

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der ER- Proteintranslokase

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von: Carsten Burgard

geb. am: 01.04.1976 in St. Ingbert

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	5
3	EINLEITUNG	7
3.1	Transport von Proteinen in das Lumen des ER	8
3.1.1	Das Ribosom.....	8
3.1.2	Transportsignale für den Transport ins ER	10
3.1.3	Der cotranslationale Proteintransport in das ER.....	11
3.1.4	Der posttranslationale Proteintransport in das ER.....	13
3.1.5	Der Sec61- Komplex	16
3.1.6	Der Sec- Komplex	18
3.1.7	Das TRAM Protein	18
3.1.8	Interaktionen der Hsp70/Hsp40 Chaperone und Nukleotidaustauschfaktor im ER.....	19
3.1.9	Posttranslationale Modifikationen der Polypeptidkette	22
3.1.10	Der Signalpeptidase-Komplex.....	22
3.2	Zielsetzung der Arbeit	23
4	MATERIAL UND METHODEN	25
4.1	Materialien	25
4.1.1	Chemikalien.....	25
4.1.2	Geräte	26
4.2	Methoden	27
4.2.1	Probenvorbereitung nach Laemmli	27
4.2.2	Präparation einer 5,5 %igen Digitonin-Lösung	27
4.2.3	große SDS-Gele.....	28
4.2.4	kleine SDS- Gele.....	29
4.2.5	Harnstoff-SDS-PAGE.....	30
4.2.6	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Western-Blot)	31
4.2.7	Immunologische Detektion von auf eine PVDF-Membran transferierten Proteinen	32
4.2.8	Fällung von Proteinen nach Wessel/Flügge	32
4.2.9	Aceton/ Methanol-Fällung von Proteinen.....	33
4.2.10	Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant Blue	33
4.2.11	Proteinfärbung mit Silber.....	34
4.2.12	Phosphorimaging, Densitometrie und Detektion der Fluoreszenz.....	35
4.2.13	Präparation von rauen Mikrosomen aus Hundepankreas	36

Inhaltsverzeichnis

4.2.14	Präparation von Puromycin- und Salz gewaschenen Hundepankreasmikrosomen.....	39
4.2.15	Puromycin/ Kaliumacetat - Behandlung von Ribosomen.....	40
4.2.16	RNaseA - Behandlung von Ribosomen	41
4.2.17	Trennung der ribosomalen Untereinheiten	41
4.2.18	Isolierung des Sec61- Komplexes aus Hundepankreasmirkrosomen	42
4.2.19	Vorbereitung der Säulen	45
4.2.20	Affinitätsreinigung von polyklonalen Peptidantikörpern	45
4.2.21	Isolierung des Sec61- Komplexes aus PK-RM.....	48
4.2.22	Isolierung von Grp170 und BiP aus Prä- Extrakten	50
4.2.23	Vorbereitung der ATP- Agarose Säule und der Probe	51
4.2.24	<i>In vitro</i> - Synthese des Präprolactin 86mer (=ppL86) Transkripts	52
4.2.25	<i>In vitro</i> - Synthese des Präprolactin (=ppL) Transkripts.....	53
4.2.26	<i>In vitro</i> - Synthese und ³⁵ S- Markierung von Proteinen in Kaninchen Retikulocytenlysat	53
4.2.27	<i>In vitro</i> - Synthese von fluoreszierenden Proteinen in Kaninchen Retikulocytenlysat	54
4.2.28	Sequestrierungstest	55
4.2.29	Translation und Prozessierung von ppL in Anwesenheit der beiden Ringfraktionen	
	(UR und OR) sowie von RM.....	57
4.2.30	Multi-Angle Light Scattering (MALS).....	59
4.2.31	Dynamische Lichtstreuung.....	60
4.2.32	Das spezifische Brechungsindexinkrement	61
4.2.33	Asymmetrische Feldflussfraktionierung	62
4.2.34	Anwendungen der AFFF/MALS	65
4.2.35	Adsorptionstest des Sec61- Komplex an die AFFF- Membranen.....	66
4.2.36	Bindungseigenschaften der verschiedenen AFFF- Membranen zum Sec61- Komplex	66
4.2.37	Gelfiltration	51
4.2.38	Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie	67
5	ERGEBNISSE.....	71
5.1	Isolierung und Charakterisierung von Ribosomen aus Hundepankreas	71
5.1.1	Trennung der ribosomalen Untereinheiten	72
5.1.2	Bestimmung der molaren Masse und des hydrodynamischen Radius der Ribosomen ... und ihrer Untereinheiten.....	73
5.2	Isolierung und Charakterisierung des Sec61- Komplexes.....	77
5.2.1	Isolierung über Ionenaustauschchromatographie.....	77
5.2.2	Isolierung über Affinitätschromatographie	82
5.2.3	Der dn/dc- Wert von Digitonin	86
5.2.4	Messung der minimal detektierbaren Digitoninkonzentration	88
5.2.5	Bindungseigenschaften der verschiedenen AFFF- Membranen zum Sec61- Komplex.	89
5.2.6	Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61- Komplexes	91
5.2.7	Der Sec61- Komplex aus Hundepankreasmikrosomen bindet an die	95

Inhaltsverzeichnis

Membranen des AFFF- Kanals	95
5.2.8 Charakterisierung der Interaktion zwischen Ribosom und dem Sec61- Komplex	96
5.2.9 Synthese von fluoreszierendem ppL86mer	101
5.3 Isolierung und Charakterisierung von Grp170 und BiP	102
5.3.1 Isolierung von Grp170 und BiP	103
5.3.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens von BiP und Grp170.....	106
5.3.3 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades und des hydrodynamischen Radius des Hsp70- Chaperons BiP	110
6 DISKUSSION	111
6.1 Charakterisierung der Ribosomen und ihrer Untereinheiten	111
6.2 Isolierung des Sec61- Komplexes	113
6.3 Charakterisierung von Digitonin.....	114
6.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des heterotrimeren Sec61- Komplexes...	116
6.5 Interaktion zwischen Ribosom und dem Sec61- Komplex.....	121
6.6 Die Synthese des fuoreszierende ppL86 war für weitere Untersuchungen nicht ausreichend	126
6.7 Grp170 und BiP interagieren in Abwesenheit von ATP.....	127
7 LITERATURVERZEICHNIS	133
8 DANKSAGUNG	141
9 LEBENS LAUF	142

1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichts/Volumenprozent
Å	Angström
AA	Aminosäure, Aminosäurereste
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
AMPS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriophosphat
BAA	Bisacrylamid
bidest.	bidestilliertes
BiP	„immunoglobulin heavy chain binding protein“
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTP	Cytosintriophosphat
d. h.	das heißt
dest.	destilliertes
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriophosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie

Abkürzungsverzeichnis

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum-assoziiertes Proteinabbau
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> = und andere
Fc	Flusszelle
FRET	„Fluorescence Resonance Energy Transfer“
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotidaustauschfaktor
Grp170	„Glucose-regulated protein 170“ (kDa)
Grp78 (BiP)	„Glucose-regulated protein 78“ (kDa)
Grp94	„Glucose-regulated protein 94“ (kDa)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde/n
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
Hsc	Konstitutiv exprimiertes Hitzeschockprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunoglobulin
Kar2	„Karyogamie-Mutante“ 2
KD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar, Mol pro Liter
mA	Milliampère
MDa	Megadalton
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute/n
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MVP	Mikrosomenverdünnungspuffer

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
NMR	„Nuclear Magnetic Resonance“
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
p.a.	per Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PK	ProteinaseK
PK-RM	Puromycin- und KCl-gewaschene RM
PL	Proteoliposomen
pL	Prolaktin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
ppL	Präprolaktin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RM	Rauhe Mikrosomen (Hundepankreasmikrosomen)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonukleaseinhibitor
RNC	Ribosom-naszierende Kette-Komplex
RP	Retikuloplasma (Gesamtfraktion der luminalen Proteine des Säuger-ER)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RU	response unit
s	Sekunde/n
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	surface plasmon resonance
SRP	„Signal Recognition Particle“
TA	tailanchored (Protein)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung

Abkürzungsverzeichnis

TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	Transmembran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	„transfer“-RNA
TX-100	TritonX-100
U Unit,	relative Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UPR	„Unfolded Protein Response“
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

2 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war es, verschiedene Komponenten der ER- Proteintranslokase strukturell und funktionell zu charakterisieren. Für die Charakterisierung kamen verschiedene biophysikalische Methoden zum Einsatz, die es ermöglichen, den hydrodynamischen Radius, die molare Masse und die Bindung zweier Interaktionspartner direkt zu messen. Für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius und die molaren Masse kamen die Methoden der Mehrwinkel- und dynamischen Lichtstreuung (MALS und QUELS) zum Einsatz. Für die Untersuchung der Interaktion von Ribosom und Sec61- Komplex wurde die SPR- Spektroskopie verwendet.

Die molare Masse des 80S Ribosoms wurde mit 3,6 MDa, die der großen Untereinheit mit 2,5 MDa und die der kleinen Untereinheit mit 1,4 MDa bestimmt. Die hydrodynamischen Radien lagen bei 18,25 nm (80S Ribosom), 7,54 nm (40S Ribosom) und 14,45 nm (60S Ribosom). Dies ist die erste direkte Messung der molaren Masse und der Radien der Ribosomen, die mit der Kombination aus MALS, QUELS und asymmetrischer Feldflussfraktionierung (AFFF) durchgeführt wurde.

Zur Bestimmung des dn/dc - Wertes von Digitonin wurden $2,5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3}$ g/ml Digitonin in einem RI- Detektor im Batch- Verfahren vermessen. Der gemessene dn/dc - Wert lag bei 0,153. Dieser Wert ist für die Bestimmung der molaren Masse von Membranproteinen essentiell. Um Mizellen während einer Messung mit der kombinierten MALS- und AFFF- Technik detektieren zu können, muss mindestens $132 \mu\text{g}$ Digitonin/ $30 \mu\text{l}$ (= $4,4 \text{ mg/ml}$ = $0,44 \%$) vorhanden sein.

Für die Interaktion von Ribosomen mit dem Sec61- Komplex wurde ein K_D -Wert von $2,2 \text{ nM}$ bestimmt. Für die Interaktion des Ribosoms mit dem Sec61- Komplex konnte gezeigt werden, dass die Bindung über die rRNA vermittelt wird.

Grp170, ein Hsp70 verwandtes Protein im Säuger- ER, konnte gemeinsam mit BiP aus Hundepankreas- Mikrosomen isoliert werden. Durch die Kombination aus MALS- und AFFF konnte die Bildung des Komplexes aus Grp170 und BiP einer früheren Arbeit bestätigt werden. In Anwesenheit von ATP dissoziierte der Komplex aus Grp170 und BiP. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl Grp170, als auch BiP in Anwesenheit von ATP als Monomere vorliegen. Der hydrodynamische Radius von BiP wurde mit $2,7 \text{ nm}$ bestimmt.

Abstract

Components of the protein translocase of the endoplasmic reticulum in pancreatic cells have been characterized functionally and structurally. Asymmetric Field Flow Fractionation (AFFF), dynamic light scattering (DLS) and Multi Angle Light Scattering (MALS) were used for direct measurements of the molar masses and the hydrodynamic radius of various homogenous protein populations. We applied these methods to purified active ribosomes, the ribosomal subunits, Grp170 and BiP. Interaction of ribosomes with the Sec61 complex, the main component of the protein conducting channel (PCC), has been tested by surface plasmon resonance spectroscopy.

The molar mass of the assembled ribosomes was calculated to be 3.6 MDa, for the large ribosomal subunit 2.5 MDa and for the small ribosomal subunit to be 1.4 MDa. The hydrodynamic radii were determined to be 18.25 nm (80S ribosome), 7.54 nm (40S ribosome) and (60S ribosome) 14.45 nm. This was the first direct measurement of the molar mass and the hydrodynamic radius with the combination of AFFF and MALS for mammalian ribosomes.

Digitonin concentrations in the range from $2.5 \cdot 10^{-4}$ to $2 \cdot 10^{-3}$ g/ml were determined using a RI- detector. The estimated dn/dc -value is 0.153. For the MALS method, the dn/dc - value is essential to determine the molar mass of membrane proteins. Furthermore, we observed that the minimal concentration of detergent that allows observation of micelles was 132 μ g digitonin/30 μ l (= 4.4 mg/ml = 0.44 %).

The dissociation constant of ribosomes to the Sec61 complex was determined to be 2.2 nM. The interaction between the mammalian ribosome and the mammalian Sec61 complex were strictly rRNA dependent.

Grp170 is a Hsp70 related protein in the lumen of the ER. It has been suggested, that Grp170 forms a complex together with the other luminal Hsp70 BiP only in the absence of ATP. In the presence of ATP, Grp170 and BiP separates to monomers. The hydrodynamic radius of BiP was calculated to be 2.7 nm.

3 Einleitung

Die eukaryontische Zelle besitzt verschiedene Kompartimente wie z. B. den Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, die Mitochondrien oder die Lysosomen. Sie sorgen für effektive Stoffwechselwege, die ohne gegenseitige Beeinflussung ablaufen können. Jedes dieser Kompartimente ist von mindestens einer aus Lipiden und Proteinen zusammengesetzten Membran umschlossen. Membranen stellen Diffusionsbarrieren dar, sodass spezifische Transportmechanismen den Austausch von Metaboliten mit der Umgebung gewährleisten müssen. Hierbei unterscheidet man zwischen dem aktivem Transport und der erleichterten Diffusion (1). Der Transport von Proteinen durch die Membran benötigt dabei komplexere Mechanismen als der Austausch von Ionen oder Stoffwechselprodukten.

In Pro- sowie Eukaryonten sind heute eine Reihe von Translokationssystemen bekannt, die den zielgerichteten Transport von Proteinen durch Membranen ermöglichen. Die zu transportierenden Proteine enthalten in ihrer Aminosäuresequenz eine Signalsequenz, durch die die Proteine an die Oberflächen der jeweiligen Bestimmungsorganellen zielgerichtet geleitet werden. An der Zielmembran sorgt ein spezielles „Targeting-System“ dafür, dass die Proteine zum eigentlichen Translokationskanal gelangen. Der Translokationskanal in der Membran besteht aus einem porenbildenden Proteinkomplex, der sich zum Zielkompartiment hin öffnen kann. Dieser Transport über die Membran ist meist ein energieabhängiger Prozess. Die für den Transport benötigte Energie wird dabei in Form von ATP oder GTP zur Verfügung gestellt. Nach dem die Proteine das Zielorganell erreicht haben, werden sie im Zielkompartiment gefaltet und gegebenenfalls weiter modifiziert. Solche, nach diesem Muster ablaufenden Transportsysteme wurden in Mitochondrien, Plastiden und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) gefunden. Ist der Zielort das ER, der Golgi-Apparat, die Lysosomen oder die Zelloberfläche, verläuft der Transport über den sogenannten sekretorischen Weg. Dabei beginnt die Proteinsynthese im Cytosol, die Proteine werden dann ins ER, dem Ausgangspunkt des sekretorischen Weges, und anschließend zum Golgi transportiert. ER oder Golgi-Apparat residente Proteine können über ein Retentionssystem aus KDEL- Sequenz und KDEL- Rezeptor dort zurückgehalten werden (2). Sollen die Proteine nicht im ER oder Golgi-Apparat verbleiben, werden die Proteine in Vesikeln verpackt und zum jeweiligen Bestimmungs-

ort befördert. Bei der Synthese sekretorischer Proteine unterscheidet man zwischen dem cotranslationalen Transport, bei dem die Proteine während ihrer Synthese am Ribosomen direkt durch die Membran gelangen, und dem posttranslationalen Transport, bei dem zuerst vollständig im Cytosol synthetisierte Proteine durch die Membran transportiert werden. Die Proteine des sekretorischen Weges besitzen eine N-terminale Signalsequenz (3), die zu einem cotranslationalen oder posttranslationalen Import in das ER Lumen oder die ER-Membran führt. In sekretorischen Zellen ist das ER mit mehr als 50 % der Gesamtmembranfraktion eines der größten Organellen der eukaryontischen Zelle (4,5). Neben dem ER-Transportapparat (dem Translokon) für die Beförderung durch die ER-Membran, wird die Translokation *in vivo* durch weitere Faktoren unterstützt. Hierzu gehören unter anderem molekulare Chaperone, die sowohl die Translokation, als auch Prozesse wie Faltung, Faltungskontrolle und auch Assemblierung von Monomeren zu multimeren Komplexen unterstützen und veranlassen können. Auf die unterschiedlichen Prozesse und Komponenten des Proteintransports soll nachfolgend näher eingegangen werden.

3.1 Transport von Proteinen in das Lumen des ER

3.1.1 Das Ribosom

Die 1955 von Palade entdeckten Ribosomen (6), sind Komplexe aus Proteinen und Ribonukleinsäuren (rRNA) und bestehen aus einer großen und einer kleinen ribosomalen Untereinheit. Sie kommen in den Zellen im Cytosol als freie Ribosomen und als an der ER-Membran assoziiert zum Translokon vor. Die ribosomalen Proteine sind für die Faltung ihrer eigenen rRNA sowie für die Erhaltung der optimalen Konformation zuständig, während die katalytischen Reaktionen wohl durch die rRNAs vorgenommen werden (7,8). Die beiden Untereinheiten werden bei Eukaryonten in den Nucleoli innerhalb der Zellkerne gebildet, zum Cytosol transportiert und dort assembliert (9,10). An den Ribosomen werden die Proteine entsprechend ihrer Basensequenz der DNA, die die Information zur Aminosäuresequenz der Proteine enthält, synthetisiert. Die Übermittlung der Information über die Aminosäuresequenz aus der DNA erfolgt durch die „messenger“-RNA (mRNA). Die Übersetzung der Information der mRNA in eine Abfolge von verknüpften Aminosäuren, wird als Transla-

tion bezeichnet. Die Translation von der mRNA am Ribosom ist ein zentraler Bestandteil der Proteinbiosynthese. Man kann die Ribosomen zu zwei Gruppen klassifizieren, den freien und den membrangebundenen Ribosomen. Wenn die Proteine an freien Ribosomen synthetisiert werden, erfüllen sie meist auch Aufgaben im Cytosol. Die an der ER-Membran synthetisierten Proteine werden mittels des cotranslationalen Proteintransportes (vgl. 3.1.3) in das Lumen des ERs geleitet. Die Translation am Ribosom kann mit dem Dreistellenmodell charakterisiert werden. Danach besitzt das Ribosom drei transfer-RNA (tRNA)-Bindungsstellen: die A- (Aminoacyl-), P- (Peptidyl-) und E- (Exit-) Stelle. Die A- Stelle bindet an einer aminoacyl- tRNA (eine Aminosäure tragende tRNA), die P- Stelle an eine peptidyl-tRNA (eine tRNA, die an einer naszierender Kette gebunden ist) und die E- Stelle an die freie tRNA, bevor sie das Ribosom verlässt. An der kleinen ribosomalen Untereinheit wird die Aminosäure Methionin tragende tRNA an das AUG- Startcodon der zuvor gebundenen mRNA dirigiert. Dies führt zu einer Rekrutierung der großen ribosomalen Untereinheit. Die Translation beginnt am 5'-Ende der m-RNA und verläuft in Richtung 3'-Ende, bis ein Stoppcodon erreicht wird. Häufig formieren sich mehrere Ribosomen an demselben mRNA-Molekül perlschnurartig zu einem Polysom. Abbildung 1 zeigt eine Cryo-EM Rekonstruktion eines Ribosoms.

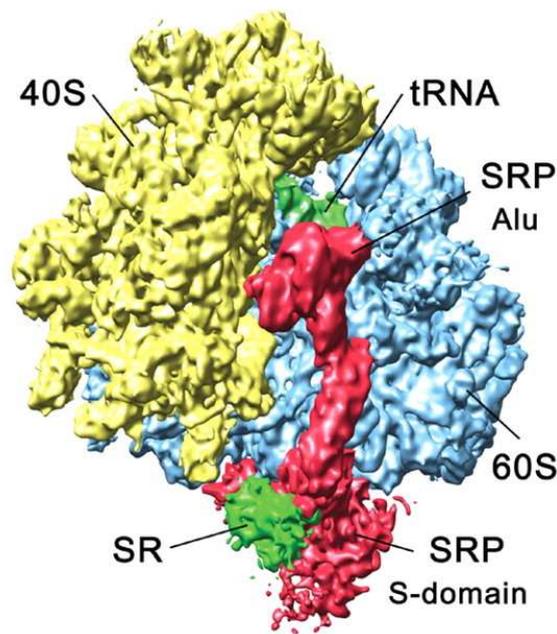


Abbildung 1: Cryo-EM Rekonstruktion des RNC-SRP (Ribosom Naszierende Kette-SRP-Komplex) in Verbund mit dem SRP-Rezeptor (SR). Die kleine (40 S) ribosomale Untereinheit ist in gelb, die große (60 S) ribosomale Untereinheit in blau, das SRP in rot, die Peptidyl-tRNA in der P-Stelle und der SR in grün eingefärbt (11).

3.1.2 Transportsignale für den Transport ins ER

Proteine, die in das ER transportiert werden, haben eine bestimmte Signalsequenz, die sie spezifisch zur ER-Membran dirigiert (3). Diese Sequenz besteht bei sekretorischen Proteinen aus einem etwa 20 Aminosäurenreste langen N-terminal lokalisierten Signalpeptid. Es können drei verschiedene Bereiche der Signalsequenz unterschieden werden: 1. Ein zentraler hydrophober Kern, der 2. N-terminal von positiv geladenen Aminosäuren und 3. C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert wird (12,13). Die Signalsequenz kann nach dem Transport über die Membran proteolytisch vom eigentlichen Protein abgespalten werden. Die Positionen -3 und -1 der C-terminalen polaren Region der Signalsequenz definiert dabei die Schnittstelle (14,15).

In der Hefe *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Signalsequenz den Transportprozess veranlasst und entscheidet ob der Proteintransport ins ER entweder co- oder posttranslational stattfindet (16,17). Proteine mit einer hydrophoberen Signalsequenz werden bevorzugt cotranslational, Proteine mit einer hydrophileren Signalsequenz dagegen überwiegend posttranslational transportiert (16). Bei Membranproteinen ohne Signalsequenz wird deren Funktion von der ersten Transmembrandomäne übernommen. Dieses, auch als Signalankersequenz bezeichnete Teilstück, unterscheidet sich erstens durch einen längeren hydrophoben Kernbereich und zweitens durch eine fehlenden Signalpeptidaseschnittstelle von der normalen Signalsequenz (18-21). So genannte „tail-anchor“ Membranproteine werden jedoch ohne N-terminale Signalsequenz in die Membranen inseriert. In diesem Fall geschieht das Erkennen durch ein C-terminal gelegenes hydrophobes Segment. Wie die Insertion dieser Proteine in die Membran funktioniert, ist bisher aber noch nicht bekannt (22,23).

3.1.3 Der cotranslationale Proteintransport in das ER

Sowohl beim cotranslationalen, als auch beim posttranslationalen Proteintransport müssen die naszierenden Polypeptide für den Transport durch die ER-Membran in einem transportkompetenten Zustand gehalten werden, da die Vorläuferproteine mit nativ gefalteten Domänen nicht in der Lage sind, die Translokationspore zu durchdringen (24-26). Beim cotranslationalen Proteintransport werden die Proteine parallel zu ihrer Synthese am Ribosom durch die ER-Membran transportiert (Abbildung 2). Das Targeting beginnt mit der spezifischen Erkennung der N-terminalen Signalsequenz. Sobald die Signalsequenz an der zugänglichen Oberfläche des Ribosoms erscheint, wird sie vom Signalsequenzerkennungsprotein SRP (Signals Recognition Protein) gebunden, das im Säuger aus sechs Proteinen und einer 7s RNA besteht (27-30). Durch die Bindung des SRP an die Signalsequenz kommt es zu einer Interaktion mit dem Ribosom, wodurch es zu einem Arrest der naszierenden Polypeptidkette kommt (29,31). Der Translationsarrest verhindert, dass die neu synthetisierte Polypeptidkette zu lang wird, was einen Transport erschweren würde (32). Das SRP ermöglicht, dass das Ribosom zur ER-Membran geleitet wird, ohne vorheriger Fertigstellung des zu transportierenden Proteins (29). An der ER-Membran interagiert der Komplex aus Ribosom, naszierender Peptidkette und SRP mit dem, in der Membran sitzenden Rezeptor. Dies geschieht, indem das SRP von seinem membranständigen Rezeptor (SRP-Rezeptor), der aus zwei Untereinheiten besteht (α - und β - Untereinheit), gebunden wird (33-35), und das Ribosom mit naszierender Kette auf den Sec61-Komplex überträgt (36-39). Das Lösen des SRP vom Ribosom und die Übergabe der naszierenden Polypeptidkette an den Translokationsapparat geschieht unter GTP-Hydrolyse (40,41). Der Kanal öffnet sich zum ER-Lumen. Der N-Terminus der naszierenden Kette liegt in einer Haarnadelkonformation vor. Die Schleife wird von der Signalsequenz und von dem C-terminalen nachfolgenden Abschnitten der Polypeptidkette gebildet. Die Signalsequenz interagiert dabei mit dem TRAMP und den Membranlipiden. Durch die weitere Elongation der Polypeptidkette wird der C-terminale Bereich der Schleife durch die Membran geschoben. Die Signalsequenz wird durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) abgespalten. Anschließend erfolgt der Transport der restlichen naszierenden Polypeptidkette direkt durch den von Ribosom und Sec61-Komplex gebildeten Kanal ins Lumen des ER.

Im Säugersystem gibt es neben dem SRP-Rezeptor noch zwei weitere Komponenten in der Membran, die für den cotranslationalen Transport benötigt werden. Hierbei handelt es sich um das TRAM-Protein (translocating chain-associated membrane protein) und um den heterotrimeren Sec61-Komplex (42). Quervernetzungsexperimente sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass der Sec61-Komplex einen Kanal bildet, durch den die Proteine transportiert werden können. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erscheint die Kanalpore als ringförmige Struktur. Die wassergefüllte Pore wird dabei vermutlich von 3 bis 4 heterotrimeren Sec61-Komplexen gebildet (43-50). Die Insertion der naszierenden Kette in den Translokationskanal erfolgt in zwei Schritten. Am Anfang der Translokation gibt es eine schwache Bindung zwischen dem Sec61-Komplex und dem Ribosom, da die Ribosomen mit einer Hochsalzbehandlung von der Membran abgewaschen werden können. Wenn die naszierende Kette eine Länge von ca. 70 Aminosäuren erreicht hat, wird die Bindung zwischen Ribosom und Sec61-Komplex hochsalzresistent und es kommt zu einer Öffnung des Translokationskanals zur luminalen Seite des ER (38,51). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass das Ribosom auf der Membranpore sitzt und der Sec61-Kanal eine Verlängerung des Ribosomenkanals bildet (11). Die restliche naszierende Kette gelangt dann direkt durch den Sec61-Kanal ins Lumen des ER.

Während des gesamten Prozesses der Translokation sollte sichergestellt sein, dass keine Ionen durch den Kanal gelangen. Dies wird auf der cytosolischen Seite durch die Interaktion des Ribosoms und auf der luminalen Seite des ERs mit BiP erreicht (52). Vermutlich ist der Vorgang des Öffnens und Schließens ein Ähnlicher wie der, den die Hsp70-Chaperone nutzen, um an die Substrate zu assoziieren bzw. dissoziieren (53). Für das Verschließen der Pore ist eine Interaktion sowohl zwischen der Substratbindungsregion, als auch der Bindungsregion der J-Domäne von BiP und von bisher unbekanntem Membranproteinen notwendig (53). Hierfür kommen zwei ER-residenten J-Proteine in Frage. Dabei handelt es sich zu einen um ERj1p (Mtj1p) und um ERj2p (Sec63p), die mit dem Sec61-Translokation assoziiert vorliegen. Sowohl für ERj1p, als auch für ERj2p wurde eine funktionelle Interaktion über ihre luminalen J-Domäne mit BiP nachgewiesen (54,55).

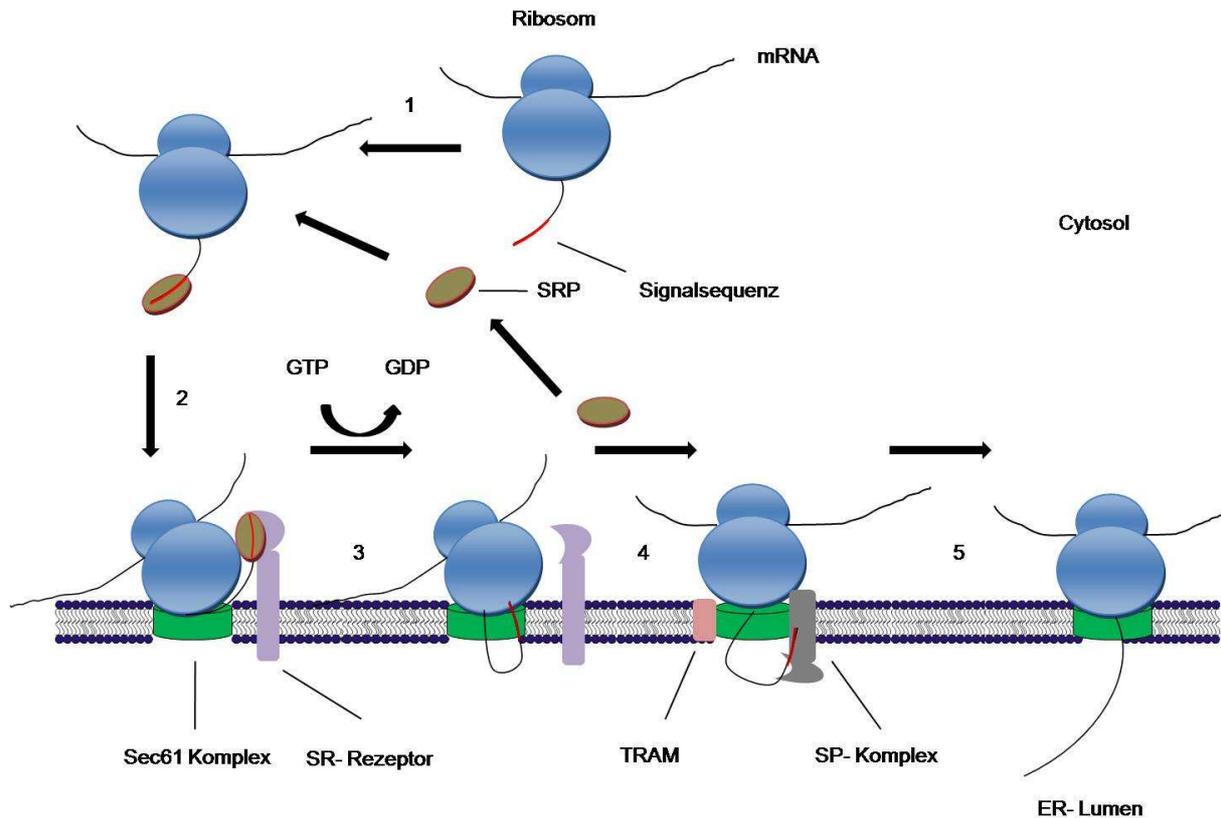


Abbildung 2: Der cotranslationalen Proteintransportes durch die ER-Membran in Säugerzellen. (1) Die Signalsequenz der Polypeptidkette wird vom SRP erkannt und gebunden. Durch Interaktion mit dem Ribosom kommt es zu einem Elongationsarrest. (2) Der Ribosom-, Polypeptidketten-, SRP-Komplex bindet an die ER-Membran. Der SRP interagiert dabei mit seinem Rezeptor und das Ribosom mit dem Sec61-Komplex. (3) Unter Hydrolyse von GTP wird die Signalsequenz vom SRP auf den Sec61-Komplex transferiert, so dass ein zweiter Signalsequenzerkennungsschritt durch den Sec61-Komplex erfolgt. (4) Der Kanal öffnet sich zum ER-Lumen. Der N-Terminus der naszierenden Kette liegt in einer Haarnadelkonformation vor. Die Schleife wird von der Signalsequenz und von dem C-terminalen nachfolgenden Abschnitten der Polypeptidkette gebildet. Die Signalsequenz interagiert dabei mit dem TRAMP und den Membranlipiden. Durch die weitere Elongation der Polypeptidkette wird der C-terminale Bereich der Schleife durch die Membran geschoben. Die Signalsequenz wird durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) abgetrennt. (5) Anschließend erfolgt der Transport der restlichen naszierenden Polypeptidkette direkt durch den von Ribosom und Sec61-Komplex gebildeten Kanal ins Lumen des ER.

3.1.4 Der posttranslationale Proteintransport in das ER

Beim posttranslationalen Transport werden die Proteine vollständig im Cytosol synthetisiert bevor sie durch die ER-Membran transportiert werden. Der Großteil der heute vorhandenen Erkenntnisse über den posttranslationalen Transport stammt aus Untersuchungen, die in der Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt wurden. In der Hefe werden die Substrate überwiegend posttranslational in das ER transportiert. Für die etwa 70 Aminosäuren kleinen Proteine Prepromelittin (Honigbiene) und dem Prepropeptid

von GLa (Frosch) ist ein posttranslationaler Transport *in vitro* auch in Säugerzellen gezeigt worden (56,57). Der Transport erfolgt wie beim cotranslationalen Transport durch den heterotrimeren Sec61- Komplex.

In der Hefe sind die beiden cytosolischen Hsp70-Chaperone Ssa1p und Ssa2p für das Targeting des Substrates (24,58) in Verbindung mit dem Hsp40- Cochaperon Ydj1p (59-61) notwendig. Durch die Interaktion der Chaperone mit dem Substrat wird die Aggregation des zu transportierenden Proteins verhindert. Ssa1/Ssa2 bringen das ungefaltete Substrat zum membranständigen Ydj1p, so dass dem Vorläuferprotein der Zugang zum Translokationsapparat ermöglicht wird (60,62). Diese Aufgaben werden vermutlich beim Säuger vom cytosolischen Hsc70 und einem Hsp40- Cochaperon übernommen (26).

In Rekonstitutionsexperimenten mit aufgereinigten Komponenten aus Hefemikrosomen wurde neben dem luminalen Chaperon Kar2p und ATP ein spezieller Membrankomplex benötigt, um *in vitro* posttranslational den Prä-Pro- α -Faktor zu transportieren. Dabei handelt es sich um den Sec-Komplex, der aus dem heterotrimeren Sec61- Komplex und dem tetrameren Sec62/Sec63-Komplex besteht (63-65). Der Sec- Komplex bildet, ähnlich wie der Sec61- Komplex, eine ringförmige Struktur in der Membran aus (43).

Der eigentliche posttranslationale Transport der Proteine durch die ER-Membran erfolgt in zwei Schritten (Abbildung 3). Der Transport beginnt mit der Bindung des zu transportierenden Proteins an den Sec- Komplex. Die cytosolisch liegenden Komponenten des Sec62/Sec63- Subkomplexes bilden wahrscheinlich eine Art „Signalsequenz-Antenne“ in der Membran (66,67). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die Signalsequenz des Proteins von der großen Untereinheit des Sec61- Komplexes erkannt und gebunden wird (68). Im zweiten Schritt wird die gebundene Polypeptidkette durch den vom Sec61- Komplex gebildeten Kanal bewegt. Für einen effizienten Transport wird zusätzlich Kar2p und ATP benötigt. Beim Kar2p (BiP beim Säuger) handelt es sich um ein Hsp70 Protein. Das Protein wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für den posttranslationalen Transport benötigt (64,69,70). Die ATP gebundene Form des Kar2p bindet an die ER luminal gelegen J- Domäne des Sec63p und wird unter ATP-Hydrolyse mit geringer Sequenzspezifität auf die Polypeptidkette des zu translozierenden Proteins übertragen (66,71,72).

Für das Modellprotein Prä- Pro- α - Faktor konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der Transport über die ER- Membran nach dem Prinzip der Brownschen Ratsche erfol-

gen könnte (73). Dabei kommt es aufgrund der Brownsche Molekularbewegung im Translokationskanal zu freier Diffusion der Kette. Durch die Anlagerung des luminalen Kar2p an die Polypeptidkette entsteht ein vektorieell gerichteter Transportprozess, indem die luminalen Bereiche der Polypeptidkette durch das gebundene Kar2p nicht zurück in den Kanal gleiten können. Der Transport des Proteins ins Lumen des ER erfolgt durch die ständige Neubindung von weiteren Kar2p Proteinen an die eintretende Polypeptidkette.

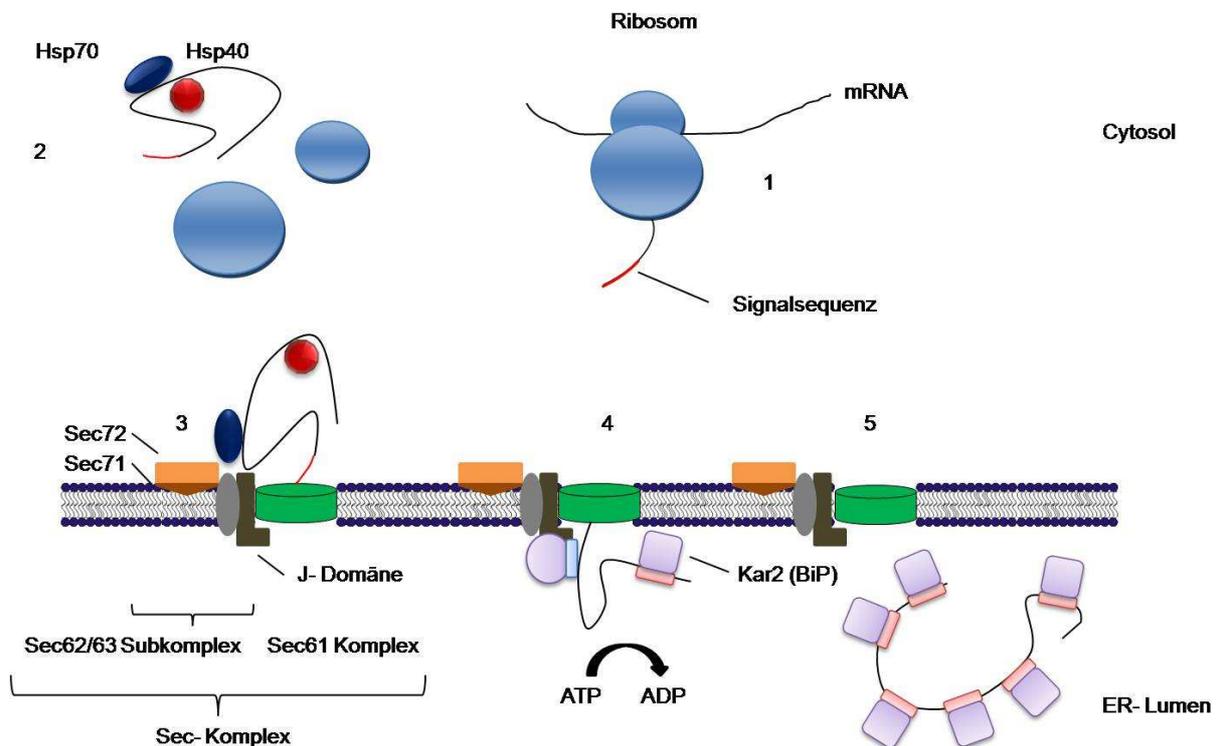


Abbildung 3: Modell des posttranslationalen Proteintransportes durch die ER-Membran der Hefe *S. cerevisiae*. (1) Das zu transportierende Protein wird vollständig im Cytosol synthetisiert. (2) Durch cytosolische Chaperone wird das Protein in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. Die Signalsequenz wird vom Sec-Komplex erkannt und gebunden. (3) Der N-Terminus der Polypeptidkette inseriert in den vom Sec61-Komplex gebildeten Translokationskanal. (4) Die eigentliche Translokation der Polypeptidkette durch die ER-Membran erfolgt in einem ATP- und Kar2 (BiP)-abhängigen Prozeß. Das luminal vorkommende Kar2p (BiP) wird durch die J-Domäne des Sec63p zur Bindung von Peptiden aktiviert. Nach Austritt der zu transportierenden Polypeptidkette auf der luminalen Seite der ER-Membran, wird Kar2p (BiP) unter ATP-Spaltung auf diese Bereiche übertragen, wodurch ein zurückgleiten der Kette verhindert wird (molekulare Ratsche). (5) Mit Hilfe von molekularen Chaperonen wird das Substrat in seine aktive Konformation gebracht.

3.1.5 Der Sec61- Komplex

Zentrale Komponente des eukaryontischen ER-Translokationsapparates ist der heterotrimere Sec61- Komplex (vgl. Abbildung 4), der im Säuger aus den Untereinheiten Sec61 α , Sec61 β und Sec61 γ gebildet wird (42). Sec61 α ist ein Protein mit zehn Transmembrandomänen, wobei C- und N-Terminus jeweils im Cytosol lokalisiert sind. Die α - Untereinheit bildet den eigentlichen Translokationskanal aus. Sec61 β und Sec61 γ besitzen jeweils nur eine Transmembrandomäne nahe dem luminal liegenden C-Terminus (36,42). Sec61 β und Sec61 γ gehören zu der Gruppe der „tail-anchor“ Membranproteine, die über ein C-terminal gelegenes hydrophobes Segment in die Membran inserieren werden (74).

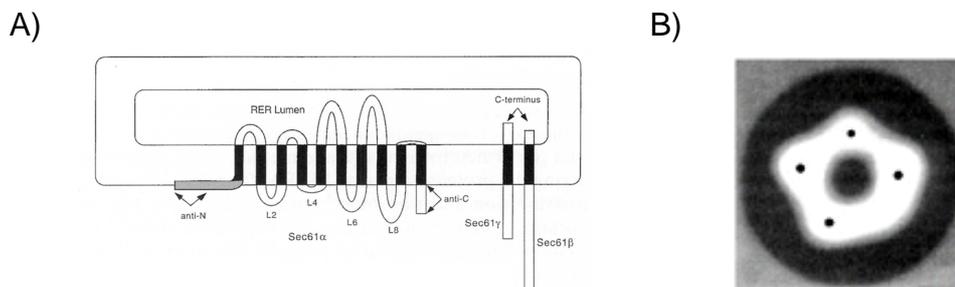


Abbildung 4: Der Sec61- Komplex aus Säugerzellen. A) Schematische Darstellung des Sec61- Komplexes. Der Komplex besteht aus den drei Membranproteinen Sec61 α , β und γ . Die Transmembransegmente der Komponenten des Sec61- Komplexes sind als schwarze Balken dargestellt (75). B) Errechnete elektronenmikroskopische Darstellung der Sec61- Pore aus 125 Einzelobjekten. Die Masseschwerpunkte sind durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Die Ringstruktur in der Membran setzt sich aus drei bis vier Sec61- Komplexen zusammen (43).

Homologe Proteine zu den Untereinheiten des Säuger Sec61- Komplexes wurden in einer Vielzahl von eukaryontischen Organismen gefunden. In der Hefe *S. cerevisiae* besteht der Komplex aus den Untereinheiten Sec61p, Sbh1p (Sec sixty-one beta homolog) und Sss1p (Sec-sixty-one suppressor). In der Hefe *S. cerevisiae* existiert noch ein zweiter homologer Komplex. Es handelt sich um den Ssh1-Komplex, bestehend aus Ssh1p (Sec sixty-one homolog), Sbh2p (Sec sixty-one beta homolog) und Sss1p. Die bakteriellen Homologen Proteine sind SecY, SecE und SecG, die den bakteriellen SecYEG Komplex bilden. Eine Übersicht der homologen Proteine gibt. Der Sec61- Komplex und seine Homologen der Hefe und Bakterien ist in allen Lebewesen vertreten (76).

Einleitung

Tabelle 1: Übersicht über die homologen Komponenten des Sec61- bzw. SecYEG-Komplexes im Säuger, der Hefe *S. cerevisiae* und dem Bakterium *E. coli*.

	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>		<i>E. coli</i>
	Sec61-Komplex	Sec61-Komplex	Ssh1-Komplex	SecYEG-Komplex
α - Untereinheit	Sec61 α	Sec61p	Ssh1p	SecYp
β - Untereinheit	Sec61 β	Sbh1p	Sbh2p	SecGp
γ - Untereinheit	Sec61 γ	Sss1p	Sss1p	SecEp

Cryo-EM- Aufnahmen von eukaryotischen, cotranslational translozierenden Komplexen haben gezeigt, dass der funktionelle Proteinkanal von einem Oligomer des Sec61- Komplex gebildet wird. Diskutiert wird, ob der Kanal aus einem, zwei, drei oder vier Sec61- Komplexen besteht (11,77-79). Hochauflösende Cryo-EM- Aufnahmen kombiniert mit Röntgen-Strukturen des SecYEG- Komplexes haben gezeigt, dass der Kern des prokaryontischen Translokons aus zwei, in einer Ringstruktur angeordneten SecYEG-Komplexen besteht (80).

Die TM-Domänen der α -Untereinheit bilden die Innenwände der Translokationspore (36,47,81-83). Ungeklärt ist jedoch, wie die Sec61 α -Untereinheiten an der Bildung der Innenpore beteiligt sind. Die Sec61 α -Untereinheit ist in zwei Hälften, den TM 1–5 und TM 6–10, unterteilt. Beide Hälften sind von der Außenseite über einen externen Loop zwischen der TM 5 und TM 6 verbunden. Jede Hälfte besteht aus drei äußeren und zwei inneren TM- Domänen. Die membrandurchspannenden TM-Domänen von SecY, dem Bakterienhomologen zu Sec61 α , bilden einen sanduhrförmigen Kanal. Ein bewegliches TM-Segment schließt möglicherweise von Außen diesen Kanal (84). Die Insertion eines Haarnadelloops von einer naszierenden Kette mit einem Transmembransegment und einem hydrophoben Segment öffnet den Kanal. Während des Transports vereinigen sich die Kanäle der Sec61- Komplexe zu einer große Pore (85). Fluoreszenzquenching und elektrophysiologische Analysen zeigen eine hoch dynamische Translokationspore, deren Durchmesser sich vom inaktiven zum aktiven Zustand verändert (52,86,87). Rekonstituierte Membranen zeigten bei elektrophysiologischen Analysen unter co- und posttranslationalen Bedingungen einen Porendurchmesser von 6 Å bis 60 Å mit einem häufigen und stabileren teilweise-geöffneten Zustand von ca. 20 Å (87).

3.1.6 Der Sec- Komplex

Der Sec- Komplex der Hefe *S. cerevisiae* (vgl. Abbildung 3) besteht aus dem heterotrimeren Sec61- Komplex und dem tetrameren Sec62/63-Subkomplex, der wiederum aus den Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p sowie Sec72p besteht (63-65). Der Sec62/63-Subkomplex übernimmt die Funktionen, die der posttranslationale Transport erfordert. Sec62p ist ein 32 kDa (Hefe) großes essentielles Protein mit zwei Transmembrandomänen. Sowohl der C- als auch der N- Terminus des Proteins sind im Cytosol lokalisiert (88,89). Sec71p ist ein Membranprotein mit einer Transmembrandomäne. Der N-Terminus des Proteins liegt im ER-Lumen und ist zweifach glycosyliert. Im Gegensatz zu den anderen Komponenten des Sec- Komplexes ist Sec72p kein Membranprotein. Es ist 21 kDa groß und ist auf der cytosolischen Seite der ER-Membran lokalisiert. In einem vom Lyman und Schekman vorgestellten Modell übernimmt Sec62p zusammen mit Sec71p und Sec72p dabei die Funktion einer Signalsequenzantenne für posttranslationale Transportsubstrate (66). Das 75 kDa große Sec63p Protein besitzt drei Transmembranbereiche. Der N-Terminus des Proteins befindet sich im Lumen des ER, der C-Terminus im Cytosol. In der luminalen Schleife zwischen der zweiten und dritten Membrandomäne befindet sich ein DnaJ-homologer Bereich (90) mit dem es mit dem luminal vorkommenden Hsp70 Kar2p interagiert und bildet somit die Grundlage für den posttranslationalen Translokationsprozeß nach dem Prinzip der Brownschen Ratsche (71,73,91). Für den posttranslationalen Transport in der Hefe ist der Sec62/63 Subkomplex essentiell.

