

**Untersuchungen zur Rückfaltung von
Urease aus *Canavalia ensiformis* und RNase A
aus Rinderpankreas durch Gradienten-SEC**

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Antje Cornelius

Hamburg-Bergedorf, Fakultät Life Sciences

am 27. April 2012

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Organische Chemie und Biochemie an der Fakultät Life Sciences der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) in Hamburg.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Birger Anspach**
- 2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Töpfke**

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig, ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Wörtlich oder dem Sinn gemäß aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Antje Cornelius

Hamburg, den 27. April 2012

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer, Prof. Dr. Birger Anspach, für die wissenschaftliche Betreuung, die aufbauenden Worte und die mir entgegen gebrachte Geduld während der gesamten Arbeit bedanken. Er gab mir die Möglichkeit die Arbeit im Labor für Organische Chemie und Biochemie an der Fakultät Life Sciences der HAW Hamburg durchzuführen.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. Susanne Töpfke, welche sich freundlicher Weise als zweite Gutachterin dieser Arbeit bereit erklärt hat.

Außerdem möchte ich mich bei allen Studenten und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Labors für Organische Chemie und Biochemie, sowie dem Labor für Instrumentelle Analytik bedanken – welche mir stets hilfreich zur Seite standen und durch das eine oder andere Gespräch wieder Licht ins Dunkel des Laboralltags gebracht haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, welche mich immer unterstützt und aufgefangen hat. Insbesondere danke ich meinen Eltern, welche mir das Studium ermöglicht haben und immer noch ermöglichen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Bruder bedanken, der mir immer mit seinen wissenschaftlichen Ratschlägen zur Seite stand und mich motiviert hat.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen	2
2.1. Struktur von Proteinen.....	2
2.2. Bakterielle Einschlusskörper – Inclusion Bodies	3
2.3. Denaturierung von Proteinen.....	5
2.4. Renaturierung von Proteinen	6
2.4.1. Herkömmliche Renaturierungsmethoden.....	9
2.4.2. Renaturierung durch Größenausschlusschromatographie (SEC).....	10
2.4.3. Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC.....	11
2.5. Fluoreszenzspektroskopie.....	12
2.5.1. Fluoreszenz von Proteinen	13
2.5.2. Quenching-Effekte	15
2.5.3. Streulichte effekte in der Fluoreszenzspektroskopie	16
2.6. Modellproteine.....	17
2.6.1. Urease.....	17
2.6.2. Ribonuklease A	19
3. Materialien und Methoden	21
3.1. Materialien.....	21
3.1.1. Verwendete Chemikalien	21
3.1.2. Pufferlösungen	22
3.1.3. Geräte und Software.....	23
3.1.4. Chromatographische Medien und Säulen für die SEC.....	23
3.1.5. Modellproteine	24
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Fluoreszenzspektroskopie	25
3.2.2. Proteindenaturierung	26
3.2.3. Bestimmung der charakteristischen Eigenschaften.....	26
3.2.4. Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten SEC	27
3.2.5. Quantitative Analytik der Urease-Renaturierung.....	28
3.2.5.1. Urease-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie	28
3.2.5.2. Umpufferung der renaturierten Urease-Proben	28
3.2.5.3. Bestimmung der Urease-Aktivität.....	29
3.2.5.4. Urease-Konzentrationsbestimmung mittels Enzymaktivität	33
3.2.6. Quantitative Analytik der RNase A-Renaturierung	33
3.2.6.1. RNase A-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie.....	33

3.2.7.	Bestimmung der Massenausbeute der renaturierten Proteine	34
4.	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1.	Charakteristische Eigenschaften und Entfaltungskurve von Urease	35
4.2.	Charakteristische Eigenschaften von Ribonuklease A	39
4.3.	Renaturierung mittels Harnstoff-Gradienten-SEC	40
4.3.1.	Renaturierung von Urease mittels Harnstoff-Gradienten-SEC	43
4.3.2.	Renaturierung von RNase A mittels Harnstoff-Gradienten-SEC.....	49
4.3.2.1.	Verwendung des Renaturierungspuffers Variante A	49
4.3.2.2.	Verwendung des Renaturierungspuffers Variante B	51
4.4.	Quantitative Analytik der RNase A-Renaturierungen (V4-V9)	53
4.5.	Quantitative Analytik der Urease-Renaturierungen (V1-V3).....	59
5.	Zusammenfassung.....	69
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Anhang.....	I

1. Einleitung

Der stetige Fortschritt in der Gentechnik ermöglicht es, eine Vielzahl von rekombinanten Proteinen industriell zu synthetisieren. Als Expressionssystem wird häufig der bakterielle Wirtsorganismus *Escherichia coli* verwendet, in welchen Vektoren mit der geforderten Gensequenz eingebracht werden. Durch die Wahl einer entsprechend gestalteten Promotorregion kann das Zielprotein in einer sehr hohen Rate exprimiert werden.

Auf Grund der hohen Ableserate des codierenden Gens kommt es zu einer steigenden translatorischen Aktivität und somit zu einer hohen Konzentration des exprimierten Proteins innerhalb der Zelle. Dieser Umstand kann jedoch dazu führen, dass die Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins einer erhöhten Fehlerrate unterliegt und stabilisierende Disulfidbrücken inkorrekt bzw. nicht ausgebildet werden.

Die in hohen Konzentrationen und zeitgleich fehlerhaft oder unvollständig gefaltet vorliegenden Proteine lagern sich zu dichten, unlöslichen Proteinaggregaten zusammen – den so genannten Inclusion Bodies. Da die Proteine in dieser Konformation größtenteils biologisch inaktiv sind, müssen Methoden zur Solubilisierung der Aggregate und zur Rückfaltung der Proteine in ihre native und somit biologisch aktive Form angewendet werden.

Eine für den Rückfaltungsprozess angewendete Methode ist die Größenausschlusschromatographie (engl.: „Size Exclusion-Chromatography“, auch SEC). Sie findet großen Zuspruch in der industriellen Biotechnologie, da sie unter anderem leicht automatisierbar und parallel anwendbar ist.

Dieser Methode werden die wesentlichen Vorteile zugeschrieben, dass durch das Porensystem die parallel ablaufenden Nebenreaktionen, wie Aggregationen und damit eine mögliche Fehlfaltung, weitestgehend unterbunden werden können – einhergehend mit einer Erhöhung der Ausbeute an nativem Protein. Außerdem kann durch diese Methode ein schonender Übergang des Proteins von denaturierenden in renaturierende Umgebungsbedingungen erreicht werden. Dieser Übergang kann durch die Ausbildung eines fallenden Harnstoff-Gradienten realisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die gewonnenen Erkenntnisse von Wilms (2010) über die Renaturierung von Lysozym mittels einer Harnstoff-Gradienten-SEC auf Basis eines Sephadex G-25-Mediums bei weiteren Modellproteinen – Urease aus *Canavalia ensiformis* und Ribonuklease A (auch RNase) aus Rinderpankreas – angewendet und somit eine mögliche Verallgemeinerung der Methode untersucht werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Struktur von Proteinen

Proteine sind Makromoleküle, welche in allen Zellen vorkommen und innerhalb dieser wichtige Funktionen einnehmen.

Der Aufbau eines Proteins ist im genetischen Code einer jeden Zelle festgelegt. Dabei sind die Grundbausteine aller natürlich vorkommenden Proteine Aminosäuren, welche prinzipiell immer die gleiche Grundstruktur haben. An ein zentrales Kohlenstoffatom sind vier Reste kovalent gebunden: ein Wasserstoffatom, eine variable Seitenkette (R) sowie eine Carboxyl-(-COOH) und eine Amino-Gruppe (-NH₂) als funktionelle Gruppen (vgl. Abb. 1).

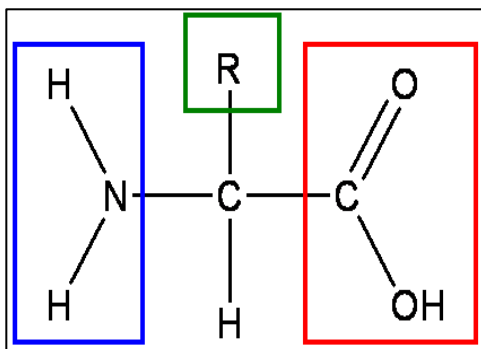


Abb. 1: Allgemeine Struktur von Aminosäuren (verändert nach Campbell, 2003)

Einzelne Aminosäuren werden durch Peptidbindungen zwischen der -COOH-Gruppe der einen und der -NH₂-Gruppe der anderen Aminosäure zu langen Polypeptidketten verknüpft, sodass jede Kette ein C- und ein N-Terminus besitzt.

Die hieraus resultierende Aminosäuresequenz wird auch als Primärstruktur von Proteinen bezeichnet.

Die räumliche Anordnung der Polypeptidketten kann durch Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Aminosäuren im Wesentlichen zwei verschiedene Konformationen einnehmen – eine schraubenförmige α -Helix und eine β -Faltblattstruktur. Diese hoch geordneten, intramolekularen Strukturen – auch als Sekundärstruktur bezeichnet – werden größtenteils durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert.

Die übergeordnete dreidimensionale Anordnung dieser Sekundärstruktur wird als Tertiärstruktur eines vollständig gefalteten Polypeptids bezeichnet. Sie ist für jedes Protein spezifisch und wird ebenfalls durch inter- und intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Eine Besonderheit bildet der sogenannte „hydrophobe Effekt“ bei löslichen Proteinen. Dieser bezeichnet die Anordnung von hydrophoben Polypeptidbereichen im Inneren eines Proteins, wogegen die hydrophilen Bereiche nach außen zum Lösungsmittel gerichtet sind. Zur weiteren Erhöhung der Stabilität der Tertiärstruktur können kovalente Bindungen zwischen benachbarten Cysteinresten der Aminosäurekette ausgebildet werden – sogenannte Disulfidbrücken (Knippers, 2006).

Die räumliche Anordnung einzelner Polypeptidketten zu einem aus mehreren Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex wird als Quartärstruktur bezeichnet.

2.2. Bakterielle Einschlusskörper - Inclusion Bodies

Der stetig steigende Bedarf an therapeutischen Proteinen bzw. Enzymen und deren Gebrauch in der Forschung und der Pharmazie verlangt nach immer schnelleren und kostengünstigeren industriellen Herstellungsverfahren.

Da die Gewinnung aus der natürlichen Matrix oftmals sehr aufwendig und wenig effizient ist, wurde die Expression rekombinanter Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen kontinuierlich weiter entwickelt. Hier wird verbreitet der bakterielle Organismus von *E. coli* verwendet – er gilt auf Grund seiner einfachen Handhabung und der schnellen und ökonomischen Produktion von rekombinanten Proteinen als das „Arbeitspferd“ der molekularen Biologie und der Biotechnologie (Jana und Deb, 2005; Clark und Pazdernik, 2009).

Durch die einleitend erwähnte praktizierte Überexpression von rekombinanten Proteinen, vor allem von eukaryontischen Produkten in prokaryontischen Organismen, werden häufig bakterielle Einschlusskörper gebildet. Diese Einschlusskörper sind meist von kugelförmiger bzw. elliptischer Gestalt und haben einen ungefähren Durchmesser von 0,5 bis 1,3 μm (Singh und Panda, 2005).

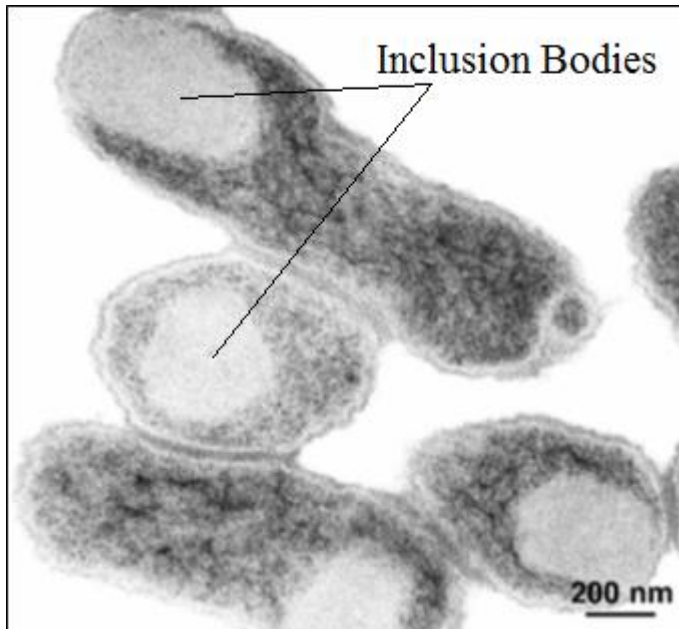


Abb. 2: Aufnahme von Inclusion Bodies in *Escherichia coli* mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops (verändert nach Jungbauer und Kaar, 2007)

Sie resultieren aus der Aggregation von fehlgefalteten, daher auch biologisch inaktiven Proteinen bzw. Faltungsintermediaten und lagern sich im Cytoplasma, teilweise auch im Periplasma ab.

Innerhalb einer Zelle wird häufig nur ein Inclusion Body gebildet, welcher in Abhängigkeit seiner Lage eine amorphe bis parakristalline Struktur aufweisen kann. Sie stellen unlösliche Aggregate dar und haben eine höhere Dichte als andere Zellkompartimente.

Auf Grund der dichten, lichtbrechenden Struktur kann man sie

vergleichsweise einfach mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops – wie in Abbildung 2 gezeigt – darstellen.

Die Ursache der Bildung dieser Aggregate wird in den Wechselwirkungen von randständigen hydrophoben Gruppen innerhalb der Polypeptidkette von teilweise bzw. fehlerhaft gefalteten Proteinen gesehen (Villaverde und Carrió, 2003).

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* führt häufig zu fehlgefalteten Proteinintermediaten und damit zu Inclusion Bodies, da dieser Syntheseapparat oftmals nicht über die notwendigen Eigenschaften zur Bildung von biologisch aktiven Proteinen verfügt. So werden viele Proteine posttranslational modifiziert – beispielsweise werden zahlreiche eukaryontische Proteine glykosyliert – dieser Mechanismus ist in Bakterien bislang nicht möglich. Ebenfalls kann es passieren, dass die korrekt translatierten Polypeptidketten nicht korrekt gefaltet und die zur Erhöhung der Stabilität vorgesehenen Disulfidbrücken nicht oder falsch synthetisiert werden (Brown, 2001).

Dennoch werden die beschriebenen Nachteile meist in Kauf genommen, da die Bildung von Inclusion Bodies bei der industriellen Herstellung von Proteinen auch Vorteile zu verzeichnen hat:

- die hohe Dichte und Stabilität der Inclusion Bodies ermöglicht eine einfache Isolation mittels Zentrifugation oder Größenausschlusschromatographie (Alibolandi und Mirzahoseini, 2011)
- hohe Konzentration des Zielproteins innerhalb des Inclusion Bodies: kann über 90 % sein (Ventura und Villaverde, 2006)
- daraus ergibt sich eine hohe Reinheit des Zielproteins innerhalb des Inclusion Bodies
- Schutz des Zielproteins vor proteolytischem Abbau

Obwohl ein bestimmter Anteil von Inclusion Bodies auch aus korrekt gefalteten und somit biologisch aktiven Proteinen bestehen kann (García-Fruitós et al., 2005), ist eine vollständige Solubilisierung der Proteinaggregate mittels denaturierenden und chaotropen Agenzien wie beispielsweise Harnstoff oder Guanidin-HCl und eine anschließende Renaturierung der Proteine unumgänglich. Das generelle Ziel eines Rückfaltungsprozesses ist dabei die Überführung des Proteins in seine native 3-dimensionale Struktur und damit die Wiedergewinnung eines biologisch aktiven Proteins.

2.3. Denaturierung von Proteinen

Nach der Isolierung der Inclusion Bodies erfolgt die Solubilisierung der aggregierten Zielproteine. Da die Inclusion Bodies in herkömmlichen Puffern schwer löslich sind, kommen hier denaturierende und chaotrope Agenzien in hohen Konzentrationen zum Einsatz – der Gebrauch von bis zu 8 M Harnstoff oder bis zu 6 M Guanidin-HCl ist am häufigsten publiziert (Villaverde und Carrió, 2003; Middelberg, 2002).

Die Verwendung dieser Agenzien erhöht die Löslichkeit der Proteine und führt dazu, dass diese ihre native Sekundär- und Tertiärstruktur verlieren und nicht klar definierte Strukturen innerhalb des Lösungsmittels einnehmen. Allerdings werden häufig Übergangszustände beobachtet – so nehmen die denaturierten Proteine zeitweise Zufallsknäuelstrukturen (auch „random coil“) an.

Allgemein sind beim Denaturierungsprozess von Proteinen mittels Harnstoff oder Guanidin-HCl Interaktionen zwischen dem denaturierendem Agenz und den hydrophoben Seitenketten des Proteins, sowie dessen Polypeptidrückgrat zu beobachten (Lindgren, 2010). Diese führen zu einer Schwächung des „hydrophoben Effekts“ und zerstören parallel die nicht-kovalenten Wasserstoffbindungen des Proteins, welche zur Aufrechterhaltung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur essentiell sind. Somit verliert das Protein seine native Konformation und damit auch die biologische Aktivität.

Neben den hydrophoben Wechselwirkungen und den stabilisierenden Wasserstoffbrücken werden die nativen Strukturen oftmals durch die in Abschnitt 2.1. *Struktur von Proteinen* beschriebenen Disulfidbrücken zusätzlich stabilisiert. Disulfidbrücken werden vorwiegend in extrazellulären Proteinen synthetisiert und entstehen durch die kovalente Bindung zwischen den Thiolgruppen zweier benachbarter cysteinhaltiger Seitenketten des Polypeptids. Bei der *in vivo*-Ausbildung der Disulfidbrücken ist vermutlich das cysteinhaltige Disulfid des Tripeptids Glutathion (GSSG) beteiligt, welches im Zuge einer Disulfid-Austauschreaktion zu einfachen Thiolgruppen im reduzierten Glutathion (GSH) umgesetzt wird (Horton et al., 2008). Um eine vollständige Entfaltung von beispielsweise extrazellulären Proteinen bzw. Proteinen mit ausgebildeten Disulfidbrücken zu erzielen, werden niedermolekulare Thiolenzen verwendet. Hier kommen vermehrt Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol zum Einsatz, welche die Cysteinreste in ihrer reduzierten Form halten und somit die Disulfidbrücken zerstören bzw. die spontane Ausbildung dieser verhindern (Wilms, 2010).

Zudem können auch andere bzw. einfachere Verfahren zur Entfaltung von Proteinen angewendet werden. Diese sind beispielsweise die Denaturierung mittels extrem hoher/niedriger pH-Werte oder Hitzeeinwirkung (Villaverde und Carrió, 2003). Allerdings muss hier verstärkt darauf geachtet werden, dass diese Methoden nicht zu einer Zerstörung der Aminosäuresequenz und damit zu einer irreversiblen Denaturierung der Proteine führt.

Als grundlegendes Puffersystem eignen sich die typischen Proteinpuffer wie z. B. TRIS-HCl- oder Phosphatpuffer. Allerdings sollte der eingestellte pH-Wert dem Optimum des Proteins angepasst werden und in jedem Fall vom isoelektrischen Punkt desselben abweichen, um das Zielprotein in Lösung zu halten (Singh und Panda, 2005).

2.4. Renaturierung von Proteinen

Nachdem die Inclusion Bodies solubilisiert und damit einhergehend denaturiert wurden, erfolgt die *in vitro*-Renaturierung der Proteine mit dem Ziel der Wiedergewinnung der biologisch aktiven Struktur. Die *in vitro*-Renaturierung von Proteinen ist ein komplexer Prozess, welcher durch viele verschiedene Faktoren beeinflusst wird. So müssen die richtige Temperatur, der eingestellte pH-Wert und die Eigenschaften des verwendeten Lösungsmittels beachtet und an das jeweils zu renaturierende Protein angepasst werden (Kayser, 2002).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass vollständig entfaltete Proteine unter bestimmten Umständen wieder in ihre native Struktur zurückfalten können. Als zentrale Frage dieses Vorgangs bleibt jedoch die Ursache bzw. die treibende Kraft dieser Rückfaltungsreaktion zu klären. In einem nach ihm benannten Paradoxon belegte Cyrus Levinthal bereits in den frühen 60'ern, dass die unterschiedlichen Faltungsvorgänge eines denaturierten Proteins in seine native Struktur keine zufälligen Prozesse sind (Levinthal, 1968).

Weitere Arbeiten von Christian Anfinsen zu diesem Thema resultierten in einem großen Fortschritt, der das Verständnis um den komplexen Renaturierungsprozess entsprechend verbessert hat. Er erkannte, dass die Informationen zur nativen 3-dimensionalen Struktur eines Proteins in dessen Aminosäuresequenz festgelegt sein können und dass das Protein in seiner nativen Konformation die thermodynamisch günstigste Struktur einnimmt (Anfinsen, 1973).

Die entscheidende Rolle bei allen Interaktionen, welche zur Faltung des Proteins führen, wird dem „hydrophoben Effekt“ in einer wässrigen Umgebung zugesprochen (Dill et al., 2008). Dieser Mechanismus ist bei allen Proteinen gleichermaßen ausgeprägt und beruht auf einer energetisch günstigen Anordnung der hydrophoben Aminosäureketten im Inneren eines Proteins. Die polaren Seitenketten werden zum Lösungsmittel ausgerichtet und sind demnach

an der Oberfläche eines Proteins angeordnet. Durch diese Anordnung wird ein frühes Faltungsintermediat erreicht, welches auch als „molten globule“ bezeichnet wird und durch einen hohen Gehalt an ausgebildeten Sekundärstrukturelementen sowie eine flexible und kompakte Struktur charakterisiert ist. Darauf folgt die Ausbildung zusätzlicher stabilisierender Wechselwirkungen wie beispielsweise elektrostatische Wechselwirkungen zwischen polaren Seitenketten, Van-der-Waals-Kräfte zwischen unpolaren Seitenketten sowie die Ausbildung nicht-kovalenter Wasserstoffbrücken und kovalenter Disulfidbrücken innerhalb des Proteins – die Tertiärstruktur wird ausgebildet und mit ihr die native biologisch aktive Proteinstruktur.

Durch die vielen Faltungsexperimente hat sich gezeigt, dass der Rückfaltungsprozess mit parallel ablaufenden Nebenreaktionen (z. B.: Aggregation und Fehlfaltungen) konkurriert. Während des Faltungsprozesses durchläuft das Protein zahlreiche Zwischenstrukturen, welche durch unterschiedliche Konformationen und energetische Zustände gekennzeichnet sind. Es treten diverse inter- und intramolekulare Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkungen auf, welche im Falle von inkorrekten Faltungsintermediaten wieder aufgebrochen und erneut hergestellt werden müssen (Schug und Onuchic, 2010).

Somit gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Intermediatzuständen, welche auf dem Weg

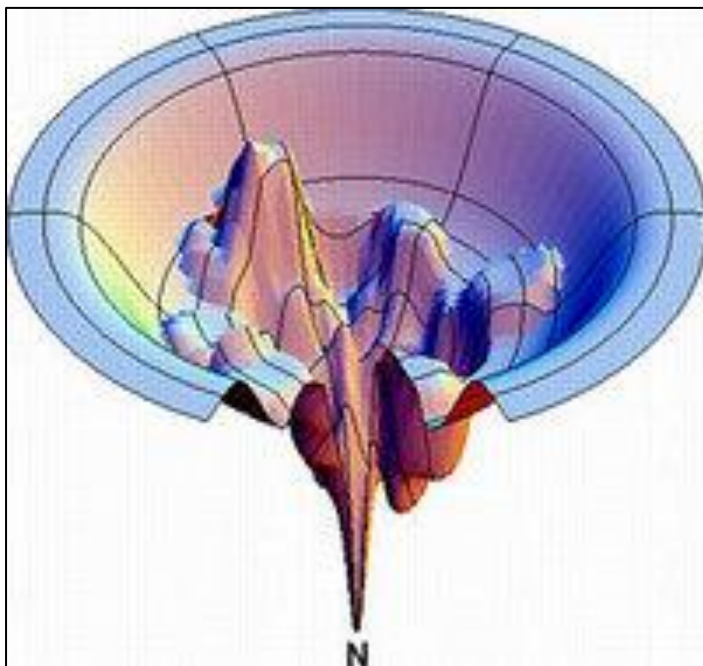


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Faltungstrichters. Die Faltung erfolgt von einem energetisch ungünstigen Zustand (äußerer Rand des Trichters) mit durchlaufen des „Tunnels“ in einen energetisch günstigen Zustand – dem des nativen Proteins (N). (nach Dill et al., 2008)

vom entfalteten Protein zur nativen Struktur durchlaufen werden. Weiterhin ist der Faltungsprozess mit einem Übergang von einer thermodynamisch ungünstigen hin zu einer thermodynamisch stabilen Konformation bestimmt – diese komplexen sowie kooperativen und sequenziellen Vorgänge werden im so genannten Faltungstrichter (vgl. Abb. 3) veranschaulicht. Das denaturierte und entfaltete Protein hat im gelösten Zustand eine sehr hohe freie Energie – dies entspricht dem äußeren, oberen Rand des Faltungstrichters.

Während des fortschreitenden Faltungsprozesses durchwandert das Protein den Faltungstrichter exemplarisch und nimmt mit der nativen Struktur eine energetisch günstige

Konformation an. Wie bereits erwähnt, können hierbei unerwünschte Intermediate entstehen, welche fehlerhaft ausgebildete Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen enthalten – diese können zu Aggregationen führen und die Ausbeute an nativem, biologisch aktiven Protein deutlich verringern.

Um die *in vitro*-Renaturierung zu verbessern und damit die Ausbeute an nativem Protein zu erhöhen, werden dem Renaturierungspuffer häufig Faltungsadditive zugesetzt. Dabei kommen besonders häufig niedermolekulare Substanzen wie z. B. Harnstoff oder auch Guanidin-HCl in geringen Konzentrationen zum Einsatz. Sie bewirken eine Reduktion der Aggregations-effekte während der Renaturierung, allerdings ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht geklärt. Weitere für die Renaturierung rekombinanter Proteine eingesetzte Faltungshelfer sind beispielsweise Aminosäuren wie L-Arginin und Prolin sowie die Detergenzien SDS, Triton X-100 oder Tween-80 (Alibolandi und Mirzahoseini, 2011). Bei der Verwendung von Detergenzien bleibt allerdings zu beachten, dass sie sich vergleichsweise schwer aus der Lösung entfernen lassen und somit weitere Aufreinigungsschritte erforderlich machen (Singh und Panda, 2005; Jungbauer und Kaar, 2007).

Ebenfalls können auch Salze, wie z. B. Natriumchlorid oder Ammoniumsulfat einen positiven Effekt auf die Renaturierungsausbeute haben. In geringen Konzentrationen wirken sie durch unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen, abhängig von der Ionenstärke des Lösungsmittels, stabilisierend auf rekombinante Proteine. Allgemein haben alle Faltungsadditive grundlegend gleiche Eigenschaften: sie Erhöhen die Löslichkeit der Proteine, vermindern Protein-Protein-Interaktionen welche zu Aggregationen führen können und stabilisieren somit die nativen Strukturen.

Für die Ausbildung von nativen Disulfidbrücken sollte im Renaturierungspuffer ein Redoxsystem vorhanden sein. Während der sogenannten „Disulfid-Austauschreaktion“ soll dieses Redoxsystem zum einen die Oxidation zweier benachbarter Cysteinreste zum Disulfid fördern und zum anderen fehlausgebildete Disulfidbrücken aufbrechen und somit die korrekte Ausbildung der nativen Disulfidbrücken unterstützen (Wang et al., 2010). Nach dem Vorbild physiologischer intrazellulärer Bedingungen werden häufig Kombinationen aus reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) im Verhältnis 10:1 im schwach alkalischen Milieu (pH 8-9) für *in vitro*-Renaturierungen verwendet. Neben diesen niedermolekularen Agenzien werden auch andere Varianten wie z. B. Dithiothreitol (DTT) und GSSG oder Cystin und Cystamin verwendet (Wang et al., 2010; Middelberg, 2002).

2.4.1. Herkömmliche Renaturierungsmethoden

Zur Überführung der entfalteten Proteine in ihre native und biologisch aktive Struktur, gibt es viele verschiedene Renaturierungsmethoden die derzeit Anwendung finden.

Eine grundlegende und einfach anzuwendende Methode ist die der Verdünnung. Hierbei wird die denaturierte Proteinprobe unter ständigem Rühren in einem bestimmten Verhältnis mit Renaturierungspuffer verdünnt. So wird die Konzentration des Proteins verringert und damit auch mögliche Protein-Protein-Interaktionen, welche zur Aggregation und parallel zum Verlust der Ausbeute an nativem Protein führen könnten. Üblicherweise wird soweit verdünnt, dass Proteinendkonzentrationen von 10 – 100 µg/ml erreicht werden (Jungbauer und Kaar, 2007).

