

LIMITIERTE PROTEOLYSE VON  
INTERNER INVERTASE AUS  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III-  
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Peter Fleischmann  
aus Weiden/Opf.  
1991

D 92/ 124

88/WD 50 65 F 596



6552183

Promotionsgesuch eingereicht am: 11.07.1991

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Franz Xaver Schmid

Prüfungsausschuß: Prof. Dr. G. Löffler (Vorsitzender)  
Prof. Dr. F.X. Schmid (Erstgutachter)  
PD Dr. L. Lehle (Zweitgutachter)  
Prof. Dr. R. Jaenicke

<b>1. EINLEITUNG</b>	7
1.1 Proteine	7
1.2 Faltung von Proteinen	8
1.3 Domänen	10
1.4 Limitierte Proteolyse	13
1.5 Invertase	14
1.5.1 Geschichtliche Daten	14
1.5.2 Struktur von Invertase	16
1.5.3 Physikalische Eigenschaften von Invertase	19
1.5.4 Katalytische Reaktionen von Invertase	20
1.6 Problemstellung	22
 <b>2. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	 23
2.1 Materialien und Geräte	23
2.1.1 Geräte	23
2.1.2 Chemikalien und Materialien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Bestimmung der Enzymkonzentration	25
2.2.2 Aktivitätsmessungen	25
2.2.2.1 Aktivitätstest für Invertase	25
2.2.2.2 Aktivitätstest für Trypsin	27
2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	29
2.2.4 Nativgelelektrophorese	31
2.2.5 Transversale Harnstoffgradientengele	32
2.2.6 Gelelektrophorese mit dem Phast-System	34
2.2.7 Färbemethoden	35
2.2.8 Endo-F Behandlung von externer Invertase	37
2.2.9 Anzucht und Aufschluß von E. coli	37
2.2.10 Anzucht der transformierten Hefen	38
2.2.11 Proteolyse und Reinigung	40
2.2.11.1 Limitierte Proteolyse von Invertase	40
2.2.11.2 Reinigung und Konzentrierung der gespaltenen Invertase	42

2.2.12 Charakterisierung der gespaltenen Invertase .....	43
2.2.12.1 Ansequenzierung der Spaltprodukte .....	43
2.2.12.2 Spektroskopische Messungen .....	43
2.2.12.2.1 UV-Messungen .....	43
2.2.12.2.2 Fluoreszenz-Messungen .....	44
2.2.12.2.3 Circular dichroismus .....	44
2.2.12.3 Stabilität .....	45
2.2.12.3.1 Langzeitstabilität bei verschiedenen pH-Werten .....	45
2.2.12.3.2 Stabilität gegenüber irreversibler Hitzdenaturierung .....	45
2.2.12.3.3 Thermische Desaktivierung .....	46
2.2.12.4 Entfaltungsübergänge in GuHCl .....	46
2.2.12.5 De- und Renaturierung in GuHCl .....	47
2.12.6 De- und Renaturierung in Harnstoff .....	49
2.2.13 Kristallisationsversuche mit nativer Invertase .....	49
 <b>3. ERGEBNISSE .....</b>	 <b>53</b>
3.1 Invertaseaktivität in E. coli .....	53
3.2 Überexpression in Hefe und Optimierung der Anzucht .....	54
3.3 Reinigung von interner Invertase .....	60
3.4 Limitierte Proteolyse von interner Invertase .....	71
3.4.1 Proteolyse von interner Invertase durch Trypsin .....	71
3.4.2 Reinigung und Konzentrierung der gespaltenen Invertase .....	78
3.4.3 Charakterisierung der gespaltenen Invertase .....	82
3.4.3.1 Ansequenzierung der Fragmente .....	82
3.4.3.2 Nativgelelektrophorese und Aktivitätsfärbung .....	84
3.4.3.3 Absorption .....	86
3.4.3.4 Fluoreszenz .....	87
3.4.3.5 Circular dichroismus .....	88
3.4.4 Diskussion der Proteolyse- und Charakterisierungs- experimente .....	93
3.4.5 Stabilität .....	93
3.4.5.1 Stabilität bei verschiedenen pH-Werten .....	94

## Inhaltsverzeichnis

---

3.4.5.2 Stabilität gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung .....	96
3.4.5.3 Kinetik der thermischen Desaktivierung .....	97
3.4.5.4 Stabilität gegen Denaturierungsmittel .....	98
3.4.5.4.1 Kinetik der Entfaltung durch GuHCl.....	98
3.4.5.4.2 Desaktivierungs- und Entfaltungsübergänge in GuHCl .....	100
3.4.5.5 Renaturierungsversuche von Invertase und Invertase-T .....	105
3.4.5.5.1 Einfluß der Enzymkonzentration auf die Renaturierungsausbeute .....	105
3.4.5.5.2 Einfluß der Renaturierungsdauer auf die Renaturierungsausbeute .....	106
3.4.5.6 Harnstoffgradientengelelektrophorese .....	108
3.4.5.6.1 Entfaltung in Harnstoffgradientengelen .....	110
3.4.5.6.2 Rückfaltung in Harnstoffgradientengelen .....	112
3.4.5.7 Diskussion der Stabilitäts- und Denaturierungsmitteldaten .....	116
3.5 Kristallisationsversuche mit interner Invertase .....	118
3.6 Limitierte Proteolyse von externer Invertase.....	120
 4. ZUSAMMENFASSUNG.....	 123
 5. ABKÜRZUNGEN .....	 127
 6. LITERATURVERZEICHNIS .....	 128



## 1.EINLEITUNG

### 1.1 Proteine

Proteine sind neben Wasser die wichtigsten Bausteine aller bekannten irdischen Lebensformen. Dies wird auch durch die Bedeutung des griechischen Wortes, *proteios* (erstrangig), aus dem der schwedische Chemiker Jöns Jakob Freiherr von Berzelius (1779-1848) den Begriff Protein ableitete, ersichtlich. Proteine erfüllen im Organismus die unterschiedlichsten Funktionen. Sie dienen zum Beispiel als Biokatalysatoren, kontraktile Elemente und haben Transport-, Stütz-, Schutz- und Abwehrfunktionen. Auf molekularer Ebene findet man eine enorme Artenvielfalt. Es wurde errechnet, daß die Anzahl der verschiedenen Proteinmolekülararten aller lebenden Species ca.  $10^{10}$ - $10^{12}$  beträgt. Alle diese Moleküle bestehen normalerweise aus einem Satz von 20 verschiedenen Aminosäuren, die in unterschiedlicher Reihenfolge und Anzahl über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Die Reihenfolge der Aminosäuren wird auf der genetischen Ebene durch die Sequenz der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin in Form von Triplets, die jeweils für eine Aminosäure codieren, in der DNA gespeichert. Theoretisch könnten  $4^3 = 64$  verschiedene Aminosäuren codiert werden. Drei dieser Triplets werden jedoch für Transkriptionsstops verwendet und die meisten Aminosäuren werden durch verschiedene Codons mehrfach repräsentiert. Diese Information wird in die messenger-RNA transkribiert und anschließend entsprechend dem genetischen Code an den Ribosomen in die jeweilige Aminosäuresequenz translatiert.

Von ausschlaggebender Bedeutung für die Funktion der Proteine ist die dreidimensionale native Konformation. Diese ist durch die Aminosäuresequenz festgelegt. Die Faltung in die native Struktur folgt vermutlich einem hierarchischen Aufbau. Die erste Stufe ist die Aminosäuresequenz, auch Primärstruktur genannt. In der nächsten Organisationsstufe bilden sich Sekundärstrukturen, die sich aus  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern,  $\beta$ -Turns und unregelmäßigen Anordnungen zusammensetzen. Mehrere dieser Elemente können sich wiederum zu Supersekundärstrukturen zusammensetzen. Globuläre Proteine entstehen durch Zusammenlagerung der Sekundärstrukturelemente in einer definierten räumlichen Anordnung. Diese Tertiärstruktur wird durch nicht-

kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenpaarbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und Dipolkräfte stabilisiert. Kovalente Quervernetzungen durch Disulfidbrücken wird vor allem bei sezernierten Proteinen beobachtet. Bei oligomeren Proteinen assoziieren mehrere gefaltete Proteinketten (Untereinheiten) zur nativen Quartärstruktur, wobei an der Stabilisierung intermolekulare Disulfidbrücken beteiligt sein können.

Durch die Faltung erlangt ein Protein das Minimum seiner freien Enthalpie. Die gesamte freie Stabilisierungsenthalpie zwischen nativem und entfaltetem Zustand ( $\Delta G_{D \rightarrow N}^0$ ) ist jedoch gering, sie beträgt in der Regel etwa  $45 \pm 15$  kJ/mol (Jaenicke, 1988).

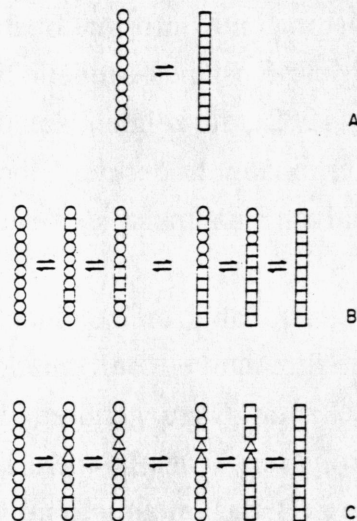
## 1.2 Faltung von Proteinen

Eine wichtige Voraussetzung für die korrekte biologische Funktion eines Proteins ist die Faltung der linearen Polypeptidkette in die dreidimensionale native Konformation, bei der das gefaltete Protein unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch am stabilsten ist. Hierbei ist anzumerken, daß der Begriff Faltung zwei Bedeutungen besitzt; zum einen bezeichnet er den Bildungsprozeß der dreidimensionalen Struktur, zum anderen die räumlichen Anordnung des Polypeptidrückgrates im nativen Zustand (Jaenicke, 1987).

Bereits Anfinsen (1956) konnte in seiner klassischen Arbeit über die Reduktion und Reoxidation von Ribonuklease zeigen, daß die Aminosäuresequenz alle notwendigen Informationen enthält, um die biologisch aktive Konformation eines Proteins zu erhalten. Die Art und Weise, in der die Information der Aminosäurekette die dreidimensionale Struktur codiert, ist dagegen noch unklar. Ein zufälliger Faltungsprozeß kann ausgeschlossen werden, da z.B. die Faltung eines Proteins mit 166 Aminosäureresten und drei Anordnungen pro Aminosäurerest  $10^{79}$  mögliche Konformationen ergeben würde. Diese Zahl liegt in der Größenordnung der Anzahl aller Atome im gesamten Universum (Creighton, 1978). Da der native Zustand oft sehr schnell erreicht wird, muß der Faltungsweg kinetisch kontrolliert sein, so daß ein Großteil der theoretisch möglichen Konformationen überhaupt nicht durchlaufen wird.

Montelione und Scheraga (1989) schlagen prinzipiell drei Faltungswege vor. Im Zwei-Zustands-Modell (Abb. 1 A), das auf kleine globuläre Proteine angewendet werden kann, faltet das Protein, ohne Intermediate zu bilden, vom

vollkommen denaturiertem zum nativen Zustand ( $U \rightarrow N$ ). In diesem Fall sind Wechselwirkungen über kurze (short range interactions) und weite Distanzen (long range interactions) von Beginn an gleichzeitig am Faltungsprozess beteiligt. Dabei bedeuten Wechselwirkungen über kurze Distanzen die Wirkung von direkt benachbarten Aminosäureresten der Polypeptidkette (Rückgrat und/oder Seitenketten) aufeinander. Dabei bilden sich geordnete Strukturen wie  $\alpha$ -Helices und Schleifen. Wechselwirkungen mittlerer und langer Distanz bilden sich erst im nächsten Schritt der Faltung in die native Form aus und bestehen zwischen in der linearen Aminosäurekette nicht nebeneinanderliegenden Resten. Diagramme, in denen die freie Enthalpie gegen die Faltungsreaktion aufgetragen wird, zeigen zwei lokale Minima, jeweils eines für die entfaltete und die native Struktur.



**Abb. 1: Schematische Darstellung verschiedener Arten von Proteinfaltungsmechanismen**

### A: Zwei-Zustands-Modell

### B: Mehr-Zustands-Modell vom G-Typ

### C: Mehr-Zustands-Modell vom R-Typ

Bedeutung der Symbole: (○) lokal ungeordnete; (◻) lokal geordnete; (Δ) lokal geordnete, aber nicht native Strukturen (Aus Montelione & Scheraga, 1989).

Neuere Untersuchungen an drei verschiedenen Proteinen ( $\alpha$ -Laktalbumin, Carboanhydrase, Rinderwachstumshormon) weisen allerdings daraufhin, daß während der Entfaltung durch Denaturierungsmittel Intermediate auftreten, die als "molten globules" bezeichnet wurden. Molten globules besitzen annähernd die kompakte globuläre Struktur des nativen Proteins mit nativ-ähnlichen

Sekundärstrukturen, aber ohne korrekt gefaltete Tertiärstruktur (Kuwait, 1989).

Bei den beiden Mehr-Zustands-Modellen (multi-state folding mechanism) ( $U \rightarrow I_x \rightarrow N$ ) zeigt das oben erwähnte Diagramm mehrere lokale Minima, die teilweise oder unkorrekt gefalteten Intermediaten entsprechen. In einem Modell erfolgt der Faltungsweg über nativähnlich gefaltete lokale Strukturen (G-Typ, growth-type) (Abb. 1 B), im zweiten (R-Typ, rearrangement-type) existieren auch nicht-native lokale Bereiche auf dem Faltungsweg (Abb. 1 C). Beiden Modellen ist gemeinsam, daß hier zunächst Wechselwirkungen über kurze Distanzen aktiv sind, die zur Ausbildung von untereinander unabhängigen lokalen Strukturen führen. Diese finden sich im weiteren Verlauf der Faltung der Proteinkette unter dem Einfluß von Wechselwirkungen über lange Distanzen zur nativen dreidimensionalen Konformation des gesamten Proteins zusammen. Evidenzen für die Mehr-Zustands-Modelle lieferten die Untersuchungen von Kim und Baldwin (1982), die zeigten, daß die Helix des isolierten S-Peptides, d. h. des aminoterminalen Endes der Ribonuklease A, mit der Helix der intakten Form des nativen Enzyms in der entsprechenden Region übereinstimmt.

Obwohl es sehr wahrscheinlich ist, daß Proteine ohne fremde Hilfe und in biologisch akzeptablen Zeiten in ihre native Konformation falten, sind dennoch einige "Faltungshelfer" bekannt. Dazu gehören die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), die Peptidyl-Prolyl Cis-Trans-Isomerase (PPIase); die Familie der Hitzeschock-Proteine wie z. B. das Immunglobuline heavy-chain binding protein (BiP), GroEL und GroES, Rubisco subunit binding protein und hsp 60, die auch unter dem Begriff "molecular chaperones" zusammengefaßt werden. Ihre Aufgabe besteht möglicherweise darin, einige geschwindigkeitsbestimmende Schritte zu beschleunigen, Aggregationen zu vermeiden und inkorrekte Faltung zu verhindern bzw. rückgängig zu machen (Fischer & Schmid, 1990).

### 1.3 Domänen

Eine weitere wichtige Unterstruktur von Proteinmolekülen sind Domänen. Dabei handelt es sich um kompakte Unterstrukturen von Proteinmolekülen, bestehend aus Sekundär- und Supersekundärstrukturelementen. Die treibende

Kraft für diese Zusammenlagerung ist möglicherweise der Ausschluß von Wassermolekülen bzw. die Bildung eines hydrophoben Kerns. Die Größe von Domänen schwankt sehr stark. Die untere Grenze dürfte bei einem Molekulargewicht von 4000-6000 Da liegen, entsprechend 30-50 Aminosäureresten, eine obere Grenze existiert a priori nicht. Die genauen Definitionen für Domänen variieren sehr stark, abhängig von den jeweiligen Untersuchungsmethoden. Es können prinzipiell vier Domänendefinitionen unterschieden werden: Faltungsdomänen, strukturelle, genetische und funktionelle Domänen, wobei Überschneidungen sehr wahrscheinlich sind.

Faltungsdomänen sind Strukturen, die sich unabhängig voneinander während der Entwicklung der nativen Struktur bilden. In einem hypothetischem Modell falten sich diese Domänen unter dem Einfluß von Wechselwirkungen kurzer und mittlerer Distanz in die native Form und assoziieren dann durch Wechselwirkungen langer Distanz zum nativen Protein (Tanaka & Scheraga, 1975).

Strukturelle Domänen sind Bereiche der Polypeptidkette, die in einem kompaktem Volumen eingeschlossen sind und ein minimales Verhältnis von Oberfläche zu Volumen besitzen (Wetlaufer, 1973; Lee & Richards, 1971). Die Identifizierung solcher Domänen ist durch visuelle Inspektion von kristallographischen Modellen möglich. Diese Methode ist allerdings sehr subjektiv. Eine objektivere Möglichkeit der Domänenidentifikation bietet die Verwendung von Distanzkarten. Dabei handelt es sich um eine zweidimensionale Beschreibung der aus kristallographischen Studien bekannten dreidimensionalen Struktur eines Proteins. In einer Matrix werden die Nummern der Aminosäurereste horizontal und vertikal aufgetragen. Gleiche Abstände zwischen zwei  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen der Aminosäurekette werden mit den gleichen Symbolen in die Matrix eingetragen. Zur Vereinfachung können Konturlinien gezeichnet werden, die einem konstanten Abstand der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome entlang dieser Linie entsprechen. Diese Art der Auftragungen werden als Konturkarten bezeichnet (Abb. 2). Strukturelle Domänen erscheinen in dieser Art der Auftragung als eine Serie von kurzen Distanzen zwischen den C- $\alpha$ -Atomen in dreieckigen Regionen nahe der Diagonalen, voneinander getrennt durch Gebiete außerhalb der Diagonalen, in denen nur wenige kurze Abstände existieren (Janin & Wodak, 1983).

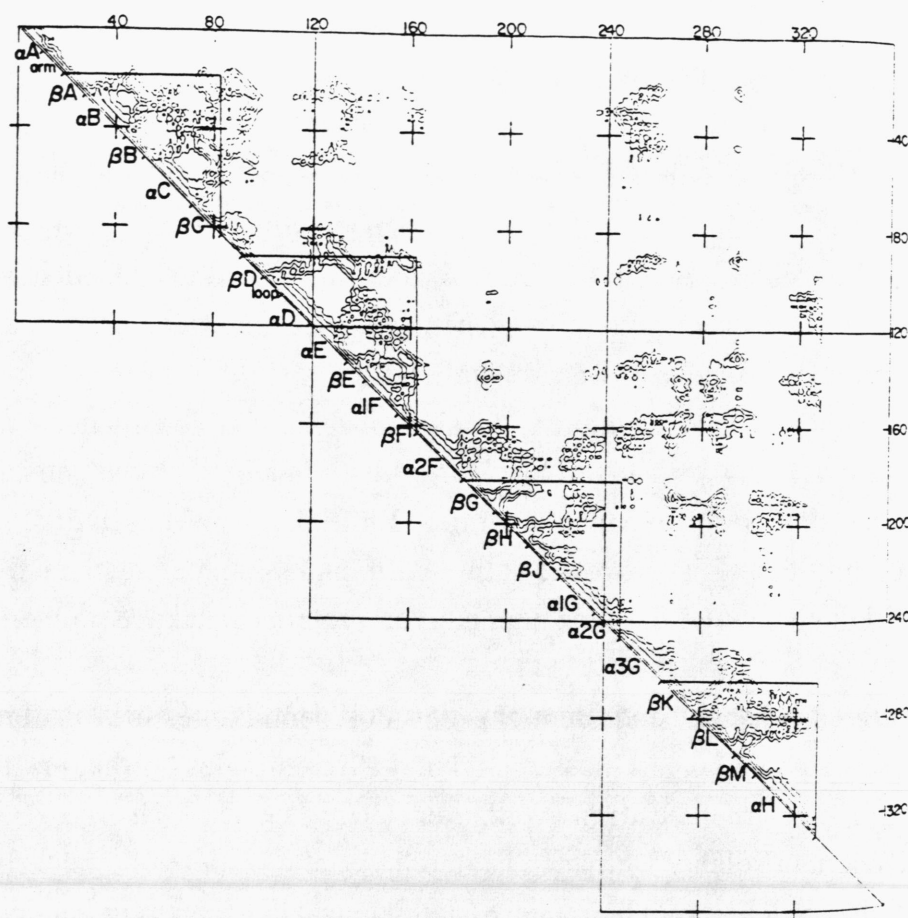


Abb. 2: Distanzkarte für Laktatdehydrogenase. Es wurden Konturlinien für die Abstände 0, 2, 4, 8, ..., 16 Å zwischen den  $C_{\alpha}$ -Atomen gezeichnet (Aus Rossman & Liljas, 1974).

Die dritte Definition steht in Zusammenhang mit der Entdeckung von Introns und Exons in Genen von Eukaryonten sowie dem Vorkommen von homologen Domänen in scheinbar nicht verwandten Proteinen. Nach dieser Definition entsprechen Domänen den Genprodukten von Exons. Proteine sind demnach aus Domänen durch Mischen und Schneiden von Exons (exon shuffling and splicing) entstanden, die im Verlauf der Evolution aus verschiedenen und oft nicht miteinander in Beziehung stehenden Quellen des Genpools stammen (Neurath, 1985).

Eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis von weitreichenden Wechselwirkungen und Faltungsprozessen ist die Vorhersage von Domänen in

Proteinen, ausgehend von der Aminosäuresequenz. Eine Möglichkeit dafür ist die Verwendung von Durchschnittswertdistanzkarten (average distance map, ADM). Diese erhält man, indem man die mittleren Abstände der Reste einer Aminosäurekette in eine Distanzkarte einträgt. Die mittleren Abstände erhält man aus Vergleichen von beobachteten Distanzen zwischen Aminosäurepaaren von verschiedenen Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur. Die ADM wird entlang der horizontalen und vertikalen Achse unter Verwendung eines bestimmten Algorithmus vermessen. Bei einem Wechsel in der Dichte der Kontakte erhält man ein Minimum und ein Maximum auf dieser Auftragung. Das Auftreten eines Minimums und eines Maximums im horizontalen sowie umgekehrt eines Maximums und eines Minimums im vertikalen Plot weisen auf das Auftreten einer kompakten Region hin. Mit Hilfe dieser Methode konnten durch Vergleiche von Scans, die aus Realdistanzkarten (real distance map, RDM) von Proteinen mit bekannter 3-D-Struktur gewonnen wurden, und ADM-Scans dieser Proteine gute Übereinstimmungen erzielt werden (Kikuchi et al., 1988).

Von funktionellen Domänen spricht man, wenn diese Strukturen auch nach der Trennung vom Gesamtprotein noch ihre ursprüngliche Aktivität zeigen (siehe auch folgendes Kapitel).

#### 1.4 Limitierte Proteolyse

Der Begriff limitierte Proteolyse bezeichnet die spezifische Spaltung von einer bis wenigen Peptidbindungen innerhalb eines Proteinmoleküls. Die limitierte Proteolyse spielt in vielen biologischen Prozessen eine fundamentale Rolle, z. B. bei der Blutgerinnungskaskade, der Zymogenaktivierung, der post-translationalen Prozessierung und dem Transport von Proteinen durch Membranen.

In experimentellen Techniken wird die limitierte Proteolyse häufig verwendet, um strukturelle und funktionelle Domänen aus Proteinen zu isolieren und deren Eigenschaften selektiv zu untersuchen. Ein klassisches Beispiel für die Isolierung von funktionellen Domänen ist die proteolytische Hydrolyse der DNA-Polymerase I (pol I) durch Subtilisin in ein großes Fragment (Klenow-Fragment), das in den beiden ungepaarten Einzelsträngen von doppelsträngiger DNA die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität katalysiert, und ein kleineres

Fragment, das nur 5'-3'-Aktivität besitzt. Diese beiden Fragmente sind im nativen Enzym kovalent miteinander verbunden (Klenow & Henningens, 1970; Ollis et al., 1985).

Eine weitere Möglichkeit ist die Erzeugung von sogenannten "nicked enzymes". Dabei handelt es sich um Proteine, deren durch limitierte Proteolyse erzeugten Fragmente in einem relativ stabilen und oftmals auch enzymatisch aktivem Komplex assoziiert bleiben. Ein Beispiel hierfür ist die Ribonuklease A, die durch Subtilisin an einer einzigen Peptidbindung ( $\text{Ala}_{20}\text{-Ser}_{21}$ ) hydrolysiert wird und dennoch funktionsfähig bleibt, solange die Fragmente assoziiert sind (Neurath, 1980).

Die Fähigkeit zur Proteolyse einer Peptidbindung hängt von der Spezifität des Enzyms und der Struktur des Substrates ab. Im Idealfall sollte die Konformation des Substrates komplementär zum aktiven Zentrum des proteolytischen Enzyms im Übergangszustand des Komplexes sein. Vermutlich sind die unstrukturierten Verbindungsstellen zwischen einzelnen Domänen exponierter zum Lösungsmittel und damit proteolytischen Angriffen leichter zugänglich, wogegen die meisten Peptidbindungen innerhalb einer Domäne durch hydrophobe Wechselwirkungen unter Ausschluß von Wassermolekülen oder durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert sind. Die "Schleifen" und "Umkehrpunkte" (loops and turns) zwischen den Domänen dagegen können sich leichter in das aktive Zentrum einer Protease einpassen und dadurch die Hydrolyse der kovalenten Peptidbindungen ermöglichen (Fontana, 1989).

## 1.5 Invertase

### 1.5.1 Geschichtliche Daten

Invertase (E.C. 3.2.1.26;  $\beta$ -D-Fruktofuranosid-Fruktohydrolase;  $\beta$ -Fruktofuranosidase; Saccharase; Sucrase; Invertin) wurde unbewußt schon vor einigen tausend Jahren bei der Weinherstellung eingesetzt. Heutzutage wird sie von der Lebensmittelindustrie verwendet (Büntemeyer et al., 1989), z.B. vielen Süßwaren wie Marzipan zugesetzt, um die Löslichkeit von Saccharose zu erhöhen.

Bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde festgestellt, daß sich Rohrzucker nach Behandlung mit Bierhefe nicht mehr kristallisieren läßt und

die Drehrichtung von Licht umgekehrt wird. Aus letzterer Beobachtung entstand der Name Invertzucker (Zitiert aus Berthelot, 1860):

"1. Parmi les altérations que le sucre de canne éprouve sous l'influence de la levûre de bière, l'une des plus remarquables est sa métamorphose en sucre inverti. En effet, les recherches de M. Dubrunfaut nous ont appris, il y a trente ans, que le sucre de canne, traité par la levûre, se change tout d'abord en un sucre incristallisable; et celles de M. Persoz ont montré que le pouvoir rotatoire de ce sucre présente un signe contraire à celui du sucre primitif. De là le nom de sucre *inverti*."

Der "wissenschaftliche Durchbruch" der Invertase erfolgte durch die Arbeit von Berthelot (1860), dem es gelang, sie durch Alkoholfällung in Form von "weißen Flocken" zu isolieren. O'Sullivan und Thompson (1890) präparierten die Invertase aus "yeast liquor", einem Hefepreßsaft. Sie stellten unter anderem fest, daß sich die Aktivität von Invertase bei einer Temperaturerhöhung um 10°C verdoppelt. Weiterhin fanden sie, daß Invertase bei 65°C langsam, bei 75°C sofort "zerstört" wird. Einen genaueren Wert für diese Tötungstemperatur gaben Euler und Kullberg (1911 a) an. Sie definierten sie als die Temperatur, bei der nach dreißigminütiger Inkubation noch 50% der Invertaseaktivität vorhanden war und erhielten hierfür einen Wert von 63°C. Invertase spielte auch eine wichtige Rolle bei Sörensens (1909) Arbeit über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration sowie der Abhängigkeit der Aktivität von Enzymen vom pH-Wert.

Die Untersuchungen zur Aufklärung der Eigenschaften und der chemischen Natur der Invertase gestalteten sich schwierig, da sie nicht in reiner Form angereichert werden konnte. Es wurden immer wieder Verunreinigungen durch Kohlenhydrate festgestellt (O'Sullivan & Thompson, 1890; Osborne, 1899). Salkowski (1901) bezeichnete diese Verunreinigungen als "Hefegummi" und bewies, daß es sich dabei um Kohlenhydrate handelte. Weitere Untersuchungen ergaben, daß es sich bei diesem Gummi um einen reduzierenden Zucker, nämlich Mannose, handelt, der sich nicht vom Protein trennen läßt. Die Einheit aus Gummi und Protein wurde als Zymogen bezeichnet, wobei der aktive Teil aus dem "Proteinferment" bestand (Mathews & Glenn, 1911). Nicht nur die Verunreinigung mit diesem Hefegummi bereitete Schwierigkeiten bei der Untersuchung der Invertase, sondern auch Verunreinigungen mit

anderen Enzymen wie z.B.  $\alpha$ -D-,  $\beta$ -D-Galaktosidase und  $\beta$ -D-Mannosidase (Adams et al., 1943). Auch das Molekulargewicht konnte lange Zeit nicht bestimmt werden. Die Angaben streuten über weite Bereiche. So gaben O'Sullivan und Thompson (1890) ein Molekulargewicht von 1886 Da an, während Euler und Kullberg (1911) aufgrund der Diffusionsgeschwindigkeit das "ungewöhnlich hohe Molekulargewicht von 27000" berechneten. Auch heute wird die Invertase als Untersuchungsobjekt in den verschiedensten Gebieten verwendet, wie z. B. zu Untersuchungen im Bereich der Funktion von Signalpeptiden und deren Einfluß auf die Sekretion von Proteinen (Perlman et al., 1986), die Bedeutung der Glykosilierung für die Sekretion und enzymatische Aktivität (Bergh et al., 1987), Stabilität (Schülke & Schmid, 1988 a), sowie die Renaturierung (Schülke & Schmid, 1988 b).

### 1.5.2 Struktur von Invertase

*Saccaromyces cerevisiae*, die ein  $\text{Suc}^+$ -Gen (sucrose fermentation) enthält, bildet zwei Formen von Saccharose-spaltender Invertase aus, eine glykosilierte und eine unglykosilierte Form (Carlson & Botstein, 1982). Die glykosilierte Form ist im periplasmatischen Raum lokalisiert und wird externe Invertase genannt. Ihre Bildung wird durch Katabolitenrepression kontrolliert, wobei Hexosen die wichtigsten Umsatzprodukte sind. Die unglykosilierte Form kommt in einem relativ konstantem Anteil innerhalb der Zelle vor und heißt deshalb interne Invertase. Sie wird nicht durch Hexosen reprimiert. Perlman und Halvorson (1981) sowie Carlson und Botstein (1982) zeigten, daß beide Formen vom selben Gen codiert werden. Damit wurde die zunächst vertretene Meinung widerlegt, daß die beiden Formen aufgrund festgestellter Unterschiede in den Eigenschaften und der Aminosäurezusammensetzung sowie des extrem hohen Anteils von externer und des niedrigen Anteils von interner Invertase von verschiedenen Genen stammen. Die Suc-Gene sind in die  $\text{Suc1-Suc5}$  und das  $\text{Suc7-Gen}$  aufgeteilt (Carlson & Botstein, 1983). Das  $\text{Suc-2 Gen}$  wurde kloniert und die Sequenz analysiert (Taussig & Carlson, 1983). Es trägt die Information für zwei m-RNA's der Größe 1.8 bzw. 1.9 kB, die sich am 5'-Ende unterscheiden und von zwei verschiedenen Promotoren aus translatiert werden. Die Nukleotidsequenzanalyse an dieser Stelle zeigt, daß die 1.9 kB-Sequenz zusätzlich ein Signalpeptid codiert, das 19 Aminosäuren enthält



(Abbildung 3). Dieses dient dazu, das Protein cotranslational in das endoplasmatische Retikulum zu transportieren. Dort erfolgt die primäre Glykosilierung, die durch Anknüpfung der "outer-chain" Mannosereste in der Golgimembran weitergeführt wird. Während der Membranpassage wird das Signalpeptid, katalysiert durch eine Signalpeptidase, abgespalten (Carlson et al, 1983; Perlman et al, 1982). Es entsteht eine Kette, die am N-Terminus um eine Aminosäure (Ser) länger ist als die entsprechende Kette der internen Invertase, ansonsten aber die gleiche Aminosäuresequenz aufweist. Die für das Signalpeptid codierende Sequenz fehlt bei der 1.8 kb-m-RNA, so daß das Translationsprodukt, anders als die externe Invertase, nicht sezerniert wird, sondern als interne Invertase im Cytoplasma der Zelle lokalisiert ist.

Die beiden Formen der Invertase, die vom SUC-2-Gen produziert werden, wurden bereits gereinigt und charakterisiert. Das Molekulargewicht einer Proteinkette beträgt bei der externen Invertase mit 513 Aminosäuren 58567 Da, bei der internen mit 512 Aminosäuren 58480 Da (Taussig & Carlson, 1983). Das externe Enzym enthält etwa 50% Glykoanteil (Mannose plus 3% Glukosamin). Die Aminosäuresequenz von externer Invertase zeigt, daß 14 theoretische Anknüpfungsstellen für Oligosaccharide (Asn-X-Thr/Ser) existieren. Trimble & Maley (1977) stellten fest, daß eine Kette im Durchschnitt neun Oligosaccharidketten enthält, die aus einem di-N-Azetylchitobiosyl-Core und 26-54 Mannoseresten bestehen. Spätere Untersuchungen zeigten, daß acht dieser 14 Anknüpfungsstellen vollständig glykosiliert sind, fünf weitere zu weniger als 50%. Bei einer überlappenden Sequenz (Asn<sup>92</sup>-Asn<sup>93</sup>-Thr<sup>94</sup>-Ser<sup>95</sup>) ist nur das erste Asparagin mit einem Oligosaccharid verknüpft (Reddy et al., 1988). Daraus ergibt sich für die dimere externe Form ein Molekulargewicht von etwa 270.000 Da. Die Abspaltung von Oligosacchariden beeinflußt die Aktivität von externer Invertase nicht (Chu et al., 1978, Ziegler et al., 1988).

Neuere Untersuchungen zeigten, daß externe Invertase nicht, wie früher angenommen, in dimerer Form (Trimble & Maley, 1977), sondern auch als Oktamer vorliegt (Chu & Maley, 1981). Auch enzymatisch aktive hexa-, tetra- und dimere Formen wurden nachgewiesen (Chu et al., 1983). Das Oktamer wird im ER gebildet, wobei die Glykosilierung die Oligomerisierung erleichtert. Wahrscheinlich spielt dieser Komplex eine Rolle beim Zurückhalten der

Invertase im periplasmatischen Raum. Die Dissoziation des Oktamers hat keinen Einfluß auf die kinetischen Parameter des Enzyms;  $K_M$  und  $V_{max}$  ändern sich nicht. Größere stabile Komplexe als Oktamere wurden nicht gefunden (Esmon et al., 1987).

Interne Invertase bildet stabile Dimere. Höhere Assoziate einzelner Dimere sind erheblich instabiler als bei der glykosilierten Form. In sehr konzentrierten Lösungen gibt es Evidenzen für die Bildung oligomerer Strukturen (bis zur oktameren Form). Auch die Zugabe von Chloridionen scheint die Bildung der Oktameren zu begünstigen (Reddy et al., 1990). Diese Fakten deuteten darauf hin, daß die Glykosilierung die Stabilität von Oligomeren erhöht (Tammi et al., 1987). Neuere Untersuchungen dagegen zeigen, daß beide Formen im wesentlichen identische Stabilitätseigenschaften in Bezug auf Denaturierung durch Guanidiniumhydrochlorid oder Temperatur besitzen (Schülke & Schmid, 1988 a). Die Glykosilierung scheint aber einen großen Einfluß auf die Löslichkeit beider Formen zu haben. Es konnte gezeigt werden, daß interne Invertase schneller aggregiert als die glykosilierte Form (Schülke & Schmid, 1988 b). Auch die Stabilität gegen Proteasen scheint durch die Glykosilierung erhöht zu sein (Brown et al., 1979). Die Raumstruktur von Invertase ist noch nicht aufgeklärt, da es bisher nicht gelang, Kristalle für eine Röntgenstrukturanalyse herzustellen.

### 1.5.3 Physikalische Eigenschaften von Invertase

Beide Formen der Invertase zeigen ein annähernd gleiches Verhalten in der Aktivität bei verschiedenen pH-Werten. Externe Invertase weist ein Aktivitätsmaximum zwischen pH 4,5 und 5,0 auf; das Optimum der internen Form liegt bei pH 5,0 (N. Schülke, 1988). Die thermische Stabilität der beiden Invertaseformen ist identisch: Beide Formen sind bei einer Temperatur von 64°C noch zu 50% aktiv. Die thermische Denaturierung ist irreversibel. Gegenüber Denaturierung durch GuHCl scheint die externe Invertase geringfügig stabiler zu sein. Kommerzielle externe Invertase wird durch 1,7 M GuHCl zu 50% inaktiviert; für interne Invertase liegt der entsprechende Wert bei 1,6 M GuHCl. Der isoelektrische Punkt interner Invertase liegt bei pH 4,5, der von externer bei pH 3,5.

### 1.5.4 Katalytische Reaktionen von Invertase

Invertase katalysiert die Spaltung von Saccharose und chemisch verwandter Verbindungen. Dazu muß das Substrat einen terminalen, unsubstituierten  $\beta$ -D-Fruktofuransylrest besitzen. Moleküle wie  $\alpha$ -Fruktofuranoside und Fruktopyranoside werden nicht angegriffen. Eine Substitution am  $\beta$ -Fruktofuransylrest verhindert die Hydrolyse ebenfalls.

Die Natur des "nicht-Fruktose"-Restes hat einen vergleichsweise geringen Einfluß auf die Enzymaktivität. Die  $\beta$ -Fruktofuranoside einfacher Alkohole werden gespalten. Eine Substitution des Glukoseanteils von Saccharose durch andere Zucker verhindert die Spaltung nicht. Auch Raffinose sowie Raffinose-derivate sind mögliche Substrate für Invertase; jedoch sinkt die Hydrolyserate mit steigendem Anteil von Galaktoseresten. Koshland und Stein (1954) zeigten in Experimenten mit schwerem Wasser ( $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ), daß hierbei die glykosydische Bindung auf der Seite des Fruktoserestes gespalten wird. Dies erklärt den Erhalt der Konfiguration des anomeren Kohlenstoffatoms des Glukoserestes. Bei der Spaltung von Saccharose in Glukose und Fruktose wird die Drehrichtung linear polarisierten Lichtes umgekehrt. Daher bezeichnet man das durch die Spaltung von Invertase entstandene Gemisch aus Fruktose und Glukose als Invertzucker.

In geringem Maß (bis maximal 10%) katalysiert Invertase den Transfer von  $\beta$ -Fruktofuransoseresten von verschiedenen Substraten (z.B. Saccharose, Raffinose, Methyl- $\beta$ -Fruktofuranoside) auf bestimmte Akzeptoren (Kosubstrate) (Bacon und Edelman, 1950; Blanchard und Albon, 1950). Als Akzeptormoleküle kommen vermutlich nur primäre Alkoholgruppen in einfachen Alkoholen, Zuckern etc. in Frage. Es kann ausgeschlossen werden, daß dieser Transfer durch Verunreinigung mit anderen Enzymen verursacht wird, da auch hochreine Invertase-Präparationen dieses Verhalten zeigen (Fischer et al., 1951; Weidenhagen et al., 1957). Mehrere Transfer-Produkte wurden bereits isoliert. In Gegenwart von Methanol wird Methyl- $\beta$ -Fruktofuranoose gebildet; ist Ethanol als Rezeptor vorhanden, entsteht Ethyl- $\beta$ -Fruktofuranoose. Weitere Beispiele für Transferreaktionen sind die Bildung von 6- $\beta$ -Fruktofuransylglukose, wenn Glukose als Kosubstrat vorliegt; bei Saccharose als Kosubstrat können drei verschiedene Produkte entstehen (Albon et al., 1953; Gross et al., 1954). Die Bildung von Polysacchariden wurde nicht beobachtet.

