

# **Gewinnung und gentechnische Modifizierung einer rekombinanten Phospholipase A<sub>2</sub> zur industriellen Anwendung**

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Yvonne Markert  
geb. am: 25.04.1977 in: Halle

**urn:nbn:de:gbv:3-000007113**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007113>]

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann.

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. U. Bornscheuer
3. Prof. Dr. P. Nuhn

Tag der öffentlichen Verteidigung: 14. 07.2004

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>6</b>
<b>2. Theoretischer Teil</b>	<b>8</b>
2.1. Phospholipasen	8
2.2. Phospholipasen A <sub>2</sub>	9
2.2.1. Sekretorische Phospholipasen A <sub>2</sub>	11
2.2.1.1. Der Katalysemechanismus	11
2.2.1.2. Strukturelle Gemeinsamkeiten	13
2.2.2. Cytosolische Phospholipasen A <sub>2</sub>	17
2.2.3. Calciumunabhängige Phospholipasen A <sub>2</sub>	19
2.2.4. <i>Platelet-activating factor</i> Acetylhydrolasen	21
2.2.5. Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Gift der Europäischen Honigbiene	23
2.3. Herstellung rekombinanter Proteine	27
2.3.1. Vor- und Nachteile der Expression in <i>Escherichia coli</i>	27
2.3.2. Herstellung rekombinanter sekretorischer Phospholipasen A <sub>2</sub>	29
2.4. Thermodynamische Stabilität von Proteinen	32
2.4.1. Definitionen	32
2.4.2. Der Einfluss von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität	33
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>35</b>
3.1. Materialien	35
3.1.1. Chemikalien	35
3.1.2. Standards und Kits	36
3.1.3. Enzyme und Proteine	36
3.1.4. Bakterienstämme	37
3.1.5. Plasmide	37
3.1.6. Oligonukleotide	37
3.1.7. Nährmedien	39
3.2. Methoden	40
3.2.1. Gensynthese	40
3.2.2. Klonierung des <i>pla</i> <sub>2</sub> -Gens	41
3.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese	41
3.2.3.1. QuikChange	41
3.2.3.2. MultiQuikChange	41
3.2.4. Molekularbiologische Standardmethoden	42
3.2.4.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> Stämmen	42
3.2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA	42
3.2.4.3. Agarosegelelektrophorese	42
3.2.4.4. Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA	42
3.2.4.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen	43

3.2.4.6.	DNA-Reinigung von PCR-Produkten	43
3.2.4.7.	Restriktionsanalysen	43
3.2.4.8.	Dephosphorylierung	43
3.2.4.9.	Ligation	43
3.2.4.10.	Mikrodialyse von DNA	44
3.2.4.11.	Amplifizierung von DNA-Fragmenten	44
3.2.4.12.	DNA-Sequenzierung	44
3.2.4.13.	Transformation durch Elektroporation	44
<b>3.2.5.</b>	<b>Expression und Reinigung von Phospholipase A<sub>2</sub></b>	<b>45</b>
3.2.5.1.	Expression	45
3.2.5.2.	Präparation von <i>inclusion bodies</i>	45
3.2.5.3.	Solubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	46
3.2.5.4.	Renaturierung	46
3.2.5.5.	Konzentrierung/Dialyse	47
3.2.5.6.	Reinigung von Phospholipase A <sub>2</sub>	47
<b>3.2.6.</b>	<b>Hochzelllichtfermentation</b>	<b>47</b>
<b>3.2.7.</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration</b>	<b>49</b>
3.2.7.1.	Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration	49
3.2.7.2.	BCA-Test	49
3.2.7.3.	Densitometrische Evaluierung der Proteinkonzentration	49
<b>3.2.8.</b>	<b>SDS-PAGE</b>	<b>50</b>
<b>3.2.9.</b>	<b>Isoelektrische Fokussierung</b>	<b>50</b>
<b>3.2.10.</b>	<b>NaDOC-Fällung</b>	<b>50</b>
<b>3.2.11.</b>	<b>Aktivitätsbestimmung von PLA<sub>2</sub></b>	<b>51</b>
3.2.11.1.	Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren	51
3.2.11.2.	Aktivität gegen 1,2-Diheptanoylthio- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	51
<b>3.2.12.</b>	<b>CD-Spektroskopie</b>	<b>52</b>
<b>3.2.13.</b>	<b>Fluoreszenzspektroskopie</b>	<b>52</b>
<b>3.2.14.</b>	<b>Proteinsequenzierung</b>	<b>53</b>
<b>3.2.15.</b>	<b>Massenspektrometrie</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1.	Gensynthese	54
4.2.	Klonierung und Expression von Phospholipase A <sub>2</sub>	56
4.2.1.	Auswahl und Konstruktion der Expressionssysteme	56
4.2.2.	Optimierung der Expression	60
4.3.	Präparation der <i>inclusion bodies</i>	62
4.4.	Optimierung der Renaturierung von Phospholipase A <sub>2</sub>	63
4.4.1.	Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Renaturierung	64
4.4.2.	Einfluss des pH-Wertes auf die Renaturierung	65
4.4.3.	Einfluss der Protein-Konzentration auf die Renaturierung	65
4.4.4.	Einfluss niedermolekularer Zusätze auf die Renaturierung	67
4.4.5.	Einfluss der GSSG- und GSH-Konzentration auf die Renaturierung	68
4.4.6.	Einfluss von GdnHCl auf die Renaturierung	70
4.4.7.	Zusammenfassung der Renaturierungsversuche	71
4.5.	Reinigung rekombinanter Phospholipase A <sub>2</sub>	72
4.6.	Charakterisierung der rekombinanten Phospholipase A <sub>2</sub> -Enzyme	73
4.6.1.	N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse	73
4.6.2.	Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivität	74
4.6.3.	Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von Phospholipase A <sub>2</sub>	75

---

<b>4.6.4.</b>	<b>Temperaturstabilität von Phospholipase A<sub>2</sub></b>	<b>76</b>
<b>4.6.5.</b>	<b>Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von Phospholipase A<sub>2</sub></b>	<b>77</b>
<b>4.6.6.</b>	<b>Spektrale Eigenschaften von Phospholipase A<sub>2</sub></b>	<b>78</b>
4.6.6.1.	Fluoreszenzemissionsspektren	78
4.6.6.2.	CD-Spektren	79
<b>4.6.7.</b>	<b>Thermodynamische Stabilität von Phospholipase A<sub>2</sub></b>	<b>80</b>
<b>4.7.</b>	<b>Scale up der Expression von PLA<sub>2</sub> – Hochzell-dichtefermentation</b>	<b>82</b>
<b>4.8.</b>	<b>Einfluss der Disulfidbrücken auf die Eigenschaften von PLA<sub>2</sub></b>	<b>85</b>
<b>4.8.1.</b>	<b>Herstellung der Cysteinmutanten</b>	<b>86</b>
<b>4.8.2.</b>	<b>Vergleich der spezifischen Hydrolyseaktivitäten</b>	<b>86</b>
<b>4.8.3.</b>	<b>Spektrale Eigenschaften der Cysteinmutanten</b>	<b>88</b>
4.8.3.1.	Fluoreszenzemissionsspektren der Cysteinmutanten	88
4.8.3.2.	CD-Spektren der Cysteinmutanten	89
<b>4.8.4.</b>	<b>Thermodynamische Stabilität der Cysteinmutanten</b>	<b>91</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>110</b>

## Abkürzungen und Symbole

Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
bp-PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas
bv-PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> aus dem Bienengift
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
CD	Circulardichroismus
cPLA <sub>2</sub>	cytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
d	Schichtdicke einer Küvette
D	denaturierter Zustand
[D]	Denaturanzkonzentration
Da	Dalton
DCPC	1,2-Dicaproyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
f <sub>N</sub>	Anteil an nativem Protein
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
iPLA <sub>2</sub>	calciumunabhängige Phospholipase A <sub>2</sub>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IRD800	Fluoreszenzfarbstoff zur Sequenzierung von DNA
Kan <sup>r</sup>	Kanamycinresistenz

$k_f$	Geschwindigkeitskonstante der Faltung
$k_u$	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung
LMW-Marker	Low-Molecular-Weight-Proteinmarker
$m$	Anstieg der freien Enthalpie in Abhängigkeit von der Denaturanzkonzentration
$M_r$	molare Masse
N	nativer Zustand
$N_A$	Anzahl der Aminosäuren eines Proteins
$OD_{600}$	optische Dichte bei 600 nm
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PAF-AH	<i>platelet-activating factor</i> Acetylhydrolase
pPAF-AH	<i>platelet-activating factor</i> Acetylhydrolase aus dem Plasma
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sPLA <sub>2</sub>	sekretorische Phospholipase A <sub>2</sub>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Internationale Einheit der Enzymaktivität; 1 U entspricht dem Substratumsatz von 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$
UV	Ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
$\Delta G$	freie Enthalpie
$\Delta G_0$	freie Standardenthalpie
$\Delta G^{\#}_F$	freie Aktivierungsenthalpie der Faltung
$\Delta G^{\#}_U$	freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung
$\Theta$	gemessene Elliptizität (mdeg)
$[\Theta]_{MRW}$	molare Elliptizität (bezogen auf die Aminosäurereste)

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Für Phospholipide, Lysophospholipide und Phospholipidanaloge besteht ein stetig wachsender Bedarf in verschiedenen Praxisbereichen. In der Lebensmittelindustrie werden vor allem Lecithine (Code E322) als Lebensmittel-Emulgatoren z.B. für Mayonnaise, Backhilfsmittel, Fließverbesserer bei der Schokoladeherstellung und als Nahrungsergänzungsmittel in der Diätetik eingesetzt. In der kosmetischen Industrie werden Phospholipide unter anderem zur Herstellung von Cremes (W/O-Emulsionen) verwendet. Weiterhin wird das im Lecithin enthaltene Phosphatidylcholin in Liposomenform eingesetzt, um Wirkstoffe gezielt in die Haut zu transportieren z.B. für die Aknebehandlung. Aber auch als Träger für Arzneistoffe (Aerosole, Salben, Gele, Suspensionen) finden Phospholipide ein breites Anwendungsspektrum.

Industriell werden Phospholipide durch chemische Modifizierung von in der Natur vorkommenden pflanzlichen oder tierischen Phospholipiden oder aber auf chemischem Weg vollsynthetisch gewonnen. Die industrielle Darstellung von Lysophospholipiden erfolgt bereits durch enzymkatalysierte Verfahren. Hierbei werden Phospholipasen A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), die aus Säugetieren (vor allem Rinder- und Schweinepankreas) isoliert wurden, eingesetzt, um gezielt eine veresterte Fettsäure zu entfernen. Dem Einsatz dieser Enzyme sind jedoch aus Sicherheitsbedenken (Gefahr von Virus- und Prioneninfektionen) und aus religiösen Vorbehalten (bei jüdischer und moslemischer Religionszugehörigkeit) für Anwendungen im pharmazeutischen Bereich und der Lebensmittelindustrie Grenzen gesetzt. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb die rekombinante Gewinnung einer PLA<sub>2</sub>, deren Gen nicht aus Säugern stammt. Die Arbeit wurde im Rahmen eines Industrie-Kooperationsverbundes, gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt, angefertigt. In Abstimmung mit dem Industriepartner (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) sollte eine PLA<sub>2</sub> hergestellt werden, deren Gensequenz der aus der Europäischen Honigbiene entspricht.

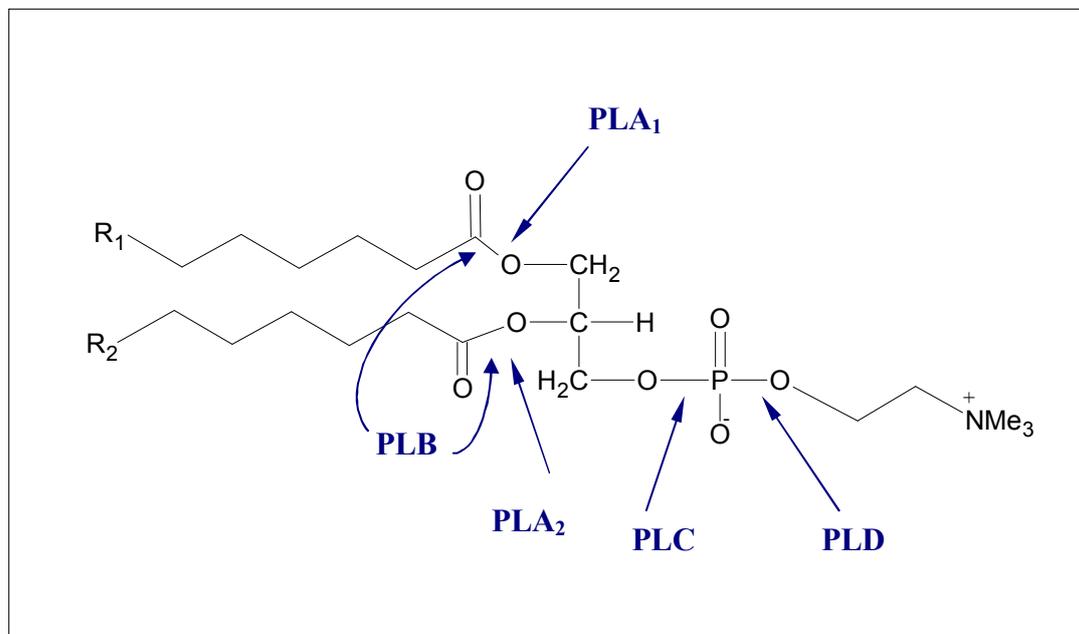
Hierfür sollte ein mittels PCR synthetisch hergestelltes PLA<sub>2</sub>-Gen angewandt werden. Das so erhaltene Gen sollte kloniert und zur heterologen Expression in Form von *inclusion bodies* in *Escherichia coli* (*E. coli*) gebracht werden. Die Methoden zur Expression, Isolierung, Renaturierung und Reinigung des Enzyms sollten hinsichtlich der Produktausbeuten optimiert werden, wobei die Expression auf den Pilotmaßstab (10 Liter-Fermentation) übertragen werden sollte, um in Vorbereitung einer möglichen Überführung in die Industrie eine Maßstabsvergrößerung der Enzymgewinnung zu überprüfen. Nach der Präparation des Enzyms sollten die Aktivitäts- und Stabilitätseigenschaften untersucht werden und mit denen des kommerziell verfügbaren Enzyms, welches aus dem Bienengift isoliert wird, verglichen

werden. Weiterhin sollte versucht werden, durch gezielte Mutagenese eine Destabilisierung des Enzyms bei Erhalt der biologischen Aktivität zu erreichen, da die hohe Stabilität der bisher eingesetzten PLA<sub>2</sub>s ein Problem beim industriellen Einsatz darstellt. Hierfür sollte der Einfluss der fünf Disulfidbrücken des Enzyms bezüglich Aktivität und Stabilität näher charakterisiert werden.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1. Phospholipasen

Phospholipasen sind Enzyme, die Phospholipide, die vor allem wichtige Bausteine aller Zellmembranen sind, spalten. Phospholipasen werden nach ihrem Angriffsort am Phospholipid (Abbildung 1) in vier Gruppen unterteilt. Phospholipase A<sub>1</sub> (EC 3.1.1.32) und Phospholipase A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4) sowie Phospholipase B (EC 3.1.1.5) sind Acylhydrolasen, die spezifisch die Fettsäurereste im Phospholipid abspalten. Phospholipase C (EC 3.1.4.10) und Phospholipase D (EC 3.1.4.4) hingegen gehören zur Gruppe der Phosphodiesterasen.



**Abbildung 1: Hydrolyse von 1,2- Diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin durch Phospholipasen.**

PLA<sub>1</sub> Phospholipase A<sub>1</sub>  
 PLA<sub>2</sub> Phospholipase A<sub>2</sub>  
 PLB Phospholipase B  
 PLC Phospholipase C  
 PLD Phospholipase D  
 R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> Alkylreste

## 2.2. Phospholipasen A<sub>2</sub>

Die PLA<sub>2</sub>-Superfamilie besteht aus einer Vielzahl von Enzymen, die spezifisch die *sn*2-Esterbindung von Phospholipiden spalten (Abbildung 1) (Dennis 1997; Six und Dennis 2000). Die Hydrolyseprodukte sind freie Fettsäuren und Lysophospholipide. Freie Fettsäuren, wie Oleinsäure, können als Energiereservoir dienen. Arachidonsäure fungiert als *second messenger* und Vorstufe für Eicosanoide, welche potente Mediatoren der Signaltransduktion und bei Entzündungsvorgängen darstellen (Murakami et al. 1999; Balsinde et al. 2002; Taketo und Sonoshita 2002; Granata et al. 2003). Lysophospholipide hingegen spielen eine entscheidende Rolle bei dem *Phospholipid-remodeling*, bei der Übertragung von Zellsignalen und bei der Zerstörung von Zellmembranen (Atsumi et al. 2000; Kudo und Murakami 2002; Asai et al. 2003). Neben diesen Funktionen wird auch die Deaktivierung von bioaktiven Lipiden wie dem *platelet-activating factor* (PAF) (Murakami et al. 1997; Derewenda und Ho 1999; Bae et al. 2000) durch Hydrolyse beschrieben, die eine Negativregulation von Zellsignalen nach sich führt. PLA<sub>2</sub>s wurden erstmals Ende des 19. Jahrhunderts aus Giften von Kobras isoliert (Six und Dennis 2000). Später wurden weitere PLA<sub>2</sub>s in großen Mengen in verschiedenen Pankreassäften gefunden (Drenth et al. 1976; Dijkstra et al. 1978). Neben diesen extrazellulären, als sekretorische PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>) bezeichneten Enzymen, deren Vertreter sich mittlerweile in 8 Untergruppen unterteilen lassen (Balsinde et al. 1999) (Tabelle 1), wurden im Cytosol von unterschiedlichen Zelltypen weitere PLA<sub>2</sub>s gefunden, die sich strukturell von den sekretorischen PLA<sub>2</sub>s unterscheiden. Diese werden als cytosolische PLA<sub>2</sub>s (cPLA<sub>2</sub>) bezeichnet (Alonso et al. 1986; Kramer et al. 1991; Sharp et al. 1991). Weiterhin wurden neben den bereits aufgeführten calciumabhängigen Enzymen PLA<sub>2</sub>s (iPLA<sub>2</sub>s) isoliert, die keine Calciumionen als Kofaktor benötigen und sich strukturell von sPLA<sub>2</sub>s und cPLA<sub>2</sub>s unterscheiden (Ackermann et al. 1994; Winstead et al. 2000). Einen weiteren wichtigen Vertreter der PLA<sub>2</sub>s stellt die Gruppe der *platelet-activating factor* Acetylhydrolasen (PAF-AHs, EC 3.1.1.47) dar (Derewenda und Ho 1999). In Tabelle 1 sind zusammenfassend alle derzeitig bekannten Gruppen der PLA<sub>2</sub>s dargestellt.

**Tabelle 1: Klassifizierung der bisher bekannten PLA<sub>2</sub>s** nach Dennis (1997), Balsinde et al. (1999), Six und Dennis (2000), Berg et al. (2001), Taketo und Sonoshita (2002).

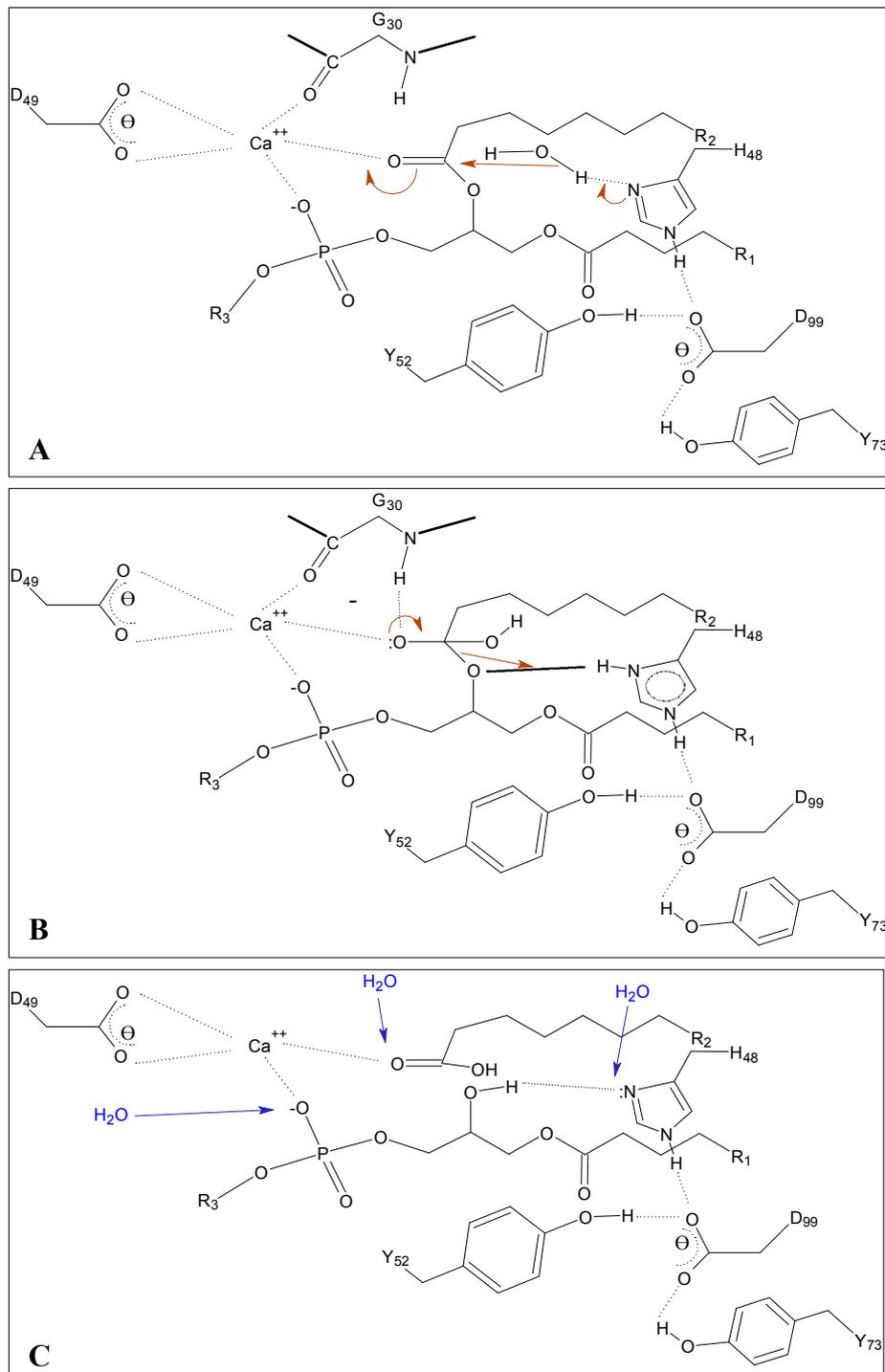
Gruppe	Vorkommen	Größe kDa	Disulfid- brücken	Calcium- bedarf	Charakteristika	Lokalisation	Referenz
I	A	Kobra-, Natterngift	13-15	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Fremont et al. 1993)
	B	Säugerpankreas	13-15	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Seilhamer et al. 1986)
II	A	Gelenkflüssigkeit Klapperschlange	13-15	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Valentin et al. 1999a)
	B	GabunViper	13-15	6	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Botes und Viljoen 1974)
	C	Ratten/Mäusehoden	15	8	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Chen et al. 1994a)
	D	Mensch/Maus, Pankreas/Milz	14-15	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Ishizaki et al. 1999)
	E	Mensch/Maus, Gehirn/Herz/Gebärmutter	14-15	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Valentin et al. 1999a)
	F	Maus, Hoden/Embryo	16-17	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Valentin et al. 1999a)
III	Biene, Skorpion, Eidechse	15-18	5	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Shipolini et al. 1971)	
IV	A	U937-Zelllinie	85	-	µM	C2-Domäne Ser505, GLSGS	cytosolisch (Alonso et al. 1986)
	B	Mensch, Gehirn	100	-	µM	C2-Domäne, GASGS	cytosolisch (Song et al. 1999)
	C	Mensch, Herz/Skelettmuskel	65	-	-	isoprenyliert, GVS GS	cytosolisch (Pickard et al. 1999)
V	Mensch/Ratte/Maus, Herz/Lunge P388D <sub>1</sub> Makrophagen	14	6	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Chen et al. 1994b)	
VI	P388D <sub>1</sub> Makrophagen	80-85	-	-	GXSXG ATP-Bindungsmotiv	cytosolisch (Balboa et al. 1997)	
VII	A	Mensch, Plasma	45	-	-	GXSXG	sekretorisch (Stafforini et al. 1997)
	B	Rind, Gehirn	42	-	-	N-terminal myristyliert	cytosolisch (Hattori et al. 1995)
VIII	Rind, Gehirn	29	-	-	Ser47	cytosolisch (Hattori et al. 1993)	
IX	marine Schnecken	14	6	µM	His-Asp-Diade	sekretorisch (McIntosh et al. 1995)	
X	Mensch, Leukozyten	14	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Cupillard et al. 1997)	
XI	A	Reis	12,4	6	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Stahl et al. 1999)
	B	Reis	12,9	6	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Stahl et al. 1999)
XII	Herz/Skelettmuskel	16	7	mM	His-Asp-Diade	sekretorisch (Gelb et al. 2000)	

### 2.2.1. Sekretorische Phospholipasen A<sub>2</sub>

sPLA<sub>2</sub>s sind kleine (12-19 kDa) Proteine, die Calciumionen als Kofaktor im millimolaren Konzentrationsbereich (außer Gruppe IX) benötigen, im alkalischen pH-Bereich ihr Aktivitätsoptimum besitzen und aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede in 8 Gruppen (Gruppen: I, II, III, V, IX, X, XI, XII) (Tabelle 1) unterteilt werden (Berg et al. 2001). sPLA<sub>2</sub>s sind weit verbreitet in der Natur. Man findet sie in fast allen Geweben sowie in der Pankreasflüssigkeit und in Giften diverser Organismen. Neben digestiven Funktionen sind sie an der Eicosanoidbildung, Zellkontraktion, Proliferation, Migration und Exocytose beteiligt (Murakami et al. 1997; Lambeau und Lazdunski 1999; Balsinde et al. 2002; Granata et al. 2003; Niessen et al. 2003). Vor allem sPLA<sub>2</sub>s aus verschiedenen Giften (Schlangen, Skorpione) besitzen neurotoxische, myotoxische, hämorrhagische und kardiotoxische Wirkungen (Arni und Ward 1996; Murakami et al. 1997; Dunn und Broady 2001; Mounier et al. 2001).

#### 2.2.1.1. Der Katalysemechanismus

Der Katalysemechanismus der sPLA<sub>2</sub>s ist dem Mechanismus von Serinproteasen (Blow et al. 1969) sehr ähnlich. Er wurde aufgeklärt, nachdem für einige sPLA<sub>2</sub>s die Raumstrukturen ermittelt worden waren (Dijkstra et al. 1981; Scott et al. 1990a; Thunnissen et al. 1990; Scott und Sigler 1994b). Die Katalyse verläuft jedoch nicht über ein Acylenzym-Intermediat. Die katalytische Triade wird bei sPLA<sub>2</sub>s aus den Aminosäuren Histidin, Aspartat und einem Wassermolekül gebildet und deshalb auch als katalytische Diade bezeichnet. Das an der Katalyse beteiligte Wassermolekül ist zu Beginn über eine Wasserstoffbrücke mit der  $\delta$ -Aminogruppe des Histidins verbunden (Abbildung 2A). Bei der Bindung des Phospholipids im aktiven Zentrum bildet das Carbonylsauerstoffatom der zu spaltenden Esterbindung eine Wasserstoffbrücke mit der Aminogruppe eines Glycinrestes. Der Imidazolrest des Histidins fungiert als Brønsted Base und entzieht dem Wassermolekül ein Proton, wodurch dieses den nucleophilen Angriff an der Carbonylgruppe der veresterten Fettsäure in *sn*2-Position durchführen kann. Die Doppelbindung der Carbonylgruppe wird zur Einfachbindung mit negativer Nettoladung am Sauerstoff und somit der Rest zum Oxyanion. Dabei wird ein tetrahedrales Intermediat gebildet (Abbildung 2B). Bei Spaltung des Phospholipids wird das Proton vom Histidin auf die Carbonylgruppe des Substrates übertragen.

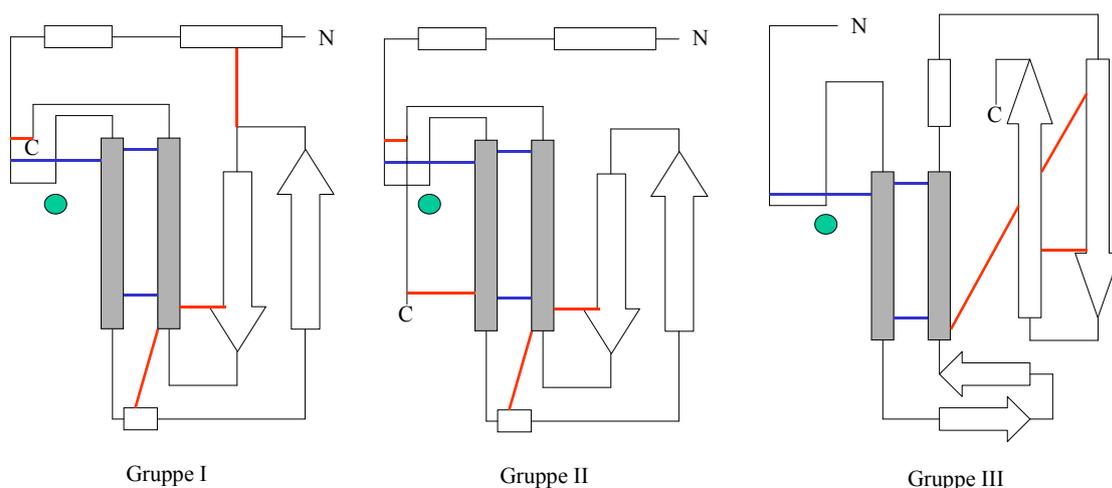


**Abbildung 2: Katalysemechanismus der PLA<sub>2</sub> aus dem Schweinepankreas nach Scott und Sigler (1994b).**  
 A: nucleophiler Angriff des H<sub>2</sub>O am gebundenen Substrat; B: Tetrahedrales Intermediat; C: Produktbildung

Im letzten Schritt gelangen drei Wassermoleküle in das aktive Zentrum und verdrängen die Produkte aus dem aktiven Zentrum (Abbildung 2C). Zwei Wassermoleküle komplexieren das Calciumion, ein Wassermolekül bildet wieder eine Wasserstoffbrücke mit der  $\delta$ -Aminogruppe des Histidins aus. Die Beteiligung des Histidins und des Aspartats am Katalysemechanismus konnte durch Mutationsstudien an unterschiedlichen sPLA<sub>2</sub>s bestätigt werden. Ein Austausch des Histidins durch Glutamin, Lysin oder Asparagin führt zu inaktiven Enzymen oder Enzymen mit sehr geringer Restaktivität (Annand et al. 1996; Janssen et al. 1999a). Weiterhin wurden sPLA<sub>2</sub>s isoliert, die anstelle des Histidins ein Leucin besitzen und somit katalytisch inaktiv sind (Rouault et al. 2003). Der Austausch des Aspartats durch Asparagin führt zu verringerten Bindungskonstanten gegenüber dem Substrat, beeinflusst die Hydrolyseaktivität jedoch nur auf moderate Weise. Es wird angenommen, dass das Aspartat nur einen stabilisierenden Einfluss auf den Imidazolrest des Histidins besitzt (Kuipers et al. 1990; Kumar et al. 1994; Annand et al. 1996; Sekar et al. 1997). Auch die hochkonservierten Tyrosine im aktiven Zentrum besitzen mehr eine strukturelle als eine katalytische Funktion (Kuipers et al. 1990; Sekharudu et al. 1992).

### 2.2.1.2. Strukturelle Gemeinsamkeiten

Bei sekretorischen PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>) liegen bis zu 50% der Struktur in  $\alpha$ -helicaler Form vor (Scott und Sigler 1994b; Arni und Ward 1996). Der homologe Kern besteht aus zwei konservierten  $\alpha$ -Helices und dem Calciumbindungsloop (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Vergleich der Strukturelemente sekretorischer PLA<sub>2</sub>s der Gruppen I, II und III nach Scott und Sigler (1994b).**

$\alpha$ -Helix (grau: konservierte Helices),   $\beta$ -Faltblatt, ● Calciumion, — nicht konservierte Disulfidbrücken, — konservierte Disulfidbrücken

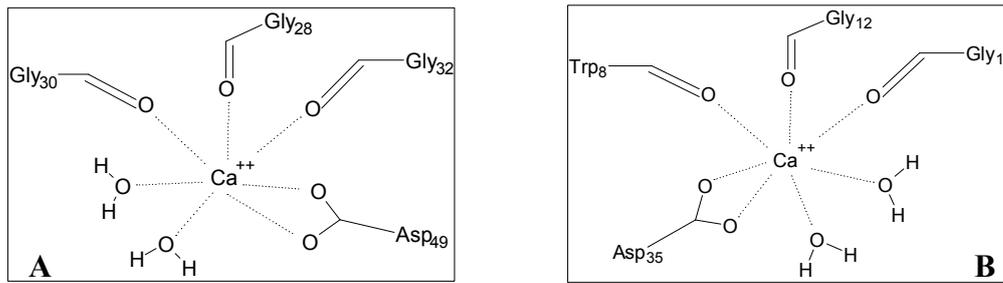
Sekretorische PLA<sub>2</sub>s besitzen fünf bis acht Disulfidbrücken, deren Anzahl von der Gruppenzugehörigkeit abhängig ist. Zwei dieser Disulfidbrücken verbinden die beiden  $\alpha$ -Helices, die die Aminosäurenreste des aktiven Zentrums beinhalten. Die dritte invariante Disulfidbrücke verbindet den Calciumbindungsloop mit einer konservierten  $\alpha$ -Helix.

### *Der Calciumbindungsloop*

Ein entscheidendes Strukturelement ist der Calciumbindungsloop, der bei allen Vertretern hochkonserviert das Motiv **XCGXGG** besitzt und für die Gruppen I und II die Aminosäuren 25-33 und für Gruppe III die Aminosäuren 8-14 umfaßt (Scott and Sigler 1994b; Murakami und Kudo 2002). Dieser flexible Loop erlaubt die Koordination des Calciumions durch drei Carbonylsauerstoffatome von Glycinresten (für Gruppe III: zwei Glycinreste und ein Tryptophanrest). Das Calciumion wird durch die Carboxylgruppe des Aspartats 49 (Position bei Gruppe I und II) und zwei Wassermoleküle pentagonal bipyramidal fixiert (Abbildung 4). Bei der Bildung des tetrahedralen Intermediates werden die Wassermoleküle durch das Oxyanion und ein Sauerstoffatom des Phosphatrestes des Substrats ersetzt (Abbildung 2B). Während der Katalyse stabilisiert das Calciumion das Oxyanion und trägt zur produktiven Substratbindung bei (McPhalen et al. 1991; Scott und Sigler 1994b; Annand et al. 1996).

Neben den sPLA<sub>2</sub>s, wo das Calciumion auch durch einen Aspartatrest ligandiert wird, wurden sPLA<sub>2</sub>s gefunden, die anstelle des Aspartats ein Lysin besitzen (Ward et al. 1998; Ward et al. 2001; Ward et al. 2002). Diese Enzyme besitzen keine oder nur geringe hydrolytische Aktivität und führen in einem calciumunabhängigen Prozess, der noch nicht aufgeklärt ist, zur Zerstörung von Zellmembranen.

Für einige Vertreter der sPLA<sub>2</sub>s wie z. B. PLA<sub>2</sub> aus dem Schweinepankreas wurde ein zweites Calciumion beschrieben, dessen Funktion bis heute noch nicht genau bekannt ist (Scott et al. 1990b; White et al. 1990; Scott und Sigler 1994a). Es wird postuliert, dass es als zusätzliches Elektrophil zur Stabilisierung des Oxyanions beiträgt.