3.1.7 Das TRAM Protein

Für den Transport bestimmter Substrate im Säugersystem wird *in vitro* zusätzlich zu dem Sec61- Komplex und dem SRP-Rezeptor das TRAMP- Protein benötigt (92). Der TRAMP- abhängige Transport wird von der Beschaffenheit der jeweiligen Signalsequenz beeinflusst (93). TRAMP spielt zusätzlich eine Rolle bei der cotranslationalen Integration von Membranankern in die Lipidschicht (44,47,94,95) und beim so genannten „pausing“-Prozeß. Beim „pausing“-Prozeß verläuft der cotranslationale Transport diskontinuierlich, indem es durch spezifische Signale im Protein zum temporären Stoppen des Transports der Polypeptidkette durch die Membran kommt, die

Synthese des Proteins am Ribosom aber normal weiterläuft. „pausing“ findet nur abhängig vom TRAMP statt (13).

3.1.8 Interaktionen der Hsp70/Hsp40 Chaperone und Nukleotidaustauschfaktor im ER

Die beiden Hauptfaltungskompartimente einer eukaryontischen Zelle sind das ER und das Cytosol. Sekretorische Proteine, Proteine der Plasmamembran, Proteine die im ER oder im Golgikomplex lokalisiert sind, müssen ins Lumen des ER transportiert werden. Im ER werden die Proteine gefaltet und gegebenenfalls modifiziert. Diese Aufgabe wird von den molekularen Chaperonen geleistet. Molekulare Chaperone schützen die Proteine vor Aggregation und Fehlfaltung, bis die Translation oder Translokation beendet ist (96). Chaperone (frz. chaperone: die „Anstandsdame“) sind in der Evolution stark konservierte zelluläre Proteine, die an der Faltung und Oligomerisierung anderer Proteinen beteiligt sind. Da die Chaperone als Reaktion auf Stressbedingungen wie erhöhte Temperatur oder chemischen Stress verstärkt exprimiert werden, wurden sie ursprünglich als Hitzeschockproteine (Hsp) bezeichnet (97,98). Diese Bezeichnung wird mittlerweile zur Klassifizierung der Chaperone verwendet. Das Kürzel Hsp wird zusammen mit dem Molekulargewicht als Name verwendet. Die bisher bekannten Chaperone werden in sechs Familien unterteilt: Familien der kleinen Hizeschockproteine (Hsp10), die Hsp40-, Hsp60-, Hsp70, Hsp90- und Hsp100-Familie. Zu den molekularen Chaperonen des endoplasmatischen Retikulums gehören Proteine der Familien Hsp40, Hsp70, Hsp90. Eine Übersicht der Vertreter der einzelnen Chaperonfamilien gibt Tabelle 2.

Einleitung

Tabelle 2: Vertreter der einzelnen Chaperonfamilien im ER von Säuger und *S. cerevisiae*

Chaperonfamilie	Säuger	<i>S. cerevisiae</i>
Hsp70/ Hsp70-verwandt	BiP (Grp78) Grp170	Kar2p Lhs1p (Ssi1p, Cer1p)
Hsp40	ERj1p (Mtj1p) ERj2p (Sec63p) ERj3p (HEDJ, Dj9) ERj4p (ERdj4p, MDG1) ERj5p (ERdj5p, JPDI)	Scj1p Scj2p (YFR041C) Sec63p Jem1p
Nukleotidaustauschfaktor (NEF)	BAP	Sil1p
Hsp90	Grp94	---

Der Hauptvertreter der Hsp70-Familie im Säuger-ER wurde zuerst als Glucose-reguliertes Protein von 78kDa (Grp78) und später als Immunglobulin schwere Kette bindendes Protein (BiP) bezeichnet (99,100). Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) ist ein Hsp70-verwandtes Glykoprotein des ER. Der N-terminale Teil von Grp170 hat eine ATPase-Domäne, die eine große Ähnlichkeit zu denen der Hsp70-Proteinen besitzt. N-terminal hat es eine peptidbindende-Domäne mit Ähnlichkeiten zur Hsp110-Familie (101). Grp170 wird deshalb als ein Vertreter einer neuen Hsp70-Unterfamilie zugeordnet (102). Das Hefe Homologe von BiP ist Kar2p (103,104) und von Grp170 ist das Lhs1p/Ssi1p/Cer1p Protein (105-107). Für BiP/Kar2p und Grp170/Lhs1p wurde gezeigt, dass sie am cotranslationalen Proteintransport ins ER beteiligt sind (108,109). Hsp40-Cochaperone werden über ihre J-Domäne charakterisiert, die es ihnen erlaubt, mit den Hsp70 zu interagieren (110-114). Der Hsp70/Hsp40-Substratzyklus (vgl. Abbildung 5) wird im Folgenden beschrieben.

Die Peptidbindungstasche eines Hsp70-Chaperons ist in der ATP-gebundenen Form geöffnet und hat eine geringe Affinität zu seinem Substrat, so dass das Hsp70-Chaperon schnell assoziieren und dissoziieren kann (115,116). Ein Hsp40-Cochaperon verstärkt die intrinsisch schwache ATPase-Aktivität des Hsp70-Chaperons und führt zur verstärkten Hydrolyse von ATP (117). Dies bewirkt eine Konformationsänderung des Hsp70, so dass es zu einem Verschluss der Peptidbindungsstelle kommt. Da in diesem Zustand die Affinität zum Peptid sehr hoch ist, bleibt es gebunden und kann die geschlossenen Bindungstasche nicht verlassen

(115,118). Um den Zyklus abzuschließen und das Peptid wieder freizugeben, kann das Hsp70-Molekül mit einem Nukleotidaustauschfaktor (NEF) interagieren. Der NEF katalysiert den ADP-ATP-Austausch und das Substrat kann aus der Hsp70- Bindungstasche entweichen (119,120). Das Hsp70- Chaperon steht dann für einen nächsten Zyklus zur Verfügung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des ATPase- Reaktionszyklus ist in Gegenwart eines Hsp40-Cochaperons die ADP- Dissoziation aus der ATPase- Domäne des Hsp70-Moleküls durch einen NEF (121). Im ER von Säuger und Hefe sind zwei Nukleotidaustauschfaktoren identifiziert worden. Im ER des Säugers ist Grp170 der hauptsächlich vorkommende NEF für BiP (122). Einen weiteren NEF im Säuger- ER stellt BAP dar (= BiP assoziiertes Protein;= Sls1p/Sil1p in Hefe; (123)). In Analogie zu dem zuvor beschriebenen Hsp70- Reaktionszyklus dienen Grp170 und BAP als alternative Nukleotidaustauschfaktoren für das Hsp70 Chaperon BiP (124,125).

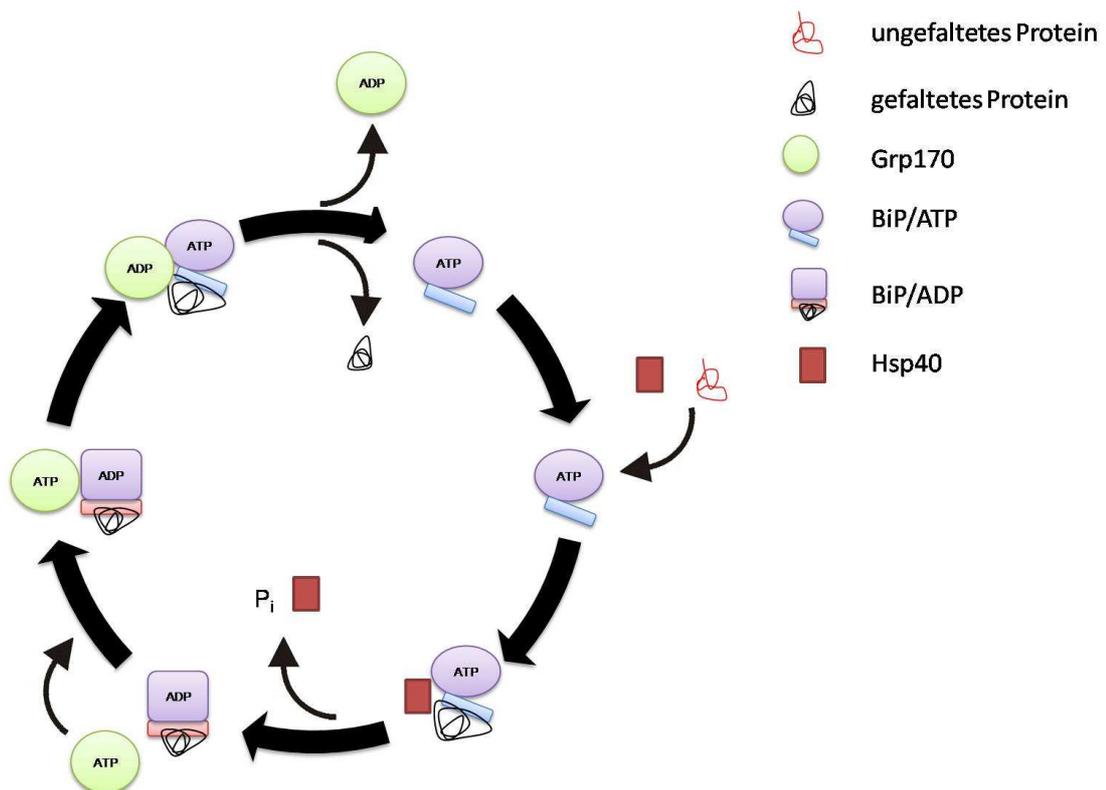


Abbildung 5: Hsp70/Hsp40-Substratzyklus von BiP und Grp170. BiP mit gebundenem ATP hat eine geringe Affinität zu seinem Substrat. Durch die Wirkung eines Cochaperon der Hsp40-Familie kommt es zur ATP-Hydrolyse des in der ATPase- Domäne gebundenen ATP zu ADP. Infolge dessen vollzieht BiP eine Konformationsänderung, die sich auf die Substratbindungsdomäne überträgt. Dadurch schließt sich die Substratbindungstasche und das ungefaltete Peptidsubstrat wird mit hoher Affinität gebunden. Durch den ADP-ATP-Austausch des Nukleotidaustauschfaktors (NEF) Grp170 wird das Peptid wieder freigesetzt. Der Zyklus aus Bindung und Freigabe kann abermals beginnen. Der Zyklus wird bis zum Erreichen der korrekten Faltung wiederholt.

3.1.9 Posttranslationale Modifikationen der Polypeptidkette

Die Polypeptidkette wird schon während des Transportprozesses durch die ER-Membran modifiziert. Dies geschieht, sobald die Signalsequenzschnittstelle in das Lumen des ER gelangt ist. Das Signalpeptid wird durch den Signalpeptidase-Komplex (SP-Komplex) spezifisch vom eigentlichen Protein abgespalten. Die Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz ist für die Zelle essentiell, da der Verlust der Aktivität der Signalpeptidase zum Absterben der Zelle führt (126,127). Eine weitere Modifikation im ER-Lumen geschieht in Form der kovalenten Anheftung von Zuckermolekülen an bestimmte Rezeptorproteine. Bewerkstelligt wird diese Modifikation durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST-Komplex), der eine N-glycosidische Bindung von Oligosacchariden an die Polypeptidkette vermittelt. Dabei wird das Oligosaccharid enzymatisch auf einen Asparaginrest übertragen, der in der Sequenzfolge Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr im Polypeptid vorkommt ($X \neq$ Prolin). Die N-glycosidische Bindung erfolgt während der Translokation des Proteins durch die ER-Membran (128). Dadurch wird gewährleistet, dass die zu glycosylierenden Stellen für den OST-Komplex optimal zugänglich sind (128-131).

3.1.10 Der Signalpeptidase-Komplex

Das Signalpeptid wird von der Polypeptidkette von der Signalpeptidase im Lumen des ER abgespaltet. Im Säuger setzt sich das Enzym aus fünf Membranproteinen zusammen, deren Untereinheiten die SPC12, SPC18, SPC21, SPC22/23 und SPC25 sind. Sie wurden jeweils nach ihren molaren Größen in der SDS-PAGE benannt (127,132). SPC18, SPC21 und SPC22/23 besitzen jeweils nur eine Transmembrandomäne, wobei der N-Terminus im Cytosol und der Großteil des Proteins zusammen mit dem C-Terminus im Lumen des ER lokalisiert ist. SPC18 und SPC21 sind fast identische Proteine und stellen mit 80 % übereinstimmender Aminosäuren zueinander Isoformen dar. SPC22/23 läuft in der SDS-PAGE als Doppelbande bei 22 kDa und 23 kDa. Die Masse von SPC22/23 ohne Glycosylierung beträgt 19 kDa (133). SPC25 und SPC12 haben je zwei Transmembrandomänen, mit im Cytosol lokalisiertem C- und N-Terminus. Der Abstand zwischen den Membranankern in beiden Proteinen ist so gering, dass SPC25 und SPC12 kaum luminale Bereiche besitzen (134).

SPC18 und SPC21 sind vermutlich Bestandteile des aktiven Zentrums der Signalpeptidase. Außer im Säuger wurde die Signalpeptidase auch im Vogel und in der Hefe näher analysiert (135,136). Auch die Hefe *S. cerevisiae* besitzt einen heteromeren Signalpeptidase-Komplex (137).

3.2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die folgenden, am cotranslationalen Transport ins ER beteiligten Komponenten strukturell und funktionell zu charakterisieren:

- die Ribosomen
- die große ribosomale Untereinheit
- die kleine ribosomale Untereinheit
- den Sec61- Komplex
- das Hsp70 verwandte luminaire Grp170
- das luminaire Hsp70 BiP

Dabei sollten die folgenden Methoden an den jeweils gereinigten Komponenten zum Einsatz kommen:

- MALS (Multi Angle Light Scattering)
- QUELS (quasielastic Light Scattering)
- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Elektrophysiologische Methoden
- Fluoreszenzmikroskopie
- Oberflächenplasmonresonanz – Spektroskopie

Diese Methoden sollten es unter anderem erlauben, den Oligomerisierungsgrad des funktionalen Säuger Sec61- Komplexes zu bestimmen, sowie seine Bindung am Ribosomen bzw. ribosomale Untereinheiten zu charakterisieren. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der Sec61- Komplex aus Hundepankreasgewebe isoliert und in nativem Zustand gereinigt werden.

Da Membranproteine im Allgemeinen nur in Mizellen (Detergenz- oder Lipidmizelle) löslich und funktional sind, wurde Sec61 unter Verwendung von Digitonin isoliert. Eine erfolgreiche Isolation des Sec61 mit Digitonin wurde von Görlich und Rapoport beschrieben (42). Des Weiteren hat Digitonin die Eigenschaft im UV- Detektor, der bei den Messungen mittels MALS neben dem RI- Detektor zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt wurde, kein Signal zu verursachen. Während Digitonin kein Signal im UV- Detektor verursacht, ist Digitonin über den RI- Detektor sehr gut messbar. Detergenzien beeinflussen wegen der Mizellenbildung die Messungen der Lichtstreuung. Deshalb musste im Vorfeld zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades eines Membranproteins der dn/dc - Wert und die minimal benutzbare Digitoninkonzentration bestimmt werden.

Die Interaktion von Ribosomen mit dem Sec61- Komplex sollte hinsichtlich der Bindung über die rRNA, der Abhängigkeit von der Ribosomenkonzentration und von den ribosomalen Untereinheiten untersucht werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob Grp170 und BiP in Abwesenheit von ATP als Komplex vorliegen, und in wieweit die Anwesenheit von ATP Monomere oder Dimere bedingt.

Außerdem sollte mit Hilfe der MALS- und QUELS Technik der hydrodynamische Radius und die absolute molare Masse von verschiedenen Komponenten, die am cotranslationalen Transport ins ER beteiligt sind, bestimmt werden.

Mittels der erhobenen Daten sollten das Verständnis des Proteintransports auf molekularer Ebene vertieft, sowie Einblick in die Mechanismen der Regulation erlangt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

GE Healthcare, Freiburg: ECL-Western Blot Detektionssystem, ³⁵S-Methionin (1000 Ci/mmol), ConA-Sepharose, S-Sepharose FF, Q-Sepharose FF, Protein A-Sepharose, Protein G-Sepharose, Supedex 200 HR10/30, m⁷GpppGLösung, Hyperfilm™ ECI

BIO-RAD, München: BIO-RAD Gel Kammern und Glasscheiben

Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA: CHAPS

Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat AR

Merck, Darmstadt: Digitonin

Promega Biotec, Madison, USA: SP6 RNA-Polymerase, Fluorotect t- RNA

Riedel de Hahn, Hannover: Aceton, Chloroform, Essigsäure, Trichloressigsäure

Roche Diagnostics, Mannheim: RNaseA, Leupeptin, Proteinase K, Trypsin, ATP, DTT, In vitro Translations Kit

Serva, Heidelberg: Na-Dodecylsulfat (SDS), TEMED, Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R250 und G250, Harnstoff, Saccharose

Sigma-Aldrich, München: β-Mercaptoethanol, BSA, DMSO, Methylmannosid, Molekularmassenmarker, Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (= „Anti Rabbit POD“)

Whatman, Maidstone, England: DE52-Cellulose

Die Immunisierung von Kaninchen mit gekoppelten Peptiden, die Herstellung des KLH- Lipids gegen Sec61β, sowie die Gewinnung der Antiseren wurden von Herrn Dr. Jung, Med. Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes in Homburg vorgenommen.

4.1.2 Geräte

Abimed, Langenfeld: Gilson-Pipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevamic 60

Agilent Technologies, Santa Clara, USA: UV- Detektor, Autosampler

Beckmann, München: GS-6KR Zentrifuge (Bactifuge), J2-MC Zentrifuge (Kühlzentrifuge) mit JA-10 und JA-20 Rotor, Optima™ TLX Ultrazentrifuge mit TLA-100.3, TLA-100, TLA-110 und TLA-120.2 Rotor, L-80 Ultrazentrifuge mit Ti70 und SW55 und SW 41Ti

Berthold, Wildbach: Luminometer Lumat LB 9501

Eppendorf, Hamburg: Tischzentrifuge 5415C, Thermomixer, Kühlzentrifuge 5402, Thermostat 5320, Tischzentrifuge 5415C, Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml), Zentrifugenröhrchen

Fröbel, Wasserburg: Gelrockner, SpeedVac

GE Healthcare, Freiburg: Spannungsgeräte EPS 3500 und EPS 600 Phosphorimager, BIACORE lite, CM5 Chip Sensorchip, Typhoon LabScan, Image Quant 5.1, Äkta Explorer 100- Apparatur, LC- Chromatographie

Amicon Inc., Beverly, USA: Zentrifugenkonzentratoren

Heraeus, Hanau: Trockenschränke

Heidolph, Schwabach: Magnetrührer

Isotherm KGW: Behälter für Flüssigstickstoff

Jalubo, Seelbach: Wasserbäder

LKB, München: Laserdensitometer Ultrascan XL

Millipore Co., Bedford: Immobilon-P Transfermembran (Dicke 0,45 µm), Semi-Dry-Elektroblotter

Peqlab, Erlangen: NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Lumi-Imager F1

Sarstedt, Nümbrecht: Pipettenspitzen, 1,5 ml Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen (TLA-100.3, TLA-120.2)

Satorius, Göttingen: Feinwaagen

Schleich & Schüll, Dassel: Filterpapiere, BioTrap-Apparatur

Schütt, Göttingen: Autoklav

Scientific Industries, Bohemie N.Y., USA: Vortex-Mixer

Shodex, Kanagawa, Japan: RI-101- Detektor

Waters-Millipore, Milford, USA: Milliporewasseranlage Milli-Q

WTW, Weilheim: pH-Meter pH 537

Wyatt, Dernbach: MiniDAWN, Eclipse, QUELS

Ziegra, Isernhagen: Eismaschine

Elektrophoresekammern (Eigenbau der Werkstatt Biochemie 1, Göttingen)

4.2 Methoden

4.2.1 Probenvorbereitung nach Laemmli

Bei der Probenvorbereitung für die SDS- PAGE wird SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf 56°C erhitzt. Dies geschieht, um die Proteine zu charakterisieren. Disulfidbrücken können durch Reduktion gespalten werden. Dazu werden reduzierende Thiolverbindungen wie β - Mercaptoethanol dem Probenpuffer zugesetzt (138).

Tabelle 3: Pippetierschema für die Herstellung des Laemmli- Probenpuffers

	1 x LM	2 x LM
2 M Tris pH 6,8	3ml	6ml
(10 %) SDS	20 ml	40 ml
87 % Glycerol	11,5 ml	23 ml
β - Mercaptoethanol	5 ml	1 ml
Bromphenolblau	20 Kristalle	20 Kristalle
ad Wasser	100 ml	100 ml

4.2.2 Präparation einer 5,5 %igen Digitonin-Lösung

Digitonin (siehe Abbildung 6) ist das giftige Steroidsaponin aus dem Fingerhut *Digitalis purpurea*. Digitonin gehört zu den nicht-ionischen Detergenzien. Für die Reinigung wurden je 5 g Digitonin p.a. in 90 ml H₂O bidest aufgenommen und bis zur Auflösung des Pulvers gekocht. Anschließend wurde der abgekühlte Ansatz durch eine 10 ml Q- Sepharose und eine 5 ml S- Sepharose Säule von Verunreinigungen chromatographisch getrennt. Der Durchfluss nach beiden Säulen wurde als 5,5 %ige Stammlö-

sung definiert. Es folgte eine Einstellung des pH-Wertes mit 1 M Tris/HCl pH 11,28 auf pH 8.

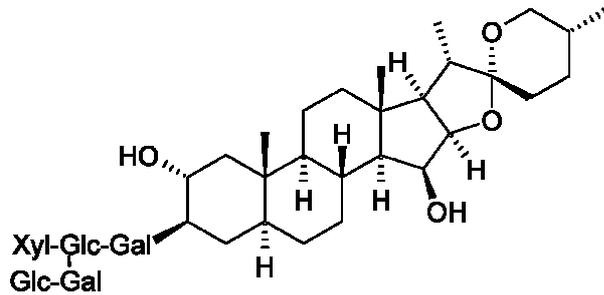


Abbildung 6: Chemische Formel von Digitonin.

4.2.3 große SDS-Gele

Probenpuffer: vgl. 4.2.1

Laufpuffer: 50 mM Tris, pH 8,3 (nicht einstellen)
384 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Die Methode wurde modifiziert nach Laemmli (1970) angewandt. Hierzu wurde die Probe 1:2 mit 2 x Laemmliprobebuffer versetzt und fünf Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Abkühlen erfolgte für eine Minute eine Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14 000 rpm mit anschließendem Probenauftrag auf ein vertikales Gel, das gemäß dem in Tabelle 4 beschriebenen Pipettierschema gegossen wurde. Der Boden der Gele wurde mit 2 % Agarlösung abgedichtet. Nach dem Füllen der Gelkammern mit Laufpuffer erfolgte die Elektrophorese mit 40 mA (3 Stunden) oder 5 mA (24 Stunden).

Tabelle 4: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-PAGE Gelen:

AA-Konzentration		Trenngel			Sammelgel
		10 %	12,5 %	15 %	5 %
Lösungen					
40 % (w/v) AA	(ml)	3,75	4,69	5,63	0,6
2 % (w/v) BAA	(ml)	1	1,25	1,5	-
1,875 M Tris/HCl, pH 8,8	(ml)	6	6	6	-
1M Tris/HCl, pH 6,8	(ml)	-	-	-	0,6
H ₂ O bidest	(ml)	4,05	2,86	1,67	3,34
10 % (w/v) SDS	(µl)	150	150	150	48
TEMED	(µl)	5	5	5	7
20 % (w/v) AMPS	(µl)	45	45	45	45
Gesamtvolumen	(ml)	15,00	15,00	15,00	4,80

4.2.4 kleine SDS- Gele

Probenpuffer: vgl. 4.2.1
 Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

Die Probe wurde 1:2 mit 2 x Laemmliprobenpuffer versetzt und fünf bis zehn Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Abkühlen erfolgte für eine Minute eine Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 14 000 rpm. Anschließend wurden die Proben auf ein vertikales Gel aufgetragen, das gemäß dem in Tabelle 5 beschriebenen Pipettierschema gegossen wurde. Nach dem Füllen der Gelkammern mit Laufpuffer erfolgte die Elektrophorese mit 200 mA (eine Stunde).

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung von kleinen SDS-PAGE Gelen.

Lösungen		Trenngel (2x)		Sammelgel (2x)
		12,5 %	16 %	5 %
	AA-Konzentration			
H ₂ O	(ml)	3,2	2	2,693
30 % AA	(ml)	4,1	5,34	1,007
1,5 M Tris	(ml)	2,5	2,5	-
0,5 M Tris	(ml)	-	-	1,25
10% (w/v) SDS	(µl)	100	100	50
TEMED	(µl)	5	5	10
10% (w/v) AMPS	(µl)	50	50	25
Gesamtvolumen	(ml)	9,955	9,995	5,035

4.2.5 Harnstoff-SDS-PAGE

Für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht <10 kDa wurden harnstoffhaltige Gele (Endkonzentration 6 M Harnstoff) verwendet (139). Die Gele wurden nach unten stehendem Schema (Tabelle 6) als Vertikalgele gegossen. Der Boden der Gele wurde mit 2 %iger Agarlösung abgedichtet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 29 mA für 18 Stunden.

Probenpuffer: vgl. 4.2.1

Laufpuffer: 50 mM Tris, pH 8,3 (nicht einstellen)
 192 mM Glycin
 0,1 % (w/v) SDS

4.2.7 Immunologische Detektion von auf eine PVDF-Membran transferierten Proteinen

TBS:	0,9 % (w/v) NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,4
TBS/TX:	TBS + 0,05 % (w/v) Triton X100
Blocklösung:	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS
Antikörperlösung:	Blocklösung + Antiserum (Verdünnung 1:500 - 1:1000, je nach Antikörper)

Um nach dem Western Blot alle unspezifischen Bindungsstellen der PVDF-Membran abzusättigen, wurde sie für 30 Minuten in Blocklösung inkubiert. Zur Detektion von spezifischen Proteinen wurde sie nun für 90 Minuten in der jeweiligen Antikörperlösung inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgten zwei Waschschriffe für fünf Minuten mit TBS/TX und zweimal für fünf Minuten mit TBS. Danach folgte wiederum eine Inkubation für 90 Minuten mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-anti-Kaninchen IgG). Im Anschluss daran wurde die Membran wie oben beschrieben gewaschen, bevor die Membran für eine Minute in ECL-Reagenz (3 ml Lsg.1 + 3 ml Lsg.2) inkubiert wurde. Um die aus der Peroxidase- ECL-Reaktion resultierende Chemolumineszenz zu visualisieren wurde die Membran entweder auf einen Röntgenfilm aufgelegt, oder am Lumi- Imager F1 digitalisiert. Die Dauer der Exposition (einige Sekunden bis mehrere Minuten) richtete sich nach der Menge des an der Membran gebundenen Proteins und der Qualität des ersten Antikörpers.

4.2.8 Fällung von Proteinen nach Wessel/Flügge

Für die Proteinfällung nach Wessel/Flügge (140) wurde zunächst ein Teil der zu fällenden Probe mit vier Teilen Methanol versetzt. Nach dem Mischen der Probe wurden zwei Teile Chloroform hinzugegeben und intensiv mit dem Vortexer durchmischt.

Anschließend wurde die Probe für zehn Sekunden bei 14 000 rpm bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurden drei Teile H₂O hinzugefügt, intensiv gemischt und zwei Minuten bei 14 000 rpm bei RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildeten sich zwei Phasen, von denen die obere Phase mit der Pipette abgesaugt und verworfen wurde. Auf den Rest wurden vier Teile Methanol hinzugegeben, durchmischt und für fünf Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Hierbei sedimentierten die gefällten Proteine. Das Sediment wurde in fünf Teilen Aceton aufgenommen, auf dem Vortexer gemischt und für fünf Minuten bei 2 °C und 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Sediment im Vakuum getrocknet. Das erhaltende Sediment konnte nun in Laemmliprobenpuffer aufgenommen, und für die SDS-PAGE verwendet werden.

4.2.9 Aceton/ Methanol-Fällung von Proteinen

Die zu fällenden Probe wurde mit dem doppelten Volumen eiskaltem Aceton versetzt. Nach Zentrifugation in der Eppendorf-Kühlzentrifuge (14 000 rpm, 10 min, 2°C) wurde das resultierende Sediment mit gleichem Ausgangsvolumen Methanol gewaschen. Anschließend erfolgte erneut eine Zentrifugation in der Eppendorf-Kühlzentrifuge (14 000 rpm, 20 min, 2°C). Das Sediment wurde auf dem Thermostat bei 56°C getrocknet, in Laemmliprobenpuffer aufgenommen, und konnte für die SDS-PAGE verwendet werden.

4.2.10 Proteinfärbung mit Coomassie-Brillant Blue

Färbelösung:	0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue R 250
	0,005 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue G 250
	40 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
Entfärber 1:	40 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	2,25 % (v/v) Glycerin (87 %)

Entfärber 2: 10 % (v/v) Methanol
 5 % (v/v) Essigsäure
 2,25 % (v/v) Glycerin (87 %)

Das Gel wurde zunächst für mindestens 60 Minuten in der Färbelösung geschwenkt. Zum Entfärben wurde das Gel nacheinander für 30 bis 60 Minuten in Entfärber 1 und mehrere Stunden in Entfärber 2 geschwenkt. Anschließend wurde das Gel gescannt (LabScan) oder mit Silber angefärbt, bevor es getrocknet wurde. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe der Software Image Quant 5.1.

4.2.11 Proteinfärbung mit Silber

Lösung 2: 50 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Aqua dest.

Lösung 4: 12,5 % (v/v) Glutardialdehyd
 in Aqua dest.

Lösung 5: Millipore Wasser

Lösung 6: 0,25 % AgNO₃
 in Aqua dest.

Lösung 7: 2,5 % Na₂CO₃ (aus 12,5 % Stocklösung) +
 0,015 % (v/v) Formaldehyd
 in Aqua dest.

Lösung 8: 5 % Essigsäure
 in Aqua dest.

Lösung 9: 10 % Essigsäure und 5 % Glycerin
 in Aqua dest.

Die Silberfärbung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Heukeshoven (141). Das Gel wurde für die Silberfärbung für 2 Minuten in Lösung 2 inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 6 Minuten in der Lösung 4 inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte ein zweimaliges Waschen mit Lösung 5. Danach wurde das Gel für 12 Minuten mit der Lösung 6 inkubiert, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Lösung 5. Dies diente dem Entfernen des überschüssigen Silbernitrats, bevor sich eine Inkubation in Lösung 7 anschloss. Dieser Schritt führte zum sichtbar werden der Proteine und dauerte solange, bis eine zufriedenstellende Anfärbung erreicht war. Durch Zugabe von Lösung 8 und Inkubation für zwei Minuten wurde die Entwicklung abgebrochen. Als letzter Schritt erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten in Lösung 9. Danach wurden die Proteine quantifiziert und das Gel getrocknet.

4.2.12 Phosphorimaging, Densitometrie und Detektion der Fluoreszenz

Entfärber-Lösung:

50 % (v/v) Methanol (techn.)

10 % (v/v) Essigsäure (techn.)

Neutralisationslösung:

50 % (v/v) Methanol (techn.)

1 % (v/v) Glycerin

4.2.12.1 Phosphorimaging

Um die bei einer *in vitro* Translation durch ^{35}S -Methionin markierten Proteine nach einer Auftrennung in SDS-Gelen nachzuweisen, wurden diese zunächst zur Fixierung der Proteine für 15 min in Entfärber-Lösung und für 30 min in Neutralisationslösung inkubiert. Für den sich daran anschließende Trocknungsprozess wurden die Gele für ca. eine Stunde unter Vakuum und gleichzeitigem Erhitzen auf ein Filterpapier gelegt. Die getrockneten Gele wurden zur Detektion des radioaktiven Isotops auf Storage PhosphorScreen Platten für einen Zeitraum von 15 h exponiert. Die Detektion der PhosphorScreen Platten geschah mit Hilfe des Typhoon Phosphorimager.

4.2.12.2 Densitometrie

Die quantitative Auswertung der Farbdichte der gescannten Gele und Filme geschah mit Hilfe der Software Image-Quant 5.1. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten wiedergegeben die für eine graphische Darstellung der Quantifizierung mit Hilfe der Software Excel (Microsoft) verwendet werden konnte. Wurden Blotmembranen per Lumi- Imager F1 gescannt, erfolgte die quantitative Analyse der Bandenintensitäten mit der Software Lumi Analyst 3.1.

4.2.12.3 Detektion der Fluoreszenz

Die quantitative Auswertung der mit Fluoreszenz markierten Lysine des ppL86 geschah mit Hilfe der Software Image-Quant 5.1. Der Scan der Gele geschah mit Hilfe des Typhoon. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten als Zahlen wiedergegeben die für eine graphische Darstellung der Quantifizierung mit Hilfe der Software Excel (Microsoft) verwendet werden konnte.

4.2.13 Präparation von rauen Mikrosomen aus Hundepankreas

Die Herstellung von rauen Mikrosomen erfolgte nach Walter und Blobel (142). Für die Präparation wurden folgende Puffer benötigt:

Puffer A: (2x)

100 mM Triethanolamin/HCl; pH 7,5

500 mM Saccharose

100 mM KAc

12 mM MgCl₂

4 mM DTT

2 mM EDTA

0,4 mM PMSF

1:1000 PLAC

Puffer A: (1x)

1 Vol. Puffer A

+ 1 Vol. H₂O

PLAC (Gemisch aus):

12 mg Pepstatin A/ml DMSO

12 mg Leupeptin/ml DMSO

12 mg Antipain/ml DMSO

12 mg Chymostatin/ml DMSO

Kissen A:

50 mM Triethanolamin/HCl; pH 7,5
1,3 M Saccharose
50 mM KAc
50 mM KCl
1:1000 PLAC
5 mM MgCl₂
4 mM DTT
1 mM EDTA
0,4 mM PMSF

Kissen 2,1 M Saccharose:

50 mM Triethanolamin/HCl; pH 7,5
2,1 M Saccharose

Kissen 1,75 M Saccharose:

wie Kissen 2,1 M Saccharose jedoch
mit 1,75 M Saccharose

Kissen 1,5 M Saccharose:

wie Kissen 2,1 M Saccharose jedoch
20 mM mit 1,5 M Saccharose

Mikrosomenverdünnungspuffer (MVP):

20 mM Hepes/KOH; pH 7,5
200 mM Saccharose
50 mM KCl
2 mM MgCl₂
2 mM DTT

Kissen 1,3 M Saccharose

wie Kissen 2,1 M Saccharose jedoch
mit 1,3 M Saccharose



Abbildung 7: Als Ausgangsmaterial für die Herstellung rauer Mikrosomen dienten ca. 30 g gefrorener Hundepankreas.

Wenn im Folgenden nicht anders angegeben, erfolgten die Arbeitsschritte bei 2°C. Zunächst wurden etwa 30 g frischer Hundepankreas (vgl. Abbildung 7) abgewogen und in 500 ml Puffer 1 x A im Kühlraum aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde das Pankreas klein geschnitten und von Bindegewebe, Fett und Gefäßen befreit. Anschließend wurde das Pankreas durch eine Gewebepresse in 100 ml Puffer 2 x A überführt und je 30 ml davon in einem 60 ml Potter in drei Durchgängen bei 300 rpm mit einem Motorpotter homogenisiert. Nachfolgend erfolgte eine Zentrifugation des

Homogenats für 10 Minuten bei 2°C mit dem Rotor JA 20 (J2-MC Zentrifuge) bei 3 000 rpm. Dies diente der Abtrennung von nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmern. Das Sediment wurde nochmals in Puffer 2 x A resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die zweiten Sedimente wurden verworfen und die resultierenden Überstände für zehn Minuten bei 2°C mit 9 000 rpm (Rotor: JA 20) zentrifugiert. Dies diente der Abtrennung von größeren Zelltrümmern und den Zellkernen. Die Sedimente wurden verworfen und der Überstand vorsichtig in einen 250 ml Messzylinder dekantiert. 9 ml Kissen A wurden in Zentrifugenröhrchen vorgelegt und jeweils 17 ml des Überstandes darauf geschichtet. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 2 1/2 Stunden bei 2°C mit 45 000 rpm (Rotor: TI 70, L-80 Ultrazentrifuge) mit langsamem Start und Stopp. Die Mikrosomen sedimentierten durch das Kissen A, die cytosolischen Bestandteile blieben im Kissen. Die sedimentierten Bestandteile wurden in 5 ml 1 x A resuspendiert, in einen 15 ml Potter überführt und in drei Durchgängen mit einem Motorpotter mit 100 rpm homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Puffer 1 x A auf das Endvolumen von ca. 80 ml aufgefüllt und auf einen diskontinuierlichen Gradienten von je 4 ml 2,1 M Saccharose, 1,75 M Saccharose und 1,5 M Saccharose in den Zentrifugenröhrchen geschichtet. Die Zugabe der homogenisierten Sedimente erfolgte auf das 1,5 M Saccharose Kissen. Die Zentrifugation erfolgte für 15 - 20 Stunden bei 2°C mit 45 000 rpm mit dem Rotor TI 70 (langsame Beschleunigung und ohne Bremse). In der unteren Phase sammelte sich das raue ER (rER = rough ER), in der oberen Phase das glatte ER (sER = smooth ER) und die freien Ribosomen sedimentierten durch den Gradienten. Die weiße Bande zwischen der 2,1 M Saccharose und der 1,75 M Saccharose wurde mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in einem Messzylinder gesammelt und mit Puffer 1 x A auf ein Volumen von 160 ml aufgefüllt. Mit dem Überstand wurden Zentrifugenröhrchen beladen, in die 2 ml 1,3 M Saccharose-Kissen vorgelegt waren. Die Zentrifugation erfolgte für 2 Stunden bei 2°C mit 45 000 rpm im Rotor TI 70. Im Sediment befanden sich die rauen Mikrosomen (RM). Die Sedimente wurden in Mikrosomenverdünnungspuffer (MVP) der 2 mM DTT enthält resuspendiert, mit einem 2 ml Potter homogenisiert (sieben Durchgänge) und in einem Falconröhrchen vereint. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{280}) erfolgte mit Hilfe des NanoDropTM 1000 Spektrophotometers. Die RM wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei – 80°C gelagert.

4.2.14 Präparation von Puromycin- und Salz gewaschenen Hundepankreasmikrosomen

Tabelle 7: Zusammensetzung der Puffer für die Puromycin/ Kaliumacetat - Behandlung von Mikrosomen

Stammlösungen	Puromycin- Puffer	Saccharose- Puffer	Kissen 1	Kissen 2	Verdünnungs- Puffer
HEPES (pH 7,5)	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Kaliumacetat	500 mM	500 mM	500 mM	500 mM	-
Magnesiumchlorid	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	-
GTP	0,04	-	-	-	-
DTT	5 mM	5 mM	-	-	5 mM
Puromycin	1 mM	-	-	-	-
Saccharose	-	2 M	1,5 M	-	-

Durch Puromycin (ein t- RNA Analogon) werden naszierende Ketten von den Ribosomen freigesetzt, sodass diese sich von den RM ablösen und gemeinsam mit den peripheren Membranproteinen beim Waschschrift mit Kaliumacetat abgewaschen werden. Es entstehen sogenannte PK-RM (Puromycin Kaliumacetat- RM). Das Waschen der rauen Mikrosomen mit Kaliumacetat und Puromycin erfolgte im Wesentlichen nach Görlich und Rapoport (42). 34,5 ml frisch aufgetauter Mikrosomensuspension ($OD_{280} = 40$) wurden sedimentiert (20 min bei 100 000 rpm und 2°C, Rotor TLA-100.3, Optima™ TLX Ultrazentrifuge). Die Sedimente wurden in 6 x 1,5 ml Puromycin-Puffer resuspendiert. Unter leichtem Schütteln (500 rpm) wurde für 20 min bei 25°C inkubiert und anschließend die PK-RM ultrazentrifugiert (20 min bei 100 000 rpm bei 25°C Rotor TLA-100.3). Das resultierende Sediment wurde zur Flotation in 500 µl Saccharose-Puffer resuspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen (TLA-100.3) überführt und mit 1 ml Kissen 1 und 0,5 ml Kissen 2 überschichtet. Es folgte eine Flotation im Rotor TLA-100.3 (60 min bei 100 000 rpm). Anschließend konnten die PK-RM aus der Interphase zwischen Kissen 1 und Kissen 2 mit einer sterilen, abgeschnittenen Pipettenspitze geerntet und mit 1 ml Verdünnungspuffer 1:1 verdünnt werden. Das Ribosomensediment wurde in 500 µl MVP resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (Rotor TLA 100.3, 20 min, 100 000 rpm, 2°C). Nach Resuspendierung des Sediments in MVP wurden die PK-RM in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.15 Puromycin/ Kaliumacetat - Behandlung von Ribosomen

Als Ausgangsmaterial für die Behandlung der Ribosomen mit Puromycin und Kaliumacetat dienten die während der Herstellung der rauen Mikrosomen (vgl. Abschnitt 4.2.13) anfallenden, in MVP-DTT resuspendierten Ribosomensedimente. In einem ersten Schritt wurden 4 x 1ml Ribosomen für 90 Minuten mit 68 000 rpm bei 2°C (TLA 100.3, Beckmann Zentrifugenröhrchen) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in je 500 µl Kaliumacetat/ Puromycin- Puffer resuspendiert und für 20 Minuten bei 25°C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss für 90 Minuten mit 68 000 rpm bei 2°C (TLA 100.3, Beckmann Zentrifugenröhrchen) zentrifugiert. Die Sedimente wurden in insgesamt 2 ml Hochsalz - Saccharose- Puffer resuspendiert, auf zwei vorgelegte 1,5 ml Hochsalz + Saccharose-Kissen aufgetragen und anschließend zentrifugiert (60 Minuten bei 100 000 rpm, 2°C, TLA 110). Alle Überstände wurden für die spätere Analyse mittels SDS- PAGE gesammelt. Abschließend wurden die Sedimente in insgesamt 2 ml MVP-DTT aufgenommen und die OD₂₈₀ mittels NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer bestimmt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der Puffer für die Puromycin/ Kaliumacetat - Behandlung von Ribosomen

	Kaliumacetat/ Puromycin- Puffer	Hochsalz - Saccharo- se Puffer	Hochsalz + Saccha- rose Puffer
GTP	1 mM	-----	-----
KAC	500 mM	500 mM	500 mM
Puromycin	0,5 mM	-----	-----
HEPES / KOH	-----	40 mM	40 mM
DTT	-----	2 mM	2 mM
Saccharose	-----	-----	500 mM
Mg(Ac) ₂	-----	5 mM	5 mM

4.2.16 RNaseA - Behandlung von Ribosomen

Um ribosomale RNA zu verdauen, wurde pro 6,2 µg Ribosomen 1 µg RNaseA zugegeben. Die Inkubation erfolgte 60 oder 90 Minuten bei 30°C und 700 rpm. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an Ribosomen unter gleichen Bedingungen aber ohne RNaseA Zugabe inkubiert.

4.2.17 Trennung der ribosomalen Untereinheiten

Um die ribosomalen Untereinheiten zu trennen, wurden 2 X 100 µl Puromycin und Kaliumacetat behandelte Ribosomen auf eine Endkonzentration von 1 M KCl, 10 mM MgCl₂ und 2 mM DTT gebracht. Es folgte eine Inkubation der Ribosomen für 1h bei Raumtemperatur. Die Ribosomen wurden anschließend auf einen Saccharosegradienten aufgetragen (je 1,25 ml 30 %, 25 %, 20 % und 15 % Saccharose) und für 3 h mit 32 000 rpm bei 26°C zentrifugiert (Rotor SW 55, langsame Beschleunigung, ohne Bremse, L-80 Ultrazentrifuge). Nach der Zentrifugation wurden von oben je 500 µl Fraktionen abgenommen und von jeder Fraktion 100 µl nach Wessel/Flügge (140) gefällt. Die Analyse erfolgte mittels SDS- PAGE und Western- Blot (primäre Antikörper gegen L4 und S3).

Die Fraktionen, die nicht getrennte Ribosomen enthielten, wurden vereinigt und mit Puffer D mindestens 1:2 verdünnt. Über Nacht erfolgte das Sedimentieren dieser Ribosomen (57 000 rpm bei 2°C im TLA 100.3 oder TLA 110, L-80 Ultrazentrifuge). Diese Sedimente wurden in 200 µl MVP+DTT resuspendiert und nochmals wie oben beschrieben erneut behandelt und analysiert. Die erneute Zentrifugation erfolgte jedoch auf einem Saccharosegradienten von je 2,75 ml 30 %, 25 %, 20 % und 15 % Saccharose mit dem Rotor SW 41 Ti (L-80 Ultrazentrifuge). Die Sedimente wurden in 10 µl MVP+DDT resuspendiert und die Zentrifugenröhrchen nochmals mit einem Gesamtvolumen von 20 µl MVP+DDT gewaschen. Die Konzentration der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit wurden mit dem NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer bestimmt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer für die Trennung der ribosomalen Untereinheiten.

Puffer	Tris/HCl pH 7,6	MgCl ₂	KCl	DTT	Saccharose
30 % Saccharose	50 mM	10 mM	850 mM	1 mM	30 %
25 % Saccharose	50 mM	10 mM	850 mM	1 mM	25 %
20 % Saccharose	50 mM	10 mM	850 mM	1 mM	20 %
15 % Saccharose	50 mM	10 mM	850 mM	1 mM	15 %
Puffer D	50 mM	10 mM	850 mM	1 mM	-----

4.2.18 Isolierung des Sec61- Komplexes aus Hundepankreas-mirkrosomen

30 ml (30 000 Äquivalente) RM mit einer OD₂₈₀= 40 wurden für 20 Minuten bei 2°C und 100 000 rpm zentrifugiert (Rotor: TLA 100.3 oder TLA 110, L-80 Ultrazentrifuge). Eine Definition der Äquivalente findet man bei Walter und Blobel (142). Die Membranen wurden in 30 ml Puffer 18 (siehe Tabelle 10) resuspendiert und anschließend für 40 Minuten bei 2°C und 100 000 rpm zentrifugiert (Rotor: TLA 100.3 oder TLA 110). Der Überstand wurde Prä- Extrakt genannt und enthält die luminalen Proteine des ER. Das Sediment wurde in Puffer 19 (siehe Tabelle 10) resuspendiert, anschließend zuerst für 10 Minuten auf Eis inkubiert dann für 60 Minuten bei 2°C und 100 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (= RM- Extrakt) kann zum Beispiel zur Isolierung von TRAM (= „translocating chain-associated membrane protein“) der Signalpeptidase und anderen Proteinen weiterverwendet werden. Das Sediment wurde nochmals in Puffer 19 (siehe Tabelle 10) gewaschen und anschließend in 30 ml Puffer 11 (siehe Tabelle 10) resuspendiert. Die Mischung wurde für 60 Minuten auf Eis und anschließend 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach 90 Minuten Zentrifugation mit 100 000 rpm bei 25°C wurde der Überstand (= RAMP vor Dialyse „ribosome associated membrane protein“) abgenommen und gegen 200 Volumen Puffer 12 (siehe Tabelle 10) über Nacht bei 4°C dialysiert. Der dialysierte Überstand (= RAMP nach Dialyse) wurde für zehn Minuten bei 100 000 rpm und 2°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf je eine 10 ml Q- Sepharose und 2 ml S- Sepharose Säule aufgetragen, die hintereinander geschaltet waren. Die Säulen wurden nach dem Auftragen der Probe mit Puffer 15 (siehe Tabelle 10) gewaschen. Die S- Sepharose- Säule

wurde anschließend mit einem 80 ml Gradienten (Puffer 16A und 16B, siehe Tabelle 10; Flussrate: 5 µl/min) eluiert. Fraktionen à 4 ml wurden gesammelt und je 50 µl Aliquots zur Analyse gefällt (Aceton/ Methanol) und auf ein SDS- Gel aufgetragen. Die Fraktionen in denen der Sec61- Komplex nachzuweisen war, wurden mit P 7 (siehe Tabelle 10) mindestens 1:3 verdünnt und auf eine 2 ml S- Sepharose aufgetragen. Nach anschließendem Waschen der Säule mit DBCP10-200 und DBCP10-400 wurde mit DP10-800 (siehe Tabelle 10) eluiert. Zur Optimierung der Proteinausbeute wurde in einer anderen Präparation die Waschschrirte mit Digitonin im Puffer und höheren Kaliumacetatkonzentration durchgeführt. Die Bestimmung der auf Sec61 positiven getesteten Proben der Salzelution erfolgte über SDS- Gelelektrophorese. Die Sec61 enthaltenden Proben wurden vereinigt, über Microcon™- Konzentratoren konzentriert, auf ein 16 % SDS- Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western- Blot analysiert.

