrose	55
3.6.1	Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels RP-HPLC.....	55
3.6.2	Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels Size Exclusion Chromatographie (SEC) – Lightscatter.....	57
3.6.3	Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels zweifacher Aufreinigung über Affinitätschromatographie	58
3.7	Komplexierung von Hsp70-Chaperonen aus <i>H. polymorpha</i> mit dem ORF313-Fusionsprotein in Abhängigkeit von ATP	60

3.8	Modifikation des HPD-Motivs der DnaJ-ähnlichen Domäne von ORF313	61
3.8.1	Erzeugung einer Punktmutation im konservierten HPD-Bindemotiv der DnaJ-ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins in <i>H. polymorpha</i> durch gezielte PCR-Mutagenese	62
3.8.2	Analysen zur Assoziation von Hsp70-Chaperonen mit dem Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP	63
3.9	Analysen zur Assoziation von Fusionsprotein und Hsp70 aus <i>H. polymorpha</i> <i>in vitro</i>	64
3.10	Analysen zur Interaktion von humanem Hsp73 mit dem ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP-Fusionsprotein in <i>H. polymorpha</i>	65
3.11	Analysen zum Einfluss der Hsp70-Interaktion auf die Stabilität von DnaJ-Fusionsproteinen in <i>H. polymorpha</i>	66
3.12	Analysen zur Assoziation von Hsp73 mit Fusionsproteinen mit DnaJ-ähnlichen Domänen aus <i>H. polymorpha</i> in Säugetierzellen <i>in vivo</i>	69
3.13	Fermentation und Aufarbeitung verschiedener <i>H. polymorpha</i> HP102 Stämme zur Herstellung größerer Mengen an Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen70	
3.13.1	Biomasseverläufe der Fermentationen 1 und 2	71
3.13.2	Produktbildungsverläufe der Fermentationen 1 und 2	72
3.13.3	Aufarbeitung von Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen mittels Hochdruckhomogenisation und Fraktionssammelsystem	74
3.14	Untersuchungen zur Stabilität von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen aus <i>H. polymorpha</i>	75
3.14.1	Stabilität von ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in Abhängigkeit von pH und Temperatur	75
3.14.2	Stabilität von ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in PBS pH 7,4 in Abhängigkeit von der Zeit	76
3.14.3	Analysen zur Stabilität der Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe	77
3.15	Adjuvanswirkung von <i>H. polymorpha</i> Hsp70-1	80
3.15.1	Bestimmung der Antikörpertiter von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen aus immunisierten Mäusen mittels ELISA	82
3.15.2	Bestimmung der cytotoxischen T-Zellantwort auf Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe mittels FCM-Analyse	83
4	Diskussion	85
4.1	<i>H. polymorpha</i> ist ein geeigneter Modellorganismus für die Herstellung von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen	85
4.1.1	Hsp70 und DnaJ-Domänen müssen für eine Interaktion in <i>H. polymorpha</i> kompatibel sein	86
4.1.2	Fusionsproteine mit <i>H. polymorpha</i> -eigenen DnaJ-ähnlichen Domänen interagieren mit Hsp70-Proteinen aus <i>H. polymorpha</i>	88
4.2	Stabilisierung von Proteinen durch eine Interaktion mit Hsp70 in <i>H. polymorpha</i>	92
4.3	<i>H. polymorpha</i> Hsp70-1 zeigt im Komplex mit ORF313-Fusionsproteinen eine adjuvante Wirkung	93
5	Zusammenfassung	97
6	Referenzen	99

Eidesstattliche Erklärung	107
Danksagung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp / kb	Basenpaar / Kilobasen(Paar)
BSA	„Bovine Serum Albumin“
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy-
C°	Grad Celsius
CD8 ⁺	T-Zellen mit einem CD8-Oberflächenprotein (CD8 - transmembranes Glykoprotein)
CD4 ⁺	T-Zellen mit einem CD4-Oberflächenprotein (CD4 - transmembranes Glykoprotein)
CHO	Chinese Hamster Ovary
kDa	Kilodalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EAg	Hepatitis B E-Antigen
FMD	Formiatdehydrogenase
Flu	Influenza Epitop
g	Gramm
h	Stunde
His-Tag (H6)	6x Histidin-Tag
HBV	Hepatitis B-Virus
HEK	human embryonic kidney cells
Hsp	Heat shock protein (Hitzeschockprotein)
k	Kilo
l / L	Liter
LB	„lysogeny broth“
M	Molar
MHC	„Major Histocompatibility Complex“
min	Minute
MOX	Methanoloxidase
µg	Mikrogramm
N-	Amino-
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
pH	negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PI2	Polylinker 2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Partialdruck Sauerstoff
Pr.	Promotor
RP-HPLC	Reverse Phase „High Performance Liquid Chromatography“
rpm	Umdrehung pro Minute

RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatographie
SIII	kleines Oberflächenanigen des Hepatitis B-Virus
s.o.	siehe oben
ST	Strep-tag
SYN 6	synthetisches Medium
T ₂₋₇₇	DnaJ-ähnliche Domäne des Tumorantigen aus SV40
Tab.	Tabelle
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polysorbate
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
w/v	„weight per volume“
w/w	„weight per weight“
YNB	„Yeast Nitrogen Base“
YPD	Vollmedium
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Molekulare Chaperone sind hochkonservierte Moleküle, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vorkommen und in verschiedenen Zellkompartimenten, wie dem Zytosol, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), Mitochondrien und Chloroplasten zu finden sind (Hartl, 1996). Die Rollen der molekularen Chaperone sind mannigfaltig, und ihre Funktionen werden durch neue Entdeckungen Jahr um Jahr erweitert. Chaperone sind hauptsächlich in der *de novo* Proteinfaltung involviert, indem sie irreversible Aggregate nicht-nativer Proteine verhindern oder Proteine bei ihrem Faltungsprozess und der Assemblierung von Proteinkomplexen unterstützen. Neben diesen Funktionen spielen Chaperone Rollen in verschiedenen anderen zellulären Prozessen. Sie halten Proteine in einer nichtgefalteten Konformation, um Translokation durch eine Membran zu ermöglichen und sind im Protein-Targeting und der Signaltransduktion involviert (Ellis, 2000). Bei irreversibler Missfaltung und Aggregation, die durch umweltbedingten Stress oder Krankheit verursacht wurden, agieren Chaperone als Sensoren, die die Proteine dem Ubiquitin-Proteasom-System zuführen oder die die Apoptose der Zelle einleiten. Demnach interagieren die meisten, wenn nicht alle zellulären Proteine, wenigstens einmal in ihrem Lebenszyklus mit Chaperonen.

Der Definition nach sind Chaperone Proteine, die vorübergehend mit einem Substratprotein interagieren, aber nicht Bestandteil der finalen Struktur sind. Die Interaktion von Chaperon und Substrat erfolgt über exponierte hydrophobe Abschnitte des Substrats, wodurch Fehlfaltungen und Aggregation des Substratproteins verhindert werden (Dobson *et al.*, 1998). Dies kann co-translational oder bei bereits fehlgefalteten Polypeptiden geschehen. Bindung und Freisetzung von Polypeptidsubstraten erfolgt durch eine ATP-vermittelte Konformationsänderung der Chaperone, welche sich mehrfach wiederholen kann, bis das Polypeptid korrekt gefaltet ist. Da langsam faltende Proteine eine Tendenz zur Aggregation haben (10-30% aller bakteriellen Proteine), ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Chaperone die Proteinfaltung unterstützen. Demnach erfolgt die Faltung großer Proteine mit Hilfe der Chaperonsysteme, kleine Proteine bilden ihre Struktur hingegen spontan.

Polissi *et al.* identifizierten zwei strukturell nicht verwandte Chaperon-Klassen: 1. Die Familie der Hsp90 und Hsp90-verwandten Proteine. Beide Familien unterstützen die Proteinfaltung und aktivieren spezielle Signalmoleküle wie Kinasen und Hormonbinderezeptoren. 2. Chaperonine (inklusive der Hsp60 Proteinfamilie) und die Hsp70/Hsp40 Familie der Co-Chaperone. Sie sind ebenfalls in der Proteinfaltung involviert und sind bedeutend bei zellulärem Stress, der durch extreme Temperaturen oder chemotoxische Agenzien, die zur Denaturierung der tertiären Struktur führen, verursacht werden.

Im Folgenden wird nur das Hsp70-Chaperon-System mit seinem Co-Faktor Hsp40 detailliert beschrieben.

1.1 Das Hsp70-Chaperon System

Zunächst wird eine kurze Übersicht über das Hsp70-Chaperon und seine Funktionen gegeben. Anschließend folgt eine detaillierte Beschreibung der Struktur und des molekularen Mechanismus der Hsp70-Funktion.

1.1.1 Hsp70-Chaperone

Die 70 kDa-Hitzeschockproteine (Hsp70) sind in allen Organismen mit mindestens 45% Sequenzübereinstimmung am stärksten konserviert und machen 1-2% des Gesamtproteins einer Zelle aus (Bukau & Horwich, 1998; Herendeen *et al.*, 1979). Die biologische Funktion von Hsp70-

Chaperonen ist umfangreich: sie sind in der Proteinfaltung und Entfaltung für den Transport durch Membranen und dem Signalisieren von Hitzeschock involviert und dienen als Motor für die Translokation von Proteinen. Es gibt zwei Varianten von Hsp70: Eine, die konstitutiv in der Zelle exprimiert wird und eine, deren Synthese bei Stress induziert wird. Die unterschiedlichen Formen von Hsp70 sind im Zytosol, im ER und in Mitochondrien zu finden. Die Chaperonaktivität, mit der 70 kDa-Hitzeschockproteine die Proteinfaltung unterstützen, basiert auf der Fähigkeit, mit kurzen linearen Polypeptiden zu assoziieren. Die Bindung und Freisetzung von Substrat ist ATP-abhängig und wird durch das Co-Chaperon Hsp40 reguliert (Fink, 1999).

1.1.2 Die Struktur von Hsp70

Hsp70-Chaperone bestehen aus einer N-terminalen, 44 kDa Nukleotidbindedomäne (NBD) mit schwacher intrinsischer ATPase-Aktivität und einer C-terminalen 28 kDa-Substratbindedomäne (SBD), die beide für die Funktion des Proteins essentiell sind (Abb. 1.1 A und 1.1 B). Beide Domänen sind innerhalb der Hsp70-Familie stark konserviert und sind jeweils durch einen exponierten Linker miteinander verbunden (Jiang *et al.*, 2005). Die Substratbindedomäne wird in zwei Subdomänen unterteilt: Eine stark konservierte, für die Funktion wichtige 18 kDa-Domäne und eine C-terminale variable 10 kDa-Domäne, die zwar für die Chaperonfunktion keine Rolle spielt, jedoch für die Oligomerisierung bedeutend ist (Young *et al.*, 2003).

Durch die Bindung von ATP an die Nukleotidbindedomäne, eine ATPase-Domäne, wird ein Signal übertragen, wodurch eine Konformationsänderung in der Substratbindedomäne ausgelöst wird. Dabei öffnet sich offenbar der helikale Deckel, der die Substratbindetasche verschließt, sodass eine Substratfreisetzung von Hsp70 ermöglicht wird (Hightower *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996). Jiang *et al.* (2005 & 2006) ist es erstmals gelungen, die Kristallstruktur von intaktem Hsp70 aus dem Rind (Hsc70), zu bestimmen. Die Struktur der Nukleotidbindedomäne von DnaK, dem Hsp70-Homolog aus *E. coli*, konnte schon zuvor (1990) von Flaherty *et al.* aufgeklärt werden. Die Nukleotidbindedomäne von Hsp70 besteht aus zwei großen Subdomänen (I und II), die jeweils in zwei weitere kleine Domänen (A und B) unterteilt werden (Abb. 1.1 C). Die Domänen IA und IIA sind in ihrer Topologie identisch. Sie bestehen jeweils aus einer zentralen 5fach β -Faltblattstruktur, die in eine zweite 3fach antiparallele β -Faltblattstruktur übergeht (Abb. 1.1 C). Der Aufbau der Domänen IB und IIB beruht auf einer $\alpha\beta\alpha$ -Struktur. Die Domänen I (A und B) und II (A und B) sind durch eine Nukleotidbindungsfurche separiert, in die ATP, komplexiert mit Mg^{2+} , zwei K^+ -Ionen und P_i , bindet und dabei alle vier kleinen Subdomänen kontaktiert (Abb. 1.1 C). Röntgenstrukturanalysen der ATPase Domäne von Hsc70 aus dem Rind, gebunden an verschiedene Adenosinnukleotide, haben gezeigt, dass sich die Nukleotidbindestelle in der hydrophoben Adenosinbindetasche zwischen zwei β und γ -Phosphatbindeschlaufen befindet (Flaherty *et al.*, 1990). Durch die hohe Flexibilität der ATPase-Domäne ergibt sich ein Öffnen und Schließen der Nukleotidbindungsfurche, wenn sich die Subdomänen aufeinander zu- oder voneinander fortbewegen (Zang & Zuiderweg, 2004).

Zhu *et al.* (1996) lösten mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen die Struktur der Substratbindedomäne von DnaK auf (Abb. 1.1 D). Sie setzt sich aus einem Sandwich bestehend aus zwei jeweils 4-strängigen β -Faltblattmotiven mit vier nach oben ragenden Schleifen (zwei innere und zwei äußere Schleifen) sowie fünf C-terminalen α -Helices A-E zusammen. Die α -Helices A und B befinden sich in räumlicher Nähe zu den inneren Schleifen $L_{1,2}$ und $L_{4,5}$. Helix B formt eine Art Deckel, der die Substratbindestelle mit Hilfe der äußeren Schleifen $L_{3,4}$ und $L_{5,6}$ über Wasserstoff- und Salzbrücken verschließen oder offen legen kann. Die Funktion des hydrophoben Bogens, bestehend aus dem C-terminalen Bereich der Helix B und den α -Helices C, D, und E ist nicht bekannt. Bei zytosolischem Hsp70 befindet sich am äußersten C-Terminus ein konserviertes EEVD-Motiv, welches Einfluss auf die ATPase-Aktivität und die Interaktion mit Substratpeptiden hat (Freeman *et al.*, 1995).

Der Linker, der die Nukleotidbindedomäne und die Substratbindedomäne miteinander verbindet, hat zwei mögliche Konformationen: eine, in der er nach außen ragt und eine in der er nach innen ragt, wobei er in räumlicher Nähe zum hydrophoben Bogen liegt (Zhu *et al.* 1996; Wang *et al.*, 1998).

Letztere Konformation ist im ATP-gebundenen Zustand von Hsp70 zu beobachten, was darauf hindeutet, dass ATP den Linker vor Proteolyse schützt (Buchberger *et al.*, 1995; Wie *et al.*, 1995). Es wurde, basierend auf *in vitro* Studien, postuliert, dass Kar2, ein Hsp70-Homolog aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) von *Saccharomyces cerevisiae*, Substrate nicht spezifisch bindet. Kar2 würde vielmehr als eine Art „Fänger“ agieren, der, nach ATPase-Stimulierung durch das DnaJ-Homolog Sec63, Peptide unspezifisch bindet (Misselwitz *et al.*, 1998; Matlack *et al.*, 1999). Dem gegenüber stehen Beobachtungen, dass DnaK (das Hsp70-Homolog aus *E. coli*) Substrate spezifisch bindet. Dabei beeinflusst die Substratspezifität von DnaK die Effizienz der ATP-Hydrolyse auch in Gegenwart von DnaJ Proteinen (Mayer *et al.*, 2000).

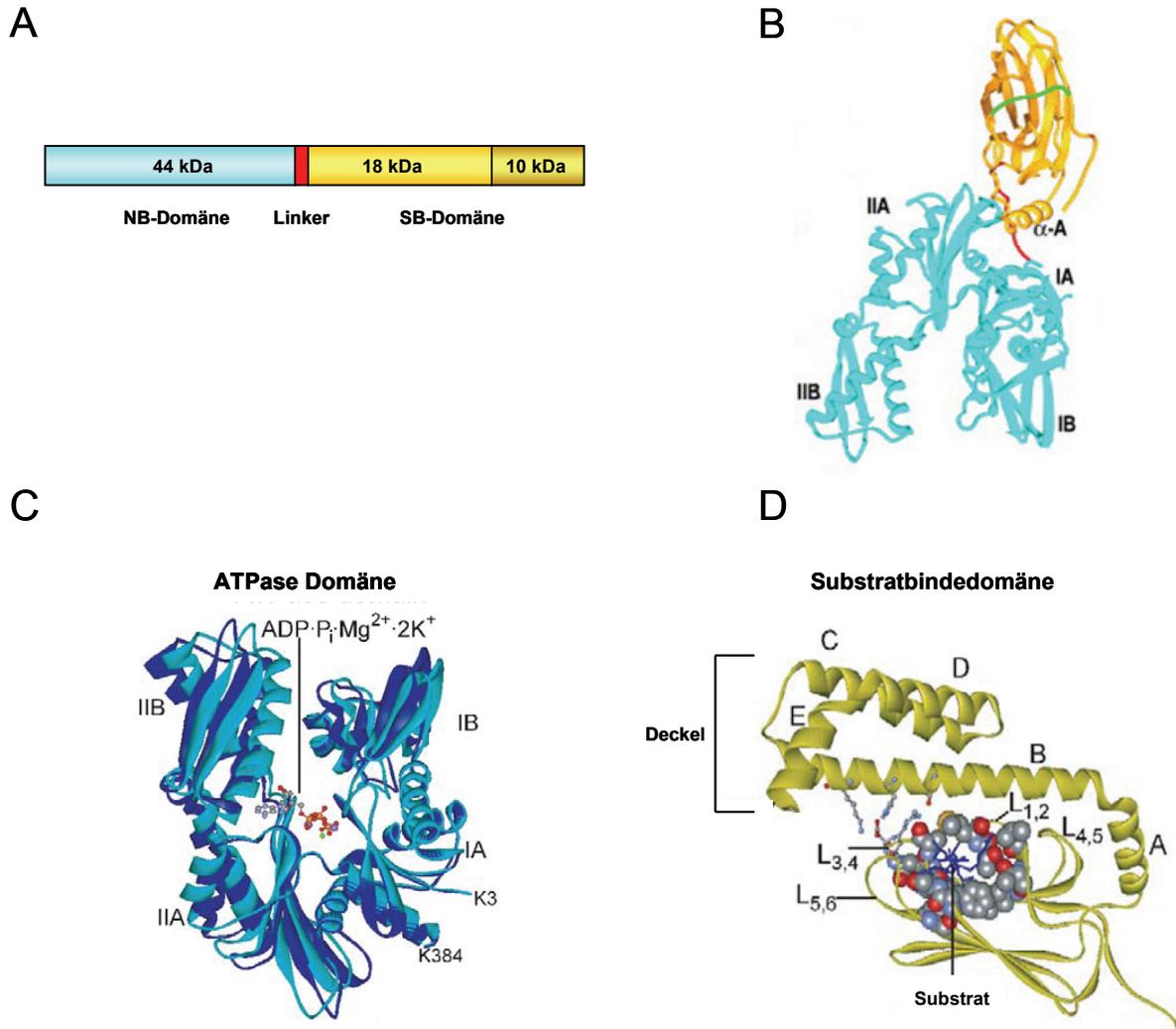


Abbildung 1.1
Struktur von Hsp70

A. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Domänen von Hsp70. Nukleotidbindedomäne (NB-Domäne) (auch als ATPase-Domäne bezeichnet); Substratbindedomäne (SB-Domäne). **B.** Struktur einer C-terminal verkürzten Form von Hsc70 aus dem Rind (Jiang *et al.*, 2005). Die ATPase-Domäne ist in blau, die Substratbindedomäne in gelb, der Linker in rot und die AS 539-544, welche die Substratbindestelle anzeigen, in grün dargestellt. **C.** Aufbau der ATPase-Domäne von Rinder Hsc70 mit den Subdomänen IA, IIA, IB und IIB, die eine Nukleotidbindetasche formen (Mayer & Bukau, 2005). Die Sekundärstruktur ist mit gebundenem ADP, Mg^{2+} und anorganischem Phosphat dargestellt. **D.** Substratbindedomäne von *E. coli* DnaK mit gebundenem (synthetischem) Substrat (Mayer & Bukau, 2005). Die Substratbindedomäne ist in gelb, das Substrat in blau dargestellt.

1.1.3 Der molekulare Mechanismus der Hsp70-Funktion

Der molekulare Mechanismus, mit dem Hsp70-Chaperone an lineare, hydrophobe Peptidsequenzen binden, ist ATP-abhängig (Szabo *et al.*, 1996). In ATP gebundener Form besitzen Hsp70-Proteine eine schwache Affinität zum Substrat und eine hohe Dissoziationsrate. Durch die Hydrolyse von ATP zu ADP verringert sich die Dissoziationsrate und die Affinität zum Substrat verstärkt sich, weil die Schließung der Substratbindestelle initiiert wird und das Substrat nicht mehr dissoziieren kann. Die ATP-Hydrolyse ist somit der limitierende Faktor im ATP-Zyklus der Hsp70-Chaperone (Ha *et al.*, 1999). Die Bindung von Klient-Proteinen stimuliert die intrinsische ATPase-Aktivität von Hsp70 zwei- bis zehnfach, was jedoch noch nicht ausreicht, um einen kontinuierlichen ATP-Zyklus voranzutreiben. Für eine adäquate Stimulierung der ATPase-Aktivität sorgt erst das Co-Chaperon Hsp40 (DnaJ in *E. coli*), welches die ATP-Hydrolyse von Hsp70 um mehr als 1000-fach anregt (Karzei & McMacken, 1996; Laufen *et al.* 1999; Liberick *et al.* 1991). Bindet nun ATP erneut in der Nukleotidbindestelle, so verändert sich die Konformation von Hsp70, und das gebundene Substrat wird freigesetzt (Palleros *et al.*, 1993; Ha *et al.*, 1999). Die Freisetzung der Klient-Proteine wird zusätzlich durch Nukleotidaustauschfaktoren beschleunigt (Flynn *et al.*, 1989; Jordan & McMacken, 1995; McCarty *et al.*, 1995).

1.2 Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus durch Co-Chaperone

Die Aktivität des Hsp70-Chaperons ist stark reguliert und, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, von ATP-Bindung und Hydrolyse abhängig. Die Regulation des Hsp70-Reaktionszyklus erfolgt durch das Co-Chaperon Hsp40 zusammen mit Nukleotidaustauschfaktoren. Im Folgenden wird auf Hsp40 und die Funktion der Nukleotidaustauschfaktoren näher eingegangen.

1.2.1 Hsp40-Chaperone

Die Chaperone der Hsp40- oder auch DnaJ-Familie sind wie die Hsp70-Chaperone in fast allen Organismen vertreten und umfassen mehr als 100 Mitglieder (Laufen *et al.*, 1999). Sie werden anhand der hoch konservierten J-Domäne definiert. Hsp40 ist hauptsächlich das Co-Chaperon von Hsp70 und beeinflusst den limitierenden Schritt des Hsp70-Reaktionszykluses, indem es die ATPase-Aktivität stimuliert (Hendershot, 1996; McCarty *et al.*, 1995). Demzufolge ist Hsp40 wichtig für die Faltung, die Assemblierung und die Translokation von Proteinen. In Hefe ist Hsp40 zusätzlich notwendig für eine selektive Ubiquitin-abhängige Degradation von abnormal gefalteten Proteinen (Lee *et al.*, 1996). Hsp40 kann einerseits an bereits gebildete Hsp70/Substrat-Komplexe binden und diese stabilisieren, indem es die ATP-Hydrolyse stimuliert. Andererseits kann Hsp40 selbst mit hydrophoben Seitenketten nicht-nativer Polypeptide interagieren und deren Aggregation verhindern. Anschließend präsentiert Hsp40 Klient-Proteine an die Hsp70 Substratbindestelle, wo diese nachfolgend korrekt gefaltet werden.

1.2.2 Die Struktur von Hsp40

Die 40 kDa-Hitzeschockproteine (Hsp40) setzen sich aus vier konservierten Regionen mit potentiellen funktionalen Domänen zusammen (Abb. 1.2 A): die N-terminale J-Domäne, welche über eine Glyzin- und Phenylalanin (G/F) -reiche Region mit einer Domäne mit unbekannter Funktion verbunden ist, gefolgt von einer Cystein-reichen Region mit zwei Zink-Finger-Motiven und einer C-terminalen Region mit wiederum unbekannter Funktion. Anhand des Vorhandenseins oder Fehlens dieser Motive werden die Hsp40-Chaperone (J-Proteine) in drei unterschiedliche Klassen eingeteilt (Cheetham & Caplan, 1998). Hsp40-ähnliche Proteine vom Typ I haben Analogien zum *E. coli* Hsp40 (DnaJ), bei dem alle

drei wichtigen Motive (J-Domäne und G/F- und Cystein-reiche Regionen) präsent sind. Hsp40-Chaperone des Typs II bestehen aus der J-Domäne und der G/F-reichen Region, während die Cystein-reiche Region fehlt. Typ III hat nur die J-Domäne mit *E. coli* DnaJ gemeinsam (siehe Abb. 1.2 A). Die J-Domäne und die G/F-reiche Region sind für eine Interaktion mit Hsp70 und die Stimulierung der ATPase-Aktivität nötig. Letztere moduliert zudem die Substratbindeaktivität von Hsp70. Über das Zink-Finger-Motiv und die C-terminale Region interagieren die J-Proteine mit nicht-nativen Polypeptiden.

Es wird angenommen, dass die J-Domäne (Abb. 1.2 B) die Hauptbindestelle ist, die für eine Interaktion mit Hsp70 benötigt wird (Corsi & Schekman, 1997; Landry, 2003; Wittung-Stafshede *et al.*, 2003). Sie wird aus vier α -Helices (Helices I-IV) gebildet. Zwischen Helix II und Helix III befindet sich eine Schleife mit dem invarianten Tripeptid Histidin, Prolin und Aspartat (HPD-Motiv) (Qian *et al.*, 1996). Die Helix-Struktur der J-Domäne ist flexibel und ein Schlüssel-Schloß-Prinzip wurde für die Interaktion der J-Domäne mit Hsp70-Partnern postuliert. Das HPD-Motiv spielt bei diesem Prinzip eine entscheidene Rolle indem es die Orientierung der positiv geladenen Reste der Helix II unterstützt, so dass diese mit den negativ geladenen Resten der ATPase-Domäne von Hsp70 interagieren kann (Huang *et al.*, 1999; Berjanskii *et al.*, 2002; Landry, 2003). Studien, bei denen die Bindung von J-Proteinen an Hsp70 inhibiert wurde, deuten darauf hin, dass die minimale Region, die für eine Bindung von Hsp40 an Hsp70 benötigt wird, die Aminosäuren 2-35 der J-Domäne umfasst, welche die Helices I und II und das HPD-Motiv beinhalten (Tsai & Douglas, 1996; Greene *et al.*, 1998). Im Vergleich zu verkürzten Varianten interagiert die vollständige J-Domäne am effektivsten mit Hsp70 (Lu & Cyr, 1998). Ein Austausch einzelner Aminosäuren des HPD-Motivs unterdrückt eine Interaktion mit Hsp70 und hebt die Stimulierung der ATPase-Aktivität durch Hsp40 auf (Tsai & Douglas, 1996; Mayer *et al.*, 1999; Kluck *et al.*, 2002). Helix IV trägt ein QKRAA Motiv, das als mögliche Interaktionsstelle von DnaJ mit der Peptidbindestelle von DnaK (*E. coli*-Hsp70) identifiziert wurde (Suh *et al.*, 1999).

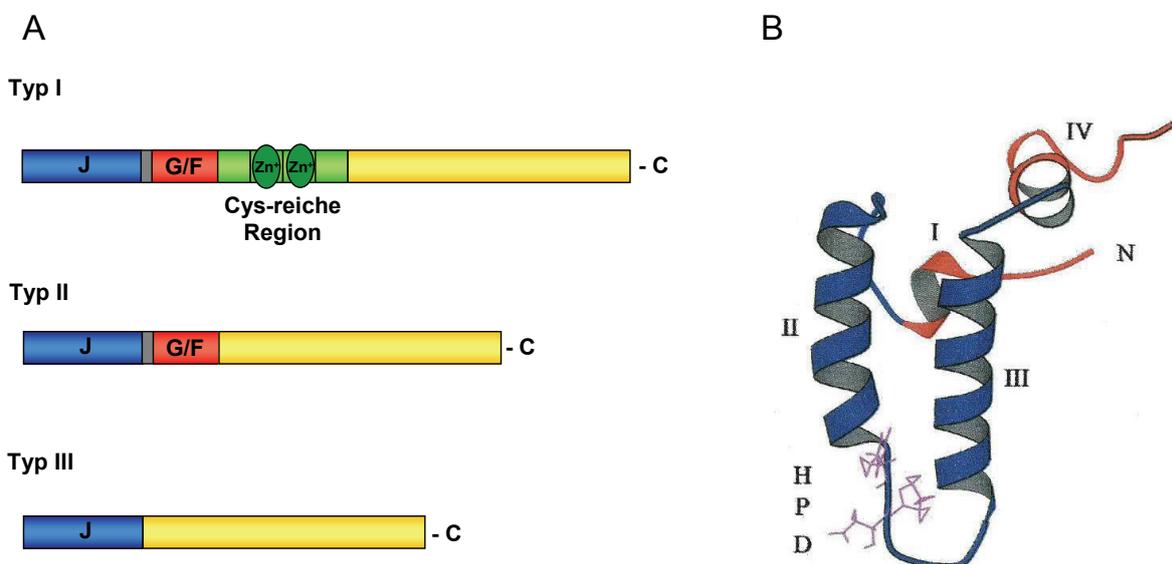


Abbildung 1.2
Struktur von Hsp40

A. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der drei Hsp40-Klassen (nach Cheetman & Caplan, 1998). J= J-Domäne (blau), G/F=Gly/Phe reiche Region (rot), C-terminale Region (gelb); C = C-Terminus.

B. Struktur der DnaJ-Domäne von *E. coli* DnaJ (Hennessy *et al.*, 2005; Pellechia *et al.*, 1996). Das konservierte HPD-Motiv ist in violett, die vier Helices in blau/rot dargestellt.

1.2.3 Nukleotidaustauschfaktoren

Nachdem Hsp40 die ATP-Hydrolyse von Substrat-gebundenen Hsp70 stimuliert hat, dissoziiert Hsp40 von dem tertiären Komplex. Ein weiterer limitierender Faktor für den Hsp70-Reaktionszyklus ist nun die Substratfreisetzung, die durch den Austausch von ADP gegen ATP reguliert wird. Damit ADP ausgetauscht werden kann, muss sich die Nukleotidbindungsfurche öffnen. Diese Konformationsänderung von Hsp70 wird durch Nukleotidaustauschfaktoren initiiert, wodurch eine erneute Bindung von ATP an Hsp70 möglich ist. Die Bindung von ATP hat die Freisetzung von gebundenem Substrat zur Folge. Der Hsp70 Reaktionszyklus kann von neuem beginnen (siehe Abb. 1.3) (Mayer & Bukau, 2005).

Die am besten charakterisierten Nukleotidaustauschfaktoren sind GrpE aus *E. coli* und Bag-1 aus dem Rind. Obwohl sich die beiden Nukleotidaustauschfaktoren, GrpE und Bag-1, in ihrer Struktur und ihrem Mechanismus unterscheiden, bewirken sie beide eine Rotation der IIB-Untereinheit ihrer jeweiligen Zielchaperone um 14° nach außen (Harrison *et al.*, 1997; Sondermann *et al.*, 2001; Briknarova *et al.*, 2001). Die Interaktion von GrpE mit DnaK verringert die Affinität von DnaK zu ADP und beschleunigt dadurch den Nukleotidaustausch (Packschies *et al.*, 1997). Darüber hinaus stabilisiert GrpE die offene Konformation der Nukleotidbindungsfurche, was eine schnelle Bindung von ATP an DnaK fördert (Gässler *et al.*, 2001; Brehmer *et al.*, 2001). In Eukaryonten existieren GrpE-Homologe nur in den Mitochondrien, nicht aber im Zytosol (Schumacher *et al.*, 1996; Bolliger *et al.*, 1994). In Hefe wurden die Nukleotidaustauschfaktoren Fes1 (Zytosol) und Sil1p (ER) beschrieben. Dragovic *et al.* (2006) konnten zeigen, dass Fes1 essentiell für die Proteinfaltung ist.

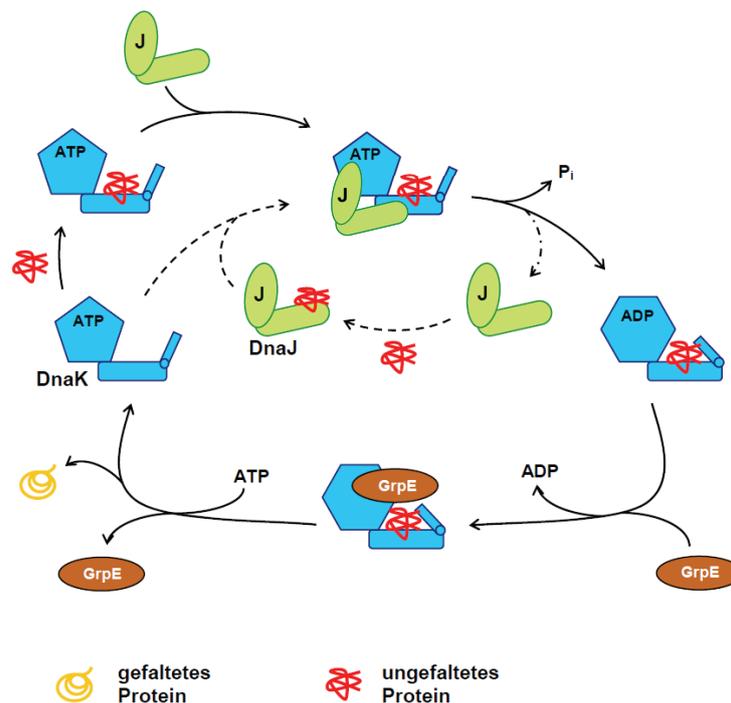


Abbildung 1.3
Schematische Darstellung des Chaperonzyklus von DnaK/DnaJ/GrpE

Ungefaltete Proteine binden entweder direkt an DnaK oder werden mit Hilfe von DnaJ auf DnaK übertragen. DnaK muss in beiden Fällen in ATP-gebundener Form vorliegen. Das Co-Chaperon DnaJ bindet an die ATPase-Domäne von DnaK und stimuliert dessen ATP-Hydrolyse. Die daraus resultierende Konformationsänderung der Substratbindedomäne von DnaK führt zu einer Stabilisierung des DnaK/Substratkomplexes und der Dissoziation von DnaJ. Die Substratfreisetzung wird durch die Bindung des Nukleotidaustauschfaktors GrpE initiiert, der die Ablösung von ADP bewirkt. Dies ermöglicht eine erneute Bindung von ATP an DnaK, wodurch die Substratbindungsfurche geöffnet wird und es zur Substratfreigabe kommt. Ist das Substrat noch nicht korrekt gefaltet, wiederholt sich der Zyklus (Darstellung aus Weitzmann, 2006).

1.2.4 Spezifität der Hsp70/Hsp40 Interaktion

Zahlreiche Austauschexperimente, bei denen in Hsp40 unterschiedliche J-Domänen eingesetzt wurden, haben gezeigt, dass nicht alle Hsp40-Proteine mit allen Hsp70-Proteinen in effizienter Weise interagieren können (Deloche *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1995). In bestimmten Fällen scheint Hsp70 nur mit einem einzigen J-Protein interagieren zu können. Ssz1, das zytosolische Hsp70 in Hefe, welches mit Ribosomen assoziiert ist, interagiert zum Beispiel ausschließlich mit dem J-Protein Zuo1. Die Hefe Hsp70-Proteine Ssa1 und Ssa2, welche ebenfalls mit Ribosomen assoziiert sind, interagieren dagegen nicht mit Zuo1 (Craig *et al.* 2003), dafür aber mit allen anderen zytosolischen J-Proteinen. Des Weiteren können J-Domänen aus einem Organismus mitunter die Funktion einer J-Domäne eines anderen Organismus ersetzen. Dies wurde für die Hsp40-Proteine Mdj1 (aus Hefe) und DnaJ (aus *E. coli*) gezeigt (Deloche *et al.*, 1997).

1.3 Das Hsp70/Hsp40-System in Hefen und in Säugetieren

Im Folgenden werden die Komponenten des Hsp70/Hsp40-Systems in Hefe näher beschrieben. Im speziellen werden die Unterschiede der Protein-Klassen des Hsp70/Hsp40-Systems der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* zu der methylo-trophen Hefe *Hansenula polymorpha*, mit der im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde, aufgezeigt. Abschließend wird ein Überblick über die einzelnen Klassen des Systems in Säugetieren gegeben.

1.3.1 Das Hsp70/Hsp40-System in *Saccharomyces cerevisiae*

In *S. cerevisiae* setzt sich das Hsp70/Hsp40-Chaperonsystem aus 14 Mitgliedern der Familie der Hsp70-Chaperone und 22 Hsp40-Proteinen zusammen, die jeweils eine der drei Typen der konservierten J-Domäne tragen (siehe Abb. 2B). Die Hsp70-Proteine werden nach dem Grad der Homologie in zwei Hauptgruppen unterteilt (Tab. 1.1): Gruppe 1 besteht aus den Unterfamilien Ssa (Ssa1, -2, -3 und -4), Ssb (Ssb1 und Ssb2), Ssc und Kar2; Gruppe 2 setzt sich aus den Unterfamilien Sse (Sse1 und Sse2), Ssh1 und Lhs1 zusammen. In der ersten Gruppe weisen die Proteine der einzelnen Unterfamilien eine Sequenzidentität auf Aminosäureebene von bis zu 99% auf. Die der zweiten Gruppe hingegen haben zu der ersten Gruppe mit 25-30% Identität nur eine entfernte Homologie. Ssz1 kann keiner der beiden Hauptgruppen zugeordnet werden. Weder die ATPase- noch die Substratbindedomäne scheint im Vergleich zu den anderen Hsp70-Proteinen für die Funktion eine Rolle zu spielen (Hallstrom *et al.*, 1998).

Die Proteine der Ssa- und der Ssb-Familien sind zytosolische Hsp70-Chaperone. Obwohl sie auf Aminosäureebene zu 60% identisch sind, können die Proteine der einen Familie die Proteine der anderen Familie nicht substituieren (Boorstein *et al.*, 1994). Die Ssa-Protein-Familie ist für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell, wobei die Anwesenheit von einem der vier Proteine ausreichend ist. Ssa1 und Ssa2 werden konstitutiv in der Zelle exprimiert, die Synthese von Ssa3 und Ssa4 ist Hitze-induzierbar (Werner-Washburne *et al.*, 1987). Ssa1-4 ist entscheidend für die Faltung und Membrantranslokation von naszierenden Peptiden, den nuklearen Import, die Formation der Mikrotubuli und die Antwort auf Hitzestress (Boorstein *et al.*, 1994; Stone & Craig, 1990; Shulga *et al.*, 1996; Oka *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Die Proteine der Ssb-Familie sind mit Ribosomen assoziiert und binden an naszierende Peptide während der Translation (Pfund *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1992). Sie sind für die Zelle nicht essentiell, jedoch resultiert die Doppeldeletion in einen Kälte-sensitiven Phänotyp (Nelson *et al.*, 1992).

Das Hsp40-Chaperon Ydj1 interagiert mit den Proteinen Ssa1/2 und stimuliert deren ATPase-Aktivität. Es ist somit in die Faltung nicht-nativer Proteine involviert (Brodsky *et al.*, 1998; Lu & Cyr, 1998). Ydj1 ist nicht essentiell, wird aber für ein normales Wachstum benötigt (Caplan *et al.*, 1991). Das Fehlen von Ydj1 kann durch das Typ II J-Protein Sis1 komplementiert werden (Jones *et al.*, 2000), von dem auf Grund seiner Ribosomenassoziation vermutet wird, dass es seine Funktion zusammen mit Ssb-Proteinen ausübt (James *et al.*, 1997). Sis1 stimuliert nicht die ATPase-Aktivität von Ssb-Proteinen, jedoch die von Ssa-Proteinen (Lu & Cyr, 1998). Das Protein Ssa1 interagiert darüber hinaus mit dem Nukleotidaustauschfaktor Fes1 (Kabani *et al.*, 2002). Fes1 ist ein zytosolisches Homolog von Sls1, für das gezeigt wurde, dass es als Nukleotidaustauschfaktor von BiP aus Hefe fungiert (Kabani *et al.*, 2000). Es ist Spezies-spezifisch und inhibiert die Ydj1-vermittelte Aktivierung der Ssa1 ATPase-Aktivität (Kabani *et al.*, 2002).

Das mitochondrielle Protein Ssc1 ist bedeutend für die Faltung und den Import von Proteinen in die Matrix der Mitochondrien. Seine ATPase-Aktivität wird von dem Typ I J-Protein Mdj1 und Pam18 stimuliert (Neupert, 1997, Wiedemann *et al.*, 2004). Die Stimulierung durch Pam18 regt die Proteintranslokation an (Wiedemann *et al.*, 2004). Das gut untersuchte membranständige Typ III J-Protein Sec63 ist im ER lokalisiert und rekrutiert das Hsp70 Protein Kar2 an Polypeptide, die durch die ER-Membran transportiert werden (Corsi & Schekman, 1997). Beide Proteine vermitteln Translokation und Proteinfaltung. Das Hsp40-Chaperon Zuo1 fungiert zusammen mit Hsp70-Protein Ssz1 als Co-Chaperon (Craig *et al.*, 2003), der die ATPase-Aktivität von Ssb1/2 stimuliert.

Die Sse-Familie gehört zur Gruppe der Hsp110-Chaperone und inhibiert *in vitro* die Aggregation denaturierter Proteine. Sie unterstützen aber die erneute Faltung nicht aktiv (Oh *et al.*, 1999). Ihre intrinsische ATPase-Aktivität ist im Vergleich zu anderen Hsp70-Proteinen gering (Raviol *et al.*, 2006). Sse-Proteine, im besonderen Sse1, agieren als zytosolische Nukleotidaustauschfaktoren von Ssa1 und Ssa2 (Dragovic *et al.*, 2006; Raviol *et al.*, 2006), indem sie heterodimere Komplexe mit diesen Proteinen formen. Für die Bindung von Sse1 an Hsp70 ist ATP nötig (Shaner *et al.*, 2006).

Tabelle 1.1: Hsp70-Chaperone, Co-Chaperone und Co-Faktoren von *E. coli*, *S. cerevisiae* und Säugetierzellen

Organismus	Hsp70	Hsp40-Co-Chaperone	Co-Faktoren
<i>E. coli</i>	DnaK * Hsc66 * HscC *	DnaJ, ClbA, Dj1A Hsc20 Dj1B, Dj1C	GrpE
<i>S. cerevisiae</i>	Gruppe 1: Ssa1-4 * Ssb1/2 * Ssc1 Kar2 Gruppe 2: Sse1/2 * Ssh1 Lhs1 Ssz1 *	Typ I Ydj1, Xdj1, Apj1, Mdj1, Scj1 Typ II Sis1, Djp1, Caj1, Hlj1 Typ III Swa1, Sec63, Pam18, Mdj2, Jac1, Zuo1	Sti1 Sil1 Fes1 Sls1
Säuger	Hsp70 * Hsc70 * Hsp70L1 * BiP	Hsp40 (Hdj1) HSDJ (Hdl2) Auxillin CSP MIDA Mpp11 ERj1-5	HspBP1 Bag1 Hip Hop CHIP

* = zytosolische Hsp70

1.3.2 Hsp70-Proteine in *Hansenula polymorpha*

Die Hsp70-Proteine in *H. polymorpha* entsprechen denen von *S. cerevisiae* und werden wie diese in Familien unterteilt (Tab. 1.2). Es existieren in *H. polymorpha* jedoch weitaus weniger Hsp70-Proteine als in *S. cerevisiae*. Aus der Ssa Familie aus *S. cerevisiae* konnten in *H. polymorpha* zwei Gene, *HSA1* und *HSA2*, identifiziert werden (Titorenko *et al.*, 1996). Das Gen *HSB* entspricht dem der Ssb Familie aus *S. cerevisiae*. *H. polymorpha* hat ebenfalls wie *S. cerevisiae* ein mitochondrielles (*HSC*) sowie ein ER-lokalisiertes Hsp70 Gen (*HSD*). Die Familie der Sse-Proteine ist in *H. polymorpha* mit zwei Mitgliedern vertreten, für die die Gene *HSE1* und *HSE2* kodieren (Diesel, 1997).

Tabelle 1.2: HSP70-Gene in *H. polymorpha* und *S. cerevisiae* sowie ihre Zelllokalisierung

<i>H. polymorpha</i> HSP70-Gene	<i>S. cerevisiae</i> HSP70-Gene	Zelluläre Lokalisation
<i>HSA1</i> (Hsp70-1) <i>HSA2</i> (Hsp70-2)	<i>SSA1-4</i>	Zytosol Zellkern Zellwand
<i>HSB</i>	<i>SSB1, SSB2</i>	Zytosol
<i>HSC</i>	<i>SSC1</i>	Mitochondrien
<i>HSD</i>	<i>KAR2</i>	ER
<i>HSE1, HSE2</i>	<i>SSE1, SSE2</i>	Zytosol
-	<i>LSH1</i>	ER
-	<i>SSH1</i>	Mitochondrien

Die Genprodukte von *HSA1* und *HSA2* sind mit 89,9% Identität stark homolog. Das Gen *HSA1* kodiert für das Protein Hsp70-1 (früher Hsp72), *HSA2* für das Protein Hsp70-2. Hsp70-1 ist auf Aminosäureebene mit den Proteinen Ssa1 (83,3% Identität) und Ssa2 (83,1% Identität) sehr homolog. Hsp70-1 und Hsp70-2 repräsentieren die zytosolische Varianten der Hsp70-Proteinfamilie in *H. polymorpha*. Die Überexpression von Hsp70-1 bewirkt eine erhöhte Sensitivität gegenüber hohen Temperaturen und Ethanolkonzentrationen, steigert aber andererseits die Toleranz für Kupfer und Kadmium (Titorenko *et al.*, 1996; Diesel, 1997).

1.3.2 Das Hsp70/Hsp40-System in Säugetieren

Bei Säugetieren wurden Hsp70-Homologe im Zytosol, im ER und in den Mitochondrien beschrieben (siehe Tab. 1.1). Im Zytosol sind zwei Formen von Hsp70 vertreten: Die konstitutive Variante Hsc70 (auch als Hsp73 bekannt) und die Stress-induzierbare Form Hsp70 (oder Hsp72). Für das ER wurde die Hsp70 Variante BiP (oder Grp78) und für die Mitochondrien mHsp70 beschrieben. Hsc70 und BiP sind Homologe von Ssa1-4 und Kar2 aus *S. cerevisiae* (Fink, 1999). Für Hsp40 existieren in Säugerzellen sieben zytosolische und fünf ER-lokalisierte Hsp40-Homologe. Die zytosolischen Homologe sind: Hsp40 (Hdj1), HSDJ (Hdj2), Auxillin, Mrj, CSP, MPP11 und MIDA1. Im ER kommen die Hsp40-Homologe ERj1-5 vor, die zusammen mit BiP hauptsächlich die korrekte Faltung von sekretorischen Proteinen, Proteinen der Plasmamembran und Proteinen, die im ER oder Golgiapparat lokalisiert sind, unterstützen. Das zytosolische Hsp70/Hsp40 System organisiert die Faltung von zytosolischen Peptiden und den Transport von Peptiden in andere Zellkompartimente. Hdj1, ein Hitze-induzierbares DnaJ-Homolog (Ohtsuka *et al.*, 1990), co-lokalisiert mit Hsc70 und Hsp70 vor und nach einem Hitzeschock (Hattori *et al.*, 1993). Hsc70 vermittelt zusammen mit Auxillin das Ablösen von Clathrin an Clathrin-umhüllten Vesikeln (Ungewickell *et al.*, 1995). Hsp70 Co-Faktore sind HspBP1, Bag-1, Hip, Hop und CHIP. Hip stabilisiert die Interaktion der ADP-gebundenen Form von Hsc70 mit einem Substrat (Bruce *et al.*, 1997; Hohfeld *et al.*, 1995), Hop unterstützt die Übertragung von

gebundenem Substrat von Hsp70 auf Hsp90 (Johnson *et al.*, 1997). Bag-1 sowie HspBP1 stimulieren den Nukleotidaustausch, was in der ATP-gebundenen Form von Hsp70 und anschließender Substratfreisetzung resultiert (Hohfeld & Jentsch, 1997). CHIP fördert zusammen mit Hsp40 die Hydrolyse von Hsp70-gebundenem ATP und stabilisiert dadurch den Hsp70/Substrat-Komplex.

1.4 Immunologische Eigenschaften von Hitzeschockproteinen

Die Eigenschaft von Hitzeschockproteinen bzw. Stressproteinen, die Strukturen intrazellulärer Proteine zu scannen und an bestimmte Sequenzabschnitte der Proteine nicht-kovalent zu binden, hat neben der Proteinfaltung auch eine Relevanz für die Antigenprozessierung. Hitzeschockproteine können mit Antigenpeptiden interagieren, diese vor Degradation schützen und aus der Zelle transportieren, um eine Immunantwort zu stimulieren. Sie sind eine Komponente der Immunüberwachung, indem sie die Antigenpeptide Antigen-präsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC), wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen, zuführen und den MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse I- und II-Weg der Immunantwort aktivieren. Zelleigene Hitzeschockproteine können über passive (nekrotische) oder aktive (physiologische) Mechanismen von den Zellen freigesetzt werden (Asea, 2005; Basu *et al.*, 2000; Lancaster *et al.*, 2004). Hitzeschockproteine dienen als Indikatoren für Zellstress und können vermehrt in das extrazelluläre Milieu freigesetzt werden. Dies kann in einer Hoch- oder Herunterregulation der Immunantwort oder der Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen resultieren (Pockley *et al.*, 2007). Exogene Stressproteine von Pathogenen sind dominant immunogen und lösen eine angeborene sowie adaptive Immunreaktion aus. Sie induzieren die Antikörperbildung und eine bisweilen sehr hohe Aktivierung von T-Zellen (Pockley *et al.*, 2007).

1.4.1 Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation

Das am besten bezüglich immunstimulatorischer Eigenschaften untersuchte Hitzeschockprotein ist Hsp70. Hsp70 fördert die Cytokinexpression und die Maturation von APCs (antigen presenting cells) (Wells & Malkovsky, 2000) und löst darüber hinaus eine cytotoxische T-Lymphocyten- (CTL) Antwort aus (Zhang *et al.*, 2006). Der genaue Mechanismus der Interaktion von Hsp70 und den APCs ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Bekannt ist, dass Antigen-präsentierende Zellen Hsp-Antigenpeptid-Komplexe über Endozytose aufnehmen, wofür Hsp70 an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche der APCs bindet (siehe Abb. 1.4). Bisher konnten unter anderen der α 2-Makroglobulin-Rezeptor CD91 (Theriault *et al.*, 2005; Delneste *et al.*, 2002; Theriault *et al.*, 2006), Lox-1 (Theriault *et al.*, 2005), die TLR (Toll-like receptor) 2 und TLR 4 mit dem Co-Faktor CD14 (Asea *et al.*, 2002) und der Rezeptor CD40 (Becker *et al.*, 2002) identifiziert werden, die in eine Interaktion von Hsp70 und APCs involviert sind. Ist Hsp70 an einen spezifischen APC-Rezeptor gebunden, finden zwei miteinander verknüpfte Reaktionen statt: Zum einen findet eine Signalkaskade statt, die über die Rezeptoren TLR2, CD14 und CD40 eingeleitet wird und den NF κ B-Komplex aktiviert, der eine Stressprotein-vermittelte Transkription von Genen initiiert, die für eine Immunantwort benötigt werden (Asea *et al.*, 2002). Dies geht einher mit der Hochregulierung von MHC-Molekülen sowie der Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen. Zum anderen nehmen APCs Hsp70 und assoziierte Antigenpeptide über Endozytose auf und die Hsp-Antigenpeptid-Komplexe werden dem Antigen-präsentierenden Weg zugeführt. Die Endozytose wird über die Rezeptoren CD91 und Lox-1 vermittelt (Delneste *et al.*, 2002; Th eriault *et al.*, 2005; Th eriault *et al.*, 2006). Die Antigene werden dann in der Zelle prozessiert und auf MHC-Moleküle transferiert, um anschließend zur Zelloberfläche transportiert und präsentiert zu werden. Dass durch MHC-Moleküle pr esentierete Antigenpeptid wird daraufhin von

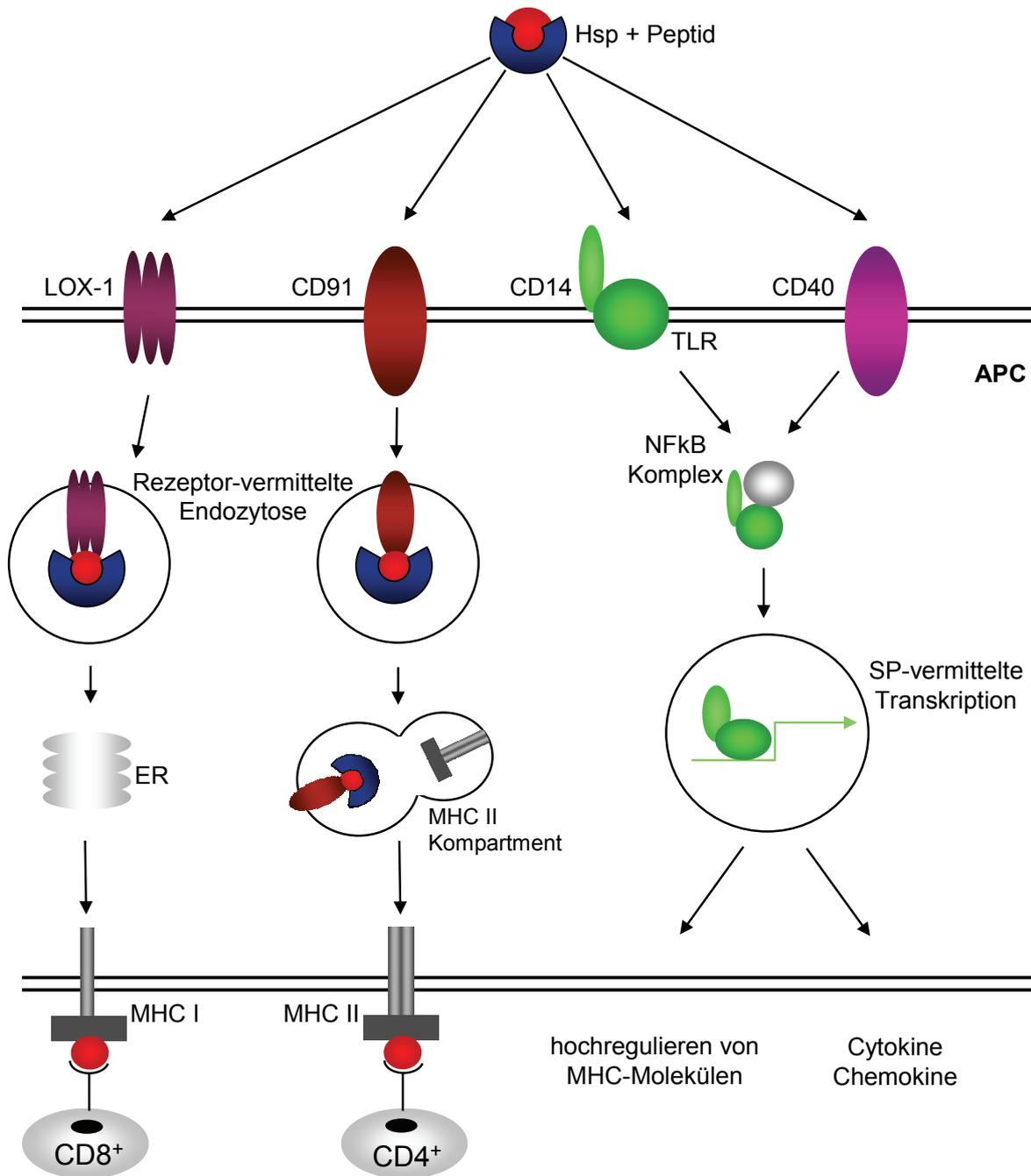


Abbildung 1.4
HSP-vermittelter Mechanismus der Antigenpräsentation von APCs

Hitzeschockproteine (Hsp) mit gebundenen Antigenpeptiden haben immunstimulatorische Eigenschaften und aktivieren die Maturation von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und fördern die Expression von Cytokinen und Chemokinen. Es konnten verschiedene Zelloberflächenrezeptoren von APCs identifiziert werden, die mit Stressproteinen interagieren. Die Rezeptoren LOX-1 und CD91 fördern die Endozytose der Hsp-Antigenpeptid-Komplexe. Die Antigenpeptide werden mit Hilfe der Stressproteine für eine Präsentation durch MHC-Klasse I Moleküle zum ER transportiert oder das Endosom fusioniert mit dem MHC-Klasse II Kompartiment. Die Antigenpeptide binden an MHC-Klasse I und II-Moleküle und werden durch diese anschließend an der Zelloberfläche präsentiert. Dies resultiert entsprechend in einer CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellantwort. Die Rezeptoren CD14/TLR 2 und 4 und CD40 vermitteln eine Signaltransduktion wodurch der NFκB-Komplex aktiviert wird. Dadurch wird die Expression von Cytokinen und Chemokinen gefördert und die Produktion von MHC-Molekülen hochreguliert (Darstellung in Anlehnung an Pockley *et al.*, 2007 und Todryk *et al.*, 2003).