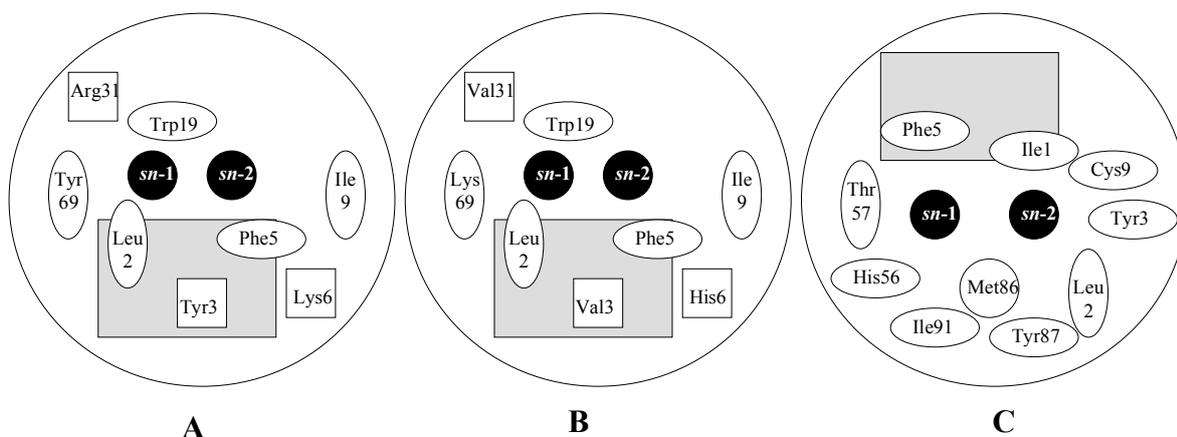


**Abbildung 4: Die Koordination des Calciumions.**

A: Gruppe I und II, nach Scott und Sigler (1994b); B: Gruppe III, nach Annand (1996)

### Der hydrophobe Kanal

Ein weiteres wichtiges Strukturelement der sPLA<sub>2</sub>s stellt der hydrophobe Kanal dar (Abbildung 5). Seine Funktion ist zum einen die Stabilisierung der Bindung des Phospholipids durch ein Cluster hydrophober Aminosäuren. Andererseits führt er durch erleichterte Diffusion das Substrat aus dem Phospholipidaggregat zum aktiven Zentrum (Dupureur et al. 1992; Scott und Sigler 1994b; Arni und Ward 1996). Die Fettsäuren in *sn*1- und *sn*2-Position des Substrats liegen fast parallel zueinander im Kanal. Der hydrophobe Kanal besitzt an der linken Wand eine bewegliche Aminosäure (Tyrosin 69 bei PLA<sub>2</sub> aus Kobragift (White et al. 1990), Lysin 69 bei humaner synovialer PLA<sub>2</sub> (Di Marco et al. 1992); Threonin 57 bei PLA<sub>2</sub> aus Bienengift (Scott et al. 1990a)), die bei Passage des hydrophilen Teils des Phospholipids im Kanal zur Seite gestellt ist. Nach der Positionierung des Substrats im Enzym wird sie in die korrekte Stellung gebracht. Dies führt zu einer weiteren Stabilisierung der Substratbindung.

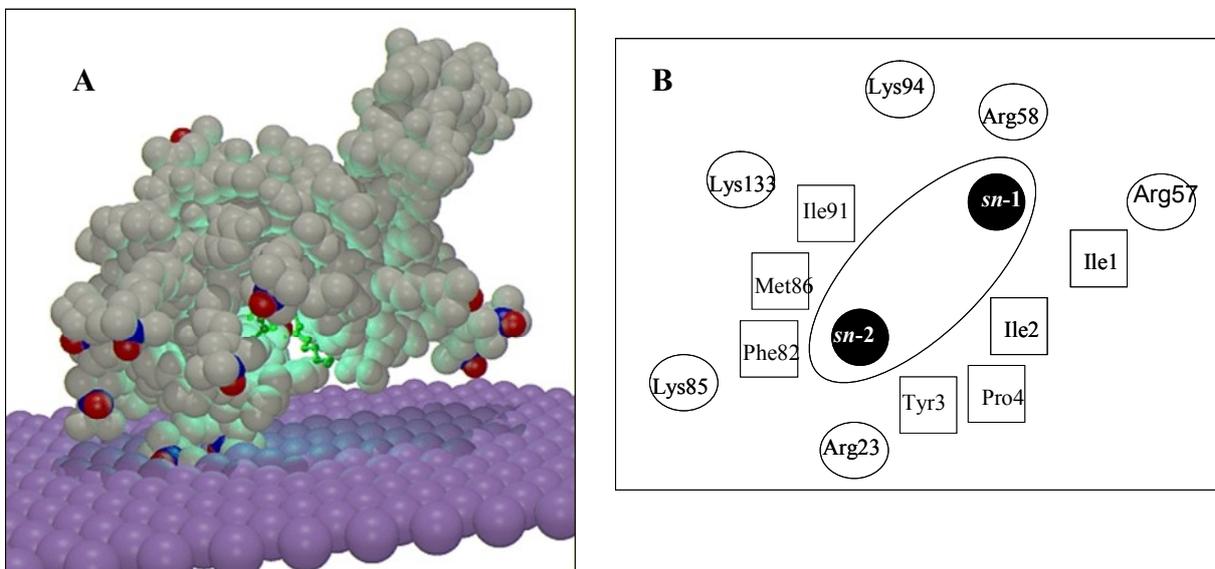


**Abbildung 5: Der hydrophobe Kanal sekretorischer PLA<sub>2</sub>s** nach Scott und Sigler (1994b).

A: Gruppe I, PLA<sub>2</sub> aus Kobragift; B: Gruppe II, synoviale PLA<sub>2</sub>; C: Gruppe III, PLA<sub>2</sub> aus Bienengift  
 Blick direkt in den hydrophoben Kanal; Ellipsen: Aminosäuren, die zum hydrophoben Kanal gehören; graue Box: Lokalisation des N-Terminus des katalytischen Netzwerkes; *sn*1 und *sn*2: Fettsäurereste in den entsprechenden Positionen

„interfacial binding site“

Allgemein gilt, dass lipolytische Enzyme wie Phospholipasen eine größere Aktivität gegenüber Substraten zeigen, die in aggregierter Form (Micellen, Membranen) vorliegen. Das heißt, das Enzym muss an die Grenzfläche zwischen wässriger Lösung und Phospholipidverband binden (Abbildung 6A). Die Bindung des Enzyms an die Grenzfläche des Phospholipidvesikels und die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum sind kinetisch betrachtet unterschiedliche Ereignisse (Ramirez und Jain 1991; Jain et al. 1995). Die Bindung des Enzyms an das in Aggregatform vorliegende Substrat erfolgt über die sogenannte „interfacial binding site“ (IBS). Die IBS besteht aus einem Ring von kationischen und hydrophoben Resten (Abbildung 6B), steht senkrecht zum hydrophoben Kanal und umhüllt die Öffnung des Kanals (Scott et al. 1990b; Ramirez und Jain 1991; Snitko et al. 1997). Durch die kationischen Aminosäuren der IBS kann eine feste Bindung des Substrates an anionische Grenzflächen erfolgen, wie sie bei biologischen Membranen bedingt durch den Gehalt an anionischen Phospholipiden und Gallensäuren vorliegen.

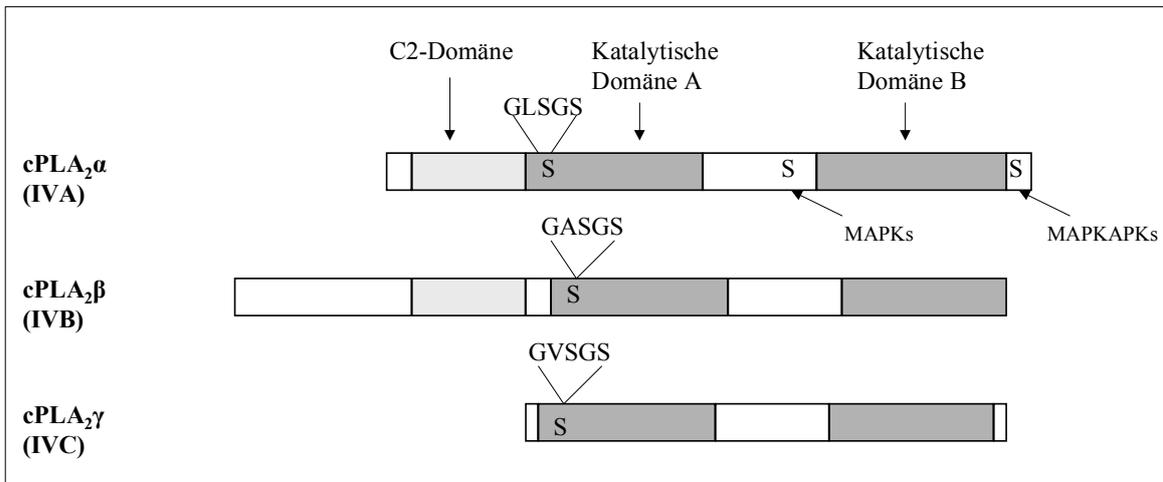


**Abbildung 6: Die „interfacial binding site“ der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift.**

A: Die Bindung von bv-PLA<sub>2</sub> an die Membran; B: IBS der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift nach Jain et al. (1995); sn1: Fettsäure in Position 1 im Phospholipid; sn2: Fettsäure in Position 2 im Phospholipid

### 2.2.2. Cytosolische Phospholipasen A<sub>2</sub>

1986 wurde eine PLA<sub>2</sub> entdeckt (Alonso et al. 1986; Kramer et al. 1986), die sich von den sPLA<sub>2</sub>s bezüglich Katalysemechanismus und Struktur stark unterscheidet. Die PLA<sub>2</sub> wurde zuerst im Cytosol von Blutplättchen- und Makrophagenzellen detektiert. Sie wurde deshalb als cytosolische PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) bezeichnet und einer vierten Gruppe der PLA<sub>2</sub>s zugeordnet. Dieses 85 kDa große Enzym (cPLA<sub>2</sub>α, Gruppe IVA) zeigt eine Calciumabhängigkeit im mikromolaren Bereich. Später wurden zwei weitere PLA<sub>2</sub>-Vertreter gefunden, die mit der cPLA<sub>2</sub>α einige Gemeinsamkeiten aufweisen (cPLA<sub>2</sub>β, Gruppe IVB und cPLA<sub>2</sub>γ, Gruppe IVC) (Pickard et al. 1999; Song et al. 1999; Asai et al. 2003). cPLA<sub>2</sub>s bestehen aus mehreren Domänen (Abbildung 7). Sie enthalten zwei katalytische Domänen, die mit A und B bezeichnet werden. Die katalytische Domäne A beinhaltet das Motif **GXSGS**, das dem Lipasemotif **GXSXG** (Cygler et al. 1993) ähnelt und ein katalytisches Serin enthält. Lipasen besitzen eine den Serinproteasen vergleichbare katalytische Triade (Serin-Aspartat/Glutamat-Histidin), deren Katalysemechanismus die Bildung eines Serinacyl-Intermediates beinhaltet. Es wird angenommen, dass bei der Katalyse durch cPLA<sub>2</sub> ebenfalls solch ein Intermediat gebildet wird. Jedoch wurden bei cPLA<sub>2</sub> bisher nur zwei Mitglieder der katalytischen Triade eindeutig bestätigt (Serin 228 und Aspartat 549, Nummerierung nach cPLA<sub>2</sub>α). Keines der 19 Histidine zeigte eine Funktion bei der Katalyse, so dass davon ausgegangen wird, dass das Aspartat als Base das Serin direkt aktiviert (Dessen 2000). cPLA<sub>2</sub>α und cPLA<sub>2</sub>β besitzen eine N-terminale C2-Domäne, die über eine flexible Linkerregion mit der katalytischen Domäne verknüpft ist (Nalefski et al. 1994; Das und Cho 2002). C2-Domänen wurden in verschiedenen phospholipidbindenden Proteinen gefunden und besitzen regulatorische Funktionen (Nalefski et al. 2001; Stahelin und Cho 2001). Sie bestehen aus einem achtsträngigen antiparallelen β-Sandwich, das aus einem Paar von viersträngigen β-Faltblättern zusammengesetzt ist. Die C2-Domäne vermittelt bei cPLA<sub>2</sub> die calciumabhängige Translokation des Enzyms vom Cytosol zu perinuklearen Membranen (Golgi, Endoplasmatisches Retikulum) (Murakami und Kudo 2002; Stahelin et al. 2003; Evans et al. 2004; Evans und Leslie 2004).



**Abbildung 7: Der strukturelle Aufbau der cPLA<sub>2</sub>-Familie** nach Murakami und Kudo (2002).

cPLA<sub>2</sub>α (Gruppe IVA) kommt ubiquitär in allen Geweben vor. Sie zeigt eine stringente Fettsäurepräferenz für die *sn*2-Position. Die primäre Funktion von cPLA<sub>2</sub>α ist die Freisetzung von Arachidonsäure. Sie ist somit in Entzündungsprozessen involviert (Balsinde et al. 2002). Das Enzym besitzt zwei Phosphorylierungsstellen (Serin 505, Serin 727) für mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und für MAPK-aktivierte Proteinkinase (MAPKAPK), deren Phosphorylierung zu einer Aktivierung des Enzyms bei Calciumanwesenheit führt. Während der Apoptose wird cPLA<sub>2</sub>α durch Caspase 3 gespalten und inaktiviert (Taketo und Sonoshita 2002; Kronke und Adam-Klages 2002).

cPLA<sub>2</sub>β (Gruppe IVB) wird in allen menschlichen Geweben exprimiert. Gegenüber cPLA<sub>2</sub>α besitzt sie eine Verlängerung am N-Terminus um 242 Aminosäuren (Abbildung 7). Ebenso wie cPLA<sub>2</sub>α ist sie calciumabhängig. Durch *in vitro* Studien wurde gezeigt, dass diese PLA<sub>2</sub> eine höhere PLA<sub>1</sub>- und Lyso-PLA<sub>1</sub>- als PLA<sub>2</sub>-Aktivität besitzt (Song et al. 1999).

cPLA<sub>2</sub>γ (Gruppe IVC) zeigt nur 30% Homologie zu cPLA<sub>2</sub>α. cPLA<sub>2</sub>γ wird im Herz- und Skelettmuskel gebildet. Dieses Enzym enthält keine C2-Domäne (Abbildung 7) und ist calciumunabhängig. Diese PLA<sub>2</sub> liegt membrangebunden vor und ist am C-Terminus isoprenyliert (Underwood et al. 1998). Sie besitzt eine stark reduzierte Spezifität gegenüber Arachidonsäure in *sn*2-Position des Phospholipids im Vergleich zu cPLA<sub>2</sub>α. Neben der PLA<sub>2</sub>-Aktivität zeigt sie eine geringe PLA<sub>1</sub>-Aktivität. Eine Beteiligung des Enzyms am Membranumbau und an der Arachidonsäurefreisetzung bei oxidativem Streß wurde bestätigt (Asai et al. 2003).

Kürzlich wurde ein weiterer Vertreter der  $cPLA_2$ s identifiziert und als  $cPLA_2\delta$  bezeichnet (Chiba et al. 2004). Diese  $cPLA_2$  zeigt eine starke Homologie bezüglich C2-Domäne und katalytischer Domäne zu den oben aufgeführten  $cPLA_2$ s und wird in den Epithelzellen der Haut gebildet.

### 2.2.3. Calciumunabhängige Phospholipasen $A_2$

Der erste Vertreter der  $iPLA_2$ s wurde aus P388D<sub>1</sub>-Makrophagen isoliert (Ackermann et al. 1994). Weitere Mitglieder dieser Gruppe wurden in CHO-Zellen und in der Lymphe entdeckt (Balboa et al. 1997).  $iPLA_2$ s sind calciumunabhängige Enzyme und werden in die Gruppe VI der  $PLA_2$ s eingeordnet. Sie enthalten ebenfalls das Lipasemotif **GXSXG**, welches das katalytische Serin beinhaltet (Tang et al. 1997). Aufgrund schwacher Transacylaseaktivität wird davon ausgegangen, dass diese Enzyme während der Katalyse ein Acyl-Enzym-Intermediat bilden (Lio und Dennis 1998).  $iPLA_2$ s enthalten ein ATP-Bindungsmotiv und zeigen bei Anwesenheit von ATP eine erhöhte Aktivität (Winstead et al. 2000). Die  $iPLA_2$ s werden nach strukturellen Unterschieden in zwei Untergruppen unterteilt (Gruppe VIA und Gruppe VIB) (Abbildung 8).

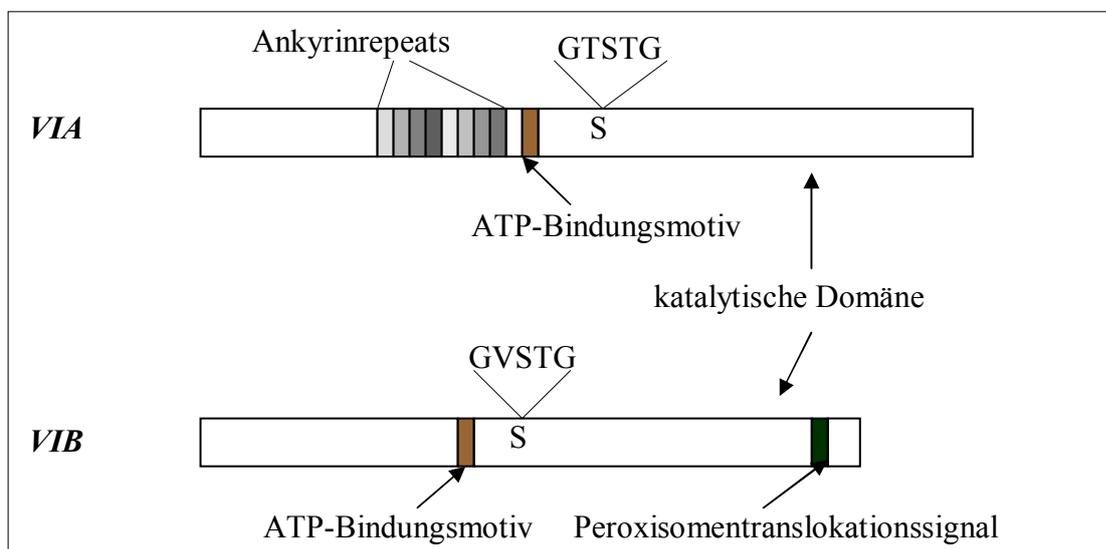


Abbildung 8: Vergleich der Untergruppen von calciumunabhängigen  $PLA_2$ s nach Murakami und Kudo (2002).

Vertreter der Untergruppe VIA besitzen acht Ankyrinrepeats, die wahrscheinlich die Oligomerisierung des Enzyms bewirken (Ackermann et al. 1994). Diese  $iPLA_2$ s sind nur in

oligomerer Form aktiv. Es sind fünf Mitglieder dieser Untergruppe bekannt, die unterschiedliche Spleißvarianten darstellen (iPLA<sub>2</sub>-1 bis iPLA<sub>2</sub>-5). Die vollständige katalytische Domäne ist nur bei iPLA<sub>2</sub>-1 und iPLA<sub>2</sub>-2 vorhanden. Bei iPLA<sub>2</sub>-4 und iPLA<sub>2</sub>-5 fehlt die katalytische Domäne und sie sind somit inaktiv. iPLA<sub>2</sub>-3 besitzt eine verkürzte katalytische Domäne, die das Lipasemotiv enthält. Es ist bisher nicht bekannt, ob diese Variante katalytisch aktiv ist (Winstead et al. 2000; Murakami und Kudo 2002). iPLA<sub>2</sub> besitzt eine wichtige Funktion beim *Phospholipid-remodeling* (Landszyklus) und somit bei der Phospholipidhomöostase von ruhenden Zellen (Balsinde et al. 1995). Dabei werden Phospholipide in Lysophospholipide umgewandelt, um dann wieder gezielt Fettsäuren einbauen zu können. Dies betrifft vor allem den Einbau von Arachidonsäure und anderen ungesättigten Fettsäuren. Weiterhin spielt dieses Enzym eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Eicosanoidsynthese, da diese an den Gehalt von Arachidonsäure in den Zellen gekoppelt ist (Balsinde und Dennis 1997). Weiterhin wird angenommen, dass iPLA<sub>2</sub> an der reizgekoppelten Arachidonsäurefreisetzung beteiligt ist (Murakami et al. 1998; Akiba et al. 1999; Murakami et al. 1999).

2000 wurde die Untergruppe VIB der iPLA<sub>2</sub>s erstmalig beschrieben (Mancuso et al. 2000). Diese iPLA<sub>2</sub> enthält das Lipasebindungsmotiv und das ATP-Bindungsmotiv (Abbildung 8). Ankyrinrepeats sind nicht vorhanden (Winstead et al. 2000). Weiterhin wurde ein C-terminales Peroxisomentranslokationssignal gefunden. Die Proteinsequenz zeigt 25% Identität zu den Enzymen der Gruppe VIA. Über die physiologischen Funktionen dieser PLA<sub>2</sub> ist noch nichts bekannt.

Den aus Säugern identifizierten iPLA<sub>2</sub>s ähnliche PLA<sub>2</sub>s wurden in verschiedenen Pflanzen entdeckt, die das gemeinsame Lipasemotiv **GXSTG** (Cygler et al. 1993) besitzen und bei denen Calcium für die Aktivität nicht essentiell ist. Der bekannteste Vertreter ist die aus der Kartoffel isolierte PLA<sub>2</sub>, auch als Patatin bekannt (Senda et al. 1996; Hirschberg et al. 2001). Eine weitere PLA<sub>2</sub>, die 48% Identität zum Patatin aus der Kartoffel zeigt, wurde aus der Gurke isoliert (May et al. 1998). Auch in *Arabidopsis thaliana* wurde eine Patatin-verwandte PLA<sub>2</sub> gefunden (Holk et al. 2002). Diese Enzyme zeigen neben der PLA<sub>2</sub>-Aktivität eine geringere PLA<sub>1</sub>-Aktivität.

### 2.2.4. Platelet-activating factor Acetylhydrolasen

PAF-AHs wurden nach ihrem primären Substrat, dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF), benannt. Es sind calciumunabhängige Enzyme, die die Acetylgruppe in *sn2*-Position von PAF hydrolysieren (Abbildung 9) und diesen somit inaktivieren. Weiterhin sind sie in der Lage, oxidierte Phospholipide mit kurzen Fettsäureresten, die durch Oxidation ungesättigter Fettsäurereste des Phospholipids entstehen, zu spalten (Patel et al. 1992; Nigam und Schewe 2000). PAF besitzt diverse physiologische Funktionen (Peplow 1999) und spielt bei pathologischen Prozessen wie Arteriosklerose oder Asthma eine Rolle (Tjoelker und Stafforini 2000; Tselepis und Chapman 2002). Die Inaktivierung von PAF durch PAF-AHs stellt somit einen wichtigen regulatorischen Schritt dar. PAF-AHs können demzufolge als Signalterminatoren betrachtet werden (Bazan 1995). Sie bilden die Gruppen VII und VIII der PLA<sub>2</sub>-Familie (Six und Dennis 2000).

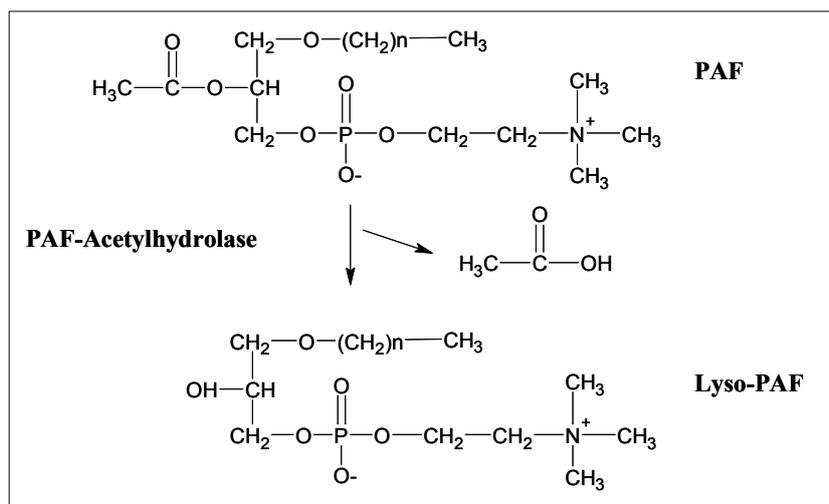


Abbildung 9: Inaktivierung von PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) durch PAF-Acetylhydrolasen. n: 15 bis 17

Die Gruppe VII der PLA<sub>2</sub>s besteht aus zwei Untergruppen (VIIA, VIIB). Zur Untergruppe VIIA gehört die sekretorische, im Plasma vorkommende PAF-AH (pPAF-AH) (Tjoelker et al. 1995; Derewenda und Ho 1999). Diese PLA<sub>2</sub> liegt im Blut an Apolipoprotein B100 gebunden vor. Sie enthält das Lipasemotiv **GXSXG** und besitzt die klassische Katalysetriade Serin-Aspartat-Histidin im aktiven Zentrum. Sie ist kein grenzflächenaktives Enzym wie andere PLA<sub>2</sub>s, sondern wirkt an Substratmonomeren. Als Hauptfunktion wird eine Schutzfunktion im Plasma bei oxidativem Streß diskutiert (Stafforini et al. 1997). Untergruppe VIIB enthält die

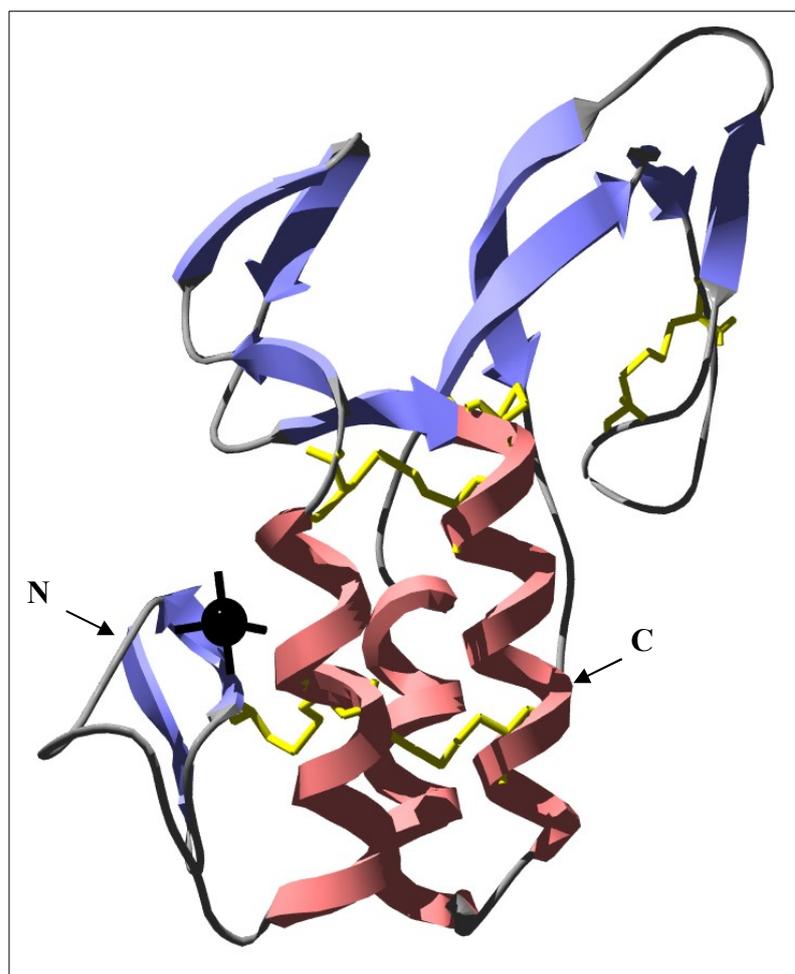
intrazelluläre PAF-AH (Hattori et al. 1995; Hattori et al. 1996), die zuerst aus dem Rinderhirn isoliert wurde. Sie zeigt 41% Sequenzidentität zu pPAF-AH und besitzt ebenfalls das Lipasemotiv. Diese PLA<sub>2</sub> wird vermehrt in Leber und Niere gebildet. Sie ist im Cytosol lokalisiert und wird partiell zum Endoplasmatischen Retikulum transloziert.

Zur Gruppe VIII gehört die PAF-AH-Ib (Hattori et al. 1993). Die Expression erfolgt intrazellulär im Gehirn. Dieses heterotrimere Enzym besteht aus zwei aktiven PLA<sub>2</sub>-Untereinheiten und der regulatorischen LIS-1 Untereinheit (Hattori et al. 1994). Das Enzym kann die beiden aktiven Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ) in homodimerer oder heterodimerer Form enthalten (Manya et al. 1999). Die aktiven Untereinheiten besitzen ein lipaseähnliches Motiv **GXSXV**. Die Tertiärstruktur des trimeren Komplexes ähnelt dem kleiner GTPasen (Ho et al. 1997).

### 2.2.5. Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Gift der Europäischen Honigbiene (*Apis mellifera*)

Die Phospholipase A<sub>2</sub> aus dem Bienengift (bv-PLA<sub>2</sub>) wurde erstmals 1954 beschrieben (Neumann und Habermann 1954). Sie gehört in die Klasse der sekretorischen PLA<sub>2</sub>s und wird hier aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede mit anderen sPLA<sub>2</sub>s in die Gruppe III eingeordnet (Tabelle 1). Der Anteil dieser PLA<sub>2</sub> am Bienengift beträgt 10 bis 12%. Durch die Hydrolyse von Phospholipiden löst sie die Zellmembran von Blutkörperchen auf, wirkt blutdrucksenkend und hemmt die Blutgerinnung. Sie ist somit der schädlichste Bestandteil des Bienengiftes und eines der Hauptallergene des Bienengifts.

bv-PLA<sub>2</sub> ist ein kleines Protein, das eine Polypeptidkette von 134 Aminosäuren umfasst (Abbildung 10). Das Enzym wird *in vivo* mit einem Signalpeptid gebildet, welches später entfernt wird (Kuchler et al. 1989).



**Abbildung 10: Tertiärstruktur der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift.**

Das Modell (1poc) wurde der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt. schwarz: Calciumion; blau:  $\beta$ -Faltblätter; rosa:  $\alpha$ -Helices; gelb: Disulfidbrücken; N: N-Terminus; C: C-Terminus

Wie alle sPLA<sub>2</sub>s besitzt bv-PLA<sub>2</sub> zwei konservierte  $\alpha$ -Helices, drei konservierte Disulfidbrücken, den Calciumbindungsloop, den hydrophoben Kanal und die IBS (2.2.1.2.). Der Proteinkern von bv-PLA<sub>2</sub> wird durch drei  $\alpha$ -Helices gebildet (Scott et al. 1990a). Das Enzym enthält insgesamt fünf Disulfidbrücken wie alle zur Gruppe III gehörenden Enzyme. Die drei konservierten Disulfidbrücken werden von den Cysteinresten Cys9-Cys31, Cys30-Cys70, Cys37-Cys63 gebildet. Das Enzym besitzt zwei Tryptophane, acht Tyrosine und eine Glykosylierungsstelle am Asparaginrest 13. Es sind vier unterschiedliche Glykosylierungsmuster bekannt (Hollander et al. 1993; Kubelka et al. 1993; Lai und Her 2000). Die Verknüpfung der Kohlenhydratreste erfolgt N-glykosidisch. Etwa 90% des Proteins liegen in glykosylierter Form vor. bv-PLA<sub>2</sub> zählt mit einem isoelektrischen Punkt von  $10,5 \pm 1,0$  zu den basischen Proteinen. Das pH-Optimum liegt im basischen pH-Bereich und wurde in der Literatur im Bereich von pH 7 bis 8,3 beschrieben (Neumann und Habermann, 1954; Habermann 1957; Shipolini et al. 1971). Die Aktivität des Enzyms ist calciumabhängig und besitzt ein Optimum bei 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Die Enzymaktivität kann durch EDTA inhibiert werden, wobei jedoch bei einem molaren Unterschuss von EDTA bei einem Verhältnis von EDTA zu Calcium von 1:10 ein aktivierender Effekt gefunden wurde. Dieser Effekt wird auf die Chelatisierung von störenden Metallionen durch EDTA zurückgeführt (Cottrell 1981). Die katalytische Diade wird bei bv-PLA<sub>2</sub> von Histidin 34 und Aspartat 64 gebildet (2.2.1.1.) (Scott et al. 1990a; Annand et al. 1996). Der Austausch von Histidin 34 durch Glutamin bewirkt einen kompletten Aktivitätsverlust. Der Austausch von Aspartat 64 durch Asparagin oder Alanin hingegen führte zu Enzymen mit geringer Restaktivität (Annand et al. 1996; Nicolas et al. 1997). Neben Mutationsstudien des aktiven Zentrums wurde bereits der Einfluss von Mutationen in der IBS, im Calciumbindungsloop sowie im hydrophoben Kanal auf die Aktivität des Enzyms analysiert. Bei Mutationen im Calciumbindungsloop (G12A, G12C, N13C, K14C, K14E, K14E/R23E) zeigte sich mit Ausnahme der Mutation G12S/K14R eine starke Abnahme der enzymatischen Aktivität, welche auf die herausragende Bedeutung der Aminosäuren des Calciumbindungsmotivs schließen läßt (Nicolas et al. 1997). Weiterhin wurde durch Mutationsstudien der Einfluss von Threonin 57, das ein wesentliches Element des hydrophoben Kanals ist (2.2.1.2.) (Abbildung 5C), untersucht. Ein Austausch dieser Aminosäure (T57F, T57V, T57D, T57E, T57L) führt zu Enzymen mit sehr geringen Restaktivitäten. Da Threonin 57 die bewegliche Aminosäure des hydrophoben Kanals repräsentiert, führt ein Austausch dieser Aminosäure vermutlich zur Ausbildung ungünstiger Konformationen im Enzym (Nicolas et al. 1997). Die Bedeutung der kationischen Aminosäuren in der IBS wurde ebenfalls durch Mutationsstudien (R23E, R58A, K85E, K94E,

K133E, K14E/R23E, R23E/R58E, K85E/K133E, K14E/R23E/R58A, R23E/K85E/K133E, K85E/K94E/K133E) untersucht. Alle Mutanten zeigen eine moderate Aktivität. Es wird daher vermutet, dass ionische Wechselwirkungen eine untergeordnete Rolle für die Bindung der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift an Phospholipidvesikel spielen (Ghomashchi et al. 1998; Lin et al. 1998).

Das aus dem Bienengift isolierte Enzym weist eine hohe thermische Stabilität auf. So zeigt bv-PLA<sub>2</sub> für Lecithin aus Eigelb ein Aktivitätsmaximum bei einer Temperatur von 65°C und für DCPC und DPPC ein Aktivitätsmaximum bei 60°C (Nair et al. 1976). Selbst bei Vorinkubation des Enzyms bei 90°C für 45 min und anschließender Aktivitätsmessung bei 65°C zeigt sich kein Aktivitätsverlust (Nair et al. 1976). Ebenso wurde durch optische Rotationsdispersion gezeigt, dass sich die Konformation der bv-PLA<sub>2</sub> im Bereich von 10°C bis 90°C nicht ändert (Nair et al. 1976). Bei einer Temperatur von 60°C tritt in Anwesenheit von 0,7 M Harnstoff ein Aktivitätsverlust auf, der bei 2 M Harnstoff zur vollständigen Inaktivierung führt. Der Zusatz von Kochsalz in hohen Konzentrationen (2-3 M) führt zu einer Erhöhung der Aktivität (Munjal und Elliott 1972).

Allgemein werden Substrate in micellarer Form durch PLA<sub>2</sub> besser hydrolysiert als in monomerer Form. Studien an bv-PLA<sub>2</sub> zeigten jedoch, dass das Enzym keine Präferenz für eine bestimmte Aggregatform des Substrates zeigt, sondern monomere und micellare Substrate gleichermaßen gut angreifen kann (Lin et al. 1988). bv-PLA<sub>2</sub> setzt vorzugsweise neutrale Phospholipide um (z.B. Lecithin) (Jentsch 1972), wobei Lecithin in wässriger Lösung nur in Gegenwart von Additiven (Hexanol, Propanol, Triton X-100, Desoxycholat) umgesetzt wird. Bei einem Zusatz der Additive im Verhältnis zum Lipid zwischen 1:1 und 1:2 erfolgt die optimale Umsetzung. In Gegenwart von Fettsäuren oder Lysolecithin wird bv-PLA<sub>2</sub> um den Faktor 20-50 aktiviert (Lawrence und Moores 1975).

Untersuchungen zur Substratspezifität von bv-PLA<sub>2</sub> in Abhängigkeit von der Länge der veresterten Fettsäuren zeigten eine Erhöhung der Aktivität bei einer Zunahme der Kettenlänge der veresterten Fettsäuren am Phospholipid von sechs auf neun Reste (Raykova und Blagoev 1986). Ein Vergleich von bv-PLA<sub>2</sub> mit dem Enzym aus dem Schweinepankreas bezüglich ihrer Kopfgruppenspezifität zeigte, dass beide Enzyme Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin gleichermaßen als Substrat akzeptieren. Die spezifischen Aktivitäten sind für bv-PLA<sub>2</sub> jedoch um den Faktor 15 höher als für das Enzym aus dem Schweinepankreas (Plückthun und Dennis 1985).

Zu Re- und Transacylierungsreaktionen mit bv-PLA<sub>2</sub> ist aus der Literatur bisher wenig bekannt. Bei Acylierung von Lysophosphocholin in Chloroform zeigte bv-PLA<sub>2</sub> eine gewisse

Recyclingpotenz (Lin et al. 1993). Bei Veresterungsstudien von Lysophosphatidylcholin mit Ölsäure in Toluol zeigte bv-PLA<sub>2</sub> nur eine sehr geringe Veresterungsreaktion (Pernas et al. 1990).