Material und Methoden

Tabelle 10: Zusammensetzung der Puffer für die Isolierung des Sec61- Komplexes aus Hundepankreasmikrosomen.

	P 7	DP10- 200 bis 1000	DBCP10- 200	DBCP10- 400	P 11	P12
Hepes/ KOH pH 7,8	10 mM	50 mM			100 mM	10 mM
DTT	5 mM					
Glycerin (in %, w/v)	-----	15%				-----
Saccharose	-----	-----	-----	-----	-----	20%
deoxyBIGCHAP	-----	-----	0,3%		-----	-----
Digitonin	0,5%	1%	-----	-----	3%	0,02%
Puromycin	-----				1 mM	-----
Kaliumacetat	-----	200 bis 1000 mM	200 mM	400 mM	1 M	-----
Magnesiumacetat	-----				17,5 mM	1 mM
GTP	-----				0,2 mM	-----
PLAC	-----				0,001 mg/ml	-----

	P13	P15	P16 A	P 16 B	P18	P19
Hepes/ KOH pH 7,8	10 mM	50 mM			20 mM	
DTT	5 mM					
Glycerin (in %, w/v)	10%		15%			
Digitonin	4 %	2,5 %			0,4%	4 %
Kaliumacetat	-----	150 mM		500 mM	-----	400 mM
Magnesiumacetat	-----				5 mM	12 mM
PLAC	-----				0,001 mg/ml	

4.2.19 Vorbereitung der Säulen

Die Q- und die S- Säulen wurden direkt hintereinander geschaltet. Vor der Benutzung wurden die Säulen mit Wasser gespült und mit mindestens 10 ml Puffer 13 (siehe Tabelle 10) äquilibriert. Die Fließgeschwindigkeit beim Äquilibrieren betrug ca. 0,3- 0,2 ml/min. Die Probe wurde mit 0,1 ml/min über beide Säulen aufgetragen und anschließend mit 5 ml Puffer 15 (siehe Tabelle 10, Flussrate: 0,1 ml/min) gewaschen. Eluiert wurde je nach Bedarf mit einem kontinuierlichen Salzgradienten oder Stufengradienten (Puffer DP10 mit 600, 800 und 1000 mM Kaliumacetat, siehe Tabelle 10).

4.2.20 Affinitätsreinigung von polyklonalen Peptidantikörpern

4.2.20.1 Kopplung des Peptides an die Sulfolink- Matrix

Probenpuffer, Kopplungspuffer, Waschpuffer 50 mM L- Glycin und 0,05 % NaN_3 (als 10 % Stocklösung) waren im Kit vorhanden.

10 mg des zu koppelnden Peptides wurden in 2-3 ml Kopplungspuffer gelöst. Nachdem 2 ml des Sulfo- Link- Materials in eine Säule gegeben wurden, wurde der überstehende Puffer entfernt und die Säule mit 12 ml Kopplungspuffer (3 x 4 ml) äquilibriert. Der überstehende Puffer wurde abgelassen und das im Kopplungspuffer gelöste Peptid auf die Säule gegeben. Die Säule wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Inkubation wurde danach für weitere 30 Minuten ohne Schwenken fortgeführt. Von der Säule wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und anschließend mit 2 x 3 ml Kopplungspuffer gewaschen. Um die nicht abgesättigten Bindungsstellen zu blockieren, wurde anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 ml einer 50 mM L- Cysteinlösung (in Kopplungspuffer) unter leichtem schwenken, anschließend 30 Minuten ohne Schwenken inkubiert.

4.2.20.2 Bindung der spezifischen Antikörper an die Matrix

Für die Bindung und die Elution der spezifischen Antikörper an der Matrix wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A: 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5

Lösung B: 10 mM Tris/ HCl, pH 8,8

Lösung C: 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5 und 500 mM NaCl

Lösung D: 100 mM Glycin/ HCl, pH 2,8

Lösung E: 100 mM Triethylamin, pH 11,5

Lösung F: 1 M Tris/ HCl, pH 8,0

Die Sulfolink- Säule wurde mit 10 Bettvolumina (BV = 2 ml) Lösung A äquilibriert. 10 ml Antiserum wurden über einen Membranfilter gegeben und mit 90 ml Lösung A verdünnt und mittels einer Peristaltikpumpe auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Auftragsgeschwindigkeit betrug 10 bis 15 ml/ h, wobei die verdünnte Antiserumlösung die Säule mindestens zweimal passieren sollte. Danach wurde die Säule nacheinander mit je 20 BV Lösung A und Lösung C mit einer Flußgeschwindigkeit von 15 – 30 ml/ h gewaschen.

4.2.20.3 Elution der spezifischen Antikörper

Die gewaschene Säule wurde mit 10 BV Lösung D versetzt. Dadurch werden die säuresensitiven Antikörper von der Säule eluiert. Um diese möglichst schnell in einen weniger schädlichen pH- Wert Bereich zu bringen, wurde das Eluat unter Rühren in einem Gefäß mit Lösung F aufgefangen. Nach dieser Säureelution wurde die Säule mit Lösung B gewaschen, bis der pH- Wert 8,8 betrug. Anschließend erfolgte die Elution der alkalisensitiven Antikörper mit 10 BV Lösung E. Wieder wurde das anfallende Eluat unter Rühren in einem Gefäß mit Lösung F aufgefangen. Die eluierten Antikörper wurden anschließend mittels Western- Blot Analyse getestet (siehe Abbildung 8).

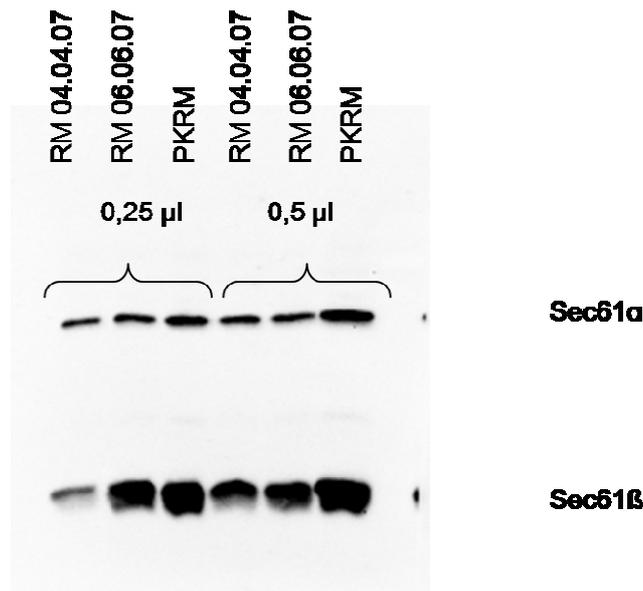


Abbildung 8: Bestimmung der Funktionalität des gereinigten Sec61 β Antikörpers. 25 μ l und 50 μ l von PK-RMs und von zwei unterschiedlichen RM wurden auf ein 16 % BIO-RAD Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE und Western- Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit den beiden primären Antikörpern Sec61 α und dem gereinigten Sec61 β , gefolgt von dem Sekundären Antikörper Peroxidase-anti-Kaninchen IgG inkubiert. Beide Primärantikörper wurden in einer 1:1 000 Verdünnung eingesetzt.

4.2.20.4 Kopplung von Antikörper an Protein A/G-Sepharose

Eine Immunpräzipitation (IP) ist eine immunologische Methode, bei der mittels eines Antikörpers ein Antigen aus einer Lösung präzipitiert wird. Dieses Antigen kann ein Protein oder ein Peptid sein. Folgende Lösungen für die Kopplung der Antikörper an Protein A/G-Sepharose werden benötigt:

- Lösung 1: 100 mM Tris/ HCl, pH 8,0
- Lösung 2: 200 mM Natriumborat pH 9,0
- Lösung 3: 200 mM Ethanolamin/ HCl, pH 8,0
- Lösung 4: 100 mM Glycin, pH 2,8
- DMP: Dimethylpimelimidat
- PBS: 155 mM NaCl
50 mM NaH₂PO₄*H₂O
200 mM NaH₂PO₄*2H₂O
mit 5 N NaOH auf pH 7,3

Die Kopplung der Antikörper an Protein A/G-Sepharose erfolgte nach Harlow und Lane (143). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. 1 ml gequollene Protein A/G-Sepharose wurde nach Äquilibration mit Lösung 1 mit 1 ml Antiserum im 15 ml Falconröhrchen unter leichtem Schwenken für eine Stunde inkubiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation in einer Bactifuge (1 000 rpm, 2 min) entfernt. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 10 ml Lösung 2 gewaschen. Das Entfernen des Überstands geschah durch Zentrifugation in einer Bactifuge (1 000 rpm, 2 min). Das Säulenmaterial wurde anschließend nochmals mit 10 ml Lösung 2 versetzt. Zur chemischen Quervernetzung wurde Dimethylpimelimidat (DMP) zugesetzt, bis zu einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 30 minütiger Inkubation wurde nach Entfernen des Überstandes die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Lösung 3 unterbrochen. Der Überstand wurde entnommen, und letzte Reste von DMP wurden durch Inkubation mit weiteren 10 ml Lösung 3 für zwei Stunden bei Raumtemperatur neutralisiert und das Säulenmaterial mit 10 ml Lösung 4 für 10 bis 15 Minuten gewaschen. Die nachfolgende Neutralisation mit 10 ml Lösung 1 war erforderlich, damit die Antikörper nicht denaturieren. Nach einem abschließenden Waschen mit PBS konnte das Material nun für die Bindung von Antigenen benutzt werden. Der Antikörper war nun kovalent an die Protein A/G-Matrix gekoppelt.

4.2.21 Isolierung des Sec61- Komplexes aus PK-RM

0,1 %DP10-800: 50 mM HEPES/KOH pH 7,8
 400 mM Kaliumacetat
 15 % Glycerin
 0,1 % Digitonin
 5 mM DTT

0,1 % DP-0: 50 mM HEPES-KOH (pH 7,8)
 5mM DTT
 15 % Glycerin
 0,1 % Digitonin

Solubilisierungspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,8
400 mM Kaliumacetat
1,5 % n- decanoyl Saccharose
15 % Glycerin
0,7 % deoxy- Big- CHAP
10 µg/ ml PLAC

Rekonstituierungsspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,8
750 mM Kaliumacetat
15 % Glycerin
0,7 % deoxy- Big- CHAP

Elutionspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,8
750 mM Kaliumacetat
15 % Glycerin
0,7 % deoxy- Big- CHAP
1,3 mg/ ml Peptid des N- Terminus von Sec61β

Verdünnungspuffer: 50 mM HEPES/KOH pH 7,8
15 % Glycerin
0,7 % deoxy- Big- CHAP

24 ml PK-RM ($OD_{280} = 25$) wurden in 24 ml Solubilisierungspuffer für 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Die solubilisierten PK-RM wurden für 10 Minuten bei 14 000 rpm in einer Eppendorf Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und über Nacht auf die Antikörper- Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit Rekonstituierungspuffer intensiv gewaschen. Die Elution erfolgte mit 8 x 500 µl Elutionspuffer, wobei die dritte Fraktion 30 Minuten auf der Säule gehalten wurde. Je 50 µl der Fraktionen wurden mit Aceton/ Methanol gefällt, mittels SDS- PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend Western- Blot analysiert. Die Proben mit positiven Ergebnis wurden vereinigt, 1:3 mit Verdünnungspuffer gemischt und auf eine 0,2 ml S- Sepharose Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Säule mit 0,1 % DP-0 gewaschen um einen Detergenzwechsel von deoxy-Big- CHAP zu Digitonin zu erreichen. Es folgte eine Elution 0,1 % DP10-800

mit Fraktionen von je 500 µl. Je 50 µl der Fraktionen wurde mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Western- Blot analysiert. Die Proteinkonzentration wurde über einen Vergleich mit einer BSA Reihe nach SDS- PAGE und Coomassie- Färbung bestimmt.

4.2.22 Isolierung von Grp170 und BiP aus Prä- Extrakten

Grp170, auch ABP 150 genannt (108) ist ein molekulares Chaperon im Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Als Ausgangsmaterial zur Isolierung des Proteins dienten raue Mikrosomen (RM). Zur Isolierung von Grp170 aus Hundepankreas- mikrosomen wurden diese in einem ersten Schritt im TLA100.3 Rotor für 20 min bei 68 000 rpm und 2°C zentrifugiert, um die Mikrosomen zu sedimentieren. Das Sediment wurde im gleichen Volumen CP- 400 (siehe Tabelle 11) resuspendiert und für 20 min bei 4°C auf dem Schüttler solubilisiert. Um unlösliche Proteine und die Membranen zu entfernen, wurde dann nochmals für 60 min bei 100.000 rpm und 2°C im TLA100.3 Rotor zentrifugiert. Der Überstand enthielt die luminalen Proteine der Mikrosomen und wurde für den weiteren Reinigungsschritt verwendet. Das Sediment enthielt den Großteil der Membranproteine und konnte zur Isolierung des Sec61- Komplexes weiterverarbeitet werden.

Als Reinigungsschritt wurde eine Chromatographie mit ATP- Agarose durchgeführt. Bei dieser Affinitätschromatographie binden ATP-bindende Proteine an das kovalent an die Agarose- Matrix gekoppelte ATP und können anschließend mit einer ATP- Lösung eluiert werden.

Tabelle 11: Pufferzusammensetzung für die ATP-Agarose Affinitätschromatographie.

Bestandteil	CP-400	CCP+Chaps	CCP-Chaps	CACP	CKACP
Hepes/ KOH pH 7,5	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
KCl	400 mM	400 mM	400 mM	400 mM	2 M
MgCl ₂	2 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
EDTA	1 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
DTT	-----	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Glycerin (in %, w/v)	-----	30	30	30	-----
ATP	-----	-----	-----	4 mM	10 mM
Chaps	0,65 %	0,65 %	-----	-----	-----

4.2.23 Vorbereitung der ATP- Agarose Säule und der Probe

Die ATP- Agarose- Säule wurde mit zwei bis drei Bettvolumen CCP+Chaps (siehe Tabelle 11) äquilibriert. Die Extrakte wurden mit dem Puffer CCP+Chaps auf ein Volumen von 30 ml gebracht und auf die ATP- Agarose mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/h aufgetragen. Im Anschluss wurde die Säule dann mit je 30 ml CCP+ Chaps und CCP- Chaps (siehe Tabelle 11) und einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/h gewaschen. Die Elution erfolgte nacheinander in je 15 Fraktionen á 2 ml CACP und CKACP (siehe Tabelle 11) bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/h. Jeweils 50 µl dieser Fraktionen wurden abgenommen und die Proteine mit Aceton/Methanol gefällt, um schließlich mittels SDS- PAGE analysiert zu werden. Die Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert. Nach dieser Prozedur konnte die Säule für die nächste Reinigung verwendet oder nach Waschen mit H₂O dest. in 20% Ethanol gelagert werden. Die positiven Proteinproben wurden anschließend vereinigt und nacheinander mit den Konzentratoren Centricon YM 30 und Microcon 30 kDa cut-off konzentriert.

4.2.24 Gelfiltration

Die Methode der Gelfiltration wurde angewendet, um freies BiP vom Proteinkomplex aus Grp170 und BiP zu trennen. Die Gelfiltration wurde mit der Äkta Explorer 100- Anlage durchgeführt. Die mit Hilfe des „molecular weight marker kit“ geeichte Supedex 200 HR10/30 Gelfiltrationssäule wurde zunächst mit einem Säulenvolumen (100 ml) CCP-Chaps Puffer (siehe Tabelle 11) äquilibriert, dann die Proteine aufgetragen und schließlich mit CCP- Chaps Puffer eluiert. Der gesamte Lauf erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min. Nach dem Auftrag der Proteine wurden 1,4 ml Fraktionen gesammelt. Von den Elutionsfraktionen wurden je 100 µl entnommen, die darin enthaltenen Proteine mittels Aceton/ Methanol gefällt (vgl. 4.2.9), in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Während des Laufes wurde die optische Dichte des Eluates bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet, so dass das genaue Volumen ermittelt werden konnte bei dem die Proteine eluieren (siehe Abbildung 35). Um das nicht an Grp170 gebundene BiP zu erhalten, wurden die positiven Proteinproben vereinigt und mittels Centriprep™ und Microcon™- Kon-

zentratoren konzentriert. Die Proben konnten anschließend für weitere Versuche eingesetzt werden oder bei -80 °C gelagert werden.

4.2.25 In vitro- Synthese des Präprolactin 86mer (=ppL86) Transkripts

Für die *in vitro*- Synthese des ppL86 Transkripts wurde der Transkriptionsansatz wie unten angegeben in ein Eppendorfreaktionsgefäß zusammenpipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für drei Stunden bei 40°C im Wasserbad. Die so erhaltenen Transkripte konnten sofort für eine *in vitro*- Synthese eingesetzt werden oder wurden bei – 80°C eingefroren.

Salzlösung: (10x)

Prämix :

400 mM Hepes/KOH; pH 7,4

1/10 Volumen 10x Salzlösung

60 mM MgAc₂

0,1 mg/ml BSA

20 mM Spermidin

10 mM DTT

0,5 mM Nukleotid-Mix

0,1 mM GTP

CAP

5 U m⁷GpppG

in 300 µl 10 mM HEPES/KOH; pH 7,9

Transkriptionsansatz:

60 µl Prämix

4 µl DNA (1,15 µg/µl) pB4- *Pvu* II

5µl CAP

3 µl RNasin

2 µl Polymerase SP6

26 µl H₂O

4.2.26 In vitro- Synthese des Präprolactin (=ppL) Transkripts

Für die *in vitro*- Synthese des ppL Transkripts wurde der Transkriptionsansatz wie unten angegeben in ein Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für drei Stunden bei 40°C im Wasserbad. Die so erhaltenen Transkripte konnten sofort für eine *in vitro*- Synthese eingesetzt werden oder wurden bei -80°C eingefroren.

Transkriptionsansatz:

30 µl Prämix (siehe Abschnitt 4.2.25)

2 µl DNA (0,5 µg/µl) pB4- *EcoR* I)

2,5 µl CAP

1,5 µl RNasin

1 µl Polymerase SP6

13 µl H₂O

4.2.27 In vitro- Synthese und ³⁵S- Markierung von Proteinen in Kaninchen Retikulytenlysat

Die Synthese von Präprolactin wurde mit dem Translations Kit (Retikulozyten-Lysat) durchgeführt. Die Translationsansätze wurden nach folgendem Schema in ein Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert:

Ret.-Lysat	40 %
ppL Transkript	6 %
KAc	4 %
MgAc ₂	6 %
AS ohne Methionin	8 %
[³⁵ S]- Methionin	8 %
H ₂ O	28 %

Die darauf einsetzende Proteinsynthese wurde in Abwesenheit, bzw. in Anwesenheit von Mikrosomen in verschiedenen Konzentrationen (2, 4 und 6 % des eingesetzten Volumens) im Rahmen eines Sequestrierungstests (vgl. Abschnitt 4.2.29) durchgeführt. Die Mikrosomen waren jeweils auf eine OD₂₈₀ von 40 eingestellt.

4.2.28 *In vitro*- Synthese von fluoreszierenden Proteinen in Kaninchen Retikulozyten-lysate

Die Synthese von Präprolactin 86mer wurde mit dem Translations Kit der Firma Roche Diagnostics (Retikulozyten- Lysate) durchgeführt. Die Translationsansätze wurden nach folgendem Schema in ein Reaktionsgefäß auf Eis zusammenpipettiert:

40 %	Retikulozytenlysate Typ II
15 %	ppL86 Transkript
6 %	MgAc ₂
4 %	KAc
4 %	Aminosäuremix ohne Methionin
4 %	Aminosäuremix ohne Leucin
0 % - 2%	FluoroTect™- tRNA
25 %- 27%	H ₂ O

Die Proteinsynthese wurde bei 30°C in Anwesenheit von fluoreszierender tRNA (FluoroTect™- tRNA) in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Nach Zugabe von 2 x Laemmli-Probenpuffer und anschließendem Erhitzen auf 95°C konnte die Probe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die fluoreszierenden Proteine wurden mittels Fluoreszenzmessung (Typhoon) analysiert.

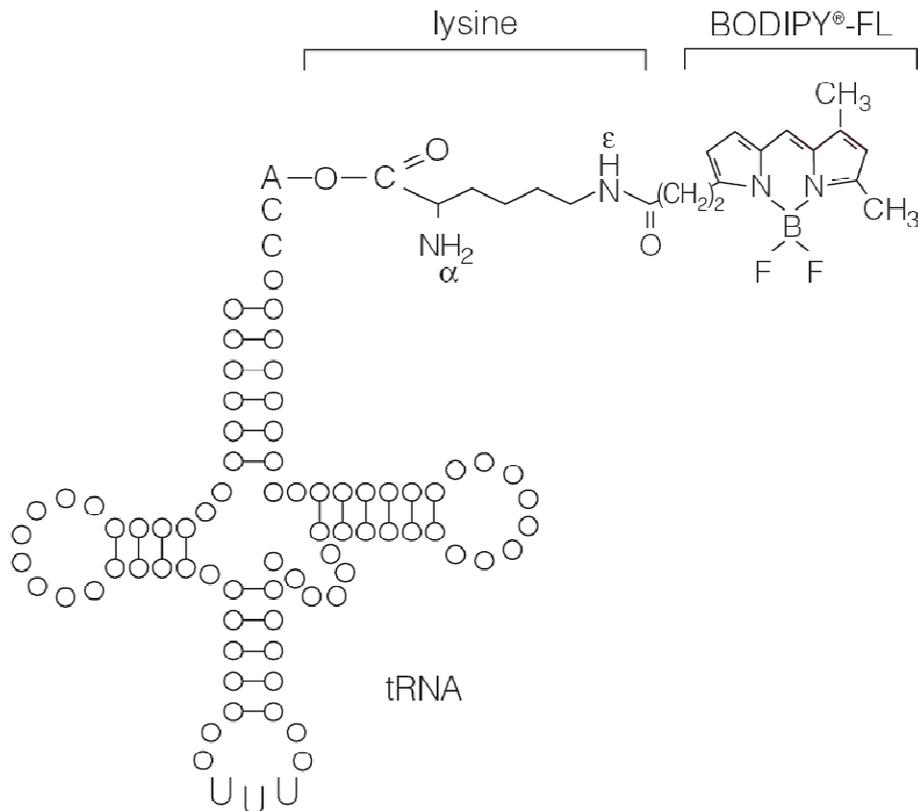


Abbildung 9: Struktur der FluoroTect™ tRNA (Quelle: Promega).

4.2.29 Sequestrierungstest

Im Anschluss an die Präparation der Mikrosomen wurde deren Funktionalität getestet. Hierfür wurde ein Sequestrierungstest durchgeführt. Dieser Test diente der Untersuchung des Transports und der Prozessierung des Vorläuferproteins (Präprolactin = ppL) in das Lumen von Mikrosomen. Dafür wurde ein Transportansatz wie in 4.2.27 beschrieben nach dessen Inkubation auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Der Transportansatz wurde in je drei Aliquots von 3,5 µl aufgeteilt. In einem nächsten Schritt wurden pro Translationsansatz je 3,5 µl der folgenden Lösungen zupipettiert: Im ersten Saccharose-Lösung, im zweiten Proteinase K-Lösung, im dritten Proteinase K/TritonX-100- Lösung. Nach durchmischen des Translationsansatzes folgte eine einstündige Inkubation bei 0°C. Um die Reaktion zu stoppen wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 µl PMSF (100 mM; in Ethanol) zugegeben und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 x Laemmliprobenpuffer und anschließendem Erhitzen auf 95°C konnte die Probe elektrophoretisch aufgetrennt und die Reaktion mittels Phosphorimaging analysiert werden.

Proteine, die in Membranvesikel importiert worden sind, sind gegen den Angriff von exogen zugegebenen Proteasen geschützt. Gleichzeitig wird synthetisiertes, aber nicht transportiertes Protein von exogener Protease verdaut. Auf diese Weise konnte bestimmt werden, ob und wie viel des synthetisierten Proteins transportiert wurde.

Saccharose-Lösung: 160 mM Saccharose

Proteinase K-Lösung: 160 mM Saccharose
380 µg/ml Proteinase K

Proteinase K/ TritonX-100-Lösung: 160 mM Saccharose
380 µg/ml Proteinase K
0,2 % (w/v) TritonX-100

Je nach Präparation und Ausgangsmaterial erhielt man aus 30 g Hundepankreas (siehe Abbildung 7) eine Ausbeute an Mikrosomen von 15 – 30 ml mit einer OD_{280} zwischen 80 und 155. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis eines Tests auf Sequestrierung. Die Transporteffizienz der rauen Mikrosomen ist in Abbildung 10 jeweils angegeben.

Material und Methoden

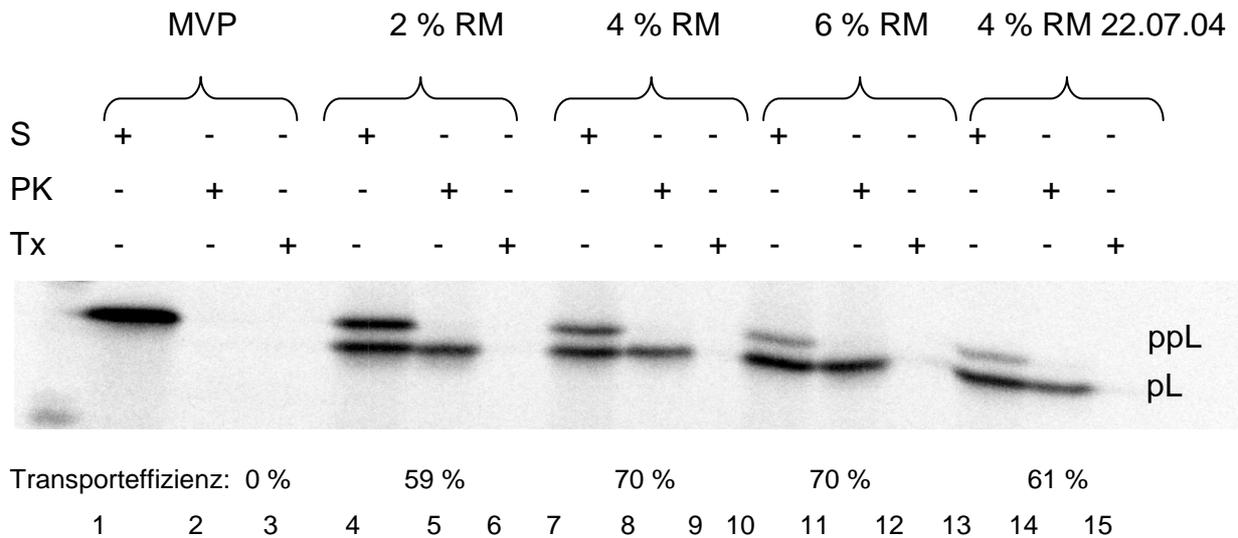


Abbildung 10: Vergleich der Transporteffizienz verschiedener RM- Konzentrationen. Verschiedene Konzentrationen von rauen Mikrosomen wurden eingesetzt. MVP diente als Negativkontrolle und die Mikrosomen vom 22.07.04 als Positivkontrolle. Die *in vitro* Translation erfolgte in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin. Die elektrophoretische Auftrennung geschah mit einem 15 % SDS-Gel. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Phosphorimaging. Die Transporteffizienz der RM wurde berechnet, indem die Gesamtmenge der prozessierten Ketten im Saccharose- Ansatz als 100 % (Spur 4, 7, 10,13) definiert wurde. Sie diente der prozentualen Bestimmung der vor dem Proteinase K- Verdau geschützten Bande (Spur 5, 8, 11,14).Die Transporteffizienz lag zwischen 59 und 70 %. S = Saccharose, Tx = Triton X-100 und PK = Proteinase K.

Die Transporteffizienz der RM wurde berechnet, indem die Gesamtmenge der prozessierten Ketten im Saccharose- Ansatz als 100 % (Spur 4, 7, 10,13) definiert wurde. Sie diente der prozentualen Bestimmung der vor dem Proteinase K- Verdau geschützten Bande (Spur 5, 8, 11,14).

4.2.30 Translation und Prozessierung von ppL in Anwesenheit der beiden Ringfraktionen (UR und OR) sowie von RM

Innerhalb des Saccharosegradienten (Abschnitt 4.2.13) entstanden nach der Zentrifugation der Mikrosomensuspension drei Banden zwischen den einzelnen Saccharosekonzentrationen (vgl. Abbildung 11 A). Ihrer Position entsprechend wurden die Banden als oberer Ring, unterer Ring und Mikrosomen bezeichnet. Die Mikrosomen befanden sich zwischen der 2,1 M Saccharose und der 1,75 M Saccharose. Um die Transportkompetenz der Banden zu testen, erfolgte eine *in vitro* Translation in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin in einem Retikulocytenlysat (vgl.4.2.27).

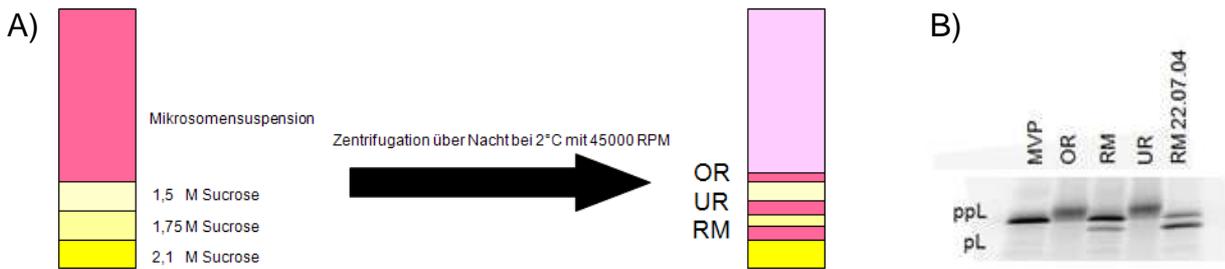


Abbildung 11: Translation und Prozessierung von ppL in Anwesenheit des oberen und unteren Rings sowie von RM. A) Nach der Zentrifugation des Saccharosegradienten der Mikrosomensuspension entstanden drei Banden zwischen den einzelnen Saccharosekonzentrationen. Die Banden wurden ihrer Position entsprechend als oberer Ring unterer Ring und Mikrosomen bezeichnet. Alle Banden wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen. B) Die Translation fand in Anwesenheit von 2 % der rauhen Mikrosomen, je 9 % des oberen Rings und MVP, 3 % des unteren Rings und 6 % der Mikrosomen vom 22.07.04 (Positivkontrolle) statt. Dabei diente die MVP Spur als Negativkontrolle. Die *in vitro* Translation erfolgte in Anwesenheit von radioaktiv markiertem Methionin in einem ungekoppelten Retikulocytenlysat. Die elektrophoretische Auftrennung geschah mit einem 15 % SDS- Gel. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Fluorographie. Ein Transport konnte nur bei den rauhen Mikrosomen festgestellt werden. OR = oberer Ring, UR = unterer Ring, ppL = Präprolaktin, pL = Prolaktin

Abbildung 11 B zeigt das Ergebnis des Transportversuches mit den bei der Mikrosomenpräparation anfallenden Ringen. Zu erkennen ist hierbei, dass ein Transport des ppL und das damit einhergehenden Abtrennen der Signalsequenz nur in den beiden Spuren mit den Mikrosomen (Spur: RM und Positivkontrolle) stattfand.

4.2.31 Multi-Angle Light Scattering (MALS)

Wenn ein Lichtstrahl durch eine Masse dringt, geht das meiste Licht in seiner ursprünglichen Richtung weiter. Ein gewisser Teil des Lichtes wird jedoch in eine neue Richtung gestreut. Um detaillierte Informationen über die Lichtstreuung zu erhalten, kann man im Labor kontrollierte Bedingungen schaffen. Es kann die Wellenlänge (λ), die Polarisation, und Intensität (I_i) des einfallenden Lichts gewählt werden. So kann das gestreute Licht (I_s) als eine Funktion des Winkels (θ) und der Polarisation bestimmt werden.

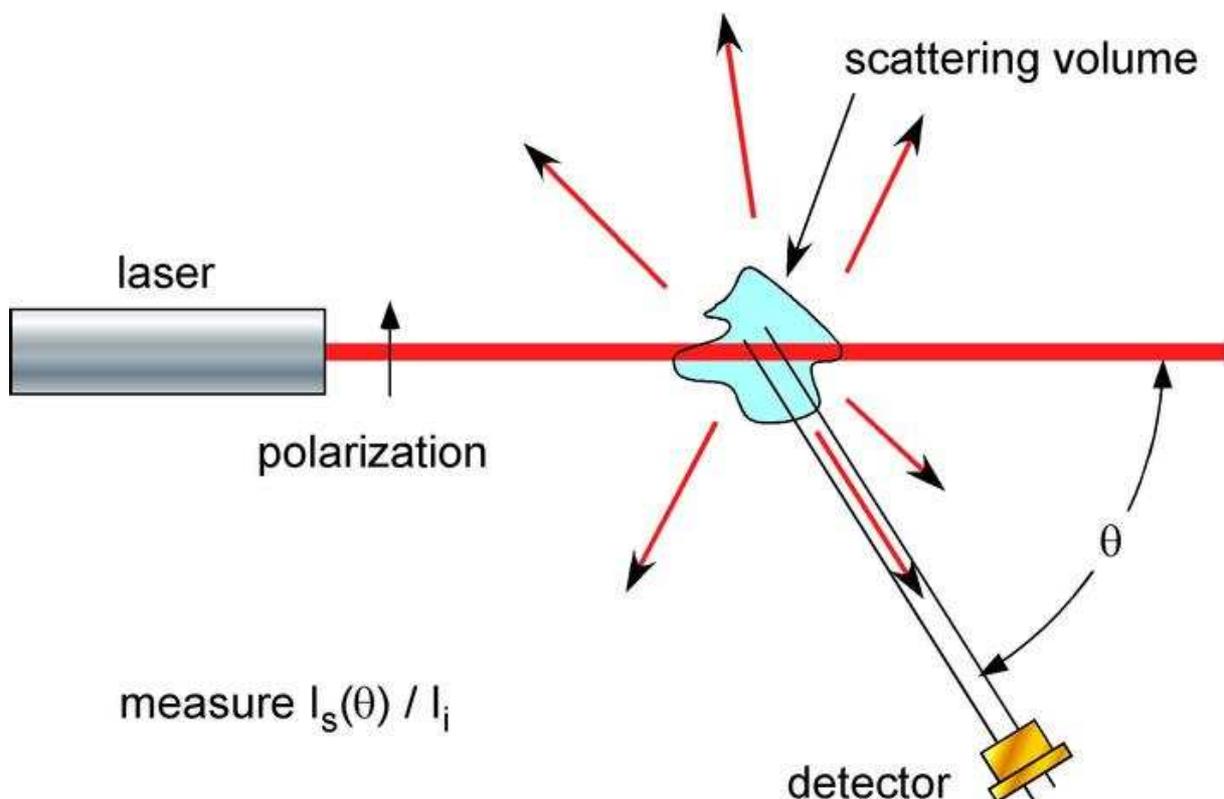


Abbildung 12: Prinzip der Messung der Lichtstreuung. Die Größe des Laserstrahls und das Blickfeld des Detektors bestimmen ein gestreutes Volumen. Es kann das gestreute Licht (I_s) von seinem Volumen als eine Funktion des Winkels (θ) und der Polarisation bestimmt werden. (Quelle: Wyatt)

Mit Hilfe der Lichtstreuung ist es möglich, die molare Masse (M), die Größe (r_g), den zweiten virialen Koeffizienten A_2 (Maß für Löslichkeit eines Stoffes in dem jeweiligen Lösungsmittel) und den translationalen Diffusionskoeffizient (D_T) zu bestimmen. Im Falle einer fraktionierten Probe kann die ungemittelte Masse und Größenverteilung erhalten werden. Auf diese Art und Weise erhält man Informationen über die Konformation der zu untersuchenden Probe. Die molare Masse wurde unter Berücksichti-

gung der unten angeführten Formel mit Hilfe des Zimm- Fittings (144) durch die ASTRA- Software (Fa. Wyatt) automatisch berechnet. Dabei sind 10 µg des zu untersuchenden Proteins für eine gute Bestimmung der molaren Masse ausreichend (145).

Formel 1

$$R(\theta) = K^*McP(\theta)[1 - 2A_2McP(\theta)]$$

$R(\theta)$ = Verhältnis der Intensität des gestreuten Lichts und der Intensität des einfallenden Lichts

$$K^* = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2$$

n_0 = Brechungsindex des Lösungsmittels

N_A = Avogadro-Konstante

λ_0 = Vakuum-Wellenlänge des einfallenden Lichts

dn/dc = spezifischer Brechungsindexinkrement

M = molare Masse

A_2 = der zweite viriale Koeffizient

c = Konzentration

$P(\theta)$ = Formfaktor; er beschreibt das Verhältnis der gemessenen Intensität $I(\theta)$ zur Intensität ohne intrapartikuläre Interferenzen $I(\theta = 0)$

π = Pi

4.2.32 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS), bekannt auch als quasielastische Lichtstreuung (QELS), handelt es sich um eine Methode, bei der das Streulicht eines Lasers an einer gelösten Probe analysiert wird. Sie kann zum Beispiel angewandt werden, um den hydrodynamischen Radius von Proteinen zu bestimmen. Der hydrodynamische Radius entspricht dem Radius einer hypothetischen Kugel, die dieselben Diffusionseigenschaften besitzt wie das durch den hydrodynamischen Radius beschriebene Teilchen. Mit dieser Methode lässt sich z.B. der Radius von Ionen, Pro-

teinen, Mizellen oder auch Viren bestimmen. Der hydrodynamische Radius wurde unter Berücksichtigung der unten angeführten Formel mit Hilfe der ASTRA- Software (Fa. Wyatt) automatisiert berechnet.

Formel 2

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

D = Diffusionskonstante

k_B = Boltzmann Konstante

T = Temperatur

η = Viskosität des Lösungsmittels

r = Radius

π = Pi

4.2.33 Das spezifische Brechungsindexinkrement

Um die richtige molare Masse mit Hilfe der Lichtstreuung messen zu können, muss das spezifische Brechungsindexinkrement, der dn/dc - Wert für jede chemische Verbindung bekannt sein. Der dn/dc - Wert muss in dem entsprechenden Lösungsmittel und der jeweiligen Wellenlänge gemessen werden. Das spezifische Brechungsindexinkrement beschreibt die Änderung des Brechungsindex einer chemischen Verbindung in Lösung relativ zu der Änderung der Konzentration der chemischen Verbindung. Die Bestimmung des dn/dc - Wertes erfolgte mit Hilfe des Batch-Verfahrens. Hierzu wurden verschieden hohen Konzentrationen des Digitonins in den RI- Detektor (RI-101, Fa. Shodex) injiziert. Aus den so gemessenen Brechungsindices kann mit Hilfe der ASTRA- Software (Fa. Wyatt) der dn/dc - Wert berechnet werden. Bei der Berechnung der molaren Masse von Membranproteinen ist es nötig, den dn/dc - Wert für den Komplex aus Detergenz und Protein zu kennen, da dieser Wert in die Formel 1 eingeht. Dies geschieht unter Berücksichtigung der Formel 3.

Formel 3

$$\frac{dn}{dc_{Komplex}} = \frac{dn}{dc_{Protein}} \times x_{Protein} + \frac{dn}{dc_{Modifizier}} \times (1 - x_{Protein})$$

$x_{Protein}$ = Masseanteil des Proteins

Der dn/dc - Wert kann von mehreren Faktoren beeinflusst werden. Dies kann beispielsweise die Aminosäuresequenz eines Proteins, die Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel und der chemischen Verbindung und die Wellenlänge des Gerätes sein. Der dn/dc - Wert für Protein liegt zwischen 0,18 und 0,2 (146). Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurde ein dn/dc - Wert von 0,185 verwendet.

4.2.34 Asymmetrische Feldflussfraktionierung

Die Asymmetrische Feldflussfraktionierung (AFFF) ist eine Einphasen Chromatographie. Sie dient der Trennung von Molekülen und Partikeln im Größenbereich von einigen Nanometern (ca. 1 nm) bis zu einigen Mikrometern (ca. 100 μ m) (147). Die Asymmetrische FFF zeichnet sich gegenüber anderen FFF-Methoden (z.B. Thermische FFF, Fluss FFF und die Split FFF) dadurch aus, dass sie die am universellsten einsetzbar und leistungsfähigste aller FFF-Trenntechniken ist.

Die Methode der AFFF wurde von Tank 1996 beschrieben (148). Die Trennung findet bei der AFFF in einem dünnen Trennkanal statt, der 26,5 cm lang ist und sich von anfänglich 2,5 cm Breite auf 0,5 cm verjüngt. Die Höhe lässt sich je nach Anforderung von 100 μ m bis 500 μ m variieren. Der Kanalstrom, der ein wässriges oder organisches Lösemittel sein kann, transportiert die zu analysierende Probe über eine Filtermembran durch den Kanal. Die Membran besteht aus regenerierter Zellulose (reg. Zellulose) mit einer Porengröße von 5,10 oder 30 kDa. Alternativ kann aber auch eine Membran aus anderen Materialien, wie beispielsweise Triacetatzellulose oder Polyethersulfon verwendet werden. Aufgrund der geringen Kanalhöhe bildet sich bei der gängigen Flussrate von 1 ml/min im Kanal eine laminare Strömung aus, wobei senkrecht zu dieser Strömung die eigentliche Trennkraft wirkt (vgl. Abbildung 13). Diese Trennkraft wird durch einen senkrecht zum Kanalfluss angelegten Fluss, den so ge-

nannten „cross flow“, erreicht. Die Flussrate ist abhängig vom zu untersuchenden Teilchen sehr variabel und bewegt sich in der Regel von 2 bis 5 ml/min.

Das Trennprinzip der AFFF beruht auf die Trennung von Partikeln mit verschiedener Größe und mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten. Dies geschieht durch einen Gradienten in der Strömungsgeschwindigkeit innerhalb des Kanals. Durch den „cross flow“ werden größere Teile stärker als kleinere in Richtung der Membran gedrückt. Der „cross flow“ verlässt den Kanal durch die Membran hinweg, während die Proben von der Membran zurückgehalten werden. Kleinere Partikel diffundieren, im Vergleich mit den größeren Partikeln, aufgrund ihres größeren Diffusionskoeffizienten weiter von der Membran in den Kanal zurück. Dadurch gelangen die kleineren Partikel in den Bereich der schnelleren Strömung im Inneren des Kanals und werden schneller als die größeren Partikel aus dem Kanal eluiert. Die fraktionierten Proben verlassen den Kanal am dafür vorgesehenen Auslass und werden zu den Detektoren (Lichtstreuendetektor, RI- und UV- Detektor) weitergeleitet. Der Ablauf einer Trennung mit der Asymmetrischen Feldflussfraktionierung sowie das Funktionsprinzip zeigt Abbildung 13.

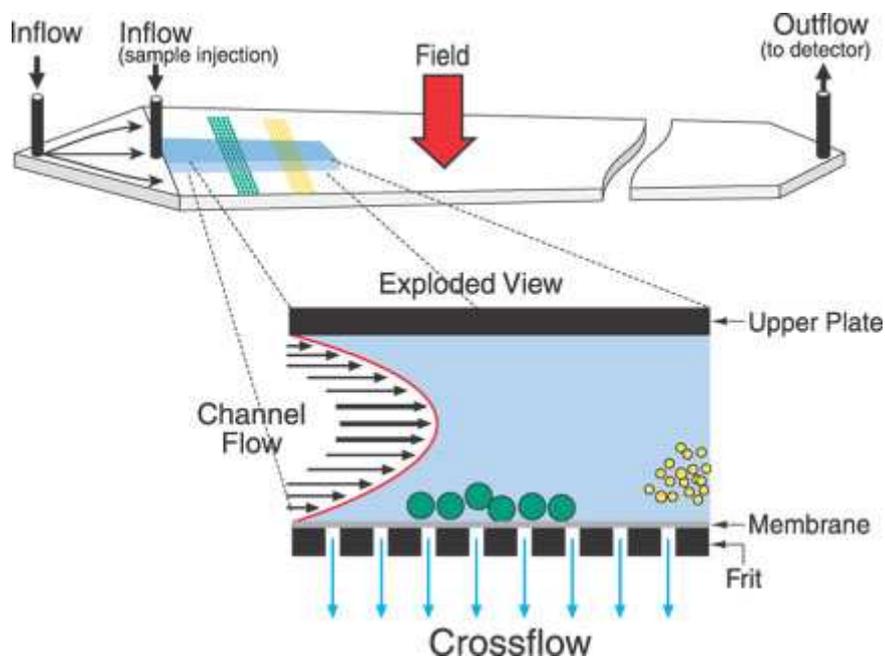


Abbildung 13: Trennprinzip der Asymmetrischen Feldflussfraktionierung Trennkanal (AFFF). Der Trennungsprozess läuft in drei Schritten ab: Während er ersten beiden Schritten, Injektion und Fokussierung, wird der Hauptfluss aufgeteilt und tritt in den Kanal von beiden Enden ein und trifft sich unter dem Injektionsport. An diesem Punkt wird der Fluss nach unten abgelenkt und durchdringt die Membran. Während des Elutionsmodus fließt der Strom nur von der Seite des Eingangs ein und verlässt ihn am Ausgang, der mit den Detektoren verbunden ist. die Probenbestandteile eluieren getrennt ihrer Größe entsprechend und werden von den Detektoren vermessen. (Quelle: Wyatt)

Dieses normale Elutionsverhalten ist, abhängig von den verwendeten Meßbedingungen, bis zu einer Größe von etwa 500 nm zu beobachten. Der Größenbereich dieser Trenntechnik kann bis zu einigen Mikrometern erweitert werden. Die Obergrenze wird durch den Durchmesser der kleinsten verwendeten Kapillare bestimmt. Die großen Partikel werden nach dem Prinzip der sterische Elution aufgetrennt. Hierbei sind die Partikel so groß, dass sie infolge des Querflusses praktisch auf der Membran aufliegen. Je größer aber ein Partikel ist, desto weiter ragt es in den Kanal und ist deshalb einer schnelleren Strömung ausgesetzt. Hierdurch eluieren die größeren Partikel zuerst, die Reihenfolge der Trennung ist also im Vergleich zur normalen Elution umgedreht. Verstärkt kann dieser Effekt eventuell auch durch den Lift- Hyperlayer Einfluss werden, bei dem große Partikel höher über der Membran hinweg eluieren wie kleinere. Hyperlayer bedeutet dabei, dass Partikel über der Membran dünne Pufferschichten ausbilden. Diese Schichten sind mit zunehmender Größe dicker ausgebildet, so dass die großen Partikel schneller eluieren (149,150). Für die Messungen mittels AFFF und MALS kamen die in Tabelle 12 aufgelisteten Puffer zur Anwendung.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Puffer für die verschiedenen Messungen mittels AFFF und MALS.