T-Lymphocyten erkannt, und eine Immunantwort wird eingeleitet. Epitope, die von CD4⁺-T-Zellen erkannt werden, sind im Allgemeinen von extrazellulärer Herkunft und wurden von endosomalen Kompartimenten prozessiert und von MHC-Klasse II-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert

(Kaufmann *et al.*, 1998). Nach der Stimulierung durch Antigenpeptide, produzieren CD4⁺-T-Zellen verschiedene Cytokine, die die Sekretion von Ig Isotypen von B-Zellen induzieren oder anti-mikrobielle Mechanismen von Phagozyten aktivieren. CD8⁺-T-Zellen hingegen erkennen MHC I-Klasse präsentierte Epitope von endogenen Proteinen (dies können virale, mikrobielle oder zelleigene Proteine sein) die von zytosolischen Proteasen gespalten wurden (Todryk *et al.*, 2003). Mittels Injektion applizierte Proteinantigene passieren in den meisten Fällen keine Lipidmembranen, sie können folglich den MHC Klasse I Weg nicht durchlaufen und stimulieren somit keine signifikante CD8 zytolytische T-Lymphocyten (CTL) -Antwort (Cho *et al.*, 2000). Bemerkenswert ist allerdings, dass gezeigt werden konnte, dass durch Hsp70-Antigenpeptid-Komplexe eine CD8⁺-T-Zellantwort unabhängig von einer CD4⁺-T-Zellantwort erzielt werden kann. Diese Kenntnisse stammen hauptsächlich aus der Tumorforschung, wo in unterschiedlichen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Immunisierung mit Hitzeschockproteinen, die aus Tumorzellen isoliert wurden, eine Generierung von spezifischen CD8⁺-T-Zellen zur Folge hat (Suto *et al.*, 1995; Schild *et al.*, 1999; Enomoto *et al.*, 2006; Binder *et al.*, 2005; Srivastava 2005; Binder *et al.*, 2001). Hierbei wird anscheinend der Status der Immuntoleranz gegenüber Tumorantigenen überwunden, die sich häufig während des Tumorwachstums entwickelt. Andere Beispiele belegen, dass eine bessere Immunantwort erreicht wird, wenn Antigene zusammen mit Stressproteinen im Komplex appliziert werden (Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997). Studien belegen, dass eine Präsentation von Peptiden, die als Antigen erkannt werden, über Hitzeschockproteine 200-400mal effizienter ist als ohne Hitzeschockproteine (Suto *et al.*, 1995). Hsp70, aber auch andere Stressproteine, scheinen demnach im Komplex mit Peptiden einen adjuvantiven Charakter zu haben. Dies bietet für die Entwicklung von neuen Impfstoffen eine attraktive Alternative, die Immunogenität zu steigern. Von besonderem Interesse ist die Entwicklung von Krebsimpfstoffen und Impfstoffen gegen intrazelluläre Pathogene bei denen jetzige Immunisierungsstrategien inadäquat sind (z. B. HIV-1, verschiedene Herpesviren und Malaria).

1.4.2 Experimentelle Ansätze für Hsp-vermittelte Vakzin-„Delivery“

Bislang werden vier Strategien verfolgt, bei denen mit Hilfe von Hitzeschockproteinen die Immunogenität gesteigert und eine spezifische CTL Stimulierung erzielt wird.

1. Isolierung von autologen Hsp-Peptid-Komplexen aus Tumorzellen als Krebsimpfstoff

Hierbei werden aus Tumorzellen Hsp-Peptid-Komplexe aufgereinigt, die eine starke, Tumorspezifische Immunantwort hervorrufen und als potente multivalente Impfstoffe fungieren (Janetzki *et al.*, 2000). Dies hat den Vorteil, dass das Material vom Tumorgewebe des jeweiligen Patienten gewonnen wurde und so das Problem der Identifizierung von Epitopen der Tumor-spezifischen Peptide vermieden wird. Eine CTL-Antwort auf die Tumor-eigenen-Peptide könnte somit idealer Weise in die Eliminierung des Tumors führen. Da bei dieser Art der Hsp-Peptid-Komplexe eine Vielzahl von Hsp-Proteine isoliert werden, die zusätzlich mit anderen verschiedenen Peptiden assoziiert sind, wirken diese Komplexe als multivalente Impfstoffe (Wang *et al.*, 2006).

2. *In vitro* Bindung von (Antigen)peptiden an Hsp-Proteine

Komplexe von aufgereinigten Peptiden (die als Antigen erkannt werden) und Hsp-Proteinen, die über nicht-kovalente Bindungen *in vitro* hergestellt wurden, sind ATP-abhängig und erzielen eine gute Immunantwort (Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997). Dies setzt allerdings die oben angesprochene Identifizierung des jeweiligen Antigenpeptids voraus. Im Fall von Tumorspezifischen Antigenepitopen könnte dies ein Hindernis darstellen, da diese auf Grund von Mutationen von Patient zu Patient individuell sein können (Wang *et al.*, 2006). Zudem ist die Herstellung und Isolierung dieser Komplexe aufwendig und in großem Maßstab schwer zu etablieren.

3. Antigen/Hsp-Fusionsproteine

Ein alternativer Ansatz ist die Herstellung von Antigen/Hsp-Fusionsproteinen, bei denen sich C-terminal der Hsp-Anteil befindet (Gu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Dies hat den Vorteil, dass alle Hsp-Moleküle mit dem (Antigen)peptid assoziiert vorliegen. Diese Fusionsproteine resultieren in eine CD4⁺-unabhängige CTL-Antwort und benötigt keine weiteren Adjuvantien. Eine kostengünstige Produktion der Hsp-Fusionsproteine wurde in Mycobakterien etabliert. Bei dieser Methode liegen die Fusionsproteine jedoch zu 90% in „Inclusion Bodies“ vor, und es können nur unlösliche Proteine gewonnen werden. Darüber hinaus sind die Proteine oftmals biologisch nicht mehr funktional (Wang *et al.*, 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Fusionsproteine, die nur die Substratbindedomäne von Hsp70 enthalten, fast ebenso effektiv eine Produktion von IL2 und IL4 bewirken wie Fusionsproteine mit vollständigem Hsp70-Anteil (Ge *et al.*, 2006).

4. Fusionsproteine bestehend aus Antigen und N-terminaler Hsp70-Bindedomäne

Die Fusionierung eines Peptids, mit einer N-terminalen verkürzten DnaJ-Domäne bewirkt eine stabile nicht-kovalente Bindung mit zytosolischem Hsp73 *in vivo*, und fördert eine spezifische CTL-Antwort gegen das fusionierte Peptid. Hauptsächlich wurde dies für Peptide mit einer fusionierten DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ des Tumorantigens (T-Ags) des Polyomavirus SV40 beobachtet. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass diese Immunantwort für Peptide mit DnaJ-Domänen verschiedener Organismen erzielt werden kann und somit Spezies-unabhängig ist (Wieland *et al.*, 2008). Damit Hsp73 diese adjuvante Wirkung entfaltet, muss es im Komplex mit dem jeweiligen Peptid vorliegen. Um einen stabilen Komplex mit Hsp73 auszubilden, muss die DnaJ-Domäne eine J-Domänentypische intakte Schleifenstruktur ausbilden (siehe Abb. 1.2 A). Die Bindung von zelleigenen Hsp70-Proteinen minimiert das Risiko einer durch pathogene Hitzeschockproteine hervorgerufene Kreuzreaktion (Fissolo *et al.*, 2006). Dieses System wurde hauptsächlich in Kombination mit einer auf Plasmid-DNA basierenden DNA-Vakzinierung untersucht. Erste Resultate von Immunisierungen mit aufgereinigten Hsp70/T₂₋₇₇-Antigen-Komplexen aus Säugetierzelllinien zeigen, dass, wie bei einer DNA-Vakzinierung, eine Hsp70-abhängige Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort induziert wird (Wieland *et al.*, 2008).

Darüber hinaus hat dieses System den Vorteil, dass ansonsten oftmals instabile Proteine stabil exprimiert werden können (Wieland *et al.*, 2008; Schirmbeck *et al.*, 2003; Schirmbeck *et al.*, 2002) und bietet demnach anscheinend Schutz vor Proteolyse (Patentanmeldung: Method for the production of (poly)peptides. EP98950105.1).

Eine Immunisierung mit rekombinantem Protein ist einer DNA-Vakzinierung vorzuziehen, da mehrere klinische Phase I Studien gezeigt haben, dass DNA-Vakzinierungen generell keine hohe Immunogenität in den Probanden hervorrufen. Darüber hinaus ist eine effiziente Applikation beim Menschen schwierig. Neueste Berichte belegen, dass DNA-Vakzinierungen helfen, die Immunogenität von ansonsten schwachen, auf rekombinanten Proteinen basierenden Impfstoffen zu steigern. Der Ansatz, Hsp73/Fusionsprotein-Komplexe aus transfizierten Zellen für einen Impfstoff zu gewinnen, ist jedoch für eine rentable Produktion in großem Maßstab zu aufwendig. Die Hefe *Hansenula polymorpha* ist hingegen auf Grund der Eigenschaften von starken, regulierbaren Promotoren und der Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten ein attraktiver Modellorganismus, um diese Hsp70/Antigen-Komplexe *in vivo* zu exprimieren.

1.5 Heterologe Genexpression in *Hansenula polymorpha*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Hansenula polymorpha* Expressionssystem eingesetzt, um Zielproteine und Heat-Shock-Proteine heterolog zu exprimieren. Im Folgenden seien die wichtigsten Merkmale dieses Systems kurz aufgeführt.

Hansenula polymorpha (*Pichia angusta*) aus der Familie der *Saccharomycetaceae* wurde zum ersten Mal von Wickerham 1951 beschrieben. *H. polymorpha* ist eine obligat aerobe, homothallische, thermotolerante Hefe, mit der besonderen Eigenschaft mit Methanol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen zu können (Wickerham & Sydow, 1970). Sie kann noch bei Temperaturen von bis zu 50°C und in einem pH-Bereich von 2,5-6 wachsen. Das Wachstumsoptimum liegt jedoch bei einer Temperatur von 37°C und einem pH-Wert von 4,0-5,5. Die Vermehrung erfolgt zum einen vegetativ durch Sprossung, bei der Pseudomycelen ausgebildet werden können, und zu anderem generativ über Sporulation. Bei der Sporulation können bis zu vier hutförmige, saturnförmige oder kugelige Ascosporen in einem Ascus gebildet werden (Kurtzman, 1984).

1.5.1 Regulation des Methanolmetabolismus

Die Umsetzung des Methanols erfolgt in zwei Kompartimenten der Zelle: in Peroxisomen und im Zytosol. Die zellulären Konzentrationen der am Methanolmetabolismus beteiligten Schlüsselenzyme, die Dihydroxyaceton synthase (Dhas), die Formiatdehydrogenase (Fmd) und die Methanoloxidase (Mox) werden auf Transkriptionsebene reguliert (Egli *et al.*, 1980; Veenhuis *et al.*, 1983). Die Expressionsraten der dazugehörigen Gene sind abhängig von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle. In Anwesenheit von Glukose und Ethanol erfolgt eine Repression der Transkription, eine Derepression erfolgt mit Glycerin, Ribose und Sorbit oder in Kohlenstoff-freiem Milieu. Unter Methanolbedingungen wird die Synthese der Schlüsselenzyme induziert (Eggeling und Sahn, 1978). In Abbildung 1.5 ist die Proteinbildung des Schlüsselenzymes Fmd auf verschiedenen Medien dargestellt.

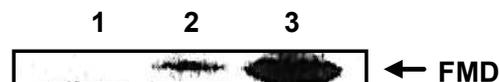


Abbildung 1.5

Intrazelluläre Proteinsynthese von *H. polymorpha* Formiatdehydrogenase (Fmd) nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Proben wurden unter reduzierenden/denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt (Gellisen *et al.*, 1990).

1: Wachstum auf Glukose / **2:** Wachstum auf Glycerin / **3:** Wachstum auf Methanol.

Der erste Schritt des Methanolstoffwechsels erfolgt nach Eintreten über die peroxisomale Membran von Methanol in das Organell (Abb. 1.6, Schritt 1). Hier wird Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid mit Hilfe der Methanoloxidase oxidiert. Das anfallende zytotoxische Wasserstoffperoxid wird durch eine peroxisomale Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff zersetzt (Abb. 1.6, Schritt 2). Formaldehyd wird auf zwei verschiedenen Wegen weiter verstoffwechselt. Zum einem wird es im Zytoplasma auf dissimilatorischem Weg unter Gewinnung von Energie zu Kohlenstoff oxidiert (siehe Abb. 1.6, Schritt 3-4), zum anderem auf assimilatorischem Weg für die Generierung von Biomasse eingesetzt (Abb. 1.6, Schritt 5-8). Die Oxidation von Formaldehyd wird über zwei Dehydrogenase-Reaktionen katalysiert, an denen die Formaldehyd-Dehydrogenase (Fid) und die Formiatdehydrogenase (Fmd) beteiligt sind (Abb. 1.6, Schritt 3-4). Der entscheidende Schritt des assimilatorischen Weges ist die Umsetzung von Formaldehyd zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Gap) und Dihydroxyaceton (Dha), der durch die Transketolase-Reaktion zwischen Formaldehyd und Xylulose-5-Phosphat erfolgt. Die Reaktion wird durch die peroxisomale Dihydroxyaceton synthase (Dhas) katalysiert (Abb. 1.6, Schritt 5). Die bei dieser Reaktion entstandenen C3-Körper gelangen ins Zytoplasma, wo sie weiter verstoffwechselt werden. Dihydroxyaceton wird durch die Dihydroxyaceton-Kinase zu Dihydroxyaceton-Phosphat phosphoryliert

(siehe Abb. 1.6, Schritt 6) und reagiert dann mit Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu Fruktose-1,6-Bisphosphat (Abb. 1.6, Schritt 7). Letzteres wird durch eine Phosphatase zu Fruktose-6-Phosphat umgelagert (Abb. 1.6, Schritt 8), welche als Ausgangsverbindung zur Regeneration von Xylulose-5-Phosphat über den Pentose-Phosphat-Weg fungiert (Yurimoto *et al.*, 2002). Ein Drittel des Glycerinaldehyd-3-Phosphats wird für den Aufbau von Biomasse eingesetzt.

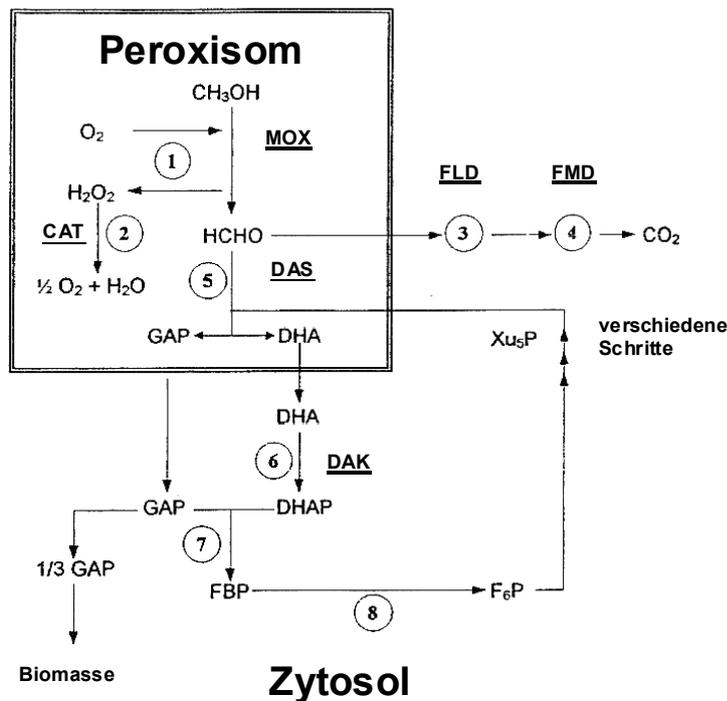


Abbildung 1.6
Schematische Darstellung des
Methanolstoffwechsels in *H.*
***polymorpha*.**

Enzymkatalysierte Reaktion und
 Abkürzungen: 1: MOX (Methanoloxidase);
 2: CAT (Katalase); 3: FLD (Formaldehyd-
 Dehydrogenase); 4: FMD
 (Formiatdehydrogenase); 5: DAS
 (Dihydroxyaceton-Synthase); 6: DAK
 (Dihydroxyaceton-Kinase); 7: Fruktose
 1,6-Bisphosphat-Aldolase; 8: Fruktose-1,6-
 Bisphosphat-Phosphatase; DHA
 (Dihydroxyaceton); DHAP
 (Dihydroxyaceton-Phosphat; FBP
 (Fruktose-1,6-Bisphosphat); F6B
 (Fruktose-6-Phosphat); GAP
 (Glycerinaldehyd-3-Phosphat); GSH
 (reduziertes Glutathion); Xu5P (Xylulose-
 5-Phosphat). Für weitere Erläuterungen
 siehe Text. (Gellisen & Hollenberg, 1999)

1.5.2 Vorteile von *H. polymorpha* als Modellorganismus in der Biotechnologie

Die strikte Regulation der starken Promotoren der drei Schlüsselenzyme (Fmd, Mox und Dhas) und die Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten macht *H. polymorpha* in der Biotechnologie zu einem attraktiven Modellorganismus für die heterologe Proteinproduktion.

Darüber hinaus hat *H. polymorpha* für die heterologe Proteinproduktion gegenüber anderen Hefen, wie *S. cerevisiae*, und höheren eukaryotischen Systemen weitere Vorteile. Zum einen hat *H. polymorpha* den Vorteil gegenüber Säugertierzellen, dass durch eine Kultivierung bei höheren Temperaturen die Kontaminationsgefahr reduziert ist. Zum anderen hat *H. polymorpha* einen Vorteil gegenüber *S. cerevisiae* bezüglich der posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Grundsätzlich hat die Verwendung von höheren eukaryotischen Zellen für die Produktion von komplexen, insbesondere glykosylierten Proteinen, den Vorteil, dass alle notwendigen posttranslationalen Modifikationen in diesen Systemen ausgeführt werden können, die zur Bildung von authentischen Produkten relevant sind. Ein wichtiger Aspekt der posttranslationalen Modifikation ist die Glykosylierung von Proteinen, die neben der Faltung auch eine signifikante Rolle für die Stabilität, Aktivität und Antigenität spielt. *H. polymorpha* besitzt die Fähigkeit, ebenso wie *S. cerevisiae*, Proteine sowohl N- als auch durch O-Glykosylierung zu modifizieren (Jenkins *et al.*, 1996). Allerdings lagern beide Hefen bei der N-Glykosylierung nur Mannose-reiche Oligosaccharide an. *S. cerevisiae* hat den Nachteil, dass sie bei der Expression von Glykoproteinen aus höheren Organismen zur Hyperglykosylierung neigt. Zudem werden die Mannosen an den Enden der Seitenketten über α 1,3-Bindungen mit Hilfe einer α 1,3-Mannosyl-Transferase verknüpft, welche in Verdacht stehen, Allergien auszulösen (Fernandez & Hoeffler, 1999). Hingegen ist eine Hyperglykosylierung in *H. polymorpha*

äußerst selten. Eine Glykosylierung findet in *H. polymorpha* in den meisten Fällen in einem definierten Umfang von 8 bis 14 Mannose-Resten statt.

Ein weiterer Vorzug von *H. polymorpha* im Vergleich mit *S. cerevisiae* ist, dass sich Expressionplasmide mitotisch stabil in das Genom integrieren und sich tandemartig mit bis zu 40 Kopien anordnen (Gatzke *et al.*, 1995; Gellissen *et al.*, 1995). Dies ermöglicht hohe Expressionsraten von heterologen Proteinen und macht *H. polymorpha* auch für eine stabile Co-Expression von zwei unterschiedlichen Proteinen interessant (Janowicz *et al.*, 1991).

Ein kritischer Punkt bei der heterologen Proteinexpression in Hefe ist die Proteolyse, da heterologe Proteine mitunter anfällig für Degradation durch die Hefe-eigenen Proteasen sind. Um Proteolyse zu vermeiden, werden einerseits Protease-freie Stämme für die Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet (Hinnen *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1998; Gleeson *et al.*, 1998; Boehm *et al.*, 1999). Andererseits kann das Risiko der proteolytischen Degradation durch eine Kultivierung bei niedriger Temperatur verringert werden, da einige Proteasen dann weniger aktiv sind. Eine weitere Möglichkeit, der Proteolyse entgegenzuwirken, ist die Sekretion von heterologen Proteinen. Es konnte jedoch in Einzelfällen auch gezeigt werden, dass Proteasen der Sekretionsmaschinerie zum Abbau von rekombinanten Proteinen beitragen. Generell scheinen zytosolisch exprimierte Zielproteine empfindlicher gegen Proteolyse zu sein als solche, die in den sekretorischen Weg eingeschleust werden.

1.5.3 *H. polymorpha* Expressionssysteme der Firma Rhein Biotech GmbH

Das von der Firma Rhein Biotech GmbH entwickelte Expressionssystem basiert auf dem Expressionsplasmid pFPMT121 (einem *HARS*-Vektor) und dem *H. polymorpha* Wirtsstamm RB11. Der Stamm RB11 unterscheidet sich von Wildtyp-*H. polymorpha*-Stämmen durch einen Defekt im *ODC1*-Gen, wodurch Uracil nicht mehr synthetisiert werden kann (*ODC1* ist das *H. polymorpha* Homolog zum *URA3*-Gen aus *S. cerevisiae*). Das Plasmid pFPMT121 (Abb. 1.7) ist ein Shuttle-Plasmid, das in *E. coli* vermehrt und in *H. polymorpha* für heterologe Genexpression genutzt werden kann. Die Propagierung des Plasmids in *H. polymorpha* erfolgt über die *HARS1*-Sequenz (*Hansenula autonomous replication sequence*). Die Expressionskassette des Plasmids enthält die Promotorregion des *FMD*-Gens und die Terminatorregion des *MOX*-Gens. Über eine Polyklonierungsstelle zwischen *FMD*-Promotor und *MOX*-Terminator können Fremdleseraster in das Plasmid inseriert werden. Als Selektionsmarker dienen das Ampizillingen für die Selektion in *E. coli* und das *URA3*-Gen aus *S. cerevisiae* für die Selektion Uracil-prototropher Transformanten in *H. polymorpha*. Für eine Co-Expression von Proteinen in *H. polymorpha* wird der Stamm HP102, mit zwei Auxotrophiemarkern (*ura3* und *leu2*) in Kombination mit dem Plasmid pFPMT121-LEU2 (Abb. 1.7) verwendet.

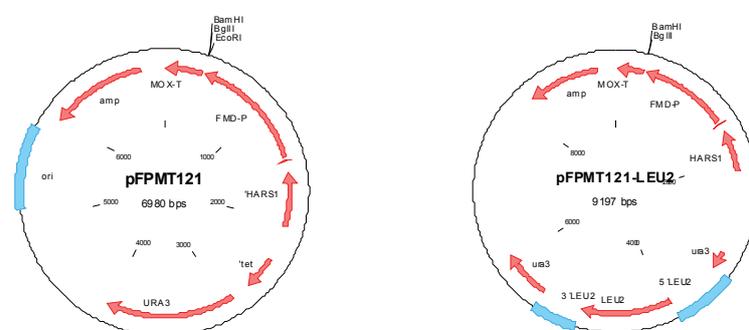


Abbildung 1.7

***H. polymorpha* Expressionsplasmide pFPMT121 und pFPMT121-LEU2.**

Die Plasmide verfügen über folgende funktionelle Elemente: *HARS* (*Hansenula autonomous replication sequence*), *FMD*-P (Promotorregion des *FMD*-Gens); *MOX*-T. (Terminatorregion des *MOX*-Gens), *amp* (Ampizillin-Resistenzgen); *URA3* (*URA3*-Gen aus *S. cerevisiae*, Selektionsmarker von pFPMT121); *LEU2* (*LEU2*-Gen aus *S. cerevisiae*, Selektionsmarker von pFPMT121-LEU2).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es ein Hsp70-Interaktionssystem in *H. polymorpha* zu etablieren, welches ermöglicht Hsp70/Antigen-Komplexe *in vivo* zu exprimieren. Bisher konnte in Säugetierzellen gezeigt werden, dass eine Komplexierung mit Hsp70 der Verbesserung der Eigenschaften von Antigenen dient: es stabilisiert die gebundenen Proteine und wirkt als natürliches Adjuvans.

Für die Etablierung eines Hsp70-Interaktionssystems soll zunächst der Ansatz, bei dem Säuger Hsp73 mit Fusionsproteinen über die verkürzte DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ des Tumorantigens (T-Ags) aus SV40 einen Komplex bildet, auf das *H. polymorpha* Expressionssystem übertragen werden. Hierbei soll die Assoziation von *H. polymorpha* Hsp70-Chaperonen mit der T₂₋₇₇-Domäne analysiert werden. Ist eine direkte Übertragung nicht möglich, soll das System mit Hilfe *H. polymorpha*-eigener DnaJ-ähnlicher Domänen an die Hefe adaptiert werden. Anhand des etablierten Systems soll untersucht werden, ob durch eine Komplexierung mit Hsp70, Proteine vor Proteolyse geschützt werden. Dafür sollen ansonsten Protease-sensitive Proteine in diesem System exprimiert und auf ihre Stabilität geprüft werden. Darüber hinaus soll die adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70-Proteinen untersucht werden, wenn diese im Komplex mit einem Fusionsprotein vorliegen, welches als Antigen erkannt wird.

2 Material & Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den folgenden Herstellern bezogen:

Abbott; Amersham Biosciences AB (Schweden); Amicon (Beverly); BioWhittaker Schweiz; Dickinson and Company (BD) (Sparks USA); BioRad (Richmond, USA); Biozym (Hess. Oldenburg); Fluka AG (Basel, Schweiz); Eppendorf (Deutschland); Epicentre Biotechnologies (Madison, USA); Gibco (Paisley, Schottland); Greiner bio-one (Österreich); IBA (Göttingen); Invitrogen (Schottland); Isconova (Schweden); HJ BIOANALYTICS GmbH (Mönchengladbach); J.T. Baker (Deventer, Holland); Merck (Deutschland); Millipore (Deutschland); NUNC; peQLab Biotechnologies GmbH; Pierce (USA); Qiagen (Hilden); Roche (Mannheim); Sartorius (Göttingen); Sigma (St. Louis, USA); WAB (Nidderau-Heldenbergen); Willy A. Bachofen GmbH (Schweiz); Whatman (Maidstone).

2.1.2 Enzyme und dazugehörige Inkubationspuffer

Die verwendeten Restriktionsenzyme und dazugehörigen Inkubationspuffer, T4-Ligase, T4-DNA-Polymerase, Kinase und das Expand-Long Template PCR System wurden von den Firmen Roche (Mannheim) und MIB Fermentas (St- Leon-Rot, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in dieser Arbeit verwendet:

GFP-Antikörper aus Kaninchen (Invitrogen), Strep-Tag Antikörper aus der Maus (Qiagen), polyklonaler His-Tag Antikörper aus der Maus und polyklonaler Core Antikörper [C124H6N] aus Kaninchen (Rhein Biotech GmbH) dienten als Erst-Antikörper.

Als Zweit-Antikörper wurden verwendet: monoklonaler Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase und monoklonaler Anti-Maus-IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase. Beide Zweit-Antikörper sind Bestandteil des Kits „Western Breeze“ (Invitrogen).

2.2 Stämme und Medien für Mikroorganismen

2.2.1 Stämme

Escherichia coli

Escherichia coli One Shot® TOP10 (Invitrogen) (F^- *mcrA* Δ (*mmr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*).*

Hansenula polymorpha

Hansenula polymorpha RB11 (*ura*³) [Wirtsstamm, Rhein Biotech GmbH]

Hansenula polymorpha HP102 (*ura*³, *leu*²) [Wirtsstamm/ RB11 Derivat, Rhein Biotech GmbH]

2.2.2 Medien

Medien, Anzucht und Lagerung von Bakterienstämmen

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB (Luria-Broth) Vollmedium bei 37°C. Für Bestandteile des Nährmediums siehe Tabelle. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar. Zur Selektion von Plasmid-beinhaltenen Zellen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampizillin oder Kanamycin zugefügt. Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte nach Anzucht bei 4°C. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Stämme als Stockkultur in 17% Glycerin bei -20°C gelagert.

LB	10	g/l	Trypton
	171	mM	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt
	100	µg/ml	Kanamycin /Ampizillin (optional)

Medien, Anzucht und Lagerung von Hefestämmen

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte bei 37°C in YPD Vollmedium oder in YNB Minimalmedium. Für Bestandteile der Nährmedien siehe Tabelle. Als Kohlenstoffquellen dienten Glukose, Glycerin oder Methanol. Zur Selektion von Uracil oder/und Leucin-phototrophen Transformanten wurde die entsprechende Base bzw. Aminosäure nicht zugesetzt. Festes Medium enthielt zusätzlich 2% Agar. Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert auf pH 6,5 eingestellt. Zur Aufbewahrung wurden die Hefestämme nach zwei Tagen Anzucht auf Platte bei 37°C bei 4°C gelagert. Glycerinstocks (17% Glycerin) wurden mit Flüssigkulturen angelegt, die über Nacht bei 37°C kultiviert wurden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

YNB-1% Glycerin /-2% Glukose	1,4	g/l	YNB (Yeast Nitrogen Base)		
	37,8	mM	Ammoniumsulfat		
	1	% w/w	Glycerin bzw. 20 g/l Glukose Monohydrat		
YNB-1% Methanol	1,4	g/l	YNB (Yeast Nitrogen Base)		
	37,8	mM	Ammoniumsulfat		
			Zugabe von 1 Vol-% Methanol nach dem Autoklavieren		
YPD	20	g/l	Sojapepton		
	10	g/l	Hefeextrakt		
	20	g/l	Glukose-Monohydrat		
SYN 6	Basismedium	115,6	mM	NH ₄ H ₂ PO ₄	
		14,7	mM	MgSO ₄	
		44,3	mM	KCl	
		5,6	mM	NaCl	
		1	mM	Glycerin	
		6,8	mM	CaCl	
	Medienzusätze	1 % v/v Mikroelemente	17,86	mM	EDTA
			17	mM	(NH ₄) ₂ Fe(II)(SO ₄) ₂
			3,38	mM	KuSO ₄
			7	mM	ZnSO ₄
			15,7	mM	MnSO ₄
1 % v/v Vitamine	0,164	mM	Biotin		
	42,4	mM	Thiamin		
	3,9	% v/v	2-Propanol		
	0,25	mM	Ni(II)SO ₄		
1 % v/v Spurenelemente	0,277	mM	Co(II)Cl ₂		

	1	M	Borsäure		
	0,4	mM	KI		
	0,27	mM	Na ₂ MO ₄		

2.3 Zelllinien und Medien zur Anzucht von Zellkulturen

2.3.1 Zelllinien

HEK293 (human embryonic kidney cells)

2.3.2 Medien zur Anzucht von Zellkulturen

Die Zellen wurden in DMEM (GIBCO) + 10% Fetales Kalbserum (FKS) kultiviert.

2.4 Mäuse

BALB/c (H-2^d) der Firma (Janvier Frankreich).

Die Mäuse wurden unter Standard Pathogen-freien Konditionen in der Tierversuchsanstalt der Universität Ulm gezüchtet und gehalten.

Weibliche und männliche Tiere wurden im Alter von 10 Wochen für die Versuche genutzt. Die Versuche wurden nach behördlicher Genehmigung gemäß des Deutschen Bundestierschutz-Gesetzes durchgeführt.

2.5 Plasmide

2.5.1 Ausgangsplasmide /Grundvektoren

E. coli-Plasmide

pCRII-TOPO-TA

E. coli-Klonierungsvektor: enthält *LacZ* Promotor/Operator Region [M13 Reverse priming site, Sp6 Promotor, T7 Promotor, M13 (-20) Forward priming site], pUC origin, f1 origin, Ampizillin- und Kanamycin-Resistenzgen (Invitrogen).

pCMV6-XL5-Hsp73

cDNA von Hsp73 aus *Homo sapiens* [Hsp70 Protein 8, Transkript Variante 1] wurde über *EcoRI/SalI* in den Vektor pCMV6-XL kloniert, wobei die *SalI*-Restriktionsschnittstelle zerstört wurde (ORIGENE).

H. polymorpha-Plasmide

pFPMT121:

H. polymorpha-Shuttle-Vektor: mit *URA3*-Marker aus *S. cerevisiae*, Promotorregion des *FMD*-Gens und Terminationsregion des *MOX*-Gens, Hochkopienzahl-Plasmid. Zu exprimierende Leseraster werden zwischen den *FMD*-Promotor und *MOX*-Terminator inseriert.

pFPMT-LEU2

H. polymorpha-Shuttle-Vektor: Aufbau wie pFPMT121 jedoch mit *LEU2*-Markergen aus *S. cerevisiae* anstelle des *URA3*-Gens.

Säugetier-Vektoren

pCIneo:

Säugetier Expressionsvektor: enthält die IE (immediate-early) Enhancer/Promotor Region von humanem Cytomegalovirus (CMV). T7 und T3 RNA Polymerase Promotoren flankieren eine multiple Klonierungsseite (multiple cloning site, MCS). Downstream der MCS befindet sich ein Polyadenylierungssignal aus SV40 (Promega).

Tabelle 2.1

Plasmid			Konstruktion				Sequenz. bei SEQLAB
Bezeichnung	Klon	Selektions- marker	Art ¹	PCR		Ligation	
				Template	Primer		
Gestellte Plasmide (exklusive Grundvektoren)							
pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP	3	URA3	2 FL.	pCI-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP	Sch hin/ Sch her	pFPMT121 [EcoRI/BglII; 6,967 kB] pCI-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [EcoRI/BglII; 1,380 kB]	06.12.05
pFPMT-MF α -core adw2 (-10 bis +149)	14	URA3	3 FL.	-	-	p94-1 [NcoI/BamHI; 4,040 kB] p94-1 [NcoI/HindIII; 3,144 kB] MF α -core adw2 (-10 bis +149) [HindIII/BamHI; 0,496 kB]	08.11.02
Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide							
E. coli-Plasmide							
pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP	3b-34	amp	2 FL	-	-	pCRII-TOPOCL-flie1-H6 A [EcoRI/BglII; 2,931 kB] ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [EcoRI/BglII; 1,380 kB]	17.10.07
pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-GFP	8b-11	amp	PRC-M.	pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP		Blunt-End	10.11.06
pCRII-TOPO-TA-ST-ORF313-PI2-GFP	13b-1	amp	2 FL + PCR-Prod.	Gen. DNA RB11	Orf313 hin / Orf313 her	pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [XhoI/MluI ; 3,764 kB] PCR-Prod. orf313(HPD) [XhoI/MluI ; 0,135 kB]	20.02.07
pCRII-TOPO-TA-ST-ORF313(HPE)-PI2-GFP	26d-1	amp	PCR-M.	pCRII-TOPO-TA-ST-orf313(HPE)-PI2-	HPE hin / HPE her	Blunt-End Ligation von PCR-Produkt	17.10.07

¹ 2 FL: Zwei Fragment-Ligation
 3 FL: Drei-Fragment-Ligation
 2 FL + PCR-Prod.: Zwei-Fragment-Ligation mit involviertem PCR-Produkt
 PCR-M.: PCR-Mutagenese

				GFP			
pCRII-TOPO-TA -ST-ORF12-PI2-GFP	23a-2	<i>amp</i>	2 FL + PCR-Prod.	Genomische DNA RB11	ORF12 hin / ORF12 her	pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [<i>XhoI/MluI</i> ; 3,764 kB] PCR-Prod. ORF12 [<i>XhoI/MluI</i> ; 0,210 kB]	06.06.07
pCRII-TOPO-TA -ST-ORF16-PI2-GFP	12b-1	<i>amp</i>	2 FL + PCR-Prod.	Genomische DNA RB11	ORF16 hin / ORF16 her	pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [<i>XhoI/MluI</i> ; 3,764kB] PCR-Prod. ORF16 [<i>XhoI/MluI</i> ; 0,219 kB]	14.03.07
pCRII-TOPO-TA -ST-PI2-GFP	14a-1	<i>amp</i>	PCR-M.	pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP	Delta T hin / Delta T her	Blunt-End	14.03.07
H. polymorpha-Plasmide							
pFPMT-Hsp70-1-H6	1b-6-1	<i>URA3</i>	2 FL. + PCR-Prod.	Genomische DNA RB11	70-1 hin/ 70-1 her	pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [<i>EcoRI/BamHI</i> ; 6,941 kB] PCR-Prod. Hsp70-1-H6 [<i>MunI/BamHI</i> ; 1,962kB]	11.09.06
pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6	5d-2	<i>LEU2</i>	2 FL.	-	-	pFPMT-LEU2 [<i>XbaI/BamHI</i> ; 7,841 kB] pFPMT-Hsp70-1-H6 [<i>XbaI/BamHI</i> ; 3,306 kB]	03.11.06
pFPMT-Hsp70-2-H6	2-18	<i>URA3</i>	2 FL. + PCR-Prod.	Genomische DNA RB11	70-2 hin/ 70-2 her	pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -SIII-flu-GFP [<i>EcoRI/BamHI</i> ; 6,941 kB] PCR-Prod. Hsp70-2-H6 [<i>MunI/BamHI</i> ; 1,965 kB]	09.08.06
pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6	6d-13	<i>LEU2</i>	2 FL.	-	-	pFPMT-LEU2 [<i>XbaI/BamHI</i> ; 7,842 kB] pFPMT-Hsp70-2-H6 [<i>XbaI/BamHI</i> ; 3,300 kB]	03.11.06
pFPMT-Hsp73-H6	32a-4	<i>URA3</i>	2 FL. + PCR-Prod.	pCMV6XL5-Hsp73	73 hin/ 73 her	pFPMT121 [<i>EcoRI/BamHI</i> ; 6,968 kB] PCR-Prod. Hsp73-H6 [<i>MunI/BamHI</i> ; 1,947 kB]	09.11.07
pFPMT-LEU2-Hsp73-H6	34a-1	<i>LEU2</i>	3 FL.	-	-	pFPMT-LEU2 [<i>EcoRI/HindIII</i> ; 1,230 kB] [<i>BamHI/HindIII</i> ; 7,955 kB] PCR-Prod. Hsp73-H6 [<i>MunI/BamHI</i> ; 1,947 kB]	21.11.07

pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP	9b-10	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT121 [BglII/EcoRI ; 6,974kB] pCRII-TOPO-TA-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [BglII/EcoRI ; 1,116 kB]	15.01.07
pFPMT-ST-ORF313-PI2-GFP	18a-2	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [MluI/EcoRI ; 7,708 kB] pCRII-TOPO-TA-ST-ORF313-PI2- GFP [BglII/EcoRI ; 0,220 kB]	04.04.07
pFPMT-ST-ORF313(HPE)-PI2-GFP	28a-3	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT121 [BglII/EcoRI ; 6,974 kB] pCRII-TOPO-TA-ST-ORF313(HPE)- PI2-GFP [MluI/EcoRI ; 0,954 kB]	26.10.07
pFPMT-ST-ORF12-PI2-GFP	25a-1	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [MluI/EcoRI ; 7,708 kB] pCRII-TOPO-TA-ST-ORF12-PI2-GFP MluI/EcoRI ; 0,297 kB]	25.06.07
pFPMT-ST-ORF16-PI2-GFP	17a-1	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [BglII/EcoRI ; 7,708 kB] pCRII-TOPO-TA-ST-ORF16-PI2-GFP [BglII/EcoRI ; 0,304kB]	04.04.07
pFPMT-ST-PI2-GFP	15a-1	URA3	2 FL.	-	-	pFPMT121 [BglII/EcoRI ; 6,974 kB] pCRII-TOPO-TA-ST-PI2-GFP [BglII/EcoRI ; 0,847 kB]	14.03.07
pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-EAg (-10 bis +149)	29a-1	URA3	2 FL. + PCR- Prod.	pFPMT-CLpre MFap _{ro} -core adw2 (-10 bis +149)	eAg hin/ eAg her	pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [MluI/BamHI ; 7,350 kB] PCR-Prod. EAg (-10 bis +149) [MluI/BamHI ; 0,485 kB]	26.10.07
pFPMT-ST-ORF313-PI2-EAg (-10 bis +149)	27a-1	URA3	2 FL.+ PCR- Prod.	pFPMT-CLpre MFap _{ro} -core adw2 (-10 bis +149)	eAg hin/ eAg her	pFPMT-ST-ORF313-PI2-GFP [MluI/BamHI ; 7,188 kB] PCR-Prod. EAg (-10 bis +149) [MluI/BamHI ; 0,485 kB]	26.10.07
pFPMT-ST-PI2-EAg (-10 bis +149)	41a-1	URA3	2 FL.+ PCR- Prod.	pFPMT-CLpre MFap _{ro} -core adw2 (-10 bis +149)	eAg hin/ eAg her	pFPMTST-PI2-GFP [MluI/BamHI ; 7,083 kB] PCR-Prod. EAg (-10 bis +149) [MluI/BamHI ; 0,485 kB]	26.10.07
pFPMT-ST-PI2-Polytop 1-H6	38a-1	URA3	2FL. + PCR-	pFPMT-Polyepitop1	Polyepitop 1 hin/	pFPMT-ST- PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,083 kB]	16.04.08

			Prod.		Polyepitop 1 her	PCR-Prod. Polyepitop 1-H6 [MluI/BamHI; 1,007 kB]	
pFPMT-ST-ORF313-PI2-Polytop 1-H6	40a-1	URA3	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-Polyepitop1	Polyepitop 1 hin/ Polyepitop 1 her	pFPMT-ST- ORF313-PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,188 kB] PCR-Prod. Polyepitop 1-H6 [MluI/BamHI; 1,007 kB]	21.04.08
pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-Polytop 1-H6	39a-2	URA3	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-Polyepitop1	Polyepitop 1 hin/ Polyepitop 1 her	pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,350 kB] PCR-Prod. Polyepitop 1-H6 [MluI/BamHI; 1,007 kB]	16.04.08
pFPMT-ST-PI2-Polytop 2-H6	35b-1	URA3	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-Polyepitop2	Polyepitop 2 hin/ Polyepitop 2 her	pFPMT-ST- PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,083 kB] PCR-Prod. Polyepitop 2-H6 [MluI/BamHI; 1,230 kB]	05.05.08
pFPMT-ST-ORF313-PI2-Polytop 2-H6	37b-4	URA3	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-Polyepitop2	Polyepitop 2 hin/ Polyepitop 2 her	pFPMT-ST- ORF313-PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,188 kB] PCR-Prod. Polyepitop 2-H6 [MluI/BamHI; 1,230 kB]	24.04.08
pFPMT-ST-T ₂₋₇₇ -PI2-Polytop 2-H6	36a-3	URA3	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-Polyepitop2	Polyepitop 2 hin/ Polyepitop 2 her	pFPMT-ST- T ₂₋₇₇ -PI2-GFP [MluI/BamHI; 7,350 kB] PCR-Prod. Polyepitop 2-H6 [MluI/BamHI; 1,230 kB]	23.04.07
Säugetier-Vektoren							
pCIneo-ST-ORF313-PI2-GFP	43a-1	Kan	2FL. + PCR- Prod.	pFPMT-ST-ORF313-PI2-GFP	pCI hin/ pCI her	pCIneo [EcoR/NotI; kB] PCR-Prod. ST-ORF313-PI2-GFP [EcoRI/NotI; kB]	21.11.08
pCIneo-ST-ORF12-PI2-GFP	44a-1	Kan	2FL.	-	-	pCIneo-ST-ORF313-PI2-GFP [EcoRI/MluI; kB] PCR-Prod. ST-ORF313-PI2-GFP [EcoRI/MluI; kB]	-
pCIneo-ST-ORF313-PI2-GFP	45a-1	Kan	2FL.	-	-	pCIneoST-ORF313-PI2-GFP [EcoRI/MluI; kB] PCR-Prod. ST-ORF313-PI2-GFP [EcoRI/MluI; kB]	-

2.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide für Amplifizierung von *H. polymorpha* Hsp70 aus genomischer DNA des Stammes RB11

70-1 hin	5`-gatgtacaattgatgtctaaagcagtcggaattgatttaggaacaac-3`
70-1 her	5`-agtcatggatccttaatggtgatggtggtggtccacctctcgacggaaggaccctgg-3`
70-2 hin	5`-gatgtacaattgatgtctaaagcagtcggtattgacttaggtactac-3`
70-2 her	5`-agtcatggatccttaatggtgatggtggtggtgatcaacctctcaacagttggaccttgagtctcc-3`

Oligonukleotide für die Plasmidkonstruktion mit Polylinker (PI2) für die Umklonierung der *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen

PL2 hin	5`-gcgctcctcagccatggtgagcaagggcgaggagctgttcac-3`
PL2 her	5`-gtttaaactagtgaggatacaggtacagttgccgctgctggg-3`

Oligonukleotide für die Konstruktion von Fusionsproteinen mit *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen

12 hin	5`-gagaaactcgagtctctttatgatattctgggagtgactctctg-3`
12 her b	5`-ggctgaggacgcggttaaactagtttctctctctataaggactcgtagg-3`
16 hin	5`-gagaaactcgagaagctctacgattgctaggggtgtccc-3`
16 her	5`-ggctgaggacgcggttaaactagttccgtactgatcgtaaacttctctgtctg-3`
313 hin	5`-gagaaactcgagccgctgatcaagaaggcctactataaactgtg-3`
313 her	5`-ggctgaggacgcggttaaactagttctctctctcaactggttttatactctctg-3`

Oligonukleotide für die HDP-Motiv Mutagenese

HPE hin	5`-agaattatcggagcatgatcagaagaagtataaac-3`
HPE her	5`-ccggatgatacttgagacacagtttatagtagcc-3`

Oligonukleotide für die Konstruktion von Fusionsproteinen ohne *H. polymorpha* DnaJ-ähnliche Domäne

Delta T hin	5`-ctcgagtttctcaaactgaggggtggaccagc-3`
Delta T her	5`-actagtttaaacacatcctcagccatggtgagc-3`

Oligonukleotide für die Amplifizierung von Hsp73 (*Homo sapiens*)

73 hin	5`-catgatcaattgatgtccaagggacctgcagttggtattgatcttg-3`
73 H6 her	5`-agtcatggatccttaatggtgatggtggtggtgatcaacctctcaatggtggccctgagg-3`

Oligonukleotide für EAg Konstruktionen

EAg hin	5`-acgatcacgcgtccaagctgtgccttgggtggcttggggca-3`
EAg her	5`-aagtcgcgagggggatccttaacaacagta-3`

Oligonukleotide für Polyepitop 1 Konstruktionen

Polyepitop 1 H6 hin	5`-gtactgacgcgtccggtaccagcttctgtactcctcaagcgc-3`
Polyepitop 1 H6 her	5`-aagttggatccttaatggtgatggtggtggtcgcacag-3`

Oligonukleotide für Polyepitop 2 Konstruktionen

Polyepitop 2 H6 hin	5`-agtagtacgcgttctcctgtccttaggcacctgaac-3`
Polyepitop 2 H6 her	5`-ctgtaggatccttaatggtgatggtggtggtgattgattgagg-3`

Oligonukleotide für die Umklonierung des ORF313-Fusionsproteins in den Vektor pCIneo pCI hin

5`-catcggaattcatggccagct-3`

pCI her 5'-tagtagcgccgacctgtacagctcgtccatgcc-3'

2.7 Methoden zur Kultivierung von Mikroorganismen

2.7.1 Kultivierung in Schüttelkolben/Röhrchen

Die Kultivierung von Mikroorganismen erfolgte entweder in Röhrchen (3 ml) oder Schüttelkolben mit unterschiedlichen Volumina (10 ml - 1 L) bei 37°C und 160 rpm.

2.7.2 Kultivierung in Deep Well-Mikrotiterplatten

Die Kultivierung von Mikroorganismen in Deep Well-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) fand in Volumina von 500 µl pro Well bei 37°C und 300 rpm im Inkubator (Kuhner) statt. Die Sterilität und der Sauerstoffaustausch der Kulturen wurde durch eine gasdurchlässige Abdeckfolie (Nonwoven-Abdeckfolie; HJ BIOANALYTICS GmbH) gewährleistet.

2.7.3 2 L Fed-Batch Fermentation

Mit der Kultivierung von Mikroorganismen im Bioreaktor im Fed-Batch Verfahren kann durch die kontinuierlichen hohen Sauerstofftransferaten und der Zufütterung von Nährstoffen eine hohe Biomasse erzielt werden. Außerdem ermöglicht eine Onlinemessung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffpartialdrucks eine Kultivierung unter definierten Bedingungen.

Für die Fermentation wurde ein 2 L-Fermenter mit 1,5 L-Arbeitsvolumen verwendet. Der Fermenter wurde mit Medium befüllt und die Stellmedien (Base, Säure, Antischaum-Lösung und Feed-Lösung) über Schläuche angeschlossen. Die pH-Elektrode wurde extern im Bereich pH 4-7 kalibriert und zusammen mit der pO₂-Elektrode und den Zu- und Abluftfiltern am Fermenter installiert. Der Fermenter wurde anschließend samt Medien, Filtern und Elektroden autoklaviert (120°C, 20 min). Die Kalibrierung der pO₂-Elektrode erfolgte nach dem Autoklavieren zwischen 0% und 95%. Die Vorkultur, mit der der Fermenter angeimpft wurde, wurde im Schüttelkolben in Vollmedium (YPD) bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Das Animpfen erfolgte über ein Septum mit Hilfe eines Vorlagegefäßes und einer Anstechnadel, welche vorher autoklaviert wurden. Die Fermentation wurde bei 37°C, einem pH-Wert von 6,5, einer Begasungsrate von 1 L/min und einer Rührerdrehzahl von 450 rpm durchgeführt. Nachdem der pO₂-Wert auf Null gesunken war, wurde eine 70%ige Glycerin-Lösung über eine externe Pumpe kontinuierlich bei einer Flussrate von 3 ml/h zugefügt. Anschließend fanden drei Methanol-Pulse (2x 1,5% MeOH und 1x 0,75% MeOH) zwecks Induktion der Zielgenexpression statt. Das Methanol wurde steril mit Hilfe einer Spritze über ein Septum im Abstand von 5 Stunden nach der ersten Zugabe und 3 Stunden nach der zweiten Zugabe zugegeben. Nach weiteren 12 Stunden Kultivierung wurde die Kultur geerntet (5000 rpm, 20 min). Die Zellen wurden in 2 L [100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl; pH 8,0] gewaschen und entweder in Aufschlusspuffer resuspendiert oder, wenn nicht sofort für weitere Analysen verwendet, bei -80°C gelagert. Während der Fermentation wurde in regelmäßigen Abständen die Optische Dichte (OD) bei 600 nm bestimmt. Kulturreste und der Fermenter wurden nach Abschluss der Prozedur autoklaviert (120°C, 20 min). Der Fermenter wurde anschließend in seine Bestandteile zerlegt und gespült.