Weiterhin findet die Renaturierung rekombinanter Proteine mittels Dialyse statt. Durch einen langsam durchgeführten Pufferaustausch wird der Übergang von denaturierenden zu renaturierenden Bedingungen schonend umgesetzt. Allerdings müssen hier Verluste durch die Bindung von Proteinen an die Membran verzeichnet werden und eine zu geringe Pufferaustauschrate führt vermehrt zu Fehlfaltungen und Aggregationen der Proteinintermediate (Basu et al., 2011). Sowohl die Renaturierung durch Verdünnung als auch durch Dialyse haben entscheidende Nachteile: sie lassen sich nur schwer im großen industriellen Maßstab anwenden. Beide Varianten benötigen große Volumina an kostenintensivem Renaturierungspuffer und sind sehr zeitaufwändig. Bei der Verdünnungsmethode muss zusätzlich noch ein finaler Aufkonzentrierungsschritt durchgeführt werden, um akzeptable Massen an nativem Protein zu erhalten. Daher wurden weitere Rückfaltungstechniken für den großen Maßstab erprobt, welche eine einfache Automatisierung ermöglichen und zugleich kostengünstiger sein können.

Hier kommen vor allem verschiedene Chromatographiesysteme zum Einsatz. Bei den Methoden der Ionenaustauschchromatographie (IEX) und IMAC (engl.: Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) werden die denaturierten Proteine reversibel an die stationäre Phase gebunden und unter definierten Bedingungen im Renaturierungspuffer eluiert. Die wesentlichen Vorteile dieser Methoden sind die Separation der denaturierten Proteine und damit die Reduktion von Aggregationseffekten (Li et al., 2004). Allerdings müssen diese Methoden den verschiedenen Proteineigenschaften angepasst werden und eignen sich daher nur für bestimmte Proteine.

Im folgenden Kapitel wird die in dieser Arbeit verwendete Methode der Größenausschlusschromatographie ausführlich beschrieben.

2.4.2. Renaturierung durch Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie oder auch Size Exclusion-Chromatographie (SEC) ist eine weit verbreitete Anwendung zur Entsalzung oder Umpufferung von Proteinlösungen. Die Grundlage dieser Trennung beruht in der unterschiedlichen Verteilung der zu trennenden Substanzen zwischen zwei verschiedene Phasen – der stationären und der mobilen Phase.

Das chromatographische Medium, also die stationäre Phase, ist in Säulen gepackt und besteht aus verschiedenen porösen Materialien welche in hohem Grad quervernetzt sind – z. B. Agarose oder Dextran. Das dicht gepackte und gleichzeitig quervernetzte Material bildet innerhalb der Säule verschieden große Poren aus, welche durch ihren Siebeffekt eine Trennung der mit der mobilen Phase aufgetragenen Moleküle verursacht.

Niedermolekulare Substanzen können durch Diffusion leicht in die Poren der stationären Phase eindringen (z. B.: Salze), während größere Moleküle (z. B.: Proteine) nur schwer oder gar nicht in das Porensystem eindringen können und davon ausgeschlossen sind – sie passieren die Säule im sogenannten Zwischenkornvolumen („Ausschlusseffekt“).

Die Elutionsreihenfolge wird durch den sterischen Ausschluss bestimmt: große Moleküle durchlaufen die Trennstrecke relativ ungehindert, während kleinere Moleküle einen längeren Weg durch das Porensystem zurücklegen und daher stärker retardiert werden. Die Trennung kommt also daher zustande, dass gelöste Substanzen die Säule mit abnehmendem Molekulargewicht zeitlich nacheinander verlassen.

Dieser Mechanismus wird im industriellen Maßstab für die Renaturierungsprozesse von rekombinanten Proteinen aus Inclusion Bodies verwendet, um die denaturierten und reduzierten Proteine durch einen Pufferaustausch in renaturierende Bedingungen zu überführen.

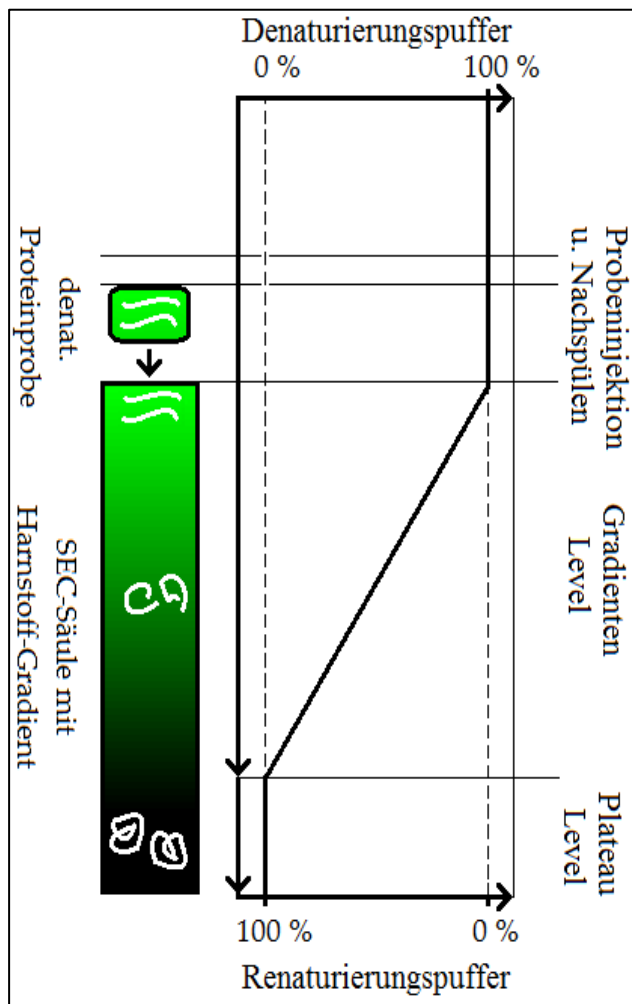
Die solubilisierte Proteinprobe wird auf einer zuvor mit Renaturierungspuffer equilibrierten SEC-Säule aufgetragen – auf Grund der unterschiedlichen Verteilungsraten, einhergehend mit den verschiedenen hydrodynamischen Volumina, werden die niedermolekularen Pufferkomponenten des Denaturierungspuffers (z. B.: Harnstoff, DTT) während des Durchlaufens der Trennstrecke von den denaturierten Proteinen getrennt. Diese Trennung führt zu einem lokalen Konzentrationsabfall des Denaturierungspuffers um das entfaltete Protein, welches mehr und mehr von Renaturierungspuffer umgeben wird und begünstigt somit die Rückfaltung desselben in seine native Konformation (Freydell et al., 2010).

2.4.3. Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC

Für die Renaturierung von rekombinanten Proteinen hat sich eine Erweiterung der oben beschriebenen Größenausschlusschromatographie (SEC) zunehmend durchgesetzt – die Verwendung eines zusätzlichen Harnstoff-Gradienten.

Diese Methode ermöglicht eine Verbesserung der Ausbeute an rückgefaltetem Protein, da der Übergang zwischen den verschiedenen Denaturierungs- und Renaturierungspuffersystemen schonender gestaltet werden kann. Dies soll zu einer Reduktion von möglichen Aggregations- und Fehlfaltungseffekten führen (Chen und Leong, 2010; Jungbauer et al., 2004).

Nachdem die Säule vollständig mit Renaturierungspuffer equilibriert wurde, erfolgt die Ausbildung eines linear steigenden Gradienten mit harnstoffhaltigem Denaturierungspuffer. Die Probeninjektion erfolgt im Anschluss an die Gradientenausbildung – dies ermöglicht



einen langsamen Übergang der entfalteten Probe von anfänglich denaturierenden in zunehmend renaturierungsfördernde Bedingungen.

Die denaturierte Proteinprobe wird demnach in gleich bleibenden Umgebungsbedingungen auf die Säule appliziert, durchläuft auf dem Weg durch die Säule den langsam fallenden Gradienten – was zu einer Rückbildung der nativen Strukturen führt – und geht unter idealen Bedingungen kurz vor der Elution in den Renaturierungspuffer über (vgl. Abb. 4).

Für die praktische Umsetzung dieser Methode, muss die Säulenlänge und damit einhergehend die Form und Länge des Harnstoff-Gradienten sowie die Fließmittelgeschwindigkeit angepasst werden (Wilms, 2010; Li et al., 2004).

Abb. 4: Schematische Darstellung der Ausbildung eines Harnstoff-Gradienten und Veranschaulichung des Rückfaltungsmechanismus innerhalb der Säule (verändert nach Wilms, 2010)

2.5. Fluoreszenzspektroskopie

Die allgemeine Definition der Fluoreszenz bezeichnet die Absorption von Licht bestimmter Anregungswellenlängen durch Moleküle und die daraus resultierende Emission von Licht höherer Wellenlängen.

Die durch elektromagnetische Strahlung eingetragene Energie wird von den außenliegenden Elektronen eines Moleküls absorbiert und resultiert in einer Änderung seines Energiezustands. Der Grundzustand von Molekülen wird mit S_0 bezeichnet und spiegelt den thermodynamisch günstigsten, energieärmsten und stabilsten Zustand wieder. Als Folge eines Energieeintrags nehmen die Elektronen einen Zustand höherer Energie ein (S_1 oder S_2) – dabei kommt es zu einer Änderung der Energieform: beispielsweise kann die Strahlungsenergie in Rotations-, Schwingungs- oder Anregungsenergie umgewandelt werden.

Der Zustand höherer Energie wird nur für einen sehr kurzen Zeitraum gehalten, da die Elektronen das Bestreben haben wieder in den stabilen Grundzustand S_0 zurück zu kehren – die aufgenommene zusätzliche Energie wird also wieder abgegeben.

Die verschiedenen Energieübergänge zwischen dem Grundzustand und den angeregten Zuständen werden in Jablonski-Diagrammen veranschaulicht (vgl. Abb. 5). Bei der Betrachtung dieses Diagramms wird deutlich, dass die Übergänge aus verschiedenen Energiezuständen unterschiedliche Eigenschaften haben. Der Übergang zwischen den

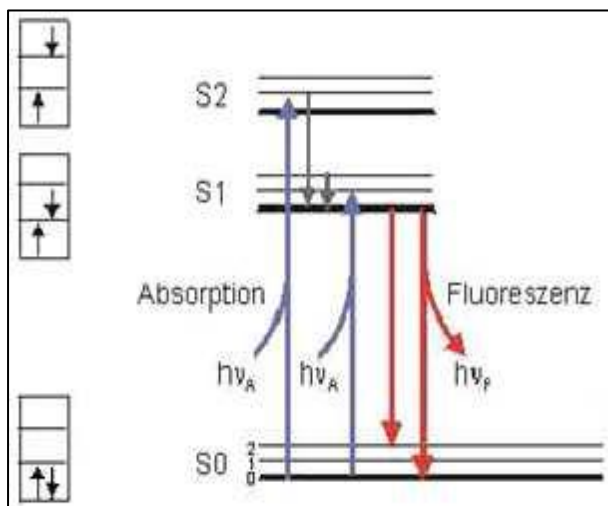


Abb. 5: Darstellung eines Jablonski-Diagramms (nach Wilms, 2010)

energetisch höheren Zuständen S_2 und S_1 erfolgt durch Energieabgabe in Form von z. B. Wärme. Beim folgenden Übergang von dem Zustand S_1 auf den Grundzustand wird Energie in Form von Licht abgegeben – auch Emission genannt. Bedingt durch die 2-stufigen Energieabgabe, ist die emittierte Strahlungsenergie niedriger als die der Anregung.

Als Konsequenz hat das emittierte Fluoreszenzlicht eine höhere Wellenlänge, was in der Stokes'schen Regel begründet

liegt (Lakowicz, 1999). Eine Besonderheit der Fluoreszenzspektroskopie ist die Messung der Emission, im Gegensatz dazu werden bei den meisten spektroskopischen Verfahren die Absorptionen gemessen.

2.5.1. Fluoreszenz von Proteinen

Für Untersuchungen der Struktur bzw. der Strukturänderungen von Proteinen eignen sich die sogenannten intrinsischen Fluorophore – sie sind in der Lage eigenständig im UV-Bereich zu fluoreszieren. Diese Fluorophore sind die natürlichen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp).

Die Absorptionsmaxima der einzelnen Aminosäuren liegen bei 258 nm (Phe), 277 nm (Tyr) und 280 nm (Trp) – wobei die Absorptionskoeffizienten mit einem Verhältnis von 1 : 7 : 27 verdeutlichen, dass Tryptophan den größten Anteil des Anregungslichts absorbiert und demnach auch am intensivsten Fluoreszenzlicht emittiert. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wird stets mit Licht höherer Wellenlängen (≥ 280 nm) angeregt, da die Fluoreszenz des Phenylalanins in wässriger Lösung sehr schwach ist und somit zu vernachlässigen ist (vgl. Abb. 6).

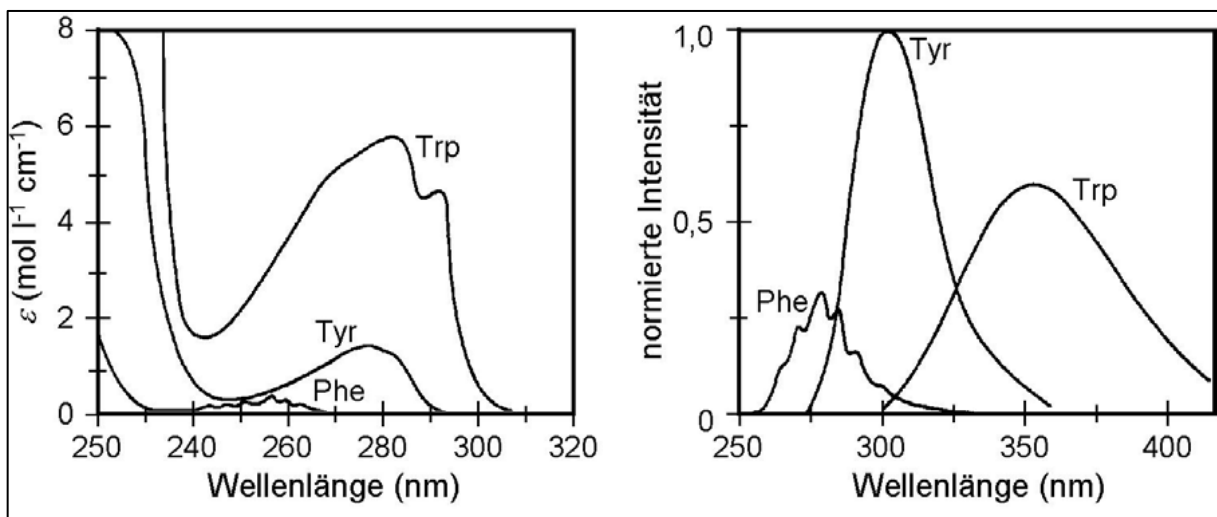


Abb. 6: Darstellung der Absorptions- und Emissionsmaxima der drei intrinsischen Fluorophore Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) (nach Lakowicz, 1999)

Nach der erfolgten Anregung durch ultraviolette Strahlung liegen die Emissionsmaxima der drei Aminosäuren bei 282 nm (Phe), 303 nm (Tyr) und 353 nm (Trp). Hieraus lässt sich relativ einfach erkennen, dass das Phenylalanin genau in dem Wellenlängenbereich Licht emittiert in welchem die beiden Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan absorbieren. Diese Erscheinung wird als Fluoreszenzlöschung (auch Quenching) bezeichnet und charakterisiert den strahlungslosen Energietransfer.

Obwohl Tyrosin in wässriger Lösung relativ stark bei 280 nm absorbiert, ist die Intensität des Fluoreszenzlichts meist eher gering – dies kann ebenfalls durch das Quenching begründet sein. Die Tyrosinfluoreszenz wird zum einen durch den oben beschriebenen strahlungslosen

Energietransfer zum Tryptophan verringert, andererseits auch durch Interaktionen mit Peptidbindungen, geladenen Seitengruppen benachbarter Aminosäuren oder Phosphationen gequenchet.

Die Eigenschaften der Tryptophanfluoreszenz sind sehr stark von der Polarität des umgebenden Lösungsmittels abhängig – dieser Effekt ist bei Tyrosin weniger stark ausgeprägt. Unter hydrophilen, also polaren Umgebungsbedingungen, steht das Tryptophan in direktem Kontakt mit dem wässrigen Lösungsmittel und hat ein Emissionsmaximum bei rund 353 nm. Erfolgt die Messung allerdings unter hydrophoben und damit unpolaren Umgebungsbedingungen, verschiebt sich das Emissionsmaximum in Bereiche kleinerer Wellenlängen – auch als Blauverschiebung bezeichnet. Genau diese Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz wird ausgenutzt um Änderungen innerhalb der Struktur von Proteinen verfolgen zu können.

Auf Grund ihres aromatischen Ringsystems sind alle intrinsischen Fluorophore eher unpolar und damit an den hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren eines Proteins beteiligt. Wird die Proteinstruktur verändert und entfaltet, z. B. in Folge eines Denaturierungsprozesses, können die Fluorophore und damit auch Tryptophan an die Proteinoberfläche treten und sind somit zum wässrigen Medium ausgerichtet. Kurz gesagt: das Maximum der Tryptophanfluoreszenz liegt bei nativen Proteinen in Bereichen kleinerer Wellenlängen und wird bei denaturierten Proteinen in Bereiche größerer Wellenlängen (350-353 nm) verschoben.

Ein weiterer durch die Denaturierung der Proteine zu beobachtender Effekt ist die Intensitätszunahme des Fluoreszenzlichts. Durch die Entfaltung der Proteine wird der räumliche Abstand zu potentiell quencheden Strukturen wie Peptidbindungen und anderen Aminosäuren größer, sodass die emittierte Strahlung einer geringeren Fluoreszenzlöschung unterliegt (Lakowicz, 1999; Lotte, 2004).

2.5.2. Quenching-Effekte

Unter dem Begriff Fluoreszenzlöschung bzw. Quenching werden verschiedene Mechanismen zusammengefasst, welche die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts verringern bzw. komplett auslöschen.

Grundsätzlich können Quencher verschiedener Natur sein – so kann das Quenching durch intermolekulare Wechselwirkungen mit Ionen, Peptidbindungen oder anderen niedermolekularen Substanzen oder dem Lösungsmittel selbst verursacht werden.

Kommt es zu einem Zusammenstoß eines angeregten Fluorophors mit einem Quencher, kann die Anregungsenergie vollständig oder auch nur teilweise auf den Quencher übertragen werden – die zusätzliche Energie wird vom Quencher umwandelt und z. B. als Wärme wieder freisetzt. Daraus ergibt sich zeitgleich ein proportionaler Zusammenhang zwischen dem Grad der Fluoreszenzlöschung und der Konzentration potentieller Quencher: Je höher die Konzentration eines quenchenden Faktors, desto höher ist auch die Verringerung der Fluoreszenzintensität.

Neben diesen Mechanismen wird ein bestimmter Teil der Anregungsenergie durch innere Umformung (auch „internal conversion“) in Schwingungsenergie oder Wärme umgewandelt und vermindert dadurch ebenfalls die Fluoreszenzintensität. Diese Vorgänge werden generell als intramolekulare Relaxationen bezeichnet und sind stark von der Temperatur des umgebenden Lösungsmittels abhängig. Dies wiederum verlangt nach einer relativ konstanten Temperatur während der Fluoreszenzmessungen – schon Temperaturerhöhungen von 10 °C bewirken eine Abnahme der Intensität der Tryptophanfluoreszenz um rund 20 % (Böhm, 2005)

Weiterhin kann es zu intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren und den Lösungsmittelmolekülen kommen, sodass beispielsweise Wasserstoffbrücken oder Komplexe ausgebildet werden (Lotte, 2004; Galler und Müller, 1988). Generell ist darauf zu achten, dass das verwendete Lösungsmittel (z. B.: Pufferkomponenten) weder im Bereich der Anregungswellenlänge absorbieren noch im Bereich der Emissionswellenlänge emittieren und damit die Signale verfälschen.

2.5.3. Streulichteffekte in der Fluoreszenzspektroskopie

Neben der bisher beschriebenen Absorption elektromagnetischer Strahlung von Molekülen kann ein bestimmter Teil des einfallenden Lichts zusätzlich in verschiedene Richtungen gestreut werden. Die Streuung kann als eine Art Wechselwirkung oder Stoßvorgang zwischen dem einfallenden Licht und den in Lösung befindlichen Molekülen gesehen werden.

Bei der Streuung wird zwischen zwei Arten unterschieden: zum einen die elastische Streuung ohne Energieübertragung und die unelastische Streuung, die mit einer Energieübertragung einhergeht. Im ersten Fall spricht man von der so genannten Rayleigh-Streuung, welche ein Emissionssignal im Bereich der Anregungswellenlänge verursacht. Dies ist darin begründet, dass das Streulicht keiner Phasenverschiebung unterliegt – lediglich die Intensität des Streulichts unterscheidet sich von der des Anregungslichts und ist zudem abhängig von der Polarität des Lösungsmittels. Zudem können Verunreinigungen oder aber auch aggregierte Proteinmoleküle die Intensität dieses Streulichteffekts verstärken.

Ein weiterer Fall wird durch die unelastische Streuung beschrieben, bei welcher das Streulicht im Vergleich mit dem Rayleigh-Peak ein Emissionssignal im Bereich höherer Wellenlängen und geringerer Intensitäten verursacht – die Raman-Streuung (vgl. Abb. 7). Die Ursache der höheren Wellenlänge ist durch den Energieverlust des Streulichts bedingt. Dieser Streulichteffekt wird allerdings erst bei größeren Verdünnungsstufen sichtbar (Rouessac und Rouessac, 2007).

Bedingt durch die höhere Streuordnung der Monochromator-Gitter treten zusätzliche Peaks bei allen Vielfachen der Anregungswellenlängen auf (Wilms, 2010).

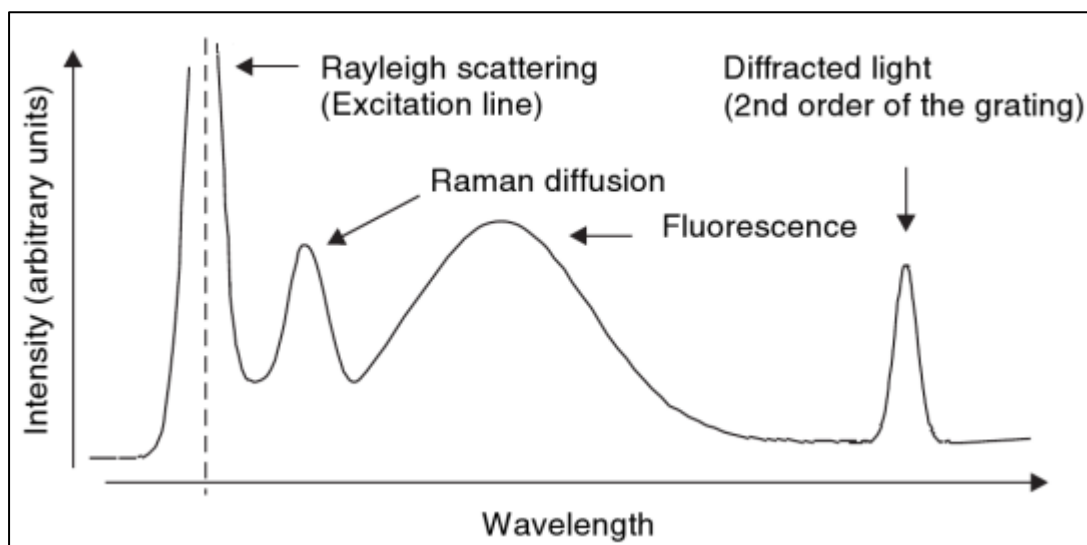


Abb. 7: Verallgemeinerte Darstellung der unterschiedlichen Streulichteffekte bei der Fluoreszenzspektroskopie (nach Rouessac und Rouessac, 2007)

2.6. Modellproteine

2.6.1. Urease

Die Urease aus der Jackbohne (lat.: *Canavalia ensiformis*) ist das erste Enzym, welches in reiner Form isoliert und anschließend kristallisiert werden konnte. Dieser bedeutende Schritt gelang dem amerikanischen Chemiker J. B. Sumner im Jahr 1926, wofür er 1946 zusammen mit den beiden Biochemikern J. H. Northrop und W. M. Stanley mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet wurde (Sumner, 1926; Sumner 1946).

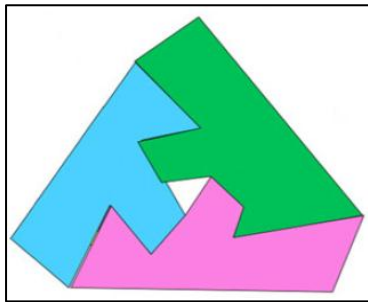


Abb. 8: Schematische Darstellung der Anordnung einzelner Monomere zu einer trimeren Untereinheit (nach Balasubramanian & Ponnuraj, 2010)

Urease liegt in seiner nativen Konformation als Hexamer vor – welches aus der Übereinanderlagerung von 2 identischen Trimeren entsteht. Die monomeren Untereinheiten setzen sich aus 840 Aminosäuren zusammen, haben eine Hammer- oder T-förmige Gestalt, eine Größe von rund 90 kDa und werden durch eine einzige Disulfidbrücke stabilisiert. Jeweils 3 Monomere lagern sich in einer dreiecksförmigen Anordnung zusammen und bilden so ein grundständiges Trimer (vgl. Abb. 8). Bei der Übereinanderlagerung zweier Trimere werden diese durch 9 Wasserstoffbrücken und zahlreiche weitere Wechselwirkungen zu der nativen, sehr stabilen hexameren Struktur mit einer Molekülgröße von ca. 540 kDa verbunden (vgl. Abb. 9).

Im aktiven Zentrum einer monomeren Urease-Einheit sind 2 Nickel-Ionen kovalent gebunden, weshalb es zu den Metalloenzymen gezählt wird. Diese Bindung wird als sehr stark und spezifisch beschrieben. Das erste Nickel-Ion wird über die Aminosäuren His (519, 545) und Lys (490) gebunden, während die Aminosäuren His (407, 409), Asp (633) und Lys (490) mit dem zweiten Nickel-Ion interagieren. Die beiderseitige Wechselwirkung von Lys (490) mit dem ersten und dem zweiten Nickel-Ion ist dadurch zu erklären, dass diese Aminosäure eine Art Brücke zwischen den beiden Nickelresten bildet – zusätzlich werden beide Nickel-Ionen durch einen Phosphatrest miteinander verbunden, welcher bei den bakteriellen Ureasen in *K. aerogenes* und *B. pasteurii* durch eine Hydroxid-Gruppe ersetzt wird (Balasubramanian und Ponnuraj, 2010).

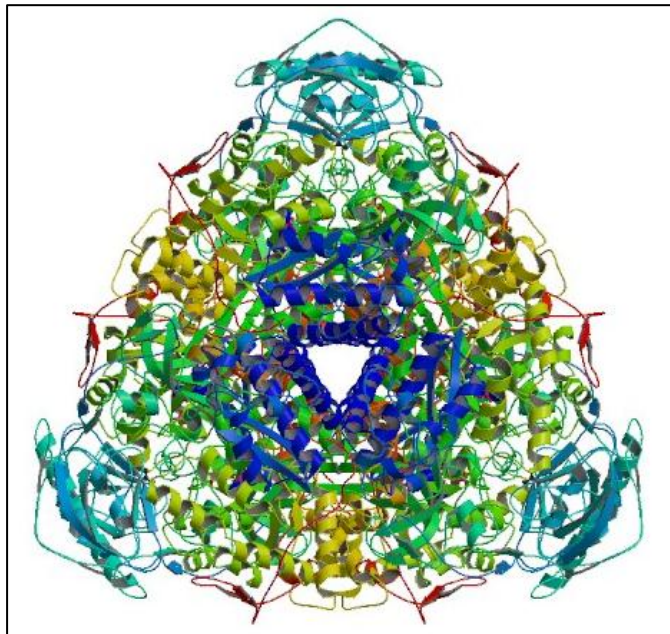
Die zu den Hydrolasen gehörende Urease katalysiert die hydrolytische Spaltung von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat – dabei zerfällt die zweite Komponente unter physiologischen Bedingungen spontan zu Kohlendioxid und einem weiteren Molekül Ammoniak, sodass man die Umsetzung von Harnstoff in zwei Molekülen Ammoniak und einem Molekül Kohlendioxid bilanzieren kann, was wiederum zu einem Anstieg des pH-Werts und der Leitfähigkeit des umgebenden Mediums führt.