Die Spezifität von Hefe-Invertase zeigt, daß ein unsubstituierter  $\beta$ -D-Fruktofuranoserest im Substrat für die Katalyse notwendig ist. Daraus wurde gefolgert, daß für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes die Wechselwirkung zwischen den Hydroxyl-Gruppen des Fruktofuranoserestes und passenden hydrophilen Gruppen über Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum verantwortlich sind (Gottschalk, 1950). Reddy und Maley (1990) inaktivierten deglykosilierte Invertase irreversibel durch CBE (condurititol B epoxide), ein Reagenz, das kovalent im aktiven Zentrum bindet. Durch Sequenzanalysen und gerichtete Mutagenese konnte gezeigt werden, daß Aspartat<sup>23</sup> essentiell für die Aktivität verantwortlich ist. Es gibt auch Hinweise auf eine Beteiligung von Histidin und Tryptophan am katalytischen Prozess.

Für die Hydrolyse und den Transfer wird von vielen Autoren eine zweistufige Reaktion vorgeschlagen, wie sie im folgenden Schema gezeigt wird:

(1) Fruktosyl-O-Glukose + Enzym-OH  $\rightarrow$  Fruktosyl-O-Enzym + Glukose

(2a) Fruktosyl-O-Enzym + H<sub>2</sub>O  $\rightarrow$  Fruktose + Enzym-OH (Hydrolyse)

(2b) Fruktosyl-O-Enzym + R-OH  $\rightarrow$  Fruktosyl-O-R + Enzym-OH (Transfer)

Abbildung 4 zeigt den möglichen Mechanismus der von Invertase katalysierten Reaktion.

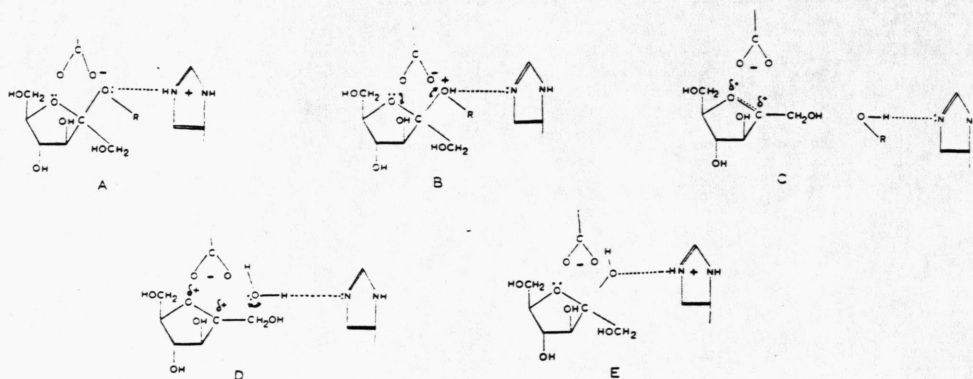


Abb. 4: Möglicher Katalysemechanismus von Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Aus Waheed & Shall, 1971).

### 1.6 Problemstellung

Die limitierte Proteolyse ist eine häufig angewandte Methode zur selektiven Untersuchung von strukturellen oder funktionellen Domänen in Proteinen. Da externe Invertase aufgrund ihres heterogenen Glykoanteils zu Untersuchungen dieser Art nur bedingt geeignet ist, wurde die kohlenhydratfreie Form ausgewählt. Auch für Kristallisierungsversuche ist ein homogenes Protein nötig. Interne Invertase kommt in *Saccharomyces cerevisiae* allerdings nur in geringen Mengen vor. Daher gliedert sich diese Arbeit in folgende Aufgabenstellungen:

- a) Test eines Expressionssystems auf geeignete Anzuchtbedingungen für maximale Invertaseproduktion
- b) Isolierung und Reinigung von interner Invertase
- c) Suche nach geeigneten Bedingungen zur limitierten Proteolyse von interner Invertase mit möglichst wenigen Spaltprodukten
- d) Reinigung der teilweise gespaltenen Invertase
- e) Charakterisierung der enzymatischen Funktion der teilweise gespaltenen internen Invertase sowie deren Stabilität in Vergleich zur intakten Form
- f) Aufsuchen von Versuchsbedingungen, worin sich aktive Fragmente selektieren lassen
- g) Versuch der Kristallisation von interner Invertase

## 2. MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Geräte

Branson	Sonifier Cell Disruptor B 15, Temperatur Controller TM 2
Desaga	Quick Scan Densitometer
Du Pont Instruments	Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge
Eppendorf	Tischzentrifuge Zentrifuge 5415 Reaktionsgefäße (Eppendorf-Cups)
Heraeus-Christ	Tischzentrifuge UJ2
Haake	Einhängethermostat Haake F8
Hellma	Küvetten
Jasco	J-500 Spectropolarimeter mit angeschllossenem DP-500N Data Processor
Knick	pH-Meter
LKB	Spannungsquelle 2301 Macrodrive 1
LKB-Bromma	HPLC-Anlage
Memmert	Trockenschrank
Merck-Hitachi	F 1000 Fluorescence Spectrophotometer
MM	Sterilisator
Mobicol	zentrifugierbare Säulen mit Fritte
Nunc	Nunclon Microtiterplatten
Pharmacia	Phast-System FPLC-Anlage
Perkin-Elmer	Lambda 5 UV/VIS Spektrophotometer LS-5B Luminescence Spectrometer + R 100A Recorder
Philips	PU 8720 UV/VIS Scanning Photometer
SLM Aminco®	French® Pressure Cell Press
SLT Labinstruments	Easy Reader EAR 340 AT Mikroplattenphotometer

---

Spectra-Physics	SP4290 Integrator
Univapo	150H Speedvac
Werkstatt Uni Rgbg	Gelapparaturen
	Mikrodialyseapparatur
WTW	Leitfähigkeitsmessgerät pH 522

### 2.1.2 Chemikalien und Materialien

Boehringer	Endoglycosidase F/N-Glycosidase F Testkombination zur Glukosebestimmung (GOD-Perid-Methode) Tris, p.A.
Roth	DTE
Serva	Acrylamid Ethylesterhydrochlorid N,N-Methylenbisacrylamid N- $\alpha$ -Benzoyl-L-Argininethylesterhydrochlorid SDS Serva-Blue R-250
Sigma	Ammoniumpersulfat GuHCl ultrapur Histidin Tris ultrapur Trypsin Type XIII Uracil
Difco	Agar Agar Bacto Peptone Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids Yeast Extract
Merck	alle übrigen Chemikalien vom Reinheitsgrad p.A.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Bestimmung der Enzymkonzentration

Die Enzymkonzentrationen für beide Spezies der Invertase (im Falle der glykosilierten Form bezogen auf den Proteinanteil) wurden absorptionsspektroskopisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient hat einen Wert von 2.25 cm<sup>2</sup>/mg bei einer 0.1%igen Enzymlösung (Trimble & Maley, 1977). Die molaren Konzentrationen beziehen sich immer auf das Molekulargewicht der Untereinheiten. Dafür wurden folgende Molekulargewichte verwendet (Taussig & Carlson, 1983):

Interne Invertase:  $M_r = 58480$

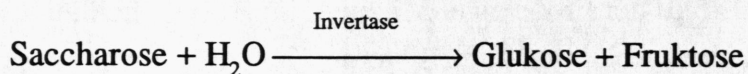
Externe Invertase:  $M_r = 58567$

### 2.2.2 Aktivitätsmessungen

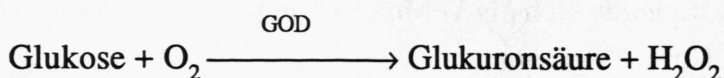
#### 2.2.2.1 Aktivitätstest für Invertase

Die Aktivität der Invertase wurde durch einen zweistufigen Test nach der Methode von Goldstein und Lampen (1975) bestimmt. Er beruht auf folgendem Prinzip:

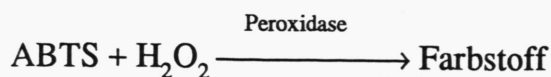
Im ersten Schritt erfolgt die durch Invertase katalysierte hydrolytische Spaltung von Saccharose zu Glukose und Fruktose:



Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird der Test gestoppt und die Invertase inaktiviert. Im zweiten Schritt erfolgt der quantitative Nachweis der gebildeten freien Glukose. Dabei wird die Glukose durch das Enzym Glukoseoxidase zu Glukuronsäure oxidiert:



Das dabei entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert in einem weiteren Schritt, katalysiert durch eine Peroxidase, die synthetische Verbindung ABTS, wobei ein grüner Farbstoff entsteht:



Die Menge dieses Farbstoffes kann durch Messung der Absorption bei 405 nm quantitativ bestimmt werden. Mit Hilfe einer Eichgerade ergibt sich daraus die Glukosemenge. Die Aktivität der Invertase läßt sich anhand der Formeln (1) bzw. (2) berechnen (s.u.).

#### *Durchführung:*

Die Proben werden in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 auf eine Invertasekonzentration von 15 µg/ml gebracht. Davon werden 20 µl entnommen und zu 980 µl Saccharoselösung (Endkonzentration im Test: 35mg/ml in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0) pipettiert und eine Minute bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Bei anderen Enzymkonzentrationen kann das eingesetzte Volumen bzw. die Inkubationszeit entsprechend variiert werden. Die Reaktion wird durch Zugabe von 125 µl 1 M Tris, pH 8.8 gestoppt. Dadurch wird der pH-Wert der Lösung auf über pH 7.5 angehoben, wodurch die Aktivität der Invertase auf maximal 10% abgesenkt wird. Zusätzlich wirkt Tris stark inhibierend auf Invertase (Myrbäck, 1965), so daß die Reaktion mit der noch im Ansatz vorhandenen Saccharose fast vollständig unterbunden wird. Im nächsten Schritt wird die Invertase durch einen Hitzeschritt quantitativ und irreversibel deaktiviert. Dazu werden 125 µl der Probe zwei Minuten im 100°C heißen Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis werden 20 µl Proben zu 380 µl GOD-Lösung in Mikrotiterplatten gegeben. Zur Bestimmung des Standards werden ebenfalls 20 µl Glukoselösung (käufliche Glukoselösung, 0.091 mg/ml; 1/2.5 verdünnt mit 0.1 M Kaliumphosphat + 0.1 M Tris/HCl, pH 7.0) zu GOD-Lösung gegeben. GOD ist ein käufliches Testgemisch, von dem 10 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphat + 0.1 M Tris/HCl pH 7.0 gelöst werden. In der GOD-Lösung befinden sich als Verunreinigung noch Spuren von Invertaseaktivität, die während der quantitativen Glukosebestimmung dazu führen, daß noch vorhandene Saccharose gespalten wird und die Probe-lösung dadurch weiterreagiert. Um diese Testverfälschung zu verhindern, wurde dem Phosphatpuffer 0.1 M Tris zugesetzt, welches diese Nebenreaktion nahezu vollständig unterbindet. Nach 15 minütiger Inkubationszeit bei 37°C

werden die Proben photometrisch im Easy Reader Mikrotiterplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen. Die bei der Hydrolyse der Saccharose entstandene Glukosemenge wird durch einen Vergleich mit dem Glukosestandard bestimmt und daraus die Aktivität der eingesetzten Invertase errechnet. Die relative bzw. spezifische Aktivität läßt sich anhand der Absorption der Proben nach folgenden Formeln bestimmen:

(1) relative Aktivität (U/ml):  $(A_{405}^P * 0.225) / (A_{405}^{St} * V * t)$

(2) spezifische Aktivität (U/mg): relative Aktivität \*  $(2.25 \text{ cm}^2/\text{mg} / A_{280}^P)$

Dabei bedeuten:

$A_{405}^P$  = Absorption der Probe im Aktivitätstest bei 405 nm;

$A_{405}^{St}$  = Absorption des Glukosestandards bei 405 nm;

$A_{280}^P$  = Absorption der Probe vor dem Aktivitätstest bei 280 nm;

V = eingesetztes Probenvolumen im Aktivitätstest in ml;

t = Inkubationszeit in Minuten;

Der Faktor 0.225 in Formel (1) ergibt sich aus der Umrechnung des Glukosestandards wie folgt:

a) 20 µl Glukosestandard = 4.04 µMol Glukose = 1/250 Unit (1 Unit = 1mmol Substratumsatz);

b) Verdünnung der Probe: 1.125 (Testvolumen in ml vor Hitzeschritt) ÷ 0.02 (Testvolumen der Probe in ml im GOD-Test);

Aus a) und b) folgt :  $1/250 * 1.125/0.02 = 0.225$ .

Der Faktor  $2.25 \text{ cm}^2/\text{mg}$  in Formel (2) entspricht dem Extinktionskoeffizienten von Invertase.

### 2.2.2.2 Aktivitätstest für Trypsin

Der Test für Trypsin wurde verwendet, um die Stabilität während der Proteolyse und die Aktivität des verwendeten Trypsins nach längerer Lagerung zu überprüfen. Als Substrat dient N-α-Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid, das zu N-α-Benzoyl-L-arginin und Ethanol gespalten wird. Der Ester absorbiert bei 254 nm sehr viel schwächer als N-α-Benzoyl-L-arginin, so daß die Spaltung des Esters direkt photometrisch gemessen werden kann. Die

Methode ist spezifisch für Trypsin. Das pH-Optimum der Spaltung liegt bei pH 8.0 (Schwert und Takenaka, 1955). Die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion wird bei Substratkonzentration höher als  $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$  erreicht. Produkthemmung durch N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin wird nicht beobachtet. Wenn die Substratkonzentration höher als  $3 \times 10^{-4} \text{ M}$  ist, verläuft die Reaktion linear, bis etwa 90% des Substrats verbraucht sind. Da das Differenzspektrum ein scharfes Maximum bei 254 nm zeigt, ist es wichtig, mit einer geringen Bandbreite zu messen. Die Absorptionsänderungen wurden kontinuierlich registriert.

Für den Aktivitätstest wurden folgende Lösungen benötigt:

*Lösung A:*

1 mM N- $\alpha$ -Benzoyl-L-argininethylesterhydrochlorid in 50 mM Tris/HCl pH 8.0

*Lösung B:*

1 mM N- $\alpha$ -Benzoyl-arginin in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0

*Bestimmungsansatz:*

Die Lösungen wurden in Quarzküvetten, Schichttiefe 1 cm, pipettiert. Das Volumen einer Probe betrug 3.2 ml. Die Temperatur während der Messung betrug 25°C.

*Leerwert:*

3.0 ml Lösung A + 0.2 ml bidestilliertes Wasser.

Mit dem Leerwert wurde das Spektralphotometer auf Extinktion 0 eingestellt.

*Hauptwert:*

3.0 ml Lösung A

0.19-0 ml Puffer

0.01-0.2 ml Enzymlösung (ca. 0.5 mg/ml) (auf 3.2 ml auffüllen)

Die Enzymlösung wurde zum Zeitpunkt  $t = 0$  zugegeben, gemischt und die Extinktion ca. 4 Minuten lang gegen den Leerwert gemessen.

Die zeitliche Extinktionsänderung  $\Delta E/\text{min}$  sollte kleiner als 0.4 sein, andernfalls sollte die Enzymlösung mit Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0) verdünnt werden.

Zur Kontrolle wird Lösung A gegen Lösung B gemessen. Die Extinktionsdifferenz sollte größer als 0.5 sein.

#### *Berechnung:*

Die Aktivität wird nach der Formel  $(\Delta E/\text{min}) / 0.359 = \mu\text{Mol Substratsatz}/\text{min}$  berechnet.

Dividiert man die Aktivität durch mg eingesetztes Trypsin pro Ansatz, so erhält man die spezifische Aktivität.

### **2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

#### *Theorie:*

Mit Hilfe dieser Elektrophorese können Proteinmoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt werden. Die Proteine werden vor der Elektrophorese durch einen Hitzeschritt in Gegenwart vom SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert. Während dieses Schrittes falten die Proteine auf und oligomere Proteine dissoziieren üblicherweise in ihre Untereinheiten. Das Detergenz bildet mit dem Protein einen Komplex, wobei ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Laufweite und dem Molekulargewicht der Protein-SDS-Komplexe besteht (Reynolds & Tanford, 1970). Die Eigenladung des Proteins gegenüber den durch das SDS in den Komplex eingebrachten Ladungen ist normalerweise vernachlässigbar. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Komplexe hängt daher von den durch das SDS eingebrachten Ladungen, der angelegten Stromstärke und der Porengröße des dreidimensional quervernetzten Polyacrylamidgels ab und ist dem Logarithmus des Molekulargewichtes des Proteins proportional (Weber & Osborn, 1969).

#### *Verwendete Gele und Durchführung*

Es wurden gekühlte Plattengelapparaturen verwendet, die es erlaubten, die Elektrophoreseexperimente bei höheren Stromstärken durchzuführen, ohne daß sich die Gele erwärmten und die Banden durch die dadurch verstärkte

Diffusion unscharf wurden. Ein weiterer Vorteil war die Möglichkeit, zwei Gelelektrophoresen parallel durchführen zu können. Die Gele hatten das Format 13 x 12 x 0.1 cm. Sie erlaubten die gleichzeitige Analyse von maximal 13 Proben.

Es wurden Gele mit einer homogenen Polycacrylamidkonzentration von 12% verwendet. Auf die Trenngele wurde ein 5%iges Sammelgel aufpolymert, um die Proben zu konzentrieren. Aufgrund der geringen Ionenstärke der Glycinionen und des niedrigen pH-Wertes durchwandern Proteine das Sammelgel und werden abgebremst und konzentriert, sobald sie den Salzkonzentrations- und pH-Sprung erreichen.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

A) Trenngel 12%

- 7.5 ml 1 M Tris, pH 8.8
- 4.85 ml bidestilliertes Wasser
- 0.2 ml 10% SDS
- 5.4 ml 40% Acrylamid (38.7 g Acrylamid und 1.3 g N,N-Methylenbisacrylamid mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml aufgefüllt)
- 42 µl Ammoniumpersulfat (100 mg/ml)
- 12 µl TEMED pur

B) Sammelgel 5%

- 0.9 ml 1 M Tris, pH 6.8
- 5.25 ml bidestilliertes Wasser
- 75 µl 10% SDS
- 0.9 ml 40% Acrylamid
- 23 µl Ammoniumpersulfat
- 5 µl TEMED pur

C) Elektrophoresepuffer (10-fach konzentriert)

- 144.0 g Glycin
- 30.7 g Tris
- 10.0 g SDS mit H<sub>2</sub>O bidestilliert auf 1 l aufgefüllt ergibt pH 8.3

Probenvorbereitung: In Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden nachstehende Lösungen pipettiert:

90 µl Proteinlösung (mit oder ohne 2 mM DTE)

10 µl 10% SDS

20% (w/v) Bromphenolblau und Saccharose zum Beschweren

Die Proben wurden vor dem Auftragen 5 min auf 80-100°C erhitzt. Das aufgetragene Volumen betrug 20 µl. Die Konzentration der Proteinlösung wurde so gewählt, daß eine Bande ca. 3 µg des zu untersuchenden Proteins enthielt. Bei der Herstellung der Proben muß beachtet werden, daß keine Kationen vorhanden sein dürfen, die mit SDS schwerlösliche Niederschläge bilden (z. B. Kalium, Guanidinium). Für die Ansequenzierung wurde eine größere Proteinmenge benötigt. Daher wurden 60 µl Proteinlösung aufgetragen. Die Konzentration pro Bande betrug ca. 30 µg.

Die Stromstärke betrug während der Zeit bis zum Einwandern der Proben in das Sammelgel (ca. 15 min) 30 mA/Gel, die Spannung 200 V, während des Laufs bis zum Eindringen in das Laufgel (ca. 30 min) 20 mA/Gel und 160 V und im Laufgel (ca. 2h) 40 mA/Gel und 400 V (jeweils Maximalwerte).

Zur quantitativen Auswertung diente ein Desaga-Quick-Scan Densitometer, das an einen Hewlett-Packard Integrator 3390A angeschlossen war.

#### 2.2.4 Nativgelelektrophorese

##### *Theorie:*

Proteine sind geladen und wandern im elektrischen Feld zu Polen entgegengesetzter Ladung. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Anzahl der Ladungen, vom Molekulargewicht und der Form der Proteine sowie von der Porengröße des Gels ab. Proteine, die sich in diesen Parametern unterscheiden, können in der PAGE aufgetrennt werden.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen stellt eine schonende Methode dar, bei der auch relativ labile Proteinkomplexe assoziiert bleiben und oft ihre katalytische Aktivität behalten.

##### *Verwendete Gele und Durchführung:*

Es wurden die gleichen Platten und Apparaturen sowie die gleichen Lösun-

gen für die Gele wie bei der SDS-PAGE, nur ohne SDS, verwendet. Für den Elektrophoresepuffer wurden 28.8 g Glycin und 6.14 g Tris abgewogen und mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 2 l aufgefüllt.

Die Elektrophoresedauer betrug mindestens 5h bei 20 mA/Gel und maximal 300 V. Das Färben der Banden wurde wie unter 2.2.7 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.5 Transversale Harnstoffgradientengele

Lösungen für das Trenngel (12% Acrylamid):

Endkonzentration an Harnstoff in M/l	0	8
2 M Tris/HCl, pH 8.8 (ml)	1.46	1.46
Aqua bidest. (ml)	3.44	0.08
Harnstoff (g)	---	3.36
Acrylamid (ml)	2.1	2.1
APS (100 mg/ml) (μl)	12	12
TEMED pur (μl)	5	5

Es wurden die Glasplatten für die gekühlten Apparaturen verwendet. Da schon leichte Unebenheiten und Wölbungen der Spacer zum Auslaufen des noch nicht auspolymerisierten Geles führten, wurden die Spacer mit zweiprozentiger Agarose, die vorher bei ca. 100°C verflüssigt wurde, abgedichtet. Die Platten mit den Spacern wurden senkrecht zur späteren Laufrichtung der Proben aufgestellt (Abb. 5). Die Lösung wurde von der unteren Seite entgegen der Schwerkraft eingefüllt. Der Gradient wurde durch einen Gradientenmischer mit angeschlossener Peristaltikpumpe erzeugt. Zur Überprüfung der korrekten Ausbildung des Gradienten wurde der Lösung mit dem Harnstoff eine Spatelspitze Bromphenolblau zugesetzt und das auspolymerisierte Gel vor dem Lauf mit einem Densitometer photometrisch vermessen. Abb. 6 zeigt den Verlauf eines Gradienten. Die auspolymerisierten Gele wurden über Nacht

in der gleichen Lage wie beim Füllen im Kühlschrank aufbewahrt, um lokale Schwankungen des Harnstoffgradienten (Schlieren), die beim Gießen des Gels entstanden sein könnten, durch Diffusion auszugleichen.

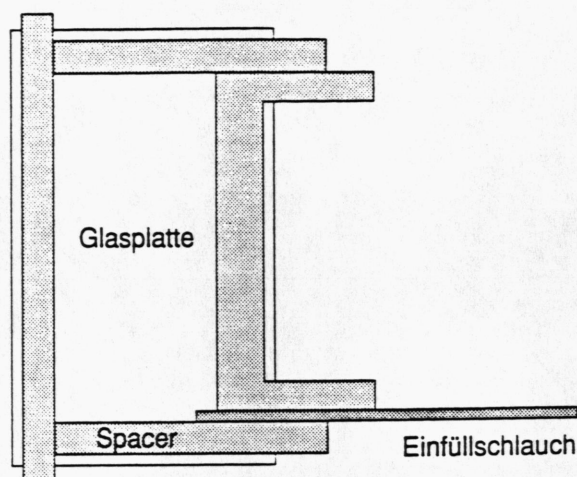


Abb. 5: Aufbau der Apparatur zur Herstellung von transversalen Harnstoffgradientengelen.

#### *Auftragung der Proben:*

Die nativen bzw. denaturierten Proben (Denaturierung siehe 2.2.12.6.) (jeweils 0.175 mg/ml) wurden mit Bromphenolblau/Saccharose beschwert und über die ganze Breite des Gels aufgetragen. Nach dem Einwandern in das Gel wurde die Spannungsquelle abgeschaltet und die Probe eine Stunde lang bei 20°C vorinkubiert, um sie an die Harnstoffkonzentration an der jeweiligen Stelle des Gels anzugleichen. Danach wurde die Elektrophorese ca. fünf Stunden bei 20 mA und 400 V (Maximalwerte) fortgesetzt. Die Temperatur während des Laufes betrug 20°C.

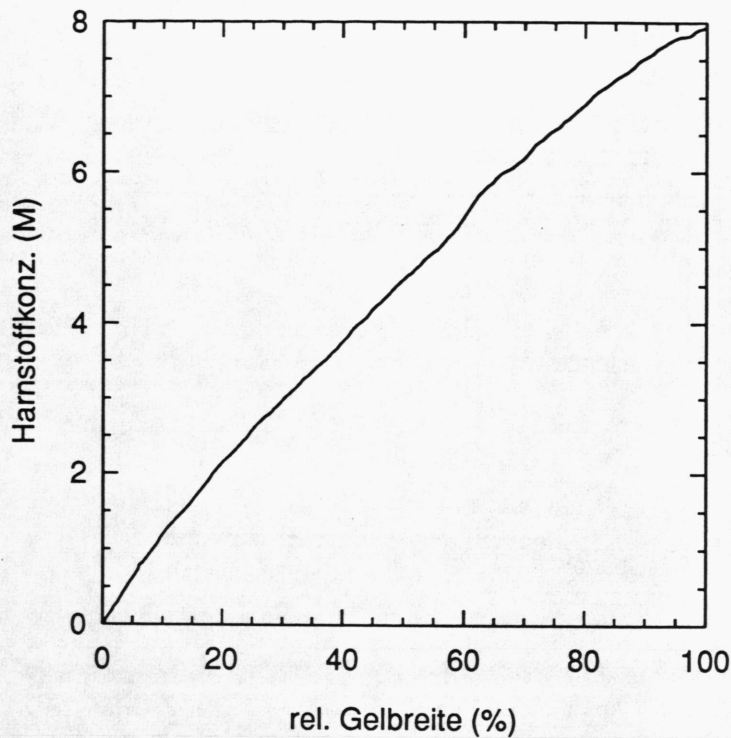


Abb. 6: Harnstoffgradient der transversalen Harnstoffgradientengelelektrophorese. Die Harnstofflösung im Gradientenmischer wurde mit Bromphenolblau gefärbt und die Färbung im fertigen Gel mit einem Quick-Scan-Densitometer vermessen. Der Wert mit der geringsten Extinktion wurde als 0 M Harnstoffkonzentration, der mit der höchsten Extinktion als 8 M Harnstoffkonzentration gesetzt.

### 2.2.6 Gelelektrophorese mit dem Phast-System

Die Methoden wurden der Gebrauchsanweisung des Gerätes entnommen. Es wurden nur käufliche Gele mit einem Gradienten von 8-25% verwendet. Der Molekulargewichtsstandard setzt sich wie folgt zusammen:

Phosphorylase S	94000 Da
BSA	67000 Da
Ovalbumin	43000 Da
Carboanhydrase	30000 Da
STI	20100 Da
$\alpha$ -Lactalbumin	14400 Da

### 2.2.7 Färbemethoden

#### *Coomassie-Blue-Färbung:*

Die Gele wurden mindestens 3h unter leichtem Schütteln in folgender Färbelösung inkubiert:

40% Ethanol

10% Essigsäure

0.125% Serva-Blue R-250 in H<sub>2</sub>O bidestilliert.

Zum Entfärben und Sichtbarmachen der Banden wurde das Gel über Nacht in 25% Methanol und 7% Essigsäure in H<sub>2</sub>O bidestilliert gelegt.

#### *Silberfärbung (Silverstain):*

Die Silberfärbung ist eine empfindlichere Methode, um Proteine anzufärben. Im Gegensatz zur Coomassie-Blue-Färbung können noch ca. 0.2- 1 µg Protein pro Bande auf 1 mm dünnen Gelen angefärbt werden.

#### *Durchführung:*

Stammlösungen:

45% Methanol/12% Essigsäure (MetOH/HAc) in H<sub>2</sub>O bidest.

10% Ethanol/5% Essigsäure (EtOH/HAc) in H<sub>2</sub>O bidest.

K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Stammlösung: 0.3 M K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> in H<sub>2</sub>O bidest.

Gebrauchslösung: 1 ml K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-Stammlösung + 20 µl

HNO<sub>3</sub> konz. + 99 ml H<sub>2</sub>O bidest.

AgNO<sub>3</sub>-Stammlösung: 1.2 M AgNO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O bidest.

Gebrauchslösung: 1 ml AgNO<sub>3</sub>-Stammlösung + 99 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Entwickler: 9 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0.165 ml 40% HCHO

(Formalin) mit H<sub>2</sub>O bidest auf 300 ml auffüllen

Wichtig: erst unmittelbar vor Gebrauch herstellen

Essigsäure (1%)

Farmer's Reducer:

Stammlösung A: 37.5 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> mit H<sub>2</sub>O bidest. auf  
500 ml auffüllen

Stammlösung B: 120 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit H<sub>2</sub>O bidest auf 500 ml  
auffüllen

Gebrauchslösung: 1 ml Lösung A + 4 ml Lösung B + 95 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest.

Das Gel wurde vorsichtig von der Glasplatte in 100 ml MetOH/HAc in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. überführt und 30 Minuten leicht geschwenkt. Nach dem Abdekantieren der Lösung wurde 3 x 10 Minuten mit je 100 ml EtOH/HAc unter leichtem Schwenken gespült. Danach wurden 100 ml  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  Gebrauchslösung zugegeben, 5 Minuten leicht geschwenkt, die Lösung in den vorbereiteten Sondermüllbehälter abdekantiert und 4 x 30 Sekunden mit je 100 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült. Nun wurden 100 ml  $\text{AgNO}_3$ -Gebrauchslösung zugegeben und das Gel zunächst 5 Minuten unter einer Schreibtischlampe, dann noch 25 Minuten bei normalem Raumlicht und unter leichtem Schwenken belichtet. Die Silbernitratlösung wurde in einen Sondermüllbehälter entsorgt. Das Gel wurde nun 2 x schnell mit je 100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Entwickler gewaschen, nochmals 100 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Entwickler zugegeben und die Bandenentwicklung beobachtet. Sobald die gewünschte Färbung erreicht war, wurde der Entwickler rasch abgegossen und das Gel in 200 ml 1% Essigsäure aufgenommen. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung wurde die Essigsäure entfernt und das Gel maximal 45 Sekunden mit Farmer's Reducer-Gebrauchslösung behandelt. Sofort nach dem Abgießen des Reducer's wurde das Gel 10 mal mit je 300 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und anschließend noch ca. 30 Minuten unter fließendem Reinwasser gespült. Das Gel konnte nun densitrometrisch vermessen und photographiert werden. Zur Aufbewahrung wurde es in 45% Methanol dehydratisiert und danach unter Zugabe von wenigen ml 45% Methanol in einer Plastikfolie eingeschweißt.

#### *Aktivitätsfärbung:*

Die Aktivitätsfärbung dient zur Lokalisierung aktiver gespaltener und intakter Invertase auf Gelen. Sie ist eine Kombination von SDS- oder Nativgelelektrophorese und anschließendem Aktivitätstest im Gel.

#### *Durchführung:*

Das Gel wurde in eine Pyrex-Glasschale mit 4.5 g Saccharose, 100 ml 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0 und 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  überführt und 15 Minuten bei

37°C inkubiert. Die Inkubationszeit kann je nach erwarteter Aktivität variiert werden. Danach läßt man die Lösung abfließen und wäscht das Gel 3 mal mit bidestilliertem Wasser.

Anschließend wurden 40 ml 0.1% 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in 0.5 N NaOH zugegeben und die Lösung im Abzug und mit Schutzbrille über einem Bunsenbrenner zum Kochen gebracht. Nach dem Sichtbarwerden der Banden wurde sofort ca. 1 l H<sub>2</sub>O hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Diese Lösung wurde abdekantiert und das Gel in 10% Essigsäure aufbewahrt.

### 2.2.8 Endo-F Behandlung von externer Invertase

Externe sowie proteolytisch behandelte externe Invertase wurden über Nacht gegen 2 l 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0 + 20 mM EDTA + 2 mM PMSF bei 2°C dialysiert. Zu 1 ml dieses Ansatzes (je 0.5 mg/ml Proteinkonzentration) wurden 5 µl Endoglycosidase F/N-Glycosidase F (0.2 Units) pipettiert, 18 Stunden bei 30°C inkubiert und danach für die Gelelektrophorese vorbereitet.

### 2.2.9 Anzucht und Aufschluß von E. coli

*Anzuchtmedium (LB-Medium):*

1% Trypton,

0.5% Hefeextrakt,

1% NaCl,

jeweils w/w

beim Medium für den transformierten Stamm wurden zur Selektion

100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

### *Durchführung*

Von zwei Stämmen E. coli, dem nicht transformierten Stamm HB 101 und dem das Plasmid pRRL1 enthaltendem Stamm RRL 1, wurden jeweils zwei 20 ml Ansätze auf LB-Medium über Nacht angezogen. Je 2 ml Zellkultur wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge fünf Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und aufbewahrt. Die Zellen wurden in 1 ml 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, resuspendiert und in ein Fiolax-Reagenzglas überführt. Die Zellsuspension wurde zwei mal je eine

Minute im Eisbad durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und jeweils 100 µl der behandelten Zellen sowie des Überstandes nach der Zentrifugation unverdünnt in den Aktivitätstest für Invertase eingesetzt.

### **2.2.10 Anzucht der transformierten Hefen**

#### *Anzuchtmedien:*

##### **YNB-Medium (Minimalmedium):**

0.67% (w/w) Bacto Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids

20 µg/ml Histidin

20 µg/ml Uracil

2% (w/w) Glukose

Die Yeast Nitrogen Base wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Danach wurden die autoklavierte Histidin- und Uracil-Stammlösung (jeweils 1.5 mg/ml) und die Glukosestammlösung (50% (w/w), autoklaviert) zugegeben.

##### **YNB-Platten:**

Die Herstellung des YNB-Mediums erfolgte wie oben beschrieben. Vor dem Autoklavieren wurden 2% (w/w) Agar Agar zugegeben. Von dem noch ca. 50°C heißen Medium wurden jeweils 20 ml in Petrischalen gefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt.

##### **Vollmedium ohne Phosphat (Vollmedium):**

1% Yeast Extract,

2% Bacto Peptone,

2% Glukose,

jeweils w/w

Der Hefeextrakt und Bacto Peptone wurden in entionisiertem Wasser gelöst. Dazu wurden jeweils 10 ml/l 1 M Magnesiumsulfat und konzentrierte Ammoniaklösung gegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert. Der dabei entstandene schwerlösliche Magnesiumphosphat-Niederschlag wurde mit einem Whatman No. 1-Filter abgenutscht. Die

klare Lösung wurde mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 5.8 eingestellt. Die Glukose wurde nach dem Autoklavieren zugegeben (Glukosestammlösung 50% (w/w), autoklaviert).

Das Autoklavieren der Lösungen und Meßgefäße erfolgte 20 Minuten bei 120°C und 1.2 bar Druck mit dem Rückkühlprogramm des Sterilisators bzw. direkt im Fermenter.

#### *Anzucht für die Screening-Versuche:*

Eingefrorene Zellen in YNB-Medium wurden aufgetaut, auf einer YNB-Platte ausgestrichen und im Wärmeraum bei 30°C inkubiert. Nachdem Kolo-nien angewachsen waren, wurde eine Kolonie auf 20 ml Minimalmedium überimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Das Zellwachstum wurde durch Absorptionsmessung bei 578 nm verfolgt. Sobald eine  $OD_{578}$  von 2.0 überschritten wurde, wurde das Volumen an Zellsuspension, das, mit der gemessenen  $OD_{578}$  multipliziert, einer  $OD_{578}$  von 40 entspricht, abzentrifugiert, mit Vollmedium gewaschen, in 20 ml dieses Mediums aufgenommen und bei 30°C im Wasserbad unter Schütteln angezogen. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die OD bei 578 nm bestimmt. War der Wert höher als 2.0, wurde die Probe mit Vollmedium entsprechend verdünnt. Anschließend wurde 1 ml der Kultur entnommen und in einer Eppendorf-Zentrifuge 5 Minuten bei maximaler Drehzahl abzentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, die Zellen eingefroren. Der Aufschluß der Zellen erfolgte nach der Glasperlenmethode.

#### *Anzucht im 1.5 l Maßstab:*

Eine Kolonie von der Platte wurde auf 30 ml Minimalmedium übertragen (Vorkultur) und bei 30°C im Wasserbad geschüttelt. Nachdem die Zellen zu einer optischen Dichte von 2.0 angewachsen waren, wurde die Vorkultur quantitativ auf 1.5 l Minimalmedium übertragen und im Wärmeraum bei 30°C angezogen. Nach ca. 20 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (GS 3-Rotor, 2°C, 4000 rpm, 1 h) und auf 1.5 l Vollmedium überführt. Bei  $OD_{578} = 12$  (ca. 18 h) wurden die Zellen wie oben abzentrifugiert, mit 2 \* 100 ml 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, gewaschen und tiefgekühlt aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet.

*Fermenteranzucht:*

Eine Kultur von der Platte wurde in 20 ml Minimalmedium überführt und 24 Stunden bei 30°C angezogen. Diese Vorkultur wurde quantitativ in 1.5 l Minimalmedium gegeben, wiederum wie oben inkubiert und nach 24 Stunden ebenfalls quantitativ in 50 l Minimalmedium im 100 l Fermenter überführt ( $OD_{578}$ : 4.48). Nach 22 Stunden wurden die Zellen geerntet ( $OD_{578}$ : 3.57), in einen zweiten vorbereiteten Fermenter mit 80 l Vollmedium überführt und weiterwachsen gelassen. Nach 18 Stunden wurden die Zellen geerntet ( $OD_{578}$ : 12.40), in 100 g Tafeln abgepackt und bei -60°C tiefgekühlt.

*Aufschlußmethoden:*

## a) Glasperlenaufschluß

Die Zellen wurden aufgetaut und zu 300 µl 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, und 1.1 g Glasperlen in einem Fiolax- Reagenzglas gegeben. Die Mischung wurde vier mal je eine Minute auf einem Whirlmix geschüttelt und dazwischen im Eisbad gekühlt. Vom Rohextrakt wurden 10 µl unverdünnt bzw. 1:10 verdünnt in den Aktivitätstest eingesetzt.

## b) Aufschluß mit der French-Press

100 g tiefgefrorene Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in 100 ml Aufschlußpuffer (50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 2mM EDTA) aufgenommen. Die Suspension wurde in der 40 ml-Zelle der French Press bei 1250 bar aufgeschlossen. Vor jedem Durchgang wurden 100 µl PMSF-Lösung (Stammlösung: 100 mM in Ethanol) und 100 µl DTE-Lösung (Stammlösung: 200 mM in bidestilliertem Wasser) zugegeben. Der Rohextrakt wurde mikroskopisch kontrolliert und der Aufschluß wiederholt, bis ca. 80% der Zellen geöffnet waren.

**2.2.11 Proteolyse und Reinigung****2.2.11.1 Limitierte Proteolyse von Invertase**a) *Limitierte Proteolyse durch einmalige Zugabe von Trypsin*

Die Stammlösung der Invertase (2.276 mg/ml) wurde mit 0.1 M Tris/HCl,

pH 8.0, auf 1 mg/ml verdünnt. Zu 500 µl dieser Lösung wurden 500 µl frisch zubereitete Trypsin-Lösung (1mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Die Probe wurde bei 30°C sechs Stunden im Wasserbad inkubiert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  und in Abständen von 30 Minuten wurden jeweils 10 µl Lösung entnommen, mit 240 µl 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, verdünnt und davon 10 µl in den Aktivitätstest eingesetzt. Ebenfalls zum Zeitpunkt  $t = 0$  sowie nach jeweils zwei Stunden Inkubationszeit wurden 10 µl des Spaltansatzes entnommen, zu 35 µl 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 5 µl 10% SDS und 1 µl 100 mM PMSF gegeben und für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die Kontrollversuche erfolgten ohne Trypsin im Ansatz wie oben beschrieben.