Base	15	%	Ammoniak
Säure	30	%	Phosphorsäure
Antischaumlösung	10	%	Struktol
Feed-Lösung	60	%	Glyzerin

2.8 *H. polymorpha*-Stammgenerierung (Rhein Biotech GmbH, Methodensammlung)

Bei *H. polymorpha* integriert die Plasmid-DNA im Gegensatz zu anderen Hefen in das Genom. Nach erfolgter Transformation liegt die Plasmid-DNA zunächst episomal vor. Um eine Integration der Plasmid-DNA in das Genom zu erzielen, werden die Transformanten für etwa 40-80 Generationen unter Selektivbedingungen (hier in YNB-2% Glukose Medium) als 4 bis 8 aufeinanderfolgende Relais-Kulturen kultiviert („passagiert“). Während dieser Passagen integriert das Plasmid schließlich mit bis zu 50 Kopien in die genomische DNA der Wirtzelle. Die Integration in das Chromosom erfolgt homolog in einen von mehreren möglichen Loci, wobei die Plasmidkopien am Ende als Konkatemere in Head-to-Tail-Anordnung vorliegen. Um Zellen mit eventuell noch vorhandener episomaler Plasmid-DNA zu eliminieren, wird eine Stabilisierung der Passagierungsansätze in YPD-Vollmedium durchgeführt. Die Stämme werden nach einer erneuten Kultivierung in Selektionsmedium auf Selektionsplatten vereinzelt. Dabei wird Glukose als Kohlenstoffquelle eingesetzt, um die Fremdgenexpression gering zu halten.

Einzelkolonien (= Stämme) werden anschließend bezüglich Produktbildung überprüft. Zu diesem Zweck wurden die zu analysierenden Stämme zunächst über Nacht in YPD-Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in YNB-1% Glyzerin (Derepression) und darauffolgend für 16-20 Stunden in YNB-1% Methanol (Induktion) bei 37°C kultiviert.

2.8.1 Stammgenerierung in 3 ml-Röhrchen

Bei der Stammgenerierung in Röhrchen (befüllt mit 3 ml Selektionsmedium) wurden generell 20 µl der dicht gewachsenen Kultur aus der vorherigen Passage in frisches Medium überführt. Die Kultivierung der einzelnen Passagen erfolgte für jeweils zwei Tage bei 37°C und 160 rpm unter Selektionsbedingungen. Für die Stabilisierung in Vollmedium wurden jeweils 20 µl Kultur aus der letzten Passage in das neue Medium überimpft. Die Inkubation erfolgte für einen Tag bei 37°C und 160 rpm.

2.8.2 Stammgenerierung in der Deep Well-Mikrotiterplatte

Für eine Stammgenerierung in Deep Well-Mikrotiterplatten (Greiner bio-one) wurden die Wells jeweils mit 500µl Medium befüllt und jeweils 10 µl Kultur aus der vorangegangenen Passage in frisches Medium überführt. Die Inkubation der einzelnen Passagen in Minimalmedium erfolgte jeweils für zwei Tage bei 37°C und 300 rpm. Die Stabilisierung erfolgte jeweils für einen Tag bei 37°C und 300 rpm.

2.9 Bestimmung der Optischen Dichte (OD) von Kulturen

Die Absorption oder Optische Dichte (OD) wurde spektralphotometrisch mit dem Spektralphotometer „Photometer DU-800“ (Beckman Coulter) bei 600 nm gemessen und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Die Absorption (A) wird durch den Vergleich der Identität des einfallenden Lichtes (I_0) und der Intensität des transmittierten Lichts (I) ermittelt.

2.10 Präparation von Nukleinsäuren

2.10.1 Präparation von genomischer DNA aus Hefe

Die Präparation der chromosomalen DNA erfolgte mit dem Master Pure™ Yeast Purification Kit (Epicentre Biotechnologies GmbH) nach Herstellerangaben.

Eine über Nacht in Vollmedium dicht gewachsene 3 ml-Kultur wurde bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 300 µl Yeast Cell Lysis-Lösung aufgenommen und für 15 min bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 150 µl MPC Protein Präzipitationsreagenz versetzt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand anschließend mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde danach getrocknet und in 35 µl TE Puffer gelöst. Für PCR-Analysen wurde die DNA zusätzlich mit 1 µl RNase A (5 µg/µl) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Für die Reklonierung von Plasmid-DNA aus genomischer DNA wird die zuvor präparierte genomische DNA mit einem „Single cutter“ Restriktionsenzym für mind. 3 Stunden verdaut, das Enzym anschließend inaktiviert und die DNA über Nacht bei 16°C religiert (siehe auch 2.14.2). Danach wird die Plasmid-DNA wie unter 2.13.2 beschrieben für einen Transformationsansatz mit *E. coli* Zellen eingesetzt, um die Plasmid-DNA anzureichern. Anschließend wird die Plasmid-DNA aus Transformanten präpariert (siehe 2.10.1) und durch eine Restriktionsanalyse verifiziert.

2.10.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-Mini-Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Methode durch alkalische Lyse. Dazu wurden je 1,5 ml von über Nacht dicht gewachsenen 2 ml-Kultur bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert und die Zellpellets in 150 µl Lösung 1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte nach Zugabe von 150 µl Lösung 2 und durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Anschließend wurden die Ansätze zur Neutralisierung mit 150 µl Lösung 3 versetzt und vorsichtig mehrmals invertiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96% Ethanol gefällt. Danach wurde durch Zentrifugation die DNA für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert wurde, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen.

Lösung I	25	mM	Tris-HCl
	10	mM	EDTA
	50	mM	Glukosemonohydrat
Lösung II	1	%	SDS
	0,2	M	NaOH
Lösung III	3	M	Kaliumacetat
	11,5	%	Essigsäure

Plasmid-Midi-Präparation

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem „peqGOLD Kit2“ (peQLab) nach Herstellerangaben durchgeführt. Mit diesem Kit präparierte Plasmid-DNA eignet sich für Sequenzierungen und andere anspruchsvolle Folgeanwendungen. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte aus einer stationären 25 ml Kulturen in Selektionsmedium. Die Plasmid-DNA wurde in 2x 50 µl Elutionspuffer eluiert.

2.11 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

2.11.1 Bestimmung der Konzentration mittels Spektralphotometrie

DNA-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bei 260 nm und 280 nm gemessen (Maniatis *et al.*, 1982). Eine Extinktion bei 260 nm von 1 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Der Quotient $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ gibt die Reinheit der DNA an.

Gerät:

Spektralphotometer "Photometer DU-800" (Beckman Coulter)

2.11.2 DNA-Konzentrationsabschätzung aus Agarosegelen

Die Abschätzung der Konzentration doppelsträngiger DNA mittels Gelelektrophorese erfolgte anhand eines Vergleichs mit einem Konzentrationsstandard (High MassTM KB-Ladder, Gibco).

2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) durchgeführt. Mit Hilfe der Computerprogramme Sci Ed Central und Chromas Lite wurden die erhaltenen Rohdaten ausgewertet.

2.13 Transformation und Herstellung elektrokompetenter Zellen

2.13.1 Herstellung elektrokompetenter *H. polymorpha*-Zellen

Von einer mit einer Einzelkolonie angeimpften über Nacht dicht gewachsenen 3 ml-Vorkultur in Vollmedium (160 rpm, 37°C), wurde eine 100 ml-Hauptkultur beimpft und bei 37°C und 160 rpm bis zu einer $OD_{600} = 0,8 - 1,0$ inkubiert. Die Hauptkultur wurde geerntet (5 min, 3000 rpm). Die Zellen wurden in auf 37°C vorgewärmten 50 mM Kaliumphosphatpuffer (KPi-Puffer) (pH 7,5) resuspendiert und mit 250 µl 1M DTT versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C und anschließender Zentrifugation (5 min, 300 rpm) wurden die Zellen in 100 ml STM-Puffer gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Waschschrift mit 50 ml STM-Puffer wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl STM-Puffer resuspendiert und als 60 µl Aliquots in sterile Eppendorf-Gefäße überführt. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

STM-Puffer	279	mM	Saccharose
	10	mM	Tris
	1	mM	MgCl ₂ *6H ₂ O
KPi-Puffer pH 7,5	174 ml	0,5 M	KH ₂ PO ₄
		0,5 M	K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml

2.13.2 Transformation von *H. polymorpha*-Zellen mittels Elektroporation

Die Transformation von *H. polymorpha* erfolgte durch Elektroporation. Dafür wurden 60 µl elektrokompetente *H. polymorpha* Zellen mit 1-2 µg Plasmid-DNA transformiert. Die Transformation erfolgte in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (2mm Spalt, Molecular Bio Products) mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) bei 2 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml Vollmedium überführt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal in 1 ml sterilem H₂O gewaschen und in 600 µl sterilem H₂O resuspendiert. Die Ansätze wurden auf Selektionsmedium ausplattiert (3x 200 µl) und für 2-3 Tage bei 37°C inkubiert.

2.13.3 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Für die Transformation wurden elektrokompetente *E. coli* Zellen (One Shot TOP10) der Fa. Invitrogen verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl Plasmid-DNA transformiert. Die Elektroporation erfolgte in Küvetten mit 1 mm Spalt mit dem „Gene Pulser II“ (BioRad, München) bei 1,6 kV, 200 Ω und 25 µF. Die Zellen wurden danach mit 1 ml LB-Medium versetzt, für 30 min bei 37°C geschüttelt und anschließend auf LB/Amp- oder LB/Kan-Platten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden makroskopische Transformantenkolonien sichtbar.

2.14 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.14.1 Restriktion von DNA

Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller (Roche, Fermentas) in den angegebenen Pufferbedingungen und Temperaturen. Analytische Restriktionsansätze wurden in Volumina von 20 µl und präparative Restriktionsansätze in Volumina von 20 – 100 µl durchgeführt. Die Inkubation erfolgte typischerweise für 1-2 h. Pro µg DNA wurden 1-10 Units (U) des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Bei analytischen Ansätzen, die mit der Methode der Plasmid-Mini-Präparation (siehe 2.10.2.1) angefertigt wurden, wurde RNase A in einer Endkonzentration von 100 µg/µl zugefügt.

2.14.2 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in der Regel mit einem Vektor/Insert-Verhältnis von 2:1 in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Pro Ligationsansatz wurde 1U T4-Ligase (Roche) und ¼ Vol. 5-fach Ligationspuffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16°C.

2.14.3 Entsalzen von Ligationsansätzen

Die Ligationsansätze wurden vor der Transformation mit Hilfe von MFTM-Membran Filtern (Millipore) für 20 min bei RT in sterilem H₂O entsalzt.

2.14.4 T4-Polymerase-Reaktion

Die T4-DNA-Polymerase hat sowohl eine 5'→3'-Polymeraseaktivität als auch eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Durch die Exonukleaseaktivität werden vorhandene 3'-Überhänge abgespalten

und es entstehen Blunt-Enden. Für die Reaktion wurden 1U T4-Polymerase (Roche) pro μg DNA und die vier Desoxyribonukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP in einer Endkonzentration von jeweils 0,25 mM verwendet. Die Ansätze wurden für 20 min bei 37°C inkubiert.

2.14.5 Kinase Reaktion

DNA-Fragmente müssen für eine Ligation an ihren 5' Enden phosphoryliert sein. Die Phosphorylierung wird durch die Polynukleotid-Kinase erzielt, die den Transfer terminaler Phosphatgruppen von ATP an die 5'-OH Gruppen terminaler Deoxyribose der DNA katalysiert. Die Phosphorylierung erfolgte durch Zugabe von 1 U Kinase (Roche) pro μg DNA und ATP. Für die Reaktion wurden die vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen verwendet. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.15 Auftrennung und Aufarbeitung von DNA-Fragmenten

2.15.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in 1%tigen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen (15 μl einer 1% EthBr-Lösung pro Gel) bei 150-180 V aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden für den Gel-Lauf mit 1/10 Vol. 10-fach konzentriertem Ficoll-SDS-Probenpuffer versetzt. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente die High MassTM DNA-Leiter der Fa. Gibco.

Geräte:

Gel Electrophoresis Apparature GNA 200 (Pharmacia)

Netzgerät H. Volt 350/300 (Welabo)

Geldokumentation (Intas®)

5x TBE-Puffer	0,45	M	Tris (hydroxy- methyl)-Aminomethan
	0,45	M	Borsäure
	10	mM	EDTA
10x Ficoll-SDS-Probenpuffer	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	0,30	%	Ficoll
	0,2	%	SDS
	10	mM	EDTA
	69,5	%	TBE-Puffer

3.15.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden die DNA-Banden mittels UV-Licht visualisiert, aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 15-50 μl Elutionspuffer eluiert.

2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.16.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch PCR erfolgte nach dem Protokoll von Inis *et al.* (1990) mit dem Thermocycler T3 (Biometra®). Die PCR-Reaktionen wurden in Volumina von 100 µl Ansätzen mit dem Expand Long Template PCR System der Fa. Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Template diente entweder Plasmid-DNA oder genomische DNA des *H. polymorpha* Stammes RB11.

Gezielte Mutationen wurden mit Hilfe von spezifischen Primern erstellt. Der Erhalt der Bindungsspezifität der Primer wird durch längere unmodifizierte Sequenzbereiche in direkter Nachbarschaft zu der Mutation gewährleistet.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte nach Auftrennung über 1%ige Agarosegele mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

1	µl	DNA-Lösung
1	µl	Expand Long Template Polymerase Mix
2	µl	Vorwärtsprimer (100µM)
2	µl	Rückwärtsprimer (100µM)
10	µl	10x Expand Long Template Puffer
8	µl	dNTPs (2,5 mM each)
76	µl	MilliQ

1.	Heat-Start	15 min	95 C°	} X 35
2.	Denaturierung	1 min	95 C°	
3.	Annealing	1 min	60 C°	
4.	Elongation	1 min/kb	72 C°	
5.	Finale Elongation	10 min	72 C°	
6.	Kühlung	konstant	4 C°	

2.16.2 PCR-Mutagenese

Bei der PCR-Mutagenese wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Nach Abschluss der PCR wurden die Ansätze mittels Gelelektrophorese bezüglich Produktbildung analysiert. Im Fall spezifischer Produkte wurden pro Ansatz 1 µl T4-Polymerase und 4µl dNTPs hinzugegeben und die durch Tag-Polymerase verursachten 3'A-Überhänge durch 20 Minuten Inkubation bei 37°C entfernt (siehe auch 2.14). Nach Fällung der Ansätze mit 97% Ethanol und anschließendem Waschen mit 70% Ethanol wurden die DNA-Pellets getrocknet und in sterilem H₂O aufgenommen. Anschließend wurden die 5'-Enden der DNA durch eine Kinase-Reaktion phosphoryliert (siehe 2.15). Aliquots der Kinasierungsansätze wurden in eine Ligasereaktion eingebracht, um zirkuläre Plasmide mit der gewünschten Mutation zu erzeugen

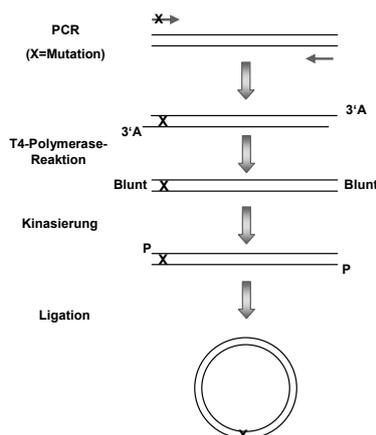


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der PCR-Mutagenese

Amplifizierung des gesamten Plasmids in Kombination mit spezifischen Primern (kodieren für die Mutation [X]). Anschließende Entfernung der 3'A Überhänge durch T4-Polymerase und Phosphorylierung der 5'-Enden ermöglichen eine Religierung des Plasmids.

2.17 Herstellung von Proteinextrakten aus *H. polymorpha*

2.17.1 Im 3 ml-Maßstab mittels Glaskugeln

Die Zellen von in 3-500 ml Medium gewachsenen Kulturen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 2000 rpm geerntet. Die Zellpellets wurden in 0,5 - 10 ml gekühltem Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden bis knapp unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus mit Glasperlen (Ø 0,5 mm; Willy A. Bachofen GmbH) versetzt und mit dem Vibrax aufgeschlossen (Typ VX 2 E; Janke & Kunkel, 15-30 min, 2200 rpm, 4°C). Zur Abtrennung der Zellbestandteile wurden die Ansätze zentrifugiert (15-30 min, 13.000 rpm, 4°C) und anschließend die geklärten Überstände in neue Eppendorf-Gefäße überführt. Für Proteinanreicherungen wurden die löslichen Fraktionen unbehandelt eingesetzt. Für SDS-PAGE Analysen wurden die löslichen Fraktionen mit ¼ Volumen 4x SAB Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt.

Zellaufschlusspuffer	50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Triton X-100
	2 mM	PMSF

2.17.2 Im Deep Well-Platten-Maßstab mittels Glaskugeln

Die Zellen von in 500 µl Medium angewachsenen Kulturen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 2000 rpm geerntet. Die Zellpellets wurden in je 150 µl Aufschlusspuffer resuspendiert und in eine Mikrotiterplatte (NUNC), deren Wells zuvor mit je 100 µl Glasperlen befüllt wurden, überführt. Der Zellaufschluss erfolgte auf dem Vibrax (Typ VX 2E; Janke & Kunkel) bei 4°C und 2200 rpm für 20 min. Die Glasperlen wurden kurz abzentrifugiert und die Überstände in eine neue Mikrotiterplatte überführt, in welcher die restlichen Zellbestandteile abzentrifugiert wurden (4500 rpm, 30 min, 4°C). Die geklärten Überstände (lösliche Fraktion) wurden mit ¼ Vol. Probenpuffer (E-PAGE Loading Buffer; Invitrogen) versetzt und im Wasserbad für 10 min bei 70°C erhitzt.

2.17.3 Herstellung von Proteinextrakten mittels Hochdruckhomogenisation

Die Hochdruckhomogenisation nach dem Prinzip von BERNOULLI (Sticker, 1987) bewirkt einen Zellaufschluss durch Kavitation, welcher durch starke Scherkräfte und Pralldrücke, die auf die Zellen ausgeübt werden, weiter unterstützt wird.

Für die Herstellung von Proteinextrakten mittels Hochdruckhomogenisation wurde der Homogenisator APV 2000 (APV, Unna) für mindestens 30 min mit 0,5 M NaOH sanitisiert. Nach dem Spülen mit sterilem Wasser, wurde das APV-Gerät mit Puffer [100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 8,0] äquilibriert. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer resuspendiert (~ 50 g Feuchtbioasse/l) und mit dem Hochdruckhomogenisator bei 1400 - 1500 bar und 4°C aufgeschlossen. Dabei zirkulierte die Zellsuspension für 30-40 min kontinuierlich bis eine Verringerung der Optischen Dichte auf 1/3 des Ausgangswertes gemessen wurde. Anschließend wurden die Zellen für 45 min bei 17.000xg und 4°C (Avanti J26-XP, Beckman Coulter) abzentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde steril filtriert (Sartoban 300; sterile capsule; 0,45 + 0,2µm; Sartorius) und für Proteinanreicherungen verwendet.

Äquilibrierungspuffer	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	NaCl
		eingestellt auf pH 8,0

2.18 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt, wobei die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Protein-bindenden Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm gemessen wird. Als Proteinstandard diente eine BSA-Lösung (Sigma), von der eine Standardkurve (von 25-200 µg/ml) erstellt wurde. Die zu bestimmenden Proben wurden seriell mit sterilem MilliQ so verdünnt, dass sie im Konzentrationsbereich der Standardkurve lagen. Sowohl von der Standardreihe als auch von den Proben wurden jeweils 20 µl in Duplikaten auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und mit je 200 µl Bradford-Reagenz (BioRad Protein Assay Dye Reagent; BioRad; München) versetzt, um die Reaktion zu starten. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion mit dem Microplatten-Reader SpectramaxPlus³⁸⁴ (Molecular Devices) bei 465 nm und 595 nm gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SOFTmax Pro 3.1.

2.19 Protein-Charakterisierung mittels Reverse Phase (RP) – HPLC

Bei der Reverse Phase (RP) – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) wird die hydrophobe Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Lösungsmittel genutzt. Die unpolaren Trägermaterialien entstehen durch die Veretherung der OH-Gruppen mit langen Kohlenwasserstoffketten. Der hydrophobe Charakter der stationären Phase steigt mit der Länge der Kohlenwasserstoffketten. Die mobile Phase der RP-HPLC besteht aus Lösungsmittelsystemen, die sich aus Wasser, organischen Lösungsmitteln, einem Ionenpaar-Reagenz oder Puffer zusammensetzen. Durch die Bindung eines Ionenpaar-Reagenz als Gegen-Ion an die ionischen Seitengruppen des Peptids wird dessen Hydrophobizität verändert und somit die Retention und die Selektivität des Trennvorgangs beeinflusst. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wird die Polarität der mobilen Phase verringert und somit die Elutionskraft erhöht (Lootspeich, 1998). Gemessen wird die Retentionszeit, die die Analyten benötigen, um von der Säule zu eluieren.

Für die Trennanalysen in dieser Arbeit wurde eine C8-Säule 150 x 4,5 mm (Nukleosil 120-3-C8) in Kombination mit dem HPLC-System Gold der Fa. Beckman Coulter verwendet. Das System wurde vor dem Trennvorgang mit Puffer A äquilibriert. Es wurde 0,05 mg Proteinlösung in einem Volumen von 100 µl aufgetragen und mit Puffer B eluiert. Die Elution erfolgte durch eine Gradiententrennung, bei der der Polarisationsgradient innerhalb von 30 min von 40% Puffer B auf 100% Puffer B gefahren wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte bei einer UV-Absorption von 168-214 nm. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das System wurde anschließend mit Acetonitril-Lösung gespült. Das HPLC-System wurde mit der Software 32Karat (Beckman Coulter) bedient.

Puffer A	100	%	H ₂ O
	0,1	%	Trifluoressigsäure pH 2,2
Puffer B	100	%	Acetonitril
	0,1	%	Trifluoressigsäure

2.20 Protein-Charakterisierung mittels Size Exclusion Chromatographie (SEC) – Lightscatter

Die Ausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Die Trennung wird durch die Verweildauer der einzelnen Moleküle in den Poren der Trenngele erzielt, wobei sich die Aufenthaltsdauer verlängert je kleiner die Moleküle sind. Die mobile Phase hat keinen Einfluss auf die Trennung der Moleküle. Moleküle, die für die Poren der Matrix zu groß sind, eluieren mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen. Als Laufmittel werden wässrige Solvenzien von mittlerer Ionenstärke (50-100 mM) verwendet, deren Auswahl sich nach der Löslichkeit der Probe richtet.

Für die Analysen wurde das HPLC Gerät System Gold (Beckman Coulter) in Kombination mit der Software 32Karat (Beckman Coulter) und Astra (Wyatt Technologies) und die Säule BioSuite 250 (5 µm, HRsec) (7,8 x 300 mm) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Säule und System wurden vor dem Trennvorgang mit Tris-Puffer äquilibriert. Für die Analysen wurden jeweils 100-250 µg Proteinlösung in einem Volumen von 100 µl injiziert. Als Negativkontrolle diente der Elutionspuffer der Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose (siehe 2.23.2.1). Die UV-Detektion erfolgte bei 220 nm und die Laserdetektion, mit der die Lichtstreuung gemessen wurde, bei 690 nm. Der Lichtstredetektor befindet sich im Strahlengang vor dem UV-Detektor. Zu Beginn wurde die Kalibrierungskonstante für den RI-Detektor (Brechungsindex-Detektor) mit BSA als Standard ermittelt, wodurch es in Kombination mit der Lichtstreuung möglich ist, das Molekulargewicht der Analyten zu berechnen.

Tris-Puffer	100	mM	Tris/HCl
	150	mM	NaCl
			eingestellt auf pH 8,0

2.21 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

2.21.1 Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

2.21.1.1 Denaturierende /reduzierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach Laemmli als kontinuierliche Elektrophorese durchgeführt. Für die Elektrophorese wurden 4-20%ige Tris/Glyzin-Gele der Fa. Invitrogen verwendet. Diese wurden mit Proteinproben beladen, die zuvor mit ¼ -Probenvolumen 4x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt wurden. Das im Probenpuffer enthaltene SDS hebt die Eigenladung und die räumliche Struktur der Proteine auf, während das β-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken reduziert. Der Trennvorgang erfolgte in 1x Laufpuffer bei 160 V für 1 h in einer Novex Gelkammer. Als Molekulargewichtsmarker diente der PreStained See Blue Standard (Invitrogen).

4x Probenpuffer	0,27	M	SDS
	0,14	M	Tris-HCl
	4	mM	EDTA
	40	% w/w	Glyzerin
	0,47	mM	Serva Blue G Farbmarder
	3,2	M	β-Mercaptoethanol
10x Laufpuffer	34,7	mM	SDS
	131,5	mM	Tris-HCl
	2	M	Glyzin

Screening-Durchgänge mit hohem Durchsatz wurden mit dem E-PAGE System von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 6%ige 96-Well E-PAGE Gele und die E-Base Apparatur verwendet. Die Proteinproben wurden für diese Analyse, wie unter 2.17.2 beschrieben, hergestellt. Als Molekulargewichtsstandard diente der Marker E-PAGE See Blue (Invitrogen).

2.21.1.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine anhand ihrer Größe, Eigenladung und Konformation aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.21.1.1 beschrieben - der Probenpuffer sowie der Laufpuffer enthielten jedoch weder SDS noch β -Mercaptoethanol. Außerdem werden die Ansätze vor der Gelelektrophorese nicht erhitzt.

2.21.2 Nachweis von Proteinen

2.21.2.1 Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie-Brilliant-Blue

Proteine werden im Polyacrylamidgel mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt, indem sich der Farbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Die Nachweisgrenze von Proteinen liegt mit dieser Methode bei 0,1 μ g pro Bande. Die Gele wurden zunächst auf dem Schüttler für 10 min in MilliQ und anschließend für mindestens 1 h in der Färbelösung Coomassie Brilliant Blue Gel Code™ Stain Reagent (Pierce) inkubiert. Im Anschluss wurden die Gele mit MilliQ bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt.

2.21.2.2 Färben von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels Ponceau-S

Protein-behaftete Nitrozellulosemembranen können mit dem Acofarbstoff Ponceau-S reversibel angefärbt werden. Dafür wurden die Membranen für 10 min in 1x Ponceau-S Lösung inkubiert und anschließend bis zur gewünschten Bandenintensität mit MilliQ entfärbt. Nach der Dokumentation durch Einscannen wurden die Membranen für Folgeanalysen wie Western-Blot-Analysen verwendet.

Ponceau-S-Lösung	0,2	%	Ponceau-S
	30	Vol-%	Trichloressigsäure
	70	Vol-%	Deionisiertes Wasser

2.22 Immunologischer Nachweis filtergebundener Proteine („Western-Blot-Analyse“)

2.22.1 Semidry-Blotting

Nach der Auftrennung der Proteine in Polyacrylamidgelen erfolgte ein Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond™-ECL; Amersham). Das Gel, die Filter (Whatman) und die Membran wurden vor dem Blot-Aufbau in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 0,92 mA/cm² für 1-1,5 h bei RT in der TRANS-BLOT® SEMI-DRY TRANSFER CELL (BioRAD).

Transferpuffer	39	mM	Glyzerin
	48 <th>mM</th> <td>Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan</td>	mM	Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan
	37 <th>% w/w</th> <td>SDS</td>	% w/w	SDS
	20 <th>% v/v</th> <td>Methanol</td>	% v/v	Methanol

Der Elektrotransfer der E-PAGE Gele erfolgte mit der iBlot™ Apparatur in Kombination mit iBlot™ Gel Transfer Stacks (Nitrozellulose) der Fa. Invitrogen nach Herstellerangaben.

2.22.2 Detektion filtergebundener Proteine

Nach dem Elektrotransfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran in deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend wie unter 2.21.2.2 beschrieben mit Ponceau-S gefärbt. Die immunologische Detektion der membrangebundenen Proteine erfolgte mit dem Western Breeze Kit (Anti-Mouse bzw. Anti-Rabbit) der Fa. Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit deionisiertem Wasser gestoppt und die Membran anschließend eingescannt und bis zur weiteren Verwendung getrocknet.

2.23 Affinitätschromatographie-Systeme

2.23.1 Affinitätschromatographie mittels Streptactin-Matrix

Das Strep-Tag-Reinigungssystem ist ein besonders schonendes Verfahren, mit dem Proteine unter physiologischen Bedingungen aufgereinigt werden können. Es basiert auf der hohen Affinität des aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) bestehenden Strep-Tags zu Streptactin, einem Streptavidin-Derivat. Da das Biotin-Derivat Desthiobiotin eine noch höhere Affinität zu Streptactin hat, können durch dessen Zugabe über den Strep-Tag an die Matrix gebundene Proteine gelöst werden. Der Strep-Tag hat in der Regel einen vernachlässigbaren Effekt auf die Struktur und die Eigenschaften von rekombinaten Proteinen und kann sowohl N-terminal als auch C-terminal an das Protein fusioniert werden.

2.23.1.1 Affinitätschromatographie mittels Streptactin Spin Columns

Für die selektive Proteinaufreinigung Strep-Tag Fusionsproteinen mittels Streptactin Spin-Columns (IBA, Göttingen) wurden Zellen einer 100 ml-Kultur geerntet und in 2 ml Aufschlusspuffer aufgenommen. Mit Hilfe von Glasperlen wurden Proteinextrakte hergestellt (siehe 2.17.1); der Zellaufschluss erfolgte für 45 min bei 2200 rpm mit einem Vibrax (Typ VX 2E; Janke & Kunkel) bei 4°C. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden nach dem Aufschluss abzentrifugiert (30 min, 13.000 rpm, 4°C). Die Säulchen wurden mit dem geklärten Proteinextrakt beladen und anschließend mit 6x 100 µl Waschpuffer gewaschen. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte jeweils eine Zentrifugation bei 500 rpm bei 4°C. Anschließend wurde das Protein mit 2x 50 µl Elutionspuffer von der Matrix eluiert.

Zellaufschlusspuffer	100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150	mM	NaCl
	0,5	%	NP40
	2	mM	PMSF
	1		Protease Cocktail Inhibitor Tablette eingestellt auf pH 8,0
Wasch- /Säulenäquilibriumspuffer	100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
			eingestellt auf pH 8,0
Elutionspuffer	100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA

	2,5	mM	D-Desthiobiotin oder Biotin eingestellt auf pH 8,0
Regenerationspuffer	100	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	1	mM	HABA (2-[4'-Hydroxy-Benzo] Benzoic Acid) eingestellt auf pH 8,0

2.23.2.2 Affinitätschromatographie mittels selbstgepackten Streptactin-Sepharose-Säulen

Die Säulenmatrix (0,5-2 ml) wurde mittels Gravity flow in einem Plastikröhrchen gepackt, das unten durch eine Schlauchverlängerung mit einer Schlauchklemme verschlossen werden kann. Für die Aufreinigung wurden 500 ml Kulturen wie unter 2.23.1.1 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde unter Gravity flow Bedingungen auf die Säule geladen und anschließend mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 ml Elutionspuffer (mit D-Desthiobiotin), die Fraktionen wurden à 0,5 ml gesammelt.

2.23.2.3 Affinitätschromatographie mittels Streptactin Superflow-Matrix

Für die Aufreinigung größerer Mengen an Strep-Tag-Fusionsprotein wurden Chromatographieläufe mit Streptactin-Superflow-Matrix [5 ml] (IBA, Göttingen) und dem automatischen Fraktionssammelsystem ÄKTAPrime Plus (Amersham Biosciences) durchgeführt. Vor der Aufreinigung wurde das ÄKTA-System und die Säule für mindestens 30 min mit 0,4 M NaOH sanitisiert und anschließend mit Waschpuffer äquilibriert. Für die Aufreinigung wurden die Hefezellen in Aufschlusspuffer ad. 500 ml resuspendiert und mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen (siehe 2.17.3). Anschließend wurden die Ansätze für 45 min bei 17.000xg bei 4°C (Avanti J26-XP, Beckman Coulter) zentrifugiert. Der geklärte Proteinextrakt (lösliche Fraktion) wurde steril filtriert (Sartoban 300; sterile capsule; 0,45 + 0,2 µm; Sartorius) und mit Hilfe einer externen Pumpe (Meredos SP-GS, 30% Pumpleistung entspricht einer Flussrate von 2 ml/min) auf die Säule geladen. Die Säule wurde danach so lange mit Waschpuffer gespült (Flussrate 2 ml/min), bis im Durchfluss kein Protein mehr mit dem UV-Detektor detektiert werden konnte. Das Protein wurde mit Elutionspuffer unter nativen Bedingungen bei einer Flussrate von 2 ml/min als 5 ml Fraktionen eluiert. Die Chromatographie erfolgte bei Raumtemperatur. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend vereint und mit Hilfe von Amicon-Säulchen aufkonzentriert und in Dialyse-Kassetten (Fa. Pierce) umgepuffert.

Nach der Aufreinigung wurde die Matrix mit dem 5-fachen Säulenvolumen Regenerationspuffer regeneriert, mit Waschpuffer gewaschen und bis zur erneuten Verwendung bei 4°C in Waschpuffer gelagert. Das ÄKTA-System wurde nach Gebrauch für mindestens 30 min mit 0,4 M NaOH sanitisiert, mit sterilem Wasser gereinigt und in 20% Isopropanol gelagert.

2.23.2 IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Für die selektive Aufreinigung von His-Tag-Fusionsproteinen aus *H. polymorpha* wurde eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA Agarose Spin-Columns (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Chromatographien erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Für die Aufreinigung wurden Zellen einer 100 ml-Kultur geerntet und in 2 ml Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe von Glasperlen mit dem Vibrax (Typ VX 2E; Janke & Kunkel) für 45 min bei 4°C und 2200 rpm. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 13.000 rpm, 4°C). Der geklärte Proteinextrakt wurde auf die Säulchen geladen, nachdem diese mit Waschpuffer äquilibriert

wurden. Die Säulchen wurden anschließend mit 6x 100 µl Waschpuffer gewaschen und das über den 6xHis-Tag an die Ni-NTA Agarose gebundene Protein mit 2x 50 µl Elutionspuffer eluiert. Für den Durchfluss der einzelnen Fraktionen wurden die Säulchen nach jedem Schritt für 2 min bei 500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Zellaufschlusspuffer	50	mM	Tris HCl
	300	mM	NaCl
	0,1	%	Triton-X-100
	2	mM	PMSF
Waschpuffer	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	20	mM	Imidazol
Elutionspuffer	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	NaCl
	250	mM	Imidazol

2.24 Konzentrierung und Pufferwechsel von Proteinlösungen

2.24.1 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Aufkonzentrierung der Protein-haltigen-Fraktionen wurden die Konzentratoren Amicon Ultra 30 verwendet. Dazu wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und mittels Zentrifugation (4500 rpm, 4°C) auf die jeweilige Konzentration eingestellt. Die Proteinlösungen wurden bei 4°C gelagert.

2.24.2 Dialyse

Für den Pufferaustausch von Protein-haltigen Lösungen wurden Dialyse-Kassetten (Slide A- Lyzer Dialysis Cassette) der Fa. Pierce verwendet. Die Anwendung der Kassetten erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Dialyse erfolgte in 1 L Puffer über Nacht bei 4°C.

Dialysepuffer (1x PBS)	0,14	M	NaCl
	5,37	mM	KCl
	8,65	mM	di-Natrium-hydrogenphosphat
	1,39	mM	Kalium-di-hydrogenphosphat
			eingestellt auf pH 7,4

2.25 Bestimmung von bakteriellem Endotoxin mittels Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Methodensammlung Rhein Biotech GmbH)

Das Prinzip der Messung von Endotoxin basiert auf der Aktivierung eines Proenzym in Limulus Amebocyte Lysate, welche durch das Endotoxin Gram-negativer Bakterien katalysiert wird. Die Aktivierungsrate ist abhängig von der Endotoxinkonzentration. Das aktivierte Enzym katalysiert die Abspaltung von p-Nitro-Anilin (pNA) von einem farblosen Substrat. Die Freisetzung von pNA wird kontinuierlich über die Inkubationszeit photometrisch bei 405 nm verfolgt, wobei die Reaktionszeit bis ein Erreichen einer Optischen Dichte von 0,2 AU gemessen wird. Die Endotoxinkonzentration wird mit Hilfe einer Endotoxin-Standardkurve berechnet, die einen Bereich von 0,005 – 50 EU/mL hat.

Für den Endotoxin-Test wurde das Kinetic QCLTM-Test Kit von BioWhittaker und der Microplate Reader Spectramax Plus384 (Molecular Devices) in Kombination mit der Software Softmax Pro 3.1 verwendet.

Für die Standardkurve wurden aus einer 50 EU/mL Endotoxin Standardlösung 10fach-Verdünnungen in Endotoxin-freien Glasröhrchen hergestellt. Jede Verdünnung wurde jeweils nach der Herstellung, vor dem Gebrauch und dem Transfer in die Mikrotiterplatte für mindestens eine Minute gevortext. Die Proben müssen vor der Messung auf Raumtemperatur eingestellt und für mindestens 5 Minuten gevortext werden. Falls nötig wurden die Proben in LAL-Reagenzwasser verdünnt und nach der Herstellung und vor jedem Gebrauch ebenfalls mindestens 1 Minute gevortext. Als Positivkontrolle wurde ein Endotoxin-Standard (5 EU/mL und 50 EU/mL) verwendet; als Negativkontrolle diente LAL-Reagenzwasser. Auf die Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl der Proben der Endotoxin-Standardkurve und der zu testenden Proben in Duplikaten aufgetragen. Alle nicht belegten Wells wurden mit 200 µl LAL-Reagenzwasser befüllt. Die Mikrotiterplatte wurde für ≥10 Minuten bei 37°C inkubiert. Das LAL-Substrat wurde in 2,6 mL LAL-Reagenzwasser aufgenommen. Davon wurden je 100 µl auf die zu messenden Proben pipettiert. Die Messung wurde direkt im Anschluss im Mikroplatten-Reader durchgeführt.

2.26 Immunpräzipitation

2.26.1 Immunpräzipitation mit löslichen Fraktionen aus *H. polymorpha*

Mittels Immunpräzipitation wurden Protein-Protein-Wechselwirkungen untersucht. Bei dieser Methode werden Proteine mit einem spezifischen Antikörper aus einer Lösung aufkonzentriert und assoziierte Proteine co-präzipitiert. Für die Versuche wurden die Zellen in 3 ml Vollmedium (YPD) angezogen und auf Mangelmedium YNB (1% Glycerin) [100 ml Kultur] überimpft. Die zu analysierenden rekombinanten Proteine werden in *H. polymorpha* unter der Kontrolle des stark regulierbaren Promotors des *FMD*-Gens exprimiert. Bei Wachstum auf Glycerin ist der Promotor dereprimiert. Die Induktion des Promotors erfolgte durch weitere 16-20 Std. Kultivierung in YNB (1% Methanol). Nach der Ernte wurden die Zellen in Zellaufschlusspuffer resuspendiert und mit Glasperlen (Ø 0,5 mm) mit Hilfe des Vibrax (Typ VX 2 E; Janke & Kunkel) für 45 min bei 4°C und 2200 rpm aufgeschlossen. Die Ansätze wurden für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Von löslichen Fraktionen wurde die Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode bestimmt und anschließend gleiche Proteinmengen in Endvolumina von 500 µl eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wurden diese Proben mit einem spezifischen Antikörper (His-Tag- [Mouse] oder GFP-[Rabbit] Antikörper) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 3 Stunden mit 150 µl 50%iger Protein A-Sepharose (Sigma) versetzt und auf einem Taumler bei 4°C inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde zuvor in 2 ml Waschpuffer zum Quellen gebracht, anschließend 2x mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und auf 50% v/v Sepharose eingestellt. Nach der Inkubation der Ansätze mit Protein A-Sepharose folgten vier Waschschrte in einem Volumen von je 1 ml des jeweils verwendeten Puffers (5 min Schütteln bei 4°C; anschließend kurze Zentrifugation bei 13000 rpm; die Überstände wurden jeweils verworfen). Zunächst wurde der Ansatz einmal mit Waschpuffer I und dann zweimal mit Waschpuffer II gewaschen. Ein weiterer Waschschrte mit 1xPBS folgte vor der Elution, bei der die Antikörper und die daran gebundenen Proteinkomplexe von der Sepharose gelöst werden. Für die Elution wurde die Sepharose mit 4x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C gekocht. Die Analyse der eluierten Protein-Protein-Komplexe erfolgte mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot.

Zellaufschlusspuffer	20	mM	HEPES pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0,1	%	Triton-x-100
	5	mM	EDTA
	1		Protease Cocktail Inhibitor Tablette
Waschpuffer I	1	%	Triton-X-100
	0,5	%	Deoxycholate

	500	mM	NaCl
	50	mM	Tris-HCl pH 8,0
	0,5	mM	EDTA
Waschpuffer II	1	%	Triton-X-100
	500	mM	NaCl
	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,5	mM	EDTA
Elutionspuffer (4x Probenpuffer)	0,27	M	SDS
	0,14	M	Tris-HCl
	4	mM	EDTA
	40	%	Glyzerin
	0,47	mM	Serva Blue G Farbmarder
	3,2	M	β-Mercaptoethanol

2.26.2 (Hot)-Co-Präzipitation von Proteinkomplexen aus Säugetierzellen (Methodensammlung R. Schirmbeck)

24 Stunden nach der Transfektion wurden die HEK293-Zellen mit 100 µCi [³⁵S]-Methionin über Nacht markiert. Die Markierung erfolgte in 3 ml Methionin-freiem RPMI-1640 Medium supplementiert mit 5% FCS (fetales Kälberserum) und L-Glutamin statt. Die markierten Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und in Lyse-Puffer extrahiert (30 min bei 4°C und kontinuierlichem Schütteln). Die Zellextrakte wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 20.000xg geklärt und anschließend für 90 min mit Streptactin-Sepharose bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 5 x 1000 µl Waschpuffer und anschließend mit zwei Waschschrinen in 1x PBS und zwei Waschschrinen in 0,1x PBS gewaschen. Die an die Streptactin-Sepharose gebundenen Proteinkomplexe wurden durch Zugabe von 300 µl Elutionspuffer und einer weiteren Inkubation von 1 Stunde bei 37°C eluiert. Die Proben wurden lyophilisiert und für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Nach einer Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proben mittels Fluorographie analysiert.

Lyse-Puffer	100	mM	Tris/HCl
	150	mM	NaCl
	0,5	%	NP-40
	0,25	%	Trasyolol
	1	µg/µl	Leupetin eingestellt auf pH 8,0
Waschpuffer	100	mM	Tris/HCl
	150	mM	NaCl eingestellt auf pH 8,0
Elutionspuffer	7	mM	Tris/HCl
	1,5	%	SDS
	5	%	β-Mercaptoethanol

2.27 Immunisierung von Mäusen (Methodensammlung R. Schirmbeck)

Die BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden mit den jeweils angegebenen Mengen an rekombinatem Protein oder Plasmid-DNA in den *Tibialis anterior*-Muskel (50 µl pro Muskel) immunisiert. Falls angegeben, wurden die rekombinaten Proteine mit 25 µl AbISCO-100 Adjuvans pro Maus (Isconova, Schweden) gemischt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse mit Forene anästhesiert.

2.28 Bestimmung der Antikörperantwort (Methodensammlung R. Schirmbeck)

Serumproben von individuellen Mäusen wurden nach der finalen Immunisierung gewonnen. Die Blutproben wurden für 1 Std. bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation für 1 Std. bei 4°C. Die Proben wurden zentrifugiert (20 min, 14.000 rpm) und das Serum im Überstand isoliert.

2.28.1 Titerbestimmung mittels ELISA

Hsp70- und GFP- spezifische IgG-Serumantikörper wurden mit Hilfe eines ELISA Assays (Endpunktverdünnung) bestimmt. MicroELISA-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit 150 ng GFP bzw. Hsp70-1-H6 in 50 µl [0,1 M Na₂CO₃, pH 9,5] pro Well gecoatet. Die Platten wurden zweimal mit PBS plus 0,05% Tween 20 gewaschen und für 30 min mit 200 µl PBS plus 3% BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten fünf Waschschrte mit PBS plus 0,05% Tween 20. Das Serum wurde seriell in PBS-Puffer plus 3% BSA/ 2% Tween 20 verdünnt, auf die Platte gegeben und für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden erneut fünfmal mit PBS plus 0,05% Tween 20 gewaschen. Die Detektion der Antikörper im Serum erfolgte durch Zugabe von 50 µl HRP-konjugiertem anti-Maus IgG (1/2000 Verdünnung in PBS plus 3% BSA) (BD Pharmingen HRP Goat Anti-Mouse Ig) und anschließender Inkubation für 1 Std. bei 37°C. Die Farbreaktion wurde nach wiederholtem Waschen durch Zugabe von 100 µl O-Phenylenediamine x 2HCl (Abbott) gestartet und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Addition von 100 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt, und die Extinktion bei 492 nm und 690 nm gemessen. Die höchste Verdünnung des Serums, die in eine Extinktion resultiert, die dreimal höher als die Negativkontrolle war, wurde als Endpunkt-Titer definiert.

2.29 Bestimmung der CTL-Antwort (Methodensammlung R. Schirmbeck)

2.29.1 Präparation von Milzzellen aus der Maus

10 Tage nach der finalen Immunisierung wurde den Mäusen die Milz entnommen und in ein Röhrchen mit 10 ml PBS-Puffer (1xPBS, 1% FCS [fetales Kälberserum]) überführt. Die Milzen wurden durch ein steriles Sieb gerieben, um die Splenozyten zu erhalten. Die Erythrozyten wurden durch Zugabe von Lyse-Puffer entfernt. Die Splenozyten wurden anschließend zweimal in PBS-Puffer gewaschen; Klumpen wurden mittels einer Pipette entfernt. Einzelzellsuspensionen wurden in α-MEM Kulturmedium resuspendiert.

Lyse-Puffer	0,14	M	NH ₄ Cl
	0,17	M	Tris/HCl pH 7,2
α-MEM	10	mM	HEPES
	5x10 ⁻⁵	M	β-Mercaptoethanol
	10	% v/v	FCS
			Antibiotika

2.29.2 Bestimmung der CTL-Frequenz

Die Milzzellen wurden wie unter 2.28.2.1 beschrieben frisch isoliert. 2x10⁶ Zellen wurden mit FACS A (1xPBS, 0,5% BSA, 0,1% NaN₃) gewaschen und anschließend mit Fc-Block (anti-CD16/CD32, Klon 2.4G2) zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit FITC-konjugiertem Anti-CD8 Antikörper (Klon 53-6.7, BD Pharmingen, 1/200 Verdünnung) und APC-konjugierten GFP-Pentameren (Proimmune 1/20 Verdünnung) für 30 min bei 4°C gefärbt.

Anschließend wurden die Zellen 2x mit FACS A gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Die Frequenz von Pentamer⁺ CD8⁺-T-Zellen wurde mit Hilfe von FCM (flow cytometry) Analyse in Kombination mit der Software WinMDI bestimmt.

FACS A	1	x	PBS
	0,5	%	BSA
	0,1	%	NaN ₃

2.30 Transiente Transfektion von Zellen mit DNA (Methodensammlung R. Schirmbeck)

Für die transiente Transfektion wurden HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden bis zu 80% Konfluenz in 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM Medium (GibcoBLR) kultiviert, welches mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und Antibiotika (Penizillin und Streptomycin) supplementiert war. 30 min vor der Transfektion wurde neues Medium zu den Zellen gegeben. Die transiente Transfektion wurde nach der Ca₂PO₄-Methode durchgeführt. Dafür wurde Lösung A tröpfchenweise unter konstantem Mischen in 500 µl HBS-Puffer eingebracht. Die Lösung wurde anschließend für 1,5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Transfektionsansätze wurden für 36-48 Std. bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde nach 16 Stunden Inkubation ausgewechselt.

Lösung A	62	µl	CaCl ₂
	10	µg	Plasmid-DNA
	ad. 500	µl	MilliQ
HBS-Puffer	280	mM	NaCl
	1,5	mM	Na ₂ HPO ₄
	50	mM	HEPES pH 7,1

2.31 Bioinformatik

Chromas Lite

Clustal X

Expasy Proteindatenbank

Genedoc

H. polymorpha Datenbank

iMolTalk

Phoretix

SECentral (Clone)

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Interaktion der DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ aus SV 40 mit Hsp70 in *H. polymorpha*

Das Tumorantigen (T-Ag) des Polyomavirus besitzt N-terminal eine DnaJ-ähnliche Struktur, durch die es mit dem konstitutiv zytosolisch exprimierten Hsp73 in Säugetierzellen assoziiert. Verkürztes, nicht aber Wildtyp-SV40 T-Ag interagiert in Abhängigkeit von ATP stabil mit Hsp73 von verschiedenen Vertebraten (Kammerer *et al.*, 2002; Brodksy & Pipas, 1998; Schirmbeck & Reimann, 1994), wodurch das Protein stabilisiert wird. Die Halbwertszeit solcher T-Ag/Hsp73-Komplexe verlängert sich im Vergleich zu anderen Hsp73-Protein-Komplexen um ein 12faches, und die Komplexe akkumulieren in der Zelle (Wieland *et al.*, 2008). Die Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck hat ein Expressionssystem entwickelt, bei dem eine verkürzte Variante des T-Ags (T₂₋₇₇) N-terminal an ein Polypeptid fusioniert wird, welches daraufhin in Abhängigkeit von ATP mit Hsp73 assoziiert (siehe Abb. 3.1). Die T₂₋₇₇-Domäne beinhaltet den intakten N-Terminus und kodiert die ersten drei Helices des T-Ags inklusive des konservierten HPD-Motivs, das typisch für J-Proteine ist. Dieses Segment scheint auszureichen, um die typische Schleifenstruktur der J-Domäne auszubilden, die es ermöglicht, mit Hsp73 zu interagieren. Da die kürzere Variante T₂₋₆₀ nicht mit Hsp73 interagiert, wurde postuliert, dass diese Form die Schleifenstruktur nicht ausbildet. Polypeptide, die in anderen konventionellen Systemen nicht exprimiert werden können, zeigen in diesem System eine stabile Expression. Das System basiert auf der Transfektion von Zelllinien mit Vektor-DNA und der *in vivo* Assemblierung von chimären

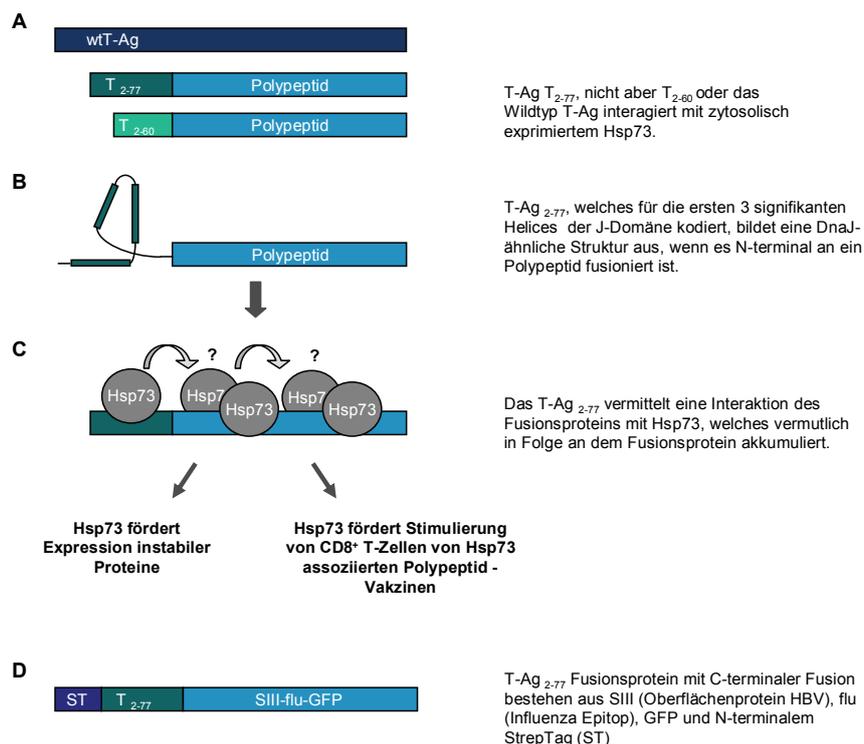


Abbildung 3.1

Hsp73 geförderte Proteinexpression.