2. Theoretische Grundlagen

Der Mechanismus der Harnstoffumsetzung wird für die bakteriellen Ureasen aus *K. aerogenes* und *B. pasteurii* wie folgt beschrieben: Das Sauerstoffatom der Carbonyl-Gruppe des Harnstoffs bindet an das erste Nickel-Ion und eine Amino-Gruppe bindet unter Wasserabspaltung an das zweite Nickel-Ion. Die überbrückende Hydroxid-Gruppe zwischen beiden Nickel-Ionen greift infolge dessen das C-Atom des Harnstoffs an, was zur Bildung von Ammoniak und Carbamat führt. Die präzisen Abläufe der katalytischen Umsetzung sind allerdings noch weitestgehend unklar (Balasubramanian & Ponnuraj, 2010), ähnlich wie die vorkommenden Strukturen die natürliche biologische Aktivität aufweisen – es wird angenommen dass sowohl die trimere als auch die monomere Struktur zur katalytischen Spaltung von Harnstoffs befähigt ist (Omar und Beauregard, 1995; Hirai et al., 1993). Neben Harnstoff als Hauptsubstrat der Urease, können auch andere Substrate wie z. B. Acetamid, N-Methylharnstoff oder Hydroxycarbamid umgesetzt werden (Follmer, 2008).

Somit nimmt dieses Enzym eine wichtige Rolle im Stickstoffhaushalt vieler Organismen ein – neben Pflanzen, Pilzen und Bakterien wird Urease auch in Hefen und Algen produziert (Balasubramanian und Ponnuraj, 2010; Krajewska und Ciurli, 2005).

Innerhalb der Polypeptidkette einer monomeren Untereinheit sind an den Positionen 495, 648, 708 und 728 insgesamt 4 Tryptophane vorhanden. Dieser Umstand wird für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen zum De- und Renaturierungsverhalten der Urease ausgenutzt. Die denaturierte und reduzierte Urease hat bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm ein Emissionsmaximum bei 346 nm, während für die native hexamere



Struktur ein Emissionsmaximum bei 330 nm beobachtet wurde. Dies lässt

Abb. 9: Darstellung der Kristallstruktur von Urease aus *Canavalia ensiformis* (nach Internet I, 2012)

darauf schließen, dass die Tryptophanreste im nativen Zustand im Inneren des Proteins vergraben liegen und durch denaturierende Bedingungen zum Lösungsmittel ausgerichtet werden (Omar und Beauregard, 1995).

2.6.2. Ribonuklease A

Allgemein zählen RNA-abbauende Enzyme zur Gattung der Ribonukleasen – so auch die gleichnamige Ribonuklease A (RNase A) aus Rinderpankreas, wobei der Zusatz „A“ die einfache Gestalt des Enzyms bezeichnet. Die RNase A gehört zu einem der am besten erforschten Enzyme und gilt als Modellprotein für Untersuchungen zur Stabilität von Proteinen sowie deren komplexen Faltungsprozesse.

Die Arbeiten begannen im Jahr 1938, als dem Mediziner und Mikrobiologen R. Dubos erstmalig die partielle Isolierung der RNase A gelang. Kurz darauf, im Jahr 1940, wird durch den Biochemiker M. Kunitz eine Methode zur Kristallisation dieses sehr stabilen Enzyms beschrieben (Kunitz, 1940). Es folgen in den Jahren 1963 und 1969 die vollständige Sequenzierung der Aminosäurekette und die ersten Erfolge zur Synthese rekombinanter RNase A (Smyth et al. 1963; Gutte und Merrifield, 1969).

Das Enzym ist mit einer Länge von 124 Aminosäuren und einem daraus resultierenden Molekulargewicht von ca. 13,8 kDa eher klein. Dennoch ist es ausgesprochen stabil und kann niedrigen pH-Werten, sowie Temperaturen von 5-100 °C Stand halten. RNase A ist ein monomeres, annähernd globuläres Enzym, welches in seiner Gestalt oftmals als nierenförmig bezeichnet wird.

In seiner Aminosäurekette sind alle proteinogenen Aminosäuren vertreten, dementsprechend auch die intrinsischen Fluorophore Tyrosin und Phenylalanin – mit Ausnahme von Tryptophan. Die acht enthaltenen Cysteinreste bilden zwischen den Positionen 26-84, 58-110, 40-95, 65-72 insgesamt vier stabilisierende Disulfidbrücken aus, wobei die beiden erstgenannten einen großen Teil zur thermodynamischen Stabilität der nativen Struktur beitragen.

Unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen werden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten der Positionen 40-95 und 65-72 zuerst destabilisiert, was zu einer vollkommenen Entfaltung der Polypeptidkette führt. Zur Untersuchung der de- und renaturierten Strukturen der RNase A mittels Fluoreszenzspektroskopie, müssen die Emissionssignale der insgesamt sechs Tyrosinreste analysiert werden (Raines, 1998). Sowohl für die denaturierte als auch für die native RNase A-Struktur werden bei einer Anregungswellenlänge von 268 nm Emissionsmaxima um 305 nm beschrieben. Allerdings unterscheiden sich die Fluoreszenzintensitäten sehr deutlich voneinander: nach der vollständigen Entfaltung der RNase A ist die Fluoreszenzintensität der denaturierten Struktur rund 2,5-mal höher als die der nativen Struktur (Krebs et al., 1984; Lin und Brandts, 1983).

2. Theoretische Grundlagen

Die Sekundärstruktur wird durch eine lange vierfaltige, antiparallele β -Faltblattregion und drei kurze α -Helices bestimmt – das aktive Zentrum ist unterdessen in der räumlichen Furche mit für die katalytische Aktivität wichtigen Aminosäuren Histidin (Position 12 und 119) und Lysin (Position 41) lokalisiert (vgl. Abb. 10).

In Umgebungen mit physiologischen pH-Werten ist die RNase A – bedingt durch einen isoelektrischen Punkt (pI) bei 9,3 – positiv geladen und katalysiert die Spaltung einzelsträngiger Ribonukleinsäuren (RNA). Es erkennt die Pyrimidine Uracil und Cytosin und spaltet die Phosphodiesterbindung an der 5'-Ribose eines Nukleotids und der Phosphatgruppe der benachbarten 3'-Ribose des folgenden Nukleotids. Somit zählt dieses Enzym zu den

Endonukleasen da es in der Lage ist RNA an bestimmten Basen innerhalb ihres Strangverlaufs zu trennen und 3'-terminale Nukleosidphosphate zu bilden (Raines, 1998).

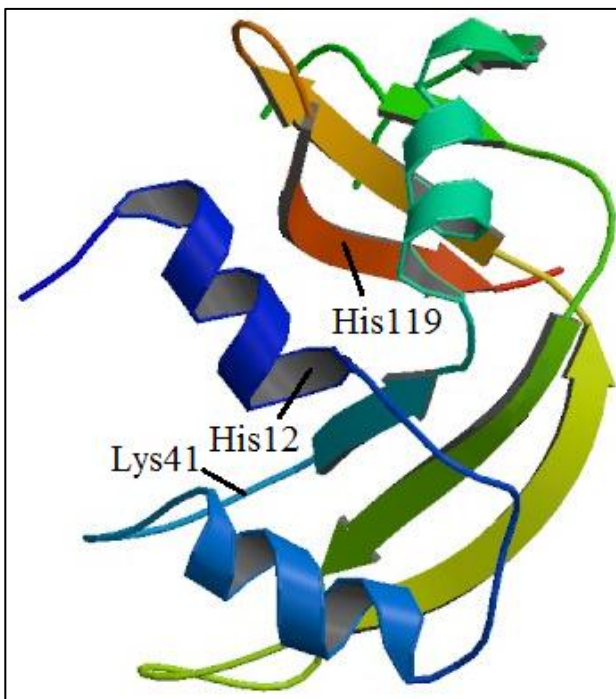


Abb. 10: Darstellung der Kristallstruktur von Ribonuklease A aus dem Rinderpankreas und den Aminosäuren His12, Lys41 und His119 im aktiven Zentrum (verändert nach Internet II, 2012)

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Für die Renaturierung und Analytik verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,4 – Dithiothreitol, $\geq 99\%$ p.a. (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid, z.A.	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Glutathion oxidiert, $\geq 98\%$ für die Biochemie (GSSG)	Roth, Karlsruhe
L-Glutathion reduziert, $\geq 98\%$ für die Biochemie (GSH)	Roth, Karlsruhe
Harnstoff, $\geq 99,5\%$ p.a. Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ p.a. ACS ISO (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, $\geq 99\%$ p.a. (NaPh)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, pellets for analysis (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorit-Lösung, 12 % Cl	Roth, Karlsruhe
Natriumsalicylat, $\geq 99,5\%$ p.a.	Roth, Karlsruhe
Nitroprussid-Natrium-Dihydrat, $\geq 99\%$ p.a. ACS	Roth, Karlsruhe
Ribonuklease A, salzfrei 90 U/mg (Kunitz)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, $\geq 99\%$ (TRIS)	Fluka Biochemika, Mannheim
Urease, lyophilisiert ≥ 5 U/mg EC 3.5.1.5.	Merck, Darmstadt

3.1.2. Pufferlösungen

Für die verschiedenen Prozessabschnitte und die Analytik wurden unterschiedliche Pufferlösungen benötigt. Die folgenden Angaben zur Einwaage beziehen sich jeweils auf 1 L der entsprechenden Pufferlösung. Alle Puffer wurden mit 2M HCl und 1M NaOH auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und für den Einsatz an Chromatographieanlagen mindestens zweimal durch einen Cellulose Acetat-Filter (Porengröße: 0,45 µm) mit Hilfe einer Vakuumpumpe (DIVAC 2,4 L, Leybold) entgast.

Des Weiteren wurden alle Pufferlösungen innerhalb einer Woche verbraucht oder erneuert.

Tabelle 2: Denaturierungspuffer

Chemikalie	Stoffmengenkonzentration c [mol/l]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]	pH-Wert
TRIS	0,10	121,14	12,11	7,4
Harnstoff	8,00	60,06	480,48	
DTT	0,03	154,20	4,63	
NaCl	0,20	58,44	11,69	

Tabelle 3: Renaturierungspuffer Variante A

Chemikalie	Stoffmengenkonzentration c [mol/l]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]	pH-Wert
TRIS	0,10	121,14	12,11	7,4
NaCl	0,20	58,44	11,69	
GSH	0,0060	307,33	1,84	
GSSG	0,0006	612,60	0,38	

Tabelle 4: Renaturierungspuffer Variante B

Chemikalie	Stoffmengenkonzentration c [mol/l]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]	pH-Wert
TRIS	0,10	121,14	12,11	7,4
NaCl	0,20	58,44	11,69	
GSH	0,0060	307,33	1,84	
GSSG	0,0006	612,60	0,38	
Harnstoff	2,00	60,06	120,12	

3. Materialien und Methoden

Tabelle 5: Allgemeiner Probenpuffer für die Urease-Analytik

Chemikalie	Stoffmengenkonzentration c [mol/l]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]	pH-Wert
NaPh	0,08	156,01	12,48	7,0

3.1.3. Geräte und Software

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Geräte und die dazu gehörige Software

Geräte	Software	Hersteller
UltraSpec 2100pro UV/VIS-Spektrophotometer	SWIFT® II	Amersham Biosciences
ÄKTApurifier 100 Chromatographiesystem	UNICORN® 5.2	GE Healthcare
RF-5301PC Spektrofluorophotometer	Panorama Fluorescence® 2.1	Shimadzu

3.1.4. Chromatographische Medien und Säulen für die SEC

Für die Rückfaltungsversuche wurde ein Sephadex™ G-25 (medium)-Material der Firma GE Healthcare (Uppsala, Schweden) als stationäre Phase verwendet – die folgenden Eigenschaften beziehen sich auf Herstellerangaben.

Dieses Material besteht aus quervernetztem Dextran und ist bei der Verwendung von wässrigen Pufferlösungen über einen weiten pH-Bereich von pH 2-13 stabil. Durch die verschiedenen großen Partikel im Bereich von 85-260 µm und der daraus resultierenden Porengrößenverteilung wird für globuläre Proteine ein Fraktionierungsspektrum zwischen 1-5 kDa angegeben.

Das Sephadex™ G-25-Material wurde manuell in eine C 10/40-Säule mit einem einfachen Adapter gepackt, welche ebenfalls vom Hersteller GE Healthcare bezogen wurde. Die gemessene Betthöhe lag bei rund 36,5 cm – somit ergab sich ein ungefähres Säulenvolumen von ca. 28,7 ml. Während der Versuchsdurchführungen wurde der Arbeitsdruck stets unter 0,35 MPa (entspricht 3,5 bar) gehalten (Wilms, 2010).

3.1.5. Modellproteine

Die in dieser Arbeit verwendete Urease (EC 3. 5. 1. 5., lyophilisiert aus *Canavalia ensiformis*, ≥ 5 U/mg) wurde von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Die Spezifikation der verwendeten Charge ergibt eine Urease-Aktivität von 8 U/mg.

Weitere Untersuchungen zum Renaturierungsverhalten wurden mit Ribonuklease A aus dem Rinderpankreas (EC 3. 1. 27. 5., lyophilisiert, salzfrei, 90 mg/U) der Firma Roth, Karlsruhe durchgeführt.

3.2. Methoden

3.2.1. Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme aller 2D-Emissions-Spektren der verschiedenen Proben erfolgte mit dem Spektrofluorophotometer RF-5301 PC der Firma Shimadzu, Duisburg. Zur Erzeugung der Anregungswellenlängen wurde eine 150 W starke Xenonlampe verwendet, welche mindestens 15 min vor jedem Messintervall eingeschaltet wurde, damit die Messungen bei konstanten Temperaturen gewährleistet werden konnten.

Für die Messungen wurden die Proben in Präzisions-Quarz-Küvetten (Firma Hellma, Jena) des Typs Suprasil® (Typ-Nr. 101-QS) mit einer Schichtdicke von 10 mm überführt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei das Probenvolumen zwischen 2 bis 3 ml variierte. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichts erfolgte durch einen senkrecht zum Anregungsstrahlengang angebrachten Photomultiplier R 3788-02 (Firma Shimadzu, Duisburg).

Das Spektrofluorophotometer wurde durch einen externen Rechner und die dazu gehörige Software „Panorama Fluorescence 2.1“ gesteuert, welche gleichzeitig zur Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzspektren verwendet wurde. Hier wurden die im Folgenden genannten Einstellungen vorgenommen:

Tabelle 7: Verwendete Geräteeinstellungen zur Analyse mittels Fluoreszenzspektroskopie

Messmodus	2D-Emissions-Messung
Anregungswellenlänge	270 nm
Emissionsdetektion Start	250 nm
Emissionsdetektion Stop	600 nm
Anregungsschlitzbreite	10 nm
Emissionsschlitzbreite	10 nm
Messgeschwindigkeit	super
Empfindlichkeit	niedrig (RNase) bzw. hoch* (Urease)

* Diese Einstellung wurde dem Master-Projekt von Pohlmann und Zahn (2010) entnommen.

3.2.2. Proteindenaturierung

Zur Untersuchung der Renaturierungsprozesse der Modellproteine wurden die Lyophilisate der jeweiligen Enzyme zuerst in Denaturierungspuffer gelöst. Da sowohl die Urease als auch die Ribonuklease A sehr stabile Enzyme darstellen, wurde die Denaturierung über Nacht (ca. 14-15 h) vollzogen.

Um eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung während der Denaturierung gewährleisten zu können, wurde für alle Ansätze ein Gesamtvolumen von 5 ml zu Grunde gelegt. Die Einwaagen der jeweiligen Enzyme resultierten in Endkonzentrationen von 2,5 g/l für Urease und 3 g/l für die RNase A. Da Urease bei Raumtemperatur nur sehr schwer löslich ist, wurde die Lösung auf rund 35 °C erwärmt und parallel zur RNase A-Lösung kontinuierlich bei geringer Umdrehungszahl auf einem Magnetrührer gerührt.

Nachdem die denaturierten Proteinlösungen am folgenden Tag auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden diese für die Applikation auf die SEC-Säule vorbereitet oder direkt im Fluoreszenzspektrophotometer gemessen.

3.2.3. Bestimmung der charakteristischen Eigenschaften

Um die charakteristischen Eigenschaften der nativen und entfalteten Proteinstrukturen ermitteln zu können, wurden die 2D-Emissions-Spektren der jeweiligen Proteinlösungen sowie der verwendeten Puffer in Vorversuchen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm am Fluoreszenzspektrophotometer ermittelt.

Zusätzlich wurde die Entfaltungskurve von Urease mit steigenden Harnstoffkonzentrationen (0-8 M) im Denaturierungspuffer aufgenommen, um den fortlaufenden Übergang von der nativen in die entfaltete Struktur verfolgen zu können.

Zur Ermittlung der nativen Proteinstrukturen wurden 12,5 mg Urease-Lyophilisat bzw. 15 mg RNase A-Lyophilisat eingewogen und mit 5 ml Renaturierungspuffer aufgefüllt. Für die Aufnahme der 2D-Emissions-Spektren der entfalteten Proteinstrukturen und der Urease-Entfaltungskurve, wurden die gleichen Mengen der jeweiligen Lyophilisate in 5 ml des entsprechenden Denaturierungspuffers gelöst und entsprechend Kapitel 3.2.2. *Proteindenaturierung* verfahren. Somit ergaben sich für alle Ansätze konstante Proteinkonzentrationen von 2,5 g/l Urease bzw. 3 g/l RNase A.

Alle Urease-Lösungen wurden vor den Messungen im Verhältnis 1:5 mit dem jeweiligen Puffer verdünnt, da die Aufnahme der Emissions-Spektren der Urease-Lösungen bei hoher Empfindlichkeit (vgl. Kapitel 3.2.1. *Fluoreszenzspektroskopie*) durchgeführt wurden.

3.2.4. Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten SEC

Die Renaturierungsversuche der vollständig denaturierten Modellproteine wurden an einer Chromatographieranlage der Firma GE Healthcare (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Das verwendete Chromatographiesystem „ÄKTA™ purifier UPC 10“ besteht aus folgenden, werkseitig vorinstallierten Komponenten:

- Controller-Einheit: CU-950
- Laufpuffer-Pumpen: P-900, max. 10 ml/min
- Mischzelle (Mixer): M-925 (0,6 ml)
- Injektionsventil: INV-907
- Detektoren: UPC-900-Kombi-Einheit zur Messung und Anzeige von UV-Absorption (280 nm, Pfadlänge: 2 mm, U); pH-Wert (P) und Leitfähigkeit (C)
- Fraktionssammler: Frac-920

Vor jeder Durchführung wurde die verwendete SEC-Säule (vgl. Kapitel 3.1.4. *Chromatographische Medien und Säulen für die SEC*) mit ungefähr 2 Säulenvolumen Renaturierungspuffer equilibriert, sodass sich konstante Basislinien für die UV-Absorption und die Leitfähigkeit einstellen konnten. Danach wurde über ein Volumen von 7,5 ml ein linearer Gradient von 0 bis 100 % Denaturierungspuffer gefahren. Je nachdem welche Variante des Renaturierungspuffers zur vorherigen Equilibrierung verwendet wurde (vgl. Tabelle 3 und 4), erfolgt vom Säuleneingang zum Säulenausgang die Ausbildung eines fallenden Gradienten von 8 M auf 0 bzw. 2 M Harnstoff (Variante A bzw. B) und somit ein langsamer Wechsel von denaturierenden in renaturierende Umgebungsbedingungen.

Im Anschluss daran wurden jeweils 0,2 ml der denaturierten und reduzierten Proteinlösung aus einer zwischengeschalteten Schleife auf die Säule appliziert. Die Probeninjektion sowie der weitere Lauf – im Programmverlauf als „Elution“ bezeichnet – wurden mit 100 % Denaturierungspuffer durchgeführt. Zum einen konnte so garantiert werden, dass die entfaltete Proteinprobe unter gleichbleibenden Bedingungen auf die Säule aufgegeben werden und keine Verstopfung des Säuleneingangs durch aggregierte Proteinintermediate auftreten konnte. Zum anderen konnten während des Rückfaltungsprozesses entstandene Proteinaggregate innerhalb der Säule wieder gelöst und aus der Säule transportiert werden.

Direkt nach der erfolgten Probeninjektion wurde die Fraktionierung des Eluats eingeleitet. Hierzu wurden über ein Säulenvolumen insgesamt 10 Fraktionen à 3 ml aufgefangen. Sowohl der Renaturierungs- als auch der verwendete Denaturierungspuffer wurden mit geringen Mengen Puffersalz (200 mM NaCl) versetzt, um mögliche ionische Wechselwirkungen

zwischen den geladenen Seitengruppen des jeweiligen Modellproteins und der stationären Phase zu vermeiden.

Der vollständige Programmablauf ist im Anhang (vgl. Seite I, Abb. I) abgebildet und folgt im Wesentlichen den Erkenntnissen aus der Arbeit von Wilms, 2010.

3.2.5. Quantitative Analytik der Urease-Renaturierung

3.2.5.1. Urease-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Für die quantitative Bestimmung der Urease-Konzentration mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde eine Kalibriergerade mit Lösungen bekannter Proteinkonzentrationen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm aufgenommen. Dazu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 g/l Urease in Renaturierungspuffer angesetzt und daraus eine Verdünnungsreihe mit einer Schrittweite von 0,1 g/l hergestellt, sodass eine Kalibriergerade im Messbereich von 0-1 g/l resultiert.

Die Verdünnungen wurden ebenfalls mit Renaturierungspuffer vorgenommen, da die rückgefalteten Proteinproben nach der Größenausschlusschromatographie ebenfalls in diesem Puffersystem vorliegen sollten.

Da die Urease in ihrer nativen Konformation vorlag, liegt das Intensitätsmaximum bei einer Emissionswellenlänge von rund 336 nm. Die Konzentration der verwendeten Kalibrierlösungen war hierbei proportional zur Fluoreszenzintensität bei 336 nm – es resultiert eine linear ansteigende Kalibriergerade.

3.2.5.2. Umpufferung der renaturierten Urease-Proben

Die weitere Analytik der renaturierten Urease-Proben erforderte eine Umpufferung der fraktionierten Proteinproben, da die im Renaturierungspuffer enthaltenen Komponenten wie beispielsweise GSH und GSSG das im Anschluss folgend durchgeführte Assay zur Bestimmung der Urease-Aktivität verfälscht hätten.

Die Umpufferung erfolgte mittels einer herkömmlich vorgepackten HiTrapTM Desalting-Säule mit einem SephadexTM G-25-Material und einem Säulenvolumen von 5 ml. Da die stationäre Phase dieser Säule dem chromatographischen Medium für die Rückfaltungsversuche gleicht, können die Materialeigenschaften dem Kapitel 3.1.4. *Chromatographische Medien und Säulen für die SEC* entnommen werden. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe eines peristaltischen Pumpsystems (Pump P-1) der Firma GE-Healthcare, welches mit einem

UV/VIS-Photometer der Firma Knauer und einem Leitfähigkeitsmessgerät der Firma Phamacia Biotech gekoppelt wurde. Die Detektion erfolgte durch einen 220 nm-UV-Filter, da die verwendete Urease keine messbare UV-Absorption bei 280 nm aufwies.

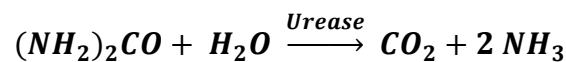
Zu Beginn wurde die Säule mit einem 80 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer (NaPh-Puffer) pH 7 equilibriert, sodass sich konstante Basislinien für die UV-Absorption und die Leitfähigkeit einstellen konnten. Anschließend erfolgte die manuelle Injektion der renaturierten Urease-Probe aus einer 500 µl-Schleife mit einer Fließgeschwindigkeit von 3 ml/min und die abschließende Fraktionierung der Proteinprobe.

Die nun im 80 mM NaPh-Puffer vorliegende renaturierte Urease-Probe wurde für das im Folgenden beschriebene Protein-Assay verwendet.

3.2.5.3. Bestimmung der Urease-Aktivität

Zur Bestimmung der Urease-Aktivität wurde im Zuge der Bachelor-Arbeit ein spezifisches Urease-Assay etabliert. Dieses Assay wurde auf Grundlage des im Handel erhältlichen „QuantiChrom™ Urease Assay Kit (DURE-100)“ der Firma BioAssay Systems (Hayward, USA) entwickelt.

Wie bereits beschrieben, katalysiert die Urease die Spaltung von Harnstoff in Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, was noch einmal in der folgenden Reaktionsgleichung verdeutlicht wird:



Das Assay basiert auf dem direkten Nachweis des durch die enzymatische Umsetzung von Harnstoff entstandenen Ammoniaks durch eine modifizierte Berthelot-Reaktion, welche auch als Indophenol-Blau-Reaktion bezeichnet wird.

Die Berthelot-Reaktion beschreibt die zweistufige Reaktion von Ammoniak mit Hypochlorit und einer Phenolverbindung (z. B.: Salicylat) zu Indophenol, welches im alkalischen Milieu in seiner blauen Basenform vorliegt und durch Absorptionsmessungen im Wellenlängenbereich zwischen 610-690 nm photometrisch nachgewiesen werden kann (Sinsabaugh et al., 2000; Kandeler und Gerber, 1988). Im ersten Schritt dieser Reaktion erfolgt die Umsetzung von Ammoniak und Hypochlorit zu Monochloramin. Im zweiten Schritt reagiert Monochloramin mit Salicylat über eine Zwischenstufe zum Indophenol-Komplex (Patton und Crouch, 1977; Searle, 1984).

3. Materialien und Methoden

Nach mehreren Optimierungsschritten konnte die am besten geeignete Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien ermittelt werden, sodass das im Folgenden dargestellte Protokoll auf der Verwendung dieser Reagenzien beruht (Kandeler und Gerber, 1988, Kempers und Kok, 1988):

- allgemeiner Probenpuffer: 80 mM NaPh (pH 7) – vgl. Tabelle 5
- Urea-Stammlösung: 420 mM Urea
- Ammoniumchlorid-Stammlösung: 50 mM NH₄Cl
- sowie Reagenz A & B (vgl. Tabelle 8 und 9), welche zu jeweils 20 ml angesetzt wurden

Tabelle 8: Zusammensetzung Reagenz A (20 ml-Ansatz)

Chemikalie	Stoffmengenkonzentration c [mol/l]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]
Natriumsalicylat	0,260	160,11	0,8330
NaOH	0,325	40,00	0,2600
Nitroprussid-Natrium-Dihydrat	0,0011	297,95	0,0068

Tabelle 9: Zusammensetzung Reagenz B (20 ml-Ansatz)

Chemikalie	Endkonzentration von Cl [%]	Volumen V [ml]
Natriumhypochlorit-Lösung, 12 % Cl	1	1,667

Um quantifizierbare Ergebnisse erhalten zu können, wurde zuerst eine externe Kalibrierung mit einem Ammonium-Standard durchgeführt. Dazu wurde eine 50 mM Ammoniumchlorid-Stammlösung um den Faktor 100 mit 80 mM NaPh-Puffer verdünnt. So wird eine als PREMIX bezeichnete 500 µM Ammonium-Lösung erhalten und daraus die in Tabelle 10 beschriebene Verdünnungsreihe hergestellt. Die Konzentrationen bzw. Molaritäten der gemessenen Standardverdünnungen sind hierbei proportional zur gebildeten Indophenol-Menge und Absorption – es resultiert eine Kalibriergerade mit linearem Anstieg.

Zur Minimierung von Messungenauigkeiten, wurde von den Standardverdünnungen und den renaturierten Urease-Proben jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3. Materialien und Methoden

Tabelle 10: Verdünnungsschema für die Kalibriergerade des Urease-Assays

Nummer	PREMIX + Puffer	Volumen [μl]	Molarität NH_4^+ [μM]
1	720 μl + 480 μl	1200 μl	300
2	600 μl + 600 μl	1200 μl	250
3	480 μl + 720 μl	1200 μl	200
4	360 μl + 840 μl	1200 μl	150
5	240 μl + 960 μl	1200 μl	100
6	120 μl + 1080 μl	1200 μl	50
7	60 μl + 1140 μl	1200 μl	25
8	0 μl + 1200 μl	1200 μl	0

Anschließend wurden von der entsprechenden Standardverdünnung, sowie von den zu vermessenden renaturierten Urease-Proben (vgl. 3.2.5.2. *Umpufferung der renaturierten Urease-Proben*) pro Reaktionsansatz jeweils 360 μl in ein 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Dazu wurden 40 μl einer 1:100-Verdünnung der Urea-Stammlösung gegeben, alles mit Hilfe eines Vortex gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nachdem die Inkubationszeit beendet war, wurde die eigentliche Nachweisreaktion gestartet. Dazu wurden zuerst 400 μl Reagenz A und darauf folgend 200 μl Reagenz B zum Reaktionsansatz pipettiert. Die Zugabe der beiden Reagenzien A und B sollte zügig stattfinden – außerdem müssen alle Proben sehr gut durchmischt werden. Danach erfolgte eine zweite Inkubation aller Ansätze für ca. 60 min im Dunkeln.