	HEPES pH 7,6	Tris/ HCl pH 8	KCl	DTT	MgCl ₂	EDTA	ATP	KAc
Digitoninmizellen	50 mM	-----	800 mM	5 mM	-----	-----	-----	-----
dn/dc Digitonin	-----	50 mM	400 mM	-----	-----	-----	-----	-----
Sec61- Komplex	50 mM	-----	-----	5 mM	-----	-----	-----	800 mM
BiP	20 mM	-----	400 mM	2 mM	1,5 mM	2 mM	-----	-----
Grp170 und BiP	20 mM	-----	400 mM	2 mM	1,5 mM	2 mM	-/4 mM	-----
Ribosomen	20 mM	-----	50 mM	-----	2 mM	-----	-----	-----
Trennung der Ribosomen	20 mM	-----	1 M	5 mM	10 mM	-----	-----	-----
kleine UE Ribosomen	20 mM	-----	1 M	5 mM	10 mM	-----	-----	-----
große UE Ribosomen	20 mM	-----	1 M	5 mM	10 mM	-----	-----	-----

4.2.35 Anwendungen der AFFF/MALS

Der größte Vorteil der AFFF ist die Anwendbarkeit in einem weiten Größenbereich. Theoretisch können Makromoleküle zwischen 1 kDa und einigen GDa sowie Partikel zwischen 2 nm und 100 µm getrennt werden (151). Die beste Trennung durch die AFFF ist hierbei bei größeren Makromolekülen von mehr als 50-100 kDa gegeben. Diese zeigen eine bessere Trennung im Vergleich zur Gelpermeationschromatographie (152,153). Eine detaillierte Beschreibung der Gelpermeationschromatographie (= GPC) findet sich z.B. bei Viovy und Lesec (154). Stark adsorbierende Proben können bei der GPC in der Trennsäule festgehalten werden. Diese Gefahr der Adsorption ist auch beim Kanal der AFFF existent, jedoch aufgrund der geringen Oberfläche der Membran ist dies unwahrscheinlicher. Ein weiterer Vorteil ist, dass die mittels MALS detektierten Molmassen Absolutwerte sind. Auf Vergleichsstandards kann deshalb verzichtet werden. In den analysierbaren Größenbereich der Fluss-FFF gehört auch eine Vielzahl pharmazeutischer Proben (155,156). Häufig wurden in der Vergangenheit bereits Proteine oder Immunglobuline charakterisiert (157-159). Besondere Bedeutung hat auch die Untersuchung von Polysacchariden mit Hilfe der Fluß-FFF gewonnen. Die Charakterisierungsmöglichkeiten mit Hilfe von MALS wurden bereits an Dextranen und Pullulanen (160) gezeigt. Spezielle Molekül Strukturuntersuchungen waren damit an z.B. κ-Carrageenanen möglich (161). Durch die Fluß-FFF/MALS- Technik kann die oft sehr breit verteilten Polysaccharide bis zu sehr hohen Molmassen gut aufgetrennt und detektiert werden (162). Eventuelle Verunreinigungen von z.B. unerwünschten Ionen können durch die Membran abgetrennt werden. Weitere mit Fluß-FFF charakterisierbare biologische Proben sind Zellorganellen, DNA, Viren und Bakterien (163). Mit Hilfe der Sterischen Fluß-FFF lassen sich weiterhin Blutbestandteile und humane und tierische Zellen trennen (159). Die Kombination aus Fluß-FFF und MALS wird zunehmend angewendet, um Nanopartikeln, Liposomen oder Mizellen zu charakterisieren (156). Die Partikel eluieren, je nach Größe, zu unterschiedlichen Zeiten. Eine aufwendige Vorreinigung vieler Proben ist damit nicht mehr notwendig. Aufgrund der Analyse jeder aufgetrennten Fraktion, die den Kanal verlässt, lassen sich neben Mittelwerten auch komplexe Partikelgrößenverteilungen angeben (164). Dies ist ein Vorteil gegenüber den anderen Methoden. Ein Beispiel einer zwei vollkommen unterschiedliche Größen enthaltenden Probe sind proteinhaltige Nanopartikel. Bei Gelatine-Nanopartikeln wurde Erythropoetin

abgetrennt und beide Komponenten während einer Messung analysiert (165). In der Literatur wird beschrieben, dass mittels der FFF/MALS- Technik selbst Suspensionen trennbar waren, die sich nur in etwa 4 nm Größe unterschieden (166).

4.2.36 Adsorptionstest des Sec61- Komplex an die AFFF- Membranen

Da während der Vermessung mit der MALS und AFFF- Technik des Sec61- Komplex festgestellt wurde, dass das Membranprotein nicht eluierte, wurde getestet, ob das Protein auf der AFFF- Membran aggregiert. Dies wurde erreicht, indem die Membran in der Mitte der Länge nach in ein Zentimeter lange schmale Streifen geschnitten worden ist (siehe Abbildung 28). Die so erhaltenen Membranstücke wurden mit 1 x Laemmliprobenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 56 °C inkubiert. Die Proben wurden mit einem SDS- Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Western Blot analysiert.

4.2.37 Bindungseigenschaften der verschiedenen AFFF- Membranen zum Sec61- Komplex

Um sicherzustellen, dass während der MALS- Messungen von dem isolierten Sec61- Komplex möglichst wenig an der Membran des AFFF- Kanals haften bleibt, wurden verschiedenen Membrantypen (Triacetat Zellulose = TA, Polyethersulfon = PES und reg. Zellulose = reg) auf ihre Adsorptionseigenschaften geprüft. Dies geschah nach unten aufgeführtem Protokoll (siehe Abbildung 14). Gefällt wurden die Proben mit Aceton/ Methanol, mit SDS-PAGE und Western- Blot analysiert (primäre Antikörper Sec61 α und Sec61 β).

Stücke der Membrantypen aus Triacetat Zellulose (=TA), Polyethersulfon (= PES) und reg. Zellulose werden in Puffer über Nacht gesättigt

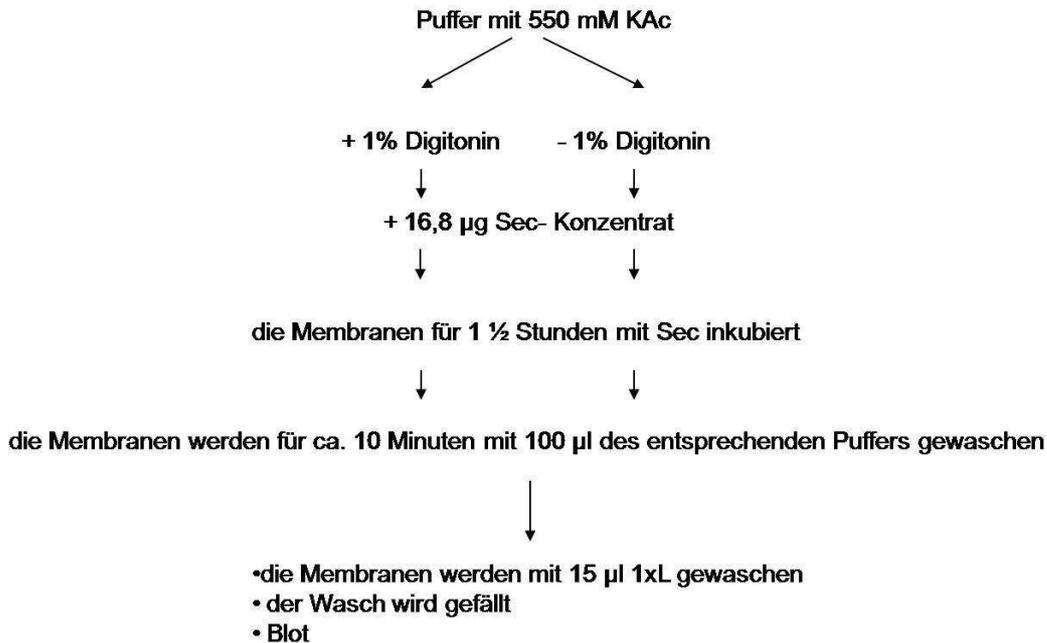


Abbildung 14: Test der Adsorptionseigenschaften der verschiedenen Membrantypen des AFFF- Kanals. Stücke der verschiedenen Membrantypen (Triacetat Zellulose = TA, Polyethersulfon = PES und reg. Zellulose = reg) wurden im Puffer DP10-550 (Tabelle 10) mit und ohne Digitonin über Nacht inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit konzentrierter Sec61- Probe. Nach 1½ stündiger Inkubation folgte ein Waschen für zehn Minuten mit den entsprechenden Puffern DP10-550 (Tabelle 10). Die Proben wurden mittels Aceton und Methanol gefällt und mit SDS-PADE und Western- Blot analysiert (primäre Antikörper Sec61 α und Sec61 β).

4.2.38 Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie

Eine Methode, mit der man Proteininteraktionen direkt und in Echtzeit messen kann, ist die Oberflächenplasmonresonanz- Spektroskopie (SPR). Man unterteilt in diesem System die beiden Interaktionspartner in einen Liganden und in einen Analyten. Der Ligand wird auf der Oberfläche eines Sensorchips gebunden, während der Analyt in Lösung über die Oberfläche mit dem Liganden fließt. Die durch die Interaktion (Assoziation und Dissoziation) von Analyt und Ligand entstandenen Massenänderungen auf der Oberfläche des Sensorchips können detektiert werden. Bei dem physikalischen Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) wird der refraktive Index nahe der Oberfläche des Sensorchips gemessen. Der Sensorchip besteht aus einem, mit einem Goldfilm überzogenem dünnen Glasplättchen. Das Gold wird für das SPR-Detektionsprinzip benötigt. Der refraktive Index ändert sich, sobald Moleküle durch Interaktionen der zu untersuchenden Moleküle an

der Sensoroberfläche gebunden bzw. abgelöst werden (Assoziation und Dissoziation). Die SPR- Antwort ist dabei proportional zur gebundenen Masse. Die Antwort pro Masseneinheit (gemessen in resonance units RU) ist für die meisten Proteine gleich. Das Messprinzip beruht darauf, dass polarisiertes Licht auf der Glasseite des Sensorchips reflektiert wird. Die Änderung der Intensität des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Winkel wird hierfür gemessen (siehe Abbildung 15). Bei einer Interaktion zweier Moleküle ändert sich der Winkel des reflektierten Lichts und wird in einem Sensorgramm aufgezeichnet.

Über den Flusskanal des Systems werden die Analyten und die Liganden in Lösungen zu der Sensoroberfläche geleitet. An der Sensoroberfläche werden nacheinander zwei Flusszellen (Fc1 und Fc2) durchflossen. In den Flusszellen, die separat angesteuert werden können, können verschiedene Liganden an die Chipoberfläche gebunden werden. Die Flusszelle Fc1 wird als Referenzzelle verwendet. In dieser Zelle wird die Referenzsubstanz gebunden, in der Zelle Fc2 der zu untersuchende Ligand. Für die mathematische Auswertung der Sensorgramme wird die Differenz der beiden Flusszellen verwendet ($Fc2 - Fc1$).

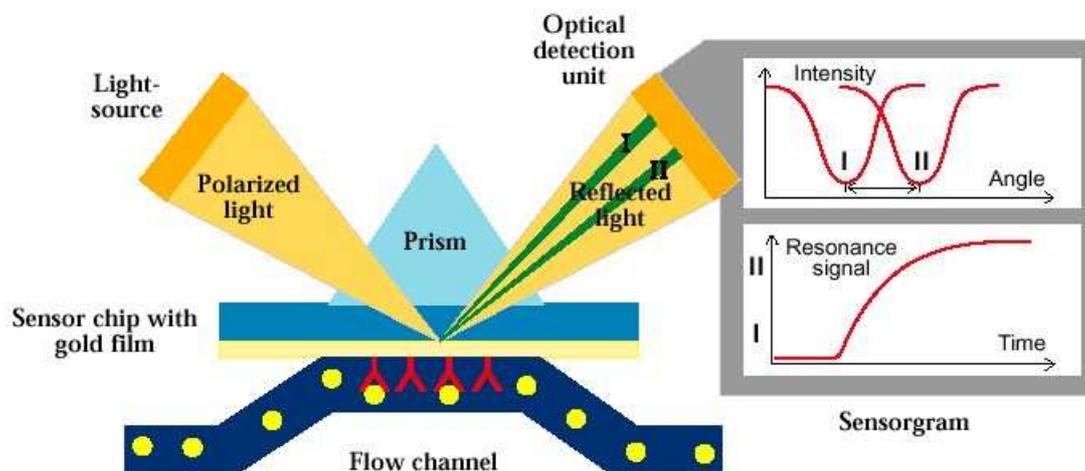


Abbildung 15: Das Detektionsprinzip des BIACORE-Systems (aus BIAjournal, No.1-1999) Polarisier-tes Licht wird an der Goldoberfläche des Sensorchips vollständig reflektiert. An der Goldoberfläche des Chips kommt es zu einer Oberflächenplasmonresonanz, die zu einer Extinktion des reflektierten Lichts bei einem spezifischen Winkel führt. Der Winkel des reflektierten Lichtes hängt vom Brechungsindex der Lösung in unmittelbarer Nähe der Goldoberfläche ab. Der Brechungsindex ändert sich mit der Bindung von Molekülen aus der Lösung an die auf dem Chip immobilisierten Proteine. Die resultierenden Winkeländerungen, die durch Änderungen des Brechungsindex hervorgerufen werden, werden detektiert und in einem sogenannten Sensorgramm aufgenommen.

Die Messungen erfolgten in einem BiaCoreX-Gerät, das über die BiaCoreX Control Software 2.1 gesteuert wird. Auf die in dieser Arbeit verwendeten CM5-Sensorchips ist auf den Goldfilm eine Dextranschicht aufgebracht, über die sich die Liganden kovalent koppeln lassen. Als Kopplungsstrategie wurde der automatisch ablaufende vorprogrammierte Prozess der Aminkopplung verwendet (vgl. Abbildung 16). Hierfür wurde der affinitätsgereinigte Antikörper Sec61 β kovalent an die Chipoberfläche gekoppelt. Die Kopplung des Sec61 β -Antikörpers an die CM5-Chips erfolgte nach Anweisung des Herstellers nach folgendem Schema:

Flussrate 5 μ l/min, Flusszelle 1 und 2

70 μ l EDC / NHS (\rightarrow Aktivierung des Chips)

4 μ l Sec61 β -Antikörper + 76 μ l Kopplungspuffer

55 μ l Ethanolamin (\rightarrow Inaktivierung der nicht gekoppelten Bereiche des Chips)

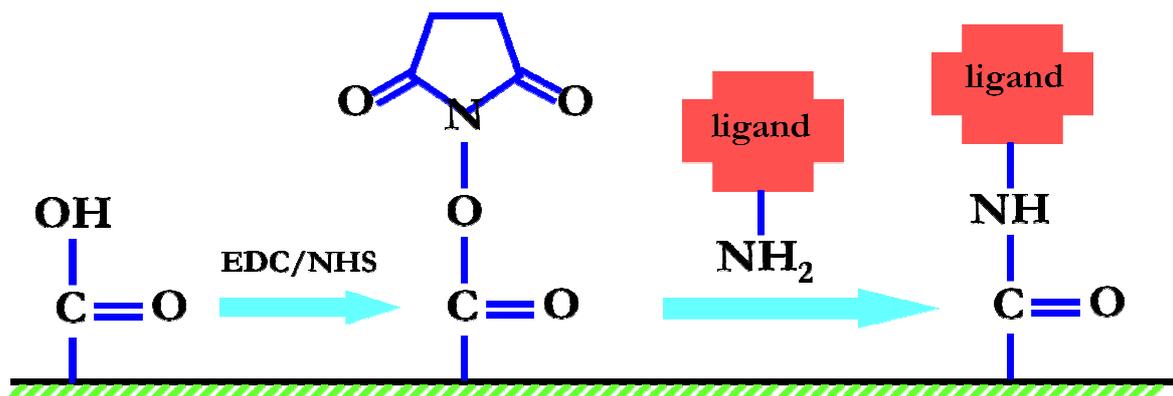


Abbildung 16: Das Amine- Kopplungsprinzip des BIACORE-Systems. Die Oberfläche wurde mit einem 1:1 Mischung von NHS:EDC aktiviert, so dass reaktive Succinimide Ester entstehen. Der Ligand passiert die Oberfläche und die Ester reagieren spontan mit den Amingruppen. Jede freie Amingruppe kann mit der Oberfläche reagieren. Die Inaktivierung der nicht gekoppelten Bereiche der Oberfläche wurden mit Ethanolamin deaktiviert. (Quelle: GE)

Die Referenzzelle (Flusszelle 1) wurde in einem ersten Schritt entweder mit dem KLH- Peptid abgesättigt (= Keyhole Limpet Hemocyanin, chemisch kovalent quervernetzt mit dem N- terminalen Oligopeptid von Sec61 β , das der Immunisierung der Kaninchen diente), oder es wurde die Fc1 nur aktiviert und deaktiviert, ohne dass ein Ligand gebunden wurde. In einem nächsten Schritt wurde das gereinigte Protein Sec61 an der Flusszelle 2 gebunden. Die eigentlichen Messungen erfolgten dann bei einer Flussrate von 10 μ l/min des Laufpuffers (10 mM HEPES pH 7,6, 150 mM NaCl und 0,125 % Digitonin). Es wurden mindestens fünf verschiedenen Konzentra-

tionen des Analyten gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Biaevaluation Software 3.1.

5 Ergebnisse

5.1 Isolierung und Charakterisierung von Ribosomen aus Hundepankreas

Die Ribosomen und die ribosomalen Untereinheiten sollten in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Hierzu mussten die Ribosomen mit Puromycin und Kaliumacetat vorbehandelt werden, um die Ribosomen von naszierenden Ketten und Proteinen zu befreien (167). Des Weiteren sollten die ribosomalen Untereinheiten voneinander getrennt werden. Nach erfolgreicher Isolierung sollte der hydrodynamische Radius, die molare Masse und die Interaktion des Ribosoms mit dem Sec61-Komplex mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden (MALS, QUELS und SPR-Spektroskopie) bestimmt werden.

Die Ribosomen wurden während der Präparation der rauen Mikrosomen gewonnen. Die sedimentierten Ribosomen wurden in MVP - DTT (siehe Abschnitt 4.2.13) resuspendiert und anschließend mit 0,5 mM Puromycin und 500 mM Kaliumacetat behandelt. Dadurch werden naszierende Ketten und Proteine von den Ribosomen freigesetzt (167). Von den Ribosomen wurde zur Bestimmung der Ausbeute und der Reinheit die Absorption bei 280 nm und 260 nm gemessen. Mit den sich hieraus ergebenden Verhältnis von $A_{260/280}$ ließ sich die Gesamtmenge der isolierten Ribosomen berechnen und die Reinheit der Ribosomen abschätzen. Gereinigte Ribosomen haben ein Verhältnis $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2 (168-171), während ein niedrigerer Wert auf Verunreinigungen hindeutet (172). Ein Überblick über die Verluste während einer Präparation gibt Tabelle 13.

Tabelle 13: Isolierung von Ribosomen. 30 g Hundepankreasgewebe wurde wie in Abschnitt 4.2.13 beschrieben aufgearbeitet. Aus dem A_{260} Wert ließ sich die Ribosomenkonzentration bestimmen.

	$A_{260/280}$	Ausbeute [mg]
Ribosomen vor Kaliumacetat und Puromycin Behandlung	1,73	58,89
Ribosomen nach Kaliumacetat und Puromycin Behandlung	1,98	13,62
kleine ribosomale Untereinheit	1,77	0,05
große ribosomale Untereinheit	1,88	0,25

Aus dem A_{260} Wert ließ sich unter Annahme, dass 44 pmol/ml Ribosomen einem $A_{260} = 2,2$ entspricht, die Ribosomenkonzentration bestimmen. Ausgehend von 30 g Hundepankreasgewebe wurden insgesamt 58,89 mg Ribosomen isoliert. Nach der Behandlung mit Puromycin und Kaliumacetat konnten noch 13,62 mg, nach der Trennung der ribosomalen Untereinheiten noch 0,25 mg der großen Untereinheit und 0,05 mg der kleinen Untereinheit aufgefunden werden. Das Verhältnis von $A_{260/280}$ für die Ribosomen änderte sich von 1,73 (vor Kaliumacetat und Puromycin Behandlung) auf 1,98 (nach Kaliumacetat und Puromycin Behandlung). Für die große ribosomale Untereinheit wurde ein Wert von 1,88 und für die kleine ribosomale Untereinheit 1,77 bestimmt.

5.1.1 Trennung der ribosomalen Untereinheiten

Als Ausgangsmaterial für die Trennung der ribosomalen Untereinheiten dienten die Kaliumacetat und Puromycin behandelten Ribosomen. Erreicht wurde die Trennung über zwei nacheinander folgende Saccharosegradienten (30 %, 25 %, 20 % und 15 % Saccharose) mit unterschiedlichem Volumen (siehe Abschnitt 4.2.17). In Abbildung 17 ist das Ergebnis der Trennung der ribosomalen Untereinheiten zu sehen.

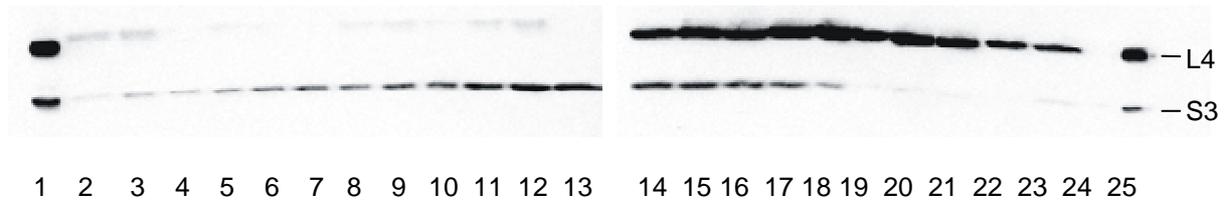


Abbildung 17: Trennung der ribosomalen Untereinheiten. 440 µg Kaliumacetat und Puromycin behandelte Ribosomen (siehe Abschnitt 4.2.15) wurden auf 1 M KCl, 10 mM MgCl₂ und 2 mM DTT eingestellt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf einen Saccharosegradienten (30 %, 25 %, 20 % und 15 % Saccharose) geschichtet und einer Zentrifugation (3 h mit 32 000 rpm bei 26 °C, SW 55) unterzogen. Nach der Zentrifugation wurden von oben je 500 µl Fraktionen abgenommen und von jeder Fraktion 100 µl nach Wessel/Flügge (140) gefällt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit den beiden primären Antikörpern L4 und S3, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert.

Es wurden je 100 µl der einzelnen Fraktionen nach Wessel/Flügge (140) gefällt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (primäre Antikörper gegen L4 und S3). In den Fraktionen 4 bis 13 war eine Trennung der kleinen ribosomalen Untereinheit (kleine UE) von der großen Untereinheit (große UE) zu sehen. Eine vollständige Reinigung der großen von der kleinen Untereinheit ist in den Fraktionen 19 bis 23 erkennbar. Die so getrennten Untereinheiten konnten anschließend für die Bestimmung der molaren Masse, des hydrodynamischen Radius und die Interaktionsstudie mit dem Sec61-Komplex weiterverwendet werden.

5.1.2 Bestimmung der molaren Masse und des hydrodynamischen Radius der Ribosomen und ihrer Untereinheiten

Die Bestimmung der molaren Masse und des hydrodynamischen Radius der Ribosomen und seiner Untereinheiten erfolgte mittels der Lichtstreuung und dem RI-Detektor (RI-101, Fa. Shodex). Für die Messungen wurden die Proben in einen AFFF-Kanal mit einer 5 kDa regenerierten (reg.) Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“ injiziert. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/min und einem „cross flow“ von 1 ml/min. Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius erfolgte mit einem „cross flow“ von 0,8 ml/min und einem „channel flow“ von 0,6 ml/min. Für die Messungen wurden die in Tabelle 12 angegebenen Puffer verwendet. Die Elutionsprofile der Messungen sind in der Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt.

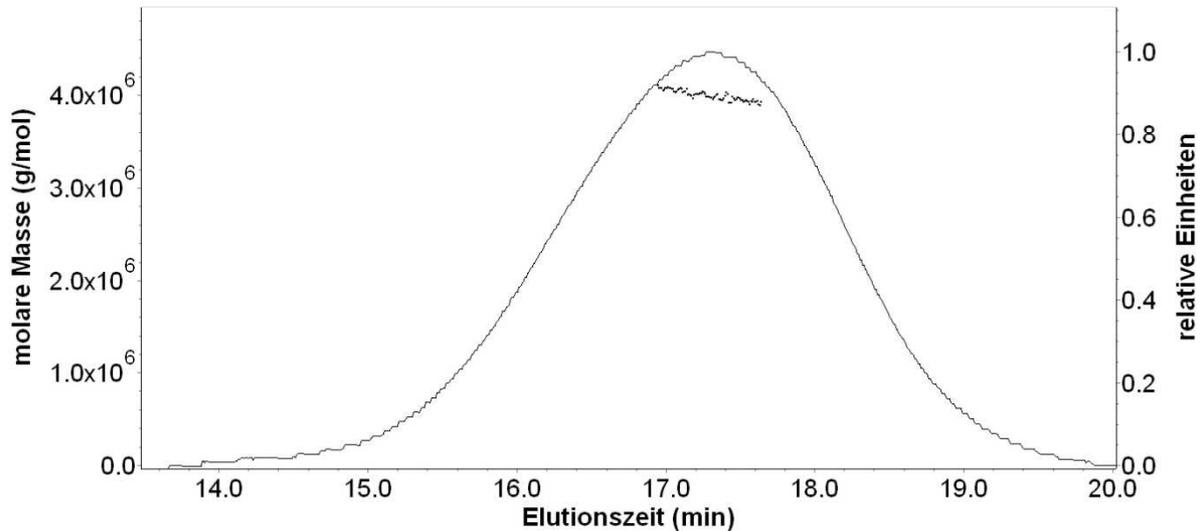


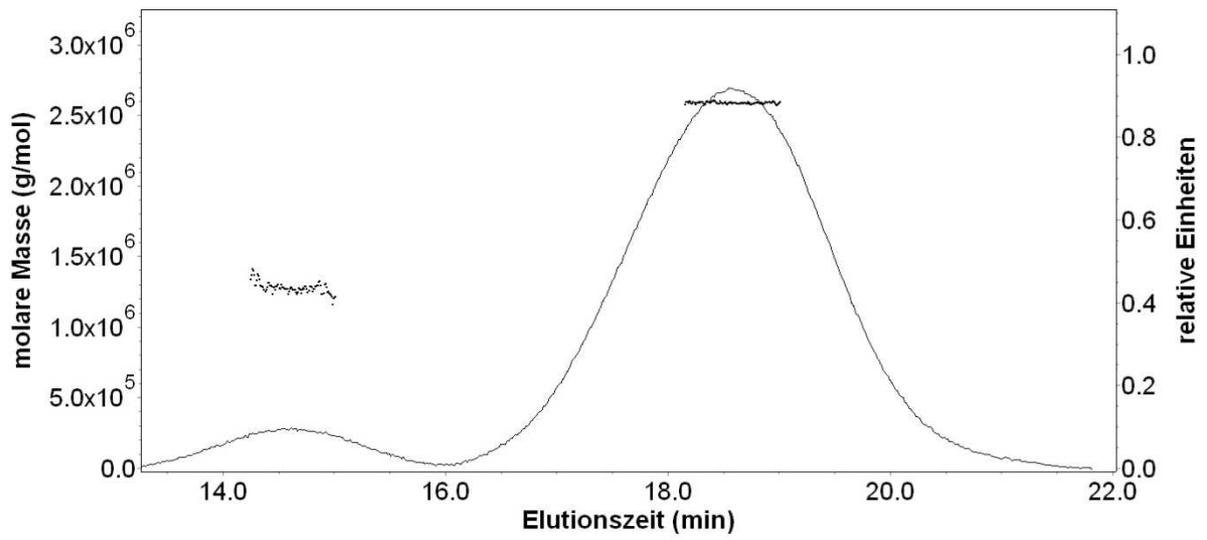
Abbildung 18: Bestimmung der molaren Masse von mit Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen (die durchgehende Linie zeigt das RI- Signal, die Punkte die zugehörige Molmasse). Injiziert wurden 276,2 μg Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen (siehe Abschnitt 4.2.15) in einen AFFF- Kanal mit einer 5 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 μm „Spacer“. Eluiert wurden mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 1 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die verwendeten Ribosomen stammten aus der Präparation von Hundepankreasribosomen. Die zeitliche Darstellung des RI- Signals während der Elution bezieht sich auf sekundäre Y- Achse (rechts), die molare Masse des Ribosoms auf die primäre Y- Achse (schwarze Punkte). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt). Die ermittelte molare Masse für das Ribosom lag bei 3,62 MDa (Stabw. 0,15 MDa; $n = 5$).

Das in Abbildung 18 dargestellte Ergebnis zeigt die Messung der mit Puromycin/ Kaliumacetat behandelten Ribosomen. Gezeigt werden die Elutionszeit der Ribosomen und die berechnete molare Masse. Insgesamt wurde die Messung fünfmal unter gleichen Bedingungen wiederholt. In Abbildung 18 bezieht sich die molare Masse (schwarze Punkte) auf die primäre Y- Achse, das aufgenommene RI- Signal auf die sekundäre Y- Achse. Nach einer Elutionszeit von 17 Minuten war das Maximum des RI- Signals zu erkennen. In der Zeit der Elution zwischen 16,5 und 17,5 Minuten war die molare Masse gleich, was bedeutet, dass es sich um eine monodisperse Probe handelte. Die molare Masse der Ribosomen wurde mit 3,62 MDa (Stabw. 0,15 MDa; $n = 5$) und der hydrodynamische Radius mit 18,25 nm (Stabw. 1,71 nm; $n = 5$) berechnet.

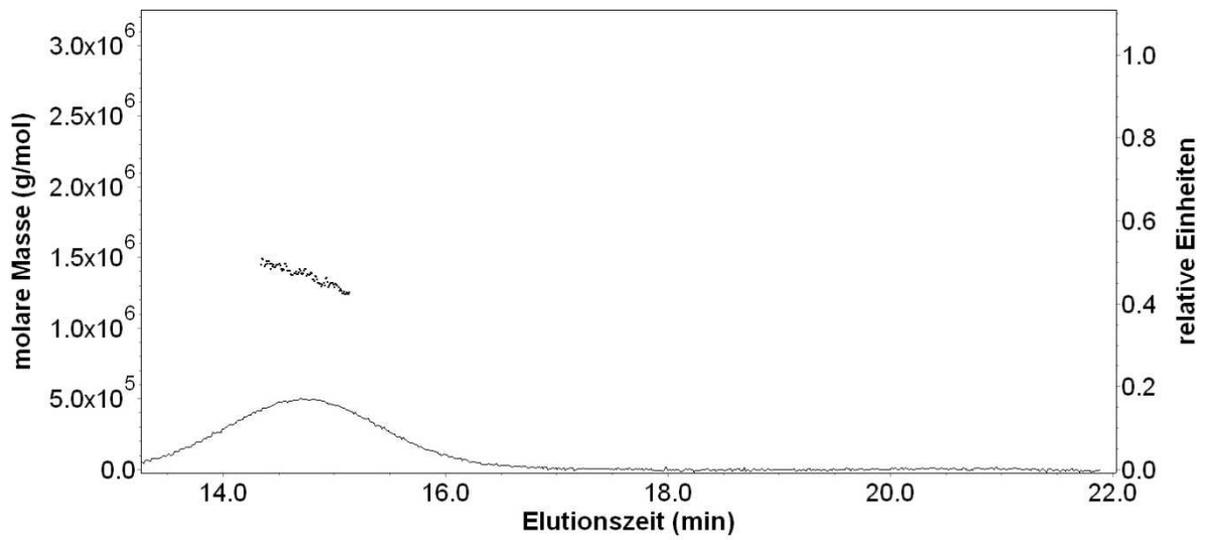
In weiteren Experimenten wurden die Ribosomen nur durch die Trennkraft des AFFF- Kanals in ihre Untereinheiten separiert und gemessen (Abbildung 19 A) bzw. die vorher getrennten Untereinheiten (siehe Abschnitt 4.2.17) einzeln gemessen (Abbildung 19 B und C).

Ergebnisse

A)



B)



C)

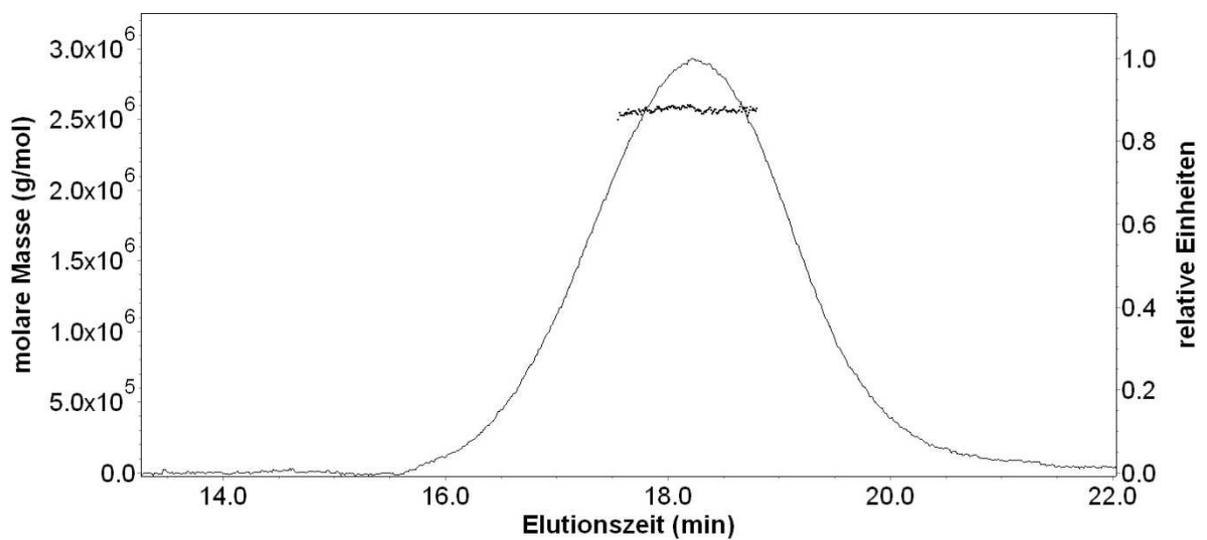


Abbildung 19: Bestimmung der molaren Masse mit Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen und ihrer Untereinheiten (die durchgehenden Linien zeigen das RI- Signal, die Punkte die zugehörigen Molmassen). Injiziert wurden 276,2 µg Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen (Abbildung 19A), 35,65 µg der kleinen Untereinheit (Abbildung 19B) und 168,8 µg der großen Untereinheit (Abbildung 19C) in einen AFFF- Kanal mit einer 5 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“. Eluiert wurden mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 1 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die verwendeten Ribosomen stammten aus der Präparation von Hundepankreasribosomen. Die zeitliche Darstellung des RI- Signals während der Elution bezieht sich auf sekundäre Y- Achse (rechts), die molare Masse des Ribosoms auf die primäre Y- Achse (schwarze Punkte). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt). Die ermittelte molare Masse für den ersten „Peak“ lag bei 1,39 MDa (Stabw. 0,01 MDa; n = 8) und den zweiten „Peak“ bei 2,49 MDa (Stabw. 0,03 MDa; n = 8).

Gezeigt werden die Elutionszeit der Ribosomen und die berechnete molare Masse. Insgesamt wurden für die Bestimmung der molaren Masse für die kleine und für die große Untereinheit acht Messungen unter den oben beschriebenen Bedingungen herangezogen. Grundlage für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius waren sechs Messungen.

Nach einer Elutionszeit von 15 Minuten war das Maximum des RI- Signals der kleinen, nach 18 Minuten der großen ribosomalen Untereinheit zu erkennen. Weiterhin war eine vollständige Trennung der Untereinheiten durch die Trennkraft des AFFF- Kanals erreicht worden. Dies war zum einen an den überlappenden RI- Signalen und zum anderen an den bestimmten molaren Massen der ribosomalen Untereinheiten zu erkennen. Sowohl die vorher getrennten Untereinheiten, als auch die im AFFF- Kanal getrennten Untereinheiten waren monodispers. Die molare Masse der kleinen ribosomalen Untereinheit wurde mit 1,4 MDa (Stabw. 0,014 MDa; n = 8) und der hydrodynamische Radius mit 7,54 nm (Stabw. 0,43; n = 6) berechnet. Für die große Untereinheit betrug der berechnete Wert der molaren Masse 2,5 MDa (Stabw. 0,025 MDa; n = 8) und der hydrodynamische Radius 14,45 (Stabw. 0,36; n = 6). In Tabelle 14 sind die Ergebnisse zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius und der molare Masse der Ribosomen zusammengefasst.

Tabelle 14: Der hydrodynamischer Radius und die molare Masse von Hundepankreasribosomen und ihrer Untereinheiten.

	hydrodynamischer Radius [nm]	molare Masse [MDa]
Ribosomen	18,25 (Stabw. 1,71; n = 5)	3,62 (Stabw. 0,15; n = 5)
kleine UE	7,54 (Stabw. 0,43; n = 6)	1,40 (Stabw. 0,01; n = 8)
große UE	14,45 (Stabw. 0,36; n = 6)	2,50 (Stabw. 0,03; n = 8)

5.2 Isolierung und Charakterisierung des Sec61- Komplexes

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit verschiedenen Methoden den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes zu bestimmen, sowie seine Affinität zu Ribosomen zu charakterisieren. Für die Isolierung des Sec61- Komplexes wurden zwei verschiedene Strategien angewendet. Die Eine bestand darin, den Komplex über Ionenaustauschchromatographie zu reinigen. Die Andere verfolgte den Weg über die Immunitätschromatographie. Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades erfolgte mit den Methoden der asymmetrischen Feldflussfraktionierung (AFFF) in Kombination der MALS- Technik („Multi Angle Light Scattering“). Nicht-translatierende Ribosomen können mit hoher Affinität am Sec61- Komplex der ER Membran binden (37,173,174). Die Interaktion zwischen Ribosom und dem Sec61- Komplex ist salzsensitiv und die Bindung des Ribosoms an dem Sec61- Komplex findet über die 28S- RNA der großen ribosomalen Untereinheit statt (39,173-175). Die Affinität des Sec61- Komplexes zum Ribosom und seinen Untereinheiten wurde mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz- Spektroskopie charakterisiert.

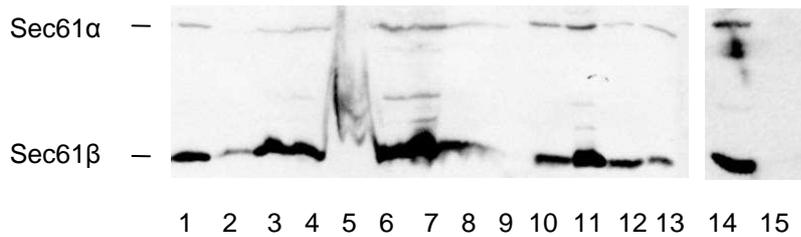
5.2.1 Isolierung über Ionenaustauschchromatographie

Um den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes zu überprüfen wurden nach der Methode von Görlich et al. (42) in einem ersten Schritt RAMPs (**R**ibosome **A**ssociated **M**embrane **P**roteins) isoliert. Zur Präparation der RAMPs wurden Hundepankreasmitochondrien zunächst mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in Puffer 18 (vgl. Tabelle 10) resuspendiert. Der erste Überstand (Abb. 20 A, Spur 2) wurde verworfen. Durch eine erneute Ultrazentrifugation konnte als Überstand der Prä- Extrakt erhalten werden (Abb. 20 A, Spur 3), in dem die luminalen Proteine enthalten waren. Das entsprechende Sediment wurde in Puffer 19 (vgl. Tabelle 10) resuspendiert. Es schloss sich eine Inkubation für zehn Minuten auf Eis an, gefolgt von einer erneuten Ultrazentrifugation. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde als RM- Extrakt definiert (Abb. 20 A, Spur 4) der die solubilisierten Membranproteine enthielt. Das entsprechende Sediment wurde nochmals in Puffer 19 gewaschen und in Puffer 11 (vgl. Tabelle 10) resuspendiert, dem kurz vor Verwendung Puromycin und GTP zugesetzt wurde. Die Probe wurde für 60 Minuten auf Eis und danach für

30 Minuten bei 30°C inkubiert. Während der Inkubationszeit dissoziierten die Ribosomen in ihre Untereinheiten. Proteine, die mit Ribosomen assoziiert sind, ist es möglich, nach dieser Behandlung solubilisiert vorzuliegen, d.h. bei einer anschließenden Ultrazentrifugation im Überstand zu bleiben, der die RAMPs enthält (Abb. 20 A, Spur 6). Das Sediment enthielt sowohl die Ribosomenuntereinheiten als auch unlösliche Proteine (Spur 5). Die Beseitigung des Puromycins erfolgte über eine Dialyse (Abb. 20 A, Spur 7). Die erhaltenen Extrakte wurden nacheinander auf eine 10 ml Q- Sepharose und eine 2 ml S- Sepharose Säule aufgetragen. Die Elution der S- Sepharose Säule erfolgte mit einem kontinuierlichen Salzgradienten. Die positiven Proteinfractionen der S- Sepharose Säule wurden vereinigt, durch Verdünnung die Salzkonzentration erniedrigt und auf eine weitere S- Sepharose Säule aufgetragen. Die S- Sepharose Säule wurde anschließend entweder vor der Elution mit DBCP10-200 und DBCP10-400 gewaschen oder direkt mit einem Stufengradienten eluiert (siehe Abb. 20 und 21). Dies war nötig, um möglichst reine Proteinfractionen zu erhalten. Eine Übersicht der beiden Strategien gibt das Flussdiagramm 1.

und Methanol gefällt, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western- Blot analysiert. Die quantitative Auswertung der Blotsignale geschah mit Hilfe der Software Image-Quant 5.1. Für die Bestimmung der Äquivalente pro Spur wurde die Spur 1 mit 1 µl Mikrosomen in Anlehnung an Walter et al. als ein Äquivalent definiert (29). Es wurden für jede Präparation 30 000 Äquivalente eingesetzt.

A)



B)

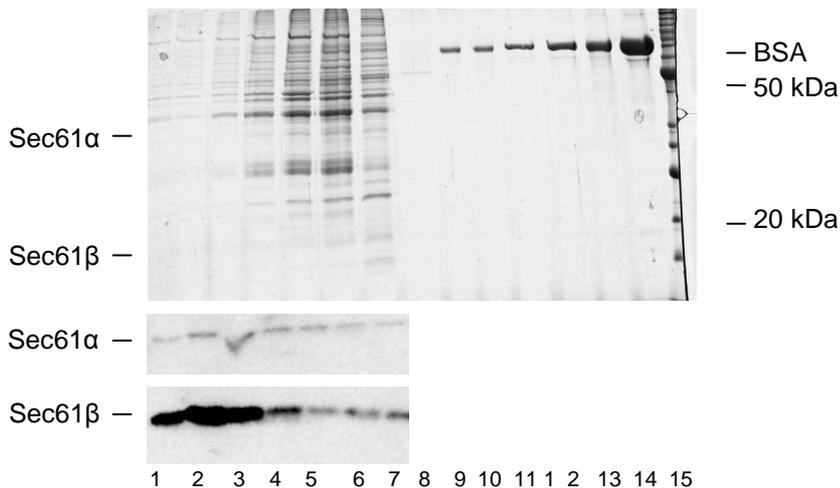


Abbildung 20: Isolierung des Sec61- Komplexes über Ionenaustauschchromatographie. A) Es wurden Extrakte aus 30 ml RM mit einer $OD_{280} = 40$ auf eine 10 ml Q- Sepharose und 5 ml S- Sepharose Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit einem kontinuierlichen Salzgradienten mit Puffer 16A und 16B (siehe Tabelle 10). Für die immunologische Detektion wurden je 1 % des Probenvolumens (Ausnahme P12 nach Dialyse: 500 µl) auf ein SDS- Gel aufgetragen. Die mit Aceton und Methanol gefällten Proben wurden mit 10 µl 1x Laemmliprobenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 56 °C inkubiert. 1 = 1 µl RM, 2 = 1. Überstand nach Sedimentierung der Mikrosomen, 3 = Prä- Extrakt, 4 = RM- Extrakt, 5 = Sediment der solubilisierten Mikrosomen, 6 und 7 = RAMP (**R**ibosome-**A**ssociated **M**embrane **P**rotein vor (6) und nach (7) Dialyse, 8 = Sediment RAMP nach Dialyse, 9 = Puffer 12 nach Dialyse (siehe Tabelle 10), 10 = Durchlauf Q- und S- Sepharose Säule, 11 = Waschschrift mit P15 (siehe Tabelle 10), 12 = Fraktion 1 nach dem kontinuierlichen Salzgradienten, 13-15 = Fraktionen 2-7 (13), 8-16 (14) und 17-23 (15) nach kontinuierlichen Salzgradienten der 1. S- Sepharose Säule, B) Je 50 µl der Proben der Salzelution der 2. S- Sepharose Säule (Spur 1-7) wurden auf ein SDS- Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie-Färbung (obere Abbildung) und Western- Blot (untere Abbildung, primäre Antikörper: Sec61α und Sec61β) analysiert. Die Proteinmenge wurde über eine BSA- Reihe bestimmt. Die isolierte Gesamtproteinmenge nach dem Stufengradienten von Sec61α betrug 60 µg in 5 ml. Spur 1-8 = Eluate 1 bis 8 des Stufengradienten mit DP10-200, DP10-400 und je 2 x 0,5 ml DP10-600, DP10-800 und DP10-1000 (siehe Tabelle 10), 9 = 0,1875 µg BSA, 10 = 0,25 µg BSA, 11 = 0,375 µg BSA, 12 = 0,75 µg BSA, 13 = 1 µg BSA, 14 = 3 µg BSA, 15 = Bench Marker

Anhand der Western-Blot Analyse ist erkennbar, dass in jeder Fraktion der Sec61- Komplex zu detektieren war. Bei jedem Arbeitsschritt war ein Verlust des Proteinkomplexes feststellbar, was zu einer geringen Ausbeute des Sec61- Komplexes führte. Besonders hohe Verluste traten während der Permeabilisierung (Prä- Extrakt), der Solubilisierung (RM- Extrakt), dem Durchlauf durch die Q/S- Sepharose Säulen und dem Waschschrift der S- Sepharose auf (Abb.20 A, Spur 3, 4, 10 und 11). Bei dieser Reinigung konnten 60 µg Sec61 in einem Volumen von 5 ml wiedergefunden werden. Eine genauere Analyse der Verluste und der Wiederfindung des isolierten Sec61- Komplexes erfolgt nach Betrachtung der anderen Strategien.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis einer Reinigung, bei der die S- Sepharose Säule vor der Elution mit DBCP10-200 und DBCP10-400 gewaschen wurde. Der Sec61- Komplex eluiert in einem deoxyBIGCHAP- Puffer ab etwa 500 mM KAc von der S- Sepharose Säule (Jung, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu eluierte der Sec61- Komplex in einem Digitoninpuffer schon bei einem Salzgehalt von 200 mM (Abbildung 20 B, Spur 1). Aus diesem Grund wurde die S- Sepharose Säule mit DBCP10-200 und DBCP10-400 gewaschen, um andere an der Säule gebundene Proteine zu eluieren und so möglichst reinen Sec61- Komplex enthaltende Fraktionen zu erhalten.