#### *b) Limitierte Proteolyse durch immobilisiertes Trypsin*

Trypsin wurde an Eupergit C gebunden, ein Kopolymerisat aus Methacrylamid, N-Methylen-bis-methacrylamid und oxiran-gruppenhaltigen Monomeren. Die Oxirangruppen fungieren als die reaktiven Komponenten; sie binden Amino-, Sulfhydryl- oder Hydroxylverbindungen kovalent in einem elektro-neutralem Mechanismus. Der chemische Aufbau bedingt eine hohe chemische Stabilität der Matrix und des gebundenen Liganden, so daß eine Lagerung von Monaten bis Jahren bei pH 5-9 und Raumtemperatur möglich ist. Die Durchflußrate beträgt bei 2 cm Durchmesser und 2 bar Druck 6 l pro Stunde; das Material ist bis zu 200 bar druckstabil.

#### Kovalente Anknüpfung von Trypsin:

Zu 150 mg Trypsin wurden 4 ml 1M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, sowie 1000 mg Eupergit C gegeben und diese Mischung ca. 72 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Freie Oxirangruppen wurden durch 24-stündiges Umsetzen mit 4 ml des Inkubationspuffers mit 1 M Glycin abgesättigt. Danach wurde der Ansatz auf einer Fritte mehrmals mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, gewaschen.

#### Proteolyse:

In eine Mobicol-Säule wurde 1 cm hoch immobilisiertes Trypsin gefüllt. Die Säule wurde mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, gewaschen und der Puffer in

einer Eppendorf-Tischzentrifuge 30 Sekunden bei 10000 U/min abzentrifugiert. Der abzentrifugierte Puffer wurde aufbewahrt. Zu 100  $\mu$ l Invertasestammlösung (2.276 mg/ml) wurden 200  $\mu$ l Puffer pipettiert. Diese Lösung wurde auf die Säule aufgetragen, der Durchlauf (ca. 100  $\mu$ l) ebenfalls aufbewahrt. Der Invertaseansatz wurde 16 Stunden bei 20°C inkubiert und danach wie oben beschrieben abzentrifugiert und die Säule mehrmals mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, gewaschen. Die aufbewahrten Lösungen und der Spaltansatz wurden für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet und ein Aktivitätstest auf Invertase durchgeführt.

#### *c) Proteolyse durch Zugabe von Trypsinpulsen*

Die Invertasestammlösung wurde mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, auf 1 mg/ml verdünnt und in einem Eppendorfcup im Wasserbad auf 30°C erwärmt. Zu 1 ml dieser Lösung wurden zum Zeitpunkt  $t = 0$  und danach in Abständen von jeweils einer Stunde 200  $\mu$ l Trypsinlösung (1 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, portionsweise eingefroren) pipettiert und bei 30°C inkubiert. In den Vorversuchen wurden nach einer Stunde Inkubationszeit vor der Zugabe der Trypsinlösung jeweils 20  $\mu$ l des Inkubationsansatzes entnommen. Diese wurden mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, auf 0.2 mg/ml Invertasekonzentration verdünnt. Der Verdünnungspuffer enthielt als Proteaseinhibitor 2mM PMSF. Davon wurden 50  $\mu$ l für eine SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Um feststellen zu können, welche Banden bei der Gelelektrophorese dem Trypsin zuzuordnen sind, wurde Trypsin wie oben beschrieben, nur ohne Invertase im Ansatz, inkubiert. Die Proben wurden auf ein Pharmacia-Gradientengel (8-25%) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel silbergefärbt. Der Rest der Proben wurde auf 20  $\mu$ g/ml verdünnt und ein Aktivitätstest für Invertase durchgeführt.

#### **2.2.11.2 Reinigung und Konzentrierung der gespaltenen Invertase**

Eine Mobicol-Säule wurde 1 cm hoch mit Q-Sepharose Fast Flow gepackt, mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0, äquilibriert, und anschließend der Spaltansatz mit 6 ml/h aufgetragen. Danach wurde mit Puffer nachgewaschen, bis die Grundlinie konstant war. Die Elution erfolgte bei den ersten Versuchen mit einem Gradienten von 0-0.6 M NaCl, später mit einem Salzpuls mit 0.3 M NaCl. Die

Fraktionen mit Invertaseaktivität (2 ml) wurden vereinigt und über Nacht bei 2°C zwei mal gegen 1 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, dialysiert. Das Dialysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und in der Speedvac in ca. 1 Stunde auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens eingeeengt. Das konzentrierte Dialysat wurde über Nacht bei 2°C zwei mal gegen 1 l Natriumacetat dialysiert und danach die Konzentration der proteolytisch gespaltenen Invertase durch spektroskopische Messung sowie einen Aktivitätstest bestimmt. Zur Bestimmung der Reinheit wurden eine SDS-PAGE durchgeführt.

## **2.2.12 Charakterisierung der gespaltenen Invertase**

### **2.2.12.1 Ansequenzierung der Spaltprodukte**

Um die Spaltstelle in der Aminosäuresequenz der internen Invertase genau lokalisieren zu können, wurden die aminoterminalen Enden beider Fragmente durch einen automatischen Edman-Abbau ansequenziert. Dazu wurde die proteolytisch behandelte, gereinigte Invertase wie in Materialien und Methoden beschrieben auf zwei Bahnen eines SDS-Gels aufgetragen. Die Konzentration der Invertase betrug 1 mg/ml. Nach dem Lauf wurde das Gel geteilt. Eine Hälfte wurde zur genauen Lokalisation der Banden mit Coomassie-Blue gefärbt, die zweite Hälfte wurde auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Fragmente wurden entsprechend der Lage im gefärbten Gel ausgeschnitten. Die Sequenzierung erfolgte in einem Applied Biosystems Protein Sequenzer 477A. Die Detektion der Aminosäurereste erfolgte bei 270 nm und einer Temperatur von 55°C nach Auftrennung auf einer PTH-C<sub>18</sub>-Säule (VYDAC Protein & Peptide C<sub>18</sub>, MZ Analysentechnik Mainz, Cat# 218 TP 54, 20 \* 2.1 mm).

### **2.2.12.2 Spektroskopische Messungen**

#### **2.2.12.2.1 UV-Messungen**

Zum Vergleich im UV-Bereich von 250-350 nm wurden die Spektren von nativer und gespaltenen Invertase aufgenommen und miteinander verglichen. Die Messung erfolgte in 1 cm-Quarzküvetten. Als Referenz wurde der jeweilige Puffer verwendet.

### 2.2.12.2.2 Fluoreszenz-Messungen

#### a) Fluoreszenzspektrum

Native Proben: Die Stammlösungen der beiden Invertaseformen wurden mit 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5, auf 10 µg/ml verdünnt. Die Messung erfolgte in thermostatisierten 1 cm-Quarzküvetten bei 20°C. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm. Die Fluoreszenz-Emission wurde in einem Bereich von 300-400 nm gemessen. Die Spaltbreite betrug jeweils 2.5 nm. Als Referenz wurde der Verdünnungspuffer verwendet.

Denaturierte Proben: Die Entfaltung erfolgte durch zweistündige Inkubation in 4 M GuHCl. Die restlichen Bedingungen entsprechen den oben beschriebenen.

#### b) Kinetik der Denaturierung in GuHCl

Eine sechsmolare GuHCL-Stammlösung in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5, wurde angefertigt. In die 1 cm Quarzküvetten wurden folgende Lösungen vorgelegt:

Endkonz. GuHCl	6 M GuHCl (µl)	Phosphatpuffer (µl)
3 M	500	450
4 M	666.7	283.3

Zum Zeitpunkt  $t=0$  wurden jeweils 50 µl Invertase bzw. Invertase-T-Stammlösung (0.2 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5) in die Küvette pipettiert und rasch vermischt. Die Konzentration an Protein während der Messung betrug 10 µg/ml. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Spaltbreite 5 nm. Die Fluoreszenzemission wurde bei 325 nm und 2.5 nm Spaltbreite gemessen. Die Temperatur während der Messung betrug 20°C.

### 2.2.12.2.3 Circular dichroismus

Native Proben: Invertase und Invertase-T wurden in einem Mikrodialysege-

rät gegen 40 mM Natriumphosphat, pH 6.5 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 0.1 mg/ml eingestellt.

Denaturierte Proben: Die Invertaselösungen (0.1 mg/ml) wurden mit 8 M GuHCl (in 40 mM Natriumphosphat, pH 6.5) auf 4 M GuHCl-Konzentration gebracht und eine Stunde inkubiert. Die Proteinkonzentration während der Messung war 50 mM.

Die Messung der Proben erfolgte in Küvetten mit 0.1 cm Schichttiefe bei 25°C. Die Spektren wurden aus 16 Messungen gemittelt.

### **2.2.12.3 Stabilität**

#### **2.2.12.3.1 Langzeitstabilität bei verschiedenen pH-Werten**

Die pH-Abhängigkeit der Aktivität von Invertase wurde in einem Bereich von pH 4.0-9.0 bei 30°C und 50°C sowie nach 1, 6 und 24 Stunden Inkubationszeit untersucht. Dazu wurden folgende Puffer verwendet:

pH 4.0-5.5: 0.1 M Natriumacetat

pH 6.0-7.0: 0.1 M Cacodylat

pH 8.0 : 0.1 M Tricin

pH 9.0 : 0.1 M Glycin

Die Stammlösungen der Invertase bzw. Invertase-T wurden mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, auf 0.15 mg/ml verdünnt. 10 µl dieser Lösungen wurden zu 90 µl des Puffers mit dem entsprechendem pH -Wert pipettiert, so daß die Enzymkonzentration im Test 15 µg/ml betrug. Die Proben wurden in den jeweiligen Wasserbädern bei 30°C und 50°C inkubiert. Nach 1, 6 und 24 Stunden wurden 10 µl-Proben entnommen und unter Standardbedingungen in den Aktivitätstest eingesetzt. Die erhaltenen relativen Werte wurden auf die jeweils höchste erhaltene Aktivität bezogen und in Prozent angegeben.

#### **2.2.12.3.2 Stabilität gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung**

Die Stabilität der Invertase -T gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung wurde getestet. Dazu wurde Invertase -T mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, auf 15 µg/ml verdünnt. Der Ansatz wurde fünf Minuten bei 30°C inkubiert,

eine 10 µl-Probe entnommen und in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Temperatur des Wasserbades wurde in 5°C-Schritten erhöht, der Ansatz 5 Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und die Invertaseaktivität bestimmt. Nach dem Erreichen von 80°C wurde der Versuch beendet.

#### **2.2.12.3 Thermische Desaktivierung**

Die Invertase- und Invertase-T-Stammlösungen wurden mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, auf 150 µg/ml verdünnt. Je 270 µl Natriumacetat wurden auf 55 bzw. 60°C vortemperiert und jeweils 30 µl der Probe nach dem Erreichen dieser Temperatur zugegeben. Die Konzentration an Invertase betrug während der Inkubation 15 µg/ml. Alle 5 Minuten wurden 10 µl Probe entnommen und deren Aktivität relativ zu dem Wert zum Zeitpunkt  $t = 0$  bestimmt.

#### **2.2.12.4 Entfaltungsübergänge in GuHCl**

In diesen Versuchen wurde die Stabilität von Invertase und Invertase-T bei verschiedenen Konzentrationen von GuHCl untersucht. Dazu wurden zu 800 µl 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0, mit steigenden Konzentrationen an GuHCl jeweils 200 µl Invertaselösung mit einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml pipettiert und bei 20°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und auf verschiedene Arten die Abnahme der Aktivität bzw. die Entfaltung untersucht.

##### **a) Aktivität:**

Aus den Versuchsansätzen wurden nach 14 Stunden jeweils 20 µl Probe entnommen und unter Standardbedingungen die restliche Invertaseaktivität bestimmt.

##### **b) Fluoreszenz:**

Die Fluoreszenz der Inkubationsansätze wurde nach 12 und 24 Stunden ermittelt. Dazu wurden die Proben unverdünnt im Photometer bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 325 nm vermessen. Die Temperatur während der Messung betrug 20°C.

### c) HPLC-Chromatographie:

Nach 4 Tagen Inkubationszeit wurden mit einer Hamilton-Spritze jeweils 20 µl Probe auf eine TSK 4000 SW-Säule (Laufpuffer: 0.1 M Natriumphosphat, pH 5.0) aufgetragen. Die Durchflußrate betrug 0.4 ml/min, die Temperatur während des Laufs 20°C. Die Detektion der Peaks erfolgte anhand der Fluoreszenzemission bei 325 nm. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Es wurden die Retentionszeiten des Proteins auf der Säule und die Peakflächen bestimmt.

### 2.2.12.5 De- und Renaturierung in GuHCl

#### *Allgemeiner Versuchsablauf:*

Native und gespaltene Invertase wurden in 4 M GuHCl denaturiert. Um verschiedene Enzymkonzentrationen während der Renaturierung zu erhalten, wurden nach einer Stunde die jeweiligen Denaturierungsansätze mit 4 M GuHCl-Lösung auf die entsprechende Konzentration an Invertase vorverdünnt. Danach wurde durch Zugabe von Puffer ohne Denaturierungsmittel renaturiert. Zur Berücksichtigung der unterschiedlichen Invertasekonzentrationen wurden in den Aktivitätstest verschiedene Mengen der jeweiligen Proben eingesetzt bzw. die Inkubationszeit verändert.

#### *Denaturierung:*

Zur Denaturierung wurden 50 µl Enzymlösung der Konzentration 1.6 mg/ml bei nativer bzw. 0.8 mg/ml bei Invertase-T (jeweils in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0) zu 50 µl 8 M GuHCl in 0.1 M Natriumcacodylat pipettiert und eine Stunde bei 20°C inkubiert. Im Kontrollversuch wurden 50 µl der jeweiligen Enzymlösung zu 50 µl 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, pipettiert.

#### *Herstellung der verschiedenen Renaturierungskonzentrationen:*

Die Vorverdünnung auf verschiedene Konzentrationen von Invertase erfolgte durch 4 M GuHCl in 0.1 M Natriumcacodylat, pH 6.5, nach folgendem Pipettierschema, wobei die gewünschten Konzentrationen während der Renaturierung angegeben sind:

c [nat. Invertase]	0.5	1	2	5	10
c [Invertase-T]	0.25	0.5	1	2.5	5
Probe (µl)	10	10	10	20	25
4 M GuHCl (µl)	190	90	40	20	-

#### *Renaturierung:*

Von diesen Lösungen wurden 25 µl zu 1975 µl Renaturierungspuffer (0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5) gegeben. Zur Kontrolle wurden 25 µl des Kontrollansatzes zu folgenden Puffern pipettiert:

- a) 1975 µl 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5
- b) 1975 µl 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0
- c) 1962.5 µl 0.1 M Natriumphosphat und 12.5 µl GuHCl

Nach einer Stunde Renaturierungszeit wurde ein Aktivitätstest durchgeführt. Um geeignete Konzentrationen an Invertase für den Aktivitätstest zu erhalten, wurde nach folgendem Schema pipettiert:

c [nat. Invertase]	0.5	1	2	5	10
c [Invertase-T]	0.25	0.5	1	2.5	5
7% Glukose (µl)	500	500	500	500	500
0.1 M NaAc, pH 5.0 (µl)	400	400	450	480	490
Probe (µl)	100*	100	50	20	10

Die Inkubationszeit bei 30°C betrug bei der mit \* bezeichneten Probe zwei Minuten, bei den restlichen eine Minute. Mit den Kontrollansätzen wurde ebenso verfahren.

### 2.12.6 De- und Renaturierung in Harnstoff

Denaturierung: Invertase und Invertase-T wurden in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5, und 8 M Harnstoff zwei Stunden bei Raumtemperatur denaturiert. Die Enzymkonzentration während der Denaturierung betrug jeweils 0.175 mg/ml.

Renaturierung: Die Renaturierungsversuche erfolgten in mit einem zur Laufrichtung der Nativgele transversalem Harnstoffgradienten (siehe 2.2.5) oder durch Herausdialysieren des Harnstoffes in einem Mikrodialysegerät. Dazu wurden jeweils 100 µl denaturierte Invertase bzw. Invertase-T in eine Kammer des Mikrodialysiergerätes pipettiert und der Harnstoff unter ständigem Durchfluß von frischem Puffer (0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5; Flußrate 50 ml/h) bei 20°C herausdialysiert. Nach 0, 2, 8 und 24 Stunden wurden jeweils 10 µl der Probe unverdünnt in den Aktivitätstest für Invertase eingesetzt.

### 2.2.13 Kristallisationsversuche mit nativer Invertase

#### *a) Nachreinigung der Invertase:*

10 ml Invertase (0.7 mg/ml in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0) wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine Anionenaustauschersäule (Mono-Q) der FPLC-Anlage aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 0-2M NaCl in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0.

#### *b) Konzentrierung der nachgereinigten Invertase:*

Die Fraktionen mit Invertaseaktivität wurden in einer Speedvac auf 1/10 des ursprünglichen Volumens eingengt, 14 Stunden gegen 2 mal 1 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, bei 2°C dialysiert und anschließend die Konzentration der Invertase spektroskopisch ermittelt. Da diese noch zu niedrig für Kristallisationsversuche war, wurde das Dialysat in der Speedvac um die Hälfte eingengt und über Nacht bei 2°C gegen 2 mal 1 l 5 mM Natriumacetat, pH 5.0 dialysiert. Danach wurde die Konzentration nochmals spektroskopisch bestimmt.

c) *Kristallisationsversuche:*

Die Kristallisation erfolgte im hängenden Tropfen durch kontrollierte Dampfdiffusion. Dazu wurden jeweils 5 µl der Proteidlösung mit 1.6 µl des jeweiligen Fällungspuffers versetzt und an einem silikonisiertem transparentem Kunststoffbänkchen hängend in einem geschlossenen Gefäß mit 5.0 ml des Fällungspuffers im Boden des Gefäßes inkubiert. Dabei wird der niedermolekularen Proteidlösung Wasser durch Dampfdiffusion langsam entzogen, so daß das Protein aufkonzentriert und gleichzeitig zunehmenden Salzkonzentrationen ausgesetzt wird. Tabelle 2 zeigt die Anfangskonzentrationen der verschiedenen Bodenpuffer sowie die jeweils zupipettierten Mengen an Puffer zur Erhöhung der Bodenkonzentration.

Alle verwendeten Lösungen enthielten 0.02% Natriumazid. Die Zusammensetzung der Bodenpuffer ist im folgenden aufgeführt.

*Fällungsmittel Ammoniumsulfat:*

Das Fällungsmittel der gewünschten Konzentration wurde aus Stammlösungen von 1 M und 3 M Ammoniumsulfat hergestellt. Zur Herstellung der Stammlösungen werden jeweils die angegebenen Mengen Puffersalz dem Fällungsmittel zugesetzt und der pH-Wert mit konzentrierter Säure bzw. Base eingestellt (Tab. 1).

Tabelle 1: Stammlösungen für das Fällungsmittel Ammoniumsulfat

pH-Wert	c [Ammoniumsulfat]	Puffer der Stammlösung
3.5-5.0	1.2 M	0.1 M Ammoniumacetat/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5.5-6.0	1.2 M	0.1 M Na/Kaliumphosphat
6.5-7.5	1.2 M	0.1 M Imidazol/HCl
8.0-8.5	1.2 M	0.1 M Tris/HCl
9.0-9.5	1.2 M	0.1 M Na/Kaliumphosphat*
10.0	1.2 M	0.1 M Kaliumphosphat/NaOH

\* "0.1 M Natrium/Kaliumphosphat" = 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH-Wert wird mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

*Fällungsmittel Citrat:*

Citratpuffer (in Abständen von einer pH-Einheit) wurden aus 1.5 M Stammlösungen hergestellt, für pH-Werte von 4.0-7.0 wurde Zitronensäure mit Trinatriumcitrat titriert und mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, für pH 8.0-10.0 wurde Trinatriumcitrat mit 0.1 M Glycin gepuffert, der pH-Wert mit konzentrierter Natronlauge eingestellt und mit Glycinpuffer verdünnt. Die Anfangskonzentration beträgt jeweils 0.75 M.

*Fällungsmittel Natrium/Kaliumphosphat:*

Lösungen der pH-Werte 4.0-10.0 in Abstufungen einer pH-Einheit wurden aus Stammlösungen von 4 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 4 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  gemischt. Bei Bedarf wurde der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure oder Natronlauge justiert. Die Anfangskonzentration im Bodenpuffer ist jeweils 1.2 M, verdünnt wird mit  $\text{H}_2\text{O}$ .

*Fällungsmittel Polyethylenglykol (PEG):**Rekristallisation von Polyethylenglykol:*

Polyethylenglykol (PEG) wurde in reinem Ethanol unter Schütteln im Wasserbad bei 30-60°C gelöst. Nach Zugabe von einem Volumen Äther wurde die Lösung bei 4°C bis zur Präzipitation stehen gelassen. Die Oxidationsprodukte des PEG bleiben dabei in Lösung. Nun kann der Niederschlag über eine Filternutsche abgetrennt, mit Äther gewaschen und in einem Gefrier-trockner vollständig eingetrocknet werden.

Bei der Kristallisation aus PEG wird der PEG-Puffer dem Protein zugegeben, die Osmolarität wird durch den Phosphatpuffer im Bodenpuffer bestimmt. Lösungen der pH-Werte 4.0-10.0 in Abstufungen von 0.5 pH-Einheiten wurden aus 10% rekristallisiertem PEG 6000 in 0.2 M Phosphatpuffer hergestellt. Hierzu wurde zunächst PEG in Phosphatpuffer des gewünschten pH-Wertes gelöst und dann die genauen pH-Werte durch Titration der PEG-Lösungen gegeneinander eingestellt. Die Anfangskonzentration im Bodenpuffer ist 0.25 M Phosphat.

Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde der Zustand des Kristallisationsansatzes unter dem Mikroskop beurteilt, und, solange das Protein nicht präzipi-

tiert (oder kristallisiert) war, die Molarität des Bodenpuffers jeweils um ca. 10% erhöht (Tab. 2).

Tab. 2: Einstellung der Molarität des Bodenpuffers

[c] (M)	Bodenpuffer (Volumen)
a) Ammoniumsulfatpuffer (AS)	
Start 1.2	0.5 ml 3 M AS + 4.5 ml 1 M AS
1.4	0.625 ml 3 M AS
1.6	0.804 ml 3 M AS
1.8	1.072 ml 3 M AS
2.0	1.500 ml 3 M AS
b) Polyethylenglykollpuffer	
Start 0.25	5 ml 0.25 M Na/K-Phosphat
0.275	46 µl 3 M Na/K-Phosphat
0.30	47 µl 3 M Na/K-Phosphat
0.33	57 µl 3 M Na/K-Phosphat
0.37	78 µl 3 M Na/K-Phosphat
0.40	60 µl 3 M Na/K-Phosphat
c) Phosphatpuffer	
Start 1.2	2 ml 3 M Phosphat + 3 ml H <sub>2</sub> O
1.4	0.625 ml 3 M 3 M Na/K-Phosphat
1.6	0.804 ml 3 M 3 M Na/K-Phosphat
1.8	1.072 ml 3 M 3 M Na/K-Phosphat
2.0	1.500 ml 3 M 3 M Na/K-Phosphat
d) Citratpuffer	
Start 0.75	2.5 ml 1.5 M Citrat + 2.5 ml H <sub>2</sub> O bzw. 0.1 M Glycin bei pH 8-10
0.82	0.556 ml 1.5 M Citrat
0.90	0.741 ml 1.5 M Citrat
1.00	1.259 ml 1.5 M Citrat
1.15	3.238 ml 1.5 M Citrat
1.30	8.096 ml 1.5 M Citrat

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Invertaseaktivität in *E. coli*

In einem Vorversuch wurde untersucht, ob im *E. coli*-Stamm RRL 1, der das Plasmid pRRL 1 enthält (genaue Beschreibung des Plasmids siehe Abschnitt 3.2.), eine signifikant erhöhte Invertaseaktivität festgestellt werden kann im Vergleich zum nicht transformiertem Stamm HB 101. Dazu wurden von den beiden Stämmen je zwei 20 ml Kulturen über Nacht in LB-Medium angezogen. Danach wurden jeweils Proben zu 2 ml entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, resuspendiert und die Zellen zwei mal je eine Minute durch Ultraschallbehandlung im Eisbad aufgeschlossen. 100 µl des Rohextraktes sowie je eines Überstandes nach der Zentrifugation wurden sofort auf Invertaseaktivität getestet. 25 µl wurden auf ein SDS-Gel der gekühlten Apparatur aufgetragen. Das Ergebnis des Aktivitätstestes zeigt Tabelle 3. Es ist zu erkennen, daß im transformierten Stamm keine erhöhte Invertase-Aktivität auftrat. Auch auf dem SDS-Gel (Abb. 7) war kein Hinweis auf eine Produktion von Invertase zu erkennen.

Tab. 3: Invertaseaktivität in *E. coli*

E. coli-Stamm	Aktivität (U/ml)
HB 101, Kultur 1	0.18
HB 101, Kultur 2	0.22
RRL 1, Kultur 1	0.18
RRL 1, Kultur 2	0.17
HB 101, Überstand 1	0
RRL 1, Überstand 1	0

Ein Vergleich der Bandenmuster des transformierten und nicht-transformierten Stammes zeigte keine Unterschiede. Nach 12 Stunden Inkubationszeit hatte lediglich die Intensität aller Banden aufgrund der höheren Zelldichte zugenommen, aber es trat keine zusätzliche Invertasebande im Bereich von 60000 Da, dem Molekulargewicht der internen Invertase, auf. Vermutlich wurde Invertase nicht exprimiert, oder sie war in der Zelle zu inclusion-bodies aggregiert.

Da zu diesem Zeitpunkt bereits transformierte Hefen zur Verfügung stan-

den, wurden keine weiteren Untersuchungen an *E. coli* durchgeführt.

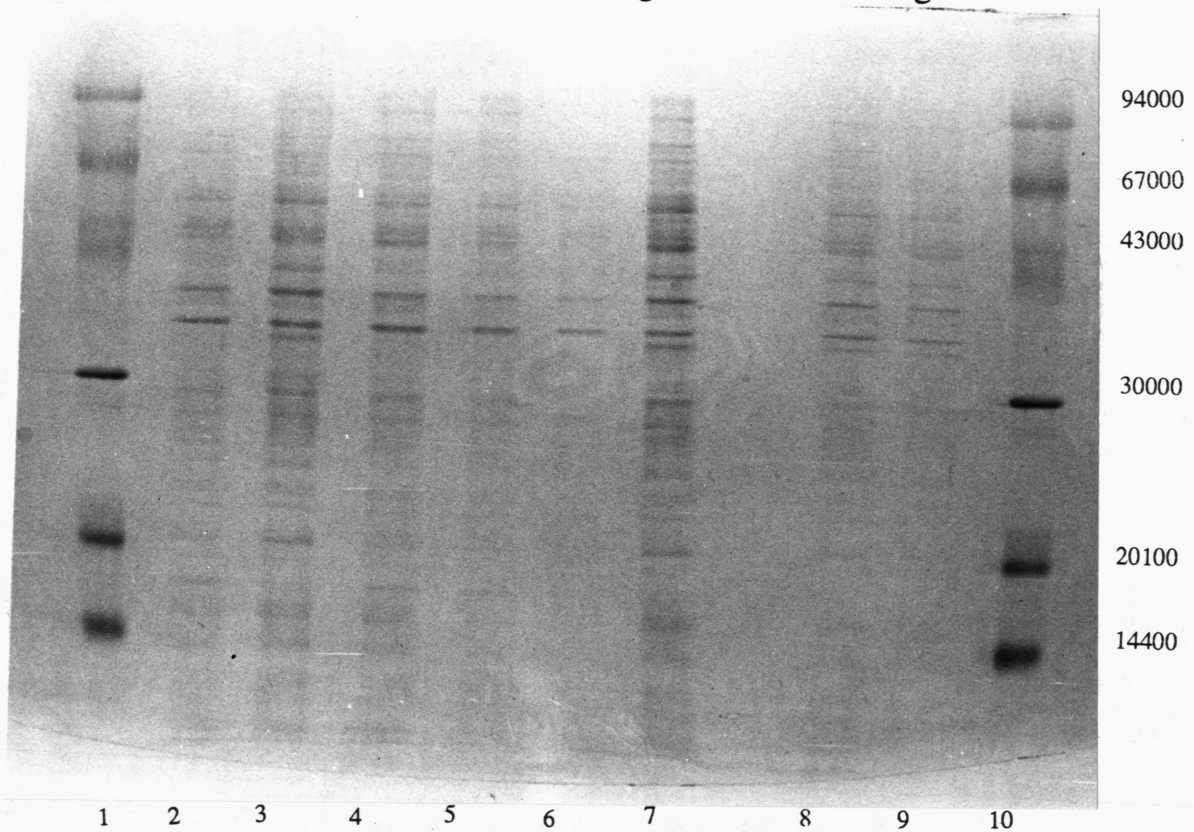


Abb. 7: Versuch der Expression von interner Invertase in *E. coli*. Der Zellaufschluß erfolgte nach 12 Stunden Inkubationszeit. Es wurden 25 µl des zentrifugierten und verdünnten Zellaufschlusses aufgetragen. Der Stamm RRL 1 enthält das Plasmid für die Expression der internen Invertase.

- 1: Marker
- 2: HB 101, Verdünnung 1/20
- 3: HB 101, Verdünnung 1/10
- 4: HB 101, Verdünnung 1/5
- 5: RRL 1, Verdünnung 1/20
- 6: RRL 1, Verdünnung 1/10
- 7: RRL 1, Verdünnung 1/5
- 8: HB 101, Verdünnung 1/5, vor Beginn der Inkubation
- 9: RRL 1, Verdünnung 1/5, vor Beginn der Inkubation
- 10: Marker

### 3.2 Überexpression in Hefe und Optimierung der Anzucht

#### *Konstruktion des Hefechromosoms und des Plasmids:*

Interne Invertase wird in Hefe nur in sehr geringen Mengen, ca. 1/100 verglichen mit der externen Form, produziert. Um eine höhere Ausbeute zu erzielen, wurde ein spezieller Hefestamm mit einem Multicopy-Vektor verwendet.

Das Plasmid wurde von Dr. Lehle, Universität Regensburg, konstruiert, sowie auch der Hefestamm zur Verfügung gestellt. Bei dem Plasmid pRRL 1 handelt es sich um einen Pendelvektor, das heißt ein Plasmid, in dem sich sowohl bakterielle Signalsequenzen für die Replikation in *E. coli* als auch Signalsequenzen für die Replikation in Hefe befinden. Weiterhin enthält es ein Gen für Tetracyclinresistenz zur Selektion in *E. coli*, sowie eine Deletion im Leucin-Gen. In diesem Plasmid befindet sich ein SUC-2-Gen mit einer Deletion in der codierenden Region für die Signalsequenz, so daß nur interne Invertase exprimiert werden kann. Zur besseren Expression wurde dem Gen ein Pho5-Promotor vor- sowie ein Pho5-Terminator nachgeschaltet. Die Transformation des Plasmids von *E. coli* in die Hefe erfolgte durch Protoplastentransformation nach der Methode von Hinnen et al. (1968).

Bei der Hefe handelt es sich um *Saccharomyces cerevisiae* vom Stamm SEY-2102 mit folgenden Eigenschaften:

Es sind haploide Zellen der Geschlechtsform  $\alpha$  (Mat $\alpha$ ), das heißt der Paarungstyp ist stabil, so daß keine Paarung der Zellen untereinander stattfinden kann und die Vermehrung rein vegetativ erfolgt. Auf den codierenden Regionen für die Leucin-, Histidin- und Uracilgene wurden einige Genabschnitte durch Deletion entfernt (Leu 2-3, 112; His 4-519; Ura 3-52). Auch ein Teil des für die Signalsequenz der externen Invertase codierenden Bereichs wurde durch Deletion entfernt (Suc 2- $\Delta$ 9).

Die Anzucht der Hefe erfolgt in Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, einem Minimalmedium auf Stickstoffbasis, das alle für das Wachstum notwendigen Vitamine, organischen Salze und Aminosäuren mit Ausnahme von Histidin, Methionin und Tryptophan enthält. Da auf dem Hefechromosom die Informationen für die Produktion von Histidin und Uracil fehlen, diese aber auf dem Plasmid vorhanden sind, kann durch die Zugabe dieser Salze zum Medium gezielt auf die plasmidhaltigen Hefen selektioniert werden. Der Pho-5 Promotor und damit die Produktion der internen Invertase wird durch das phoshatfreie Vollmedium induziert.

#### *Anzucht transformierter Hefekulturen*

Die Anzucht von transformierter Hefe erfolgte in drei Schritten. Im ersten wurden in Minimalmedium tiefgekühlte Zellen aufgetaut und auf YNB-Plat-

ten steril ausgestrichen. Die Platten wurden im Wärmerraum bei 30°C inkubiert. Nach ca. drei Tagen waren Kolonien verschiedener Größe angewachsen. Im zweiten Teil wurden die fünf am besten angewachsenen Kolonien auf 20 ml Minimalmedium überimpft und wiederum bei 30°C und leichtem Schütteln angezogen. Nach 15 Stunden wurde im Photometer die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm in regelmäßigen Abständen überprüft. Um für die Aktivitätstests identische Ausgangsbedingungen in Bezug auf die Zellmasse zu erhalten, wurde, nachdem bei allen Kulturen eine optische Dichte von 2 überschritten worden war (nach 24 Stunden), das Volumen in ml entnommen, das, mit der  $OD_{578}/\text{ml}$  multipliziert, den Wert 20 ergab. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit 10 ml Vollmedium ohne Phosphat gewaschen, nochmals abzentrifugiert und in 100 ml Erlenmeyerkolben in 20 ml dieses Mediums aufgenommen. Die Zentrifugation wurde in einer Christ-Tischzentrifuge 20 Minuten bei 2000 U/min durchgeführt. Im dritten Schritt wurden die Zellen bei 30°C in Vollmedium ohne Phosphat unter leichtem Schütteln inkubiert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  und nach jeder Stunde Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei 578 nm ermittelt (Abb. 8) sowie 1 ml der Probe entnommen und eingefroren. Bei dieser Anzucht wurden mit den jeweiligen 5 Proben zwei identische Ansätze aus der selben Kultur um 6 Stunden zeitversetzt angezogen, um einen Zeitraum von 24 Stunden abzudecken. Nach der letzten Entnahme nach 24 Stunden wurden die Proben aufgetaut, zentrifugiert und die sedimentierten Zellen in Aufschlußpuffer und Glasperlen aufgenommen. Alle Proben wurden gleichzeitig auf dem Whirlmix aufgeschlossen, um möglichst gleichmäßig hohe Ausbeuten zu erzielen. Anschließend wurden die Zellaufschlüsse auf Invertaseaktivität getestet sowie auf ein SDS-Gel aufgetragen. Auf diesem ist deutlich die zunehmende Invertasebande zu erkennen (Abb. 9). Die Abbildungen 8A und 8B zeigen das Ergebnis der Aktivitätstests bzw. der Messungen der optischen Dichte bei 578 nm der beiden zeitversetzten Ansätze.

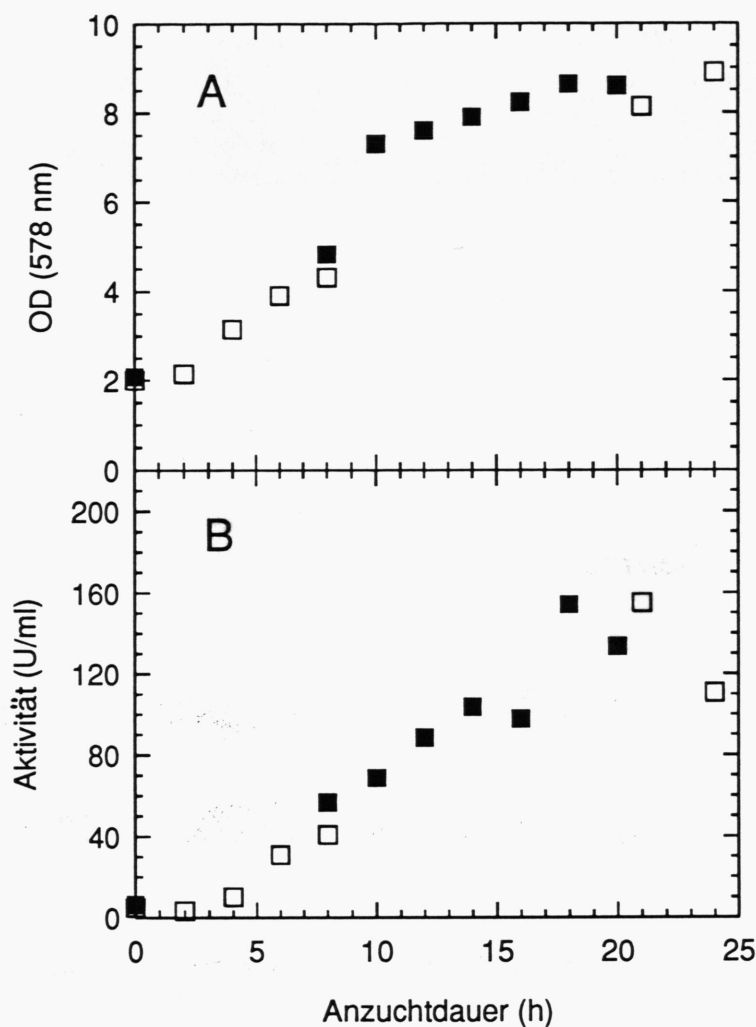


Abb. 8: Wachstumskurve (A) und Verlauf der Invertase-Aktivität (B) von *Saccharomyces cerevisiae* in 20 ml Vollmedium ohne Phosphat. Die Anzuchttemperatur betrug 30°C. Es wurden zwei identische Ansätze aus dem gleichen Pool zu verschiedenen Startzeiten angeimpft.

□ : Ansatz 1  
■ : Ansatz 2

Die Wachstumskurve zeigt einen typischen Verlauf. Die Verzögerungsphase dauerte etwa zwei Stunden, die Wachstumsphase ca. 15 Stunden, wobei die höchste Wachstumsrate zwischen zwei und zehn Stunden lag. Nach 17 Stunden war die höchste Populationsdichte erreicht, d. h. es erfolgte kein weiteres Wachstum der Zellen.

Von Bedeutung sind die Ergebnisse der Tests auf Invertaseaktivität. Trotz größerer Abweichungen, vermutlich durch unterschiedliche Ausbeuten beim

Aufschluß der einzelnen Proben, läßt sich ein Verlauf der Kurve, ähnlich dem Wachstumsverlauf der Hefezellen, erkennen (Abb. 8B).