## 2.3. Herstellung rekombinanter Proteine

### 2.3.1. Vor- und Nachteile der Expression in *Escherichia coli*

Die rekombinante Darstellung von Enzymen und therapeutischen Proteinen gewann in den letzten Jahren immer größere Bedeutung, da der Isolierung von Proteinen aus den natürlichen Quellen oft Grenzen gesetzt sind. Außerdem können rekombinante Proteine gezielt durch gentechnische Methoden manipuliert und dadurch in ihren Eigenschaften verändert werden. Trotz der erfolgreichen Etablierung eukaryontischer Expressionssysteme findet immer noch die Expression in *E. coli* die weiteste Verbreitung (Anderson und Krummen 2002). Von Vorteil sind hierbei die ausgezeichnete Charakterisierung des Bakteriums, die abgeschlossene Aufklärung dessen Genoms sowie die große Anzahl an verfügbaren Vektoren für *E. coli* (Hannig und Makrides 1998; Baneyx 1999; Swartz 2001). Weiterhin sind das schnelle Wachstum des Organismus bei geringen Fermentationskosten, die hohen erreichbaren Expressionsraten und die damit verbundene hohe Produktivität als positiv zu bewerten.

Der folgende Abschnitt soll sich auf die heterologe Expression in *E. coli* beschränken. Eine Produktion der Proteine in eukaryontischen Organismen (Hefen, Insektenzellen, Säugerzelllinien) ist dagegen notwendig, wenn eine korrekte posttranslationale Prozessierung, wie z. B. eine Glykosylierung, essentiell für die Aktivität ist. Für die heterologe Expression in *E. coli* kommen bezüglich des Zellkompartiments, in dem sich das synthetische Protein wiederfindet, mehrere Strategien in Frage. Die Bildung des rekombinanten Proteins erfolgt im Cytoplasma, in dem ein reduzierendes Milieu herrscht. Dadurch ist eine Bildung von Disulfidbrücken schwer möglich (Lilie et al. 1998). Vor allem sekretorische Proteine enthalten jedoch oft Disulfidbrücken, die für den Erhalt der Proteineigenschaften essentiell sind. Bei der Produktion derartiger Proteine im Cytoplasma von *E. coli* können diese Proteine ihre native Konformation nicht erhalten und fallen in Form unlöslicher Proteinaggregate, den *inclusion bodies*, an. Aber auch Proteine ohne Disulfidbrücken können in Form von *inclusion bodies* akkumuliert werden (Mitraki und King 1989), wobei hier jedoch oft durch die Wahl geeigneter Expressionsbedingungen (Stamm, Promotor, Temperatur, Induktorkonzentration) eine lösliche Expression möglich wird (Makrides 1996). Eine direkte Korrelation zwischen der Neigung eines Proteins, *inclusion bodies* zu bilden, und den intrinsischen Eigenschaften, wie Molekulargewicht oder Hydrophobizität wurde bisher nicht gefunden (Lilie et al. 1998). Um die Bildung von *inclusion bodies* zu umgehen, kann durch die Verwendung von Signalsequenzen das Protein ins Periplasma sezerniert werden. Dort liegen Bedingungen vor,

die eine Bildung von Disulfidbrücken ermöglichen können (Missiakas und Raina 1997). Allerdings kann es auch hier zu einer Bildung periplasmatischer *inclusion bodies* kommen (Baneyx 1999). Weiterhin kann dabei die Translokationsmaschinerie ein limitierender Faktor sein und das Protein deshalb ganz oder teilweise im Cytoplasma verbleiben.

Die Vor- und Nachteile der *inclusion-body*-Bildung werden kontrovers diskutiert. Als nachteilig wird die notwendige Renaturierung des Proteins angesehen, weil für jedes Protein ein individuelles Rückfaltungsprotokoll erstellt werden muss. Weiterhin kann die Rückfaltungsausbeute und somit die Endausbeute an nativem Protein sehr gering sein. Dem stehen jedoch auch einige Vorteile gegenüber. So kann der Anteil an *inclusion bodies* bis zu 50% des Gesamtzellproteins betragen (Lilie et al. 1998). Damit wird eine beträchtliche Konzentrierung des gewünschten Proteins erreicht. Weiterhin liegt das rekombinante Protein in den *inclusion bodies* meist schon in hoher Reinheit (bis zu 90%) vor, wodurch der Reinigungsaufwand stark vermindert wird. Im Gegensatz dazu ist bei löslich exprimierten Proteinen die Abtrennung aller *E. coli*-Cytoplasmaproteine notwendig, was aufwendige Reinigungsverfahren erfordert. Ein weiterer Vorteil der *inclusion bodies* ist die hohe Proteaseresistenz der Proteinaggregate (Carrio et al. 2000), die bei löslichen Proteinen im Cytoplasma nicht gegeben ist.

Zur Rückfaltung des Proteins aus den *inclusion bodies* werden diese in Gegenwart starker Denaturanzien (GdnHCl, Harnstoff) zunächst solubilisiert. Disulfidbrückenhaltige Proteine müssen außerdem durch Zusatz von Thiolreagenzien reduziert werden. Nach Entfernung des Reduktionsmittels wird das Protein durch Verdünnung oder Dialyse des Solubilisats renaturiert. Die verwendete Methode zur Reduzierung der Denaturanzkonzentration ist dabei von den Eigenschaften des zu renaturierenden Proteins abhängig. Die Renaturierungseffizienz wird bestimmt vom Verhältnis der beiden Konkurrenzreaktionen Faltung und Aggregation. Um das Ausmaß der Aggregation zu minimieren, wird oft mit geringen Proteinkonzentrationen gearbeitet (1-100 µg/ml) (Misawa und Kumagai 1999). Zur Erreichung maximaler Ausbeuten ist der Einfluss externer Faktoren wie Temperatur, Ionenstärke oder pH-Wert zu untersuchen. Bei disulfidbrückenhaltigen Proteinen ist der Zusatz von niedermolekularen Thiolreagenzien in reduzierter und oxidierte Form als Redoxshufflingsystem zur Bildung der Disulfidbrücken und somit der nativen Konformation notwendig (De Bernardez Clark 2001). Hierbei wird oft Glutathion in einem bestimmten Verhältnis von reduzierter (GSH) und oxidierte Form (GSSG) eingesetzt. Aber auch Cystein und Cystin finden als Redoxpaar Verwendung. Die Rückfaltungsausbeuten können weiterhin durch den Einsatz niedermolekularer Additive wie L-Arginin, Tris, Polyethylenglycol, den

Zusatz chaotroper Reagenzien in nichtdenaturierenden Konzentrationen (GdnHCl, Harnstoff) sowie durch Detergenzien (Laurylmaltosid) wesentlich erhöht werden (Lilie et al. 1998; De Bernardez Clark 2001; Middelberg 2002). Die genaue Wirkungsweise dieser Zusätze ist noch nicht geklärt. Sie könnten sowohl die Löslichkeit als auch die Stabilität des nativen, denaturierten und intermediären Zustands beeinflussen. Weiterhin ist die Veränderung des Verhältnisses von Faltungs- und Aggregatbildungsrate denkbar (De Bernardez Clark et al. 1999). Vor allem für industrielle großtechnische Prozesse wird die Methode der Rückfaltung an Chromatographiesäulen beschrieben (Middelberg 2002). Während des Chromatographieverfahrens wird dabei die Denaturanzkonzentration reduziert und somit die Rückfaltung ermöglicht. Hierbei kann das denaturierte Protein spezifisch an das Säulenmaterial gebunden werden, oder es wird eine Gelfiltration durchgeführt. Weiterhin können Enzyme oder Faltungshelfer, die die Faltung begünstigen, am Säulenmaterial immobilisiert werden, so dass die Säule als katalytischer Faltungsreaktor dient.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Produktion rekombinanter Proteine in Form von *inclusion bodies* und die anschließende Renaturierung der Proteine auf Grund hoher Expressionsleistungen und Renaturierungsausbeuten eine praktikable und attraktive Alternative zur Expression löslicher Proteine bietet.

### 2.3.2. Herstellung rekombinanter sekretorischer Phospholipasen A<sub>2</sub>

Versuche, sPLA<sub>2S</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* oder Säugerzellen in löslicher Form zu gewinnen, führten zu niedrigen Produktausbeuten (van den Bergh et al. 1987; Tanaka et al. 1988; Kramer et al. 1989; Pernas et al. 1991; Lefkowitz et al. 1999; Valentin et al. 1999b).

Für die rekombinante Herstellung von sPLA<sub>2S</sub> in *E. coli* sind mehrere Verfahren aus der Literatur bekannt.

Dabei sind Versuche zur löslichen Expression von sPLA<sub>2S</sub> mit Signalsequenzen beschrieben worden, die zur Sekretion des Proteins ins Periplasma führen. Hierbei konnten sPLA<sub>2S</sub> aus *Agkistrodon contortrix laticinctus* und *Notechis scutatus scutatus* in löslicher Form erhalten werden (Hodgson et al. 1993; Giuliani et al. 2001). Diese Strategie führte jedoch bei einigen sPLA<sub>2S</sub> nicht zum Erfolg, da die Proteine gar nicht (sPLA<sub>2</sub> aus *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, Lathrop et al. 1992) oder nur in unzureichenden Mengen in *E. coli* gebildet wurden (sPLA<sub>2</sub> aus Schweinepankreas, de Geus et al. 1987; Ammodytoxin A, Liang et al.

1993). Im Fall von sPLA<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas (Noel und Tsai 1989) verblieb das Protein im Cytoplasma in Form von *inclusion bodies*.

Die Expression von sPLA<sub>2</sub>s und der Verbleib des Proteins im Cytoplasma von *E. coli* sollte auf Grund der Cytotoxizität für die Zellen nur in Form von *inclusion bodies* möglich sein.

Ein großes Problem bei der Expression im Cytoplasma von *E. coli* stellt außerdem das N-terminale Methionin dar, welches proteinsequenzabhängig bei einigen sPLA<sub>2</sub>s in *E. coli* nicht entfernt wird. Das Vorhandensein dieser zusätzlichen Aminosäure führte bei einigen sPLA<sub>2</sub>s zu teilweise drastischen Aktivitätsverlusten (Lathrop et al. 1992; Chang et al. 1996). Erst bei Austausch der N-terminalen Aminosäure und die damit möglich gewordene Entfernung des Startmethionins wurde die ursprüngliche Aktivität erhalten (Lathrop et al. 1992; Chang et al. 1996; Othman et al. 1996; Baker et al. 1998). Deshalb erfolgte die Expression verschiedener sPLA<sub>2</sub>s in *E. coli* auch in Form von Fusionsproteinen (z. Bsp. mit His-Tag, Dudler et al. 1992; Pan et al. 1994; Chen et al. 1998; Cro-LacZ-Fusion, de Geus et al. 1987; Franken et al. 1992; GST-Fusion, Rouault et al. 2003; Adenylatkinase-Fusion, Liang et al. 1993;  $\beta$ -Galactosidase-Fusion, Tseng et al. 1991). Zur Gewinnung des Tag-freien Proteins muss jedoch der Tag durch spezifische Proteasen oder durch chemische Spaltung vor oder nach der Renaturierung entfernt werden.

Zur Renaturierung der in *E. coli* erzeugten *inclusion bodies* von sPLA<sub>2</sub>s sind mehrere Methoden aus der Literatur bekannt. Alle sPLA<sub>2</sub>s besitzen Disulfidbrücken und benötigen somit bei der Solubilisierung den Zusatz von Thiolreagenzien zur Reduktion dieser. Oftmals wird auch eine Sulfonierung der Cysteinreste des Proteins vorgenommen (de Geus et al. 1987; Dudler et al. 1992; Han et al. 1998; Zhong et al. 2001; Rouault et al. 2003), um die Löslichkeit des Proteins bei der Rückfaltung zu erhöhen. Für einige sPLA<sub>2</sub>s sind darüber hinaus Rückfaltungsprotokolle beschrieben, bei denen die reduzierten Cysteinreste vor der Rückfaltung nicht modifiziert wurden (Tseng et al. 1991; Kelley et al. 1992; Chen et al. 1998). Die anschließende Rückfaltung von sPLA<sub>2</sub>s wurde in der Literatur durch die Methoden der Verdünnung (Kelley et al. 1992; Liang et al. 1993; Chang et al. 1996), der Dialyse (Dudler et al. 1992; Kishimura et al. 2001) oder der Rückfaltung an Chromatographiesäulen (Ward et al. 2001) mittels Gelfiltration beschrieben.

Für die rekombinante Herstellung von bv-PLA<sub>2</sub> wurde in der Literatur eine Methode von Dudler et al. (1992) beschrieben, bei der die Expression in Form von *inclusion bodies* in *E. coli* mit einem N-terminalen His-Tag erfolgt, der durch eine Behandlung mit Kallikrein entfernt werden kann. Bei der Solubilisierung der *inclusion bodies* wurden die Cysteinreste sulfoniert und die Rückfaltung wurde durch Dialyse gegen den Renaturierungspuffer erreicht.

Die während der Rückfaltung entstandenen Präzipitate wurden noch zweimal denaturiert und renaturiert. Der Einfluss von Additiven auf die Rückfaltungsausbeute wurde für bv-PLA<sub>2</sub> bisher nicht untersucht. Die Reinigung erfolgte durch eine Metallionenaффinitätschromatographie und durch Kationenaustauschchromatographie. Mit dieser Methode wurde eine Proteinausbeute an Tag-freiem Protein von 8 bis 9 mg pro Liter Ausgangskultur erzielt. Dieses Verfahren weist jedoch einige gravierende Nachteile auf. Einerseits wird durch die Sulfonierung ein zusätzlicher Schritt bei der Produktion notwendig. Weiterhin ist eine Abspaltung des N-terminalen His-Tags durch Kallikrein im größeren Maßstab nicht praktikabel. Außerdem verliert der Prozess durch die mehrfache Rückfaltungsprozedur an Attraktivität und erscheint somit für eine großtechnische Anwendung nicht geeignet.

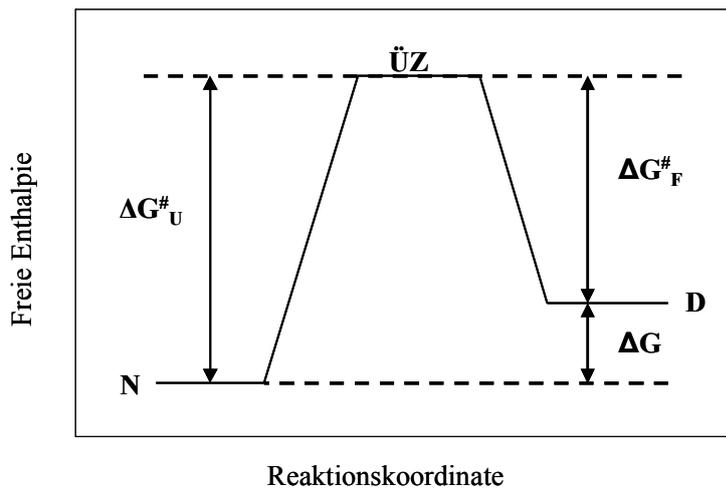
## 2.4. Thermodynamische Stabilität von Proteinen

### 2.4.1. Definitionen

Die biologische Aktivität eines Proteins ist eng mit dem Erhalt seiner nativen dreidimensionalen Struktur verbunden. Die native Proteinkonformation wird durch schwache nichtkovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Interaktionen, van der Waals-Bindungen, ionische Wechselwirkungen) und durch kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) stabilisiert. Unter denaturierenden Bedingungen (hohe Temperatur, hoher Druck, organische Lösungsmittel, chemische Denaturanzien) wird das Protein abhängig von der Art und der Intensität der Denaturierung proteinspezifisch vollständig oder teilweise entfaltet und verliert somit seine biologische Aktivität. Die Proteinstabilität ist ein Maß dafür, wie gut das Protein in der Lage ist, denaturierende Einflüsse in gewissen Grenzen zu kompensieren und die native Struktur zu behalten. Der denaturierte Zustand ist durch ein Gemisch unterschiedlicher, flexibler, im Gleichgewicht stehender Zustände gekennzeichnet. Unter nativen Standardbedingungen ist der native Zustand energetisch um 20-60 kJ/mol gegenüber dem denaturierten Zustand begünstigt (Fersht 1999). Eine Voraussetzung für die Beschreibung der thermodynamischen Stabilität ist die Gültigkeit des Zweizustandsmodells (Gleichung 1) und somit die Reversibilität der Übergänge zwischen nativem (N) und denaturiertem (D) Zustand.  $k_U$  und  $k_F$  kennzeichnen die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungsreaktion bzw. der Faltungsreaktion. Die Lage des Gleichgewichts ist proteinspezifisch und von der Denaturanzintensität abhängig.



Das Energieschema der Änderung der freien Enthalpie unter denaturierenden Einflüssen ist in Abbildung (11) dargestellt.



**Abbildung 11: Energieschema für die Änderung der freien Enthalpie der Entfaltung.**

N: nativer Zustand  
 D: denaturierter Zustand  
 ÜZ: Übergangszustand  
 $\Delta G$ : freie Enthalpie  
 $\Delta G^{\#}_U$ : freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung  
 $\Delta G^{\#}_F$ : freie Aktivierungsenthalpie der Faltung

Die Differenz zwischen freier Enthalpie des nativen Zustands (N) und des denaturierten Zustands (D) wird mit  $\Delta G$  bezeichnet und stellt die thermodynamische Stabilität eines Proteins dar.  $\Delta G$  charakterisiert die Lage des Gleichgewichts (Pace 1990). Die Differenz zwischen freier Enthalpie des nativen Zustands und des Übergangszustands wird mit  $\Delta G^{\#}_U$  bezeichnet und korreliert mit der Geschwindigkeit der Denaturierung (kinetische Stabilität).

#### 2.4.2. Der Einfluss von Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität

Durch die Entwicklung einer Vielzahl gentechnischer Methoden ist es heute möglich die Stabilität eines Proteins zu verändern und zum Beispiel durch Mutationen gezielt zu beeinflussen.

Die Einführung von Disulfidbrücken sollte im allgemeinen die Proteinstabilität erhöhen (Thornton 1981). Experimentell wurde jedoch durch den Einbau zusätzlicher Disulfidbrücken bei verschiedenen Proteinen gezeigt, dass dies von einer Destabilisierung (Kanaya und Kikuchi 1992) bis zu einer erheblichen Stabilisierung des Proteins führen kann (Mansfeld et al. 1997; Li et al. 1998; Janssen et al. 1999b; Zavodszky et al. 2001; D'Amico et al. 2002; Ikegaya et al. 2003). Für den Stabilisierungserfolg ist die Position der eingeführten Disulfidbrücke entscheidend (Creighton 1988).

Die chemische Reduktion natürlicher Disulfidbrücken oder deren Entfernung durch den Einbau anderer Aminosäuren bewirkt im allgemeinen eine Destabilisierung des Proteins. So wurde zum Beispiel für die variable Domäne eines Antikörpers (Glockshuber et al. 1992), für Rhodopsin (Davidson et al. 1994), sPLA<sub>2</sub> aus Rinderpankreas (Zhu et al. 1995), Hühnerlysozym (Guez et al. 2002) und das Skorpiontoxin BmK M1 (Sun et al. 2002) gezeigt,

dass die Entfernung von Disulfidbrücken tatsächlich zu einer Destabilisierung führt. Interessanterweise führte die Entfernung einer der sieben Disulfidbrücken der sPLA<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas jedoch zu einer Stabilisierung des Proteins (Zhu et al. 1995).

Zur Beschreibung des Einflusses von Disulfidbrücken auf die thermodynamische Proteinstabilität wurden zwei Modelle entwickelt.

Das Entropiemodell (Flory 1956; Pace et al. 1988) nennt als Ursache der thermodynamischen Stabilisierung durch eine Disulfidbrücke in reversiblen Systemen die Verringerung der Entropie des entfalteten Zustandes. Dies ist mit einer Erhöhung der freien Enthalpie des entfalteten Zustands verbunden und führt somit zu einer Verschiebung des Entfaltungsgleichgewichts zwischen entfaltetem und nativem Zustand auf die Seite des nativen Zustands. Experimentell konnten für einige Modellproteine wie Ribonuklease T1 (Pace et al. 1988) und T4-Lysozym (Pjura et al. 1990) die theoretisch mit dem Entropiemodell bestimmten freien Stabilisierungsenthalpien bestätigt werden.

Das Enthalpiemodell (Doig und Williams 1991) führt den Stabilisierungseffekt auf die enthalpische Stabilisierung des nativen Zustands und in geringerem Maße auf die entropische Destabilisierung des nativen Zustands zurück. Disulfidbrücken führen im entfalteten Zustand zu Reststrukturen, die einen Stabilisierungseffekt der Hydratationsentropie bewirken. Im entfalteten Zustand sind jedoch ungünstige Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden, die verbunden mit einer Verringerung der Entfaltungsenthalpie zu einer Destabilisierung des entfalteten Zustands führen und den Stabilisierungseffekt der Hydratationsentropie überwiegen. Gesamt betrachtet wird das Entfaltungsgleichgewicht damit auf die Seite des nativen Zustands verschoben.

Hieraus zeigt sich, dass der Einfluss einer Disulfidbrücke auf die Stabilität eines Proteins sich aus vielen Einzeleffekten zusammensetzt und insgesamt betrachtet zu einer Stabilisierung, Destabilisierung oder Kompensation der verschiedenen Effekte führen kann.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Materialien

#### 3.1.1. Chemikalien

Acrylamid	Applichem, Darmstadt
Agar	Difco, Augsburg
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
L-Arginin	Ajinomoto, Tokio, Japan
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Casaminosäuren	Difco, Augsburg
Caseinhydrolysat	Serva, Heidelberg
Coomassie-Brilliant-Blau-G 250	Serva, Heidelberg
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoat) (DTNB)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	ThermoHybaid, Milford, MA USA
EB-Puffer	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
D-Glucose	Applichem, Darmstadt
Glutathion (oxidiert) (GSSG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Glutathion (reduziert) (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid, <i>ultra pure</i> (GdnHCl)	ICN Biomedicals, Irvine, USA
Guanidinhydrochlorid, <i>C grade</i> (GdnHCl)	Nigu Chemie, Waldkraiburg
Hefeextrakt Typ KAV	Deutsche Hefewerke, Hamburg
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Applichem, Darmstadt
Natriumdesoxycholat (NaDOC)	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem, Darmstadt
Trypton	Difco, Augsburg

Alle weiteren verwendeten Reagenzien waren von höchster Reinheit.

### 3.1.2. Standards und Kits

1kb-DNA-Leiter	Gibco BRL, Paisley, UK
100 bp-DNA-Leiter	Gibco BRL, Paisley, UK
BCA ProteinAssayKit	Pierce, Bonn
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>QuikChange<sup>TM</sup> Multi-Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
<i>SequiThermExcel<sup>TM</sup> LongRead<sup>TM</sup> DNA Sequencing Kit</i>	Biozym, Hess. Oldendorf
LMW-Marker:	Amersham Biosciences, Freiburg
$\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa)	
Sojabohnen-Trypsininhibitor (20,1 kDa)	
Carboanhydrase (30,0 kDa)	
Ovalbumin (45,0 kDa)	
Rinderserumalbumin (66,0 kDa)	
Phosphorylase b (97,0 kDa)	

### 3.1.3. Enzyme und Proteine

<i>DpnI, HindIII, MscI, NcoI, NdeI</i>	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Herculase<sup>TM</sup> Enhanced DNA Polymerase</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Lysozym (Hühnereiweiß)	Serva, Heidelberg
<i>Pfu Turbo DNA Polymerase</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phospholipase A <sub>2</sub> (Bienengift)	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Shrimp Alkalische Phosphatase	USB, Cleveland, OH, USA
T4 DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.1.4. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sub>r</sub> )] c
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B F' <i>dcm hsdS</i> (r <sub>B</sub> m <sub>B</sub> ) <i>gal lon ompT λ</i> (DE3)
<i>E. coli</i> JM109 (DE3)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> m <sup>+</sup> <sub>K</sub> ) <i>supE44 Δ(lac-proAB) relA1</i> [F', <i>traD36, proAB+</i> <i>lacI<sup>q</sup>ZΔM15</i> ] λ(DE3)

Alle verwendeten Stämme wurden von Stratagene, La Jolla, CA, USA bezogen.

### 3.1.5. Plasmide

pET 22b(+)	Amp <sup>r</sup> , MerckBiosciences, Darmstadt
pET 28b(+)	Kan <sup>r</sup> , MerckBiosciences, Darmstadt

### 3.1.6. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

#### Primer für die Gensynthese

##### Oligo 1

5' -ATT ATT TAT CCG GGT ACC CTG TGG TGT GGT CAT GGC AAC AAA  
AGC TC-3'

##### Oligo 2

5' -GCA TCG GTA TGT TTA AAG CGG CCC AGT TCG TTC GGA CCA GAG  
CTT TTG TTG CCA TGA CC-3'

##### Oligo 3

5' -CGC TTT AAA CAT ACC GAT GCG TGC TGC CGT ACC CAT GAT ATG  
TGC CCG GAT GTG ATG-3'

##### Oligo 4

5' -GTG TTG GTC AGA CCA TGT TTG CTT TCA CCT GCG CTC ATC ACA  
TCC GGG CAC ATA TCA TGG-3'

##### Oligo 5

5' -TGC TAA TGG TAT CCG CGG AGT TTT TCA GGC AAT CAT AGA ATT  
TAT CAT CGC AAT CAC AGC TCA GAC GGG-3'

**Oligo 6**

5´-TGC TAA TGG TAT CCG CGG AGT TTT TCA GGC AAT CAT AGA ATT  
TAT CAT CGC AAT CAC AGC TCA GAC GGG-3´

**Oligo 7**

5´-CGC GGA TAC CAT TAG CAG CTA CTT TGT GGG CAA AAT GTA TTT  
TAA CCT GAT TGA TAC CAA ATG CT-3´

**Oligo 8**

5´-GGT ACG TTC GCC ACA GCC AGT AAC CGG ATG TTC CAG TTT ATA  
GCA TTT GGT ATC AAT CAG G-3´

**Oligo 9**

5´-CTG GCT GTG GCG AAC GTA CCG AAG GTC GTT GCC TGC ATT ATA  
CCG TGG ATA AAA GCA AAC C-3´

**Oligo 10**

5´-TTA TTA ATA TTT GCG CAG ATC GAA CCA CTG ATA CAC TTT CGG  
TTT GCT TTT ATC CAC GG-3´

**NTflank1**

5´-CCA TTA TTT ATC CGG GTA CCC TGT G-3´

**CTflankrev**

5´-CCC CAA GCT TAT TAA TAT TTG CGC AGA TCG-3´

*Primer für die Modifizierung des N-Terminus***Alafw**

5´-CAT GCC ATG GCG ATT TAT CCG GGT ACC CTG TGG-3´

**Valfw**

5´-CAT GCC ATG GTG ATT TAT CCG GGT ACC CTG TGG-3´

**6xHisfw**

5´-GGG AAT TCC ATA TGA TTA TTT ATC CGG GTA CCC TGT GG-3´

**Ilefw**

5´-AGG AGA TAT ACC ATG ATC ATT TAT CCG GGT AC-3´

**Ilerev**

5´-GTA CCC GGA TAA ATG ATC ATG GTA TAT CTC CT-3´

*Sequenzierungsprimer*

Die Sequenzierungsprimer waren am 5´-Ende mit dem Farbstoff IRD800 markiert.

T7Promotor 5´-CGA AAA TAA TAC GAC TCA C-3´

T7Terminator 5´-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3´

### *Primer für das MultiQuikChange-Mutagenese-Verfahren*

Die Primer für das *MultiQuikChange*-Mutagenese-Verfahren waren am 5'-Ende phosphoryliert.

C9S	5´-GTA CCC TGT GGT CTG GTC ATG GCA-3´
C31S	5´-CCG ATG CGT GCA GCC GTA CCC ATG A-3´
C30S	5´-CAT ACC GAT CGA GCT GCC GTA CC-3´
C70S	5´-GAT AAA TTC TAT GAT AGC CTG AAA AAC TCC G-3´
C37S	5´-GTA CCC ATG ATA TGT CTC CGG ATG TGA TGA GC-3´
C63S	5´-GCC TGA GCT GTG ATA GCG ATG ATA AAT TCT ATG-3´
C61S	5´-ACC CGC CTG AGC TCT GAT TGC GAT G-3´
C95S	5´-CCT GAT TGA TAC CAA AAG CTA TAA ACT GGA ACA TC-3´
C105S	5´-CGG TTA CTG GCT CTG GCG AAC GTA C-3´
C113S	5´-GTA CCG AAG GTC GTA GCC TGC ATT ATA CC-3´

#### **3.1.7. Nährmedien**

##### *LB-Flüssigmedium:*

LB-Flüssigmedium enthält pro Liter 10 g Natriumchlorid, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt.

##### *LB-Flüssigmedium mit Zusatz von 1% Glucose:*

Das LB-Flüssigmedium enthält zusätzlich 1% (w/v) Glucose.

##### *LB- Agarplatten:*

LB-Agarplatten bestehen aus LB-Flüssigmedium dem 20 g Agar pro Liter zugesetzt wurde.

##### *SOC-Medium:*

SOC-Medium enthält pro Liter 10 g Caseinhydrolysat, 5 g Hefeextrakt, 5 g Natriumchlorid, 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung und 20 ml 20% (w/v) Glucoselösung.

##### *TB-Medium:*

TB-Medium enthält pro Liter 12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin, 2,13 g Kaliumdihydrogenphosphat und 12,54 g Dikaliumhydrogenphosphat.

##### *TCYM-Medium:*

TCYM-Medium enthält pro Liter 5 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 2 g MgSO<sub>4</sub> und 1 g Casaminoäuren.

*Mineralsalz-Medium für die Fermentation:*

Mineralsalzmedium enthält pro Liter 2,468 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 14,6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{-H-citrat}$ , 4 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 20 g Glucose, 0,1 g Thiamin, 2,465 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  und 2 ml Spurenelementelösung (pro Liter 0,74 g  $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,18 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 20,1 g Na-EDTA).

Die Zufütterungslösung für die *fedbatch*-Phase der Fermentation enthält pro Liter 733 g Glucose, 111 ml Salzlösung (pro Liter: 22 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 24,92 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 146 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 36 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 10 g  $(\text{NH}_4)_2\text{-H-citrat}$ ), 2,2 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung und 12,0 ml Spurenelementelösung.

Den Medien wurden 25 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin oder 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zugesetzt.

**3.2. Methoden****3.2.1. Gensynthese**

Das *pla<sub>2</sub>*-Gen wurde unter Verwendung der unter 3.1.6. aufgeführten Primer in einer PCR assembliert. Dabei wurden je 1  $\mu\text{g}$  Oligonukleotid 1 - 10, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U *Herculase*<sup>TM</sup> Enhanced DNA-Polymerase sowie *Herculase*-Puffer in 50  $\mu\text{l}$ -Ansätzen verwendet. Die Reaktionsbedingungen sind Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Programmparameter der PCR zur Genassemblierung.**

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	5 min
2	12	94°C 60°C 72°C	1 min 1 min 1 min
3	1	72°C	5 min

Anschließend wurden 1  $\mu\text{l}$  aus diesem Ansatz entnommen und in einer weiteren PCR als Matrize für die Amplifizierung des *pla<sub>2</sub>*-Gens eingesetzt. 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz enthielten außerdem je 1  $\mu\text{g}$  der Primer NTflank1 und CTflankrev (siehe 3.1.6.), 0,2 mM dNTPs, *Herculase*-Puffer und 5 U *Herculase*<sup>TM</sup> Enhanced DNA-Polymerase. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3 angegeben.

**Tabelle 3: Programmparameter der PCR zur Amplifizierung des *pla<sub>2</sub>*-Gens.**

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	94°C	5 min
2	25	57°C 72°C 94°C	1 min 1 min 1 min
3	1	72°C	5 min

Anschließend wurde das PCR Produkt wie unter 3.2.4.6. beschrieben gereinigt.

### 3.2.2. Klonierung des *pla<sub>2</sub>*-Gens

Das unter 3.2.1. erhaltene PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* verdaut (siehe 3.2.4.7.) und nach erneuter Reinigung (3.2.4.6.) in den Vektor pET 22b(+), welcher zuvor mit *MscI* und *HindIII* verdaut, dephosphoryliert (3.2.4.8.) und gereinigt (3.2.4.5.) wurde, wie unter 3.2.4.9. beschrieben ligiert. Eine Selektion positiver Klone erfolgte durch Probeverdau der erhaltenen Plasmide mit *MscI* und *HindIII* und anschließender Agarosegelelektrophorese (3.2.4.3.).

### 3.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese

#### 3.2.3.1. QuikChange

Die ortsgerechte Mutagenese, die zum Austausch von Aminosäuren im Protein verwendet wird, wurde mit dem *QuikChange<sup>TM</sup>Site-Directed Mutagenesis* Kit der Firma Stratagene nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend vom Protokoll wurde das erhaltene Produkt mit 2 µl *DpnI* für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend mikrodialysiert (3.2.4.10.) und mittels Elektroporation (3.2.4.13.) in XL1Blue-Zellen transformiert.

#### 3.2.3.2. MultiQuikChange

Die ortsgerechte Mutagenese, die den gleichzeitigen Austausch zweier nicht unmittelbar benachbarter Aminosäuren ermöglicht, wurde mit dem *QuikChange<sup>TM</sup>Multi-Site-Directed Mutagenesis* Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Entgegen den Protokollangaben wurde das Produkt mit 2 µl *DpnI* für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **3.2.4. Molekularbiologische Standardmethoden**

#### **3.2.4.1. Kultivierung von *Escherichia coli* Stämmen**

5 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum, 3.1.7.) wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte (mit Antibiotikum) oder aus einer Glycerinkultur beimpft und für 12 Stunden bei 37°C, 180 rpm inkubiert.

#### **3.2.4.2. Präparation von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Qiaprep Spin Miniprep* Kit der Firma Qiagen. Es wurde nach den Herstellerangaben gearbeitet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 30 bis 50 µl Wasser (bidestilliert) oder EB-Puffer, der im Kit enthalten ist, aufgenommen.

#### **3.2.4.3. Agarosegelelektrophorese**

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 1%-ige (w/v) Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 V in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) durchgeführt. Anschließend wurde die DNA in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) angefärbt.

#### **3.2.4.4. Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch in einem Ultrospec 3000 Spektrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bei 260 nm bestimmt ( $A_{260}=1$  entspricht 50 µg/ml DNA).

Die Größenbestimmung von DNA erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards (1kb-DNA-Leiter oder 100-bp-DNA-Leiter, 3.1.2.) im Agarosegel.

#### **3.2.4.5. DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande mit dem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben behandelt.

#### **3.2.4.6. DNA-Reinigung von PCR-Produkten**

Die Reinigung von PCR-Produkten wurde mit dem PCR- Purification Kit (3.1.2.) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die gereinigte DNA wurde in 20 bis 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  oder EB-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.4.7. Restriktionsanalysen**

Der Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom Hersteller (3.1.3.) empfohlenen Angaben bei 37°C für 1 bis 24 Stunden. Anschließend wurde die Reaktion (10  $\mu\text{l}$ ) mit 4  $\mu\text{l}$  Stopp-Puffer (10 mM Tris/HCl, 150 mM EDTA, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin, pH 8,0) abgestoppt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

#### **3.2.4.8. Dephosphorylierung**

Nach Verdau der Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen erfolgte eine Dephosphorylierung des 5'-Ende der DNA durch alkalische Shrimp Phosphatase (1 U für 10  $\mu\text{l}$  Ansatz) nach Herstellerangaben für 1 Stunde bei 37°C. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gereinigt (3.2.4.5.)

#### **3.2.4.9. Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten in die entsprechenden Vektoren erfolgte durch Inkubation von Insert und Vektor bei 24°C für 2 Stunden in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (10  $\mu\text{l}$  Ansatz, 1 U). Insert und Vektor wurden in einem Stoffmengenverhältnis von 5:1 eingesetzt.

### 3.2.4.10. Mikrodialyse von DNA

Die Mikrodialyse von DNA wurde in Petrischalen mit einer Mikrodialysemembran von Millipore (Schwalbach) durchgeführt. Hierfür wurde die Membran auf das in der Petrischale befindliche Wasser gelegt und die DNA vorsichtig auf die Membran getropft und für 2 Stunden dialysiert.

### 3.2.4.11. Amplifizierung von DNA-Fragmenten

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels PCR. Hierfür wurden 80 ng Template-DNA, je 1 µg der entsprechenden Primer (3.1.6.), 1 mM dNTPs, 10x*PfuTurbo*-Puffer und 5 U *PfuTurbo* DNA Polymerase in 100 µl Ansätzen verwendet. Die Annealing-Temperatur betrug 60°C. Es wurden 25 Zyklen durchgeführt.

### 3.2.4.12. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte über das Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977). Dabei wurde der *SequiThermExcel<sup>TM</sup>LongRead<sup>TM</sup>DNA Sequencing Kit* (Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Sequenzen der benutzten Primer sind in 3.1.6. aufgeführt. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden mit dem LiCor 4000-Sequenzier (LiCor, Lincoln, NE) ermittelt.