Abbildung 21 A zeigt das Ergebnis der Elution der S- Sepharose Säule, die mit DBCP10-200 und DBCP10-400 gewaschen wurden. Die Elution erfolgte mit 800 mM Kaliumacetat. Durch den Waschschrift mit DBCP10-400 konnten zwei Proteine von den restlichen Proteinen abgetrennt werden (vgl. Abbildung 21 A, Spur 4 mit Spur 5). Dennoch konnte der Sec61- Komplex nicht vollständig von anderen Proteinen getrennt werden.

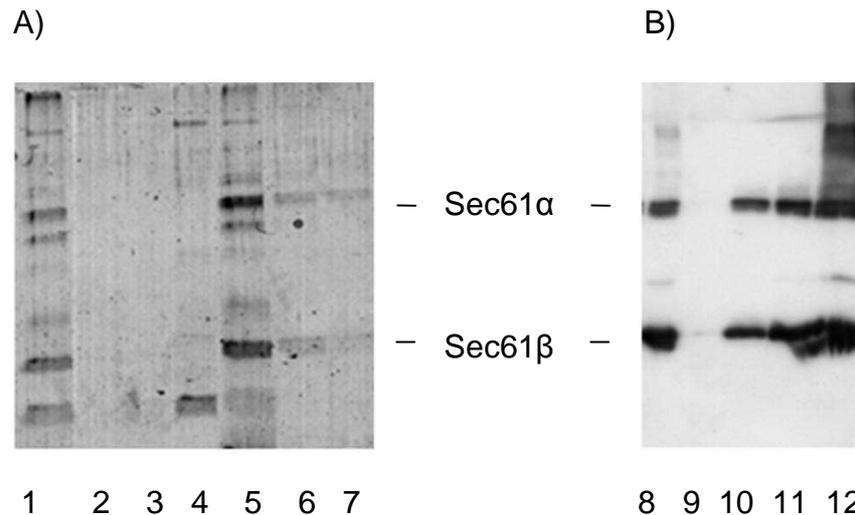
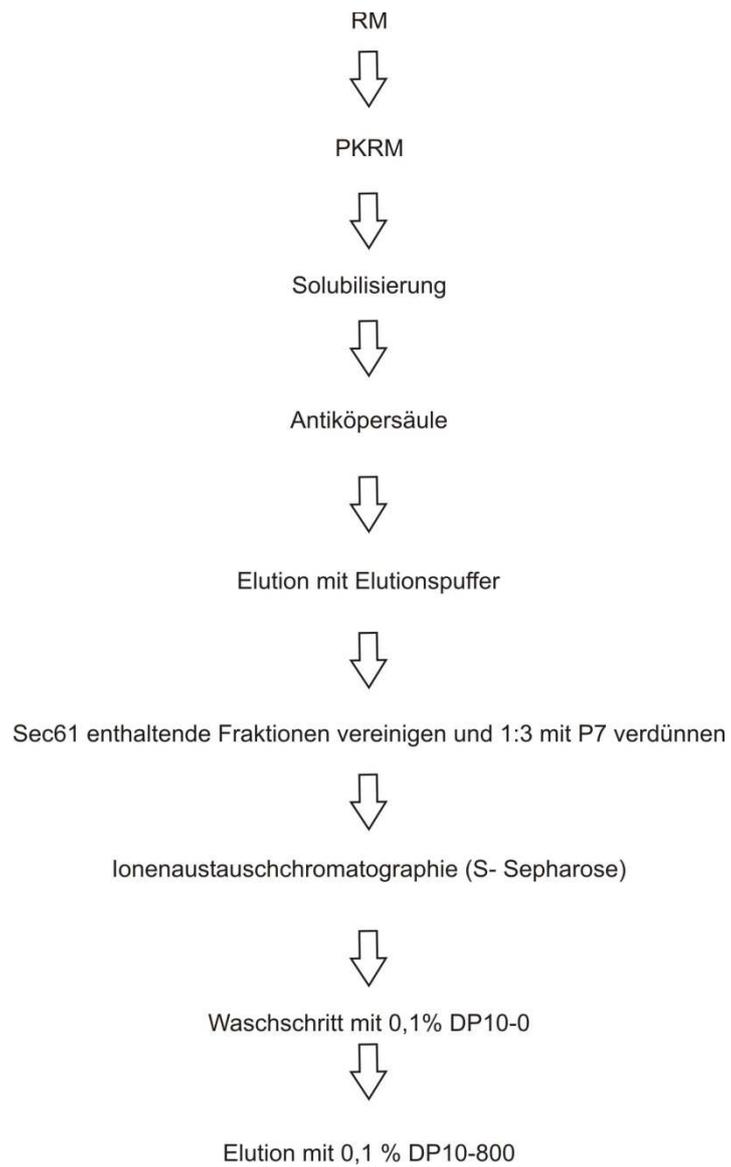


Abbildung 21: Isolierung des Sec61- Komplexes über Ionenaustauschchromatographie. Die positiven Proteinfractionen des Salzgradienten wurden mit P 7 (siehe Tabelle 10) 1:3 verdünnt und auf eine 2 ml S- Sepharose Säule aufgetragen. A) Nach anschließendem Waschen mit DBCP10-200 und DBCP10-400 (siehe Tabelle 10), wurde mit DP10-800 (siehe Tabelle 10) eluiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Coomassie- und Silberfärbung erfolgte die Analyse. B) Die positiven Proteinfractionen der Salzelution (A) wurden vereinigt und über Microcon™- Konzentratoren konzentriert und auf ein SDS- Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western- Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurde die PVDF Membran mit den beiden primären Antikörpern Sec61α und Sec61β, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert. Aufgetragen wurden je 2 µl Probe, die mit 8 µl 1x Laemmliprobenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 56 °C inkubiert wurden. 1 = Auftrag S- Sepharose Säule, 2 = Durchlauf S- Sepharose Säule, 3 = Waschschrift mit DBCP10-200 (siehe Tabelle 10), 4 = Waschschrift mit DBCP10-400 (siehe Tabelle 10), 5-7 = Eluate mit DP10-800 (siehe Tabelle 10), 8 = 1µl RM, 9= Durchlauf Microcon™, 10 = Waschschrift der Microconmembran mit DP10-800 (siehe Tabelle 10), 11 = Sec61- Komplex vor der Konzentrierung über Microcon™, 12 = Sec61- Komplex nach der Konzentrierung über Microcon™

5.2.2 Isolierung über Affinitätschromatographie

Für die Isolierung des Sec61- Komplexes aus PK-RM erfolgte zunächst eine Solubilisierung der PK-RM mittels deoxy- Big CHAP. Die Extrakte wurden über Nacht auf die Antikörper- Säule gegeben. An die Antikörpersäule war der Antikörper gegen die β- Untereinheit des Sec61- Komplexes gekoppelt. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS- PAGE und anschließendem Western- Blot. Um einen Detergenzwechsel von deoxy-Big- CHAP zu Digitonin zu erreichen, folgte ein Auftrag auf eine 0,2 ml S- Sepharose Säule. Nach intensivem Waschen der Säule erfolgte die Elution der S-Sepharose Säule mit 0,1 % DP10-800 (vgl. Abschnitt 4.2.21). Einen Überblick über die Reinigungsschritte gibt das Flussdiagramm 2.

Ergebnisse



Flussdiagramm 2: Strategie der Isolierung des Sec61- Komplexes aus PK-RM über eine Antikörper-säule.

Abbildung 22 zeigt das Ergebnis einer Isolierung des Sec61- Komplexes über eine Immunaффinitätschromatographie.

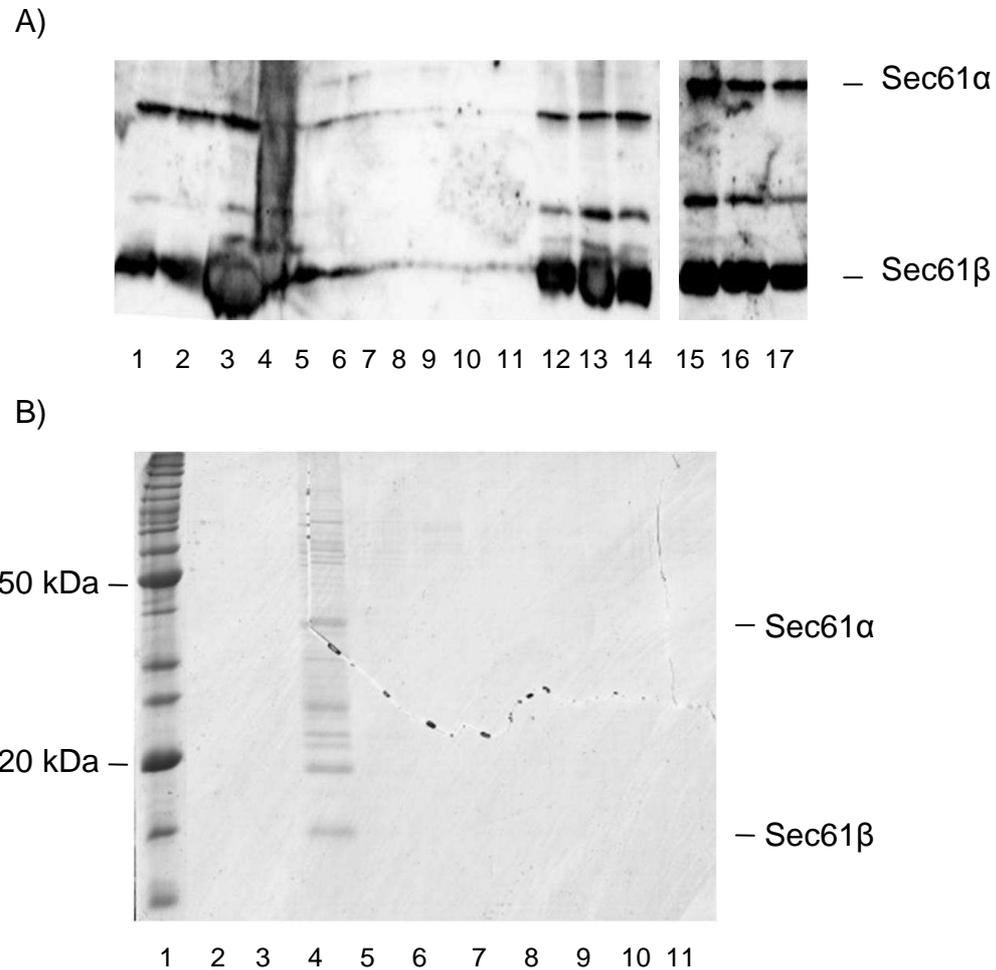


Abbildung 22: Isolierung des Sec61- Komplexes über Affinitätschromatographie. A) Es wurden Extrakte aus 24 ml PK-RM mit einer $OD_{280} = 29$ auf eine A/G-Sepharose aufgetragen und mit Elutionspuffer eluiert. Je 50 μ l der Fraktionen wurde mittels Aceton/ Methanol gefällt und auf ein SDS- Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western- Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit den beiden primären Antikörpern Sec61 α und Sec61 β , gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert. 1 = RM, 2 = PK-RM, 3 = Auftrag Antikörpersäule, 4 = Sediment PK-RM, 5 = Durchlauf Antikörpersäule, 6-9 = Waschritt 1 bis 4 mit Rekonstituierungspuffer (siehe Abschnitt 4.2.21), 10-17 = Eluate 1 bis 8 der Antikörpersäule mit Elutionspuffer (vgl. Abschnitt 4.2.21). B) Die den Sec61- Komplex enthaltenden Fraktionen wurden mit Verdünnungspuffer 1:3 gemischt und auf eine 0,2 ml S- Sepharose Säule aufgetragen. Nach anschließendem Waschen und gleichzeitigem Detergenzwechsel zu Digitonin mit 0,1 % DP-0 (siehe Abschnitt 4.2.21), wurde mit 0,1 % DP10-800 (siehe Abschnitt 4.2.21) eluiert. Es wurden je Fraktion 25 μ l Probe mit Aceton und Methanol gefällt, mit 10 μ l 1x Laemmliprobenpuffer versetzt, für fünf Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung und eine Analyse nach Coomassie- Färbung. 1 = Bench Marker, 2 = Durchlauf S- Sepharose Säule, 3 = Waschritt der S- Sepharose Säule mit 0,1 % DP-0 (siehe Abschnitt 4.2.21), 4-11 = Eluate 1 bis 8 mit DP10-800 (siehe Tabelle 10)

Ergebnisse

Die Elution der Antikörpersäule erfolgte mit Elutionspuffer (vgl. Abschnitt 4.2.21). Der Sec61- Komplex eluierte in den Fraktionen 3 bis 8 (Abb. 22 A, Spur 12-17). Bei der Salzelution der S- Sepharose Säule zeigte sich, dass der Sec61- Komplex vollständig in dem ersten Eluat zu finden war (Abbildung 22 B, Spur 4). Tabelle 15 vergleicht die isolierte Proteinmenge des Sec61- Komplexes (μg) der verschiedenen Isolierungsstrategien.

Tabelle 15: Anreicherung des Sec61- Komplex aus RM

	Ausbeute (μg)		Ausbeute (μg)
RM	4200	RM	4830
1. Überstand	150	PK-RM	4048
Pre-Extrakt	599	Auftrag AK Säule	567
RM- Extrakt	682	Waschschritt 1 bis 4	0
RAMP vor Dialyse	988	E1-E8	52
RAMP nach Dialyse	1531		
P12	190		
DL	326		
Wasch Q/S	874		
Fraktion 1	4		
Fraktion 2-7	17		
Fraktion 8- 16	90		
Fraktion 17 - 23	2		
DL S- Säule	4		
E1- E8	20		

Beginnend mit der Isolierung über die Ionenaustauschchromatographie kann man feststellen, dass starke Verluste bei der Permeabilisierung und Solubilisierung auftreten. Während dieser beiden Schritte gingen ca. 30 % verloren. Ein weiterer großer Verlust trat beim Reinigen des Sec61- Komplexes über die Ionenaustauschchromatographie auf. Der Anteil des nicht gebundenen Sec61- Komplexes an der S- Sepharose Säule betrug ebenfalls etwa 30 %, so dass nur ca. 30 % zur Isolierung des Sec61- Komplexes zur Verfügung standen. Hinzu kam ein unbekannter Anteil, der an das Säulenmaterial irreversibel gebunden hatte, so dass nur ein sehr geringer Anteil von 0,5 % für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand. Ein vergleichbares Bild ergab sich für die Isolierungsstrategie über die Affinitätschromatographie. Ein massiver Verlust trat bei der Solubilisierung der PK-RM auf. Bei den ersten beiden Arbeitsschritten gingen ca. 90 % des Ausgangsmaterials verloren. Der Detergenzwechsel über eine S- Sepharose Säule brachte nochmals einen Verlust mit sich (1/10 des Auftrags auf die Antikörpersäule), so dass letztendlich nur 1 % der Ausgangsmenge des Sec61- Komplexes wiedergefunden wurde. Die Ausbeute im Vergleich zu der

Isolierung über die Ionenaustauschchromatographie war etwa doppelt so hoch. Jedoch lag der gewonnene Komplex in beiden Fällen nicht in reiner Form vor, sondern war mit anderen Proteinen verunreinigt (vgl. Abb. 20 B, Spur 1-7; Abb. 21 A, Spur 5; Abb. 22 A, Spur 4). Insgesamt wurden mehrere erfolgreiche Sec61 Isolierungen durchgeführt, wobei insgesamt ca. ein Milligramm des Sec61 isoliert wurde.

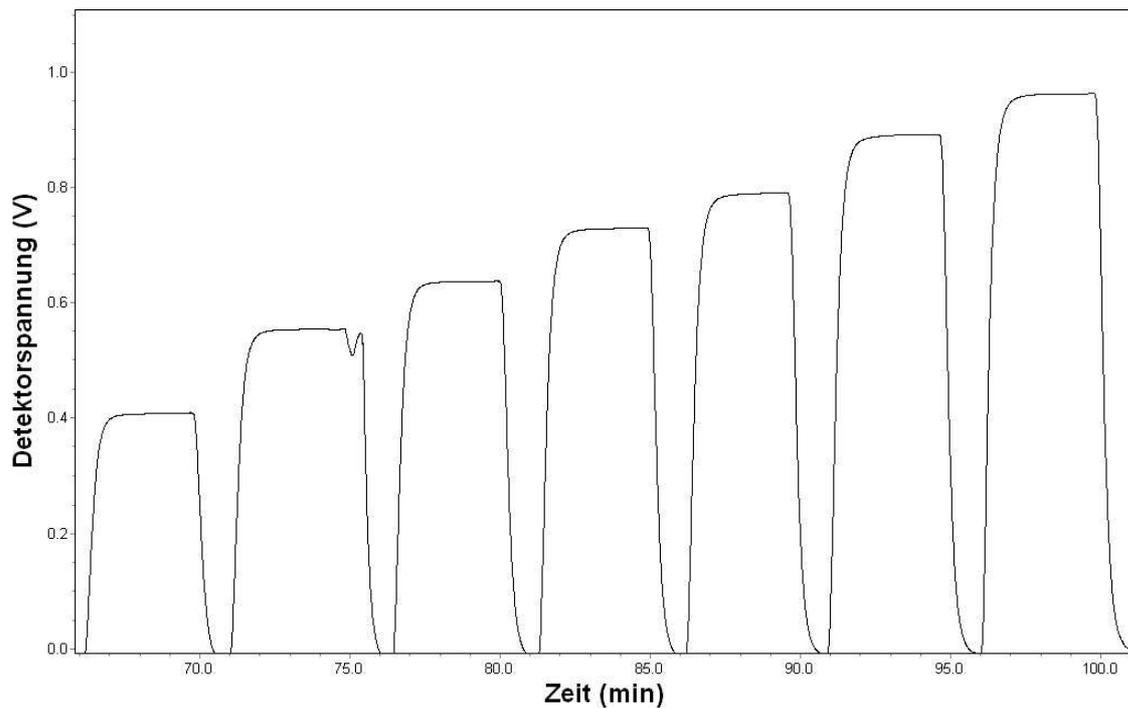
5.2.3 Der dn/dc- Wert von Digitonin

Der dn/dc- Wert ist das spezifische Brechungsindexinkrement. Er beschreibt die Änderung des Brechungsindex einer Polymerlösung relativ zu der Änderung der Polymerkonzentration. Der dn/dc- Wert ist für jedes zu vermessende Polymer eine konstante Größe. Bei der Isolierung von Membranproteinen kommen Detergenzien zum Einsatz. Für die Isolierung des Sec61- Komplexes wurden die Detergenzien deoxyBIGCHAP und Digitonin verwendet. Um mit Hilfe der Lichtstreuung in Verbindung mit einem RI- und UV- Detektor die molare Masse, und damit den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes bestimmen zu können, musste der dn/dc- Wert sowohl des Proteins, als auch des eingesetzten Detergenz bekannt sein (siehe Formel 1). Für Proteine wird ein dn/dc- Wert von 0,18 bis 0,2 angegeben (146), für Digitonin musste er in dieser Arbeit bestimmt werden. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen von Digitonin direkt in den RI- Detektor injiziert (Abbildung 23).

$2,5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3}$ g/ml Digitonin wurde im Batch- Verfahren mit einem RI- Detektor (Shodex RI-101) vermessen (Abbildung 23). Zu erkennen war eine konzentrationsabhängige Zunahme der Signalstärke. Der dn/dc- Wert errechnete sich aus der Änderung des Brechungsindex Δn in Abhängigkeit der Änderung der Konzentration Δc (Abbildung 23 B). Das Bestimmtheitsmaß R^2 wurde mit 0,99 und der errechnete dn/dc- Wert mit 0,153 bestimmt. Als eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des dn/dc- Wertes wurde mit Hilfe der ASTRA- Software eine AFFF- Messung mit dem gewünschten Detergenz durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis der Bestimmung des dn/dc- Werts mittels einer AFFF- Messung war 0,013. Grundlage der Kalkulation über die ASTRA- Software ist die Annahme, dass 100 % des eingesetzten Digitonins wiedergefunden werden. Der so bestimmte dn/dc- Wert lag um ein zehnfaches niedriger, als der bei der Bestimmung über das Batch- Verfahren.

Ergebnisse

A)



B)

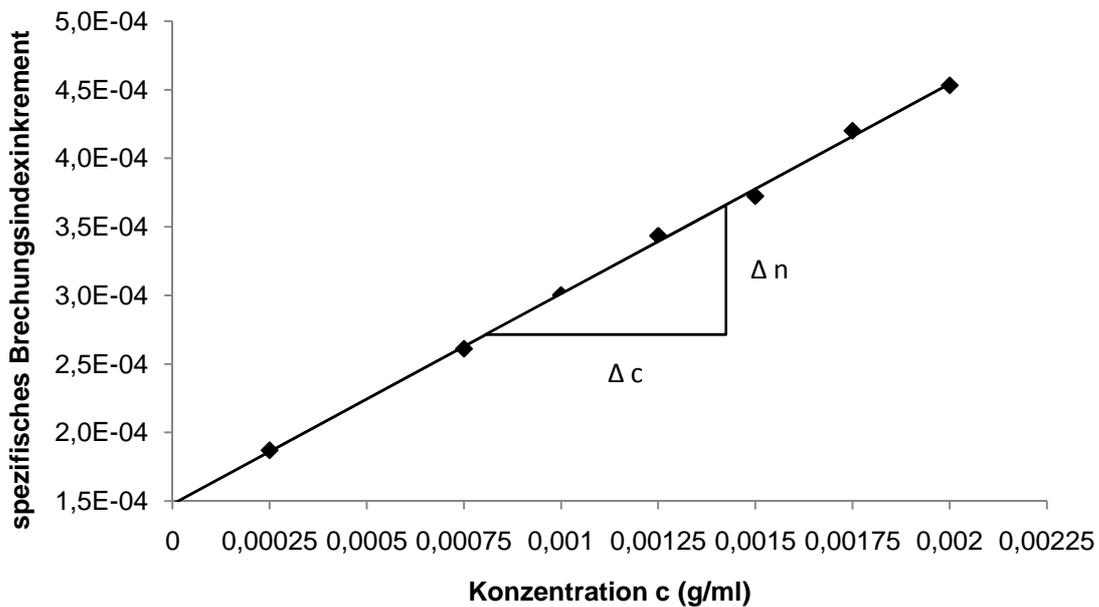


Abbildung 23: Bestimmung des dn/dc - Wertes von Digitonin mit Hilfe des Batch- Verfahrens. Digitoninkonzentrationen wurden von $2,5 \cdot 10^{-4}$ bis $2 \cdot 10^{-3}$ g/ml in einem RI- Detektor (Shodex RI-101) vermessen. Für den Puffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. A) Gezeigt sind die Ergebnisse der verschiedenen Digitoninkonzentrationen des Batch- Verfahrens. Der ermittelte dn/dc - Wert lag bei 0,153. B) Zeigt das Diagramm der dn/dc - Wert Berechnung ($R^2 = 0,99$).

5.2.4 Messung der minimal detektierbaren Digitoninkonzentration

Um eine AFFF- Messung mit anschließender MALS- Analyse für Membranproteine durchführen zu können, muss bekannt sein, ab welcher Konzentration Mizellen zu detektieren sind. Dies ist wichtig, um zwischen einem Mizellen- "Peak" und dem Protein/ Mizellen- "Peak" unterscheiden zu können, und damit gewährleistet wird, dass das Detergenz während der Elution mit einem detergenzfreien Laufpuffer nicht unter die CMC (= critical micelle concentration) fällt.

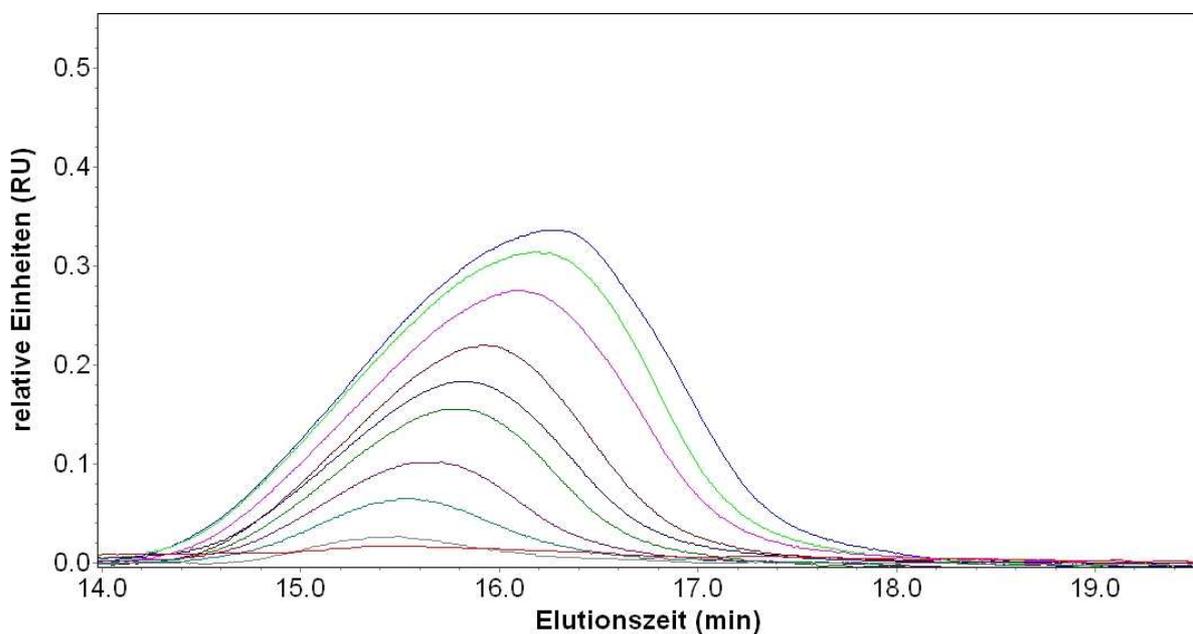


Abbildung 24: Bestimmung der minimal messbaren Digitoninkonzentration. Injiziert wurden Digitoninkonzentrationen von 99 μg bis 396 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ in einen AFFF- Kanal mit einer 5 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 μm „Spacer“. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die geringste messbare Konzentration war 132 μg Digitonin in 30 μl (graue Linie).

Abbildung 24 zeigt die Elutionprofile der verschiedenen Digitoninkonzentrationen. Injiziert wurden 99 μg bis 396 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$ in einen AFFF- Kanal mit einer 5 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 μm „Spacer“. Die Elution erfolgte mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Sowohl die Höhe des RI- Signals, als auch die Breite der einzelnen „Peaks“ nahmen mit steigender Digitoninkonzentration zu. Der maximale Signalausschlag der Messungen wurde nach etwa 16 Minuten erreicht. Der maximale Wert wurde mit der höchsten Konzentration (= 396 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$)

erreicht. Die geringste messbare Konzentration von Digitonin war 132 µg Digitonin in 30 µl = 4,4 mg/ml = 0,44 % (graue Linie).

5.2.5 Bindungseigenschaften der verschiedenen AFFF- Membranen zum Sec61- Komplex.

Die bei den Messungen standardmäßig eingesetzte Membran bestand aus regenerierter Zellulose. Neben der reg. Zellulose sind auch noch Membranen aus anderen Materialien erhältlich (Triacetat Zellulose und Polyethersulfon). Um herauszufinden, ob die verschiedenen Membrantypen den Sec61- Komplex adsorbieren, wurden Stücke der Membran mit 16,8 µg des Sec61- Komplexes für 1,5 h inkubiert. Vor der Inkubation wurden Stücke der Membranen entweder mit (+) oder ohne (-) Digitonin über Nacht mit DP10-550 (siehe Tabelle 10) abgesättigt. Zum Ablösen des Sec61- Komplexes von der Membran wurde nach der Probeninkubation alle Membranstücke für zehn Minuten mit 100 µl des entsprechenden Puffers (DP10-550, siehe Tabelle 10) gewaschen. Die sich aus dem Waschschrift ergebenden Proben wurden mit Aceton/ Methanol gefällt und die Membranen mit 15 µl 1 x Laemmliprobeppuffer versetzt. Anschließend folgte eine Inkubation für zehn Minuten bei 56°C. Nach Auftragen der Proben auf ein SDS- Gel wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western- Blot analysiert.

Ergebnisse

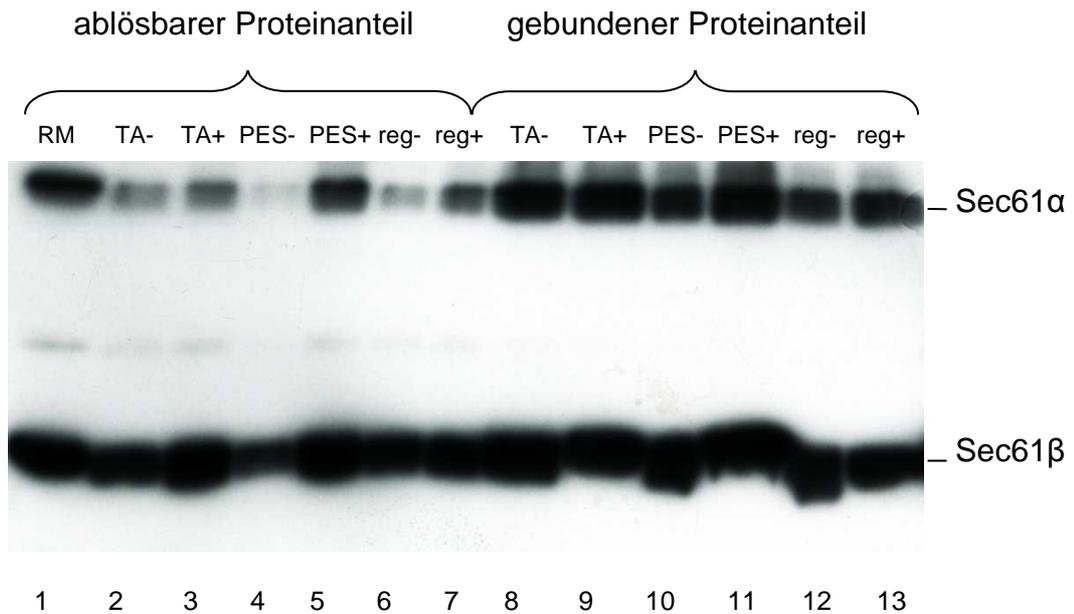


Abbildung 25: Test der verschiedenen AFFF- Membranen auf die Bindungseigenschaften zum Sec61- Komplex. Alle Membranstücke wurden mit 16,8 µg Sec61 in DP10-550 (siehe Tabelle 10) für 1,5 h inkubiert. Die Membranen wurden vor der Inkubation entweder mit (+) oder ohne (-) Digitonin im Puffer (DP10-550, siehe Tabelle 10) über Nacht abgesättigt. Zum Ablösen des Sec61- Komplexes von der Membran, wurde nach der Probeninkubation alle Membranstücke für zehn Minuten mit 100 µl des entsprechenden Puffers (siehe XY) gewaschen. Die Proben des Waschschrtes wurden mit Aceton/ Methanol gefällt und die Membranen mit 15 µl 1 x Laemmliprobenpuffer versetzt und für zehn Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Auftragen der Proben auf ein SDS- Gel wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western- Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurde die PVDF Membran mit den beiden primären Antikörpern Sec61α und Sec61β, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert. TA = Triacetat Zellulose PES = Polyethersulfon, reg = regenerierte Zellulose

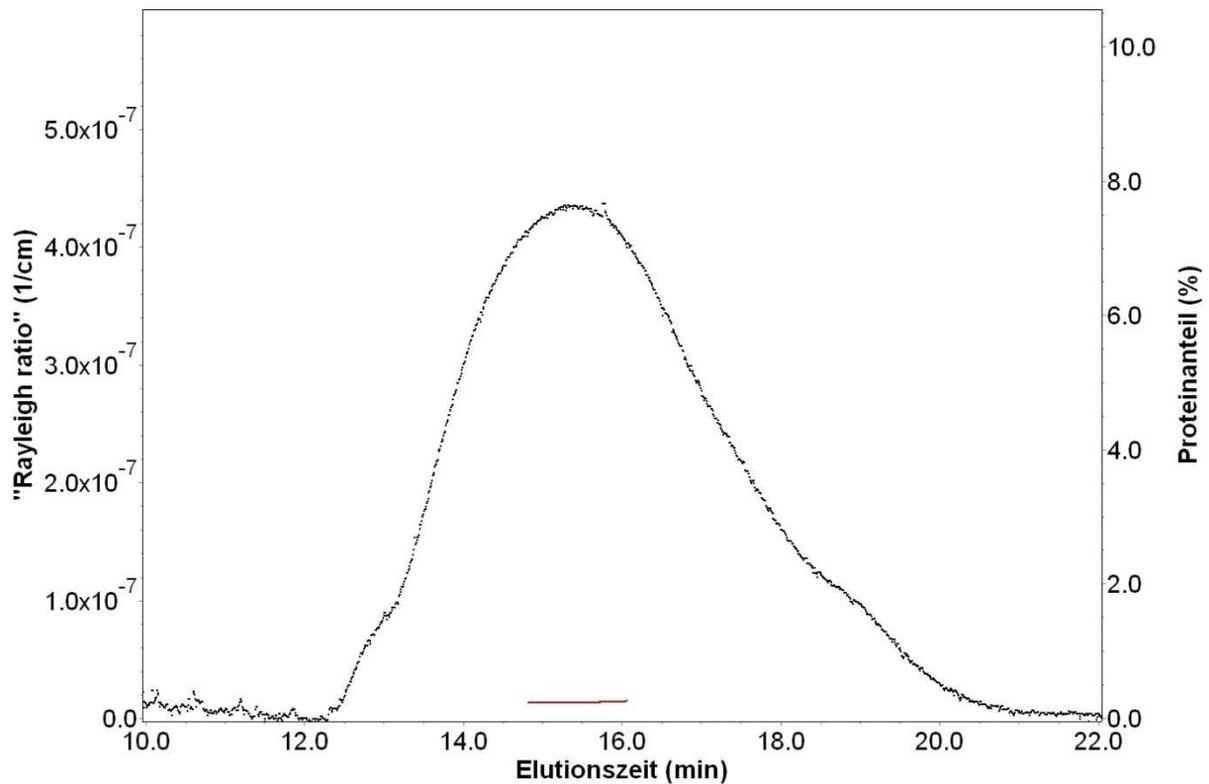
Generell war unabhängig von den Materialien eine starke Adsorption des Proteinkomplexes an die verschiedenen Membrantypen zu erkennen (Abbildung 25, Spur 8-13). Eine vorherige Inkubation der Membranen mit einem Digitoninpuffer führte zu einer stärkeren Ablösbarkeit des Proteinkomplexes von der Membran im Vergleich zu den vorher unbehandelten Membranen (vgl. Abbildung 25, Spur 2 mit 3, 4 mit 5 und 6 mit 7). Einen besonders starken Effekt einer vorherigen Inkubation mit dem Detergenzpuffer konnte bei den Membranen aus Polyethersulfon und aus reg. Zellulose festgestellt werden (vgl. Abbildung 25, Spur 4 mit 5 und 6 mit 7). Dennoch blieb auf den Membranen der Großteil des Sec61 hängen. Man kann sagen, dass die Membranen aus Polyethersulfon und reg. Zellulose am besten geeignet waren und eine Inkubation mit Detergenzpuffer einen positiven Effekt auf die Bindung an der Membran hatte. Grundsätzlich war bei Messungen mit der AFFF- Technik mit hohen Verlusten des Sec61- Komplexes zu rechnen. Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des Sec61- Komplexes kam aufgrund dieses Ergebnisses die regenerierte Zellulose zum Einsatz.

5.2.6 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61- Komplexes

Nachdem sowohl der dn/dc - Wert von Digitonin, als auch die minimale messbare Konzentration von Digitonin im MALS- System bekannt waren, erfolgte die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61- Komplexes. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 zu sehen. Hierfür wurden 75 μg Probe des isolierten Sec61- Komplexes in einen AFFF- Kanal mit einer 10 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 μm „Spacer“ injiziert. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die während der Elution aufgefangenen Fraktionen (500 μl) wurden mittels Aceton/ Methanol gefällt. Die Analyse erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung und Western- Blot.

Das Elutionsprofil der AFFF- und MALS- Messung zeigt Abbildung 26 A. In der Elutionszeit zwischen der 12. und 20. Minute war eine Änderung des Signals des Lichtstreuendetektors (90° Winkel) erkennbar. Für die Berechnung wurde 1,798 ($\text{mL}/(\text{g}\cdot\text{cm})$) als Extinktionskoeffizienten für Digitonin (Bestimmung mit der ASTRA- Software, Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt) und $1,007\text{e}^{+3}$ ($\text{mL}/(\text{g}\cdot\text{cm})$) für den Sec61- Komplex (Analyse mit dem Programm PROTEAN der DNASTar- Software, Version 7) verwendet. Die verwendeten dn/dc - Werte waren 0,153 für Digitonin und 0,185 für das Protein. Die molare Masse wurde mit 55,9 kDa bestimmt. Der prozentuale Proteinanteil des Detektorsignals war nur 0,17 %. Ein Signal der Sec61 α oder β Untereinheit in der Western- Blot Analyse war jedoch nicht feststellbar. Da die Positivkontrolle (RM) ein Signal ergab, konnte man die Möglichkeit eines Detektionsfehlers ausschließen. Als Ursache kommt erstens eine nicht ausreichend große Menge des eingesetzten Proteins und zweitens ein Verlust der Probe im AFFF- Kanal in Frage.

A)



B)

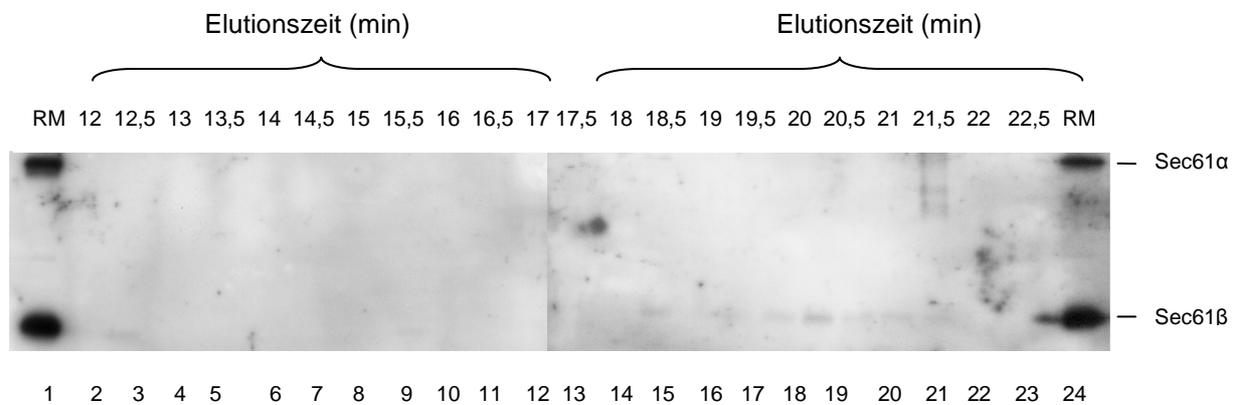


Abbildung 26: Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61-Komplexes (die schwarze Linie zeigt das Signal des 90° Winkels des Lichtstredetektors, die rote Linie den zugehörigen Proteinanteil in Prozent). A) 75 µg Sec61 in DP10-800 wurden in einen AFFF- Kanal mit einer 10 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“ injiziert. Die Elution erfolgte mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Während der Elution wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Western- Blot analysiert. Die zeitliche Darstellung des Lichtstredetektorsignals (90° Winkel) während der Elution bezieht sich auf die primäre Y- Achse (links), der Proteinanteil (%) am Signal (schwarze Linie) auf die sekundäre Y- Achse (rechts). B) Western- Blot Analyse der gesammelten und gefällten Fraktionen. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit den beiden primären Antikörpern Sec61α und Sec61β, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert.

Um die Möglichkeit, eine nicht ausreichend große Menge des Proteins eingesetzt zu haben auszuschließen, wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen, aber mit einem größeren Proteingehalt wiederholt. Hierfür wurden 150 µg Probe des isolierten Sec61-Komplexes in den AFFF-Kanal injiziert und mit Hilfe der MALS-Technik vermessen. Die Elution wurde wiederum in Fraktionen à 500 µl aufgefangen (Abbildung 27 B), mittels Aceton/ Methanol gefällt und durch elektrophoretische Auftrennung und Western-Blot analysiert.

Der Elutionspeak der AFFF- und MALS-Messung (Abbildung 27 A) war zwischen der 16. und der 18. Minute zu erkennen. Ein positives Signal der Sec61 α oder β Untereinheit in der Western-Blot Analyse war im gleichen Zeitraum feststellbar, so dass der Elutionspeak tatsächlich dem Signal des Proteins entsprach. In diesem Fall war das Digitonin in der zu vermessenden Probe ausgefallen. Aus diesem Grund war keine Auswertung der Messung möglich. Erkennbar ist das ausgefallene Digitonin daran, dass das Signal des Lichtstredetektors (rote Linie) einen maximal möglichen Ausschlag zeigte. Dennoch kann man sagen, dass eine Messung prinzipiell mit dieser Methode möglich wäre. Im nachfolgenden Kapitel wurde die oben erwähnte zweite Möglichkeit des Verbleibs des Proteins getestet.

Ergebnisse

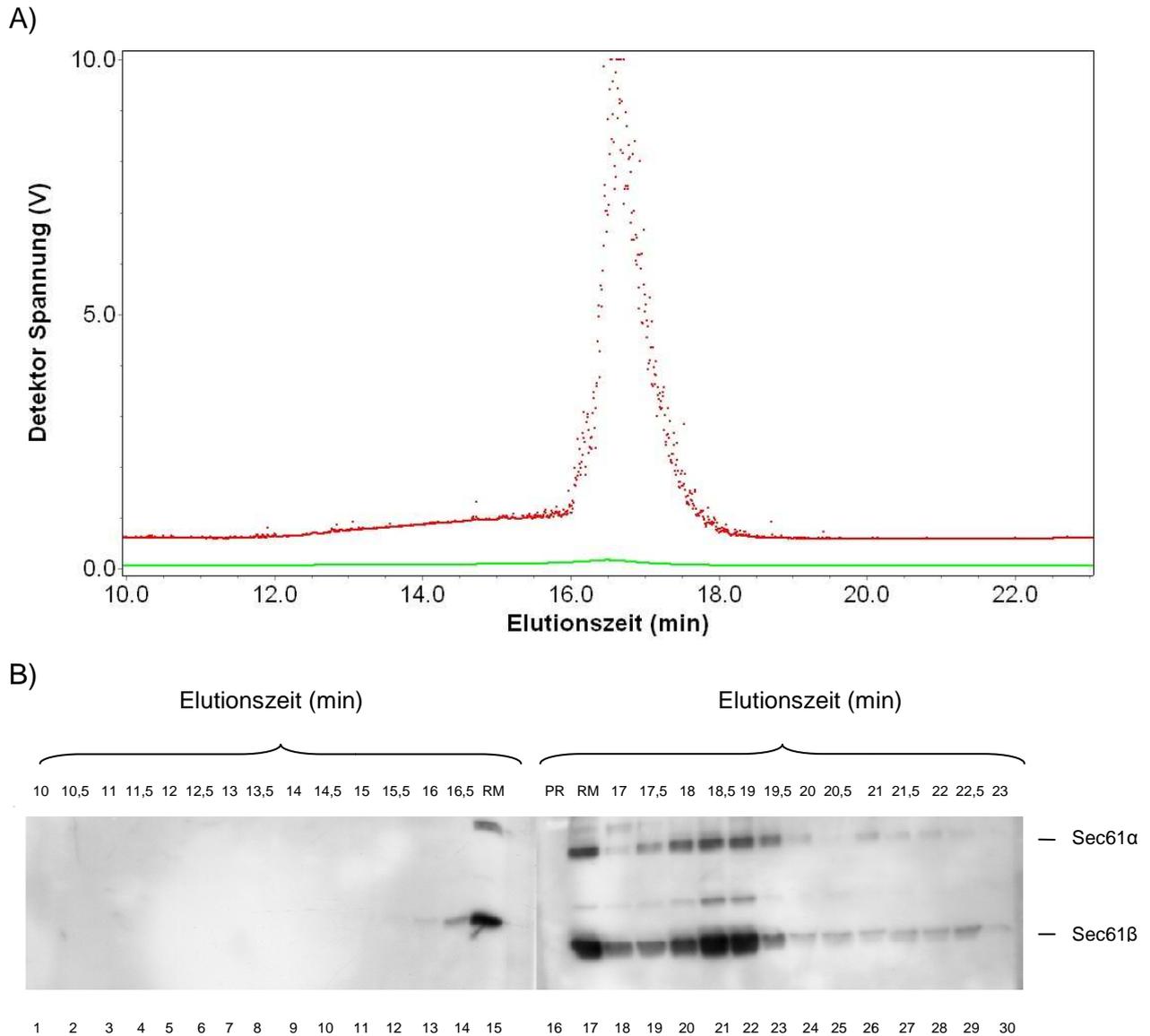


Abbildung 27: Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61- Komplexes (durchgehende grüne Linie zeigt das Signal des UV- Detektors, die roten Punkte das zugehörige Signal des 90° Winkels des Lichtstredetektors. A) 150 µg Sec61 in DP10-800 wurden in einen AFFF- Kanal mit einer 10 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“ injiziert. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Während der Elution wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Western- Blot analysiert. B) Western- Blot Analyse der gesammelten und gefällten Fraktionen. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit den beiden primären Antikörpern Sec61α und Sec61β, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert.

Ergebnis aus Kapitel 5.2.6 somit vor allem mit dem Verlust des Proteins im Kanal begründet lag. Allerdings scheint es einen Absättigungseffekt der Membran mit dem Sec61- Komplex und Digitonin zu geben.

5.2.8 Charakterisierung der Interaktion zwischen Ribosom und dem Sec61- Komplex

Für die Bestimmung der Affinität vom Ribosom zum Sec61- Komplex wurde die Oberflächenplasmonresonanz- Spektroskopie (SPR) verwendet (siehe Abschnitt 4.2.38). Der Sec61- Komplex wurde dazu als Ligand in einer Flusszelle auf der Oberfläche eines CM5 Sensorchips mittels eines kovalent gebundenen Antikörpers gegen die Sec61 β - Untereinheit immobilisiert. Anschließend wurden die Ribosomen oder seine Untereinheiten als Analyt in verschiedenen Konzentrationen in Lösung über die Oberfläche des Sensorchips geleitet. Die Konzentration der Ribosomen und der ribosomalen Untereinheiten wurde zuvor photometrisch bestimmt. Mittels der SPR- Detektion konnte die Bindung der Ribosomen an den immobilisierten Sec61- Komplex beobachtet werden. Als Referenz wurde entweder eine Flusszelle mit dem KLH- Peptid (= **K**eyhole **L**impet **H**emocyanin, chemisch kovalent quervernetzt mit dem N- terminalen Oligopeptid von Sec61 β , das der Immunisierung der Kaninchen diente) abgesättigt, oder nach Vorschrift des Herstellers nur aktiviert und deaktiviert. Für die mathematische Auswertung wurde die Differenz der Sensorgramme der beiden Flusszellen verwendet. Auf diese Weise konnten eventuell auftretende unspezifische Bindungen berücksichtigt werden. Die Affinität des Proteinkomplexes wurde mit Hilfe der Biaevaluation Software 3.1. bestimmt.