Abschließend wurde jeweils das gesamte Probenvolumen von 1 ml in 1,5 ml-Halbmikro-Einmalküvetten aus PMMA (Schichtdicke 10 mm) überführt und die Messung bei 650 nm durchgeführt.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit dieser Methode und damit einhergehend der Kalibrierung wurden bei jeder Durchführung die ermittelten Absorptionswerte und das Bestimmtheitsmaß der daraus erzeugten Kalibriergeraden miteinander verglichen. Als Beispiel werden im Folgenden die Kalibriergeraden mehrere Durchläufe stellvertretend diskutiert (vgl. Abb. 11).

3. Materialien und Methoden

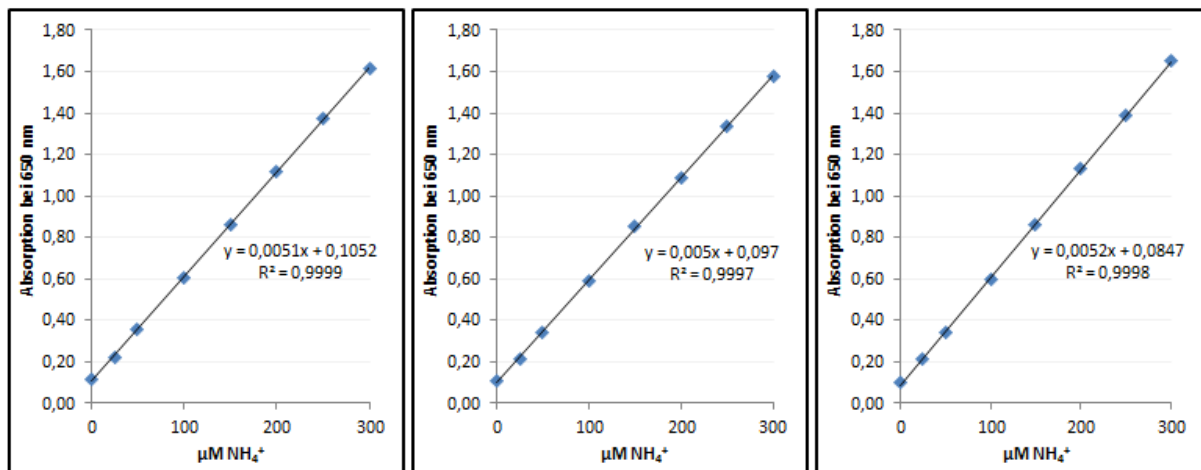


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der Kalibriergeraden verschiedener Assay-Durchführungen vom 27.02.12, 29.02.12 und 02.03.12 (v.l.n.r.)

Alle Kalibriergeraden haben mit ungefähr $0,005 \mu\text{M}^{-1}$ einen sehr ähnlichen Anstieg und auch die gemessenen Absorptionswerte liegen in vergleichbaren Bereichen. Die Blindwerte – also die Absorptionswerte, welche allein durch die verwendeten Puffer- und Reagenzkomponenten verursacht werden ($0 \mu\text{M NH}_4^+$) – sind ebenfalls sehr ähnlich, wenn auch nicht identisch. Kleinere Schwankungen können dem Photometer bzw. der eingebauten Xenonlampe geschuldet sein.

Durch die beschriebene Kalibrierung konnten durchgehend hohe Bestimmtheitsmaße um die 99,9 % erreicht werden – was eine hohe Reproduzierbarkeit widerspiegelt. Zudem kann somit darauf geschlossen werden, dass die zu Grunde liegende Stammlösung aus 50 mM Ammoniumchlorid über den Zeitraum von 5 Tagen bei Raumtemperatur stabil war und für mehrere Kalibrierungen verwendet werden konnte.

Die Aktivität der renaturierten Urease wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Urease Aktivität} = \frac{OD_{\text{Sample}} - OD_{\text{Blind}}}{\text{Steigung} * t} \quad [\text{U/L}]$$

Die Bezeichnungen „ OD_{Sample} “ und „ OD_{Blind} “ stehen für die bei der Wellenlänge von 650 nm ermittelten Absorptionswerte der renaturierten Urease-Proben bzw. des Blindwerts. Die Steigung entspricht dem Anstieg der Kalibriergeraden und „ t “ steht für die Inkubationszeit zur Umsetzung des in der Lösung vorhandenen Harnstoffs, welche durchgehend bei 10 min lag.

Hier ist eine Unit als diejenige Urease-Menge definiert, welche die Bildung von $1 \mu\text{mol}$ Ammoniak pro Minute bei einem pH-Wert von 7 unter den genannten Assay-Bedingungen katalysiert.

3.2.5.4. Urease-Konzentrationsbestimmung mittels Enzymaktivität

Neben der Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde die Urease-Konzentration in den renaturierten Proteinproben zusätzlich durch das Enzym-Assay ermittelt. Hierzu wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 g/l Urease in 80 mM NaPh-Puffer pH 7 angesetzt, welche anschließend noch einmal 1 : 10 mit dem selben Puffer verdünnt wurde – es resultiert eine Urease-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 g/l.

Die Enzymaktivität dieser Lösung wurde in einer Dreifachbestimmung an verschiedenen Versuchstagen bestimmt – es ergab sich ein Umrechnungsverhältnis von 0,1 g/l = 9,88 U/L (Units/Liter). Somit konnten die ermittelten Urease-Aktivitäten in die entsprechenden Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

3.2.6. Quantitative Analytik der RNase A-Renaturierung

Zur Ermittlung der RNase A-Konzentration in den nach der chromatographischen Renaturierung vorliegenden Proben, wurde aus zeitlichen Gründen allein das Fluoreszenzsignal der untersuchten Proben ausgewertet.

Neben dieser Methode, wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration die UV-Absorptionsmessung bei 280 nm in Erwägung gezogen. Da allerdings sowohl der Renaturierungs- als auch der Denaturierungspuffer in diesem Wellenlängenbereich sehr stark absorbieren und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würden, wurde diese zweite Methode nicht angewendet.

3.2.6.1. RNase A-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie

Für die quantitative Bestimmung der RNase A-Konzentration mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde eine Kalibriergerade mit bekannten Proteinkonzentrationen im Bereich von 0-1 g/l RNase A bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm aufgenommen.

Hierzu wurde eine Stammlösung mit 1 g/l RNase A in Renaturierungspuffer angesetzt und diese entsprechend dem im Kapitel 3.2.5.1. *Urease-Konzentrationsbestimmung mittels Fluoreszenzspektroskopie* beschriebenen Schema verdünnt.

Die native Ribonuklease A wies eine maximale Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge zwischen 304 und 307 nm auf. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in diesem Wellenlängenbereich waren proportional abhängig von den verschiedenen Proteinkonzentrationen – somit resultierte eine Kalibriergerade mit linearem Anstieg.

3.2.7. Bestimmung der Massenausbeute der renaturierten Proteine

Zur Berechnung der Massenausbeute der jeweiligen Modellproteine, werden aus den ermittelten Proteinkonzentrationen und den dazugehörigen Fraktionsvolumina die entsprechenden Proteinmassen berechnet.

Da die untersuchten Proteine nach der chromatographischen Renaturierung über mehrere Fraktionen eluieren, werden die Proteinmassen der einzelnen Fraktionen eines Versuchs aufsummiert. Die resultierende Proteingesamtmasse wird mit der in der Ausgangsprobe injizierten Proteinmasse in Bezug gesetzt – es ergibt sich eine prozentuale Massenausbeute.

$$\text{Massenausbeute } w = \frac{\sum (c_i * V_{frac})}{m_0} * 100 \% = \frac{\sum(m_i)}{m_0} * 100 \%$$

mit:	w	-	Massenausbeute [%]
	c_i	-	Proteinkonzentration in Fraktion i [mg/ml]
	V_{frac}	-	Fraktionsvolumen [ml]
	m_i	-	Proteinmasse in Fraktion i [mg]
	m_0	-	Proteinmasse der Ausgangsprobe [mg]

4. Ergebnisse und Diskussion

Zur Bestimmung der charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften der nativen und denaturierten Proteinstrukturen, wurden zu Beginn der Versuche die 2D-Emissions-Spektren der jeweiligen Proteinlösungen aufgenommen.

Zur Ermittlung der optimalen Anregungswellenlänge und dem daraus resultierenden Emissions-Spektrum wurden anfänglich mehrere Testmessungen mit nativen Proteinlösungen bei verschiedenen Anregungswellenlängen im Bereich von 270 nm bis 290 nm durchgeführt und die Emissions-Spektren untereinander verglichen. Sowohl für die Urease als auch für die RNase A zeigten die Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm die am besten verwertbaren Spektren mit eindeutigen Emissionsmaxima und stabilen sowie reproduzierbaren Wellenlängenänderungen, welche den Modellproteinen zugeschrieben werden konnten. Bei Anregungen mit höheren Wellenlängen konnten keine deutlichen Emissionsmaxima festgestellt werden, was eine spätere Auswertung der Ergebnisse erschwert hätte. Somit erfolgten alle fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm.

4.1. Charakteristische Eigenschaften und Entfaltungskurve von Urease

Nach der Publikation von Omar und Beauregard (1995) weist die Urease in ihrer nativen hexameren Struktur bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm ein Emissionsmaximum bei 330 nm auf. Im entfalteten Zustand, welcher durch die Denaturierung mit 6 M Guanidin-HCl erreicht wurde, verschiebt sich das Maximum des Fluoreszenzlichts mit 346 nm in den Bereich größerer Wellenlängen.

Bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm – wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde – lässt sich ein ähnliches Verhalten erkennen. In Abbildung 12 werden die 2D-Emissions-Spektren der nativen und denaturierten Urease-Strukturen dargestellt.

Das Emissionsmaximum der nativen Urease liegt bei ca. 336 nm und verschiebt sich im denaturierten Zustand auf ca. 349 nm (vgl. Tabelle 11). Diese Wellenlängenverschiebung geht mit einer parallelen Abnahme der Fluoreszenzintensität einher.

Tabelle 11: Emissionsmaxima der nativen und entfalteten Urease-Struktur bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm

	nativ	denaturiert
Urease (<i>canavalia ensiformis</i>)	336 nm	349 nm

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Wellenlängenverschiebung sowie die Änderung der Fluoreszenzintensität können durch die Konformationsänderung der Proteinstruktur und die Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz von der Polarität des Puffersystems erklärt werden. Durch die vollständige Entfaltung der Urease werden die intrinsischen Fluorophore – insbesondere die Tryptophane – aus dem hydrophoben Kern delokalisiert und zur hydrophilen Proteinoberfläche ausgerichtet.

Theoretisch betrachtet, sollte diese Wellenlängenverschiebung mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität einhergehen, da die möglichen Quenching-Effekte wie beispielsweise räumliche Nähe zu anderen Aminosäuren vermindert werden. In den vorliegenden Versuchen ist aber eine Abnahme der Intensität vom nativen zum entfalteten Zustand zu beobachten, was vermutlich durch die Thiolgruppen des reduzierenden Agens DTT verursacht wird (Qiu et al., 2008; Sanyal et al., 1989). Somit kann durch die Änderung der Fluoreszenzintensität allein, keine Aussage über die Änderung der Urease-Konformation getroffen werden.

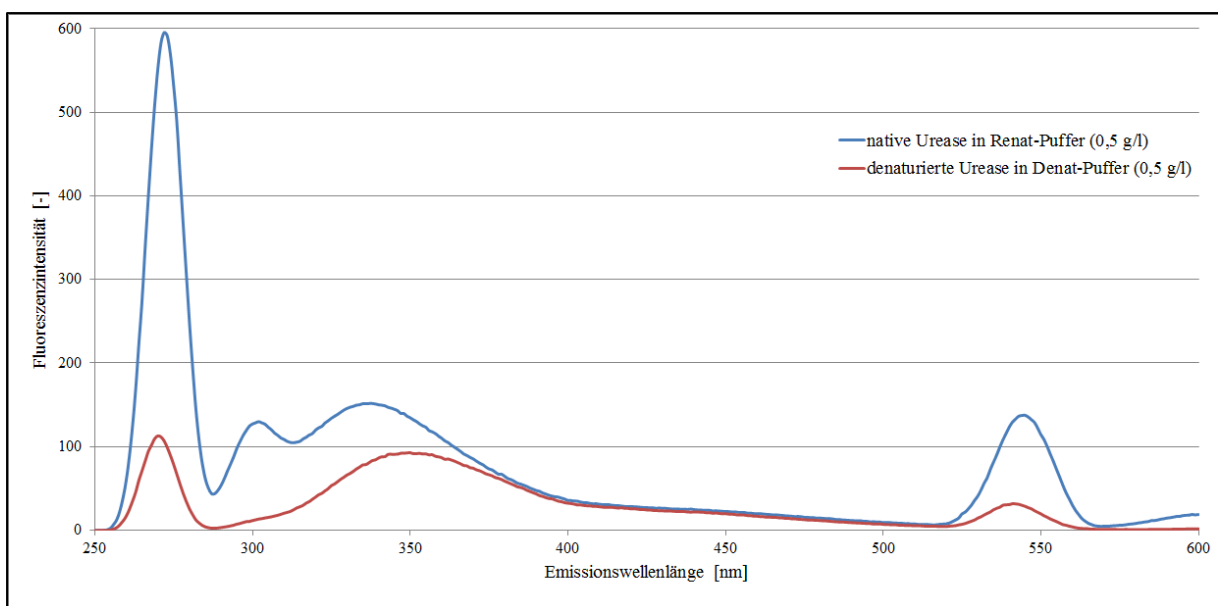


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der 2D-Emissions-Spektren der nativen und denaturierten Urease (0,5 g/l) bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm (Renaturierungspuffer Variante A)

Neben diesen Emissionsmaxima sind in den Spektren noch weitere Emissions-Peaks zu erkennen. Das Maximum im Bereich der einfachen Anregungswellenlänge von 270 nm wird durch die Rayleigh-Streuung verursacht – gleiches gilt für den Peak im Bereich der doppelten Anregungswellenlänge um ca. 540 nm. Die Intensität der Rayleigh-Streuung steht mit den in der Lösung vorhandenen Aggregaten im Zusammenhang. Da die Urease wie eingangs beschrieben nur sehr schwer löslich war und die Lösung der nativen Urease dementsprechend etwas trüber war, ist die Intensität des Rayleigh-Peaks hier sehr hoch. Die Intensitätsabnahme für die Lösung der denaturierten Urease ist wiederum ein Indiz dafür, dass weniger

Aggregate vorliegen und die Urease besser löslich war. Bei einer Wellenlänge von rund 300 nm ist ein weiterer Peak im Spektrum der nativen Urease zu erkennen. Dieser Peak kann durch das wässrige Puffermilieu verursacht worden sein, da die Spektren des Renaturierungspuffers ebenfalls bei Emissions-Wellenlängen von 300 ± 1 nm einen Peak von vergleichbarer Intensität aufweisen. Im Spektrum der denaturierten Urease, welcher DTT anstelle des Redox-Systems enthält, ist in diesem Bereich kein Maximum mehr zu erkennen.

Um den Übergang von der nativen in die vollständig entfaltete Struktur der Urease verfolgen zu können und somit die Emissions-Spektren der verschiedenen Entfaltungsstadien bei steigenden Harnstoffkonzentrationen (0-8 M) zu veranschaulichen, wurde die Entfaltungskurve von Urease aufgenommen. Im Folgenden werden die Änderungen der Emissionsmaxima sowie die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten bei steigenden Harnstoffkonzentrationen dargestellt (vgl. Abb. 13).

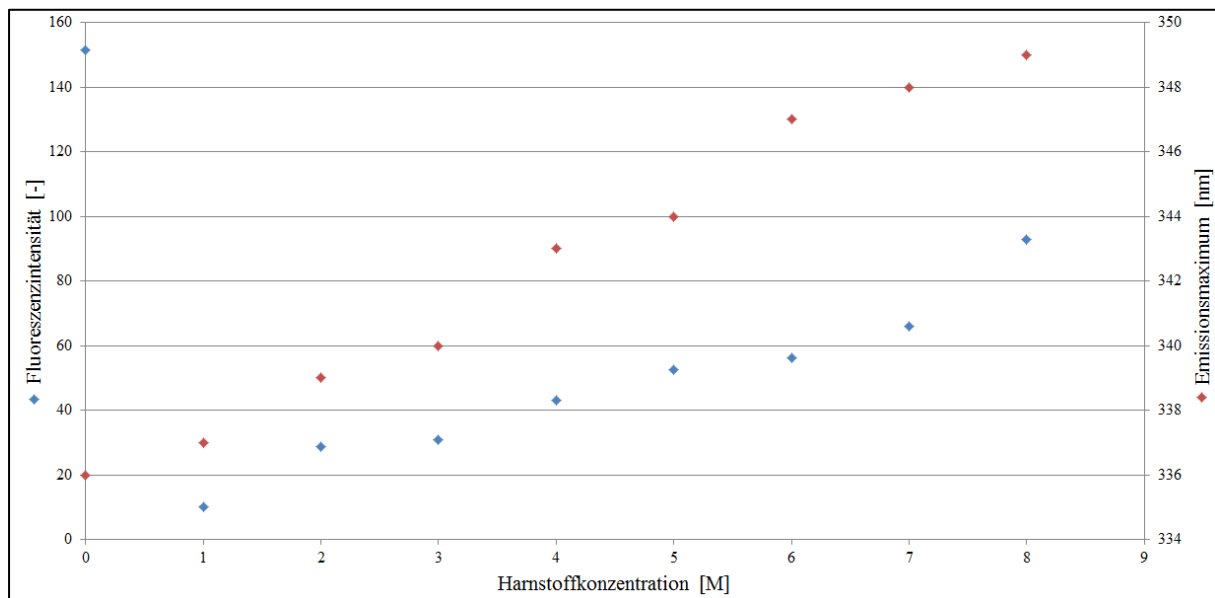


Abb. 13: Entfaltungskurve von Urease (0,5 g/l) bei steigender Harnstoffkonzentration (0-8 M) im Denaturierungspuffer und einer Anregungswellenlänge von 270 nm

In dieser Abbildung entspricht die native hexamere Urease-Struktur dem Datenpunkt bei 0 M Harnstoff, bei welcher die Urease in Renaturierungspuffer (Variante A, vgl. Tabelle 3) gelöst wurde.

Mit steigender Harnstoffkonzentration lässt sich eine stetige Zunahme des Emissionsmaximums erkennen – von anfänglich 336 nm im nativen Zustand, verschiebt sich das Maximum im Laufe des Denaturierungsprozesses in einem fast linearen Übergang auf 349 nm. Durch die geringe Änderung der Emissionsmaxima bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen bis 3 M wird allerdings ebenso deutlich, dass in diesen Konzentrationsbereichen nur eine geringe bzw. teilweise Entfaltung der Urease verursacht und erst bei

höheren Konzentrationen die weitere sowie vollständige Entfaltung der Urease-Struktur erreicht wird.

Für die Fluoreszenzintensität konnte ein sehr starker Abfall von 151 auf 10 beobachtet werden, nachdem die Urease im Denaturierungspuffer mit geringer Harnstoffkonzentration (1 M) gelöst wurde. Bei der anschließenden Erhöhung der Harnstoffkonzentration (2-8 M) im Denaturierungspuffer wurde eine stetige Zunahme der Intensität festgestellt, welche jedoch in allen Fällen niedriger als in der Ausgangslösung (0 M Harnstoff) war. Diese Tatsachen könnten durch die enzymatische Umsetzung des Harnstoffs durch die biologisch aktive Urease und der damit verbundenen Zunahme des pH-Werts verbunden sein, welcher möglicherweise das Fluoreszenzsignal abschwächt. Die anfänglich niedrigen Konzentrationen des Harnstoffs wurden als Substrat der Urease umgesetzt, was durch einen Anstieg des pH-Werts nachgewiesen werden konnte – somit wurde in diesen Konzentrationsbereichen noch keine Denaturierung der Urease bewirkt. Im Bereich von 4-6 M Harnstoff scheint es eine Art Plateau zu geben – zumindest bei den Werten der Fluoreszenzintensität – was auf eine stabilisierte Struktur hinweisen könnte, welche jedoch eine andere Konformation als die der hexameren nativen Struktur haben muss, da auch die Emissionsmaxima nicht mehr denen der nativen Struktur entsprechen. Eine Möglichkeit wäre die Aufspaltung des Hexamers in die nächst kleineren trimeren Struktureinheiten, welche ebenfalls über biologische Aktivität verfügen und etwas höhere Emissionsmaxima als hexamere Strukturen aufweisen (Omar und Beauregard, 1994). Dies könnte eine Erklärung für die kontinuierliche Verschiebung der Emissionsmaxima und den parallelen nachweisbaren Anstieg der pH-Werte in den Denaturierungspuffern (0-5 M Harnstoff) sein.

In der folgenden Tabelle werden die gemessenen pH-Werte der verschiedenen Denaturierungspuffer mit steigenden Harnstoffkonzentrationen dargestellt (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: Darstellung der gemessenen pH-Werte in den Denaturierungspuffern der Entfaltungskurve mit steigenden Harnstoffkonzentrationen versetzt mit jeweils 0,5 g/l Urease

Harnstoffkonzentration [M]	0	1	2	3	4	5	6	7	8
pH-Wert	7,40	7,62	8,11	8,93	8,64	8,05	7,51	7,52	7,46

Für die Denaturierungspuffer mit niedrigen Harnstoffkonzentrationen (1-3 M) resultierte die Umsetzung des in den Lösungen vorhandenen Harnstoffs in einem Anstieg des pH-Werts vom ursprünglich eingestellten pH-Wert um 7,40 im Renaturierungs- und Denaturierungspuffer auf einen maximalen pH um 8,93.

In den Lösungen mit höheren Harnstoffkonzentrationen konnte ebenfalls ein Anstieg des pH-Werts nachgewiesen werden, allerdings nahm dieser bei hohen Konzentrationen (6-8 M) einen konstanten Wert im Bereich des vorher eingestellten pH-Werts ein. Dies deutet darauf

hin, dass sowohl die biologische Aktivität der Urease und als auch damit einhergehend die Umsetzung des Harnstoffs bei höheren Harnstoffkonzentration im Denaturierungspuffer sehr stark reduziert bzw. komplett unterbunden wurde. Hieraus kann der Schluss der vollständigen Entfaltung der Urease bei einer hohen Harnstoffkonzentration (8 M) im Denaturierungspuffer gezogen werden. Da keine eindeutigen Literaturangaben zur pH-Abhängigkeit der Tryptophanfluoreszenz gefunden werden konnten, ist der an dieser Stelle beschriebene Einfluss der oben dargestellten pH-Wert-Änderung nur ein Verdacht.

Ebenso könnte die starke Intensitätsabnahme durch das im Denaturierungspuffer vorhandene DTT bedingt sein, welches einen Teil der Anregungsenergie aufnimmt und somit die Fluoreszenzintensität verringert. Da alle Denaturierungspuffer die gleiche Konzentration an DTT enthalten, könnte die beobachtete Zunahme der Intensität mit steigender Harnstoffkonzentration durch die weitere Entfaltung der Urease erklärt werden.

4.2. Charakteristische Eigenschaften von Ribonuklease A

Nach den Publikationen von Lin und Brandts (1983) und Krebs et al. (1984) konnten sowohl für die nativen als auch für die entfalteten RNase A-Strukturen bei einer Anregungswellenlänge von 268 nm Emissionsmaxima um 305 nm festgestellt werden, wobei die Fluoreszenzintensität der entfalteten Struktur rund 2,5-mal höher war als die der nativen Struktur.

In der vorliegenden Arbeit wurden die 2D-Emissions-Spektren der nativen und denaturierten RNase A-Strukturen ebenfalls bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm aufgenommen (vgl. Abb. 14). Das Emissionsmaximum der nativen RNase A liegt mit rund 304-305 nm im Bereich der zuvor beschriebenen Werte und unter dem der Urease (vgl. Tabelle 13).

Tabelle 13: Emissionsmaxima der nativen und entfalteten RNase A-Struktur bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm

	nativ	denaturiert
RNase A (Rinderpankreas)	304 nm	309 nm

Dies ist durch die Abwesenheit des Tryptophans begründet – somit fluoreszieren hier nur die Fluorophore Tyrosin und Phenylalanin im Bereich kleinerer Wellenlängen. Im denaturierten Zustand verschiebt sich das Emissionsmaximum nur sehr gering in den Bereich höherer Wellenlängen auf 309 nm. Die relativ geringe Änderung des Emissionsmaximums verläuft allerdings mit einem sehr ausgeprägten Anstieg der Fluoreszenzintensität, was durch die Konformationsänderung während der Entfaltung der Proteinstruktur erklärt werden kann. Die

Fluoreszenzintensität der denaturierten RNase A-Struktur ist rund 4,3-mal höher als die der nativen Struktur, was annähernd mit den Ergebnissen von Lin und Brandts (1983) und Krebs et al. (1984) übereinstimmt.

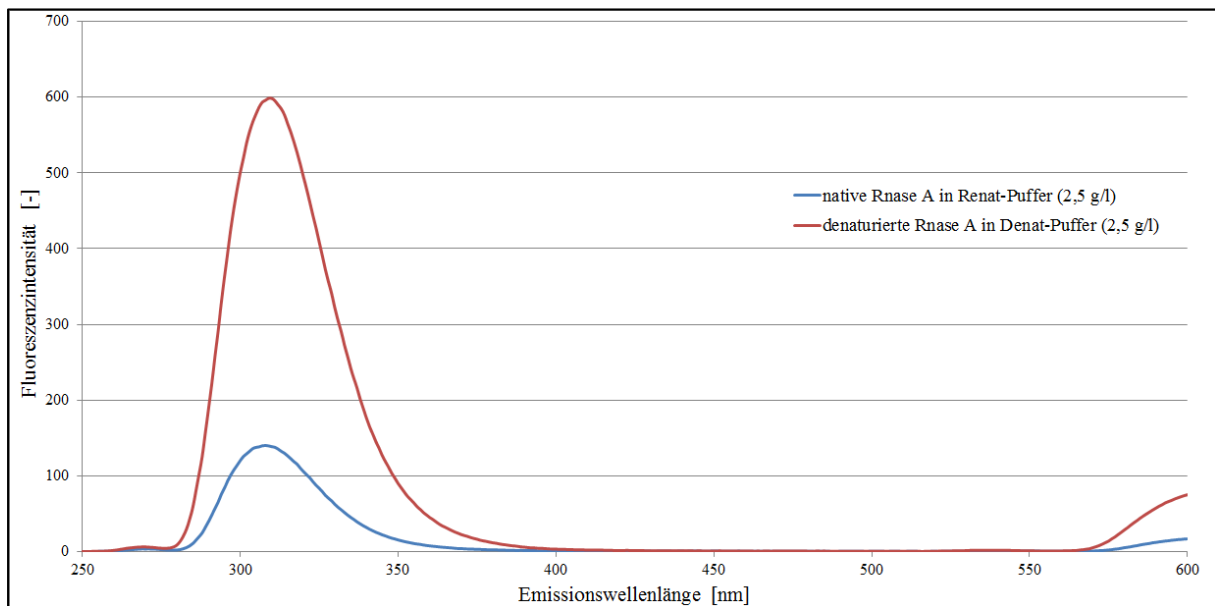


Abb. 14: Vergleichende Darstellung der 2D-Emissions-Spektren der nativen und denaturierte RNase A (2,5 g/l) bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm (Renaturierungspuffer Variante A)

Neben den charakteristischen Protein-Peaks sind die Effekte der Rayleigh-Streuung und der Raman-Streuung kaum ausgeprägt. Im Bereich der einfachen Anregungswellenlänge von 270 nm ist zwar eine kleine Emissionsbande mit geringer Fluoreszenzintensität zu erkennen – allerdings sind die für die Fluoreszenzspektroskopie typischen Streulichte effekte nahezu nicht vorhanden. Dies kann durch die gute Löslichkeit der RNase A in den verschiedenen Puffern und die somit ausgebliebene Aggregatbildung erklärt werden.

4.3. Renaturierung mittels Harnstoff-Gradienten-SEC

Nach der vollständigen Denaturierung der Modellproteine wurden verschiedene Versuche zur Renaturierung mittels Harnstoff-Gradienten-SEC durchgeführt. Die Parameter sowie die genaue Durchführung dieser Versuche sind dem Kapitel 3.2.4. *Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC* zu entnehmen, welche auf den Ergebnissen von Wilms (2010) beruhen. Die Resultate dieser Arbeit zeigten, dass bei der Verwendung des Sephadex G-25-Materials für die chromatographische Rückfaltung sehr hohe Massenausbeuten an renaturiertem Enzym (hier Lysozym) erzielt wurden und diese nicht allein auf die räumliche Trennung der Faltungsintermediate durch das vorliegende Porensystem zurückzuführen sind. Um diese Aussagen verifizieren zu können, wurden an der bestehenden Methode und den

Pufferzusammensetzungen keine Änderungen vorgenommen – mit Ausnahme der Versuche V1-V3 zur Urease-Renaturierung. Hier wurde der Renaturierungspuffer etwas modifiziert, da der ursprünglich enthaltene Harnstoff durch die Urease umgesetzt werden würde und das spätere Aktivitätsassay verfälscht hätte – daher wurde in diesen Versuchen ausschließlich mit dem harnstofffreien Renaturierungspuffer Variante A gearbeitet.