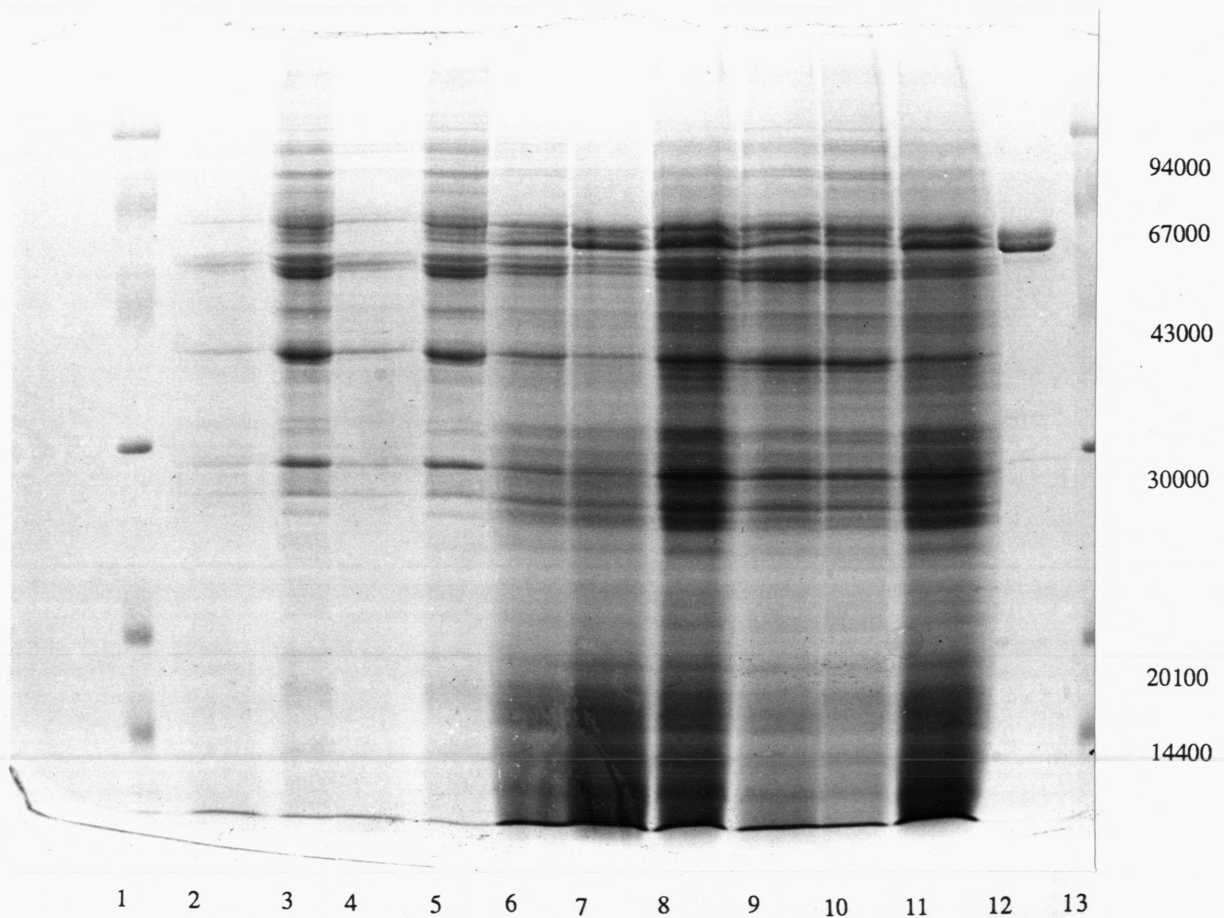


Abb. 9: Zellaufschluß von *Saccharomyces cerevisiae* nach verschiedenen Inkubationszeiten. Es wurden 25 µl zentrifugierte Probe aufgetragen.

- 1: Marker
- 2: Anzucht 1, t=0h
- 3: Anzucht 1, t=24h, Verdünnung 1/45
- 4: Anzucht 2, t=0h
- 5: Anzucht 2, t=24h, Vedünnung 1/45
- 6: Anzucht 1, t=8h
- 7: Anzucht 1, t=16h
- 8: Anzucht 1, t=24h
- 9: Anzucht 2, t=8h
- 10: Anzucht 1, t=16h
- 11: Anzucht 1, t=24h
- 12: Interne Invertase
- 13: Marker

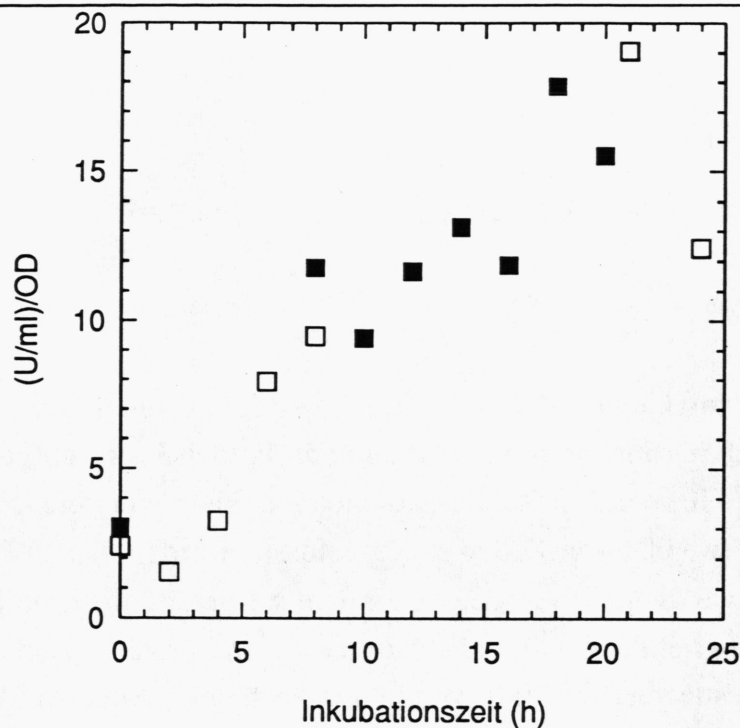


Abb. 10: Verhältnis der Invertaseaktivität zur optischen Dichte von *Saccharomyces cerevisiae* nach verschiedener Anzuchtdauer. Die hohlen Symbole stehen für die Entnahmezeiten 0, 2, 4, 6, 8, 21 u 24 Stunden, die gefüllten für 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20 Stunden.  
 □ : Ansatz 1  
 ■ : Ansatz 2

Nach einer kurzen lag-Phase (2 Stunden) erfolgte ein Anstieg der Aktivität. Nach 17 Stunden, das ist auch das Ende der Wachstumsphase, war das Maximum der Aktivität erreicht. Nach 24 Stunden nahm die Aktivität wieder ab. Dies ist vermutlich auf einen Verlust der Plasmide zurückzuführen, da im zur raschen Anzucht verwendeten Vollmedium kein Selektionsdruck mehr auf die Hefezellen ausgeübt wird.

In Abbildung 10, in der das Verhältnis von Aktivität zur optischen Dichte gegen die Anzuchtdauer aufgetragen ist, ist zu erkennen, daß die Aktivität bis zu 21 Stunden Anzuchtdauer stärker zunimmt als die Dichte der Zellen. Dies bedeutet, daß die Menge an Invertase in den Zellen während dieses Zeitraumes anstieg. Auch hier war nach 24 Stunden ein deutlicher Rückgang zu erkennen. Aufgrund dieser Daten wurden die Zellen in den weiteren Anzuchten nach einer Wachstumsdauer von 20 Stunden geerntet, da zu diesem Zeitpunkt mit großer Wahrscheinlichkeit bereits das Maximum der Aktivität erreicht ist und noch etwa zwei Stunden zur Verfügung stehen, um die Zellen abzuzentrifugie-

ren und einzufrieren bzw. aufzuschließen, ohne daß ein Verlust an interner Invertase zu erwarten war.

### 3.3 Reinigung von interner Invertase

#### Reinigungsstrategie

##### Zellaufschluß:

Vorversuche im kleinen Maßstab (ca. 10 g Zellen) zeigten, daß etwa 90% der Zellen durch fünfmalige Behandlung in der French-Press aufgeschlossen werden. Durch Glasperlenaufschluß konnten in einem vergleichbaren Zeitraum lediglich etwa 60% der Zellen aufgeschlossen werden. Durch Wiederholungen hätten zwar ähnliche Ausbeuten erreicht werden können, zugleich wäre jedoch die Wahrscheinlichkeit von Denaturierung und proteolytischem Abbau der Invertase gestiegen. Um diese Minderung auch beim Aufschluß durch die French-Press weitgehend zu unterbinden, wurden dem Aufschlußpuffer PMSF und EDTA (zur Hemmung von Serinproteasen) sowie DTE (zur Verhinderung der Bildung unspezifischer Disulfidbrücken) zugesetzt.

##### Ammoniumsulfatfällung:

Der Fällungsbereich der internen Invertase liegt bei 40-60% Ammoniumsulfat. Es wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, bei der zunächst ein Teil der Fremdproteine durch Sättigung mit 35% Ammoniumsulfat und anschließender Zentrifugation abgetrennt wurde. Anschließend wurde der Überstand durch 70% Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert und das Pellet gegen Aufschlußpuffer dialysiert. Durch diese Vorgehensweise konnten nahezu 100% der Invertaseaktivität zwischen 35 und 70% Ammoniumsulfatsättigung gefällt werden.

##### Ionenaustauscherchromatographie:

Der isoelektrische Punkt der internen Invertase liegt bei pH 4.5. Daher wurden folgende Anionenaustauscher verwendet: DEAE-Zellulose bei pH 5.0 sowie Q-Sepharose bei pH 5.0 und 6.5. Die Mindestmengen an Austauscher-material zur vollständigen Bindung der Invertase beim Auftragen wurden in Vorversuchen ermittelt.

a) DEAE-Zellulose, pH 5.0

Nach dem Zellaufschluß und der Ammoniumsulfatfällung wurde dieser Anionenaustauscher im Batch-Verfahren eingesetzt. Die DEAE-Zellulose wurde in einem geeigneten Gefäß mit Aufschlußpuffer äquilibriert und das Dialysat der Ammoniumsulfatfällung eingerührt. Die Invertaseaktivität des Überstandes wurde ermittelt und bei Bedarf noch weitere voräquilibrierte DEAE-Zellulose zugegeben. Anschließend wurde die DEAE-Zellulose mit den gebundenen Proteinen in eine Chromatographiesäule eingefüllt. Die Elution erfolgte durch einen Puls mit 0.3 M NaCl.

b) Q-Sepharose Fast Flow, pH 5.0

Dieses Ionenaustauschermaterial wurde aufgrund seiner hohen Durchflußrate eingesetzt. Die Säule wurde mit Aufschlußpuffer äquilibriert und die dialysierten Fraktionen der DEAE-Zellulose mit Invertaseaktivität aufgetragen. Die Invertase bindet unter diesen Bedingungen quantitativ an das Säulenmaterial. Die Elution erfolgte durch einen linearen Salzgradienten von 0-0.3 M NaCl.

c) Q-Sepharose Fast Flow, pH 6.5

Die gegen 50 mM Imidazol, pH 6.5 dialysierten Fraktionen mit Invertaseaktivität wurden auf die mit diesem Puffer umäquilibrierte Säule aufgetragen und gewaschen. Bei diesem pH-Wert bindet die interne Invertase stärker an das Säulenmaterial und durch Elution mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl können weitere Fremdproteine abgetrennt werden. Die Fraktionen mit Aktivität wurden gegen 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, dialysiert.

Hydrophobe Chromatographie:

Für die hydrophobe Chromatographie standen Phenyl- und Butylsepharose zur Verfügung. Um die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu begünstigen, muß der Proteinlösung Ammoniumsulfat zugesetzt werden. Um Invertase an Phenylsepharose zu binden, genügt eine Ammoniumsulfatkonzentration von 20%. Da die Wechselwirkungen mit der Butylsepharose schwächer sind, ist auch eine höhere Ammoniumsulfatkonzentration nötig. Es zeigte sich, daß ein Teil der Invertase bei den vorliegenden

Konzentrationen bei Ammoniumsulfatsättigung über 25% teilweise ausfällt und eine definierte Bindung an Butylsepharose nicht möglich wäre. Daher wurde im letzten Reinigungsschritt nur Phenylsepharose verwendet.

#### Phenylsepharose:

Um eine Präzipitation durch zu hohe lokale Konzentrationen zu vermeiden, wurde dem Dialysat des letzten Säulenlaufes portionsweise Ammoniumsulfat in fester Form zugegeben, bis 20% Sättigung erreicht waren. Diese Lösung wurde auf die ebenfalls mit 20% Ammoniumsulfat äquilibrierte Säule aufgetragen, wobei die gesamte Invertase absorbiert wurde. Anschließend wurde mit 20%, danach mit 10% Ammoniumsulfat gewaschen, um noch vorhandene Fremdproteine zu entfernen. Die Desorption der Invertase erfolgte durch Puffer ohne Ammoniumsulfat.

#### Reinigung von interner Invertase

##### Aufschluß:

100 g Zellen wurden in der French-Press aufgeschlossen. Es wurden fünf Durchgänge ausgeführt und der Rohextrakt im Eisbad aufgefangen. Das Ausmaß des Aufschlusses wurde nach jedem Durchgang mikroskopisch überprüft. Nach dem fünften Durchgang waren etwa 90% der Zellen aufgeschlossen. Die beim Aufschluß intakt gebliebenen Zellen sowie die Zellfragmente wurden durch einstündige Zentrifugation im SS 34 Rotor mit 13000 U/min (20000 g) bei 2°C abgetrennt.

##### Ammoniumsulfatfällung:

Der Rohextrakt (250 ml) wurde im Eisbad durch vorsichtige Zugabe von 52.25 g Ammoniumsulfat und unter ständigem leichtem Rühren auf 35% Sättigung gebracht und eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (SS 34, 1h, 13000 U/min, 2°C). Das Pellet wurde verworfen, der Überstand (265 ml) mit 63.1 g Ammoniumsulfat auf 70% Sättigung gebracht und eine Stunde unter leichtem Rühren inkubiert. Der gebildete Niederschlag wurde sedimentiert (SS 34, 1h, 13000 U/min, 2°C). Der Überstand wurde verworfen, das gut lösliche Pellet in 150 ml Aufschlußpuffer aufgenommen

und über Nacht gegen zwei mal 5 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, und 2 mM EDTA dialysiert. Nach der Dialyse war eine große Menge an nicht gelösten Bestandteilen zu erkennen. Diese wurden im SS 34-Rotor eine Stunde bei 13000 U/min und 2°C abzentrifugiert und der Überstand, in dem sich 51% der Invertaseaktivität befanden, weiterverwendet.

#### *DEAE-Zellulose (DE 52):*

In den Überstand wurden 100 g in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, voräquilibriumierte DEAE-Zellulose eingerührt und eine Stunde bei gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Der Überstand nach dem Absetzen der DEAE-Zellulose wurde auf Invertaseaktivität getestet. Da keine Aktivität festgestellt werden konnte und damit die Invertase quantitativ an das Säulenmaterial gebunden hatte, wurde die abgesetzte DEAE-Zellulose in eine Säule mit einem 2 cm hohen vorgepackten Fuß aus äquilibriumierter DEAE-Zellulose gepackt. Die Säule (16 \* 4 cm) wurde anschließend mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA gewaschen, bis eine konstante Grundlinie erreicht war. Die Elution erfolgte im Batch-Verfahren mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 2 mM EDTA und 0.3 M Natriumchlorid. Diverse Fraktionen wurden auf Invertaseaktivität getestet und die Fraktionen mit der Hauptaktivität vereinigt. Abb. 11 zeigt das Elutions- und Aktivitätsprofil dieses Säulenlaufes. Es folgte eine Dialyse über Nacht gegen 2 \* 5 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA.

#### *Q-Sepharose Fast Flow, pH 5.0:*

Das Dialysat (195 ml) wurde auf eine mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA voräquilibriumierte Q-Sepharose Fast Flow Säule (10.5 \* 2.8 cm) aufgetragen und gewaschen. Anschließend wurde mit 600 ml eines linearen Gradienten von 0-0.3 M Natriumchlorid in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, und 2 mM EDTA eluiert. In Abbildung 12 ist das Elutionsdiagramm dargestellt. Die Aktivität verschiedener Fraktionen wurde getestet, die Fraktionen mit der Hauptaktivität, die bei 0.2 M NaCl festgestellt wurden, gesammelt und über Nacht gegen 2 \* 5 l 50 mM Imidazol, pH 6.5 und 2 mM EDTA dialysiert.

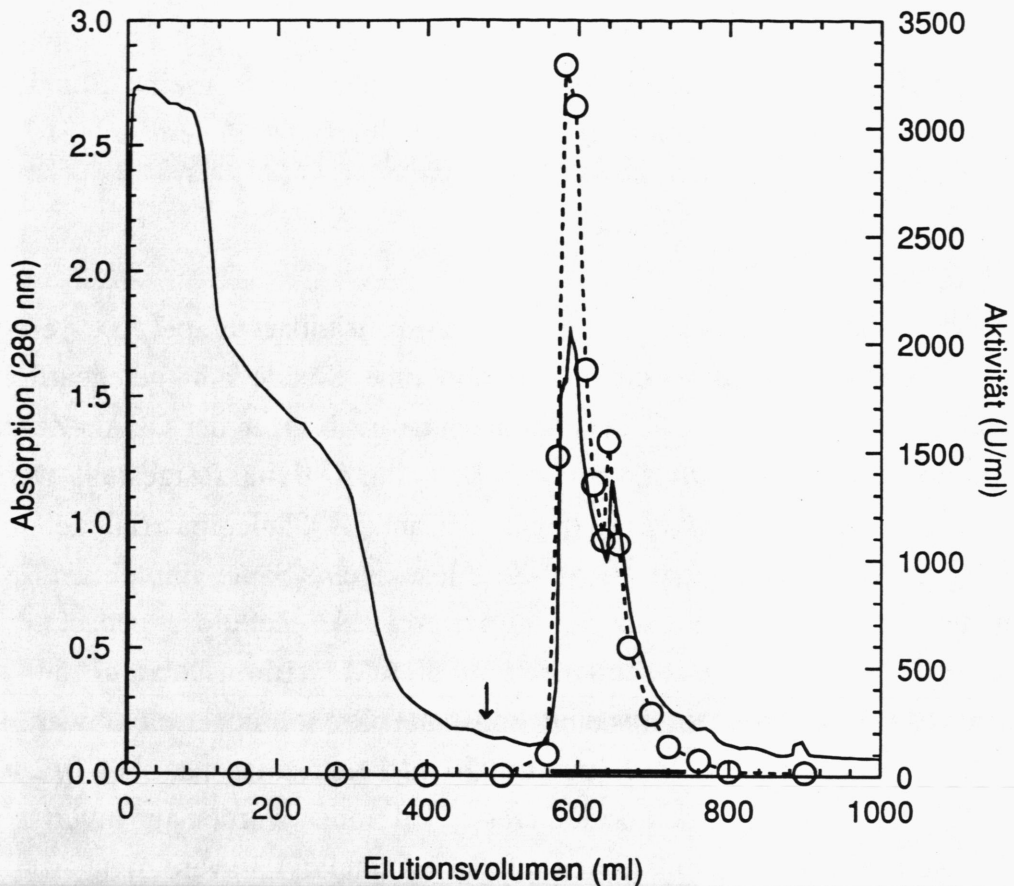


Abb. 11: Reinigung von interner Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie im Batch-Verfahren über DEAE-Zellulose DE 52 mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Säulenabmessungen betrugen 16 \* 4 cm. Die Elution erfolgte mit einem Batch mit 0.3 M NaCl in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Flußrate betrug 200 ml/h, die Fraktionsgröße 7 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○--○ : Invertaseaktivität in U/ml

Der Pfeil zeigt den Beginn der Elution, der Balken am unteren Rand die vereinigten Fraktionen.

#### *Q-Sepharose Fast Flow, pH 6.5:*

Das Dialysat (90 ml) wurde auf die mit 50 mM Imidazol, pH 6.5 und 2 mM EDTA umäquilierte Säule aufgetragen und gewaschen. Die Elution erfolgte durch 600 ml eines linearen Gradienten von 0-1 M Natriumchlorid in 50 mM Imidazol, pH 6.5 und 2 mM EDTA. Die Invertase eluierte bei ca. 0.3 M Natriumchlorid. Verschiedene Fraktionen wurden auf Aktivität getestet und dieje

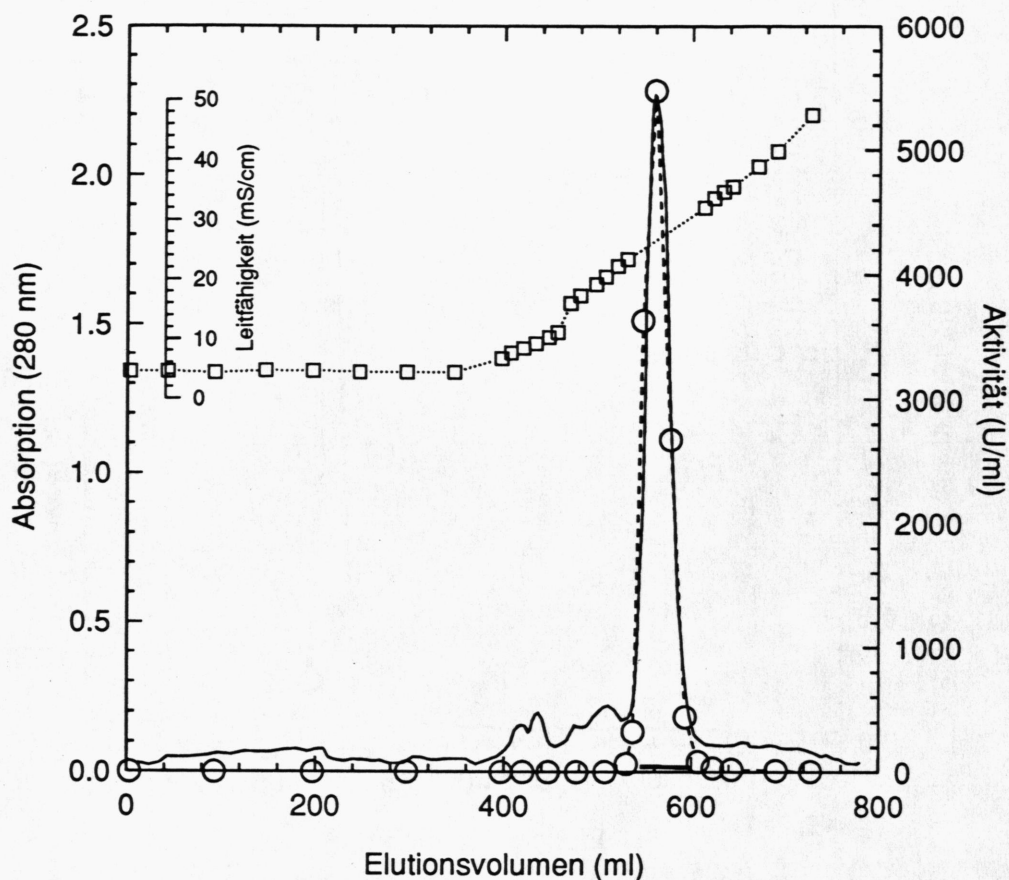


Abb. 12: Reinigung von interner Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie über Q-Sepharose Fast Flow mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Säulenabmessungen betrugen 10.5 \* 2.8 cm. Die Elution erfolgte mit 600 ml eines linearen Gradienten von 0 - 0.3 M NaCl in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Flußrate betrug 200 ml/h, die Fraktionsgröße 6 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○--○ : Invertaseaktivität in U/ml

□--□ : Leitfähigkeit in mS/cm

Der Pfeil zeigt den Beginn der Elution, der Balken am unteren Rand die vereinigten Fraktionen.

nigen mit der Hauptaktivität vereinigt (Abbildung 13). Es folgte eine Dialyse über Nacht gegen 2 \* 5 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA.

#### Phenylsepharose:

Im letzten Schritt der Reinigung wurde eine hydrophobe Chromatographie

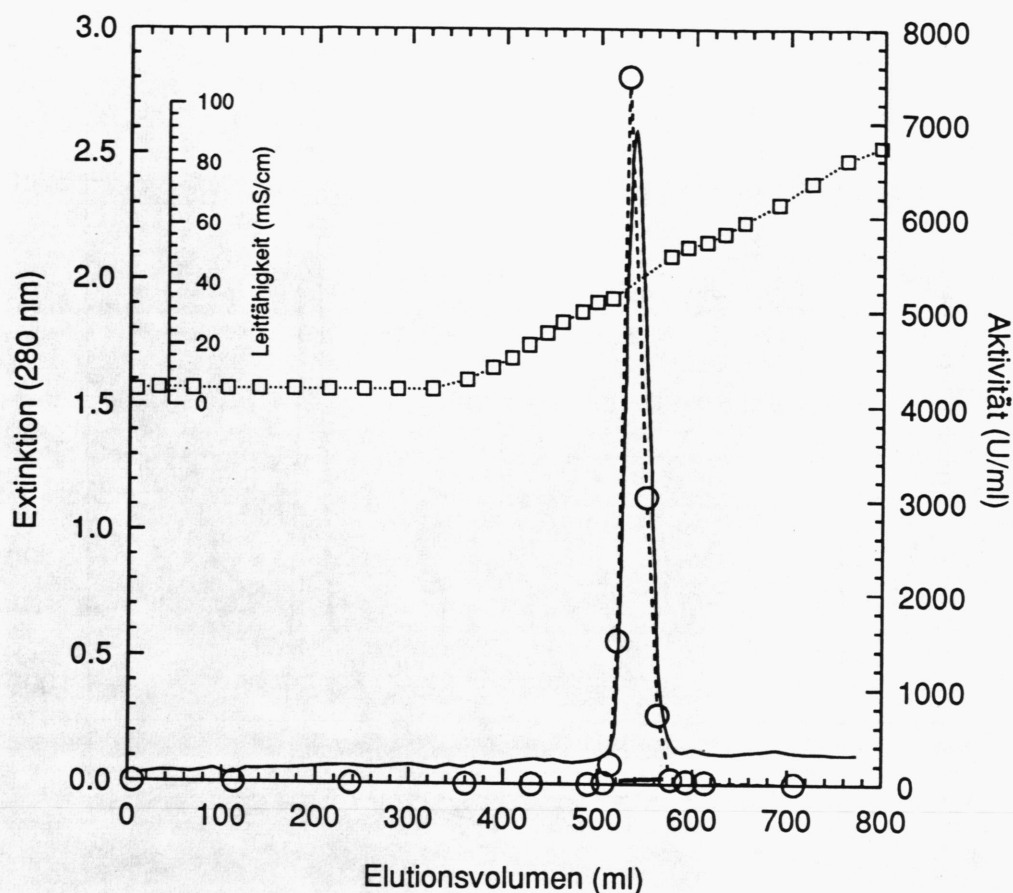


Abb. 13: Reinigung von interner Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie über Q-Sepharose Fast Flow mit 50 mM Imidazol, pH 6.5 und 2 mM EDTA. Die Säulenabmessungen betrugen 10.5 \* 2.8 cm. Die Elution erfolgte mit 600 ml eines linearen Gradienten von 0 - 1 M NaCl in 50 mM Imidazol, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Flußrate betrug 200 ml/h, die Fraktionsgröße 7 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○—○ : Invertaseaktivität in U/ml

□—□ : Leitfähigkeit in mS/cm

Der Pfeil zeigt den Beginn der Elution, der Balken am unteren Rand die vereinigten Fraktionen.

mit einer Phenylsepharose-Säule (8.5 \* 1 cm) verwendet. Diese wurde mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, 2 mM EDTA und 20% Ammoniumsulfat äquilibriert. Das Dialysat (52 ml) wurde durch Zugabe von 5.93 g Ammoniumsulfat auf 20% Sättigung gebracht und auf die Säule aufgetragen. Danach wurde zunächst mit 20%, anschließend mit 10% Ammoniumsulfat, jeweils in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA, gewaschen, um schwächer gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution erfolgte mit reinem Puffer (50 mM

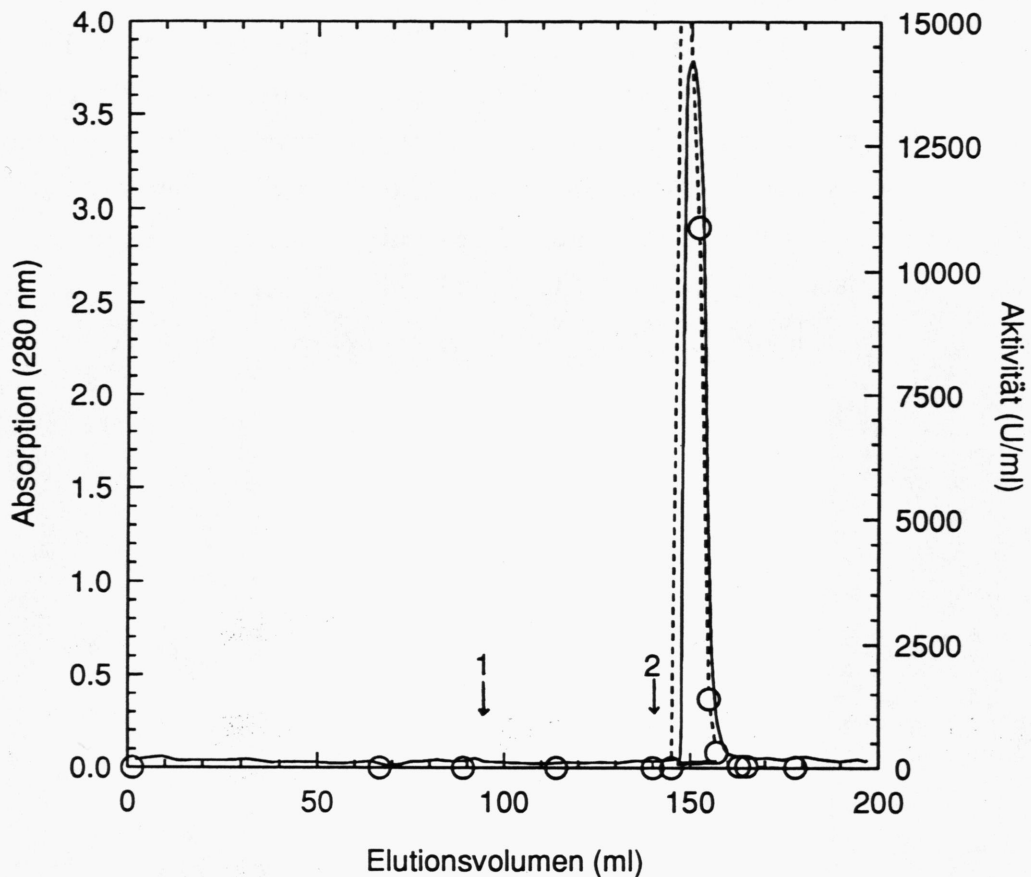


Abb. 14: Reinigung von interner Invertase durch hydrophobe Chromatographie über Phenylsepharose mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Säulenabmessungen betrugen 8.5 \* 1 cm. Die Auftragung und das Waschen erfolgte in 20% Ammoniumsulfat, die Elution zunächst in 10%, anschließend mit 0% Ammoniumsulfat, jeweils in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 und 2 mM EDTA. Die Flußrate betrug 40 ml/h, die Fraktionsgröße 1.5 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○--○ : Invertaseaktivität in U/ml

Der erste Pfeil zeigt den Beginn der Elution mit 10% Ammoniumsulfat, der zweite den Beginn der Elution mit 0% Ammoniumsulfat. Der Balken am unteren Rand zeigt die weiterverwendeten Fraktionen.

Natriumacetat, pH 5.0, 2mM EDTA) (Abbildung 14). Die Fraktionen mit Invertaseaktivität wurden vereinigt und über Nacht gegen 2 \* 5 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 dialysiert.

### Diskussion der Reinigung

Die interne Invertase konnte durch diese Methode bis zur elektrophoretischen Reinheit angereichert werden. Zur Erklärung der zusätzlichen Banden muß angemerkt werden, daß das Gel zweimal gefärbt wurde, da Invertase trotz relativ hoher Konzentrationen beim Auftragen nur schwach färbt. Dadurch wurden auch sonst nicht erkennbare Verunreinigungen, die sonst vernachlässigbar sind, noch sichtbar. Abbildung 15 zeigt die Zunahme der Reinheit der internen Invertase im Verlauf der einzelnen Reinigungsschritte.

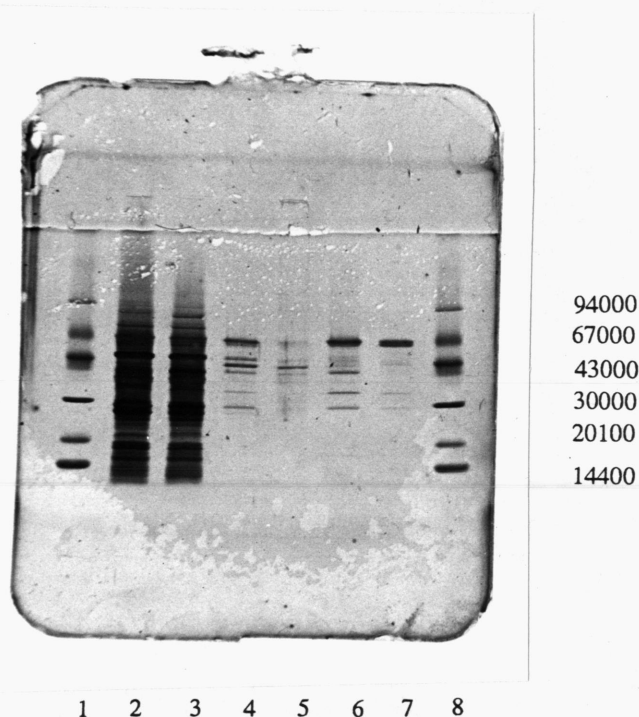


Abb. 15: Zunahme der Reinheit von interner Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* während der Präparation. Es wurden jeweils 1 µl der aktiven Fraktionen auf ein SDS-Gradientengel aufgetragen.

- 1: Marker
- 2: Zellaufschluß nach Zentrifugation
- 3: Zellaufschluß nach Ammoniumsulfatfällung und Dialyse
- 4: Dialysat nach Deae-Zellulose-Chromatographie
- 5: Dialysat nach Q-Sepharose-Fast Flow-Chromatographie, pH 5.0
- 6: Dialysat nach Q-Sepharose-Fast Flow-Chromatographie, pH 6.5
- 7: Dialysat nach Phenylsepharose-Fast Flow-Chromatographie
- 8: Marker

Im Vergleich zu anderen Reinigungsverfahren konnten durch die Verwendung des transformierten Hefestammes wesentlich höhere Ausbeuten an interner Invertase im Verhältnis zur eingesetzten Zellmasse erzielt werden. So war die Ausbeute ca. 13fach höher (bezogen auf 100 g Naßgewicht der Zellen) als bei einer vergleichbaren Präparation aus dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* DBY 469-SUC 2 (N. Schülke, 1988). Auch die Ausbeute, bezogen auf den Anteil an Invertase im Rohextrakt, konnte von 17% auf 27% gesteigert werden. Während einer vorhergehenden Reinigung stellte sich heraus, daß sich das Pellet nach der Ammoniumsulfatfällung in einer relativ geringen Menge Puffer (ca. 100 ml) auflösen ließ. Nach der Dialyse konnte aber keine Aktivität, weder im Niederschlag noch im Überstand, festgestellt werden. Vermutlich war die Gesamtproteinkonzentration so hoch, daß die Invertase irreversibel aggregierte und nicht mehr reaktiviert werden konnte. Auch bei der beschriebenen Präparation aggregierte vermutlich noch ein Teil der Invertase, da nur noch 51% der im Rohextrakt vorhandenen Aktivität nach der Dialyse des gelösten Pellets der Ammoniumsulfatfällung im Dialysat vorhanden war (Tab. 4). Bei einer vergleichbaren Reinigung während der Vorversuche mit einer geringeren Konzentration an Invertase konnten bei diesem Schritt 75% der Invertase gewonnen werden. Die Verluste im weiteren Verlauf der Präparation waren deutlich geringer. Es konnten insgesamt 37.4 mg Invertase präpariert werden. Dies entspricht einem Anteil von 27.9% der im Rohextrakt enthaltenen Menge. Die Daten des letzten Reinigungsschrittes sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4: Verlauf der Reinigung von interner Invertase<sup>①</sup>

## a) Rohextrakt bis Q-Sepharose Fast Flow pH 6.5

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Invertase <sup>②</sup> (mg)	Aktivität (U/ml)	Ausbeute (%)
Überstand Rohextrakt nach Zentrifugation	250	134	1872	100
Dialysat nach Ammoniumsulfatfällung	220	69	1142	51
Dialysat nach DEAE- Zellulose	195	51	922	38
Dialysat nach Q-Sepharose pH 5.0	84	46.9	1954	35
Dialysat nach Q-Sepharose pH 6.5	52	40.2	2709	30

## b) Dialysat nach Phenylsepharose:

Fraktion	Volumen (ml)	Extinktion (280 nm)	Aktivität (U/ml)	spez. Akt. (U/mg)
Hauptfraktion	2.8	17.7	25659	3260
Randfraktion 1	5.2	6.2	9560	3464
Randfraktion 2	4.65	0.84	768	3657

① Das Nassgewicht der Zellen vor dem Aufschluß betrug 100 g

② Die ungefähre Menge an Invertase wurde durch folgende Formel errechnet :

$$\text{Invertase (mg)} = \text{Aktivität (U/ml)} \cdot \text{Volumen (ml)} / \text{spezifische Aktivität}$$

(angenommener Wert: 3500 U/mg)

### 3.4 Limitierte Proteolyse von interner Invertase

Trypsin, eine Serin-Protease, wurde als eines der ersten proteolytischen Enzyme in reiner Form und ausreichenden Mengen für chemische und enzymatische Analysen aus Rinderpankreas isoliert. Dabei wurde zunächst der Vorläufer des Trypsins, das Trypsinogen, präpariert (Balls, 1965; Schroeder & Shaw, 1968). Das aktive Enzym entsteht durch Spaltung der Peptidbindung zwischen den Aminosäureresten Lysin-6 und Isoleucin-7 aus seinem Zymogen, z. B. durch Autokatalyse im neutralen oder basischen pH-Bereich (Pechère & Neurath, 1957) oder Proteolyse durch Trypsin oder verschiedene andere proteolytische Enzyme (Keil, 1971). Trypsin aus Rinderpankreas enthält 229 Aminosäurereste, entsprechend einem Molekulargewicht von 23991 (Walsh & Neurath, 1964). Es spaltet spezifisch auf der Carboxylseite von Lysin- und Argininresten in natürlichen und künstlichen Substraten (Neurath & Schwert, 1950). Am katalytischen Prozess sind die Aminosäurereste Serin-183 und Histidin-46, an der Bindung des Substrates Aspartat-177 beteiligt (Keil, 1971). Das Aktivitätsmaximum von Trypsin liegt zwischen pH 7.0 und 9.0.

#### *Problemstellung:*

Im ersten Teil dieser Versuche wurde untersucht, ob durch Inkubation von interner Invertase in Gegenwart von Trypsin eine Fragmentierung erfolgt. Als proteolytisch aktives Enzym wurde Trypsin ausgewählt, da es sehr spezifisch die Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Lysin und Arginin hydrolysiert. Da vermutlich viele potentielle Spaltstellen im Enzym dem Trypsin nicht zugänglich sind, sollten erwartungsgemäß wenige Fragmente gebildet werden. Im nächsten Schritt sollte die gespaltene Invertase gereinigt und danach deren Stabilität im Vergleich zur nativen Invertase untersucht werden.

#### 3.4.1 Proteolyse von interner Invertase durch Trypsin

##### *Proteolyse durch einmalige Zugabe von Trypsin*

In Vorversuchen war bereits festgestellt worden, daß zur limitierten Proteolyse von interner Invertase relativ hohe Konzentrationen an Trypsin eingesetzt werden müssen. Daher wurden gleiche Konzentrationen von Invertase und

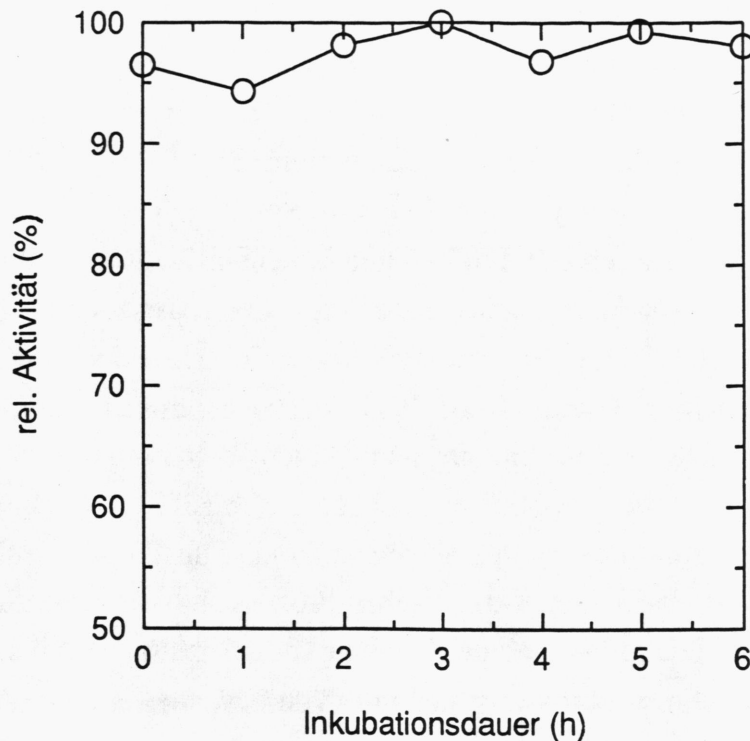


Abb. 16: Aktivität der Invertase während der Proteolyse durch Trypsin. Die Inkubation erfolgte in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 bei 30°C. Die Konzentrationen von Invertase und Trypsin während der Inkubation betrugen jeweils 0.5 mg/ml. In den Standardaktivitätstest wurden jeweils 10 µl des Ansatzes, 1/50 verdünnt, eingesetzt und die Aktivität relativ zum Maximalwert bestimmt.