### 3.2.4.13. Transformation mittels Elektroporation

Die Transformation der Plasmid-DNA in die jeweiligen Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Elektrokompente Zellen (40 µl; *E. coli* BL21 (DE3) bzw. *E. coli* XL1 Blue) wurden mit der zu transformierenden Plasmid-DNA auf Eis vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Elektroporation in einer 1 mm Elektroporationsküvette am Gerät *Gene Pulser<sup>TM</sup>* der Firma BioRad (München) nach Protokollanleitung. Die transformierten Zellen wurden mit SOC-Medium (960 µl, 3.1.7.) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum als Selektionsmarker verteilt und bei 37°C inkubiert.

### 3.2.5. Expression und Reinigung von Phospholipase A<sub>2</sub>

#### 3.2.5.1. Expression

Zur Optimierung der Expressionsbedingungen wurden 10 ml Medium in 100 ml Schüttelkolben mit einer Einzelkolonie des jeweiligen Expressionskonstruktes beimpft und bei 180 rpm geschüttelt. Die Kultivierungs- und Expressionsbedingungen wurden hinsichtlich Expressionsstamm (BL21(DE3), JM109(DE3)), Temperatur (30, 37, 42°C), Kulturmedium (LB-, LB/1% Glucose-, TB- und TCYM-Medium), Start der Induktion (OD<sub>600</sub>: 0,5 bis 3), Induktorkonzentration (IPTG: 0,2 bis 2 mM) und Induktionszeitraum (0 bis 4 Stunden) optimiert. Die Analyse des Gesamtzellproteins erfolgte wie unter 3.2.6. angegeben.

Zur Produktion rekombinanter Phospholipase A<sub>2</sub> wurden 1 Liter TCYM- oder TB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) mit 10 ml einer Übernachtskultur (mit gleicher Medienzusammensetzung, enthält das entsprechende Expressionskonstrukt in BL21(DE3)-Zellen) inokuliert und bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach Induktion für 4 Stunden bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6000 g, 15 min) und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5.2. Präparation von *inclusion bodies*

Das Zellpellet aus 1 Liter Kultur wurde in 35 ml Zellysepuffer (0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (1,5 mg/g Zellen) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit einem Homogenisator (Gaulin, 2 Passagen, 1200 bar). Zum Abbau bakterieller DNA wurden 3 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 µg/ml DNase I zugegeben und für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 Volumenanteile einer Triton X-100-Lösung (6% (w/v) Triton X-100, 60 mM EDTA, 1,5 M NaCl, pH 7,0) zugegeben, um Membranbestandteile zu solubilisieren. Die Lösung wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die freigesetzten *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation (30000 g, 20 min) gewonnen und anschließend noch einmal mit dem Zellysepuffer gewaschen. Die *inclusion bodies* wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.2.5.3. Solubilisierung von *inclusion bodies*

Die *inclusion bodies* aus 1 Liter Kultur wurden in 2 bis 10 ml Solubilisierungspuffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,3, 6 M GdnHCl, 100 mM DTT) gelöst und zur vollständigen Reduzierung der Disulfidbrücken für 2 bis 3 Stunden unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 4,0 abgesenkt und das Solubilisat zur Entfernung von DTT gegen 2x 1 Liter 20 mM Essigsäure/4 M GdnHCl dialysiert. Während der Dialyse entstandene Präzipitate wurden durch Zentrifugation (30000 g, 20 min) entfernt.

### 3.2.5.4. Renaturierung

Zur Optimierung der Renaturierungsbedingungen wurde ein Basispuffer verwendet, der 0,1 M Tris/HCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA enthielt. Dieser wurde durch die in Tabelle 4 aufgeführten Zusätze ergänzt und entgast. Weiterhin wurden die Proteinkonzentration (im Bereich 1-100 µg/ml rekombinante PLA<sub>2</sub>, ermittelt durch densitometrische Proteinbestimmung (3.2.7.3.)), der pH-Wert und die Temperatur variiert. Nach 24 Stunden wurde die PLA<sub>2</sub>-Aktivität bestimmt (3.2.11.1.). Die Bestimmung der Renaturierungsausbeuten erfolgte durch Vergleich der erhaltenen spezifischen PLA<sub>2</sub>-Aktivitäten mit der spezifischen Aktivität rekombinanter gereinigter PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Renaturierungspuffer für die Rückfaltung der *inclusion bodies* rekombinanter PLA<sub>2</sub>.** Der Basispuffer enthielt 0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA.

Zusatz	verwendete Konzentrationen
Tris/HCl	0,1-1,5 M
L-Arginin	0-1,5 M
NaCl	0-1,5 M
GdnHCl	0,04-1 M
GSSG	1-10 mM
GSH	1-10 mM

Unter optimierten Bedingungen wurde die rekombinante PLA<sub>2</sub> in entgastem Renaturierungspuffer (1 M Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM GSSG) bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml über 24 Stunden bei 4°C renaturiert.

### 3.2.5.5. Konzentrierung/Dialyse

Die renaturierte Proteinlösung wurde in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle (350 ml) mit einer 3 K Omega-Membran (Pall Filtron, Bonn) konzentriert. Um die Pufferkonzentration im Ansatz zu senken, wurde das Konzentrat entweder direkt in der Ultrafiltrationszelle mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) gewaschen oder gegen diesen Puffer dialysiert (Dialyseschlauch: 3,5 kDa Ausschlussgrenze).

### 3.2.5.6. Reinigung von PLA<sub>2</sub>

Die renaturierte und konzentrierte PLA<sub>2</sub> wurde mittels Kationenaustausch-Chromatographie gereinigt. Hierfür wurde die Proteinlösung (maximal 0,7 mg Protein) filtriert (0,45 µm Filter Roth) und auf eine FPLC-Säule MONO S HR 5/5 (PHARMACIA, Uppsala, Schweden), die mit einer inerten HPLC-Anlage (Detektor L-4250, Niederdruckgradientenpumpe L-6210, Merck Hitachi, Tokio, Japan) verbunden war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem steigenden NaCl-Gradienten in der mobilen Phase (Laufmittel A: 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, Laufmittel B: 50 mM Tris/HCl pH 9,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M NaCl). Die Flussrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte bei 278 nm. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt. Die Reinheit des erhaltenen Proteins wurde elektrophoretisch (SDS-PAGE) und durch Rechromatographie an der Mono S-Säule überprüft.

Anschließend wurde die Proteinlösung mittels Amicon-Ultrafiltrationszelle und 3 K Omega-Membran umgepuffert (10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) und konzentriert. Die Lagerung der PLA<sub>2</sub> erfolgte bei -80°C.

### 3.2.6. Hochzellichtefermentation

Fermentationsexperimente wurden in einem 10 Liter-Bioreaktor (BIOSTAT C-Laborfermentor, B. Braun, Melsungen) durchgeführt und der Fermentationsverlauf mittels Prozessleitsystem MFCS-Win aufgezeichnet.

Für die erste Vorkultur wurde eine Einzelkolonie einer Agarplatte entnommen oder etwas Material aus einer Glycerinkultur. Damit wurden 10 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin in einem 100 ml Schüttelkolben beimpft. Nach 4 bis 6 Stunden wurden 5 ml dieser Vorkultur in eine zweite Vorkultur mit 200 ml FB-Medium, 50 µg/ml Kanamycin (3.1.7.) überführt. Nach ca. 4 bis 7 Stunden wurden die sich in der exponentiellen Phase befindlichen Zellen in

den Fermentor zur Hochzelldichtefermentation überführt. Die Vorkulturen wurden bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die Inokulation der Vorkulturen in den Fermentor erfolgte in einem Verhältnis von 1:10.

Die Fermentationen erfolgten im *fedbatch*-Verfahren. Die Kultivierungsexperimente wurden als *batch*-Kulturen mit einem Volumen von 5-7 Liter Mineralsalzmedium (3.1.7.) bei 37°C gestartet. Der pH-Wert wurde bei allen Fermentationen durch automatische Titration mit 25%-iger Ammoniaklösung konstant bei 7,0 gehalten. 50%-ige (v/v) Polypropylenglykollösung (Roth, Karlsruhe) diente als Antischaummittel. Während der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationslösung durch eine Kaskadenregelung von Rührer (400 bis 1212 rpm) und Belüftungsrate (4 bis 16 l/min) konstant bei 20% gehalten. Bei Bedarf wurde zur Aufrechterhaltung des Sauerstoffpartialdrucks reiner Sauerstoff (0 bis 6 l/min) zugegeben. Bei Glucosemangel (<0,2 g/l) wurde die Fedbatchphase durch Zugabe der Zufütterungslösung (3.1.7.) gestartet. Zum Einpumpen der Zufütterungslösung diente eine externe Pumpe. In der Fedbatch-Phase wurden verschiedene feeding-Raten getestet, um eine optimale Genexpression zu erhalten. Die Expression des *pla<sub>2</sub>*-Gens wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet und die Fermentation nach 4 bis 5 Stunden beendet. Es wurden bei verschiedenen Fermentationen optische Zelldichten (600 nm) von 60 bis 110 erzielt. Die erreichten Expressionsausbeuten wurden mittels SDS-PAGE bestimmt.

*Glucosebestimmung:* Die Bestimmung der Glucosekonzentration verschiedener Fermentationsproben wurde freundlicherweise von Dipl.-Ing. Marco Jenzsch (Institut für Bioengineering, Halle) an einem Yellow Springs Instruments Biochemistry Analyser 2700 Select (YIS, Inc., Yellow Springs, USA) durchgeführt.

*Biotrockenmassebestimmung:* Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden dem Fermentor 1 ml Zellsuspension entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (6000 g, 10 min) wurde das Pellet mit 0,9%-iger NaCl-Lösung (w/v) versetzt, resuspendiert und erneut zentrifugiert (6000 g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 24 h bei 80°C getrocknet und ausgewogen.

*Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm:* Zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> wurden dem Fermentor Proben entnommen und entsprechende Verdünnungen mit Leitungswasser hergestellt, um eine Messung im linearen Bereich zu gewährleisten. Die Messung der Proben

erfolgte mit dem Spektrophotometer Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gegen Wasser.

*Bestimmung des Anteils von rekombinantem Protein am Gesamtzellprotein:* Einer Kulturlösung mit einer  $OD_{600}$  von 1 wurde 1 ml Probe entnommen. Bei höheren optischen Dichten wurde entsprechend weniger Kulturlösung entnommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit 50  $\mu$ l Probenpuffer der SDS-PAGE (3.2.8.) versetzt. Davon wurden 5 bis 10  $\mu$ l für die SDS-PAGE (3.2.8.) eingesetzt. Die Gelfärbung erfolgte mit Coomassie-Brilliant-Blue. Die densitometrische Auswertung und Evaluierung erfolgte wie unter 3.2.7.3. beschrieben.

### **3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration**

#### **3.2.7.1. Spektroskopische Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration von PLA<sub>2</sub>-Lösungen wurde durch Extinktionsmessungen bei 280 nm in Quarzglasküvetten (1 cm Schichtdicke) unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von  $E_{280}^{0,1\%}=1,3$  (Ghomashchi et al. 1991) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt.

#### **3.2.7.2. BCA-Test**

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels BCA-Methode wurde der BCA ProteinAssay Kit (Pierce, Bonn) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Für den BCA-Test im Mikrotiterplattenmaßstab wurden 10  $\mu$ l Probe und 200  $\mu$ l BCA-Reagenz eingesetzt.

#### **3.2.7.3. Densitometrische Evaluierung der Proteinkonzentration**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von rekombinanter PLA<sub>2</sub> in solubilisierten *inclusion bodies* oder in Renaturierungsansätzen wurden die Proben einer NaDOC-Fällung unterzogen (3.2.10.) und anschließend mittels SDS-PAGE (3.2.8.) gelelektrophoretisch getrennt. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassie-Farbstoff angefärbt. Als Standard in der SDS-PAGE wurden bv-PLA<sub>2</sub>-Proben definierter Proteinkonzentration (0,25 ng bis 5  $\mu$ g

Protein) auf das Gel aufgetragen. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte bei 595 nm mit dem Densitometer CD 60 (DESAGA, Heidelberg).

### **3.2.8. SDS-PAGE**

Die Gelelektrophorese wurde, wie in der Literatur beschrieben (Laemmli 1970), in einer Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Es wurden 15%-ige Trenngele verwendet. Als Probenpuffer diente 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 25% (w/v) Glycerin, 10 mM DTT und Bromphenolblau. Nach der Elektrophorese wurden die Proteinbanden durch Silber- (Blum et al. 1987) oder Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (200 ml Färbe-Lösung: 0,5 g Coomassie-Brilliant-Blue G 250, 42,5% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure; Entfärbungslösung: 7% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Ethanol) angefärbt.

### **3.2.9. Isoelektrische Fokussierung**

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit PhastGel-IEF-Flachbettgelen (Serva, Taufkirchen) mit immobilisiertem pH-Gradient von 6-10 am PhastSystem<sup>TM</sup> (Pharmacia, Uppsala, Schweden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. 3 µl Probe sowie ein IEF Standard (Serva, Heidelberg) wurden an drei Stellen im Gel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden im Gel mittels Coomassie angefärbt.

### **3.2.10. NaDOC-Fällung**

Für die Fällung von Proteinproben mittels NaDOC wurden diese auf 2 ml mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde 10 µl 10% (w/v) NaDOC-Lösung und 50 µl 50% (w/v) TCA-Lösung zugegeben. Die Fällung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (20400 g, 30 min, 4°C) wurde das Pellet mit eiskaltem Aceton gewaschen, erneut zentrifugiert (20400 g, 30 min, 4°C) und mit eiskaltem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und anschließend in einer SpeedVac-Savant (LifeScience-International GmbH, Frankfurt am Main) eingetrocknet.

### 3.2.11. Aktivitätsbestimmung von PLA<sub>2</sub>

#### 3.2.11.1. Bestimmung der freigesetzten Fettsäuren

10 mg DOPC wurden in 300 µl Chloroform und 150 µl Methanol gelöst. Zur Herstellung eines Lipidfilms wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Erzeugung der Mischmicellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl 1 M Tris/HCl pH 8,3, 250 µl 0,1 M Triton X-100 Lösung, 25 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 25 µl 0,2 M SDS-Lösung und schütteln für 15 Minuten. Die Umsetzung des Substrats (60 µl) durch PLA<sub>2</sub> (40 µl, 1-5 µg/ml Protein) erfolgte bei 37°C. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und die Reaktion mit 10 µl 0,2 M EDTA-Lösung abgestoppt. Die Detektion der freigesetzten Fettsäuren erfolgte nach den im NEFA C-Test (Wako, Neuss) aufgeführten Angaben. Die Extinktionsmessungen erfolgten in einem Microplatereader (Dynatech MR7000, Cheminst, Berlin).

Die Ermittlung der Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur erfolgte nach Standardvorschrift bei verschiedenen Temperaturen (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C).

Die Bestimmung der Temperaturstabilität erfolgte durch Inkubation der PLA<sub>2</sub> bei verschiedenen Temperaturen (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C) für 30 Minuten. Nach Abkühlung der Proben für 10 Minuten auf Eis wurde die Aktivität unter Standardbedingungen bestimmt.

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden die Mischmicellen mit 10 mM Tris/HCl pH 8,3 statt mit 1 M Tris/HCl pH 8,3 erzeugt. Die PLA<sub>2</sub>-Stammlösung wurde durch 0,2 M Puffer mit entsprechendem pH-Wert (Acetat-Puffer pH 4,0-6,0, Mes-Puffer pH 6,0, Tris/HCl-Puffer pH 7,0-9,0) 1:1000 auf 1 µg/ml verdünnt. Die Substratumsetzung erfolgte im weiteren wie im oberen Abschnitt aufgeführt.

#### 3.2.11.2. Aktivität gegen 1,2-Diheptanoylthio-*sn*-glycero-3-phosphocholin

Die Ermittlung der PLA<sub>2</sub>-Aktivität erfolgte mit dem sPLA<sub>2</sub>-Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) nach Herstellerangaben. Die Extinktionsmessungen erfolgten in einem Microplatereader (Dynatech MR7000, Cheminst, Berlin) Als Substrat wurde 1,2-

Diheptanoylthio-*sn*-glycero-3-phosphocholin eingesetzt. Nach Hydrolyse der Thioesterbindung in *sn*2-Position des Phospholipids werden die freien Thiolgruppen durch DTNB modifiziert. Das erhaltene Produkt kann spektrophotometrisch bei 405 nm detektiert werden.

### 3.2.12. CD-Spektroskopie

Die Proben wurden mit einem CD-Spektrometer (Modell 62 ADS, AVIV, Lakewood, N.J., USA) bei 20°C vermessen. Für die Aufnahme im fernen UV-Bereich wurden 2 mg/ml Protein in 10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, in einer 0,1 mm Quarzküvette verwendet. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und filtriert (0,45 µm Filter, Roth). Die Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm und einer Aufnahmezeit von 70 s aufgenommen. Die Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  wurde nach Gleichung 2 berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{c \cdot d \cdot N_A} \quad (2)$$

$[\Theta]_{MRW}$	molare Elliptizität pro Aminosäurerest
$\Theta$	Elliptizität (mdeg)
$M_r$	molare Masse des Proteins
$N_A$	Anzahl der Aminosäuren im Protein
$c$	Proteinkonzentration (mg/ml)
$d$	Schichtdicke der Küvette (cm)

### 3.2.13. Fluoreszenzspektroskopie

Alle Lösungen wurden vor Gebrauch entgast und filtriert (0,45 µm Filter, Roth). Die Messungen erfolgten an einem Fluoro-Max2 Spektrometer (Jobin Yvon, Bensheim) unter Verwendung einer 1 cm x 4 mm Fluoreszenzquarzküvette. Alle Experimente wurden bei 20°C durchgeführt.

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 40 µg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Nach Anregung bei 278 nm wurden die Emissionsspektren von 290 bis 400 nm aufgenommen. Es wurden 7 Einzelspektren akkumuliert.

Für die Aufnahme der Übergangskurven wurden 30 µl Proteinlösung (1 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub>), 100 µl 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,3, 10 µl 1 M CaCl<sub>2</sub>, x µl 8 M GdnHCl-Lösung und y µl H<sub>2</sub>O (x+y = 860 µl) für 24 Stunden bei 20°C vorinkubiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte von 310 bis 395 nm bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm, wobei fünf Einzelspektren akkumuliert wurden. Für die Anregung und auch für die Emission wurde eine Spaltbreite von 5 nm verwendet, die Integrationszeit betrug 1 s. Die Bestimmung der Übergangskurven erfolgte im Maximum des Differenzspektrums des nativen und denaturierten Zustands. Die Ermittlung der freien Standardenthalpie ( $\Delta G_0$ ) in Abwesenheit des Denaturanz wurde durch lineare Extrapolation vorgenommen (Santoro und Bolen 1988).

### **3.2.14. Proteinsequenzierung**

Für die N-terminale Sequenzierung wurden die zu untersuchenden Proteinproben auf eine PVDF-Membran (Sartorius, Göttingen) geblottet. Im Anschluß an die SDS-PAGE (3.2.8.) wurde das Gel in der Blotting-Apparatur Fast Blot B33 (Biometra, Göttingen) mit dem Semi-Dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. Als Blot-Puffer wurde 50 mM Natriumborat-Puffer pH 9,0, der 20% Methanol enthielt, verwendet. Die eingesetzte Stromstärke betrug 2,5 mA cm<sup>-2</sup>. Die Blotdauer betrug 3 bis 4 Stunden. Die Proteinsequenzierung wurde freundlicherweise von Dr. Rücknagel (MPG, Halle, Deutschland) durchgeführt. Die N-terminale Proteinsequenzierung erfolgte mittels eines automatisierten Edman-Abbaus unter Verwendung eines Protein Sequenzers 476A (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers.

### **3.2.15. Massenspektrometrie**

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte freundlicherweise durch Dr. Schierhorn (MPG, Halle). Die MALDI-Spektren wurden mit einem Reflektor-Flugzeit-Massenspektrometer (BRUKER-FRANZEN, Bremen) aufgenommen. Die Ionisierung und Desorption erfolgte durch Beschuss der beladenen Sinapinsäure-Matrix mit der Strahlung (337 nm) eines N<sub>2</sub>-Lasers.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Gensynthese

Wie in der Einleitung dargestellt, lag das Ziel dieser Arbeit in der Herstellung einer rekombinanten PLA<sub>2</sub>, die der Gensequenz der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift entspricht. Die Sequenz des *pla*<sub>2</sub>-Gens ist in der Datenbank (NCBI Accession Nummer AF 438408) hinterlegt, so dass auf die aufwendige Isolierung der Nukleotidsequenz aus dem Ursprungsmaterial verzichtet und stattdessen das Gen durch eine PCR-vermittelte Gensynthese gewonnen werden konnte. Vorteil dieser Methode ist, dass die *codon usage* dem Wirtsorganismus angepaßt werden kann und so bei der Überexpression des Gens Wachstumsinhibierung und verringerte Produktausbeuten durch Codons, die vom Wirtsorganismus selten verwendet werden, vermieden werden können (Baneyx 1999). Ein weiterer Grund für die Benutzung dieser Methode ist die geringe Größe des *pla*<sub>2</sub>-Gens (408 bp), so dass die Anzahl der verwendeten Primer sehr gering ist. Die angewandte Methode zur Darstellung des synthetischen Gens wurde von Stemmer und Mitarbeitern für das Gen von TEM-1  $\beta$ -Lactamase entwickelt (Stemmer et al. 1995) und leitet sich vom DNA-Shuffling ab (Stemmer 1994). Sie ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

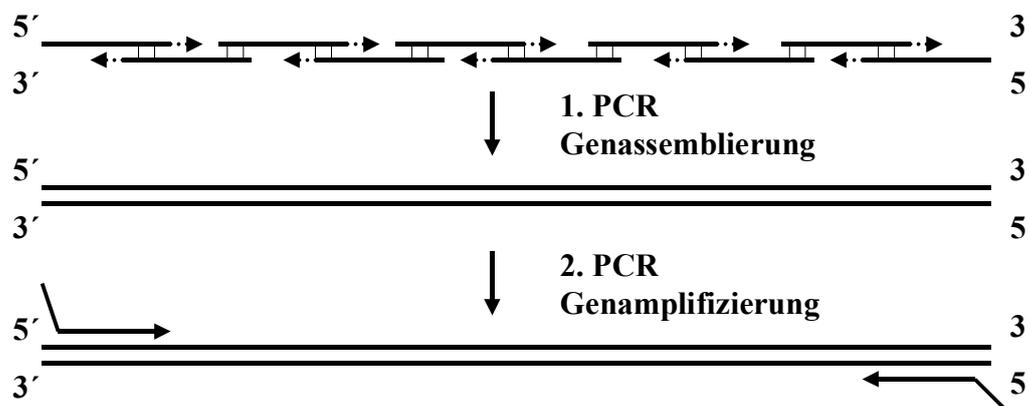


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Gensynthese nach Stemmer (1995).

Für die Gensynthese wurden 10 Oligonukleotide (Oligo 1 bis 10, 3.1.6.) mit einer Länge von je 50 bis 60 bp verwendet, die alternierend die beiden Stränge der DNA repräsentieren und an den Enden jeweils um bis zu 25 Nukleotide komplementär überlappen. Diese Oligonukleotide wurden im ersten PCR-Schritt zum vollständigen Gen assembliert (3.2.1.). In einer zweiten PCR wurde durch flankierende Primer (NTflank1, CTflankrev, 3.1.6.) das Gen amplifiziert



## 4.2. Klonierung und Expression von Phospholipase A<sub>2</sub>

### 4.2.1. Auswahl und Konstruktion der Expressionssysteme

Für die Überexpression des *pla*<sub>2</sub>-Gens wurde als Wirtsorganismus *E. coli* ausgewählt, da aus der Literatur bekannte Versuche zur Expression von sPLA<sub>2</sub>s in löslicher Form in Hefen oder Säugerzellen zu sehr geringen Produktausbeuten führten (van den Bergh et al. 1987; Lefkowitz et al. 1999; Valentin et al. 1999b). Weil das Enzym aus dem Bienengift fünf Disulfidbrücken besitzt, käme für *E. coli* nur eine Sekretion ins Periplasma in Frage, um das Enzym in löslicher Form zu gewinnen, wobei hier die Cytotoxizität der PLA<sub>2</sub> für den Wirtsorganismus *E. coli* problematisch sein könnte. Somit stellt die Expression des Gens in Form von unlöslichen Proteinaggregaten in *E. coli* trotz des erhöhten Aufwands durch Solubilisierung und Renaturierung des Proteins aus den *inclusion bodies* die sinnvollste Strategie zur Gewinnung der rekombinanten sPLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift dar.

Für die Expression des synthetischen Gens der sPLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift in *E. coli* wurden verschiedene Expressionskonstrukte hergestellt. Als Expressionssystem wurde das T7-System ausgewählt (Studier et al. 1990). Dieses System ist ein Kaskadensystem. Die Expression des rekombinanten Gens auf dem Plasmid wird durch die Induktion der T7 RNA Polymerase Expression, die unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht, im Wirtsstamm eingeleitet. Die Expression kann durch Zugabe von IPTG oder Lactose (Donovan et al. 1996) induziert werden.

Da die Proteinsequenz der bv-PLA<sub>2</sub> mit einem Isoleucin beginnt, war hier die Abspaltung des Startmethionins in *E. coli* in Frage gestellt (Chang et al. 1996; Gergiou 1996). Durch ein zusätzliches Methionin könnten sowohl die Faltung des rekombinanten Proteins als auch die Aktivität negativ beeinflusst werden, da der N-terminale Bereich des Enzyms Bestandteil der IBS ist (2.2.1.2.) (Lathrop et al. 1992). Es wurden deshalb verschiedene Varianten des Gens erzeugt, die N-terminal modifiziert waren.

### 1. pla<sub>2</sub>-pET 22b(+)

Das erhaltene synthetische Gen (4.1.) wurde mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* behandelt (3.2.4.7.) und wie unter 3.2.4.6. beschrieben gereinigt und in den Expressionsvektor pET 22b(+), der mit *MscI* und *HindIII* geschnitten worden war, kloniert (3.2.2.). Das so erhaltene Konstrukt besitzt die Leadersequenz PelB (Pectatlyase aus *Erwinia carotovora*) (Lei et al. 1987), die eigentlich der Translokation des Proteins in das Periplasma von *E. coli* dient. Diese Strategie wurde bereits in der Literatur (delCardayre et al. 1995) und in der Arbeitsgruppe (Markert et al. 2001) zur Expression von Ribonuclease A erfolgreich angewendet, wobei hier jedoch das Protein mit korrektem N-Terminus in Form von *inclusion bodies* im Cytoplasma von *E. coli* verbleibt.

### 2. I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)

Zur Erzeugung dieses Expressionskonstruktes wurde das *pla<sub>2</sub>*-Gen in die *NcoI/HindIII*-Schnittstellen des Vektors pET 28b(+) kloniert. Das *pla<sub>2</sub>*-Gen wurde mit Hilfe der Primer Alafw/CTflankrev (3.1.6.) mit dem Plasmid pla<sub>2</sub>-pET 22b(+) als Template amplifiziert (3.2.4.11.), mit *NcoI* und *HindIII* verdaut (3.2.4.7.) und in den ebenso vorbehandelten Vektor pET 28b(+) kloniert. Somit wurde ein Expressionskonstrukt erhalten (I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)), dessen Translationsprodukt anstelle der N-terminalen Aminosäure Isoleucin ein Alanin enthält, um die Abspaltung des Startmethionins zu gewährleisten.

### 3. I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)

Das Konstrukt I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) wurde in Analogie zu I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) mit den Primern Valfw/Ctflankrev (3.1.6.) hergestellt. Bei diesem Expressionskonstrukt (I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)) ist im resultierenden Protein die N-terminale Aminosäure Isoleucin durch ein Valin ausgetauscht.

### 4. M-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)

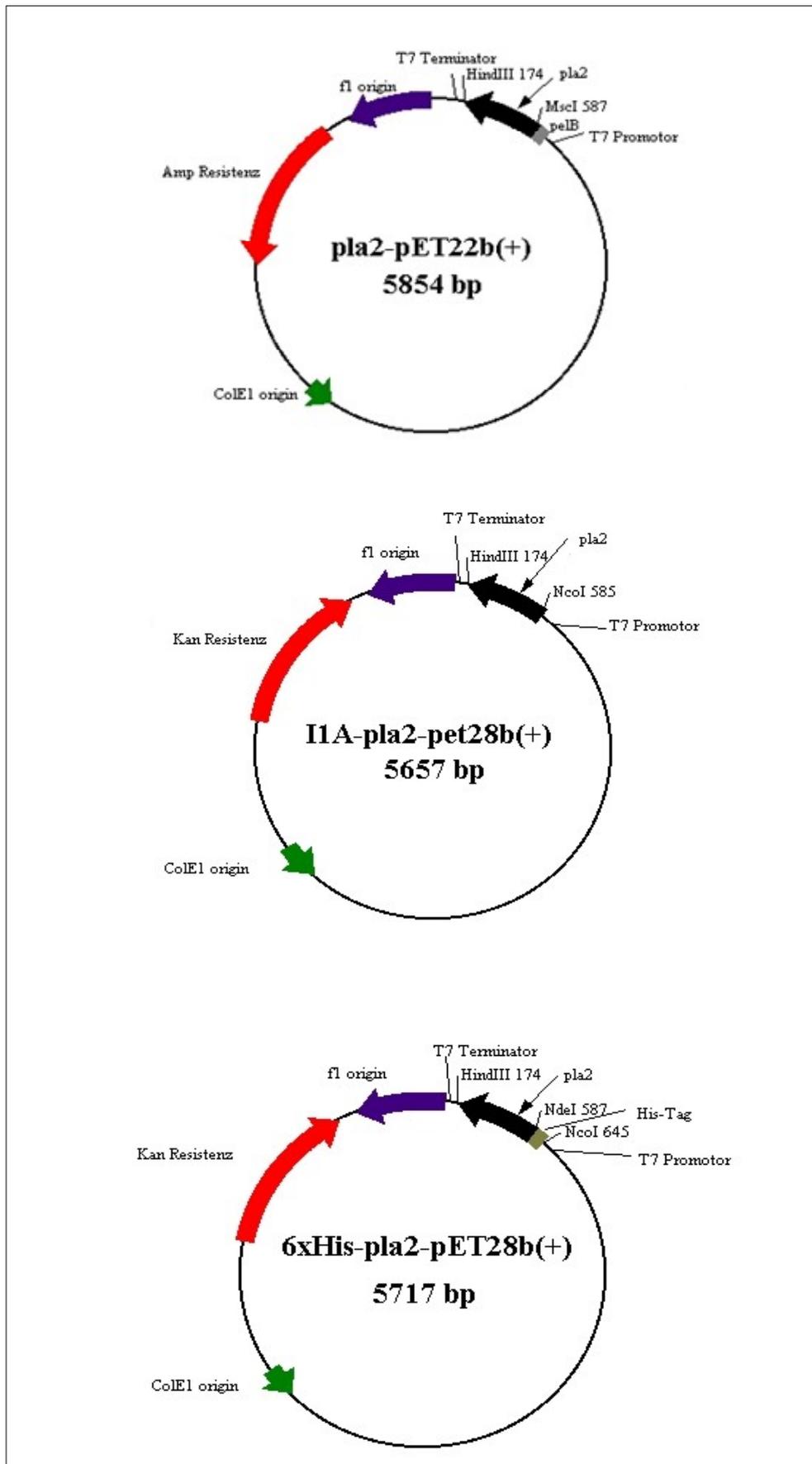
Durch ortsgerichtete Mutagenese (3.2.3.1.) (Primer Ilefw und Ilerev, 3.1.6.) wurde das Codon für die N-terminale Aminosäure Valin der PLA<sub>2</sub> im Vektor I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) durch das Codon für Isoleucin ersetzt. Das führt dazu, dass im Protein zwar die korrekte N-terminale Sequenz vorhanden ist, aber das Startmethionin nicht abgespalten wird.

### 5. 6xHis-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)

Es wurde eine Variante der PLA<sub>2</sub> mit N-terminalem Hexa-His-Tag hergestellt. Hierfür wurde das Gen mit dem Plasmid pla<sub>2</sub>-pET 22b(+) als Matrize und den beiden Primern 6xHisfw und CTflankrev (3.1.6.) mittels PCR (3.2.4.11.) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *HindIII* geschnitten (3.2.4.7.) und in den Expressionsvektor pET 28b(+), der ebenfalls mit den beiden Enzymen behandelt wurde, kloniert. Diese Variante diente dem Vergleich mit einer bereits publizierten PLA<sub>2</sub> mit der Gensequenz des Enzyms aus Bienengift (Dudler et al. 1992), die jedoch für industrielle Zwecke nicht geeignet erschien. Außerdem sollte festgestellt werden, inwieweit das Vorhandenseins des Tags die Aktivität des Enzyms beeinflusst, da hierzu die Daten aus der Literatur kontrovers sind (Dudler et al. 1992; Nicolas et al. 1997).

Die korrekte DNA-Sequenz der Expressionskonstrukte wurde durch DNA-Sequenzierung (3.2.4.12.) bestätigt. Die Expressionskonstrukte wurden anschließend in die entsprechenden *E. coli*-Expressionsstämme transformiert (3.2.4.13.).

Die verwendeten Expressionskonstrukte sind in Abbildung 15 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Plasmidkonstrukte zur Expression von PLA<sub>2</sub>. pla<sub>2</sub>-pET 22b(+), I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+), 6xHis-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+)

#### 4.2.2. Optimierung der Expression

Die Expression in *E. coli* war für die Expressionskonstrukte 2: I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+), 3: I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+), 4: M-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) und 5: 6xHis-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) erfolgreich. Die entsprechenden PLA<sub>2</sub>-Varianten (I1A-PLA<sub>2</sub>, I1V-PLA<sub>2</sub>, M-PLA<sub>2</sub>, 6xHis-PLA<sub>2</sub>) fielen in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* im Cytoplasma an. Im Gegensatz dazu war die Expression des pla<sub>2</sub>-Gens im Vektor pET 22b(+) nicht erfolgreich. Auch bei Variation aller Expressionsparameter konnte weder im Cytoplasma noch im Periplasma eine Expressionsbande detektiert werden. Eine Translationshemmung durch unvorteilhafte Sekundärstrukturen der gebildeten mRNA konnte jedoch durch eine Sekundärstrukturanalyse (Software: mfold Version 3.1, M. Zuker, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA) ausgeschlossen werden. Es ist daher anzunehmen, dass dieses Konstrukt nicht exprimiert oder nach Expression durch Wirtsproteasen abgebaut wird. Letzteres ist jedoch unwahrscheinlich, da gebildete *inclusion bodies* im Allgemeinen relativ proteaseresistent sind.

Zur Optimierung der Überexpression der verschiedenen Expressionskonstrukte im Schüttelkolben wurden nachfolgend aufgeführte Parameter variiert:

- Expressionsstamm (BL21(DE3) und JM109(DE3))
- Temperatur (30, 37 und 42°C)
- Kulturmedium (LB-, LB/1% Glucose-, TB- und TCYM-Medium)
- Start der Induktion (OD<sub>600</sub>: 0,5 bis 3)
- Induktorkonzentration (IPTG: 0,2 bis 2 mM)
- Induktionszeitraum (0 bis 4 Stunden)

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden Zellproben mittels SDS-PAGE (3.2.8.) analysiert. Der Anteil des rekombinanten Proteins am Gesamtzellproteingehalt wurde densitometrisch bestimmt (3.2.6.).

Für die Expression der verschiedenen PLA<sub>2</sub>-Varianten wurden die beiden *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und JM109(DE3) getestet. BL21(DE3) zeichnete sich im Vergleich zu JM109(DE3) bei ähnlicher Expressionsleistung durch höhere Wachstumsraten aus, so dass bei weiteren Optimierungsexperimenten nur mit BL21(DE3) gearbeitet wurde.

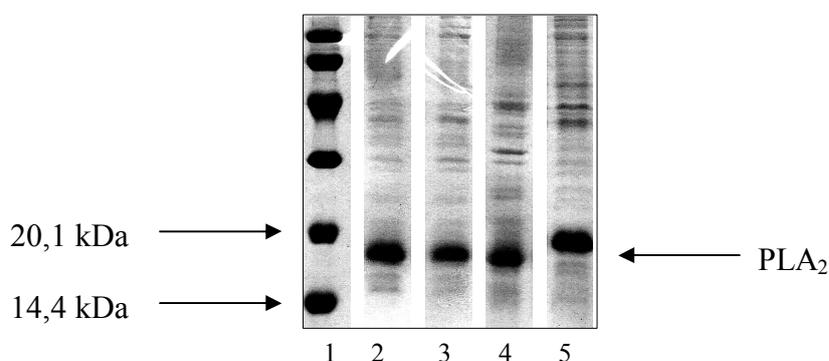
Die Expression in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur zeigte für die Expressionsvarianten 2 bis 5 ein Optimum bei 37°C. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem Maximum der Wachstumsrate (37 bis 39°C) von *E. coli* (Ingraham 1987) und der Aktivität von *lac*-Promotoren, welche ebenfalls bei dieser Temperatur ihr Optimum besitzen (Auger und Bennett 1987).