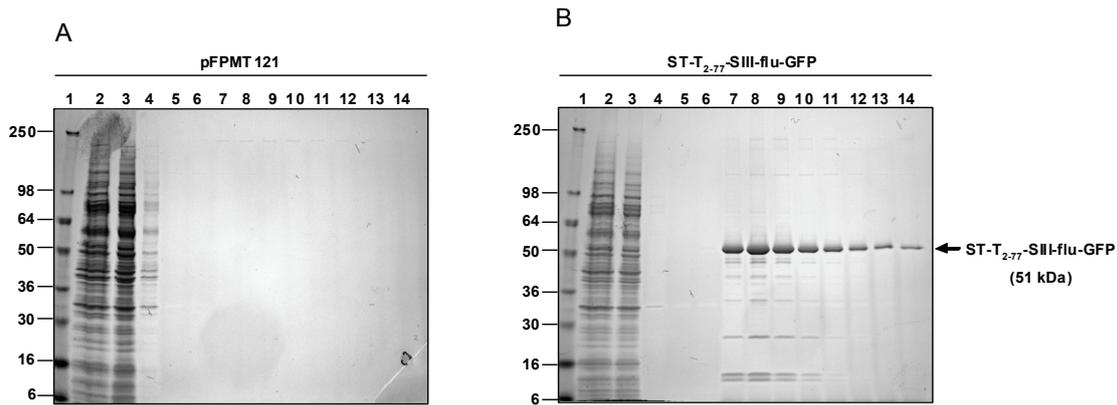
A. Die mutierte Variante des SV40 T-Ags T₂₋₇₇ interagiert mit Hsp73, nicht aber die Wildtypform oder die kürzere Variante T₂₋₆₀. **B.** Die Variante T₂₋₇₇ bildet eine DnaJ-ähnliche Schleifenstruktur aus und interagiert mit Hsp73. Diese Interaktion findet auch statt, wenn C-terminal eine Polypeptidsequenz fusioniert ist, die von unterschiedlicher Größe sein kann. **C.** T₂₋₇₇ assoziiert mit zytosolisch exprimiertem Hsp73, welches in Form von Hsp73/Fusionsproteinkomplexen in der Zelle akkumuliert. Die Interaktion von Hsp73 mit dem Fusionsprotein fördert dessen Stabilität. Die Verabreichung solcher Komplexe als Impfstoff bewirkt die Stimulierung von einer mono- oder multispezifischen CD8⁺-T-Zellantwort. Abbildung in Anlehnung an Fissolo (2004). **D.** Fusionsprotein ST = Strep-Tag, T₂₋₇₇ = DnaJ-ähnliche Domäne des T-Ags aus SV40, SIII = Oberflächenprotein des Hepatitis B Virus, flu = Influenza Epitop, GFP = Green Fluorescent Protein.

Fusionsprotein-Komplexen mit Hsp73. Darüber hinaus wird durch die Wechselwirkung mit Hsp73 eine mono- oder multispezifische CD8⁺-T-Zellantwort induziert, wenn das Fusionsgen als DNA-Vakzin appliziert wird. Hsp73 wirkt somit als natürliches Adjuvans für die assoziierten Fusionsproteine, die als Antigen erkannt werden. Erste Resultate von Immunisierungen mit aufgereinigten Hsp70/T₂₋₇₇-Fusionsprotein-Komplexen aus Säugetierzelllinien zeigen, dass, wie bei einer DNA-Vakzinierung, eine Hsp70-abhängige Fusionsprotein-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort induziert wird (Wieland *et al.*, 2008). Da eine Immunisierung mit rekombinanten Proteinen einer DNA-Vakzinierung vorzuziehen ist, ist *H. polymorpha* auf Grund der Eigenschaften der starken, regulierbaren Promotoren und der Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten ein attraktiver Modellorganismus, um diese Hsp70/Fusionsprotein-Komplexe *in vivo* zu exprimieren.

Im Folgenden soll überprüft werden, ob das Expressionssystem mit der verkürzten Variante des T-Ags (T₂₋₇₇) aus SV40 auf die Hefe *H. polymorpha* übertragbar ist und entsprechende Fusionsproteine *in vivo* mit *H. polymorpha*-eigenen Hsp70-Chaperonen assoziieren. Für diesen Test wurde das Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP ausgewählt, welches über die T₂₋₇₇-Domäne mit Hsp73 interagiert (Abb.3.1 D). Es besteht aus einem N-terminalen Strep-Tag (ST), der T₂₋₇₇-Domäne, einem Fragment des kleinen Oberflächenantigens von HBV (SIII), einem Influenza Epitop (flu) und GFP.

Die Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck konnte in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary cells) und HEK-Zellen (Human Emryonic Kidney cells) zeigen, dass bei der Aufreinigung des Fusionsproteins über den Strep-Tag Hsp73 co-eluiert (Wieland *et al.*, 2008, unveröffentlichte Daten). Bei dem Fusionsprotein mit verkürzter Variante des T-Ags T₂₋₆₀, co-eluiert Hsp73 nicht (Wieland *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass eine nicht-kovalente Interaktion zwischen dem Fusionsprotein und Hsp73 über die DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ stattfindet.

Für die Überprüfung, ob *H. polymorpha*-eigene zytosolische Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein assoziieren, wurde ein RB11 Stamm generiert, bei dem die Expressionskassette ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP stabil in mehreren Kopien in das Genom integriert vorliegt. Die Expression des Fusionsleserasters wird über den *FMD*-Promotor (*FMD* = Formiatdehydrogenase) gesteuert, der über die Art der Kohlenstoffquelle reguliert werden kann. Das Fusionsprotein wurde über den Strep-Tag aufgereinigt (siehe Kapitel 2.17.1 und 2.23) und daraufhin untersucht, ob Hsp70-Chaperone co-eluieren (Abb. 3.2). Spuren 2-5 zeigen die jeweils lösliche Fraktion, mit der die Streptactin-Säule beladen wurde, sowie die Waschfraktionen 1-3, mit denen unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden. Spuren 6-14 zeigen die Elutionsfraktionen 1-9, in denen das Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP unter nativen Bedingungen von der Säule eluiert werden sollte. Das Fusionsprotein eluiert mit einem Molekulargewicht von 51 kDa ab der zweiten Elutionsfraktion (siehe Abb. 3.2 B). Es wurden keine Proteine mit einem Molekulargewicht von ~70 kDa co-eluiert. Dies deutet darauf hin, dass die zytosolischen Hsp70 Chaperone von *H. polymorpha* (Hsp70-1: 70 kDa; Hsp70-2: 71 kDa) nicht an das Fusionsprotein binden. Als Negativkontrolle diente der Stamm pFPMT121/RB11 #8, bei dem das Expressionsplasmid pFPMT121 (ohne Expressionskassette) in das Genom integriert ist. Die Elutionsfraktionen beinhalten hier keine detektierbaren Proteine (siehe Abb. 3.3 A, Spuren 6-14).

**Abbildung 3.2****Aufreinigung von ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP-Fusionsprotein mittels Streptactin-Sepharose.**

Die Stämme pFPMT121/RB11 #8 (Negativkontrolle) (A) und pFPMT-ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP/RB11 #5 (B) wurden kultiviert und mit Methanol induziert. Anschließend wurden die intrazellulären löslichen Fraktionen präpariert und mittels Streptactin-Sepharose aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen, das Protein wurde durch Zugabe von 2,5 mM Desthiobiotin von der Säule eluiert. Die dargestellten Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden in einem 4-20% Tris/Glyzin-Polyacrylamidgel unter reduzierenden/denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. Die Banden des Fusionsproteins sind in B mit einem Pfeil markiert.

Beladungsschema für A und B:

Spur 1: Marker See Blue PreStained

Spur 2: lösliche Fraktion

Spur 3-5: Waschfraktion 1-3

Spur 6-14: Elutionsfraktion 1-9

3.2 Suche nach DnaJ-ähnlichen Domänen in *H. polymorpha* mit Hilfe von Homologie-Vergleichen

Der Befund, dass in *H. polymorpha* keine Hsp70-Chaperone nachweisbar sind, die mit dem Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP assoziieren, legte die Vermutung nahe, dass die DnaJ-ähnliche Domäne des T-Ags aus SV40 nicht mit den Hsp70-Chaperonen von *H. polymorpha* interagiert.

Um das System an *H. polymorpha* anzupassen, sollte die T₂₋₇₇-Domäne gegen eine J-Domäne von *H. polymorpha*-eigenen Hsp40-Proteinen ersetzt werden. Da in *H. polymorpha* keine Hsp40-Chaperone bekannt sind, wurde mit Hilfe der *H. polymorpha* Genomdatenbank nach Proteinen gesucht, die eine J-Domäne enthalten. Verschiedene Proteine mit unterschiedlichen DnaJ-ähnlichen Domänen wurden identifiziert. Drei dieser Proteine werden von den Leserastern ORF12, ORF16 und ORF313 kodiert und für weitere Analysen ausgewählt. Abbildung 3.3 zeigt ein Alignment der DnaJ-Domänen-ähnlichen Bereiche aus *H. polymorpha*, *S. cerevisiae*, *E. coli* und SV40. Ein Vergleich der *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen mit der annotierten Sekundärstruktur der J-Domäne von Sis 1 und DnaJ ergab folgende Homologien: 1. Sis1: ORF12 (62%), ORF16 (77%), ORF313 (57%), 2. DnaJ: ORF12 (56%), ORF16 (60%) und ORF313 (48%). Dies deutet darauf hin, dass die DnaJ-ähnlichen Domänen analog zu Sis1 und DnaJ funktionelle Domänen haben. Alle DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* beinhalten das hochkonservierte HPD-Motiv, welches invariant bei allen Hsp40-Chaperonen vorkommt und für die Interaktion mit Hsp70 eine große Rolle spielt. In den ORF12- und ORF16-Domänen ist das konservierte KRK-Motiv in Helix III wiederzufinden, welches wichtig für die Funktion der J-Domäne ist. ORF313 hat anstelle des KRK- ein KQK-Motiv. Des Weiteren sind konservierte Aminosäuren Leucin (L) und Alanin (A) in Helix I und III zu finden, die eine Rolle für die Integrität der J-Domäne spielen, sowie Lysin (K) in Helix II, welche eine Bedeutung für die Funktion und die Struktur von J-Domänen haben. Für die T₂₋₇₇-Domäne scheint zwischen den Aminosäuren 60-77 (Helix III) ein kritischer Bereich zu liegen, der vermutlich für die Ausbildung der

Schleifenstruktur der J-Domäne essentiell ist und so eine Interaktion mit Hsp73 ermöglicht. Die DnaJ-ähnlichen Domänen der ORF12-, -16- und -313-Proteine können auf Grund von Sekundärstrukturanalysen vermutlich alle die Helix III ausbilden, unterscheiden sich jedoch insgesamt in der Länge der Sequenz. Aufgrund dieser Heterogenität wurden alle drei für Interaktionsstudien mit Hsp70-Chaperonen in *H. polymorpha* ausgewählt.

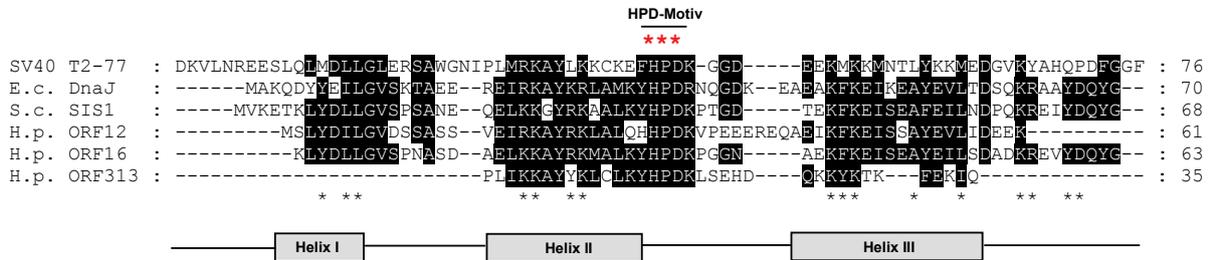


Abbildung 3.3

Sequenz-Alignment der J-Domänen aus *S. cerevisiae*, *E. coli*, SV40 und ORF12-, -16- und -313-Proteine aus *H. polymorpha*. * zeigt konservierte Aminosäuren an, die eine Rolle für die Struktur und die Funktion der J-Domäne spielen. E.c. = *E. coli*; S.c. = *S. cerevisiae*; H.p. = *H. polymorpha*. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt.

3.3 Konstruktion von *H. polymorpha* Expressionsplasmiden für Fusionsproteine mit DnaJ-ähnlichen Domänen

Um zu testen, ob die vermuteten DnaJ-Domänen der *H. polymorpha*-eigenen ORF12-, -16- und -313-Proteine *in vivo* mit Hsp70 assoziieren, wurden drei Expressionsplasmide konstruiert, die Fusionsproteine vom Aufbau Strep-Tag (ST)-X-GFP kodieren, wobei X eine der drei in Abb. 3.3 gezeigten DnaJ-Domänen der ORF12-, -16- und -313-Proteine ist. Abb. 3.4 zeigt die Konstruktion der *H. polymorpha* Expressionsplasmide pFPMT-ST-ORF12 (oder ORF16 / oder ORF313)-GFP schematisch. Nach Verifikation der jeweiligen Insertsequenz durch Sequenzierung wurde der *H. polymorpha* Stamm RB11 mit den drei Expressionsplasmiden transformiert und entsprechende Stämme generiert (siehe Kapitel 2.8). Das Screening nach positiven Stämmen erfolgte mittels Western-Blot, wobei die intrazellulären löslichen Fraktionen von je 14 Stämmen pro Serie in Kombination mit einem GFP-spezifischen Primäntikörper analysiert wurden (Daten nicht gezeigt). Pro Konstrukt wurde ein typischer Fusionsprotein-positiver Stamm für weitere Analysen ausgewählt, um Hinweise auf mögliche Interaktionen mit endogenen Hsp70-Chaperonen aus *H. polymorpha* zu erhalten.

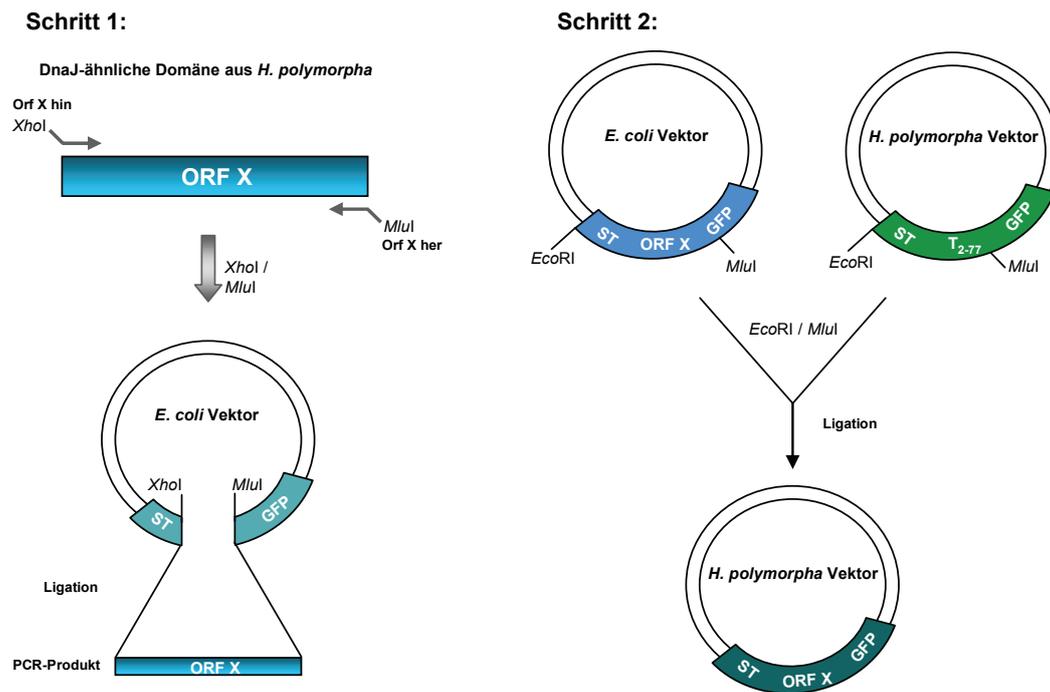


Abbildung 3.4

Schematische Darstellung der Konstruktion der *H. polymorpha* Expressionsplasmide für Fusionsproteine mit unterschiedlichen DnaJ-ähnlichen Domänen.

Schritt 1: Insertion der DnaJ-ähnlichen Domänen von *ORF12*-, *ORF16*- und *ORF313*-PCR-Produkten in den *E. coli* Expressionsvektor pCRII-TOPO-TA-ST-T₂₋₇₇-GFP. Template für die PCR: genomische DNA von *H. polymorpha* RB11 in Kombination mit den Primerpaaren *ORF12*hin/her; *ORF16* hin/her und *ORF313* hin/her. Die PCR-Produkte wurden mit (*XhoI/MluI*) verdaut und anschließend mit dem 3,764 kB-Fragment (pCRII-TOPO-TA-ST-T₂₋₇₇-GFP) ligiert.

Schritt 2: Die 0,297 kB (*ORF12*), 0,304 kB (*ORF16*) und 0,220 kB (*ORF313*) Fragmente der in Schritt 1 erzeugten Plasmide wurden jeweils mit dem 7,708 kB Fragment aus pFPMT-ST-T₂₋₇₇-GFP ligiert, um die zugehörigen *H. polymorpha* Expressionsplasmide zu erzeugen (siehe Tabelle 2.1).

3.4 Analysen zur Assoziation von *ORF12*-, -16- und -313-DnaJ-Domänen mit *H. polymorpha* Hsp70-Chaperonen *in vivo*

H. polymorpha Transformanten, die die verschiedenen DnaJ-Fusionsproteine exprimieren können, wurden mit Methanol induziert und die lösliche Fraktion anschließend präpariert. Nach Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose (selbstangefertigte Säule, Gravity flow) (siehe auch Kapitel 2.23), wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.5). Als Negativkontrolle wurde ein Stamm, der das GFP-Fusionsprotein ohne DnaJ-Domäne exprimiert, eingesetzt.

Bei allen vier Stämmen zeigt sich in den jeweiligen Elutionsfraktionen eine sehr deutliche Bande, die auf Grund der Laufgeschwindigkeit dem jeweiligen Fusionsprotein zugeordnet werden kann (Abb. 3.5 A-D, siehe Pfeile). Für das Negativkontrollfusionsprotein (A) und das Fusionsprotein mit der DnaJ-Domäne von *ORF12* (B) wurden darüber hinaus keine weiteren Proteinbanden detektiert. Die Fraktionen der Fusionsproteine mit den DnaJ-Domänen von *ORF16* (C) und *ORF313* (D) weisen zusätzliche Banden auf, die Molekulargewichten von etwa 70 kDa entsprechen (siehe Pfeile). Bei dem *ORF313*-Fusionsprotein ist auch klar erkennbar, dass es sich um zwei Proteinbanden in der 70 kDa Größenordnung handelt (D siehe Pfeile). Diese Banden konnten im Western-Blot mit einem polyklonalen Hsp70-spezifischen Serum detektiert werden (freundliche Gabe von M. Veenhuis; Daten

nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass es sich hierbei um Hsp70-1 (70 kDa) und Hsp70-2 (71 kDa) handelt, die untereinander 89,9% Homologie aufweisen und sich nur geringfügig im Molekulargewicht unterscheiden. Das Fusionsprotein mit der DnaJ-Domäne des ORF12-Proteins führte nicht zu einer Co-Reinigung von Hsp70-Proteinen (Abb. 3.5 B) – es verhält sich diesbezüglich wie das Negativkontrollprotein (Abb. 3.5 A) sowie das ursprünglich getestete Fusionsprotein mit der DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ des SV40 T-Ags (siehe Abb. 3.2). Offensichtlich ist die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF12-Proteins nicht in der Lage, stabil mit den *H. polymorpha* Hsp70-Proteinen zu komplexieren. Die ORF16- und ORF313-Fusionsproteine interagieren jeweils mit Hsp70-1 und Hsp70-2 (Abb. 3.5 C und D), wobei dieser Effekt bei der DnaJ-Domäne von ORF313 stärker ausgeprägt ist (Abb. 3.5 D). Offensichtlich findet mit diesen beiden Fusionsproteinen in *H. polymorpha* mit den Hsp70-Proteinen eine Komplexbildung statt, wie sie von R. Schirmbeck für das T₂₋₇₇-Fusionsprotein und Hsp73 in HEK-Zellen gezeigt wurde (Wieland *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse belegen außerdem, dass der gezeigte experimentelle Ansatz ein brauchbares Testsystem zur Charakterisierung von *H. polymorpha* spezifischen Fusionsprotein/Hsp70-Interaktionen darstellt.

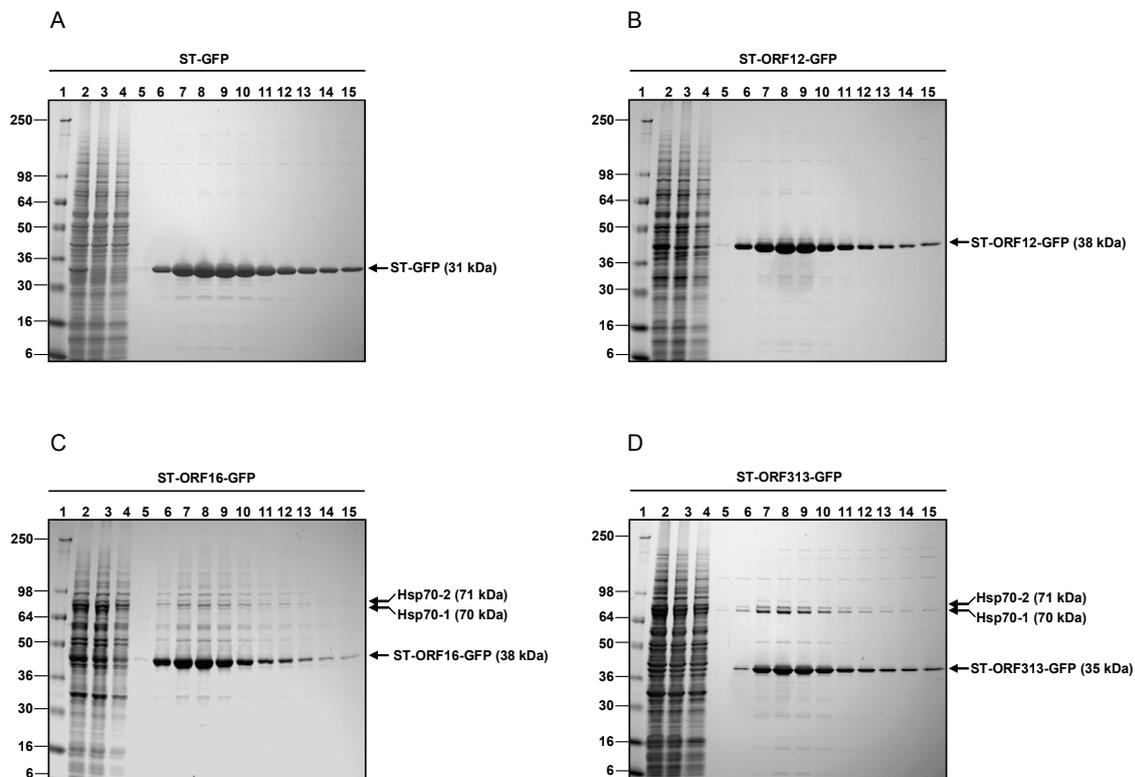


Abbildung 3.5

Aufreinigung von Fusionsproteinen mit unterschiedlichen DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* mittels Streptactin-Sephrose.

Die Stämme pFPMT-ST-GFP/ RB11 #2 (A), pFPMT-ST-ORF12-GFP / RB11 #1 (B), pFPMT-ST-ORF16-GFP / RB11 #4 (C), pFPMT-ST-ORF313-GFP / RB11 #10 (D) wurden Methanol-Induktionen im 500 ml Maßstab unterzogen und die löslichen intrazellulären Fraktionen präpariert. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen; die Fusionsproteine und die jeweiligen mit dem Fusionsprotein assoziierten Proteine wurden durch Zugabe von 2,5 mM Desthiobiotin von der Matrix eluiert. Die Fraktionen wurden in 4-20% Tris/Glyzin Polyacrylamidgelen unter reduzierenden/denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt (siehe 2.21).

Beladungsschema für A-D:

- Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
- Spur 2: lösliche Fraktion
- Spur 3: Durchfluss
- Spur 4: Waschfraktion 1
- Spur 5-15: Elutionsfraktionen 1-11

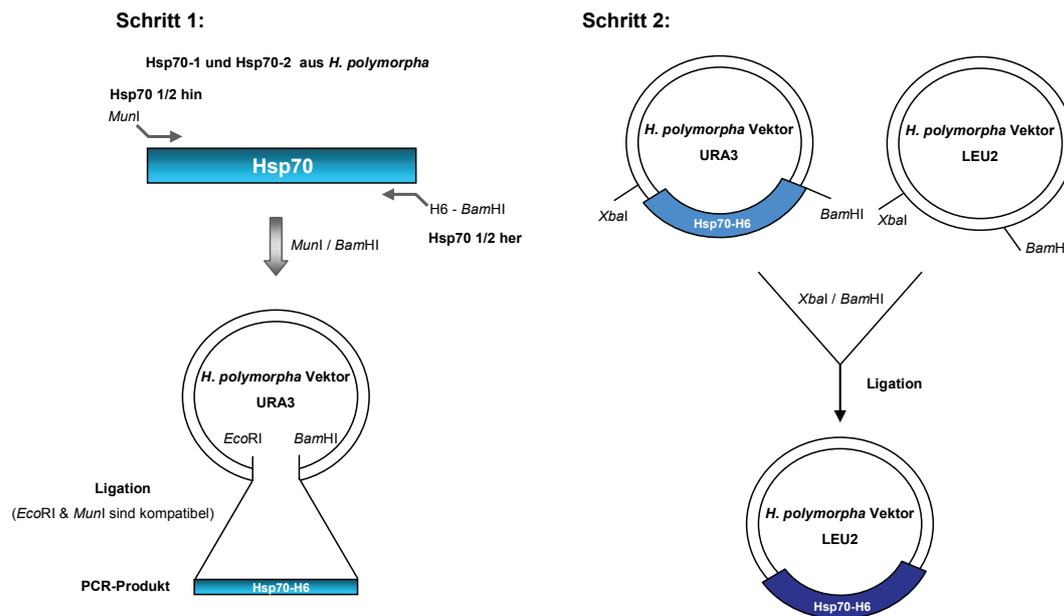
Die genauen Konzentrationen von Hsp70-1 und Hsp70-2 in der Zelle sind nicht bekannt. Daher können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob Hsp70-1 oder Hsp70-2 der bessere Interaktionspartner für die DnaJ-ähnlichen Domänen ist. Fusionsproteine mit einer ORF313-Domäne interagieren stärker mit Hsp70-1 und Hsp70-2 als die mit einer ORF16-Domäne (Vergleich Abb. 3.5 C-D). Interessanterweise verhält sich die Homologie dieser Domänen zu der DnaJ-Domäne der Proteins Sis1 reziprok (siehe Abb. 3.3). Aufgrund der höchsten Homologie von ORF16 und Sis1 wurde erwartet, dass die Interaktion in der Reihenfolge ORF16-, ORF12- und ORF313-DnaJ-Domäne abnimmt. Es zeigte sich allerdings, dass die ORF313-DnaJ-Domäne am besten mit Hsp70-Chaperonen in *H. polymorpha* interagiert.

3.4.1 Interaktion von co-exprimierten Hsp70-Chaperonen und Fusionsproteinen mit einer DnaJ-ähnlichen Domäne aus *H. polymorpha*

Da das ORF313-Fusionsprotein unter der Kontrolle des *FMD*-Promotors in der Zelle sehr stark exprimiert wird, liegt das Fusionsprotein im Vergleich zu den endogenen Hsp70-Chaperonen Hsp70-1 und Hsp70-2 sehr wahrscheinlich in stöchiometrischen Überschuss in der Zelle vor. Nach den Daten der Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck (Wieland *et al.*, 2008) assoziiert Hsp73 in HEK-Zellen mindestens in einem 1:1 Verhältnis mit T_{2-77} -Fusionsproteinen, während das ORF313-Fusionsprotein in *H. polymorpha* Zellen offenbar weniger effizient Hsp70-1 und Hsp70-2 bindet (siehe Abb. 3.5). Im Folgenden soll getestet werden, ob die Komplexbildung von Hsp70-Chaperonen in *H. polymorpha* mit dem ORF313-Fusionsprotein über die Anhebung der Hsp70 Konzentration gesteigert werden kann.

3.4.1.1 Konstruktion von Stämmen mit erhöhter Hsp70-Genexpression für die Co-Expression mit dem ORF313-Fusionsprotein

Die Leseraster der Hsp70-Chaperongene *HSP70-1* und *HSP70-2* wurden mit Hilfe von PCR aus dem Genom von *H. polymorpha* (Stamm RB11) amplifiziert (Abb. 3.6). Die Primer waren so konstruiert, dass die Kodons für einen C-terminalen His-Tag (H6) addiert wurden. Darüber hinaus wurde am 5'-Ende der PCR-Produkte eine *MunI* Schnittstelle und am 3'-Ende eine *BamHI* Schnittstelle angefügt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in zwei Schritten in den *H. polymorpha* Expressionsvektor pFPMT-LEU2 eingesetzt (siehe Abb. 3.6 und Tabelle 2.1). Die Inserts beider Plasmide wurden sequenziert und die Richtigkeit der Sequenz verifiziert. Der Vektor pFPMT-LEU2 enthält das *LEU2*-Gen aus *S. cerevisiae* als Selektionsmarker, anstelle von *URA3*. Bisher wurden die Analysen mit dem *H. polymorpha* Stamm RB11 (*ura³*) durchgeführt, der die Transformation mit einem *URA3*-Plasmid erlaubt. Für die weiteren Experimente wurde zusätzlich der Stamm HP102 (*ura³; leu²*) eingesetzt, der zwei Auxotrophien enthält und so hintereinander oder eine simultane Transformation mit einem *URA3*- und einem *LEU2*-Plasmid erlaubt. Mit diesem System ist es möglich, Stämme zu generieren, die jeweils das ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 exprimieren.

**Abbildung 3.6****Schematische Darstellung der Klonierung von Hsp70-Chaperonen**

Schritt 1: Generierung von *HSP70-1-H6* und *HSP70-2-H6* über PCR (mit den Primerpaaren Hsp70-1 hin/her und Hsp70-2 hin/her) und Insertion der Leseraster in den Vektor pFPMT121. Als Template diente genomische DNA des *H. polymorpha* Stammes RB11.

Schritt 2: Konstruktion von pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 und pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6. Die Hsp70-enthaltenden Abschnitte wurden mittels Ligation entsprechender 3,3 kB (*XbaI/BamHI*)-Fragmente von den pFPMT121-Derivaten auf den pFPMT-LEU2-Vektor übertragen (für weitere Details siehe Tabelle 2.1)

H6 = His-Tag

3.4.1.2 Analysen zur Assoziation des ORF313-Fusionsproteins mit Hsp70-Proteinen in *H. polymorpha* Stämmen mit erhöhter Gendosis von Hsp70-1 oder Hsp70-2

Ausgewählte Stämme wurden kultiviert, mit Methanol induziert und die löslichen intrazellulären Fraktionen über Streptactin-Sepharose aufgereinigt (siehe Kapitel 2.23.1.2). Die verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung wurden anschließend über SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.7). Als Negativkontrolle wurde ein Stamm eingesetzt, der das GFP-Fusionsprotein (ohne DnaJ-Domäne) in Kombination mit Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 produziert. In Abb. 3.7 C und D sind die Aufreinigungen des Materials dargestellt, die zusätzlich zum ORF313-Fusionsprotein entweder Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 produzieren. Abb. 3.7 A und B zeigen das Material der zugehörigen Negativkontrollstämmen. In allen vier Fällen wurden deutliche Mengen des jeweiligen Fusionsproteins eluiert (A-D, siehe Pfeile). Banden von Hsp70-Proteinen finden sich nur in Kombination mit dem ORF313-Fusionsprotein (C und D, siehe Pfeile), nicht aber mit dem Negativkontrollprotein ohne DnaJ-Domäne (Abb. 3.7 A und B). Sowohl im Hsp70-1-H6 (C) als auch Hsp70-2-H6 Stammhintergrund (D) zeigt sich eine Doppelbande auf Höhe von 70 kDa. Diese lassen sich dadurch erklären, dass die Stämme neben dem jeweiligen heterologen Hsp70-H6- auch die endogenen Hsp70-Proteine enthalten, die schon vorher in Assoziation mit dem Fusionsprotein dargestellt wurden (siehe Abb. 3.5). Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass in Abb. 3.7 C die Hsp70-1 Bande (erhöhte Gendosis Hsp70-1) und in Abb. 3.7 D die Hsp70-2 Bande (erhöhte Gendosis Hsp70-2) verstärkt erscheint. Mittels Western-Blot Analyse, bei dem ein His Tag-spezifischer Primärantikörper eingesetzt wurde, konnte immunologisch nachgewiesen werden, dass die Verstärkung auf die heterologen *HSP70-1-H6* und *HSP70-2-H6* Genprodukte zurückzuführen sind (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man das Verhältnis der Gesamt Mengen der mit dem ORF313-Fusionsprotein co-eluierten Hsp70-Mengen aus Hsp70-1-H6 und Hsp70-2-H6 Stammhintergründen, mit denen aus dem RB11-Stammhintergrund (nur endogenes Hsp70-1 und Hsp70-2; siehe Abb. 3.5 D), lässt sich eine klare Steigerung erkennen: In den Stammhintergründen mit erhöhter *HSP70* Gendosis wird mehr Hsp70 komplexiert. Allerdings wird nicht das von R. Schirmbeck für das Hsp73/T₂₋₇₇ System für HEK-Zellen beschriebene stöchiometrische Verhältnis erreicht – hier co-eluierten vergleichbare Mengen Hsp73 mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein. Das Ergebnis gleicht eher den stöchiometrischen Verhältnissen wie sie für das Hsp73/T₁₋₇₇-System in HeLa Zellen oder in einem bakteriellen DnaK/T₁₋₇₇-System beobachtet wurden (Wieland *et al.*, 2008). Dort wurde deutlich mehr Fusionsprotein als Hsp73 aufgereinigt.

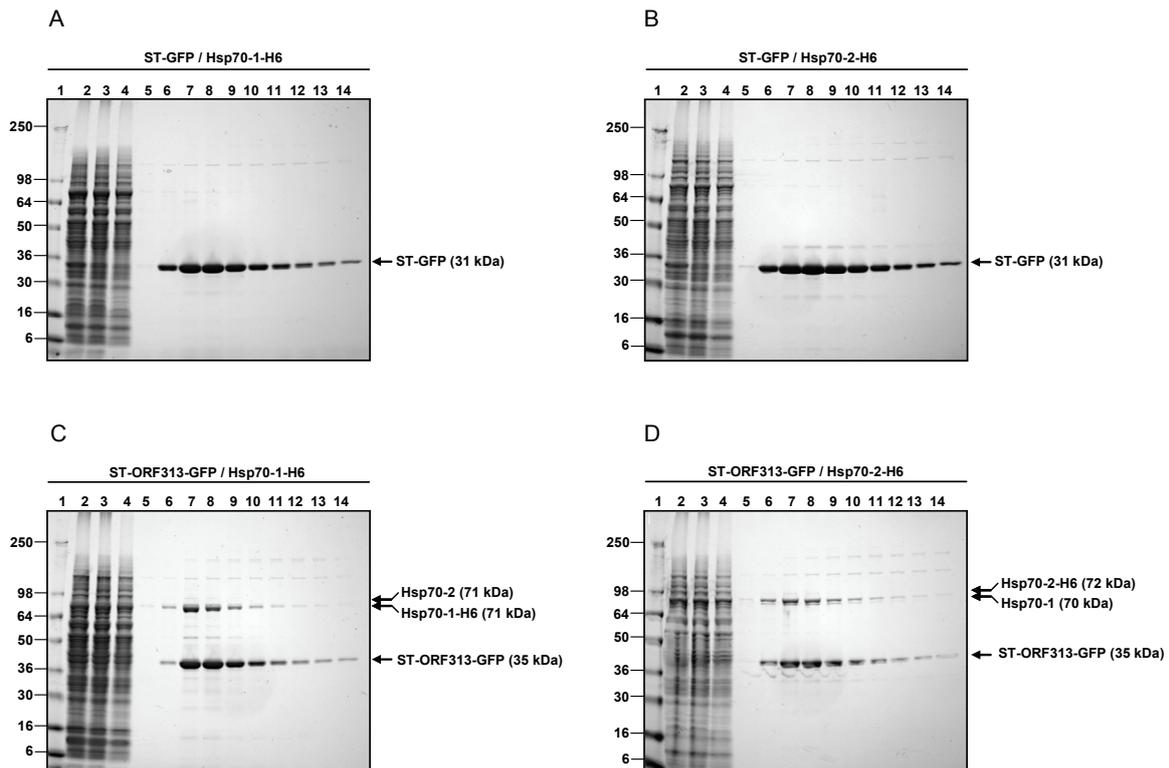


Abbildung 3.7

Aufreinigung von Fusionsprotein-Hsp70-H6 Komplexen aus *H. polymorpha* mit Hilfe von Streptactin-Sepharose.

Die Stämme pFPMT-ST-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 / HP102 # 7-11, pFPMT-ST-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6 / HP102 # 3-1, pFPMT-ST-ORF313-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 / HP102 # 7-6 und pFPMT-ST-ORF313-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6 / HP102 # 3-4 wurden im 500 ml Maßstab kultiviert und mit Methanol induziert. Die intrazellulären löslichen Fraktionen wurden für eine Aufreinigung über Streptactin-Sepharose eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte unter nativen Bedingungen; die Fusionsproteine und die jeweiligen mit den Fusionsproteinen assoziierten Hsp70 Chaperone wurden durch Zugabe von 2,5 mM Desthiobiotin von der Säule eluiert. Die Proben wurden in einem 4-20% Tris/Glyzin Polyacrylamidgel unter reduzierenden/ denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt.

Beladungsschema für A-D:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained

Spur 2: lösliche Fraktion

Spur 3: Durchfluss

Spur 4: Waschfraktion 1

Spur 5-15: Elutionsfraktionen 1-10

3.5 Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit der DnaJ-ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins ist unabhängig vom fusionierten Zielprotein

In den vorangegangenen Interaktionsstudien konnte eine Assoziation von Hsp70-Chaperonen mit einem GFP-Fusionsprotein über die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313-Proteins in *H. polymorpha* gezeigt werden. Für die industrielle Nutzung dieses Systems (z.B. zur Herstellung von Impfstoffen) muss das fusionierte Zielprotein austauschbar sein. Eine Interaktion von Hsp73 konnte in Säugetierzelllinien nicht nur mit einem, sondern mit verschiedenen Zielproteinen über die T₂₋₇₇-Domäne des T-Ags demonstriert werden. Es stellte sich nun die Frage, ob die Interaktion der Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein in *H. polymorpha* ebenfalls unabhängig vom fusionierten Zielprotein ist. Für dieses Experiment wurde als neues Zielprotein SIII-flu-GFP ausgewählt, welches, wenn in Fusion mit der ST-T₂₋₇₇-Einheit keine spezifische Interaktion mit Hsp70 in *H. polymorpha* zeigte (siehe Abb. 3.2).

Die Generierung des Plasmids pFPMT-ST-ORF313-SIII-flu-GFP erfolgte in zwei Schritten, die in Material und Methoden, Tabelle 2.1 beschrieben sind. Nachdem die Insertionssequenz über DNA-Sequenzierung verifiziert war, wurde das Plasmid in die *H. polymorpha* Stämme HP102 und HP102 mit erhöhter Hsp70-1 Genexpression eingeführt. Anschließend wurden positive bzw. doppeltpositive Stämme mittels Western-Blot der intrazellulären löslichen Fraktionen identifiziert (Daten nicht gezeigt) und durch Immunpräzipitation analysiert. Die Immunpräzipitation stellt eine weitere Möglichkeit dar, Proteinkomplexe nachzuweisen. Tatsächlich konnte mit dieser Methode eine Interaktion von Hsp70-1-H6 und dem Fusionsprotein ST-ORF313-SIII-flu-GFP nachgewiesen werden (Abb.3.8). Für den Versuch wurden die Zellen, wie bereits für die Affinitätschromatographie beschrieben, angezogen und lösliche Fraktionen der Zelllysate hergestellt. Anschließend wurden mit diesen Fraktionen Immunpräzipitationen mit den Antikörpern Anti-GFP oder Anti-H6 durchgeführt und die jeweils präzipitierten Proteine immunologisch in einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Im Fall des Stammes, der sowohl das neue Fusionsprotein als auch Hsp70-1-H6 produziert, konnte mit dem GFP-

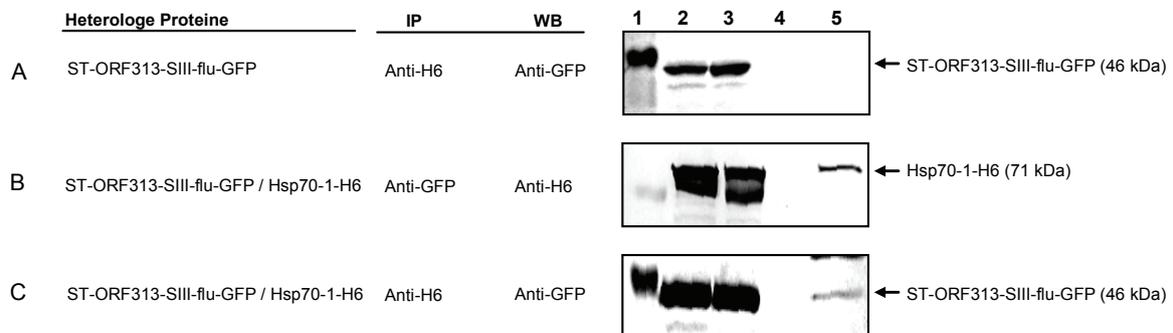


Abbildung 3.8
Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erfolgte mit den Stämmen: pFPMT-ST-ORF313-SIII-flu-GFP / HP102 #1 und pFPMT-ST-ORF313-SIII-flu-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 / HP102 #7-1. Dafür wurden lösliche Fraktionen mit den Antikörpern Anti-GFP (Invitrogen) oder Anti-H6 versetzt. Schlüsselfraktionen wurden in einem 4-20% Polyacrylamidgel unter denaturierenden/reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Semidry-Transfer auf Nitrozellulosemembran übertragen. Die immunologische Auswertung erfolgte mit den Antikörpern Anti-GFP (Invitrogen) in Kombination mit dem Kit „Western Breeze – Rabbit“ (Invitrogen) und Anti-H6 in Kombination mit dem Kit „Western Breeze – Mouse“ (Invitrogen). IP: Immunpräzipitation; WB: Western-Blot.

Beladungsschema für A und B:
 Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
 Spur 2: lösliche Fraktion
 Spur 3: nach Inkubation mit Antikörper
 Spur 4: letzte Waschfraktion mit 1xPBS
 Spur 5: Elutionsfraktion

spezifischen Antikörper das Fusionsprotein und ebenfalls Hsp70-1-H6 präzipitiert werden. Hsp70-1-H6 wurde immunologisch mit dem Antikörper Anti-H6 nachgewiesen (siehe Abb. 3.8 B). Reziprok konnte das Fusionsprotein über Hsp70-1-H6 mit dem His-Tag (H6)-Antikörper präzipitiert werden (Abb. 3.8 C). Ohne heterolog exprimiertes Hsp70-1-H6 (Negativkontrolle) konnte das Fusionsprotein mittels eines spezifischen Anti-H6 Antikörpers nicht präzipitiert werden (Abb. 3.8 A), was auf eine spezifische Interaktion von Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 hinweist. Da für das T₂₋₇₇-Fusionsprotein keine Bindung mit Hsp70-Chaperonen gefunden wurde (siehe Abb. 3.2 B), kann eine Interaktion von Hsp70 mit den Komponenten SIII-flu-GFP ausgeschlossen werden. Dies deutet darauf hin, dass in *H. polymorpha* die Interaktion der Hsp70-Chaperone mit Fusionsproteinen ausschließlich über deren DnaJ-ähnliche ORF313-Domäne erfolgt. Es ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion unabhängig vom jeweils fusionierten Zielprotein ist.

Neben der Aufreinigung mit Hilfe von Streptactin-Sepharose steht nun mit der Immunpräzipitation eine zweite Methode zur Verfügung, um Interaktionen zwischen *H. polymorpha* Hsp70-Proteinen und ORF313-Fusionsproteinen darzustellen.

3.6 Analysen zur Interaktion von ST-ORF313-GFP und heterologem Hsp70-1-H6 nach Aufreinigung über Streptactin-Sepharose

Nachdem mit zwei verschiedenen Methoden die nicht-kovalente Bindung von ORF313-Fusionsproteinen an Hsp70-Proteine *in vivo* gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob die Komplexstrukturen auch nach der Aufarbeitung stabil erhalten bleiben. Für die folgenden Analysen wurde der HP102 Teststamm der heterolog das ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 produziert, ausgewählt, welcher in vorangegangenen Analysen eine Komplexbildung gezeigt hatte (siehe Kapitel 3.4.2.1). Als Kontrolle wurden Stämme verwendet, die Hsp70-1-H6 und Hsp70-1-H6 plus ST-GFP-Fusionsprotein (kein Komplex) exprimieren.

Die Stämme wurden mit Methanol induziert; anschließend wurden lösliche intrazelluläre Fraktionen präpariert und die Proteine über Affinitätschromatographie angereichert. Die Elutionsfraktionen wurden mit drei verschiedenen Methoden analysiert, die Aussagen über mögliche Komplexbildung zulassen: (1) mit Reverse Phase (RP)-HPLC, (2) Size Exclusion Chromatographie (SEC) Lightscatter und (3) Ni-NTA Affinitätschromatographie. Unter dem Aspekt der Prozessentwicklung sollte gleichzeitig eruiert werden, welche Methoden sich am besten für einen Nachweis der Komplexe eignen.

3.6.1 Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels RP-HPLC

Bei der RP-HPLC wird das Prinzip der hydrophoben Wechselwirkung des Analyten mit der unpolaren stationären Phase der Säule im polaren, wässrigen Lösungsmittel genutzt. Durch die Bindung eines Ionenpaar-Reagenz als Gegen-Ion an die ionischen Seitengruppen des zu analysierenden Peptids wird dessen Hydrophobizität verändert und beeinflusst dadurch die Retention und die Selektivität des Trennvorgangs. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln zur mobilen Phase wird deren Polarität verringert und somit die Elutionskraft erhöht. Dies ermöglicht eine Trennung von Einzelkomponenten, z. B. freiem Hsp70-1-H6, freiem Fusionsprotein ST-ORF313-GFP und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen. Um die jeweiligen detektierten Peaks identifizieren zu können, wurden zusätzlich zu den Proben des Teststammes die Proteine ST-GFP und Hsp70-1-H6 einzeln analysiert.

Das ST-GFP-Protein (ohne DnaJ-Domäne) wurde als Kontrolle ausgewählt, da dieses nicht mit Hsp70-1 interagiert. Das zu analysierende ORF313-Fusionsprotein hingegen bildet mit endogenen und heterologen Hsp70-Chaperonen einen Komplex und wird mittels Streptactin-Sepharose daher

nicht als Einzelkomponente aufgereinigt. Die Resultate der RP-HPLC Analyse sind in Abbildung 3.9 gezeigt. Das Fusionsprotein ST-GFP (grüne Kurve) hat eine Retentionszeit von 6,3 min, Hsp70-1-H6 eluiert nach 7,8 min (violette Kurve). (Die beiden kleinen Peaks bei 5,6 min und 6,4 min, die mit Hsp70-1-H6 detektiert wurden, könnten auf Verunreinigungen oder Abbau zurückzuführen sein.) Das Profil der Elutionsfraktion von ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex (blaue Kurve) zeigt drei Peaks mit den Retentionszeiten von 5,9 min, 6,3 min und 7,8 min. Der Peak bei 6,3 min stimmt mit dem des Fusionsproteins ST-GFP überein. Dies deutet auf freies, unkomplexiertes ORF313-Fusionsprotein hin. Der Peak bei 7,8 min stimmt mit dem des Proteins Hsp70-1-H6 überein und weist auf freies Hsp70-1-H6 hin. Möglich ist, dass unter den stark sauren Bedingungen (pH 2,2) unter denen der Trennvorgang stattgefunden hat, die Komplexe dissoziiert sind. Für die Fraktion mit einer Retentionszeit von 5,9 min konnte kein entsprechendes Profil in den Analysen der Einzelkomponenten Hsp70-1-H6 und ST-GFP detektiert werden. Deshalb wird vermutet, dass es sich hierbei um Komplexe aus ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 handelt.

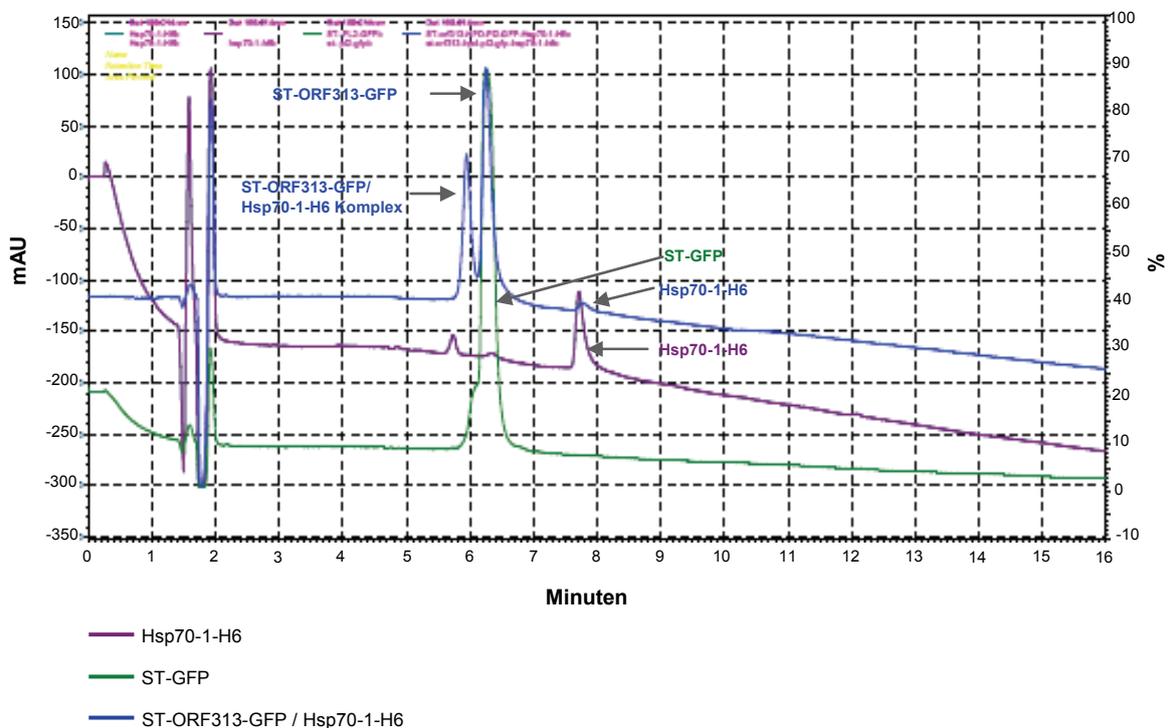


Abbildung 3.9

RP-HPLC Analyse von Hsp70-1-H6, ST-GFP, und ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexen.

Die Stämme pFPMT-ST-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-11, pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-6 und pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7 wurden Methanol-Induktionen unterzogen. Die Fusionsproteine und Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe wurden aus den löslichen intrazellulären Fraktionen der ersten beiden Stämme mit Hilfe von Streptactin Superflow Matrix in Kombination mit dem Fraktionssammelsystem ÄKTA Prime Plus aufgereinigt. Das Protein Hsp70-1-H6 wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. Die gepoolten Elutionsfraktionen wurden mittels RP-HPLC analysiert. Für den Trennvorgang wurde eine C8-Säule 150 x 4,5 mm (Nukleosil 120-3-C8) und das HPLC-System Gold der Fa. Beckman Coulter verwendet. Die Detektion der Elutionsfraktionen erfolgte mit Hilfe von UV-Absorption bei 168-214 nm. Für die Analysen wurden jeweils 0,05 mg aufgereinigtes Gesamtprotein eingesetzt.

3.6.2 Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels Size Exclusion Chromatographie (SEC) – Lightscatter

Die Ausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC) trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Die Trennung wird durch die Verweildauer der einzelnen Moleküle in den Poren der Trenngele erzielt, wobei sich die Aufenthaltsdauer umso mehr verlängert, je kleiner die Moleküle sind. Die mobile Phase hat keinen Einfluss auf die Trennung der Moleküle. Moleküle, die zu groß für die Poren der Matrix sind, eluieren mit der Lösungsmittelfront im Ausschlussvolumen. Mit Hilfe von Laserdetektion wird die Lichtstreuung der einzelnen Elutionsfraktionen gemessen, wodurch in Kombination mit dem Brechungsindex die molekulare Masse der Moleküle berechnet werden kann. Um eine Aussage über das Molekulargewicht der Analyten machen zu können, muss die Kalibrierungskonstante des RI Detektors (Brechungsindex-Detektors) mit einem Standardmolekül ermittelt werden, dessen Molekulargewicht bekannt ist.

Mit Hilfe dieser Methode sollten nun die Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe anhand der Größenauftrennung und durch die Zuordnung der jeweils berechneten Molekulargewichte identifiziert werden. Es wurden Aliquots der aufgereinigten Proben der Proteine Hsp70-1-H6, ST-GFP und der ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe für die Untersuchung eingesetzt, die bereits zuvor für die RP-HPLC verwendet wurden. Die Proteine waren in ihrem jeweiligen Elutionspuffer gelöst (ST-GFP und ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex [100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin]; Hsp70-1-H6 [50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol]).