Vor jeder Versuchsdurchführung und nach dem Ansetzen neuer Pufferlösungen wurden so genannte Leergradienten gefahren. Bei diesen Durchläufen entspricht der Programmablauf dem der Renaturierungsversuche (vgl. 7. Anhang, Abb. I), allerdings wurde keine denaturierte Enzymprobe in die Probenschleife geladen und somit allein die charakteristischen Kennlinien/Verläufe der interagierenden Renaturierungs- und Denaturierungspuffer aufgezeichnet. Dies ermöglicht eine genauere Auswertung der Chromatogramme zu den Renaturierungsversuchen und eine Überprüfung der Säule, um gleichbleibende Bedingungen und damit gute Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können.

Da in dieser Arbeit zwei verschiedene Renaturierungspuffer – die harnstofffreie Variante A und Variante B mit 2 M Harnstoff – verwendet werden, sind in der folgenden Abbildung die charakteristischen Verläufe beider Leergradienten vergleichend dargestellt (vgl. Abb. 15).

Allgemein zeigen beide Chromatogramme der Leergradienten einen sehr ähnlichen Verlauf und lassen sich in vier charakteristische Abschnitte (I-IV) einteilen. Die Basislinien für die UV-Absorption bei 280 nm und die Leitfähigkeit entsprechen den Werten der jeweiligen Renaturierungspuffer, wobei die UV-Signale nach der Equilibrierung automatisch auf null gesetzt wurden und daher gleiche Werte aufweisen.

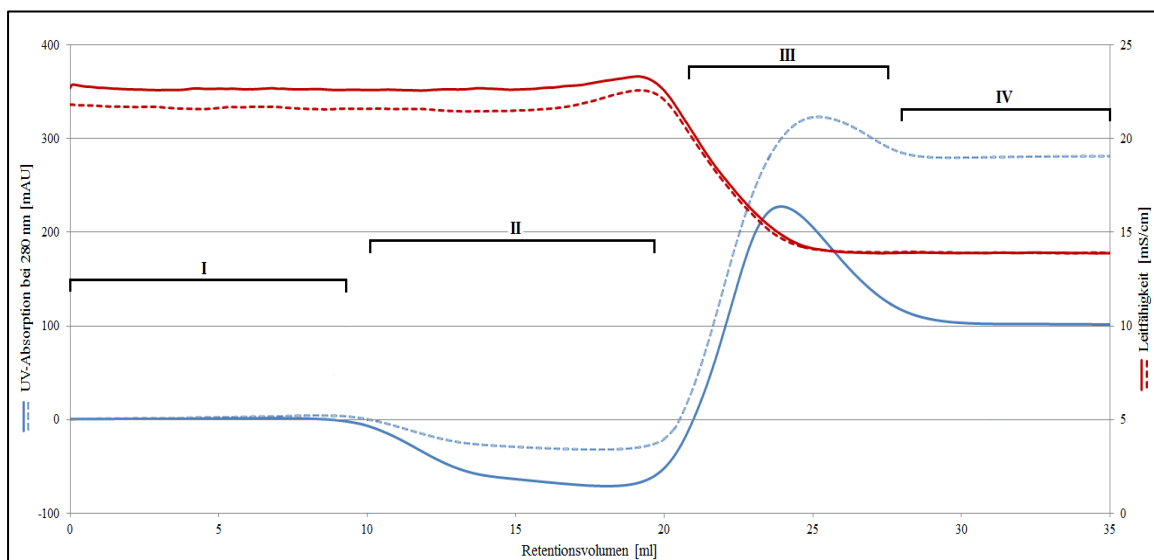


Abb. 15: Darstellung der typischen Verläufe der Leergradienten für die Renaturierungsprozesse mittels Harnstoff-Gradienten-SEC bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Die durchgehenden Kurven entsprechen den Versuchen mit der harnstofffreien Renaturierungspuffer Variante A und die gestrichelt dargestellten Kurven denen mit dem Renaturierungspuffer Variante B.

Ein Unterschied wird jedoch in den Leitfähigkeitskurven beider Renaturierungspuffer deutlich – die Variante A weist mit durchschnittlich 23 mS/cm eine höhere Leitfähigkeit als die Variante B auf, auch wenn sich die Werte beider Puffer nur sehr gering voneinander unterscheiden. Dies kann durch die geringe Harnstoffkonzentration (2 M) im Renaturierungspuffer Variante B begründet sein. Durch das Vorhandensein des Harnstoffs wird die relative Viskosität des Puffers erhöht und damit die Leitfähigkeit reduziert (Herskovits und Kelly, 1973).

Der zweite Abschnitt (II) zwischen 10 und 20 ml ist in beiden Versuchsdurchführungen durch ein deutliches Absinken des UV-Signals unterhalb der Basislinie charakterisiert, was durch den fortschreitenden Übergang von Renaturierungs- in Denaturierungspuffer verursacht worden sein kann. Vermutlich führt die Schlierenbildung beim Kontakt beider Puffersysteme zu diesem Effekt – welcher bei der Verwendung des harnstofffreien Renaturierungspuffers stärker ausgeprägt ist, als bei der Variante B. Die Leitfähigkeitswerte bleiben in diesem Abschnitt weitestgehend konstant.

Anschließend erfolgt der komplette Übergang vom Renaturierungs- in den Denaturierungspuffer in Form des linearen Gradienten (III). Dieser Übergang ist durch einen Anstieg des UV-Signals und einen gleichzeitigen Abfall der Leitfähigkeit (nach kurzem Überschwingen um ungefähr 0,7-0,9 mS/cm zwischen 18-19 ml) gekennzeichnet. Die sinkende Leitfähigkeit kann wieder auf die zunehmende Viskosität, bedingt durch den im Denaturierungspuffer vorhandenen Harnstoff, zurück zu führen sein.

Der Anstieg des UV-Signals beruht vermutlich auf dem niedermolekularen DTT (Gu et al., 2001; Li et al., 2004), welches bei 280 nm absorbiert und in niedrigen Konzentrationen im Denaturierungspuffer vorhanden ist (vgl. Tabelle 2, Seite 22).

Letztendlich nehmen die Kurven für die UV-Absorption und die Leitfähigkeit beider Leergradienten konstante Werte an, was 100 % des Denaturierungspuffers entspricht und im Abschnitt IV wiedergespiegelt wird. Da die unterschiedlichen Leergradienten auf der Verwendung des gleichen Denaturierungspuffers basieren, sollten sowohl die Werte der Leitfähigkeit als auch die des UV-Signals der einen Kurve denen der anderen Kurve entsprechen. Dies trifft für die Leitfähigkeit zu, welche bei beiden Kurven einen konstanten Wert um $13 \pm 0,5$ mS/cm erreicht. Die UV-Signale unterscheiden sich jedoch voneinander, was offenbar durch die unterschiedliche Verwendungsdauer der Denaturierungspuffer begründet sein kann – die Aufnahme des Leergradienten zu Renaturierungspuffer Variante B wurde mit einem 3 Tage alten Denaturierungspuffer durchgeführt. In diesem Zeitraum ist die Oxidation des DTT's weit voran geschritten, was eine Erhöhung der Absorptionseigenschaften bei 280 nm verursacht (Sanyal et al., 1989). Ob dieser Effekt Auswirkungen auf die Renaturierungsprozesse hat, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Im Folgenden soll zuerst auf die Renaturierung von Urease eingegangen werden. Hier wurde ausschließlich mit dem harnstofffreien Renaturierungspuffer (Variante A) gearbeitet, da der ansonsten enthaltene Harnstoff durch die Urease umgesetzt und das entstehende Ammoniak das spätere Enzymaktivitäts-Assay gestört hätte.

Im Anschluss daran wird auf die Renaturierung der RNase A eingegangen, welche mit beiden Renaturierungspuffern (Variante A & B) durchgeführt wurde, um einen direkten Vergleich zu den vorherigen Renaturierungsversuchen der Urease zu erhalten und zu prüfen, ob der Zusatz von niedermolekularen Substanzen wie z. B. Harnstoff die Ausbeute an nativem Protein erhöht. Zur Veranschaulichung und Vergleichbarkeit der Renaturierungsprozesse werden jeweils 3 Chromatogramme zu den identisch durchgeführten Renaturierungsversuchen der Urease (V1-V3) und der RNase A mit den beiden verschiedenen Renaturierungspuffern Variante A (V4-V6) und Variante B (V7-V9) dargestellt. Die Chromatogramme beginnen jeweils zum Zeitpunkt der Harnstoff-Gradienten-Ausbildung nach der Equilibrierungs-Phase und enden nachdem der gesamte Gradient vollständig durch die Säule gelaufen und 100 % des Denaturierungspuffers erreicht sind.

Die 2D-Emissions-Spektren aller Fraktionen, welche vermeintlich renaturierte Modellproteine enthielten, sind im Anhang (Abb. III-V) abgebildet.

4.3.1. Renaturierung von Urease mittels Harnstoff-Gradienten-SEC

Nachdem die SEC-Säule mit dem Renaturierungspuffer Variante A equilibriert und der Harnstoff-Gradient mit steigender Harnstoffkonzentration von 0-8 M durch den linearen Anstieg des Denaturierungspuffers gefahren wurde, wurden jeweils 200 µl der denaturierten Urease-Probe (2,5 g/l) durch Ausspülen der Schleife mit Denaturierungspuffer auf die SEC-Säule appliziert. Die absolute Urease-Menge, welche pro Renaturierungsversuch auf die Säule aufgetragen wurde, liegt demnach bei jeweils 0,5 mg. Die in Abbildung 16 dargestellten Chromatogramme der Renaturierungsprozesse V1-V3 sind die Ergebnisse der Versuche von drei aufeinander folgenden Tagen. Beim Vergleich der drei Chromatogramme fällt auf, dass alle einem sehr ähnlichen Verlauf folgen, welcher im Wesentlichen dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Leergradienten mit dem Renaturierungspuffer Variante A entspricht und gleichzeitig eine gute Reproduzierbarkeit des Prozesses darstellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

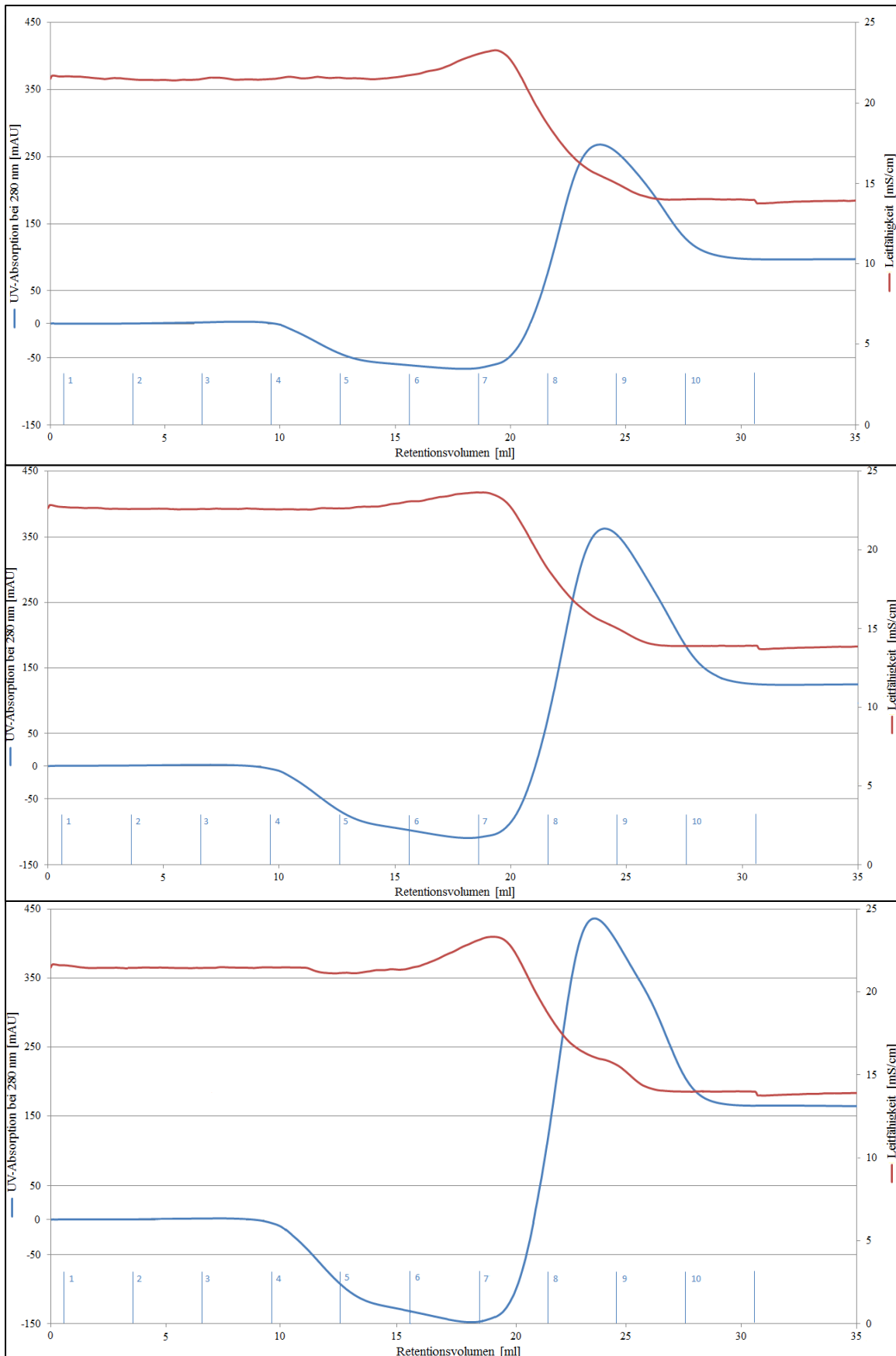


Abb. 16: Chromatogramme der Urease-Renaturierungen V1-V3 (v.o.n.u.) mittels Harnstoff-Gradienten-SEC von 8-0M Urea (Säule: C 10/40 mit Sephadex™ G-25-Material; Säulenvolumen: 28,7 ml; Flow: 0,2 ml/min; UV-Detektor 280 nm)

Nach genauerer Betrachtung der Chromatogramme werden jedoch zwei wesentliche Unterschiede deutlich – zum einen sinkt das UV-Signal zwischen 10 und 20 ml von Versuch V1 zu V3 immer weiter unterhalb der Basislinie ab und zum anderen wird der Übergang von Renaturierungs- in Denaturierungspuffer mit einem Peak von unterschiedlicher Intensität gekennzeichnet. Diese Unterschiede sind durch die fortschreitende Oxidation des DTT's im Denaturierungspuffer während der Versuchstage zu erklären, was ebenfalls eine Erhöhung des UV-Signals bei 100 % des Denaturierungspuffers verursacht (Sanyal et al., 1989).

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass in keinem der drei Chromatogramme ein weiterer Peak zu erkennen ist, welcher der auf die SEC-Säule aufgetragenen Urease entspricht. Erste Vermutungen, bei welchen der Verdacht bestand, dass die denaturierte Urease auf Grund ihrer Molekülgröße am Säuleneingang zurück gehalten und somit nicht von der Säule eluiert wurde, konnten durch einen Kontrollversuch verworfen werden.

Bei diesem Kontrollversuch wurden sowohl der Renaturierungspuffer der Variante A, als auch der gleiche Renaturierungspuffer mit einer Konzentration von 2,5 g/l Urease im Photometer über einen Wellenlängenbereich von 200-900 nm vermessen. Die resultierenden Ergebnisse zeigten, dass beide Lösungen sehr ähnliche, kaum differenzierbare Absorptionswerte im verwendeten Wellenlängenbereich von 280 nm haben (vgl. 7. Anhang, Abb. II). Somit lässt sich bei der Elution der Urease keine Änderung der UV-Absorption im Chromatogramm erkennen.

Um den tatsächlichen Elutionszeitpunkt der renaturierten Urease bestimmen zu können, wurden anfänglich alle gesammelten Fraktionen mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen. Diese Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass jeweils die Fraktionen 3 und 4 ähnliche 2D-Emissions-Spektren aufwiesen, wie die native Urease (vgl. 7. Anhang, Abb. III) – alle anderen Fraktionen enthielten allein den Renaturierungs- bzw. Denaturierungspuffer oder Gemische davon.

Aufgrund des frühen Elutionszeitpunktes kann davon ausgegangen werden, dass die renaturierte Urease im Renaturierungspuffer eluiert wurde. Obwohl die Fluoreszenzmaxima der entsprechenden Fraktionen mit 338 ± 1 nm teilweise etwas über denen der nativen Urease lagen, konnte in beiden Fraktionen jeweils biologisch aktive Urease mittels später durchgeführter Enzymaktivitäts-Assays nachgewiesen werden. Die Abweichungen der Emissionsmaxima könnten durch strukturelle Unterschiede zu der nativen hexameren Form erklärt werden, worauf in der späteren Auswertung noch einmal näher eingegangen wird (vgl. Seite 59). Möglicherweise enthielten die Fraktionen mehrere verschiedene Konformationen renaturierter Urease – beispielsweise hexamere Strukturen deren Faltung sich teilweise in

einigen weniger relevanten Strukturbereichen von denen der nativen Urease unterscheidet oder aber auch andere Quartärstrukturen wie Trimere, welche ebenfalls biologische Aktivität aufweisen (Omar und Beauregard, 1995; Hirai et al., 1993). Außerdem könnte es auch sein, dass neben der korrekt rückgefalteten ebenfalls noch die entfaltete Struktur vorliegt.

Ein weiteres Indiz für den Renaturierungsprozess der anfänglich entfalteten Urease ist die steigende Leitfähigkeit. Im Bereich von rund 18-19 ml – bei welchen auch im Leergradienten ein Überschwingen zu erkennen war – ist in allen drei Chromatogrammen ein geringer Anstieg der Leitfähigkeit zu erkennen, auch wenn die Abweichungen zum Leergradienten durchschnittlich nur 1 mS/cm ausmacht. Dieses Phänomen kann durch die Reaktion von biologisch aktiver Urease und dem im Denaturierungspuffer vorhandenen Harnstoff erklärt werden – die Spaltung des Harnstoffs führt zur Bildung von Ammoniak und Kohlendioxid, was wiederum durch die Ausbildung von Ionen zur Erhöhung der Leitfähigkeit führt. Diese Reaktion wird unter anderem als übliche Methode zum Nachweis von Harnstoff verwendet (Thavarungkul und Kanatharana, 1994).

Auf Grund der verwendeten SEC-Säule und die Molekülgröße der renaturierten Urease, dessen monomere Untereinheit schon eine Molekülgröße von rund 90 kDa hat, eluieren die Urease und der Abschnitt mit erhöhter Leitfähigkeit zeitlich versetzt voneinander. Bei einem Retentionsvolumen von ungefähr 23-25 ml ist ein zweiter kleinerer Anstieg der Leitfähigkeit zu erkennen, welcher jedoch in allen Versuchen V1-V3 unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Da der zweite Peak, verursacht durch die Zunahme der Leitfähigkeit, mit dem Volumen der mobilen Phase (V_M) korreliert, kann dieser durch die applizierte Proteinprobe hervorgerufen worden sein. Wie zuvor festgestellt wurde, sind die pH-Werte und damit verbunden auch die Leitfähigkeiten der denaturierten Urease-Lösungen etwas höher als die der verwendeten Puffer (vgl. Tabelle 12).

Neben den in Abb. 16 dargestellten Werten wurden im Laufe des Renaturierungsprozesses auch die pH-Werte durch eine Online-Messung aufgezeichnet, welche im Folgenden näher betrachtet werden sollen (vgl. Abb. 17). Die verwendete pH-Elektrode wurde einmal wöchentlich mit den gleichen Kalibrierlösungen wie die externe Elektrode zur pH-Bestimmung der Pufferlösungen kalibriert. Dennoch wurden durch diese zweite Elektrode immer geringfügig niedrigere Werte ermittelt als die, die tatsächlich in den verschiedenen Puffern eingestellt wurden – daher erfolgt hier nur die Auswertung der relativen Änderung des pH-Wertes. Zum Vergleich der während der Renaturierungsprozesse V1-V3 erhaltenen Werte mit denen des Leergradienten, werden alle pH-Kurven im gleichen Diagramm dargestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

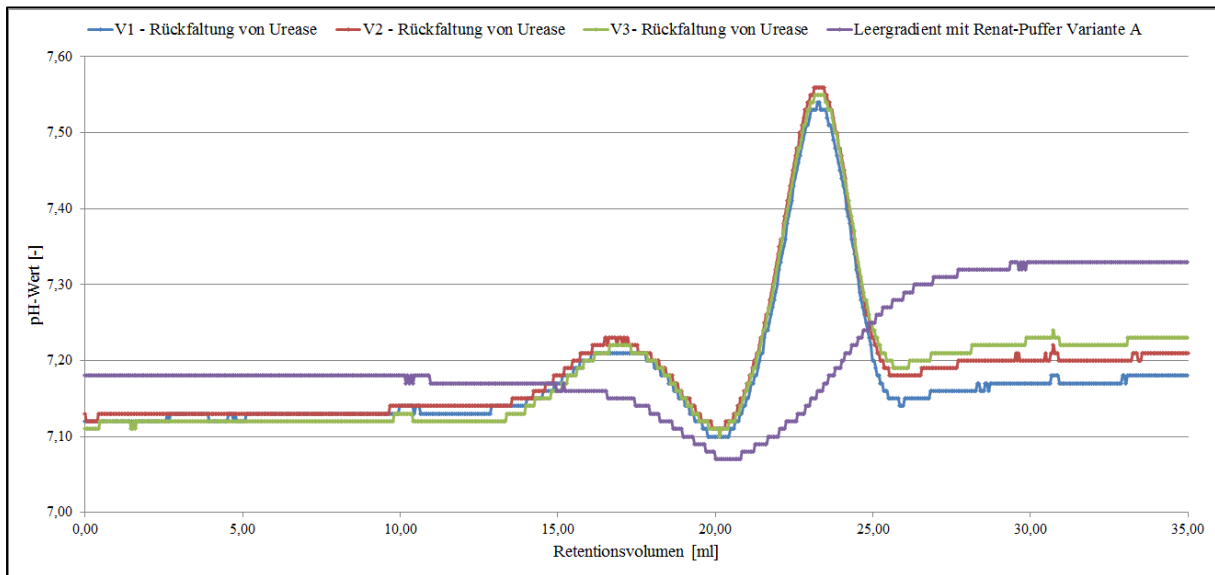


Abb. 17: Darstellung der gemessenen pH-Werte für die Renaturierungsprozesse der Urease mittels Harnstoff-Gradienten-SEC (V1-V3) und den entsprechenden Leergradienten (Säule: C 10/40 mit Sephadex™ G-25-Material; Säulenvolumen: 28,7 ml; Flow: 0,2 ml/min; UV-Detektor 280 nm)

Bei der ersten Betrachtung der verschiedenen pH-Kurven werden Ähnlichkeiten zu den Verläufen der Chromatogramme der Renaturierungsprozesse (V1-V3) deutlich. Innerhalb der ersten 10 ml bleiben die pH-Werte aller Kurven konstant. Im Bereich von ungefähr 10-26 ml erfolgt dann eine relativ klare Zu- oder Abnahme der pH-Werte, welche dann letztendlich wieder konstante Werte einnehmen. Allgemein ist jedoch ein Unterschied zwischen den Verläufen der pH-Kurven der Prozesse V1-V3 und dem Leergradienten festzustellen – während im Leergradienten eine Abnahme der pH-Werte stattfindet, nehmen die pH-Werte innerhalb der Renaturierungsprozesse V1-V3 zu. Der Grund für die kurzfristige und geringe Abnahme der pH-Werte im Leergradienten konnte nicht festgestellt werden – da der Tiefpunkt bei ~ 20 ml jedoch relativ genau mit der Elution des Harnstoff-Gradienten übereinstimmt, kann ein Zusammenhang mit dem Übergang vom Renaturierungs- in den Denaturierungspuffer vermutet werden.

Ein Vergleich der pH-Werte der einzelnen Renaturierungsprozesse (V1-V3) untereinander zeigt auf, dass sehr ähnliche Kurvenverläufe aufgezeichnet wurden. Sowohl die Zeitpunkte als auch die Intensität der Zunahme der pH-Werte stimmen relativ gut überein, was wiederholt auf eine gute Reproduzierbarkeit dieser Prozesse hinweist.

Der im zeitlichen Verlauf zuerst eluierende Peak, dessen Maximum bei ungefähr 17 ml liegt, kann auf die widerhergestellte biologische Aktivität der Urease und der Umsetzung des im Denaturierungspuffer vorhandenen Harnstoffs zurückzuführen sein. Wenn hier noch einmal auf den zuvor beschriebenen Leitfähigkeitsanstieg um ca. 18 ml eingegangen wird – welcher

ebenfalls ein Indiz für die Rückfaltung ist – können somit beide Parameter der biologisch aktiven Urease zugeschrieben werden.

Der zweite Anstieg der pH-Werte mit einem Maximum im Bereich von V_M (~23 ml) kann wieder durch die aufgetragene denaturierte Proteinprobe verursacht worden sein, da diese Lösung einen etwas höheren pH-Wert als die verwendeten Puffer hatte (vgl. Seite 38). Bei einem ähnlichen Retentionsvolumen zwischen 23-25 ml konnte zuvor ebenfalls eine geringe Zunahme der Leitfähigkeit beobachtet werden – somit kann eine hohe Übereinstimmung beider Prozessparameter (pH-Wert und Leitfähigkeit) gefunden werden und beide Änderungen zum einen auf die biologisch aktive Urease (bei ~ 18 ml) und zum anderen auf die applizierte Proteinprobe (bei ~ 23 ml) zurückgeführt werden.

Die unterschiedlichen Elutionszeitpunkte können auch hier durch die verwendete SEC-Säule begründet werden. Die zu Beginn der chromatographischen Trennung denaturierte Urease, welche sich im Vergleich zum Lösungsmittel schneller durch die Säule bewegt, läuft innerhalb der Säule/des ausgebildeten Harnstoff-gradienten in renaturierungsfördernde Umgebungsbedingungen und gewinnt zunehmend ihre biologische Aktivität wieder. Die aktiven Ureasemoleküle setzen einen Teil des Harnstoffs um – was zu einem lokalen Anstieg des pH-Werts und der Leitfähigkeit führt – und bewegen sich dabei immer weiter durch die Säule. Aufgrund der Molekülgröße eluiert die renaturierte Urease somit zuerst (bei ~ 8-10 ml) und dann der ersten kleinere Peak (bei ~ 17-18 ml), welcher dem beschriebenen lokalen Anstieg beider Parameter entspricht. Das Lösungsmittel mit welchem die denaturierte Proteinprobe anfangs aufgetragen wurde im Bereich von V_M (~ 23 ml) eluiert und wird durch den zweiten Peak dargestellt.

Abschließend wurde ein Waschschrift mit jeweils einem Säulenvolumen Denaturierungspuffer durchgeführt, um möglicherweise gebildete Faltungsintermediate oder Aggregate, welche mit dem chromatographischen Material interagieren, von der SEC-Säule zu eluieren. Hier bleibt jedoch anzumerken, dass in keinem der abschließenden Waschschrift eine Änderung im UV-Signal zu beobachten war – genau wie beim eigentlichen Renaturierungsprozess – und die Eluate optisch klar waren.

4.3.2. Renaturierung von RNase A mittels Harnstoff-Gradienten-SEC

Die Versuche zur Renaturierung von RNase A wurden wie bereits erwähnt mit beiden Renaturierungspuffern – der harnstofffreien Variante A und der harnstoffhaltigen Variante B – durchgeführt, um einen direkten Vergleich beider Methoden zu erhalten. Theoretisch betrachtet, sollte die zweite Versuchsreihe mit der Verwendung des Renaturierungspuffers der Variante B eine höhere Ausbeute an renaturierter RNase A liefern, da der zusätzliche Harnstoff zu einer Reduktion von möglichen Aggregationseffekten führen kann (Alibolandi und Mirzahoseini, 2011).

Nachdem die SEC-Säule mit dem entsprechenden Renaturierungspuffer equilibriert wurde, wurden auch hier jeweils 200 µl der denaturierten RNase A-Probe (3 g/l) durch das Ausspülen der Schleife mit Denaturierungspuffer auf die Säule appliziert. Jedoch unterscheidet sich die absolute Menge der aufgetragenen RNase A von der der Urease, da hier mit anderen Konzentrationen gearbeitet wurde (vgl. 3.2.2. *Proteindenaturierung*) – bei diesen Versuchen wurden jeweils 0,6 mg denaturierte RNase A auf die Säule gegeben.

4.3.2.1. Verwendung des Renaturierungspuffers Variante A

Die folgend dargestellten Chromatogramme zu den Versuchen V4-V6 sind die Ergebnisse von drei aufeinander folgenden Versuchstagen und der Verwendung des harnstofffreien Renaturierungspuffers Variante A (vgl. Abb.18).

