



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Untersuchungen zur Denaturierung und Renaturierung von *Amyloglucosidase aus *Aspergillus niger**

Bachelorarbeit

Im Studiengang

Biotechnologie

Vorgelegt von

Christian Richelmann

1952352

Hamburg – Bergedorf

28. Februar 2013

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Birger Anspach (HAW Hamburg)
2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

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

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 Denaturierung von Proteinen	4
2.2 Proteinrückfaltung	6
2.2.1 Renaturierung durch Verdünnung	10
2.2.2 Renaturierung durch Size-Exclusion-Chromatographie	11
2.2.3 Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC	12
2.3 Fluoreszenzspektroskopie	14
2.3.1 Proteinfluoreszenz	16
2.3.2 Streulichteffekte	18
2.3.3 Löschung von Fluoreszenz	19
2.4 Modellprotein Amyloglucosidase	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Verwendete Chemikalien	22
3.1.2 Pufferlösungen und Reaktionslösungen	23
3.1.3 Geräte und Software	25
3.1.4 Chromatographie Materialien und Säule	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie	27
3.2.2 Denaturierung der Amyloglucosidase	28
3.2.3 Renaturierung durch Verdünnung	29
3.2.4 Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC	30
3.2.5 Quantitative Analytik der Amyloglucosidaseaktivität	32
3.2.6 Umpufferung der renaturierten Amyloglucosidase Proben	34
3.2.7 Bestimmung der Massenausbeute	35
4 Ergebnisse	36

4.1 Entfaltungskurven	36
4.2 Renaturierung von Amyloglucosidase durch Verdünnung	41
4.3 Renaturierung von Amyloglucosidase mittels Harnstoff-Gradienten-SEC	47
4.3.1 Versuch V1	48
4.3.2 Versuch V2	50
4.3.3 Quantitative Analytik der Renaturierung von Amyloglucosidase	52
5 Diskussion	57
6 Zusammenfassung	61
7 Literaturverzeichnis und Quellenverzeichnis	62
7.1 Literaturverzeichnis	62
7.2 Quellenverzeichnis	66
8 Anhang	67
9 Eidesstattliche Erklärung	70
10 Danksagungen	71

1 Einleitung

Der Fortschritt in der Molekularbiologie ermöglicht es rekombinante Proteine in Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* und in eukaryotischen Wirtsorganismen zu produzieren. Obwohl eukaryotische Wirtsorganismen im Gegensatz zu Bakterien posttranslationale Modifikationen am synthetisierten Protein vornehmen können, werden Bakterien häufiger eingesetzt, wegen schnellerer und kostengünstigerer Fermentationsprozesse. Die Überexpression der relevanten Gene kann zu der Bildung von fehlgefalteten und inaktiven Proteinen führen, die zu Einschlusskörpern (engl. Inclusion Bodies) aggregieren. Diese sammeln sich im Zellinneren an und können nach einem Aufschluss der Zelle, z.B. durch Hochdruckhomogenisierung, mittels Zentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden. Es folgen Waschschrte mit harnstoff- oder guanidinhydrochloridhaltigen Puffern um eine Solubilisierung herbeizuführen. Auf die Solubilisierung der exprimierten Proteine folgt die Rückfaltung, auf die ein erheblicher Anteil der Gesamtkosten eines Produktionsprozesses fällt. Es steht eine Reihe von Rückfaltungsmethoden zur Verfügung die sich in ihrer Ausbeute und ihrem Aufwand von Protein zu Protein unterscheiden. In dieser Arbeit wurde das Enzym Amyloglucosidase aus *Aspergillus niger* durch die Zugabe von 8 M Harnstoff und 30 mM DTT denaturiert und anhand von Verdünnungsversuchen und einer in der Erforschung befindlichen Methode – der Harnstoff-Gradienten-SEC renaturiert. Die Harnstoff-Gradienten-SEC gewährleistet eine stufenlose Überführung des denaturierten Proteins in rückfaltungsfördernde Bedingungen und verspricht durch die Reduzierung der Ausbildung von Aggregaten eine höhere Aktivitätsausbeute im Vergleich zur herkömmlich eingesetzten Renaturierung durch Verdünnung (Singh und Panda; 2005, Li et al. 2003).

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Denaturierung von Proteinen

Für die Solubilisierung von Inclusion Bodies werden chaotrope Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid in hohen Konzentrationen von 8M bzw. 6M eingesetzt. Chaotrope Agentien bewirken eine Verringerung der Kohäsionskräfte von Wassermolekülen mit der Konsequenz, dass Wechselwirkungen gelöster Proteine untereinander zurückgehen und sich die Löslichkeit derselben erhöht.

Harnstoff kann mit polaren und nicht-polaren Lösungsmittelkomponenten interagieren und gliedert sich in wässrigen Lösungsmitteln in das Netzwerk von Wasserstoffbrücken ein. Harnstoff zeigt gegenüber Wasser eine höhere Präferenz die Mikroumgebung des Proteins zu bilden. Die Harnstoffmoleküle verdrängen die Wassermoleküle die nahe der Oberfläche des Proteins diffundieren in einem dynamischen Vorgang – die Entropie des Lösungsmittels erhöht sich. Dadurch wird der hydrophobe Effekt, der zur Proteinstabilisierung beiträgt, verringert, und ungefaltete Proteine werden stabilisiert (indirekter Mechanismus). Harnstoff interagiert auch direkt mit den Peptidbindungen und hydrophoben Seitenketten von Aminosäureketten (direkter Mechanismus). Dieser Effekt ist proportional zur Gesamthydrophobizität der Aminosäureseitenketten eines Proteins und der Anzahl an unpolaren Gruppen die dem Lösungsmittel zugewandt sind. Beide Mechanismen schwächen die im Protein vorherrschenden nicht-kovalenten Wechselwirkungen wodurch die Entfaltung des Proteins eingeleitet wird (Rosky, 2008)

Dabei verliert das Enzym seine Sekundär- und Tertiärstruktur und damit seine biologische Aktivität. Der Denaturierungsvorgang ist auf diese Weise reversibel weswegen eine Renaturierung in den nativen Zustand möglich ist. Extrazelluläre Enzyme weisen im Gegensatz zu intrazellulären Enzymen häufig Disulfidbrücken auf. Diese kovalenten Bindungen werden durch die Oxidation zweier sterisch nahe beieinander liegender Sulfhydrylgruppen der Aminosäure Cystein ausgebildet. Disulfidbrücken stabilisieren die Konformation von Enzymen, sodass eine Reduktion der Sulfhydrylgruppen erforderlich ist um das Enzym vollständig reversibel zu denaturieren. Dithiothreitol (DTT) und β -Mercaptoethanol sind geeignet Disulfidbrücken aufzubrechen. Es werden Konzentrationen von 0,1 M für β -Mercaptoethanol und 1-15mM für DTT eingesetzt (Jungbauer und Kaar, 2007; Clark, 1998)

2.2 Proteinrückfaltung

Die Tertiärstruktur eines nativen Proteins in seiner physiologischen Umgebung (Lösungsmittel, pH-Wert, Ionenstärke, Präsenz anderer Komponenten wie Metallionen oder prosthetische Gruppen, Temperatur u.a.) ist diejenige in der die freie Enthalpie des Gesamtsystems am niedrigsten ist. Diese thermodynamisch stabilste Form wird durch die Gesamtheit der intramolekularen Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, hydrophobe Bindungen, Ionenbindungen und kovalente Disulfidbrücken und damit durch die Aminosäuresequenz bestimmt (Anfinsen, 1973). Der Vorgang der Proteinfaltung kann als die Gesamtheit statistisch auftretender Konformationszustände begriffen werden und kann mit einem Faltungstrichter veranschaulicht werden. Der Faltungstrichter verkörpert die Ansicht, dass es eine große Anzahl an Konformationszuständen eines ungefalteten Proteins gibt. Der Durchmesser des Trichters entspricht der Entropie der Konfigurationen der Polypeptidkette, während die Höhe eine Funktion der freien Energie darstellt. Die Rückfaltung geht mit einer Abnahme an freier Energie und einer gleichzeitigen Abnahme der Entropie des Proteins einher (Honig, 1999). Dieser Entropieverlust wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen die aus dem Inneren des Proteins verdrängt werden überkompensiert, was als Triebkraft des Faltungsvorgangs verstanden werden kann. Bei dem Faltungsprozess können Intermediate und Fehlfaltungen auftreten die einem lokalen Minimum im Faltungstrichter entsprechen (Abbildung 1).

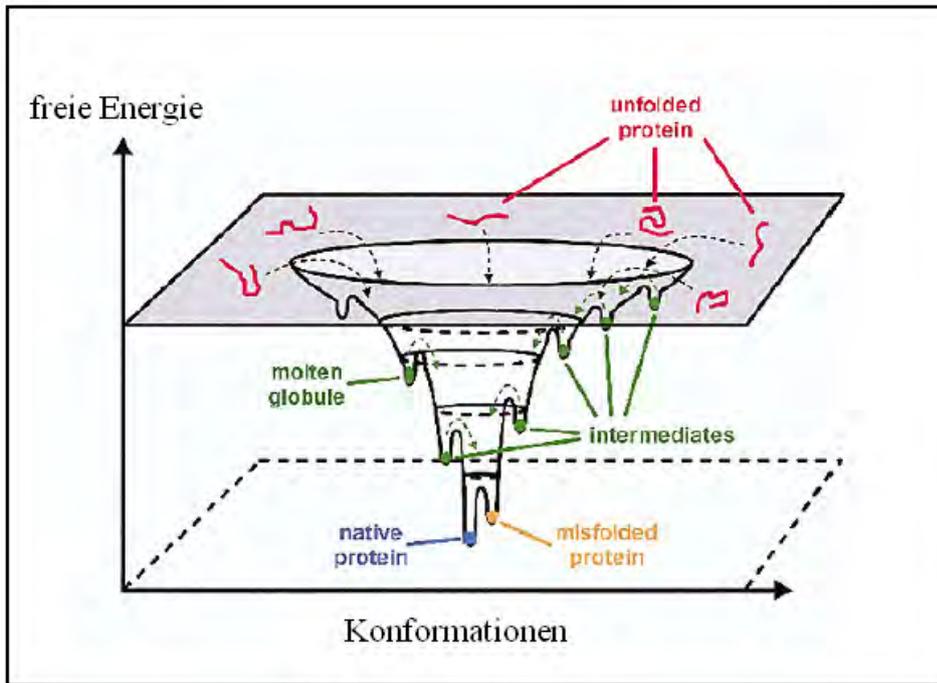


Abbildung 1: Schema eines Faltungstrichters. Es zeigt die Freie Energie in Abhängigkeit von verschiedenen Faltungszuständen eines Proteins (verändert nach Schultz, 2000)

Die Faltungskinetik eines Proteins kann mathematisch mit einer Funktion erster Ordnung beschrieben werden wohingegen die Ausbildung von Aggregationen mit einer Funktion zweiter oder höherer Ordnung wiedergegeben werden kann. Daraus resultiert die Annahme, dass bei niedrigen Proteinkonzentrationen die Faltung bevorzugt wird (Gu et al., 2001).

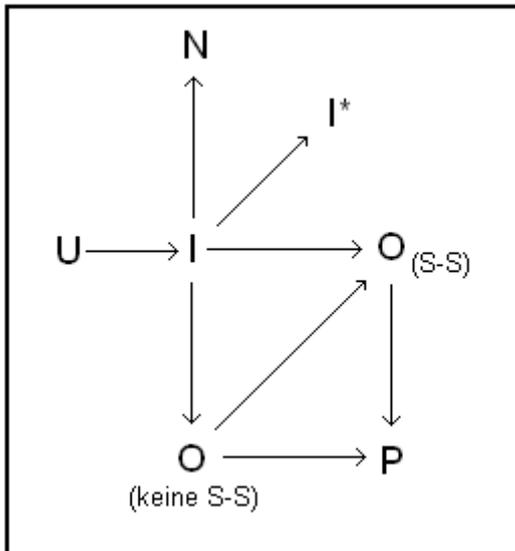


Abbildung 2: Modell der Proteinrückfaltung. U: Ungefaltetes Protein, I: instabiles Intermediat, I*: stabiles Intermediat, N: native Konformation, O (S-S): lösliche kovalente Oligomere, O (keine S-S): lösliche hydrophobe Oligomere, P: unlösliche Präzipitate (verändert nach Chen et al., 2004)

Die Faltungszustände können qualitativ in einem Modell dargestellt werden, das um eine mathematische Beschreibung der Kinetik erweitert werden kann. Hier soll nur die qualitative Beschreibung vorgestellt werden. Der ungefaltete Zustand des Proteins (U) kann durch Ausbildung von Sekundärstrukturen eine stabile (I*) oder instabile Intermediatform (I) einnehmen von der aus der native Zustand (N) oder alternativ lösliche Oligomere ($O_{(S-S)}$, $O_{(keine\ S-S)}$) entstehen können. Oligomere sind Aggregationen von Proteinen die durch intermolekulare Disulfidbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden. Bei Verdichtung von Oligomeren kann es zur Ausfällung in unlösliche Präzipitate (P) kommen. Die kinetischen Parameter hängen u.a. von den Pufferkomponenten ab, die bestimmte Faltungswege verstärken oder abschwächen. Harnstoff wird in niedrigen Konzentrationen von 1-2 M und Arginin von 0,5 M als aggregationsmindernd beschrieben. So haben Chen et al. einen verlangsamen Einfluss von Harnstoff und Arginin auf die Rückfaltung in die native Konformation dem Protein rhG-CSF beobachtet. Beide Substanzen

zeigten einen Einfluss die die Bildung von löslichen kovalent gebundenen Oligomeren förderten. Die Bildung von unlöslichen Präzipitaten wurde dabei unterdrückt. Hierbei hat Harnstoff einen stärkeren Effekt als Arginin. Arginin verringert zudem die Ausbildung von löslichen Oligomeren die durch hydrophobe Wechselwirkungen aggregieren (Chen et al., 2009).

Der Ausbildung von Disulfidbrücken kommt eine besondere Bedeutung zu, da diese die korrekte Konformation vieler nativer Proteine stabilisieren und die enzymatische Aktivität erst ermöglichen. Die Fluktuation der Bildung und Spaltung einer Disulfidbrücke wird durch die Anwesenheit von oxidierten und reduzierten Thiolreagenzien gefördert, was zur Folge hat, dass die thermodynamisch stabilste Kombination zweier Cysteine bevorzugt wird. Häufig verwendete Systeme sind GSH/GSSG, DTT/GSSG, Cystein/Cystin und Cysteamin/Cystamin bei Konzentrationen von 5-15mM. Das Konzentrationsverhältnis von reduzierter zu oxidiertes Komponente beeinflusst die Ausbeute an nativem Protein und variiert dabei zwischen 1:1 und 10:1 (Singh und Panda, 2005).

Die Präsenz von niedermolekularen Additiven während des Rückfaltungsprozesses kann die Ausbeute von Proteinen aus Inclusion Bodies verbessern. Ein häufig eingesetztes Additiv ist die Aminosäure L-Arginin. Sie besitzt eine Guanidino-Gruppe und gehört damit zu den basischen Aminosäuren. Ihr pI liegt bei pH 10,8, weswegen der Einsatz in den allermeisten Puffersystemen möglich ist. L-Arginin wird in Konzentrationen von 0,4 M bis 1 M eingesetzt, um Proteinaggregationen zu unterbinden und die Faltung in die nativen Konformation zu begünstigen (Reddy et al., 2009).

2.2.1 Renaturierung durch Verdünnung

Die einfachste Methode der Proteinrenaturierung ist die Verdünnung. Das denaturierte Protein wird mit einer Pumpe in kontinuierlich gerührten Renaturierungspuffer überführt. Die Proteinkonzentration und die der denaturierenden Agenzien verringern sich dabei schlagartig, was einen Kollaps der Proteinstruktur nach sich zieht, bei dem eine starre Struktur ausgebildet wird, die sich nicht in die native Konformation umformt. Die Zugabe von niedrigen Konzentrationen eines Denaturierungsmittels (1-2 M Harnstoff) ist daher notwendig um Proteinaggregationen zu unterbinden. Während der Überführung des denaturierten Proteins in den Rückfaltungspuffer erhöht sich die Konzentration des Proteins und der Denaturierungsmittels mit der Zeit. Es treten Proteinendkonzentrationen von 10 – 100 µg/mL bei schnellen Verdünnungen auf. Der Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung, der Nachteil liegt bei hohen Prozessvolumina im industriellen Maßstab. Es müssen zusätzliche Aufkonzentrierungsschritte nachgeschaltet werden, die die Prozesskosten erhöhen (Jungbauer und Kaar, 2007; Tsumoto et al., 2002).

2.2.2 Renaturierung durch Size-Exclusion-Chromatographie

Die Ausschluss-Chromatographie, auch Size-Exclusion Chromatographie (SEC), ist eine chromatographische Methode die in industriellem Maßstab zur Rückfaltung von rekombinant synthetisierten Proteinen eingesetzt wird (Li et al., 2004). Die für die SEC verwendeten Materialien sind meist in hohem Maße quervernetzte Dextrane oder Agarose mit einer sphärischen Form. Der Grad der Vernetzung bestimmt die Porengröße, die für die in der mobilen Phase gelösten Substanzen zugänglich sind. Der SEC liegt als Wirkprinzip ein sterischer Ausschlussmechanismus zugrunde, bei dem die Trennung von Substanzen aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte erfolgt. Die Elution der Moleküle tritt in Abhängigkeit des hydrodynamischen Volumens ein, wobei Moleküle, deren hydrodynamische Volumina oberhalb der Ausschlussgrenze des Chromatographiematerials liegen, einer kürzeren Retention unterliegen und mit dem Zwischenkornvolumen eluiert werden.