Die Ergebnisse der detektierten Molekulargewichte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Für die Probe des Chaperons Hsp70-1-H6 wurden mit dieser Methode drei Peaks detektiert, für die die Molekulargewichte 162 kDa, 100 kDa und 80 kDa berechnet wurden. Da auf Basis der Gewichte der einzelnen Aminosäuren für Hsp70-1-H6 ein Molekulargewicht von 70 kDa berechnet wurde, können die detektierten Molekulargewichte von 80 kDa und 162 kDa somit auf Hsp70-1-H6 Monomere bzw. Dimere zurückgeführt werden. Für Moleküle mit einem Molekulargewicht von 100 kDa konnte in direktem Zusammenhang kein Hsp70-Chaperon zugeordnet werden. Eine mögliche Erklärung sind Proteinverunreinigungen, die gegebenenfalls mit einem Hsp70-1-H6 Monomer interagieren. Für die Probe des Fusionsproteins ST-GFP konnte ein Molekulargewicht von 612 kDa bestimmt werden, was auf nicht näher definierbare Multimere des Fusionsproteins hinweist. Ein weiterer Peak mit einem berechneten Molekulargewicht von 39 kDa könnte auf ST-GFP Monomere hindeuten, da das über die Aminosäuregewichte berechnete Molekulargewicht 31 kDa beträgt. Die Probe des ST-ORF313-GFP/Hsp70-Komplexes weist einen Peak mit einem zugeordneten Molekulargewicht von 420 kDa auf – auch hier weist die Größe auf multimere Komplexe hin, deren Zusammensetzung nicht näher definiert werden kann. Möglich ist, dass es sich hierbei um Fusionsproteine im Komplex mit mehreren Hsp70-Proteinen handelt. Die berechneten Molekulargewichte von 48 kDa und 100 kDa weisen auf Monomere und Dimere des ORF313-Fusionsproteins hin. Der Peak mit einem zugeordnetem Molekulargewicht von 126 kDa stimmt gut mit der Summe des für Hsp70-1-H6 detektierten Molekulargewichtes von 80 kDa und dem für das ORF313-Fusionsprotein detektierten Molekulargewichtes von 48 kDa überein – das Signal kann als Komplex aus jeweils einem Hsp70-Molekül und einem Fusionsprotein-Molekül erklärt werden. Das Erscheinen eines Peaks, für den ein Molekulargewicht von 120 kDa berechnet wurde, deutet ebenfalls auf einen Komplex aus einem Hsp70 und einem Fusionsprotein hin. Die zwei unterschiedlichen Komplexgewichte (120 kDa und 126 kDa) könnten dadurch erklärt werden, dass entweder das heterolog produzierte Hsp70-1-H6 oder das endogene Hsp70-1 an dem jeweiligen Komplex beteiligt ist. Die prozentualen Anteile der Hsp70/Fusionsprotein-Komplexe in der Probe ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex machen insgesamt 18% aus, wovon 3% auf Komplexe mit endogenem Hsp70-1 (120 kDa) und 15% auf Komplexe mit heterolog exprimiertem Hsp70-1-H6 (126 kDa) entfallen würden. Den größten Proteinanteil bilden nicht-assoziierte Fusionsproteine (36% Monomere und 28% Dimere), sowie multimere Komplexe.

Molekulargewicht (kDa)		
Hsp70-1-H6	ST-GFP	ST-ORF313-GFP/ Hsp70 Komplex
162 (Dimer)	612 (Multimer)	420 (Multimer)
100 (keine Zuordnung)	39 (Monomer)	126 (Komplex mit Hsp70-1-H6)
80 (Monomer)		120 (Komplex mit Hsp70-1)
		100 (Dimer ST-ORF313-GFP)
		48 (Monomer ST-ORF313-GFP)

Tabelle 3.1**Analyse von Hsp70-1-H6, ST-GFP, und ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexen mittels Size Exclusions Chromatographie (SEC)-Lightscatter.**

Die Stämme pFPMT-ST-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-11, pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-6 und pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7 wurden Methanol-Induktionen unterzogen. Die Fusionsproteine und Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe wurden aus den löslichen intrazellulären Fraktionen der ersten beiden Stämme mit Hilfe von Streptactin-Superflow Matrix in Kombination mit dem Fraktionssammelsystems ÄKTA Prime Plus aufgereinigt. Das Protein Hsp70-1-H6 wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Spin-Columns) angereichert. Die gepoolten Elutionsfraktionen wurden mittels SEC-Lightscatter analysiert. Für den Trennvorgang wurde die Säule BioSuite 250 (5µm, HRsec) (7,8 x 300 mm) und das HPLC-System Gold der Fa. Beckman Coulter verwendet. Die Detektion der Elutionsfraktionen erfolgte mit Hilfe von UV-Absorption bei 220 nm und Laserdetektion bei 690 nm. Für die Analysen wurden zwischen 100-250 µg aufgereinigtes Gesamtprotein eingesetzt.

Neben der RP-HPLC ist das SEC-Lightscattering somit eine zweite Methode, mit der die Interaktion der Fusionsproteine und der Hsp70-Chaperone nach der Aufreinigung über Streptactin-Sepharose dargestellt werden kann. Vorteilhaft bei dieser Methode ist die Zuordnung der Einzelkomponenten und der Komplexe anhand des Molekulargewichtes.

3.6.3 Nachweis von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen mittels zweifacher Aufreinigung über Affinitätschromatographie

Um mit einer weiteren Methode zu zeigen, dass das über Streptactin-Sepharose aufgereinigte Fusionsprotein ST-ORF313-GFP und das zytosolische Hsp70-1-H6-Chaperon einen Komplex bilden, wurde die Elutionsfraktion anschließend mit Hilfe von Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose nochmals aufgereinigt. Hierbei wurde das zuvor co-eluierte Hsp70-1-H6-Chaperon nun selektiv über den His-Tag aufgereinigt – eventuell mitgereinigte Proteine sollten demnach nicht-kovalent an Hsp70-1-H6 gebunden gewesen sein.

In Abb. 3.10 ist die SDS-PAGE Analyse von Schlüsselfraktionen dieser zwei hintereinander geschalteten Aufreinigungen dargestellt. Spuren 2 und 3 zeigen die lösliche Fraktion des Rohextraktes, mit der die Streptactin-Spin-Columns beladen wurde, sowie deren Durchlaufraction. Spuren 4 und 5 zeigen den ersten und letzten von insgesamt sechs Waschsritten, mit denen unspezifisch an die Streptactin-Matrix gebundene Proteine von der Säule gewaschen wurden. Die Proteine ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 mit einem Molekulargewicht von 35 kDa und 70 kDa wurden durch Zugabe von 2,5 mM Biotin von der Säule eluiert (Spur 6). Im Anschluss erfolgte die zweite Aufreinigung mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose, ebenfalls in Form von Spin-Columns. Die Ni-NTA-Säule wurde mit der Elutionsfraktion der vorher durchgeführten Aufreinigung über Streptactin-Sepharose beladen. Schlüsselfraktionen dieser zweiten Aufreinigung sind in Abbildung 3.10 in den

Spuren 7-10 gezeigt. Die Durchflussfraktion ist in Spur 7 dokumentiert. Um unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebundene Proteine von der Matrix zu entfernen, wurde die Säule 6x mit 300 µl Waschpuffer mit einer niedrigen Imidazolkonzentration (20 mM Imidazol) gewaschen. Material des ersten und letzten Waschschrittes ist in den Spuren 8 und 9 dokumentiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 250 mM Imidazol. Die Elutionsfraktion ist in Spur 10 mit den Proteinen ST-ORF313-GFP (35 kDa) und Hsp70-1-H6 (70 kDa) zu sehen. Die Proteine wurden in einem 1:1 Verhältnis aufgereinigt.

Die Doppelaufreinigung über Streptactin-Sepharose und Ni-NTA-Agarose stellt somit ein weiteres Analyse-Tool für die Isolation und Charakterisierung von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen dar. Vergleicht man in Abb. 3.10 Spur 6 (Eluat nach Aufreinigung über Streptactin-Sepharose) mit Spur 10 (Eluat nach anschließender Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose), zeigt sich, dass durch die zweite Anreicherung kaum Verluste bei der Ausbeute entstehen, die Reinheit der Probe jedoch gesteigert wird. Zudem lässt sich nach der zweiten Elution kein nennenswerter Unterschied in den Stöchiometrien zwischen ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 detektieren. Es eluieren in etwa gleiche Mengen an Fusionsprotein und Hsp70-1-H6. Dies deutet darauf hin, dass je ein Hsp70-1-H6-Protein mit einem Fusionsprotein assoziiert ist. Eine ähnliche Aussage über die Stöchiometrie der Komplexe wurde mit der Analyse mittels SEC Lightscatter erzielt. Im Gegensatz dazu, zeigte sich mittels RP-HPLC ein erkennbarer Zerfall der Komplexe. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Komplexe nur unter bestimmten Bedingungen stabil sind und eine RP-HPLC unter diesen Bedingungen nicht die optimale Methode zu sein scheint.

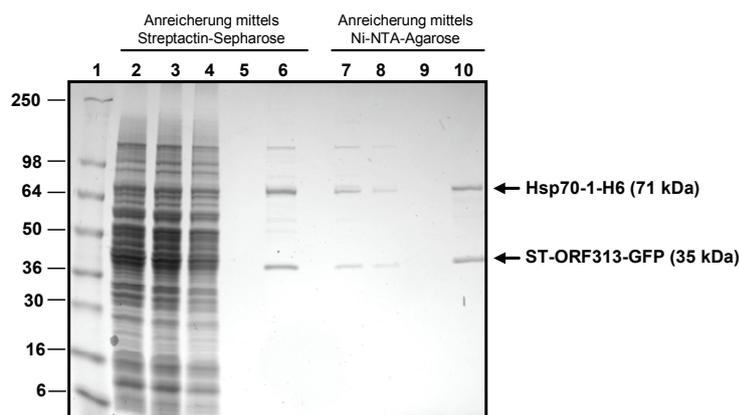


Abbildung 3.10
Doppelaufreinigung der ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose und Ni-NTA-Agarose.

Für die Analyse wurde der Stamm pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102#7-6 im 100 ml Maßstab kultiviert, mit Methanol induziert und anschließend die intrazelluläre, lösliche Fraktion präpariert. Mit dieser wurden zuerst die Streptactin-Spin-Columns beladen und daran anschließend mit der erhaltenen Elutionsfraktion die Ni-NTA-Agarose Spin-Columns. Die Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden in einem reduzierendem/denaturierendem 4-20% Tris/Glyzin-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt. Die Spuren 2-6 zeigen die Aufreinigung über Streptactin-Sepharose. Die Proteine wurden durch Zugabe von 2,5 mM Biotin von der Säule eluiert. Die Spuren 7-10 zeigen die anschließende Aufreinigung der Elutionsfraktion über Ni-NTA-Agarose. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 250 mM Imidazol.

Beladungsschema:

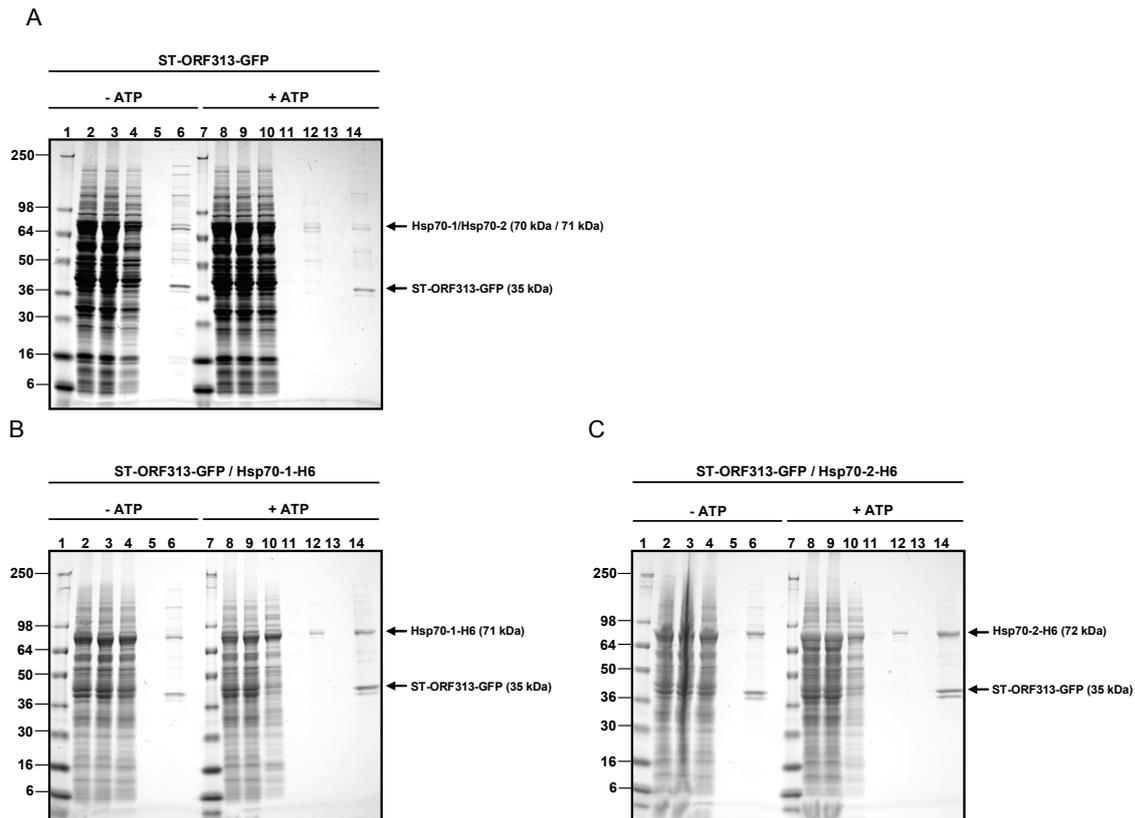
1. Aufreinigung mittels Streptactin-Sepharose
Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
Spur 2: lösliche Fraktion
Spur 3: Durchfluss
Spur 4: Waschfraktion 1
Spur 5: Waschfraktion 6
Spur 6: Elutionsfraktion

2. Aufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose
Spur 7: Durchfluss
Spur 8: Waschfraktion 1
Spur 9: Waschfraktion 6
Spur 10: Elutionsfraktion

3.7 Komplexierung von Hsp70-Chaperonen aus *H. polymorpha* mit dem ORF313-Fusionsprotein in Abhängigkeit von ATP

Die Fähigkeit von Hsp70-Chaperonen, mit linearen Polypeptidabschnitten über die Substratbindedomäne zu interagieren, ist eine ATP-vermittelte Reaktion, die durch das Co-Chaperon Hsp40 reguliert wird. Eine Interaktion von Hsp40 über die J-Domäne mit der Nukleotidbindedomäne von Hsp70 aktiviert dessen ATPase-Aktivität und resultiert in einer Konformationsänderung. Durch diese Konformationsänderung, die durch die Hydrolyse von ATP zu ADP initiiert wird, schließt sich der „Deckel“ der Substratbindedomäne und Hsp70-gebundenes Substrat kann nicht mehr dissoziieren (siehe auch Abb. 1.3). Wird ADP mit Hilfe von Nukleotidaustauschfaktoren aus der Nukleotidbindetasche gelöst, wird die Substratbindungsfurche durch eine erneute Bindung von ATP geöffnet, und das Substrat kann auf Grund der geringeren Affinität zu Hsp70 dissoziieren. Wieland *et al.* (2008) konnten zeigen, dass sowohl in HeLa Zellen das unter Stress gebildete Hsp70, sowie das konstitutiv gebildete Hsp73, durch Zugabe von ATP aus dem *in vitro* Komplex mit einem T₁₋₇₇-Fusionsprotein, welches die DnaJ-ähnliche Domäne T₁₋₇₇ aus SV40 beinhaltet, herausgelöst werden kann. Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob auch die Hsp70-Chaperone aus *H. polymorpha*, Hsp70-1 und Hsp70-2, in Abhängigkeit von ATP aus ihren Fusionsprotein-Komplexen dissoziieren (Abb. 3.11).

Die löslichen Fraktionen der zu untersuchenden Stämme wurden wie in Kapitel (2.23) beschrieben mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose aufgereinigt, nur dass jetzt ein zweiter Waschschrift eingefügt wurde, in welchem dem Waschpuffer 10mM ATP zugesetzt war. Die wichtigsten Fraktionen der Aufreinigung wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Wie Abb.3.11 zeigt, wurde in der ersten Waschfraktion mit ATP freies Hsp70 detektiert, welches in den Waschfraktionen ohne Zugabe von ATP nicht gefunden wurde. Es findet demnach eine ATP-abhängige Dissoziation statt. Diese ist allerdings nur partiell – ein Vergleich der Elutionsfraktionen mit und ohne vorherige ATP-Zugabe (jeweils Spur 6 und 14) zeigt, dass in allen Fällen beide Proteine, Fusionsprotein und Hsp70, eluiert werden. Im Unterschied zum Säugetierzellsystem (Wieland *et al.*, 2008) bewirkt ATP im *H. polymorpha* System also nur eine unvollständige Dissoziation.

**Abbildung 3.11****Einfluss von ATP auf die Komplexierung von Hsp70-Chaperonen und dem Fusionsprotein ST-ORF313-GFP.**

Die Stämme pFPMT-ST-ORF313-GFP/RB11 #10, pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 /HP102 #7-6 und pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6 /HP102 #3-4 wurden mit Methanol induziert und anschließend intrazelluläre, lösliche Fraktionen präpariert. Die Aufreinigung der Komplexe erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose mit Hilfe von Streptactin-Spin-Columns. Hsp70 wurde durch Zugabe von 10 mM ATP in den Waschschritten 7-12 von dem Fusionsprotein gelöst. Die Proben der einzelnen Fraktionen wurden in einem 4-20% Tris/Glyzin Polyacrylamidgel unter reduzierenden/denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt.

Beladungsschema für A-C:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
 Spur 2: lösliche Fraktion
 Spur 3: Durchfluss
 Spur 4: Waschfraktion 1
 Spur 5: Waschfraktion 6
 Spur 6: Elutionsfraktion

Spur 7: Marker SeeBlue PreStained
 Spur 8: lösliche Fraktion
 Spur 9: Durchfluss
 Spur 10: Waschfraktion 1
 Spur 11: Waschfraktion 6
 Spur 12: Waschfraktion 7 + ATP
 Spur 13: Waschfraktion 12 + ATP
 Spur 14: Elutionsfraktion

3.8 Modifikation des HPD-Motivs der DnaJ-ähnlichen Domäne von ORF313

Im Folgenden sollte die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313-Proteins näher charakterisiert werden. Wie in den Experimenten zuvor gezeigt werden konnte, assoziieren die Hsp70-Chaperone Hsp70-1 und Hsp70-2 über diese Domäne mit dem Fusionsprotein ST-ORF313-GFP. Für die Interaktion der J-Proteine mit Hsp70-Chaperonen und der Aktivierung derer ATPase-Aktivität ist das invariante HPD-Motiv essentiell. Frühere Studien in anderen Systemen ergaben, dass bereits ein einzelner Aminosäureaustausch im HPD-Motiv eine Interaktion mit Hsp70-Chaperonen unterdrückt und die Stimulierung der ATPase Aktivität nicht erfolgt (Tsai & Douglas, 1996; Mayer *et al.*, 1999; Kluck *et al.*,

2002). Für das DnaJ-Protein aus *Agrobacterium tumefaciens* konnte gezeigt werden, dass bei einer Substitution der Aminosäure Aspartat (D) zu Glutamat (E) im HPD-Motiv, die HPE-Mutante den Wildtyp nicht supplementiert (Hennessey *et al.*, 2005). Schon ein Aminosäureaustausch, bei dem sich die Aminosäure nur in einer zusätzlichen CH₂-Gruppe unterscheidet und keine große Modifikation in der Konformation hervorruft, resultiert demnach in einem Funktionsverlust von DnaJ. Es sollte nun untersucht werden, ob durch denselben Austausch – D zu E - im HPD-Motiv der DnaJ-ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins die Interaktion des ORF313-Fusionsproteins mit beiden Hsp70-Chaperonen inhibiert wird. Diese HPE-Variante sollte im Gegensatz zu dem Fusionsprotein ST-GFP als „echte“ Negativkontrolle für das Fusionsprotein mit HPD-Motiv eingesetzt werden.

3.8.1 Erzeugung einer Punktmutation im konservierten HPD-Bindemotiv der DnaJ- ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins in *H. polymorpha* durch gezielte PCR-Mutagenese

Die Herstellung der HPE-Mutation erfolgte mittels PCR-Mutagenese (siehe Kapitel 2.16.2). Der Vektor pCRII-TOPO-TA, der das Fusionsgen ST-ORF313-GFP enthält, diente als Template; als Primer wurden HPE hin/HPE her eingesetzt (siehe Tab. 2.1). Die Primer waren so konstruiert, dass bei erfolgreicher Durchführung im Bereich des durch die Mutagenese generierten HPE-Abschnitts eine *Kpn2I*-Restriktionsstelle entsteht, die in der Vorläufersequenz nicht vorhanden war. Es konnte mittels *Kpn2I* Testverdauung ein restriktionspositives pCRII-TOPO-ST-ORF313(HPE)-GFP Konstrukt identifiziert werden, dessen Fusionsleseraster anschließend über *EcoRI*/*BglII*-Klonierung in den *H. polymorpha* Expressionsvektor pFPMT121 eingesetzt wurde. Die Plasmidkonstruktion ist in Abb. 3.12 schematisch dargestellt. Für die Analysen wurden Stämme mit folgenden Stammhintergründen mit dem Plasmid pFPMT-ST-ORF313(HPE)-GFP transformiert: a) RB11 (endogene Hsp70-Chaperone),

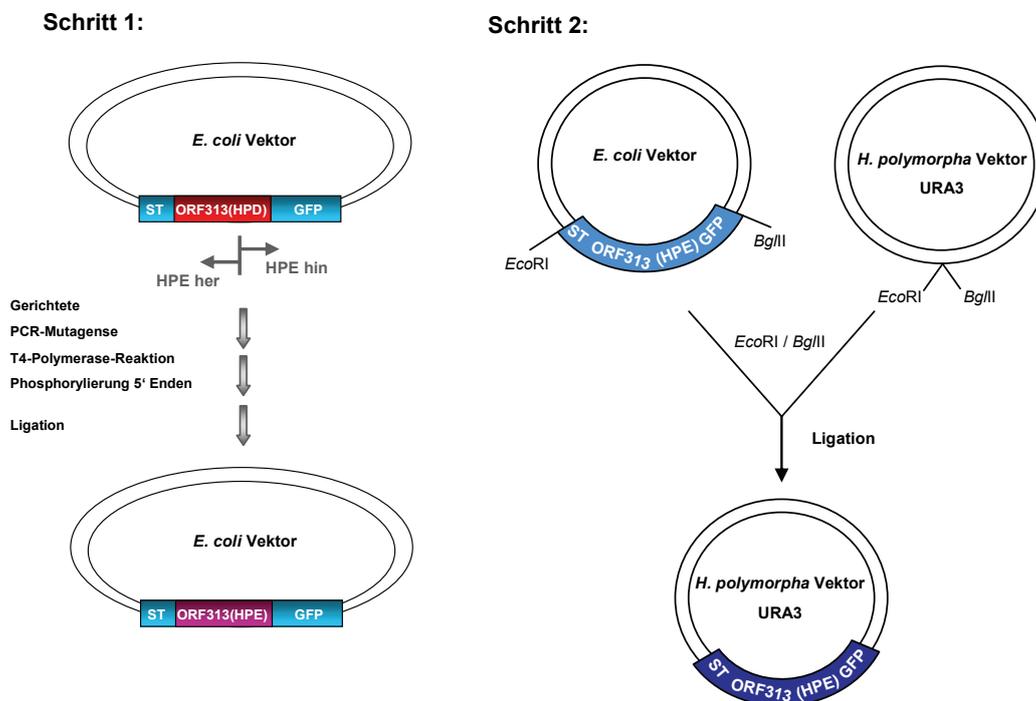


Abbildung 3.12
Schematische Darstellung der gerichteten PCR-Mutagenese.

Schritt 1: Mittels des Primerpaares HPE hin/HPE her wurde die Punktmutation in die Kodons des HPD-Motivs von ORF313 eingeführt. Für methodische Details siehe Kapitel 2.16.2. **Schritt 2:** Durch gerichtete Ligation über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI*/*BglII* wurde das Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP in den *H. polymorpha* Expressionsvektor pFPMT121 kloniert. Nach Sequenzierung wurden verschiedene *H. polymorpha* Stämme mit dem Plasmid transformiert und anschließend auf eine Assoziierung des Fusionsproteins mit Hsp70-Chaperonen überprüft.

b) HP102 mit erhöhter Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 Gendosis. Produkt-positive bzw. doppelt-positive Stämme wurden mit Hilfe von Western-Blot-Analyse identifiziert und je ein positiver Stamm für die weiteren Analysen ausgewählt (Daten nicht gezeigt).

3.8.2 Analysen zur Assoziation von Hsp70-Chaperonen mit dem Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP

Die Interaktion der Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP wurde in An- und Abwesenheit von ATP mit Hilfe von Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose mittels Streptactin-Spin-Columns analysiert. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 3.7 beschrieben. Abbildung 3.13 zeigt, dass beide Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein co-eluierten. Obwohl die mutierte DnaJ-ähnliche Domäne anstelle des (invarianten) HPD-Motivs die Abfolge HPE enthält, assoziieren sowohl Hsp70-1 als auch Hsp70-2 mit dem Fusionsprotein. Dies ist ein bemerkenswertes Resultat, da in der Literatur beschrieben ist, dass DnaJ-Domänen mit mutiertem HPD-Motiv generell nicht mehr mit Hsp70 interagieren können (Hennessey *et al.*, 2005; Tsai & Douglas, 1996; Mayer *et al.*, 1999; Kluck *et al.*, 2002). Auch dieser Austausch führte zu einem Funktionsverlust des DnaJ-Proteins in *Agrobacterium tumefaciens*. (Wie oben bemerkt, war das HPE-Fusionsprotein eigentlich als ein Negativkontrollprotein gedacht, welches aufgrund des auf Strukturebene moderaten Aminosäureaustausches – D nach E- im Vergleich zum Wildtypprotein keine nennenswerte Konformationsänderung zeigen sollte.)

Im Vergleich unterscheiden sich die Mengen der über das HPE-Fusionsprotein mitgereinigten endogenen Hsp70-1 und Hsp70-2 Proteine (siehe Abb. 3.13 A, Spur 6 und 14) nicht von jenen, die über das HPD-Fusionsprotein co-eluiert werden (siehe Abb. 3.11 A, Spuren 6 und 14). Abweichend dazu, konnte in den Stammhintergründen mit erhöhtem Level an Hsp70-1-H6 (Abb. 3.13 B) oder Hsp70-2-H6 (Abb. 3.13 C) ein Unterschied beobachtet werden. In beiden Fällen ist eine signifikante Steigerung (~ 100-200%) an über das HPE-Fusionsprotein gereinigtem Hsp70 zu erkennen im Vergleich zu den Resultaten von entsprechenden Experimenten, die mit dem HPD-Fusionsprotein erzielt wurden (siehe Abb. 3.11 B und C, Spuren 6 und 14). Die Assoziation der Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein scheint sich durch die HPE-Mutation also verbessert zu haben. In den Elutionsfraktionen (Abb. 3.11, B-C, Spur 6 und 14) konnte für die Einzelkomponenten der HPD-Komplexe ein Verhältnis von etwa 1:1 beobachtet werden (siehe Abbildung 3.11 B und C). Während mit den HPE-Komplexen Verhältnisse von 1: 2 bis 1:3 für das Fusionsprotein und Hsp70-H6 detektiert wurden (siehe Abbildung 3.13 B und C). [Dieses 1:1 (HPD-Komplex) oder 1:2/1:3 (HPE-Komplex) Verhältnis scheint in Zusammenhang mit der Aufarbeitungsmethode zu stehen – weder mit selbstangefertigten Steptactin-Sepharose-Säulen noch mit kommerziellen Säulen mit Streptactin-Superflow Matrix konnte diese Stöchiometrie der Komplexe erreicht werden].

Für die HPE-Komplexe konnte gezeigt werden, dass sich ein geringer Anteil von Hsp70 aus dem Komplex durch ATP-Zugabe lösen lässt (Abb. 3.13, Spur 6). Allerdings wurde nach der finalen Elution immer noch Hsp70 mit dem HPE-Fusionsprotein co-eluiert (Abb. 3.11 und 3.13, Spuren 14). Wie bei den HPD-Komplexen bewirkt die ATP-Zugabe im Waschpuffer bei der HPE-Mutante auch nur eine partielle Ablösung der Hsp70-Chaperone.

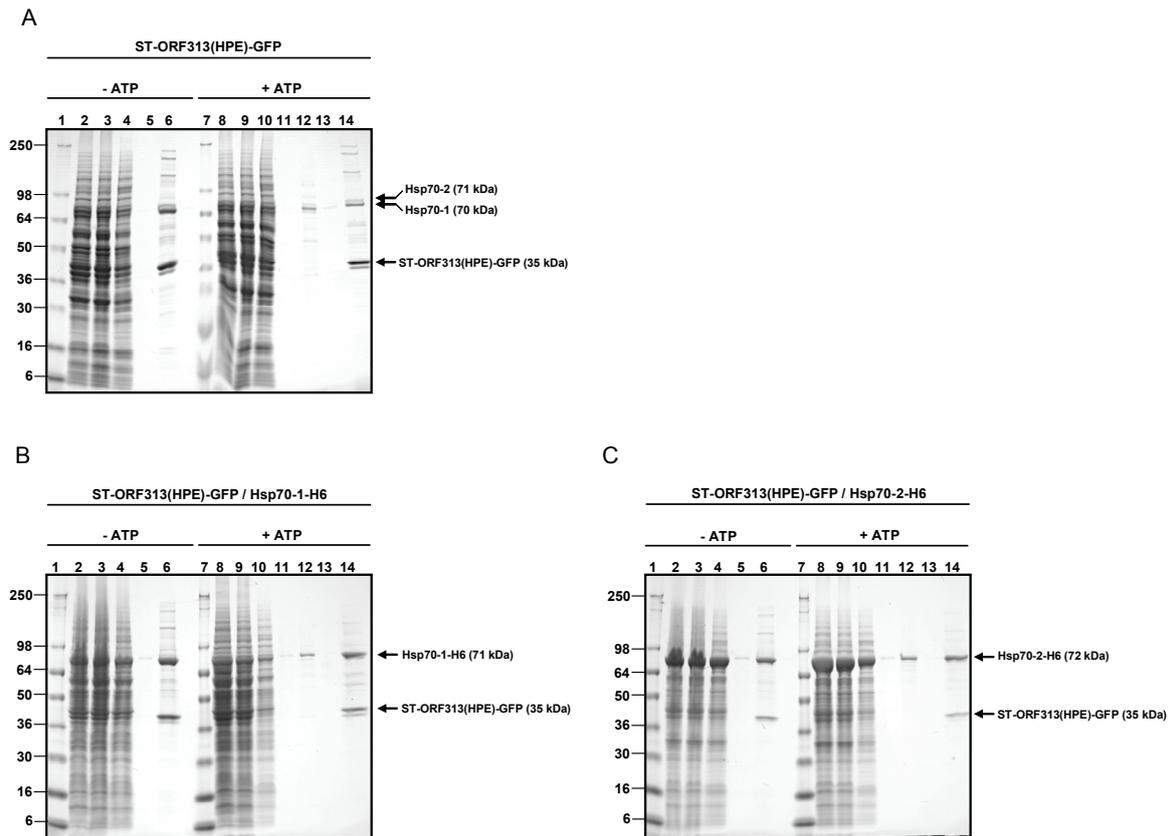


Abbildung 3.13

Einfluss der HPE-Mutation auf die Komplexierung von Hsp70-Chaperonen mit dem Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP.

Die Stämme pFPMT-ST-ORF313-GFP /RB11 #10, pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6 /HP102 #7-6 und pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6 /HP102 #3-4 wurden mit Methanol induziert und anschließend intrazelluläre, lösliche Fraktionen präpariert. Die Aufreinigung der Komplexe erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose mit Hilfe von Streptactin-Spin-Columns. Hsp70 wurde durch Zugabe von 10mM ATP in den Waschschritten 7-12 von dem Fusionsprotein gelöst. Die Proben der einzelnen Fraktionen wurden in einem 4-20% Tris/Glyzin Polyacrylamidgel unter reduzierenden/denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue angefärbt.

Beladungsschema für A-C:

Spur 1: SeeBlue PreStained
Spur 2: lösliche Fraktion
Spur 3: Durchfluss
Spur 4: Waschfraktion 1
Spur 5: Waschfraktion 6
Spur 6: Elutionsfraktion

Spur 7: SeeBlue PreStained
Spur 8: lösliche Fraktion
Spur 9: Durchfluss
Spur 10: Waschfraktion 1
Spur 11: Waschfraktion 6
Spur 12: Waschfraktion 7 + ATP
Spur 13: Waschfraktion 12 + ATP
Spur 14: Elutionsfraktion

3.9 Analysen zur Assoziation von Fusionsprotein und Hsp70 aus *H. polymorpha* *in vitro*

Die artifizielle *in vitro* Herstellung von Hsp70-Peptid-Komplexen wurde für die Entwicklung von potentiellen Krebsimpfstoffen genutzt und wird zurzeit klinisch mit dem E7 Protein des humanen Papilloma Virus getestet (Wang *et al.*, 2006). Nachdem an mehreren Beispielen und mit verschiedenen Methoden eine Interaktion zwischen Hsp70 und ORF313-DnaJ-Fusionsproteinen *in vivo* gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob eine solche Komplexbildung auch *in vitro* stattfindet. Diesbezügliche Studien wurden bereits für Hsp73 und T₂₋₇₇-DnaJ-Fusionsproteine durchgeführt – wobei aber keine Hinweise für eine Interaktion *in vitro* gefunden wurden (R.

Schirmbeck, pers. Mitteilung). Da sich das an *H. polymorpha* adaptierte System in manchen Details (z. B. ATP-Ablösungsverhalten, siehe Abb. 3.11) von dem Säugetiersystem unterscheidet, könnte sich auch die *in vitro* Assemblierung der Komponenten anders verhalten. Für das adaptierte System in *H. polymorpha* konnten über verschiedene *in vitro* Mischungsansätze von vorher aufgereinigten Komponenten in Kombination mit unterschiedlichen Testmethoden ebenfalls keine Interaktion *in vitro* von Hsp70 über die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313-Proteins mit dem Fusionsprotein nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.10 Analysen zur Interaktion von humanem Hsp73 mit dem ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP-Fusionsprotein in *H. polymorpha*

Wieland *et al.* (2008) zeigten, dass das Hsp73-Chaperon in HEK-Zellen mit dem Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP co-präzipitiert. Gleiches konnte in LMH Zellen (Hepatoma Zelllinie aus Huhn) für T₂₋₇₇-Fusionsproteine demonstriert werden (Schirmbeck *et al.*, 2003). Da eine Assoziation der *H. polymorpha* Hsp70-Chaperone mit dem Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.2), wurde im Folgenden getestet, ob heterolog exprimiertes Hsp73 aus *Homo sapiens* mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein in *H. polymorpha* interagiert. Die Primärsequenz von humanem Hsp73 zeigt 97% Identität mit Hsp73 aus Hühnerzellen, aber nur moderate Homologien (75% bzw. 76% Identität) zu Hsp70-1 und Hsp70-2 aus *H. polymorpha*. Es erschien daher möglich, dass die heterologe Co-Expression eines T₂₋₇₇-Fusionsproteins und humanem Hsp73 in *H. polymorpha* zu der bisher nur in Säugetierzellen beobachteten *in vivo* Interaktion führt.

Das humane *HSP73-ORF* wurde aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pCMV6-XL5-Hsp73 (ORIGENE) entnommen, ein C-terminaler His-Tag angefügt und in den *H. polymorpha* Expressionsvektor pFPMT121 inseriert (siehe Methoden Tab. 2.1). Außerdem wurde das *Xba*I/*Bam*HI Fragment (1,947 kB) des PCR-Produktes Hsp73-H6 auf den Vektor pFPMT-LEU2 übertragen. Für Details der Konstruktionen siehe Tabelle 2.1. Die anschließende Stammgenerierung wurde wie unter 2.8 beschrieben durchgeführt. Produkt-positive Stämme wurden mittels Western-Blot-Analyse in Kombination mit einem His-Tag spezifischen Antikörper identifiziert (Daten nicht gezeigt). Ein positiver Stamm wurde ausgewählt und mit dem Plasmid pFPMT-ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP supertransformiert.

Tatsächlich konnte jetzt in *H. polymorpha* eine Interaktion von humanem Hsp73-H6 mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein beobachtet werden (Abb.3.14). Die Interaktion wurde mit Hilfe einer Immunpräzipitation gezeigt. Dafür wurde die lösliche Fraktion des Zelllysates in Kombination mit den GFP- und His-Tag-spezifischen Antikörpern eingesetzt. Der GFP-Antikörper erkennt das Fusionsprotein direkt, während der His Tag-spezifische Antikörper das Hsp73-H6-Chaperon erkennt. In beiden Fällen konnte die Co-Präzipitation des jeweils anderen Proteins immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 3.14 C und D). Die Interaktion der beiden Proteine muss spezifisch sein, da keine Kreuzreaktionen mit dem Anti-H6 Antikörper mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein stattfindet (siehe Abb. 3.14 B). Dies beweist die Assoziation von Hsp73-H6 mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein in *H. polymorpha* - das Säugetiersystem konnte mit diesem Ansatz auf *H. polymorpha* übertragen werden.

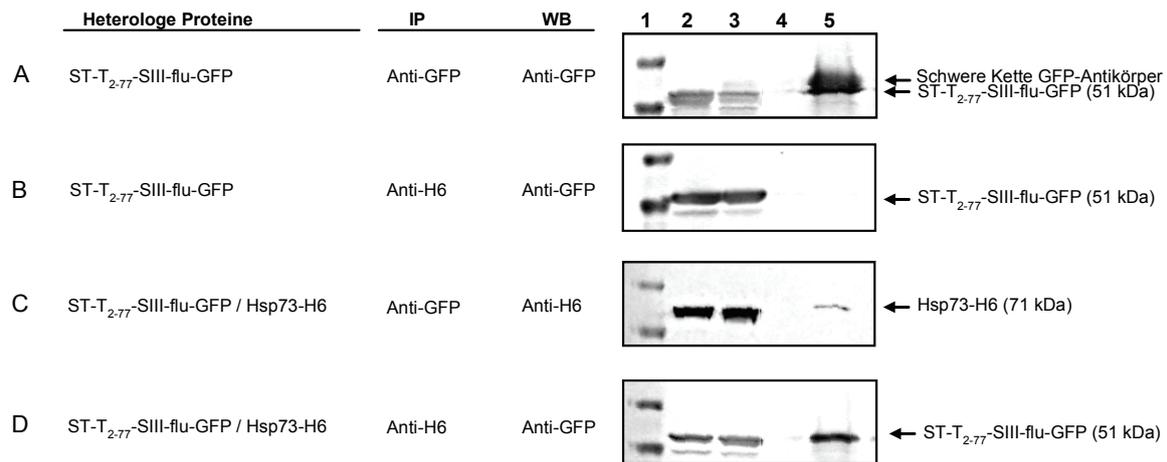


Abbildung 3.14

Immunpräzipitation von humanem Hsp73 und ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP-Fusionsprotein in *H. polymorpha*

Die Immunpräzipitation erfolgte mit den Stämmen: pFPMT-ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP / RB11 #5 und pFPMT-ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP / pFPMT-LEU2-Hsp73-H6 / HP102 #1-1 (siehe Methoden 2.26.1). Dafür wurden löslichen Fraktion mit den Antikörpern Anti-GFP (Invitrogen) oder Anti-H6 versetzt. Schlüsselfraktionen wurden in einem 4-20% Polyacrylamidgel unter denaturierenden/reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mittels Semidry-Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die immunologische Auswertung erfolgte mit den Antikörpern Anti-GFP (Invitrogen) in Kombination mit dem Kit „Western Breeze – Rabbit“ (Invitrogen) und Anti-H6 in Kombination mit dem Kit „Western Breeze – Mouse“ (Invitrogen). IP: Immunpräzipitation; WB: Western-Blot.

Beladungsschema für A-D:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained

Spur 2: lösliche Fraktion

Spur 3: nach Inkubation mit Antikörper

Spur 4: Waschfraktion mit 1xPBS

Spur 5: Elutionsfraktion

3.11 Analysen zum Einfluss der Hsp70-Interaktion auf die Stabilität von DnaJ-Fusionsproteinen in *H. polymorpha*

Wieland *et al.* (2008) konnten zeigen, dass Protease-sensitive Proteine in Säugerzellen stabil exprimiert werden konnten, wenn sie als T₂₋₇₇-Fusionsprotein vorliegen und *in vivo* mit Hsp73 interagieren. Diese Interaktion bewirkt in diesem System anscheinend Schutz vor Proteolyse (Patentanmeldung: Method for the production of (poly)peptides. EP98950105.1). Dieser Befund wurde weiter untermauert, indem der Schutz bzw. die Stabilität ausbleibt, wenn die Zielproteine mit der Hsp73-Interaktions-inkompetenten T₁₋₆₀-Domäne fusioniert wurden (Schirmbeck *et al.*, 2003, Wieland *et al.*, 2008).

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass Interaktionen zwischen Hsp70-Proteinen und DnaJ-Domänen-Fusionsproteinen auch in *H. polymorpha* etabliert werden konnten. Die Interaktionspartner waren hier die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313-Proteins und Hsp70-1 und /oder Hsp70-2. Es sollte nun überprüft werden, ob über diese Interaktion die Expression ansonsten in *H. polymorpha* Proteolyse-sensitiver Proteine stabilisiert werden kann.

Für diese Versuche wurden drei aus vorangegangenen Expressionsstudien von der Firma Rhein Biotech GmbH als „schwierig“ exprimierbar eingestufte Zielproteine ausgewählt: Das E-Antigen des Hepatitis B-Virus, sowie zwei weitere Fusionsproteine, bestehend aus vielen durch Protease-

Erkennungssequenzen voneinander getrennten Epitopen eines anderen humanpathogenen Virus (M. Suckow, pers. Mitteilung).

Es wurden neun Expressionsplasmide konstruiert, die die drei zu testenden Leseraster jeweils als ST-X, ST-ORF313-X und ST-T₂₋₇₇-X Fusionsgen enthalten. Abb. 3.15 zeigt die schematische Darstellung der von diesen Plasmiden kodierten Fusionsproteine. Die Plasmidkonstruktionen sind im Detail in Material & Methoden in Tabelle 2.1 aufgezeigt.

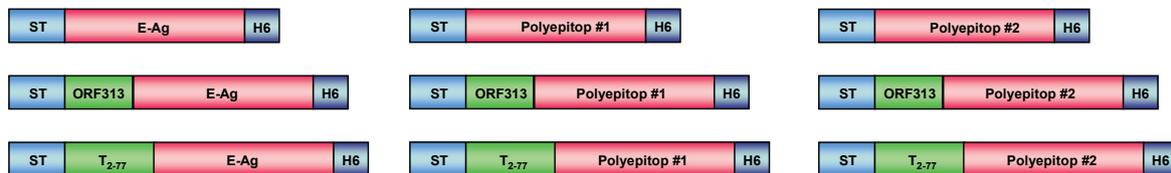


Abbildung 3.15

Schematische Darstellung der verschiedenen Fusionsproteine mit unterschiedlichen Zielgenen und den DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* (ORF313) und SV40 (T₂₋₇₇). ST = Strep-Tag, ORF313 = DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313-Proteins aus *H. polymorpha*; T₂₋₇₇ = DnaJ-ähnliche Domäne des T-Ags aus SV40; H6 = His-Tag; E-Ag = E-Antigen des Hepatitis B-Virus; Polyepitop #1 und #2 = Polyepitope aus einem humanpathogenen Virus.

HP102-Stämme, die Hsp70-1-H6, Hsp70-2-H6 oder humanes Hsp73-H6 überexprimieren, wurden jeweils mit den neun Expressionsplasmiden transformiert und entsprechende Produkt-positive und doppeltpositive Stämme wurden für die verschiedenen Kombinationen mittels SDS-PAGE/Western-Blot der löslichen intrazellulären Fraktionen identifiziert. Für jede Kombination, für die ein Produkt-positiver Stamm identifiziert werden konnte, wurde ein Stamm für weitere Analysen ausgewählt.

Alle Teststämme wurden nun Methanol-Induktionen unterzogen und die Fusionsproteine entweder direkt mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert oder zuvor mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose, wie unter 2.23 beschrieben, angereichert. Die Schlüsselfraktionen aller Durchgänge wurden anschließend mit His-Tag-, Strep-Tag- und (wenn vorhanden) Zielprotein-spezifischen Antikörpern analysiert. In Tabelle 3.2 sind die Expressionen der getesteten EAg-Stämme dargestellt. Abb. 3.16 zeigt die Ergebnisse beispielhaft für ST-ORF313-EAg in den Stämmen, die Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 überexprimieren. Die anderen Rohdatensätze sind nicht detailliert aufgeführt – die Ergebnisse werden zusammenfassend beschrieben.

Tabelle 3.2: Expression von EAg-Fusionsproteinen in verschiedenen *H. polymorpha* HP102 Stammhintergründen.

Fusionsprotein	HP102 Stammhintergrund		
	ST-EAg	ST-ORF313-EAg	ST-T ₂₋₇₇ -EAg
Endog. Hsp70-1/Hsp70-2	-	+	+
+ heterol. expr. Hsp70-1-H6	-	+	+
+ heterol. expr. Hsp70-2-H6	-	+	+

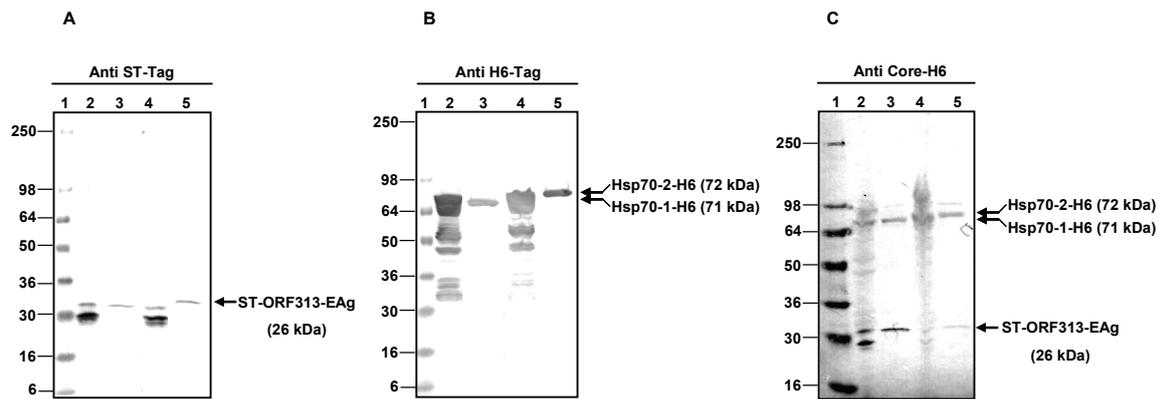


Abbildung 3.16

Anreicherung von EAg-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose.

Die Stämme pFPMT-ST-ORF313-EAg/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-12 und pFPMT-ST-ORF313-EAg/pFPMT-LEU2-Hsp70-2-H6/HP102 #3-10 wurden einer Methanol-Induktion unterzogen und die intrazellulären löslichen Fraktionen präpariert. Aus den löslichen Fraktionen wurden die EAg-Fusionsproteine über Streptactin-Sepharose aufgereinigt. Schlüsselfraktionen wurden in einem 4-20% SDS-Gel aufgetrennt und immunologisch mit den (A) Strep-Tag- und (B) His-Tag-spezifischen Antikörpern in Kombination mit dem Kit „Western Breeze-Mouse“ und dem (C) Core-H6 spezifischen Antikörper [C124H6N] in Kombination mit dem Kit „Western Breeze-Rabbit“ ausgewertet.

Beladungsschema:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained

ST-ORF313-EAg/Hsp70-1-H6

Spur 2: lösliche Fraktion

Spur 3: Elutionsfraktion

ST-ORF313-EAg/Hsp70-2-H6

Spur 4: lösliche Fraktion

Spur 5: Elutionsfraktion

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz des DnaJ-Hsp70-Interaktionssystems im Fall der E-Ag-Fusionsproteine zu Produkt geführt hat. Wie in Abb.3.16 gezeigt, lässt sich das intakte ST-ORF313-EAg-Fusionsprotein exprimieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es im Komplex mit Hsp70-1-H6 und Hsp70-2-H6 vorliegt (Abb. 3.16 A-C Spuren 3 und 5). Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da mit dem EAg-Fusionsprotein ohne DnaJ-Domäne in keinem Stammhintergrund Produktbildung erfolgte (siehe Tabelle 3.2). Die Analyse der genomischen DNA von einem Teststamm mit Hsp70-2-H6-Hintergrund ergab, dass die Expressionskassette intakt vorliegt (siehe auch Kapitel 2.10.1). Dies zeigt, dass die Expressionskassette im Stamm integriert ist, jedoch das Fusionsprotein nicht vorliegt. Das Polyepitop #1, welches bisher mit keinem Ansatz zu Produkt geführt hat, konnte auch durch Fusionierung mit ST-ORF313- oder ST-T₂₋₇₇-Elementen in einem Hsp70-1-H6, Hsp70-2-H6 oder Hsp73-H6-Stammhintergrund nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für das Polyepitop #2 konnte sowohl ein Produkt detektiert werden, dass auf das vollständige Protein hinweist, sowie dessen Abbauprodukte (Daten nicht gezeigt). Mit diesem Ansatz konnte die Proteolyse von Polyepitop #2 ebenfalls nicht verhindert werden. Sowohl im konventionellen Expressionssystem als auch als ST-ORF313- oder ST-T₂₋₇₇-Fusionsprotein in Stammhintergründen mit erhöhter Hsp70-Genexpression wurde ein proteolytischer Schnitt in der Nähe des C-Terminus beobachtet (Daten nicht gezeigt, M. Suckow, pers. Mitteilung).

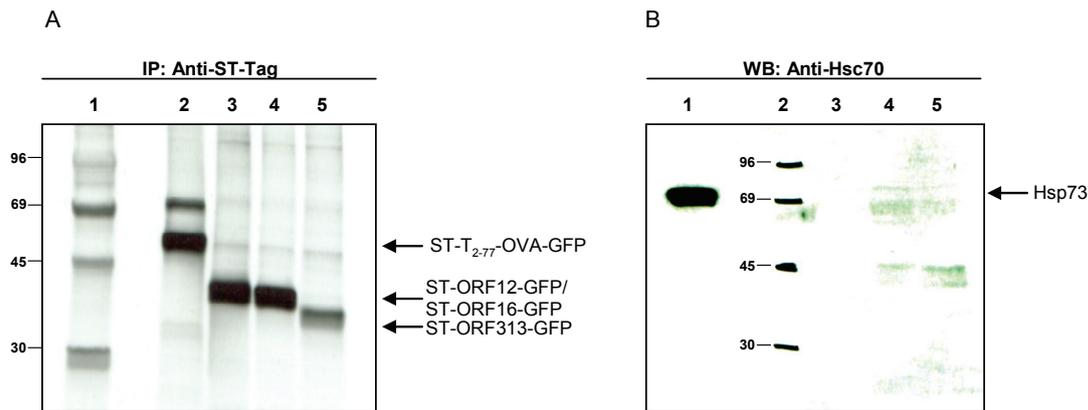
3.12 Analysen zur Assoziation von Hsp73 mit Fusionsproteinen mit DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* in Säugetierzellen *in vivo*

Das Hsp70-Chaperonsystem von *H. polymorpha* interagiert *in vivo* nicht mit Fusionsproteinen, die die DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ des T-Ags von SV40 enthalten, wie im Kapitel 3.1 demonstriert werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten Wieland *et al.* (2008), dass in Säugetierzellen (HEK293) Hsp73 mit DnaJ-ähnlichen Domänen unterschiedlichster Organismen, wie Bakterien und Pflanzen, interagieren kann. So wurden beispielsweise die Aminosäuren 15-75 des T-Ags von SV40 gegen eine DnaJ-Domäne von Hsp40-Proteinen aus *Chlamydia trachomatis* oder *Arabidopsis thaliana* ausgetauscht. Obwohl sich diese DnaJ-ähnlichen Domänen auf Aminosäureebene stark von der T₁₅₋₇₅-Sequenz unterscheiden, konnte für die chimären Proteine eine *in vivo* Interaktion mit Hsp73 gezeigt werden. Möglicherweise erkennt das Hsp73 aus Säugetierzellen ein breites, Spezies-übergreifendes Spektrum an DnaJ-ähnlichen Domänen, während die *H. polymorpha* Hsp70-Proteine nur an DnaJ-ähnliche Domänen aus homologen Proteinen binden.

Es stellte sich daher die Frage, ob GFP-Fusionsproteine über die DnaJ-ähnlichen Domänen der ORF12-, -16- und -313-Proteine mit Hsp73 in Säugetierzellen *in vivo* Komplexe bilden.

Für dieses Experiment wurden die Fusionsgene kodierend für die ST-ORF12-, -ORF16 und -ORF313-GFP Fusionsproteine in den Säugetiervektor pCneo überführt. Die Konstruktionen der Vektoren sind in Tabelle 2.1 detailliert beschrieben. Als Positivkontrolle wurde das Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP eingesetzt. Dieses setzt sich aus einem Strep-Tag (ST), der DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ aus SV40, Bereiches des Ovalbumin (OVA) und GFP zusammen.

Die im Folgenden beschriebenen Zellkulturversuche wurden in Co-Operation mit der Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck (Ulm) durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe der Ca₂PO₄ Methode mit der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert und 24 Stunden danach mit 100 µCi [³⁵S]-Methionin über Nacht markiert. Die Fusionsproteine wurden mittels eines Strep-Tag-spezifischen Antikörpers und Protein A-Sepharose präzipitiert, in einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Fluorographie visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 A dokumentiert. Alle Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert. Die Menge der Fusionsproteine ST-ORF12-GFP (A, Spur 3) und ST-ORF16-GFP (A, Spur 4) ist mit der der Positivkontrolle ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP vergleichbar, die von ST-ORF313-GFP (A, Spur 5) liegt deutlich niedriger. Schon durch fluorographische Detektion ist mit der Positivkontrolle eine weitere Bande bei 70 kDa zu beobachten, bei der es sich vermutlich um zuvor assoziierte Hsp73-Moleküle handelt. Bei den Fusionsproteinen mit DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* sind keine zusätzlichen prägnanten Banden zu sehen. Mit Hilfe einer Western-Blot Analyse wurden eventuelle mit den Fusionsproteinen co-präzipitierte Hsp73-Chaperone mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper analysiert (siehe Abbildung 3.17 B). Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigten, dass nur im Ansatz mit dem Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP (B, Spur 1) – nicht aber in den Proben der anderen Fusionsproteine (B; Spur 3, 4 und 5) Hsp73 Moleküle detektiert werden konnten. (Im Fall des ST-ORF16-Fusionsproteins konnte eine schwache Bande, die ungefähr mit Hsp73 co-migriert detektiert werden; die Intensität dieser Bande (Spur 4) liegt unter einem zehntel des mit dem Positivkontrollprotein beobachteten Signals (Spur 1)). Dies zeigt, dass Hsp73 nicht bzw. nur ineffizient mit den DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* interagiert - das *H. polymorpha* System scheint nicht auf humane Zelllinien übertragbar zu sein.