Das Kulturmedium kann einen erheblichen Einfluss auf die Akkumulation des rekombinanten Proteins im Wirtsorganismus haben, da vor allem beim Einsatz aminosäurereicher Komplexmedien der proteolytische Abbau des rekombinanten Proteins vermindert werden kann (Donovan et al. 1996). Es wurden die im oberen Teil aufgeführten Standardmedien getestet. Für die Expressionskonstrukte I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+), I1V-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+), M-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) erwies sich die Expression im TCYM-Medium als optimal, während für das Konstrukt 6xHis-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) die Expressionsleistung in TB-Medium am besten war. Somit zeigte sich für alle exprimierten Konstrukte die Verwendung aminosäurereicher Medien als vorteilhaft.

Die Induktorkonzentration kann ebenfalls eine wichtige Rolle spielen, da IPTG in hohen Konzentrationen toxisch auf die Zellen wirkt und zu verringerten Zellausbeuten führen kann (Bentley et al. 1991). Es zeigte sich für die Expressionskonstrukte 2 bis 5 die IPTG-Konzentration von 1 mM als optimal. Dies steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten zur Abhängigkeit der Expressionsleistung für rekombinante Proteine von der Induktorkonzentration (Donovan et al. 1996).

Die Zelldichte, bei der die Induktion des Gens gestartet wird, besitzt ebenfalls einen großen Einfluss, da hohe Zelldichten zu Plasmidverlust führen können und somit Anlass zu geringeren Expressionsleistungen (Baneyx 1999) geben können. Für alle Konstrukte zeigte sich die Induktion bei OD<sub>600</sub>=1 als optimal. Die Induktion zu späteren Zeitpunkten (OD<sub>600</sub>=2 bis 3) führte zu drastisch verringerten Expressionraten. Nach 3 bis 4 Stunden wurde die höchste Expressionsrate erreicht, und die Zellen konnten geerntet werden.

Durch die Optimierung der Expression der verschiedenen PLA<sub>2</sub>-Konstrukte konnten die Expressionsleistungen im Vergleich zur nichtoptimierten Expression um mehr als 10% gesteigert werden. Die erzielten Expressionsleistungen nach der Optimierung sind in Tabelle 5 und in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: SDS-PAGE des Gesamtzellproteins der Expression in Form von *inclusion bodies* der verschiedenen rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten.**

Die Analyse des Gesamtzellproteins erfolgte wie unter 3.2.6. angegeben.

- 1: LMW-Marker
- 2: I1A-PLA<sub>2</sub>
- 3: I1V-PLA<sub>2</sub>
- 4: M-PLA<sub>2</sub>
- 5: 6xHis-PLA<sub>2</sub>

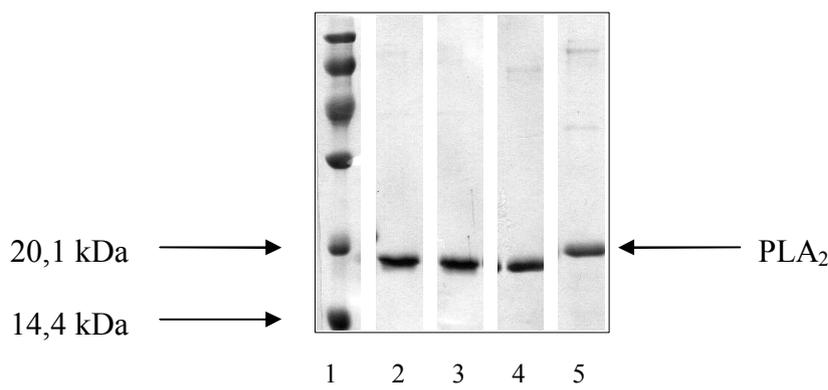
**Tabelle 5: Optimierte Expressionsbedingungen für die verschiedenen rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten.**

Die Optimierung der Expressionsbedingungen für die verschiedenen Expressionskonstrukte erfolgte nach der unter 3.2.5.1. aufgeführten Methode. Die Bestimmung des Anteils an rekombinanten Protein am Gesamtzellprotein wurde wie unter 3.2.6. beschrieben durchgeführt.

Expressionskonstrukt	Protein	Anteil am Gesamtzellprotein (%)	optimale Bedingungen
pla <sub>2</sub> -pET 22b(+)	PLA <sub>2</sub>	-	-
I1A-pla <sub>2</sub> -pET 28b(+)	I1A-PLA <sub>2</sub>	28	BL21(DE3), 37°C, TCYM, 1 mM IPTG, Induktion bei OD <sub>600</sub> =1 für 4 h
I1V-pla <sub>2</sub> -pET 28b(+)	I1V-PLA <sub>2</sub>	27	BL21(DE3), 37°C, TCYM, 1 mM IPTG, Induktion bei OD <sub>600</sub> =1 für 4 h
M-pla <sub>2</sub> -pET 28b(+)	M-PLA <sub>2</sub>	26	BL21(DE3), 37°C, TCYM, 1 mM IPTG, Induktion bei OD <sub>600</sub> =1 für 4 h
6xHis-pla <sub>2</sub> -pET 28b(+)	6xHisPLA <sub>2</sub>	35	BL21(DE3), 37°C, TB, 1 mM IPTG, Induktion bei OD <sub>600</sub> =1 für 4 h

#### 4.3. Präparation der *inclusion bodies*

Nach erfolgreicher Überexpression der Konstrukte 2 bis 5 und Zellaufschluss (3.2.5.2.), wurden die in den Zellen enthaltenen *inclusion bodies* isoliert. Die erzeugten *inclusion bodies* besaßen bereits eine hohe Reinheit. Die densitometrische Analyse der SDS-PAGE zeigte für die PLA<sub>2</sub>-Varianten eine Reinheit von 80-90% (Abbildung 17). Die apparenten Molekülmassen betragen ca. 18 kDa (I1A-PLA<sub>2</sub>, I1V-PLA<sub>2</sub>, M-PLA<sub>2</sub>) und 20 kDa (6xHis-PLA<sub>2</sub>), bei einer berechneten Molekülmasse von 15,207 kDa, 15,235 kDa, 15,38 kDa bzw. 17,412 kDa. Die Abweichungen werden vermutlich durch die hohe Basizität (pI=10,5 (Shipolini et al. 1971)) der Proteine hervorgerufen, da diese mehr SDS-Moleküle als saure oder neutrale Proteine binden können und demzufolge in der SDS-PAGE ein langsames Laufverhalten zeigen.



**Abbildung 17: SDS-PAGE der isolierten *inclusion bodies* der rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten.**

Die Präparation der *inclusion bodies* wurde wie unter 3.2.5.2. beschrieben durchgeführt.

- 1: LMW-Marker
- 2: I1A-PLA<sub>2</sub>
- 3: I1V-PLA<sub>2</sub>
- 4: M-PLA<sub>2</sub>
- 5: 6xHis-PLA<sub>2</sub>

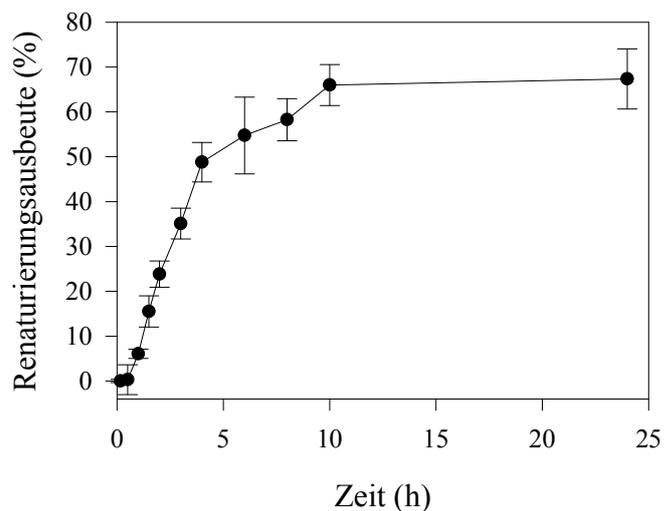
#### 4.4. Optimierung der Renaturierung von Phospholipase A<sub>2</sub>

Zur Renaturierung wurden die *inclusion bodies*, wie unter 3.2.5.3. beschrieben, solubilisiert. Hierbei stellte sich bei der Entfernung des Reduktionsmittels DTT durch Dialyse die eingesetzte GdnHCl-Konzentration im Dialysepuffer als kritischer Parameter heraus. Konzentrationen unterhalb von 4 M GdnHCl im Dialysepuffer führten zu einer drastischen Zunahme an Präzipitatbildung der solubilisierten *inclusion bodies*. Es wird vermutet, dass bei geringeren GdnHCl-Konzentrationen das reduzierte Protein nicht mehr durch das GdnHCl in Lösung gehalten wird und aggregiert. Als beste Methode zur Renaturierung erwies sich die schnelle Verdünnung des reduzierten, denaturierten Proteins in den Renaturierungspuffer. Versuche, die Proteinrenaturierung durch Dialyse gegen den Renaturierungspuffer durchzuführen, wie sie für mehrere sPLA<sub>2</sub>s aus der Literatur bekannt ist (Dudler et al. 1992; Kelley et al. 1992; Valentin et al. 1999b), um eine Verdünnung zu vermeiden, scheiterten, da hier eine starke Präzipitatbildung beobachtet wurde. Wahrscheinlich führt hier die langsame Entfernung des Denaturanz und somit die Inkubation des Proteins über einen längeren Zeitraum bei mittleren Denaturanzkonzentrationen zur Bildung von Faltungsintermediaten, die stark zur Aggregation neigen. Die Optimierung des Renaturierungsprozesses wurde mit dem Protein I1A-PLA<sub>2</sub> durchgeführt. Anschließend wurden die Renaturierungsausbeuten für die anderen PLA<sub>2</sub>-Varianten unter den für I1A-PLA<sub>2</sub> optimierten Faltungsbedingungen bestimmt. Nachfolgend aufgeführte Parameter wurden variiert:

- Inkubationszeit
- Temperatur
- pH-Wert
- PLA<sub>2</sub>-Konzentration
- niedermolekulare Zusätze (NaCl, L-Arginin, Tris)
- GSSG- und GSH-Konzentration
- Guandihydrochloridkonzentration

#### 4.4.1. Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Renaturierung

Als erster Parameter der oxidativen Faltung wurde die Kinetik der Renaturierung untersucht, um zu ermitteln, welche Inkubationszeit für die nachfolgenden Versuche am besten geeignet ist. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Die Renaturierungskinetik von I1A-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

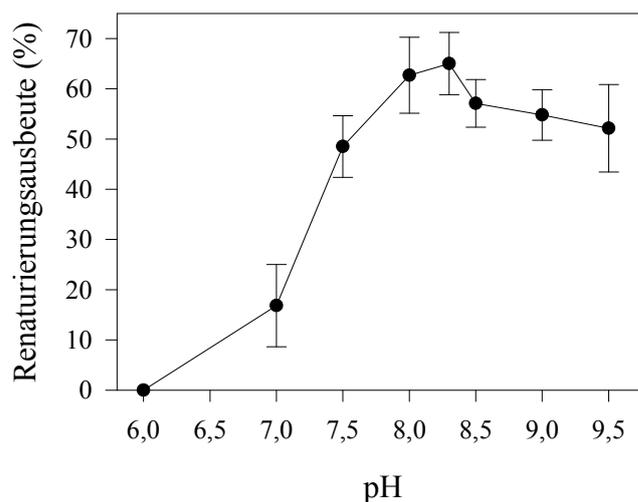
Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl, pH 8,3; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein bei 4°C. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Aus der Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die Renaturierung bereits nach 10 Stunden abgeschlossen ist. Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt.

Es ist bekannt, dass bei steigender Temperatur hydrophobe Wechselwirkungen eines Proteins zunehmen und somit Aggregationsreaktionen begünstigt werden, die zu verminderten Faltungsausbeuten führen können. Für die Renaturierung von I1A-PLA<sub>2</sub> konnte jedoch im untersuchten Temperaturbereich von 4°C bis 25°C keine Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Temperatur gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Für die Renaturierung verschiedener rekombinanter sPLA<sub>2</sub>s sind in der Literatur Rückfaltungstemperaturen von 4°C bis 25°C angegeben (Dudler et al. 1992; Liang et al. 1993; Chang et al. 1996). Die Temperatur ist somit im untersuchten Bereich bei der Rückfaltung von bv-PLA<sub>2</sub> kein kritischer Parameter.

#### 4.4.2. Einfluss des pH-Wertes auf die Renaturierung

Als nächster Parameter wurde die Abhängigkeit der Renaturierung vom pH-Wert des Renaturierungspuffers untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Die höchste Renaturierungsausbeute wurde bei einem pH-Wert von 8,3 erzielt. Dies steht in Übereinstimmung mit den aus der Literatur bekannten Daten zur Rückfaltung von rekombinanter bv-PLA<sub>2</sub> (Dudler et al. 1992). Bei einem pH-Wert von 6,0 fand keine Renaturierung statt. Da bei der Bildung von Disulfidbrücken das Thiolat-Anion die reaktive Species darstellt und die SH-Gruppe von Cystein einen pK<sub>a</sub>-Wert von 8,6 besitzt (Gilbert 1990), kann die Ausbildung von Disulfidbrücken nur im alkalischen Bereich erfolgen. Bei stärker alkalischem pH-Wert nimmt die Renaturierungsausbeute wieder leicht ab. Hier spielt wahrscheinlich die allgemeine Instabilität von Proteinen im stärker alkalischen pH-Bereich eine Rolle.



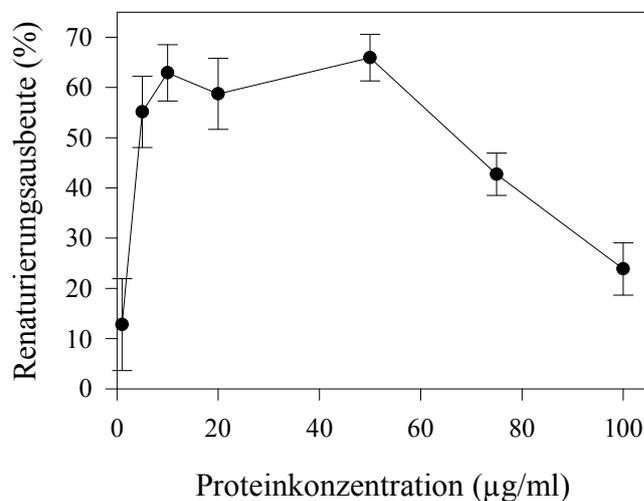
**Abbildung 19: Der Einfluss des pH-Wertes auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

#### 4.4.3. Einfluss der Proteinkonzentration auf die Renaturierung

Die Proteinkonzentration spielt eine entscheidende Rolle bei Renaturierungsprozessen, da die Rückfaltungsreaktion in Konkurrenz zur Aggregationsreaktion steht (De Bernardez Clark et al. 1999). Die Faltungsreaktion stellt eine Reaktion erster Ordnung dar, während die Aggregation stets eine Reaktion höherer Ordnung und demzufolge von der Proteinkonzentration abhängig ist. Als Konsequenz daraus erhöht sich mit steigender

Proteinkonzentration der Anteil an Protein, der aggregiert. Die Ergebnisse der Abhängigkeit der Renaturierung von der Proteinkonzentration sind in Abbildung 20 gezeigt. Die höchste Renaturierungsausbeute wurde bei einer Proteinkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  erhalten. Jedoch zeigt sich im Bereich von 10 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  eine ähnliche Renaturierungsausbeute. Bei Proteinkonzentrationen über 50  $\mu\text{g/ml}$  nimmt die Renaturierungsausbeute durch das vermehrte Auftreten von Aggregation drastisch ab. Bei einer sehr geringen Proteinkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  vermindert sich die Renaturierungsausbeute ebenfalls drastisch. Hier wird vermutet, dass durch Adsorptionsprozesse an Oberflächen die Proteinkonzentration im Ansatz verringert wird, wie dies für sPLA<sub>2</sub> bereits beobachtet wurde (Dudler et al. 1992).



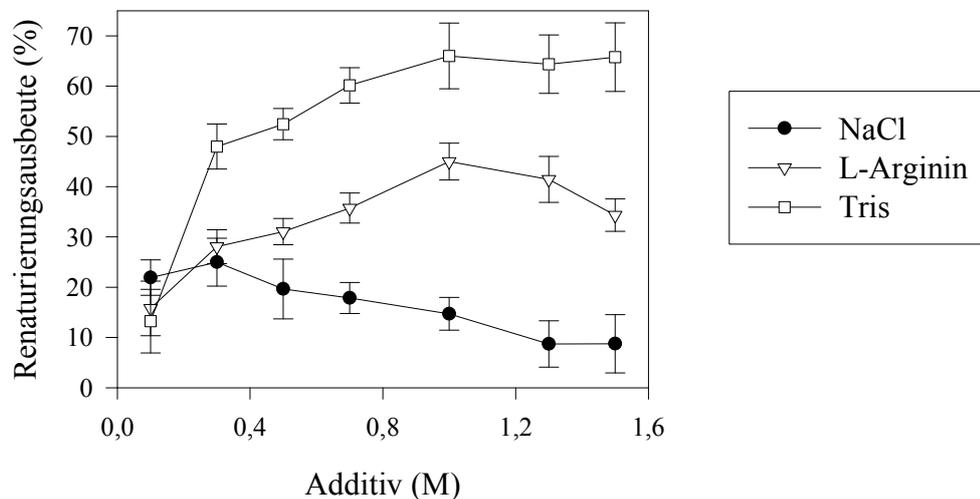
**Abbildung 20: Der Einfluss der Proteinkonzentration auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl, pH 8,3; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Bei der Methode der Renaturierung durch Verdünnung in den Renaturierungspuffer erfolgt eine starke Volumenzunahme (bis 1:100), die besonders bei der industriellen Anwendung von Rückfaltungsprozessen nachteilig ist. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, stellt die Variante der Pulsrenaturierung dar. Auf diese Renaturierungstechnik wird im Abschnitt 4.4.6. ausführlicher eingegangen.

#### 4.4.4. Einfluss niedermolekularer Zusätze auf die Renaturierung

Eine sehr effiziente Strategie zur Unterdrückung von Aggregationsreaktionen ist die Unterdrückung intermolekularer hydrophober Wechselwirkungen durch die Anwesenheit niedermolekularer Additive. Der Mechanismus der Wirkung von Additiven auf die Renaturierung ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Zum einen könnten sie die Löslichkeit und Stabilität von nativem oder denaturiertem Protein bzw. von Intermediaten beeinflussen. Andererseits könnte das Verhältnis von Faltung und Aggregatbildung beeinflusst werden (Lilie et al. 1998). Für die Renaturierung von PLA<sub>2</sub> wurde der Einfluß von NaCl, Tris/HCl und L-Arginin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Der Einfluss von Additiven auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

Die Renaturierung erfolgte in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,3; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein in Gegenwart unterschiedlicher Additivkonzentrationen bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich wird, zeigt die Zugabe von NaCl als Faltungsadditiv nur einen geringen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute. Bei 0,3 M NaCl ist die Renaturierungsausbeute mit ca. 23% am höchsten. Wird die NaCl-Konzentration weiter gesteigert, sinkt die Renaturierungsausbeute wieder ab.

Bei Zusatz von L-Arginin wurde die höchste Renaturierungsausbeute bei 1 M erreicht. Hier konnte die Ausbeute um ca. 30% gesteigert werden. Eine Erniedrigung der L-Argininkonzentration im Renaturierungsansatz führte zu einer drastischen Absenkung der Renaturierungsausbeute. Ebenso sank bei einer Erhöhung der L-Argininkonzentration auf über 1 M die Renaturierungsausbeute wieder. L-Arginin stellt ein weit verbreitetes Additiv

dar, das bei sehr vielen Proteinen wesentlich zur Erhöhung der Renaturierungsausbeute beiträgt. L-Arginin wirkt als Aggregationssuppressor, indem es die Löslichkeit partiell strukturierter Faltungsintermediate erhöht (De Bernardez Clark et al. 1999). Die Guanidinogruppe von L-Arginin besitzt einen gewissen destabilisierenden Einfluss, der dem geringer Konzentrationen von chaotropen Substanzen ähnlich ist.

Die Renaturierung in Anwesenheit von Tris zeigte die höchsten Renaturierungsausbeuten. Die Renaturierungsausbeute nimmt kontinuierlich bis zu einer Tris-Konzentration von 1 M zu. Hier konnte die Renaturierungsausbeute um ca. 50% gesteigert werden im Vergleich zur Renaturierung in Gegenwart von 0,1 M Tris bei ansonsten gleichen Bedingungen. Eine weitere Erhöhung der Tris-Konzentration führt nicht zu einer weiteren Steigerung der Renaturierungsausbeute.

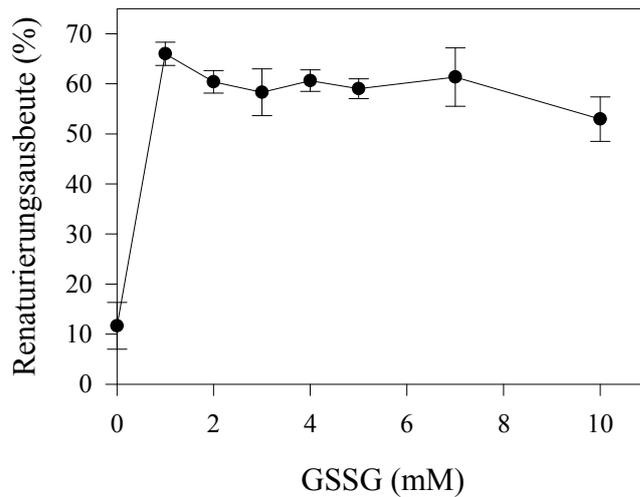
Eine Verbesserung der Renaturierungsausbeuten bei Anwesenheit hoher Tris-Konzentrationen durch seine löslichkeitsvermittelnde Eigenschaft wurde bereits für rh-tPA, Antikörper Fab-Fragmente und G-CSF beschrieben (Ambrosius und Rudolph 1997).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei Verwendung von Additiven der Einsatz von 1 M Tris für die Renaturierung von IIA-PLA<sub>2</sub> die höchsten Ausbeuten liefert. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich in der Arbeitsgruppe für eine rekombinant hergestellte PLA<sub>2</sub> aus *Arabidopsis thaliana* (Kristin Dathe, persönliche Mitteilung) gefunden.

#### 4.4.5. Einfluss der GSSG- und GSH-Konzentration auf die Renaturierung

Um die korrekte Disulfidverbrückung bei der Renaturierung disulfidbrückenhaltiger Proteine wie sPLA<sub>2</sub> zu erreichen, muss der Renaturierungsansatz ein Reduktionsmittel (GSH) und ein Oxidationsmittel (GSSG) für das *Redox-Shuffling* enthalten. Das Verhältnis von GSH/GSSG, den meistbenutzten Shufflingpartnern, zur optimalen Renaturierung ist vom eingesetzten Protein abhängig (Panda 2003).

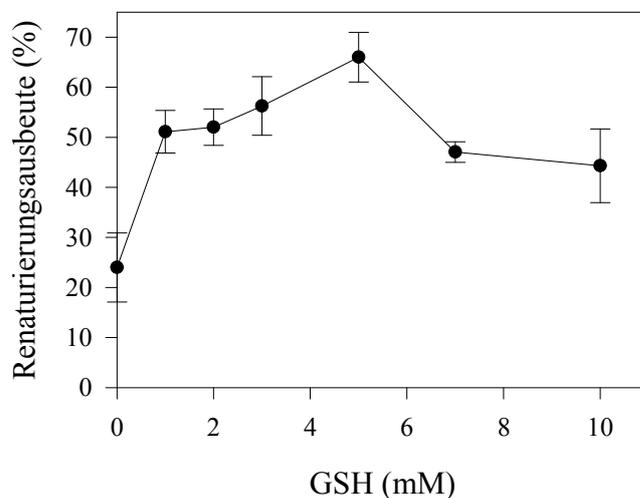
Im ersten Schritt wurde die Konzentration an GSSG im Renaturierungsansatz variiert und die GSH-Konzentration konstant bei 5 mM belassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Renaturierungsausbeute ohne GSSG-Zusatz ist sehr gering, da hier nur eine ineffiziente Luftoxidation erfolgen kann. Bei Zugabe von 1 mM GSSG wird die Renaturierungsausbeute drastisch gesteigert. Bei einer weiteren Erhöhung der GSSG-Konzentration bis zu 10 mM nimmt die Renaturierungsausbeute wieder leicht ab.



**Abbildung 22: Der Einfluss der GSSG-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl, pH 8,3; 5 mM GSH; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Im zweiten Schritt wurde die GSH-Konzentration variiert und die GSSG-Konzentration konstant bei 1 mM eingesetzt. Die erhaltenen Resultate sind in Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 23: Der Einfluss der GSH-Konzentration auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

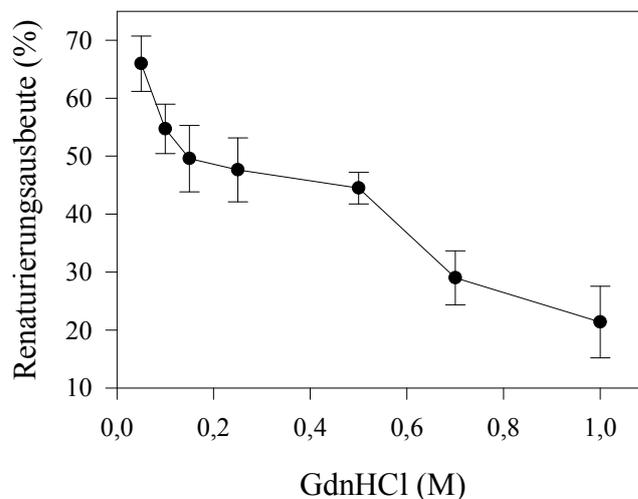
Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl, pH 8,3; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Bereits ohne den Zusatz von GSH findet eine Renaturierung von PLA<sub>2</sub> statt. Die in reduzierter PLA<sub>2</sub> vorhandene Thiolatkonzentration war jedoch für eine optimale Renaturierung zu gering. Durch Zusatz von GSH konnte die Renaturierungsausbeute gesteigert werden. Bei einer

Konzentration von 5 mM konnte die höchste Ausbeute erreicht werden. Bei noch höheren GSH-Konzentrationen nahm die Renaturierungsausbeute wieder ab.

#### 4.4.6. Einfluss von GdnHCl auf die Renaturierung

Die GdnHCl-Konzentration spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Renaturierung. Zum einen wird bei der Zugabe des Proteins zum Renaturierungspuffer GdnHCl in den Ansatz eingebracht. Andererseits wird oft die Methode der Pulsrenaturierung angewendet, um die Volumenvergrößerung zu minimieren. Dabei wird nach Beendigung der Renaturierung ein neuer Puls an denaturiertem und reduziertem Protein dem Renaturierungsansatz zugegeben. Hierbei wird jedoch mit jedem Puls die GdnHCl-Konzentration im Renaturierungsansatz erhöht. Bei Erreichen einer kritischen Konzentration kann die Renaturierungsausbeute drastisch sinken. Deshalb muss in Vorversuchen die maximal mögliche GdnHCl-Konzentration ermittelt werden. Die Ergebnisse der Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der GdnHCl-Konzentration sind in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Der Einfluss des Zusatzes von GdnHCl zum Renaturierungsansatz auf die Renaturierungsausbeute von IIA-PLA<sub>2</sub> im Renaturierungspuffer.**

Die Renaturierung erfolgte in 1 M Tris/HCl, pH 8,3; 5 mM GSH; 1 mM GSSG; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA mit 50 µg/ml Protein in Gegenwart unterschiedlicher GdnHCl-Konzentrationen bei 4°C für 24 h. Die Renaturierungsausbeute wurde wie unter 3.2.5.4. beschrieben bestimmt. Die gezeigten Messdaten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass schon bei geringen GdnHCl-Konzentrationen eine erhebliche Abnahme der Renaturierungsausbeute erfolgt. Anhand der erhaltenen Daten wurde auf Versuche zur Pulsrenaturierung verzichtet.

#### 4.4.7. Zusammenfassung der Renaturierungsversuche

Die Rückfaltung von rekombinanter bv-PLA<sub>2</sub> ist nach ca. 10 Stunden abgeschlossen. Eine Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Inkubationstemperatur wurde im untersuchten Bereich (4-25°C) nicht gefunden. Voraussetzung für die erfolgreiche Renaturierung ist die Anwesenheit von 1 M Tris, 5 mM GSH und 1 mM GSSG. Die Proteinkonzentration im Faltungsansatz sollte im Bereich von 10 bis 50 µg/ml Protein liegen. Der optimale pH-Wert für die Rückfaltung liegt bei pH 8,3. Während der Optimierungsversuche zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der GdnHCl-Konzentration. Schon bei niedrigen Konzentrationen wird die Renaturierungsausbeute reduziert.

Die Renaturierungsoptimierung erfolgte mit I1A-PLA<sub>2</sub>. Die Renaturierungsausbeuten aller PLA<sub>2</sub>-Varianten unter den für I1A-PLA<sub>2</sub> ermittelten Bedingungen (3.2.5.4.) sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Die Renaturierungsausbeuten der verschiedenen rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten.**

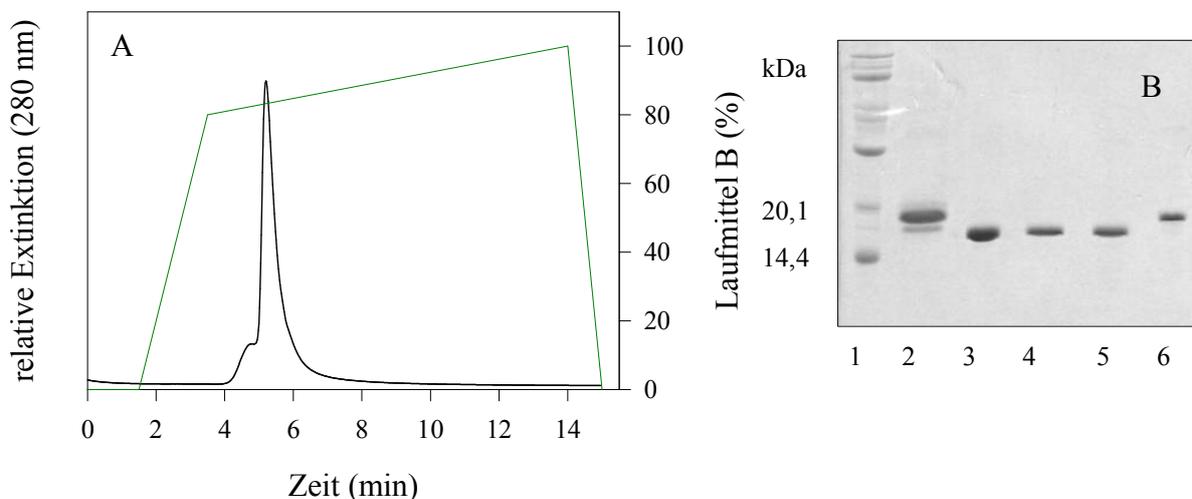
Die Renaturierung der rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten erfolgte unter den für I1A-PLA<sub>2</sub> ermittelten optimalen Renaturierungsbedingungen (3.2.5.4.). Die Bestimmung der Renaturierungsausbeuten erfolgte wie unter 3.2.5.4. beschrieben.

PLA <sub>2</sub> -Variante	Renaturierungsausbeute (%)
I1A-PLA <sub>2</sub>	66 ± 8
I1V-PLA <sub>2</sub>	69 ± 5
M-PLA <sub>2</sub>	65 ± 6
6xHis-PLA <sub>2</sub>	13 ± 4

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, sind die Renaturierungsausbeuten für I1A-PLA<sub>2</sub>, I1V-PLA<sub>2</sub> und M-PLA<sub>2</sub> sehr ähnlich. Demgegenüber zeigt die mit einem His-Tag versehene PLA<sub>2</sub>-Variante eine stark reduzierte Renaturierungsausbeute. Hier war eine starke Aggregatbildung zu beobachten. Es wird vermutet, dass der N-terminale His-Tag die Rückfaltung negativ beeinflusst und der N-Terminus eine wichtige Rolle bei der Faltung des Proteins besitzt.

#### 4.5. Reinigung rekombinanter Phospholipase A<sub>2</sub>

Da die unter 4.3. erhaltenen *inclusion bodies* für alle Enzymvarianten schon eine hohe Reinheit aufwiesen (Abbildung 17), gelang die Feinreinigung in einem Schritt. Aufgrund des hohen isoelektrischen Punkts von bv-PLA<sub>2</sub> (pI=10,5±1,0, Shipolini 1971), war die Reinigung durch Kationenaustauschchromatographie (Mono-S-Säule, 3.2.5.6.) möglich. Abbildung 25A zeigt das Elutionsprofil von rekombinanter I1A-PLA<sub>2</sub>. In Abbildung 25B sind die Ergebnisse der SDS-PAGE für die reinen PLA<sub>2</sub>-Varianten im Vergleich mit der kommerziell erhältlichen glykosylierten bv-PLA<sub>2</sub> demonstriert.



**Abbildung 25: Reinigung von rekombinanter PLA<sub>2</sub> nach der Renaturierung aus *inclusion bodies*.**

**A:** Elutionsprofil der Reinigung von I1A-PLA<sub>2</sub> an einer Mono-S-Säule (3.2.5.6.); **B:** SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten 1: LMW-Marker 2: bv-PLA<sub>2</sub> 3: I1A-PLA<sub>2</sub> 4: I1V-PLA<sub>2</sub> 5: M-PLA<sub>2</sub> 6: 6xHis-PLA<sub>2</sub>

Die rekombinanten PLA<sub>2</sub>s konnten alle bei ca. 90% Laufmittel B (3.2.5.5.) eluiert werden. Bei Rechromatographie der gereinigten Proteine zeigte sich für alle PLA<sub>2</sub>-Varianten nur ein diskreter Elutionspeak (nicht gezeigt). Weiterhin wurde die Reinheit der erhaltenen Proteine mittels isoelektrischer Fokussierung überprüft. Auch hier wurde für jedes Protein nur eine diskrete Proteinbande im Gel erhalten (nicht gezeigt).

Nach der Reinigung wurden die in Tabelle 7 angegebenen Mengen an rekombinanter PLA<sub>2</sub> erhalten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Mengen an rekombinanter PLA<sub>2</sub>, mit Ausnahme von 6x-His-PLA<sub>2</sub>, sind den in der Literatur angegebenen Mengen für eine rekombinante PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift vergleichbar (8-9 mg/Liter Ausgangskultur) (Dudler et al. 1992). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen beruhen die von Dudler et al. angegebenen Proteinausbeuten auf der zweifach wiederholten Rückfaltung des präzipitierten

Proteins. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren ist somit dem bisher bekannten Verfahren deutlich überlegen.

**Tabelle 7: Proteinausbeuten an rekombinanter PLA<sub>2</sub> nach der Reinigung.**

Die Gewinnung der rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Formen erfolgte wie im Kapitel 3. Materialien und Methoden beschrieben (Abschnitt 3.2.5.1. bis 3.2.5.6.). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der reinen Proteine wurde mit dem BCA-Test durchgeführt (3.2.7.2.).

PLA <sub>2</sub> -Variante	Ausbeute (mg/Liter Expressionskultur)
I1A-PLA <sub>2</sub>	10 ± 2
I1V-PLA <sub>2</sub>	10 ± 2
M-PLA <sub>2</sub>	11 ± 2
6xHis-PLA <sub>2</sub>	4 ± 1

#### 4.6. Charakterisierung der rekombinanten Phospholipase A<sub>2</sub>-Enzyme

Die gereinigten rekombinant erzeugten PLA<sub>2</sub>-Varianten sowie die kommerziell erhältliche bv-PLA<sub>2</sub> bildeten die Grundlage für eine weiterführende biochemische Charakterisierung des Enzyms.

##### 4.6.1. N-terminale Sequenzierung und massenspektrometrische Analyse

Zur Überprüfung der Identität der rekombinant erhaltenen PLA<sub>2</sub>-Varianten wurde eine N-terminale Aminosäurebestimmung durch Edman-Abbau und eine massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmassen vorgenommen (Tabelle 8).

**Tabelle 8: N-terminale Aminosäuresequenz und Molekülmassen der rekombinanten PLA<sub>2</sub>s.**

Die Bestimmung der N-terminalen Sequenzen und der Molekülmassen erfolgte wie unter 3.2.14. und 3.2.15. beschrieben.