Für die Rückfaltung von denaturierten Proteinen werden SEC-Methoden als alternative zur Verdünnung, Dialyse oder Diafiltration eingesetzt. Dabei wird das Wirkprinzip der SEC ausgenutzt um entfaltete Proteine von niedermolekularen Denaturierungsagenzien zu trennen. Die mobile Phase stellt rückfaltungsfördernde Bedingungen um die Rückfaltung in den nativen Zustand des Proteins zu begünstigen. Die Änderung des hydrodynamischen Volumens mit dem Grad der Rückfaltung ist abhängig von den Bedingungen des Übergangs des Proteins vom Denaturierungspuffer in den Renaturierungspuffer. Dies ist ein wichtiger Faktor bei der Vermeidung von Proteinaggregationen. Die Rückfaltung erfolgt im Zwischenkornvolumen des Chromatographiematerials weswegen die Wahl der Porengröße entscheidenden Einfluss auf den Trennungserfolg hat. Des Weiteren zeigten

steigende Elutionsflussrate und steigende Anfangsproteinkonzentration bei dem Modelenzym Lysozym eine Verminderung der Aktivitätswiederfindung (Wilms, 2010, Z. Gu et al., 2001).

2.2.3 Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC

Die Harnstoff-Gradienten-SEC als Rückfaltungsmethode für reversibel denaturierte Proteine wurde in einer Reihe von Publikationen beschrieben (M. Li et al. 2004, Z. Gu et al., 2001). Bei dieser Methode wird die stationäre Phase zunächst mit Renaturierungspuffer equilibriert. Im Anschluss wird über ein definiertes Säulenvolumen eine stufenlose Änderung der mobilen Phase von Renaturierungspuffer zu Denaturierungspuffer vorgenommen. Nach Applikation der Proteinprobe durchläuft sie den Harnstoffgradienten, wodurch der Übergang des entfalteten Proteins in den Rückfaltungspuffer ohne schnelle Änderung des hydrodynamischen Volumens erfolgt. Proteinaggregationen werden damit verringert. Das Volumen des Gradienten vergrößert sich mit fortschreitender Elutionszeit. Das Anfangsvolumen des Gradienten muss demnach so bestimmt werden, dass sich das Protein die längst mögliche Strecke der Säule im Gradienten aufhält ehe es sich bei der Elution ausschließlich in Renaturierungspuffer befindet (Abbildung 3).

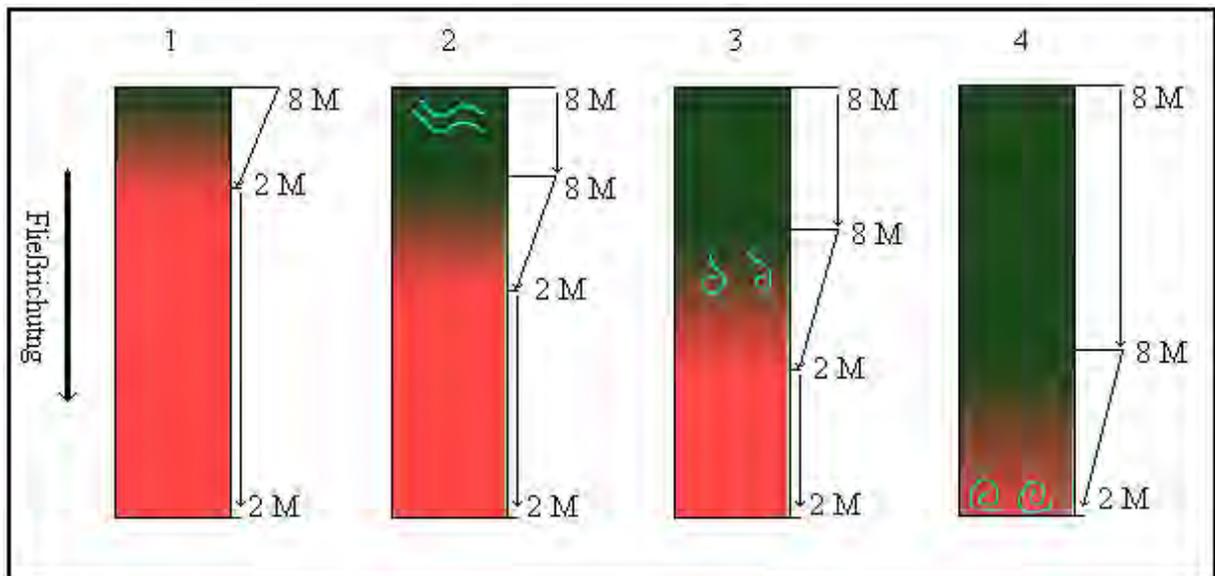


Abbildung 3: Fließschema der Harnstoff-Gradienten-SEC (verändert nach Li et al., 2004)

Das mit 1 benannte Bild in Abbildung 3 zeigt eine in Renaturierungspuffer equilibrierte Säule. Über das erste Viertel der Säule erfährt die mobile Phase eine stufenlose Änderung von Renaturierungspuffer zu Denaturierungspuffer. Bild 2 zeigt die Beladung der Säule mit in Denaturierungspuffer gelöstem Protein. Während der Elution mit Denaturierungspuffer durchläuft das Protein den Harnstoffgradienten wie in Bild 3 zu sehen ist. Bei Austritt aus der Säule hat das Protein idealerweise den Gradienten durchlaufen und befindet sich in Renaturierungspuffer (Bild 4).

2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz bildet neben der Phosphoreszenz eine Form wie Moleküle elektromagnetische Strahlung emittieren können – dieser Vorgang wird übergreifend Lumineszenz genannt.

Die Fluoreszenz beruht darauf, dass ein Molekül ein Photon absorbiert und kurze Zeit später (ca. 10 ns) in Form einer Emissionsstrahlung wieder abgibt (Gey, 2008). Der Vorgang der Absorption und Emission von Licht eines Moleküls kann in einem Jablonski-Diagramm dargestellt werden. Im Jablonski-Diagramm

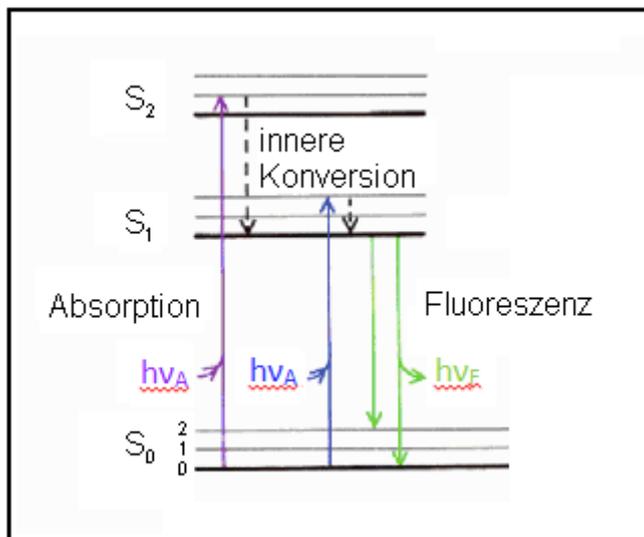


Abbildung 4: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm (verändert nach LAKOWICZ, 1999)

wird der energetische Grundzustand eines Elektrons mit S_0 und die verschiedenen Anregungszustände des Elektrons mit S_1 und S_2 bezeichnet. Die Anregung eines Elektrons aus dem Grundzustand in den S_1 - oder S_2 -Zustand bedarf einer spezifischen Anregungsenergie. Ein Teil dieser Energie wird im Falle der Anregung in den S_2 Zustand in

Form von strahlungsloser Schwingungsenergie abgegeben, sodass das Elektron in einen niedrigeren Schwingungszustand (S_1) übergeht. Dieser Vorgang wird Schwingungsrelaxation (innere Konversion) genannt. Bei dem Übergang des Elektrons von S_1 in den Grundzustand wird Energie in Form elektromagnetischer Strahlung, des Fluoreszenzlichts, abgegeben. Es hat eine größere Wellenlänge als die des Anregungslichtes und folgt damit der Stokes

Regel. Die Differenz der Wellenlängen der Anregungsstrahlung und der Emissionsstrahlung wird als Stokes-Differenz bezeichnet (Lakowicz, 1999).

Die Fluoreszenz-Spektroskopie wird bei naturwissenschaftlichen Fragestellungen als Analyseverfahren mit hoher Sensitivität, Spezifität und vergleichsweise einfacher Durchführung herangezogen. Im Kontext der Renaturierung von Proteinen ermöglicht die Fluoreszenz-Spektroskopie die Charakterisierung von Faltungsintermediaten und gibt Aufschluss über deren Mikroumgebung.

2.3.1 Proteinfluoreszenz

Grundlage für die Analytik von Proteinen mittels Fluoreszenzspektroskopie bildet das Vorhandensein von intrinsischen Fluophoren. Im Gegensatz zu extrinsischen Fluophoren sind intrinsische Fluophore integraler Bestandteil der Polypeptidkette in Form von aromatischen Aminosäuren. In Proteinen sind die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin verantwortlich für das Fluoreszenzverhalten. Dabei variieren die Wellenlänge des

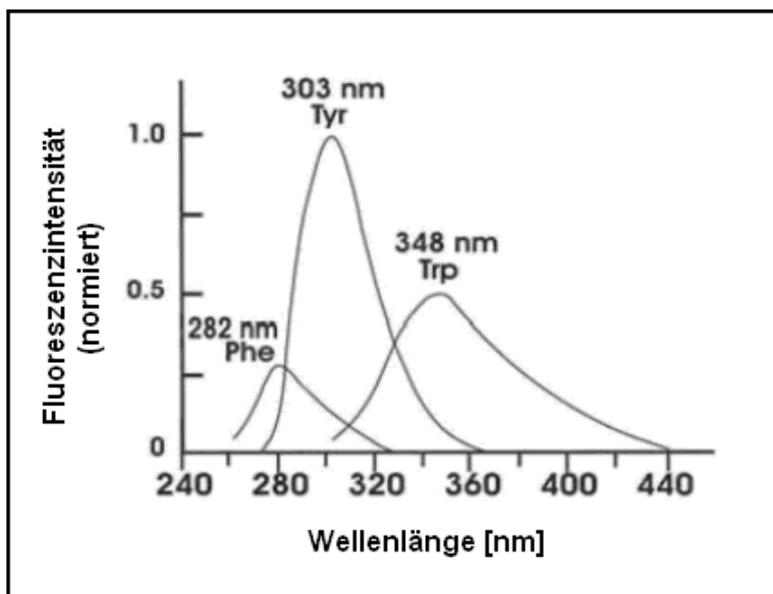


Abbildung 5: Fluoreszenzemissionsspektren von aromatischen Aminosäuren (verändert nach Albani, 2004)

Absorptionsmaximums und der Anteil des emittierten Lichts zwischen den Aminosäuren. Tyrosin und Phenylalanin haben Absorptionsmaxima von 274 nm bzw. 257 nm. Tryptophan hat sein Absorptionsmaximum bei 280 nm und sein Emissionsmaximum bei

355 nm in polarem Lösungsmittel. In unpolaren Lösungsmitteln verschiebt sich aufgrund der hohen Sensibilität des Tryptophans das Emissionsmaximum zu einer kleineren Wellenlänge von 320 nm. Die Extinktionskoeffizienten geben einen Hinweis auf den Anteil des emittierten Lichts einer Aminosäure an der Gesamtemission. Die Extinktionskoeffizienten stehen in einem Verhältnis von 28:7:1 (Tryptophan:Tyrosin:Phenylalanin), woran zu erkennen ist, dass der Fluoreszenzanteil des Tryptophans maßgeblich ist. Das liegt daran, dass es im Zuge der energetischen Anregung des Moleküls zu einem Energietransfer von

Tyrosin oder Phenylalanin auf Tryptophan kommen kann. Das Emissionsspektrum von Tryptophan ist wegen seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber seinem Umgebungsmilieu geeignet Proteinfaltungsvorgänge zu verfolgen. Bei vollständiger Entfaltung stehen mehr Tryptophanreste für eine energetische Anregung zur Verfügung, wohingegen sich in einem nativen Protein die aromatischen Aminosäuren vermehrt im Inneren befinden um hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen (Albani, 2004 Vivian und Callis, 2001)

2.3.2 Streulichteffekte

Einfallende Strahlung wird an Molekülen und kleinen Teilchen in alle Richtungen gestreut. Zwei Arten von Lichtstreuung sind bei der Fluoreszenz bedeutend: Rayleigh-Streuung und Raman-Streuung. Rayleigh-Streuung tritt bei der gleichen Wellenlänge wie der Anregungswellenlänge auf und resultiert aus der Entsendung von elektromagnetischer Strahlung induzierter Dipolmomente. Das Emissionsspektrum des Analyten sollte deshalb versetzt zur Anregungswellenlänge sein. Die Intensität der Rayleigh-Streuung hängt von

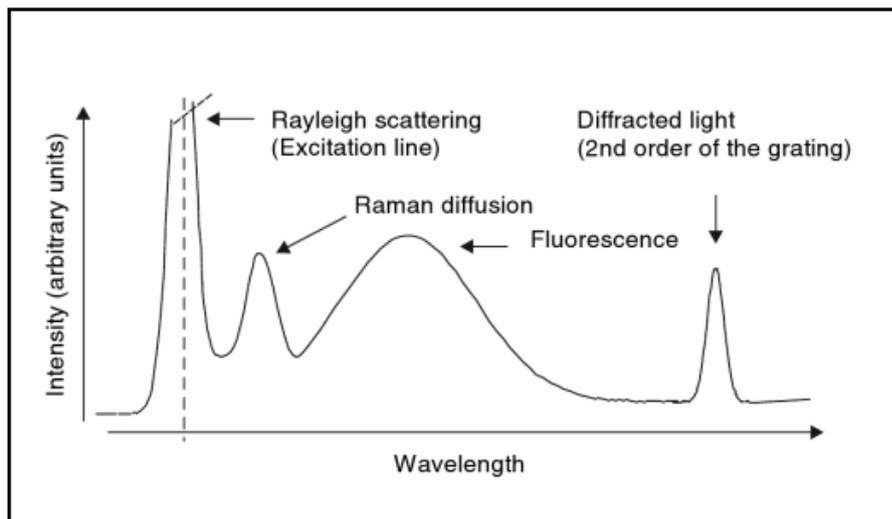


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Streulichteffekten bei der Fluoreszenzspektrometrie (ROUESSAC und ROUESSAC, 2007)

der Polarität des Lösungsmittels ab. Ein geringer Anteil der Anregungsenergie wird in Schwingungs- und Rotationsenergie umgewandelt. Die resultierende Strahlung hat

demnach eine geringere Energie und ist zu einer längeren Wellenlänge verschoben. Es resultiert die Raman-Streuung, die um den Faktor 100-1000 schwächer ist als die Rayleigh-Streuung. Raman-Streuung wird bei Wellenlängen oberhalb der Anregungswellenlänge beobachtet und unterscheidet sich demnach bezüglich der Frequenz von der Anregungswellenlänge. Raman-Banden treten immer in einem definierten Abstand zum Rayleigh-Peak auf, der Abstand ist unabhängig von der

Anregungswellenlänge. Das Raman-Spektrum kann mit dem Fluoreszenzspektrum interferieren, tritt allerdings erst bei niedrigen Analytkonzentrationen in Erscheinung (Rouessac und Rouessac, 2007).

Durch die Beugung des Anregungslichts am Monochromator treten Emissionspeaks bei allen Vielfachen der Anregungswellenlänge auf.

2.3.3 Löschung von Fluoreszenz

Unter Fluoreszenzlöschung wird jeglicher Prozess verstanden, der die Fluoreszenzintensität eines Analyten verringert. Es wird zwischen statischer und dynamischer Fluoreszenzlöschung unterschieden. Die statische Fluoreszenzlöschung tritt auf, wenn ein fluoreszierendes Molekül mit einem andern Molekül zusammentrifft und zu einem stabilen Komplex bindet. Die Anregungsenergie wird dabei in Form von Wärme frei. Die dynamische Fluoreszenzlöschung resultiert aus dem Zusammenstoß von Fluorophoren mit anderen Molekülen aus der Matrix, auf die ein Teil der Anregungsenergie des Fluorophors übertragen wird, welche somit nicht an der Emission von Licht beteiligt ist. Der Stoßvorgang muss innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustands ablaufen. Der Grad der Fluoreszenzlöschung hängt demnach von der Konzentration des sogenannten Quenchers aber auch von der des Analyten ab, da die Emissionsenergie reabsorbiert werden kann. Des Weiteren beeinflusst die Temperatur des Mediums die Viskosität und damit die Anzahl der Kollisionen zwischen Fluorophor und Quencher. Eine Erhöhung der Temperatur von 10°C führt zu einer Reduktion der Tryptophanfluoreszenz um ca. 20% (Wilms, 2010).

2.4 Modellprotein Amyloglucosidase

Die Amyloglucosidase (1,4- α -D-Glucan-Glucohydrolase, EC 3.2.1.3), auch Glucamylase, ist eine Exoamylase die die Hydrolyse von α -1,4-D-glykosidisch gebundenen und α -1,6-D-glykosidisch gebundenen Glucosemonomeren des nichtreduzierenden Endes von Stärke und verwandten Oligo- und Polysacchariden katalysiert. Es wurden zwei Isoformen der Amyloglucosidase

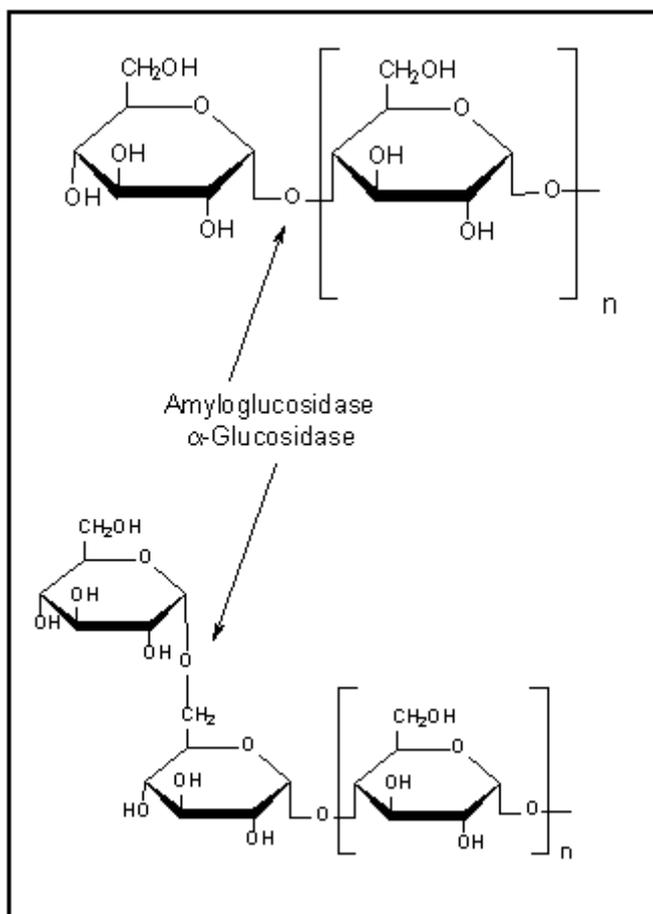


Abbildung 7: Die Pfeile deuten auf die glykosidischen Bindungen, die durch die Amyloglucosidase aufgebrochen werden (verändert nach INTERNET I)

aus *Aspergillus niger* charakterisiert (Pazur and Ando 1959). Die molare Masse der einen Form, G1, beträgt 96 kDa, die von G2 beträgt 74 kDa. Die isoelektrischen Punkte befinden sich bei 3,8 und 3,95. Die pH-Optima liegen bei pH 4,2 und pH 4,5. Beide Formen sind stabil in einem pH-Bereich zwischen 3,5 und 9,0. Die Amyloglucosidase hat ihr Temperaturoptimum bei 60°C-65°C (Amirul et al., 1996).