Auch hier können Parallelen zum Verlauf des entsprechenden Leergradienten gezogen werden (vgl. Abb. 15, Seite 41). Die dort beschriebenen Abschnitte I-IV sind hier ebenfalls mit den jeweiligen Charakteristiken zu erkennen. Des Weiteren sind die Effekte des fortschreitenden Absinkens des UV-Signals unterhalb der Basislinie sowie die Intensitätszunahme des Peaks beim Übergang vom Renaturierungs- in den Denaturierungspuffer über die Versuchstage auch hier vorhanden.

Ein wesentlicher Unterschied zu den ersten Renaturierungsversuchen mit Urease ist jedoch der zusätzliche Peak im Bereich von rund 8-11 ml, welcher über die Fraktionen 3 und 4 gesammelt wurde. Der Elutionszeitpunkt mit einem Maximum bei ca. 10 ml stimmt mit den Ergebnissen einer weiterführenden Arbeit von Wilms (2012) überein – hier wurde bei der chromatographischen Rückfaltung von Lysozym (14,4 kDa) der gleiche Elutionszeitraum festgestellt.

4. Ergebnisse und Diskussion

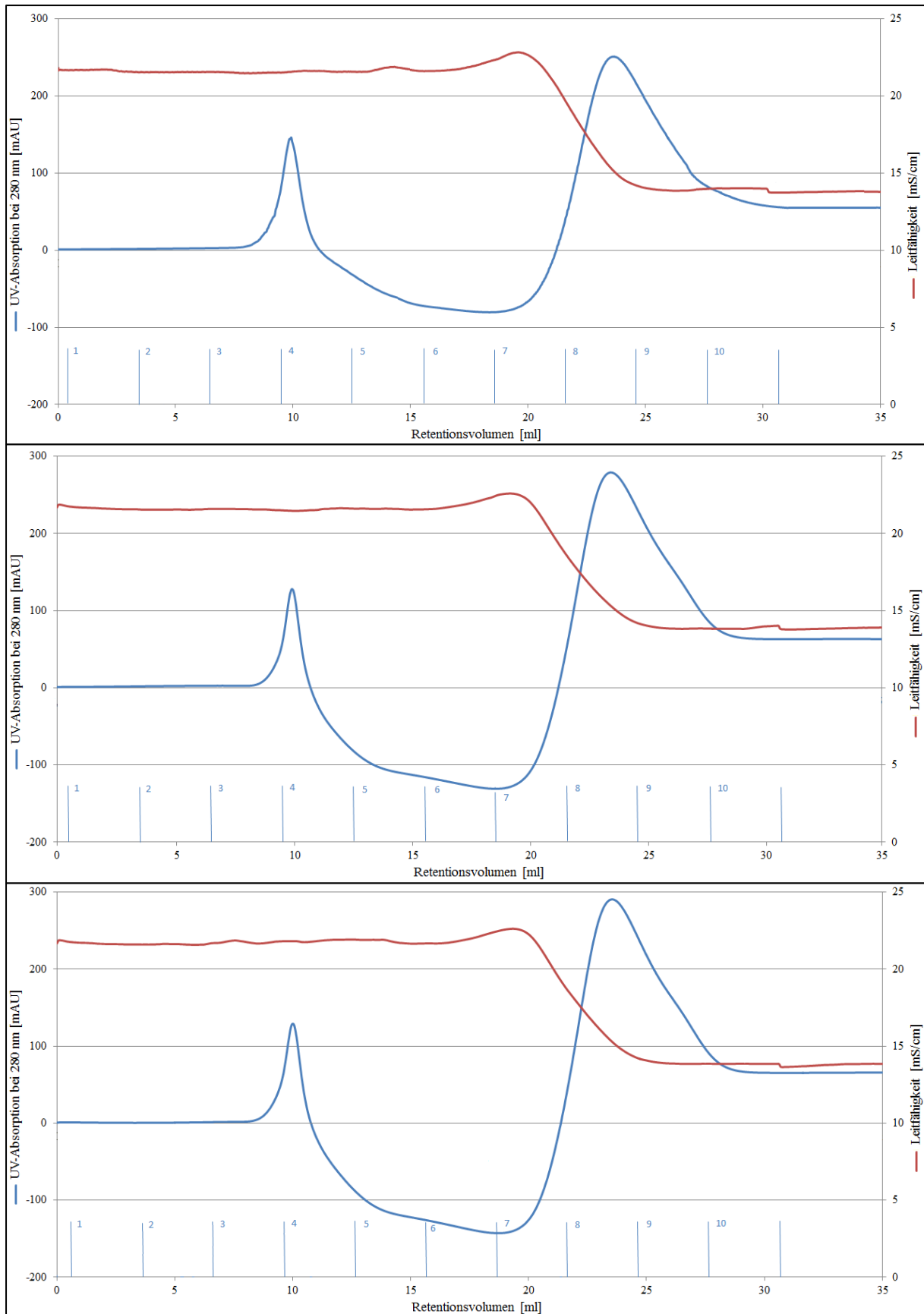


Abb. 18: Chromatogramme der RNase A-Renaturierungen V4-V6 (v.o.n.u.) mittels Harnstoff-Gradienten-SEC von 8-0M Urea (Säule: C 10/40 mit Sephadex™ G-25-Material; Säulenvolumen: 28,7 ml; Flow: 0,2 ml/min; UV-Detektor 280 nm)

In allen Versuchen V4-V6 konnte in den besagten Fraktionen dieses im zeitlichen Verlauf zuerst auftretenden Peaks potentiell renaturierte RNase A identifiziert werden. Der Vergleich der 2D-Emissions-Spektren dieser Fraktionen mit denen der nativen RNase A lassen den Schluss zu, dass die Rückfaltung erfolgreich war. Die Fluoreszenzmaxima liegen mit durchschnittlich 304 ± 1 nm genau in dem Wellenlängenbereich der nativen RNase A (vgl. 7. Anhang, Abb. IV). Eine Aussage zur biologischen Aktivität der RNase A in diesen Fraktionen kann hier leider nicht getroffen werden, da in der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen kein Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet wurde.

Als Puffersystem der untersuchten Fraktionen kann auch hier der verwendete Renaturierungspuffer Variante A angenommen werden, da der Elutionszeitpunkt innerhalb des ersten Viertels eines Säulenvolumens liegt und somit kein anderer Puffer in diesen Fraktionen vorhanden sein kann.

Die Intensitäten und damit einhergehend womöglich auch die Flächen der jeweiligen Protein-Peaks variieren innerhalb der verschiedenen Versuche gering², was ein Hinweis für unterschiedliche Ausbeuten der renaturierten RNase A sein kann. Auf die tatsächlich erzielten Massenausbeuten der Renaturierungsprozesse (V4-V5) wird im später folgenden Kapitel näher eingegangen (vgl. Seite 53).

4.3.2.2. Verwendung des Renaturierungspuffers Variante B

Die Chromatogramme zu den Versuchen V7-V9 der RNase A-Rückfaltung unter Verwendung des Renaturierungspuffer Variante B, welcher 2 M Harnstoff enthielt, sind fast identisch zu den zuvor dargestellten (vgl. Abb. 19). Wie schon beim Vergleich der beiden Leergradienten festgestellt, ist die Leitfähigkeit des hier verwendeten harnstoffhaltigen Renaturierungspuffers Variante B etwas niedriger als bei der harnstofffreien Variante.

Da bei diesen Versuchen der selbe Denaturierungspuffer wie bei den Versuchen V4-V6 verwendet wurde, sollte der Übergang von Renaturierungs- in den Denaturierungspuffer in Form des linearen Gradienten in konstanten Werten – ähnlich denen der vorherigen Versuche – für die Leitfähigkeit und das UV-Signal enden. Für die Werte der Leitfähigkeit kann dies bestätigt werden, allerdings bleibt das UV-Signal auf einem sehr hohen Niveau. Der gleiche Effekt konnte auch beim Leergradienten unter Verwendung des harnstoffhaltigen Renaturierungspuffers Variante B festgestellt werden. Die ursprüngliche Vermutung, dass die

² Die Zahlenwerte der Peakflächen können hier nicht gezeigt werden, da durch einen kompletten und irreparablen Systemabsturz des neuen Steuerrechners die Originaldaten verloren gingen.

4. Ergebnisse und Diskussion

hohe UV-Absorption durch die fortgeschrittene Oxidation des im Denaturierungspuffer befindlichen DTT's verursacht wurde kann hier nicht geltend gemacht werden, da der

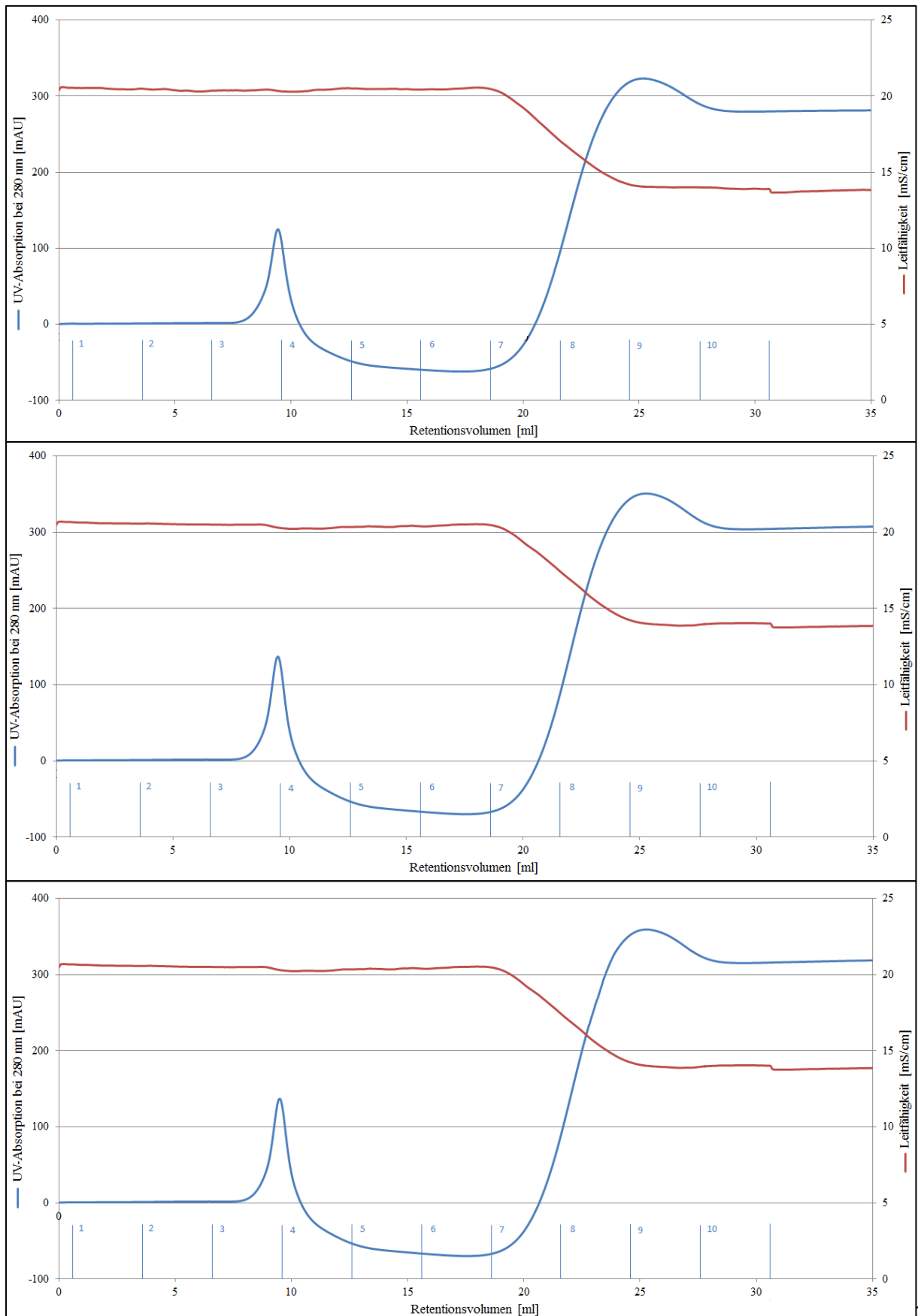


Abb. 19: Chromatogramme der RNase A-Renaturierungen V7-V9 (v.o.n.u.) mittels Harnstoff-Gradienten-SEC von 8-2M Urea (Säule: C 10/40 mit SephadexTM G-25-Material; Säulenvolumen: 28,7 ml; Flow: 0,2 ml/min; UV-Detektor 280 nm)

Denaturierungspuffer zuvor neu angesetzt wurde. Somit muss dieses hohe und zeitgleich reproduzierbare UV-Signal eine Folge der Interaktion beider Puffersysteme sein, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht wurde.

Anhand der zur RNase A gehörenden Peaks um ca. 10 ml kann hier noch keine Aussage getroffen werden, ob die Verwendung des Renaturierungspuffers der Variante B eine erhöhte Ausbeute an renaturiertem Enzym verursacht. Die Peakform und auch die Intensität sind vergleichbar mit den Ergebnissen der vorherigen Versuche V4-V6 – allerdings gibt es einen wesentlichen Unterschied: beim Vergleich der Elutionszeitpunkte beider Prozesse zeigte sich, dass die renaturierten Enzyme in den Versuchen V7-V9 rund einen halben Milliliter früher eluierten.

Dies kann durch kleinere Konformationsunterschiede der renaturierten RNase A begründet sein, welche sich auf das hydrodynamische Volumen der Struktur auswirken und somit auch einen Einfluss auf den Elutionszeitpunkt haben können.

Diese möglichen strukturellen Unterschiede wurden auch in den 2D-Emissions-Spektren der Fraktionen 3 und 4, welche potentiell renaturierte RNase A enthielten, wiedergespiegelt. Die Emissionswellenlängen liegen mit ungefähr 303-304 nm ebenfalls genau im Wellenlängenbereich der nativen RNase A, allerdings um durchschnittlich 1 nm unter denen der Renaturierungsversuche V4-V6.

Der im Renaturierungspuffer Variante B befindliche Harnstoff könnte als Grund für diese Unterschiede angesehen werden, jedoch liegen keine Daten zur Abhängigkeit der Fluoreszenzspektren von der Harnstoffkonzentration vor.

Die quantitative Auswertung und die Vergleiche der beiden RNase A-Renaturierungsprozesse mit Verwendung der unterschiedlichen Renaturierungspuffer erfolgten mittels Fluoreszenzspektroskopie.

4.4. Quantitative Analytik der RNase A-Renaturierungen (V4-V9)

Zur quantitativen Analytik der verschiedenen Versuchsergebnisse erfolgte zunächst die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie. Dazu wurden die 2D-Emissions-Spektren von Lösungen mit bekannten Proteinkonzentrationen aufgezeichnet und daraus Kalibriergeraden erstellt, indem die Fluoreszenzintensitäten der Emissionsmaxima in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration aufgetragen wurden.

Da bei der Durchführung der RNase A-Rückfaltungen zwei verschiedene Renaturierungspuffer zum Einsatz gekommen sind und diese Puffersysteme unterschiedlich starke Einflüsse

auf die Spektren hatten, wurden für die Versuche V4-V6 und für V7-V9 jeweils separate Kalibriergeraden im Bereich von 0,1-1 g/l erstellt. Die beiden verwendeten Renaturierungspuffer waren zum einen die harnstofffreie Variante A und zum anderen die harnstoffhaltige Variante B, mit einer Konzentration von 2 M Harnstoff.

Nachdem die Stammlösung der RNase A auf Grundlage des jeweiligen Puffersystems angesetzt und für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde, erfolgten die fluoreszenzspektroskopischen Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm – es resultierten die folgenden Kalibriergeraden für verschiedene Konzentrationen von nativer RNase A in Renaturierungspuffer der Variante A und B (vgl. Abb. 20).

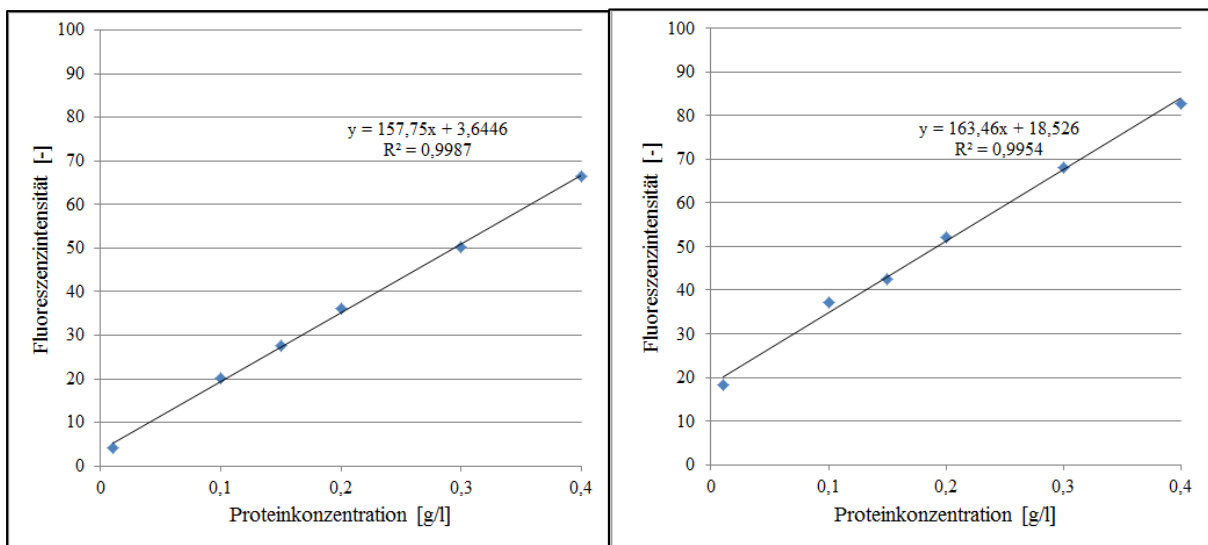


Abb. 20: Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Kalibriergeraden für die RNase A in den Renaturierungspuffern der Variante A (harnstofffrei) und B (2 M Harnstoff) (v.l.n.r.) bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm

Die Ursprünge beider Kalibriergeraden verlaufen nicht durch den Nullpunkt. Dies deutet darauf hin, dass die verwendeten Renaturierungspuffer im betrachteten Emissionswellenlängenbereich entsprechende Signale verursacht haben.

Weiterhin sind in den oben abgebildeten Kalibriergeraden nur die Bereiche von 0,01-0,4 g/l dargestellt, da bei höheren Konzentrationen keine lineare Abhängigkeit zur Fluoreszenzintensität mehr bestand. Dies hat aber keine weitere Relevanz für die Auswertung der Ergebnisse, da die Proteinkonzentrationen der betrachteten Fraktionen der chromatographischen Rückfaltungsversuche innerhalb der Grenzen dieser Kalibriergeraden lagen.

Die durch die lineare Regression ermittelten Trendlinien entsprechen den Werten der im jeweiligen Diagramm dargestellten Gleichung. Die gemessenen Werte zeigen mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von mindestens 99 % eine sehr hohe Übereinstimmung mit der Regressionsgeraden, weshalb die Berechnungen der Proteinkonzentrationen der jeweiligen Fraktionen mit Hilfe der Gleichungen erfolgten.

Nach jedem chromatographischen Rückfaltungsversuch mit RNase A (V4-V9) mussten die untersuchten Fraktionen 3 und 4 für 24 h bei Raumtemperatur inkubieren, da die Fluoreszenzintensitäten innerhalb dieser Zeit stets abnahmen und erst zwischen 21 und 24 h konstante Werte erreichten. Im Gegensatz dazu änderten sich die Werte der Emissionsmaxima nicht mehr und waren durchweg konstant – kleinere Schwankungen von ± 1 nm wurden als angenommene Systemfehler toleriert. Die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten und die konstanten Werte der Emissionsmaxima werden am Beispiel des Renaturierungsprozesses V4 stellvertretend besprochen (vgl. Abb. 21).

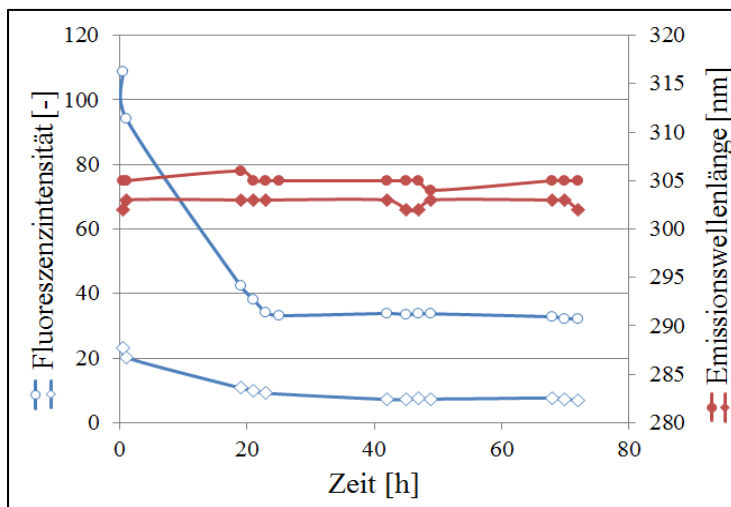


Abb. 21: Entwicklung der Fluoreszenzintensitäten und Emissionsmaxima der Fraktionen 3 (Quadrate) und 4 (Kreise) nach der chromatographischen Rückfaltung V4 (Anregungswellenlänge: 270 nm)

In der obigen Abbildung sind die Verläufe der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten (blau) und die dazu gehörigen Emissionsmaxima (rot) der einzelnen Fraktionen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Emissionswellenlängen beider Fraktionen liegen ab dem Zeitpunkt der Elution mit 304 ± 1 nm relativ genau im Bereich der nativen RNase A-Strukturen und blieben über den gesamten Messzeitraum konstant.

Die Werte der Fluoreszenzintensitäten beider Fraktionen 3 und 4 nahmen dagegen innerhalb der ersten 20 h nach der Elution sehr deutlich ab. Ausgehend von einem anfänglichen Intensitätswert um ca. 24 (Fraktion 3) wird nach rund 21 h eine gleichbleibende Intensität um 7 erreicht. Im Verlauf der Fluoreszenzintensität der Fraktion 4 kann man eine ähnlich zeitabhängige Abnahme erkennen: hier fällt der Wert von anfänglich ca. 110 auf ein konstantes Level um 32.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der betrachteten Fraktionen und damit der Ausbeute an renaturierter RNase A wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten ab dem Erreichen von konstanten Werten (21 h) verwendet.

Für den Versuch V4 konnten für ein Probenvolumen von 3 ml somit die jeweiligen Proteinmassen von 0,064 mg (Fraktion 3) und 0,539 mg (Fraktion 4) berechnet und damit eine

4. Ergebnisse und Diskussion

gesamte Massenausbeute an renaturierter RNase A von rund 100 % erreicht werden. Die Massenausbeuten der Versuche V5 und V6 resultieren mit 88 % und 91 % dagegen in sehr ähnlichen Ergebnissen (vgl. Tabelle 14). Allgemein lassen diese hohen Ausbeuten an renaturierter RNase A den Schluss zu, dass die verwendete Methode sehr gut zur Rückfaltung dieses kleineren Enzyms geeignet ist. Die Abweichung des Ergebnisses für den Versuch V4 von den anderen beiden Versuchsergebnissen V5/6 scheint offenbar auf kleineren zufälligen Fehlern zu basieren.

Tabelle 14: Darstellung der Ergebnisse für die Rückfaltungsversuche V4-V5 mit RNase A und der Verwendung des Renaturierungspuffers Variante A mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fraktionsvolumen: 3 ml, Ausgangsmenge der denaturierten RNase A: 0,6 mg)

	Versuch V4		Versuch V5		Versuch V6	
	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4
Fluoreszenzintensität [-]	7	32	7	28	8	28
Proteinkonzentration [g/l]	0,021	0,180	0,021	0,154	0,028	0,154
Proteinmasse [mg]	0,064	0,539	0,064	0,463	0,083	0,463
Massenausbeute [%]	10,6	89,8	10,6	77,2	13,8	77,2
gesamte Massenausbeute [%]	100,4		87,8		91,0	

Schon bei den entsprechenden Chromatogrammen der Rückfaltungsversuche V4-V6 (vgl. Seite 50) konnte beobachtet werden, dass die Intensität und daraus folgend womöglich auch die Fläche des Proteinpeaks im Versuch V4 höher bzw. größer war, als die der anderen parallel durchgeführten Versuche. Obwohl die Ursache hierfür nicht bekannt ist, könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass bei der Einwaage des RNase A-Lyophilisats versehentlich zu viel eingewogen wurde und die Konzentration der denaturierten Probe bei diesem Durchlauf etwas erhöht war. Andere Gründe wie zum Beispiel Proteinrückstände auf der Säule können ausgeschlossen werden, da nach jeder Versuchsdurchführung ein abschließender Waschschrift mit mindestens einem Säulenvolumen Denaturierungspuffer vorgenommen wurde.

Die Rückfaltungsversuche V7-V9 unter Verwendung des harnstoffhaltigen Renaturierungspuffers der Variante B resultierten in folgenden Ergebnissen (vgl. Tabelle 15).

4. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 15: Darstellung der Ergebnisse für die Rückfaltungsversuche V7-V9 mit RNase A und der Verwendung des Renaturierungspuffers Variante B mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fraktionsvolumen: 3 ml, Ausgangsmenge der denaturierten RNase A: 0,6 mg)

	Versuch V7		Versuch V8		Versuch V9	
	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4
Fluoreszenzintensität [-]	42	29	45	41	40	28
Proteinkonzentration [g/l]	0,144	0,064	0,162	0,138	0,131	0,058
Proteinmasse [mg]	0,431	0,192	0,486	0,413	0,394	0,174
Massenausbeute [%]	71,8	32,0	81,0	68,8	65,6	29,0
gesamte Massenausbeute [%]	103,8		149,8		94,6	

Auch hier konnte wie bei den vorherigen Versuchen eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der betrachteten Fraktionen 3 und 4 nach der Elution festgestellt werden. Über einen Zeitraum von ebenfalls rund 21 h wurde eine stetige Abschwächung des Fluoreszenzsignals beobachtet, welches dann konstante Werte – wie in Tabelle 15 dargestellt – annahm. Die Emissionsmaxima lagen mit 303 ± 1 nm gleich nach der Elution im Wellenlängenbereich der nativen RNase A-Struktur.

Beim Vergleich beider Renaturierungsprozesse mit Verwendung des harnstofffreien Renaturierungspuffer Variante A (V4-V6) und dem harnstoffhaltigen Renaturierungspuffer Variante B (V7-V9) können Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede festgestellt werden.

Zum einen konnten in beiden Prozessen Emissionsmaxima vergleichbar mit denen der nativen RNase A-Struktur mit 305 nm nachgewiesen werden – die Tatsache, dass diese Emissionsmaxima der untersuchten Fraktionen kurz nach der Elution von der SEC-Säule vorlagen deutet darauf hin, dass die Rückfaltungsprozesse während der Migration der Proteine durch den Harnstoff-Gradienten bzw. die Säule weitestgehend abgeschlossen waren.

Zum anderen nahmen die Fluoreszenzintensitäten aller Fraktionen innerhalb eines bestimmten Zeitraums (~ 21 h) nach der Elution ab, um dann konstante Werte anzunehmen. Diese Abnahme kann durch die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten bedingt sein, welche unter den gegebenen Bedingungen etwas mehr Zeit in Anspruch nimmt. Für die Annahme spricht auch, dass dieser Zeitraum unabhängig vom verwendeten Renaturierungspuffer für beide Teilversuche gleich ist und diese Abnahme der Fluoreszenzintensität ebenfalls bei anderen Proteinen wie α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin beobachtet werden konnte (Wilms, 2012).

Dennoch gibt es auch wesentliche Unterschiede der Ergebnisse bei der Verwendung der verschiedenen Renaturierungspuffer. In den Versuchen V4-V6 wurden die größten Proteilmengen jeweils in Fraktion 4 eluiert, wohingegen bei den Versuchen V7-V9 die jeweilige Fraktion 3 die größeren Anteile an renaturierter RNase A enthielt – diese Eigenschaft wurde auch in den 2D-Emissions-Spektren durch entsprechende Intensitätsunterschiede wieder gespiegelt (vgl. 7. *Anhang*, Abb. IV-V). Dies wurde gleichermaßen bei der Auswertung der Chromatogramme deutlich, da sich die Retentionsvolumina der beiden Versuchsdurchführungen durchgehend um ungefähr einen halben Milliliter unterschieden (vgl. Seite 52). Die Ursache könnte in der Verwendung des zusätzlichen Harnstoffs (Renaturierungspuffer Variante B) liegen, da dies der einzige Parameter ist welcher die beiden Versuchsdurchführungen voneinander unterscheidet.