Trypsin verwendet. Der pH-Wert wurde so gewählt, daß noch keine Denaturierung der nativen Invertase stattfindet und sich das Trypsin im Maximum seiner Aktivität (pH 8.0) befand. Dem Inkubationsansatz wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und auf Invertaseaktivität untersucht (Abb. 16). Es ist zu erkennen, daß die Aktivität der Invertase während des Versuches im Rahmen der Meßgenauigkeit im Vergleich zum Kontrollversuch nicht abnimmt. Um den Verlauf der Spaltung verfolgen zu können, wurde nach jeweils zwei Stunden eine Probe entnommen und gelelektrophoretisch untersucht. Den Proben wurde sofort nach der Entnahme PMSF zugegeben, um Trypsin zu hemmen und damit eine Verfälschung der Ergebnisse der Proteolyse durch eine Aktivierung der Protease oder eine Veränderung der Struktur der Invertase und damit einer zufälligen Spaltung während des Hitze-

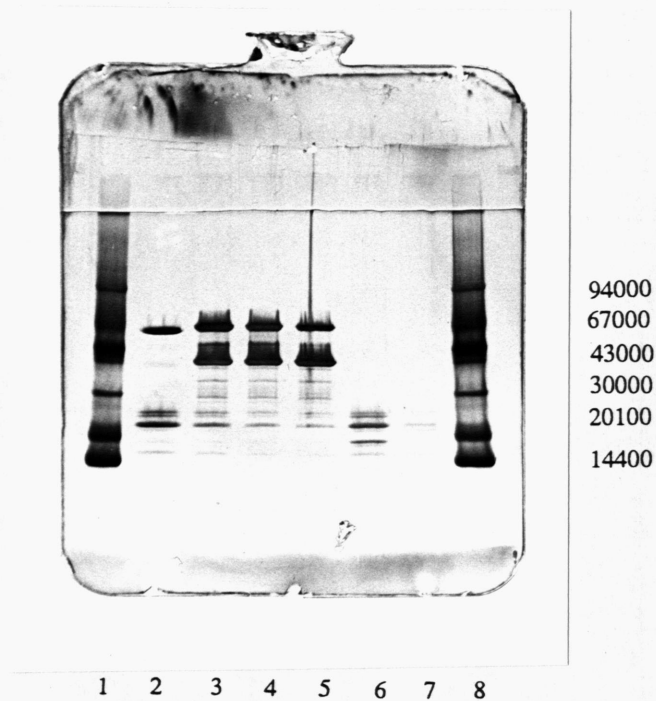


Abb. 17: Proteolyse von interner Invertase durch einmalige Zugabe von Trypsin. Die Proteolyse erfolgte in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 bei 30°C. Die Proteinkonzentrationen während der Inkubation betrugen jeweils 0.5 mg/ml. Nach jeweils zwei Stunden wurden 50 µl der Proben entnommen, zu 50 µl Inkubationspuffer mit 4 mM PMSF gegeben und für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Zur Kontrolle wurden Invertase sowie Trypsin unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

- 1: Marker
- 2: Proteolysedauer 0h
- 3: Proteolysedauer 2h
- 4: Proteolysedauer 4h
- 5: Proteolysedauer 6h
- 6: Trypsin
- 7: Trypsin nach 6 Stunden Inkubation
- 8: Marker

schrittes zu vermeiden. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese. Es ist zu erkennen, daß eine Proteolyse durch Trypsin stattfindet. Dabei entstehen zwei Spaltprodukte mit Molekulargewichten von etwa 20000 Da bzw. 40000 Da. Bei diesem Gel und den folgenden ist auffällig, daß das kleine Fragment durch diese Art der Färbung nicht oder nur sehr schwach angefärbt wurde. Zudem ist es von den Autoproteolysefragmenten von Trypsin nur

schwer unterscheidbar. Dieses Fragment entsteht jedoch tatsächlich, wie in dem Gel für die Ansequenzierung der Fragmente zu erkennen ist (Abb. 25). Die Spaltung war jedoch nicht vollständig. Dies ist vermutlich auf die Autoproteolyse und damit Inaktivierung des Trypsins zurückzuführen. Darauf weist auch die in Abbildung 18 dargestellte starke Abnahme der Aktivität von Trypsin unter den in den Versuchen vorliegenden Bedingungen hin.

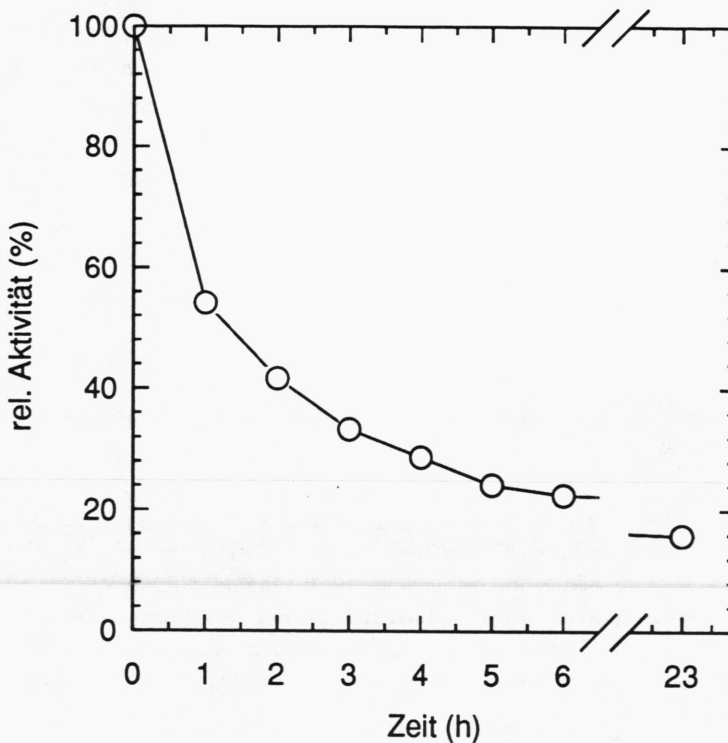


Abb. 18: Abnahme der Aktivität von Trypsin. Die Inkubation erfolgte in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0 bei 30°C. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, in den Aktivitätstest für Trypsin eingesetzt und die Aktivität relativ zum Zeitpunkt  $t=0$  bestimmt.

### *b) Proteolyse durch immobilisiertes Trypsin*

In einem weiteren Experiment wurde versucht, eine vollständige Spaltung der nativen Invertase durch immobilisiertes Trypsin zu erreichen. Immobilisiertes Trypsin hat mehrere Vorteile. Erstens findet keine Autoproteolyse statt, so daß kein Aktivitätsverlust zu erwarten ist und die limitierte Proteolyse der Invertase bei einmaliger Zugabe vollständig sein sollte. Zum zweiten wäre keine Nachreinigung der Spaltprodukte nötig, da das Trypsin am Trägermate-

rial gebunden bleibt und die Enzymlösung nur abzentrifugiert zu werden braucht. Außerdem sollte es durch die Kopplung an das Trägermaterial nach Angaben des Herstellers mehrere Monate haltbar und öfter verwendbar sein. Ein Nachteil ist, daß die Inkubationszeiten erhöht werden müssen, da keine Diffusion der Trypsinmoleküle mehr stattfinden kann. In diesem Versuch wurde Trypsin mit Eupergit C inkubiert und anschließend freie Gruppen mit Glycin abgesättigt, um zu vermeiden, daß Invertase an das Material bindet. In eine Mobicol-Säule wurde 1 cm hoch immobilisiertes Trypsin gefüllt und mit 0.1 M Tris/HCl gewaschen. Der Puffer wurde abzentrifugiert und die Invertasestammlösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde die Invertaselösung abzentrifugiert und zusammen mit der Waschlösung auf ein Phast-Gel aufgetragen. Auf Abbildung 19 erkennt man, daß eine Proteolyse stattfindet. Diese scheint aber unspezifischer als beim nicht-immobilisiertem Trypsin zu sein, da mehr als zwei Banden auftreten. Möglicherweise finden Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und der Invertase statt, die die Zugänglichkeit zu potentiellen Spaltstellen verändern. Auch eine Veränderung der Struktur von Trypsin und damit der Bindung des Substrates im aktiven Zentrum durch die Kopplung an Eupergit C könnte in Betracht gezogen werden. Weiter ist noch eine Nativbande zu erkennen. Diese native Invertase konnte zwar durch längere Inkubationsdauer verdaut werden, dabei nimmt aber auch der Anteil an Fragmenten ab. Dies bedeutet, daß ein Teil der Invertase so weit hydrolysiert wird, daß die Fragmente nicht mehr auf dem Gel nachweisbar sind.

### *c) Proteolyse durch Trypsinpulse*

Da durch einmalige Zugabe von Trypsin keine vollständige Verdauung der Invertase erreicht werden konnte, und auch die Verwendung von immobilisiertem Trypsin kein befriedigendes Resultat erbrachte, wurde im nächsten Versuch einer vorgelegten Invertaselösung das Trypsin portionsweise in einstündigen Abständen zugegeben, bis gleiche Konzentrationen (in mg/ml) beider Proteine erreicht waren. Die sonstigen Bedingungen entsprachen denen bei der einmaligen Zugabe von Trypsin. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben für einen Invertaseaktivitätstest sowie eine Gelelektrophorese entnommen. Die Proben wurden mit 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 verdünnt. Zusätzlich

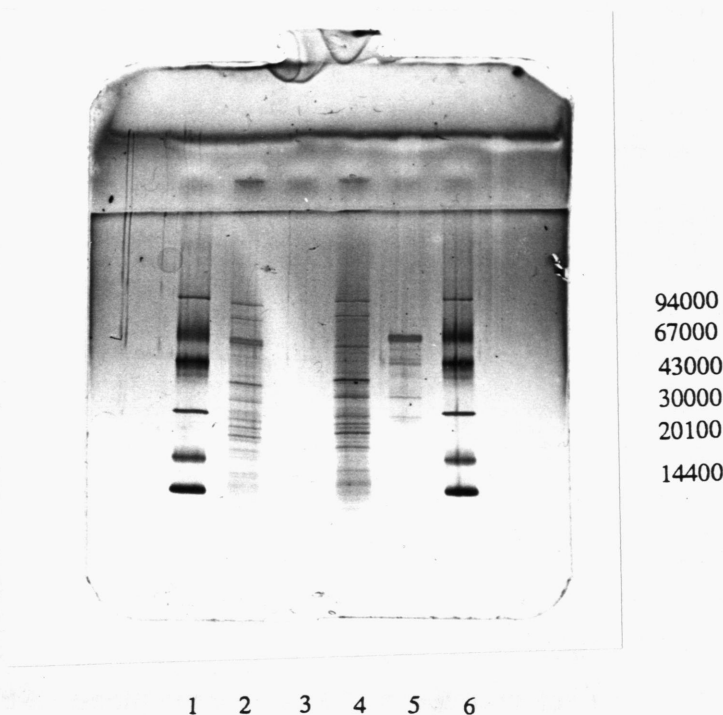


Abb. 19: Proteolyse von interner Invertase durch immobilisiertes Trypsin. In einer Mobicolsäule, die 1 cm hoch mit immobilisiertem Trypsin gefüllt war, wurde Invertaselösung (0.5 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl) so eingefüllt, daß kein Überstand zu erkennen war. Die Inkubation erfolgte 16 Stunden bei 30°C. Nach der Inkubationszeit wurde die Invertaselösung abzentrifugiert und die Säule gewaschen. Es wurden jeweils 1 µl Proteinlösung nach entsprechender Vorbereitung auf ein Pharmacia SDS-Gel aufgetragen.

- 1: Marker
- 2: Durchlauf nach Auftragung der Invertase
- 3: Durchlauf nach Waschen der Säule
- 4: Proteolytisch verdaute Invertase
- 5: Native Invertase
- 6: Marker

enthält dieser Puffer PMSF. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes in einen Bereich, in dem Trypsin nicht mehr optimal aktiv ist, sowie durch den Serinproteaseninhibitor PMSF sollte eine weitere, möglicherweise unspezifische Spaltung, z.B. während des Erhitzens für die Elektrophorese, verhindert werden. Auf Abbildung 20 ist zu sehen, daß die Nativbande während des Versuchsablaufes verschwindet und mit deren Abbau die Intensität der Fragmente zunimmt. Die Fragmente sind in der Größe identisch mit denen, die bei der

einmaligen Zugabe durch Trypsin gebildet wurden. Die weiteren Banden, die auf dem Gel zu erkennen sind, stammen vom Trypsin und dessen autoproteolytischen Abbauprodukten, wie später auf Abb. 23 zu erkennen ist. Die Aktivität der Invertase änderte sich während der Proteolyse nicht. Dies bedeutet, daß die Hydrolyse einer Bindung durch Trypsin keinen für die Aktivität der Invertase wichtigen Bereich betrifft.

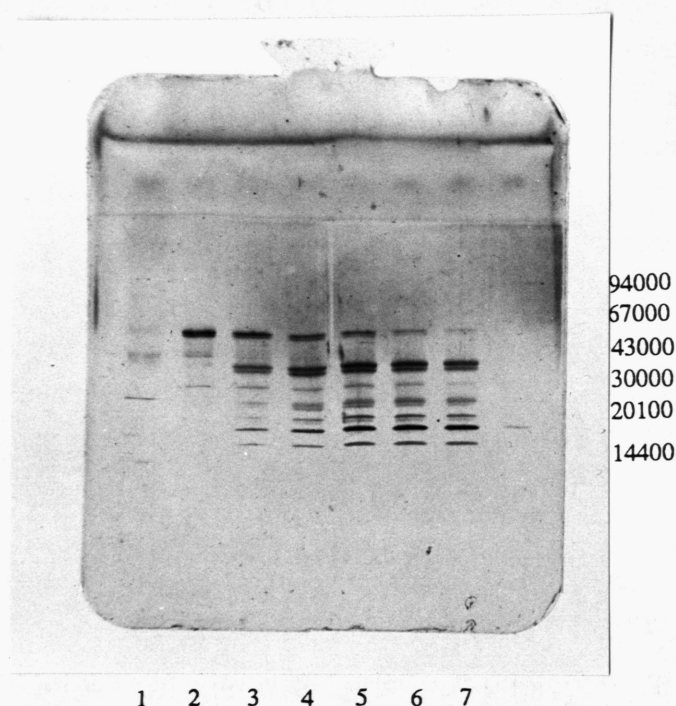


Abb. 20: Verlauf der Proteolyse bei Zugabe von Trypsinpulsen. Zu 1 ml Invertaselösung (1 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  und anschließend in Abständen von einer Stunde 200  $\mu$ l Trypsinlösung (1 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Nach jeweils einer Stunde wurden Proben für die Gelelektrophorese und den Aktivitätstest entnommen.

- 1: Marker
- 2: native Invertase
- 3: Inkubationszeit 1h
- 4: Inkubationszeit 2h
- 5: Inkubationszeit 3h
- 6: Inkubationszeit 4h
- 7: Inkubationszeit 5h

### 3.4.2 Reinigung und Konzentrierung der gespaltenen Invertase

#### a) *Reinigung der gespaltenen Invertase*

Anmerkung: Die proteolytisch gespaltene und gereinigte interne Invertase wird im folgenden auch als Invertase-T bezeichnet.

Die unterschiedlichen pK-Werte von interner Invertase (4.5) und Trypsin (10.1) legten es nahe, für die Trennung der beiden Proteine einen Ionenaustauscher zu verwenden. Invertase ist bei pH 8.0 negativ geladen und sollte damit sehr gut, Trypsin aufgrund seiner bei diesem pH-Wert positiven Ladung dagegen schlecht oder überhaupt nicht an einen Anionenaustauscher binden. Es konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß durch die Proteolyse beider Enzyme Fragmente entstanden waren, die andere isoelektrische Punkte besitzen. Aufgrund der guten Ergebnisse bei der Präparation von interner Invertase wurde als Ionenaustauscher wieder Q-Sepharose Fast Flow verwendet. Eine Mobicol-Säule wurde bei pH 8.0 äquilibriert und der Spaltansatz aufgetragen. Trypsin bindet unter diesen Bedingungen nicht an den Ionenaustauscher und kann gelelektrophoretisch im Durchfluß nachgewiesen werden. Die Elution der Invertase erfolgte zunächst durch einen Gradienten von 10 ml 0.1 M NaCl (Abb. 21). Dies erbrachte aber keine weitere Abtrennung von Verunreinigungen und führte zu einer relativ starken Verdünnung der Invertase-T, so daß die Elution in den weiteren Präparationen mit einem Puls von 0.3 M NaCl durchgeführt wurde. Abbildung zeigt das Elutionsdiagramm einer auf diese Art durchgeführten Reinigung. Die Fraktionen mit Invertaseaktivität wurden gesammelt.

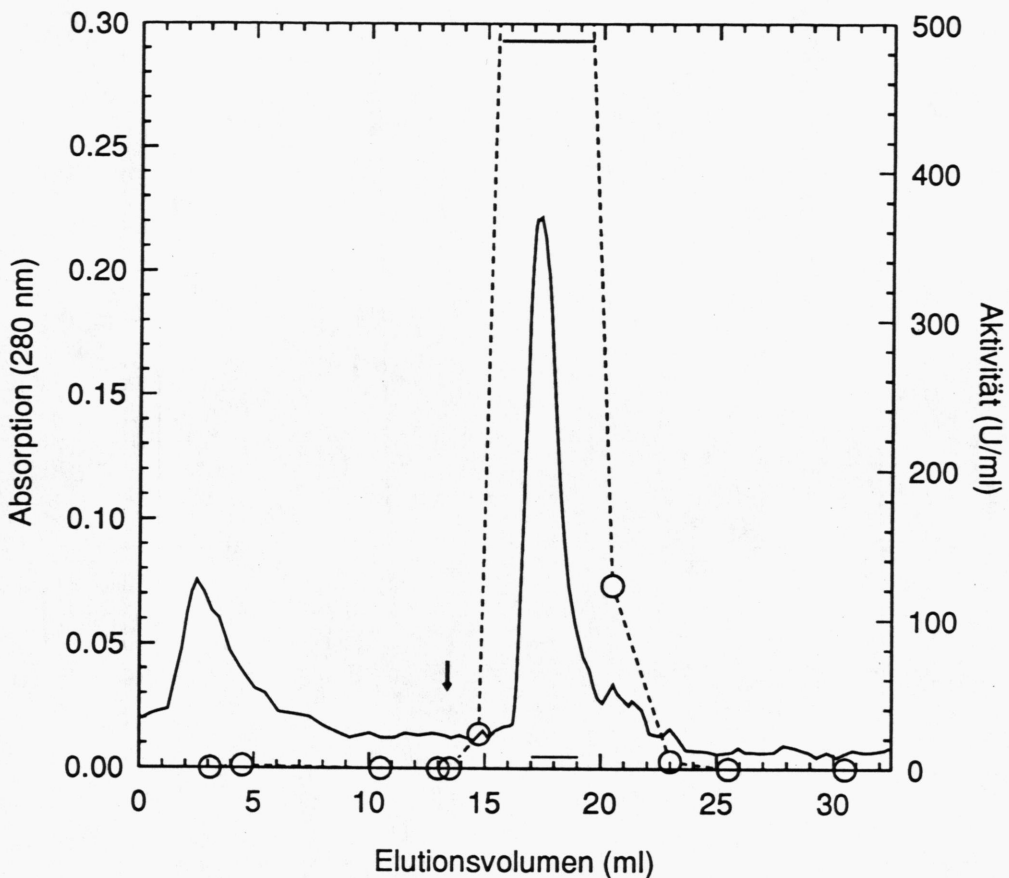


Abb. 21: Reinigung von tryptisch gespaltenen interner Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie über Q-Sepharose Fast-Flow mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0. Die Säulenabmessungen betragen 1 \* 0.7 cm. Die Elution erfolgte mit 10 ml eines Gradienten von 0 - 1 M NaCl in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0. Die Flußrate betrug 15 ml/h, die Fraktionsgröße 0.5 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○-○ : Invertaseaktivität in U/ml

Der Balken am unteren Rand zeigt die weiterverwendeten Fraktionen, der Pfeil den Beginn des Gradienten.

### b) Konzentrierung der Invertase-T

Da die Konzentration der Invertase-T zu gering für weitere Untersuchungen war, wurden die gesammelten Fraktionen in der Speedvac eingengt. Um die Salzkonzentration des Puffers während der Aufkonzentrierung nicht zu hoch ansteigen zu lassen, wurden die Proben vorher über Nacht gegen 10 mM Natriumacetat, pH 5.0, dialysiert und anschließend in der Speedvac in ca. einer Stunde auf 1/10 des ursprünglichen Volumens reduziert. Danach folgte

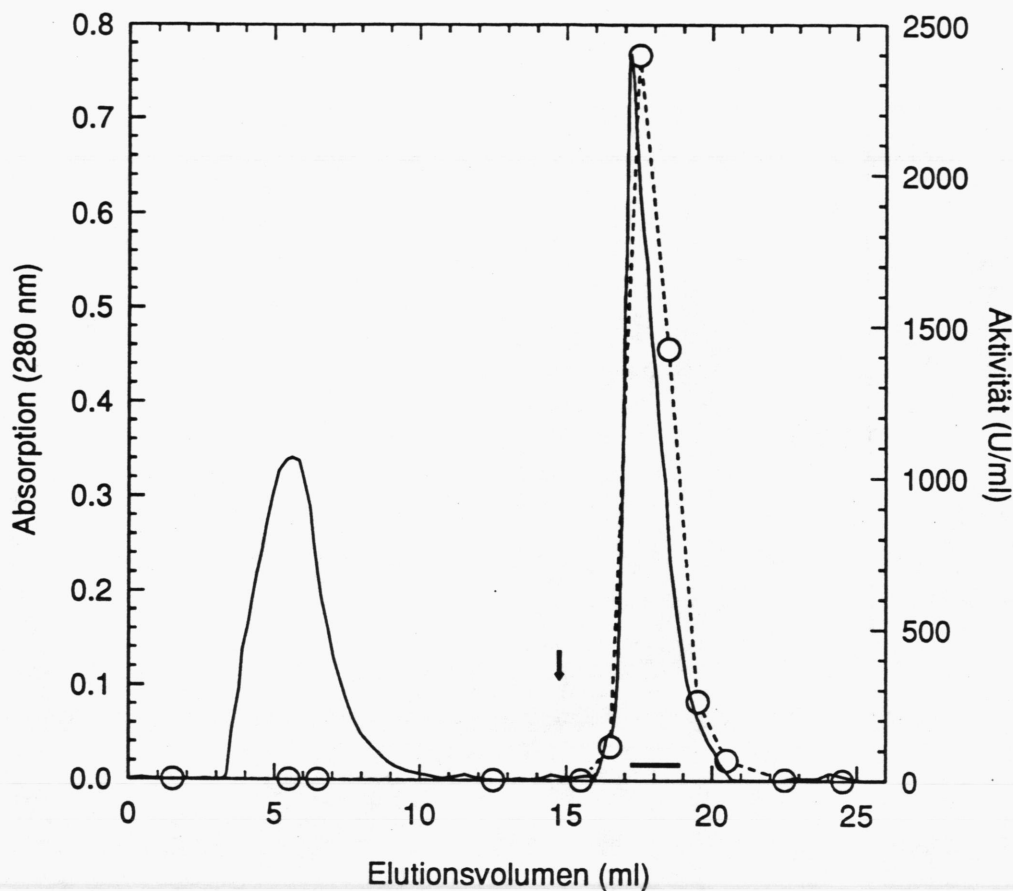


Abb. 22: Reinigung von tryptisch gespaltener interner Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie über Q-Sepharose Fast-Flow mit 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0. Die Säulenabmessungen betrugen 1 \* 0.7 cm. Die Elution erfolgte mit 0.3 M NaCl in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0. Die Flußrate betrug 15 ml/h, die Fraktionsgröße 0.5 ml.

— : Absorption bei 280 nm

○-○ : Invertaseaktivität in U/ml

Der Balken am unteren Rand zeigt die weiterverwendeten Fraktionen, der Pfeil den Beginn des Salzpulses.

eine Dialyse gegen 50 mM Natriumacetat, pH 5.0. Zur Kontrolle der Reinheit der Invertase-T wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 23). Zur Kontrolle wurden die Trypsinfraktion der Ionenaustauscherchromatographie, natives Trypsin sowie native Invertase aufgetragen. Der Vergleich der Bandenmuster von Trypsin und Invertase vor und nach Ionenaustauscherchromatographie zeigt einen deutlichen Reinigungseffekt. Außerdem konnte durch dieses Gel nachgewiesen werden, daß es sich beim Peak im Durchlauf der Q-Sepharose

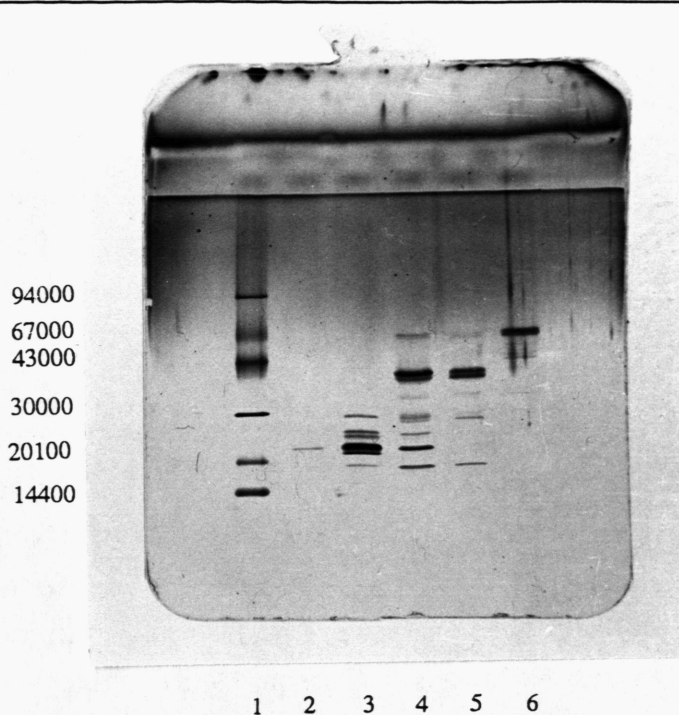


Abb. 23: SDS-Gelelektrophorese verschiedener Fraktionen der Reinigung von Invertase-T über Q-Sephrose Fast Flow.

- 1: Marker
- 2: Trypsinfraktion des Eluats
- 3: natives Trypsin
- 4: Invertase-T vor der Reinigung
- 5: Invertase-T nach der Reinigung
- 6: native Invertase

Fast Flow um Trypsin handelt, auch wenn diese Bande aufgrund der hohen Verdünnung nur schwach zu erkennen ist. Weiterhin zeigt dieses Gel, daß das kleine Fragment durch die Silberfärbung, trotz Nachfärbung, äußerst schlecht zu erkennen ist. Dieses Problem trat auch auf den vorhergehenden Gelen auf. Lediglich auf dem überladenen Gel für die Sequenzierung und durch Coomassie-Blue-Färbung wird dieses Fragment deutlich erkennbar (Abb. 25).

### 3.4.3 Charakterisierung der gespaltenen Invertase

#### 3.4.3.1 Ansequenzierung der Fragmente

Zur genauen Bestimmung der Spaltstelle in der Aminosäuresequenz wurden die beiden Fragmente durch SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 25 zeigt die mit Coomassie-Blue gefärbte Hälfte des Gels. Auf diesem Gel sind deutlich die beiden Fragmente zu erkennen. Die Konzentration der Proteinen auf diesem Gel ist etwa 10fach höher als für eine normale Färbung an Protein nötig ist. Daher sind auch noch Verunreinigungen zu erkennen. Jedes dieser Spaltprodukte wurde einem automatischen Edman-Abbau unterworfen. Es ergaben sich die folgenden N-terminalen Sequenzen: Thr/Ser (konnte nicht einwandfrei bestimmt werden)-Asn-Glu-Thr-Ser-Asp sowie Ala-Asn-Ser-Tyr-Asn-Val-Asp-Leu-Ser. Durch Vergleich mit der bekannten Aminosäuresequenz von interner Invertase (Taussig & Carlson, 1983) konnte der Ort der jeweiligen Sequenz eindeutig identifiziert werden. Die Spaltstelle befindet sich demnach zwischen den Aminosäuren 354, d.h. auf der Carboxylseite von Lysin, einem typischen Substrat von Trypsin, und Alanin 355 (Abb. 3). Interessant ist auch, daß sich am aminoterminalen Ende im Gegensatz zur Literaturangabe kein Methionin befindet. Aus diesen Befunden ergeben sich für die beiden Fragmente folgende Molekulargewichte: Das größere aminoterminaler besteht aus 353 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 40300 Da, das kleinere carboxyterminale Fragment enthält 158 Aminosäuren, entsprechend einem Molekulargewicht von etwa 18050 Da. Diese Daten stimmen sehr gut mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese überein.

Von Interesse sind auch die strukturellen Eigenschaften im Bereich der Spaltstelle. Da keine Röntgenstrukturanalyse für Invertase zur Verfügung steht, wurde mit Hilfe des Computerprogrammes PEPLOT eine Sekundärstrukturanalyse angefertigt. Diese ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Aminosäuren der Signalsequenz sind in dieser Grafik ebenfalls aufgeführt. Der senkrechte Strich markiert die Lage der Spaltstelle. Auffällig ist, daß diese in einem Bereich liegt, der sich nicht durch starke Hydrophilie auszeichnet und damit besonders zum Lösungsmittel exponiert sein sollte, wie das zum Beispiel im Bereich der Aminosäure 200 der Fall ist (nach Kyte & Doolittle, 1982; Engelman et. al, 1986 ). Es scheinen hier nach Chou & Fasman (1978)

PEPLOT of: scinve.pap ck: 184, 1 to 532 June 19, 1991 09:28  
 Translate of: scinve check: 9359 from: 785 to: 2380

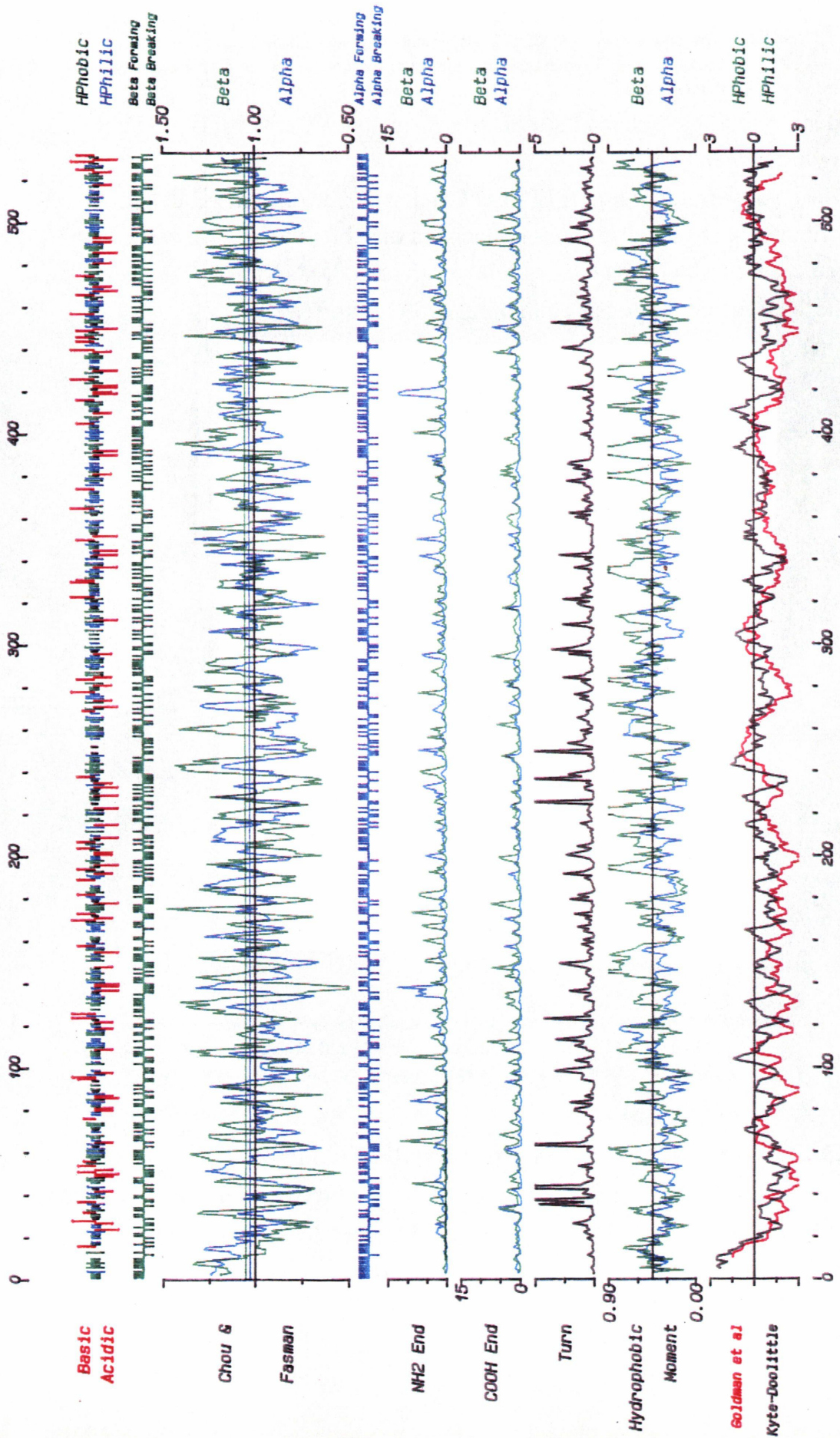


Abb. 24 (vorhergehende Seite): Graphische Darstellung der aus Primärstrukturdaten berechneten Sekundärstrukturvorhersagen von Invertase (mit Signalsequenz) durch PEPLOT.

weder ausgeprägte Sekundärstrukturelemente, noch für Turns typische Regionen vorzuliegen.

Zur Auswertung dieser PEPLOT-Daten ist anzumerken, daß hier nur Vermutungen angestellt werden können, da die computerunterstützten Vorhersagen von Strukturelementen allein aufgrund der Aminosäuresequenz nach bisherigen Erfahrungen nur zu maximal 75% zutreffen.

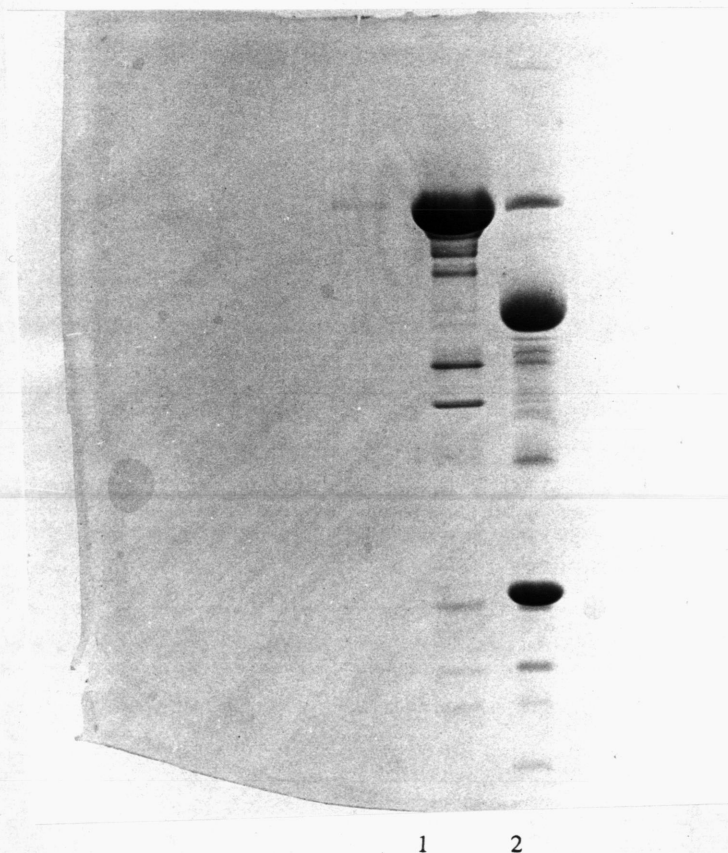


Abb. 25: SDS-Gelelektrophorese von Invertase und Invertase-T. Von beiden Formen wurden 60 µl mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen. Die zweite Hälfte dieses Gels wurde zur Ansequenzierung der Fragmente verwendet.

1: Invertase  
2: Invertase-T

### 3.4.3.2 Nativgelelektrophorese und Aktivitätsfärbung

Mit Hilfe von Nativgelelektrophorese wurde untersucht, ob die gespaltene Invertase unter nativen Bedingungen als Assoziat oder zwei getrennte Domänen vorliegt. Die beiden Invertaseformen wurden in einer Konzentration von

0.7 mg/ml auf ein Pharmacia-Gradientengel (8-25%) aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel geteilt und eine Hälfte mit Coomassie-Blue gefärbt, mit der anderen wurde eine Aktivitätsfärbung durchgeführt. Abb. 25 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Beide Invertaseformen wandern als eine Bande auf dem Gel. Sie unterscheiden sich leicht in der Wanderungsstrecke. Dies ist vermutlich auf die Einführung von zusätzlichen Ladungen an der Spaltstelle der proteolytisch verdauten Invertase zurückzuführen. Diese wirken sich bei der Nativgelelektrophorese aus, da die Wanderungsgeschwindigkeit und -strecke im Gegensatz zur SDS-Gelelektrophorese neben der Größe auch von der Eigenladung des Proteins abhängt.

Die Aktivitätsfärbung beweist, daß die gespaltene Invertase hier als Assoziat der beiden Fragmente vorliegt. Ein weiteres Ergebnis dieses Versuchs ist, daß die Invertase-T ebenso wie native Invertase als Dimer aktiv ist. Unter den hier vorliegenden Bedingungen können weder bei der gespaltenen noch bei der nativen Invertase andere Assoziate, wie z.B. Tetra- oder Oktamere, festgestellt werden.

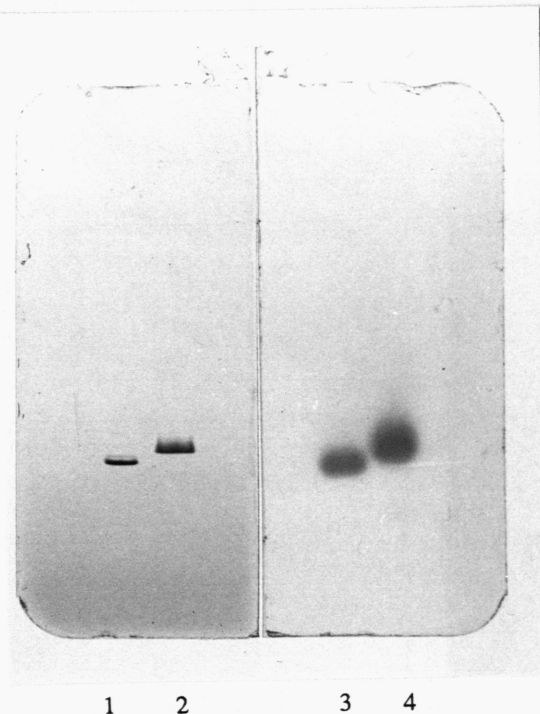


Abb. 26: Nativgelelektrophorese von nativer Invertase und Invertase-T  
1: Native Invertase, Coomassie-Blue-Färbung  
2: Invertase-T, Coomassie-Blue Färbung  
3: Native Invertase, Aktivitätsfärbung  
4: Invertase-T, Aktivitätsfärbung

### 3.4.3.3 Absorption

Ein Vergleich der Spektren beider Invertaseformen im UV-Bereich von 240-350 nm zeigt, daß diese keine Unterschiede aufweisen (Abb. 27).