G1 und G2 besitzen kovalentgebundene Kohlenhydrate (D-Mannose, D-Glucose und D-Galactose) und

gehören damit zur Gruppe der Glykoproteine. G1 hat eine Länge von 616 Aminosäuren und G2 hat eine Länge von 512 Aminosäuren. Beide Formen

weisen eine identische Aminosäuresequenz im Bereich von 1-512 auf, unterscheiden sich aber in ihrem Gehalt an kovalentgebundenen Kohlenhydraten. Der Kohlenhydratgehalt der größeren Isoform G1 ist etwa doppelt so hoch wie der der kleineren Isoform. Beide Formen weisen die gleichen K_m - und V_{max} -Werte mit Maltose als Substrat auf. G1 hydrolysiert Stärke fast dreimal schneller als G2 (Bennett, 1992). G1 lässt sich in drei funktionale Abschnitte unterteilen. Die katalytische Domäne (1-466) ist an der Hydrolyse der glykosidischen Bindungen beteiligt wohingegen die stärkebindende Domäne (509-616) an der Entflechtung des Substrates mitwirkt. Beide Domänen werden über eine Linker Region (467-508) mit hohem Glykolisierungsgrad miteinander verbunden. Die stärkebindende Domäne enthält eine Disulfidbrücke zwischen Cys 3 und Cys 98. G2 fehlt die stärkebindende Domäne (Bennett, 1992).

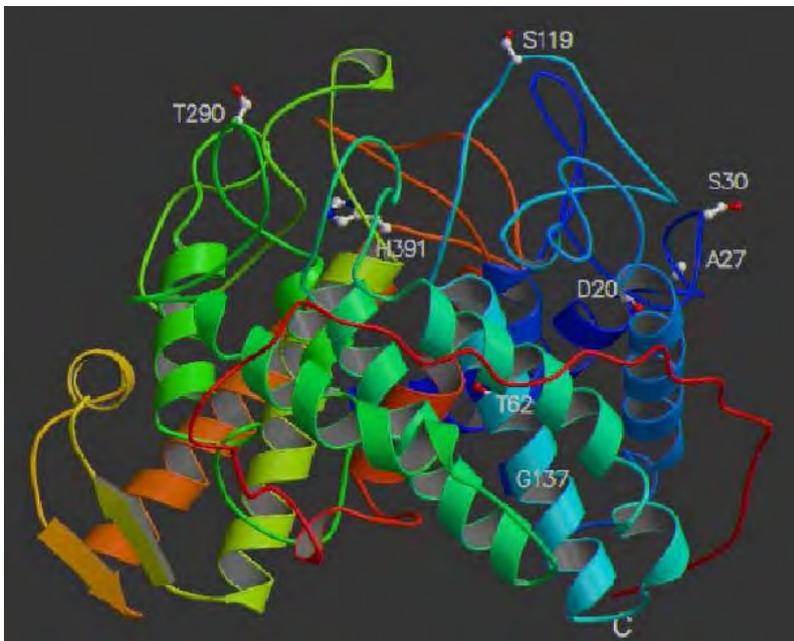


Abbildung 8: 3D-Modell der Amyloglucosidase. Dargestellt sind β -Faltblattstrukturen und α -Helices (Quelle: INTERNET II)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Amyloglucosidase, EC 3.2.1.3,75 U/mg	MERCK, Darmstadt
3,3' -Dimethoxybenzidine dihydrochloride (o-Dianisidin)	SIGMA ALDRICH, Hamburg
1,4-Dithiothreit, ≥99 % p.a. (DTT)	ROTH, Karlsruhe
L-Arginin-monohydrochlorid	ROTH, Karlsruhe
L-Glutathion reduziert (GSH)	MERCK, Darmstadt
Glutathion oxidiert (GSSG)	ROTH, Karlsruhe
Glucose-Oxidase Typ VII, EC 1.1.3.4, from Aspergillus Niger, ≥100000 Units/g	SIGMA ALDRICH, Hamburg
Harnstoff	ROTH, Karlsruhe
D(+)-Maltose-Monohydrat, ≥99%	SIGMA ALDRICH, Hamburg
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid, 99,9 % analytical reagent	ROTH, Karlsruhe
Peroxidase Typ II, EC 1.11.1.7, from Horseradish, 150-250 units/mg solid (using pyrogallol)	SIGMA ALDRICH, Hamburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, ≥99 % (Tris)	MERCK, Darmstadt
Schwefelsäure, 95%Vol.	VWR, Darmstadt

3.1.2 Pufferlösungen und Reaktionslösungen

Tabelle 2: Denaturierungspuffer

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

Einwaagen pro 1 L Gesamtvolumen

Tabelle 3: Renaturierungspuffer

Substanz	Stoffmengenkonz. c [mol/L]	Molare Masse M [g/mol]	Einwaage m [g]	pH-Wert
Harnstoff	2,00	60,06	120,12	7,4
Tris	0,10	121,14	12,11	
NaCl	0,20	58,44	11,69	
Glutathion red.	0,0060	307,33	1,84	
Glutathion ox.	0,0006	612,60	0,37	
optional				
L-Arginin- hydrochlorid	0,5	210,67	105,335	

Einwaagen pro 1 L Gesamtvolumen

Die Puffer wurden nach der Herstellung mit Hilfe einer Vakuumpumpe (DIVAC 2.4 L, Leybold) einmal über einen 0,4µm Cellulose -Acetat Filter (Sartorius Stedim Biotech) filtriert.

Tabelle 4: Assay-Reagenz

Enzym	Molekulargewicht [kDa]		Einwaage <i>m</i> [mg]
Glucose-Oxidase	160		2,5
Peroxidase	44		0,5
Chromogen	Stoffmengenkonz. <i>c</i> [mol/L]	Molare Masse <i>M</i> [g/mol]	Einwaage <i>m</i> [g]
o-Dianisidin	0,4093	244.29 g/mol	4

Einwaagen pro 40 mL Gesamtvolumen Phosphatpuffer

Tabelle 5: Phosphatpuffer

Substanz	Stoffmengenkonz. <i>c</i> [mol/L]	Molare Masse <i>M</i> [g/mol]	Einwaage <i>m</i> [g]	pH-Wert
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	0,1	156,01	15,6	6,0

Einwaage pro 1 Liter Gesamtvolumen, mit 1 M NaOH adjustiert

Tabelle 6: Maltoselösung

Substanz	Stoffmengenkonz. <i>c</i> [mmol/L]	Molare Masse <i>M</i> [g/mol]	Einwaage <i>m</i> [g]	pH-Wert
Maltose-Monohydrat	2,775	360,31	10	6,0

Einwaage pro 10 mL Gesamtvolumen Phosphatpuffer

Tabelle 7: Schwefelsäureansatz

Substanz	Stoffmengenkonz. <i>c</i> [mol/L]	Molare Masse <i>M</i> [g/mol]	%Vol.
Schwefelsäure,95%	6	98,08	67,325

3.1.3 Geräte und Software

Tabelle 8: Geräte und Software

Gerät	Komponente	Funktion	Software	Hersteller
ÄKTA purifier UPC 100	Controller-Einheit CU-950		Unicorn 5.3.1	GE Healthcare
	UPC-900-Einheit			
	Pumpeneinheit P-903	Flussrate konstant halten		
	Mischzelle M-925	Gradienten erstellen		
	Fraktions-sammler F-920	Automatisches Fraktions-sammeln		
	Injektionsventil INV-907	Proben-applikation		
Umpufferungsanalge	Peristaltik-pumpe P1	Konstante Flussrate halten		GE-Healthcare
	UV/VIS-Photometer	UV-Absorptions-messung		Knauer
	Leitfähigkeits-messgerät	Leitfähigkeits-messung		Pharmacia Biotech
	Schreiber	Messwert-aufzeichnung		
UltraSpec 2100pro UV/VIS-Spektrophotometer				Amersham Biosciences
Halbmikroküvetten (1,5 mL)				
RF-5301PC Spektrofluoro-photometer			Panorama Fluores-cence 2.1	Shimadzu
Suprasil Präzisions-Quarzküvette				Hellma, Jena

3.1.4 Chromatographie Materialien und Säule

Für die SEC-Renaturierungsversuche wurde das Chromatographiematerial Sephadex G-25 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) verwendet. Es besteht aus quervernetztem Dextran mit einer sphärischen Form. Der Durchmesserbereich liegt zwischen 85 μm und 260 μm . Es ist über einen pH-Bereich von 2-13 stabil. Die Ausschlussgrenze liegt oberhalb von 5 kDa. Das Chromatographiemedium wird in einer C 10/40 Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) fixiert. Es ist nahezu inkompressibel (Darcy'sches Gesetz) weswegen der maximale Arbeitsdruck von der Glassäule bestimmt wird und auf ein Wert von maximal 6 bar beschränkt wurde. Das Säulenbett hat eine Höhe von ca. 36,3 cm was einem Säulenvolumen von ca. 28,7 mL entspricht.

3.2 Methoden

3.2.1 Fluoreszenzspektroskopie

Für die Fluoreszenzanalytik wurden 2D-Emissionsmessungen mit einem Spektrofluorophotometer (Shimadzu) vom Typ RF-5301 PC durchgeführt. Die verwendete Küvette besteht aus Quarzglas und hat eine Schichtdicke von 10 mm. Das Probenvolumen betrug 1,5 mL. Die Proben wurden bei Raumtemperatur vermessen. Zur Datenauswertung diente das Programm Panorama 2.1.

In Tabelle 9 sind die vorgenommenen Einstellungen am Gerät aufgelistet:

Tabelle 9: Einstellungen am Fluoreszenzspektroskop

Anregungswellenlänge	280 nm
Emission Start	250
Emission Stop	600
Anregungsschlitzbreite	10 nm
Emissionsschlitzbreite	10 nm
Empfindlichkeit	niedrig
Messgeschwindigkeit	super
Antwortzeit	Automatisch
Abtastzeit	1 nm

Im Anhang in Abbildung 23 ist eine Standardgerade in einem Konzentrationsbereich der Amyloglucosidase von 0 – 0,1 mg/mL für die fluoreszenzspektrometrische Auswertung dargestellt.

3.2.2 Denaturierung der Amyloglucosidase

Die Amyloglucosidase wurde für die Verdünnungsversuche und die SEC-Versuche mit einer Konzentration von 2,5 mg/mL in Denaturierungspuffer gelöst und für 2 Stunden inkubiert. Für die Entfaltungsversuche wurde die Amyloglucosidase auf eine Konzentration von 0,1 mg/mL in Denaturierungspuffer gelöst und für 2 Stunden inkubiert. Die Harnstoffkonzentration im Denaturierungspuffer deckte dabei einen Bereich von 1 M bis 8 M ab um daraus eine Abhängigkeit des Fluoreszenzverhaltens der Amyloglucosidase bezüglich des Intensitätsmaximums und der dazugehörigen Wellenlänge von der Harnstoffkonzentration ableiten zu können. Das im Denaturierungspuffer enthaltene DTT wurde in einem weiteren Versuch in seiner Konzentration variiert um zum einen den Quenchingeffekt des DTT auszumachen und zum anderen die Konformationsänderung der Amyloglucosidase im Vergleich zu höheren DTT-Konzentrationen zu ermitteln. Die Proben für die Entfaltungskurven wurden nach 2 Stunden mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen.

3.2.3 Renaturierung durch Verdünnung

Die Amyloglucosidase wurde in Denaturierungspuffer gelöst um die Entfaltung und damit den Verlust der nativen Konformation und den der enzymatischen Aktivität herbeizuführen. Es wurde eine Proteinausgangskonzentration von 2,5 mg/mL hergestellt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die denaturierte Amyloglucosidase in vier Renaturierungspuffer unterschiedlicher Zusammensetzung zu je fünf Endkonzentrationen verdünnt. Die Wahl der Zusammensetzung der Renaturierungspuffer hatte dabei den Einfluss des Harnstoffs und den des L-Arginins auf die Rückfaltung im Fokus. Der Renaturierungspuffer wurde dazu bezüglich der Molaritäten von Harnstoff und Arginin den in Tabelle 10 gezeigten Werten angepasst. Die Konzentrationen von Natriumchlorid, Tris und des Glutathionensystems blieben bei allen Renaturierungspuffervarianten gleich (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 10: Renaturierungspuffermodifikationen

Renaturierungspuffer	Harnstoffkonzentration [M]	L-Argininkonzentration [M]
1M	1	0
1MA	1	0,5
2M	2	0
2MA	2	0,5

Die Verdünnungsstufen wurden so gewählt, dass die Amyloglucosidasekonzentrationen nach Umpufferung im linearen Nachweisbereich des Aktivitätsassays lagen.

Tabelle 11: Verdünnungsstufen und Endkonzentrationen

Verdünnungsstufe	1:10	1:25	1:50	1:75	1:100
Endkonzentration [mg/mL]	0,25	0,1	0,05	0,033	0,025

Die denaturierte Amyloglucosidase wurde mit einer peristaltischen Pumpe aus dem Vorlagengefäß bei einer Flussrate von 0,5 mL/min für eine Minute in die jeweilige Verdünnungsstufe in eine der vier Renaturierungspuffer überführt. Um eine homogene Durchmischung im Renaturierungspuffer zu gewährleisten wurde dieser während des Verdünnungsvorgangs bei ca. 150 rpm gerührt. Nach zwei Stunden und ca. 72 Stunden Inkubationszeit im Renaturierungspuffer wurden die Proben in Phosphatpuffer umgepuffert und dem Aktivitätsassay zugeführt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

3.2.4 Renaturierung durch Harnstoff-Gradienten-SEC

Für die Durchführung der Renaturierung mit der Harnstoff-Gradienten-SEC wurde das in Kapitel 3.1.3 genannte ÄKTA System und das in Kapitel 3.1.4 beschriebene Sephadex G-25 Material verwendet. Der gesamte Prozess unterteilt sich in die drei Abschnitte Equilibrierung der Säule, Gradienten-Einstellung und Applikation und Elution der Probe. Die SEC-Säule wurde zunächst mit 2 CV des Renaturierungspuffers equilibriert um eine konstante UV-Absorptionslinie zu erhalten. Im Anschluss wurde über ein Volumen von ca. 7,5 mL, was dem ersten Viertel der Säule entspricht, eine stufenlose Änderung von Renaturierungspuffer zu Denaturierungspuffer vorgenommen. Innerhalb des Gradienten fällt die Konzentration des Denaturierungspuffers wohingegen die Konzentration des Renaturierungspuffers steigt. Die Applikation der

denaturierten Amyloglucosidase erfolgt über eine 200 µL Probenschleife. Es wurde bei einer Flussrate von 0,2 mL/min mit Denaturierungspuffer eluiert. Die folgende Tabelle enthält die Daten die während aller SEC-Renaturierungsversuche konstant blieben.

Tabelle 12: Allgemeingültige Angaben zu den SEC-Renaturierungsversuchen V1 und V2

Säule	C 10/40
Chromatographiematerial	Sephadex G-25
Gradientenvolumen	0,25 CV
Applikationsvolumen der Probe	200 µL
Probenkonzentration bei Applikation	2,5 mg/mL
Lineare Elutionsflussrate	15,27 cm/h
Fraktionsvolumen	1,5 mL

In dieser Arbeit wurden die SEC-Renaturierungsversuche mit zwei Renaturierungspuffern, die sich ausschließlich in der Konzentration des Harnstoffs unterscheiden, durchgeführt. Zunächst wurde eine Harnstoffkonzentration von 2 M gewählt, um direkt an Ergebnisse aus anderen Publikationen (Dirksen, 2010; Wilms, 2010; Cornelius, 2012) anzuschließen. Anschließend wurde eine Harnstoffkonzentration von 1 M gewählt um einen Vergleich mit den in Kapitel 4.2 beschriebenen Ergebnissen ziehen zu können.

Tabelle 13: Harnstoffkonzentrationen der Renaturierungspuffer in den Versuchen V1 und V2

	Versuchsbezeichnung	
Renaturierungspuffer	V1	V2
Harnstoffkonzentration [mol/L]	2	1

3.2.5 Quantitative Analytik der Amyloglucosidaseaktivität

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der Amyloglucosidase basiert auf einer dreistufigen Reaktionsfolge an deren Ende die Messung der Absorption eines Farbstoffes steht. Die Amyloglucosidase katalysiert die Hydrolyse von Maltose. Die dabei freigesetzten Glucose Monomere werden bei der Anwesenheit von Wasser und Sauerstoff durch das Enzym Glucose-Oxidase zu D-Gluconsäure oxidiert wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Das Wasserstoffperoxid oxidiert wiederum unter dem katalytischen Einfluss des Enzyms Peroxidase den Farbstoff o-Dianisidin. Die oxidierte Form des Dianisidins wird durch die Zugabe von 12 N Schwefelsäure zu einem pink gefärbten Endprodukt stabilisiert, dessen Absorption bei 540 nm gemessen wird.