Ergebnisse

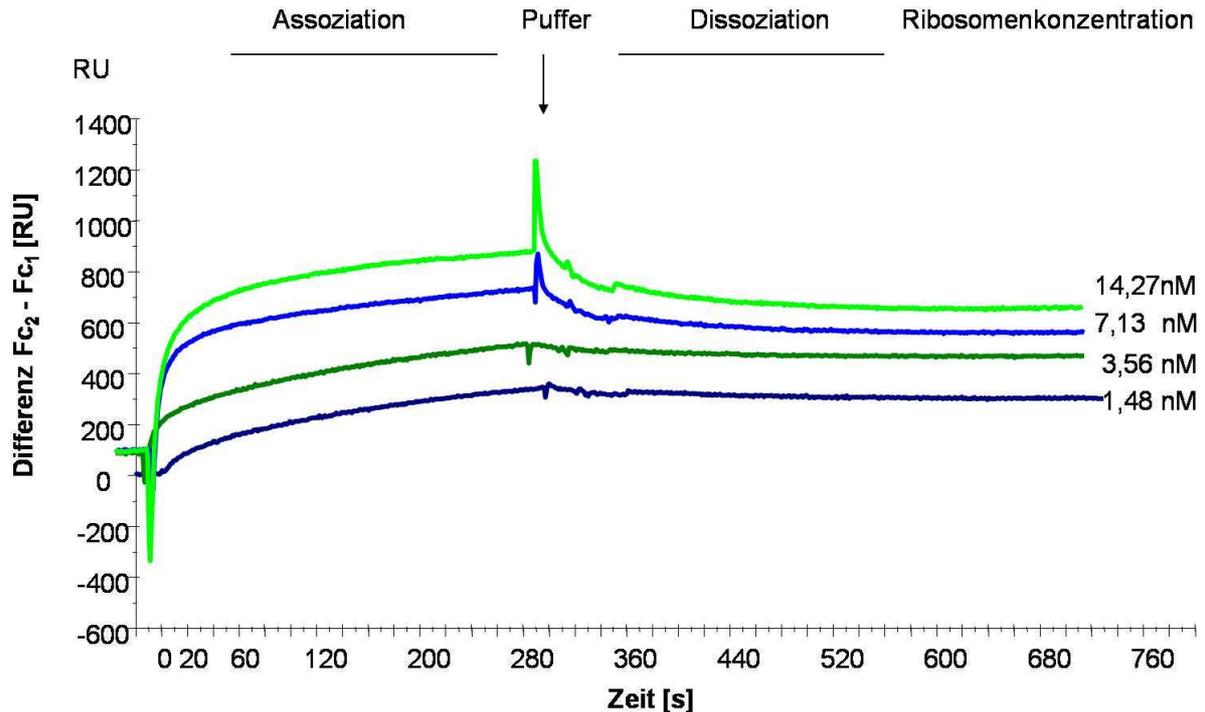


Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Bindung der Ribosomen an den Sec61- Komplex. Der Antikörper gegen die Sec61 β - Untereinheit des Sec61- Komplexes wurde nach Anweisung des Herstellers an einen CM5 Chip gekoppelt. Der aus Hundepankreas isolierte Sec61- Komplex wurde über diesen Antikörper an die Flusszelle 2 (Fc2) immobilisiert. Als Referenz wurde die Flusszelle 1 (Fc1) mit KLH- Peptid abgesättigt. Dann wurden die mit Puromycin/ Kaliumacetat behandelten Ribosomen in den angegebenen Konzentrationen mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min (Laufpuffer siehe Abschnitt 4.2.38) über die Chipoberfläche geleitet. Nach jeder Injektion wurde ein Waschschrift mit 500 mM Salz (= Laufpuffer mit 500 mM NaCl) über den Chip geleitet, um die noch gebundenen Ribosomen vom Liganden zu lösen. Die Sensorgramme zeigten die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem Sec61- Komplex und der Referenzzelle mit dem KLH-Peptid.

Abbildung 29 zeigt die Sensorgramme für verschiedene Analyt- Konzentrationen, die für die Bindung von Ribosomen an den Sec61- Komplex aufgezeichnet wurden, während die Ribosomen über den Chip geleitet wurden. Es war eine Assoziation mit dem immobilisierten Sec61- Komplex (0-300 s) erkennbar, an die sich nach Umschalten auf Laufpuffer eine Dissoziation anschloss. Aus den aufgezeichneten Sensorgrammen konnte mit Hilfe der BiaEvaluation- Software 3.1. für die Interaktion der Ribosomen und dem Sec61- Komplex ein K_D -Wert (= k_d/ k_a) von 2,2 nM berechnet werden. Die Daten wurden mit dem von der Software zur Verfügung gestellten Modell für eine Bindung mit einer driftenden Basislinie ausgewertet, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass sich dabei zum Teil hohe Abweichungen von den Idealkurven ergaben.

Um zu testen, ob die so gemessene Bindung der Ribosomen an den Sec61- Komplex tatsächlich eine biologische Aktivität war, wurden die Ribosomen mit RNaseA für eine und anderthalb Stunden bei 30°C inkubiert. Da die Ribosomen

über die 28S rRNA der großen ribosomalen Untereinheit binden sollen (39), sollte nach dem Verdau der RNA auch keine Bindung der Ribosomen messbar sein.

Abbildung 30 A zeigt die Sensorgramme für die mit RNaseA inkubierten Analyten. Die für eine Stunde mit RNaseA inkubierten Ribosomen zeigten nur noch eine geringe, die für anderthalb Stunden mit RNaseA inkubierten Ribosomen zeigten keine Assoziation mit dem immobilisierten Sec61-Komplex (0-300 s). Als Positivkontrolle (Abbildung 30 B) wurden Ribosomen ohne RNaseA Behandlung für zehn Minuten (rote Linie) oder anderthalb Stunden (grüne Linie) bei 30°C inkubiert und über den Sensorchip geleitet. Dies geschah vor (rote Linie) und nach (grüne Linie) den Messungen der mit RNaseA behandelten Ribosomen. In beiden Fällen war eine Assoziation (0-300 s) und eine Dissoziation nach Umschalten auf Laufpuffer (300-620 s) erkennbar.

Ergebnisse

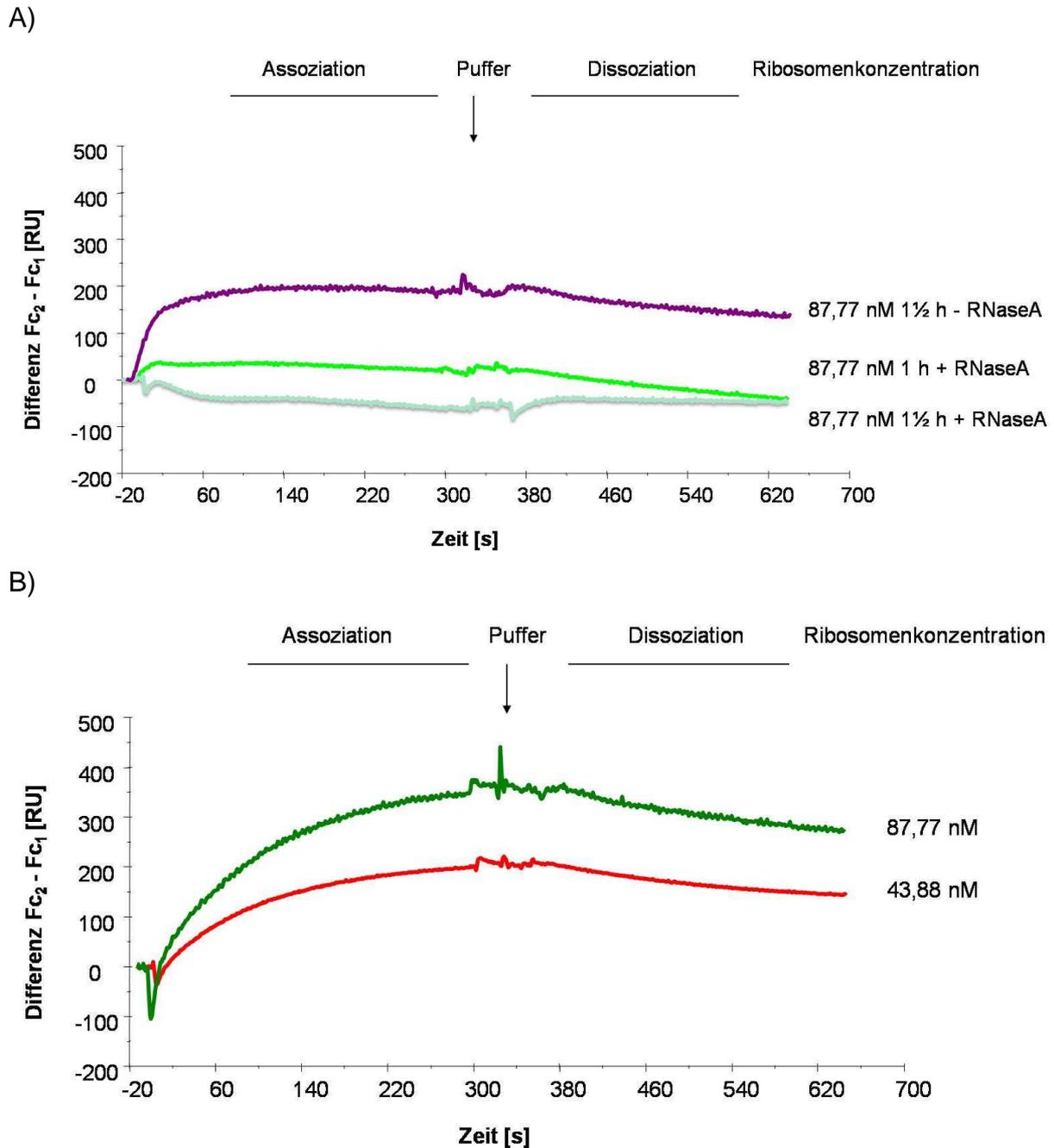


Abbildung 30: RNA abhängige Bindung der Ribosomen an den Sec61- Komplex. Der Antikörper gegen die Sec61 β - Untereinheit des Sec61- Komplexes wurde an einem CM5 Chip nach Anweisung des Herstellers gekoppelt. Der aus Hundepankreas isolierte Sec61- Komplex wurde über diesen Antikörper an die Flusszelle 2 (Fc2) immobilisiert. Als Referenz wurde die Flusszelle 1 (Fc1) nach Vorschrift des Herstellers aktiviert und deaktiviert (siehe Abschnitt 4.2.38). A) Es wurden 87,77 nM mit Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen, die zuvor eine anderthalb Stunden bei 30°C mit RNaseA inkubiert wurden, über die Chipoberfläche geleitet. Anschließend folgte eine Injektion von 87,77 nM Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen, die zuvor anderthalb Stunden bei 30°C inkubiert wurden. Die Messungen fanden jeweils mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min (Laufpuffer siehe Abschnitt 4.2.38) statt. B) Als Funktionstest des gekoppelten Sec61- Komplexes wurde vor (43,88 nM) und nach (87,77 nM) der Messung von A) Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen, die zuvor zehn Minuten (rote Linie) oder anderthalb Stunden (grüne Linie) bei 30 °C inkubiert wurden, über die Chipoberfläche geleitet. Nach jeder Injektion wurde ein Waschschrift mit 500 mM Salz (= Laufpuffer mit 500 mM NaCl) über den Chip geleitet, um die noch gebundenen Ribosomen vom Liganden zu lösen. Die Sensorgramme zeigten die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem Sec61- Komplex und der Referenzzelle.

Ergebnisse

Um zu testen, welche der beiden ribosomalen Untereinheiten am Sec61- Komplex binden, wurden die vorher getrennten Untereinheiten (vgl. Abschnitt 4.2.17) über den Sensor geleitet. Als Kontrolle wurden 43,88 nM Puromycin/ Kaliumacetat behandelte Ribosomen, die zuvor zehn Minuten bei 30 °C inkubiert wurden über die Chipoberfläche geleitet.

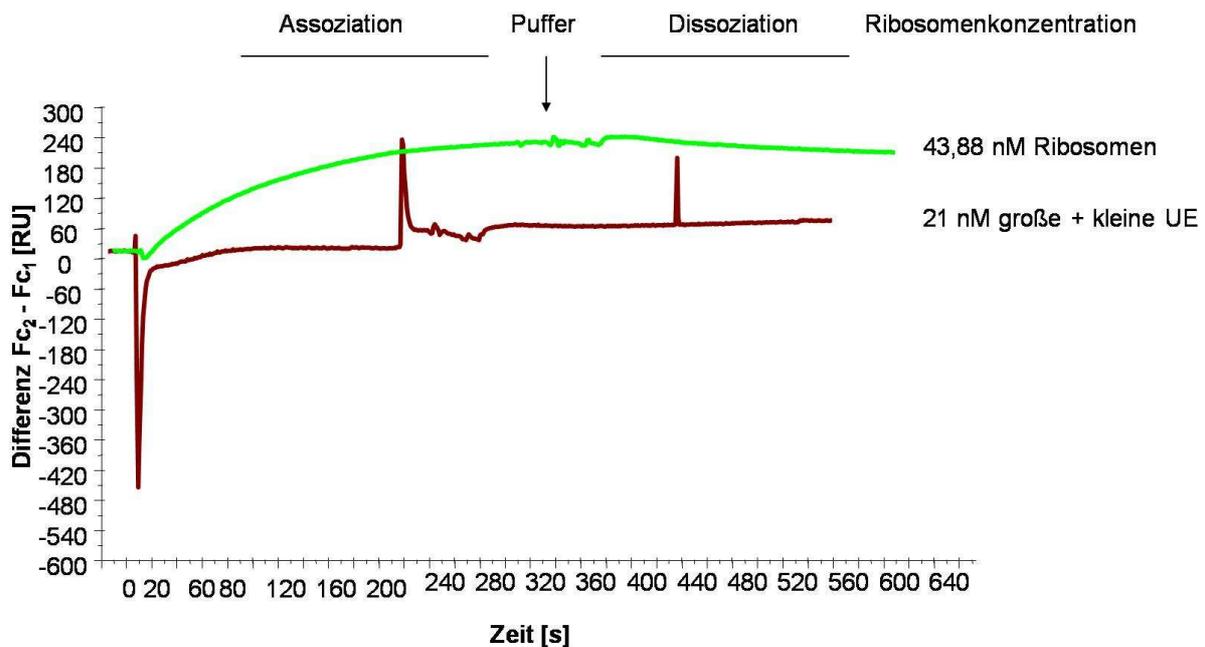


Abbildung 31: Bindung der ribosomalen Untereinheiten an den Sec61- Komplex. Der Antikörper gegen die Sec61 β - Untereinheit wurde an einem CM5 Chip nach Anweisung des Herstellers gekoppelt. Der aus Hundepankreas isolierte Sec61- Komplex wurde über diesen Antikörper an die Flusszelle 2 (Fc2) immobilisiert. Als Referenz wurde die Flusszelle 1 (Fc1) nach Vorschrift des Herstellers aktiviert und deaktiviert (siehe Abschnitt 4.2.38). Es wurden 43,88 nM mit Puromycin/ Kaliumacetat (grüne Linie) behandelte Ribosomen, die zuvor zehn Minuten bei 30°C inkubiert wurden über die Chipoberfläche geleitet. Dann wurden die vorher getrennten ribosomalen Untereinheiten (vorher zehn Minuten bei 30°C inkubiert) zusammen in der angegebenen Konzentration über die Chipoberfläche geleitet. Die Messungen fanden jeweils mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min (Laufpuffer siehe Abschnitt 4.2.38) statt. Nach jeder Injektion wurde ein Waschschrift mit 500 mM Salz (= Laufpuffer mit 500 mM NaCl) über den Chip geleitet, um die noch gebundenen Ribosomen vom Liganden zu lösen. Die Sensorgramme zeigten die Differenz zwischen der Messzelle mit immobilisiertem Sec61- Komplex und der Referenzzelle.

Abbildung 31 zeigt die Sensorgramme für die ribosomalen Untereinheiten (braune Linie) und die 80S Ribosomen (grüne Linie). Die ribosomalen Untereinheiten zeigten keine Assoziation mit dem immobilisierten Sec61- Komplex (0-300 s). Einzig die 80S Ribosomen zeigten eine Assoziation und eine Dissoziation.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bindung der Ribosomen am Sec61- Komplex sowohl von der Konzentration der Ribosomen, als auch von der RNA abhängig ist. Eine Bindung der getrennten ribosomalen Untereinheiten am

Sec61- Komplex konnte mit dieser Messtechnik nicht gezeigt werden, obwohl eine Bindung der 80S Ribosomen messbar war. Die K_D wurde mit 2,2 nM bestimmt.

5.2.9 Synthese von fluoreszierendem ppL86mer

Der isolierte Sec61- Komplex sollte funktionell und strukturell untersucht werden. Hierfür war geplant, den gereinigten und mit Fluoreszenz markierten Sec61- Komplex in einen Bilayer zu rekonstituieren, fluoreszierendes ppL86mer zu isolieren und die Translokationsaktivität an diesem definierten System zu verfolgen. Die Untersuchungen sollten aufklären, wie die Sec61 Translokase mit dem inserierenden Substrat interagiert. Hierzu sollten FRET- Messungen (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) zwischen dem fluoreszierenden Sec61- Komplex und dem fluoreszierenden ppL86mer durchgeführt werden. Die Bindung der Translokase an das fluoreszierende ppL86mer sollte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologischen Methoden näher definiert werden. Dies sollte in Kooperation mit der Biophysik der Universität Osnabrück erfolgen.

Das FluoroTect™ System nutzt eine modifiziert beladene Lysin transfer RNA (tRNA) mit dem Fluorophor BODIPY®-FL. Die modifizierte Lysin tRNA kann in einem *in vitro* Translationsystem genutzt werden. Die Kontrolle der Synthese des fluoreszierenden Polypeptids ppL86mer erfolgte mittels Fluoreszenzmessung.

Die Synthese des fluoreszierenden ppL86mer fand im Translationsmix (Retikulozyten- Lysat) mit 0 %, 0,2 %, 1,6 % und 2 % Anteil fluoreszierender tRNA im Translationsansatz zusammen mit dem ppL86- Transkript statt (vgl. Abschnitt 4.2.28). Nach Stoppen der Synthese durch Zugabe von 2 x Laemmliprobenpuffer und Inkubation bei 95 °C wurde die Probe mittels SDS- PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz der gescannten Gele geschah mit Hilfe der Software Image- Quant 5.1. Die Ergebnisse wurden in relativen Einheiten als Zahlen wiedergegeben (Abbildung 32 B). Die Analyse durch Fluoreszenzmessung (Abbildung 32 A) zeigte, dass die Synthese des fluoreszierenden ppL86mer mit zunehmendem Anteil fluoreszierender tRNA im Translationsansatz (Abbildung 32, Spur 1-4) zunahm. Mit einem Anteil von 0,2 % fluoreszierender tRNA erreichte man eine Synthese von 17 relativen Einheiten. Diese steigerte sich auf 31,5 (1,6 % tRNA) und 48 (2 % tRNA) relative Einheiten. Die maximale Synthese reichte trotz verschiedener

Optimierungsversuche nicht aus, um mit dem synthetisierten ppL86mer beispielsweise eine FRET- Messung durchführen zu können.

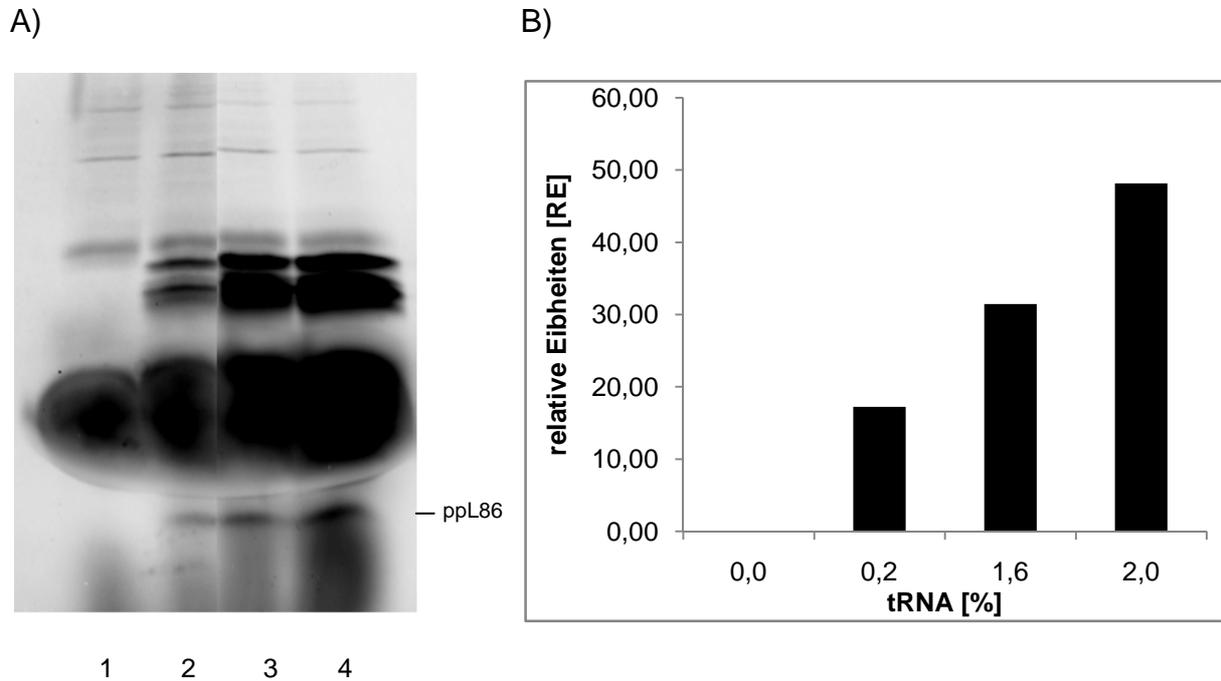


Abbildung 32: Synthese von fluoreszierendem ppL86mer. Unterschiedliche Mengen FluoroTect™- tRNA (0 %, 0,2 %, 1,6 % und 2 % Anteil im Translationsansatz) wurden im Translationsmix (Retikulozyten- Lysat) zusammen mit dem ppL- Transkript bei 30°C inkubiert (vgl. Abschnitt 4.2.28). Nach 20 Minuten wurde die Translation durch eine Inkubation für 5 min bei 95°C mit Laemmliprobepuffer gestoppt. A) Nach SDS-PAGE wurde das fluoreszierende ppL86mer durch Fluoreszenzmessung sichtbar gemacht, quantifiziert und B) graphisch dargestellt. Die Menge des synthetisierten ppL86mers (in relativen Einheiten) ist gegen die FluoroTect™- tRNA Konzentrationen aufgetragen.

5.3 Isolierung und Charakterisierung von Grp170 und BiP

Grp170 (170 kDa glucose-regulated protein) ist ein Hsp70 verwandtes Protein des endoplasmatischen Retikulums, das Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen der Hsp70- und Hsp110- Familie aufweist und in allen eukaryontischen Zellen gefunden wurde (102). Wie alle Hsp70 Proteine besitzt Grp170 eine ATPase- und eine peptidbindende- Domäne (176). Wegen seiner Größe und verschiedener Strukturmerkmale wurde Grp170 aber keiner der beiden Proteinfamilien, sondern einer eigenständigen Familie zugeordnet (102). Nach erfolgreicher Isolierung sollte mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden (MALS und QUELS) der hydrodynamische Radius und der Oligomerisierungsgrad von BiP bestimmt werden. Des Weiteren sollte die Bildung des Komplexes aus Grp170 und BiP einer früheren Arbeit bestätigt werden.

5.3.1 Isolierung von Grp170 und BiP

Da es sich bei Grp170 um ein Glykoprotein handelt, konnte es nicht in nativer Form im *E. coli* Expressionssystem synthetisiert werden. Daher wurde es aus Hundepankreas-mikrosomen gewonnen (vgl. Abschnitt 4.2.22). Grp170 und BiP wurden mittels einer ATP- Agarose Chromatographie aus rauen Mikrosomen isoliert (177). Das Ergebnis einer typischen Reinigung von Grp170 und BiP ist in Abbildung 33 zu sehen. Die eluierten Proteine bei 140 kDa und 80 kDa konnten in einer früheren Arbeit durch Sequenzierung mittels Edman-Abbau (178) als Grp170 und BiP identifiziert werden (179). Die Identität des Proteins unterhalb von BiP bei 50 kDa konnte dagegen noch nicht geklärt werden.

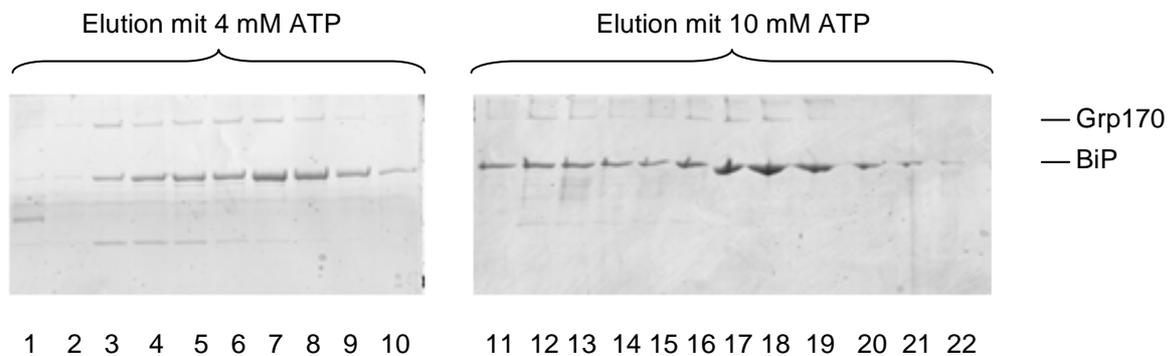


Abbildung 33: ATP- Agarose- Chromatographie mikrosomaler Proteine aus rauen Mikrosomen. Es wurden Extrakte aus 30 ml RM mit einer $OD_{280} = 40$ auf eine 20 ml ATP- Agarose Säule aufgetragen. Nach Waschen mit CCP + Chaps (siehe Abschnitt 4.2.22) und CCP - Chaps (siehe Abschnitt 4.2.22) wurde zuerst mit 4 mM ATP (Spur 1 bis 10) und anschließend mit 10 mM ATP (Spur 11 bis 22) eluiert. Die Eluate wurden in 2 ml Fraktionen aufgefangen, von den Fraktionen jeweils 50 μ l entnommen und nach Aceton/Methanol Fällung elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie- Färbung analysiert.

Grp170 und BiP eluierten gemeinsam ab der ersten Fraktion. Das Ende der Elution von Grp170 und BiP war während der Hochsalz- und 10 mM ATP Elution erreicht (Abbildung 33, Spur 19). Da Grp170 ab Spur 19 nicht mehr eluierte, enthielten die Fraktionen von 20 bis 22 reines BiP. Die Grp170/BiP enthaltenden Proben der Elution wurden vereinigt und mit den Konzentratoren Centricon YM 30 und Microcon 30 kDa cut-off konzentriert.

Ergebnisse

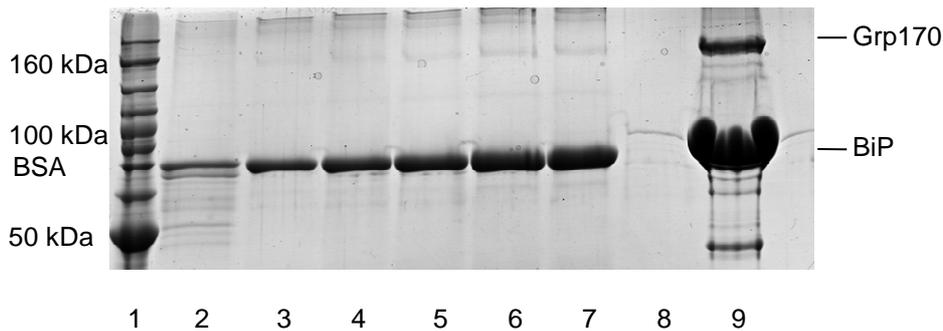


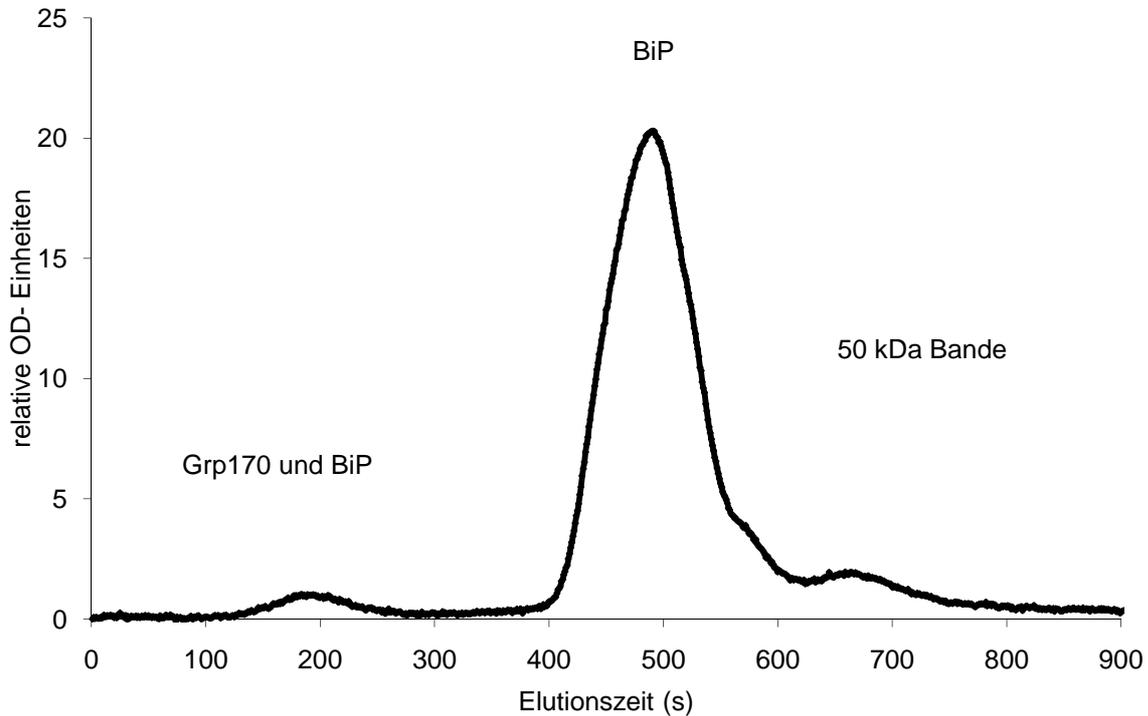
Abbildung 34: Bestimmung der Konzentration des isolierten Grp170/BiP- Proteingemisches. Das verwendete Proteingemisch stammte aus einer ATP- Agarose- Chromatographie von solubilisierten Hundepankreas-mikrosomen. Alle Grp170 und BiP enthaltenden Elutionsfraktionen der ATP- Agarose Säule wurden vereinigt und mit CentriconTM- und MicroconTM- Konzentratoren auf ein Volumen von ca. 100 µl gebracht. 1 = Bench Marker, 2 = 0,2 µg BSA, 3 = 0,4 µg BSA, 4 = 0,6 µg BSA, 5 = 0,8 µg BSA, 6 = 1 µg BSA, 7 = 1 µg BSA, 8 = Durchlauf der Konzentrierung mittels MicroconTM, 9 = Konzentrat des Grp170/ BiP Proteingemisches.

Die Konzentration der Probe konnte mittels BSA- Reihe bestimmt werden (vgl. Abbildung 34). Aus 30 ml RM mit einer $OD_{280} = 40$ konnten je nach Präparation für BiP zwischen 45 µg und 288 µg und für Grp170 zwischen 9 und 23 µg isoliert werden.

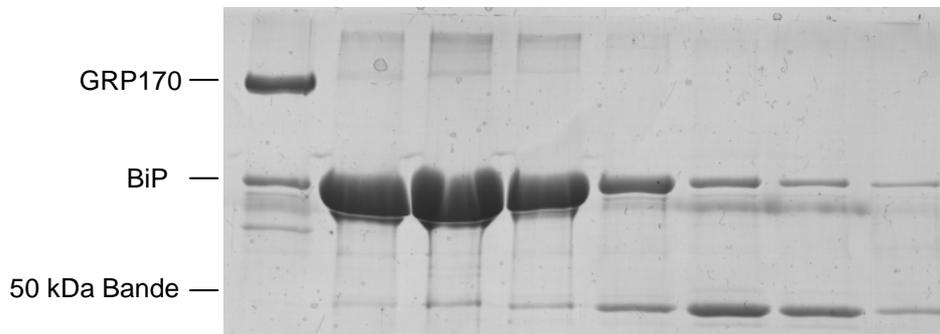
Bei der Isolierung von Grp170 über eine ATP-Agarose Chromatographie aus solubilisierten Hundepankreas-mikrosomen wurden neben Grp170 auch sehr große Mengen des ATP bindenden Hsp70- Chaperons BiP isoliert. Um reines BiP aus der Probe von Grp170 gebundenem BiP abzutrennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt (siehe Abbildung 35). Für den Versuch wurde eine Superdex 200 HR10/30 Säule verwendet, die zuvor mit Molekulargewichtsstandards geeicht worden war. Für den Auftrag auf die Gelfiltrationssäule wurden die BiP und Grp170 enthaltenden Elutionsfraktionen der ATP- Agarose Säule vereinigt und mittels CentriconTM- Konzentratoren auf ein Volumen von 500 µl gebracht. Nach der Elution von der Gelfiltrationssäule wurden Aliquots der Elutionsfraktionen mit Aceton und Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert.

BiP cofraktionierte mit Grp170 in den Fraktionen nach 200 Sekunden. Ab den Fraktionen zwischen 400 und 500 Sekunden eluierte hauptsächlich BiP. In den letzten Fraktionen nach 550 Sekunde war die 50 kDa Bande erkennbar. Die BiP enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von CentriprepTM und MicroconTM- Konzentratoren konzentriert. Die Konzentration, die über eine BSA- Reihe bestimmt wurde, lag bei 0,67 mg/ml. Insgesamt konnten 0,54 µg isoliert werden. Mit dem so isolierten BiP wurden dann mit der AFFF- und MALS- Technik der Oligomerisierungsgrad und der hydrodynamische Radius bestimmt.

A)



B)



Faktionen nach 200 400 450 500 550 600 650 700 Sekunden

Abbildung 35: Gelfiltration eines Grp170/BiP-Proteingemisches in Abwesenheit von ATP zur Isolierung von BiP. A) Elutionsprofil (OD_{280}) der Gelfiltration. Das verwendete Proteingemisch stammte aus einer ATP- Agarose Chromatographie von solubilisierten Hundepankreas-mikrosomen. Mehrere Grp170 und BiP enthaltende Elutionsfraktionen der ATP- Agarose Säule wurden vereinigt, mit Centri-con™-Konzentratoren auf ein Volumen von ca. 500 μ l gebracht und auf eine geeichte Superose 6- Gelfiltrationssäule (100 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Gelfiltration wurde an einer Äkta Explorer 100- Anlage mit CCP400 (siehe Abschnitt 4.2.22) als Laufpuffer durchgeführt. B) Von den gesammelten Fraktionen wurden jeweils 100 μ l Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Coomassie- Färbung analysiert.

Bei der Isolierung von BiP und Grp170 kann man feststellen, dass ein starker Verlust bei den ersten Arbeitsschritten (Solubilisierung und ATP- Agarose- Chromatographie) auftraten, sodass ca. 288 µg BiP und 23 µg des eingesetzten Ausgangsmaterials von Grp170 isoliert werden konnte. Um freies BiP zu erhalten, wurde im Anschluss an die ATP- Agarose- Chromatographie eine Gelfiltration durchgeführt, was zu einem weiteren Verlust an BiP führte. Nach der Gelfiltration konnten noch 54 µg an BiP wiedergefunden werden.

Tabelle 16: Vergleich der erzielten Ausbeute von BiP und Grp170 aus RM

	BiP (mg)	Grp170 (mg)
RM	11,7	2,25
nach ATP- Agarose- Chromatographie	0,288	0,023
nach Gelfiltration	0,054	-----

5.3.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens von BiP und Grp170

In einer früheren Arbeit (179) konnte nachgewiesen werden, dass Grp170 als Dimer und BiP als Monomer nach Auftrag auf eine Gelfiltrationssäule in Anwesenheit von ATP eluierten. In Abwesenheit von ATP lagen die beiden Proteine jedoch als Komplex vor. Da die Gelfiltration nur eine indirekte Messung der molaren Masse einer Probe zulässt, stellte sich die Frage, ob sich die gleichen Ergebnisse mit der Methode der Asymmetrische Feldflussfraktionierung (AFFF) in Kombination mit der direkten Bestimmung der molaren Masse mittels „Multi Angle Light Scattering“ (MALS) erzielen lassen. Wenn Grp170 keinen Komplex mit BiP bildet, können die beiden Proteine aufgrund ihres Größenunterschiedes (BiP: 78 kDa, Grp170: 150 kDa) durch den AFFF- Kanal voneinander getrennt werden. Es ist bekannt, dass das Bindungsverhalten von BiP von seinem Nukleotidstatus abhängig ist. Deshalb wurden AFFF- Kanal- Messungen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von ATP durchgeführt. Während der Elution aus dem AFFF- Kanal wurden 500 µl Elutionsfraktionen gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert. Mit der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt) wurde die molare Masse der Elutionspeaks berechnet. In Abwesenheit von ATP eluierte das Proteingemisch aus Grp170 und BiP in zwei von einander getrennten „Peaks“, wobei der erste „Peak“ (11. bis 14. Minute) ein höheres Elutionsmaximum aufwies als der zweite „Peak“ (14.

bis 17. Minute). Die von der ASTRA- Software berechnete molare Masse des ersten „Peaks“ betrug 76,17 kDa, was dem theoretischen monomeren Molekulargewicht von BiP entspricht. Die molare Masse für den zweiten „Peak“ ergab 211,4 kDa, was der Summe der Molekulargewichte beider Proteine entspricht und auf eine Interaktion hindeutet. Die gute Trennung der beiden „Peaks“ durch die Trennkraft des AFFF- Kanals spiegelte sich auch nach der Analyse der SDS- PAGE wieder (Abbildung 36). Die Elutionspeaks der AFFF- und MALS Messung stimmten sehr gut mit den „Peaks“ der SDS- PAGE überein. Die beiden Proteine eluierten wie bei der AFFF- und MALS- Messung in dem Zeitraum zwischen der 11. und 14. Minute bzw. zwischen der 14. und 17. Minute. Daraus folgt, dass im „Peak“ mit der Masse von 211 kDa tatsächlich ein Komplex aus beiden Proteinen vorlag.

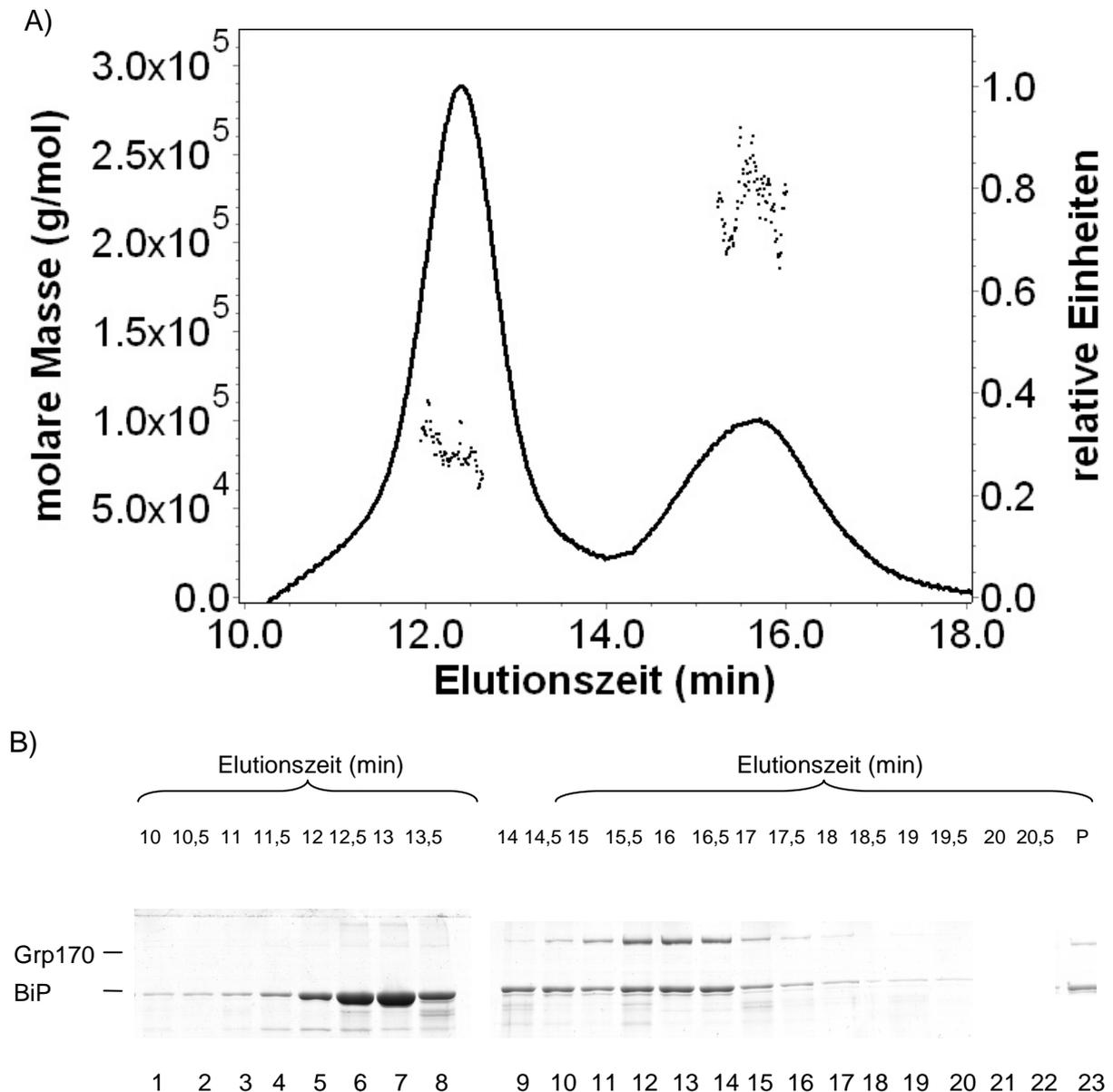
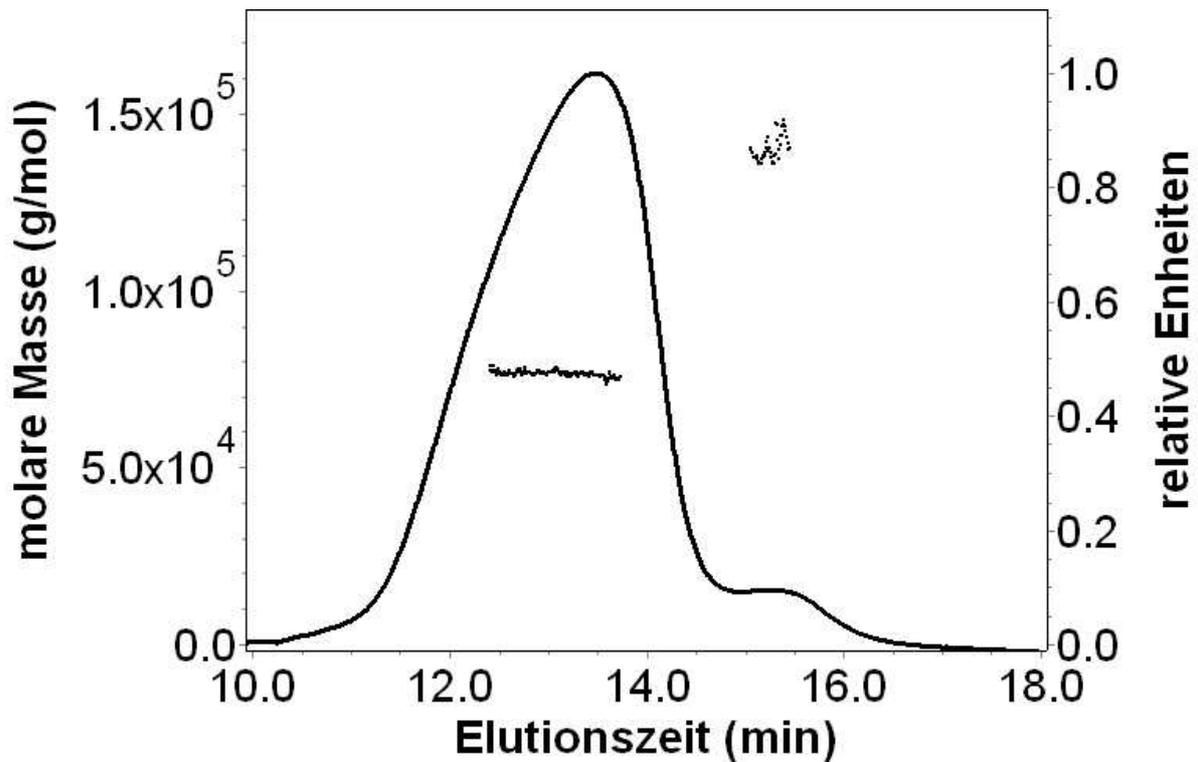


Abbildung 36: Bestimmung der molaren Masse von BiP und Grp170 in Abwesenheit von ATP (die durchgehende Linie zeigt das RI- Signal, die Punkte die zugehörigen Molmassen). A) Injiziert wurden 45 µg BiP und 9 µg Grp170 in einen AFFF- Kanal mit einer 10 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 3 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die zeitliche Darstellung des RI- Signals während der Elution bezieht sich auf die sekundäre Y- Achse (rechts), die molare Masse von BiP und Grp170 auf die primäre Y- Achse (schwarze Punkte). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt). Die ermittelte molare Masse für den ersten „Peak“ lag bei 76,17 kDa und für den zweiten „Peak“ bei 211,4 kDa. B) Während der Elution wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Coomassie- Färbung analysiert. P = injizierte Probe

In Anwesenheit von ATP eluierte BiP über einen sehr großen Zeitraum (Abbildung 37, Minute 11 bis 14,5). Die ermittelte molare Masse lag bei 75,14 kDa, was der molaren Masse von einem monomeren BiP entspricht. Eine gute Trennung von Grp170 und BiP wurde nicht erreicht. Die Elution von Grp170 erstreckte sich von Minute 15 bis 16,5, die ermittelte molare Masse lag bei 129 kDa. Diese molare Masse stimmte nicht exakt mit seinem tatsächlichen Molekulargewicht von 150 kDa überein. Da in der Messung mit ATP ein extremer Überschuss von BiP in der Probe vorhanden war, kam es bei der Elution zu einer Vermischung der beiden Proben (Abbildung 37 B), die die molare Masse des zweiten „Peaks“ verfälschte. Zusammenfassend kann man erstens daraus schließen, dass Grp170 in Abwesenheit von ATP mit BiP assoziiert vorliegt und zweitens, dass Grp170 in Anwesenheit von ATP nicht mit BiP interagiert, sondern als Monomer vorliegt.