Die Massenausbeuten der Versuche V7-V9 unter Verwendung des harnstoffhaltigen Puffers sind ebenfalls durchgehend höher als die der Renaturierungsversuche V4-V6, was die theoretisch angenommene Ausbeuteerhöhung bestätigen könnte. Die dabei berechneten Werte höher als 100 % können auch hier durch offenbar zufällige Fehler verursacht worden sein. Als wichtigste und wahrscheinlichste Fehlerquelle sind die Temperatureinflüsse zu benennen – hier finden sich Literaturangaben, welche eine Abnahme der Tryptophanfluoreszenz um 2 % bei einem Temperaturanstieg um 1 °C beschreiben (Böhm, 2005). Zwar kann im Nachhinein nicht mehr genau rekonstruiert werden inwiefern sich die Raumtemperaturen zu den jeweiligen Versuchstagen unterschieden haben, allerdings waren Schwankungen vorhanden. Ein weiterer potentieller Fehler könnten kleinere Verunreinigungen der verwendeten Quarzküvetten sein, welche jedoch keine sichtbaren Verschmutzungen aufwiesen und bei jedem Gebrauch mit sehr feinen Tüchern äußerlich gereinigt wurden.

Dennoch kann durch die durchschnittlich höheren Massenausbeuten, welche bei den Renaturierungsversuchen V7-V9 erzielt wurden, auf eine Verbesserung des Rückfaltungsprozesses durch den zusätzlichen Harnstoff im Renaturierungspuffer geschlossen werden. Zudem sind Massenausbeuten zwischen 90 und 100 % bei der Renaturierung von RNase A keine Seltenheit (Ono et al., 2004; Hagen et al., 1990).

4.5. Quantitative Analytik der Urease-Renaturierungen (V1-V3)

Um quantitative Aussagen über die durchgeführten Rückfaltungsprozesse der Urease (V1-V3) treffen zu können wurden verschiedene Methoden angewendet. Zuerst wurden die Fraktionen 3 und 4 mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht, worauf dann eine Umpufferung und die abschließende Bestimmung der Urease-Aktivität folgten.

Um die Proteinkonzentrationen in den entsprechenden Fraktionen ermitteln zu können und daraus auf eine erste Ausbeute renaturierter Urease schließen zu können, wurden auch hier die 2D-Emissions-Spektren von Lösungen mit bekannten Urease-Konzentrationen aufgezeichnet und daraus eine Kalibriergerade erstellt.

Dazu wurde eine Urease-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 g/l nativer Urease und der Verwendung von Renaturierungspuffer A angefertigt, um anschließend für mindestens 12 h bei Raumtemperatur zu inkubieren. Danach wird die Verdünnungsreihe von 0-1 g/l in Abständen von 0,1 g/l hergestellt und alle Lösungen bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm vermessen. Die Fluoreszenzintensitäten der Emissionsmaxima um 336 nm wurden abschließend gegen die entsprechenden Urease-Konzentrationen aufgetragen – woraus sich folgende Kalibriergerade ergab (vgl. Abb. 22).

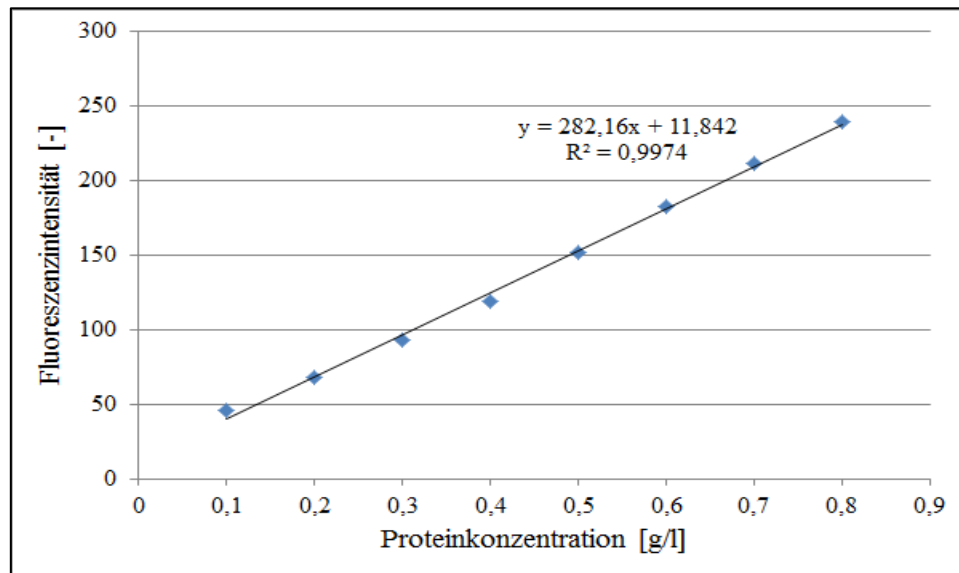


Abb. 22: Darstellung der fluoreszenzspektroskopischen Kalibriergeraden für die native hexamere Urease-Struktur im Renaturierungspuffer der Variante A bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm

Hier ist ebenfalls eine lineare Abhängigkeit zwischen den Fluoreszenzintensitäten und der Urease-Konzentration zu erkennen. Allerdings besteht diese Proportionalität nur bis zu einer Konzentration von 0,8 g/l – weshalb die Darstellung auf diesen Bereich eingeschränkt wurde. Mit einem Bestimmtheitsmaß von über 99 % stimmen die gemessenen Werte sehr gut mit der

kalkulierten Regressionsgeraden überein, welche durch die in der Abbildung dargestellte Gleichung beschrieben wird.

Die Bestimmungen der Konzentrationen in den Fraktionen 3 und 4 konnten in dieser Versuchsreihe erst nach einer Inkubationszeit von rund 24 h durchgeführt werden, da auch hier die Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ersten Stunden nach der Elution abnahmen. Die Verläufe der Emissionswellenlängen und der dazu gehörigen Intensitäten werden für den Versuch V3 stellvertretend besprochen und sind in der folgenden Abbildung 23 dargestellt.

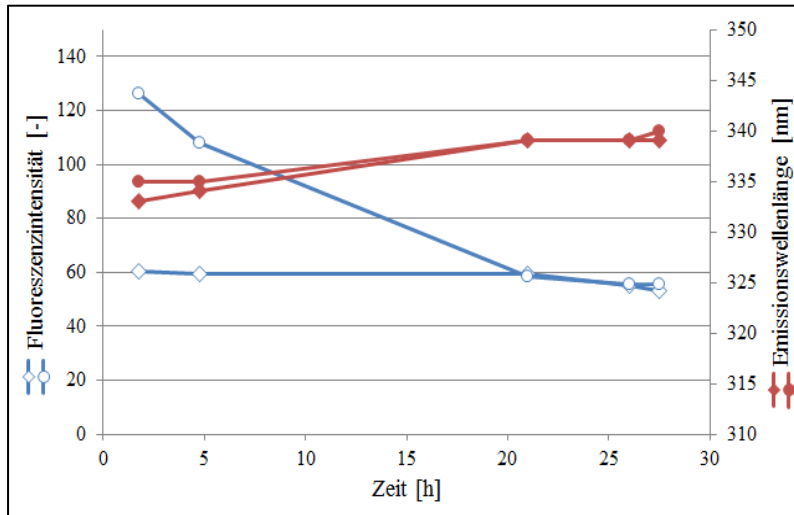


Abb. 23: Entwicklung der Fluoreszenzintensitäten und Emissionsmaxima der Fraktionen 3 (Quadrate) und 4 (Kreise) nach der chromatographischen Rückfaltung V3 (Anregungswellenlänge: 270 nm)

Zu Beginn der Messungen (ca. 2 h nach der Elution von der SEC-Säule) liegen die Emissionswellenlängen beider Fraktionen mit 334 ± 1 nm im Bereich der nativen Urease-Strukturen (~ 336 nm) – jedoch verschieben sich die Maxima beider Fraktionen nach rund 20 h in den Bereich höherer Wellenlängen auf 339 nm, um dann diese Werte über den restlichen Messzeitraum konstant beizubehalten.

Da die Emissionsmaxima in den Fraktionen um rund 3 nm von denen der nativen hexameren Struktur abweichen, kann von geringen Konformationsunterschieden oder der Organisation einzelner monomerer Untereinheiten in differente Quartärstrukturen – beispielsweise in Trimere – ausgegangen werden. Ein entsprechender Übergang von der hexameren in die trimere Urease-Struktur, welcher mit einer parallelen Verschiebung des Emissionsmaximums um 2 nm in den Bereich höherer Wellenlängen verbunden ist, wurde bereits in der Publikation von Omar und Beauregard (1994) beschrieben.

Die Verschiebung der Emissionsmaxima auf 339 nm, welche in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, könnte dahingehend erklären werden, dass innerhalb der trimeren Struktur die fluoreszierenden Tryptophane weniger stark vom polaren Lösungsmittel abgeschirmt sind. Allerdings würde dies auch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bewirken können, da die

4. Ergebnisse und Diskussion

quenched Einflüsse reduziert sind. Ein Einfluss von DTT auf die Fluoreszenzintensität kann an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da nach der SEC kein DTT in den Fraktionen enthalten sein kann.

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten in Fraktion 3 und 4 sind innerhalb der ersten 21 h deutliche Änderungen erkennbar, vergleichbar mit denen der RNase A-Renaturierungen. Die Kurven beider Fraktionen zeigen eine Abnahme und enden auf einem ähnlichen Niveau, was die Vermutung zulässt, dass in beiden Fraktionen ebenso ähnliche Proteinmengen vorhanden sind.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den betrachteten Fraktionen wurden die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten bei 336 nm der beiden jeweils letzten Messungen nach 26 und 28 h gebildet und daraus die Massenausbeuten berechnet.

Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse für die Rückfaltungsversuche V1-V3 mit Urease und der Verwendung des Renaturierungspuffers Variante A mittels Fluoreszenzspektroskopie (Fraktionsvolumen: 3 ml, Ausgangsmenge der denaturierten Urease: 0,5 mg)

	Versuch V1		Versuch V2		Versuch V3	
	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4
Fluoreszenzintensität [-]	40	75	69	75	51	55
Proteinkonzentration [g/l]	0,100	0,224	0,203	0,224	0,139	0,153
Proteinmasse [mg]	0,300	0,672	0,608	0,647	0,416	0,459
Massenausbeute [%]	60,0	134,4	121,6	129,4	83,2	91,8
gesamte Massenausbeute [%]	194,4		251,0		175,0	

Wie relativ schnell zu erkennen ist, liegen die Ergebnisse der Massenausbeuten mittels Fluoreszenzspektroskopie allesamt weit oberhalb von 100 %. Da die zur Berechnung der Massenausbeute verwendete Kalibriergerade auf Basis der nativen hexameren Struktur erstellt wurde und die 2D-Emissions-Spektren der betrachteten Fraktionen nach der Renaturierung durchgehend abweichende Emissionsmaxima von denen der nativen hexameren Struktur aufweisen, kann dies durchaus zu einer solchen Verfälschung der Ergebnisse führen. Aufgrund der bereits geäußerten Vermutung, dass nach der Rückfaltung trimere Urease-Strukturen vorliegen und diese wahrscheinlich mit größeren Fluoreszenzintensitäten einhergehen, kann allein durch die Analytik mittels Fluoreszenzspektroskopie kein Rückschluss auf die tatsächliche Massenausbeute der renaturierten Urease gezogen werden.

Für die weitere quantitative Analytik zur Bestimmung der Enzymaktivität war eine Umpufferung der Fraktionen 3 und 4 erforderlich, da die im Renaturierungspuffer enthalten

Komponenten wie beispielsweise GSH und GSSG die Ergebnisse des folgend durchgeführten Assays verfälscht hätten.

Da sowohl für die Umpufferung als auch für die Renaturierungsversuche das gleiche chromatographische Säulenmaterial verwendet wurde und die Urease bei 280 nm nicht detektierbar war, wurden zuerst Versuche mit einem Standardprotein durchgeführt, um den tatsächlichen Elutionszeitpunkt bestimmen zu können. Das Standardprotein sollte zwei wichtige Eigenschaften besitzen: zum einen musste es bei der Wellenlänge von 280 nm gut detektierbar und zum anderen – ähnlich wie die Urease – groß genug sein, um nicht in das Porensystem des Säulenmaterials eindringen zu können. Daher wurde für die Bestimmung des Elutionszeitpunkts eine BSA-Lösung (66 kDa) mit einer Konzentration von 2,5 g/l verwendet.

Bei einer eingestellten Flussrate von 3 ml/min konnte durch Mehrfachbestimmungen ein wiederholter Elutionszeitpunkt im Bereich zwischen 35 und 60 s festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten auch bei der Verwendung eines 220 nm-Filters zur Detektion bestätigt werden.

Nachdem die zur Umpufferung verwendete SEC-Säule mit 80 mM NaPh-Puffer pH 7 equilibriert wurde, wurden 500 µl der jeweiligen Fraktion manuell auf die Säule appliziert und die umgepufferten Proben manuell am Säulenausgang aufgefangen (UV-Filter: 220 nm). Zur Kontrolle wurden parallel dazu ebenfalls Proben des Renaturierungspuffers Variante A umgepuffert, um diese im Assay als Kontroll- bzw. Blankwerte verwenden zu können. Hier bleibt anzumerken, dass die jeweiligen Blankwerte pro Versuchstag variieren und somit separat berücksichtigt werden. Die unterschiedlichen Blankwerte könnten durch variierende Pumpleistungen der verwendeten peristaltischen Pumpe und die Reihenfolge der zur Umpufferung aufgetragenen Fraktionen bedingt sein. Diese Annahme kommt dadurch zustande, dass allein bei Versuch V1 der Blankwert entscheidend von denen der anderen Versuche abweicht und genau in diesem Versuch eine andere Reihenfolge der aufgetragenen Fraktionen gewählt wurde. Bei der Auswertung der mitgeschriebenen Chromatogramme zu Versuch V1 kann man erkennen, dass die Intensität des Peaks zum relevanten Elutionszeitpunkt etwas niedriger ist, als bei den anderen beiden Versuchen. Daher könnte auf eine unzureichende Beladung der Probenschleife geschlossen werden, was jedoch rückblickend nicht mehr nachvollzogen werden kann und somit der genaue Grund der Abweichung dieses Blankwertes nicht bestimmt werden kann.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Aktivitätsassays für die Versuche V1-V3 dargestellt, welche jedoch vorerst als Rohdaten betrachtet werden müssen (vgl. Tabelle 17). Die berechneten Konzentrationen beziehen sich auf die umgepufferten Proben, welche durch

4. Ergebnisse und Diskussion

die Umpufferung jedoch um den Faktor 1,2 gering verdünnt wurden und der Faktor in Tabelle 17 zunächst unberücksichtigt bleibt.

Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 650 nm und zur Berechnung der Aktivität wurde der Mittelwert der Steigungen der Kalibriergeraden verwendet, welcher bei $0,0051 (\mu\text{M NH}_4^+)^{-1}$ lag (vgl. Seite 32).

Tabelle 17: Darstellung der Rohdaten des photometrischen Aktivitätsassays für die Renaturierungsversuche V1-V3 der Urease
(Messungen bei 650 nm in 1,5 ml-Halbmikro-Einmalküvetten aus PMMA (Schichtdicke 10 mm), Probenvolumen: 1 ml)

	Versuch V1		Versuch V2		Versuch V3	
	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4
A_{Blank}	0,125		0,250		0,271	
A_{Sample}	0,250	0,434	0,255	0,589	0,462	0,665
$\Delta (A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}})$	0,125	0,309	0,005	0,339	0,191	0,394
Aktivität [U/L]	2,45	6,06	0,10	6,65	3,75	7,73
Proteinkonzentration [g/l]	0,025	0,061	0,001	0,067	0,038	0,078

Aus den ermittelten Rohdaten wurden im nächsten Schritt die tatsächlichen Werte der einzelnen Fraktionen ermittelt. Dazu wurden zunächst die Urease-Konzentrationen mit dem Verdünnungsfaktor 1,2 multipliziert und unter Berücksichtigung der tatsächlichen Fraktionsvolumina von 3 ml die gesamte Proteinmasse der jeweiligen Fraktionen berechnet.

Abschließend konnte aus den gewonnenen Daten die gesamte Massenausbeute an renaturierter Urease bestimmt werden (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: Darstellung der tatsächlichen Ergebnisse des photometrischen Aktivitätsassays für die Renaturierungsversuche V1-V3 der Urease
(Messungen bei 650 nm in 1,5 ml-Halbmikro-Einmalküvetten aus PMMA (Schichtdicke 10 mm), Probenvolumen: 1 ml)

	Versuch V1		Versuch V2		Versuch V3	
	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 3	Fraktion 4
Proteinkonzentration [g/l]	0,030	0,074	0,001	0,081	0,046	0,094
Proteinmasse [mg]	0,090	0,221	0,004	0,242	0,137	0,282
Massenausbeute [%]	17,9	44,2	0,01	48,4	27,3	56,3
gesamte Massenausbeute [%]	62,1		48,4		83,6	

Obwohl die Ergebnisse der Renaturierungsprozesse V1-V3 sehr unterschiedliche Werte liefern, konnte dennoch in allen Versuchen biologisch aktive Urease nachgewiesen werden. Dies spricht zumindest teilweise für einen Erfolg der angewendeten Renaturierungsmethoden, jedoch scheinen die Ergebnisse unter gleichen Versuchsbedingungen nicht reproduzierbar zu sein. Bei der Betrachtung der Massenausbeuten muss berücksichtigt werden, dass die trimere Urease-Struktur eine um ~ 20 % geringere Aktivität als die native hexamere Struktur besitzt (Omar und Beauregard, 1994). Da der genaue Anteil an aktiven Urease-Molekülen der verschiedenen Strukturen nicht bestimmt werden konnte und es grundsätzlich möglich ist, dass verschiedene Konformationen der aktiven Urease-Strukturen parallel vorliegen, kann an dieser Stelle keine genauere Auswertung durchgeführt werden.

Bei einem Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration – fluoreszenzspektroskopische Kalibriergerade und Aktivitätsassay – wird deutlich, dass die daraus resultierenden Ergebnisse in einem gewissen Maß vergleichbar sind.

Die unterschiedlich starken Fluoreszenzintensitäten der Fraktionen 3 und 4 – welche in einem bestimmten Bereich proportional zur Urease-Konzentration sind – lassen den ersten Schluss zu, dass in der jeweiligen Fraktion 4 aller Versuche V1-V3 eine höhere Proteinkonzentration und damit eine höhere Enzymaktivität nachweisbar sein müsste. Die ermittelten Massenausbeuten des Aktivitätsassays zeigen ein ähnliches Ergebnis, denn auch hier ist der größere Anteil der aktiven Ureasemoleküle in der Fraktion 4 vorhanden.

Die anteiligen Massenausbeuten der Fraktion 3 unterliegen jedoch größeren Schwankungen – hier konnte zum einen fast keine aktive Urease (V2) nachgewiesen werden und in Versuch V3 wiederum rund 30 % der gesamten Massenausbeute an renaturierter Urease (vgl. Tabelle 18). Dies könnte durch kleine Unterschiede in den Retentionsvolumina während der chromatographischen Rückfaltung begründet sein. Wenn das Maximum der eluierenden Urease genau am Übergang der beiden Fraktionen 3 und 4 liegt – also bei einem Retentionsvolumen von rund 9,5 ml (vgl. Seite 44, Abb. 16), was durch Vergleiche mit den RNase A-Renaturierungen durchaus plausibel ist – und nur geringe Unterschiede während der Rückfaltung zu einer minimalen Änderung des Retentionsvolumens führen, können diese bestehenden Schwankungen resultieren.

4.6. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Renaturierung der beiden Modellproteine Urease aus *Canavalia ensiformis* und Ribonuklease A aus Rinderpankreas führten zu Ergebnissen, welche in einem weiten Bereich mit den Resultaten der Arbeit von Wilms (2010) vergleichbar sind und ebenfalls Gemeinsamkeiten mit in der Literatur beschriebenen Besonderheiten aufweisen.

Die anfänglich bestimmten charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften für die jeweiligen nativen und denaturierten Modellproteine, stimmten weitestgehend mit den bereits publizierten Ergebnissen überein. Für die Urease konnte bei einer verwendeten Anregungswellenlänge von 270 nm für die native hexamere bzw. die entfaltete Struktur Emissionsmaxima von rund 336 bzw. 349 nm festgestellt werden, welche auf der Fluoreszenz der Tryptophanreste basierten. Ähnliche Werte wurden von Omar und Beaugard (1995) veröffentlicht, weshalb die in der Arbeit erzielten Ergebnisse als plausibel angenommen wurden. Für die RNase A konnten bei gleicher Anregungswellenlänge Emissionsmaxima im Bereich kleinerer Wellenlängen ermittelt werden, da in ihrer Aminosäurekette nur die Fluorophore Phenylalanin und Tyrosin vorhanden sind – die native Struktur wies ein Emissionsmaximum bei 305 nm auf und die entfaltete RNase A-Struktur hatte ein Maximum bei 309 nm. Dies wurde ebenfalls durch verschiedene Literaturangaben bestätigt (Krebs et al., 1984; Lin und Brandts, 1983).

Bei der Aufnahme der Entfaltungskurve für Urease konnte aufgrund der Verschiebung der Emissionsmaxima in Bereiche höherer Wellenlängen die zunehmende Auffaltung durch den Anstieg der Harnstoffkonzentration im Denaturierungspuffer festgestellt werden (vgl. Abb. 13). Hier wurde in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Wilms (2010) der mögliche quenchende Einfluss des im Denaturierungspuffer vorhandenen DTT auf die Fluoreszenzintensität des Tryptophans festgestellt. Das in niedrigen Konzentrationen vorliegende DTT hat im Bereich von 280-290 nm absorptive Eigenschaften, welche durch die fortschreitende Oxidation in die thermodynamisch günstigere Form kontinuierlich zunehmen (Sanyal et al., 1989). Um diesen Einfluss so gering wie möglich zu halten, sollte ein zügiger Verbrauch des DTT-haltigen Puffers oder eine kontinuierliche Erneuerung dieses Puffers vorgesehen werden.

Parallel zu diesem Effekt wurde ein weiterer potentieller Einfluss auf die Fluoreszenzintensität festgestellt: der pH-Wert des Lösungsmittels. Da in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Renaturierung von Urease durchgeführt wurden und diese das chaotrope Agens Harnstoff umsetzt, was wiederum zu einem Anstieg des pH-Wertes führt, könnte dies die

Fluoreszenzintensität ebenfalls beeinflussen. Da diese Vermutungen durch etwaige Literaturangaben weder bestätigt noch verworfen werden konnten, wären zukünftig weitere Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom pH-Wert des Lösungsmittels empfehlenswert.

Allgemein ist die Methode der Fluoreszenzspektroskopie sehr gut geeignet um strukturelle Eigenschaften oder Veränderungen von Proteinstrukturen, wie etwa die Re- oder Denaturierung, anhand von 2D-Emissions-Spektren zu verfolgen. Hier zählen die relativ einfache Handhabung, die zerstörungsfreie Analyse und die schnelle Auswertbarkeit zu den Vorteilen. Dennoch hat dieses sehr sensitive Verfahren auch einige Nachteile: eine der größten Fehlerquellen liegt in der Temperaturempfindlichkeit, was einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Fluoreszenzintensitäten haben kann. Daher ist bei der Anwendung dieser Methode auf möglichst gleichbleibende Umgebungstemperaturen zu achten, was in dieser Arbeit offenbar nicht immer gewährleistet werden konnte – dies konnte sehr gut bei der Bestimmung der Proteinkonzentration, welche über einen bestimmten Bereich proportional zur Fluoreszenzintensität des jeweiligen Proteins ist, beobachtet werden (vgl. Abschnitt 4.4.). Die Bestimmung der Proteinkonzentration und der davon abhängigen Massenausbeute unterlag kleineren Schwankungen, was aber schon ausreicht um die quantitative Analytik zu erschweren und die Plausibilität der gewonnenen Ergebnisse in Frage stellen kann. Somit sollten möglicherweise andere Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung parallel genutzt werden und, falls sich um Enzyme handelt, Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität verwendet werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Assay zur Bestimmung der Urease-Aktivität auf Grundlage der Berthelot-Reaktion, wies sehr gut reproduzierbare Werte auf. Mit einem durchgehend hohen Bestimmtheitsmaß von über 99 % scheinen die Messunsicherheiten und damit verbunden die Fehlerraten sehr gering zu sein. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Durchführung des Assays zum einen durch das Ansetzen verschiedener Reagenzien, Puffer und Standards sehr komplex und langwierig ist und der Prozess zum anderen durch die langen Inkubationszeiten von ca. 1 h noch zusätzlich zeitintensiv ist (vgl. Abschnitt 3.2.5.3.). Außerdem findet hier die giftige Chemikalie Nitroprussid-Natrium-Dihydrat als Katalysator Verwendung, was die Handhabung des Assays ebenfalls erschwert. Zur einfacheren und schnelleren Aktivitätsbestimmung wäre die Verwendung schon bestehender Test-Kits sinnvoll, falls dies aus kostentechnischer Sicht realisierbar ist oder aber eine Optimierung des verwendeten Assay empfehlenswert.

Das für die Rückfaltungsprozesse verwendete chromatographische Medium Sephadex G-25, sowie die weiterführende Anwendung der Harnstoff-Gradienten SEC resultierten bei den hier

durchgeführten Versuchen in allen Fällen in der angestrebten Renaturierung der Modellproteine. Die Versuchsbedingungen und die Zusammensetzung der Re- wie Denaturierungspuffer entsprachen den von Wilms (2010) getroffenen Erkenntnissen, welcher in der benannten Arbeit die höchsten Massenausbeuten an renaturiertem Lysozym durch die Verwendung des vergleichsweise einfachen und kostengünstigen Sephadex G-25-Mediums erzielen konnte. Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollte eine Verallgemeinerung dieser Ergebnisse überprüft und die Anwendungsbereiche durch die Verwendung von sehr großen Proteinen, wie der Urease mit 540 kDa, erweitert werden.

Die Ergebnisse der Rückfaltung der RNase A ähneln sehr stark denen der Lysozym-Renaturierung. Bei einer aufgetragenen Konzentration von 3 g/l denaturierter RNase A konnte eine Massenausbeute an renaturiertem Protein zwischen 90-100% erreicht werden. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls zuvor in diversen Publikationen beschrieben (Ono et al., 2004; Hagen et al., 1990), allerdings wurde hier ein paralleler Vergleich von verschiedenen Renaturierungspuffern durchgeführt. Einerseits wurde der gleiche Renaturierungspuffer wie in der Arbeit von Wilms (2010) benutzt – welcher eine Harnstoffkonzentration von 2 M aufwies und mit Variante B bezeichnet wurde – und andererseits erfolgten mehrere Rückfaltungsprozesse auf Grundlage eines harnstofffreien Renaturierungspuffers Variante A bei ansonsten konstanten Versuchsbedingungen, um den tatsächlichen Einfluss des zusätzlichen Harnstoffs bestimmen zu können. Der Vergleich beider Renaturierungspuffer durch die erzielten Massenausbeuten der jeweiligen Prozesse, resultierte in einem Anstieg der Massenausbeuten unter Verwendung des harnstoffhaltigen Renaturierungspuffers (vgl. Abschnitt 4.4.).

Die Ergebnisse der Urease-Renaturierungen lieferten weniger hohe Massenausbeuten, welche durchschnittlich bei 60 % lagen, dennoch scheint die Rückfaltung durch die verwendete Methode generell möglich zu sein (vgl. Abschnitt 4.5.). Bei diesen Rückfaltungsprozessen wurde ebenfalls auf den harnstofffreien Renaturierungspuffer Variante A zurückgegriffen, da der ansonsten vorhandene Harnstoff durch die Urease umgesetzt werden würde, was wiederum zu einem Anstieg des pH-Werts und der Leitfähigkeit geführt hätte. Da die Auswirkungen dieser beiden Parameter auf den Rückfaltungsprozess nicht bekannt waren und dadurch eine zusätzliche Verfälschung der Ergebnisse des Aktivitätsassays aufgetreten wären, wurde auf den Harnstoff verzichtet. Obwohl die so erzielten Massenausbeuten vergleichsweise sehr hoch sind, könnte in weiterführenden Arbeiten die Verwendung anderer chaotroper Agenzien wie beispielsweise Guanidin-HCl als Denaturierungsmittel untersucht werden. Da das Guanidin-HCl keiner Zersetzung durch die Urease ausgesetzt ist und somit die Ausbildung eines vergleichbaren Gradienten, sowie der Zusatz als Faltungsadditiv im Renaturierungspuffer denkbar ist, sollte die beschriebene Methode unter Verwendung eines

anderen Denaturierungsmittels potentiell umsetzbar sein. Somit könnte ebenfalls eine Erhöhung der Massenausbeute erzielt werden, da chaotrope Agenzien im Renaturierungspuffer mögliche Aggregationseffekte minimieren können (Alibolandi und Mirzahoseini, 2011).