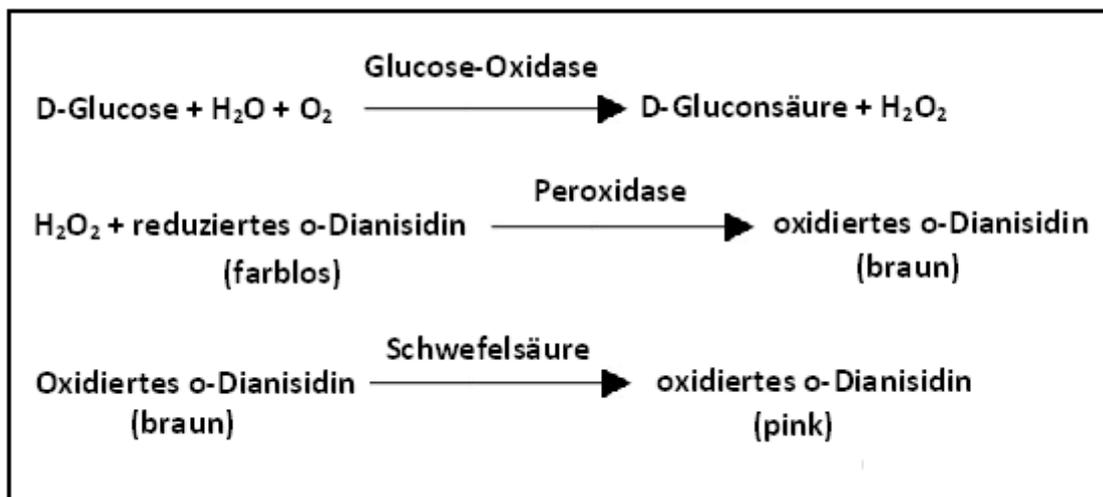


Abbildung 9: Reaktionsfolge des Glucosenachweises (modifiziert nach INTERNET II)

Der zweite Reaktionsschritt bei dem das Wasserstoffperoxid mit dem reduzierten o-Dianisidin umgesetzt wird, ist störanfällig gegenüber Substanzen mit reduzierenden Eigenschaften. Das im Renaturierungspuffer enthaltene

reduzierte Glutathion tritt dabei in Konkurrenz mit der reduzierten Form des o-Dianisidin.

Das reduzierte Dianisidin stellt einen Elektronendonator dar, der unter Einwirkung von Peroxidase Wasserstoffperoxid verbraucht. Das reduzierte Glutathion stellt in lebenden Zellen zusammen mit der Glutathion-Peroxidase einen enzymatischen Schutzmechanismus um die Schädigungen von reaktiven O_2 -Spezies und freien Radikalen abzuschwächen oder zu verhindern. Es verringert die Menge an Wasserstoffperoxid die unter Katalyse der Peroxidase mit dem o-Dianisidin reagieren kann und täuscht so eine geringere Konzentration der vorhandenen Amyloglucosidase vor, was zu falschen Endergebnissen führt. Es ist daher eine Umpufferung der Amyloglucosidase notwendig bevor sie dem Assay zugeführt wird.

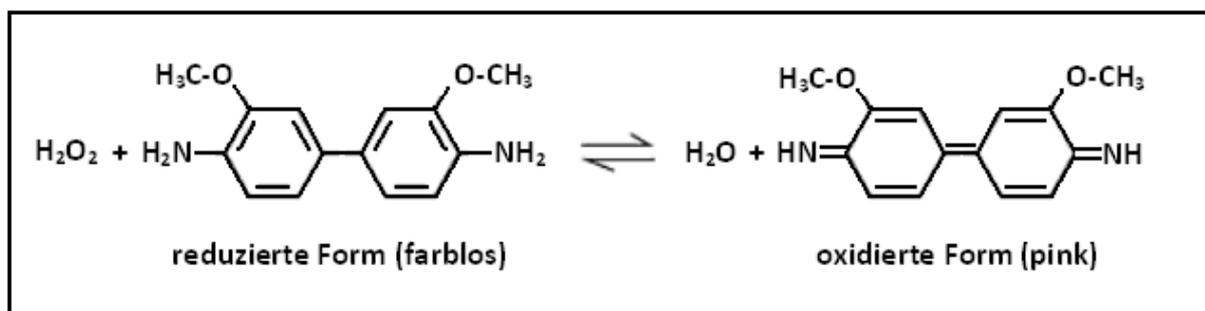


Abbildung 10: Chemische Struktur von reduziertem und oxidiertem o-Dianisidin (verändert nach INTERNET III)

Dianisidin in seiner oxidierten Form stellt ein konjugiertes pi-Elektronensystem mit chinoiden Gruppen dar. Es absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 540 nm, was im elektromagnetischen Spektrum der Farbe Grün entspricht. Die sichtbare Komplementärfarbe ist pink (Gey, 2008). In Tabelle 14 sind die Volumina des Reaktionsansatzes pro Küvette angegeben.

Tabelle 14: Reagenzansatz für den quantitativen Nachweis der Amyloglucosidaseaktivität

Lösung	Volumen [μL]
Assay-Reagenz	300
Amyloglucosidaseprobe (umgepuffert)	135
Maltose-Lösung	15
Inkubation für 30 min bei 37°C	
Schwefelsäure-Ansatz	300

3.2.6 Umpufferung der renaturierten Amyloglucosidase Proben

Die Umpufferung erfolgt mit einer Sephadex G-25 HiTrap-Säule mit einem Säulenvolumen von 5 mL. Die Daten des Chromatographiematerials sind identisch mit dem der Renaturierungssäule und können in Kapitel 3.1.4 eingesehen werden. Das Probenvolumen beträgt 500 μL bei einer Elutionsflussrate von 3 mL/min. Es wurde jeweils der gesamte Peak in Fraktionen aufgefangen. Das Fraktionsvolumen hängt von der aufgegebenen Amyloglucosidasemenge ab und beträgt zwischen 1 mL – 2 mL. Um den Massenverlust durch die Umpufferung zu quantifizieren wurden Amyloglucosidasestandards umgepuffert und bei bekanntem Verdünnungsfaktor mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen.

3.2.7 Bestimmung der Massenausbeute

Die Bestimmung der Massenausbeute erfolgte bei den SEC-Renaturierungsversuchen und der Verdünnung prinzipiell in gleicher Weise. Die mit dem Aktivitäts-Assay berechnete Konzentration an aktiver Amyloglucosidase wurde unter Kenntnis der eingesetzten Volumina in eine Masse umgerechnet und ins Verhältnis zur eingesetzten Masse gesetzt:

$$\text{Massenausbeute } \omega = \frac{\sum(c_i \cdot V_{\text{Fraktion}})}{m_0} \cdot 100\% = \frac{\sum m_i}{m_0} \cdot 100\%$$

Mit:

- ω : Massenausbeute [%]
- c_i : Enzymkonzentration in Fraktion i [mg/mL]
- V_{Fraktion} : Fraktionsvolumen [mL]
- m_i : Enzymmasse in Fraktion i [mg]
- m_0 : eingesetzte Enzymmasse [mg]

4 Ergebnisse

4.1 Entfaltungskurven

In Vorversuchen wurde das Absorptionsmaximum der Amyloglucosidase in Renaturierungspuffer experimentell bestimmt. Die Anregungswellenlänge wurde in einem Bereich von 270 nm bis 290 nm variiert, mit dem Ergebnis, dass bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm die Emissionsintensität ihr Maximum erreicht. Die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der Amyloglucosidase ist demnach identisch mit der Wellenlänge bei der Tryptophan sein Absorptionsmaximum hat.

Die Entfaltungskurven stellen die Fluoreszenzintensität und die Wellenlänge bei maximaler Intensität in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration bildlich dar. Entfaltungskurven geben Aufschluss über Änderungen der Lösungsmittelpolarität und damit einhergehend Konformationsänderung der Amyloglucosidase.

In den Versuchen zur Bestimmung der charakteristischen Eigenschaften der Amyloglucosidase wurden die Proben, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, vorbereitet und spektrofluometrisch vermessen.

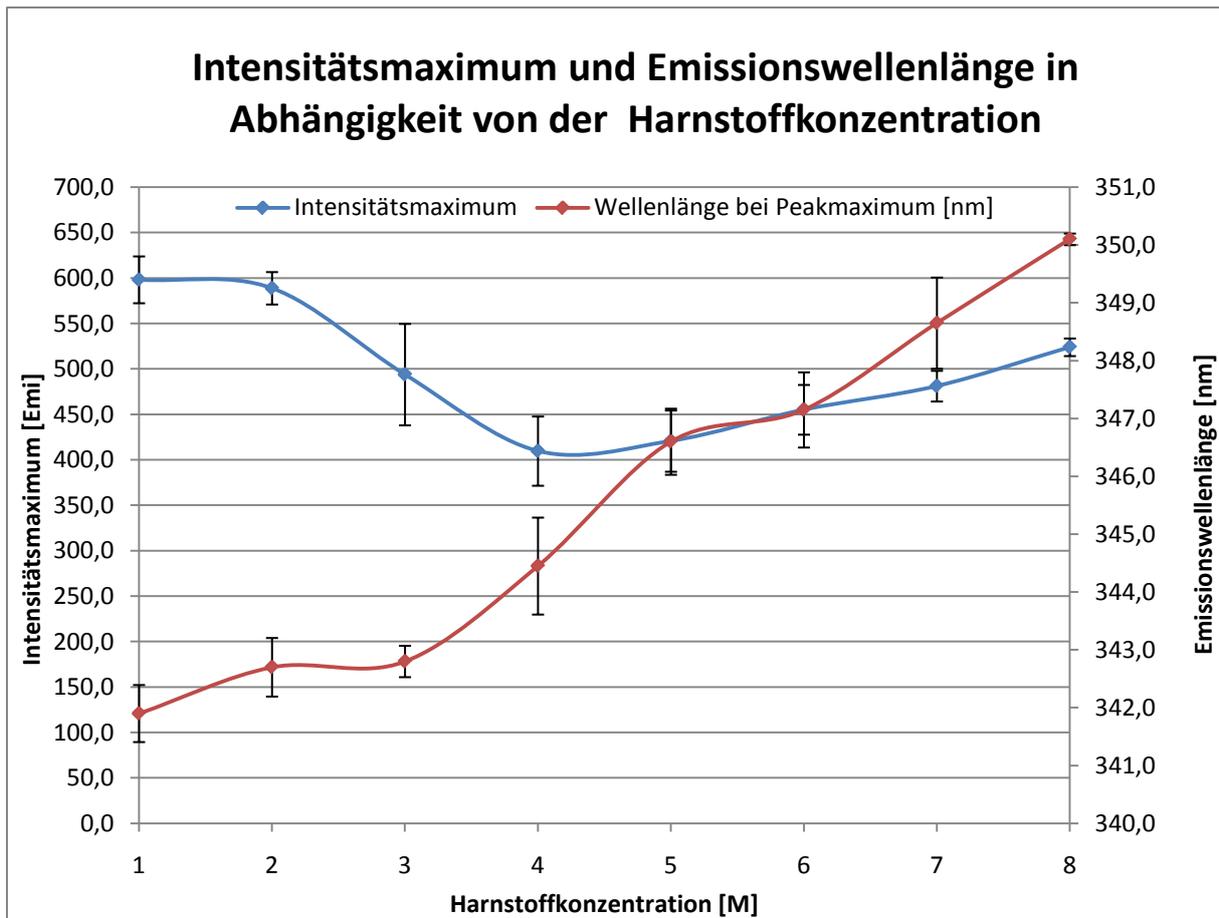


Abbildung 11: Entfaltung von Amyloglucosidase (0,1 mg/mL) durch chemische Denaturierung mit 1-8 M Harnstoff in 30mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer, pH 7,4. Anregungswellenlänge: 280 nm.

In Abbildung 11 nimmt der Verlauf des Intensitätsmaximums von 1 M bis 4 M Harnstoff in einer sigmoidalen Kurve ab. Bei 4 M erreicht das Intensitätsmaximum den niedrigsten Wert von ca. 410 und steigt dann von 4 M bis 8 M auf ca. 87% des Anfangswertes bei 1 M wieder an. Bis zu der Konzentration von 4 M ist der Quenching-Effekt des Harnstoffs maßgeblich für die Abnahme der Intensität. Die freien Aminogruppen des Harnstoffs sind hierfür mitverantwortlich. Die Emissionswellenlänge des Intensitätsmaximums steigt von 1 M auf 2 M um etwa 1 nm an, verhält sich bei 2 M und 3 M nahezu gleich und verschiebt sich zwischen 3 M und 5 M um ca. 4 nm zu größeren Wellenlängen. Dieser rasche Anstieg kann durch veränderte Polarität des die

Tryptophanreste umgebenden Lösungsmittels erklärt werden. Der Anstieg des Intensitätsmaximums ab 4 M resultiert aus der Konformationsänderung der Amyloglucosidase. Es treten vermehrt aromatische Aminosäuren aus dem Inneren des Proteins an die Oberfläche, wodurch sie der energetischen Anregung besser zur Verfügung stehen. Außerdem wird weniger emittiertes Licht reabsorbiert, weil der Abstand zwischen den Fluophoren infolge der Entfaltung zunimmt. Die hieraus resultierende Zunahme der Intensität überdeckt den Quenching-Effekt des Harnstoffs. (Wilms, 2010)

Das Denaturierungsgenz DTT hat ebenfalls einen mindernden Einfluss auf die Emissionsintensität. Dieser Einfluss wurde in einem weiteren Versuch qualitativ bestimmt, wobei gleichzeitig eine mögliche Änderung im Verlauf der Entfaltungskurve beobachtet werden konnte. Die DTT-Konzentration wurde von 30 mM auf 6 mM reduziert, ansonsten blieben die Versuchsbedingungen, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, identisch.

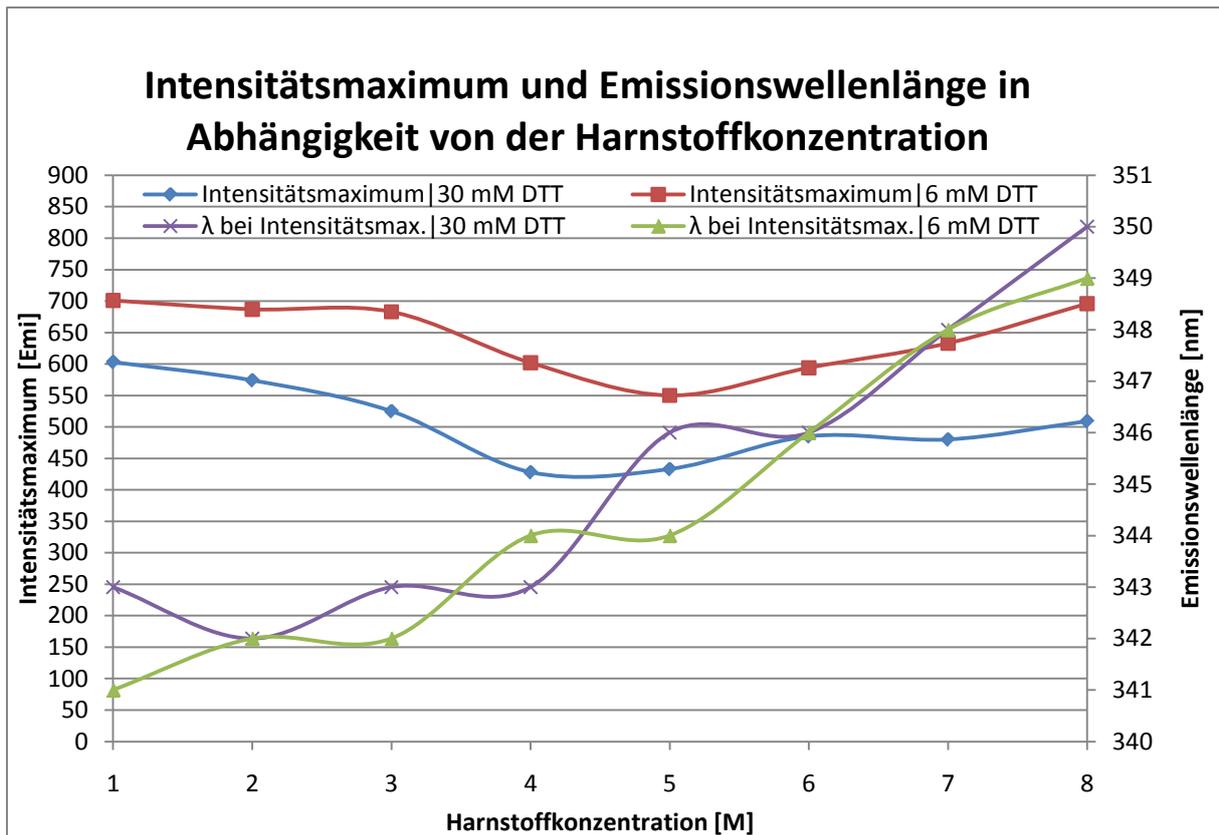


Abbildung 12: Entfaltung von Amyloglucosidase (0,1 mg/mL) durch chemische Denaturierung mit 1-8 M Harnstoff in 6 bzw. 30mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer, pH 7,4. Anregungswellenlänge: 280 nm.