**Abbildung 3.17****Interaktion von Hsp73 mit verschiedenen DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha***

HEK293 Zellen wurden transient mit verschiedenen Konstrukten transfiziert, mit [³⁵S]-Methionin markiert, lysiert und mittels Immunpräzipitation fluorographisch und durch Western-Blot analysiert. Für die Western-Analyse wurden die Zellen vor der Lyse nicht radioaktiv markiert. Die für den Versuch verwendeten Vektoren waren: pCIneo-ST-ORF12-GFP, pCIneo-ST-ORF16-GFP, pCIneo-ST-ORF313-GFP und pCIneo-ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP. Die *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen waren ORF12, -16 und -313; als Positivkontrolle diente die T₂₋₇₇-Domäne des T-Ags aus SV40.

A: Immunpräzipitation der Fusionsproteine mit einem Streptactin-spezifischen Antikörper. Die Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und fluorographisch analysiert.

B: Immunpräzipitation der Fusionsproteine mit einem Streptactin-spezifischen Antikörper. Die Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper immunologisch ausgewertet.

Beladungsschema für A:

Spur 1: Marker

Spur 2: ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP

Spur 3: ST-ORF12-GFP

Spur 4: ST-ORF16-GFP

Spur 5: ST-ORF313-GFP

Beladungsschema für B:

Spur 1: ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP

Spur 2: Marker

Spur 3: ST-ORF12-GFP

Spur 4: ST-ORF16-GFP

Spur 5: ST-ORF313-GFP

3.13 Fermentation und Aufarbeitung verschiedener *H. polymorpha* HP102 Stämme zur Herstellung größerer Mengen an Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen

In mehreren Studien konnte eine Adjuvansfunktion von Hsp73 gezeigt werden, wenn dieses mit einem Fusionsprotein über die DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ assoziiert ist (Wieland *et al.*, 2008; Schirmbeck *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine eventuelle Adjuvansfunktion von *H. polymorpha* Hsp70-1 im Komplex mit dem Fusionsprotein ST-ORF313-GFP analysiert werden. Um die für Immunisierungsexperimente benötigte große Menge an Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen zu generieren, wurde der zuvor charakterisierte Produktionsstamm fermentiert und ausgewertet. Als Negativkontrolle für die Immunisierungsexperimente sollte das GFP-Protein ohne DnaJ-Domäne verwendet werden. Der das GFP-Protein exprimierende Stamm wurde auf Grund dessen ebenfalls fermentiert. Das GFP-Protein wurde im gleichen Hsp70-1-H6 Stammhintergrund exprimiert (GFP + Hsp70-1-H6; keine Komplexe). Material aus diesen Fermentationen wurde präparativ aufgearbeitet, Stabilitätsstudien unterzogen und schließlich für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt.

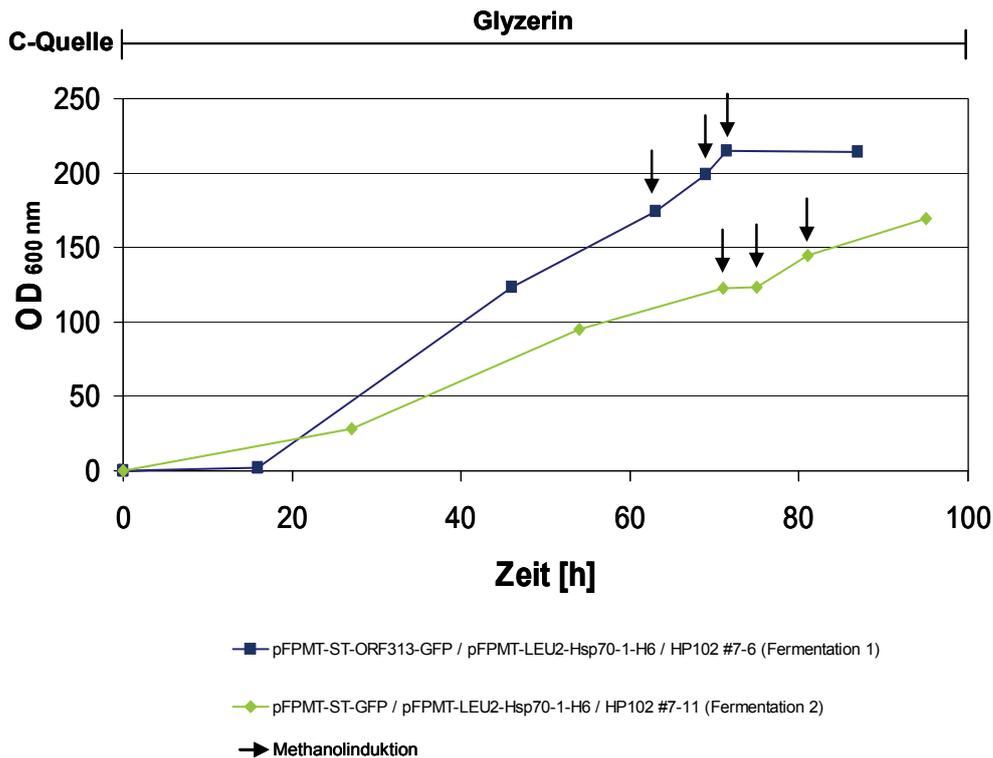
3.13.1 Biomasseverläufe der Fermentationen 1 und 2

Die Kurzbeschreibung der einzelnen Fermentationen ist in Tabelle 3.3 dargestellt, Abbildung 3.19 zeigt die Biomassebildung im Verlauf der Fermentation. Vor- und Nachbereitung sowie Durchführung sind im Kapitel 2.7.3.2 detailliert beschrieben.

Tabelle 3.3: Kurzbeschreibung der Fed-Batch Fermentationen 1 und 2

		Fermentation 1	Fermentation 2
Stamm		pFPMT-ST-ORF313-GFP/ pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-6	pFPMT-ST-GFP/ pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-11
Vorkultur (VK)	Medium Volumen Inokulum Inkubation OD _{600nm}	YPD 100 ml Einzelkolonie von YNB Glukose Platte 37°C; 160 rpm; 17 h 5,94	VK I: YPD 3 ml Einzelkolonie von YNB Glukose Platte 37°C; 160 rpm; ÜN 18,3 VK II: YPD 100 ml 0,05 ml von VK I 37°C; 160 rpm; 14 h 15,16
Hauptkultur (HK)	Medium Volumen Inokulum Inkubation Stellmedien Begasung Rührerdrehzahl pH Induktor pO ₂	Syn6 Glycerin (1,5%) 1,5 L 50,5 ml von VK OD _{600nm} = 0,25 37°C 13% NH ₃ ; 10% Struktol; 30% H ₃ PO ₄ 1L/min 450 rpm 4,8 Methanol 2x 1% MeOH = 2x 15 ml 1x 0,5% MeOH = 1x 7,5 ml Nicht reguliert	Syn6 Glycerin (1,5%) 1,5 L 10 ml von VK II OD _{600nm} = 0,3 37°C 13% NH ₃ ; 10% Struktol; 30% H ₃ PO ₄ 1L/min 450 rpm 4,8 Methanol 2x 1% MeOH = 2x 15 ml 1x 0,5% MeOH = 1x 7,5 ml Nicht reguliert
Feed	Medium Volumen	70% Glycerin 200 ml	70% Glycerin 200 ml
Fermentationsverlauf		0 h: Start Fermentation: Start OD _{600nm} = 0,25 21 h: Start Feed mit 70% Glycerin Flussrate 15% (=4,5 ml/h) 28 h: Reduzierung von Feed auf Flussrate 5% (=1,5 ml/h) <u>Start MeOH-Induktion</u> 53 h: Zugabe von 1% MeOH (15 ml) 62 h: Zugabe von 1% MeOH (15 ml) 87 h: Zugabe von 0,5% MeOH (7,5 ml)	0 h: Start Fermentation: Start OD _{600nm} = 0,3 8,5 h: Start Feed mit 70% Glycerin Flussrate 15% (=4,5 ml/h) 53,5 h: Reduzierung von Feed auf Flussrate 5% (=1,5 ml/h) <u>Start MeOH-Induktion</u> 70 h: Zugabe von 1% MeOH (15 ml) 81 h: Zugabe von 1% MeOH (15 ml) 95 h: Zugabe von 0,5% MeOH (7,5 ml)
Verbräuche	13% NH ₃ 30% H ₃ PO ₄ 10% Struktol	140 ml 37 ml 2 ml (Zugabe vor Start der Fermentation)	181 ml 0 ml 4 ml (Zugabe vor Start der Fermentation)
End OD_{600nm}		215	169,65

Fermentation 1 erfolgte über einen Zeitraum von 87 Stunden, während die Fermentation 2 über 95 Stunden gelaufen ist. Der Stamm in Fermentation 1 (Abb. 3.18, blau) wächst unter den gewählten Fermentationsbedingungen deutlich besser als der Stamm in Fermentation 2 (Abb. 3.18, grün). Ersterer zeigt ein stärker ausgeprägtes exponentielles Wachstum mit einem Plateau, welches bereits nach 71 Stunden erreicht wurde (OD_{600nm} von 215). Dagegen befand sich Stamm in Fermentation 2 nach 95 Stunden noch immer in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} = 169). Wahrscheinlich hätte eine länger andauernde Fermentation dieses Stammes zu einer höheren Biomasse geführt.

**Abbildung 3.18****Biomasseverläufe der Fed-Batch Fermentationen 1 und 2.**

Die *H. polymorpha* Stämme pFPMT-ST-ORF313-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-6 (Fermentation 1) und pFPMT-ST-GFP/pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7-11 (Fermentation 2) wurden in einem 2L Fermenter mit 1,5L Kulturvolumen in Kombination mit einer BIOSTAT B-Steuerung in synthetischem Medium Syn6 unter Fed-Batch Bedingungen fermentiert. Als Kohlenstoffquelle diente Glyzerin. Die Zellen wurden durch punktuelle Zugabe von Methanol (siehe Pfeile) induziert.

3.13.2 Produktbildungsverläufe der Fermentationen 1 und 2

Die Produktbildung wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Fermentationen analysiert. Zu diesem Zweck wurden aus Fermentationsproben die löslichen intrazellulären Fraktionen präpariert und mittels SDS-PAGE/Western-Blot untersucht. Hsp70-1-H6 wurde immunologisch mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper detektiert, die Fusionsproteine mit einem GFP-spezifischen Antikörper. Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse sind in Abbildungen 3.19 und 3.20 dargestellt.

Bei Fermentation 1 war Hsp70-1-H6 kurz nach Animpfen bereits deutlich sichtbar vorhanden (Abb. 3.19 Spur 2; Abb. 3.20 Spur 2) und die Konzentration stieg bereits während der Derepressionsphase auf ein hohes Niveau (Spuren 3 und 4). Eine anschließende Methanol-Induktion steigerte die Konzentration nur noch geringfügig (Spuren 5-7). Bei Fermentation 2 (Abb. 3.20) ist ebenfalls schon kurz nach Animpfen Hsp70-1-H6 in der Zelle exprimiert, allerdings blieb die Hsp70-1-H6 Menge während der Derepressionsphase auf geringem Niveau (Spur 3). Erst während der Methanol-Induktion stieg die Hsp70-1-H6 Menge deutlich und stetig bis zum Ende der Fermentation an (Spuren 4-6). Während sich die Hsp70-1-H6 Bildungsverläufe der Fermentationen 1 und 2 also deutlich unterschieden, ähnelten sich jene der Fusionsproteine sehr. In beiden Fermentationen zeigte sich wenig Produkt nach Animpfen und während der Glyzerin-Derepression (Abb. 3.19 Spuren 2-4 und Abb. 3.20 Spuren 2-3). Zudem setzte in beiden Fällen eine verstärkte Produktbildung während der Methanol-Induktion ein (Abb. 3.19 Spuren 5-7; Abb. 3.20 Spuren 4-6). Beide Fusionsproteine zeigten in den späten Proben einen verstärkten Abbau (Abb. 3.19; Abb. 3.20)

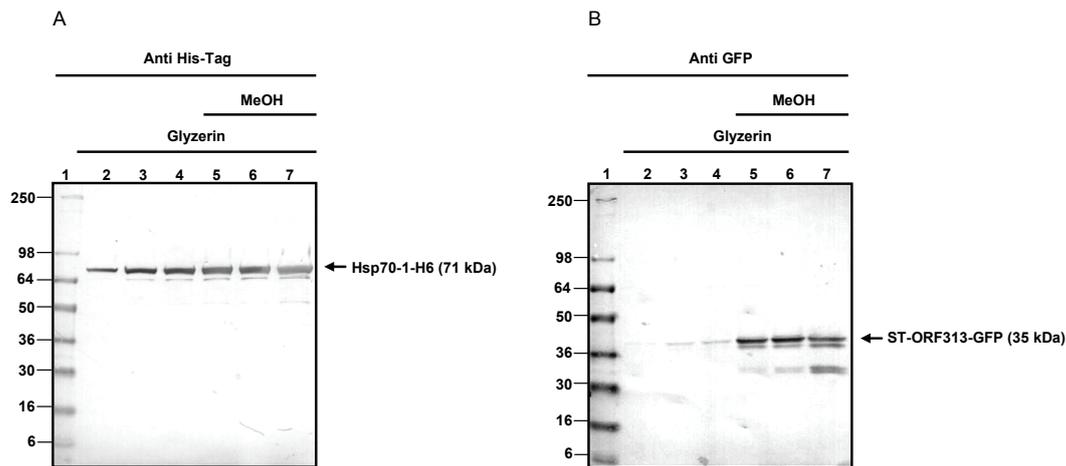


Abbildung 3.19
Produktbildungsverläufe von Fermentation 1.

Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden der Fermentation Proben entnommen und analysiert. Intrazelluläre lösliche Fraktionen wurden präpariert und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Zur Detektion des ST-ORF313-GFP-Fusionsproteins (welches mit Hsp70-1-H6 interagieren kann), wurde ein GFP-spezifischer Primärantikörper eingesetzt (B), die Detektion von Hsp70-1-H6 erfolgte mittels eines His Tag-spezifischen Antikörpers (A). Die weitere Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Western Breeze Kit (Invitrogen) „Mouse“ (A) oder „Rabbit“ (B).

Beladungsschema für A und B:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
Spur 2: 40 Std. nach Animpfen
Spur 3: 46 Std.
Spur 4: 63 Std.

Spur 5: 68 Std.
Spur 6: 71 Std.
Spur 7: 87 Std.

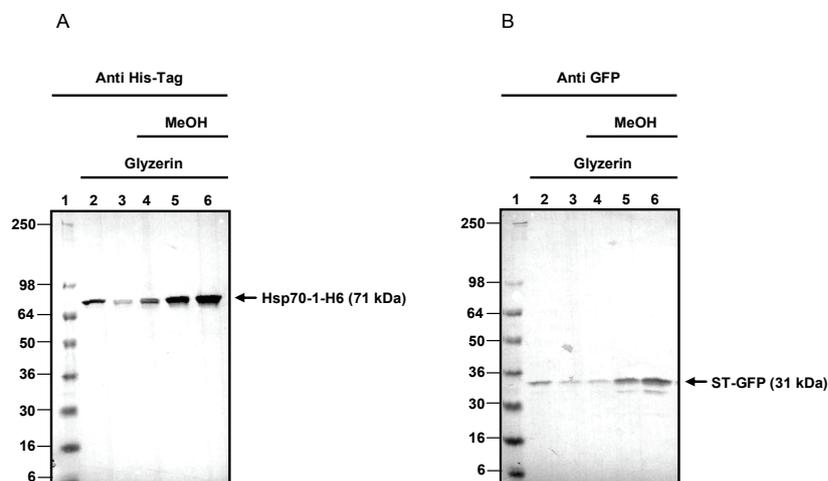


Abbildung 3.20
Produktbildungsverläufe von Fermentation 2.

Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden der Fermentation Proben entnommen und analysiert. Intrazelluläre lösliche Fraktionen wurden präpariert und mittels SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Zur Detektion des ST-GFP-Fusionsproteins (welches nicht mit Hsp70-1-H6 interagieren kann), wurde ein GFP-spezifischer Primärantikörper eingesetzt (B), die Detektion von Hsp70-1-H6 erfolgte mittels eines His Tag-spezifischen Antikörpers (A). Die weitere Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Western Breeze Kit (Invitrogen) „Mouse“ (A) oder „Rabbit“ (B).

Beladungsschema für A und B:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained
Spur 2: 0 Std. nach Animpfen
Spur 3: 71 Std.

Spur 4: 76 Std.
Spur 5: 79 Std.
Spur 6: 95 Std.

3.13.3 Aufarbeitung von Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen mittels Hochdruckhomogenisation und Fraktionssammelsystem

Die Herstellung größerer Mengen an Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen erforderte nicht nur die Generierung einer hohen Biomasse sondern auch ein Upscale des Zellaufschlusses und der Aufreinigung. Für die Etablierung beider Aspekte wurde ein Teil des Materials von Fermentation 1 und 2 eingesetzt, das übrige Material wurde bei -80°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde der Hochdruckhomogenisator (APV) genutzt, wobei die Zellen durch Kavitation, unterstützt durch Pralldrücke und Scherkräfte, aufgeschlossen werden. Da das verwendete Volumen von 500 ml nur geringfügig das Standvolumen des APV-Gerätes überschritt, erfolgte der Aufschluss kontinuierlich und nicht wie bei der Rhein Biotech GmbH etablierten Methode, bei der die Zellen mit einer gewissen Anzahl an Zyklen aufgeschlossen werden. Der Zellaufschluss wurde durch Messen der Optischen Dichte verfolgt. Eine Verringerung der Optischen Dichte auf 1/3 des Ausgangswertes ergab, dass die eingesetzte Zellsuspension ausreichend aufgeschlossen war. Die anschließende Aufreinigung erfolgte über Streptactin-Superflow Matrix in Kombination mit dem Fraktionssammelsystems ÄKTA Prime Plus (für detaillierte Durchführung siehe 2.23.1.3). Die Elutionsfraktionen sind in Abbildung 3.21 dokumentiert. Es zeigte sich, dass das ST-GFP-Protein und die ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe mit dieser Methode aufreinigen lassen. Demnach hat weder die Aufschlussmethode noch die Aufreinigung mittels der anderen Matrix Auswirkungen auf die Interaktion von Hsp70-1-H6 und ORF313-Fusionsprotein. Das Verhältnis in dem Hsp70-1-H6 mit dem Fusionsprotein co-eluiert, ist allerdings nicht so optimal wie bei einer Aufreinigung mit Streptactin-Spin-Columns (siehe Abb. 3.21, Spur 4). Eine anschließende Aufkonzentrierung der Proben mit Hilfe von Amicon-Ultra 30 Konzentratoren hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Stabilität der Einzelkomponenten (siehe Abb.3.21 spur 3 und 5).

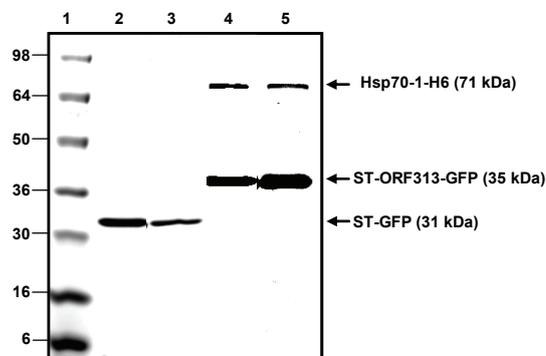


Abbildung 21

Aufreinigung von Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen mittels Streptactin-Superflow Matrix in Kombination mit dem Fraktionssammelsystems ÄKTA Prime Plus.

Für die Aufarbeitung der ST-GFP-Fusionsproteine und ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe wurde Material der Fermentation 1 und 2 verwendet. Der Zellaufschluss (je 500 ml Zellsuspension) erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation, die anschließende Aufreinigung über Streptactin-Superflow Matrix wurde in Kombination mit dem Fraktionssammelsystems ÄKTA-Prime Plus bei einer Flussrate von 2 ml/min durchgeführt. Die Elution erfolgte durch Desthiobiotin. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend gepoolt und mit Hilfe von Amicon-Ultra 30 Konzentratoren aufkonzentriert.

Beladungsschema:

Spur 1: Marker SeeBlue PreStained

Spur 2: Elution ST-GFP

Spur 3: ST-GFP nach Aufkonzentrierung

Spur 4: Elutionsfraktion ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex

Spur 5: ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex nach Aufkonzentrierung

3.14 Untersuchungen zur Stabilität von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen aus *H. polymorpha*

Das in den Fermentationen 1 und 2 gewonnene Material sollte im Rahmen von Maus-Immunisierungsexperimenten bezüglich einer eventuellen Hsp70-abhängigen adjuvantiven Wirkung untersucht werden. Bereits bei Material, welches nur ein rekombinantes Protein enthält, spielt die Produktstabilität eine entscheidende Rolle für Lagerung und Handhabbarkeit. Im Fall der Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe ist Lagerung und Handhabbarkeit jedoch noch wesentlich komplizierter: Hier müssen nicht nur die beiden Proteine stabil vorliegen sondern auch ihr Komplex – nur dann entfaltet sich, wie für das Hsp73-System gezeigt, eine Hsp70-spezifische adjuvante Wirkung (Wieland *et al.*, 2008).

In den Kapiteln 3.13.1 und 3.13.2 wurden die Proben der Fermentation 1 und 2 bezüglich Biomasse- und Produktbildung analysiert, während die geerntete Gesamtzellmasse aliquotiert bei -80°C gelagert wurde. Bevor nun diese Zellmasse zur Produktreinigung und anschließend für Immunisierungsexperimente eingesetzt werden konnte, musste zunächst in Vorexperimenten analysiert werden, unter welchen Bedingungen die Hsp70/Fusionsprotein-Komplexe soweit stabilisiert vorliegen, dass ein Immunisierungsexperiment durchgeführt werden kann.

3.14.1 Stabilität von ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in Abhängigkeit von pH und Temperatur

Aus den bisherigen Studien ging hervor, dass die aus *H. polymorpha* präparierten Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe in Standard-Aufschlusspuffer und dem für die Affinitätschromatographie über Streptactin-Sepharose verwendeten Elutionspuffer zumindest nach kurzzeitiger Lagerung keinen nennenswerten Abbau bzw. Komplexzerfall zeigten. Somit erschien dieser Puffer mit einem pH von 8,0 für eine Aufarbeitung und kurzzeitige Lagerung der Proteinkomplexe geeignet. In einer Stabilitätsstudie sollte daher zunächst der Einfluss von Temperatur und pH auf die Produktkonsistenz untersucht werden. Im ersten Experiment wurde die Stabilität der Komponenten in einem pH-Bereich zwischen 6 und 8 untersucht. In keinem Fall wurden Protease-Inhibitoren hinzugegeben. Dazu wurden die Eluate, bei denen die Proteinkomplexe im Standard-Elutionspuffer (pH 8,0) vorlagen, in Puffer mit den pH-Werten 6, 6,5, 7 und 7,5 überführt, wobei die Salzzusammensetzungen nicht verändert wurden. Aliquots dieser Proben wurden bei 4°C und bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Zu Beginn des Versuchs sowie nach 48 Stunden und 96 Stunden wurden Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Abb. 3.22 zeigt das Coomassie-Brilliant-Blue gefärbte Gel.

Hsp70-1-H6 und das ORF313-Fusionsprotein verhalten sich bezüglich ihrer pH- und Temperaturstabilität in den gewählten Testpuffern höchst unterschiedlich. Hsp70-1-H6 zeigt bei 4°C bei allen pH-Werten Stabilität. Instabilität wird erst bei RT offenbar – hier zeigt sich bei den beiden niedrigsten pH-Werten (pH 6,0 und pH 6,5) nach 48 und 96 Stunden Lagerung eine gegenüber der Ausgangsprobe (Spur 1) verringerte Hsp70-1-H6 Menge. Diese Verringerung deutet auf pH-abhängige Degradation hin. Für Hsp70-1-H6 erscheinen daher die höheren pH-Werte optimal. Das Fusionsprotein zeigte sich insgesamt wesentlich empfindlicher als Hsp70-1-H6. Auch bei ihm steigt die Stabilität mit dem pH, und Abbau wird durch höhere Temperaturen (hier RT) begünstigt. Bei 4°C zeigt sich tolerierbare Stabilität (wenig Abbauprodukte) ab einem pH von 7,5; bei RT erfolgt bei diesem pH noch starke Degradation. Eine Stabilität des Fusionsproteins bei RT zeigt sich erst bei pH 8,0 (Abb. 3.22). Somit ergibt sich für die Lagerung von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen im Standard-Elutionspuffer ein pH von 8 als optimal. In diesem Puffer können die Proben für mindestens 96 Stunden ohne nennenswerte Degradierung bei 4°C aufbewahrt werden.

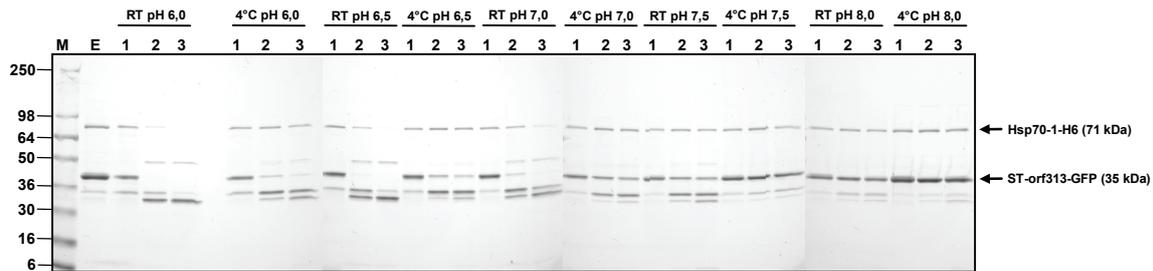


Abbildung 3.22

Stabilität von ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in Elutionspuffer in Abhängigkeit von pH und Temperatur.

Ein Aliquot der finalen Zellernte von Fermentation 1 (ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe) wurde mittels Glasperlen aufgeschlossen, und die lösliche intrazelluläre Fraktion präpariert. Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe wurden über Affinitätschromatographie mittels Streptactin-Sepharose aufgereinigt. Das Eluat (pH 8,0) wurde aufgeteilt und die verschiedenen Aliquots wurden auf pH-Werte von 6,0, 6,5, 7,0 und 7,5 so justiert, dass die Salzkonzentration nicht verändert wurde. Die Proben wurden bei 4°C oder RT gelagert. Zu Beginn des Versuchs sowie nach 48 Std. und 96 Std. wurden Aliquots entnommen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE auf einem 4-20% Tris/Glyzin Gel mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blue Färbung. Die Pfeile geben Positionen von intaktem Hsp70-1-H6 und Fusionsprotein an. Über dem Gel ist der pH Wert sowie die Lagerungstemperatur vermerkt.

Beladungsschema:

M: Marker SeeBlue PreStained

E: Elutionsfraktion vor Start des Lagerungsexperimentes in Elutionspuffer pH 8,0

Spuren 1-3: Aliquots nach 0, 48 und 96 Std. Lagerung unter den jeweiligen angegebenen Bedingungen

3.14.2 Stabilität von ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in PBS pH 7,4 in Abhängigkeit von der Zeit

Für das geplante Immunisierungsexperiment waren zwei Immunisierungen in einem zeitlichen Abstand von vier Wochen vorgegeben. Des Weiteren sollten die Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe in dem für Injektionen bevorzugten Puffer PBS appliziert werden, um Verträglichkeit zu gewährleisten. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob und wie lange Hsp70-1-H6 und das ST-ORF313-GFP-Fusionsprotein in PBS pH 7,4 stabil vorliegen – für das geplante Immunisierungsexperiment sollte die Stabilität mindestens vier Wochen betragen.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde ein Aliquot der finalen Zellernte von Fermentation 1 mit dem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Die intrazelluläre lösliche Fraktion wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie über Streptactin-Superflow Matrix aufgearbeitet, unter Standardbedingungen (pH 8,0) eluiert und anschließend mit Hilfe von Amicon-Ultra 30 Konzentratoren aufkonzentriert. Eine Hälfte des Eluats wurde in Elutionspuffer pH 8,0 bei 4°C – der als optimal ermittelten pH-Bedingung – gelagert. Die andere Hälfte wurde über Dialyse auf 1xPBS pH 7,4 Bedingungen eingestellt. Letztere Probe befand sich also in dem typischerweise für Immunisierungsexperimente eingesetzten Puffer. Als Kontrolle dienten die Proteine ST-GFP und Hsp70-1-H6, welche ebenfalls im Immunisierungsexperiment eingesetzt werden sollten. Diese wurden ebenso gelagert und umgepuffert wie die ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe.

Abb. 3.23 zeigt die Ergebnisse. In dem Vorexperiment als optimal identifizierten Lagerungspuffer (Standard-Elutionspuffer, pH 8,0) zeigen weder die Fusionsproteine ST-ORF313-GFP und ST-GFP noch Hsp70-1-H6 zu irgendeinem Zeitpunkt Degradation (Abb. 3.23 A). In PBS pH 7,4 liegen Hsp70-1-H6 und ST-GFP stabil vor, jedoch zeigt das ORF313-Fusionsprotein bereits nach einem Tag sichtbaren Abbau. Die Degradation dieses Fusionsproteins schreitet über den Testzeitraum von vier Wochen immer weiter fort, bis ca. 50% des Fusionsproteins abgebaut sind. Für die praktische Durchführung des Immunisierungsexperimentes bedeutet dies, dass die Proben bis zu ihrem Einsatz

in dem optimierten Elutionspuffer gelagert werden können. Die Umpufferung der Proben in 1xPBS pH 7,4 sollte erst unmittelbar vor der Injektion in die Mäuse stattfinden.

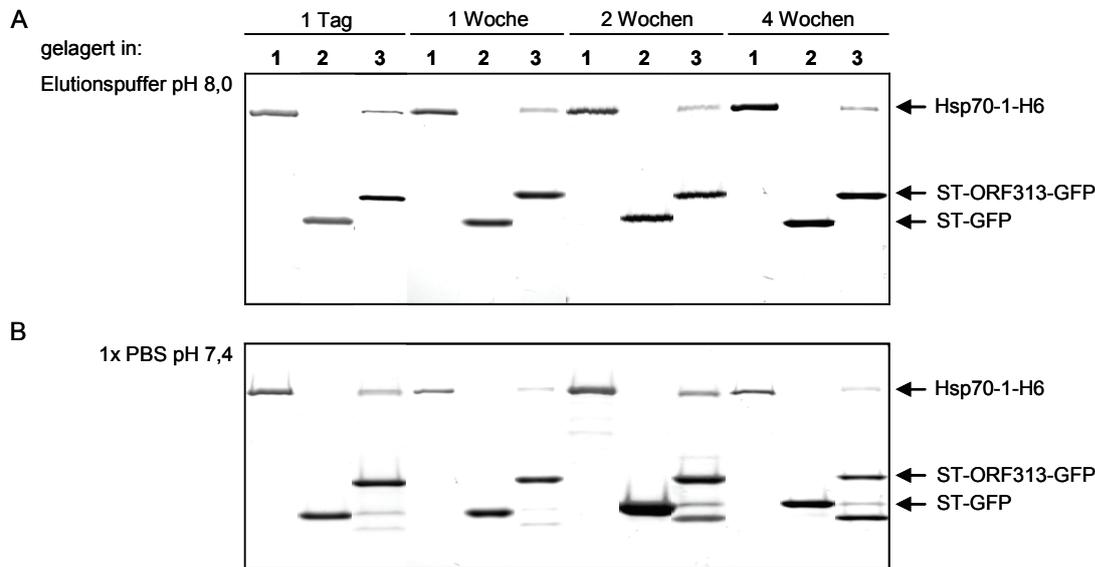


Abbildung 3.23

Stabilität von ST-GFP, ST-ORF313-GFP und Hsp70-1-H6 in Elutionspuffer (pH 8,0) und PBS (pH 7,4) in Abhängigkeit von der Zeit.

Ein Aliquot der finalen Zellernte von Fermentation 1 (ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe) und Fermentation 2 (ST-GFP + Hsp70-1-H6; keine Komplexbildung) und einer 500 ml Kultivierung von pFPMT-LEU2-Hsp70-1-H6/HP102 #7 (Hsp70-1-H6) wurde mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen, und die lösliche intrazelluläre Fraktion präpariert. Fusionsprotein bzw. Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe wurden über Affinitätschromatographie mittels Streptactin-Superflow Matrix aufgereinigt, Hsp70-1-H6 wurde über Ni-NTA-Agarose angereichert. Die Eluate wurden aufgeteilt und die verschiedenen Aliquots wurden über Dialyse in PBS pH 7,4 umpufferung. Die Proben wurden bei 4°C gelagert. Aliquots wurden zu Beginn des Versuchs nach einem Tag, einer Woche, zwei Wochen und vier Wochen entnommen. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE auf einem 4-20% Tris/Glyzin Gel mit anschließender Coomassie-Brilliant-Blue Färbung. Die Pfeile geben Positionen von intaktem Hsp70-1-H6 und Fusionsprotein an. Über dem Gel ist die Lagerungszeit vermerkt, links die Pufferbedingung.

Beladungsschema für A und B:

Spur 1: Hsp70-1-H6

Spur 2: ST-GFP

Spur 3: ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex

3.14.3 Analysen zur Stabilität der Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe

Die vorangegangenen Stabilitätsstudien lassen Rückschlüsse auf die Stabilität der einzelnen Komponenten der Proteinkomplexe zu. Dies sagt jedoch nichts darüber aus, ob auch die Komplexe nach der Dialyse in 1xPBS pH 7,4 noch intakt vorliegen. Anhand von Studien der Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck mit Hsp73/Antigen-Komplexen konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation von Hsp73 mit dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein für eine Verbesserung der CTL-Antwort essentiell ist (Wieland *et al.*, 2008). Somit ist die Integrität der Komplexe auch für die Untersuchung der Adjuvansfunktion von Hsp70 aus *H. polymorpha* ein kritischer Faktor. Es wurden zwei Versuche zur Komplexstabilität durchgeführt. Zum einen wurden Proben aus dem Vergleich von Elutionspuffer, pH 8,0 und PBS, pH 7,4 (siehe Abb. 3.24) mittels Immunpräzipitation analysiert. Zum anderen wurden Hsp70-1-H6, ST-GFP sowie ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe, die zuvor bei 4°C entweder für zwei Wochen in PBS pH 7,4 oder fünf Wochen in Elutionspuffer gelagert worden waren, mittels nativer Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 3.25).

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation sind in Abb. 3.24 gezeigt. Native Proben aus dem Startbereich des im Kapitel 3.14.2 beschriebenen Lagerungsexperimentes wurden vor bzw. nach der Justierung auf PBS pH 7,4 mittels Dialyse mit Hilfe eines His-Tag-spezifischen Antikörpers präzipitiert (für detaillierte Durchführung siehe auch 2.26.1). Dieser Antikörper präzipitiert Hsp70-1-H6 sowie Proteinkomplexe, in denen dieses Protein enthalten ist. Die Proben wurden anschließend über SDS-PAGE/Western-Blot analysiert. Es wurden Proben des für die Immunpräzipitation eingesetzten Materials sowie der letzte Waschschrift und die Elutionsfraktion aufgetragen. Im Falle des Negativkontrollproteins ST-GFP (ohne ORF313-DnaJ-Domäne) führte eine Immunpräzipitation mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper, wie erwartet, weder vor noch nach der Dialyse zu keiner Präzipitation des Fusionsproteins. Dies zeigt, dass keine unspezifische Interaktion des Antikörpers mit dem Fusionsprotein stattfindet. Dagegen wird in den Proben mit Hsp70-1-H6/ST-ORF313-GFP nach der Immunpräzipitation von Hsp70-1-H6 das ORF313-Fusionsprotein co-präzipitiert – ein klarer Beweis für Komplexbildung. Die Komplexe überstehen folglich die Prozedur der Aufreinigung über Streptactin-Superflow Matrix in Kombination mit dem Fraktionssammelsystem und eine Aufkonzentrierung mittels Amicon-Konzentratoren. Die Menge an co-präzipitiertem ST-ORF313-GFP-Fusionsprotein ist vor und nach der Dialyse vergleichbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Komplexe während der Umpufferung in PBS pH 7,4 nicht zerfallen. Das Umpufferungsverfahren mittels Dialyse wirkt sich auf die Assoziation der Proteine nicht negativ aus und kann somit für einen Pufferaustausch verwendet werden. Eine kurzfristige Lagerung der Proteinkomplexe in PBS pH 7,4 hat keinen Einfluss auf die Stabilität der Komplexe. Somit dürfte die oben angesprochene Strategie (Lagerung der Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe in Elutionspuffer pH 8,0 / Umpufferung in PBS pH 7,4 erst kurz vor Injektion in die Mäuse) einsetzbar sein.

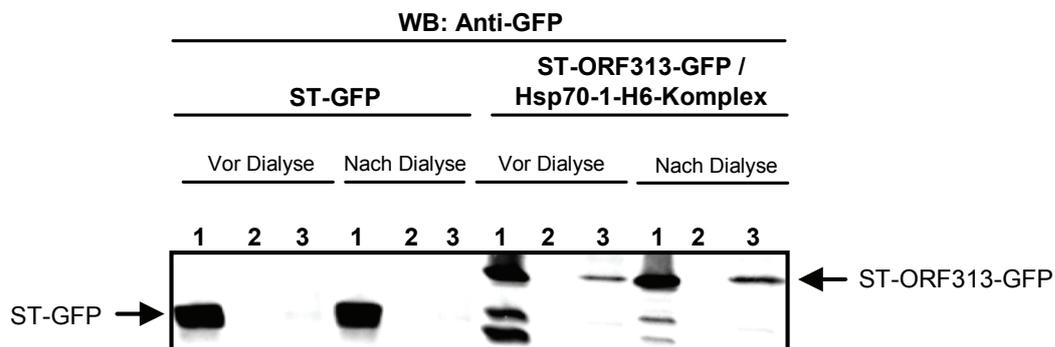


Abbildung 3.24

Analyse von ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen vor und nach Umpufferung in PBS pH 7,4 durch Immunpräzipitation (IP) der Hsp70-Komponente

Ein Aliquot der finalen Zellernte von Fermentation 1 (ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe) und als Negativkontrolle dienende Fermentation 2 (ST-GFP + Hsp70-1-H6; keine Komplexbildung) wurde mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen, und die lösliche intrazelluläre Fraktion präpariert. Fusionsprotein bzw. Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe wurden über Affinitätschromatographie mittels Streptactin-Superflow Matrix aufgereinigt. Die Eluate wurden aufgeteilt und über Dialyse in PBS pH 7,4 umpufferiert. Die Immunpräzipitation erfolgte mit einem His-Tag-spezifischen Antikörper, welcher die Hsp70-1-H6 Komponente erkennt. Nach SDS-PAGE auf einem 4-20% Tris/Glyzin-Gel und Semidry-Transfer der Bandenmuster auf Nitrozellulosemembran, erfolgte die Entwicklung des Western-Blots mittels eines GFP-spezifischen Antikörpers, welcher co-präzipitiertes Fusionsprotein detektiert. Der Antikörper wurde in Kombination mit dem Western Breeze Kit „Rabbit“ (Invitrogen) eingesetzt. Die Pfeile geben Positionen von intaktem Fusionsprotein an. Über dem Gel sind die verschiedenen Pufferbedingungen angezeigt: vor Dialyse (Elutionspuffer, pH 8,0); nach Dialyse (PBS, pH 7,4).

Beladungsschema:

Spur 1: Eluat der Streptactin Aufreinigung = eingesetztes Protein für IP

Spur 2: letzter Waschschrift der IP

Spur 3: Elutionsfraktion der IP

Wie oben bereits erwähnt, wurden Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe auch noch mit einer zweiten Methode analysiert – der nativen Gelelektrophorese (Abb. 3. 25). Für dieses Experiment wurden Proben ausgewählt, die schon längere Zeit bei 4°C gelagert worden waren. Dabei dienten ST-GFP (Negativkontroll-Fusionsprotein; keine Komplexbildung), Hsp70-1-H6 sowie ST-ORF313-GFP/ Hsp70-1-H6-Komplexe als Testobjekte, die bei 4°C entweder für fünf Wochen in Elutionspuffer pH 8,0 (optimale Lagerungsbedingung) oder für zwei Wochen in PBS pH 7,4 (Puffer für Immunisierungsexperiment) gelagert wurden. Es wurden Bereiche für beide Lagerungsbedingungen detektiert, die mit beiden Antikörpern angezeigt werden. Die Signale sind bei den Proben nach fünfwöchiger Lagerung in Elutionspuffer pH 8,0 (Abb. 3.25 A, Spuren 3) wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den zweiwöchig in PBS pH 7,4 gelagerten Proben (Abb. 3.25 B, Spuren 3). Da der His-Tag-spezifische Antikörper Hsp70-1-H6, aber nicht das Fusionsprotein erkennt, und da der GFP-spezifische Antikörper das Fusionsprotein aber nicht Hsp70-1-H6 erkennt, zeigen Signale der beiden Antikörper auf gleicher Höhe Stellen im Gel an, in denen Hsp70-1-H6 und Fusionsprotein colokalisieren. Dies deutet darauf hin, dass diese doppelt-detektierten Bereiche Komplexe anzeigen. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass der verwendete Elutionspuffer pH 8,0 tatsächlich eine brauchbare Langzeitlagerungsbedingung darstellt. Zum anderen zeigt es, dass die native Gelelektrophorese alternativ oder zusätzlich zur Immunpräzipitation eingesetzt werden kann, um Stabilitäten von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen zu analysieren.

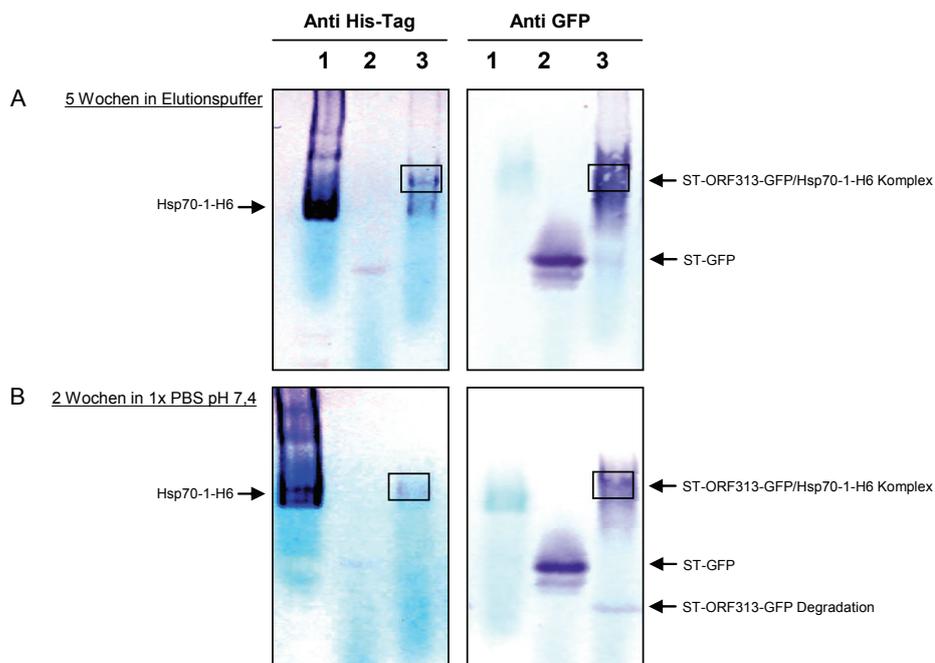


Abbildung 3.25

Analyse von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen mittels nativer Gelelektrophorese

Aufgereinigtes Hsp70-1-H6, ST-GFP oder ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe wurden bei 4°C für fünf Wochen in den jeweiligen Elutionspuffern gelagert (Fusionsprotein und Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplex in Elutionspuffer pH 8,0 des Streptactin-Reinigungsprotokolls; Hsp70-1-H6 in Elutionspuffer des Reinigungsprotokolls über Ni-NTA-Agarose) (A) oder für zwei Wochen in PBS pH 7,4 (B). Anschließend wurden Aliquots dieser Ansätze nativ unter nicht-reduzierenden Bedingungen über 4-20% Tris/Glyzin-Gele aufgetrennt. Nach Semidry-Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurden His-Tag- (Autoradiogramme links) oder GFP-spezifische Antikörper (Autoradiogramme rechts) in Kombination mit dem Western Breeze Kit „Mouse“ bzw. „Rabbit“ (Invitrogen) eingesetzt.

Beladungsschema für A und B:

Spur 1: Hsp70-1-H6

Spur 2: ST-PI2-GFP

Spur 3: ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex

3.15 Adjuvanswirkung von *H. polymorpha* Hsp70-1

In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass Hitzeschockproteine als Warnsignale für (Hitze)stress und Gewebeschäden fungieren und Immunantworten stimulieren können, indem sie Antigene den APCs (Antigen-präsentierende Zellen, Antigen Presenting Cells) - wie dendritische Zellen, Macrophagen und B-Zellen - zuführen und den MHC Klasse I und II Weg der Immunantwort einleiten (Wells & Malkovsky, 2000). Das am besten auf immunstimulatorische Eigenschaften untersuchte Hitzeschockprotein ist Hsp70. In unterschiedlichen Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass Hsp70 seine immunstimulatorischen Eigenschaften vornehmlich erst entfaltet wenn es im Komplex mit einem Peptid vorliegt, das dann als Antigen erkannt wird (Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997; Suto *et al.*, 1995). Bei der von Prof. R. Schirmbeck im Säugetiermodell verfolgten Strategie zeigt Hsp73 eine adjuvante Wirkung, wenn dieses mit einem als Antigen wirkenden Fusionsprotein über die DnaJ-ähnliche Domäne von T₂₋₇₇ assoziiert ist (Wieland *et al.*, 2008, Schirmbeck *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit soll nun der adjuvante Charakter von Hsp70-1 aus *H. polymorpha* im Komplex mit dem ORF313-Fusionsprotein analysiert werden.

Auf Grund der im Kapitel 3.14 beschriebenen Problematik der mangelnden Stabilität bei pH 7,4 der Einzelkomponenten und der Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe in dem für Injektionen im Rahmen eines Immunisierungsexperimentes bevorzugten Puffers PBS, war die Lösungsstrategie für den Versuchsablauf wie folgt: Die Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe (aus Fermentation 1) wurden zeitnah für das Immunisierungsexperiment mit Hilfe von Affinitätschromatographie über Streptactin-Superflow Matrix aufgereinigt. Die Eluate wurden aufkonzentriert (siehe 2.24.1), aliquotiert und in Elutionspuffer bei 4°C (= optimale Lagerungsbedingung) gelagert. Jeweils erst einen Tag vor der Immunisierung wurden die Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe über Dialyse (bei 4°C) in PBS pH 7,4 umgepuffert. Auf Grund der Stabilitätsdaten in PBS-Puffer (siehe Kapitel 3.14) war somit gewährleistet (siehe Abb. 3.26 blaue Linie), dass das Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 als Komplex vorliegen (siehe auch Abb. 3.24).

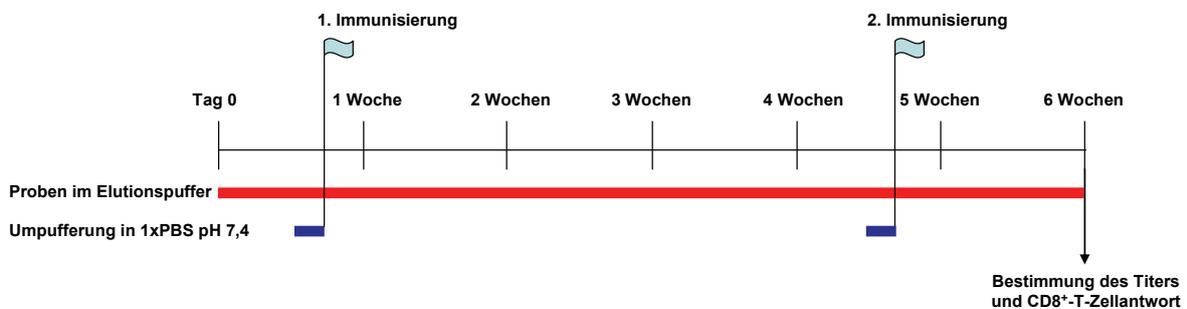


Abbildung 3.26

Schematische Darstellung des Versuchsablaufs des Immunisierungsexperimentes.

Die Proben wurden zeitnah über Affinitätschromatographie aufgearbeitet und im jeweiligen Elutionspuffer bei 4°C (optimaler Lagerbedingung) gelagert und jeweils einen Tag vor der 1. und 2. Immunisierung in 1xPBS pH 7,4 über Dialyse umgepuffert. Dies entspricht dem Zeitraum, in dem ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 im Komplex in PBS pH 7,4 vorliegen (siehe blaue Linie). Somit ist eine Applikation der Komplexe bei den jeweiligen Immunisierungen gewährleistet.

Da durch ATP keine 100%ige Ablösung von Hsp70-1-H6 vom Fusionsprotein erreicht werden konnte (siehe Kapitel 3.7), wurde das Fusionsprotein ST-GFP (ohne ORF313-DnaJ-Domäne; kein Komplex mit Hsp70-1) aus *H. polymorpha* (Fermentation 2) als Negativkontrollprotein eingesetzt. Das ST-GFP-Fusionsprotein wurde ebenfalls über Streptactin-Superflow Matrix aufgearbeitet. Zusätzlich wurde das Protein Hsp70-1-H6 (über Ni-NTA-Agarose isoliert) als Negativkontrolle eingesetzt. Die Lagerung und Umpufferung der beiden Proteine erfolgte wie für die Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe

beschrieben. Weitere Kontrollen waren Adeno/ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP (freundliche Gabe von R. Schirmbeck; Positivkontrolle), bei der eine Komplexierung des Fusionsproteins mit Hsp73 *in vivo* stattfindet, und PBS-Puffer. Bei Adeno/ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP handelt es sich um Adenoviren, die die Expressionskassette für das T₂₋₇₇-Fusionsprotein tragen. Adenoviren infizieren besonders gut Zellen und stimulieren, da sie nach Infektion intrazellulär vorliegen, CD8-T-Zellantworten.

Für die Immunisierung sollten Proteinkonzentrationen der Kontrollen (ST-GFP und Hsp70-1-H6 aus *H. polymorpha*) eingesetzt werden, die an das Konzentrationsverhältnis von ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexen angepasst sind. Dafür wurde das Verhältnis der aufgereinigten Einzelkomponenten ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 des Komplexes in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel mit Hilfe des Programms Phoretix densitometrisch ermittelt. Die Komplexe waren in einem 4:1 Verhältnis assoziiert. Das Immunisierungsschema mit den jeweils eingesetzten Konzentrationen ist in Tabelle 3.4 verzeichnet. Für das Experiment wurden die Mäuse jeweils mit 20 µg GFP-Fusionsprotein und 5 µg Hsp70-1-H6 immunisiert. Zusätzlich wurde in zwei Gruppen den Proben ST-GFP und ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex das Adjuvans AbISCO-100 (Isconova) zugesetzt, das sowohl CD8⁺-T-Zellantworten als auch Antikörperbildung stimulieren kann. Um eine Stimulation des Immunsystems durch bakterielle Endotoxinverunreinigungen auszuschließen, wurde der Endotoxingehalt der Proteinproben mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Assays bestimmt. Für alle Proben konnte ein Endotoxingehalt unterhalb der Detektionsgrenze (< 0,5 EU/ml bzw. <0,05 EU/ml) festgestellt werden.

Tabelle 3.4: Immunisierungsschema

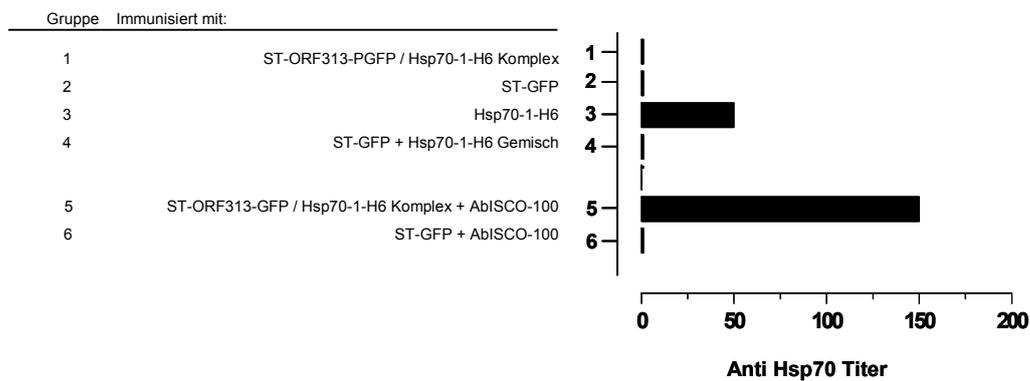
Gr.	Antigen	GFP-Fusionsprotein (µg)	Hsp70-1-H6 (µg)	AbISCO-100	Adenoviren	Anzahl der Tiere
1	ST-ORF313-GFP / Hsp70-1-H6 Komplex	20	5	-	-	3
2	ST-GFP	20	-	-	-	3
3	Hsp70-1-H6	-	5	-	-	2
4	ST-GFP + Hsp70-1-H6 Gemisch (kein Komplex)	20	5	-	-	3
5	ST-ORF313-GFP / Hsp70-1-H6 Komplex	20	5	+	-	3
6	ST-GFP	20	-	+	-	3
7	Adeno/ST-T ₂₋₇₇ -OVA-GFP	-	-	-	109	2
8	PBS	-	-	-	-	1

Die im Folgenden beschriebenen Immunisierungsexperimente wurden in Co-Operation mit der Arbeitsgruppe von R. Schirmbeck in Ulm durchgeführt. Für die Versuche wurden weibliche und männliche Tiere des Mausstammes BALB/c (H-2^d) mit den im Immunisierungsschema angegebenen Mengen an rekombinantem Protein in den *Tibialis anterior* Muskel immunisiert. Die zweite Immunisierung erfolgte nach 32 Tagen mit der gleichen Dosis des gleichen Impfstoffes. Zehn Tage nach der finalen Immunisierung wurde der Antikörpertiter von Hsp70 und GFP und die GFP⁺-Pentamer CD8⁺-T-Zellantwort determiniert.