A)



B)

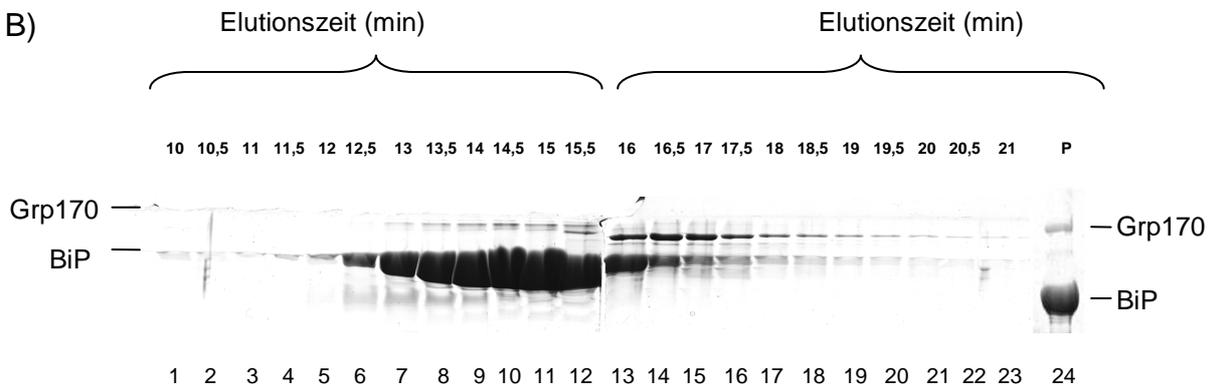
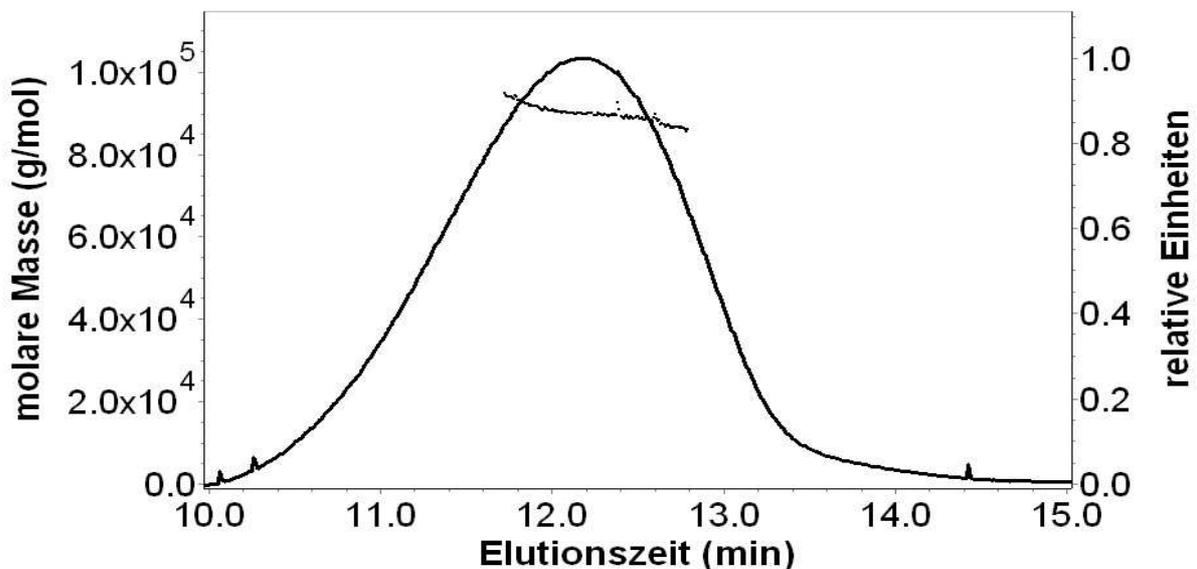


Abbildung 37: Bestimmung der molaren Masse von BiP und Grp170 in Anwesenheit von ATP (die durchgehende Linie zeigt das RI- Signal, die Punkte die zugehörigen Molmassen). A) Injiziert wurden 288 μg BiP und 15 μg Grp170 in einen AFFF- Kanal mit einer 10 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 μm „Spacer“. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 3 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die zeitliche Darstellung des RI- Signals während der Elution bezieht sich auf sekundäre Y- Achse (rechts), die molare Masse von BiP und Grp170 auf die primäre Y- Achse (schwarze Punkte). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt). Die ermittelte molare Masse für den ersten „Peak“ lag bei 75,14 kDa und für den zweiten „Peak“ bei 129 kDa. B) Während der Elution wurden Fraktionen à 500 μl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS-PAGE und Coomassie- Färbung analysiert. P = injizierte Probe

5.3.3 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades und des hydrodynamischen Radius des Hsp70- Chaperons BiP

Für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min, für die Bestimmung des hydrodynamischen Radius mit einem „channel flow“ von 0,8 ml/ min und einem „cross flow“ von 0,6 ml/ min eluiert. Während der Elution wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western- Blot. Im Elutionszeitraum konnte BiP nachgewiesen werden. BiP eluierte zwischen der 11. und 15. Minute. Die ermittelte molare Masse lag bei 70,88 kDa und der hydrodynamische Radius bei 2,7 nm ($\pm 0,1\text{nm}$). Die gemessene molare Masse von 70,88 kDa entspricht der molaren Masse eines Monomers.

A)



B)

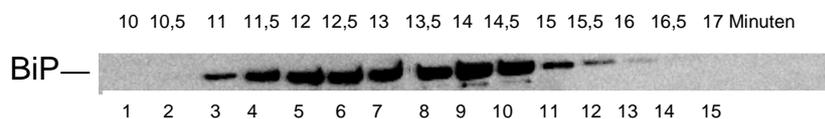


Abbildung 38: Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des Hsp70- Chaperons BiP (die durchgehende Linie zeigt das RI- Signal, die Punkte die zugehörigen Molmassen). Vor der Messung wurde die Probe zentrifugiert (2°C, 30 min, TLA100.3-Rotor, 6 8 000 rpm). Injiziert wurden 23,45 µg BiP in einen AFFF- Kanal mit einer 5 kDa reg. Zellulosemembran und einem 350 µm „Spacer“. Eluiert wurde mit einem „channel flow“ von 1 ml/ min und einem „cross flow“ von 2 ml/ min. Für den Laufpuffer galt die in Tabelle 12 angegebene Zusammensetzung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ASTRA Software (Version 5.3.2.16, Fa. Wyatt). Die molare Masse wurde mit 70,88 kDa bestimmt. B) Während der Elution wurden Fraktionen à 500 µl gesammelt, mit Aceton/ Methanol gefällt und mittels SDS- PAGE und Western- Blot analysiert. Für die immunologische Detektion wurden die PVDF Membranen mit dem primären Antikörpern gegen BiP, gefolgt von dem sekundären Antikörper „Anti Rabbit POD“ inkubiert.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der Ribosomen und ihrer Untereinheiten

Ribosomen wurden erstmals 1955 von George E. Palade beschrieben (6). Die Ribosomen bestehen zu 60 % aus RNA und 40 % aus Proteinen (180). Um die Ribosomen weiter zu charakterisieren, sollten die Ribosomen mit Puromycin und Kaliumacetat vorbehandelt werden und die ribosomalen Untereinheiten voneinander getrennt werden. Die Behandlung der Ribosomen mit Puromycin und Kaliumacetat diente dazu, naszierende Ketten und Proteinen von den Ribosomen freizusetzen (167). Gereinigte Ribosomen haben ein Verhältnis $A_{260/280}$ zwischen 1,7 und 2 (168-170), während ein niedrigerer Wert auf Verunreinigungen hindeutet (172). Eine erfolgreiche Behandlung müsste sich an einer Änderung des $A_{260/280}$ Wertes zeigen. Der $A_{260/280}$ Wert stieg von 1,73 vor Puromycin/Kaliumacetat Behandlung auf 1,98 nach Puromycin/Kaliumacetat Behandlung. Da der $A_{260/280}$ Wert auf 1,98 stieg, kann davon ausgegangen werden, dass die Ribosomen von Verunreinigungen befreit wurden. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, war die Trennung der Ribosomen in ihre Untereinheiten nach dem zweiten Gradienten prinzipiell erfolgreich. Die Ribosomen und ihre Untereinheiten konnten daher im Anschluss mit verschiedenen Methoden näher charakterisiert werden. Eine Charakterisierung der Größe und der molaren Masse geschah mit Hilfe der Asymmetrischen Feldflussfraktionierung (AFFF) in Kombination mit der Mehrwinkellichtstreuung (MALS) und der quasielastischen Lichtstreuung (QUELS). Mittels der AFFF kann man Proteingemische entsprechend der Größe, Masse, Dichte, Ladung oder des Diffusionskoeffizienten trennen (147). Der AFFF-Kanal wurde 1996 erstmals von Tank beschrieben (148). Im Gegensatz zur Gelfiltration (SEC) eluieren hier die kleinen Proteine vor den Großen. Sehr große Partikel werden nach dem Prinzip der sterischen Elution aufgetrennt (149,150). In diesem Fall sind die Partikel so groß, dass sie infolge des Querflusses auf der Membran aufliegen. Je größer ein Partikel ist, desto weiter ragt es in das Kanalinnere und ist deshalb einer schnelleren Strömung ausgesetzt. Hierdurch eluieren die größeren Partikel zuerst, die Reihenfolge der Trennung ist hier also invers. Bei den beiden Methoden (AFFF und SEC) werden die Proteine nach ihrem Stokes-Radius ge-

trennt. Bei der Gelfiltration müssen die Proteine durch ein quervernetztes Polymer wandern, was bei der AFFF nicht der Fall ist. Hier wird die Trennung durch den hydrodynamischen Fluss erreicht. Eine sterische Elution wurde im Rahmen dieser Arbeit beim Vergleich der Maxima der RI- Signale der 80S Ribosomen und der großen ribosomalen Untereinheit beobachtet. Die Messungen mit Ribosomen zeigten einen Maximalen Ausschlag des RI- Signals nach 17 Minuten, die der großen ribosomale Untereinheit nach 18 Minuten. In früheren Arbeiten wurde der hydrodynamische Radius für die 16S und 23S rRNA von *E. coli* bestimmt. Es werden für die 16S rRNA Werte von 9 bis 11,5 nm (181-183) und für die 23S rRNA von 10,6 bis 16,4 nm angegeben, je nachdem, welche Pufferbedingungen gewählt wurden (184,185). Werte für die kleine ribosomale Untereinheit werden von 8,1 bis 11 nm und für die Große von 9,8 bis 11,5 nm angegeben (181,182,186-188). Für die 70S *E. coli* Ribosomen fehlen die Werte. Gemessene Werte für die 80S Ribosomen und seiner Untereinheiten sind jedoch nur für *Artemia* sp. (Crustacea) zu finden. Nieuwenhuysen und Clauwaert bestimmten den hydrodynamischen Radius für die kleine Untereinheit mit 11,9 nm, die große Untereinheit mit 13,3 nm und die 80S Ribosomen mit 15,2 nm (171). Werte für Ribosomen der Vertebrata sind bisher jedoch noch nicht bekannt. Die hier bestimmten Werte für die caninen Ribosomen stimmen mit 18,25 (80S Ribosom), 14,45 nm (große Untereinheit) und 7,54 nm (kleine Untereinheit) recht gut mit den Werten der *Artemia* Ribosomen überein. Zwar liegen die hier gemessene Werte leicht über den in der Literatur angegebenen Werten, allerdings kann dies durch die veränderten Pufferbedingen leicht erklärt werde. Dies zeigt sich auch bei den Angaben der rRNAs, bei denen je nach Puffer Abweichungen bis zu 6 nm angegeben werden (189). Eine ähnlich gute Übereinstimmung kann man für die molare Masse der Ribosomen feststellen. Nieuwenhuysen and Clauwaert geben eine molare Masse der Ribosomen und den Untereinheiten von 3,8, 2,4 und 1,4 MDa an (171). Die Messungen dieser Arbeit kamen zu molaren Massen von 3,6, 2,5 und 1,4 MDa. Die hier vorliegenden Ergebnisse der molaren Masse sind über eine direkte Messmethode zustande gekommen, während die Literaturwerte indirekt über die Bestimmung verschiedener Parameter, z.B. den Sedimentationkoeffizienten und dem Diffusionkoeffizienten, erfolgte (171). In Abschnitt 5.1.2 wurde gezeigt, dass die ribosomalen Untereinheiten nur mit Hilfe der Trennkraft des hydrodynamischen Flusses im AFFF- Kanal und in Kombination der Hochsalzbedingungen (1M KCl) zu trennen

sind. Dies ist eine neue schonende Methode zur Trennung und anschließenden Isolierung der ribosomalen Untereinheiten.

6.2 Isolierung des Sec61- Komplexes

Periphere Membranproteine sind über ionische Wechselwirkungen oder Wasserstoff-Brücken an die Membran gebunden und lassen sich schon durch eine Veränderung des pH-Wertes, des Puffers oder durch Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen ablösen. Integrale Membranproteine können durch Zugabe eines Detergenz (z.B. Digitonin, Chaps) aus ihrer Wechselwirkung mit den Membranlipiden gelöst werden. Ein Detergenz muss dabei drei Bedingungen erfüllen. Dazu gehört das Abtrennen des gewünschten Proteins von allen anderen Membranbestandteilen, das Protein darf nicht denaturieren und sich nach der Aufreinigung gegebenenfalls auch leicht wieder entfernen/ austauschen lassen. Diese Bedingungen werden von milderen Detergenzien wie z.B. Natriumcholat oder Octylglucosid erfüllt, während sich das häufig angewendete Detergenz SDS nur schwer wieder entfernen lässt und Proteine auch denaturiert. Um die Membranproteine aus den rauen Mikrosomen zu solubilisieren wurde in dieser Arbeit das Detergenz Digitonin verwendet. Digitonin wurde aus zwei Gründen für die Isolierung verwendet. Erstens hat es sich bei der Isolierung des funktionalen Sec61- Komplexes bewährt (42) und zweitens musste ein Detergenz verwendet werden, das für eine Messung mit der MALS- Technik geeignet ist. Digitonin stellte sich vor allem für die Messung mittels der MALS- Technik als geeignet heraus, da es im UV- Detektorsignal kaum absorbiert, aber die Mizellen dennoch im RI- Detektor zu messen sind. Das sind zwei Grundvoraussetzungen, um ein Membranprotein mit dieser Technik vermessen zu können. Man kann festhalten, dass eine Isolierung nach Görlich und Rapoport (42) prinzipiell funktioniert hat, allerdings die Proteinausbeute von 15 bis 30 % weder über die Immunaффinitätschromatographie, noch über die Ionenaustauschchromatographie erreicht werden konnte. In dieser Arbeit konnte 0,006 µg (Immunaффinitätschromatographie) bzw. 0,003 µg (Ionenaustauschchromatographie) des Proteins gefunden werden. Auch lagen die Fraktionen nie so sauber vor, wie bei Görlich und Rapoport (42) gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nur einmal, den Sec61- Komplex in einer hohen Konzentration zu isolieren, um ihn mittels der Mehrwinkellichtstreutechnik zu vermessen. Unglücklicherweise

adsorbierte das Protein entweder an die Membran des AFFF- Kanals, oder das Digitonin der Probe fiel aus. Das Ausfallen des Digitonins kann auch als Ursache der hohen Verluste während der Präparationen angesehen werden. Es ist vorstellbar, dass der Teil der Proteine, der sich in den Digitoninmizellen befindet zusammen mit dem Digitonin ausfällt und es so zu hohen Verlusten kommt. Digitonin tendiert besonders im Kalten dazu, aus der Lösung auszufallen. Da die Isolierung fast vollständig bei 4°C erfolgte, gab es immer wieder Probleme mit dem ausgefallenen Digitonin. Dies machte sich beispielsweise bei dem Probenauftrag auf die S- Sepharose Säule bemerkbar, bei der das ausgefallene Digitonin auf dem Säulenmaterial auflag. Es kam zu einem Abdichten der Säule und der Auftrag konnte die Säule folglich nicht durchlaufen. Auch hat sich herausgestellt, dass das Säulenmaterial an sich das Protein stark adsorbiert. Die Isolierung bedarf somit weiterer Optimierungsschritte, um die hohen Verluste reduzieren zu können. Dies gilt insbesondere für die Solubilisierung der RM und die Lösung des Digitonins. Nur dann ist es möglich, den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes mit Hilfe der hier gewählten Methode aufzuklären.

6.3 Charakterisierung von Digitonin

Um die molare Masse eines Membranproteins mit Hilfe der Mehrwinkellichtstreuung bestimmen zu können, müssen einige Parameter bekannt sein. Hierzu gehört sowohl der dn/dc - Wert des Proteins, als auch der des eingesetzten Detergenz. Außerdem muss die minimale Konzentration bekannt sein, bei der Detergenzmizellen messbar sind. Dies stellt sicher, dass das Detergenz nicht unter die kritischen Mizellenkonzentration (CMC oder critical micell concentration) kommt und somit das Membranprotein von Detergenzmolekülen umschlossen bleibt. Dies ist nötig, da Membranproteine nur in Anwesenheit von Mizellen löslich sind. Mit der Kombination aus Lichtstreu-, RI- und UV- Detektor kann man die molare Masse des Kernproteins, der Mizellen und des Detergenz/Proteinkomplexes bestimmen. Mit Hilfe der in Abschnitt 4.2.31 gezeigten Formel berechnet die ASTRA- Software die molare Masse. In diese Formel geht unter anderem der dn/dc - Wert ein. Hier kann es über die dn/dc - Werte des Proteins und des Detergenz zu großen Fehlern in der Analyse mittels Mehrwinkellichtstreuung kommen, da der dn/dc -Wert quadratisch in die Gleichung eingeht. Dies zeigt, warum eine korrekte Bestimmung des dn/dc - Werts für

das Protein und das Detergenz wichtig ist. Der dn/dc -Wert von Digitonin wurde in dieser Arbeit mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Einmal mit Hilfe des Batch-Verfahrens, und einmal, indem eine genau festgelegte Menge an Digitonin in einen AFFF-Kanal injiziert wurde und anschließend mittels des Signals des RI-Detektors und unter Verwendung der ASTRA-Software bestimmt wurde. Der Berechnung durch die ASTRA-Software wird die Annahme zugrunde gelegt, dass das Digitonin zu 100% aus dem Kanal eluiert und somit nichts im System verloren geht. Beim Vergleich der beiden Ergebnisse stellte sich heraus, dass sich der dn/dc -Wert je nach Methode um den Faktor 10 unterscheidet (Batch-Verfahren = 0,153, AFFF = 0,013). Vergleicht man die dn/dc -Werte mit denen andere Detergenzien, ist feststellbar, dass der mittels Batch-Verfahren bestimmte Wert in deren Bereich liegt. So werden die dn/dc -Werte für C12E9, LDAO, FOS-14 und DDM wie folgt angegeben: C12E9 = 0,109, LDAO = 0,148, FOS-14 = 0,133 und DDM = 0,133 (190). Für das Peptid CNY21 geben Ringstad et al einen dn/dc -Wert von 0.154 an (191). Somit ist davon auszugehen, dass während der Messung mit dem AFFF-Kanal in Kombination des RI-Detektors ein gewisser Teil des Digitonins verloren ging und somit die Berechnungsgrundlage (100% Wiederfindung des Digitonins) dieser Methode nicht gegeben ist. Da alle gefundenen dn/dc -Werte zwischen 0,1 und 0,16 liegen, muss der korrekte Wert der des Batch-Verfahrens sein.

Wie oben schon erwähnt, ist es für die Löslichkeit der Membranproteine von größter Wichtigkeit, dass die Konzentration des Detergenz während einer Messung mittels AFFF nicht unter die CMC sinkt. Dies kann geschehen, da im Laufpuffer kein Detergenz enthalten ist. Das in der Probe enthaltene Detergenz wird während einer Messung durch den Laufpuffer verdünnt, so dass das Detergenz unter die CMC fallen kann. Aus diesem Grund wurde getestet, wie viel Digitonin in der zu messenden Probe vorhanden sein muss, dass eine Detektion der Mizellen noch möglich ist. Gleiches gilt auch für den Fall, dass man anstelle eines Detergenz Lipidmizellen verwenden will. Die minimale Menge, die benötigt wurde, um Mizellen des Digitonins zu messen, betrug 132 μg Digitonin in 30 μl . Wenn man ein, in Digitoninpuffer gelöstes Membranprotein, vermessen will, muss somit mindestens 132 μg Digitonin pro 30 μl (= 4,4 mg/ml = 0,44 %) vorhanden sein. Als Ergebnis einer Messung bekommt man im Elutionsprofil einen Peak, der sowohl den Proteinanteil, als auch den Detergenzanteil beinhaltet. Durch die Astra-Software (Proteinkonjugat Analyse) wird dann die molare Masse des Detergenz aus der gesamten molaren Masse des Peaks heraus

gerechnet, so dass man die molare Masse des Proteins und des Protein- Mizellen Komplexes erhält. Diese Methode wurde zum Beispiel bei der Bestimmung eines Membranproteins in Lipidmizellen angewendet (192), um den Oligomerisierungsgrad des Proteins zu bestimmen (siehe Abbildung 39). Nachdem der dn/dc - Wert und die minimale Menge des Digitonins für das System aus AFFF, MALS, UV und RI bekannt sind, sind die Grundvoraussetzungen einer Messung von Membranproteinen in einem Digitoninpuffer bekannt. Eine Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des isolierten Sec61- Komplexes ist mit den nun bekannten Größen möglich.

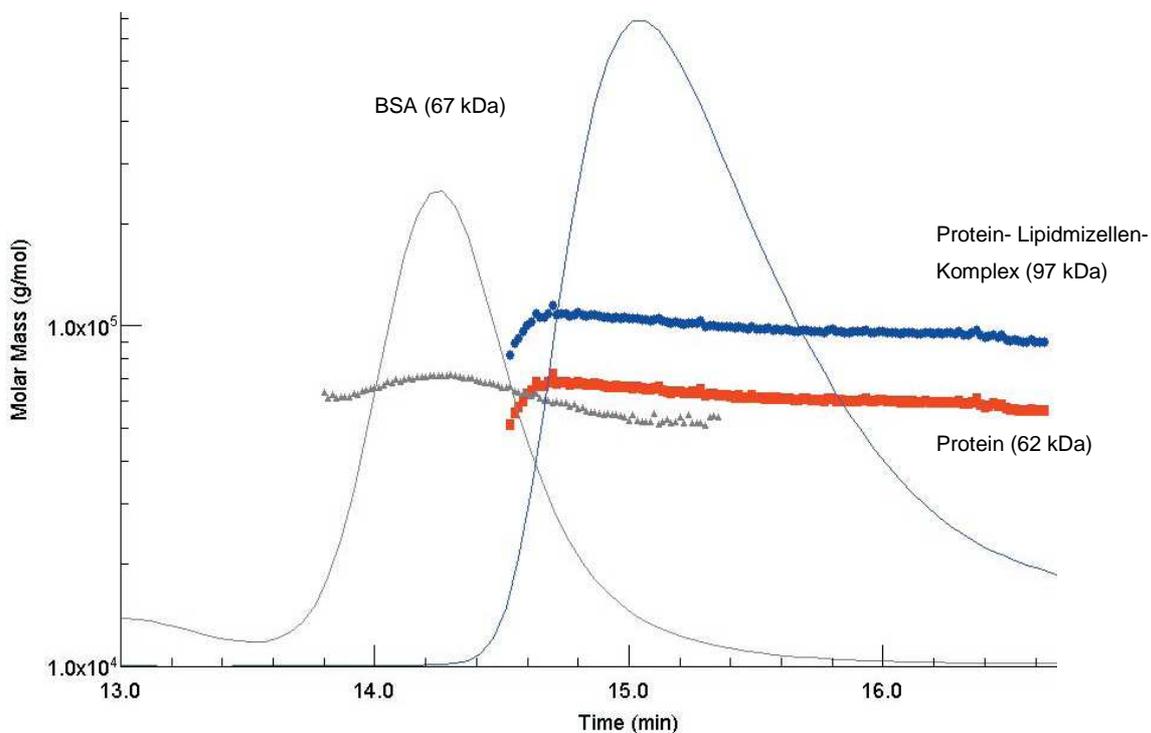


Abbildung 39: Die Daten für die Analyse eines Membranproteins (blaue Kurve) stammen von einem Lichtstreu-, UV-, und RI- Detektor. Gezeigt wird die molare Masse des Membranproteins (62 kDa, rote Linie) und des Protein- Lipidmizellen- Komplexes (97 kDa, blaue Linie). Als Vergleich ist eine BSA-Messung (67 kDa, graue Kurve) in das Elutionsdiagramm eingetragen (Quelle: Wyatt (192)).

6.4 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des heterotrimeren Sec61- Komplexes

Die Rahmenbedingungen für eine Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des heterotrimeren Sec61- Komplexes waren durch die Bestimmung des dn/dc - Wertes und der minimalen einzusetzenden Menge des Digitonins gegeben. Bei der an die Vorversuche anschließende Auswertung der Messung über die Proteinkonjugatana-

lyse wurde festgestellt, dass der Proteinanteil am Signal des Lichtstreuendetektors (90° Winkel) bei 0,17 % lag. Für eine gute Auswertbarkeit wäre nach Angaben des Herstellers ein Proteinanteil von fünf bis zehn Prozent nötig. Da die bestimmte molare Masse von 55,9 kDa in etwa in der Größenordnung der durchschnittlichen molaren Masse der Digitoninmizellen liegt (nach Angabe von Sigma- Aldrich: 70 kDa), wurde in der in Abbildung 26 gezeigten Messung nur Digitoninmizellen gemessen. Dass die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades prinzipiell mit Hilfe der Kombination eines Systems aus MALS-, UV- und RI- Detektoren möglich ist, zeigt das Beispiel eines Membranproteins (vgl. Abbildung 39). Diese Messung wurde im Rahmen eines Applikationsprojektes von Wyatt Technology Corporation in Santa Barbara durchgeführt. Eine weitere erfolgreiche Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von Membranproteinen wurde für das α -HL Heptamer von *Staphylococcus aureus* und Maltoporin von *E. coli* gezeigt (193). Allerdings wurde in beiden Fällen eine SEC vorgeschaltet. Hier sollte anstelle der SEC die AFFF- Trennmethode verwendet werden. Diese Methode ermöglicht eine Trennung, ohne dass die zu untersuchende Probe durch ein quervernetztes Polymer wandern muss. Die gesamte Separation im AFFF- Kanal ist sanft, schnell und ohne einer stationären Phase, die die Probe verändern oder degradieren kann (194). Das Problem, das bei dem Versuch auftrat, den gereinigten Sec61- Komplex mit der Methode der AFFF und MALS zu vermessen, war, dass das Protein mit der Membran des AFFF- Kanals interagierte. Dadurch kam es zu keiner Elution und auch zu keinem Signal (vgl. Abbildung 26). Eine sehr starke Adsorption fand statt, obwohl die als am besten geeignete Membran (reg. Zellulose) verwendet wurde. Um die besten Versuchsbedingungen herauszufinden, unter denen der Sec61- Komplex nicht, oder möglichst wenig mit der Membran interagiert (siehe Abschnitt 5.2.5) wurden die verschiedenen Membrantypen (Triacetat Zellulose, Polyethersulfon und reg. Zellulose) einmal mit Digitoninpuffer und einmal mit Puffer ohne Digitonin vorinkubiert. Es zeigte sich, dass unabhängig vom Material, der Sec61- Komplex mit der AFFF- Membran interagierte. Jedoch scheint die Bindung des Proteins nach vorangegangener Inkubation mit Digitoninpuffer einen positiven Effekt zu haben. Als am besten geeignet stellte sich dabei neben der reg. Zellulose noch die Membran aus Polyethersulfon heraus. Einen Hinweis darauf, dass sich die Membranen mit Digitonin und Protein absättigen lässt, lieferte die Tatsache, dass der Sec61- Komplex erst nach mehrmaliger Injektion in den AFFF- Kanal in den Eluaten gefunden werden konnte. Bei der einzigen erfolgreichen Probenelution war jedoch

das Digitonin ausgefallen. Dies hatte zur Folge, dass der Lichtstredetektor bis zum oberen Bereich des Signals ausschlug (vgl. Abbildung 27). Leider gelang es im Anschluss an die fehlgeschlagenen Versuche nicht mehr, genügend Protein für eine erneute Messung zu isolieren. Sowohl die hier gezeigten Versuche, ein Membranprotein mittels der kombinierten AFFF/MALS- Technik zu vermessen, als auch Versuche mit den beiden rekombinanten Proteinen SecYEG und ERj1 (Daten nicht gezeigt) haben gezeigt, dass die Membran des AFFF- Kanals die Membranproteine stark adsorbierte.

Alternativ zu der hier verwendeten Strategie könnte man den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes auch mit anderen Methoden bestimmen. Hierzu stehen verschiedene, auf Fluoreszenz basierende Methoden zu Verfügung. Hierzu zählen beispielsweise die Methoden des **F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer (FRET) oder **F**luorescence **I**ntensity **D**istribution **A**nalysis (FIDA). Bei der FIDA- Messung wird die spezifische Helligkeit der einzelnen fluoreszierenden Proteine genutzt. Wenn jedes Monomer spezifisch mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, dann hat jedes Oligomer x - mal die Helligkeit der Helligkeit der Anzahl der Monomere pro Oligomer. Für Interaktionsstudien könnte zudem noch die Methode der **F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching (FRAP) angewendet werden. Bei der FRAP- Technik wird eine kleine Region mit einem starkem Laserstrahl irreversibel ausgebleicht. Die nicht ausgebleichten fluoreszierenden Moleküle können im Anschluss an die Behandlung mit dem Laserstrahl in die ausgebleichte Region zurückdiffundieren und mit einem schwachen Laser detektiert werden (195-197). FRET ist ein 1946 von Förster (198) entdeckter physikalischer Prozess, bei dem Energie eines angeregten Fluoreszenzfarbstoffs (Donor-Fluorophor) auf einen zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor-Fluorophor) übertragen werden kann. Die Energie eines angeregten Donor-Fluorophors wird auf einen fluoreszierenden Akzeptor übertragen. FRET kann über eine Abnahme der Donor-Fluoreszenz oder eine Zunahme der Akzeptorfluoreszenz detektiert werden. Die Funktionalität eines FRET im Falle von Membranproteinen wurde beispielsweise mit den Proteinen Sec61 α und Sec61 β von Snapp nachgewiesen (199). Eine Übersicht über die verschiedenen Applikationen von auf Fluoreszenz basierenden Methoden gibt Lippincott-Schwarz (196). Eine weitere Methode zur Bestimmung der Oligomerisierung ist die BN-PAGE (**B**lue **N**ative **P**olyacrylamid **G**el **E**lektrophorese), die schon erfolgreich bei Membranproteinen angewendet wurde (200). BN-PAGE ist eine Trennmethode mit einer höheren Auflösung als SEC oder

eine Sucrose Dichtezentrifugation, die für die Analyse von abundanten und stabilen Multiproteinkomplexen von 10 kDa bis 10 MD genutzt werden kann (201). Im Gegensatz zur Immunopräzipitation und dem zwei-hybrid System erlaubt die BN-PAGE eine Bestimmung der Masse, die relative Abundanz und die Zusammensetzung eines Multiproteinkomplexes (201). Die analytische Ultrazentrifugation ist eine der klassischen Techniken der Makromolekülforschung. Die Theorie der analytischen Ultrazentrifugation geht auf Svedberg und Yphantis zurück und konnte für die Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen übernommen werden (202,203). Mit ihr war es ebenfalls möglich die Molmasse vieler Proteine, Nukleinsäuren und supramolekularer Aggregate zu bestimmen. Zur Detektion werden Eigenschaften wie die Absorption (UV- Detektor) oder Brechungsindex verwendet, die eine Sensitivität von 50 µg/ml haben (204). Eine Weiterentwicklung dieser Methode besteht darin, die analytischen Ultrazentrifugation mit der Fluoreszenzdetektion zu verknüpfen, so dass die Sensitivität erhöht werden konnte. Die Analyse des Oligomerisierungsverhaltens eines Proteins gehört zu einer der Standardanwendungen der analytischen Ultrazentrifugation (204). Die Dichtegradientenzentrifugation, die ebenfalls zu den physikalischen Trennverfahren gehört, sortiert die verschiedenen gelösten Makromoleküle durch die starke Zentrifugalkraft. Die Bewegungsgeschwindigkeit hängt von der Winkelgeschwindigkeit des Rotors, dem Abstand des Maximums des Konzentrationsgradienten vom Rotorzentrum, den Moleküleigenschaften, der Dichte des Lösungsmittels und der Viskosität des Lösungsmittels ab. Weitere Möglichkeiten, das Oligomerisierungsverhalten des Sec61- Komplexes zu bestimmen bieten die Cryo- Elektronenmikroskopie und die Kristallstrukturanalyse. Eine Übersicht der Ergebnisse zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrads aus der Literatur, die mit diesen Methoden erzielt worden ist, gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Übersicht über die bisherigen Ergebnisse zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des Sec61- Komplexes

Autor	Protein	Anzahl der heterotrimeren Untereinheiten	Methode	Quelle
Beckmann	Sec61 (Hefe)	3 - 4	Cryo-Elektronenmikroskopie	Cell 2001 (77)
van den Berg/ Rapoport	SecYEG	1	Kristallstruktur	Nature 2004 (84)
Mitra	SecYEG	2	Cryo-Elektronenmikroskopie	Nature 2005 (80)
Hanein	Sec61 (Säuger)	3 - 4	Cryo-Elektronenmikroskopie	Cell 1996 (43)
Wang/ Dobberstein	Sec61 (Säuger)	1 - 2	BN- PAGE	FEBS Letters 1999 (205)
Song/ Jung	Sec61 (Säuger)	3 - 4	Dichtegradienten Zentrifugation	JCB 2000 (206)/ Jung pers. Mit.
Ménéret	Sec61 (Säuger)	3 - 4	Cryo-Elektronenmikroskopie	Molecular Cell 2000 (78)
Snapp	Sec61 (Säuger)	mind. 2	FRET	JCB 2004 (199)

Beim Vergleich der Ergebnisse aus der Literatur findet man kein einheitliches Ergebnis. Die Angaben, aus wie vielen heterotrimeren Untereinheiten die Translokationspore gebildet wird, reicht von einer heterotrimeren Sec61- Untereinheit bis zu 4 heterotrimeren Sec61- Untereinheiten. Scheuring zeigte, dass der in die Membran eingebettete SecYEG- Komplex konzentrationsabhängig in einem Gleichgewicht aus Monomeren, Dimeren und Tetrameren existiert und ein dynamischer Austausch der Untereinheiten zwischen den Oligomeren stattfindet (207). Die Bildung von Dimeren und Tetrameren in der Lipidumgebung kann dabei durch die Membraninsertion von SecA und durch die Interaktion mit den Translokationsliganden SecA, dem Preprotein und dem ATP signifikant stimuliert werden (207). Der aktive Translokationskanal könnte demnach aus mehreren SecYEG- Komplexen bestehen (207,208). Ménéret zeigte, dass ein Sec61- Heterotrimer eine naszierende Kette translozieren kann, während drei Kopien des Sec61 eine strukturelle Rolle spielten oder akzessorische Faktoren wie TRAP rekrutierten (208). Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe mit „cross-link“

Versuchen lieferten bisher Hinweise darauf, dass der aktive Translokationskanal aus drei bis vier Sec61- Heterotrimeren gebildet wird (209). Diese Unterschiede machen klar, dass die Notwendigkeit der Bestimmung des Oligomerisierungsgrades weiterhin von Interesse ist. Mit Hilfe einer direkten Messmethode, wie die Mehrwinkellichtstreuung, könnte die genaue Anzahl der heterotrimeren Sec61- Untereinheiten geklärt werden.

6.5 Interaktion zwischen Ribosom und dem Sec61- Komplex

Die Ribosomen interagieren bei der Proteinsynthese am ER mit dem Sec61- Komplex. Für eine Interaktion zwischen einem 80S Ribosom und dem Sec61- Komplex ist ein intakter COOH-Terminus des Sec61 α erforderlich. Für die Bindung wird der achte Loop des Sec61 α benötigt (206). Von der ribosomalen Seite wird die Bindung über die 28S rRNA bzw. 23S rRNA vermittelt (39). Die hier bestimmte K_D der Ribosomen zum isolierten Sec61- Komplex lag bei 2,2 nM. In der Literatur findet man dagegen einen Wert von 12 nM (39) der damit ca. 6-mal höher liegt als der in dieser Arbeit bestimmte Wert. Rolleston *et al.* bestimmten die K_D von 60S Ribosomen zu RER (rough ER) und SER (smooth ER) mit 19 nM bzw. 33 nM (210). Die Affinität zweier Interaktionspartner nimmt mit einer kleineren K_D zu. In dieser Arbeit wurde somit eine höhere Affinität der Ribosomen zum Sec61- Komplex gefunden, als es in der Literatur angegeben wird. Die Unterschiede der K_D aus der Literatur und den hier gemessenen Werten ist durch die Verwendung von verschiedenen Methoden erklärbar. Prinz *et al.* verwendete für die Bestimmung der Bindungseigenschaften der Ribosomen zum Sec61- Komplex einen Flotationsassay mit radioaktiv markierten Ribosomen. Mit dieser Methode wird die Ribosomenbindung indirekt bestimmt. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz- Spektroskopie kann man jedoch die Bindung direkt messen. Allerdings wird mit der Oberflächenplasmonresonanz- Spektroskopie ohne natürliche Membranen gemessen. Die Membranen werden hier von Digitonin im Puffer simuliert. Im Vergleich dazu ist in der Arbeit von Prinz *et al.* zwischen der Bindung mit Membranen (PK-RM) und isoliertem Sec61- Komplex verglichen worden. Dabei zeigte sich ein Unterschied der K_D von Ribosomen zu isoliertem Sec61- Komplex und Ribosom zu PK-RM. Die K_D von Ribosom zu PK-RM war mit 26 nM mehr als doppelt so hoch wie die zum isolierten

Sec61- Komplex (39). Die Frage, welche Methode als genauer einzuschätzen ist, kann hier nicht beantwortet werden, da ein direkter Vergleich der beiden Methoden mit identischem Probenmaterial nicht vorliegt. Wenn man sich aber die Unterschiede der angegebenen Werte ansieht stellt man fest, dass die Werte allein durch die An- bzw. Abwesenheit der Membran stärker schwanken (14 nM), als es bei den Werten der unterschiedlichen Messmethoden der Fall ist (10 nM).

Beim Vergleich der Affinität der Ribosomen mit anderen Interaktionspartnern, ist festzustellen, dass die K_D stark variabel ist, je nachdem, welcher Interaktionspartner betrachtet wird. Nimmt man zum Beispiel das ERj1, ist die K_D mit 3 nM bestimmt worden (J. Benedix, persönliche Mitteilung). Der C- terminale Teil des ERj1 hat dagegen eine K_D von 0,11 nM (J. Benedix, persönliche Mitteilung). Der C- terminale Teil des ERj1 ist im Cytosol lokalisiert, so dass die Ribosomen am ERj1 binden können (55). Die K_D des C- terminalen Teils des ERj1 entspricht wiederum in etwa dem des N- terminalen Teils des Sec62 (vgl. Tabelle 18). Auffällig hierbei ist, dass sowohl der C- terminale Teil des ERj1, als auch der N- terminale Teil des Sec62 eine positiv geladene Region aufweist (vgl. Abbildung 40). Die Bindung der Ribosomen am ERj1 findet, wie beim Sec61, über die 28S rRNA statt (39,211). Ein hoch basisches Oligopeptid in der cytosolischen Domäne von ERj1 ist für eine Assoziation mit dem Ribosomen ausreichend (212). Das Säuger Sec62 weist zum Hefe Protein eine hohe Sequenz- Homologie in den TM- Domänen und den flankierenden Regionen auf. In der cytosolischen N- terminalen Domäne befindet sich ein basisches Oligopeptid- Motiv (Aminosäure 4-10), das nur in dem Säuger- Protein vorkommt und dem in ERj1 sehr ähnlich ist (212). Bei der Bindung der cytosolischen N- terminalen Domäne (Sec62N) handelt es sich um eine direkte Interaktion mit den Ribosomen, die unabhängig von der C-terminalen Domäne geschieht. Die Bindung von Sec62N zu den Ribosomen ist Salz sensitiv. Die Interaktion von Sec62 mit den Ribosomen ist somit von elektrostatische Natur (212). Ein Überblick der schon getesteten Sec62 Konstrukte gibt Tabelle 18 (M. Jung, persönliche Mitteilung).

Tabelle 18: KD- Vergleich der Sec62- Konstrukte (M. Jung, persönliche Mitteilung)

Sec62- Konstrukt	K _D (nM)	Ribosomen
N- Terminus	0,13	Hochsalz
N- Terminus	0,13	Puromycin/ Hochsalz
N- Terminus	0,12	RNC
volle Länge	0,04	Hochsalz
10 -195	0,35	Hochsalz

Der Verlust des N-terminalen Peptids 1-10 bewirkte eine schwache Reduktion der Interaktion im Vergleich zu der N-terminalen cytosolischen Domäne von Sec62p mit Ribosomen. Die Interaktion des vollständigen Proteins zeigte eine höhere Affinität zu den Ribosomen, als die Proteinfragmente. Die schwächere Bindung der Fragmente könnte auf eine Konformationsänderung hindeuten, so dass die Interaktion zwischen Ribosom und Protein eingeschränkt ist. Dies würde bedeuten, dass die richtige Konformation wichtig für die Bindung der N- terminalen Domäne von Sec62 am Ribosom ist.

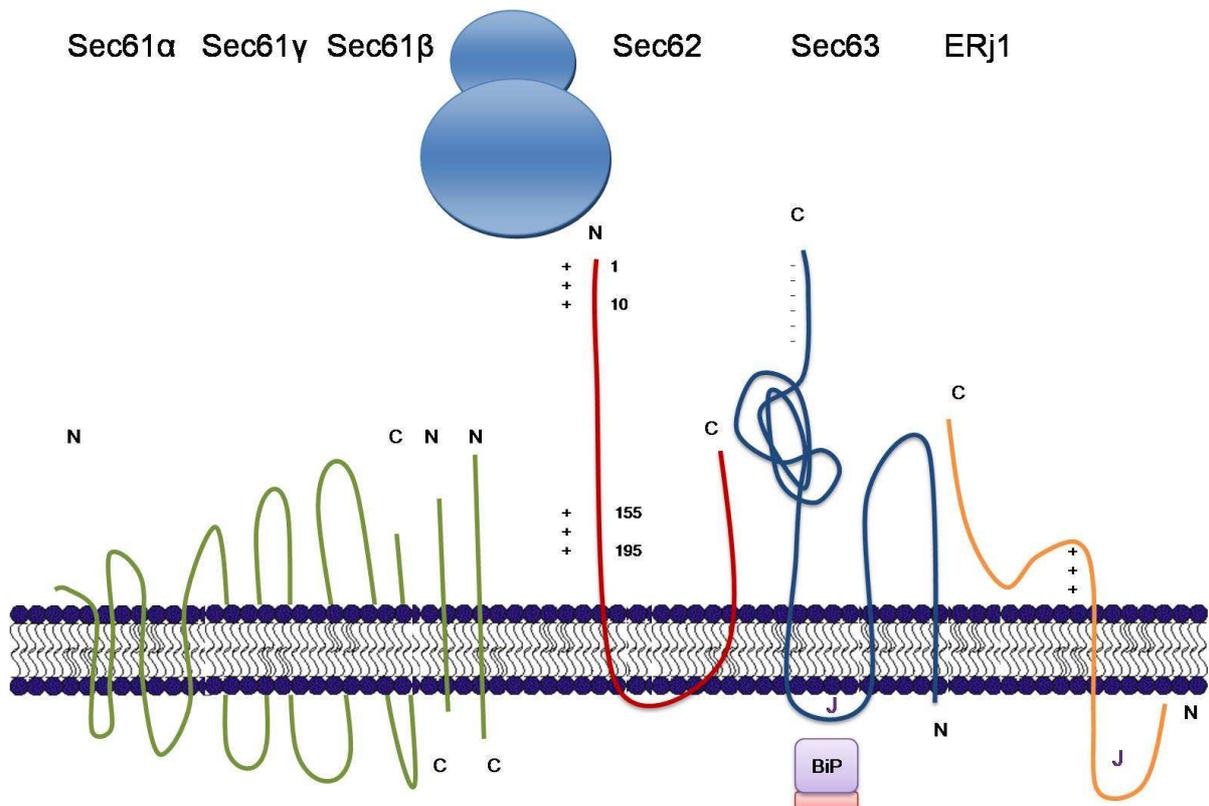


Abbildung 40: Topologische Darstellung des Sec61- Komplexes, Sec62, Sec63 und ERj1. C = C- Terminus, N = N- Terminus, J = J- Domäne

Die BIACORE- Messung der RNaseA vorbehandelten Ribosomen hatte hauptsächlich zwei Gründe: erstens sollte durch den Verdau der RNA gezeigt werden, dass es sich um eine Bindung am heterotrimeren Sec61- Komplex handelt und zweitens, ob die Bindung, wie von Prinz *et al.* beschrieben, über die ribosomale RNA stattfindet (39). Die RNasen sind Enzyme (Nukleasen), die die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysieren. Man unterscheidet dabei die Endo- und Exoribonukleasen, je nachdem ob sie die Ribonukleinsäuren intern oder extern spaltet. Die RNaseA ist eine Endonuklease. Durch den Verdau der ribosomalen RNA sollten die Ribosomen nicht mehr an den heterotrimeren Sec61- Komplex binden können. Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, findet nach einer Stunde Inkubation mit RNaseA fast keine Bindung, nach eineinhalb Stunden keine Bindung mehr statt. Um auszuschließen, dass die fehlende Bindung durch die lange Inkubation bei 30 °C hervorgerufen wurde, wurden parallel dazu mit RNaseA unbehandelte Ribosomen bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die so vorbehandelten Ribosomen wurden sowohl vor, als auch nach der RNaseA Behandlung auf ihre Bindung überprüft (siehe Abschnitt 5.2.8). In beiden Fällen konnte eine Bindung der Ribosomen gezeigt werden, so dass von funktionalen Ribosomen und aktivem Sec61- Komplex auszugehen ist. Die lange Inkubation schadete den Ribosomen nicht. Damit konnte bestätigt werden, dass die Bindung des Ribosoms in der Tat über die RNA stattfindet, wie es bei Prinz beschrieben wurde (39). Brimacombe fand heraus, dass die große rRNA einige evolutionär konservierte und stabile Loops aufweist. Gute Kandidaten für die Domänen innerhalb der großen rRNA für die Interaktion mit dem Kanal sind die Helices H5, H6, H7, H46, H50, H52, H53 und H101 (213). Es wird spekuliert, ob verschiedene dieser Regionen eine spezifische Struktur bilden können, die es bestimmten Phosphatgruppen erlaubt, mit positiv geladenen Resten der konservierten cytosolischen Loops des Sec61/SecYEG- Komplexes zu interagieren. Wie Hanein *et al.* mittels EM demonstrieren haben, können Ribosomen die Bildung des Kanals aus dem oligomeren Sec61- Komplex induzieren (43). Ob die von Prinz *et al.* (39) als evolutionär beschriebene konservative Interaktion zwischen Ribosom und Sec61- Komplex mit diesem System nachzuweisen ist, bleibt unklar. Bei ersten Versuchen, die mit Ribosomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt wurden, scheinen diese am Sec61- Komplex aus Hundepankreasribosomen zu binden. Wenn sich dies in weiteren Versuchen verifizieren lässt, dann kann von einer evolutionär konservativen Bindung ausgegangen werden.

In einem nächsten Versuch sollte die Bindungseigenschaften der ribosomalen Untereinheiten an den Sec61- Komplex untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die große ribosomale Untereinheit mit dem Sec61- Komplex interagiert (siehe Abbildung 41), wobei die Interaktion über die 28S bzw. 23S RNA vermittelt wird (11,39). Um dies zu testen, wurden die vorher getrennten ribosomalen Untereinheiten einzeln und zusammen in das BIACORE- System injiziert. Als Positivkontrolle dienten intakte Ribosomen. Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, binden nur die intakten Ribosomen (grüne Linie), während die ribosomalen Untereinheiten nicht an den Sec61- Komplex binden. Als Ursache für dieses Ergebnis sind mehrere Gründe denkbar.

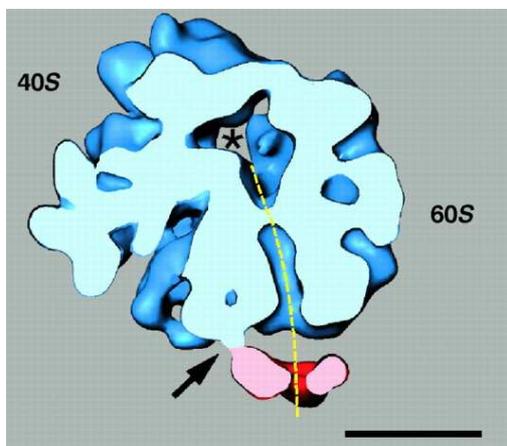


Abbildung 41: Dreidimensionale Rekonstruktion des Ribosom- Sec61 Komplexes nach Cryo- EM in einer seitlichen Ansicht, aufgeschnitten entlang der Ebene, die durch den Abschnitt der Pore des Sec61 Oligomers und des Ribosomentunnel verläuft. Der Pfeil zeigt den "Stiel", der das Ribosom mit dem Sec61 Oligomer verbindet, der Raum zwischen den beiden ribosomalen Untereinheiten ist mit einem Stern markiert. Der ribosomale Tunnel und seine Ausrichtung mit der Sec61 Pore wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Der Skalierungsbalken entspricht einer Größe von 100 Å (11).