In Abbildung 12 ist der Vergleich der Entfaltungskurven der Amyloglucosidase in 30 mM DTT haltigem Denaturierungspuffer mit 6 mM DTT haltigem Denaturierungspuffer dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Amyloglucosidase in 6 mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer ist durchgehend höher als bei der Vergleichsreihe mit 30 mM DTT. Die Differenz der Intensitätsmaxima ist abhängig von der jeweiligen Harnstoffkonzentration und variiert in einem Bereich zwischen 98 und 187. Auffällig ist, dass die niedrigste Intensität von 550 bei dem 6 mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer bei einer Harnstoffkonzentration von 5 M gemessen wurde im Vergleich zur Intensität von 428 bei 4 M bei dem 30 mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen,

dass die niedrigere DTT-Konzentration eine höhere Harnstoffkonzentration erfordert um die Entfaltung einzuleiten. Das Intensitätsmaximum bei 8 M Harnstoff steigt bei dem 6 mM DTT-haltigen Denaturierungspuffer auf ca. 99% des Anfangswertes von 1 M Harnstoff an. Dieser Wert ist im Vergleich zum Verhältnis von Intensitätsmaximum bei 8 M Harnstoff zu 1 M Harnstoff in 30 mM DTT-haltigem Denaturierungspuffer um ca. 12 % größer. Eine mögliche Ursache für dieses nicht-lineare Verhalten könnte ein Einfluss des DTT sein, das in Kombination mit dem Harnstoff einen überproportionalen Quenching-Effekt aufweist.

Die Emissionswellenlängen bei den jeweiligen Intensitätsmaxima zeigen keine vollständige Übereinstimmung zwischen den zwei verschiedenen Entfaltungskurven auf. Zum einen könnte diese Beobachtung auf unterschiedliche Entfaltungsstadien, in denen sich die Amyloglucosidase jeweils befindet, und zum anderen auf messbedingte Schwankungen die im Bereich von ± 1 nm liegen, zurückgeführt werden.

4.2 Renaturierung von Amyloglucosidase durch Verdünnung

Die Rückfaltung durch Verdünnung hatte zum einen das Ziel die Abhängigkeit der ermittelten Wiederfindungsrate von der Verdünnungsstufe untereinander zu vergleichen und daraus eine Aussage über Aktivitätsverluste durch Aggregatbildung ableiten zu können. Zum anderen wurden die Konzentrationen von Harnstoff und L-Arginin variiert um einen Einfluss dieser Additive auf die Wiederfindungsrate bestimmen zu können. Die Rückfaltung eines Proteins in seine native Konformation ist des Weiteren eine Funktion der Zeit, weswegen die Enzymaktivität in definierten Zeitabständen von 2 Stunden und 72 Stunden nach der Verdünnung ermittelt wurde.

Die Amyloglucosidase wurde wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben denaturiert und wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben umgepuffert und dem Aktivitätsassay zugeführt. Um einen Vergleich zwischen den Ausbeuten aus dem Aktivitätsassay und der Fluoreszenzanalytik zu ermöglichen wurden die Proben nach 72 Stunden Inkubationszeit in Renaturierungspuffer fluoreszenzspektrometrisch vermessen.

In Abbildung 13 sind exemplarisch die Fluoreszenz-Spektrogramme der Verdünnungsstufe 1:25 gezeigt. Die Wellenlänge bei der das Intensitätsmaximum gemessen wurde lag bei allen vier Proben bei einem Wert von ca. 343 nm und liegt damit um 1 nm über der Wellenlänge der nativen Amyloglucosidase von (342 ± 1) nm. Es wurde daher angenommen, dass der Großteil der vorhandenen Amyloglucosidasemoleküle in ihrer nativen oder einer im Fluoreszenzverhalten ähnlichen Konformation vorlag.

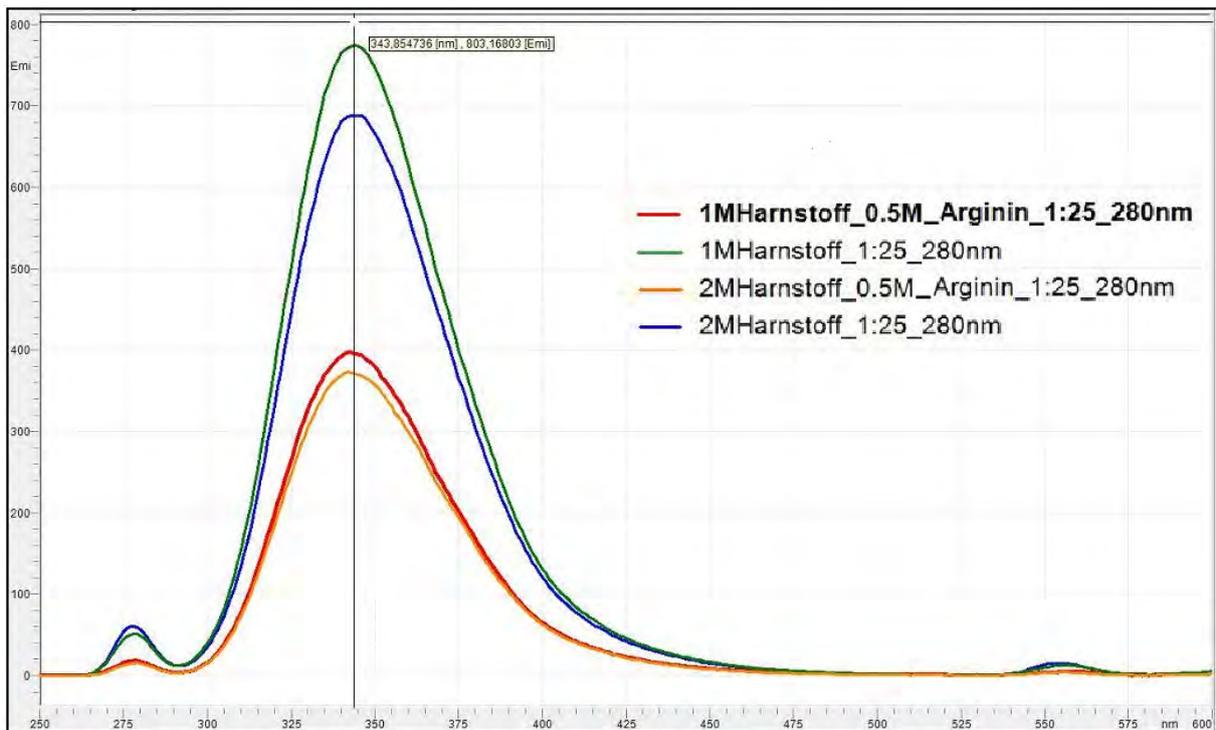


Abbildung 13: Fluoreszenzspektrogramme der Verdünnungsstufe 1 zu 25 (0,1 mg/mL) nach 72 Stunden Inkubation. Anregungswellenlänge: 280 nm.

Die niedrigere Fluoreszenzintensität des 2 M Harnstoff haltigen Renaturierungspuffer im Vergleich zum 1 M harnstoffhaltigen Puffer resultiert aus dem Quenching-Einfluss des Harnstoffs. Die Intensitätsmaxima der argininhaltigen Renaturierungspuffer und der Renaturierungspuffer ohne Arginin unterscheiden sich in einem konstanten Faktor von ca. 1,93. Diese

Beobachtung lässt darauf schließen, dass das Arginin ebenfalls einen Quenching-Effekt, der stärker als beim Harnstoff ausfällt, aufweist.

In Abbildung 14 ist die Wiederfindungsrate der enzymatischen Aktivität der Amyloglucosidase nach zwei Stunden Inkubationsdauer in den jeweiligen Renaturierungspuffern in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe dargestellt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate bei einer Endkonzentration von 0,25 mg/mL liegt für alle Renaturierungspuffer unter 10 %, woraus geschlossen werden kann, dass ein hoher Anteil der Amyloglucosidase nicht in seiner nativen Konformation sondern in Faltungsintermediaten oder löslichen Oligomeren vorliegt. Die Wiederfindungsrate zeigt bei den Proteinendkonzentrationen 0,25 mg/mL und 0,1 mg/mL eine durchschnittlich höhere Enzymaktivität bei den Arginin haltigen Puffern an und liegt hier bei beiden Harnstoffkonzentrationen gleichauf.

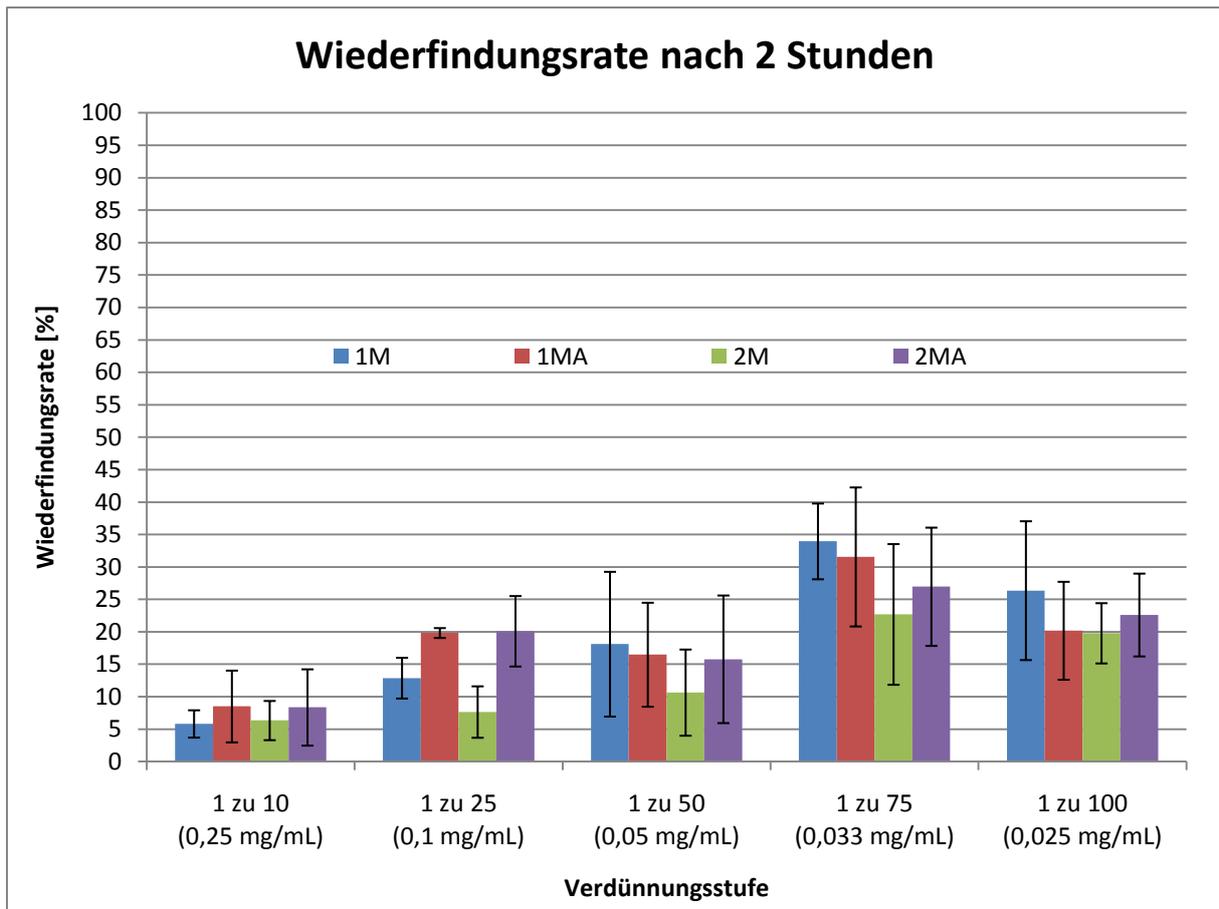


Abbildung 14: Vergleich der Wiederfindungsraten nach 2 Stunden Inkubation. 1M: 1 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer, 1MA: 1 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer mit Zusatz von 0,5 M L-Arginin, 2M: 2 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer, 2MA: 2 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer mit Zusatz von 0,5 M L-Arginin. Die Fehlerbalken zeigen die Mittelwertabweichung berechnet aus drei identisch durchgeführten Versuchen an.

Es ist anzunehmen, dass L-Arginin die Bildung von löslichen Oligomeren, die kurz nach dem Verdünnungsvorgang entstanden sind, in einem geringen Maße unterdrückt und somit die Faltung in die native Form begünstigt. Bei einer Endkonzentration von 0,033 mg/mL (1 zu 75) wurden die durchschnittlich höchsten Wiederfindungsraten nach 2 Stunden Inkubationsdauer ermittelt. Bei 1 M Harnstoff ohne den Zusatz von 0,5 M Arginin wurden darüber hinaus die höchsten Wiederfindungsraten im Vergleich zu den anderen Puffern bei den

Verdünnungsstufen 1 zu 50, 1 zu 75 und 1 zu 100 festgestellt. Bei diesen niedrigen Endkonzentrationen könnte es zu einer Umkehrung der Faltungsbegünstigung kommen. Es bilden sich aufgrund der niedrigeren Endkonzentration weniger Aggregate aus, sodass der Zusatz von Arginin oder einer höheren Harnstoff Konzentration von 2 M die Faltung in die native Konformation der Amyloglucosidase verlangsamt.

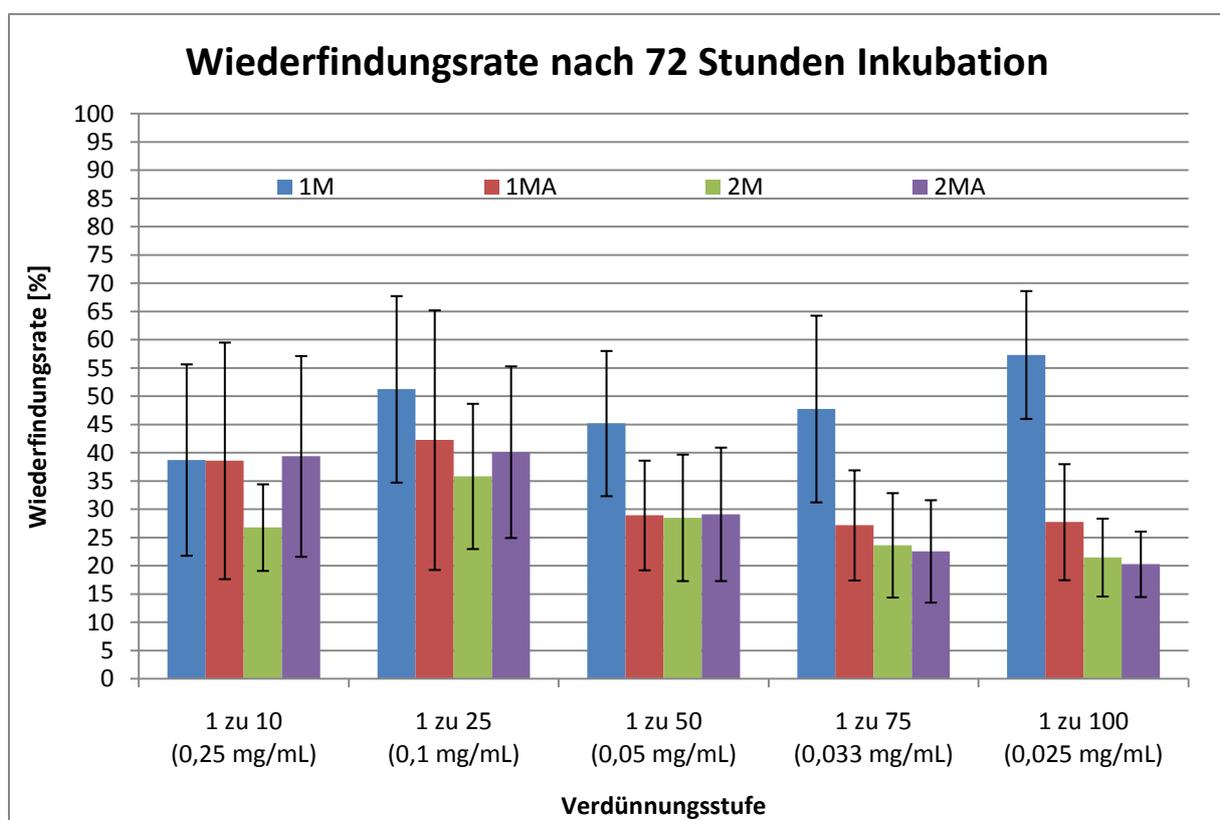


Abbildung 15: Vergleich der Wiederfindungsraten nach 72 Stunden Inkubation. 1M: 1 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer, 1MA: 1 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer mit Zusatz von 0,5 M L-Arginin, 2M: 2 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer, 2MA: 2 M harnstoffhaltiger Renaturierungspuffer mit Zusatz von 0,5 M L-Arginin. Die Fehlerbalken zeigen die Mittelwertabweichung berechnet aus drei identisch durchgeführten Versuchen an.

In Abbildung 15 sind die Wiederfindungsraten nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden in Renaturierungspuffer dargestellt. In den Verdünnungsstufen 1 zu 10, 1 zu 25 und 1 zu 50 steigen alle Werte innerhalb dieser Zeit an. Die durchschnittlichen Zuwächse der Wiederfindungsraten in den 1 zu 10 Verdünnungen bei 1M, 1MA und 2MA liegen bei ca. 30 %. Bei dem 2M Renaturierungspuffer liegt der Zuwachs bei ca. 20 %. Bei den 1 zu 25 Verdünnungen fallen die Steigerungen der Wiederfindungsraten geringer aus, mit Ausnahme des Renaturierungspuffer 1M bei dem ein Zuwachs von ca. 40 % gemessen wurde. In den Verdünnungsstufen 1 zu 50 steigerte sich die Aktivität in den Renaturierungspuffern 1MA, 2M und 2MA zwischen 12% und 18 %. Bei 1M liegt der Zuwachs bei ca. 27%. Bei den Verdünnungsstufen 1 zu 75 und 1 zu 100 steigt nur der Wert des 1 M Harnstoff haltigen Puffers an. Die Werte von 1 MA und 2 MA verringern sich um ca. 4,5 %, die Werte von 2M zeigen keine signifikante Veränderung auf.