3.15.1 Bestimmung der Antikörpertiter von Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen aus immunisierten Mäusen mittels ELISA

Der Antikörpertiter der Antigene Hsp70-1-H6 und GFP-Fusionsproteine in immunisierten Mäusen wurde mittels eines ELISAs bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.27 dokumentiert. Der Hsp70-Titer aller getesteten Proben zeigte nur einen sehr geringen Wert. Für Mäuse die mit Hsp70-1-H6 immunisiert wurden, konnte ein Titer von 50 gemessen werden (Abb. 3.27 A; Gruppe 3). In Anwesenheit des Adjuvans AbISCO-100 zeigte der Komplex einen auf 150 erhöhten Hsp70-Titer (Abb.27 3. A; Gruppe 5). Für den Komplex ohne AbISCO-100 sowie für das Hsp70-1-H6-Gemisch lag der Hsp70-Titer unter der Nachweisgrenze (Abb. 3.27 A; Gruppe 1). Dies zeigt, dass das Adjuvans AbISCO-100 die Antikörperbildung gegen Hsp70 fördert.

A



B

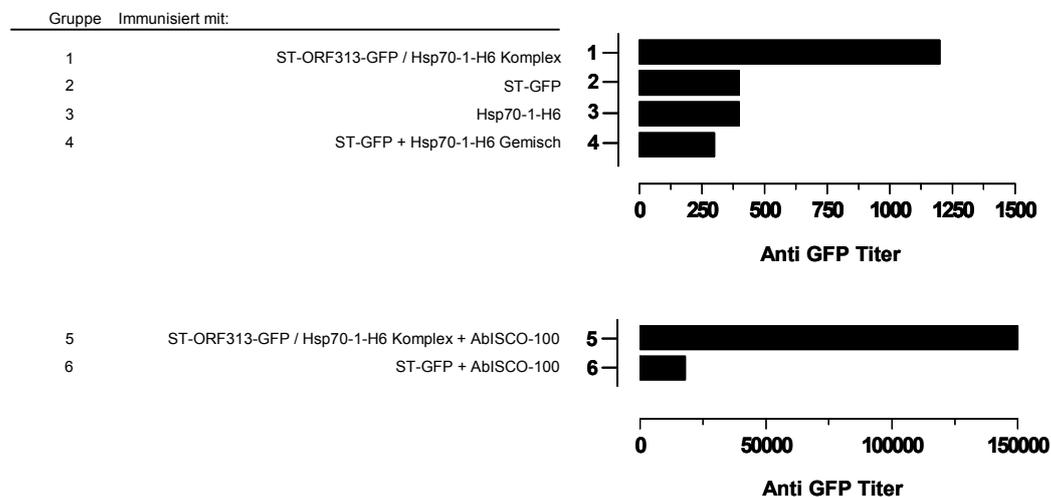


Abbildung 3.27

Messung der Hsp70- und GFP-Antikörpertiter mittels ELISA

BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden mit Antigenen (ST-GFP; Hsp70-1-H6), Antigen-Gemischen (ST-GFP + Hsp70-1-H6) und Antigen/Hsp70-Komplexen (ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex), die aus *H. polymorpha* gewonnen wurden, immunisiert. Dies erfolgte entweder mit oder ohne eines weiteren Adjuvans (AbISCO-100). Die zweite Immunisierung fand nach 32 Tagen mit der gleichen Dosis desselben Impfstoffes statt. 10 Tage nach der finalen Injektion wurde der Antikörpertiter gegen Hsp70 und GFP-Fusionsprotein mittels ELISAs und Einsatz von Hsp70-1-H6-Protein und GFP-Protein in Kombination mit HPR-konjugiertem Anti-Mouse Sekundärantikörper bestimmt. Für Details siehe Kapitel 2.28.1.

Eine Immunisierung mit Komplexen resultiert in einen 4-5fach höheren GFP-Titer (Abb.3.27 B, Gruppe 1) als für das nicht-komplexierte GFP-Antigen (Abb.3.27 B, Gruppe 2), dessen Titer als Background betrachtet werden kann. Bei einer gleichzeitigen Co-Immunisierung mit dem Adjuvans AbISCO-100 verstärkt sich der Effekt für den Komplex um über 130fach (Abb.3.27 B, Gruppe 5). Diese Zunahme der GFP-spezifischen Antikörperantwort durch Zugabe von AbISCO-100 ist zwar auch für das GFP-Protein (kein Komplex) zu beobachten (Abb.3.27 B, Gruppe 6), jedoch mit einer 60fachen Steigerung des GFP-Titers zu einem weitaus geringeren Maße. Folglich ist die Komplexbildung von Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 aus *H. polymorpha* essentiell, um effizient eine Fusionsprotein-spezifische Antikörperbildung zu stimulieren. Darüber hinaus wird die Antikörperbildung durch gleichzeitige Applikation von AbISCO-100 entschieden gefördert. Daraus lässt sich eine besondere adjuvante Wechselwirkung des AbISCO-100 mit dem komplexierten Hsp70-1-H6 bei der Antikörperantwort ableiten. Der Adjuvanseffekt für GFP alleine ist nur gering ausgeprägt.

3.15.2 Bestimmung der cytotoxischen T-Zellantwort auf Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe mittels FCM-Analyse

Die cytotoxische T-Zellantwort gegen ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe wurde anhand GFP-spezifischer CD8⁺-T-Zellen aus der Milz immunisierter Tiere ermittelt. Für die Analyse wurden die frisch isolierten Milzzellen mit APC-konjugierten GFP-Pentameren und FITC-konjugierten Anti-CD8 Antikörpern gefärbt und anschließend die Häufigkeit der GFP-Pentamer⁺ CD8⁺-T-Zellen mit Hilfe von Durchflusszytometrie (FCM, *Flow Cytometry* Analyse) bestimmt (für Details siehe Kapitel 2.28.2.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 gezeigt. Eine Immunisierung mit entweder aufgereinigtem GFP-Protein (ohne ORF313-DnaJ-Domäne) oder Hsp70-1-H6, sowie mit einer Mischung dieser beiden Proteine (GFP + Hsp70-1-H6; keine Komplexe) resultiert in keiner signifikanten Antigen (GFP)-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort (Abb. 3.28 Gruppe 2, 3, 4). Ebenfalls konnte mit ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen kein Unterschied bezüglich GFP-Pentamer⁺ CD8-T-Zellen

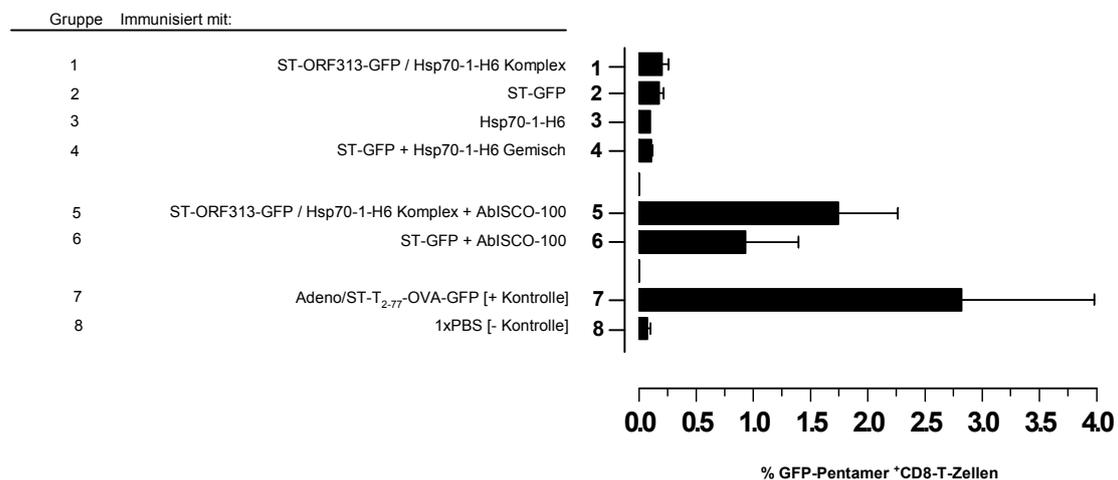


Abbildung 3.28

Bestimmung der CD8⁺ T-Zellantwort mittels FCM-Analyse

BALB/c (H-2^d) Mäuse wurden mit einzelnen Antigenen (ST-GFP; Hsp70-1-H6), Antigen-Gemischen (ST-GFP + Hsp70-1-H6) und Antigen/Hsp70-Komplexen (ST-ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplex), die aus *H. polymorpha* gewonnen wurden, immunisiert. Dies erfolgte entweder mit oder ohne weiteres Adjuvans (AbISCO-100). Als Positivkontrolle wurde Adenoviren injiziert, die das Fusionsprotein ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP tragen, als Negativkontrolle diente PBS pH 7,4. Die zweite Immunisierung fand nach 32 Tagen mit der gleichen Dosis desselben Impfstoffes statt. 10 Tage nach der finalen Injektion wurden GFP-spezifische CD8⁺-T-Zellen durch Anfärben mit APC-konjugierten GFP-Pentameren und FITC-konjugierten Anti CD8 Antikörpern mittels FCM Analyse bestimmt.

festgestellt werden (Abb.3.28 Gruppe 1). Bei gleichzeitiger Applikation des Adjuvans AbISCO-100 wird jedoch eine GFP-spezifische CD8-T-Zellantwort induziert (Abb. 3.28, Gruppe 5 & 6). Dies konnte für das GFP-Protein und in einem weitaus höheren Maße für ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe beobachtet werden. Die Immunogenität der Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe plus Adjuvans ist jedoch geringer als die der Positivkontrolle Adeno/ST-T₂₋₇₇-OVA-GFP ohne zusätzliches Adjuvans. Dies zeigt deutlich, dass eine Immunisierung von Mäusen mit Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen aus *H. polymorpha* in Kombination mit dem Adjuvans AbISCO-100 effizient eine Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort initiiert. Dabei ist die Assoziation von Hsp70-1-H6 mit dem Antigen essentiell, um die spezifische CD8⁺-T-Zellantwort zu fördern.

4 Diskussion

Das 70 kDa-Hitzeschockprotein und sein Co-Chaperon Hsp40 (oder DnaJ-Protein) sind hochkonservierte Moleküle, die sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten vorkommen. Das Hsp70/Hsp40-System signalisiert einen Hitzeschock und ist in der *de novo* Proteinfaltung involviert, indem Hsp70 ATP-abhängig mit Substratproteinen über kurze lineare Polypeptidabschnitte assoziiert. Hsp40 interagiert über die J-Domäne mit Hsp70 und stimuliert dessen ATPase-Aktivität, wodurch der Hsp70/Substrat-Komplex stabilisiert und die Faltung des Substrates unterstützt wird. Die Interaktion von Hsp70 mit Substratpeptiden hat darüber hinaus eine Relevanz für die Antigenprozessierung und die Immunantwort. Verschiedene Studien belegen, dass Hsp70 im Komplex mit Peptiden, die als Antigen erkannt werden, eine adjuvante Wirkung auf eine Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort hat, die unabhängig von der CD4⁺-T-Zellantwort ist. Hsp70 führt demnach exogene Peptide, einem anderen Prozessierungsweg zu. Die normalerweise auf MHC Klasse II Moleküle transferierten exogenen Peptide, werden durch eine Komplexierung mit Hsp70 von MHC Klasse I Molekülen präsentiert.

Auf Grund dessen wird diese Hsp70-Wirkung für die Entwicklung neuer Impfstoffe, insbesondere für Krebsimpfstoffe und Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene, untersucht. Dabei werden verschiedene Strategien für die Produktion von Hsp70-Peptid-Komplexen verfolgt: 1. Isolierung von autologen Hsp-Peptid-Komplexen aus Tumorzellen (Przepiorka *et al.*, 1998), 2. Herstellung von Hsp70-Peptid-Komplexen *in vitro* (Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997), und 3. Herstellung von Hsp-Peptid-Fusionsproteinen *in vivo*. Ein weiterer innovativer Ansatz ist die *in vivo* Komplexierung von Hsp70 mit Fusionsproteinen über eine fusionierte DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ des Tumorantigens (T-Ags) aus SV40 (Schirmbeck *et al.*, 2002; Schirmbeck *et al.*, 2003; Wieland *et al.*, 2008). Zusätzlich zur adjuvanten Funktion von Hsp70 bewirkt dieses System eine Stabilisierung der Fusionsproteine, da die Interaktion mit Hsp70 vor Proteolyse schützt (Patentanmeldung: Method for the production of (poly)peptides. EP98950105.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser Ansatz auf die methylotherme Hefe *H. polymorpha* übertragen werden. Dabei galt es: 1. das System auf *H. polymorpha* zu übertragen und anzupassen, 2. den stabilisierenden Einfluss von Hsp70 auf Fusionsproteine in *H. polymorpha* zu untersuchen und 3. die adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70 im Komplex mit Fusionsproteinen in Immunisierungsexperimenten zu analysieren.

4.1 *H. polymorpha* ist ein geeigneter Modellorganismus für die Herstellung von Fusionsprotein/Hsp70-Komplexen

H. polymorpha ist in der Biotechnologie ein attraktiver Modellorganismus für die heterologe Proteinproduktion. Die Expressionsplasmide können mitotisch stabil in das Genom integriert werden, die Proteinexpression kann mit Hilfe der starken Promotoren (FMD/ Formiatdehydrogenase; MOX/Methanoloxidase; DHAS/Dihydroxyacetosynthase) strikt reguliert werden und die Kultivierbarkeit zu hohen Zelldichten ermöglicht hohe Expressionsraten rekombinanter Proteine. Darüber hinaus werden alle notwendigen posttranslationalen Modifikationen ausgeführt, die die Produktion auch von komplexen, insbesondere glykosylierten Proteinen erlaubt. Die Glykosylierung findet in den meisten Fällen in einem definierten Umfang von 8-14 Mannoseresten statt, wodurch die Gefahr, durch Verknüpfung von Seitenketten über α 1,3-Bindungen mittels α 1,3-Mannosyl-Transferase Allergien auszulösen, minimiert ist. Das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem von *H. polymorpha* beruht auf einer Basistechnologie der Firma Rhein Biotech GmbH mit dem Stamm RB11(*ura*³) in dem Uracil-prototrophe Transformanten selektioniert werden können, welches eine Umgehung von dominanten Markern ermöglicht. Der Stamm ist für die Produktion von HBsAg, Insulin und Hirudin zugelassen. Der ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Stamm HP102 mit zwei Auxotrophien (*ura*³; *leu*²) ermöglicht die gleichzeitige Selektion und Expression von zwei verschiedenen rekombinanten

Proteinen. Im Fall des Hsp70-Interaktionssystems bietet dieser Stamm die Möglichkeit einer heterologen Co-Expression von Hsp70 und Zielprotein unter der Kontrolle des starken *FMD*-Promotors. Aufgrund all dieser Vorteile ist *H. polymorpha* ein interessanter Organismus um das Hsp70-Interaktionssystem für die industrielle Produktion von Impfstoffen zu nutzen.

4.1.1 Hsp70 und DnaJ-Domänen müssen für eine Interaktion in *H. polymorpha* kompatibel sein

Wieland *et al.* (2008) konnten zeigen, dass das HBV-Influenza-GFP-Antigen (SIII-flu-GFP) als Fusionsprotein in Säugetierzellen stabil exprimiert werden konnte, sofern dieses über die DnaJ-ähnliche T₂₋₇₇-Domäne des T-Ags aus SV40 verfügt, über welche das Protein *in vivo* mit Hsp73 interagiert. Fusionsproteine mit einer kürzeren Variante der DnaJ-Domäne T₂₋₆₀ zeigten keine stabile Expression und interagierten nicht mit Hsp73. Um dieses System auf *H. polymorpha* zu übertragen, wurde das ST-T₂₋₇₇-SIII-flu-GFP kodierende Fragment in den *H. polymorpha* Expressionsvektor pFPMT121 eingesetzt und in den Stamm RB11 unter der Kontrolle des *FMD*-Promotors integriert. Es zeigte sich, dass in *H. polymorpha* keine Interaktion mit *H. polymorpha*-eigenen Hsp70-Chaperonen stattfindet, die Expression des Fusionsproteins aber auch ohne diese Interaktion erfolgte. Letzteres ist ein klarer Unterschied zum Säugetiersystem – in *H. polymorpha* ist eine stabile Expression des Fusionsproteins offensichtlich unabhängig von einer Assoziation mit Hsp70. Wenn das Fusionsprotein zusammen mit humanem Hsp73 in *H. polymorpha* exprimiert wurde, konnte eine Interaktion mit Hsp73-Chaperonen erzielt werden. Dies entspricht Ergebnissen die in HEK (Human Embryonic Kidney) Zellen beobachtet wurden (Wieland *et al.*, 2008). Eine Interaktion von Hsp73 mit T₂₋₇₇-Fusionsproteinen konnte ebenfalls in LMH (Hepatoma Zelllinie aus dem Huhn) gezeigt werden (Schirmbeck *et al.*, 2003), welches 97% Identität mit dem humanem Hsp73 aufweist. Dies deutet darauf hin, dass ausreichend Identität zwischen der DnaJ-ähnlichen Bindestelle T₂₋₇₇ und beiden Hsp73 besteht. Das humane Hsp73 zeigt nur moderate Homologien (75% bzw. 76% Identität) zu den zytosolischen Chaperonen Hsp70-1 und Hsp70-2 aus *H. polymorpha* auf. Diese Differenz scheint demnach ausschlaggebend für die fehlende Interaktion von Hsp70-1 und Hsp70-2 mit der T₂₋₇₇-Domäne zu sein. Es können jedoch keine Bereiche definiert werden, auf die eine fehlende Interaktion zurückzuführen wäre. Die nicht-homologen Bereiche sind homogen über die ganze Sequenz von Hsp70 verteilt – sie befinden sich sowohl in der Nukleotidbindedomäne als auch in der Substratbindedomäne. Die genauen Hsp70-Bindestellen für die J-Domäne sind bisher nicht bekannt. NMR-Analysen verschiedener Hsp70-Proteine geben jedoch Hinweise darauf, dass die J-Domäne an die Unterseite der Nukleotidbindungsfurche bindet. Genetische Studien mit dem *E. coli* Hsp70-Protein DnaK haben verschiedene Mutationen identifiziert, die eine Interaktion mit der J-Domäne supprimieren. Dies impliziert, dass diese Aminosäuren in einer Interaktion mit der J-Domäne involviert sind (Greene *et al.*, 1998, Landry *et al.*, 2003).

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Unfähigkeit von Hsp70 mit der T₂₋₇₇-Domäne zu interagieren *H. polymorpha* spezifisch ist. Substitutionen der Ydj1 J-Domäne gegen die J-Domäne des T-Ags in *S. cerevisiae* resultierten in einem funktionalen chimären Protein, für das die Interaktion mit Hsp70 gezeigt werden konnte (Kelley & Georgopoulos, 1997). Die erfolgreiche Übertragung des Säugetiersystems mit humanem Hsp73 auf *H. polymorpha* zeigt, dass eine Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit Fusionsproteinen über DnaJ-ähnliche Domänen in *H. polymorpha* generell möglich ist.

In der Literatur wurde der Interaktionsmechanismus von Hsp70 und Hsp40 als ein Schlüssel-Schloss-Prinzip postuliert (Berjanskii *et al.*, 2002; Landry 2003). Die fehlende Interaktion mit *H. polymorpha*-eigenen Hsp70-Proteinen legte somit die Vermutung nahe, dass diese nicht mit der SV40 DnaJ-ähnlichen Domäne T₂₋₇₇ kompatibel sind. Dies steht in Einklang mit Publikationen, die belegen, dass die Einzelkomponenten Hsp70 und Hsp40 spezifisch miteinander interagieren. Es wurden *S. cerevisiae* Hsp70-Chaperone identifiziert (z. B. Ssz1), die ausschließlich nur mit einem einzigen J-Protein interagieren (Craig *et al.*, 2003), was auf eine hohe Spezifität der Hsp70/Hsp40-Interaktionen

hindeutet. Allerdings konnte ebenfalls für Hsp40-Chaperone aus *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die verschiedenen Hsp40-Proteine einander funktional ersetzen können (Jones *et al.*, 2000). So konnte das fehlende Hsp40-Chaperon Ydj1 durch Sis1 komplementiert werden. Darüber hinaus belegen zahlreiche Austauschexperimente, bei denen unterschiedliche J-Domänen aus verschiedenen Organismen in das *E. coli* Hsp40 (DnaJ) eingesetzt wurden, dass die Funktion auch Spezies-übergreifend ersetzt werden kann (Deloche *et al.*, 1997). Auch Hefe J-Domänen konnten die Funktion von *E. coli* J-Domänen ersetzen. Es interagieren jedoch nicht alle Hsp40-Proteine mit allen Hsp70-Proteinen in effizienter Weise (Deloche *et al.*, 1997; Schlenstedt *et al.*, 1995). Demzufolge kann eine höhere Spezifität bezüglich der Hsp40-Interaktionspartner für die zytosolischen *H. polymorpha* Hsp70-Chaperone vermutet werden. Sie scheinen nicht, wie Hsp73, Spezies-übergreifend mit Hsp40 und deren J-Domänen zu interagieren.

Der in dieser Arbeit verfolgte Lösungsansatz, eine Interaktion von *H. polymorpha*-eigenen Hsp70-Proteinen mit DnaJ-Fusionsproteinen zu erreichen, zielte darauf das System an *H. polymorpha* anzupassen. Hierfür sollte die SV40 T₂₋₇₇-Domäne gegen eine *H. polymorpha*-eigene DnaJ-ähnliche Domäne ausgetauscht werden. Da in *H. polymorpha* noch keine Hsp40-Proteine bekannt waren, wurde in einem *in silico* Ansatz in der *H. polymorpha* Genomdatenbank nach Proteinen mit DnaJ-ähnlichen Domänen gesucht. Es wurden die drei Leseraster ORF12, ORF16 und ORF313 identifiziert, über deren Genprodukte jedoch keine weiteren Informationen vorliegen, als dass anhand der Primärstruktur Ähnlichkeiten zu DnaJ-Proteinen festgestellt wurden. Sie weisen Homologien zu den J-Domänen der Hsp40-Proteine Sis1 (*S. cerevisiae*) und DnaJ (*E. coli*) auf, wobei die ORF16-DnaJ-Domäne die höchste und die ORF313-DnaJ-Domäne die niedrigste Homologie zeigt (siehe Abb. 3.3). Anhand von Sekundärstrukturanalysen (Daten nicht gezeigt) ergab sich für alle ausgewählten Proteine eine Verwandtschaft zu J-Proteinen, die auf gemeinsame funktionelle und strukturelle Domänen hindeuten. Ein Vergleich der DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* mit annotierten Sekundärstrukturen liefert zudem Hinweise auf die sich ausbildenden Helixstrukturen der für J-Domänen typischen Helices I-IV (Abb. 3.3). Die DnaJ-ähnlichen Domänen von ORF12 und ORF16 können vermutlich, wie die T₂₋₇₇-Domäne, die Helices I-III ausbilden, jene von ORF313 die Helices II-III. Darüber hinaus kodieren alle das hochkonservierte HPD-Motiv, welches für eine Bindung von Hsp40 an Hsp70 essentiell ist. Gruschus *et al.* (2004) vermuten, dass die positiv geladene J-Domäne die negativ geladene Phosphat-Gruppe von ATP, welches in der Hsp70 Nukleotidbindetasche gebunden ist, anzieht und dabei die ATP-Hydrolyse fördert. Hennessey *et al.* (2005) stellten daher die These auf, dass auf Grund der stark positiven Ladung von Helix II und Helix III, inklusive des HPD-Motivs, diese die elementaren Bindestellen sind, mit denen die J-Domäne mit der negativ geladenen Nukleotidbindungsfurche der ATPase Domäne von Hsp70 interagiert. Unter diesen Gesichtspunkten wäre eine Interaktion der DnaJ-ähnlichen Domänen der ORF12-, ORF16- und ORF313-Proteine mit Hsp70 möglich, da alle wahrscheinlich Helix II und III ausbilden. Außerdem ist das für Helix III typische konservierte KRK-Motiv in den DnaJ-ähnlichen Domänen der ORF12- und ORF16-Proteine wiederzufinden, welches eine wichtige Rolle für die Struktur der J-Domäne spielt (Hennessey *et al.*, 2000). Die ORF313-DnaJ-Domäne hat anstelle des KRK- ein KQK-Motiv. Weitere konservierte Aminosäuren in den Helices I-III (Hennessey *et al.*, 2000) weisen darauf hin, dass die drei *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen funktionale J-Domänen sind. Interessanterweise konnte für das GFP-Fusionsprotein mit der kürzesten DnaJ-ähnlichen Domäne ORF313 die stärkste Interaktion mit den *H. polymorpha* Hsp70-Proteinen Hsp70-1 und Hsp70-2 gefunden werden. Die ORF12-DnaJ-Domäne interagiert hingegen nicht mit den Hsp70-Proteinen. Dies bestätigt die Vermutung, dass Hsp70-Proteine aus *H. polymorpha* kompatible Interaktionspartner benötigt, die jedoch im Vergleich zu den Hsp40-Proteinen anderer Organismen nicht ähnlich sind. Es ist anzunehmen, dass *H. polymorpha* Hsp70-Proteine besser an DnaJ-ähnliche Domänen aus homologen Proteinen binden, als an J-Domänen anderer Organismen.

Da in Säugetierzellen (HEK293) Hsp73 mit DnaJ-ähnlichen Domänen unterschiedlichster Organismen, sowohl bakterieller als auch pflanzlicher Herkunft, interagieren kann (Wieland *et al.*, 2008), wurden die ORF12-, ORF16- und ORF313-DnaJ-ähnlichen Domänen im Säugetiersystem getestet. Dabei wurde festgestellt, dass keine bzw. nur eine ineffiziente Interaktion von Hsp73 mit den *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen stattfindet. Anscheinend können *H. polymorpha* Hsp70-Chaperone nicht mit DnaJ-ähnliche Domänen interagieren an die Säuger Hsp73 bindet und umgekehrt. Obwohl die Interaktion von Hsp73 und DnaJ-ähnlichen Domänen Spezies-übergreifend ist, ist sie gleichzeitig auch sehr spezifisch. Dies zeigt das Beispiel, bei dem die Interaktion von Hsp73 mit der T₂₋₇₇-Domäne erfolgt nicht aber mit der kürzeren T₂₋₆₀-Domäne (Wieland *et al.*, 2008; Schirmbeck *et al.*, 2003). Anscheinend spielt für die Bindung der Bereich zwischen den Aminosäuren 61-77, der Helix III mit Helix IV verbindet (= Turn), eine große Rolle. Es ist davon auszugehen, dass der Turn Auswirkungen auf die sich ausbildende Helixstruktur hat, wenn ein Protein C-terminal fusioniert ist. So könnte eine fehlende Interaktion mit den *H. polymorpha* Domänen auf die fehlende bzw. zu kurze Sequenz, die für diesen Turn kodiert, zurückzuführen sein. Für ORF16-Fusionsproteine konnte eine sehr geringe Interaktion mit Hsp73 beobachtet werden, ORF12- und ORF313-Fusionsproteine interagieren nicht mit Hsp73. Die ORF16-DnaJ-Domäne ist die längste der drei Domänen und bildet vermutlich ähnlich wie T₂₋₇₇ einen Turn nach Helix III aus. Trotzdem bewirkte die ORF16-Domäne nur eine ineffiziente Bindung mit Hsp73. Es ist anzunehmen, dass alle *H. polymorpha* Domänen zu kurz sind um eine kompatible Helixstruktur auszubilden und effektiv an Hsp73 binden zu können. Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten Interaktionen von Hsp70-Proteinen und DnaJ-ähnlichen Domänen in *H. polymorpha*: hier interagierten die Hsp70-Proteine deutlich besser mit der kurzen DnaJ-ähnlichen Domänen des ORF313-Proteins.

4.1.2 Fusionsproteine mit *H. polymorpha*-eigenen DnaJ-ähnlichen Domänen interagieren mit Hsp70-Proteinen aus *H. polymorpha*

Es konnte gezeigt werden, dass die zytosolischen *H. polymorpha* Hsp70-Proteine, Hsp70-1 und Hsp70-2 bei einer Aufreinigung über Streptactin-Sepharose mit Fusionsproteinen immer co-eluierten, wenn die Fusionsproteine eine kompatible DnaJ-ähnliche Domäne aus *H. polymorpha* enthalten. Dies konnte reproduzierbar unabhängig vom Säulentypen und von der Streptactin-Matrix erzielt werden. Sowohl mit Streptactin-Sepharose in Form von kommerziellen Spin-Columns als auch mit selbstangefertigten Säulen (Gravity-flow) oder mit vorgepackter Streptactin-Superflow-Matrix wurde Hsp70 immer gleichzeitig mit dem getesteten DnaJ-Fusionsprotein angereichert. Dies zeigt, dass die Interaktion spezifisch und unabhängig von der verwendeten Reinigungstechnik ist. Das Reinigungsverfahren über den Strep-Tag ist somit eine ideale Methode Hsp70/Fusionsprotein-Interaktionen in *H. polymorpha* zu untersuchen.

Eine Interaktion von Hsp70-1 und Hsp70-2 mit Fusionsproteinen in *H. polymorpha* wurde erreicht, indem das System dahingehend angepasst wurde, dass die T₂₋₇₇-Domäne gegen *H. polymorpha*-eigene DnaJ-ähnliche Domänen ausgetauscht wurde. Enthalten die ST-GFP-Fusionsproteine entweder die DnaJ-ähnliche Domäne des ORF313- oder ORF16-Proteins, so co-eluierte Hsp70-1 und Hsp70-2 bei einer Aufreinigung des Fusionsproteins über Streptactin-Sepharose. Hierbei ist hervorzuheben, dass dieser Effekt wesentlich deutlicher beim ORF313-Fusionsprotein ausgeprägt ist. Dies weist auf eine stärkere *in vivo* Interaktion von Hsp70 mit dem Fusionsprotein hin. Fusionsproteine ohne DnaJ-Domäne zeigten hingegen keine Komplexierung mit Hsp70-1 oder Hsp70-2, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Interaktion ausschließlich über die DnaJ-ähnlichen Domänen der ORF313- und ORF16-Proteine erfolgt. Das ORF12-Fusionsprotein verhält sich wie ein Fusionsprotein ohne DnaJ-Domäne. Anscheinend komplexieren Hsp70-1 und Hsp70-2 nur über spezifische DnaJ-eigene Domänen, wobei nicht alle zu einer Interaktion führen (wie am Beispiel der ORF12-DnaJ-Domäne gezeigt). Darüber hinaus gibt es Abstufungen bezüglich der Fähigkeit mit den verschiedenen DnaJ-Domänen zu interagieren (wie an den ORF16- und ORF313-

Fusionsproteinen gezeigt). Im Bezug auf die denkbaren Helixstrukturen, die die DnaJ-ähnlichen Domänen aus *H. polymorpha* ausbilden könnten, ließe für die ORF16-DnaJ-Domäne die beste Interaktion mit Hsp70 vermuten, da anzunehmen ist, dass hier, wie für die T₂₋₇₇-Domäne die Helices I-III einer J-Domäne ausgebildet werden können. Interessanterweise interagiert Hsp70 bedeutend besser mit der ORF313-DnaJ-Domäne, die vermutlich aufgrund ihrer Länge und anhand von Sekundärstrukturanalysen nur die Helices II und III ausbildet. Für das Hsp40-Protein Ydj1 aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass verkürzte J-Domänen, bestehend aus Helix II plus HPD-Motiv sowie HPD-Motiv plus Helix III, eine effektive Interaktion mit Hsp70 vermitteln. Während diese Regionen für eine Interaktion ausreichend sind, werden die anderen Bereiche der J-Domäne (Helix I und IV) für eine vollständige Bindung mit Hsp70 benötigt (Lu & Cry, 1998). Für das in dieser Arbeit untersuchte Hsp70-Interaktionssystem über eine fusionierte DnaJ-ähnliche Domäne ist der für eine Interaktion benötigte minimale Bereich (Helix II und III) am besten für eine Assoziation mit Hsp70-Proteinen in *H. polymorpha* geeignet.

Für die Produktion von Impfstoffen bzw. heterologen Proteinen auf der Basis des Hsp70-Interaktionssystems ist anzunehmen, dass die kurze ORF313-Domäne vorteilhaft ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass kürzere Elemente Auswirkungen auf die Konformation der fusionierten Zielproteine haben, ist gering. Je kleiner die chimären Anteile der Zielproteine sind, desto geringer sind darüber hinaus mögliche Kreuzreaktionen und Unverträglichkeiten, die auf diese Anteile zurückzuführen sein könnten.

Eine weitere Beobachtung war, dass mit beiden ORF16- und ORF313-Fusionsproteinen vermehrt Hsp70-1 co-eluiert. Aussagen darüber, ob Hsp70-1 gegenüber Hsp70-2 ein besserer Interaktionspartner ist, können allerdings nicht getroffen werden. Bekannt ist, dass Hsp70-2 konstitutiv in der Zelle vorliegt, die Expression von Hsp70-1 unter Stressbedingungen (wie z. B. Hitzeschock) induziert wird (Titorenko *et al.*, 1996). Bei sehr hoher Expression von GFP kann bei der Bildung des Fluorophores Peroxid entstehen und die Zelle unter Stress setzen. Dies könnte bedeuten, dass die heterologe Überexpression der GFP-Fusionsproteine eine derartige Stresssituation für die Zelle darstellt, Hsp70-1 verstärkt synthetisiert wird und dadurch vermehrt an das Fusionsprotein bindet.

Die ersten Interaktionsstudien wurden in Stammhintergründen mit endogenem Hsp70-1 und Hsp70-2 durchgeführt. Eine Aufreinigung der Fusionsproteine über Streptactin-Sepharose ergab, dass diese in größerer Menge im Gegensatz zu den co-eluierten Hsp70-Proteinen angereichert wurden. Das beobachtete 1:1 Verhältnis in den Elutionsfraktionen von T₂₋₇₇-Fusionsproteinen und Hsp73 aus Säugetierzellen (Wieland *et al.*, 2008) konnte im *H. polymorpha*-System nicht erreicht werden. Es ist anzunehmen, dass die in der Zelle vorliegende Menge an (überexprimiertem) Fusionsprotein die der Hsp70-Proteine weit überschreitet. Eine Verbesserung des Assoziationsverhältnisses in *H. polymorpha* könnte dadurch erzielt werden, dass Hsp70-1 bzw. Hsp70-2 ebenfalls unter der Kontrolle des *FMD*-Promotors in der Zelle exprimiert wird. Um die heterolog exprimierten von den endogenen Hsp70-Proteinen unterscheiden zu können, wurde diesen N-terminal ein Histidin Tag (H6) angefügt. Tatsächlich konnte in diesen Stämmen eine vermehrte Co-Reinigung von rekombinantem Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 beobachtet werden, was auf ein verbessertes Mengenverhältnis von Hsp70 und Fusionsprotein schließen lässt. Allerdings konnte auch mit erhöhter Hsp70-Gendosis in Kombination mit dem Reinigungsverfahren über selbstangefertigten Streptactin-Säulen immer noch nicht das für das Hsp73/T₂₋₇₇-System beschriebene 1:1 Assoziationsverhältnis erreicht werden. Erst eine Aufreinigung über kommerzielle Streptactin-Spin-Columns und gleichzeitiger Überexpression von Hsp70-1-H6 oder Hsp70-2-H6 führte zu dem optimalen 1:1 Verhältnis von Fusionsprotein und Hsp70-Proteinen. Daran wird deutlich, dass die Aufreinigungsmethode bzw. der verwendete Säulentyp Auswirkungen auf die Verhältnisse von isoliertem Hsp70 und Fusionsprotein hat.

Für eine universelle Nutzung des Hsp70-Interaktionssystems in der Impfstoffherstellung müssten die an das ORF313-Element fusionierten Zielproteine individuell austauschbar sein. Dies setzt eine

Zielprotein-unabhängige Komplexierung über die ORF313-Domäne mit Hsp70-Proteinen voraus. Es konnte anhand von drei unterschiedlichen Zielproteinen gezeigt werden, dass dies für das *H. polymorpha*-System der Fall ist. Die Zielproteine GFP, HBV-Influenza-GFP (SIII-flu-GFP) und HBV E-Antigen (EAg) bilden alle einen Komplex mit Hsp70, sofern eine ORF313-DnaJ-Domäne vorliegt. Eine Assoziation von Hsp70-Proteinen mit dem GFP-Fusionsprotein erfolgt einzig über die ORF313-DnaJ-Domäne, das GFP-Protein ohne DnaJ-Domäne zeigte keine Interaktion. Da für das SIII-flu-GFP-Fusionsprotein mit der T₂₋₇₇-Domäne aus SV40 keine Interaktion mit Hsp70-Proteinen in *H. polymorpha* nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Hsp70-Interaktion mit dem äquivalenten ORF313-Fusionsprotein über die ORF313-DnaJ-Domäne erfolgt. Auch bei dem dritten Fusionsprotein ST-ORF313-EAg co-eluierte bei Reinigung über Streptactin-Sepharose Hsp70-1-H6 bzw. Hsp70-2-H6. Allerdings kann auf Grund der fehlenden Negativkontrolle (EAg ohne DnaJ-Domäne), die in *H. polymorpha* trotz nachgewiesener Plasmid-Integration nicht exprimiert werden konnte, eine Interaktion von Hsp70-1-H6 mit der Zielprotein EAg nicht ausgeschlossen werden. Da in den beiden anderen Fällen die Komplexierung ausschließlich auf eine Assoziation mit der ORF313-DnaJ-Domäne zurückzuführen war, ist anzunehmen, dass es sich bei dem EAg-Fusionsprotein ebenso verhält. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das ORF313/Hsp70-Interaktionssystem für die Herstellung verschiedener Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe eingesetzt werden kann.

Für das Hsp73/T₂₋₇₇-Interaktionssystem konnte in Säugetierzellen gezeigt werden, dass Peptide mit bis zu 800 Aminosäuren erfolgreich exprimiert werden können, obwohl ihre für Antigene kodierende Domänen in nativen Zustand instabil oder sogar toxisch für die Zelle sind (Reimann *et al.*, 2004; Riedl *et al.*, 2006). Dies eröffnet die Möglichkeit verschiedene Epitope unterschiedlicher Proteinantigene gleichzeitig zu exprimieren. Die vorhandene Kapazität größere Peptide in diesem System zu exprimieren, erlaubt einen Einbau von längeren Linkerregionen zwischen den einzelnen Epitopen oder längere flankierende Bereiche. Dadurch könnten die Epitope einzeln und nicht überlappend exprimiert und so normal prozessiert werden (Schirmbeck *et al.*, 2003). Die Expression dieser Polyepitope bietet daher eine interessante Möglichkeit multivalente Impfstoffe herzustellen. Sollte die Expression solcher großen Polyepitope im Komplex mit Hsp70 in *H. polymorpha* ebenfalls möglich sein, wäre die Hefe ein idealer Organismus die Polyepitope zu produzieren. Hohe Zelldichten und Expressionraten, mitotisch stabil integrierte Expressionkassetten und geringe Glykosylierung der heterologen Proteine würden hohe Ausbeuten und Verträglichkeit gewährleisten.

Nachdem die Interaktion von Hsp70 mit Fusionsproteinen über *H. polymorpha*-eigene DnaJ-ähnliche Domänen *in vivo* demonstriert worden ist, stellte sich die Frage, ob die Proteine auch *in vitro* einen Komplex bilden. Wie bereits für Hsp70 und Peptide des E7 Proteins des humanpathogenen Papilloma Virus gezeigt (Li, 2006), ist es möglich, Komplexe von aufgereinigten Antigenpeptiden und Hsp70-Proteine über nicht-kovalente Bindungen *in vitro* herzustellen. Die Produktion ist jedoch schwierig und in großem Maßstab schwer zu etablieren. Die Komplexierung von Proteinen über eine fusionierte DnaJ-ähnliche Domäne könnte eine Alternative sein, mit der die Herstellung von Komplexen *in vitro* erleichtert wird. Bisher konnte für das Säugetiermodell allerdings keine *in vitro* Interaktion von Hsp73 und T₂₋₇₇-Fusionsproteinen gezeigt werden (R. Schirmbeck, pers. Mitteilung). Für das *H. polymorpha*-System konnte ebenfalls keine exogene Interaktion von Hsp70 über die ORF313-DnaJ-ähnliche Domäne mit dem Fusionsprotein festgestellt werden. In diesem Aspekt verhalten sich das Säugetier- und das *H. polymorpha*-System gleich. Anscheinend muss die Interaktion *in vivo* erfolgen. Frühere Studien belegen, dass Hsp70-1 und Hsp70-2 mit denaturierten, nicht aber mit nativen Proteinen interagieren (Evers *et al.*, 1993). Eine mögliche *in vitro* Interaktion des nativen fusionierten Zielproteins mit Hsp70 kann deshalb ausgeschlossen werden. Die ORF313-Bindestelle vermittelt demnach anscheinend keine Hsp70-Interaktion *in vitro*. Es könnten aber auch andere unbekannte Faktoren in der *in vivo* Interaktion involviert sein, die in der *in vitro* Situation nicht gegeben sind. Es ist bekannt, dass die Stabilität von *in vitro* assemblierten Hsp70/Antigenpeptid-Komplexen in Anwesenheit von ADP gesteigert wird. Dies ist vergleichbar mit der *in vivo* Situation, bei der die Affinität von Hsp70 in

ADP-gebundener Form zum Substrat erhöht ist und eine Stabilisierung des Komplexes bewirkt (Ha *et al.*, 1999). Eine inadäquate ADP-Konzentration oder Pufferbedingungen könnten Faktoren sein, die eine Komplexierung *in vitro* verhindern.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Interaktionsmechanismus der ORF313-Domäne jenem anderer bekannter J-Domänen ähnelt. Dafür wurde das Fusionsprotein ST-ORF313(HPE)-GFP generiert, das den moderaten Austausch von Aspartat (D) nach Glutamat (E) im HDP-Motiv der DnaJ-ähnlichen Domäne des ORF313-Proteins trägt. Durch diesen Austausch entstehen, trotz Änderung auf Aminosäureebene, keine großen Modifikationen in der Konformation der ORF313-DnaJ-Domäne und ist so in der Struktur dem HPD-Fusionsprotein ähnlich. Hennessey *et al.* (2005) konnten belegen, dass bereits dieser geringfügige Aminosäureaustausch im invarianten HPD-Motiv eine Interaktion von Hsp40 aus *A. tumefaciens* mit Hsp70-Chaperonen unterdrückt. Das HPE-Konstrukt sollte deshalb als optimierte Negativkontrolle für das ORF313-Fusionsprotein (im Gegensatz zum GFP-Protein ohne DnaJ-Domäne) eingesetzt werden. Wider den Erwartungen interagierten Hsp70-1 und Hsp70-2 mit dem HPE-Fusionsprotein – sogar in einem besseren Verhältnis als mit der ursprünglichen HPD-Variante. Mit Hilfe von Streptactin-Spin-Columns konnten HPE-Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:3 aufgearbeitet werden. Die Mutation scheint eine umgekehrte Wirkung zu haben und in einem Konstrukt zu resultieren, welches verstärkt mit Hsp70 interagiert. Eine Komplexbildung, bei der Hsp70 im Überschuss an das Fusionsprotein bindet, unterstützt die These von R. Schirmbeck (pers. Mitteilung), dass eine DnaJ-Domäne vermittelte Interaktion von Hsp73 mit dem Fusionsprotein, in Folge zu weiterer Akkumulierung von Hsp73 an dem Fusionsprotein führt (siehe Abb. 3.1). Durch die Interaktion und Akkumulierung von Hsp73 soll dann für das Fusionsprotein ein Schutz vor Proteolyse gegeben sein. Die vermehrte Bindung von Hsp70 an das HPE-Fusionsprotein lassen auf eine Akkumulierung des Chaperons schließen, ein Schutz vor Proteolyse konnte in diesem Fall jedoch nicht nachgewiesen werden.

Dass durch die HPE-Mutation im HDP-Motiv die Interaktion mit Hsp70-1 oder Hsp70-2 nicht inhibiert wird, widerspricht Studien von Mutanten, bei denen schon ein einziger Aminosäureaustausch – auch $D \rightarrow E$ - in einem Funktionsverlust von Hsp40 resultierte (Hennessey *et al.*, 2005; Tsai & Douglas, 1996; Mayer *et al.*, 1999; Kluck *et al.*, 2002). Die Auswirkungen sind nicht immer so drastisch, jedoch haben Substitutionen einzelner Aminosäuren im HPD-Motiv immer einen negativen Effekt auf die Interaktion mit Hsp70 oder die Funktion, die ATPase Aktivität von Hsp70 zu aktivieren. Das beobachtete Phänomen der vermehrten Bindung von Hsp70 an das HPE-Fusionsprotein steht im Kontrast zu dem für andere Organismen ansonsten invarianten HPD-Motiv der Hsp40 J-Domänen. Auf Grund der hohen Konservierung des HPD-Motivs und dessen Funktion ist es allerdings fraglich, ob sich der Hsp70/Hsp40-Interaktionsmechanismus in *H. polymorpha* stark unterscheidet. Es könnte jedoch eine Erklärung dafür sein, warum weder Hsp70-1 noch Hsp70-2 mit der DnaJ-ähnlichen Domäne T_{2-77} aus SV40 interagiert.

Eine weitere Differenz zwischen dem *H. polymorpha*- und dem Hsp73/ T_{2-77} -System in Säugetierzellen ist die unterschiedliche Dissoziation von Hsp70 aus dem Komplex in Anwesenheit von ATP. Hsp70-1 und Hsp70-2 können durch Zugabe von ATP nur partiell von ORF313-Fusionsproteinen abgelöst werden und nicht, wie für das Hsp73/ T_{2-77} -System gezeigt, vollständig dissoziieren (Wieland *et al.*, 2008). Der größere Hsp70-Anteil bleibt unter diesen Bedingungen an dem Fusionsprotein gebunden. Das gleiche Phänomen konnte für HPE-Fusionsproteine beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass die nicht-kovalente Bindung von Hsp70-Chaperonen mit der ORF313-Domäne sehr viel stärker ist, als die zwischen Hsp73 und der T_{2-77} -Domäne.

Grundsätzlich unterscheidet sich die Interaktion von Hsp70-Chaperonen mit DnaJ-Fusionsproteinen von jener der meisten zellulären Proteine. Der Hsp70 Reaktionszyklus ist normalerweise von kurzer Dauer und kann sich sooft wiederholen, bis das gebundene Substratprotein korrekt gefaltet ist. Hingegen ist die Halbwertszeit der Komplexe, deren Assoziation über eine DnaJ-ähnliche Domäne vermittelt wird, bedeutend länger. Im Hinblick auf eine Herstellung von Hsp70-Peptid-Komplexen, scheint die stärkere Bindung von ORF313-Domäne und Hsp70 vorteilhaft gegenüber jener der

Hsp73/T₂₋₇₇-Komplexe. Es ist anzunehmen, dass eine stärkere Bindung eine höhere Stabilität der Komplexe gewährleistet und Stabilitätsstandards für eine Produktion dieser Komplexe einfacher erfüllt werden können.

4.2 Stabilisierung von Proteinen durch eine Interaktion mit Hsp70 in *H. polymorpha*

Ein weiterer Aspekt der im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, war der Einfluss der Hsp70-Interaktion auf die Stabilität von DnaJ-Fusionsproteinen in *H. polymorpha*. Vorangegangene Studien in Säugetierzellen haben gezeigt, dass durch eine *in vivo* Interaktion von Hsp73 mit T₂₋₇₇-Fusionsproteinen, die Stabilität dieser Proteine gefördert wird bzw. diese Proteine erst erfolgreich exprimiert werden können. Da dies im Besonderen für Protease-sensitive Proteine zutrifft, hat Prof. R. Schirmbeck die These aufgestellt hat, dass dieses Expressionssystem Schutz vor Proteolyse bewirkt (Patentanmeldung: Method for the production of (poly)peptides. EP98950105.1). Drei verschiedene Proteine, die auf Grund vorangegangener Expressionsstudien von der Firma Rhein Biotech GmbH als „schwierig“ exprimierbar eingestuft wurden, dienten als Zielproteine, um diese These in *H. polymorpha* zu überprüfen. Die zu analysierenden Zielproteine waren: zwei Fusionsproteine (Polyepitop #1 und Polyepitop #2), bestehend aus vielen durch Protease-Erkennungssequenzen voneinander getrennten Epitopen eines humanpathogenen Virus (M. Suckow, pers. Mitteilung), sowie das E-Antigen des Hepatitis B-Virus.

Für diese Versuche wurden für jedes Zielprotein drei unterschiedliche Fusionsproteine konstruiert, die sich in der jeweiligen fusionierten DnaJ-Domäne unterscheiden: ST-X (Negativkontrollprotein), ST-ORF313-X und ST-T₂₋₇₇-X [X= Zielprotein]. Die Fusionsproteine wurden in dem Wildtyp HP102 Stammhintergrund und in Stämmen mit erhöhter Hsp70-Gendosis (Hsp70-1-H6, Hsp70-2-H6 und Hsp73-H6) analysiert.

Das Polyepitop #1 konnte auch in diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden. Die Fusionierung mit den ST-ORF313- oder ST-T₂₋₇₇-Elementen und Expression dieser Fusionsgene in den Hsp70-1-H6, Hsp70-2-H6 und Hsp73-H6 Stammhintergründen zeigte keinen Einfluss auf die Expression. Das Protease-sensitive Polyepitop #2 konnte im konventionellen *H. polymorpha* Expressionssystem (ohne fusionierte DnaJ-ähnliche Domäne) als vollständiges Protein mit mehreren Abbauprodukten gezeigt werden. Anhand von Antikörpern, die gegen unterschiedliche spezifische Epitope gerichtet waren, konnte sowohl ein N-terminaler als auch C-terminaler Proteinabbau nachgewiesen werden (M. Suckow, pers. Mitteilung). Auffällig war hierbei ein Abbaumuster, welches auf einen Schnitt am C-Terminus zurückzuführen war (M. Suckow, pers. Mitteilung). Auch durch eine Fusionierung des Polyepitopes #2 an die DnaJ-ähnlichen Domänen ORF313 oder T₂₋₇₇ konnte der Proteinabbau nicht verhindert werden. Der proteolytische Schnitt am C-Terminus erfolgte ebenso im Wildtyp HP102 Stammhintergrund als auch in Stämmen mit erhöhter Hsp70-Gendosis.

Für das E-Antigen, welches bislang in anderen Organismen, jedoch nicht in *H. polymorpha*, exprimiert werden konnte, konnte mit Hilfe des DnaJ-Hsp70-Interaktionssystems erstmalig Produktbildung in *H. polymorpha* gezeigt werden. Sowohl EAg-Fusionsproteine mit einer ORF313- als auch mit einer T₂₋₇₇-DnaJ-Domäne konnten exprimiert werden. Die Expression ist unabhängig von der jeweiligen Hsp70-Gendosis (endogen oder heterolog). Für das ORF313-EAg-Fusionsprotein konnte zudem eine Interaktion mit den Chaperonen Hsp70-1-H6 und Hsp70-2-H6 nachgewiesen werden. Diese Interaktion scheint jedoch unabhängig von der Expression zu sein, da das EAg auch durch eine T₂₋₇₇-Fusion erfolgreich in der Zelle synthetisiert wird. Bemerkenswert ist allerdings, dass trotz nachgewiesener Plasmidintegration für das EAg ohne DnaJ-Domäne keine Produktbildung erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass beide DnaJ-ähnlichen Domänen eine Rolle für die Expression spielen. Ob die Interaktion von Hsp70 mit dem ORF313-EAg-Fusionsprotein die Expression positiv beeinflusst, ist nicht ersichtlich. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Fusion mit DnaJ-ähnlichen Domänen die Expression von Proteinen anscheinend fördert, die Interaktion von Hsp70 mit den

Fusionsproteinen jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Expression hat. Des Weiteren ist nur ein partieller Schutz vor Proteolyse gegeben.

4.3 *H. polymorpha* Hsp70-1 zeigt im Komplex mit ORF313-Fusionsproteinen eine adjuvante Wirkung

Nachdem das Hsp73/T₂₋₇₇ Säugetiersystem an *H. polymorpha* adaptiert wurde, wurde der dritte Aspekt dieser Arbeit, die adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70 im Komplex mit Fusionsproteinen untersucht. Für das Säugetiersystem werden signifikante Steigerungen in der Antigen-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort erzielt, wenn Hsp73 mit dem als Antigen wirkendem T₂₋₇₇-Fusionsprotein im Komplex vorliegt. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Daten überein, die anhand verschiedener Systeme zeigen, dass die Assoziation (kovalent oder nicht-kovalent) von Hsp70 mit Peptiden, die als Antigen erkannt werden, für die immunstimulatorische Wirkung von Hsp70 nötig ist (Janetzki *et al.*, 2000; Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2006; Lewis, 2004; Ge *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Die spezifische CD8⁺-T-Zellantwort ist bei Fusionsproteinen, die nicht im Komplex vorliegen bedeutend geringer. Eine gleichzeitige Applikation von Hsp73 (nicht mit den Peptiden komplexiert) hat ebenfalls keine Auswirkungen auf die CD8⁺-T-Zellantwort gegenüber der alleinigen Immunisierung mit dem Fusionsprotein (Wieland *et al.*, 2008).