Eine Möglichkeit, warum die ribosomalen Untereinheiten, insbesondere die große Untereinheit, nicht bindet, könnte darin begründet liegen, dass bei der Trennung die 28S RNA sich in einem inaktiven Zustand für die Interaktion mit dem Sec61- Komplex befindet. Es ist vorstellbar, dass dies durch eine Konformationsänderung der 28S RNA zustande kommt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die 28S RNA Schaden genommen hat und dadurch keine Bindung mehr möglich ist. Ob die ribosomale Untereinheit in der Tat die Aktivität verloren hat, ließe sich nur über einen Funktionalitätstest überprüfen. Hierzu würde sich beispielsweise ein „pull-down“- Versuch anbieten. „Pull-down“- Versuche, auch Bindungsversuche in Lösung genannt, dienen der *in vitro* Untersuchung von Protein/Protein- Interaktionen. Da sich

Ribosomen im Vergleich mit löslichen Proteinen gut sedimentieren lassen, können die interagierenden Proteine zusammen mit den Ribosomen im Sediment wiedergefunden werden. Im Gegensatz dazu bleiben löslichen Proteine, die nicht mit den Ribosomen interagieren in Lösung.

6.6 Die Synthese des fluoreszierende ppL86 war für weitere Untersuchungen nicht ausreichend

Das FluoroTect™ System nutzt eine modifiziert Geladene Lysin transfer RNA (tRNA) mit dem Fluorophor BODIPY®-FL. Die modifizierte Lysin transfer RNA kann in einem *in vitro* Translationssystem verwendet werden (siehe Abbildung 9). Die Synthese mit markierten Lysinen hat gegenüber markiertem Methionin den Vorteil, dass Lysin mit 6,6 % gegenüber dem Methionin mit 1,7 % der Aminosäuren eines Proteins im Durchschnitt öfter vorkommt (214). Die mRNA des ppL86 besitzt kein Stopp- Codon, was ein C-terminal verkürztes, 86 Aminosäure langes Fragment von ppL darstellt. Dadurch bleibt das ppL86 mit dem Ribosom assoziiert, kann aber durch Zugabe von Puromycin von ihm abgelöst werden. Um den Oligomerisierungsgrad des Sec61- Komplexes zu bestimmen, sollte zwischen dem fluoreszierendem ppL86 und dem, mit Fluoreszenz markiertem Sec61- Komplex eine FRET- Messung (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) durchgeführt werden. Desweiteren sollte versucht werden, ob mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologischen Methoden die Insertion und der Transport nach Zugabe von Puromycin durch den Translokationskanal verfolgt werden kann. Für die Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologischen Methode sollte der isolierte Sec61- Komplex in einen horizontal ausgerichtet Bilayer inseriert werden. Mit dem Fluoreszenzmikroskop sollte das ppL86 in dem Bilayer detektiert und die Ortsveränderung durch den Translokationskanal verfolgt werden. Gleichzeitig sollte über Leitfähigkeitsmessungen die Aktivierung des Kanals ermittelt werden. Diese Messungen sollten in Kooperation mit der Biophysik der Universität in Osnabrück durchgeführt werden. Nach Rücksprache wurde darauf hingewiesen, dass die Fluoreszenzintensität des fluoreszierenden ppL86mer nicht ausreichend war, um eine FRET- Messung oder Versuche mit der Fluoreszenzmikroskopie gekoppelt mit Leitfähigkeitsmessungen durchzuführen. Alle Optimierungsversuche, die Ausbeute zu erhöhen, waren erfolglos geblieben. Hierzu

zählten beispielsweise die Zugabe verschiedener Konzentrationen von $MgAc_2$ oder KAc . Der Einsatz von verschiedenen Lysaten brachte ebenfalls keine Verbesserung, sodass dieses Projekt im Rahmen dieser Arbeit eingestellt wurde. Welche anderen Methoden für die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des Sec61-Komplexes noch möglich wären, wurde bereits in Kapitel 6.4 diskutiert.

6.7 Grp170 und BiP interagieren in Abwesenheit von ATP

Die Bezeichnung „glucose-regulated protein“ stammte ursprünglich aus der Beobachtung dass diese Proteine, ähnlich den Hitzeschockproteine, durch Glukosemangel, geringem pH-Wert und anderen Stressbedingung induziert werden können (215). Grp170 (glucose-regulated protein of 170 kDa) ist ein Hsp70-verwandtes Chaperon im Endoplasmatischen Retikulum von Säugerzellen. Es wurde 1993 erstmals von Lin (215) als Glykoprotein des ER beschrieben. Koimmunopräzipitationsversuche haben gezeigt, dass Grp170 mit anderen Grp-Proteinen, wie beispielsweise mit Grp78 und dem Grp94 interagiert (216). Für das homologe Protein zu Grp170 aus der Hefe (Lhs1) wurde gezeigt, dass es für die Solubilisierung und Rückfaltung eines durch Hitze inaktiviertes Protein verantwortlich ist (217). Grp170 wurde aber weder der Hsp70- noch der Hsp110-Familie zugeordnet. Grp170 wird als eigene Gruppe zu der Hsp70-Superfamilie gezählt, zu der auch die Hsp110-Familie gehört (216). Die beiden Proteine BiP (Grp78) und Grp170 kommen im Lumen des ER vor und assistieren beim Proteintransport und bei der Proteinfaltung (55). Als Hauptvertreter der Hsp70-Familie des Säuger-ER wurde BiP zuerst als Glucose-reguliertes Protein von 78 kDa (Grp78) und später als Immunglobulin schwere Kette bindendes Protein (BiP) beschrieben (99,100). BiP bindet naszierende, fehlgefaltete, oder nicht assemblierte Proteine im ER und vermittelt die Translokation von neu synthetisierten Vorläuferproteinen und den Rücktransport von fehlgefalteten Proteinen über die ER Membran (73,218). In seiner ADP-Form bindet BiP an ein Membranprotein, oder assoziiert über die Substratbindungsdomäne an das Translokon. Durch die Assoziation wird das Translokon verschlossen (219). Das Verschließen der Translokationspore ist dabei eng an den katalytischen ATPase Zyklus von BiP gekoppelt. Hierfür muss BiP mit einem membranständigen J-Protein interagieren (219). J-Proteine, bei denen eine Interaktion mit BiP gezeigt wurden, sind Sec63 und ERj1, die beide mit dem

Sec61 assoziiert vorliegen. BiP/Kar2 und Sec63 werden, zumindest in der Hefe, sowohl beim posttranslationalen, als auch beim cotranslationalen Transport benötigt (4,54,55,73,124,220-223). Der Verschluss des Translokons sollte deshalb von einer Interaktion von BiP mit einem membranständigen J-Protein abhängig sein (219). Eine weitere Funktion von BiP besteht darin, die membranegebundenen Kinasen (PERK und IRE1) und den Transkriptionsfaktor (ATF6), der in den UPR (unfolded protein response) durch Bindung der luminalen Domänen involviert ist, negativ zu regulieren (224-227).

Die erfolgreiche Isolation von Grp170 fand überwiegend nach Volkmer mit Hilfe der Chromatographie über eine ATP-Agarose als Reinigungsschritt statt (177). Es konnte Grp170 zusammen mit BiP isoliert werden, wobei BiP als das abundantere Protein (5 μ M) im ER, im Vergleich zu Grp170 (0,5 μ M) in vielfacher Menge vorhanden war (vgl. Abbildung 34). Es stellte sich die Frage, ob sich die Feststellung, dass Grp170 mit BiP in Abwesenheit von ATP interagiert (179), mit Hilfe der AFFF-Technik in Kombination der Mehrwinkellichtstreuung (MALS) verifizieren lässt. Desweiteren sollte überprüft werden, ob Grp170 in Anwesenheit von ATP dimerisiert und BiP als Monomer vorliegt. Dies zu überprüfen war angebracht, da es bei einem anderen Fall zu unterschiedlichen Ergebnissen kam, wenn man die beiden Methoden SEC und AFFF/MALS miteinander vergleicht (228). In der Arbeit von Dambe *et al.* wurde das Protein AFR (1,5-anhydro-d-fructose reductase) mit Hilfe der Gelfiltration als Monomer und mit der kombinierten AFFF- und MALS-Technik als Dimer bestimmt. Sowohl bei der Verwendung der AFFF, als auch bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) eluieren die Komponenten zu bestimmten Elutionszeiten. Die Elutionszeiten stehen in Relation zur hydrodynamischen Größe der jeweiligen Probenbestandteile. Im Fall der SEC ist eine Kalibrierung anhand eines Standards erforderlich, um die Relation zwischen Elutionszeit und -größe herzustellen, was bei der AFFF nicht nötig ist (229). Die AFFF hat eine höhere Selektivität und somit ein breiteres Anwendungsgebiet als die SEC (229). Eine schonendere Trennung sollte mit der AFFF-Technik erreicht werden, da hier die Proteine nicht durch eine Gelmatrix wandern müssen und keine Scherkräfte auftreten (229). Auch in dieser Arbeit sind Unterschiede bei der Bestimmung der molaren Masse von Grp170 im Vergleich zur SEC festgestellt worden. In der Dissertation von Weitzmann eluierte Grp170 in Anwesenheit von ATP als Dimer und in Abwesenheit von ATP zusammen mit BiP (179). In dieser Arbeit eluierte Grp170 im Gegensatz dazu in Anwesenheit von ATP als Mo-

nomer. In Abwesenheit von ATP eluierten BiP und Grp170 wie in der Arbeit von Weitzmann (179) zusammen. Damit konnte verifiziert werden, dass Grp170 und BiP in Abwesenheit von ATP einen Komplex bildeten, wie es von Weitzmann gezeigt wurde. Das Dimer von Grp170 konnte nicht nachgewiesen werden, so dass von einem Monomer ausgegangen werden kann. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem homologen Protein von Grp170 der Hefe (Lhs1), stellt man fest, dass es ebenfalls mit ATP interagiert. Für Lhs1 wurde festgestellt, dass die Peptidbindung und die Oligomerisation durch Zugabe von ATP aufgehoben werden. Lhs1 hat einen funktionalen ATP Bindungsort, ähnlich dem Kar2 und anderen Mitgliedern der Hsp70 Familie (230). Lhs1 und Kar2 interagieren gekoppelt und ihre Aktivität wird koordiniert reguliert. Durch Bereitstellung einer spezifischen Nukleotidaustauschaktivität stimuliert Lhs1 das Kar2, wobei Kar2 reziprok die Lhs1 ATPase aktiviert. Die koordinierte und gekoppelte ATPase- Aktivität ist hier für die normale Funktion *in vivo* essentiell (231). Die Stimulation der Lhs1- ATPase ist dabei von der ATPase- Aktivität von Kar2 abhängig. Die Auflösung des Komplexes aus Grp170 und BiP in Anwesenheit von ATP erscheint hinsichtlich der Funktion des Grp170 als Nukleotidaustauschfaktor (NEF) und des ATP-ADP- Zyklus von BiP aus biologischer Sicht als sinnvoll. BiP hat in seiner ATP- Form eine geringe Substrataffinität, so dass das Substrat aus der Bindungstasche entweichen kann. Gleichzeitig kann BiP wieder unter Hydrolyse an der J- Domäne eines ER- Membranproteins binden. Dabei verschließt es die Translokationspore von der luminalen Seite des ERs und steht für die Aufnahme des nächsten Substratmoleküls zur Verfügung (219). Dadurch kann das innere Milieu des ER stabil gehalten werden, da der Ionenfluss verhindert wird.

BiP wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit Hilfe der Mehrwinkel- und der dynamischen Lichtstreuung näher charakterisiert. Im Interesse dabei stand die Bestimmung sowohl des Oligomerisierungsgrades, als auch des hydrodynamischen Radius von BiP. Die hier bestimmte molare Masse von BiP stimmt mit der theoretischen molaren Masse von 78 kDa sehr gut überein, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Grp170 oder ATP. Die Bestimmung des Oligomerisierungsgrades fand in Abwesenheit von ATP statt. Der hier bestimmte Wert von BiP lag bei 70,88 kDa. Bei den vergleichbaren Messungen, die in Anwesenheit von Grp170 durchgeführt wurden, betrug die molare Masse 76,17 kDa in Abwesenheit von ATP und 75,14 kDa in Anwesenheit von ATP. Zwar ist keine gesonderte Messung von BiP alleine in Anwesenheit von ATP durchgeführt worden, aber die Übereinstimmung der molaren Mas-

sen der Messungen von BiP und BiP/Grp170 zeigten keinen Unterschied. Deshalb kann angenommen werden, dass ebenfalls keine Unterschiede mit BiP/Grp170 mit ATP feststellbar gewesen wäre, wenn BiP allein in Anwesenheit von ATP vermessen worden wäre.

Die Bestimmung der Proteinstruktur hat eine hohe Priorität für ein komplettes Verständnis über die Rolle und Funktion von vielen Proteinen. Ein Indikator der Proteinstruktur ist dabei die Größe des Moleküls. Mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann die Größe eines Proteins sehr schnell abgeschätzt werden. Allgemein hat eine stark asymmetrische Struktur einen größeren hydrodynamischen Radius als sein globuläres Äquivalent (183). Für viele Proteine ist die DLS eine angenehme Methode, einen Anhaltspunkt über die Quartärstruktur zu bekommen. Beispielsweise hat das menschliche Insulin als Monomer eine molare Masse von 5,7 kDa, zeigt aber einen hydrodynamischen Radius der einer molaren Masse von 34,2 kDa entsprechen würde. Dies deutet auf eine hexamere Konformation hin, was mit der Kristallstruktur übereinstimmt. Um dies nun auf die Messergebnisse von BiP anzuwenden, kann festgehalten werden, dass BiP mit einem hydrodynamischen Radius von 2,8 nm mit 78 kDa in etwa der gleichen Größenordnung liegt, wie es andere Proteine mit ähnlicher molaren Masse haben. Dies zeigt sich beim Vergleich von BiP mit BSA oder Hämoglobin, die mit einer molaren Masse von 67 bzw. 65 kDa einen hydrodynamischen Radius von 3,6 und 3,5 nm haben (siehe Tabelle 19). Somit scheint BiP eine globulärere Struktur zu haben, als das für die beiden anderen Proteine der Fall ist. Das Ovalbumin dagegen hat als gegenteiliges Beispiel einen hydrodynamischen Radius von 3 nm mit einer molaren Masse von 43 kDa. Somit hat Ovalbumin im Vergleich zum BiP scheinbar eine asymmetrischere Struktur. Sowohl die molare Masse als auch der hydrodynamische Radius von BiP sprechen dafür, dass BiP unabhängig von ATP als ein Monomer vorliegt. Eine denkbare Änderung der Konformation in Anwesenheit von ATP konnte bisher noch nicht untersucht werden, da das Signal des Detektors für die DLS während der Messung von BiP und Grp170 in Anwesenheit von ATP ein zu starkes Signalrauschen aufwies und das Ergebnis deshalb als unsicher anzusehen ist. Wenn sich der gemessene Wert jedoch bestätigen sollte, zeigt BiP auch in Anwesenheit von ATP keine, mit diesem System messbare Konformationsänderung.

Tabelle 19: Übersicht über den hydrodynamischen Radius (Rh) und der dazugehörigen molaren Masse (MW) verschiedener Proteine (232).

Protein	hydrodynamischer Radius, Rh in nm	MW in kDa
Lysozym	1,9	14,7
Chymotrypsinogen	2,4	25
Insulin (Human, pH7)	2,7	34,2
Ovalbumin	3,0	43
Hämoglobin	3,5	65
BSA (Bovine Serum Albumin)	3,6	67
Hexokinase	4,3	102
Apoferritin	8,2	443
Thyroglobulin	10,1	669

Die quantitative Auswertung der erzielten Proteinmengen von BiP und Grp170 zeigt einen starken Proteinverlust während der Isolierung beider Proteine. BiP liegt in einer Konzentration von 5 μ M, Grp170 von 0,5 μ M vor. Die sich daraus ergebene theoretische Proteinmenge, die für eine Isolation zur Verfügung steht beträgt für BiP 11,7 mg und für Grp170 2,25 mg in 30 ml RM ($OD_{280}= 40$). Die isolierte Proteinmenge von BiP war mit 2,5 % vor Gelfiltration und mit 0,0005 % nach der Gelfiltration ausgesprochen gering. Ein ähnliches Bild ergibt die Auswertung des isolierten Grp170, bei dem 0,7 % des eingesetzten Proteins isoliert wurden. Wenn man in die quantitative Betrachtung der Isolierung der Proteine aus Mikrosomen betrachtet stellt man fest, dass alle hier zu isolierenden Proteine (BiP, Grp170 und der Sec61- Komplex) mit diesen Methoden nur in sehr geringen Mengen isolieren werden konnte. Über die Gründe für diese Beobachtung kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit, die den hohen Verlust erklären kann, ist in der unzureichenden Solubilisierung, wie es für den Sec61- Komplex gezeigt wurde zu finden. Bei der Solubilisierung der RM für die Isolierung über die Affinitätschromatographie sind 80 % des zur Verfügung stehenden Proteins verloren gegangen. Dieses Problem ist auch für die Solubilisierung der Membranen bei der Isolierung von BiP und Grp170 denkbar. Eine mögliche Verbesserung könnte durch den Einsatz eines anderen Detergenz erreicht werden. Als Detergenz für die Solubilisierung wurde hier Chaps eingesetzt. Alternativ könnte bei-

spielsweise auch Detergenzien wie Natriumcholat, Octylglucosid, Nonidet P-40 oder E9C12 zum Einsatz kommen. In seiner Dissertation testete Hubenova beispielsweise verschiedenen Detergenzien auf ihre Solubilisierungseigenschaften bei der Isolierung des Hirnenzyms L- Aspartat- NAcetyltransferase (233). Dabei zeigte sich ein erheblicher Unterschied, je nachdem, welches Detergenz zum Einsatz kam. Mit Digitonin wurden ca. 10 % der L- Aspartat- NAcetyltransferase isoliert, mit Nonidet P-40 dagegen ca. 60 %. Auch die Methode, mit der man die Membranen solubilisiert, kann modifiziert werden. Im Fall der Isolierung von BiP und Grp170 wurden die Membranen über starkes Schütteln auf dem Vortexer erreicht. Eine Verbesserung könnte durch Zugabe von Glasperlen erzielt werden, so dass die Membranvesikel durch größere Scherkräfte besser aufgeschlossen werden. Trotz der geringen erzielten Ausbeute der beiden luminalen Proteine Grp170 und BiP war es möglich, sowohl eine ATP- abhängige Bildung bzw. Auflösung eines Komplexes nachzuweisen, als auch den hydrodynamischen Radius und den Oligomerisierungsgrad von BiP zu bestimmen. Für weitere Untersuchungen wie beispielsweise mit Hilfe der Cryo- Elektronenmikroskopie sollte jedoch eine größere Proteinmenge isoliert werden. Dies macht die Suche nach effektiveren Isolierungsverfahren notwendig, indem weitere Solubilisierungsmittel und andere Methoden zur Erhöhung der Effizienz entwickelt werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Lehninger, N., Cox. (1989) Vol. 2. Ausgabe, Spektrum Verlag
2. Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V. D., Latva-Ranta, M., and Ruddock, L. (2007) *J. Cell Biol.* **179**, 1193-1204
3. Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) *J. Cell Biol.* **67**, 835-851
4. Chevalier, M., Rhee, H., Elguindi, E. C., and Blond, S. Y. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19620-19627
5. Chevet, E., Cameron, P. H., Pelletier, M. F., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. M. (2001) *Current Opinion in Structural Biology* **11**, 120-124
6. Palade, G. E. (1955) *J. Cell Biol.* **1**, 59-68
7. Bruce Alberts, e. a. (2002) in *Garland Science*, pp. pg. 342
8. Wool, I. G. (1996) *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 164-165
9. Warner, J. R. (1990) *Current Opinion in Cell Biology* **2**, 521-527
10. Scheer, U., and Weisenberger, D. (1994) *Current Opinion in Cell Biology* **6**, 354-359
11. Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G., and Frank, J. (1997) *Science* **278**, 2132-2126
12. von Heijne, G. (1985) *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105
13. Hegde, R. S., Voigt, S., Rapoport, T. A., and Lingappa, V. R. (1998) *Cell* **92**, 621-631
14. von Heijne, G. (1990) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 604-608
15. Folz, R., Nothwehr, S., and Gordon, J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 2070-2078
16. Ng, D. T. W., Brown, J. D., and Walter, P. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 269-278
17. Feldheim, D., and Schekman, R. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 935-943
18. Wickner, W. T., and Lodish, H. F. (1985) *Science* **230**, 400-407
19. Lipp, J., Flint, N., Haeuptle, M.-T., and Dobberstein, B. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2013-2022
20. Andersson, H., and von Heijne, G. (1994) *EMBO J.* **13**, 2267-2272
21. Spiess, M. (1995) *FEBS Letters* **369**, 76-79
22. Kutay, U., Ahnert-Hilger, G., Hartmann, E., Wiedenmann, B., and Rapoport, T. A. (1995) *EMBO J.* **14**, 217-223
23. Kutay, U., Hartmann, E., and Rapoport, T. A. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 72-75
24. Chirico, W. J., Waters, M. G., and Blobel, G. (1988) *Nature* **332**, 805-810
25. Eilers, M., and Schatz, G. (1988) *Cell* **52**, 481-483
26. Zimmermann, R., Sagstetter, M., Lewis, M. J., and Pelham, H. R. B. (1988) *EMBO J.* **7**, 2875-2880
27. Walter, P., and Blobel, G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7112-7116
28. Walter, P., and Blobel, G. (1982) *Nature* **299**, 691-698
29. Walter, P., Ibrahimi, I., and Blobel, G. (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 545-550
30. von Heijne, G. (1995) *BioEssays* **17**, 25-30
31. Krieg, U. C., Walter, P., and Johnson, A. E. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8604-8608
32. Walter, P., and Johnson, A. E. (1994) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**, 87-119
33. Gilmore, R., Blobel, G., and Walter, P. (1982) *J. Cell Biol.* **95**, 463-469
34. Gilmore, R., Walter, P., and Blobel, G. (1982) *J. Cell Biol.* **95**, 470-477
35. Meyer, D. I., Krause, E., and Dobberstein, B. (1982) **297**, 647-650

36. Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U., and Rapoport, T. A. (1992) *Cell* **71**, 489-503
37. Kalies, K. U., Görlich, D., and Rapoport, T. A. (1994) *J. Cell Biol.* **126**, 925-934
38. Jungnickel, B., and Rapoport, T. A. (1995) *Cell* **82**, 261-270
39. Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T. A., Hartmann, E., and Kalies, K.-U. (2000) *EMBO J.* **19**, 1900-1906
40. Conolly, T., and Gilmore, R. (1989) *Cell* **57**, 599-610
41. Rapiejko, P. J., and Gilmore, R. (1997) *Cell* **89**, 703-713
42. Görlich, D., and Rapoport, T. A. (1993) *Cell* **75**, 615-630
43. Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (1996) *Cell* **87**, 721-732
44. High, S., Martoglio, B., Görlich, D., Andersen, S. S. L., Ashford, A. J., Giner, A., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., Dobberstein, B., and Brunner, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26745-26751
45. High, S., and Stirling, C. J. (1993) *Trends Cell Biol.* **3**, 335-339
46. Kellaris, K. V., Bowen, S., and Gilmore, R. (1991) *J. Cell Biol.* **114**, 21-33
47. Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T. A. (1994) *EMBO J.* **13**, 3973-3982
48. Nicchitta, C. V., Murphy, E. C. I., Haynes, R., and Shelness, G. S. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 957-970
49. High, S., Görlich, D., Wiedmann, M., Rapoport, T. A., and Dobberstein, B. (1991) *J. Cell Biol.* **113**, 35-44
50. Mothes, W., Jungnickel, B., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (1998) *J. Cell Biol.* **142**, 355-364
51. Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E. (1994) *Cell* **78**, 461-471
52. Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (1998) *Cell* **92**, 747-758
53. Alder, N. N., and Johnson, A. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22787-22790
54. Corsi, A. K., and Schekman, R. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 1483-1493
55. Dudek, J., Volkmer, J., Bies, C., Guth, S., Muller, A., Lerner, M., Feick, P., Schafer, K.-H., Morgenstern, E., Hennessy, F., Blatch, G. L., Janoscheck, K., Heim, N., Scholtes, P., Frien, M., Nastainczyk, W., and Zimmermann, R. (2002) *EMBO J.* **21**, 2958-2967
56. Schlenstedt, G., and Zimmermann, R. (1987) *EMBO J.* **6**, 699-703
57. Müller, G., and Zimmermann, R. (1987) *EMBO J.* **6**, 2099-2107
58. Deshaies, R. J., Koch, D., Werner-Washburne, M., Craig, E. A., and Schekman, R. (1988) *Nature* **332**, 800-805
59. Cyr, D. M., Lu, X., and Douglas, M. G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20927-20931
60. Caplan, A. J., Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1992) *Cell* **71**, 1143-1455
61. Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4378-4386
62. Lyman, S. K. u. S., R. (1996) *Experientia* **52**, 1042-1049
63. Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A., and Schekman, R. (1991) *Nature* **349**, 806-808
64. Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A. (1995) *Cell* **81**, 561-570
65. Wittke, S., Lewke, N., Müller, S., and Johnsson, N. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 2519-2530
66. Lyman, S. K., and Schekman, R. (1997) *Cell* **88**, 85-96

67. Dünwald, M., Varshavsky, A., and Johnsson, N. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 329-344
68. Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J., and Rapoport, T. A. (1998) *Cell* **94**, 795-807
69. Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D., and Schekman, R. (1992) *Cell* **69**, 353-365
70. Vogel, J. P., Misra, L. M., and Rose, M. D. (1990) *J. Cell Biol.* **110**, 1885-1895
71. Matlack, K. E. S., Plath, K., Misselwitz, B., and Rapoport, T. A. (1997) *Science* **277**, 938-941
72. Misselwitz, B., Staeck, O., and Rapoport, T. A. (1998) *Molecular Cell* **2**, 593-603
73. Matlack, K. E. S., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A. (1999) *Cell* **97**, 553-564
74. Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T. A. (1994) *Nature* **367**, 654-657
75. Raden, D., Song, W., and Gilmore, R. (2000) *J. Cell Biol.* **150**, 53-64
76. Pohlschröder, M., Prinz, W. A., Hartmann, E., and Beckwith, J. (1997) *Cell* **91**, 563-566
77. Beckmann, R., Spahn, C. M. T., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., and Blobel, G. (2001) *Cell* **107**, 361-372
78. Ménétret, J.-F., Neuhof, A., Morgan, D. G., Plath, K., Radermacher, M., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (2000) *Molecular Cell* **6**, 1219-1232
79. Morgan, D. G., Ménétret, J.-F., Neuhof, A., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (2002) *Journal of Molecular Biology* **324**, 871-886
80. Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C. L., Ban, N., and Frank, J. (2005) **438**, 318-324
81. Joly, J. C., and Wickner, W. (1993) *EMBO J.* **12**, 255-263
82. High, S., Andersen, S. S. L., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A., and Dobberstein, B. (1993) *J. Cell Biol.* **121**, 743-750
83. Sanders, S., and Schekman, R. (1992) *J. Biol Chem.* **267**, 13791-13794
84. Berg, B. v. d., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A. (2004) **427**, 36-44
85. Driessen, A. J. M. (2005) **438**, 299-300
86. Hamman, B. D., Chen, J.-C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E. (1997) *Cell* **89**, 535-544
87. Wirth A., J. M., Bies C., Frie M., Tyedmers J., Zimmermann R., Wagner R. (2003) *Mol. Cell* **12**, 261-268
88. Deshaies, R., and Schekman, R. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2653-2664
89. Deshaies, R. J., and Scheckman, R. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 6024-6035
90. Feldheim, D., Rothblatt, J., and Scheckman, R. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3288-3296
91. Scidmore, M. A., Okamura, H. H., and Rose, M. D. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 1145-1159
92. Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., and Rapoport, T. A. (1992) *Nature* **357**, 47-52
93. Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., and Rapoport, T. A. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 25-35
94. Do, H., Falcone, D., Lin, J., Andrews, D. W., and Johnson, A. E. (1996) *Cell* **85**, 369-378
95. Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J., and Rapoport, T. A. (2000) *Cell* **102**, 233-244

96. Netzer, W. J., and Ulrich Hartl, F. (1998) *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 68-73
97. Craig, E. A. (1985) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**, 239-280
98. Gething, M. J., Blond-Elguindi, S., Mori, K., and Sambrook, J. (1994) in *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones* (Morimoto, R. I., Tissieres, A., and Georgopoulos, C., eds), pp. 111-136, Cold Spring Laboratory Press, Plainview, NY
99. Pouyssegur, J., Shiu, R. P. C., and Pastan, I. (1977) **11**, 941-947
100. Haas, I. G., and Wabl, M. (1983) *Nature* **306**, 387-389
101. Chen, X., Easton, D., Oh, H. J., Lee-Yoon, D. S., Liu, X., and Subject, J. (1996) *FEBS Lett.* **380**, 68-72
102. Park, J., Easton, D. P., Chen, X., MacDonald, I. J., Wang, X.-Y., and Subject, J. R. (2003) *Biochemistry* **42**, 14893-14902
103. Rose, M. D., Misra, L. M., and Vogel, J. P. (1989) *Cell* **57**, 1211-1221
104. Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.-J., and Sambrook, J. (1989) *Cell* **57**, 1223-1236
105. Craven, R. A., Egerton, M., and Stirling, C. J. (1996) *EMBO J.* **15**, 2640-2650
106. Hamilton, T. G., and Flynn, G. C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30610-30613
107. Baxter, B. K., James, P., Evans, T., and Craig, E. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6444-6456
108. Dierks, T., Volkmer, J., Schlenstedt, G., Jung, C., Sandholzer, U., Zachmann, K., Schlotterhose, P., Neifer, K., Schmidt, B. und Zimmermann, R. (1996)
109. Stirling, J. R. T. a. C. J. (2000) *The EMBO Journal* **19**, 6440–6452
110. Gässler, C. S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M. P., Schröder, H., Valencia, A., and Bukau, B. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15229-15234
111. Suh, W.-C., Burkholder, W. F., Lu, C. Z., Zhao, X., Gottesman, M. E., and Gross, C. A. (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15223-15228
112. Cheetham, A. J. C. a. M. E. (1998) *Cell Stress Chaperones.* **3**, 28-36
113. Fritha Hennessy, W. S. N., Richard Zimmermann, Michael E. Cheetham, Gregory L. Blatch,. (2005) *Protein Science* **14**, 1697-1709
114. Dudek, J. B., S. Cappel, M. Greiner, C. Jalal, L. Müller and R. Zimmermann. (2009) *Cellular and Molecular Life Sciences*
115. Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., and Christen, P. (1994) *Science* **263**, 971-973
116. McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J., and Bukau, B. (1995) *Journal of Molecular Biology* **249**, 126-137
117. Russell, R., Karzai, A. W., Mehl, A. F., and McMacken, R. (1999) *Biochemistry* **38**, 4165-4176
118. Palleros, D. R., Reid, K. L., Shi, L., Welch, W. J., and Fink, A. L. (1993) *Nature* **365**, 664-666
119. Simon Alberti, C. E., and Jörg Höfheld. (2003) *Cell Stress & Chaperones* **8**, 225-231
120. Shomura, Y., Dragovic, Z., Chang, H.-C., Tzvetkov, N., Young, J. C., Brodsky, J. L., Guerriero, V., Hartl, F. U., and Bracher, A. (2005) *Molecular Cell* **17**, 367-379
121. Bukau, B., and Horwich, A. L. (1998) *Cell* **92**, 351-366
122. Andreas Weitzmann, C. B., Johanna Dudek, Richard Zimmermann,. (2007) *FEBS Journal* **274**, 5175-5187
123. Chung, K. T., Shen, Y., and Hendershot, L. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47557-47563

124. Tyedmers, J., Lerner, M., Bies, C., Dudek, J., Skowronek, M. H., Haas, I. G., Heim, N., Nastainczyk, W., Volkmer, J., and Zimmermann, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7214-7721 7219
125. Zimmermann, R., Müller, L., and Wullich, B. (2006) *Trends in Molecular Medicine* **12**, 567-573
126. Bohni, P., Deshaies, R., and Schekman, R. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1035-1042
127. Ross E. Dalbey, M. O. L., Sierd Bron, Jan Maarten Van Dijk, (1997) *Protein Science* **6**, 1129-1138
128. Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L., and Shakin-Eshleman, S. H. (1998) *Biochemistry* **37**, 6833-6837
129. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664
130. Varki, A. (1993) *Glycobiology* **3**, 97-130
131. Knauer, R., and Lehle, L. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 17249-17256
132. Evans, E. A., Gilmore, R., and Blobel, G. (1986) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 581-585
133. Shelness, G., and Blobel, G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9512-9519
134. Kalies, K.-U., and Hartmann, E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 3925-3929
135. Lively, M. O. e. a. (1994) *Methods Enzymol.* **244**, 301-314
136. Baker, R. K., and Lively, M. O. (1987) *Biochemistry* **26**, 8561-8567
137. YaDeau, J. T., Klein, C., and Blobel, G. (1991) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 517-521
138. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
139. Ito, K., Date, T. und Wickner, W. (1980) *J Biol Chem* **255**, 2123-2130
140. Wessel, D., and Flügge, U. I. (1984) *Analytical Biochemistry* **138**, 141-143
141. Jochen Heukeshoven, R. D. (1985) *Electrophoresis* **6**, 103-112
142. Walter, P., and Blobel, G. (1983) *Methods Enzymol.* **96**, 84-93
143. Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
144. Zimm, B. H. (1948) *The Journal of Chemical Physics* **16**, 1093-1099
145. Folta-Stogniew. (1999) *J Biomol Tech.* **10**, 51-63
146. Kendrick, B. S., Kerwin, B. A., Chang, B. S., and Philo, J. S. (2001) *Analytical Biochemistry* **299**, 136-146
147. Giddings, J. (1993) *Science* **260**, 1456-1465
148. Claus Tank, M. A. (1996) *Macromolecular Chemistry and Physics* **197**, 2943-2959
149. Caldwell, K. D. (2000) *Fieldflow fractionation handbook*, Wiley Interscience, New York, 79-94.
150. Giddings, J. C. (2000) *Field-flow fractionation handbook*, Wiley Interscience, New York, 3-30
151. M. E. Schimpf, K. C., J. C., and Giddings, J. C. (2000) *Experimental field-flow fractionation: overview*. (handbook, F.-f. f., Ed.)
152. M. E. Schimpf, K. C., J. C. Giddings. (2000) *Resolution and fractionating power* (handbook, F.-f. f., Ed.)
153. Klein, M. u. (2008) *LABORFACHZEITSCHRIFT*
154. Viovy, J.-L., Lesec, J., (1994) *Separation of macromolecules in gels: permeation chromatography and electrophoresis*. Polymer analysis and characterization, Springer, V. A. Bershtein, G. C. Berry, N. Ise, J. Lesec, H. Matsuoka, I. S. Osad'ko, V. A., Ryzhov, J.-L. Viovy, Berlin
155. Gimbert, L. J., Andrew, K. N., Haygarth, P. M., and Worsfold, P. J. (2003) *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**, 615-633

156. Fraunhofer, W. a. W., Gerhard. (2004) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics-The International Association of Pharmaceutical Technology (APV)* **58**, 369-383
157. Litzen, A., Walter, J. K., Krischollek, H., and Wahlund, K. G. (1993) *Analytical Biochemistry* **212**, 469-480
158. Min-Kuang Liu, P. L., J. Calvin Giddings,. (1993) *Protein Science* **2**, 1520-1531
159. Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Michelini, E., and Roda, A. (2005) *Trends in Biotechnology* **23**, 475-483
160. Wittgren, B., and Wahlund, K.-G. (1997) *Journal of Chromatography A* **760**, 205-218
161. B. Wittgren, J. B., L. Piculell, K.-G. Wahlund,. (1998) *Biopolymers* **45**, 85-96
162. Andersson, M., Wittgren, B., and Wahlund, K.-G. (2001) *Analytical Chemistry* **73**, 4852-4861
163. Reschiglian, P., Zattoni, A., Roda, B., Casolari, S., Moon, M. H., Lee, J., Jung, J., Rodmalm, K., and Cenacchi, G. (2002) *Analytical Chemistry* **74**, 4895-4904
164. Korgel, B. A., van Zanten, J. H., and Monbouquette, H. G. (1998) **74**, 3264-3272
165. Fraunhofer, W., Winter, G., and Coester, C. (2004) *Analytical Chemistry* **76**, 1909-1920
166. R. J. White. (1997) *Polymer International* **43**, 373-379
167. Blobel, G. n., and Sabatini, D. (1971) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**, 390-394
168. Gray, J. E. a. H., Diane S. (1976) in *Archives of Microbiology* Vol. 109, pp. 95-99
169. IRWIN W. SHERMAN, R. A. C., B. HIGGINSON, D. J. McLAREN, J. WILLIAMSON,. (1975) *Journal of Eukaryotic Microbiology* **22**, 568-572
170. Stenesh, J., and Yang, C. (1967) *J. Bacteriol.* **93**, 930-936
171. Nieuwenhuysen, P., and Clauwaert, J. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9626-9632
172. Martin, T. E., Wool, I. G., and Castles, J. J. (1971) in *Part C: Nucleic Acids and Protein Synthesis* (Grossman, K. M. a. L., ed), Volume 20 Ed., pp. 417-429, Academic Press
173. Borgese, N., Mok, W., Kreibich, G., and Sabatini, D. D. (1974) *Journal of Molecular Biology* **88**, 559-580
174. Rolleston, F. S. (1972) *Biochem. J.* **129**, 721-731
175. Unwin, P. N. T. (1977) *Nature* **269**, 118-122
176. Chen, C.-F., Chen, Y., Dai, K., Chen, P.-L., Riley, D., and Lee, W.-H. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4691-4699
177. Volkmer, J. (1995) in *Dissertation*
178. Edman, P. (1949) *A method for the determination of amino acid sequence in peptides.* Arch. Biochem., 22
179. Weitzmann, A. (2006) *Dissertation*
180. Jungbauer, L. M., Bakke, C. K., and Cavagnero, S. (2006) *Journal of Molecular Biology* **357**, 1121-1143
181. Allen, S. H., and Wong, K. P. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 8759-8766
182. Bogdanov, A., Zimmermann, R., Wang, C., and Ford, N., Jr. (1978) *Science* **202**, 999-1001
183. Tam, M., Dodd, J., and Hill, W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 6430-6434
184. Tam, M. F., Dodd, J. A., and Hill, W. E. (1981) *FEBS Letters* **130**, 217-220
185. Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M., and Koteliansky, V. E. (1978) *FEBS Letters* **95**, 273-276

186. Allen, S. H., and Wong, K.-P. (1979) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **195**, 112-120
187. Koppel, D. E. (1974) *Biochemistry* **13**, 2712-2719
188. Tam, M. F., and Hill, W. E. (1980) *FEBS Letters* **120**, 230-232
189. Donceel, K., Nieuwenhuysen, P., and Clauwaert, J. (1982) *Biochem. J.* **205**, 495-501
190. Brunger, S. a. (2005) *Protein Sci.* **14**, 2207-2211
191. Ringstad, L., Andersson Nordahl, E., Schmidtchen, A., and Malmsten, M. (2007) **92**, 87-98
192. Wyatt. (2002)
193. Yernool, D., Boudker, O., Folta-Stogniew, E., and Gouaux, E. (2003) *Biochemistry* **42**, 12981-12988
194. Wyatt.
195. Rolls, M. M., Hall, D. H., Victor, M., Stelzer, E. H. K., and Rapoport, T. A. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 1778-1791
196. Lippincott-Schwartz, J., Snapp, E., and Kenworthy, A. (2001) **2**, 444-456
197. Nikonov, A. V., Snapp, E., Lippincott-Schwartz, J., and Kreibich, G. (2002) *J. Cell Biol.* **158**, 497-506
198. Th. Förster. (1948) *Annalen der Physik* **437**, 55-75
199. Snapp EL., R. G., Bogert BA., Lippincott-Schwartz J., Hegde RS. (2004) *J Cell Biol* **164**, 997-1007
200. Schagger, H., Cramer, W. A., and Vonjagow, G. (1994) *Analytical Biochemistry* **217**, 220-230
201. Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., and Schamel, W. W. A. (2006) *Sci. STKE* **2006**, pl4-
202. Svedberg T, P. K. O. (1940) *The Ultracentrifuge*. The international Series of monographs on physics, Clarendon Press, Oxford
203. Yphantis, D. A. (1964) *Biochemistry* **3**, 297-317
204. Franzmann, R. u. (2009) *BIOspektrum*, 47-49
205. Wang, L., and Dobberstein, B. (1999) *FEBS Lett.* **457**, 316-322
206. Song, W., Raden, D., Mandon, E. C., and Gilmore, R. (2000) *Cell* **100**, 333-343
207. Scheuring, J., Braun, N., Nothdurft, L., Stumpf, M., Veenendaal, A. K. J., Kol, S., van der Does, C., Driessen, A. J. M., and Weinkauff, S. (2005) *Journal of Molecular Biology* **354**, 258-271
208. Ménétret, J.-F., Hegde, R. S., Heinrich, S. U., Chandramouli, P., Ludtke, S. J., Rapoport, T. A., and Akey, C. W. (2005) *Journal of Molecular Biology* **348**, 445-457
209. Guth S., M. A., Völzing C., Jung M., Zimmermann R. (2004) *Eur J.Biochem.* **271**, 3200-3207
210. Rolleston, F. S., and Lam, T. Y. (1974) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **59**, 467-473
211. Dudek, J., Greiner, M., Muller, A., Hendershot, L. M., Kopsch, K., Nastainczyk, W., and Zimmermann, R. (2005) **12**, 1008-1014
212. Escauriaza, M. D. d. (2006) *Dissertation*
213. Brimacombe, R. (1995) *European Journal of Biochemistry* **230**, 365-383
214. Dayhoff, M. O. (1978) *national biomedical research foundation* **2**
215. Lin, H., Masso-Welch, P., Di, Y., Cai, J., Shen, J., and Subject, J. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 1109-1119
216. Easton, K. a. S. (2000) *Cell Stress Chaperones* **5**, 276-290

217. Saris, N., Holkeri, H., Craven, R. A., Stirling, C. J., and Makarov, M. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 813-824
218. Kabani M., K. S., Morrow MW., Montgomery DL., Sivendran R., Rose MD., Gierasch LM., Brodsky J. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 3437-3448
219. Alder, N. N., Shen, Y., Brodsky, J. L., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (2005) *J. Cell Biol.* **168**, 389-399
220. Brodsky, J. L., Goeckeler, J., and Schekman, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9643-9646
221. Meyer, H.-A., Grau, H., Kraft, R., Kostka, S., Prehn, S., Kalies, K.-U., and Hartmann, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 14550-14557
222. Misselwitz, B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20110-20115
223. Young, C., Reid, Willer and Stirling. (2001) *The EMBO Journal* **20**, 262-271
224. Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000) **2**, 326-332
225. Ma, K., Vattem, K. M., and Wek, R. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 18728-18735
226. Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002) **3**, 99-111
227. Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., Rose, M. D., and Kohno, K. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 2559-2569
228. Dambe, T. R., Kuhn, A. M., Brossette, T., Giffhorn, F., and Scheidig, A. J. (2006) *Biochemistry* **45**, 10030-10042
229. Johann, C. (2006) *Laborpraxis*
230. Hamilton, T. G., Norris, T. B., Tsuruda, P. R., and Flynn, G. C. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5298-5307
231. Steel, G. J., Fullerton, D. M., Tyson, J. R., and Stirling, C. J. (2004) *Science* **303**, 98-101
232. <http://www.malvern.com>.
233. Hubenova, Y. (2004) in *Dissertation*, Bonn

8 Danksagung

Ich möchte besonders Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen, sowie für eine optimale Betreuung und ständige, aktive Unterstützung bei der Arbeit danken.

Herrn Dr. Markus Greiner und Dr. Martin Jung möchte ich für die wissenschaftliche Diskussionen zur Interpretation der Daten danken.

Dr. Martin Jung und Mitarbeitern danke ich für die Herstellung von Proteinantikörper.

Bei Frau Simone Amann bedanke ich mich herzlich für ihre Unterstützung bei meinen experimentellen Arbeiten, für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft.

Großer Dank geht an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Zimmermann.

Meinen Eltern und meinen Schwiegereltern danke ich für ihre Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Zuletzt möchte ich von Herzen meiner Frau und meinen Kindern für die Unterstützung meiner Arbeit, für das entgegengebrachte Verständnis, den Halt und die Aufmunterung in schwierigen Phasen danken.

9 Lebenslauf

Carsten Burgard

Diplombiologe

Rickertstr.21

66386 St. Ingbert

Tel.: +49-6894-974083

+49-179-6849594

e-Mail: carstenburgard@web.de



Geburtsdatum: 1. April 1976

Geburtsort: St. Ingbert, Deutschland

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (Tochter: 3 Jahre, Sohn: 4 Monate)

Nationalität: deutsch

Ausbildung

1982 – 1986 Grundschule (Südschule, St. Ingbert)

1986 – 1991 Gymnasium (Albertus-Magnus-Gymnasium, St. Ingbert)

1991 - 1996 Gymnasium (Johanneum-Gymnasium, Homburg/Saar)

1996 – 1997 Zivildienst, Rettungssanitäter (Deutsches Rotes Kreuz,
Kreisverband St. Ingbert)

universitäre Ausbildung

- 1997 - 2002 Universität Rostock, Studium der Biologie (Vordiplom März 2000, 2002 Diplomprüfung)
- 2002 - 2004 Diplomarbeit am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven (Ökophysiologie/ Ökotoxikologie) mit dem Thema: Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen auf den Stoffwechsel von marinen Fischen - Untersuchungen mit Hilfe der *in vivo* ³¹P-NMR-Spektroskopie an der antarktischen Aalmutter *Pachycara brachycephalum*
- 2005 - 2009 Promotionsarbeit mit dem Thema: "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Komponenten der ER- Proteintranslokase"

Berufserfahrung

- 1996 -1997 Deutsches Rotes Kreuz, Rettungssanitäter, Kreisverband St. Ingbert
- 1997 -1998 Deutsches Rotes Kreuz, ehrenamtlicher Rettungssanitäter, Kreisverband St. Ingbert
- 2003 Aquarienbetreuung am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven
- 2004 Betreuung des ökophysiologischen Praktikums des SS 2004 am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven
- 2004-2005 Tätigkeit im pharmazeutischen Außendienst bei Co- Pharma Außendienst GmbH , Lenggries
- 2005- 2007 Stipendiat zur Promotion im Graduiertenkolleg 377 "Zelluläre Regulation und Wachstum"
- 2008- 2009 Angestellter der Universität des Saarlandes zur Promotion

Poster

Bock, C, Burgard, C, Lannig, G, Pörtner, H.-O. (2005). The impact of high CO₂ concentrations on energy metabolism of Antarctic eelpout *Pachycara brachycephalum*, *Comp Biochem Physiol A*, 141: 189, Animal and cell biology, SEB 05, A11.3, Barcelona, Spain, 11.07-15.07.05.

Burgard, C, Jung, M, Greiner, M, Zimmermann, R. (2007). Determination of the molar mass of native Sec61 complex by AFFF and MALS, "New Methods in Membrane Protein Research (24 - 26 August 2007, Stockholm)

Carsten Burgard

Homburg, 06.04.2009