Der Vergleich der Enzymaktivitäten bezüglich der Inkubationsdauer und bezüglich der Faltungsadditive zeigt, dass der Renaturierungsvorgang ein komplexer Mechanismus ist und vielen Einflüssen unterliegt. Die Zunahme der Aktivität mit der Zeit, die in den meisten Proben beobachtet wurde, lässt darauf schließen, dass die Faltung der Amyloglucosidase in die native Konformation zwar bevorzugt, aber dennoch in Konkurrenz zur Aggregatbildung steht und sich nur langsam durchsetzt. Außerdem bewirken die Additive Harnstoff und L-Arginin eine Verlangsamung der Rückfaltung und stabilisieren ungefaltete Intermediatzustände. Dies konnte vor allem bei niedrigen Konzentrationen (1 zu 75 und 1 zu 100) im zeitlichen Vergleich beobachtet werden. Hier liegen die Wiederfindungsraten nach 72 Stunden von Renaturierungspuffer 1M 20% respektive 30% über denen der Renaturierungspuffer 1MA, 2M und 2MA.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse aus den Verdünnungsversuchen darauf schließen, dass sich die Amyloglucosidase erfolgreich in ihre native Konformation zurückfalten lässt. Der Auswertung aus der Fluoreszenzanalytik zufolge befindet sich ein Großteil der Amyloglucosidasemoleküle in einem nativen oder zumindest in einem nativ-ähnlichen Zustand. Die Wiederfindungsraten der Enzymaktivität fallen nach 72 Stunden Inkubationszeit bei Renaturierungspuffer 1M insgesamt am höchsten aus. Es kann demnach angenommen werden, dass eine Konzentration von 1 M Harnstoff ausreicht um Aggregationen zu unterbinden und gleichzeitig die Faltung in die native Konformation nicht zu stark zu verlangsamen.

4.3 Renaturierung von Amyloglucosidase mittels Harnstoff-Gradienten-SEC

Im Folgenden werden die Chromatogramme aus den SEC-Renaturierungsversuchen V1 und V2 dargestellt und diskutiert. Die Zusammensetzungen der Renaturierungspuffer sind in Kapitel 3.2.3 einzusehen. Es folgt eine Zusammenfügung der Ergebnisse aus der Enzymaktivitätsbestimmung und der Fluoreszenzanalytik der Versuche V1 und V2 und eine vergleichende Darstellung der Ausbeuten.

4.3.1 Versuch V1

In Abbildung 16 ist ein Chromatogramm aus Versuch V1 dargestellt. Es zeigt die UV-Absorption und die Leitfähigkeit in Abhängigkeit von dem Retentionsvolumen nach Applikation der denaturierten Amyloglucosidase auf die Säule.

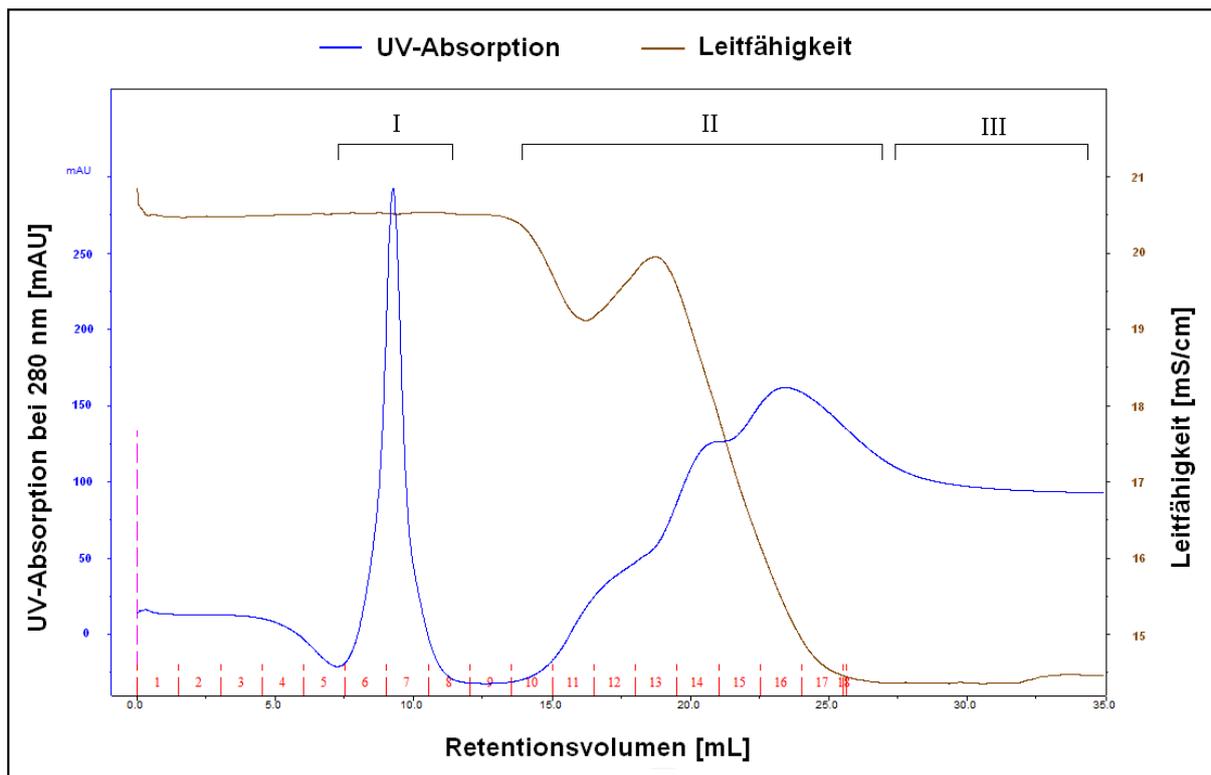


Abbildung 16: Chromatogramm des Renaturierungsversuches V1. (Harnstoffgradient von 8 M – 2 M. Säule: C 10/40 mit Sephadex G-25-Material, Säulenvolumen: 28,7 mL, Elutionsflussrate: 0,2 mL/min, UV-Absorptionsmessung bei 280 nm)

Die UV-Absorption ist bis zu einem Retentionsvolumen von ca. 5 mL konstant und spiegelt die absorptiven Eigenschaften des Renaturierungspuffers bei 280 nm wider. Ab einem Retentionsvolumen von ca. 5 mL bis zu einem Retentionsvolumen von ca. 7,5 mL nimmt die Absorption ab, bevor ein starker

Anstieg erkennbar ist. Diese kurzzeitige Abnahme könnte die Folge einer Schlierenbildung sein, die beim Kontakt von reinem Renaturierungspuffer mit Proteinhaltigem Renaturierungspuffer entstanden sind. Da die Abnahme der UV-Absorption mit und ohne Zugabe einer Proteinprobe beobachtet wurde (WILMS, 2012), wird davon ausgegangen, dass dies ein Resultat des Mischungseffektes des Renaturierungspuffers mit dem Denaturierungspuffer ist. Ab einem Retentionsvolumen von ca. 7,5 mL steigt die UV-Absorption bis zu einem maximalen Wert von ca. 300 mAU bei ca. 9 mL an und nimmt bis ca. 12 mL Retentionsvolumen wieder ab (in Abb. 16 mit I benannt). Die UV-Absorption die nach dem Peak gemessen wurde nimmt Werte unterhalb der Basislinie an. Der Peak hat ein geringes Tailing zeigt aber sonst ein klares Profil auf. Die Leitfähigkeit bleibt bis zu einem Retentionsvolumen von ca. 12,5 mL auf einem konstanten Wert von ca. 20,5 mS/cm. Dies spricht dafür, dass die Pufferzusammensetzungen innerhalb des Elutionsvolumens des Proteins keine messbaren Veränderungen durchlaufen haben. Es kann demnach angenommen, dass die Amyloglucosidase den Harnstoffgradienten vollständig durchlaufen hat und ausschließlich in Renaturierungspuffer eluiert ist. Ab einem Retentionsvolumen von ca. 12,5 mL erhöht sich die UV-Absorption un stetig und nimmt bei ca. 23 mL ein Maximum an (II). Anschließend fällt die UV-Absorption auf einen Wert von ca. 100 mAU, der die Absorption des Denaturierungspuffers widerspiegelt (III). Der un stetige Anstieg der UV-Absorption im Bereich II ist auf den Gradienten zurück zu führen, innerhalb dessen mit zunehmendem Retentionsvolumen die Harnstoffkonzentration und die des DTT steigen. Die Leitfähigkeit weist in Bereich II eine Besonderheit auf. Es zeigt sich nach einer konstanten Basislinie eine kurzfristige Abnahme der Leitfähigkeit von ca. 1 mS/cm über ca. 3 mL Retentionsvolumen gefolgt von einem lokalen Maximum um anschließend auf einen Wert unter 15 mS/cm zu

sinken. Innerhalb des Retentionsvolumens dieses lokalen Maximums eluiert eine Substanz, die trotz steigender Viskosität des Puffers und damit einhergehender Abnahme der Leitfähigkeit (Wilms, 2012) ein deutliches Signal zeigt.

4.3.2 Versuch V2

Die Abschnitte im Retentionsverlauf wie sie im vorherigen Kapitel besprochen wurden zeigen ein sehr ähnliches Verhalten bezüglich der UV-Absorption und der Leitfähigkeit mit den Ergebnissen aus Versuch 2. Abbildung 17 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm aus Versuch V2.

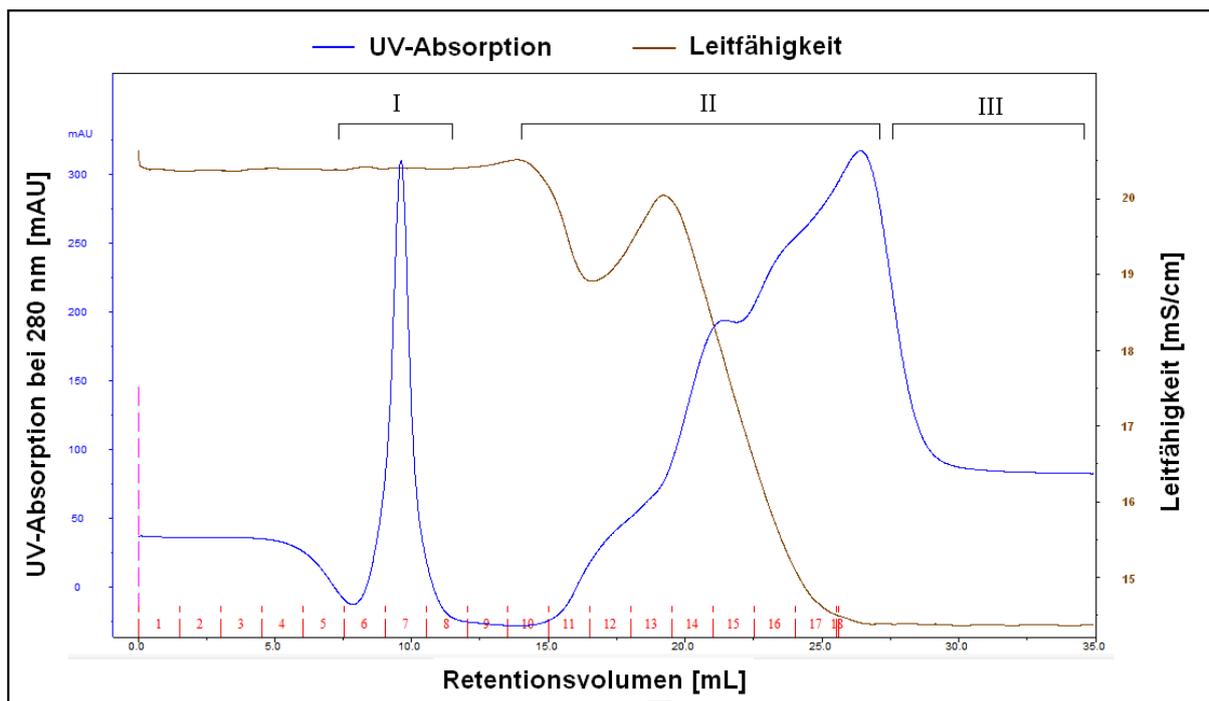


Abbildung 17: Chromatogramm des Renaturierungsversuches V2. (Harnstoffgradient von 8 M – 2 M. Säule: C 10/40 mit Sephadex G-25-Material, Säulenvolumen: 28,7 mL, Elutionsflussrate: 0,2 mL/min, UV-Absorptionmessung bei 280 nm)

Im Bereich I eluiert die Amyloglucosidase in drei Fraktionen. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass das Protein den Harnstoffgradienten durchlaufen hat bevor es in Renaturierungspuffer eluiert ist. Der Übergangsbereich (II), in dem der Gradient eluiert, zeigt wie in Versuch V1 einen un stetigen Verlauf der UV-Absorption. Das Überschwingen der UV-Absorption fällt stärker aus als im Versuch V1. Ein möglicher Grund hierfür könnte die größere Differenz der Harnstoffmolaritäten zwischen den Puffern und eine resultierende Änderung in den Absorptionseigenschaften sein. Die Leitfähigkeit zeigt im Abschnitt II ebenfalls ein lokales Maximum auf. Ausgehend von der Beobachtung, dass kein weiterer Peak vor dem Eluieren des Gradienten erscheint, wird angenommen, dass die applizierte Amyloglucosidasemenge in den Fraktionen 6, 7 und 8 vorhanden ist.

4.3.3 Quantitative Analytik der Renaturierung von Amyloglucosidase

Die quantitative Analytik der Renaturierung der Amyloglucosidase erfolgte mittels des Enzymaktivitäts-Assays und anhand von fluoreszenzspektroskopischen Messungen.

In Abbildung 18 sind die Massenausbeuten der Fraktionen 6, 7 und 8 dreier gleichartig durchgeführter Versuche V1 und V2 dargestellt. Die Messwerte wurden ca. 2 Stunden nach der SEC-Renaturierung aufgenommen. Die aus den gemessenen Werten des Intensitätsmaximums aus der Fluoreszenzanalytik berechneten Massen zeigten in den Fraktionen 6 und 8 nur eine sehr geringe Abweichung voneinander an, sodass hier nur die Mittelwerte ohne Fehlerbalken angezeigt sind. Die Aktivitätswerte zeigten ebenfalls nur sehr geringe Abweichungen, weswegen hier auch nur der Mittelwert angegeben ist. In Fraktion 7 sind die höchsten Massenausbeuten aus der Fluoreszenzanalytik und aus dem Aktivitätsassays zu verzeichnen. Hier waren Verdünnungen notwendig, die die durch die Fehlerbalken angezeigten Schwankungen verursacht haben können.

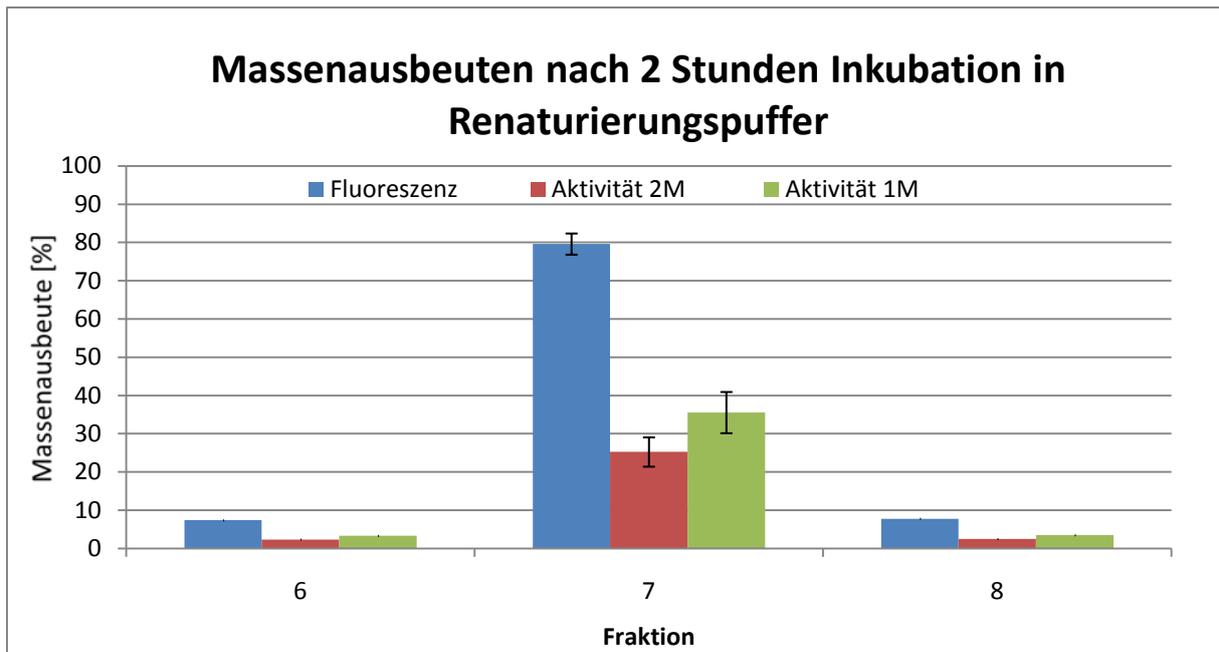


Abbildung 18: Massenausbeute aus Fluoreszenzanalytik und Aktivitätsbestimmung nach 2 Stunden Inkubation. Vergleichende Darstellung der Versuche V1 und V2.

Das Ergebnis untermauert die in den vorherigen Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 beschriebene Beobachtung, dass die Amyloglucosidase in den Fraktionen 6, 7 und 8 eluiert ist. Dort wurde bei diesen Fraktionen ein Anstieg der UV-Absorption gemessen, der der Amyloglucosidase zugeschrieben wurde. Die Massenausbeuten zwischen der Fluoreszenzanalytik und der Aktivitätsbestimmung unterscheiden sich stark. Während die Fluoreszenzmessungen eine prozentuale Gesamtausbeute von ca. 95 % ergaben, wurde durch die Aktivitätsbestimmung bei dem Versuch V1 nur eine Gesamtmassenausbeute von ca. 42 % und in Versuch V2 von nur ca. 30 % erreicht. Die Versuchsaufbauten V1 und V2 unterscheiden sich lediglich in der Konzentration des Harnstoffs im Renaturierungspuffer. Es ist daher anzunehmen, dass die Differenz der Massenausbeuten aus Versuch V1 und Versuch V2, die bei ca. 12 % liegt, eine Folge der unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen ist.