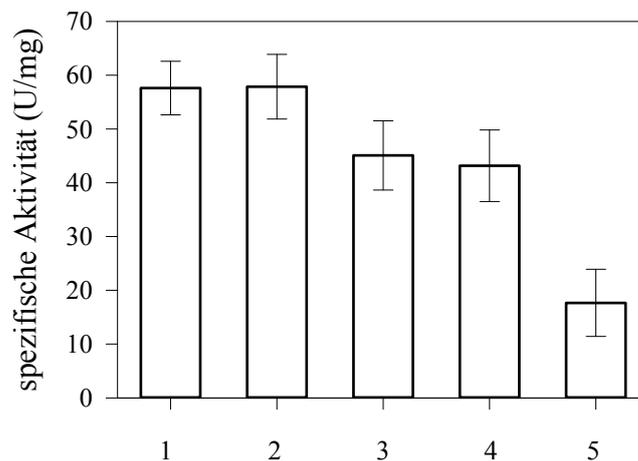
PLA <sub>2</sub> -Variante	bestimmte N-terminale Sequenz	berechnete Molekülmasse (Da)	bestimmte Molekülmasse (Da)
I1A-PLA <sub>2</sub>	AITP	15207	15202
I1V-PLA <sub>2</sub>	MVITP ca. 80%	15366	15360
	VITP ca. 20%	15235	15228
M-PLA <sub>2</sub>	MII >95%	15380	15360
	II <5%	15249	-
6xHis-PLA <sub>2</sub>	-	17412	17409

Für 6xHis-PLA<sub>2</sub> wurde auf die N-terminale Sequenzierung verzichtet. Die N-terminale Sequenzierung sowie das Massenspektrum zeigen für I1A-PLA<sub>2</sub> die vollständige

Eliminierung des Startmethionins. Im Fall von I1V-PLA<sub>2</sub> wurde eine Abspaltung des Startmethionins nur zu ca. 20% gefunden. M-PLA<sub>2</sub> zeigt zu über 95% den Erhalt des Startmethionins. Hier konnte die Sequenz ohne Startmethionin bei der massenspektrometrischen Analyse nicht detektiert werden. Sowohl die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung als auch die ermittelten Massenspektren zeigen, dass die rekombinant erhaltenen PLA<sub>2</sub>-Varianten in intakter Form vorliegen und nicht während der Aufarbeitung durch Proteasen modifiziert wurden.

#### 4.6.2. Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivität

Der Vergleich der verschiedenen PLA<sub>2</sub>-Varianten hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität erfolgte nach der unter 3.2.11.2. beschriebenen Methode.



**Abbildung 26: Vergleich der spezifischen Hydrolyseaktivität der rekombinant erzeugten PLA<sub>2</sub>s mit der aus dem Bienengift isolierten PLA<sub>2</sub>.**

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit dem Substrat 1,2-Diheptanoylthio-*sn*-glycero-3-phosphocholin wie unter 3.2.11.2. angegeben. 1: bv-PLA<sub>2</sub>, 2: I1A-PLA<sub>2</sub>, 3: I1V-PLA<sub>2</sub>, 4: M-PLA<sub>2</sub>, 5: 6xHis-PLA<sub>2</sub>. Die gezeigten Messdaten wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt.

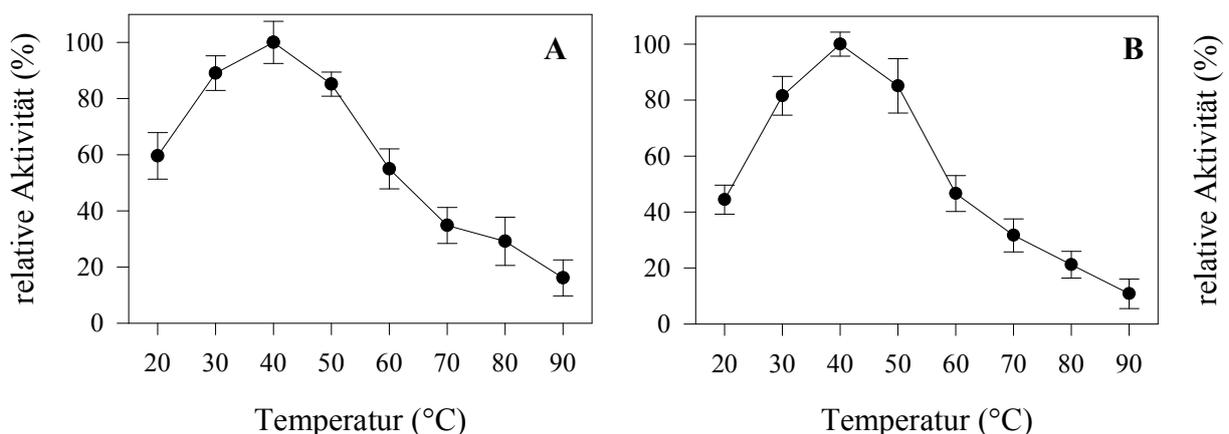
Beim Vergleich der ermittelten Aktivitätsdaten von I1A-PLA<sub>2</sub> und bv-PLA<sub>2</sub> (Abbildung 26) zeigen sich keine Unterschiede in der Aktivität. Das bestätigt, dass die im aus dem Bienengift isolierten Enzym vorhandene Glykosylierung am Asparagin 13 für die Aktivität nicht essentiell ist. Für die Varianten I1V-PLA<sub>2</sub> und M-PLA<sub>2</sub> bezogen auf bv-PLA<sub>2</sub> wurde eine verringerte Aktivität gefunden. Dies könnte auf das Vorhandensein des zusätzlichen Methionins am N-Terminus (4.6.1.) zurückgeführt werden, das in beiden Fällen zu einem großen Teil noch vorhanden ist. Der Einfluss des zusätzlichen Methionins ist bei diesen sPLA<sub>2</sub>s jedoch verglichen mit Literaturdaten anderer sPLA<sub>2</sub>s sehr gering. So wurde für sPLA<sub>2</sub>s der Gruppe-II gefunden, dass das Vorhandensein des Startmethionins zu einem

drastischen Aktivitätsverlust führt (Lathrop et al. 1992; Othman et al. 1996). Beim Austausch der N-terminalen Aminosäure durch Alanin, Serin oder Glycin und somit Entfernung des Methionins erlangten die Enzyme ihre volle katalytische Aktivität wieder. Ebenso führte die Anwesenheit des Startmethionins bei der sPLA<sub>2</sub> aus dem Natterngift (Gruppe-I) zu einer erheblichen Aktivitätsabnahme. Bei Entfernung des Methionins durch Behandlung des Enzyms mit einer Aminopeptidase wurde eine wildtypähnliche Aktivität erreicht (Chang et al. 1996). Wahrscheinlich sind strukturelle Unterschiede der verschiedenen PLA<sub>2</sub>-Gruppen im N-terminalen Bereich für die unterschiedlichen Aktivitätsbefunde verantwortlich.

Erwartungsgemäß zeigt die 6xHis-PLA<sub>2</sub>-Variante im Vergleich zu bv-PLA<sub>2</sub> eine stark reduzierte Aktivität. Durch die Anwesenheit des N-terminalen His-Tags und somit Verlängerung des Proteins um 20 Aminosäuren, wird wahrscheinlich die Bindung des Enzyms an Phospholipidvesikel noch stärker ungünstig als bei Anwesenheit eines Methionins beeinträchtigt. Auf eine Abspaltung des His-Tags durch Thrombin wurde verzichtet, weil die anderen drei PLA<sub>2</sub>-Varianten eine sehr hohe spezifische Aktivität aufwiesen und für weiterführende Versuche favorisiert wurden.

#### 4.6.3. Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von Phospholipase A<sub>2</sub>

Die Bestimmung des Temperaturoptimums der Aktivität von bv-PLA<sub>2</sub> im Vergleich zur rekombinant erzeugten I1A-PLA<sub>2</sub> wurde wie unter 3.2.11.1. angegeben bestimmt und ist in Abbildung 27 grafisch dargestellt.



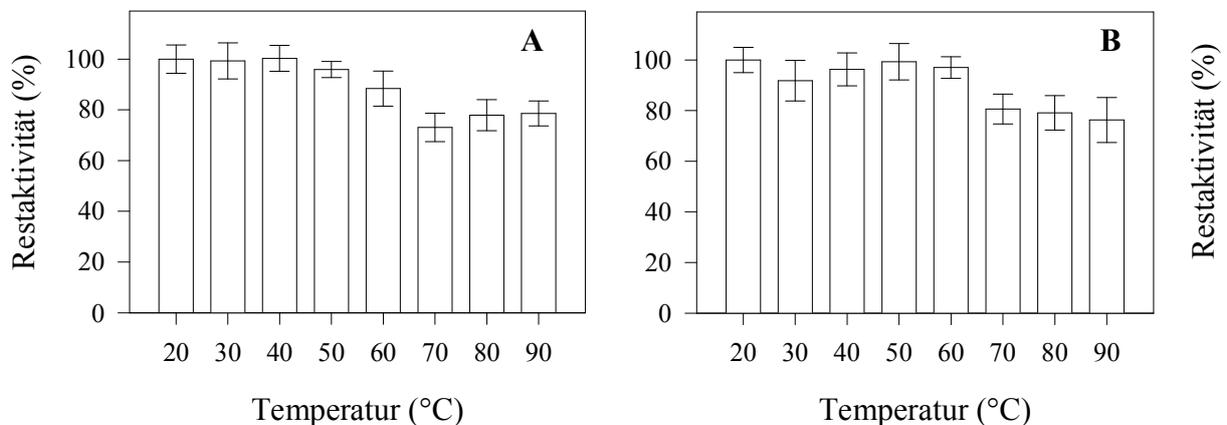
**Abbildung 27: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität von PLA<sub>2</sub>.**

A: bv-PLA<sub>2</sub>; B: I1A-PLA<sub>2</sub>; Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit dem Substrat DOPC wie unter 3.2.11.1. angegeben. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Die maximale Aktivität wurde für beide Enzyme bei 40°C erreicht. Es sind jedoch auch bei 90°C noch Restaktivitäten vorhanden. Vergleicht man die glykosylierte bv-PLA<sub>2</sub> mit der rekombinant erzeugten I1A-PLA<sub>2</sub> so zeigt sich für beide Enzyme ein ähnlicher Kurvenverlauf bezüglich des Aktivitätsmaximums. Daraus wird deutlich, dass der Glykosylierungsrest bei bv-PLA<sub>2</sub> auf die Aktivität keinen Einfluss hat. Bei einem Vergleich der erhaltenen Resultate mit aus der Literatur bekannten Angaben zum Aktivitätsmaximum von bv-PLA<sub>2</sub> ergeben sich Differenzen. So wurden hier für das Aktivitätsoptimum mit dem Substrat DPPC Temperaturen von 50°C und 60°C (Munjal und Elliott 1972; Nair et al. 1976) bestimmt. Bei Verwendung von DCPC und Lecithin aus Eigelb wurden als Temperaturoptimum 60°C und 65°C (Nair et al. 1976) ermittelt.

#### 4.6.4. Temperaturstabilität von Phospholipase A<sub>2</sub>

Für die Bestimmung der Temperaturstabilität wurden die Enzyme für 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und anschließend unter Standardbedingungen (3.2.11.1.) die Restaktivität bestimmt.



**Abbildung 28: Temperaturstabilität von PLA<sub>2</sub>.**

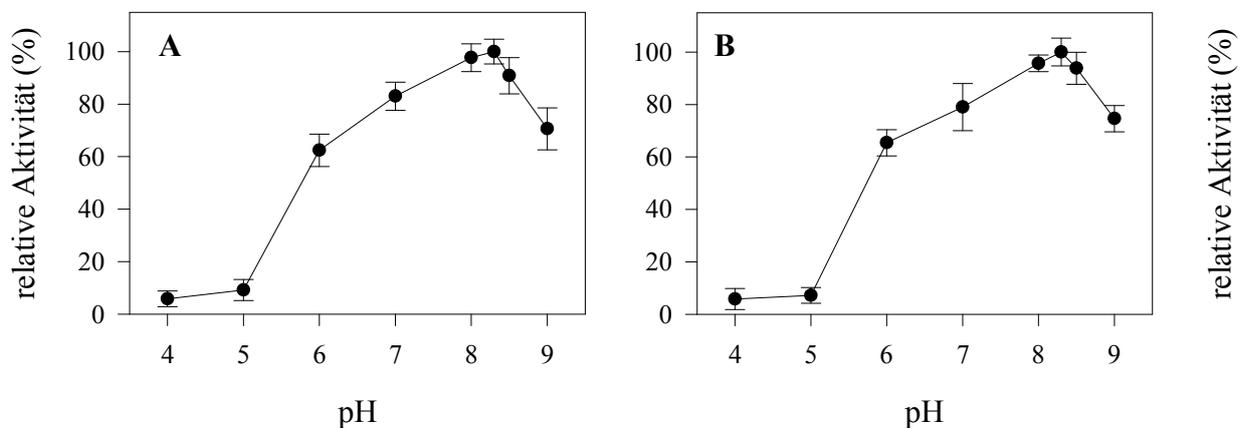
A: bv-PLA<sub>2</sub>; B: I1A-PLA<sub>2</sub>; Die Restaktivitäten wurden wie unter 3.2.11.1. aufgeführt nach 30-minütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen mit dem Substrat DOPC unter Standardbedingungen bestimmt. Die Aktivität bei 30-minütiger Inkubation bei 20°C wurde als 100% gesetzt. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

Aus Abbildung 28 wird ersichtlich, dass bv-PLA<sub>2</sub> und I1A-PLA<sub>2</sub> ein ähnliches Verhalten bezüglich ihrer Temperaturstabilität zeigen. Beide Enzyme weisen eine hohe Temperaturstabilität auf. Bei einer Inkubation bis zu 60°C zeigt sich für beide Enzyme kaum eine Abnahme an Aktivität. Selbst bei Inkubation bei 90°C sind nach halbstündiger Inkubation noch Restaktivitäten von ca. 80% vorhanden. Ähnlich hohe Restaktivitäten nach

Inkubation bei verschiedenen Temperaturen wurden bereits in der Literatur beschrieben, wobei hier als Ursache für die Temperaturstabilität die Reversibilität der thermischen Denaturierung von bv-PLA<sub>2</sub> diskutiert wird (Nair et al. 1976).

#### 4.6.5. Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität von Phospholipase A<sub>2</sub>

Die Bestimmung des pH-Optimums von bv-PLA<sub>2</sub> und I1A-PLA<sub>2</sub> erfolgte wie unter 3.2.11.1. angegeben im pH-Bereich von 4 bis 9. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich wird, zeigen bv-PLA<sub>2</sub> und die rekombinant hergestellte Variante I1A-PLA<sub>2</sub> einen ähnlichen Kurvenverlauf. Die Aktivität steigt bei beiden Enzymen im pH-Bereich von 4 bis 8,3 an. Bei pH 8,3 befindet sich das Optimum der Aktivität. Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes sinkt die Aktivität wieder ab. sPLA<sub>2</sub>s besitzen generell ihr pH-Optimum im alkalischen pH-Bereich. Bei Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Aktivität von bv-PLA<sub>2</sub> wurde dieses bisher im Bereich von pH 7 bis 8,3 ermittelt (Neumann und Habermann, 1954; Habermann 1957; Shipolini et al. 1971), was mit den in der Arbeit erhaltenen Daten übereinstimmt.



**Abbildung 29: pH-Einfluss auf die Aktivität von PLA<sub>2</sub>.**

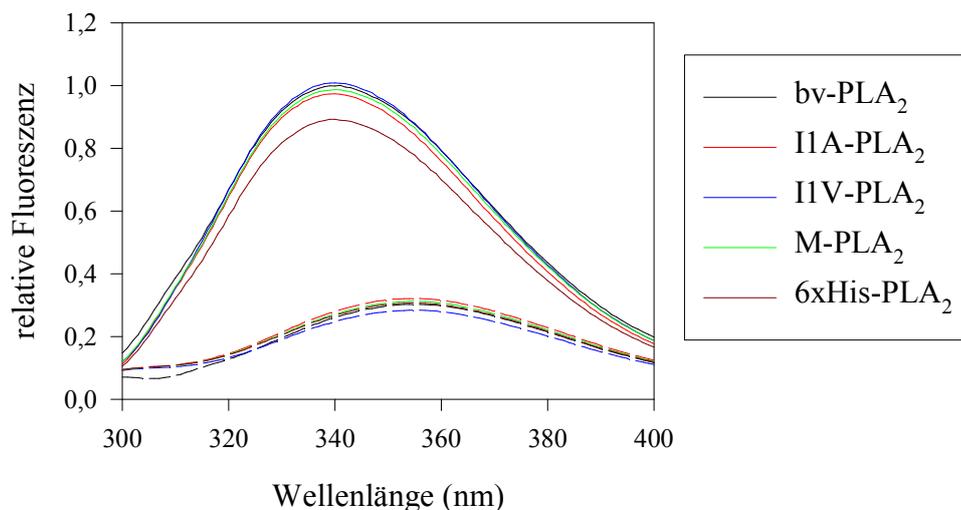
A: bv-PLA<sub>2</sub>; B: I1A-PLA<sub>2</sub>; Die Aktivität wurde bei verschiedenen pH-Werten wie unter 3.2.11.1. aufgeführt mit dem Substrat DOPC bestimmt. Die gezeigten Messdaten wurden aus zwei unabhängigen Messungen ermittelt.

#### 4.6.6. Spektrale Eigenschaften von Phospholipase A<sub>2</sub>

Das bv-PLA<sub>2</sub>-Protein enthält fünf Phenylalanin-, acht Tyrosin- und zwei Tryptophanreste, die die spektralen Eigenschaften des Enzyms bestimmen.

##### 4.6.6.1. Fluoreszenzemissionsspektren

Die Aufnahme von Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte wie unter 3.2.13. beschrieben. Die erhaltenen Spektren der rekombinanten Enzyme wurden auf das Spektrum von bv-PLA<sub>2</sub> im nativen Zustand im Emissionsmaximum normiert. In Abbildung 30 sind die Fluoreszenzemissionsspektren von PLA<sub>2</sub> im nativen Zustand und unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdnHCl) dargestellt. Die Fluoreszenz von Phenylalaninresten spielt aufgrund ihrer geringen Sensitivität und des Energietransfers zu Tyrosin- und Tryptophanresten keine Rolle (Schmid 1997).



**Abbildung 30:** Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren von bv-PLA<sub>2</sub> und rekombinanter PLA<sub>2</sub> in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und in Gegenwart (gestrichelte Linie) von 6 M GdnHCl.

Alle Messungen wurden wie unter 3.2.13. beschrieben mit 40 µg/ml Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C und bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm durchgeführt.

Die Fluoreszenzemissionsspektren von bv-PLA<sub>2</sub> und den rekombinanten PLA<sub>2</sub>s sind sich sowohl im nativen als auch im denaturierten Zustand bezüglich der Lage des Maximums und der Signalintensität im Maximum relativ ähnlich. Die acht Tyrosinreste sind über das Molekül verteilt. Von den zwei Tryptophanen bei bv-PLA<sub>2</sub> befindet sich eines in der Nähe des N-Terminus und das andere nahe dem C-Terminus. Die Fluoreszenzemissionsspektren der nativen Moleküle zeigen, dass sich die Tryptophanreste in einer moderat hydrophoben

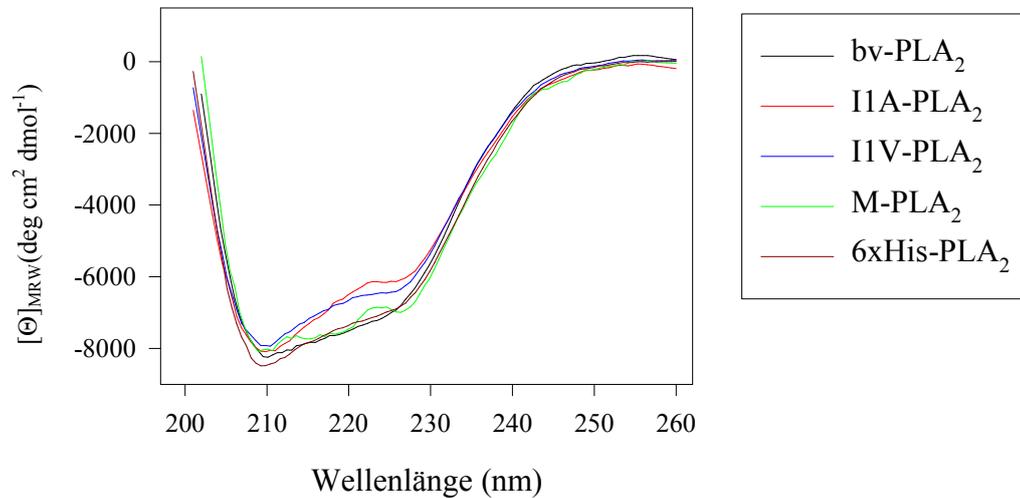
Umgebung befinden (Eftink und Ghiron 1976; Ahmed et al. 1996). Nach Anregung bei 278 nm zeigen die Nativspektren bei 341 nm ein Maximum, wie es auch bereits aus der Literatur für bv-PLA<sub>2</sub> beschrieben wurde (Ahmed et al. 1996). Das Intensitätsmaximum wird durch die Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Eine separate Tyrosinfluoreszenz ist nicht sichtbar, was auf einen strahlungslosen Energietransfer von Tyrosin zu Tryptophan zurückzuführen ist. Bei Denaturierung der Proteine erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums, verursacht durch den zunehmenden Kontakt der Tryptophanreste mit dem polaren Lösungsmittel. Bei der Denaturierung erfolgt außerdem eine starke Abnahme der Signalintensität, die durch die Einschränkung des Resonanzenergietransfers von Tyrosinen zu Tryptophanen hervorgerufen wird. Aus den Spektren wird ersichtlich, dass die Modifikationen am N-Terminus der rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Formen keine gravierenden Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften nach sich ziehen.

#### 4.6.6.2. CD-Spektren

CD-Spektren im Fern-UV-Bereich geben Auskunft über die Sekundärstruktur von Proteinen, da hier die  $\pi$ -Elektronen der Peptidbindungen des Rückgrates des Proteins als Chromophor wirken, wohingegen bei CD-Spektren im Nah-UV-Bereich die aromatischen Seitenketten von Tyrosinen und Tryptophanen als Chromophor dienen. Deshalb werden hier Aussagen über die Tertiärstruktur eines Proteins möglich. Versuche, CD-Spektren im Nah-UV-Bereich zu akkumulieren und zu interpretieren, scheiterten, da hier die Messungen keine eindeutigen Daten lieferten. Um ein eindeutiges Signal im Nah-UV-Bereich zu erhalten, müssen die chromophoren Gruppen des Proteins sich in einer asymmetrischen Umgebung befinden. Es wird daher vermutet, dass die Tryptophane von bv-PLA<sub>2</sub> sich nicht in einer asymmetrischen Umgebung innerhalb des Proteins befinden und demzufolge kein Signal liefern können. Es sind bisher auch noch keine Nah-UV-CD-Spektren von bv-PLA<sub>2</sub> publiziert.

Die CD-Spektren im Fern-UV-Bereich sind in Abbildung 31 dargestellt. Während geringe Abweichungen in der Intensität des CD-Signals oft auf eine fehlerbehaftete Proteinbestimmung zurückgeführt werden können, zeigen Veränderungen der Form des Spektrums sowie starke Änderungen der Signalintensität lokale Störungen von Wechselwirkungen im Protein an. Das aufgenommene Spektrum von bv-PLA<sub>2</sub> ist mit dem aus der Literatur bekannten Spektrum vergleichbar und zeigt bei ca. 208 nm ein Minimum, was durch den  $\alpha$ -helicalen Strukturanteil hervorgerufen wird (Ahmed et al. 1996). Die Fern-UV-Spektren der rekombinanten Varianten zeigen eine ähnliche Signalintensität, jedoch

scheint die Form des Spektrums für I1A-PLA<sub>2</sub> und I1V-PLA<sub>2</sub> im Bereich um 215 nm bis 225 nm leicht abweichend. Eventuell bestehen hier geringe Störungen der lokalen Struktur, die jedoch nicht die Bildung einer aktiven und somit nativen Konformation behindern (4.6.2.).



**Abbildung 31: Vergleich der CD-Spektren von bv-PLA<sub>2</sub> und rekombinanter PLA<sub>2</sub>.**

Die Aufnahme der CD-Spektren im fernen UV-Bereich erfolgte wie unter 3.2.12. beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C in einer 0,1 mm Quarzglasküvette.

#### 4.6.7. Thermodynamische Stabilität von Phospholipase A<sub>2</sub>

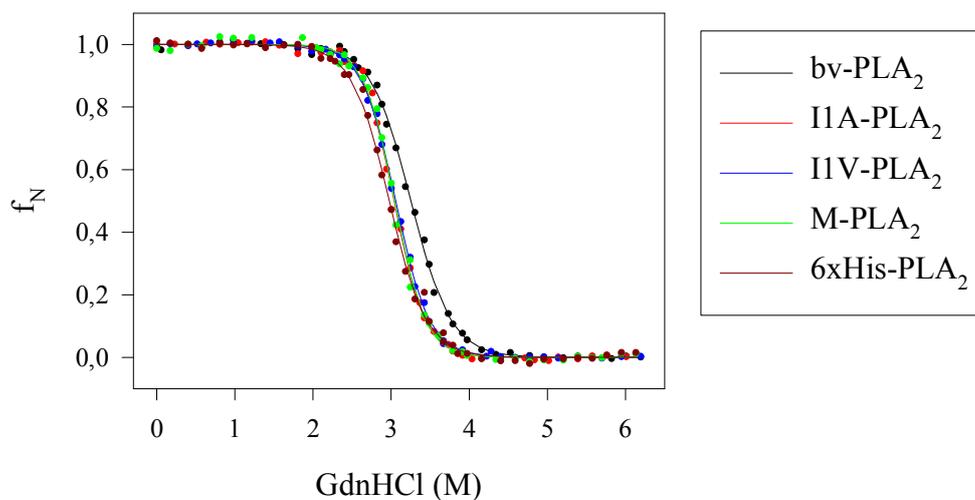
Die Stabilität der rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten und der glykosylierten bv-PLA<sub>2</sub> wurden durch die Aufnahme von GdnHCl-induzierten Entfaltungskurven mittels Fluoreszenzspektroskopie (3.2.13) bestimmt. Wie in Abbildung 32 und Tabelle 9 dargestellt, zeigen alle rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Formen einen kooperativen Konformationsübergang, der einen Zweizustandsübergang widerspiegelt, und bei gleicher Kooperativität keine Stabilitätsunterschiede innerhalb der ermittelten Fehlerbreiten zeigt. Die glykosylierte bv-PLA<sub>2</sub> unterscheidet sich nur wenig von den rekombinanten unglykosylierten Formen.

**Tabelle 9: Parameter der thermodynamischen Stabilität der verschiedenen PLA<sub>2</sub>-Formen.**

Die Parameter der thermodynamischen Stabilität wurden aus den GdnHCl-induzierten Übergangskurven wie unter 3.2.13. angegeben ermittelt.

Parameter	bv-PLA <sub>2</sub>	I1A-PLA <sub>2</sub>	I1V-PLA <sub>2</sub>	M-PLA <sub>2</sub>	6xHis-PLA <sub>2</sub>
$\Delta G_0$ (kJ/mol)	$31,4 \pm 3,6$	$37,6 \pm 5,1$	$35,0 \pm 3,0$	$38,2 \pm 6,0$	$31,0 \pm 4,8$
$m$ (kJ/(mol*M))	$9,7 \pm 0,4$	$12,4 \pm 0,6$	$11,5 \pm 0,3$	$12,6 \pm 0,6$	$10,4 \pm 0,5$
$[D]_{1/2}$ (M)	$3,25 \pm 0,12$	$3,03 \pm 0,17$	$3,05 \pm 0,10$	$3,04 \pm 0,20$	$2,97 \pm 0,16$

Aus den erhaltenen Daten wurden die Freien Enthalpien der Entfaltung sowie über das lineare Extrapolationsmodell (Pace et al. 1989) ( $\Delta G = \Delta G_0 - m[D]$ ) die freie Standardenthalpie der Entfaltung  $\Delta G_0$ , und der Faktor  $m$ , der ein Maß für die Kooperativität des Entfaltungsvorgangs ist, ermittelt (Santoro und Bolen 1988). Daraus konnte dann die Denaturanzkonzentration, bei der 50% des Proteins denaturiert vorliegen ( $[D]_{1/2}$ ), berechnet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Modifikationen am N-Terminus bei den rekombinanten Enzymen keinen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität des Enzyms haben. Weiterhin belegen die Ergebnisse, dass der Kohlenhydratanteil bei bv-PLA<sub>2</sub>, der mit dem Protein über den Asparaginrest 13 verknüpft ist, nicht essentiell für die Stabilität ist. Bei Vergleich der ermittelten thermodynamischen Stabilität von bv-PLA<sub>2</sub> mit aus der Literatur bekannten Angaben zeigen sich Unterschiede. So wurde hier eine freie Standardenthalpie von  $9,5 \pm 1,3$  kJ/mol bestimmt und ein Faktor  $m$  von  $3,0 \pm 0,4$  kJ/(mol\*M) (Annand et al. 1996), wobei der ermittelte  $[D]_{1/2}$ -Wert von 3,14 M mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert von 3,25 M gut übereinstimmt.



**Abbildung 32: Vergleich der GdnHCl-induzierten Entfaltungskurven von bv-PLA<sub>2</sub> und den rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Varianten.**

Die Datenaufnahme erfolgte mit 30 µg/ml Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C wie unter 3.2.13. beschrieben. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm aufgenommen. Die Auswertung der Entfaltungskurven erfolgte im Maximum des Emissionsspektrums (341 nm). Die Bestimmung der Stabilitätsparameter wurde wie unter 3.2.13. angegeben durchgeführt.

#### 4.7. Scale up der Expression von PLA<sub>2</sub> - Hochzelllichtfermentation

Die Verwendung von Hochzelllichtfermentationsverfahren zur Herstellung rekombinanter Proteine ist mit einer Reihe von Vorteilen verknüpft. So können im Gegensatz zu einfachen Schüttelkolbenkulturen Parameter wie pH, Sauerstoffpartialdruck, Temperatur und Substratzufuhr sehr schnell kontrolliert und geregelt werden. Durch das Erreichen hoher Zelldichten im Fermentor ist die volumetrische Ausbeute an rekombinantem Protein sehr hoch.

Bei einem *Fedbatch*-Verfahren (Zulaufkulturen) wird zunächst eine *batch*-Phase durchlaufen, bei der keine Zufuhr von Nährstoffen erfolgt und es zu einer Erhöhung der Zelldichte kommt. Bei Limitierung durch Substratverbrauch erfolgt der Eintritt in die *Fedbatch*-Phase durch die Zugabe von Nährstoffen. Die Zufütterung kann konstant, schrittweise oder linear bzw. exponentiell ansteigend erfolgen.

Als Nährmedien können undefinierte Vollmedien (Extrakte, Mineralsalze) oder definierte Minimalmedien (Kohlenstoffquelle, Salze) eingesetzt werden. Vollmedien ermöglichen ein sehr schnelles Wachstum der Mikroorganismen, besitzen jedoch den Nachteil, dass Wachstum und Produktbildung stark von der Qualität der verwendeten Extrakte abhängen. Bei Minimalmedien hingegen kann der Verbrauch der Substrate meist sehr genau und einfach verfolgt werden. Sie werden auch aus ökonomischer Sicht bevorzugt.

Fermentationen wurden wie unter 3.2.6. beschrieben mit dem Konstrukt I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+) in BL21(DE3)-Zellen durchgeführt. Aus den im oberen Abschnitt aufgeführten Gründen wurde ein Minimalmedien definierter Zusammensetzung mit Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet (3.1.7.). Fermentationsversuche wurden bei 37°C durchgeführt, da sich diese Temperatur auch bei den Versuchen in Schüttelkolben als optimal herausgestellt hat (4.2.2.). Die Induktion der Genexpression von PLA<sub>2</sub> erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG. Versuche zur Variation der IPTG-Konzentration wurden für die Fermentationen nicht durchgeführt, da die ausgewählte Konzentration eine vollständige Induktion erlauben sollte und bei in der Literatur beschriebenen Fermentationsprozessen oft verwendet wird (Donovan et al. 1996; Jurgen et al. 2000; Ramchuran et al. 2002; Panda 2003). Die Bedingungen der *batch*-Phase waren für alle Fermentationen gleich. Bei Glucosemangel und somit Eintritt in die *Fedbatch*-Phase wurde durch eine schrittweise Erhöhung der Zufütterungsrate die Wachstumsrate reguliert. Die Wachstumsrate wurde durch unterschiedliche Zufütterungsraten bis zur Induktion variiert. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, zeigt sich eine Abhängigkeit der

Produktbildung von der Wachstumsrate vor der Induktion. Eine Erhöhung der Wachstumsrate von  $\mu=0,13 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu=0,51 \text{ h}^{-1}$  führt zu einer Steigerung der Produktbildung um 13%. Eine weitere Erhöhung der Wachstumsrate über  $\mu=0,51 \text{ h}^{-1}$  konnte mit dem vorhandenen System nicht erfolgen, da hier eine Limitierung des Zellwachstums durch ungenügenden Lufteintrag entsteht.

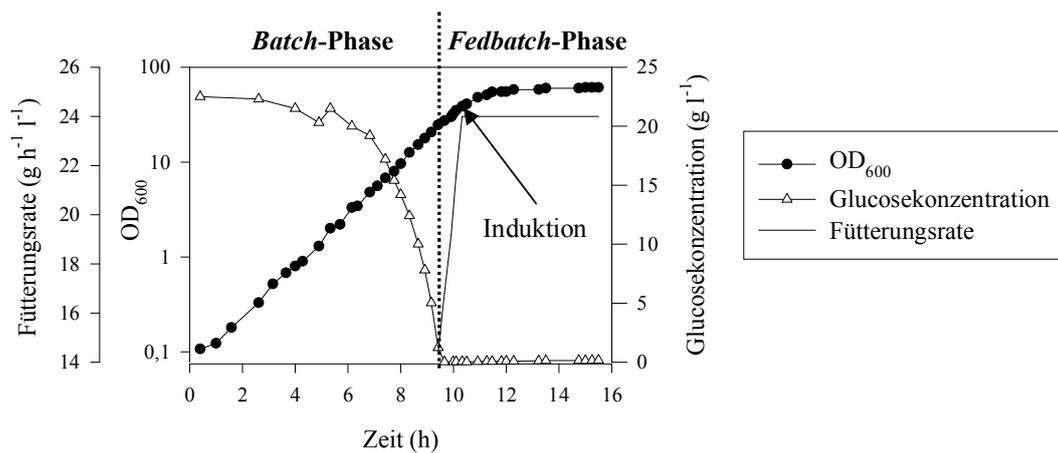
Aus der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Wachstumsrate vor der Induktion auf die Produktbildung bekannt. So wurde für einige Fermentationsprozesse rekombinanter Protein wie verschiedene Interferone (Curless et al. 1990; Ryan et al. 1996; Khalilzadeh et al. 2003) ebenfalls eine gesteigerte Produktbildung bei erhöhter Wachstumsrate beobachtet. Einige Arbeitsgruppen fanden jedoch, dass keine Korrelation zwischen Wachstumsrate vor Induktion und Produktbildung besteht (Zabriskie et al. 1987; Bech und Carlsen 1990; Harder et al. 1994; Shin et al. 1997). Allgemein wird angenommen, dass der Einfluss der Wachstumsrate abhängig vom eingesetzten System ist (Stamm, Vektor, Promotor).

**Tabelle 10: Die Bildung rekombinanter IIA-PLA<sub>2</sub> in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei Fermentationsversuchen.**

Fermentationen wurden wie unter 3.2.6. angegeben durchgeführt. rekombinantes Protein (%): Anteil an rekombinanter PLA<sub>2</sub> am Gesamtzellprotein;  $\mu$  (h<sup>-1</sup>): spezifische Wachstumsrate; Biotrockenmasse (g l<sup>-1</sup>): Biotrockenmasse am Ende der Fermentation; Fütterungsrate (g h<sup>-1</sup> l<sup>-1</sup>): Fütterungsrate bei Induktionsstart

Fütterungsrate (g h <sup>-1</sup> l <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Biotrockenmasse (g l <sup>-1</sup> )	rekombinantes Protein (%)
10,8	0,13	50	3
12,8	0,15	51	3
19,2	0,26	50	5
24,0	0,35	51	8
27,3	0,41	52	15
35,0	0,51	60	16

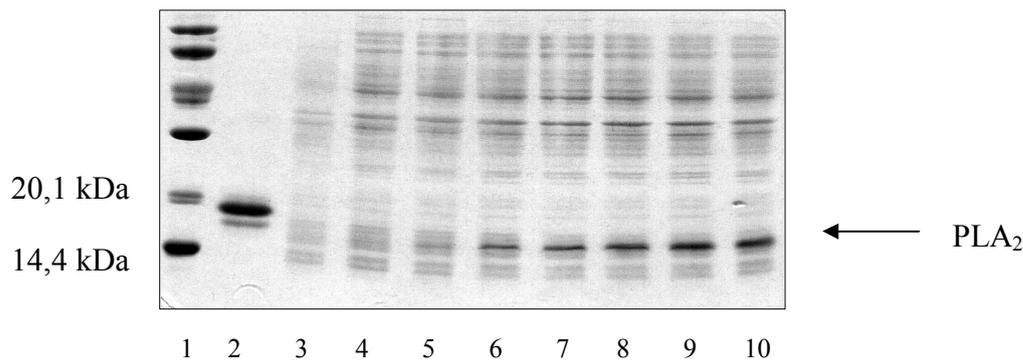
Nach der Induktion der Zellen mit 1 mM IPTG zeigte sich eine starke Reduktion der Wachstumsrate, so dass in der Postinduktionsphase die Zufütterungsrate konstant gehalten wurde. Dieses Phänomen des reduzierten Wachstums nach der Induktion ist aus der Literatur bekannt und wird als ein Zeichen für den metabolischen Stress gewertet, der durch die Expression des rekombinanten Proteins in der Zelle ausgelöst wird (Panda 2003). Abbildung 33 zeigt einen typischen Fermentationsverlauf.



