



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Untersuchungen zur oxidativen in vitro Proteinrückfaltung unter
Verwendung von Gemini-Disulfiddetergenzien**

Autor: Marc Potempa
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule
Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Seit ihrer ersten Einführung nimmt die Bedeutung rekombinanter Proteine als Therapeutika stetig zu. Insbesondere in *E. coli* führt die Überexpression von Proteinen häufig zur Aggregation und Bildung von dichten, unlöslichen Proteinpartikeln, den so genannten *inclusion bodies*. Um das nicht korrekt gefaltete und aggregierte Protein zu solubilisieren, kommen hoher hydrostatischer Druck oder Chaotrope Agenzien wie z.B. Harnstoff oder Guanidin zum Einsatz.

Im Falle nicht-nativer Disulfidbrücken müssen zudem Reduktionsmittel zugesetzt werden. Im Jahre 1996 wurde für die Proteinrückfaltung die *artificial chaperone* Technik eingeführt. Im ersten Schritt wird dabei das denaturierte und reduzierte Protein von Detergenzmolekülen in Form von gemischten Micellen aus Detergenz und denaturiertem Protein eingefangen. Im zweiten Schritt werden die Detergenzmoleküle zumeist durch β -Cyclodextrin aus dem Protein-Detergenz-Komplex entfernt. Hierdurch wird es den Proteinen ermöglicht in ihre native Struktur zurückzufalten. Um die Ausbildung nativer Disulfidbrücken zu ermöglichen muss ein Oxidationsmittel zugesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges *artificial chaperone* System zur in vitro Rückfaltung von Proteinen unter Verwendung oxidativer Detergenzien etabliert. Als Modellprotein wurde Lysozym verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass sich Gemini-Detergenzien der Form Det-S-S-Det, bei denen die hydrophilen Kopfgruppen über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, zur oxidativen Rückfaltung im *artificial chaperone* System eignen. Das etablierte System unterscheidet sich erheblich von den bisher bekannten, da während der Proteinfaltung Detergenzien kovalent an das Protein gebunden werden. Es wurden daher die Einflüsse von Protein- und Denaturierungsmittelkonzentration sowie der Hydrophobizität des verwendeten Detergenz auf Rückfaltungsausbeute und Kinetik untersucht. Insbesondere Detergenzien mit einer weniger stark ausgeprägten Hydrophobizität zeigten dabei hohe Rückfaltungsausbeuten. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten kinetischen Modell zur in vitro Proteinfaltung lässt sich der Faltungsvorgang als "Konkurrenz" zwischen Faltung und Aggregation beschreiben. Die kinetischen Untersuchungen der Proteinfaltung zeigten, dass es mit zunehmender Hydrophobizität der Disulfid-Detergenzien zu einem nahezu exponentiellen Anstieg der Geschwindigkeitskonstante der Aggregation kommt. Auf der anderen Seite wird eine minimale Hydrophobizität der Disulfid-Detergenzien für eine maximale Geschwindigkeitskonstante der Faltung benötigt.

Um den Einfluss der in das Protein intermediär eingeführten hydrophoben Gruppen noch besser zu verstehen, wurde denaturierte und reduzierte RNase A ohne *artificial chaperone* System mit Disulfid-Detergenzien oxidiert.

RNase A neigt selbst im reduzierten Zustand und bei hoher Konzentration nicht zur Präzipitation, so dass der Einfluss der hydrophoben Gruppen auf die Löslichkeit und Aggregation unmittelbar zu beobachten war. Hier zeigte sich ebenfalls, dass eine Präzipitation des Proteins mit zunehmender Hydrophobizität des Disulfid-Detergenz begünstigt wird.