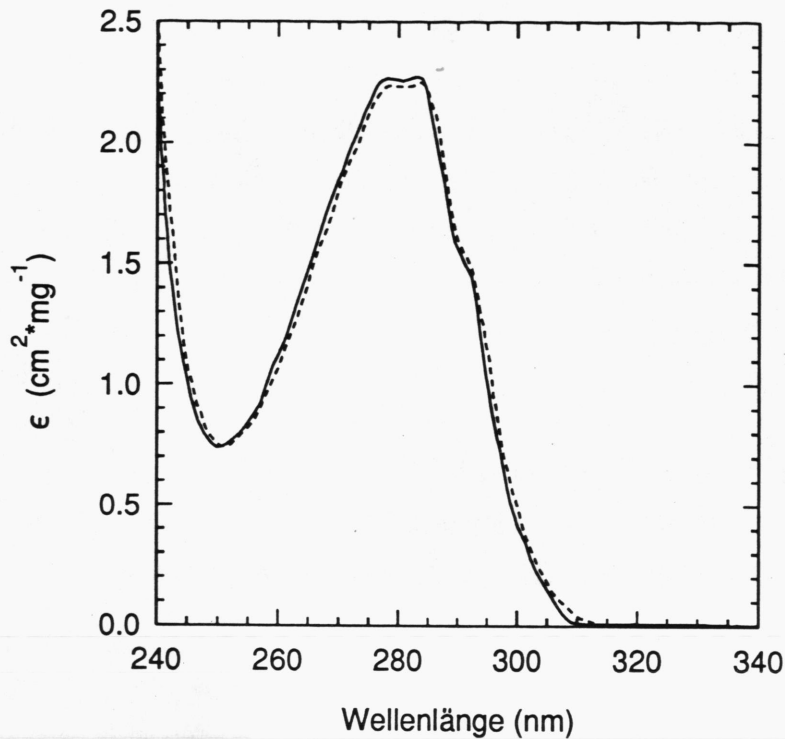


Abb. 27: UV-Absorptionsspektren von Invertase (—) und Invertase-T (---) im Bereich von 240-340 nm. Die Spektren wurden in 50 mM NaAc, pH 5.0, aufgenommen und für eine Konzentration von 1 mg/ml bei einer Schichttiefe von 1 cm berechnet.

Es sind jeweils zwei Maxima bei 282 und 276 nm vorhanden, die auf die 16 Tryptophan- und 31 Tyrosinreste zurückzuführen sind. Die Schultern bei 250-270 nm werden durch die 36 Phenylalanine verursacht. Das Minimum liegt bei 249 nm, ein Nebenminimum ist bei einer Wellenlänge von 279 nm zu erkennen. Da die beiden Spektren im UV-Bereich identisch sind, wurde für die gespaltene Invertase zur Konzentrationsbestimmung derselbe Extinktionskoeffizient verwendet wie für die unbehandelte Form. Damit konnte auch die spezifische Aktivität ermittelt werden. Dazu wurde die Aktivität der beiden spektroskopisch vermessenen Proben gemessen. Aus diesen Daten ergab sich ein Wert von 3700 U/mg für unbehandelte Invertase, für proteolytisch be-

handelte Invertase 3800 U/mg. Dies bedeutet, daß durch die Proteolyse keine Aktivität verlorenght. Die leichte Zunahme der spezifischen Aktivität ist vermutlich auf einen zusätzlichen Reinigungseffekt oder den vollständigen proteolytischen Abbau von Invertase zurückzuführen.

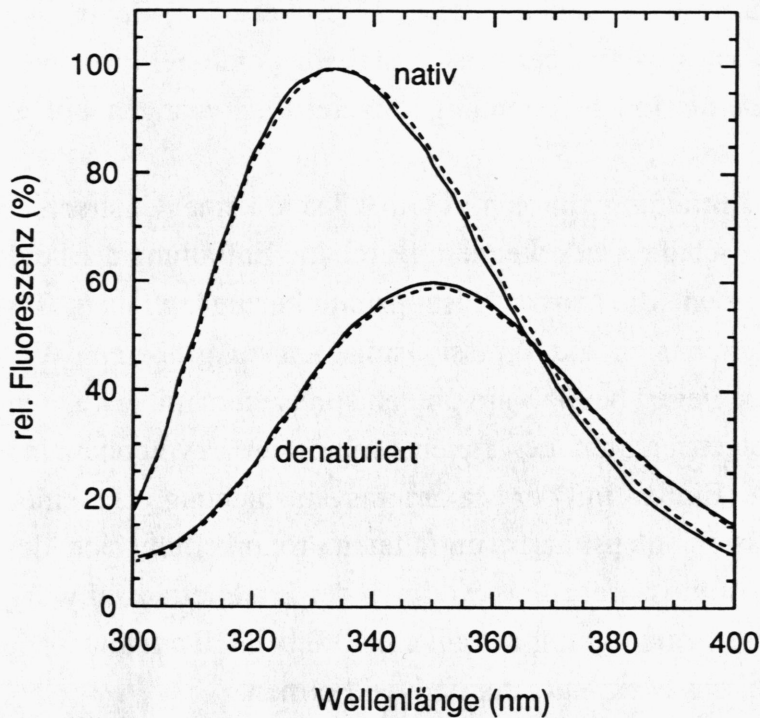


Abb.28: Fluoreszenzemissionsspektren von nativer bzw. in 4 M GuHCl denaturierter Invertase und Invertase-T. Die Konzentration an Invertase (—) und Invertase-T (---) betrug jeweils 10 µg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Die Messung erfolgte in 1 cm-Küvetten bei 20°C. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, die Spaltbreite betrug jeweils 2.5 nm.

#### 3.4.3.4 Fluoreszenz

Die beiden Invertaseformen sind auch im Fluoreszenzemissionsspektrum über den gesamten Bereich identisch, wie in Abbildung 28 zu erkennen ist. Die Spektren zeigen keine Tyrosinfluoreszenz. Dies wird durch mehrere Effekte verursacht. Invertase enthält zwar knapp doppelt so viele Tyrosin- wie Tryptophanreste, die Fluoreszenzausbeute bei gleicher Anregungsenergie ist jedoch für Tyrosin geringer. Dieser 'Sensitivitätsparameter' beträgt 1100 für Tryptophan und 200 für Tyrosin (Schmid, 1989). Dies bedeutet, daß die Fluoreszenzemission der Tryptophanreste im Falle der Invertase um den

Faktor 2.8 höher ist. Außerdem findet ein Energietransfer zwischen diesen beiden Aminosäureresten statt. Ein Teil der Tyrosinemission (bei 305 nm) führt zur Anregung der Tryptophanreste und bedingt einen Löscheffekt der Tyrosinfluoreszenz. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei 332 nm. Ein weiteres Nebenmaximum ist nicht vorhanden. Dies weist darauf hin, daß sich alle Tryptophanreste im Inneren des Proteins befinden, da in hydrophoben Umgebungen, wie sie typischerweise innerhalb gefalteter Proteine vorliegen, die Tryptophanemission in Richtung kürzerer Wellenlängen hin zu Tyrosin verschoben ist.

Auch nach Entfaltung durch 4 M GuHCl sind keine Unterschiede in den spektralen Eigenschaften zu erkennen. Durch die Entfaltung der beiden Invertaseformen werden die zuvor lösungsmittelunzugänglichen Tryptophane exponiert, wodurch sich die Emissionsmaxima zu größeren Wellenlängen verschieben. Sie liegen bei 350 nm und entsprechen damit etwa den Fluoreszenzemissionseigenschaften der freien Aminosäure Tryptophan in wäßrigen Lösungsmitteln. Einher mit der Maximumverschiebung geht eine Erniedrigung der Emissionsintensität. Im entfalteten Protein erhöht sich der Abstand zwischen den Aminosäureresten, wodurch der Energietransfer weniger wirksam wird. Diese Erniedrigung beträgt ca. 40% bei 330 nm und 60% bei 350 nm, bezogen auf das Maximum der nativen Formen.

#### 3.4.3.5 Circular dichroismus

CD-Spektren eines Proteins im Fern-UV-Bereich (170-250nm) geben Hinweise auf die Sekundärstruktur eines Proteins. Dadurch sind Vergleiche von verwandten Proteinen mit ähnlicher räumlicher Struktur möglich. Falls durch die limitierte Proteolyse der internen Invertase eine Änderung in der räumlichen Struktur erfolgt, sollte dies im CD-Spektrum nachweisbar sein. Dazu wurden die beiden Formen der Invertase gegen 40 mM Natriumphosphat, pH 6.5, dialysiert und anschließend auf eine Proteinkonzentration von 0.1 mg/ml gebracht. Die molare Elliptizität ( $\theta$ ) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\theta] = \frac{\theta * 100 * M}{c * d * N}$$

Dabei bedeuten  $[\theta]$  die molare Elliptizität,  $\theta$  die gemessene Elliptizität in Grad,  $M$  das Molekulargewicht,  $c$  die Proteinkonzentration in mg/ml,  $d$  die Schichttiefe der Küvette und  $N$  die Anzahl der Aminosäuren. Der Faktor 100 ergibt sich aus der Umwandlung der molaren Konzentration in  $\text{dmol}/\text{cm}^3$ .  $[\theta]$  hat die Einheit  $\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Abbildung 29 zeigt die Spektren von Invertase (A) und Invertase-T (B). Die Spektren zeigen hohe Homologie. Beide Formen besitzen ein lokales Minimum bei etwa 217 nm.

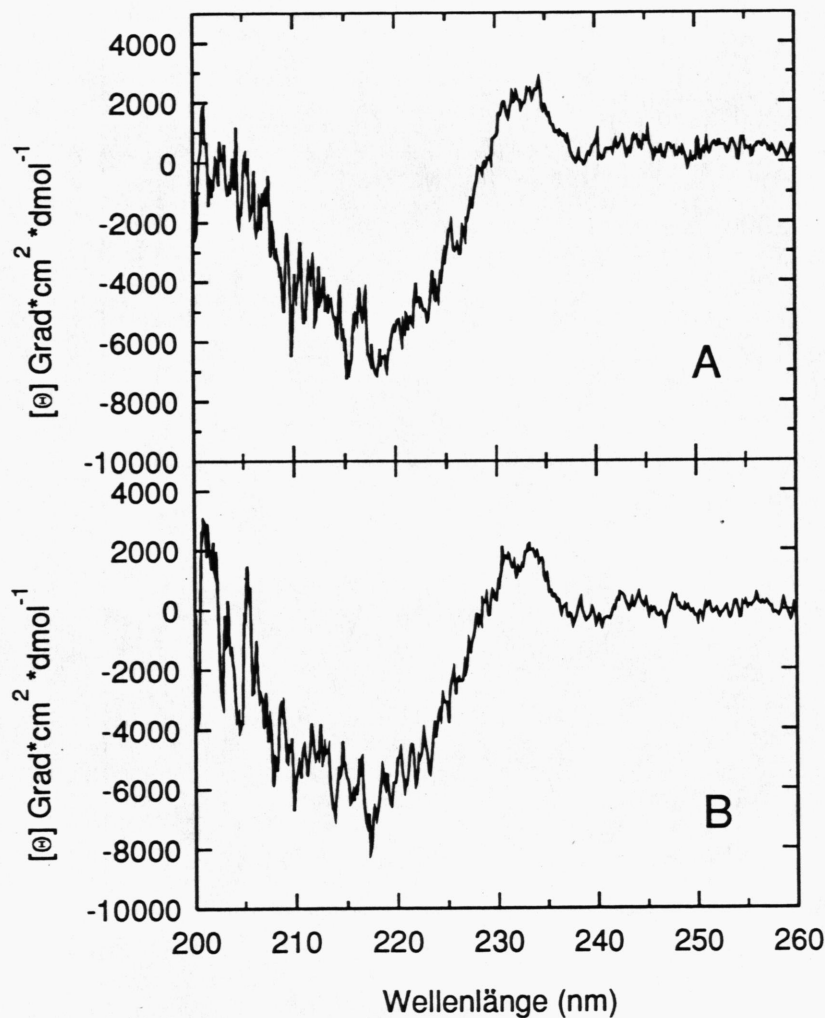


Abb. 29: CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von Invertase (A) und Invertase-T (B). Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0.1 mg/ml in 40 mM Natriumphosphat, pH 6.5. Die Schichttiefe betrug 1 mm. Die Messung erfolgte bei 25°C. Die Spektren sind aus jeweils 16 Messungen gemittelt.

Die molare Elliptizität  $[\theta]$  beträgt hier jeweils etwa  $-7000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Dieser relativ niedrige Wert deutet auf einen geringen Anteil an  $\alpha$ -Helices sowie einen entsprechend höheren Anteil an  $\beta$ -Faltblatt- und unregelmäßigen Strukturen hin. Auffallend ist das lokale Maximum bei 235 nm mit einer molaren Elliptizität von  $3000 \text{ Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ . Dieses Maximum wird vermutlich durch aromatische Seitenketten hervorgerufen, die typischerweise für eine Erhöhung des Signals bei 230 nm verantwortlich sind.

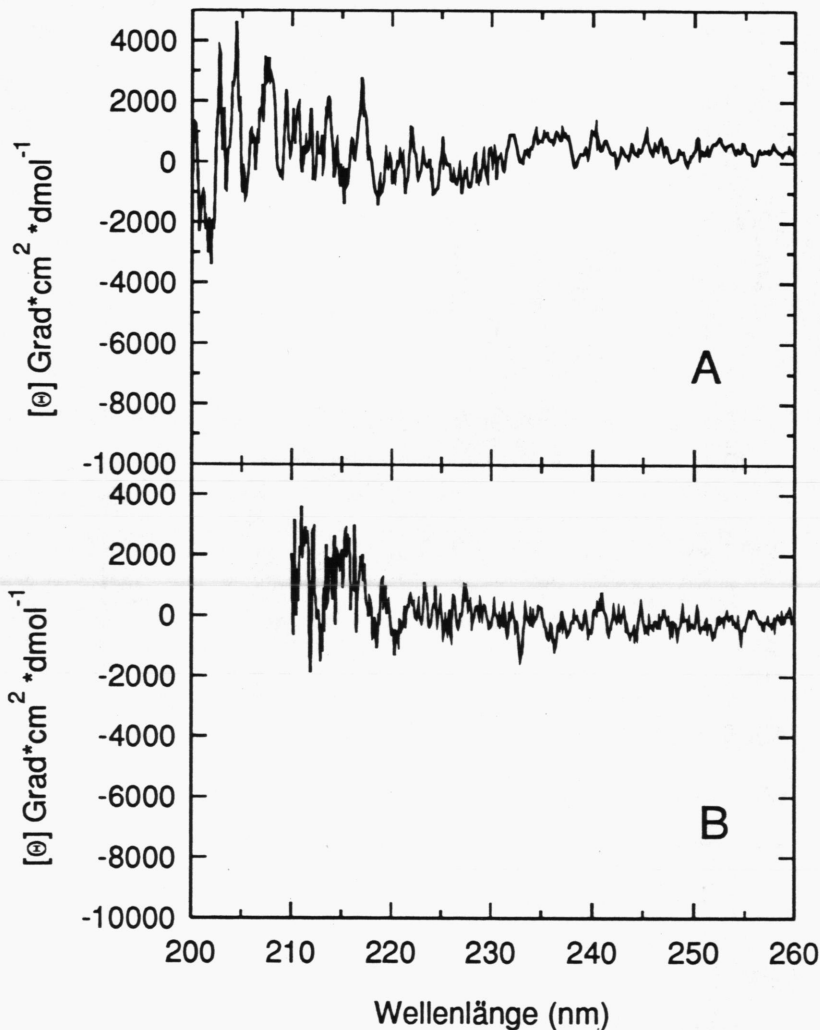


Abb. 30: CD-Differenzspektren von nativer (A) sowie denaturierter (B) Invertase und Invertase-T. Die Proteinkonzentration der nativen Proben betrug jeweils  $0.1 \text{ mg/ml}$ , die der denaturierten  $0.05 \text{ mg/ml}$  in  $40 \text{ mM}$  Natriumphosphat, pH 6.5. Die entfaltenen Proben enthielten  $4\text{M}$  GuHCl. Die Schichttiefe betrug  $1 \text{ mm}$ .

Die Ähnlichkeit der beiden Spektren und damit auch der räumlichen Struktur der beiden Invertaseformen wird besonders im Differenzspektrum (Abb.

30A) deutlich. Es sind keine ausgeprägten Minima oder Maxima zu erkennen, die auf gravierende Änderungen der räumlichen Struktur durch die Einführung einer Spaltstelle in der Invertase schließen lassen.

Ähnliche Ergebnisse liefern auch die CD-Spektren der denaturierten Invertase (Abb. 31A) und Invertase-T (Abb. 31B). Beide in 4M GuHCl inkubierten Formen weisen nahezu identische Eigenschaften auf. Die native Struktur ist zerstört. Diese 'random coil'-Struktur äußert sich durch das Fehlen des CD-Signals im Fern-UV-Bereich und ist charakteristisch für denaturierte Proteine.

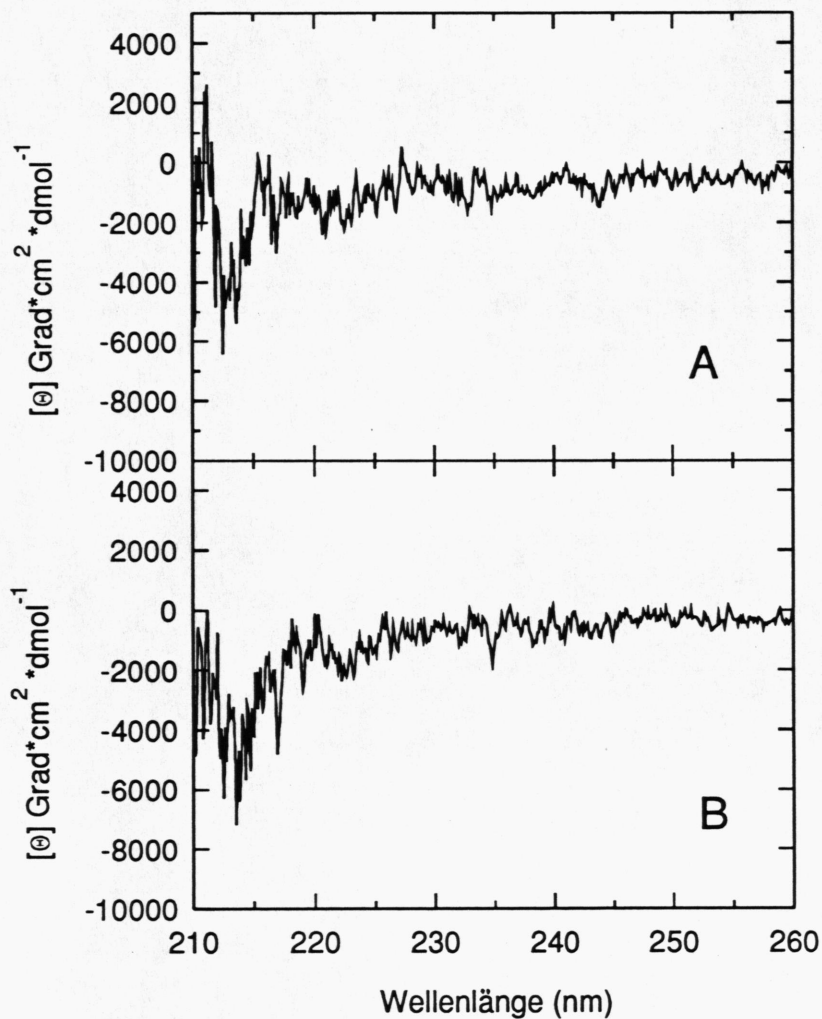


Abb. 31: CD-Spektren im Fern-UV-Bereich von denaturierter Invertase (A) und Invertase-T (B). Die Proteinkonzentration betrug jeweils 0.1 mg/ml in 40 mM Natriumphosphat, pH 6.5, und 4 M GuHCl. Die Messung erfolgte bei 25°C. Die Schichttiefe betrug 1 mm. Die Spektren sind aus jeweils 16 Messungen gemittelt.

---

Die entfalteten Formen können durch die CD-Spektroskopie nicht unterschieden werden, wie auch im Differenzspektrum in Abbildung 30B zu erkennen ist.

#### 3.4.4 Diskussion der Proteolyse- und Charakterisierungsexperimente

Die limitierte Proteolyse von interner Invertase erforderte relativ hohe Konzentrationen an Trypsin. Trotz gleicher Endkonzentrationen (in mg/ml) von Invertase und Trypsin, optimaler Spaltbedingungen (pH 8.0, 30°C), sowie gepulster Zugabe der Protease war die Invertase erst nach sechs Stunden vollständig gespalten. Vermutlich ist die Spaltstelle nur schwer zugänglich und liegt nicht in einer besonders hydrophilen exponierten Schleife der Polypeptidkette. Darauf deutet auch die Auswertung durch das PEPLOT-Programm hin. Damit ist interne Invertase relativ stabil gegen einen Angriff von Trypsin.

Die Spaltung erfolgt sehr spezifisch an nur einer Stelle des Enzyms. Sie liegt zwischen den Aminosäureresten Lysin<sup>354</sup> und Alanin<sup>355</sup>, d.h. auf der Carboxylseite von Lysin, einem typischen Substrat für Trypsin. Durch Ansequenzieren konnten die Molekulargewichte der Fragmente zu 40300 Da und 18050 Da bestimmt werden.

Die interne Invertase bleibt auch nach vollständiger Spaltung der Lys<sup>354</sup>-Ala<sup>355</sup>-Bindung zu 100% aktiv. Durch Nativgelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die Invertase-T als Assoziat der beiden Fragmente vorliegt, wie die native Invertase als Dimer aktiv ist und somit die Struktur im wesentlichen erhalten bleibt. Darauf weisen auch die spektralen Daten hin, bei denen keine Unterschiede zu nativen Form festgestellt werden konnten. Höhere, enzymatisch aktive Assoziate wurden bei keiner der beiden Formen beobachtet.

Möglicherweise ist die Proteolysestelle schwer zugänglich oder wenig beweglich, so daß die Spaltung nur einen lokalen Effekt zu haben scheint. Die Struktur und die Aktivität bleiben jedoch generell erhalten.

#### 3.4.5 Stabilität

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die Wirkung der limitierten Proteolyse auf die Stabilität der Invertase zu untersuchen. Es wurden verschiedene Parameter getestet, um Hinweise auf eine Möglichkeit zu erhalten, die beiden Fragmente in einem gefalteten Zustand zu trennen. Diese Untersuchungen waren deshalb wichtig, da eine Renaturierung von ungespaltenen Invertase nach Denaturierung mit GuHCl nur zu einem sehr geringen Teil möglich ist (Schülke & Schmid, 1988 a, b). Es wurden die Stabilität bei verschiedenen pH-Werten, die Stabilität gegen thermische Desaktivie-

lung und der GuHCl-induzierte Übergang untersucht.

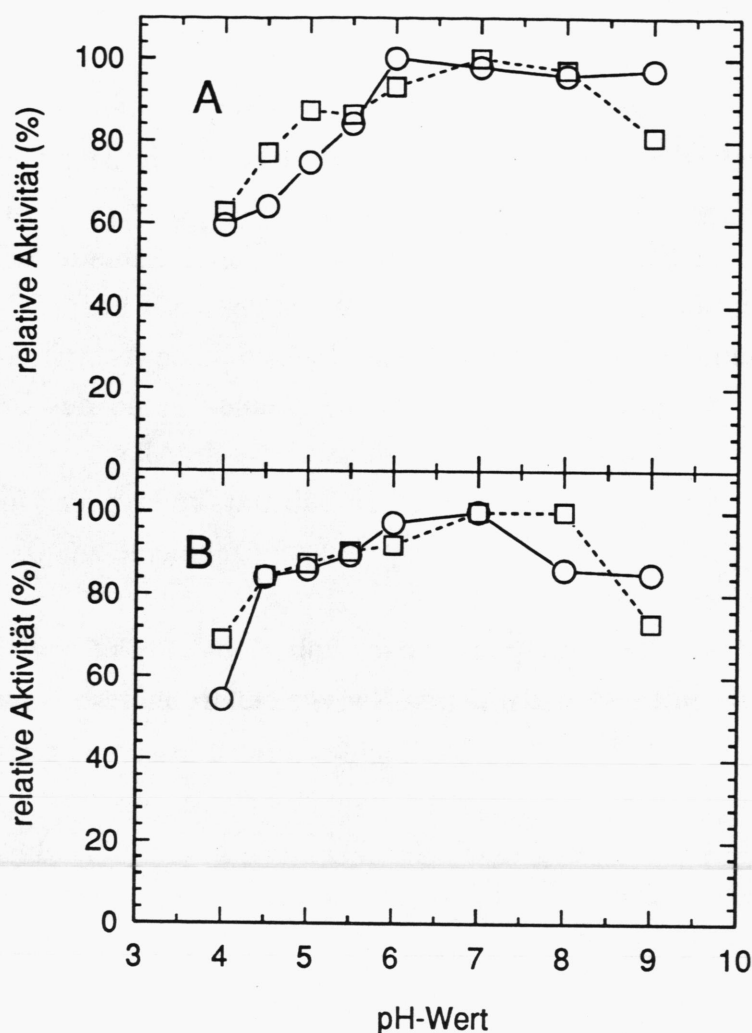


Abb. 32: Stabilität von nativer Invertase und Invertase-T bei verschiedenen pH-Werten nach ein- (A) und fünfstündiger (B) Inkubationszeit bei 30°C. Beide Formen wurden in verschiedenen Puffern mit den jeweiligen pH-Werten inkubiert und die Restaktivität, bezogen auf den Maximalwert der entsprechenden Invertaseform, unter Standardbedingungen ermittelt. Die Invertasekonzentration betrug 15 µg/ml.

○—○ : native Invertase  
 □--□ : Invertase-T

### 3.4.5.1 Stabilität bei verschiedenen pH-Werten

#### a) Stabilität bei 30 °C

Die beiden Formen der Invertase wurden in Puffern mit pH-Werten zwischen 3.0 und 9.0 verdünnt und eine bzw. fünf Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden Proben entnommen und in den Aktivitätstest eingesetzt.

Abbildung 32A zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Die Stabilität der Invertase-T unterscheidet sich über nahezu den gesamten pH-Bereich nach einer Stunde Inkubationszeit im Rahmen der Fehlergrenze nicht signifikant von der nativen Form. Lediglich bei pH 9.0 findet ein stärkerer Verlust an Aktivität der gespaltenen Form statt. Das gleiche Resultat liefert auch die Auswertung der Aktivitäten nach fünf Stunden Inkubationszeit (Abb. 32B).

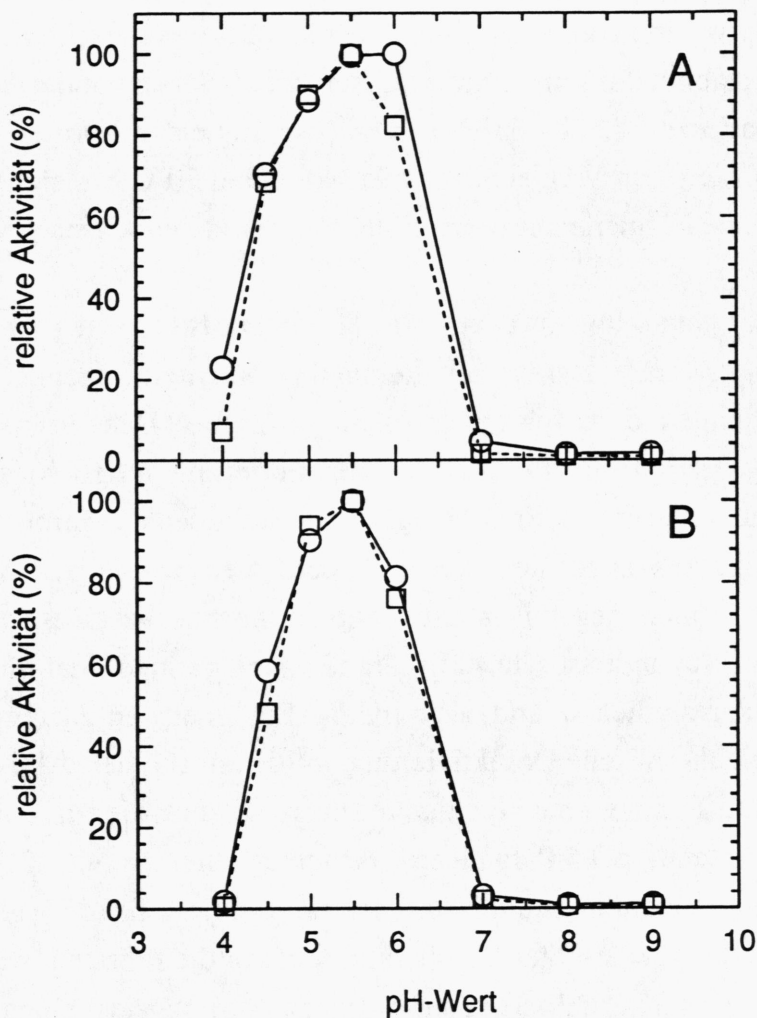


Abb. 33: Stabilität von nativer Invertase und Invertase-T bei verschiedenen pH-Werten nach ein- (A) und fünfstündiger (B) Inkubationszeit bei 50°C. Beide Formen wurden in verschiedenen Puffern mit den jeweiligen pH-Werten inkubiert und die Restaktivität, bezogen auf den Maximalwert der entsprechenden Invertaseform, unter Standardbedingungen ermittelt. Die Invertasekonzentration betrug 15 µg/ml.

○—○ : native Invertase  
 □—□ : Invertase-T

#### *b) Stabilität bei 50 °C*

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie im Teil a) beschrieben, lediglich die Inkubationstemperatur wurde auf 50 °C erhöht. Unterschiede in der Stabilität der beiden Invertaseformen sollten hier besser erkennbar sein, da diese Temperatur näher am Übergangspunkt der thermischen Desaktivierung liegt und damit zusätzlich destabilisierend wirkt. In Abbildung 33A ist das Ergebnis des Versuchs nach einer Stunde Inkubationszeit zu sehen. Auch hier ist der Verlauf beider Kurven nahezu identisch. Die native Invertase scheint nur bei pH 6.0 etwas stabiler zu sein. Dieser Unterschied verschwindet nach fünf Stunden Inkubationszeit (Abb. 33B). Das Maximum beider Formen liegt im Bereich von pH 5.0. Im Vergleich zur Inkubation bei 30 °C hat sich der Bereich, in dem beide Formen nahezu maximal aktiv sind, jedoch stark verengt.

#### **3.4.5.2 Stabilität gegenüber irreversibler Hitzedenaturierung**

Mit interner Invertase lassen sich keine thermodynamischen Gleichgewichtsuntersuchungen durchführen, da nach thermischer Denaturierung bzw. Entfaltung Aggregation auftritt und keine Renaturierung möglich ist. Daher können keine quantitativen thermodynamischen Methoden zur Ermittlung der Stabilität des Enzyms angewandt werden. Stattdessen wurde das Verhalten beider Invertaseformen gegenüber irreversibler thermischer Desaktivierung untersucht. Diese Methode ist sehr gut geeignet, auch geringe Stabilitätsunterschiede zwischen ähnlichen und verwandten Enzymen aufzuzeigen. Der Übergang für die thermische Desaktivierung wurde anhand der Aktivitätsabnahme bestimmt. Dazu wurden die native Invertase und die Invertase-T in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, in einem Temperaturbereich von 30 °C-80 °C aufgeheizt. Die Temperatur wurde stufenweise um jeweils 5 °C gesteigert. Nach Erreichen der gewünschten Temperatur wurden die Proben jeweils fünf Minuten inkubiert und anschließend sofort in den Aktivitätstest eingesetzt. In Abbildung 34 ist zu erkennen, daß die Temperaturprofile für beide Formen sehr ähnlich sind. Bis zu einer Temperatur von etwa 50 °C ist der Kurvenverlauf fast identisch, wobei die Zunahme der Aktivität auf eine höhere Enzymaktivität bei höheren Temperaturen zurückzuführen ist. Ab 55 °C tritt Hitzedesaktivierung auf, wobei die Invertase-T schneller an Aktivität verliert. Der Mittelpunkt des thermisch induzierten Aktivitätsüberganges liegt für native Invertase

bei 64°C, der für Invertase-T bei 60.5°C.

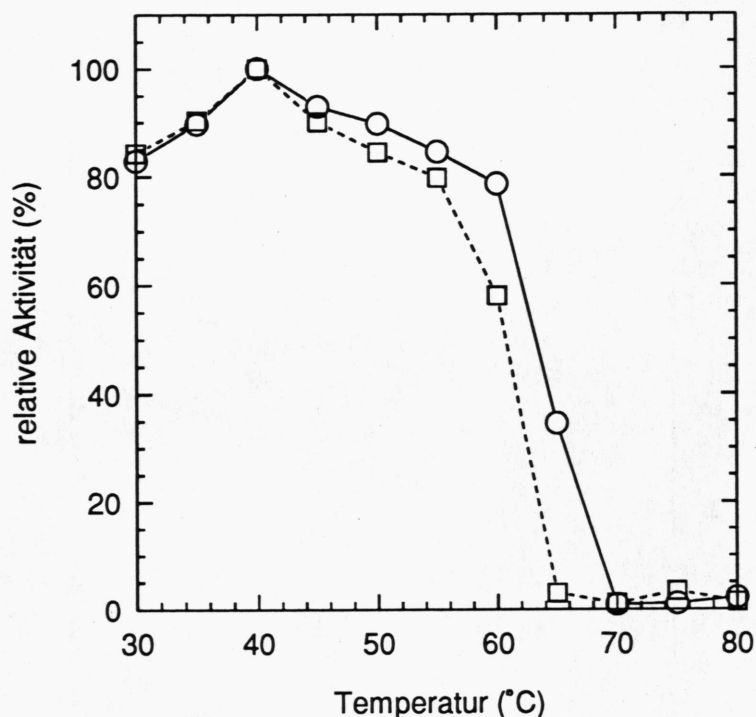


Abb. 34: Irreversible thermische Desaktivierung von nativer Invertase und Invertase-T in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0. Die Inkubation erfolgte fünf Minuten bei der jeweiligen Temperatur, anschließend wurde sofort die verbliebene Restaktivität unter Standardbedingungen bestimmt. Die jeweiligen Maximalwerte wurden auf 100% Aktivität gesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 15 µg/ml.

○—○ : native Invertase  
 □—□ : Invertase-T

### 3.4.5.3 Kinetik der thermischen Desaktivierung

Einen weiteren Hinweis auf die verringerte Stabilität der gespaltenen Invertase gegenüber Hitzedenaturierung liefert die Kinetik der thermischen Desaktivierung. Mit Hilfe dieser Methode können bereits geringe Unterschiede in der Stabilität des gefalteten Zustandes nachgewiesen werden. Dazu wurden Invertase und Invertase-T in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, bei 60°C inkubiert. Diese Temperatur wurde ausgewählt, da sie nahe am Übergangspunkt der thermischen Desaktivierung der Invertase-T liegt und daher der Unterschied zur ungespaltenen Invertase mit einem Übergangspunkt bei 64°C besonders deutlich erkennbar sein sollte. Dies bestätigt sich auch, wie in

Abbildung 35 zu erkennen ist. Die gespaltene Invertase ist bereits nach 15 Minuten zu 50% desaktiviert, während die intakte Form zu diesem Zeitpunkt noch zu 85% aktiv ist.

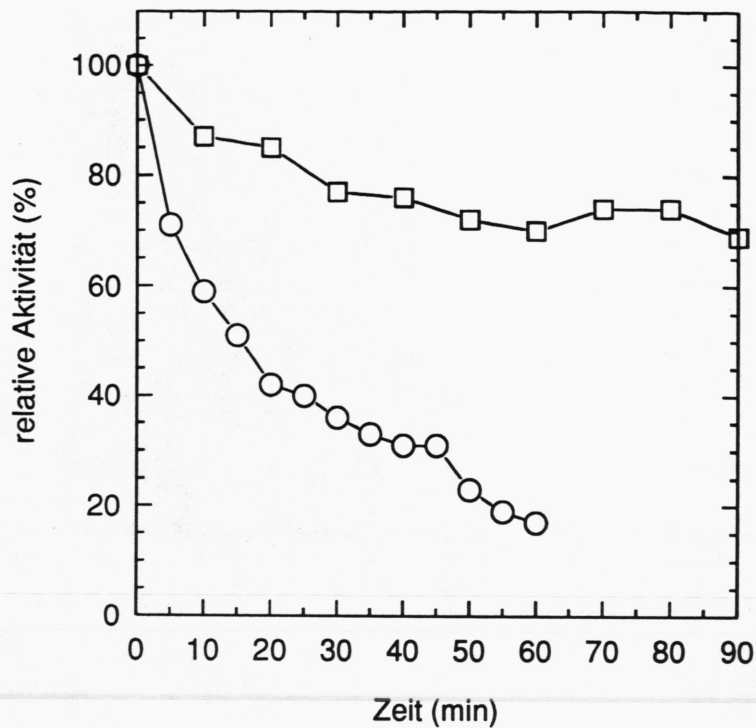


Abb. 35: Kinetik der irreversiblen thermische Desaktivierung von Invertase (O—O) und Invertase-T (□—□) bei 60°C. Die Inkubation erfolgte in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0. Die Konzentration der beiden Invertaseformen betrug jeweils 15 µg/ml.

#### 3.4.5.4 Stabilität gegen Denaturierungsmittel

##### 3.4.5.4.1 Kinetik der Entfaltung durch GuHCl

Um Renaturierungsexperimente durchführen zu können, ist es notwendig, das zu untersuchende Protein vollständig zu entfalten. Dazu wurde die Denaturierungsgeschwindigkeit von Invertase und Invertase-T in 3 M und 4 M GuHCl anhand der Fluoreszenzabnahme ermittelt. Die Inkubation erfolgte in 0.1 M Natriumphosphatpuffer bei pH 6.5. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde bei 325 nm aufgezeichnet.

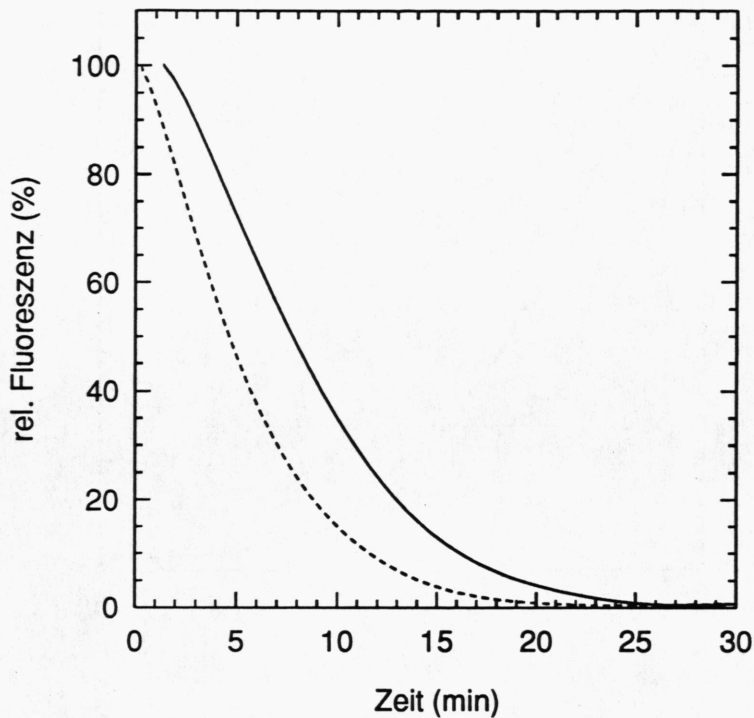


Abb. 36: Kinetik der Entfaltung von Invertase (—) und Invertase-T (---) durch 3 M GuHCl. Die Inkubation erfolgte in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5 bei 20°C. Der Verlauf der Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzemission bei 325 nm verfolgt (Spaltbreite 2.5 nm). Die Anregung erfolgte bei 280 nm (Spaltbreite 5 nm). Die Enzymkonzentration betrug 10 µg/ml.