**Abbildung 33: Typischer Verlauf einer Hochzell-dichtefermentation von I1A-PLA<sub>2</sub>.**

Fermentationen wurden wie unter 3.2.6. beschrieben mit einem Mineralsalzmedium (3.1.7.) durchgeführt. Bei Glucosemangel wurde die *fedbatch*-Phase durch Zugabe der Zufütterungslösung gestartet. Die Zufütterungsrate wurde stufenweise bis zur Induktion mit 1 mM IPTG erhöht und nach der Induktion konstant gehalten.

Die maximale IB-Bildung ist nach 3 bis 4 Stunden erreicht (Abbildung 34) und die Fermentationen wurden 4 Stunden nach Induktion beendet.



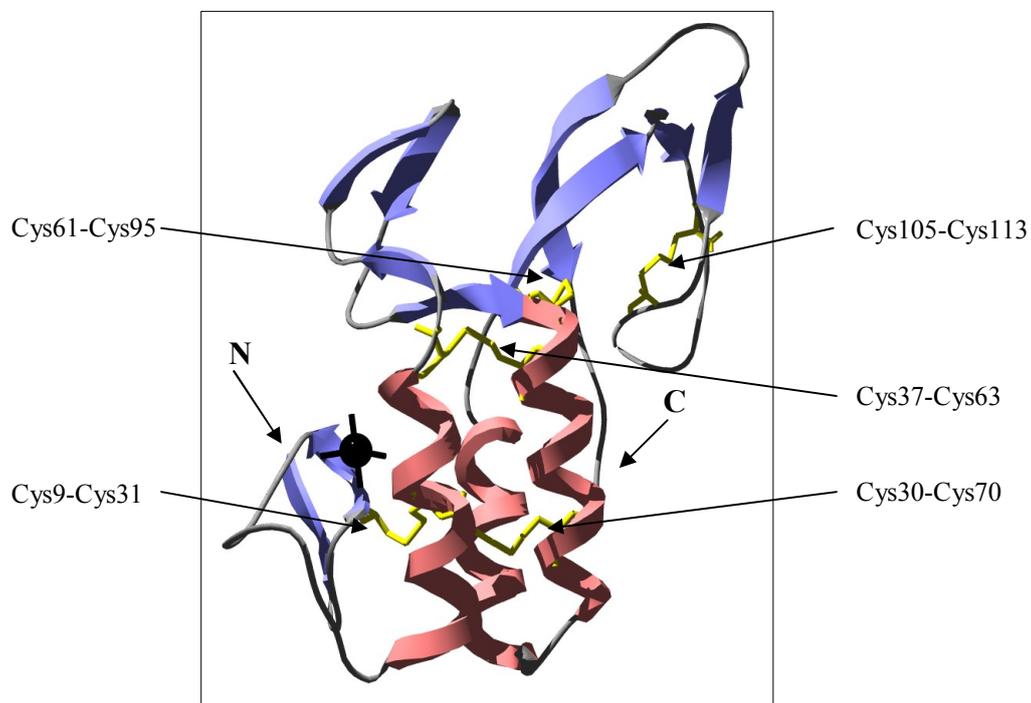
**Abbildung 34: Verfolgung der Expression von I1A-PLA<sub>2</sub> während eines Fermentationsexperiments mittels SDS-PAGE ( $\mu=0,51$  h<sup>-1</sup>).**

Fermentationen wurden wie unter 3.2.6. beschrieben durchgeführt. 1: LMW-Marker 2: bv-PLA<sub>2</sub> 3: Zellen der *batch*-phase 4: Zellen der *fedbatch*-phase vor Induktion 5: 0,25 h nach Induktion 6: 0,5 h nach Induktion 7: 1 h nach Induktion 8: 2 h nach Induktion 9: 3 h nach Induktion 10: 4 h nach Induktion

Beim Vergleich der erreichten Expressionsraten (Anteil an rekombinantem Protein bezogen auf das Gesamtzellprotein) durch Hochzell-dichtefermentation mit den Schüttelkolbenexperimenten (4.2.2.) zeigt sich bei der Fermentation eine Verringerung der Expression um ca. 50%. Jedoch werden hier sehr viel höhere Zelldichten erreicht und eine effizientere volumetrische Ausbeute. Somit sind Fermentationsprozesse gegenüber der einfachen Schüttelkolbenexpression zu favorisieren. Aus einem Fermentationsansatz könnten so ca. 1 g reines Protein isoliert werden (Dr. R. Schöps, persönliche Mitteilung).

#### 4.8. Einfluss der Disulfidbrücken auf die Eigenschaften von PLA<sub>2</sub>

bv-PLA<sub>2</sub> besitzt fünf Disulfidbrücken (Abbildung 35). Um den Einfluss der individuellen Disulfidbrücken auf die Proteinstabilität zu überprüfen, wurden Enzymvarianten erzeugt, in denen jeweils zwei Cysteinreste, die in der natürlich vorkommenden PLA<sub>2</sub> Disulfidbrücken bilden, durch Serinreste ersetzt. An dieser Fragestellung bestand auch ein Interesse des Industriepartners (Lipoid GmbH), da eine Destabilisierung des Enzyms bei weitgehendem Erhalt der biologischen Aktivität wünschenswert sein könnte, um störende Restaktivitäten der PLA<sub>2</sub> in den Phospholipidprodukten zu vermeiden.



**Abbildung 35: Die fünf Disulfidbrücken der PLA<sub>2</sub> aus dem Bienengift.**

Das Modell (1poc) wurde der Brookhaven Proteindatenbank entnommen und mit dem Programm SwissPDBViewer erstellt. schwarz: Calciumion; blau:  $\beta$ -Faltblätter; rosa:  $\alpha$ -Helices; gelb: Disulfidbrücken; N: N-Terminus; C: C-Terminus

#### 4.8.1. Herstellung der Cysteinmutanten

Als Matrize zur Einführung der Mutationen diente das Plasmid I1A-pla<sub>2</sub>-pET 28b(+). Die ortsgerichtete Mutagenese wurde wie unter 3.2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Proteingewinnung aus *E. coli* erfolgte in Analogie zu den Wildtypvarianten in der Schüttelkultur. Alle Mutanten konnten erfolgreich exprimiert, renaturiert und bis zur Homogenität gereinigt werden. In Tabelle 11 sind die Proteinausbeuten der Cysteinmutanten dargestellt. Für einige Mutantenzymen wie I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub>, I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> wurden im Vergleich zum Wildtyp deutlich niedrigere Ausbeuten erhalten.

**Tabelle 11: Vergleich der Proteinausbeuten an gereinigten Enzymen für die verschiedenen Cysteinmutanten.**

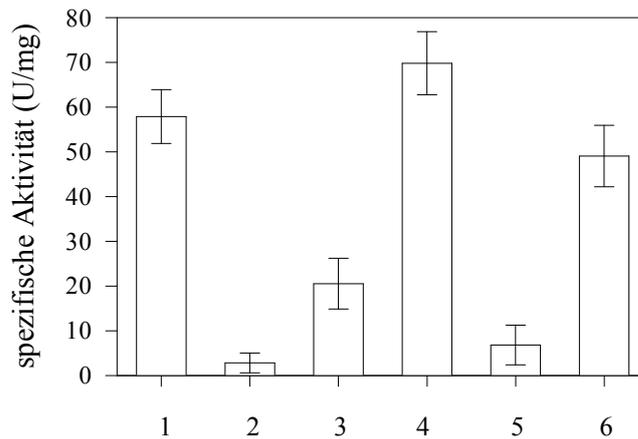
Die Gewinnung der Cysteinmutanten erfolgte in Analogie zu den Wildtypvarianten wie im Kapitel 3. Materialien und Methoden beschrieben (Abschnitt 3.2.5.1. bis 3.2.5.6.). Die Bestimmung der Proteinkonzentration der reinen Proteine wurde mit dem BCA-Test durchgeführt (3.2.7.2.).

PLA <sub>2</sub> -Variante	Ausbeute (mg/l Kultur)
I1A-PLA <sub>2</sub>	10
I1A/C9S/C31S-PLA <sub>2</sub>	4
I1A/C30S/C70S-PLA <sub>2</sub>	8
I1A/C37S/C63S-PLA <sub>2</sub>	8
I1A/C61S/C95S-PLA <sub>2</sub>	5
I1A/C105S/C113S-PLA <sub>2</sub>	4

Die unterschiedlich hohen Ausbeuten an gereinigtem Protein könnten auf differierende Faltungsausbeuten bei der Renaturierung zurückzuführen sein, da alle Mutanten wildtypähnliche Expressionsraten gezeigt haben. Renaturierungsausbeuten wurden jedoch nicht bestimmt. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass einige der Disulfidbrücken für die Faltung des Proteins eine wichtige Rolle spielen.

#### 4.8.2. Vergleich der spezifischen Hydrolyseaktivitäten

Die Bestimmung der spezifischen Hydrolyseaktivität erfolgte gegenüber dem Substrat 1,2-Diheptanoylthio-*sn*-glycero-3-phosphocholin wie unter 3.2.11.2. beschrieben. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 36 grafisch dargestellt. Als Referenzwert wurde die Aktivität von I1A-PLA<sub>2</sub> benutzt.



**Abbildung 36: Vergleich der spezifischen Hydrolyseaktivität von I1A-PLA<sub>2</sub>s mit den Cysteinmutanten.**

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit dem Substrat 1,2-Diheptanoylthio-*sn*-glycero-3-phosphocholin wie unter 3.2.11.2. beschrieben. 1: I1A-PLA<sub>2</sub>; 2: I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub>; 3: I1A/C30S/C70S-PLA<sub>2</sub>; 4: I1A/C37S/C63S-PLA<sub>2</sub>; 5: I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub>; 6: I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub>

Beim Vergleich der Aktivitäten zeigen sich für die beiden Enzyme I1A/C37S/C63S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> wildtypähnliche Aktivitäten. Die Disulfidbrücke Cys105-Cys113 befindet sich im C-terminalen Bereich des Enzyms in einer Loopregion (Abbildung 35) und somit nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums. Die Eliminierung dieser Disulfidbrücke zeigt deshalb offensichtlich keinen gravierenden Einfluss auf die Aktivität. Die Disulfidbrücke Cys37-Cys63 stellt eine der beiden Disulfidbrücken dar, die die beiden  $\alpha$ -Helices, welche die Aminosäuren des aktiven Zentrums beherbergen, verbinden. Deshalb wurde vermutet, dass die Entfernung dieser Disulfidbrücke zu einer reduzierten spezifischen Aktivität führen wird. Überraschenderweise besitzt diese Mutante jedoch eine dem Wildtyp vergleichbare spezifische Aktivität.

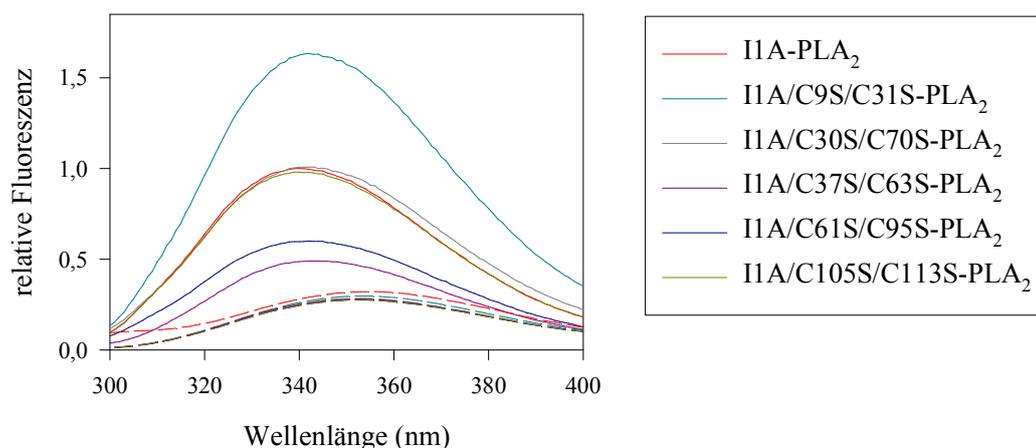
Die Mutanten I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub>, I1A/C30S/C70S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub> zeigen gegenüber dem Wildtyp einen starken Aktivitätsverlust. Die Disulfidbrücke Cys9-Cys31 verknüpft den Calciumbindungsloop mit der ersten  $\alpha$ -Helix des Proteins (Abbildung 35). Die Entfernung dieser Disulfidbrücke führt wahrscheinlich zu einer Änderung der Konformation im Bereich des Calciumbindungsloop. Da dieser Loop ein entscheidendes Strukturelement der PLA<sub>2</sub> darstellt und für die korrekte Koordination des Calciumions verantwortlich ist (2.2.1.2.), welches in den Katalysemechanismus (2.2.1.1.) involviert ist, ist dieser Aktivitätsverlust nicht überraschend. Die Disulfidbrücke Cys61-Cys95 scheint ebenfalls essentiell für die Aktivität zu sein. Die Disulfidbrücke Cys30-Cys70 ist die zweite Disulfidbrücke, die die beiden  $\alpha$ -Helices verbindet. Hier führt die Eliminierung der Disulfidbrücke erwartungsgemäß zu einem Aktivitätsverlust, der dadurch begründet werden kann, dass die Entfernung der Disulfidbrücke wahrscheinlich zu einer Störung des aktiven Zentrums führt.

Vergleicht man die erhaltenen Aktivitätsdaten mit aus der Literatur bekannten Angaben über den Einfluss von Disulfidbrücken auf die Aktivität der sPLA<sub>2</sub> aus dem Rinderpankreas (bp-PLA<sub>2</sub>), wo diese durch Alaninreste ersetzt wurden (Zhu et al. 1995), so zeigen sich für die drei konservierten Disulfidbrücken (Cys9-Cys31/Cys29-Cys45, Cys30-Cys70/Cys44-Cys105, Cys37-Cys63/Cys51-Cys98) ähnliche Ergebnisse bezüglich der Aktivität. Die Betrachtung von Literaturdaten zum Einfluss von Disulfidbrücken auf die Aktivität liefert unterschiedliche Ergebnisse. Die Entfernung einer Disulfidbrücke kann zu einem Aktivitätsverlust führen, wie dies z. B. für das Scorpiontoxin BmK M1 (Sun et al. 2002) gezeigt wurde, bedingt diesen aber nicht, wie im Fall von Prochymosin (Chen et al. 2000). Für Ribonuclease A und Trypsininhibitor aus Rinderpankreas wurde ermittelt, dass der Einfluss der Disulfidbrücke auf die Aktivität abhängig ist von der Lage dieser im Protein (Klink et al. 2000; Hagihara et al. 2002).

#### 4.8.3. Spektrale Eigenschaften der Cysteinmutanten

##### 4.8.3.1. Fluoreszenzemissionsspektren der Cysteinmutanten

Die Fluoreszenzemissionsspektren der Cysteinmutanten wurden wie unter 3.2.13. aufgeführt aufgenommen. Die Spektren wurden auf I1A-PLA<sub>2</sub> im nativen Zustand normiert. Die erhaltenen Fluoreszenzemissionsspektren sind in Abbildung 37 dargestellt.



**Abbildung 37: Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren von I1A-PLA<sub>2</sub> und den Cysteinmutanten in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit (gestrichelte Linie) von 6 M GdnHCl.**

Alle Messungen wurden wie unter 3.2.13. beschrieben mit 40 µg/ml Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C und einer Anregungswellenlänge von 278 nm durchgeführt.

Die Fluoreszenzemissionsspektren unter denaturierenden Bedingungen sind für alle Cysteinmutanten den Spektren von I1A-PLA<sub>2</sub> ähnlich. Sie weisen eine drastische Signalintensitätsreduktion und eine bathochrome Verschiebung des Wellenlängenmaximums auf.

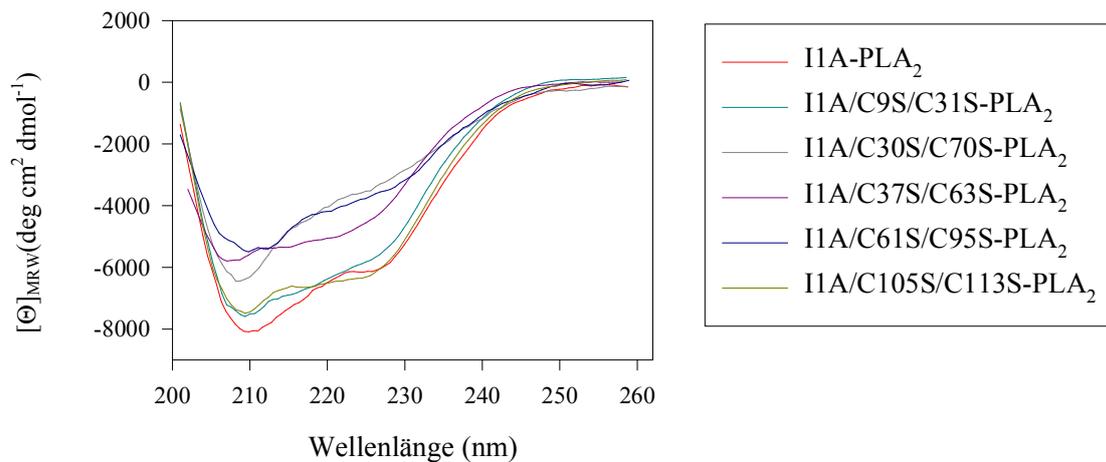
Der Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften für den nativen Zustand zeigt für I1A-PLA<sub>2</sub>, I1A/C30S/C70S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> identische Spektren, so dass hier die Abwesenheit der Disulfidbrücken keinen Einfluss auf die Fluoreszenz hat. Das Fluoreszenzemissionsspektrum von I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub> weist eine deutliche Erhöhung der Signalintensität im Bezug auf den Wildtyp auf. Bei dieser Mutante befindet sich Tryptophan 8 direkt neben dem substituierten Cystein 9. Es wird daher angenommen, dass die Disulfidbrücke bei I1A-PLA<sub>2</sub> einen Quencheffekt hervorruft, der bei Eliminierung dieser durch die Einführung von Serinen aufgehoben wird und die Fluoreszenzsignalintensität erhöht. Der Quencheffekt von Disulfidbrücken ist aus der Literatur bekannt (Schmid 1997). So wurde bei der Entfernung einer Disulfidbrücke im DsbA-Protein (Hennecke et al. 1997), für Prochymosin (Chen et al. 2000) oder Lysozym (Guez et al. 2002) ebenfalls eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet.

Die Cysteinmutanten I1A/C37S/C63S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub> zeigen eine Reduktion der Signalintensität der Fluoreszenzemissionsspektren im Vergleich zu I1A-PLA<sub>2</sub>. Dies indiziert eine Veränderung der Umgebung der beiden Tryptophanreste innerhalb des Proteins, die aus einer lokalen Konformationsänderung im Vergleich zum Wildtyp hervorgerufen werden könnte. Ähnliche Effekte wurden bei der Untersuchung des Einflusses von Disulfidbrücken bei Lysozym gefunden (Guez et al. 2002).

#### **4.8.3.2. CD-Spektren der Cysteinmutanten**

Für Strukturuntersuchungen der Cysteinmutanten wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich aufgenommen. Versuche zur Ermittlung von Nah-UV-Spektren wurden aus den unter 4.6.6.2. aufgeführten Gründen nicht durchgeführt. Vergleicht man die Spektren der Cysteinmutanten mit dem Spektrum für I1A-PLA<sub>2</sub> (Abbildung 38), so zeigen sich für I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> ähnliche Signalintensitäten, wobei die Form der Spektren marginal verändert ist. Daraus lässt sich ableiten, dass der Einfluss der Disulfidbrücken Cys9-Cys31 (N-terminaler Calciumbindungsloop) und Cys105-Cys113 (C-terminaler Loop) auf die Sekundärstruktur des Proteins gering ist.

Die anderen drei Cysteinmutanten (I1A/C30S/C70S-PLA<sub>2</sub>, I1A/C37S/C63S-PLA<sub>2</sub>, I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub>) zeigen neben einer deutlichen Verringerung der Signalintensität auch eine Veränderung der Spektrenform, so dass hier wahrscheinlich eine Reduktion der Sekundärstruktur durch Verringerung  $\alpha$ -helicaler Anteile und Zunahme der unstrukturierten Bereiche in den Proteinen vorliegt. Die Disulfidbrücken Cys30-Cys70 und Cys37-Cys63 verbinden die zwei  $\alpha$ -Helices des Proteins (Abbildung 35). Bei ihrer Eliminierung wird die Struktur stark verändert. Erstaunlicherweise zeigt die Entfernung der Disulfidbrücke Cys 37-Cys63 jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität (4.8.2.), so dass hier eine Konformation vorliegen muss, die die Aktivität nicht beeinträchtigt. Die Disulfidbrücke Cys61-Cys95 verknüpft die zweite Helix mit einer Faltblattstruktur und scheint aufgrund der erhaltenen Daten ebenfalls essentiell für die Struktur zu sein. Die Analyse von Literaturdaten zum Einfluss der Eliminierung von Disulfidbrücken auf die Sekundärstruktur ermittelt durch CD-Spektroskopie zeigt, dass eine Änderung der Struktur nicht zwingend ist (Chen et al. 2000), jedoch auftreten kann (Mayr et al. 1994; Hagihara et al. 2002; Sun et al. 2002).



**Abbildung 38: Vergleich der CD-Spektren im fernen UV-Bereich von I1A-PLA<sub>2</sub> und den Cysteinmutanten.**

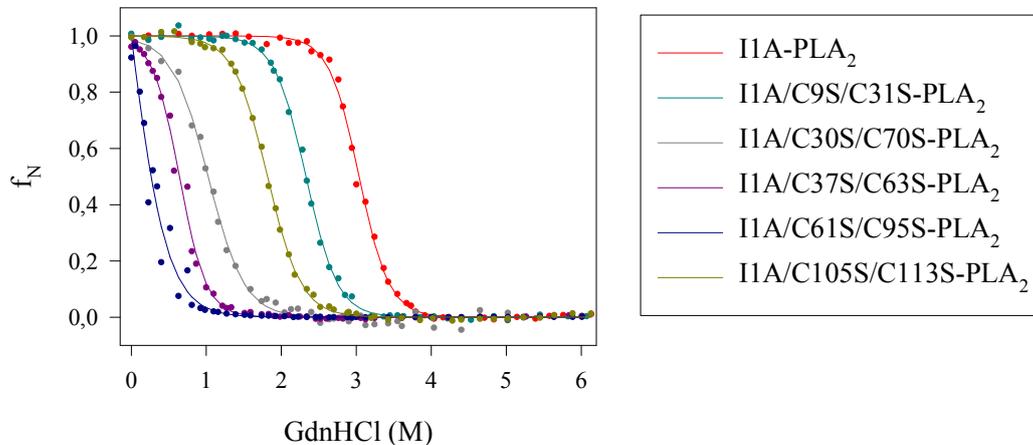
Die Aufnahme der CD-Spektren im fernen UV-Bereich erfolgte wie unter 3.2.12. beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C in einer 0,1 mm Quarzglasküvette.

#### 4.8.4. Thermodynamische Stabilität der Cysteinmutanten

Die Stabilität der Cysteinmutanten wurde in Analogie zu den Wildtypformen durch die Aufnahme von GdnHCl-induzierten Übergangskurven mittels Fluoreszenzspektroskopie (3.2.13.) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt. Zum Vergleich wurden die Übergangskurven in Form von  $f_N$ -Kurven präsentiert. Die aus den Übergangskurven nach dem Zweizustandsmodell berechneten Stabilitätsparameter sind in Tabelle 12 angegeben.

**Tabelle 12: Parameter der thermodynamischen Stabilität der Cysteinmutanten im Vergleich zu I1A-PLA<sub>2</sub>.** Die Parameter der thermodynamischen Stabilität wurden aus den GdnHCl-induzierten Übergangskurven wie unter 3.2.13. angegeben ermittelt.

PLA <sub>2</sub> -Variante	$\Delta G_0$ (kJ/mol)	m (kJ/(mol*M))	$[D]_{1/2}$ (M)
I1A-PLA <sub>2</sub>	$37,6 \pm 5,1$	$12,5 \pm 0,5$	$3,03 \pm 0,17$
I1A/C9S/C31S-PLA <sub>2</sub>	$27,4 \pm 3,2$	$11,8 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,2$
I1A/C30S/C70S-PLA <sub>2</sub>	$(7,9 \pm 2,0)$	$(8,8 \pm 0,7)$	$(0,9 \pm 0,2)$
I1A/C37S/C63S-PLA <sub>2</sub>	$(8,9 \pm 1,9)$	$(13,8 \pm 0,4)$	$(0,7 \pm 0,3)$
I1A/C61S/C95S-PLA <sub>2</sub>	$(3,1 \pm 2,5)$	$(9,9 \pm 0,4)$	$(0,03 \pm 0,01)$
I1A/C105S/C113S-PLA <sub>2</sub>	$20,0 \pm 1,8$	$11,0 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$



**Abbildung 39: Vergleich der GdnHCl-induzierten Übergangskurven von I1A-PLA<sub>2</sub> mit den Cysteinmutanten.**

Die Datenaufnahme erfolgte mit 30  $\mu\text{g/ml}$  Protein in 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 10 mM CaCl<sub>2</sub> bei 20°C wie unter 3.2.13. beschrieben. Die Fluoreszenzemissionsspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm aufgenommen. Die Auswertung der Entfaltungskurven erfolgte im Maximum des Emissionsspektrums (341 nm). Die Bestimmung der Stabilitätsparameter wurde wie unter 3.2.13. angegeben durchgeführt.

Für die Cysteinmutanten I1A/C30S/C70S-PLA<sub>2</sub>, I1A/C37S/C63S-PLA<sub>2</sub> und I1A/C61S/C95S-PLA<sub>2</sub> war keine Basislinie im nativen Zustand detektierbar. Deshalb ist eine Auswertung und

mathematische Anpassung schwierig, und die ermittelten Parameter sind in Tabelle 12 in Klammern angegeben. Beim Vergleich der Stabilität der Cysteinmutanten mit dem Wildtyp zeigen sich in Abhängigkeit von der Lokalisation der Disulfidbrücke sehr distinkte Stabilitätsunterschiede. Die Entfernung einer Disulfidbrücke führt zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Destabilisierung bei weitgehend erhaltener Kooperativität der Übergänge. Vergleicht man die Stabilität von I1A-PLA<sub>2</sub> und I1A/C9S/C31S-PLA<sub>2</sub> so zeigt sich eine Destabilisierung um 10,2 kJ/mol und eine Verringerung von  $[D]_{1/2}$  um 0,73 M. Damit liefert die Disulfidbrücke Cys9-Cys31 den geringsten Beitrag zur Stabilität des Proteins. I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> zeigt eine Destabilisierung um 17,6 kJ/mol und eine Verminderung von  $[D]_{1/2}$  um 1,23 M. Die Entfernung der anderen drei Disulfidbrücken führt zu einer sehr starken Destabilisierung und verdeutlicht somit, dass diese Disulfidbrücken essentiell für die Stabilität sind.

Bei Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den für bp-PLA<sub>2</sub> beschriebenen Effekten, zeigen sich für die drei konservierten Disulfidbrücken (Cys9-Cys31/Cys29-Cys45, Cys30-Cys70/Cys44-Cys105, Cys37-Cys63/Cys51-Cys98) weitgehend ähnliche Effekte (Zhu et al. 1995). Bei bp-PLA<sub>2</sub> führt die Entfernung der Disulfidbrücke, die den Calciumbindungsloop mit einer Helix verbindet, zu keiner Änderung der Stabilität im Vergleich zu einer Abnahme der Stabilität um 10,2 kJ/mol bei bv-PLA<sub>2</sub>. Die Entfernung der Disulfidbrücken, die die Helices verbrücken, die das aktive Zentrum beinhalten, führt zu einer Destabilisierung um 10-15 kJ/mol. Wahrscheinlich ist bei bp-PLA<sub>2</sub> insgesamt der Einfluss der Disulfidbrücken nicht so stark wie bei bv-PLA<sub>2</sub>, da das Enzym insgesamt sieben Disulfidbrücken besitzt und so der Beitrag jeder einzelnen Disulfidbrücke geringer sein könnte. Die Entfernung der Disulfidbrücke Cys27-Cys123 bei bp-PLA<sub>2</sub> führte erstaunlicherweise zu einer Erhöhung der Stabilität um 10 kJ/mol. Für diese Disulfidbrücke gibt es kein Äquivalent bei bv-PLA<sub>2</sub>. Betrachtet man den Einfluss der Eliminierung von Disulfidbrücken für verschiedene aus der Literatur bekannte Proteine, so führt diese meist zu einer Destabilisierung, die unterschiedlich stark ausgeprägt ist und von der Lokalisation der Disulfidbrücke abhängig ist. So zeigte das bereits erläuterte Beispiel von bp-PLA<sub>2</sub>, dass die Entfernung von Disulfidbrücken thermodynamische Effekte einer Destabilisierung bis zu einer Stabilisierung (Zhu et al. 1995) hervorrufen kann. Die Entfernung einer Disulfidbrücke von Azurin führte zu einer Stabilitätsabnahme um 20 kJ/mol (Bonander et al. 2000). Ebenso wurde die Stabilität von Trypsininhibitor durch die Eliminierung einer Disulfidbrücke um 4,2 bis zu 12,5 kJ/mol in Abhängigkeit der Lage vermindert (Zavodszky et al. 2001).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass sich die Proteinstabilität von bv-PLA<sub>2</sub> bei weitgehendem Erhalt der enzymatischen Aktivität modulieren lässt. I1A/C105S/C113S-PLA<sub>2</sub> zeigt bei annähernder Wildtypaktivität und dem Wildtyp vergleichbaren spektralen Eigenschaften eine um 17,6 kJ/mol reduzierte Stabilität und ist somit für biokatalytische Prozesse, die ein Enzym mit geringerer Stabilität wünschenswert erscheinen lassen, sehr wertvoll.

## 5. Zusammenfassung

Der Ersatz chemischer Produktionsverfahren durch enzymkatalysierte Verfahren stellt vor allem unter ökologischen Gesichtspunkten eine sinnvolle Alternative dar. Die Darstellung von Lysophospholipiden erfolgt bereits industriell mit PLA<sub>2</sub>s, die aus Säugetieren isoliert wurden. Der Anwendung dieser Enzyme sind jedoch Grenzen gesetzt, da hier aus Sicherheitsbedenken und religiösen Vorbehalten die Akzeptanz vor allem im Lebensmittelbereich und pharmazeutischen Bereich sehr gering ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Gewinnung einer rekombinanten PLA<sub>2</sub>, deren Gensequenz nicht aus Säugern stammt. So wurde ein synthetisches Gen mittels PCR erzeugt, welches der Gensequenz der PLA<sub>2</sub> aus der Europäischen Honigbiene entspricht, und in entsprechende Expressionsvektoren zur heterologen Genexpression in *E. coli* kloniert. Zur Modifizierung des N-terminalen Bereiches wurden verschiedene Expressionskonstrukte erzeugt (I1A-PLA<sub>2</sub>, I1V-PLA<sub>2</sub>, M-PLA<sub>2</sub>, 6xHis-PLA<sub>2</sub>), um den Einfluss einer zu erwartenden Verlängerung des N-Terminus durch das Startmethionin zu ermitteln und diese Varianten mit dem Protein mit der Originalsequenz zu vergleichen. Nach Optimierung der Expressionsbedingungen gelang es, alle aufgeführten Proteine in Form von *inclusion bodies* im Cytoplasma mit einem Anteil von 26 bis 35 % am Gesamtzellprotein anzureichern. Eine Expression, bei der das Protein ins Periplasma sezerniert wird, gelang nicht. Die aus den Zellen isolierten *inclusion bodies* enthielten die Zielproteine bereits in einer Reinheit von 80 bis 90%.

Für die isolierten und solubilisierten *inclusion bodies* wurde ein Renaturierungsverfahren entwickelt und optimiert. Hierbei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von niedermolekularen Zusätzen. Der Zusatz von NaCl hatte einen geringen Einfluss auf die Ausbeute, während bei Verwendung von L-Arginin oder Tris die Ausbeute an nativem Protein drastisch gesteigert werden konnte, wobei jedoch Tris der Renaturierung mit L-Arginin überlegen ist. Bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml und einem pH-Wert von 8,3 konnten in Gegenwart von 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 1 mM EDTA und 1 M Tris nach 24 Stunden Renaturierungsausbeuten von bis zu 69% erreicht werden. Ein Einfluss der Temperatur auf die Renaturierungsausbeute konnte im untersuchten Bereich von 4 bis 25°C nicht festgestellt werden.

Die in aktiver Form erhaltenen PLA<sub>2</sub>-Varianten konnten durch Kationenaustauschchromatographie (Mono S) in einem Schritt bis zur Homogenität gereinigt

werden. Die Enzymausbeuten nach der Reinigung betragen in Abhängigkeit von der rekombinanten Form bis zu 11 mg/Liter Expressionskultur.

Durch N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie wurde die N-terminale Sequenz der Enzymvarianten analysiert. Für I1A-PLA<sub>2</sub> wurde die vollständige Eliminierung des Methionins gefunden, während bei I1V-PLA<sub>2</sub> und M-PLA<sub>2</sub> das Methionin zu einem Großteil noch vorhanden ist.

Der Vergleich der Enzymaktivitäten der rekombinanten Proteine mit der kommerziell verfügbaren bv-PLA<sub>2</sub> zeigt für die Variante I1A-PLA<sub>2</sub>, eine dem glykosylierten Bienengiftenzym ähnliche Aktivität. Die Varianten I1V-PLA<sub>2</sub> und M-PLA<sub>2</sub> weisen eine leicht verringerte Aktivität auf, während die PLA<sub>2</sub>-Variante mit N-terminalem His-Tag eine drastisch reduzierte Aktivität zeigt.

Der Vergleich der CD-Spektren im Fern-UV-Bereich und der Fluoreszenzemissionsspektren beweist, dass alle rekombinanten PLA<sub>2</sub>-Formen eine dem Bienengiftenzym vergleichbare Struktur besitzen. Die Untersuchung der thermodynamischen Stabilität erfolgte durch die Aufnahme von GdnHCl-induzierte Entfaltungskurven mittels Fluoreszenzspektroskopie. Die Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation am N-Terminus in den rekombinanten Enzymen keinen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität des Enzyms hat. Weiterhin belegen die Ergebnisse, dass der Kohlenhydratanteil bei bv-PLA<sub>2</sub>, der mit dem Protein über den Asparaginrest 13 verknüpft ist, weder für die Aktivität noch für die Stabilität essentiell ist.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Aktivität gegenüber dem Substrat DOPC von der Temperatur zeigte für bv-PLA<sub>2</sub> und I1A-PLA<sub>2</sub> ein Maximum bei 40°C. Für beide Proteine wurde eine hohe Temperaturstabilität gefunden, so dass selbst nach 30-minütiger Inkubation bei 90°C Restaktivitäten von über 80% vorhanden waren. Weiterhin wurde bei der Analyse des Einflusses des pH-Wertes auf die Aktivität von bv-PLA<sub>2</sub> und I1A-PLA<sub>2</sub> ein Optimum bei pH 8,3 bestimmt.

Für die Variante I1A-PLA<sub>2</sub> wurde ein Fedbatch-Hochzelllichtfermentationsverfahren auf Minimalmediumbasis etabliert. Hierbei zeigte sich die Wachstumsrate in der Präinduktionsphase als entscheidender Parameter für die Produktausbeute. Bei relativ hohen Wachstumsraten vor dem Induktionsstart konnten Ausbeuten von bis zu 16% rekombinantes Protein als Anteil am Gesamtzellprotein erreicht werden.

Im abschließenden Teil der Arbeit wurde der Einfluss der fünf Disulfidbrücken bezüglich Aktivität, spektraler Eigenschaften sowie Stabilität untersucht. Hierfür wurden durch gezielte Mutagenese Enzymvarianten gewonnen, in denen jeweils zwei Cysteinreste, die in der natürlich vorkommenden bv-PLA<sub>2</sub> Disulfidbrücken bilden, durch Serine ersetzt wurden.