Um die adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70-Chaperonen zu untersuchen, wurde das ORF313-GFP-Fusionsprotein ausgewählt. Als Negativkontrollproteine wurden Hsp70-1-H6 und ST-GFP (kein Komplex mit Hsp70) eingesetzt. Letzteres wurde ausgewählt, da das ORF313-Fusionsprotein immer im Komplex mit endogenem Hsp70 vorliegt und Hsp70 durch ATP-Zugabe nicht vollständig abgelöst werden kann.

Bevor die ersten Immunisierungsexperimente durchgeführt werden konnten, musste die Integrität der Komplexe nach Aufreinigung über Streptactin-Sepharose nachgewiesen werden. Weitere Vorexperimente waren ein Upscale der Produktion und Aufarbeitung der Komplexe, um die für die Immunisierungsexperimente benötigte Menge an Protein bereitzustellen, sowie Stabilitätsstudien der Einzelkomponenten und der Komplexe, die Aufschluss über Lagerung und Handhabbarkeit geben sollten.

Bislang konnte mit Hilfe der Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass Hsp70 mit dem ORF313-GFP-Fusionsprotein spezifisch co-eluiert, woraufhin geschlossen werden kann, dass die Proteine zum Zeitpunkt der Elution assoziiert vorliegen. Der Nachweis, dass Komplexe intakt im Eluat vorliegen, musste noch erbracht werden. Im Hinblick auf eine Prozessentwicklung wurden verschiedene analytische Methoden getestet, mit denen Komplexe dargestellt werden können, die darüber Aufschluss geben, welche sich am besten für In-Prozesskontrollen eignen. Die Komplexe wurden mittels fünf verschiedener analytischer Methoden untersucht: Immunpräzipitation, zweifache Aufreinigung über Affinitätschromatographie, native Gelelektrophorese, Reverse Phase (RP)-HPLC und Size Exclusion Chromatographie (SEC)-Lightscatter. Mit allen fünf Methoden konnte belegt werden, dass ORF313-GFP/Hsp70-1-H6-Komplexe nach der Aufreinigung im Elutionspuffer vorhanden sind. Die Aufreinigung über Streptactin-Sepharose bzw. Streptactin-Superflow Matrix ist nicht nur ein Verfahren um die Hsp70-Fusionsprotein-Interaktion nachzuweisen, es eignet sich zudem dazu, intakte Hsp70/Fusionsprotein-Komplexe zu isolieren und anzureichern. Mit Immunpräzipitation, Doppelreinigung sowie nativer Gelelektrophorese konnte die Integrität der Komplexe überprüft werden. Diese Methoden ließen jedoch keine genaue Differenzierung zwischen Komplexen und nicht assoziierten Einzelkomponenten zu. Für die Differenzierung eigneten sich hingegen RP-HPLC und SEC-Lightscatter. Für beide Analyseverfahren wurden aufgereinigte Proteinproben eingesetzt, bei denen das ORF313-Fusionsprotein und Hsp70-1-H6 in einem 4:1 Verhältnis vorlagen. Dementsprechend wurden auch freie, nicht-assoziierte Fusionsproteine detektiert. Bei der RP-HPLC

konnte für ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe ein Profil mit drei Peaks beobachtet werden. Zwei dieser Peaks (6,3 min und 7,8 min) stimmen mit dem Profil der Einzelkomponenten ST-GFP und Hsp70-1-H6 überein, was auf nicht-assoziierte Einzelkomponenten hindeutet. Der Peak mit einer Retentionszeit von 5,9 min lässt auf intakte Komplexe schließen. Eine genaue Zuordnung der Komplexe ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich – eine anschließende massenspektroskopische Analyse würde eine Definition dieses Peaks und eine Bestimmung der Komplexe ermöglichen. Dies wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Stattdessen konnten die ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe im Elutionspuffer mit Hilfe von SEC-Lightscatter näher charakterisiert werden. So konnte gezeigt werden, dass bei einem stöchiometrischen Überschuss des Fusionsproteins alle Hsp70-Proteine im Komplex vorliegen. Die detektierten Molekulargewichte von 120 kDa und 126 kDa sind vermutlich auf Komplexe mit endogenem Hsp70-1 (120 kDa) und heterologem Hsp70-1-H6 (126 kDa) zurückzuführen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Komplexe von 3% und 15% stimmt dahingehend überein, dass Hsp70-1-H6 unter der Kontrolle des *FMD*-Promotors vermehrt in der Zelle vorliegt, und folglich der größere Anteil aus Hsp70-1-H6/Fusionsprotein-Komplexen besteht. Diese Methode zeigt, dass die Komplexe im Elutionspuffer in einem 1:1 Verhältnis assoziiert vorliegen und nicht zerfallen (es wurde kein freies nicht-assoziiertes Hsp70 detektiert) und ermöglicht aufgrund der hohen Sensitivität eine Zuordnung der Komponenten anhand ihres Molekulargewichtes. Fraktionen, für die Proteine mit großem Molekulargewicht berechnet wurden, deuten auf Multimere hin. Eine genaue Zuordnung ist mit dieser Methode nicht möglich. Es ist anzunehmen, dass es sich um multimer Komplexe bestehend aus mehreren Hsp70-Molekülen und Fusionsprotein handelt. Dies würde die These von R. Schirmbeck (pers. Mitteilung) wiederum untermauern, bei der Hsp73-Moleküle an dem T₂₋₇₇-Fusionsprotein akkumulieren.

Im Vergleich mit der SEC-Lightscatter Methode scheint die Analyse mittels PR-HPLC weniger optimal, da die Komplexe nicht mit Bestimmtheit identifiziert werden können und darüber hinaus, die Prozedur bei einem pH von 2,2 anscheinend zu einem Zerfall der Komplexe führt (es konnte nicht-assoziiertes Hsp70-1-H6 detektiert werden).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Immunpräzipitation, Doppelreinigung über Streptactin-Sepharose und Ni-NTA-Agarose und native Gelelektrophorese für den Nachweis von ORF313-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexen eignen. RP-HPLC und SEC-Lightscatter eignen sich ebenfalls als Analysetool, um zwischen Einzelkomponenten und Komplexen zu differenzieren. Dabei ist die SEC-Lightscatter Methode der RP-HPLC vorzuziehen, da mit Hilfe dieses Verfahrens in Kombination mit der Berechnung der molekularen Masse, die detektierten Moleküle zugeordnet werden können. Nachteilig ist allerdings, dass für diese Analyse größere Mengen (mind. 0,5 mg) Protein benötigt werden.

Um die für die Immunisierungsexperimente benötigte Menge Protein bereitzustellen, wurde ein Upscale der Kolbenkultivierung in Form einer 1,5L Fed-Batch Fermentation vorgenommen, sowie die Aufarbeitung der Proben mit einer größeren Säule (Streptactin-Superflow-Matrix, 5 ml) in Kombination mit dem Fraktionssammelsystem ÄKTA Prime Plus. Hierbei war die besondere Anforderung, dass neben dem Erreichen einer hohen Biomasse, beide rekombinaten Proteine, Fusionsprotein und Hsp70-1-H6, erfolgreich exprimiert werden und dazu als Komplex vorliegen müssen. Beide Aspekte des Upscales wurden erfolgreich durchgeführt.

Des Weiteren war für die Immunisierungsexperimente erforderlich, dass die Einzelkomponenten und ihre Komplexe mindestens für vier Wochen stabil, ohne Zusätze von Protease-Inhibitoren, vorliegen. Sowohl die erste und als auch die zweite Immunisierung sollte mit Komplexen erfolgen, die aus der gleichen Charge stammen. Ferner sollten die Proteinproben in PBS umgepuffert werden, um Verträglichkeit zu gewährleisten. Die Stabilität musste dementsprechend nicht nur über Zeit, sondern auch in anderen Pufferbedingungen mit unterschiedlichem pH überprüft werden, da PBS eine Pufferkapazität bis maximal pH 7,4 bietet. Stabilitätsstudien zeigten, dass die optimale Lagerungsbedingung der Komplexe im Elutionspuffer bei einem pH-Wert von 8,0 bei 4°C ist. Je

stärker der pH-Wert vom optimalen pH-Wert abwich, desto sensitiver reagierten die Proteine auf die Temperaturerhöhung. Grundsätzlich ist das ORF313-Fusionsprotein empfindlicher gegenüber pH und Temperatur als Hsp70-1-H6. Nur eine Lagerung bei pH 8 und 4°C garantiert die Stabilität des ORF313-Fusionsproteins über einen Zeitraum von vier Wochen. Nach Umpufferung in PBS pH 7,4 mittels Dialysekassette, verliert das Fusionsprotein an Stabilität, so dass es nach vier Wochen zu 50% abgebaut ist. Mittels Immunpräzipitation wurde nachgewiesen, dass die Integrität der Komplexe kurz nach der Dialyse in PBS pH 7,4 intakt ist. Auch die Ergebnisse nativer Gelelektrophoresen wiesen daraufhin, dass die Komplexe über einen Zeitraum von mindestens fünf Wochen im Elutionspuffer pH 8,0 stabil waren, eine Lagerung in PBS pH 7,4 jedoch schon nach zwei Wochen zur Verringerung der Assoziation führt. Die zuvor beobachtete stärkere Bindung von ORF313-Domäne und Hsp70 in Anwesenheit von ATP, scheint im Kontrast sehr sensitiv gegenüber pH-Veränderungen zu sein. Da sowohl die Einzelkomponenten Hsp70-1-H6 und das Negativkontrollprotein ST-GFP über vier Wochen in PBS pH 7,4 stabil sind, scheint die ORF313-Domäne sich paradoxerweise negativ auf die Stabilität des Fusionsproteins auszuwirken. Zudem scheinen die Degradation und der Komplexzerfall in Zusammenhang zu stehen. Ob eine Dissoziation von Hsp70-1-H6 aus dem Komplex die Degradation des Fusionsproteins hervorruft (also das Fusionsprotein nicht mehr vor Abbau geschützt ist) oder der Abbau des Fusionsproteins die Dissoziation von Hsp70-1-H6 bewirkt, ist nicht ersichtlich.

Als Fazit für den Aufbau des Immunisierungsexperiments kann festgehalten werden, dass die Umpufferung jeweils zeitnah vor der Immunisierung der Mäuse stattfinden muss, damit eine Applikation von intakten Komplexen gewährleistet ist und so die adjuvante Wirkung, die Hsp70 im Komplex entfaltet, gegeben ist.

Nach der Etablierung der Lagerungsbedingungen, die eine Stabilität der Einzelkomponenten und der Fusionsprotein/Hsp70-Komplexe über einen Zeitraum von vier Wochen gewährleisten, wurde der dritte Aspekt dieser Arbeit, die adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70-1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der Hsp70-spezifische Antikörpertiter nur sehr gering ist. Dies zeigt, dass Hsp70 aus *H. polymorpha* in den Mäusen kaum eine Immunantwort auslöst. Hingegen konnte beobachtet werden, dass sich der GFP-spezifische Antikörpertiter erhöht, wenn das ORF313-Fusionsprotein im Komplex mit Hsp70-1-H6 den Mäusen appliziert wurde. Das Adjuvans AbISCO-100 fördert die Antikörperbildung nochmals 130fach. Die Immunisierung mit einem Gemisch von GFP und Hsp70-1-H6, wobei Hsp70-1-H6 keinen Komplex mit dem GFP-Protein bildet, resultierte in einem Titer, der nicht über das Hintergrundlevel hinausgeht. Ebenfalls konnte eine signifikante Steigerung der GFP-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort für Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe gezeigt werden. Die Steigerung konnte jedoch nur in Anwesenheit des Adjuvans AbISCO-100 beobachtet werden. Hsp70-1-H6 hat demnach zusammen mit AbISCO-100 einen synergistischen Effekt auf die GFP-spezifische Antikörperbildung und die CTL-Antwort, vorausgesetzt Hsp70 ist mit dem GFP-Fusionsprotein komplexiert. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein bei denen gezeigt wurde, dass Hsp70 seine adjuvante Wirkung erst im Komplex entfaltet (Wieland *et al.*, 2008; Janetzki *et al.*, 2000; Flechtner *et al.*, 2006; Moroi *et al.*, 2000; Blachere *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2006; Lewis, 2004; Ge *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006). Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe aus *H. polymorpha* induzieren sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort, wobei für letztere ein weiteres Adjuvans (AbISCO-100) benötigt wird. MHC Klasse II Moleküle präsentieren im Allgemeinen mit Epitopen extrazellulärer Herkunft, die von CD4⁺-T-Zellen erkannt werden (Kaufmann *et al.*, 1998). Da die Antikörperbildung der B-Zellen durch CD4⁺-T-Zellen aktiviert wird, die MHC II-präsentierte Antigene erkannt haben, kann davon ausgegangen werden, dass die GFP-Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe wie extrazelluläre Proteine in endosomalen Kompartimenten der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) prozessiert wurden. Nicht komplexiertes GFP löste hingegen keine GFP-spezifische Proliferation der B-Zellen aus. Deswegen ist anzunehmen, dass *H. polymorpha* Hsp70-1-H6, wie bereits für andere Hsp70-Proteine gezeigt (Theriault *et al.*, 2005; Theriault *et al.*, 2006; Delneste *et al.*, 2002) die Endozytose von Hsp70/Antigen-Komplexen in APCs stimuliert. Darüber, ob die Endozytose auch über die für Hsp70 bekannten APC-Zelloberflächenrezeptoren

Lox-1 und CD91 erfolgt, kann nur spekuliert werden. Mittels Injektion applizierte Proteinantigene durchlaufen in den meisten Fällen nicht den MHC Klasse I Weg der Immunantwort und stimulieren keine Produktion spezifischer CD8⁺-T-Zellen. Dies stimmt mit den in diesem Immunisierungsexperiment beobachteten Ergebnissen für die nicht mit Hsp70 assoziierten GFP-Fusionsproteine überein. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass durch injizierte Hsp70/Antigen-Komplexe eine signifikante CTL-Antwort induziert wird. Dies konnte ebenfalls für das Hsp73/T₂₋₇₇-System beobachtet werden (Wieland *et al.*, 2008; Schirmbeck *et al.*, 2003; Schirmbeck *et al.*, 2006). Es scheint, als ob Hsp73 zytosolische Proteine einem anderen Weg für die Antigenprozessierung zuführt. Durch eine Komplexierung mit Hsp70 werden die exogen applizierten Antigene (z. B. T₂₋₇₇-Fusionsproteine) anscheinend anstatt auf MHC Klasse II auf MHC Klasse I Moleküle transferiert. Diese präsentieren die Peptide CD8⁺-T-Zellen, die dann eine zelluläre Immunantwort einleiten. Im Komplex mit Hsp70 wird das Antigen wahrscheinlich in die Zellen aufgenommen und wie ein endogenes Protein prozessiert. Dieses System bietet damit eine interessante Möglichkeit, Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene zu entwickeln. Diese Wirkung konnte bereits für Antigenkomplexe aus bakteriellen und Säugetierzellensystemen gezeigt werden (Wieland *et al.*, 2008). Für Fusionsprotein/Hsp70-1-H6-Komplexe aus *H. polymorpha* ohne zusätzliches Adjuvans konnte hingegen nur eine schwache GFP-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass eine alleinige Verwendung dieser Komplexe für die Stimulierung einer CTL-Antwort unzureichend ist. Durch Zugabe des Adjuvans AbISCO-100 wurde allerdings eine Hsp70-Komplex abhängige Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort initiiert. Diese liegt jedoch zu dreiviertel unter den erzielten CTL-Antworten von T₂₋₇₇-Fusionsproteinen die mit Hsp73 komplexiert sind (Wieland *et al.*, 2008). Die geringere adjuvante Wirkung von *H. polymorpha* Hsp70-Komplexen könnte auf die schwache Stabilität der Komplexe bei einem pH-Wert von $\leq 7,4$ zurückzuführen sein. Darüber hinaus kann über die Stabilität der Komplexe nach der Injektion in die Mäuse keine Aussage getroffen werden, da diese nicht kontrolliert werden kann. Womöglich fördern ähnliche bzw. niedrigere pH-Bedingungen in der Maus den Zerfall der Komplexe. Aufgrund dessen wäre es möglich, dass die geringere Stimulierung der CTL-Antwort auf einem Zerfall der *H. polymorpha* Hsp70-Komplexe basiert.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine Assoziation von *H. polymorpha* Hsp70-1-H6 mit dem Antigen essentiell ist, sowohl eine spezifische Antikörperbildung als auch eine Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort zu fördern. *H. polymorpha* Hsp70-1-H6 hat demnach eine adjuvante Wirkung für komplexierte Peptide, die als Antigen erkannt werden. Für eine effiziente Initiation der CD8⁺-T-Zellantwort müssen die Antigen/Hsp70-1-H6-Komplexe in Kombination mit einem zweiten Adjuvans appliziert werden. Darüber hinaus stimuliert Hsp70-1 alleine keine signifikante Immunantwort, was darauf hindeutet, dass das *H. polymorpha* Chaperon sehr verträglich ist. Es wird einzig eine spezifische Immunantwort gegen das im Komplex vorliegende Antigen ausgelöst. Das *H. polymorpha*-System bietet daher eine interessante Perspektive für die Entwicklung von Impfstoffen, vorzugsweise gegen intrazelluläre Pathogene, mit denen durch Zugabe eines Adjuvans keine ausreichende Immunantwort bzw. Immunschutz erzielt werden kann.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein Hsp70-Interaktionssystem in *Hansenula polymorpha* zu etablieren, bei dem Hsp70-Chaperone mit Antigenen über DnaJ-ähnliche Domänen einen Komplex bilden. Der Komplex dient der Verbesserung der Eigenschaften von Antigenen: Zum einen soll die Komplexierung mit einem Chaperon die fusionierten Zielproteine stabilisieren; zum anderen soll Hsp70 als Adjuvans die Immunantwort gegenüber dem als Antigen wirkendem Fusionsprotein verstärken.

Eine Übertragung des Säuger Hsp73/T₂₋₇₇-Interaktionssystem konnte durch die heterologe Expression von humanem Hsp73 in *H. polymorpha* erzielt werden. Dabei bildet Hsp73 mit dem Fusionsprotein über die DnaJ-ähnliche Domäne T₂₋₇₇ des Tumorantigens (T-Ag) aus SV40 einen Komplex. Die zytosolischen Hsp70-Chaperone Hsp70-1 und Hsp70-2 aus *H. polymorpha* sind hingegen mit der T₂₋₇₇-Domäne nicht kompatibel – es erfolgte keine Interaktion. Eine Anpassung des Systems an die Chaperone Hsp70-1 und Hsp70-2 wurde durch Austauschen der T₂₋₇₇-Domäne gegen homologe *H. polymorpha*-eigene DnaJ-ähnliche Domänen der Proteine ORF12, ORF16 und ORF313 erreicht. Die ORF313-DnaJ-Domäne vermittelte die beste Assoziation mit Hsp70-Proteinen - es wurden Assoziationsverhältnisse von 1:1 erzielt. Die Mutation D→E im für andere Organismen invarianten HPD-Motiv der J-Domäne, inhibierte eine Komplexierung von ORF313-Fusionsproteinen und Hsp70 nicht. Im Gegenteil, die Mutation bewirkte eine vermehrte Assoziation mit Hsp70-Chaperonen, die auf eine Akkumulierung von Hsp70 am HPE-Fusionsprotein hindeutet. ORF12-Fusionsproteine interagierten wie Fusionsproteine ohne DnaJ-ähnliche Domäne nicht mit Hsp70-Proteinen. Die Komplexierung erfolgte ausschließlich über die homologen DnaJ-ähnlichen Domänen. Analysen von drei verschiedenen ORF313-Fusionsproteinen zeigten, dass die Interaktion von Hsp70-Proteinen über die ORF313-Domäne unabhängig vom fusionierten Zielprotein ist. Die Ablösung der Hsp70-Chaperone von ORF313-Fusionsproteinen erfolgte durch ATP nur partiell. Dies zeigte, dass die nicht-kovalente Bindung von Hsp70 und ORF313-Domäne in *H. polymorpha* sehr viel stärker ist, als die zwischen Säuger Hsp73 und T₂₋₇₇-Domäne.

Interaktionsstudien in Säugetierzellen belegen außerdem, dass die *H. polymorpha* DnaJ-ähnlichen Domänen der Proteine ORF12, ORF16 und ORF313 nicht mit dem Säuger Hsp73 kompatibel sind. Es konnte keine Interaktion von Hsp73 mit diesen DnaJ-ähnlichen Domänen gezeigt werden.

Mit Hilfe von Protease-sensitiven Proteinen wurde untersucht, ob durch eine Komplexierung mit Hsp70 ein Schutz vor Proteolyse und somit eine Proteinstabilisierung erfolgt. Die Ergebnisse ergaben, dass eine Interaktion mit Hsp70 keine Proteinstabilisierung bewirkt. Allerdings konnte mit Hilfe dieses Systems erstmals das Hepatitis B E-Antigen (EAg) in *H. polymorpha* nachgewiesen werden. Die Expression scheint jedoch unabhängig von einer Interaktion mit Hsp70-Proteinen zu sein, da sowohl mit fusionierten ORF313- und T₂₋₇₇-Elementen Produktbildung beobachtet werden konnte. Vielmehr scheinen die DnaJ-ähnlichen Domänen die Expression zu fördern, da EAg-Proteine ohne fusionierte DnaJ-Domäne nicht exprimiert werden konnten.

Durch Immunisierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass *H. polymorpha* Hsp70-1 eine adjuvante Wirkung für komplexierte Proteine hat, die als Antigen erkannt werden. Eine Assoziation von Hsp70-1 fördert eine spezifische Antikörperbildung und, in Anwesenheit des Adjuvans AbISCO-100, eine Antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort. Darüber hinaus stimulierte Hsp70-1 alleine nur eine geringe Antikörperbildung und CD8⁺-T-Zellantwort. Hsp70-1 löst einzig eine spezifische Immunantwort gegen das im Komplex vorliegende Antigen aus. Da im *H. polymorpha*-System die Zielproteine individuell austauschbar sind, bietet dieses System eine interessante Perspektive für die Entwicklung verschiedener Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene mit denen durch Zugabe eines einzigen Adjuvans keine ausreichende Immunantwort bzw. Schutz erzielt werden kann.

Summary

The purpose of this dissertation was to establish an expression system in *Hansenula polymorpha*, in which chimeric antigenic proteins with a Hsp70-capturing DnaJ-like domain form stable complexes with Hsp70 *in vivo*. The complex-formation provides an improvement for the antigenic properties of the target protein: on the one hand being complexed with Hsp70-proteins enhances the stability of the fused target protein; on the other hand the natural adjuvant Hsp70 elicits antigen-specific immune responses when complexed with antigenic proteins.

The transfer of the mammalian Hsp73/T₂₋₇₇-system was accomplished by heterologous expression of human Hsp73 in *H. polymorpha*. Here, Hsp73 forms a complex with the fusion protein through the DnaJ-like domain T₂₋₇₇ of the tumorantigen (T-Ag) of SV40. However, the cytosolic *H. polymorpha* Hsp70 chaperones, Hsp70-1 and Hsp70-2, were incompatible with the T₂₋₇₇-domain – no interaction could be detected.

The adaptation of the system to Hsp70-1 and Hsp70-2 was achieved by exchanging the T₂₋₇₇-domain against homologous *H. polymorpha* DnaJ-like domains of the proteins ORF12, ORF16 and ORF313. The ORF313-DnaJ-domain mediated the best association with Hsp70 chaperones – an association ratio of 1:1 was obtained. The mutation D→E for the in other organisms otherwise invariant HPD-motif of the J-domain did not inhibit an interaction of the ORF313-fusion protein and Hsp70. Moreover, the mutation resulted in an even better association with Hsp70 chaperones, which indicates an accumulation of Hsp70 to the fusion proteins. ORF12-fusion proteins, like proteins without a DnaJ-like domain, did not interact with Hsp70. Complexes were formed only in the presence of DnaJ-like domains. Analysis with three different ORF313-fusion proteins demonstrated, that the interaction of Hsp70 with the ORF313-domain is independent of the fused target protein.

The addition of ATP merely resulted in a partial stripping of Hsp70 from the ORF313-fusion proteins. This revealed that the non-covalent bond in *H. polymorpha* between Hsp70 and ORF313-domain is much stronger than the one between Hsp73 and the T₂₋₇₇-domain in mammals.

Interaction studies in cell cultures proved that the *H. polymorpha* DnaJ-like domains of the ORF12-, ORF16- and ORF313-proteins are incompatible with the mammalian Hsp73. An interaction of Hsp73 with any one of the DnaJ-like domains could not be detected.

With protease-sensitive proteins we investigated if complex formation with Hsp70 causes proteolytic protection and hence better protein stability of the fusion protein. The results showed that this is not the case. Being complexed with Hsp70 did not prevent the proteolytic degradation of the fusion protein. However, for the first time the system facilitated the expression of the hepatitis E-antigen (EAg) in *H. polymorpha*. The Expression seems to be independent of an interaction with Hsp70: EAg-product could be detected for fusion proteins with either ORF313-elements or T₂₋₇₇-elements. In fact, the DnaJ-like domains seem to assist protein expression as EAg without a DnaJ-like domain could not be expressed.

Immunisation experiments showed that *H. polymorpha* Hsp70-1 has an adjuvant effect on complexed antigenic proteins. An Hsp70-association provokes an enhanced antigen-specific antibody production and, in the presence of a second adjuvant, AbISCO-100, an antigen-specific CD8⁺ T cell response. Furthermore, Hsp70-1 alone did not stimulate any significant antibody production or a CD8⁺ T cell response. Hsp70-1 only triggers a specific immune response against a complexed antigen. As the target proteins are individually replaceable, the *H. polymorpha* system is an interesting perspective to develop vaccines for intracellular pathogens that fail to stimulate a sufficient immune response with only one adjuvant.

6 Referenzen

Asea A., (2005)

Stress proteins and Initiation of Immune Response: Chaperokine activity of Hsp72. *Exerc. Immunol. Rev.* 11: 34-45.

Asea A., (2006)

Initiation of the immune response by extracellular Hsp72: Chaperokine activity of Hsp72. *Curr. Immunol. Rev.* 2(3): 209-215.

Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch JA., Bare O., Auron PE., Stevenson MA., Calderwood SK., (2002)

Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277: 15028-15034.

Basu S., Binder RJ., Suto R., Anderson KM., Srivastava PK., (2000)

Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NFkappa B pathway. *Int. Immunol.* 12: 1539-1546.

Basu S., Binder RJ., Ramalingam T., Srivastava PK., (2001)

CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303-313.

Becker T., Hartl FU., Wieland F., (2002)

CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158: 1277-1285.

Berjanskii MV., Riley MI., Van Doren SR., (2002)

Hsc70-interacting HPD loop of the J domain of polyomavirus T antigens fluctuates in ps to ns and ms to ms. *J. Mol. Biol.* 321: 503-516.

Binder RJ., Blachere NE., Srivastava PK., (2001)

Heat shock protein chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J. Biol. Chem.* 276: 17163-17171.

Binder RJ., Srivastava PK., (2005)

Peptides chaperoned by heat shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat. Immunol.* 6: 593-599.

Blachere NE., Li Z., Chandawarkar RY., Suto R., Jaikaria NS., Basu S., Udono H., Srivastava PK., (1997)

Heat shock protein-peptide complexes reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J. Exp. Med.* 186: 1315-1322.

Boehm T., Pirie-Shephard S., Trinh LB., Shiloach J., Folkman J., (1999)

Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full length murine and human endostatin. *Yeast* 15: 563-567.

Boisvert DC., Wang J., Otwinowski Z., Horwich AL., Sigler PB (1996)

The 2.4A crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP- γ -S. *Nature Struct. Biol.* 3: 170-177.

Bolliger L., Deloche O., Glick B.S., Georgopoulos C., Jeno P., Kronidou N., Horst M., Morishima N., Schatz G., (1994)

A mitochondrial homologue of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.* 13: 1998-2006.

Boorstein WR., Ziegelhoffer T., Craig EA., (1994)

J. Mol. Evol. 38: 1-17.

Brehmer D., Rüdiger S., Gässler CS., Klostermeier D., Packschies L., Reinstein J., (2001)

Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.* 8: 427-432.

Briknarova K., Takayama S., Brive L., Havert ML., Knee DA., Velasco J., (2001)

Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* 8: 349-352.

Brodsky JL., Pipas JM., (1998)

Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J. Virol.* 72: 5329-5334.

Bruce, BD., Churchich J., (1997)

Characterization of the molecular-chaperone function of the heat-shock-cognate-70-interacting protein. *Eur. J. Biochem.* 245: 738-744.

Buchberger A., Theyssen H., Schroder H., McCarty JS., Virgallita G., Milkereit P., Reinstein J., Bukau B., (1995)

Nucleotide induced conformational changes in the ATPase and substrate binding domains of the DnaK chaperone provide evidence for interdomain communication. *J. Biol. Chem.* 270: 16903-16910.

Bukau, B., Horwich, AL., (1998)

The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.

Caplan AJ., Douglas MG., (1991)

Characterization of Ydj1: A yeast homologue of the bacterial DnaJ protein. *J. Cell Biol.* 114: 609-621.

Cheetham ME., Caplan AJ., (1998)

Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* 3: 28–36.

Cho BK., Palliser D., Guillen E., Wisniewski J., Young RA., Chen J., Eisen HN., (2000)

A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins. *Immunity* 12: 263–272.

Corsi AK., Schekman R., (1997)

The lumenal domain of Sec63p stimulates the ATPase activity of BiP and mediates BiP recruitment to the translocon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 137: 1483–1493.

Craig EA., Eisenman HC., Hundley HA., (2003)

Ribosome-tethered molecular chaperones: the first line of defence against protein misfolding? *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 157–162.

Delneste Y. et al., (2002)

Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* 17: 353–362.

Deloche O., Kelly W.L., Georgopoulos C., (1997)

Structure-function analyses of Ssc1p, Mdj1p and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 6066–6075.

Diesel A., (1997)

Die hsp70-Gene der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha*. Inaugural Dissertation.

Dobson C.M., Sali A., Karplus M., (1998)

Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angewandte Chemie.* 110: 908–935.

Dragovic Z., Broadley SA., Shomura Y., Bracher A., Hartl FU., (2006)

Molecular chaperones of the Hsp110 family act as nucleotide exchange factors of Hsp70s. *EMBO J.* 25: 2519–2528.

Dragovic Z., Shomura Y., Tzvetkov N., Hartl FU, Bracher A., (2006)

Fes1p acts as a nucleotide exchange factor for the ribosome-associated molecular chaperone Ssb1p. *Biol. Chem.* 387 (12): 1593–1600.

Eggeling L., Sahn H., (1978)

Derepression and partial insensitivity to carbon catabolite repression of the methanol-dissimilating enzymes in *Hansenula polymorpha*. *Eur. J. Microb. Biotechnol.* 5: 197–202.

Egli T., van Dijken JP., Veenhuis M., Harder W., Fichter A., (1980)

Methanol metabolism in yeast: Regulation of the synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Microbiol.* 124: 115–121.

Ellis RJ., (2000)

Chaperone substrates inside the cell. *Trends Biochem. Sci.* 25: 210–212.

Enomoto Y., Bharti A., Khaleque AA., Song B., Liu C., Apostolopoulos V., Xing PX., Calderwood SK., Gong J. (2006)

Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J. Immunol.* 177: 5946–5955.

Evers M., Huhse B., Titokrenko VI., (1993)

Affinity purification of molecular chaperones of the yeast *Hansenula polymorpha* using immobilized denatured alcoholoxidase. *FEBS Letters* 321: 32–36.

Fernandez JM., Hoeffler JP., (1999)

Gene expression systems, using nature for the art of expression. *Academic Press San Diego*.

Fink AL., (1999)

Chaperone-Mediated Protein Folding. *Phys. Rev.* 79 (2): 425–449.

Fissolo NM., (2004)

Exploring the potential of novel multivalent DNA-based vaccines. Inaugural Dissertation.

Flaherty KM., Deluca-Flaherty C., McKay DB., (1990)

Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 46: 623–628.

Flechtner JB., Cohane KP., Mehta S., Slusarewicz P., Leonard AK., Barber BH., Levey DL., Andjelic S., (2006)

High-affinity interactions between peptides and heat shock protein 70 augment CD8⁺ T lymphocyte immune responses. *J. Immunol.* 177: 1017–1027.

Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE., (1989)

Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 245: 85–390.

Gässler CS., Wiederkehr T., Brehmer D., Bukau B., Mayer MP., (2001)

Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration dependent as positive and negative cofactor. *J. Biol. Chem.* 276: 32538–32544.

- Gatzke R., Weydemann U., Janowicz ZA., Hollenberg CP., (1995)**
Stable multicopy integration of vector sequences in *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 844-849.
- Gautschi M., Lilie H., Fünfschilling U., Mun A., Ross S., Lithgow T., Rücknagel, P., Rospert S., (2001)**
RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zutin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 3762–3767.
- Ge F., Qiu Y., Gao X., Yang Y., Chen P., (2006)**
Fusion expression of major antigenic segment of JEV E protein-hsp70 and the identification of domain acting as adjuvant in hsp70. *Vet. Immunol. and Immunother.* 113: 288-296.
- Gellissen G., Hollenberg CP., (1999)**
Hansenula. In Robinson RK, Batt CA, Patel PD (eds) Encyclopedia of Food Microbiology. *Academic Press.* 2: 976-982.
- Gellissen G., Hollenberg CP., Janowicz ZA., (1995)**
Gene expression in methylotrophic yeast, in: Gene expression in recombinant Microorganisms (Smith A, Ed). Marcel Dekker, New York, pp 195- 239.
- Gellissen G., Strasser WM., Melber K., Meckelbach A., Weydeman U., Keup P., Dahlems U., Piontek M., Hollenberg CP., Janowicz ZA., (1990)**
Die methylotrophe Hefe *Hansenula polymorpha* als Expressionssystem für heterologe Proteine. *Bioeng.* 5: 20-26.
- Gleeson MAG., White CE., Meininger DO., Komives EA., (1998)**
Generation of protease deficient strains and their use in heterologous protein expression. *Methods Mol. Biol.* 103: 81-94.
- Greene M., Makos K., Landry SJ., (1998)**
Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6108–6113.
- Gruschus J.M., Greene LE., Eisenberg E., Ferretti JA., (2004)**
Experimentally based model structure of the hsc70/auxilin complex: Substrate transfer and interdomain structural change. *Protein Sci.* 3: 2029–2044.
- Gu QL., Huang X., Ren WH., Shen L., Kiu BY., Chen AY., (2007)**
Targeting hepatitis B virus antigens to dendritic cells by heat-shock protein to improve DNA Vaccine potency. *World J. Gastroenterol.* 13 (44): 5911-5917.
- Ha JH., Johnson ER., McKay DB., Sousa MC., Takeda S., Wilbanks SM., (1999)**
Structure and mechanism of Hsp70 proteins. In: *Molecular Chaperones and Folding Catalysts Regulation, Cellular Function and Mechanism*, pp. 573–607. Bukau B. (ed.), Harwood Academic Publishers, Amsterdam
- Harrison CJ., Hayer-Hartl M., Di Liberto M., Hartl F-U., Kuriyan J., (1997)**
Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science* 276: 431–435.
- Hartl FU., (1996)**
Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.
- Hattori H., Kaneda T., Lokeshwar B., Laszlo A., Ohtsuka K., (1993)**
A stress-inducible 40 kDa protein (hsp40): purification by modified two-dimensional gel electrophoresis and co-localization with hsc70 (p73) in heat-shocked HeLa cells. *J.Cell Sci.* 104: 629–638.
- Hendershot L., Wie J., Gaut J., Melnick J., Aviel S., Argon Y., (1996)**
Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5269–5274.
- Hennessy F., Cheetham ME., Dirr HW., Blatch GL., (2000)**
Analysis of the levels of conservation of the J domain among the various types of DnaJ-like proteins. *Cell Stress Chaperones* 5: 347-358.
- Hennessy F., Nicoll WS., Zimmermann R., Cheetham ME., Blatch GL., (2005)**
Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Prot. Science.* 14: 1697-1709.
- Herendeen SL., Van Bogelen RA., Neidhardt FC., (1979)**
Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* 139: 185-194.
- Hightower LE., Sadis SE., Takenaka IM., (1994)**
The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, edited by R. I. Morimoto, A. Tissieres & C. Georgopoulos, pp. 179–207. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hinnen A., Buxton F., Chaudhuri B., Heim J., Hottinger T., Meybeck B., Pohlig G., (1995)**
Gene expression in recombinant yeast, in: Gene Expression in Recombinant Microorganisms (Smith A, Ed). Marcel Dekker, New York, pp 121-193.
- Hohfeld J., Jentsch S., (1997)**
GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.* 16: 6209–6216.

Hohfeld J., Minami Y., Hartl FU., (1995)

Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* 83: 589–598.

Horwich AL., Fenton WA., Chapman E., Farr GW., (2007)

Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 23:115-145.

Huang K., Ghose R., Flanagan JM., Prestegard JH., (1999)

Backbone dynamics of the N-terminal domain in *E. coli* DnaJ determined by 15N- and 13CO-relaxation measurements. *Biochemistry* 38: 10567–10577.

Huang P., Gautschi M., Walter W., Rospert S., Craig EA., (2005)

The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 497–504.

Inis MA., Gelfand DH., Sninski JJ., White JT., (1990)

PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academ. Press Inc.*

James P., Pfund C., Craig EA. (1997)

Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science* 275: 387–389.

Jenkins N., Parekh RB., James DD., (1996)

Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotechnol.* 14: 975-981.

Jiang J., Lafer EM., Sousa R., (2006)

Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone. *Struct. Biol. and Crystallization Communic.* F62: 39-43.

Janowicz ZA., Melber K., Merckelbach A., Jacobs E., Harford N., Comberbach M., Hollenberg CP. (1991)

Simultaneous expression of the S and L surface antigens of Hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 7: 431-443.

Jiang J., Prasad K., Lafer EM., Sousa R., (2005)

Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 Chaperone. *Mol. Cell* 20: 513-524.

Jones G., Masison DC., (2000)

A role for cytosolic hsp70 in yeast [PSI(+)] prion propagation and [PSI(+)] as a cellular stress. *Genetics* 163: 495–506.

Johnson BD., Schumacher RJ., Ross ED., Toft DO., (1998)

Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 3679–3686.

Jordan R., McMacken R., (1995)

Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 270: 4563-4569.

Kabani M., Beckerich JM., Brodsky JL., (2002)

Nukleotide Exchange Factor fort he Yeast Hsp70 Molecular Chaperone Ssa1p. *Molecular and Cellular Biology* 22(13): 4677-4689.

Kabani M., Beckerich JM. and Gaillardin C., (2000)

Sis1p stimulates Sec63p-mediated activation of Kar2p in a conformation-dependent manner in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6923–6934.

Kammerer R., Stober D., Riedl P., Oehninger C., Schirmbeck R., Reimann J., (2002)

Noncovalent association with stress protein facilitates cross-priming of CD8+ T cells to tumor cell antigens by dendritic cells. *J Immunol.* 168: 108-117.

Kang HA., Sohn J-H., Choi E-S., Chung B-H, Yu M-H., Rhee SK., (1998)

Glycosilation of human α 1- antitrypsin in *Saccharomyces cerevisiae* and methylotrophic yeast. *Yeast* 14: 371-381.

Karzai AW., McMacken R., (1996)

A bipartite signalling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the *Escherichia coli* DnaK Protein. *J. Biol. Chem.* 271: 11236–11246.

Kaufmann SHE., (1998)

Immunity to intracellular bacteria, p. 1345–1381. In W. E. Paul (ed.), *Fundamental immunology*, 4th ed., Lippincott-Raven, New York, N.Y.

Kelley WL., Georgopoulos C., (1997)

The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J domain of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 3679-3684.

Kim S., Schilke B., Craig EA., Horwich AL., (1998)

Folding *in vivo* of a newly translated yeast cytosolic enzyme is mediated by the SSA class of cytosolic yeast Hsp70 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 12860–12865.

Kluck CJ., Patzelt H., Genevaux P., Brehmer D., Rist W., Schneider-Mergener J., Bukau B. and Mayer MP., (2002)

Structure-function analysis of HscC, the *Escherichia coli* member of a novel subfamily of specialized Hsp70 chaperones. *J. Biol. Chem.* 277: 41060–41069.

Kurtzman CP., (1984)

Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. Antoine van Leeuwenhoek. The Netherlands, pp413-419.

Lamb JR. et al. (1989)

Stress proteins might provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol.* 1: 191-196.

Lancaster GI., Moller K., Nielsen B., Secher NH., Febbraio MA., Nybo L., (2004)

Exercise induces the release of heat shock protein 72 from the human brain in vivo. *Cell Stress Chaperones* 9: 276-280.

Landry SJ., (2003)

Structure and energetics of an allele-specific interaction between DnaJ and DnaK: Correlation of nuclear magnetic resonance chemical shift perturbations in the J-domain of Hsp40/DnaJ with binding affinity for the ATPase domain of Hsp70/DnaK. *Biochemistry* 42: 4926-4936.

Laufen T., Mayer MP., Beisel C., Klostermeier D., Reinstein J., Bukau B., (1999)

Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ co-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5452-5457.

Laufen T., Zuber U., Buchberger A., Bukau B., (1998)

DnaJ proteins In: *Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins*, edited by A. L. Fink and Y. Goto. New York: Dekker, 1998, p. 241-274.

Lee DH., Sherman MY., Goldberg AL., (1996)

Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4773-4781.

Lewis JJ., (2004)

Therapeutic cancer vaccines: Using unique antigens. *PNAS.* 101 (2): 14653-14656.

Li D., Li H., Zhang P., Wu X., Wie H., Wang L., Wan M., Deng P., Zhang Y., Wang J., Yu Y., Wang L., (2006)

Heat shock fusion protein induces both specific and nonspecific anti-tumor immunity. *Eur. J Immunol.* 36: 1324-1336.

Liberek K., Marszalek J., Ang D., Georgopoulos C., Zylicz M., (1991)

Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2874-2878.

Lottspeich F., Zorbach H. (1998)

Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag.

Lu, Z. and Cyr, DM., (1998)

The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone YDJ1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273: 5970-5978.

Janetzki S., Palla D., Rosenhauer V., Loch H., Lewis JJ., Srivastava PK., (2000)

Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparation: a pilot study. *Int. J. Cancer* 88: 232-238.

Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J., (1982)

Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

Matlack KES., Misselwitz B., Plath K., Rapoport TA., (1999)

BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-factor across the ER membrane. *Cell* 97: 553-564.

Mayer MP., Bukau B., (2005)

Review Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS* 62: 670-684.

Mayer MP., Laufen T., Paal K., McCarty JS., Bukau B., (1999)

Investigation of the interaction between DnaK and DnaJ by surface plasmon resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 289: 1131-1144.

Mayer M.P., Schroder H., Rudiger S., Paal K., Laufen T., Bukau B., (2000)

Multistep mechanism of substrate binding determines chaperone activity of Hsp70. *Nat. Struct. Biol.* 7: 586-593.

McCarty JS., Buchberger A., Reinstein J., Bukau B., (1995)

The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J. Mol. Biol.* 249: 126-137.

Misselwitz B., Staack O. and Rapoport TA J., (1998)

Proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol. Cell* 2: 593-603.

Moroi Y., Mayhew M., Trcka J., Hoe MH., Takechi Y., Hartl FU., Rothman JE., Houghton AN., (2000)

Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 97: 3485-3490.

Munk ME. et al. (1989)

T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. *J. Immunol.* 143: 2844-2849.

- Nelson RJ., Zeigelhoffer T., Nicloet C., Werner-Washburne M., Craig EA., (1992)**
The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 71: 97–105.
- Neupert W., (1997)**
Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 863–917.
- Oh HJ., Easton D., Murawski M., Kaneko Y., Subject JR., (1999)**
The chaperoning activity of Hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J. Biol. Chem.* 274: 15712–15718.
- Ohtsuka K., Masuda A., Nakai A., Nagata K., (1990)**
A novel 40-kDa protein induced by heat shock and other stresses in mammalian and avian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166: 642–647.
- Oka M., Nakai M., Endo T., Lim CR., Kimata Y., Kohno K., (1998)**
Loss of Hsp70-Hsp40 chaperone activity causes abnormal nuclear distribution and aberrant microtubule formation in M-phase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273: 29727–29737.
- Palleros DR., Reid KL., Shi L., Welch WJ., Fink AL., (1993)**
ATP-induced protein Hsp70 complex dissociation requires K1 but not ATP hydrolysis. *Nature* 365: 664–666.
- Packschies L., Theyssen H., Buchberger A., Bukau B., Goody RS., Reinstein J., (1997)**
GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry* 36: 3417–3422.
- Patentanmeldung:** Method for the production of (poly)peptides. EP98950105.1
- Pellecchia M., Szyperski T., Wall D., Georgopoulos C., Wüthrich K., (1996)**
NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the *Escherichia coli* DnaJ chaperone. *J. Mol. Biol.* 260: 236–250.
- Pfund C., Hoyo-Lopez N., Ziegelhoffer T., Schilke BA., Lopez-Buesa P., Walter WA., Wiedmann M., Craig EA., (1998)**
The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J.* 17: 3981–3989.
- Pockley G., Muthana M., Calderwood SK., (2007)**
The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochem. Sci.*
- Przepiorka D., Srivastava PK. (1998)**
Heat shock protein complexes as immunotherapy for human cancer. *Mol Med Today.* 4: 478–484.
- Qian YQ., Patel D., Hartl FU., McColl DJ., (1996)**
Nucleic Magnetic Resonance solution structure of the human Hsp40 HDJ-1 J domain. *J. Mol. Biol.* 260: 224–235.
- Raviol H., Sadlish H., Rodriguez F., Mayer MP., Bukau B., (2006)**
Chaperone network in the yeast cytosol: Hsp110 is revealed as an Hsp70 nucleotide exchange factor. *EMBO J.* 25: 2510–2518.
- Reimann J., Schirmbeck R., (2004)**
DNA vaccines expressing antigens with stress protein-capturing domain display enhanced immunogenicity. *Immunol. Rev.* 199: 54–67.
- Riedl P., Fissolo N., Reimann J., Schirmbeck R., (2006)**
A stress protein-facilitated antigen expression system for plasmid DNA vaccines. *Methods Mol. Med.* 127: 41–53.
- Rodriguez L., Narciandi RE., Roca H., Cremata J., Montesinos R., Rodriguez E., Grillo JM., Muzio V., Herrera LS., Delgado JM., (1996)**
Invertase secretion in *Hansenula polymorpha* under the AOX1 promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast* 12: 815–822.
- Arnold-Schild D., Hanau D., Spehner D., Schmid C., Rammensee H-G., de la Salle H., Schild H., (1999)**
Receptor mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162: 3757–3760.
- Schild H., Arnold-Schild D., Lammert E., Rammensee H-G., (1999)**
Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 109–113.
- Schirmbeck R., Fissolo N., Chaplin P., Reimann J., (2003)**
Enhanced priming of multispecific, murine CD8+ T cell responses by DNA vaccines expressing stress protein-binding polytope peptides. *J. Immunol.* 171: 1240–1246.
- Schirmbeck R., Reimann J., (1994)**
Peptide transporter-independent, stress protein mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur. J. Immunol.* 24: 1478–1486.
- Schirmbeck R., Kwissa M., Fissolo N., Elkholy S., Riedl P., Reimann J., (2002)**
Priming polyvalent immunity by DNA vaccines expressing chimeric antigens with a stress protein-capturing, viral J-domain. *FASEB J.* 16: 1108–1110.

- Schlenstedt G., Harris S., Risse B., Lill R., Silver PA., (1995)**
A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J. Cell Biol.* 129: 979-988.
- Schumacher RJ., Hansen WJ., Freeman BC., Alnemri E., Litwack G., Toft DO., (1996)**
Cooperative action of Hsp70, Hsp90 and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry* 35: 14889-14898.
- Shaner L., Sousa R., Morano KA., (2006)**
Characterization of Hsp70 Binding and Nucleotide Exchange by the Yeast Hsp110 Chaperone Sse1. *Biochem.* 45: 15075-15084.
- Sondermann H., Scheufler C., Schneider C., Hohfeld J., Hartl FU., Moarefi I., (2001)**
Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science* 291: 1553-1557.
- Srivastava PK., (2005)**
Immunotherapy for human cancer using heat shock protein-peptide complexes. *Curr. Oncol. Rep.* 7: 104-108.
- Srivastva PK., (2002)**
Interaction of heat-shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 395-425.
- Stone DE., Craig EA., (1990)**
Self-regulation of 70-kilodalton heat shock proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1622-1632.
- Suh W-C., Lu CZ., Gross CA., (1999)**
Structural features required for the interaction of the Hsp70 molecular chaperone DnaK with its cochaperone DnaJ. *J. Biol. Chem.* 274: 30534-30539.
- Shulga N., Roberts P., Gu S., Spitz L., Tabb MM., Nomura M., Goldfarb DS., (1996)**
In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J. Cell Biol.* 135: 329-339.
- Suto R., Srivastava PK., (1995)**
A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269: 1585-1588.
- Szabo A., Korszun R., Hartl FU., 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.
- Theriault JR., Mambula SS., Sawamura T., Stevenson MA., Calderwood SK., (2005)**
Extracellular HSP70 binding to surface receptors present on antigen presenting cells and endothelial/epithelial cells. *FEBS Lett.* 579: 1951-1960.
- Theriault JR. et al., (2006)**
Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J. Immunol.* 177: 8604-8611.
- Titorenko VI., Evers ME., Diesel A., Samyn B., van Beeumen J., Roggenkamp R., Kiel JAKW., van der Klei I., Veenhuis M., (1996)**
Identification and Characterization of cytosolic *Hansenula polymorpha* Proteins Belonging to the Hsp70 Protein Family. *Yeast* 12: 849-857.
- Todryk SM., Gough MJ., Pockley G., (2003)**
Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunol.* 110: 1-9.
- Tsai J., Douglas MG., (1996)**
A conserved HPDsequence of the J-domain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271: 9347-9354.
- Ungewickell E., Ungewickell H., Holstein SE., Lindner R., Prasad K., Barouch W., Martin B., Greene LE., Eisenberg E., (1995)**
Role of auxilin in uncoating clathrincoated vesicles. *Nature* 378: 632-635.
- Veenhuis M., van Dijken JP., Harder W., (1983)**
The significans of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Micro Phys.* 24: 1-82.
- Wang H., Kurochkin AV., Pang Y., Hu W., Flynn GC., Zuiderweg ER., (1998)**
NMR solution structure of the 21 kDA chaperone protein DnaK substrate binding domain: a preview of chaperone protein interactions. *Biochemistry* 37: 7929-7940.
- Wang H-H., Mao C-Y., Teng L-S., Cao J., (2006)**
Recent advantages in heat shock protein-based cancer vaccines. *Hepatobiliary & Pancreatic diseases International* 5 (1): 22-27.
- Werner-Washburne M., Stone DE., Craig EA., (1987)**
Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2568-2577.

Wei J., Gaut JR., Hendershot LM., (1995)

In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 270: 26677–26682.

Weitzmann A., (2006)

Untersuchungen zur Rolle der Komponenten der Hsp70/Hsp40-Chaperonsysteme im Cytosol und Endoplasmatischen Retikulum der Pankreaszelle. Inaugural Dissertation.

Wells AD., Malkovsky M., (2000)

Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol. Today.* 21: 129–132.

Wickerham LJ., (1951)

Taxonomy of yeasts. Technical Bulletin 1029, US Dept. Agric., Washington DC, USA, pp1-56.

Wickerham, Sydow (1970)

The Yeasts, a Taxonomic Study 2nd Edn (LodderJ, Ed). North Holland, Amsterdam, The Netherlands, pp 226-315.

Wiedemann N., Frazier AE., Pfanner N., (2004)

The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279: 14473–14476.

Wieland A., Denzel M., Schmidt E., Kochanek S., Kreppel F., Reimann J., Schirmbeck R., (2008)

Recombinant complexes of antigen with stress proteins are potent CD8 T-cell-stimulating immuogens. *J. Mol. Med.*86(9): 1067-1079.

Wittung-Stafshede P., Guidry J., Horne BE., Landry SJ., (2003)

The J domain of Hsp40 couples ATP hydrolysis to substrate capture in Hsp70. *Biochemistry* 42: 4937–4944.

Young BP., Craven RA., Reid PJ., Willer M., Stirling CJ., (2003)

Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMB.* 20 (1&2): 262-271.

Zang Y., Zuiderweg ER., (2004)

The 70 kDa heat shock protein chaperone nucleotide-binding domain in solution unveiled as a molecular machine that can reorient its functional subdomains. *Proc Natl. Acad.Sci. USA.* 101: 10272-10277.

Zhang H., Wang W., Li Q., Huang W., (2006)

Fusion protein of ATPase domain of Hsc70 with TRP2 acting as a tumor vaccine against B16 melanoma. *Immunol. Lett.* 105: 167–173.

Zhu X., Zhao X., Burkholder WF., Gragerov A., Ogata CM., Gottesman ME., Hendrickson WA., (1996)

Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* 272: 1606–1614.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, Mai 2009

Pia Bernsmeier

Danksagung

Ich danke der Firma Rhein Biotech GmbH für die Überlassung des Themas.

Ich danke Herrn Prof. Dr. C.P. Hollenberg für die Übernahme des Referats, der Betreuung und die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. J.F. Ernst für die Übernahme des Referats.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Wagner für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Herrn Dr. M. Suckow für die Betreuung dieser Arbeit in der Rhein Biotech GmbH, sein Engagement und für die Mühe, die er sich bei der Durchsicht des Manuskriptes gemacht hat.

Ich danke Prof. R. Schirmbeck für die Unterstützung und die Co-Operation bei der Durchführung der Immunisierungsexperimente und der Zellkulturversuche.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Kollegen der Firma Rhein Biotech für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Ganz besonderes möchte ich Nico danken, der mich trägt und immer wieder zum Lachen bringt.