In Abbildung 19 sind die Massenausbeuten der Fraktionen 6,7 und 8 nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in Renaturierungspuffer dargestellt. Die Massenausbeuten, die aus dem Aktivitätsassay gewonnen wurden, steigen in allen Fraktionen an, wobei der Zuwachs am deutlichsten in Fraktion 7 zu sehen ist. Hier liegen die Steigerungen bei ca. 12 % für Versuch V2 und bei ca. 4 % für Versuch V1. Die Gesamtmassenausbeuten aus der Aktivitätsmessung aus V1 und V2 haben sich innerhalb der 72 Stunden Inkubationsdauer auf einen vergleichbaren Wert von ca. 45% (V2) bzw. 47 % (V1) angeglichen.

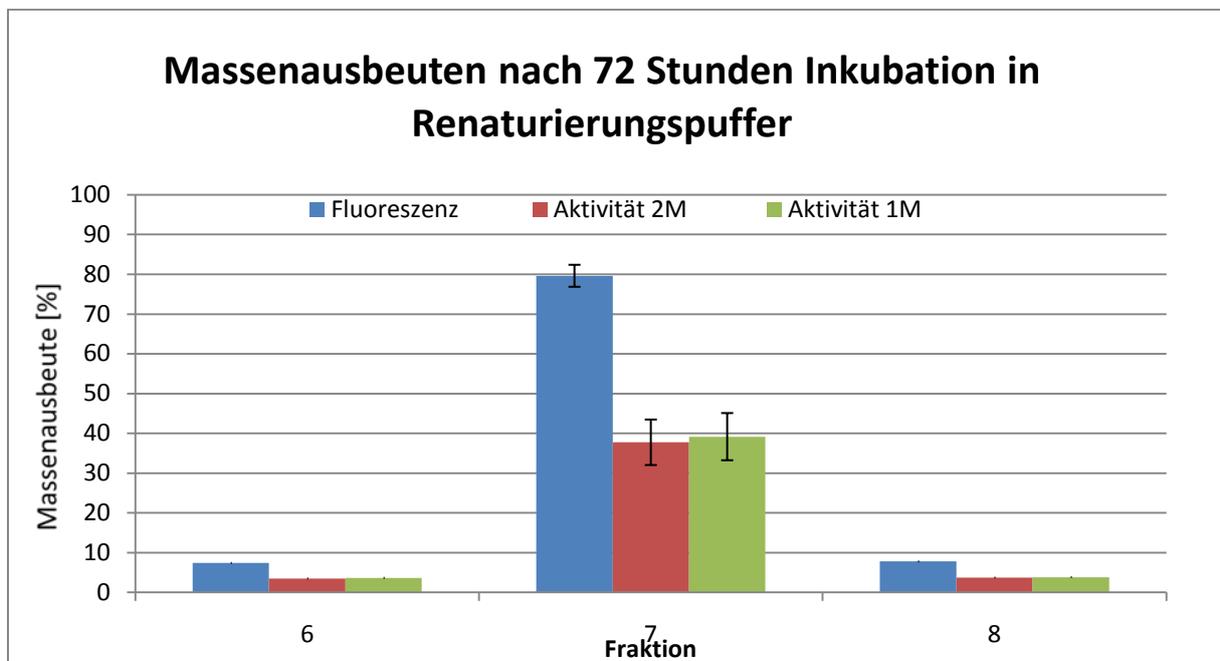


Abbildung 19: Massenausbeute aus Fluoreszenzanalytik und Aktivitätsbestimmung nach 72 Stunden Inkubation. Vergleichende Darstellung der Versuche V1 und V2.

Die Ergebnisse aus der Aktivitätsbestimmung lassen zum einen darauf schließen, dass ein Großteil der Amyloglucosidasemoleküle nach Durchlaufen der Harnstoff-Gradienten-SEC noch nicht in einer rückgefalteten Konformation vorliegt. Nach einer Zeit von 72 Stunden wurden jeweils höhere Aktivitäten

gemessen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus den Verdünnungsversuchen (s. Kapitel 4.2) überein. Ein weiterer Schluss, der aus den Ergebnissen gezogen werden kann, betrifft den Vergleich zwischen den Versuchen V1 und V2. Die höhere Massenausbeute von ca. 12 %, die in Versuch V2 im Vergleich zu V1 nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden gemessen wurde, zeigt, dass die Elution in 1M harnstoffhaltigen Renaturierungspuffer den Rückfaltungsprozess der Amyloglucosidase beschleunigen kann. Da nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden sehr ähnliche Aktivitätswerte in V1 und V2 gemessen wurden, liegt nahe, dass die größere Differenz der Harnstoffkonzentrationen im Harnstoffgradienten bei Versuch V2 zwar eine Beschleunigung des Rückfaltungsprozesses gewährt, aber darüber hinaus keine höheren Endausbeuten erbrachte.

Bei dem Vergleich der Fluoreszenzdaten zeigten die Wellenlängen bei maximaler Emissionsintensität keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inkubationsdauer im Renaturierungspuffer als auch zwischen Versuchen V1 und V2. Sowohl nach zwei Stunden als auch nach 72 Stunden lagen die Wellenlängen bei allen Fraktionen in einem Bereich von (342 ± 1) nm obwohl die Aktivitätsbestimmung eine höhere Ausbeute nach 72 Stunden ergab und daher auf eine Konformationsänderung eines Großteils der Amyloglucosidasemoleküle schließen lässt. Es folgt der Schluss, dass die Fluoreszenzanalytik für mögliche geringe Veränderung in der Konformation und damit einhergehend Veränderungen in der Aktivität nicht zugänglich ist.

Die in den Abbildungen 16 und 17 gezeigte Abnahme der UV-Absorption die schon vor der Elution der Amyloglucosidase eintritt, deutet daraufhin, dass in diesem Bereich möglicherweise schon geringe Anteile an Denaturierungspufferkomponenten eluieren und den Rückfaltungsvorgang zu einem gewissen Grad unterbinden. Da die Leitfähigkeit bei der Elution der

Amyloglucosidase konstant bleibt und angenommen wird, dass das Enzym in Renaturierungspuffer eluiert, kann dies nur als Vermutung für die geringen Aktivitätsausbeuten aufgestellt werden.

Des Weiteren kann die Bildung von stabilen Intermediaten und Oligomeren, die keine Bioaktivität aufweisen, für die geringen Ausbeuten in Betracht gezogen werden. Der Harnstoff ist ein chaotropes Agens und verlangsamt zum einen die Rückfaltung in die native Konformation und stabilisiert gleichzeitig Intermediate.

In Tabelle 15 werden die gewonnenen prozentualen Massenausbeuten aus dem Aktivitätsassay und aus der Fluoreszenzanalytik für die Versuche V1 und V2 vergleichend dargestellt.

Tabelle 15: Übersicht zur Massenausbeute berechnet aus Enzymaktivität und Fluoreszenzanalytik. Vergleichende Darstellung der Versuche V1 und V2 nach 2 Stunden und 72 Stunden Inkubation in Renaturierungspuffer.

Massenausbeute	Versuch	
	V1	V2
Aktivitätsassay		
nach 2 Stunden	30	42
nach 72 Stunden	45	47
Fluoreszenz		
nach 2 Stunden	95	95
nach 72 Stunden	95	95

5 Diskussion

Die Denaturierung der Amyloglucosidase konnte durch die Zugabe von 8 M Harnstoff und 30 mM DTT erfolgreich durchgeführt werden. Es zeigt sich bei Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen, dass ab einer Konzentration von 4 M Harnstoff eine Konformationsänderung der Amyloglucosidase eintritt, die mit einer Intensitätszunahme und einer Wellenlängenverschiebung einhergeht. Das Enzym in seiner nativen Form erreicht bei einer Wellenlänge von 342 nm das Intensitätsmaximum während die Zugabe von von 8 M Harnstoff eine Wellenlängenverschiebung von 8 nm auf 350 nm hervorruft. In einem vergleichenden Versuch konnte das für die Reduktion der Disulfidbrücken verwendete DTT als fluoreszenzmindernde Substanz identifiziert werden und gleichzeitig den Einfluss der DTT-Konzentration auf die Denaturierung aufzeigen. Bei verwendeten Konzentrationen von 30 mM und 6 mM DTT wurden nur geringe Unterschiede im Verlauf der Entfaltungskurven festgestellt.

Bei der Renaturierung durch Verdünnung wurden vier Renaturierungspuffer, die sich in der Harnstoffkonzentration bzw. in der Argininkonzentration unterscheiden, verwendet. Auf der Basis eines Modells, das die Kooperativen Effekte dieser beiden Faltungsadditive beschreibt, wurden die Einflüsse auf die Renaturierung der Amyloglucosidase in einem Proteinkonzentrationsbereich von 0,25 mg/mL bis 0,025 mg/mL untersucht. Die Inkubationszeit stellte sich als wichtiger Faktor bei der Faltung in die native Konformation heraus, da die Aktivitätsausbeute innerhalb von 72 Stunden um einen maximalen Wert von 38% bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL in einem 1 M harnstoffhaltigen Puffer gestiegen ist.

Die Zugabe von 0,5 M L-Arginin konnte nur bei hohen Proteinkonzentrationen von 0,25 mg/mL und 0,1 mg/mL eine um ca. 3 % bis 5 % höhere Aktivitätsausbeute kurz nach dem Verdünnungsvorgang bewirken. Dies könnte auf einen kooperativen Effekt zwischen L-Arginin und Harnstoff zurück zu führen sein. Der Harnstoff unterdrückt die Bildung von unlöslichen Präzipitaten und lässt das Protein in einer solubilisierten Form vorliegen. L-Arginin unterbindet die Bildung von Oligomeren die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Amyloglucosidasemolekülen stabilisiert werden. Es resultiert eine Begünstigung der Rückfaltung in die native Konformation. Dieser Vorteil relativiert sich bei niedrigeren Konzentrationen (0,05 mg/mL, 0,033 mg/mL, 0,025 mg/mL), weil die Bildung von Aggregationen konzentrationsabhängig ist. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine niedrige Harnstoffkonzentration von 1 M die Rückfaltung weniger stark verlangsamt als bei 2 M Harnstoff und wahlweise mit dem Zusatz von 0,5 M L-Arginin.

Ausgehend von den Ergebnissen aus den Verdünnungsversuchen wurden die SEC-Renaturierungsversuche mit 1M harnstoffhaltigen und 2 M harnstoffhaltigen Renaturierungspuffern durchgeführt. Die Fluoreszenzanalytik ergab, dass ca. 80 % der Gesamtmasse, die detektiert wurde, in Fraktion 7 eluiert. Dies entspricht einer Masse von ca. 0,4 mg, die in einer Fraktion von 1,5 mL eine Konzentration von ca. 0,266 mg/mL erreicht. Diese Konzentration liegt in einem vergleichbaren Bereich der niedrigsten Verdünnungsstufe (1 zu 10) aus den Verdünnungsversuchen, sodass ein direkter Vergleich zwischen den Renaturierungsmethoden gezogen werden kann.

Tabelle 16: Vergleichende Darstellung der Massenausbeuten aus der Aktivitätsbestimmung der Fraktionen 7 aus Versuch V1 und Versuch V2 und der Massenausbeute aus der Aktivitätsbestimmung der Verdünnungsstufe 1 zu 10 (0,25 mg/mL) mit Renaturierungspuffer 1 M und Renaturierungspuffer 2M aus den Verdünnungsversuchen

Massenausbeuten aus Aktivitätsassay [%]	V1 (Fraktion 7)	V2 (Fraktion 7)	Verdünnungsstufe 1 zu 10	
			1M	2M
			Nach 2 h	25
Nach 72 h	37	39	38	26

In Tabelle 16 sind die Massenausbeuten der SEC-Versuche im Vergleich zur Verdünnung aufgezeigt. Die Ausbeute liegt bei SEC-Renaturierungsversuchs V1 ca. 20 % über der Wiederfindung die bei der Verdünnung gewonnen wurde. Bei der Verwendung von 1 M Harnstoff haltigem Renaturierungspuffer liegt die Ausbeute sogar ca. 30 % über der Ausbeute bei der Verdünnung. Dieses Ergebnis unterstreicht die Vorteile der Harnstoff-Gradienten-SEC gegenüber der Verdünnung als Renaturierungsmethode. Es zeigt sich allerdings auch, dass die Wiederfindung nicht über einen Prozentsatz von 47 % gesteigert werden konnte. Es gilt weitere Prozessparameter wie die Applikationskonzentration oder die Flussrate zu untersuchen. Das verwendete Chromatographie Material Sephadex G-25 konnte eine Trennung der Amyloglucosidase von Denaturierungsagenzien gewährleisten und erfüllt damit die Anforderungen einer ausreichend niedrigen Ausschlussgrenze. Des Weiteren kann der Verlauf des Harnstoffgradienten dergestalt geändert werden, dass der Abstand zwischen der Elution der Amyloglucosidase und der Elution der Komponenten des Harnstoffgradienten verringert wird. Das in dieser Arbeit eingestellte

Volumen des Gradienten beträgt 7,5 mL und könnte, unter Berücksichtigung der Verbreiterung des Gradienten beim Durchlaufen der Säule, erhöht werden. Auch wäre eine Verringerung des Gradientenvolumens denkbar, um herauszufinden, welche Einflüsse die durch die Verringerung der UV-Absorption angezeigten Mischeffekte zwischen Renaturierungspuffer und Denaturierungspuffer im Retentionsvolumen der Amyloglucosidase auf die Rückfaltung haben.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Denaturierung und Renaturierung der Amyloglucosidase aus *Aspergillus niger* durchgeführt. Es wurden 8 M Harnstoff und 30 mM DTT zur Denaturierung der Amyloglucosidase verwendet und Entfaltungskurven aufgenommen. Es zeigte sich durch Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen, dass die Amyloglucosidase bei einer Harnstoffkonzentration von 4 M einer Konformationsänderung unterliegt und bei 8 M Harnstoff in einem um 8 nm höheren Wellenlängenbereich von 350 nm das Emissionsintensitätsmaximum erreicht, im Vergleich zu 342 nm bei der nativen Amyloglucosidase. Es fanden die Verdünnung und die Harnstoff-Gradienten-SEC als zwei Renaturierungsmethoden eine Anwendung zur Untersuchung ausgewählter Aspekte des Renaturierungsverhaltens der Amyloglucosidase und wurden miteinander verglichen. Aus den Verdünnungsversuchen wurde der Schluss gezogen, dass die Renaturierung ein vielfältiger Prozess ist und von den Faktoren Proteinkonzentration, Inkubationsdauer und Faltungszusätze abhängt. Tendenziell wurden bei niedrigeren Endkonzentrationen und längerer Inkubationsdauer in Renaturierungspuffer höhere Ausbeuten erzielt. Eine Erhöhung der Wiederfindungsrate durch die Zugabe von 0,5 M L-Arginin konnte nur bei hohen Endkonzentrationen von 0,25 mg/mL und 0,1 mg/mL in einem geringen Ausmaß beobachtet werden. Die Harnstoff-SEC-Versuche wurden zum einen so konzipiert, dass auf der Grundlage der Erkenntnisse aus den Verdünnungsversuchen gearbeitet wurde und zum anderen einen Vergleich der Renaturierung von weiteren Modellproteinen (Wilms, 2010, Wilms, 2012, Cornelius, 2012, Dirksen 2010) ermöglichen. Die höchste Aktivitätswiederfindung von 47 % bei der Harnstoff-Gradienten-SEC konnte mit einem 1 M harnstoffhaltigem Renaturierungspuffer mit Glutathionensystem erzielt werden.

7 Literaturverzeichnis und Quellenverzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

Albani, J. R. (2011). STRUCTURE AND DYNAMICS OF MACROMOLECULES: ABSORPTION AND FLUORESCENCE STUDIES. Elsevier-Verlag

Amirul, A. A., Khoo, S. L., Nazalan, M. N., Razip, M. S., Azizan, M. N.(1996). Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol (Praha)*; 41(2):165-74.

Anfinsen C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230

Baynes, B. M., Trout, B. L. (2004). Rational Design of Solution Additives for the Prevention of Protein Aggregation. *Biophys J.* 87(3): 1631–1639.

Bennett, J. W., Klich, M. A. (1992). *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*. 1. Auflage, Stoneham: Butterworth-Heinemann

Chen, J., Liu, Y., Li, X., Wang, Y., Ding, H., Ma, G., Su, Z. (2009). Cooperative effects of urea and L-arginine on protein refolding. *Protein Expression and Purification* 66 82-90

Clark E. D. B. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 157-163

Clark E. D. B. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2 (12), 202-207

Cornelius, A. (2012). Untersuchungen zur Rückfaltung von Urease aus *Canavalia ensiformis* und RNase A aus Rinderpankreas durch Gradienten-SEC. Bachelor-Arbeit HAW Hamburg

Cornett, C. A. G., Fang, T.-Y., Reilly, P. J., Ford, C. (2003). Starch-binding domain shuffling in *Aspergillus niger* glucoamylase. *Protein Eng.* 16 (7): 521-529.

Dirksen A. (2010). Untersuchungen zur Denaturierung und Rückfaltung von Lysozym und β -Lactoglobulin. Diplomarbeit HAW Hamburg

Gey, M. (2008). Instrumentelle Analytik und Bioanalytik. 2.Auflage, Berlin Heidelberg :Springer-Verlag

Gu Z., Su Z., Janson J.-C. (2001). Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding. *J. Chromatogr. A* 918, 311-318

Harris, E. L. V., Angal, S. (1993). Protein Purification methods: a practical approach. 3. Auflage, Oxford: Oxford University Press

Honig, B. (1999). Protein Folding: From the Levinthal Paradox to Structure Prediction. *J. Mol. Biol.* 293, 283-293

Jungbauer A., Kaar W. (2007). Current status in technical protein refolding. *J. Biotechnol.* 128, 587–596

Kleber, H.-P., Schlee, D. (1991). Biochemie I. 2. Auflage, Jena: Gustav Fischer Verlag

Lakowicz J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2. Edition, New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers

Lee, J., Paetzl, M. (2011). Structure of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2011 February 1; 67(Pt 2): 188–192.