Es zeigt sich, daß die gespaltene Invertase schneller entfaltet als die native Form. Die Halbwertszeit, d.h. die Zeit, nach der 50% des Proteins entfaltet vorlag, wurde für Invertase-T zu 5 Minuten bestimmt, für native Invertase betrug dieser Wert 8 Minuten (Abb. 36). Der Verlauf der Entfaltung ist bei beiden Formen identisch. Es kann zunächst eine lag-Phase beobachtet werden, was auf eine Folgereaktion hinweist. Vermutlich besteht die erste Reaktion in der Dissoziation in Monomere. Bei Inkubation in 4 M GuHCl können weder im Verlauf der Entfaltung noch im zeitlichen Ablauf Unterschiede festgestellt werden. Die Halbwertszeit beträgt jeweils 1.5 Minuten (Abb. 37).

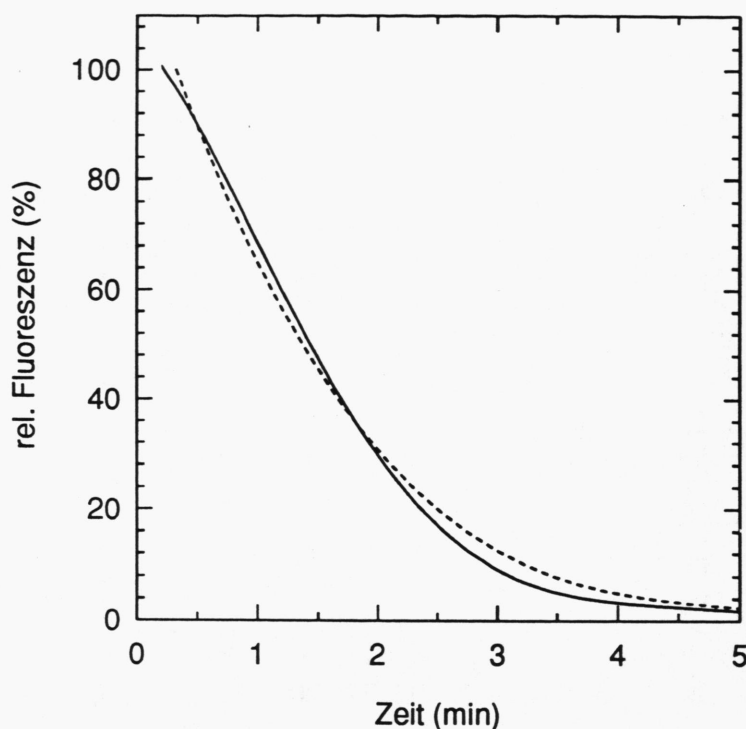


Abb. 37: Kinetik der Entfaltung von Invertase (—) und Invertase-T (---) durch 4 M GuHCl. Die Inkubation erfolgte in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5 bei 20°C. Der Verlauf der Entfaltung wurde anhand der Fluoreszenzemission bei 325 nm verfolgt (Spaltbreite 2.5 nm). Die Anregung erfolgte bei 280 nm (Spaltbreite 5 nm). Die Enzymkonzentration betrug 10 µg/ml.

#### 3.4.5.4.2 Desaktivierungs- und Entfaltungsübergänge in GuHCl

##### a) Aktivitätsmessungen:

Die Übergangskurve für die Desaktivierung beider Invertaseformen durch zunehmende Konzentrationen an GuHCl wurde ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 dargestellt. Es zeigte sich auch hier, daß nur geringfügige Unterschiede in der Stabilität auftreten. Beide Formen zeigen bei 1 M GuHCl einen leichten Aktivitätsverlust. Bei einer Konzentration von 1.5 M GuHCl ist die ungespaltene Form noch zu ca. 40% aktiv, während bei der gespaltenen Invertase fast keine Aktivität mehr festgestellt werden kann. Bei 2 M GuHCl sind beide Formen inaktiv. Der Übergangsmittelpunkt der ungespaltenen Invertase liegt bei 1.2 M GuHCl, für die Invertase-T erfolgt dieser bei 1.4 M GuHCl.

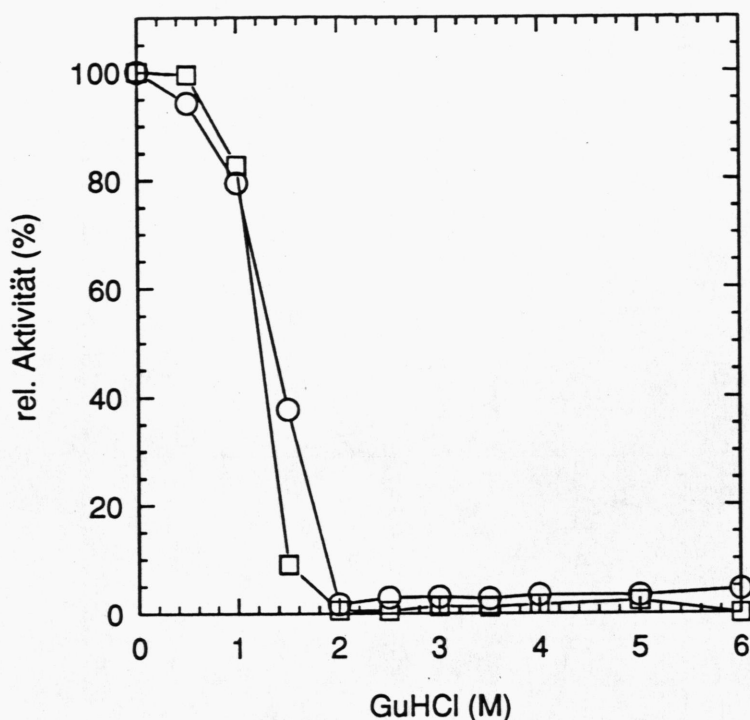


Abb. 38: GuHCl-induzierter Aktivitätsübergang von interner Invertase (○—○) und Invertase-T (□—□). Die Inkubation der Proben erfolgte in 0.1 M NaAc, pH 5.0 und der jeweiligen GuHCl-Konzentration bei 20°C. Die Enzymkonzentration betrug 10 µg/ml. Die verbliebene Restaktivität wurde nach 14-stündiger Inkubationszeit ermittelt.

#### b) Fluoreszenzmessungen:

Durch diese Messungen wurde untersucht, ob die Abnahme der Aktivität Übereinstimmungen mit der Abnahme der Fluoreszenz aufweist. Wie in Abbildung 39A zu erkennen ist, nimmt die Fluoreszenz nach 12 Stunden langsamer als die Aktivität ab. Die Übergangsmittelpunkte liegen hier für unbehandelte Invertase bei 1.8 M GuHCl, für Invertase-T bei 1.6 M GuHCl. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden haben sich die Übergangspunkte zu geringeren Konzentrationen verschoben (Abb. 39B). Die Werte liegen hier bei GuHCl-Konzentrationen von 1.2 und 1.4 M für Invertase-T bzw. unbehandelte Invertase. Auffallend sind auch bei diesen Messungen die sehr geringen Unterschiede in der Stabilität beider Formen, wie sie bereits bei den Aktivitätsdaten zu beobachten sind. Zusätzlich weisen die vorliegenden Daten darauf hin, daß Entfaltung und Desaktivierung in einem Schritt erfolgen.

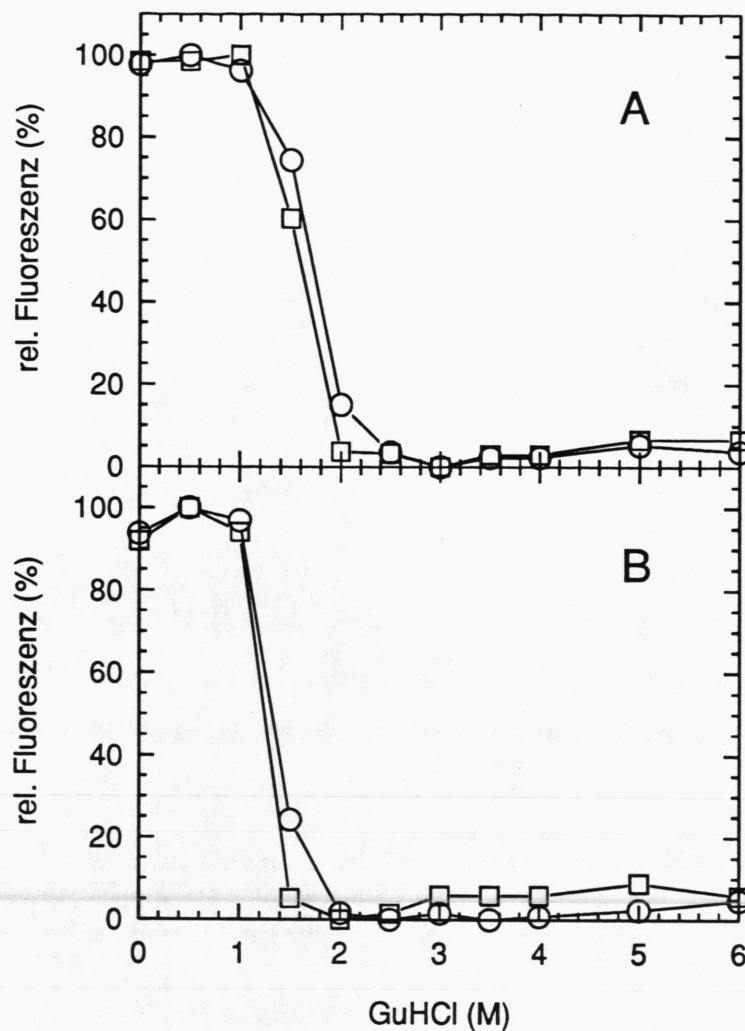


Abb. 39: GuHCl-induzierter Entfaltungsübergang von interner Invertase (○—○) und Invertase-T (□—□). Die Inkubation der Proben erfolgte in 0.1 M NaAc, pH 5.0 und der jeweiligen GuHCl-Konzentration bei 20°C. Die Enzymkonzentration betrug 10 µg/ml. Die Fluoreszenzemission bei 325 nm wurde nach 12 (A) und 24-stündiger Inkubationszeit (B) ermittelt. Es ist die Differenz zur jeweiligen maximalen Fluoreszenz (= 100%) aufgetragen, die Fluoreszenz des entfalteten Proteins wurde auf 0% gesetzt.

### c) HPLC-Chromatographie:

Die HPLC-Chromatographie diente der Aufklärung zweier Fragen. Mithilfe der Ermittlung der Retentionszeit auf der verwendeten TSK-4000 SW-Säule, einem Gelfiltrationsmaterial, sollte untersucht werden, inwieweit eine Monomerisierung beider dimerer Invertaseformen beobachtbar ist. Zur Ermittlung der Mengenverhältnisse wurde die Fläche der Peaks gravimetrisch be-

stimmt. Entfaltetes Protein aggregiert und wird auf der Säule zurückgehalten. Dadurch kann durch Ausmessen der Peakfläche auf die Menge an nicht entfalteter Invertase zurückgeschlossen werden.

Tabelle 5 zeigt die Laufstrecken beider Formen. Diese sind im Rahmen der Fehlergrenze für alle GuHCl-Konzentrationen identisch. Da davon ausgegangen werden kann, daß beide Invertaseformen im reinen Puffer ohne GuHCl in dimerer Form vorliegen, muß angenommen werden, daß die Monomerisierung und die Entfaltung gleichzeitig erfolgen.

Tab. 5: Retentionszeit (min) der Invertasepeaks nach HPLC-Gelchromatographie über eine TSK-4000 SW-Säule

GuHCl-Konz. Invertase		Invertase-T
0	57.5	57.0
0.5	57.0	57.0
1.0	58.0	57.5
1.5	58.0	57.5
2.0	58.0	--

Die Ergebnisse der Auswertung der Peakflächen sind ein Hinweis auf die noch vorhandene Menge an nicht aggregiertem Enzym im Durchlauf der Säule, da entfaltetes und aggregiertes Protein zurückgehalten wird. Die Ergebnisse sind mit denen der Fluoreszenzmessungen vergleichbar. Die Übergangspunkte sind hier nahezu identisch. Der Verlauf der Entfaltung ist in beiden Systemen hoch homolog (Abb. 40).

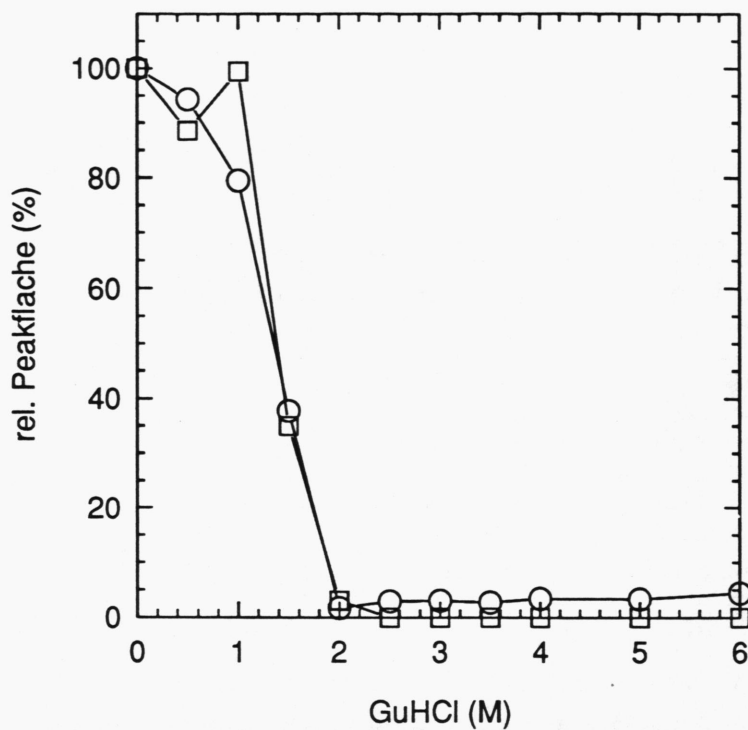


Abb. 40: GuHCl-induzierte Änderung der Peakfläche von interner Invertase (○—○) und Invertase-T (□—□) nach HPLC-Gelchromatographie über eine TSK 4000 SW-Säule. Die Detektion der Elutionspeaks erfolgte anhand der Fluoreszenzemission bei 325 nm, die Anregung bei 280 nm. Die Inkubation der Proben erfolgte in 0.1 M NaAc, pH 5.0 und der jeweiligen GuHCl-Konzentration bei 20°C. Die Enzymkonzentration betrug 10 µg/ml, die Inkubationszeit 4 Tage. Die Fläche der Peaks wurde gravimetrisch bestimmt.

### 3.4.5.5 Renaturierungsversuche von Invertase und Invertase-T

#### 3.4.5.5.1 Einfluß der Enzymkonzentration auf die Renaturierungsausbeute

Intakte Invertase liegt in der enzymatisch aktiven Form normalerweise als Dimer vor. Daher muß nach der Faltung in die native Form ein Assoziationsschritt folgen. Dies bedeutet, daß die Reaktivierungsausbeute von der Enzymkonzentration abhängig ist. Das sollte auch für Invertase-T gelten, da sie bei der Nativgelelektrophorese ein nahezu identisches Laufverhalten zur nativen Form zeigt. Daher wurden die Renaturierungsausbeuten für beide Formen bei verschiedenen Invertasekonzentrationen untersucht. Die Denaturierung erfolgte in 4 M GuHCl bei pH 6.5. Die Konzentration der nativen Invertase betrug dabei 0.8 mg/ml, die der Invertase-T 0.4 mg/ml. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde diese Stammlösung mit 4 M GuHCl so vorverdünnt, daß nach der Zugabe des Renaturierungspuffers die gewünschten Enzymkonzentrationen (Invertase: 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/ml; Invertase-T: 0.25, 0.5, 1, 2, 5 µg/ml) vorlagen. Nach 24 Stunden Renaturierungszeit bei 20°C wurde die enzymatische Aktivität der Proben bestimmt. Abb. 41 zeigt die Reaktivierungsausbeuten für die verschiedenen Enzymkonzentrationen.

Wurden bei intakter Invertase Ausbeuten von 45% erreicht, konnten hingegen bei Invertase-T nur maximal ein Anteil von 6% reaktiviert werden. Die Ausbeuten sind deutlich konzentrationsabhängig. Intakte Invertase erreicht die optimale Ausbeute bis zu einer Konzentration von 2 µg/ml. Danach erfolgt ein rascher Abfall. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Invertase-T, bei der die Abnahme der Aktivität bereits im Bereich von 0.5 µg/ml Proteinkonzentration erfolgt.

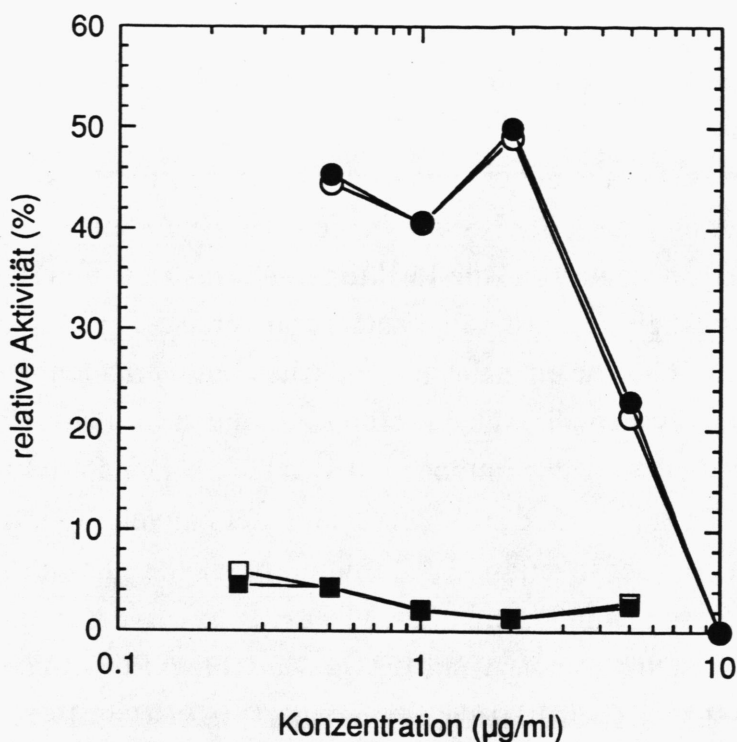


Abb. 41: Konzentrationsabhängige Renaturierung von nativer Invertase und Invertase-T nach 24 Stunden Renaturierungszeit. Die Denaturierung erfolgte durch einstündige Inkubation mit 4 M GuHCl in 0.1 M Natriumcacodylat, pH 6.5 bei 20°C. Die Proteinkonzentration während der Denaturierung betrug 0.8 mg/ml für native Invertase bzw. 0.4 mg/ml für Invertase-T. Nach Vorverdünnung auf die jeweilige Renaturierungskonzentration mit 4 M GuHCl in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5 erfolgte die Renaturierung in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Nach verschiedenen Renaturierungszeiten wurde die verbliebene Aktivität unter Standardbedingungen ermittelt. Die Werte beziehen sich auf Kontrollansätze unter identischen Bedingungen, wobei der Entfaltungsschritt durch einen entsprechenden Verdünnungsschritt ersetzt wurde und der Renaturierungspuffer kein GuHCl enthielt bzw. auf die gleiche Restkonzentration an GuHCl wie der Renaturierungspuffer im Versuchsansatz eingestellt wurde.

- : native Invertase, Kontrolle ohne GuHCl im Renaturierungspuffer
- : native Invertase, Kontrolle mit GuHCl im Renaturierungspuffer
- : Invertase-T, Kontrolle ohne GuHCl im Renaturierungspuffer
- : Invertase-T, Kontrolle mit GuHCl im Renaturierungspuffer

#### 3.4.5.5.2 Einfluß der Renaturierungsdauer auf die Renaturierungsausbeute

Die Renaturierung von aktiver interner Invertase erfordert nach der korrekten Rückfaltung einzelner Monomere einen zusätzlichen Assoziationsschritt,

da nur die dimere Form enzymatisch aktiv ist.

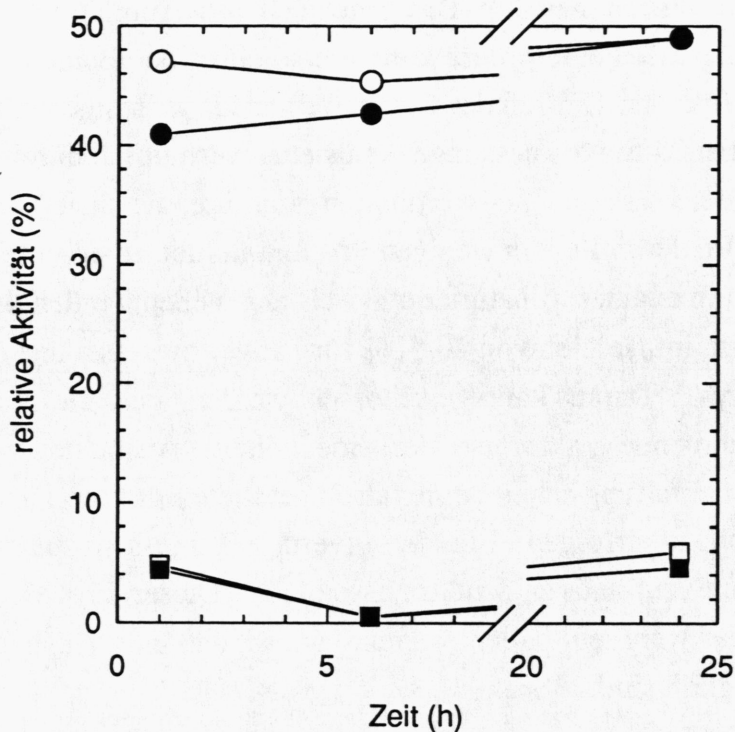


Abb. 42: Einfluß der Renaturierungsdauer auf die Ausbeute von Invertase und Invertase-T nach einstündiger Denaturierung mit 4 M GuHCl in 0.1 M Natriumcacodylat, pH 6.5 bei 20°C. Die Proteinkonzentration während der Denaturierung betrug 0.8 mg/ml für native Invertase bzw. 0.4 mg/ml für Invertase-T. Nach Vorverdünnung auf 2 µg/ml für native bzw. 0.25 µg/ml für Invertase-T mit 4 M GuHCl in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5 erfolgte die Renaturierung in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Nach verschiedenen Renaturierungszeiten wurde die verbliebene Aktivität unter Standardbedingungen ermittelt. Die Werte beziehen sich auf Kontrollansätze unter identischen Bedingungen, wobei der Entfaltungsschritt durch einen entsprechenden Verdünnungsschritt ersetzt wurde und der Renaturierungspuffer kein GuHCl enthielt bzw. auf die gleiche Restkonzentration an GuHCl wie der Renaturierungspuffer im Versuchsansatz eingestellt wurde.

- : native Invertase, Kontrolle ohne GuHCl im Renaturierungspuffer
- : native Invertase, Kontrolle mit GuHCl im Renaturierungspuffer
- : Invertase-T, Kontrolle ohne GuHCl im Renaturierungspuffer
- : Invertase-T, Kontrolle mit GuHCl im Renaturierungspuffer

Um festzustellen, ob dieser Schritt langsam im Vergleich zur Rückfaltung ist und die Reaktivierungsausbeute durch längere Inkubationszeiten erhöht werden kann, wurde der Einfluß der Renaturierungsdauer ermittelt. Es wurden die optimalen Konzentrationen für die Renaturierung unter diesen Bedingun-

gen, die im vorhergehenden Versuch bestimmt wurden (2  $\mu\text{g/ml}$  Invertase, 0.25  $\mu\text{g/ml}$  Invertase-T), eingesetzt. Die übrigen Bedingungen wurden wie im vorhergehenden Versuch gewählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 42 dargestellt. Im Rahmen der Fehlergrenze konnte bei keiner der beiden Invertaseformen ein signifikanter Einfluß der Renaturierungsdauer festgestellt werden. Schwankungen bei Aktivitätsmessungen entstehen vermutlich durch Pipettierfehler während der verschiedenen Verdünnungsschritte, die sich aufsummieren, so daß eine Fehlerbreite von wenigen Prozentpunkten zu erwarten ist. Das bedeutet, daß kein exakter Renaturierungswert angegeben werden kann. Die Ausbeuten liegen im Bereich von 40-50% für native Invertase und bei etwa 4% bei Invertase-T. Daraus kann geschlossen werden, daß die Assoziation nicht der bestimmende Faktor ist, der eine höhere Ausbeute verhindert. Während der Rückfaltung scheint eine falsch gefaltete Struktur zu entstehen oder Aggregation zu erfolgen. Bei der Invertase-T müssen zusätzlich die beiden Fragmente zur nativen Struktur assoziieren. Dieser Prozeß läuft anscheinend in nur wenigen Fällen korrekt ab, so daß nur Ausbeuten von maximal 5% möglich sind.

#### 3.4.5.6 Harnstoffgradientengelelektrophorese

Zur Untersuchung der Konformation von Proteinen eignet sich die Gelelektrophorese mit einem zur Laufrichtung der Probe senkrechten Gradienten (Goldenberg, 1989). Möglichkeiten hierfür sind Polyacrylamid-, pH-, Temperatur- und Harnstoffgradienten. Mit diesen Methoden wird die elektrophoretische Mobilität der Proteine unter variierenden Bedingungen verglichen. In einem Polyacrylamidgel mit kontinuierlichem transversalem Harnstoffgradienten kann die Ent- und Rückfaltung von Proteinen untersucht werden, da ein entfaltetes Protein im Gegensatz zur nativen Form eine geringere elektrophoretische Mobilität aufgrund seines größeren hydrodynamischen Volumens besitzt. Durch Polyacrylamidgelelektrophorese mit quer zur Laufrichtung ansteigenden denaturierenden Bedingungen lassen sich theoretisch sowohl thermodynamische wie auch kinetische Daten ermitteln. Die thermodynamische Stabilität ergibt sich aus der Messung des Gleichgewichtes zwischen dem nativen und entfaltetem Zustand. In einem Harnstoffgradientengel ist dieser Zustand durch den Mittelwert der Mobilität der sich umwandelnden Moleküle

definiert. Auch unabhängige Domänen können erkannt werden, falls diese unterschiedliche Entfaltungsübergänge besitzen (Goldenberg & Creighton, 1984).

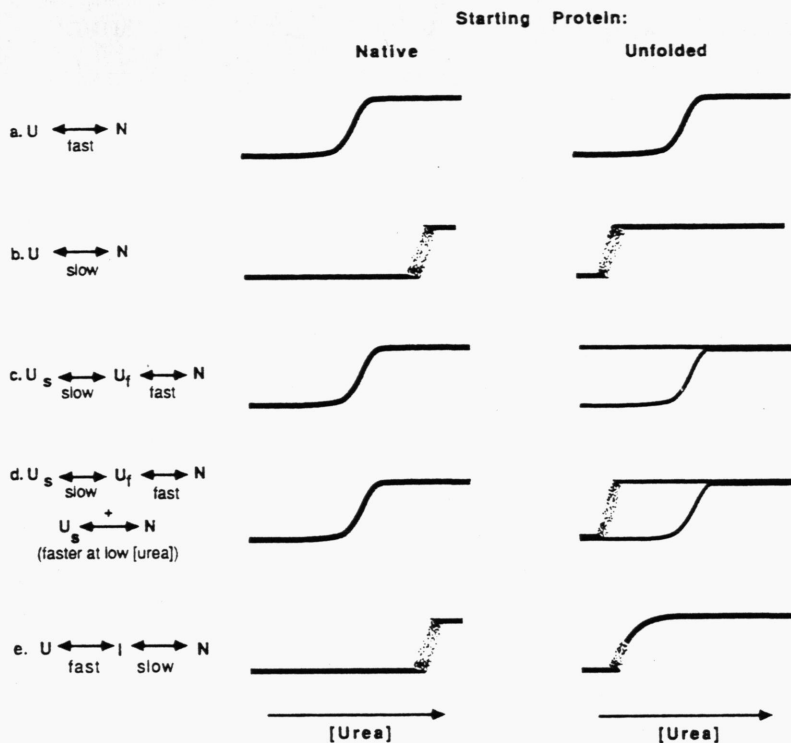


Abb. 43: Mögliche Faltungsübergänge in Harnstoffgradientengelen (aus T.E. Creighton, 1989).

Die Kinetik des Überganges vom gefalteten zum ungefalteten Zustand hat einen starken und charakteristischen Einfluß auf den Verlauf der Banden im Gel. Stellt sich das Gleichgewicht im Vergleich zur Elektrophoresedauer schnell ein, so ist in der Übergangszone zwischen nativem und denaturiertem Protein eine scharfe kontinuierliche Bande zu erkennen. Dabei sollte die Auftragung von nativem und denaturiertem Protein das gleiche Bild ergeben. In diesem Fall kann auch die thermodynamische Stabilität des Proteins untersucht werden. Erfolgt der Übergang von nativem zum denaturiertem Protein langsam, so zeigt sich dies in zwei Effekten. Zum einen verschmieren die Banden im Übergangsbereich, da die Proteine je nach dem Zeitpunkt der Umwandlung verschieden weit wandern. Weiterhin unterscheiden sich die Bandenmuster bei der Auftragung von nativem und denaturiertem Protein, d.h. die Übergangspunkte sind nicht identisch. Hier können keine thermodynami-

schen Stabilitätsdaten gewonnen werden, da sich das System nicht im Gleichgewicht befindet. Eine kinetische Auswertung ist dagegen möglich. Auch über den Mechanismus der Faltung können Aussagen getroffen werden. Abbildung 43 zeigt schematisch einige Bandenmuster und deren Auswertung.

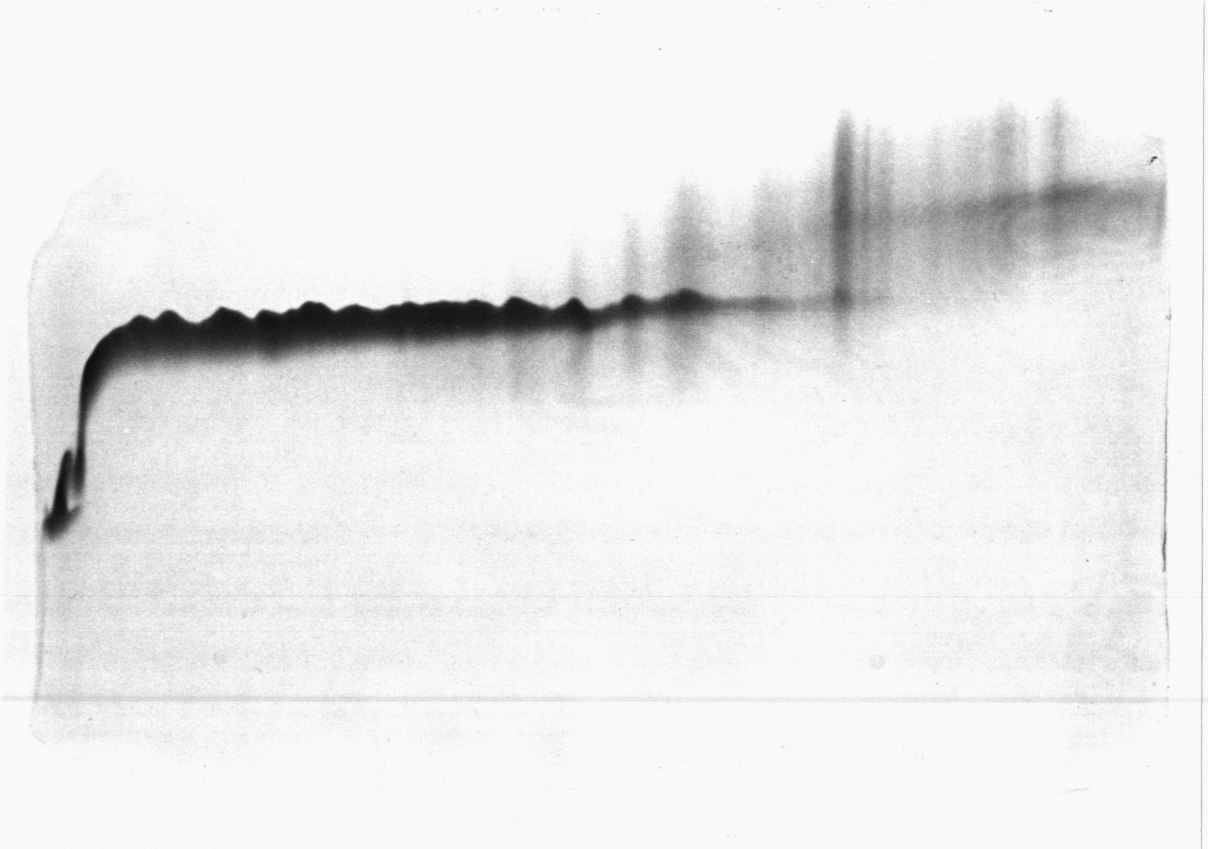


Abb. 44: Entfaltung von nativer Invertase durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase betrug 0.175 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Der Gradient verlief linear von 0-4 M Harnstoff.

#### 3.4.5.6.1 Entfaltung in Harnstoffgradientengelen

In den folgenden Versuchen wurden beide Invertaseformen auf Gradientengele aufgetragen. Die Temperatur während des Laufes betrug 20°C, die Laufzeit sechs Stunden. Abb. 44 und 45 zeigen den Übergang von nativer Invertase bzw. Invertase-T in einem Gradientengel von 0-4 M Harnstoff.

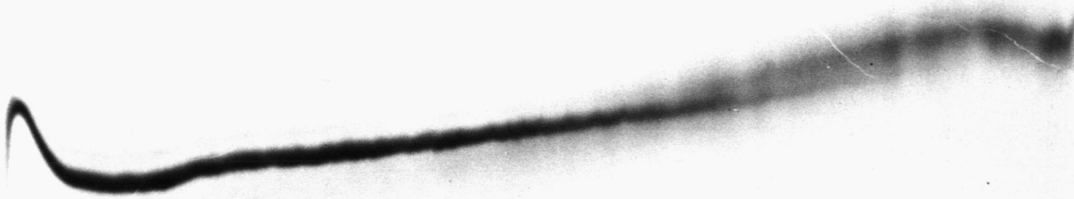


Abb. 45: Entfaltung von Invertase-T durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase-T betrug 0.175 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Der Gradient verlief linear von 0-4 M Harnstoff.

Es ist zu erkennen, daß der Beginn der Entfaltung bei etwa 2 M Harnstoffkonzentration liegt. Der Übergang vom nativem zum entfaltetem Zustand erfolgt im Vergleich zur Laufzeit der Proben langsam, wie an den diffusen Banden in diesem Bereich zu sehen ist. Bei keiner der beiden Formen ist eine Monomerisierung der Invertase zu beobachten. Diese sollte sich in einer höheren Laufgeschwindigkeit des Proteins äußern. Eine genauere Aussage liefern die Elektrophoresen in einem Gradienten von 0-8 M Harnstoff (Abb. 46 und 47). Die native Invertase ist bei ungefähr 4.5 M Harnstoff vollständig entfaltet. Bei der Invertase-T überlagern sich zwei Effekte. Zunächst beginnt die Entfaltung bei 2 M Harnstoff. Ab 3 M Harnstoff erkennt man die Dissoziation der Invertase-T in die beiden proteolytischen Fragmente, die ab 6 M Harnstoff als deutlich getrennte Banden laufen.



Abb. 46: Entfaltung von nativer Invertase durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase betrug 0.175 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Der Gradient verlief linear von 0-8 M Harnstoff.

#### 3.4.5.6.2 Rückfaltung in Harnstoffgradientengelen

Beide Invertaseformen wurden in 8 M Harnstoff denaturiert und anschließend auf ein Gel mit einem Gradienten von 0-8 M Harnstoff aufgetragen. Die Proben wurden 10 Minuten einwandern gelassen und anschließend eine Stunde im Gel inkubiert, um eine mögliche Assoziation der Invertase-T-Fragmente zu erlauben, die ohne Inkubation aufgrund der unterschiedlichen Größe sofort getrennt würden. Die Laufzeit betrug 6 Stunden, die Temperatur 20°C. Abbildung 48 zeigt das Ergebnis der Elektrophorese mit ungespaltener Invertase. Es ist zu erkennen, daß der größte Teil der Invertase nicht renaturiert werden kann und über den gesamten Bereich des Gels auf gleicher Höhe liegenbleibt.



Abb. 47: Entfaltung von Invertase-T durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase-T betrug 0.175 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Der Gradient verlief linear von 0-8 M Harnstoff.

Vermutlich aggregiert dieser Teil bei der Rückfaltung im Bereich niedriger Harnstoffkonzentrationen und zeigt das gleiche Laufverhalten wie vollkommen entfaltetes Protein. Lediglich ein kleiner Teil des Proteins zeigt einen Übergang zu einer kompakteren Struktur. Dieser Übergangsbereich liegt bei etwa 3.5 M Harnstoff. Es handelt sich dabei nicht um eine enzymatisch aktive Form. Dies konnte durch einen Reaktivierungsversuch, in dem unter identischen Bedingungen denaturierte Invertase in einem Mikrodialysegerät gegen 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5, dialysiert wurde, gezeigt werden. Es konnte zu keinem Zeitpunkt der Probenentnahme (0, 2, 8, 24h) Aktivität festgestellt werden.

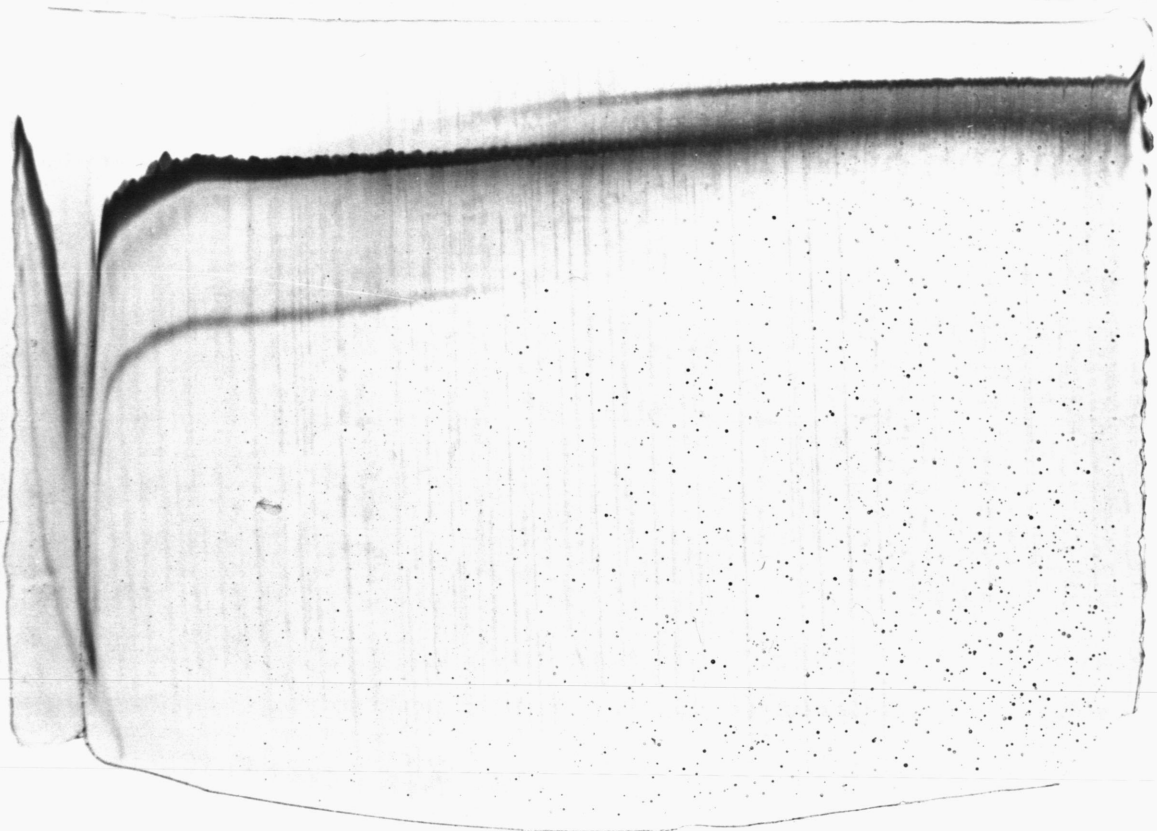


Abb. 48: Rückfaltung von denaturierter Invertase durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Die Denaturierung erfolgte in 8 M Harnstoff. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase betrug 0.175 mg/ml in 0.1 M Natriumphosphat, pH 6.5. Der Gradient verlief linear von 0-8 M Harnstoff.