Neben den relativ hohen Massenausbeuten beider Modellproteine, konnte für die Urease eine Besonderheit festgestellt werden. Da das Ureasemolekül im nativen Zustand aus sechs identischen monomeren Untereinheiten besteht, bestand im Laufe des Renaturierungsprozesses die Möglichkeit der Rückfaltung in eine weitere aktive Struktur: dem Trimer. Diese Besonderheit scheint in den durchgeführten Versuchen aufgetreten zu sein, was jedoch allein anhand der sehr sensitiven und störungsanfälligen Fluoreszenzspektroskopie festgestellt werden konnte (Omar und Beauregard, 1994). Aufgrund der Tatsache, dass das trimere Ureasemolekül über eine um ~ 20 % geringere Aktivität als die native Struktur verfügt, wären hier weiterführende qualitative sowie quantitative Analysen erforderlich, um die Aussagen bezüglich der Massenausbeuten zu stützen und das Verhältnis der verschiedenen Strukturen innerhalb einer Lösung feststellen zu können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Renaturierung von Urease aus *Canavalia ensiformis* und Ribonuklease A (RNase A) aus dem Rinderpankreas unter Verwendung einer Harnstoff-Gradienten-SEC durchgeführt.

Anhand parallel durchgeführter Rückfaltungsprozesse der RNase A unter Verwendung von zwei verschiedenen Renaturierungspuffern – einer harnstofffreien und einer harnstoffhaltigen Variante – konnte der positive Einfluss von Faltungsadditiven, wie dem niedermolekularem Harnstoff, auf die Massenausbeute der renaturierten RNase A bestätigt werden.

Generell konnte durch die Anwendung einer Harnstoff-Gradienten-SEC die Rückfaltung beider Modellproteine erreicht werden. Durch den Einsatz dieser sehr unterschiedlichen Proteine – der Urease mit einer Molekülgröße von 540 kDa und der RNase mit einer vergleichbar kleinen Molekülgröße von 13,8 kDa – wurde gezeigt, dass die beschriebene Renaturierungsmethode über einen weiten Bereich verschieden großer Proteine angewendet werden kann.

Zur quantitativen Analytik der Urease-Rückfaltung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Assay zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Urease etabliert. Dieses Assay basiert auf dem direkten Nachweis des durch die enzymatische Umsetzung von Harnstoff entstandenen Ammoniaks durch eine modifizierte Berthelot-Reaktion, welche auch als Indophenol-Blau-Reaktion bezeichnet wird.

Weiterhin wurde die Fluoreszenzspektroskopie zur Analytik der charakteristischen Fluoreszenzeigenschaften der nativen und denaturierten Proteinstrukturen, sowie zur Bestimmung der Proteinkonzentration der renaturierten Proteine anhand der Fluoreszenzintensität in den entsprechenden Lösungen angewendet.

Während der untersuchten Rückfaltungsprozesse beider Modellproteine konnten weiterführende strukturelle Änderungen nach dem Durchlaufen des Harnstoff-Gradienten und der Elution von der SEC-Säule festgestellt werden, da die Fluoreszenzintensitäten erst nach einem längeren Zeitraum von bis zu 24 h ein konstantes Niveau erreicht und damit auf einen Abschluss der Renaturierung hingewiesen haben.

6. Literaturverzeichnis

6.1. Publikationen

- Alibolandi M., Mirzahoseini H.** (2011) “Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies”, *Biochemistry Research International*, Article ID 631607
- Anfinsen C. B.** (1973) “Principles that govern the folding of protein chains”, *Science* 181, 223-230
- Balasubramanian A., Ponnuraj K.** (2010) “Crystal Structure of the First Plant Urease from Jack Bean: 83 Years of Journey from Its First Crystal to Molecular Structure“, *Journal of Molecular Biology* 400, 274-283
- Basu A., Li X., Leong S. S. J.** (2011) “Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes”, *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 241-251
- Böhm G.** (2005) “Spektroskopische Verfahren”, ACGT ProGenomics AG, Halle (Saale)
- Brown T. A.** (2001) “Gene Cloning and DNA analysis – an introduction”, 4. Auflage, Blackwell Science, 382-385
- Chen Y., Leong S. S. J.** (2010) “High productivity refolding of an inclusion body protein using pulsed-fed size exclusion chromatography”, *Process Biochemistry* 45, 1570-1576
- Clark D. P., Pazdernik N. J.** (2009) “Molekulare Biotechnologie – Grundlagen und Anwendungen”, Spektrum Akademischer Verlag, 8-11
- Dill K. A., Ozkan S. B., Shell M. S., Weikl T. R.** (2008) “The Protein Folding Problem”, *Annu Rev Biophys.* 37, 289-316
- Follmer C.** (2008) „Insights into the role and structure of plant ureases“, *Phytochemistry* 69, 18-28
- Freydell E. J., van der Wielen L. A. M., Eppink M. H. M., Ottens M.** (2010) „Size-exclusion chromatographic protein refolding: Fundamentals, modeling and operation“, *Journal of Chromatography A* 1217, 7723-7737
- Galler H.-J., Müller H.-J.** (1988) „Spektroskopische Methoden in der Biochemie“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- García-Fruitós E., González-Montalbán N., Morell M., Vera A., Ferraz R. M., Arís A., Ventura S., Villaverde A.** (2005) "Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins", *Microbial Cell Factories* 4:27
- Gu Z., Su Z., Janson J.-C.** (2001) "Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding", *Journal of Chromatography A* 918, 311-318
- Gutte B., Merrifield R. B.** (1969) "Total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity", *Journal of the American Chemical Society* 91, 501-502
- Hagen A. J., Hatton T. A., Wang D. I. C.** (1990) „Protein Refolding in Reversed Micelles“, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 35, 955–965
- Herskovits T. T., Kelly T. M.** (1973) "Viscosity studies of aqueous solutions of alcohols, ureas and amides", *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 77, No. 3, 381–388
- Hirai M., Kawai-Hirap R., Hira T., Ueki T.** (1993) "Structural change of jack bean urease induced by addition of surfactants studied with synchrotron-radiation small-angle X-ray scattering", *European Journal of Biochemistry* Volume 215, 55-61
- Horton H. R., Moran L. A., Scrimgeour K. G., Perry M. D., Rawn J. D.** (2008) "Biochemie", 4. aktualisierte Auflage, Addison Wesley Longman Verlag, München
- Jana S., Deb J. K.** (2005) "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 67, No. 3, 289-298
- Jungbauer A., Kaar W., Schlegl R.** (2004) „Folding and refolding of proteins in chromatographic beds“, *Current Opinion in Biotechnology* 15, 487-494
- Jungbauer A., Kaar W.** (2007) „Current status of technical protein refolding“, *Journal of Biotechnology* 128, 587-596
- Kandeler E., Gerber H.** (1988) „Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium“, *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72
- Kayser O.** (2002) „Grundwissen Pharmazeutische Biotechnologie“, 1. Auflage, B. G. Teubner Verlag, Stuttgart
- Kempers A. J., Kok C. J.** (1988) „Re-Examination of the determination of ammonium as the indophenol blue complex using salicylate“, *Analytica Chimica Acta* 221, 147-155

- Knippers R.** (2006) „Molekulare Genetik“, 9. komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Krajewska B., Ciurli S.** (2005) “Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. Probing acid–base groups of the active site by pH variation”, *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 651-658
- Krebs H., Schmid F. X., Jaenicke R.** (1984) „Native-like Folding Intermediates of Homologous Ribonucleases”, *Biochemistry* Vol. 24, No. 15, 3846-3852
- Kunitz M.** (1940) “Crystalline ribonuclease“, *The Journal of General Physiology* 24, 15-32
- Lakowicz J. R.** (1999), “Principles of Fluorescence Spectroscopy”, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2. Edition, New York
- Larson S. B., Day J. S., Nguyen C., Cudney R., McPherson A.** (2010), “Structure of bovine pancreatic ribonuclease complexed with uridine 50-monophosphate at 1.60 Å resolution”, *Acta Crystallographica Section F, Volume 66, Part 2*, 113-120
- Levinthal C.** (1968) “Are there pathways for protein folding?”, *Journal of Medical Physics* Volume 65, 44-45
- Li M., Su Z.-G., Janson J.-C.** (2004) „In vitro protein refolding by chromatographic procedures“, *Protein Expression and Purification* 33, 1-10
- Lin L.-N., Brandts J. F.** (1983) „Mechanism for the Unfolding and Refolding of Ribonuclease A. Kinetic Studies Utilizing Spectroscopic Methods”, *Biochemistry* Vol. 22, No. 3, 564–573
- Lindgren M.** (2010) “On the Mechanism of Urea-Induced Protein Denaturation“, ISBN: 978-91-7264-997-2, Printed by: VMC KBCm Umeå/Sweden
- Lotte K.** (2004) “3D-Fluoreszenzspektroskopie mit Tryptophan und Tryptophan-Analoga: von Lösungsmiteleinflüssen zu Proteinkonformationen“, Dissertation, Universität Bielefeld
- Middelberg A. P. J.** (2002) “Preparative protein refolding”, *TRENDS in Biotechnology* Vol.20, No.10, 437-443
- Omar S., Beauregard M.** (1994) “Detection of α -Urease dissociation by fluorescence emission spectroscopy”, *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 201, No. 3, 1096-1099

- Omar S., Beauregard M.** (1995) "Dissociation and unfolding of jack bean urease studied by fluorescence emission spectroscopy", *Journal of Biotechnology* 39, 221-228
- Ono T., Nagatomo M., Nagao T., Ijima H., Kawakami K.** (2004) "Nonaggregating refolding of Ribonuclease A using reverse micellar dialysis", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 89, 290-295
- Patton C. J., Crouch S. R.** (1977) "Spectrophotometric and Kinetics Investigation of the Berthelot Reaction for the Determination of Ammonia", *Analytical Chemistry*, Vol. 49, 464-469
- Pohlmann K., Zahn D.** (2010) "Untersuchungen zu Denaturierung und Renaturierung von Proteinen mittels Fluoreszenzspektroskopie", Master-Projekt, HAW Hamburg
- Qiu W., Li T., Zhang L., Yang Y., Kao Y.-T., Wang L., Zhong D.** (2008) „Ultrafast quenching of tryptophan fluorescence in proteins: Interresidue and intrahelical electron transfer", *Chemical Physics*, Vol. 350, 154-164
- Raines R. T.** (1998) "Ribonuclease A", *Chemical Reviews* 98, 1045-1065
- Rouessac F., Rouessac A.** (2007) "Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques", 2. Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester/England
- Sanyal G., Kim E., Thompson F. M., Brady E. K.** (1989) "Static quenching of tryptophan fluorescence by oxidized dithiothreitol". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 165, 772-781
- Schug A., Onuchic J. N.** (2010) "From protein folding to protein function and biomolecular binding by energy landscape theory", *Current Opinion in Pharmacology* 10, 709-714
- Searle P. L.** (1984) "The Berthelot or Indophenol Reaction and Its Use in the Analytical Chemistry of Nitrogen", *Analyst* Vol. 109, 549-568
- Singh S. M., Panda A. K.** (2005) "Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 99, No. 4, 303-310
- Sinsabaugh R. L., Reynolds H., Long T. M.** (2000) "Rapid assay for amidohydrolase (urease) activity in environmental samples", *Soil Biology & Biochemistry* 32, 2095-2097

- Smyth D. G., Stein W. H., Moore S.** (1963) „The Sequence of Amino Acid Residues in Bovine Pancreatic Ribonuclease: Revisions and Confirmations”, The journal of biological chemistry, Vol. 238, 227-234
- Sumner J. B.** (1926) “The isolation and crystallization of the enzyme Urease”, The Journal of Biological Chemistry 69, 435-441
- Sumner J. B.** (1946) “The chemical nature of enzymes”, Nobel Lecture
- Thavarungkul P., Kanatharana P.** (1994) “An enzyme sensor for urea based on conductivity measurement”, Journal on the Science Society of Thailand, Vol. 20, 23-30
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T.** (2002) „Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies“, Protein Expression and Purification 28, 1-8
- Ventura S., Villaverde A.** (2006) “Protein quality in bacterial inclusion bodies”, Trends in Biotechnology Vol. 24, No. 4, 179-185
- Villaverde A., Carrió M. M.** (2003) “Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies”, Biotechnology Letters 25, 1385-1395
- Wang S. S.-S., Hung Y.-T., Lin Y.-C.** (2010) „Kinetic studies of the oxidation of glutathione in protein refolding buffer”, Bioprocess and Biosystems Engineering 33, 277-286
- Wilms D.** (2010) “Renaturierung von Lysozym mittels Harnstoff-Gradienten-SEC“, Bachelor-Arbeit HAW Hamburg
- Wilms D.** (2012) „Process Optimization of Urea-Gradient SEC for Protein Refolding“, Master-Arbeit HAW Hamburg

6.2. Internetquellen

Internet I (2012), <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LA4>
letztes Abrufdatum 26.04.2012

Internet II (2012), <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3JW1>
letztes Abrufdatum 26.04.2012

7. Anhang

Main method:	
▣ (Main)	
0.00	Base Volume 29.452 {ml} Sephadex_G25_C10/40_Desalting
0.00	Alarm_Pressure Enabled 0.45 {MPa} 0.00 {MPa}
0.00	Message "Schleife mit 1ml Probe (native Urease) füllen" Screen "submarine"
▣ 0.00	Block Equilibration (Equilibration)
0.00	Base SameAsMain
0.00	Flow 1.000 {ml/min}
0.00	Gradient 100 {%B} 0.00 {base}
60.00	AutozeroUV
60.00	End_Block
▣ 0.00	Block Denat_Gradient (Denat_Gradient)
0.00	Base SameAsMain
0.00	Flow 1.000 {ml/min}
0.00	Gradient 0.0 {%B} 7.50 {base}
7.50	End_Block
▣ 0.00	Block Injection (Injection)
0.00	Base SameAsMain
0.00	InjectionValve Inject
0.00	InjectionMark
0.00	Flow 0.200 {ml/min}
0.60	InjectionValve Load
0.60	End_Block
▣ 0.00	Block Elution (Elution)
0.00	Base SameAsMain
0.00	Flow 0.200 {ml/min}
0.00	Fractionation_900 3.000 {ml}
30.00	Fractionation_Stop_900
60.00	End_Method

Abb. I: Darstellung des Chromatographie-Programms für die Versuche zur Renaturierung der Modellproteine mittels Harnstoff-Gradienten-SEC (Säule: C 10/40 mit Sephadex™ G-25-Material; Säulenvolumen: 28,7 ml; UV-Detektor 280 nm). Das verwendete Chromatographiesystem war ein ÄKTA™ purifier UPC 10 der Firma GE Healthcare. Diese Methode wurde mit Hilfe der dazugehörigen Software UNICORN® 5.2 erstellt.

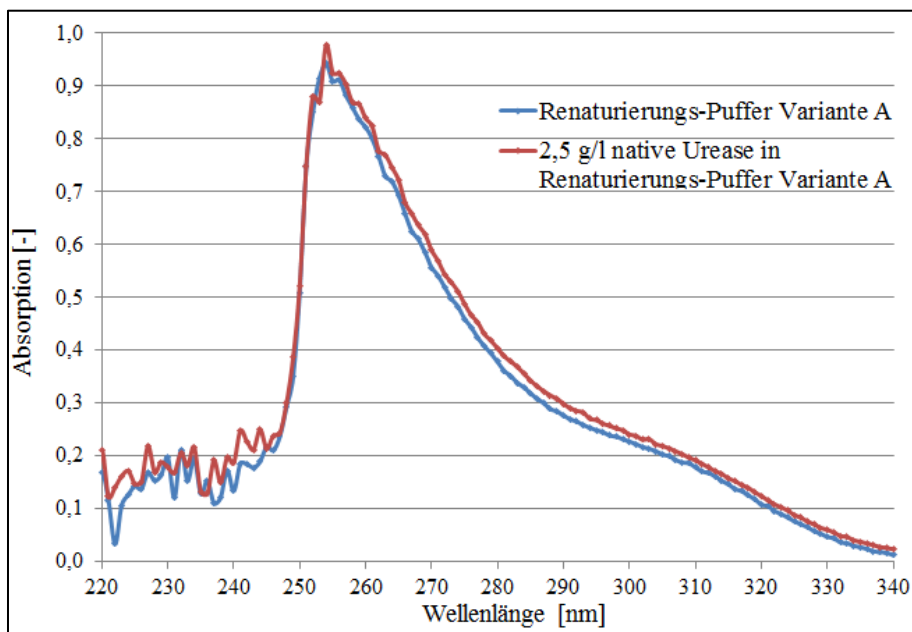


Abb. II:

UV-Absorptions-Scans von Renaturierungspuffer Variante A und dem gleichen Puffer mit einer Konzentration von 2,5 g/l Urease im Wellenlängenbereich von 220-340 nm

7. Anhang

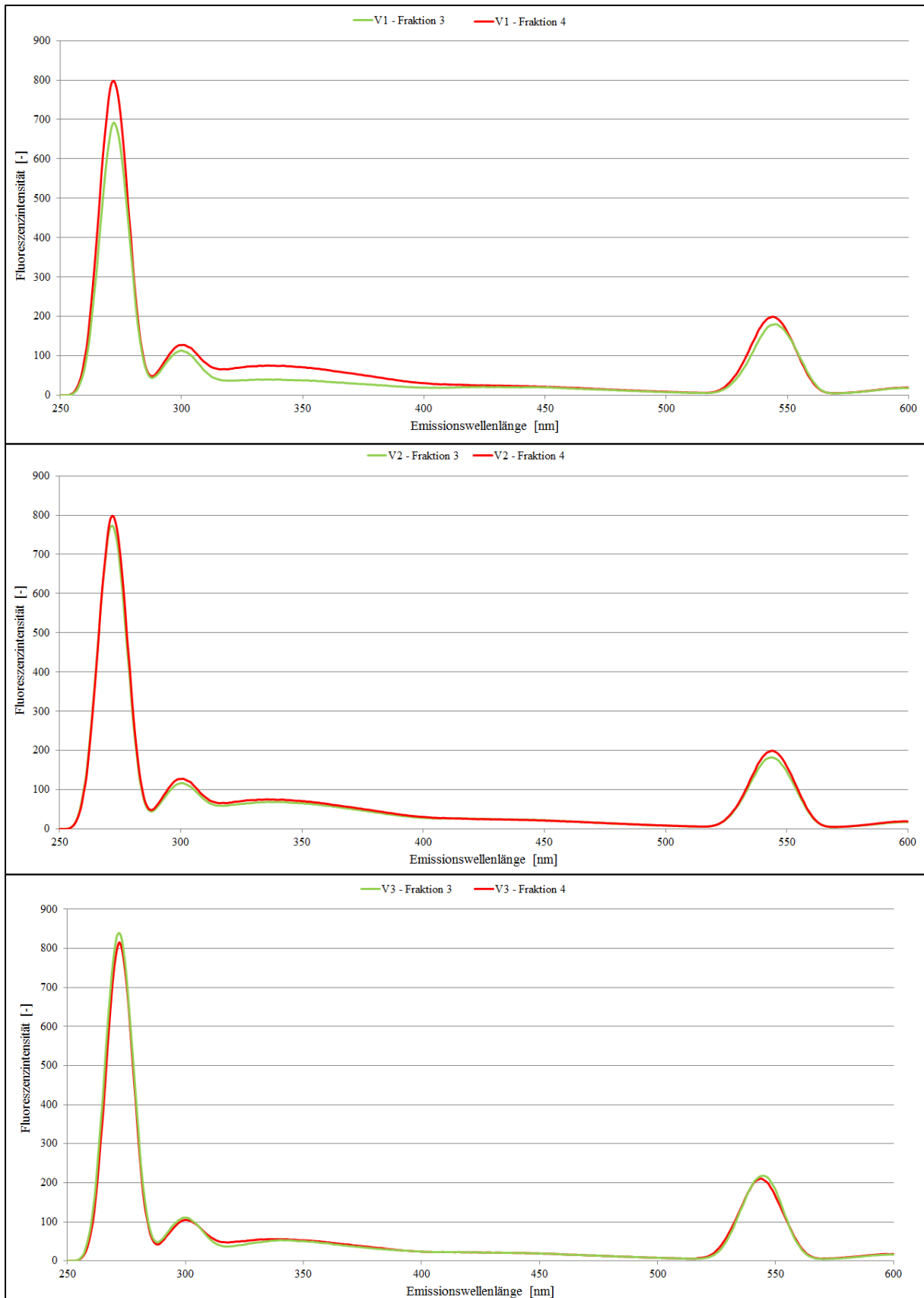


Abb. III: Darstellung der 2D-Emissions-Spektren zu den Renaturierungsversuchen V1-V3 für Urease. Hier sind nur die jeweiligen Fraktionen 3 und 4 berücksichtigt, welche nachweisbar biologisch aktive Urease enthielten. (Anregungswellenlänge: 270 nm, hohe Empfindlichkeit)

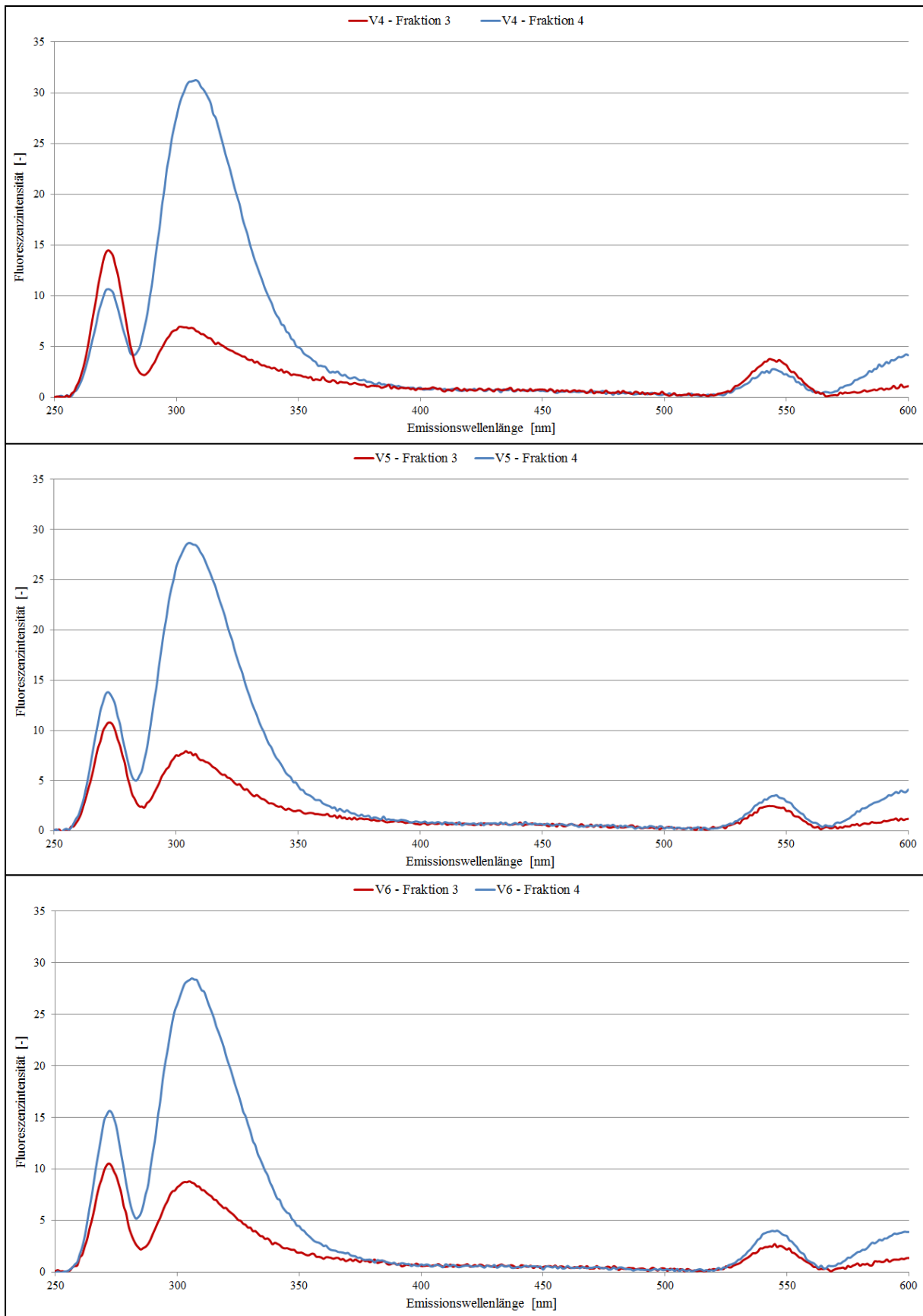


Abb. IV: Darstellung der 2D-Emissions-Spektren zu den Renaturierungsversuchen V4-V6 für RNase A. Hier sind nur die jeweiligen Fraktionen 3 und 4 berücksichtigt, welche potentiell renaturierte RNase A enthielten. (Anregungswellenlänge: 270 nm, niedrige Empfindlichkeit)

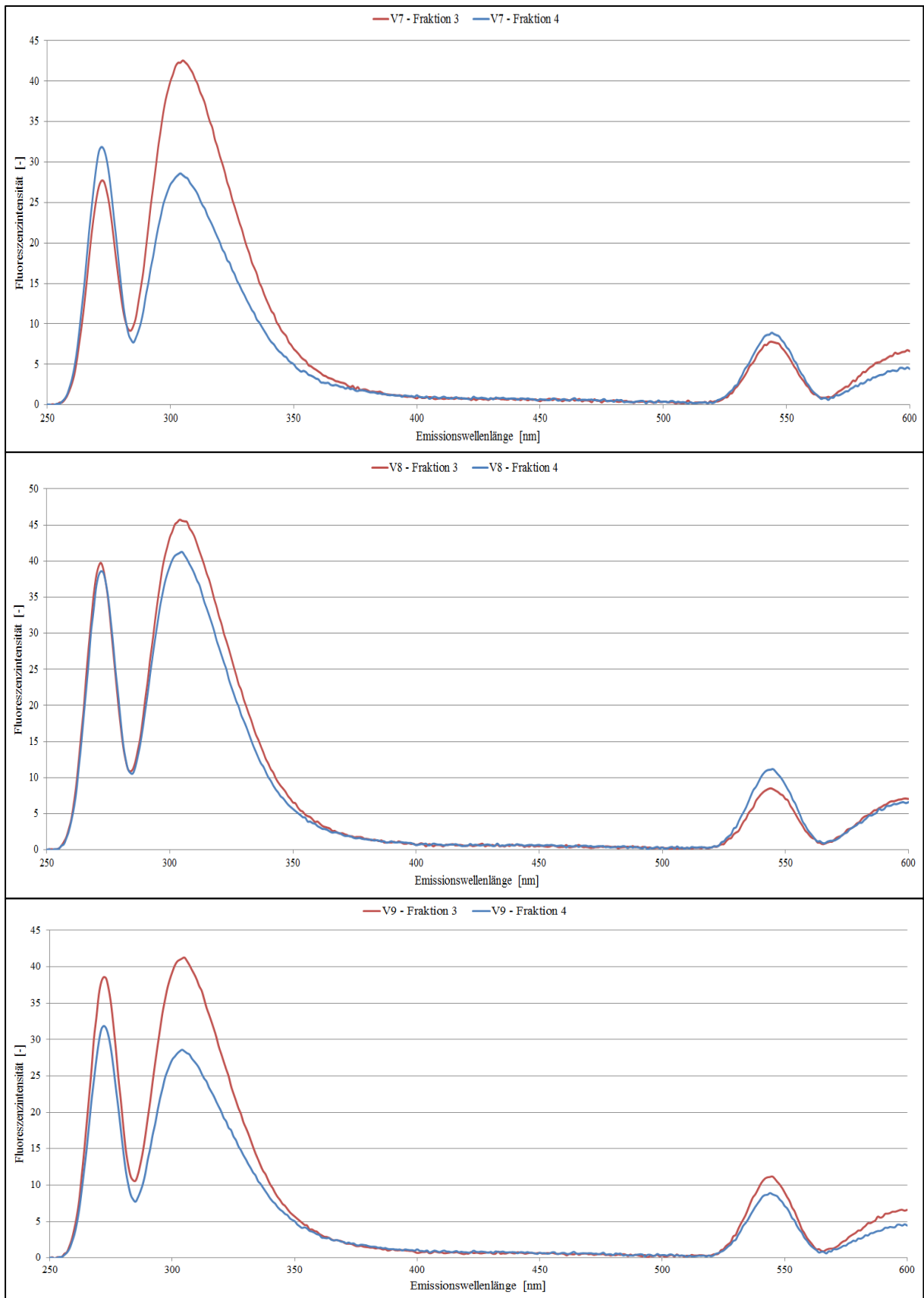


Abb. V: Darstellung der 2D-Emissions-Spektren zu den Renaturierungsversuchen V7-V9 für RNase A. Hier sind nur die jeweiligen Fraktionen 3 und 4 berücksichtigt, welche potentiell renaturierte RNase A enthielten. (Anregungswellenlänge: 270 nm, niedrige Empfindlichkeit)