Li M., Su Z., Janson J.C. (2004). In vitro refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 33, 1-10

Liu, H.-L., Wang, W.-C. (2002). The predicted unfolding order of the β -strands in the starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Chemical Physics Letters* 366 284–290

Middelberg A. P. J. (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 10 (20), 437-443

Nelson, D., Cox, M. (2009). *Lehninger Biochemie.* 4. Auflage, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag

Reddy, R. C. K., Lillie, H., Rudolph, R., Lange, C. (2005). L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Science*, 14:929-935

Rosky, P. J. (2008). Protein denaturation by urea: slash and bond, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(44): 16825–16826

Rouessac F., Rouessac A. (2007). *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques*, Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester

Schultz C. P. (2000). Illuminating folding intermediates. *Nat. Struct. Biol.* 7 (1), 7-10

Singh S. M., Panda A. K. (2005). Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J. Biosc. Bioeng.* 4 (99), 303-310

Stumpe MC, Grubmüller H (2008). Polar or Apolar—The Role of Polarity for Urea-Induced Protein Denaturation. *PLoS Comput Biol* 4(11): e1000221. doi:10.1371/journal.pcbi.1000221

Sugimoto, H., Nakaura, M., Kosuge, Y., Imai, K., Miyake, H., Karita, S., Tananaka, A. (2007). Thermodynamic Effects of Disulfide Bond on Thermal Unfolding of the Starch-Binding Domain of *Aspergillus niger* Glucamylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (6), 1535-1541

Tanaka, A., Fukada, H., Takahashi, K. (1994). Differential Scanning Calorimetric Studies on the Domain Structure of *Aspergillus* Glucamylase. *J.Biochem.* 117, 1024-1028

Tischer, A., Lilie, H., Rudolph, R., Lange, C. (2010). L-Arginine hydrochloride increases the solubility of folded and unfolded recombinant plasminogen activator rPA. *Protein Sci* 19(9): 1783–1795

Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. (2002). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 1 (28), 1-8

Vivian J. T., Callis P. R. (2001). Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophysical Journal* 80, 2093-2109

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

7.2 Quellenverzeichnis

INTERNET I (zuletzt aufgerufen am 27.02.2013):

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/carbohydrate-analysis.html#Amyloglucosidase>

INTERNET II (zuletzt aufgerufen am 27.02.2013):

<http://isbibbio.wikispaces.com/Enzyme+Production+of+Glucos+Syrup>

INTERNET III (zuletzt aufgerufen am 27.02.2013):

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g2133?lang=de®ion=DE>

8 Anhang

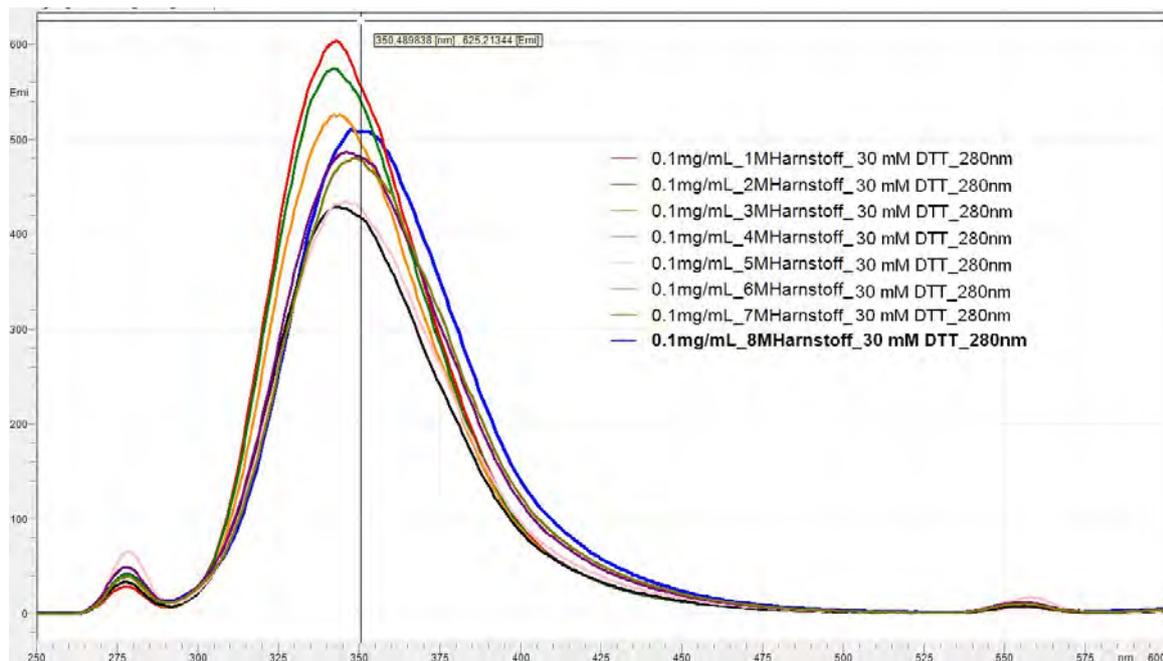


Abbildung 20: Überlagerung der Fluoreszenzspektren der Entfaltungskurve bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL. Der Cursor ist angelegt bei dem Peakmaximum der 8 M harnstoffhaltigen Probe. Die Wellenlänge bei Peakmaximum beträgt hier 350 nm.

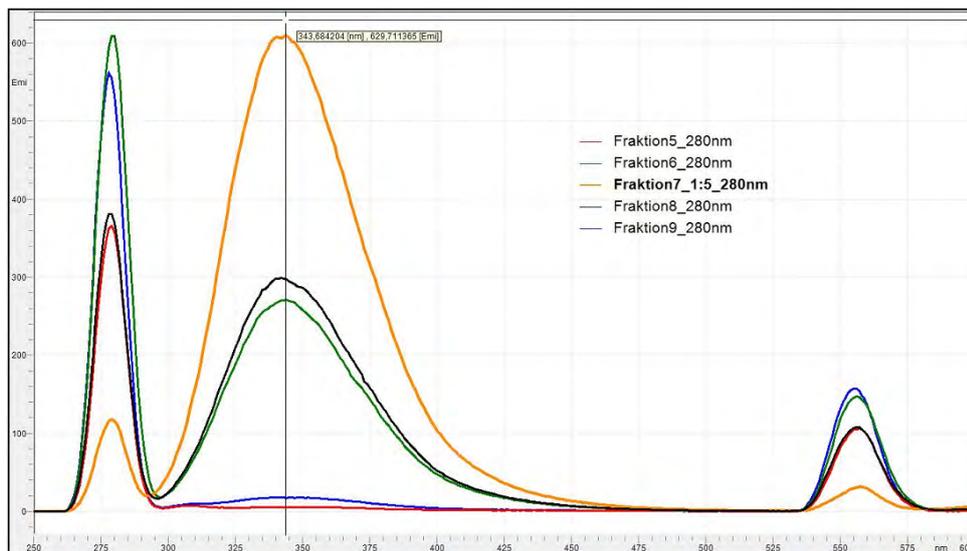


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der fluoreszenzspektrometrischen Analyse der Fraktionen 5 bis 9 von Versuch V1 bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm

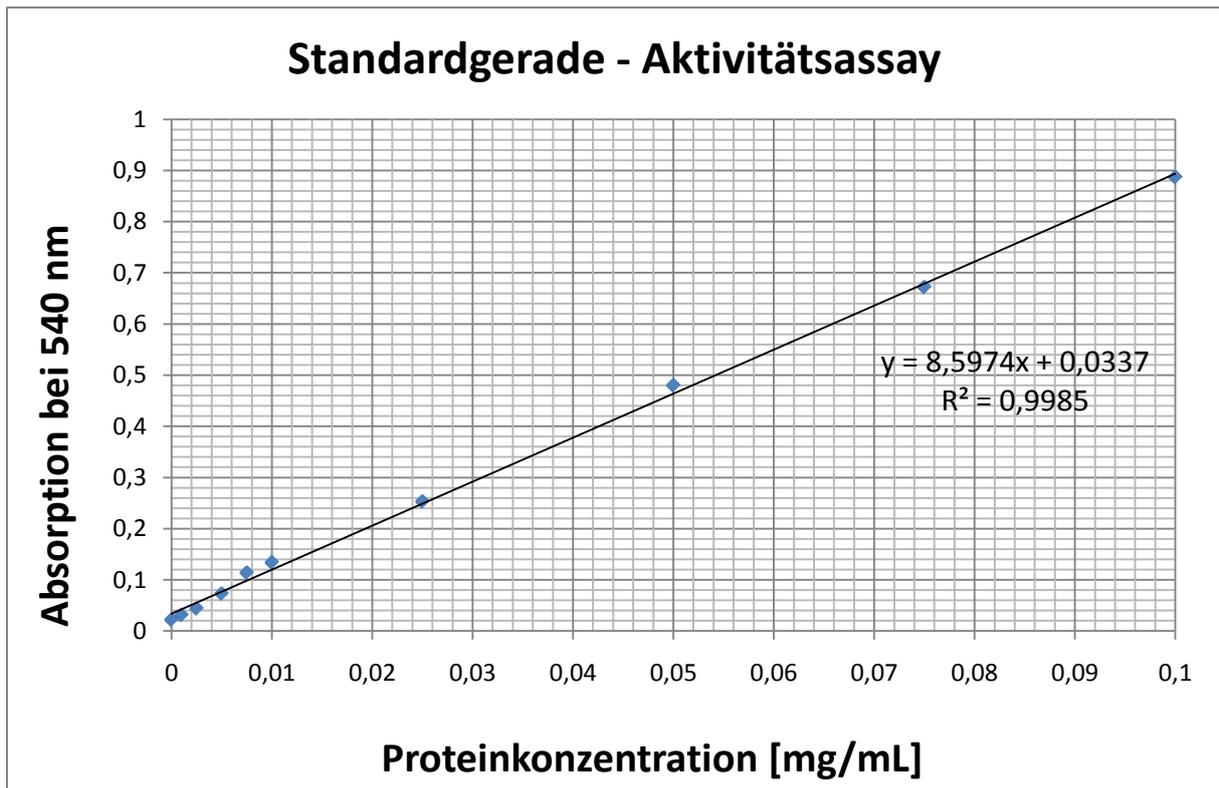


Abbildung 22: Standardgerade des Aktivitätsassays

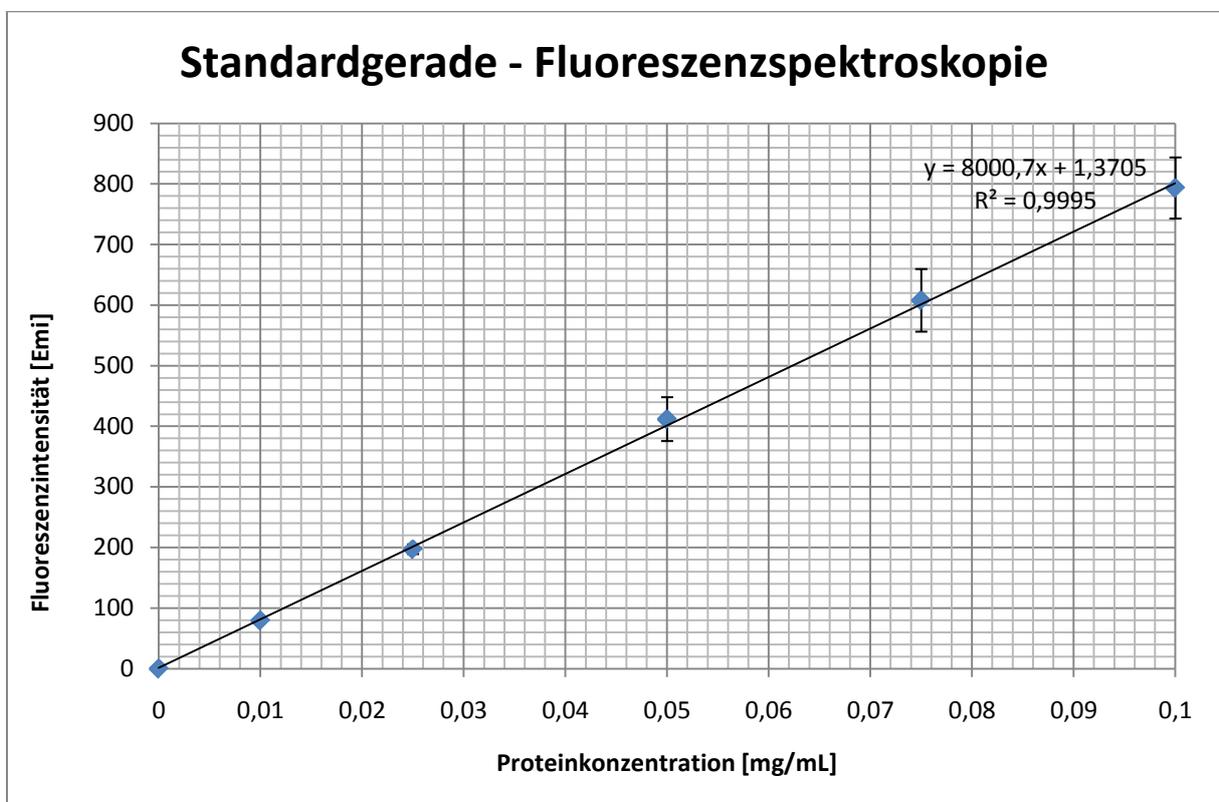


Abbildung 23: Standardgerade der Fluoreszenzanalytik in einem Proteinkonzentrationsbereich von 0 – 0,1 mg/ml

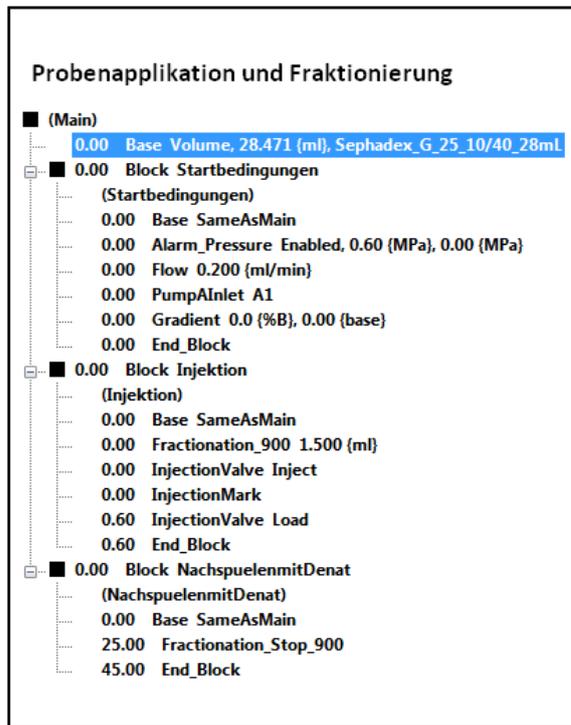
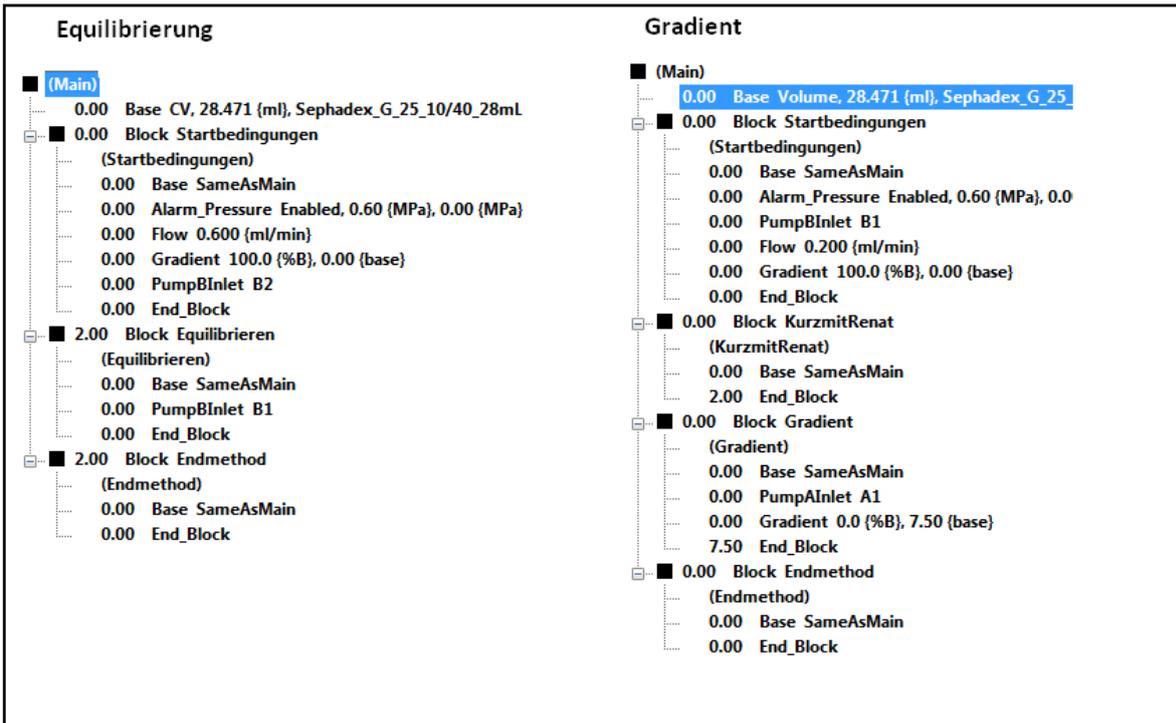


Abbildung 24: Prozessalgorithmen für die Equilibrierung der Säule, das Erstellen des Gradienten und Probenapplikation und Fraktionierung

9 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.

Christian Richelmann

Hamburg, den 28. Februar 2013

10 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Fakultät Life Sciences in Bergedorf für die überaus lehrreiche Zeit bedanken.

Mein besonderer Dank geht im Speziellen an Herrn Prof. Dr. Birger Anspach für seine freundliche und kompetente Unterstützung während der Verfertigung der Bachelorarbeit und während des gesamten Studiums.

Frau Prof Dr. Gesine Cornelissen möchte ich für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit bedanken.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Iris Ziehm, die mich bei Labortätigkeiten stets sehr freundlich und hilfsbereit unterstützt hat.

Ich danke meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für den motivierenden Zuspruch während des gesamten Studiums.