Bei den Langzeitentnahmen kann eine Hemmung der Invertase durch Harnstoff ausgeschlossen werden, da dieser durch die Dialyse vollständig entfernt wurde. Aufgrund dieser Daten muß angenommen werden, daß es sich bei dieser kompakten Struktur um inkorrekt gefaltete Invertase handelt.

Ein komplizierteres Bild ergibt sich bei den Rückfaltungsversuchen gespaltenen Invertase (Abb. 49). Zunächst ist bei einer Konzentration von 8 M Harnstoff die Invertase-T in die beiden Fragmente aufgetrennt. Das größere Fragment verhält sich bei abnehmender Harnstoffkonzentration ähnlich wie die ungespaltene Invertase, wobei die aggregierte Form etwas schneller zu laufen scheint. Ein Teil des größeren sowie das kleine Fragment falten in eine

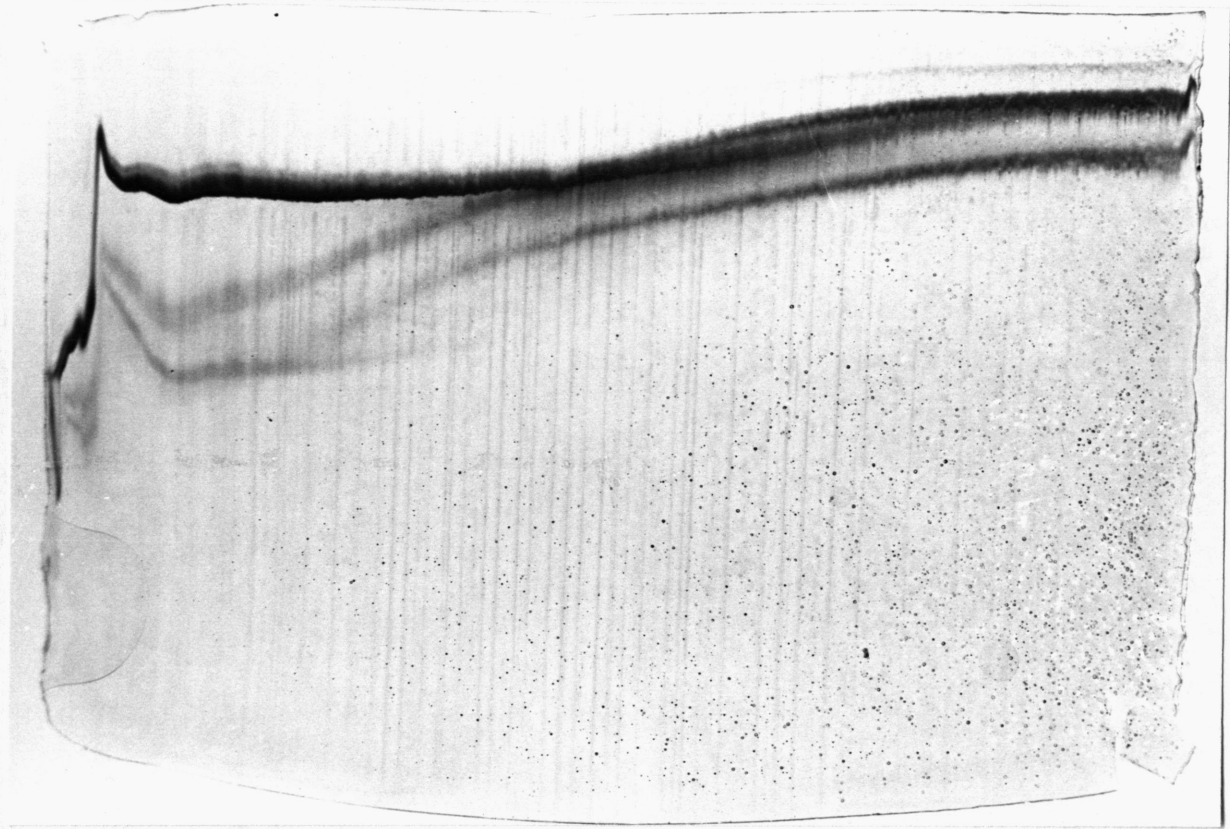


Abb. 49: Rückfaltung von denaturierter Invertase-T durch Harnstoffgradientengelelektrophorese. Die Denaturierung erfolgte in 8 M Harnstoff. Es wurde 1 ml Probe aufgetragen. Die Konzentration der Invertase-T betrug 0.175 mg/ml. Der Gradient verlief linear von 0-8 M Harnstoff.

kompaktere Struktur. Dieser Übergang beginnt bei etwa 3.5 M Harnstoff und endet bei 2 M Harnstoff. Das kleine Fragment zeigt keine Aggregation. Eine Bande, die assoziierte Fragmente enthält, ist nicht zu erkennen. Bei Reaktivierungsversuchen, die parallel mit Invertase-T durchgeführt wurden, konnten wie bei der intakten Invertase keine Aktivität festgestellt werden.

Die Effekte bei niedrigen Harnstoffkonzentrationen sind folgendermaßen zu erklären: Da das Einfüllen des gesamten Gelmaterials maßgeblich zum Erhalt eines exakten Gradienten ist, mußte das Volumen etwas unterhalb des Gesamtvolumens (Menge zwischen den Glasplatten) gewählt werden. Nach dem

Auspolymerisieren des Gradientengels wurde die Apparatur mit Polyacrylamid ohne Denaturierungsmittel aufgefüllt. An den Grenzflächen zwischen beiden auspolymerisierten Polyacrylamidformen entstehen indifferente Bereiche mit undefinierten Harnstoffkonzentrationen. Daraus erklärt sich das Verhalten der Invertaseformen an diesen Grenzflächen.

### 3.4.5.7 Diskussion der Stabilitäts- und Denaturierungsmitteldaten

Die Stabilitätsdaten zeigen, daß sich Invertase und Invertase-T nur sehr geringfügig unterscheiden. Bei pH-Variationen verhalten sich beide Formen nahezu homolog. Sehr geringe Unterschiede gibt es bei der Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung. Der Differenz beim Mittelpunkt des irreversiblen thermischen Übergangspunktes beträgt lediglich 3.5°C. Diese etwas verringerte Stabilität gegenüber Hitzedenaturierung konnte durch kinetische Daten bestätigt werden. Auch bei der Stabilität gegenüber Entfaltung durch GuHCl treten nur sehr geringe Unterschiede auf. Dabei wurden die Aktivität, Entfaltung (durch Fluoreszenzmessungen) und die Abnahme der Nativbande (mittels HPLC-Gelchromatographie) untersucht. Dabei zeigte sich zusätzlich, daß Aktivitätsverlust und Entfaltung der jeweiligen Invertaseform im gleichen GuHCl-Konzentrationsbereich stattfinden. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Abnahme der Aktivität und die Entfaltung gleichzeitig erfolgen. Die Kinetiken der Entfaltung weisen ebenfalls nur geringe Unterschiede auf. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Struktur und Aktivität. Die Stabilität wird durch die Fragmentierung nicht wesentlich verringert.

Ein anderes Bild ergibt sich aus den Reaktivierungsversuchen. Intakte interne Invertase weist bereits eine relativ schlechte Reaktivierungsausbeute auf (max. 50%). Die Proteolyse der Invertase verhindert eine Reaktivierung jedoch fast vollständig. Dies bedeutet, daß weder eine unabhängige Faltung der Fragmente noch eine spezifische Assoziation in eine enzymatisch aktive Form möglich sind. Eventuell sind diese Schritte aber auch so stark verlangsamt, daß sie nicht mehr mit der Aggregation konkurrieren können.

Aus den Harnstoffgradientengelen lassen sich mehrere Schlußfolgerungen ziehen. Die Entfaltungsexperimente zeigen, daß Invertase-T in die beiden Fragmente dissoziiert. Diese Fragmente assoziieren beim Übergang zu gering-

eren Harnstoffkonzentrationen nicht mehr korrekt. Sowohl bei Invertase-T, als auch bei intakter Invertase ist zu beobachten, daß der größte Teil der Proteine als aggregierte Formen bestehen bleiben. Ein kleiner Teil der beiden Invertaseformen bzw. der Fragmente geht zwar in eine kompaktere Struktur über, er ist jedoch nicht enzymatisch aktiv. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, daß ein enzymatisch aktives Fragment womöglich nicht zu isolieren ist.

### 3.5 Kristallisationsversuche mit interner Invertase

Von Invertase existieren bisher keine röntgenkristallographischen Bilder. Dies liegt daran, daß vom heterogenen Glykoanteil der externen Invertase eine Kristallisation verhindert wird. Von der internen Invertase dagegen stand bisher nicht genügend Material zur Verfügung, um Experimente dieser Art durchführen zu können. Der hier verwendete Hefestamm mit dem überproduzierenden Plasmid und die optimierten Anzuchtbedingungen erlaubten nun die Durchführung dieses Versuchs.

Die interne Invertase wurde zunächst nachgereinigt. Dazu wurden 10 ml Invertase (0.7 mg/ml in 50 mM Natriumacetat, pH 5.0) auf eine voräquilibrierte Pharmacia Mono-Q-Säule aufgetragen, gewaschen und mit einem Gradienten von 0-2 M NaCl eluiert. Abb. 50 zeigt das Elutionsprofil dieser Nachreinigung. Es ist zu erkennen, daß nur sehr wenige Verunreinigungen vorhanden sind, die durch die Nachreinigung abgetrennt wurden. Die Fraktionen mit Invertaseaktivität wurden gesammelt, in einer Speedvac eingengt und über Nacht gegen 2 \* 5 l 50 mM Natriumacetat, pH 5.0, dialysiert. Da nach der Dialyse die Konzentration noch zu niedrig für Kristallisationsversuche war, wurde dieser Vorgang wiederholt. Anschließend wurde die Konzentration spektroskopisch bestimmt. Sie betrug 7.6 mg/ml und war damit für die Kristallisationsversuche ausreichend.

Die Proben wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben angesetzt. Der Zustand der Kristallisationsansätze wurde nach drei Tagen unter dem Mikroskop untersucht. Da keine Kristalle entstanden waren, wurden in allen Ansätzen die Molarität der Bodenpuffer erhöht und die Ansätze wiederum nach drei Tagen kontrolliert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Nach dieser Aufkonzentrierung waren alle Proben präzipitiert. In den äußeren pH-Bereichen (z.B. pH 4.0, pH 10.0) war dies bereits beim vorhergehenden Ansatz geschehen.

Lediglich bei folgenden Ansätzen wurden mögliche kleine kristallähnliche Strukturen beobachtet:

- 1.4 M Ammoniumsulfat, pH 6.0
- 0.82 M Citrat, pH 6.0
- 1.4 M Phosphatpuffer, pH 7.0

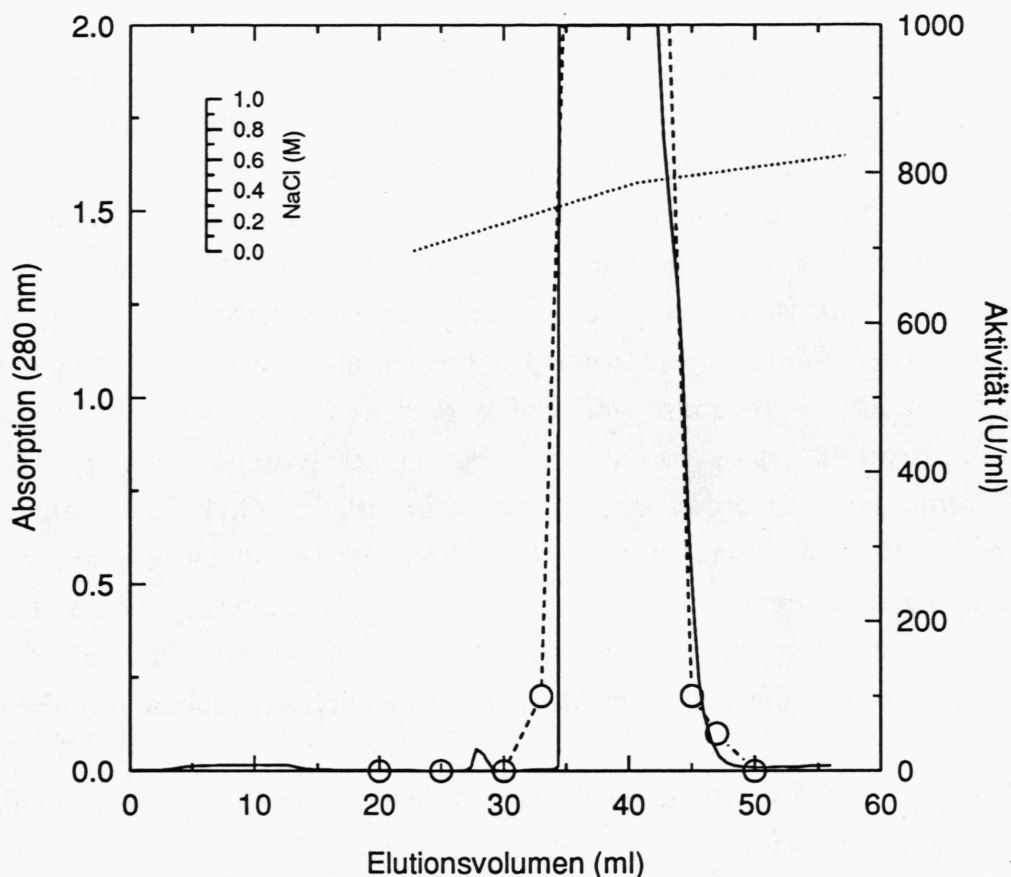


Abb. 50: Nachreinigung von Invertase durch Ionenaustauscherchromatographie über eine Mono-Q-Säule. Als Laufpuffer wurde 50 mM Natriumacetat, pH 5.0 verwendet. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 0-2 M NaCl im Laufpuffer. Die Flußrate betrug 1 ml/Minute, die Fraktionsgröße 1 ml.

— : Absorption bei 280 nm  
 ○--○: Invertaseaktivität in U/ml  
 .....: [NaCl] in M/l

Diese Proben wurden nochmals neu angesetzt, beim Phosphatpuffer wurde ein zusätzlicher Ansatz mit einem Startpuffer der Konzentration 1.0 M Phosphat anstelle von 1.2 M Phosphat hergestellt und wie oben beschrieben die Pufferkonzentration erhöht. Es konnte jedoch keine Kristallisation beobachtet werden. Weiter Versuche wurden an dieser Stelle zurückgestellt, da der für weitere, geplante Kristallisationsvariationen kalkulierte Materialverbrauch an interner Invertase den vorhandenen Vorrat überstieg. Diese Ansätze könnten jedoch einen Ansatzpunkt für weitere Kristallisationsversuche bieten.

### 3.6 Limitierte Proteolyse von externer Invertase

Die Beständigkeit von externer im Vergleich zu interner Invertase wurde bereits von Brown et al. (1979) untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die externe Form unter den angewandten Versuchsbedingungen (1 mg/ml Invertase, 0.04 mg/ml Trypsin in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 37°C Inkubationstemperatur) auch nach sieben Stunden Inkubationszeit vollständig resistent gegen einen proteolytischen Verdau ist, während interne Invertase teilweise gespalten wird. Hier sollte nun geklärt werden, ob dies auch unter den Bedingungen, bei denen interne Invertase vollständig gespalten wird, der Fall ist. Dazu wurde externe Invertase wie die interne Form proteolytisch behandelt.

Externe Invertase ergibt wegen ihres uneinheitlichen Glykoanteils nur sehr unscharfe Banden. Deshalb können durch Proteolyse entstandene Spaltprodukte möglicherweise nicht erkannt werden. Die Deglykosilierung von externer Invertase bzw. tryptisch gespaltenen externer Invertase mit 'Endo-F' wurde durchgeführt, um bei der Gelelektrophorese deutlich erkennbare Banden zu erhalten.

'Endo-F' ist ein käufliches Gemisch aus Endoglycosidase F/N-Glycosidase F aus dem Organismus *Flavobacterium meningosepticum*. N-Glycosidase F (*Peptide:N-glycosidase F*) besitzt die breitere Substratspezifität. Sie katalysiert die Hydrolyse der Glykosilamin-Bindung zwischen den N-Acetylglukosamin- und Asparaginresten, wobei das Asparagin an der ehemaligen Anknüpfungsstelle in ein Aspartat umgewandelt wird (Plummer et al., 1984). Es werden fast alle N-glykosidischen Bindungen gespalten. Die N-Glycosidase F hat das Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 8.5.

Endoglycosidase F (*Endo-β-N-acetylglucosamidase F*) hydrolysiert hauptsächlich die Verbindung zwischen den N-Acetylglukosamin-Resten der Oligosaccharidketten vom high-Mannose-Typ. Glykane mit komplexen Verzweigungen sind resistent gegen Endo F (Tarentino et al., 1985).

Da die Einführung von geladenen Aminosäureresten in das Protein durch die Umwandlung des Asparagin in Aspartat durch N-Glycosidase F die molekularen Eigenschaften verändern könnte, wurde die Inkubation bei pH 5.0 durchgeführt, wo im wesentlichen nur die Endoglycosidase F aktiv ist. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Auf Abb. 51 ist zu erkennen, daß die Deglykosilierung von externer Inver-

tase eine deutlich schärfere Bande ergibt. Das Molekulargewicht der 'Endo-F' behandelten externen Invertase ist aber noch höher als das der internen Form.

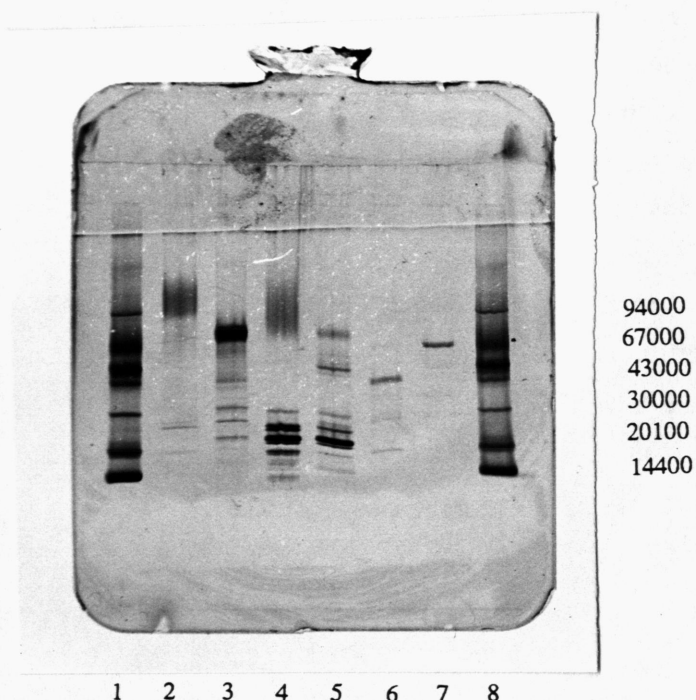


Abb. 51: Proteolyse von externer Invertase durch Zugabe von Trypsinpulsen. Zu 1 ml Invertaselösung (1 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  und anschließend in Abständen von einer Stunde 200  $\mu$ l Trypsinlösung (1 mg/ml in 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0) zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Nach jeweils einer Stunde wurden Proben für die Gelelektrophorese und den Aktivitätstest entnommen.

- 1: Marker
- 2: Externe Invertase
- 3: Externe Invertase nach 'Endo-F'-Behandlung
- 4: Externe Invertase nach Trypsin-Verdau
- 5: Externe Invertase nach Trypsin-Verdau und anschließender 'Endo-F'-Behandlung
- 6: Invertase-T
- 7: native Invertase
- 8: Marker

Dies zeigt, daß ein relativ einheitlicher Glykoanteil kovalent an der externen Invertase gebunden bleibt.

Bei dem nicht mit 'Endo-F' deglykosiliertem Spaltansatz ist zu erkennen, daß sich die Bande über einen größeren Molekulargewichtsbereich verteilt. Das könnte bedeuten, daß eine Spaltung stattgefunden hat und sich die Fragmente durch ihren unterschiedlichen Glykoanteil auf dem Gel vermischen.

Dies wird durch den 'Endo-F'-Abbau der Glykoreste bestätigt. Neben einem Anteil des unverdauten Proteins ist eine zweite Bande mit niedrigerem Molekulargewicht ähnlich der des größeren Fragmentes der internen Invertase zu erkennen. Dieses Experiment zeigt, daß die externe Invertase unter diesen Bedingungen auch proteolytisch gespalten werden kann. Dieser Vorgang läuft aber langsamer als bei der internen Form ab. Der Glykoanteil schützt somit die externe Invertase vor einem Angriff durch Trypsin und möglicherweise auch anderen Proteasen. Vermutlich erschweren die Glykoanteile sterisch den Zugang zu den potentiellen Spaltstellen, wodurch die Hydrolyse zwar verlangsamt, aber nicht verhindert wird.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung limitierter Proteolyse auf die physikalischen und enzymatischen Eigenschaften von interner Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen. Auch sollte geklärt werden, ob es möglich ist, ein enzymatisch aktives Fragment zu isolieren.

Da interne Invertase in *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zur externen Form nur in sehr geringen Mengen vorkommt, mußte ein geeignetes Expressionssystem gefunden und dafür die optimalen Anzuchtbedingungen gefunden werden. Zunächst wurde der *E. coli*-Stamm RRL 1 mit dem Multicopy-Vektor pRRL 1 untersucht. Dieses Plasmid enthält sowohl bakterielle Signalsequenzen für die Replikation in *E. coli*, als auch Signalsequenzen für die Replikation in *Saccharomyces cerevisiae*. Unter anderem wurde von dem in diesem Plasmid befindlichen SUC-2-Gen ein Teil der codierenden Region für die Signalsequenz entfernt, so daß nur interne Invertase exprimiert werden kann. Die Aktivitätstests der aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen zeigten jedoch keine erhöhte Invertaseaktivität. Deshalb wurde das Plasmid in den Hefestamm SEY-2102 transformiert. Mit diesen Zellen wurden die Anzuchtbedingungen optimiert, wobei eine Anzucht in drei Schritten die höchsten Ausbeuten erbrachte. Unter optimalen Bedingungen konnte die Invertaseaktivität, bezogen auf die optische Dichte, etwa um den Faktor 10 erhöht werden. Da auch die Zellmasse um den Faktor fünf zunahm, ergab sich eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Induktion um den Faktor 50.

Die Isolierung und Reinigung der internen Invertase erfolgte durch Aufschluß der Zellen in einer French-Press, fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie über Ionenaustauscher (DEAE-Zellulose, Q-Sepharose Fast Flow) sowie durch hydrophobe Chromatographie über Phenylsepharose. Durch diese Reinigungsmethode konnten ca. 27% der im Rohextrakt enthaltenen Menge an interner Invertase isoliert werden. Dies bedeutet eine Steigerung um etwa 60%, bezogen auf vergleichbare Präparationen aus dem Hefestamm DBY 469-SUC 2. Durch die Verwendung des neuen Hefestammes mit dem Multicopy-Plasmid und der optimierten Anzuchtbedingungen konnte die Ausbeute an interner Invertase relativ zur identischen Menge an Zellmasse im Vergleich zu früheren Präparationen um das 13fache gesteigert werden.

Die Proteolyse der internen Invertase durch Trypsin wurde auf drei verschiedene Arten versucht. Im ersten Fall wurden gleiche Konzentrationen an Trypsin und Invertase eingesetzt und die Probe 6 Stunden bei pH 8.0 und 30°C inkubiert. Die Auswertung durch SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß die Invertase nur unvollständig verdaut wurde, da die Aktivität des Trypsins im Lauf der Inkubation rasch abnahm. Auch die Proteolyse durch immobilisiertes Trypsin brachte kein befriedigendes Ergebnis, da die Invertase unspezifisch verdaut wurde. Durch wiederholte Zugabe von Trypsin konnte eine vollständige Verdauung der Invertase erzielt werden, ohne daß ihre Aktivität verlorenging. Es entstanden zwei Fragmente mit Molekulargewichten von 40300 Da und 18050 Da.

Die Trennung der gespaltenen Invertase (Invertase-T) von den Verunreinigungen durch Trypsin bzw. dessen Autoproteolyseprodukten erfolgte durch Ionenaustauscherchromatographie.

Durch Ansequenzierung der beiden Fragmente und Vergleich mit der bekannten Aminosäuresequenz konnte die Spaltstelle exakt lokalisiert werden. Sie liegt zwischen den Aminosäureresten Lys<sup>354</sup> und Ala<sup>355</sup>. Die Auswertung dieses Bereiches durch das Programm PEPLOT ergab, daß die Umgebung der Spaltstelle nicht in einem besonders hydrophilen Bereich liegt, in dem sie vermutlich besonders zum Lösungsmittel exponiert wäre. Durch die Ansequenzierung wurde auch festgestellt, daß sich im Gegensatz zu Literaturangaben kein Methionin am aminoterminalen Ende befindet.

Die Aktivitätsfärbung der Invertase-T nach Nativgelelektrophorese ergab, daß Invertase-T als nicht-kovalentes enzymatisch aktives Assoziat der beiden Fragmente vorliegt, da die Wanderungsstrecke nahezu identisch mit der von nativer Invertase ist und keine weiteren Banden auf mit Coomassie-Blue gefärbten identischen Gelen auftreten. Die Invertase-T liegt nach diesen Ergebnissen wie die native Form als Dimer vor. Höhere Assoziate wie z.B. Tetra- oder Oktamere konnten bei keiner der beiden Invertaseformen nachgewiesen werden.

Beide Formen unterscheiden sich weder im UV-Spektrum von 240-350 nm, noch in den Fluoreszenzemissionsspektren. Auch durch CD-Spektroskopie im Fern-UV-Bereich konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Stabilitäten von Invertase-T und nativer Invertase sind nach 1- und 5-stündiger Inkubation bei verschiedenen pH-Werten und einer Temperatur von 30°C identisch. Geringe Stabilitätsunterschiede wurden bei 50°C beobachtet. Das Stabilitätsoptimum liegt für beide Formen bei pH 5.0.

Ein geringer Unterschied beider Invertaseformen zeigt sich im Mittelpunkt der irreversiblen thermischen Desaktivierung. Dieser Wert liegt für native Invertase bei 64°C, für Invertase-T bei 60.5°C. Diese verringerte Stabilität gegen Hitzedenaturierung zeigt sich auch in der Kinetik der thermischen Desaktivierung. Invertase-T ist nach Inkubation bei einer Temperatur von 60°C nach 15 Minuten zu 50% desaktiviert, während native Invertase zu diesem Zeitpunkt noch zu 85% aktiv ist.

Ähnliche Ergebnisse liefern die Daten zur Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln. Die Zeit, nach der 50% des Proteins entfaltet vorlagen, wurde durch Fluoreszenzmessungen bei einer GuHCl-Konzentration von 3 M für Invertase-T zu 5 Minuten bestimmt. Unter identischen Versuchsbedingungen lag dieser Wert für ungespaltene Invertase bei 8 Minuten. Bei Inkubation in 4M GuHCl beträgt die Halbwertszeit für beide Formen 1.5 Minuten.

Die GuHCl-abhängigen Desaktivierungsübergänge liegen nahe zusammen. Die Übergangsmittelpunkte liegen bei 1.4 und 1.2 M GuHCl für native und gespaltene Invertase. Der Entfaltungsmittelpunkt, bestimmt durch Fluoreszenzmessungen, unterscheidet sich leicht von den vorhergehenden Werten. Hier liegen die Werte nach 12 Stunden Inkubationszeit bei 1.8 (native Form) und 1.6 M GuHCl, nach 24 Stunden bei 1.4 und 1.2 M GuHCl.

Die Renaturierungsausbeuten nach vollständiger Entfaltung mit GuHCl sind bei beiden Formen konzentrationsabhängig. Die optimale Ausbeute wurde bei nativer Invertase bei maximal 2 µg/ml erreicht, bei Invertase-T betrug diese Konzentration 0.5 µg/ml. Die Renaturierungsdauer scheint dagegen keinen Einfluß auf die Reaktivierungsausbeute zu haben. Nach 2, 6 und 24 Stunden Renaturierungszeit konnte native Invertase zu jeweils etwa 45% renaturiert werden, während bei Invertase-T lediglich Ausbeuten von maximal 5% möglich waren.

Zur Untersuchung von Konformationsänderungen der beiden Invertaseformen wurde die Harnstoffgradientengelelektrophorese. Der Gradient verlief senkrecht zur Laufrichtung der Proteine linear von 0-4 M bzw. 0-8 M Harn-

stoff. Die Auftragung von nativen Proben ergab folgende Ergebnisse: Die Entfaltung nativer Invertase beginnt bei einer Harnstoffkonzentration von 2 M. Bei 4 M liegt sie vollständig entfaltet vor. Bei Invertase-T überlagern sich zwei Effekte. Zunächst beginnt die Enfaltung bei 2 M Harnstoff. Ab 3 M erfolgt die Dissoziation der beiden proteolytischen Fragmente, die bei 6 M Harnstoff als deutlich getrennte Banden auf dem Gel zu erkennen sind.

Die Auftragung von vollständig in 8 M Harnstoff denaturierten Proben ergab bei beiden Formen, daß der größte Teil der ungespaltenen Invertase nicht renaturiert werden kann und vermutlich aggregiert. Lediglich ein kleiner Teil zeigt einen Übergang zu einer kompakteren Struktur. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß es sich dabei nicht um enzymatisch aktive Formen handelt. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei der gespaltenen Invertase. Das größere Fragment verhält sich wie die intakte Invertase, das kleinere Fragment faltet vollständig in eine kompaktere Struktur. Assoziate aus den beiden Fragmenten bildeten sich nicht. Auch hier konnte keine Invertaseaktivität festgestellt werden.

Da von Invertase keine röntgenkristallographischen Daten vorliegen, wurde versucht, das Protein zu kristallisieren. Dazu wurde interne Invertase nachgereinigt, auf 7.6 mg/ml aufkonzentriert und Ansätze mit verschiedenen Puffern und pH-Werten angefertigt. Unter den vorliegenden Bedingungen konnte jedoch keine Kristallbildung beobachtet werden.

In einem weiteren Experiment wurde die Beständigkeit von interner und externer Invertase gegenüber Proteolyse durch Trypsin verglichen. Es stellte sich heraus, daß externe Invertase unter identischen Versuchsbedingungen langsamer gespalten wird. Dies bedeutet, daß externe Invertase durch den Glykoanteil vor einem hydrolytischem Angriff geschützt wird.

---

**5. ABKÜRZUNGEN**

$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
A	Absorption
ABTS	2.2'-Amino-di-[3äthyl-benzthiazolin-sulfonsäure-(6)]-di-ammoniumsalz
Å	Ångström
c	Proteinkonzentration
d	Schichttiefe
DEAE	Diethylaminoethan
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
g	Erdbeschleunigung
GOD	Glukoseoxidase
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
h	Stunde
Invertase-T	Durch Trypsin gespaltene Invertase
min	Minute
$M_r$	Molekülmasse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TEMED	Tetramethylendiamin
$T_M$	Mittelpunkt des thermischen Entfaltungsübergangs
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volumen

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, M., Richtmeyer, N. K. & Hudson, C. S. (1943) *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 1369-1380
- Albon, N., Bell, D. J., Blanchard, P. H., Gross, D. & Rundell, J. T. (1953) *J. Chem. Soc.*, 24-27
- Anfinsen, C. B. (1956) *J. Biol. Chem.* 221, 405-412
- Bacon, J. S. D. & Edelman, J. (1950) *Arch. Biochem. Biophys.* 28, 467-468
- Balls, A. K. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 53, 392-396
- Bergh, M. L. E., Cepko, C. L., Wolf, D. & Robbins, P. W. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 3570-3574
- Berthelot, M. (1860) *Compt. Rend. Acad. Sci.* 50, 980-988
- Blanchard, P. H. & Albon, N. (1950) *Arch. Biochem. Biophys.* 29, 220-222
- Brown, J. A., Segal, H. L., Maley, F., Trimble, R. B. & Chu, F. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3689-3691
- Büntemeyer, K., Kroner, K. H., Hustett, H. & Deckwer, W.-D. (1989) *Process Biochemistry* 24, 212-216
- Carlson, M. & Botstein, D. (1982) *Cell* 28, 145-154
- Carlson, M. & Botstein, D. (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 351-359
- Chou, P. I. & Fasman, G. D. (1978) *Adv. Enzymol.* 47, 45-148
- Chu, F. K., Trimble, R. B. & Maley, F. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8691-8693
- Chu, F. K., Watorek, W. & Maley, F. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 223, 543-555
- Chu, F. K. & Maley, F. (1981), *Fed. Proc.* 40, 1556-1556
- Creighton, T. E. (1978) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33, 231-297
- Engelman, D. M., Steitz, T. A., Goldman, A. (1986) *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15, 321-353
- Esmon, P. C., Esmon, B. F., Schauer, I. E., Taylor, A. & Schekman, R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4387-4394
- Euler, H. & Kullberg, S. (1911a) *Z. physiol. Chem.* 71, 134-142
- Euler, H. & Kullberg, S. (1911b) *Z. physiol. Chem.* 73, 335-344
- Fischer, E. H., Kohtes, L. & Fellig, J. (1951) *Helv. Chim. Acta* 34, 1132-1138
- Fischer, G. & Schmid, F. X. (1990) *Biochemistry* 29, 2205-2212

- Fontana, A. (1989) *Highlights of Modern Biochemistry* (Kotyk, A., Skoda, J., Paces, V. & Kostka, V., Hrsg.) pp. 1711-1726, VSP International Science Publishers, Zeist (Holland)
- Goldenberg, D. P. & Creighton, T. E. (1984) *Anal. Biochem.* 138, 1-18
- Goldenberg, D. P. (1989) *Protein Structure, A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed.) pp. 225-250, IRL Press Oxford New York Tokyo
- Goldstein, A. & Lampen, J.O. (1975) *Meth. Enzym.* 42, 504-511
- Gottschalk, A. (1950) *Advances in Carbohydrate Chem.* 5, 49-78
- Gross, D., Blanchard, P. H. & Bell, D. J. (1954) *J. Chem. Soc.* 1727-1730
- Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 1929-1933
- Jaenicke, R. (1987) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 49, 117-237
- Jaenicke, R. (1988) *Naturwissenschaften* 75, 604-610
- Janin, J. & Wodak, S. J. (1983) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 42, 21-78
- Keil, B. (1971) *The Enzymes Vol III* (Boyer, P. D., Hrsg), pp. 250-273, Academic Press Inc., New York
- Kikuchi, T., Némethy, G. & Scheraga, H. A. (1988) *J. Prot. Chem.* 7, 427-471
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 459-489
- Klenow, H. & Henningens, I. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 65, 168-175
- Koshland, D. E. Jr. & Stein, S. S. (1954) *J. Biol. Chem.* 208, 139-148
- Kuwajima, K. (1989) *Proteins* 6, 87-103
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- Lee, B. & Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Chem.* 55, 379-400
- Mathews, A. P. & Glenn, T. H. (1911) *J. Biol. Chem.* 9, 29-56
- Montelione, G. T. & Scheraga, H. A. (1989) *Acc. Chem. Res.* 22, 70-76
- Myrbäck, K. (1965) *Arkiv f. Kemi* 25, 315-320
- Neurath, H. & Schwert, G. W. (1950) *Chem. Rev.* 46, 69-153
- Neurath, H. (1980) in *Protein Folding* (Jaenicke, R., Hrsg) pp. 501-523, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam & New York
- Neurath, H. (1985) *Chemica Scripta* 27B, 221-229
- Ollis, D., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G. & Steitz, T. A. (1985) *Nature* 313, 762-766

- Osborne, W. A. (1899) *Z. physiol. Chem.* 28, 399-425
- O'Sullivan, C. & Thompson, F. W. (1890) *J. Chem. Soc.* 57, 834-891
- Pechère, J. F. & Neurath, H. (1957) *J. Biol. Chem.* 229, 389-407
- Perlman, D., Halvorson, H. O. & Cannon, L. E. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 781-785
- Perlman, D., Raney, P., Halvorson, H. D. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 5033-5037
- Plummer, T. H. Jr., Elder, J. H., Alexander, S., Phelan, A. W. & Tarentino, A.L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 10700-10704
- Reddy, V. A., Johnson, S. J., Biemann, K., Williams, R. S., Ziegler, F. D., Trimble, R. B. & Maley, F. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6978-6985
- Reddy, V. A., MacColl, R. & Maley, F. (1990) *Biochemistry* 29, 2482-2487
- Reddy, V. A. & Maley, M. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10817-10820
- Reynolds, J. A. & Tanford, C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 5161-5165
- Rick, W. (1962) *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H-U., Hrsg.) pp. 807-818, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.
- Rossmann, M. G. & Liljas, A. (1974) *J. Mol. Biol.* 85, 177-181
- Salkowski, E. (1901) *Z. physiol. Chem.* 31, 305-328
- Schroeder, D. D. & Shaw, E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 2943-2949
- Schülke, N. (1988), Promotionsarbeit Universität Regensburg
- Schülke, N. & Schmid, F. X. (1988a) *J. Biol. Chem.* 263, 8827-8831
- Schülke, N. & Schmid, F. X. (1988b) *J. Biol. Chem.* 263, 8832-8837
- Schwert, G. W. & Takenaka, Y. (1955) *Biochim. Biophys. Acta* 16, 570-575
- Sörensen, S. P. L. (1909) *Biochem. Z.* 21, 131-304
- Tammi, M., Ballou, L., Taylor, A. & Ballou, C. E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 4395-4401
- Tanaka, S. & Scheraga, H. A. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 3802-3806
- Tarentino, A. L., Gómez, C. M., Plummer, T. H. Jr. (1985) *Biochemistry* 24, 4665-4671
- Taussig, R. & Carlson, M. (1983) *Nucl. Acid. Res.* 11, 1943-1954
- Trimble, R. B. & Maley, F. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4409-4412
- Waheed, A., & Shall, S. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242, 172-186

- Walsh, K. A. & Neurath, H. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 52, 884-889
- Weber, K. & Osborne, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- Weidenhagen, R. N., Prissler, E. & Lorenz, S. (1957) *Chem. Ber.* 90,  
1046-1050
- Wetlaufer, D. B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 697-701
- Ziegler, F. D., Maley, F. & Trimble, R. B. (1988) *J. Biol. Chem.* 263,  
6986-6992

*Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1987 bis Juni 1991 am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Professor Dr. Franz Xaver Schmid angefertigt.*

*Bei Herrn Professor Dr. Franz Xaver Schmid bedanke ich mich für die Anleitung, hilfreiche Unterstützung und anregende Diskussionen.*

*Herrn Professor Dr. Rainer Jaenicke möchte ich für das Interesse an meiner Arbeit danken.*

*Bei Frau Heidi Blaschek, Frau Verena Schultes, Frau Judith Schumann und Frau Andrea Tomschy sowie den Herren Gerald Böhm, Stefan Kallasch, Gunther Kern, Dr. Kurt Lang, Paul Rehner, Winfried Reng, Dr. Norbert Schülke und Dr. Alexander Wrba bedanke ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit.*

*Darüber hinaus gilt mein Dank allen anderen hier ungenannten Mitgliedern des Lehrstuhls für die zahlreichen Hilfeleistungen und die freundliche Aufnahme in ihren Kreis.*

*Herrn Priv. Doz. Dr. Ludwig Lehle bin ich für die freundliche Überlassung des transformierten Hefestammes zu besonderem Dank verpflichtet.*

*Des weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie sowie meinen Freunden für die entspannenden Stunden in meiner Freizeit.*