Dabei zeigten sich die Disulfidbrücken Cys37-Cys63 und Cys105-Cys113 als nicht essentiell für die Aktivität, wohingegen die Eliminierung der Disulfidbrücken Cys9-Cys31, Cys30-Cys70 und Cys61-Cys95 zu Enzymen führte, deren Aktivität stark reduziert war. Anhand der Fern-UV-CD-Spektren kann für die Enzyme, bei denen die Disulfidbrücke Cys9-Cys31 oder Cys105-Cys113 entfernt wurde, eine dem Wildtypenzym ähnliche Sekundärstruktur angenommen werden. Für die anderen Mutanten wurden Änderungen in der Struktur detektiert. Der Vergleich der thermodynamischen Stabilität mit der von bv-PLA<sub>2</sub> zeigt für alle Cysteinmutanten eine Erniedrigung dieser, die in Abhängigkeit von der Lage der eliminierten Disulfidbrücke differenziert ausgeprägt ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine rekombinante PLA<sub>2</sub> in ausreichender Menge erzeugt wurde, die sich bezüglich ihrer Eigenschaften kaum von dem aus der natürlichen Quelle isolierten Enzym unterscheidet und damit für eine weitere Maßstabsvergrößerung für biokatalytische Prozesse geeignet ist. Weiterhin gelang die gezielte Modulation der Proteinstabilität bei Erhalt der enzymatischen Aktivität.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aarsman, A.J., Schalkwijk, C.G., Neys, F.W., Iijima, N., Wherrett, J.R., and van den Bosch, H. 1996. Purification and characterization of Ca(2+)-dependent phospholipases A2 from rat kidney. *Arch Biochem Biophys* **331**: 95-103.
- Ackermann, E.J., Kempner, E.S., and Dennis, E.A. 1994. Ca(2+)-independent cytosolic phospholipase A2 from macrophage-like P388D1 cells. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **269**: 9227-9233.
- Ahmed, T., Kelly, S.M., Lawrence, A.J., Mezna, M., and Price, N.C. 1996. Conformational changes associated with activation of bee venom phospholipase A2. *J Biochem (Tokyo)* **120**: 1224-1231.
- Akiba, S., Mizunaga, S., Kume, K., Hayama, M., and Sato, T. 1999. Involvement of group VI Ca2+-independent phospholipase A2 in protein kinase C-dependent arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells. *J Biol Chem* **274**: 19906-19912.
- Alonso, F., Henson, P.M., and Leslie, C.C. 1986. A cytosolic phospholipase in human neutrophils that hydrolyzes arachidonoyl-containing phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **878**: 273-280.
- Ambrosius, D., and Rudolph, R. 1992. Process for the reactivation of denatured protein. US Patent 5,618,927.
- Anderson, D.C., and Krummen, L. 2002. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 117-123.
- Annand, R.R., Kontoyianni, M., Penzotti, J.E., Dudler, T., Lybrand, T.P., and Gelb, M.H. 1996. Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. *Biochemistry* **35**: 4591-4601.
- Arni, R.K., and Ward, R.J. 1996. Phospholipase A2-a structural review. *Toxicon* **34**: 827-841.
- Asai, K., Hirabayashi, T., Houjou, T., Uozumi, N., Taguchi, R., and Shimizu, T. 2003. Human group IVC phospholipase A2 (cPLA2gamma). Roles in the membrane remodeling and activation induced by oxidative stress. *J Biol Chem*. **278**: 8809-8814.
- Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., and Kudo, I. 2000. Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca2+-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem* **275**: 18248-18258.
- Auger, N.A., and Bennett, G.N. 1987. Temperature optimization of in vivo expression from the *E. coli* and trp:lac promoters. *Biotechnol Lett* **8**: 157-162.
- Bae, K., Longobardi, L., Karasawa, K., Malone, B., Inoue, T., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., and Lee, T. 2000. Platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase and its relationship with PAF acetylhydrolases. *J Biol Chem* **275**: 26704-26709.
- Baker, S.F., Othman, R., and Wilton, D.C. 1998. Tryptophan-Containing Mutant of Human (Group IIa) Secreted Phospholipase A2 Has a Dramatically Increased Ability To Hydrolyze Phosphatidylcholine Vesicles and Cell Membranes. *Biochemistry* **37**: 13203-13211.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Jones, S.S., and Dennis, E.A. 1997. Identity between the Ca2+-independent phospholipase A2 enzymes from P388D1 macrophages and Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **272**: 8576-8580.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., and Dennis, E.A. 1999. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **39**: 175-189.

- Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E.A. 1995. Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8527-8531.
- Balsinde, J., and Dennis, E.A. 1997. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* **272**: 16069-16072.
- Balsinde, J., Winstead, M.V., and Dennis, E.A. 2002. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* **531**: 2-6.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Op Biotech* **10**: 411-421.
- Bazan, N.G. 1995. Inflammation. A signal terminator. *Nature* **374**: 501-502.
- Bech Jensen, E.C., and Carlsen, S. 1990. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. *Biotechnol Bioeng* **36**: 1-11.
- Bentley, W.E., Davis, R.H., and Kompala, D.S. 1991. Dynamics of CAT expression in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng* **38**: 749-760.
- Berg, O.G., Gelb, M.H., Tsai, M., and Jain, M.K. 2001. Interfacial Enzymology: The Secreted Phospholipase A2-Paradigm. *Chem. Rev.* **101**: 2613-2653.
- Betz, S.F. 1993. Disulfide bonds and stability of globular proteins. *Protein Science* **2**: 1551-1558.
- Blow, D.M., Birktoft, J.J., and Hartley, B.S. 1969. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**: 337-340.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bonander, N., Leckner, J., Guo, H., Karlsson, B.G., and Sjolín, L. 2000. Crystal structure of the disulfide bond-deficient azurin mutant C3A/C26A: How important is the S-S bond for folding and stability? *Eur J Biochem* **267**: 4511-4519.
- Botes, D.P., and Viljoen, C.C. 1974. *Bitis gabonica* venom. The amino acid sequence of phospholipase A. *J Biol Chem* **249**: 3827-3835.
- Carrio, M.M., Cubarsi, R., and Villaverde, A. 2000. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* **471**: 7-11.
- Chang, L.S., Wu, P.F., and Chang, C.C. 1996. Expression of Taiwan banded krait phospholipase A2 in *Escherichia coli*, a fully active enzyme generated by hydrolyzing with aminopeptidase. *Biochem Biophys Res Commun* **225**: 990-996.
- Chen, H., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, Y., and Yang, K. 2000. Functional implications of disulfide bond, Cys206-Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry* **39**: 12140-12148.
- Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., and Tischfield, J.A. 1994a. Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2s containing 16 cysteines. *J Biol Chem* **269**: 23018-23024.
- Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., and Tischfield, J.A. 1994b. Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1215**: 115-120.
- Chen, Y., and Dennis, E.A. 1998. Expression and characterization of human group V phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta* **1394**: 57-64.
- Chiba, H., Michibata, H., Wakimoto, K., Seishima, M., Kawasaki, S., Oku, K., Mitsui, H., Torii, H., and Imai, Y. 2004. Cloning a gene for a novel epithelial-specific cytosolic phospholipase A2, cPLA2delta, induced in psoriatic skin. *J Biol Chem*: 2004 [Epub ahead of print]
- Cottrell, R.C. 1981. Phospholipase A2 from bee venom. *Methods Enzymol* **71**: 698-702.
- Creighton, T.E. 1988. Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays* **8**: 57-63.

- Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M.G., Lazdunski, M., and Lambeau, G. 1997. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **272**: 15745-15752.
- Curless, C., Pope, J., and Tsai, L. 1990. Effect of preinduction specific growth rate on the yield of recombinant consensus interferon synthesis in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **6**: 149-152.
- Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, J., and Gentry, M.K. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Prot Sci* **2**: 366-382.
- D'Amico, S., Gerday, C., and Feller, G. 2002. Dual effects of an extra disulfide bond on the activity and stability of a cold-adapted alpha-amylase. *J Biol Chem* **277**: 46110-46115.
- Das, S., and Cho, W. 2002. Roles of catalytic domain residues in interfacial binding and activation of group IV cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **277**: 23838-23846.
- Davidson, F.F., Loewen, P.C., and Khorana, H.G. 1994. Structure and function in rhodopsin: replacement by alanine of cysteine residues 110 and 187, components of a conserved disulfide bond in rhodopsin, affects the light-activated metarhodopsin II state. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4029-4033.
- De Bernardez Clark, E. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 202-207.
- De Bernardez Clark, E., Schwarz, E., and Rudolph, R. 1999. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* **309**: 217-236.
- delCardayre, S.B., Ribo, M., Yokel, E.M., Quirk, D.J., Rutter, W.J., and Raines, R.T. 1995. Engineering ribonuclease A: Production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng* **8**: 261-273.
- De Geus, P., van den Bergh, C.J., Kuipers, O., Verheij, H.M., Hoekstra, W.P.M., and de Haas, G.H. 1987. Expression of porcine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. Generation of active enzyme by sequence-specific cleavage of a hybrid protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **15**: 3743-3759.
- Dennis, E. 1997. The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. *TIBS* **22**: 1-2.
- Derewenda, Z.S., and Ho, Y.S. 1999. PAF-acetylhydrolases. *Biochim Biophys Acta* **1441**: 229-236.
- Dessen, A. 2000. Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488**: 40-47.
- Di Marco, S., Marki, F., Hofstetter, H., Schmitz, A., van Oostrum, J., and Grutter, M.G. 1992. Purification, analysis, and enzymatic activity of recombinant human synovial fluid phospholipase A<sub>2</sub> and N-terminal variants. *J Biochem (Tokyo)* **112**: 350-354.
- Dijkstra, B.W., Drenth, J., and Kalk, K.H. 1981. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Nature* **289**: 604-606.
- Dijkstra, B.W., Drenth, J., Kalk, K.H., and Vandermaelen, P.J. 1978. Three-dimensional structure and disulfide bond connections in bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *J Mol Biol* **124**: 53-60.
- Doig, A.J., and Williams, D.H. 1991. Is the hydrophobic effect stabilizing or destabilizing in proteins. The contribution of disulphide bonds to protein stability. *J Mol Biol* **217**: 389-398.
- Donovan, R.S., Robinson, C.W., and Glick, B.R. 1996. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol* **16**: 145-154.
- Drenth, J., Enzing, C.M., Kalk, K.H., and Vessies, J.C. 1976. Structure of porcine pancreatic prephospholipase A<sub>2</sub>. *Nature* **264**: 373-377.

- Dudler, T., Chen, W.Q., Wang, S., Schneider, T., Annand, R.R., Dempcy, R.O., Cramer, R., Gmachl, M., Suter, M., and Gelb, M.H. 1992. High-level expression in *Escherichia coli* and rapid purification of enzymatically active honey bee venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim Biophys Acta* **1165**: 201-210.
- Dunn, R.D., and Broady, K.W. 2001. Snake inhibitors of phospholipase A(2) enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1533**: 29-37.
- Dupureur, C.M., Yu, B.Z., Mamone, J.A., Jain, M.K., and Tsai, M.D. 1992. Phospholipase A<sub>2</sub> engineering. The structural and functional roles of aromaticity and hydrophobicity in the conserved phenylalanine-22 and phenylalanine-106 aromatic sandwich. *Biochemistry* **31**: 10576-10583.
- Eftink, M.R., and Ghiron, C.A. 1976. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* **15**: 672-680.
- Evans, J.H., Gerber, S.H., Murray, D., and Leslie, C.C. 2004. The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> domain specific targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* **15**: 371-383.
- Evans, J.H., and Leslie, C.C. 2004. The Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub> catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J Biol Chem* **279**: 6005-6016.
- Fersht, A.R. 1999. Structure and mechanism in protein science. *W.H. Freeman and Company, New York*.
- Flory, P.J. 1956. Theory of Elastic Mechanisms in Fibrous Proteins. *J Am Chem Soc* **78**: 5222-5235.
- Franken, P.A., van den Bergh, L., Huang, J., Gunyuzlu, P., Lugtigheid, R.B., Verheij, H.M., and de Haas, G.H. 1992. Purification and characterization of a mutant human platelet phospholipase A<sub>2</sub> expressed in *Escherichia coli*. Cleavage of a fusion protein with cyanogen bromide. *Eur J Biochem* **203**: 89-98.
- Fremont, D.H., Anderson, D.H., Wilson, I.A., Dennis, E.A., and Xuong, N.H. 1993. Crystal structure of phospholipase A<sub>2</sub> from Indian cobra reveals a trimeric association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 342-346.
- Gelb, M.H., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., and Lambeau, G. 2000. Cloning and recombinant expression of a structurally novel human secreted phospholipase A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* **275**: 39823-39826.
- Gergioui, G. 1996. Expression of Proteins in Bacteria. *Protein Engineering: Principles and Practice*: 101-127.
- Ghomashchi, F., Yu, B.Z., Mihelich, E.D., Jain, M.K., and Gelb, M.H. 1991. Kinetic characterization of phospholipase A<sub>2</sub> modified by mannan. *Biochemistry* **30**: 9559-9569.
- Ghomashchi, F., Lin, Y., Hixon, M.S., Yu, B.Z., Annand, R., Jain, M.K., and Gelb, M.H. 1998. Interfacial recognition by bee venom phospholipase A<sub>2</sub>: insights into nonelectrostatic molecular determinants by charge reversal mutagenesis. *Biochemistry* **37**: 6697-6710.
- Gilbert, H.F. 1990. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol* **63**: 69-172.
- Giuliani, C.D., Iemma, M.R., Bondioli, A.C., Souza, D.H., Ferreira, L.L., Salvini, T.F., and Selistre-de-Araujo, H.S. 2001. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin as a fusion protein in bacteria. *Toxicon* **39**: 1595-15600.
- Glockshuber, R., Schmidt, T., and Pluckthun, A. 1992. The disulfide bonds in antibody variable domains: effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**: 1270-1279.

- Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Giannattasio, G., Marone, G., and Triggiani, M. 2003. Secretory phospholipases A<sub>2</sub> as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* **131**: 153-163.
- Guez, V., Roux, P., Navon, A., and Goldberg, M.E. 2002. Role of individual disulfide bonds in hen lysozyme early folding steps. *Protein Sci* **11**: 1136-1151.
- Habermann, E. 1957. Manometrische Bestimmung von Phospholipase A. *Biochem Z* **328**:474.
- Hagihara, Y., Shiraki, K., Nakamura, T., Uegaki, K., Takagi, M., Imanaka, T., and Yumoto, N. 2002. Screening for stable mutants with amino acid pairs substituted for the disulfide bond between residues 14 and 38 of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI). *J Biol Chem* **277**: 51043-51048.
- Han, S.K., Yoon, E.T., and Cho W. 1998. Bacterial expression and characterization of human secretory class V phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochem J* **331**: 353-357.
- Hannig, G., and Makrides, S.C. 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **16**: 54-60.
- Harder, M.P., Sanders, E.A., Wingender, E., and Deckwer, W.D. 1994. Production of human parathyroid hormone by recombinant *Escherichia coli* TG1 on synthetic medium. *J Biotechnol* **32**: 157-164.
- Hattori, K., Adachi, H., Matsuzawa, A., Yamamoto, K., Tsujimoto, M., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., and Inoue, K. 1996. cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* **271**: 33032-33038.
- Hattori, K., Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. 1995. Purification and characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver cytosol. *J Biol Chem* **270**: 22308-22313.
- Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H., and Inoue, K. 1994. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**: 216-218.
- Hattori, M., Arai, H., and Inoue, K. 1993. Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**: 18748-18753.
- Hennecke, J., Sillen, A., Huber-Wunderlich, M., Engelborghs, Y., and Glockshuber, R. 1997. Quenching of tryptophan fluorescence by the active-site disulfide bridge in the DsbA protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**: 6391-6400.
- Hirschberg, H.J., Simons, J.W., Dekker, N., and Egmond, M.R. 2001. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur J Biochem* **268**: 5037-5044.
- Ho, Y.S., Swenson, L., Derewenda, U., Serre, L., Wei, Y., Dauter, Z., Hattori, M., Adachi, T., Aoki, J., Arai, H., et al. 1997. Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-protein-like trimer. *Nature* **385**: 89-93.
- Hodgson, D., Gasparini, S., Drevet, P., Ducancel, F., Bouet, F., Boulain, J.C., Harris, J.B., and Menez, A. 1993. Production of recombinant notechis 11'2L, an enzymatically active mutant of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Notechis scutatus scutatus* venom, as directly generated by cleavage of a fusion protein produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **212**: 441-446.
- Holk, A., Rietz, S., Zahn, M., Quader, H., and Scherer, G.F. 2002. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from Arabidopsis with potential functions in plant signal transduction. **130**: 90-101.
- Hollander, T., Aeed, P.A., and Elhammer, A.P. 1993. Characterization of the oligosaccharide structures on bee venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Carbohydr Res* **247**: 291-297.
- Ikegaya, K., Sugio, S., Murakami, K., and Yamanouchi, K. 2003. Kinetic analysis of enhanced thermal stability of an alkaline protease with engineered twin disulfide bridges and calcium-dependent stability. *Biotechnol Bioeng* **81**: 187-192.

- Ingraham, J. 1987. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. *Cell Mol Biol* **2**: 1543-1554.
- Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H., and Hanasaki, K. 1999. Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A(2)s. *J Biol Chem* **274**: 24973-24979.
- Jain, M.K., Gelb, M.H., Rogers, J., and Berg, O.G. 1995. Kinetic basis for interfacial catalysis by phospholipase A2. *Methods Enzymol* **249**: 567-614.
- Janssen, M.J., van de Wiel, W.A., Beiboer, S.H., van Kampen, M.D., Verheij, H.M., Slotboom, A.J., and Egmond, M.R. 1999a. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A2 probed by the variants H48Q, H48N and H48K. *Protein Eng* **12**: 497-503.
- Janssen, M.J., Verheij, H.M., Slotboom, A.J., and Egmond, M.R. 1999b. Engineering the disulphide bond patterns of secretory phospholipases A2 into porcine pancreatic isozyme. The effects on folding, stability and enzymatic properties. *Eur J Biochem* **261**: 197-207.
- Jentsch, J. 1972. Vergleich von Bienengift- und Schweine-Phospholipase A. *Naturwiss Rundsch* **25**: 68-69.
- Jurgen, B., Lin, H.Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., Hecker, M., and Schweder, T. 2000. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in escherichia coli glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* **70**: 217-224.
- Kanaya, E. and Kikuchi, M., 1992. Folding of Human Lysozyme *in Vivo* by the Formation of an Alternative Disulfide Bond. *J Biol Chem* **267**: 15111-15115.
- Kelley, M.J., Cowl, R.M., and Dennis, E.A. 1992. Renaturation of cobra venom phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1118**: 107-115.
- Khalilzadeh, R., Shojaosadati, S.A., Bahrami, A., and Maghsoudi, N. 2003. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* **25**: 1989-1992.
- Kishimura, H., Ojima, T., Hayashi, K., and Nishita, K. 2001. Bacterial expression and characterization of starfish phospholipase A(2). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **128**:565-573.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M., and Raines, R.T. 2000. Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur J Biochem* **267**: 566-572.
- Kramer, R.M., Checani, G.C., Deykin, A., Pritzker, C.R., and Deykin, D. 1986. Solubilization and properties of Ca<sup>2+</sup>-dependent human platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **878**: 394-403.
- Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E.P., Tizard, R., and Pepinsky, R.B. 1989. Structure and properties of a human non pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem* **264**: 5768-5775.
- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J., and Putnam, J.E. 1991. The Ca<sup>2+</sup>(+)-sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. *J Biol Chem* **266**: 5268-5272.
- Kronke, M., and Adam-Klages, S. 2002. Role of caspases in TNF-mediated regulation of cPLA(2). *FEBS Lett* **531**: 18-22.
- Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., Tretter, V., Marz, L., Hard, K., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F. 1993. Primary structures of the N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A2. *Eur J Biochem* **213**: 1193-1204.
- Kuchler, K., Gmachl, M., Sippl, M.J., and Kreil, G. 1989. Analysis of the cDNA for phospholipase A2 from honeybee venom glands. The deduced amino acid sequence

- reveals homology to the corresponding vertebrate enzymes. *Eur J Biochem* **184**: 249-254.
- Kudo, I., and Murakami, M. 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 3-58.
- Kuipers, O.P., Franken, P.A., Hendriks, R., Verheij, H.M., and de Haas, G.H. 1990. Function of the fully conserved residues Asp99, Tyr52 and Tyr73 in phospholipase A2. *Protein Eng* **4**: 199-204.
- Kumar, A., Sekharudu, C., Ramakrishnan, B., Dupureur, C.M., Zhu, H., Tsai, M.D., and Sundaralingam, M. 1994. Structure and function of the catalytic site mutant Asp 99 Asn of phospholipase A2: absence of the conserved structural water. *Protein Sci* **3**: 2082-2088.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, C.C., and Her, G.R. 2000. Analysis of phospholipase A2 glycosylation patterns from venom of individual bees by capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometry using an ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 2012-2018.
- Lambeau, G., and Lazdunski, M. 1999. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 162-170.
- Lathrop, B.K., Burack, W.R., Biltonen, R.L., and Rule, G.S. 1992. Expression of a group II phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus* in *Escherichia coli*: recovery and renaturation from bacterial inclusion bodies. *Protein Expr Purif* **3**: 512-517.
- Lawrence, A.J., and Moores, G.R. 1975. Activation of bee venom phospholipase A2 by fatty acids, aliphatic anhydrides and glutaraldehyde. *FEBS Lett* **49**: 287-291.
- Lefkowitz, L.J., Deems, R.A., and Dennis, E.A. 1999. Expression of group IA phospholipase A2 in *Pichia pastoris*: identification of a phosphatidylcholine activator site using site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **38**: 14174-14184.
- Lei, S.P., Lin, H.C., Wang, S.S., Callaway, J., and Wilcox, G. 1987. Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. *J Bacteriol* **169**: 4379-4383.
- Li, Y., Coutinho, P.M., and Ford, C. 1998. Effect on thermostability and catalytic activity of introducing disulfide bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Eng* **11**: 661-667.
- Liang, N.S., Pungercar, J., Krizaj, I., Strukelj, B., and Gubensek, F. 1993. Expression of fully active ammodytoxin A, a potent presynaptically neurotoxic phospholipase A2, in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **334**: 55-59.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 497-501.
- Lin, G., Noel, J., Loffredo, W., Stable, H.Z., and Tsai, M.D. 1988. Use of short-chain cyclopentano-phosphatidylcholines to probe the mode of activation of phospholipase A2 from bovine pancreas and bee venom. *J Biol Chem* **263**: 13208-13214.
- Lin, G., Wu, F.C., and Liu, S.H. 1993. Phospholipase A2 in Catalysis in Organic Media. *Tetrahedron Lett* **34**: 1959-1962.
- Lin, Y., Nielsen, R., Murray, D., Hubbel, W.L., Mailer, C., Robinson, B.H., and Gelb, M.H. 1998. Docking phospholipase A2 on membranes using electrostatic potential-mediated spin relaxation magnetic resonance. *Science* **279**: 1925-1929.
- Lio, Y.C., and Dennis, E.A. 1998. Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1392**: 320-332.

- Maiti, N.R., and Surewicz, W.K. 2001. The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein. *J Biol Chem* **276**: 2427-2431.
- Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**: 512-538.
- Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., and Gross, R.W. 2000. The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* **275**: 9937-9945.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R., and Eijssink, V.G. 1997. Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J Biol Chem* **272**: 11152-11156.
- Manya, H., Aoki, J., Kato, H., Ishii, J., Hino, S., Arai, H., and Inoue, K. 1999. Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **274**: 31827-31832.
- Markert, Y., Koeditz, J., Mansfeld, J., Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Increased proteolytic resistance of ribonuclease A by protein engineering. *Protein Eng* **14**: 791-796.
- May, C., Preisig-Muller, R., Hohne, M., Gnau, P., and Kindl, H. 1998. A phospholipase A2 is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. *Biochim Biophys Acta* **1393**: 267-276.
- Mayr, L.M., Willbold, D., Landt, O., and Schmid, F.X. 1994. Role of the Cys 2-Cys 10 disulfide bond for the structure, stability, and folding kinetics of ribonuclease T1. *Protein Sci* **3**: 227-239.
- McIntosh, J.M., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Dooley, D.J., Stoehr, S.J., Giordani, A.B., Naisbitt, S.R., and Olivera, B.M. 1995. Conodipine-M, a novel phospholipase A2 isolated from the venom of the marine snail *Conus magus*. *J Biol Chem* **270**: 3518-3526.
- McPhalen, C.A., Strynadka, N.C., and James, M.N. 1991. Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv Protein Chem.* **42**: 77-144.
- Middelberg, A.P.J. 2002. Preparative protein refolding. *TIBTECH* **20**: 437-443.
- Misawa, S., and Kumagai, I. 1999. Refolding of Therapeutic Proteins Produced in *Escherichia coli* as Inclusion Bodies. *Biopolymers* **51**: 297-307.
- Missiakas, D., and Raina, S. 1997. Protein Folding in the Bacterial Periplasm. *J Biotechnol* **179**: 2465-2471.
- Mitraki, A., and King, J. 1989. Protein Folding Intermediates and Inclusion Body Formation. *Biotechnology* **7**: 690-696.
- Mounier, C.M., Bon, C., and Kini, R.M. 2001. Anticoagulant venom and mammalian secreted phospholipases A(2): protein- versus phospholipid-dependent mechanism of action. *Haemostasis* **31**: 279-287.
- Munjal, D. and Elliott, W.B. 1972. Further studies on the properties of phospholipase A from honeybee (*Apis mellifera*) venom. *Toxicon* **10**: 367-375.
- Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., and Kudo, I. 1999. Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* **274**: 3103-3115.
- Murakami, M. and Kudo, I. 2002. Phospholipase A(2). *J Biochem (Tokyo)* **131**: 285-292.
- Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., and Kudo, I. 1997. Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* **17**: 225-283.
- Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M.V., Tischfield, J.A., and Kudo, I. 1998. The functions of five distinct mammalian phospholipase A2s in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2s are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **273**: 14411-14423.

- Nair, C., Hermanns, J., Munjal, D., and Elliott, W.B. 1976. Temperature stability of phospholipase A activity. I. Bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. *Toxicon* **14**: 35-42.
- Nalefski, E.A., Sultzman, L.A., Martin, D.M., Kriz, R.W., Towler, P.S., Knopf, J.L., and Clark, J.D. 1994. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain. *J Biol Chem* **269**: 18239-18249.
- Nalefski, E.A., Wisner, M.A., Chen, J.Z., Sprang, S.R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., and Falke, J.J. 2001. C2 domains from different Ca<sup>2+</sup> signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* **40**: 3089-3100.
- Neumann, W., and Habermann, E. 1954. Phospholipase A of the bee venom. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **296**: 166-179.
- Nicolas, J.P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., and Gelb, M.H. 1997. Localization of Structural Elements of Bee Venom Phospholipase A2 Involved in N-type Receptor Binding and Neurotoxicity. *J Biol Chem* **272**: 7173-7181.
- Niessen, H.W., Krijnen, P.A., Visser, C.A., Meijer, C.J., and Erik Hack, C. 2003. Type II secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: a mediator in atherosclerosis and ischemic damage to cardiomyocytes? *Cardiovasc Res* **60**: 68-77.
- Nigam, S., and Schewe, T. 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **1488**: 167-181.
- Noel, J.P. and Tsai, M.D. 1989. Phospholipase A<sub>2</sub> Engineering: Design, Synthesis, and Expression of a Gene for Bovine (Pro)Phospholipase A<sub>2</sub>. *J Cell Biochem* **40**: 309-320.
- Othman, R., Baker, S., Li, Y., Worrall, A.F., and Wilton, D.C. 1996. Human non-pancreatic (group II) secreted phospholipase A2 expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*: characterization of N-terminal mutants. *Biochim Biophys Acta* **1303**: 92-102.
- Pace, C.N. 1990. Measuring and increasing protein stability. *Trend Biotechnol* **8**: 93-98.
- Pace, C.N., Grimsley, G.R., Thomson, J.A., and Barnett, B.J. 1988. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *J Biol Chem* **263**: 11820-11825.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., and Thomson, J.A. 1989. Measuring the conformational stability of a protein. In Protein Structure – a practical approach. Oxford, IRL Press.
- Pan, F.M., Yeh, M.S., Chang, W.C., Hung, C.C., and Chiou, S.H. 1994. Sequence Analysis And Expression Of Phospholipase A<sub>2</sub> From Taiwan Cobra. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 969-976.
- Panda, A.K. 2003. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **85**: 43-93.
- Patel, K.D., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., and McIntyre, T.M. 1992. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *J Biol Chem* **267**: 15168-15175.
- Peplow, P.V. 1999. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 65-82.
- Pernas, P., Masliah, J., Olivier, J.L., Salvat, C., Reybkine, T., and Berenziat, G. 1991. Type II phospholipase A2 recombinant overexpression enhances stimulated arachidonic acid release. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 1298-1305.
- Pernas, P., Olivier, J.L., Legoy, M.D., and Berenziat, G. 1990. Phospholipid synthesis by extracellular Phospholipase A2 in organic solvent. *Biochem Biophys Res Commun* **168**: 644-650.
- Pickard, R.T., Striffler, B.A., Kramer, R.M., and Sharp, J.D. 1999. Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**: 8823-8831.

- Pjura, P.E., Matsumura, M., Wozniak, J.A., and Matthews, B.W. 1990. Structure of a thermostable disulfide-bridge mutant of phage T4 lysozyme shows that an engineered cross-link in a flexible region does not increase the rigidity of the folded protein. *Biochemistry* **29**: 2592-2598.
- Plückthun, A., Dennis, E.A. 1981. Phospholipase A2 Hydrolysis of Phospholipids: Use of <sup>31</sup>P NMR to Study the Hydrolysis, Acyl Migration, Regiospecific Synthesis, and Solubilization of Phospholipids. *Phosphorus Chemistry* **171**: 591-594.
- Plückthun, A., Dennis, E.A. 1985. Activation, aggregation, and product inhibition of cobra venom phospholipase A2 and comparison with other phospholipases. *J Biol Chem* **260**: 11099-11106.
- Ramchuran, S.O., Nordberg Karlsson, E., Velut, S., De Mare, L., Hagander, P., and Holst, O. 2002. Production of heterologous thermostable glycoside hydrolases and the presence of host-cell proteases in substrate limited fed-batch cultures of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 408-416.
- Ramirez, F., and Jain, M.K. 1991. Phospholipase A2 at the bilayer interface. *Proteins* **9**: 229-239.
- Raykova, D., and Blagoev, B. 1986. Hydrolysis of short-chain phosphatidylcholines by bee venom phospholipase A2. *Toxicon* **24**: 791-797.
- Rouault, M., Bollinger, J.G., Lazdunski, M., Gelb, M.H., and Lambeau, G. 2003. Novel Mammalian Group XII Secreted Phospholipase A<sub>2</sub> Lacking Enzymatic Activity. *Biochemistry* **42**: 11494-11503.
- Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutierrez, J.M., Luly, P., Massoud, R., Morero, R., and Pedersen, J.Z. 1992. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. *Biochemistry* **31**: 12424-12430.
- Ryan, W., Collier, P., Loredo, L., Pope, J., and Sachdev, R. 1996. Growth Kinetics of *Escherichia coli* and Expression of a Recombinant Protein and Its Isoforms under Heat Shock Conditions. *Biotechnol Prog* **12**: 596-601.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santoro, M.M., and Bolen, D.W. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**: 8063-8068.
- Schmid, F.X. 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. IN: *Protein Structure: A practical approach*. 261-279.
- Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., and Sigler, P.B. 1990a. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue [published erratum appears in *Science* 1991 May 10;252(5007):764]. *Science* **250**: 1563-1566.
- Scott, D.L., and Sigler, P.B. 1994a. The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A2. *Adv Inorg Biochem* **10**: 139-155.
- Scott, D.L., and Sigler, P.B. 1994b. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A2. *Adv Protein Chem* **45**: 53-88.
- Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., and Sigler, P.B. 1990b. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* **250**: 1541-1546.
- Seilhamer, J.J., Randall, T.L., Yamanaka, M., and Johnson, L.K. 1986. Pancreatic phospholipase A2: isolation of the human gene and cDNAs from porcine pancreas and human lung. *DNA* **5**: 519-527.
- Sekar, K., Yu, B.Z., Rogers, J., Lutton, J., Liu, X., Chen, X., Tsai, M.D., Jain, M.K., and Sundaralingam, M. 1997. Phospholipase A2 engineering. Structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-99. *Biochemistry* **36**: 3104-3114.

- Sekharudu, C., Ramakrishnan, B., Huang, B., Jiang, R.T., Dupureur, C.M., Tsai, M.D., and Sundaralingam, M. 1992. Crystal structure of the Y52F/Y73F double mutant of phospholipase A2: increased hydrophobic interactions of the phenyl groups compensate for the disrupted hydrogen bonds of the tyrosines. *Protein Sci* **1**: 1585-1594.
- Senda, K., Yoshioka, H., Doke, N., and Kawakita, K. 1996. A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin. *Plant Cell Physiol* **37**: 347-353.
- Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R., et al. 1991. Molecular cloning and expression of human Ca(2+)-sensitive cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **266**: 14850-14853.
- Shin, C.S., Hong, M.S., Bae, C.S., and Lee, J. 1997. Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch cultures at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2]. *Biotechnol Prog* **13**: 249-257.
- Shipolini, R.A., Callewaert, G.L., Cottrell, R.C., Doonan, S., Vernon, C.A., and Banks, B.E. 1971. Phospholipase A from bee venom. *Eur J Biochem* **20**: 459-468.
- Six, D.A., and Dennis, A. 2000. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488**: 1-19.
- Snitko, Y., Koduri, R.S., Han, S.K., Othman, R., Baker, S.F., Molini, B.J., Wilton, D.C., Gelb, M.H., and Cho, W. 1997. Mapping the interfacial binding surface of human secretory group IIa phospholipase A2. *Biochemistry* **36**: 14325-14333.
- Song, C., Chang, X.J., Bean, K.M., Proia, M.S., Knopf, J.L., and Kriz, R.W. 1999. Molecular characterization of cytosolic phospholipase A2-beta. *J Biol Chem* **274**: 17063-17067.
- Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. 1997. Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* **272**: 17895-17898.
- Stahelin, R.V., and Cho, W. 2001. Roles of calcium ions in the membrane binding of C2 domains. *Biochem J* **359**: 679-685.
- Stahelin, R.V., Rafter, J.D., Das, S., and Cho, W. 2003. The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C-alpha and group IVa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*. **278**: 12452-12460.
- Stahl, U., Lee, M., Sjudahl, S., Archer, D., Cellini, F., Ek, B., Iannacone, R., MacKenzie, D., Semeraro, L., Tramontano, E., et al. 1999. Plant low-molecular-weight phospholipase A2S (PLA2s) are structurally related to the animal secretory PLA2s and are present as a family of isoforms in rice (*Oryza sativa*). *Plant Mol Biol* **41**: 481-490.
- Stemmer, W.P. 1994. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Stemmer, W.P., Cramer, A., Ha, K.D., Brennan, T.M., and Heyneker, H.L. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **164**: 49-53.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89.
- Sun, Y.M., Liu, W., Zhu, R.H., Goudet, C., Tytgat, J., and Wang, D.C. 2002. Roles of disulfide bridges in scorpion toxin BmK M1 analyzed by mutagenesis. *J Pept Res* **60**: 247-256.
- Swartz, J.R. 2001. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* **12**: 195-201.
- Taketo, M.M., and Sonoshita, M. 2002. Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 72-76.
- Tanaka, T., Kimura, S., and Ota, Y. 1988. Secretion of the proenzyme and active bovine pancreatic phospholipase A2 enzyme by *Saccharomyces cerevisiae*: design and use of a synthetic gene. *Gene* **64**: 257-264.

- Tang, J., Kriz, R.W., Wolfman, N., Shaffer, M., Seehra, J., and Jones, S.S. 1997. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. *J Biol Chem* **272**: 8567-8575.
- Thornton, J.M. 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol* **151**: 261-287.
- Thunnissen, M.M., Ab, E., Kalk, K.H., Drenth, J., Dijkstra, B.W., Kuipers, O.P., Dijkman, R., de Haas, G.H., and Verheij, H.M. 1990. X-ray structure of phospholipase A2 complexed with a substrate-derived inhibitor. *Nature* **347**: 689-691.
- Tjoelker, L.W., and Stafforini, D.M. 2000. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1488**: 102-123.
- Tjoelker, L.W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D.M., Dietsch, G., Schimpf, B., Hooper, S., Le Trong, H., Cousens, L.S., Zimmerman, G.A., et al. 1995. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **374**: 549-553.
- Tselepis, A.D., and John Chapman, M. 2002. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl* **3**: 57-68.
- Tseng, A., Buchta, R., Goodman, E., Loughnan, M., Cairns, D., Seilhamer, J., Johnson, L., Inglis, A.S., and Scott, K.F. 1991. A Strategy for Obtaining Active Mammalian Enzyme from a Fusion Protein Expressed in Bacteria Using Phospholipase A<sub>2</sub> as a Model. *Prot Expr Pur* **2**: 127-135.
- Underwood, K.W., Song, C., Kriz, R.W., Chang, X.J., Knopf, J.L., and Lin, L.L. 1998. A novel calcium-independent phospholipase A2, cPLA2-gamma, that is prenylated and contains homology to cPLA2. *J Biol Chem* **273**: 21926-21932.
- Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. 1999a. On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem* **274**: 31195-31202.
- Valentin, E., Koduri, R.S., Scimeca, J.C., Carle, G., Gelb, M.H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. 1999b. Cloning and recombinant expression of a novel mouse-secreted phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**: 19152-19160.
- van den Bergh, C.J., Bekkers, A.C., De Geus, P., Verheij, H.M., and de Haas, G.P. 1987. Secretion of biologically active porcine prophospholipase A2 in *Saccharomyces cerevisiae*. Use of the prepro sequence of the alpha-mating factor. *Eur J Biochem* **170**: 241-246.
- Ward, R.J., Alves, A.R., Ruggiero Neto, J., Arni, R.K., and Casari, G. 1998. A SequenceSpace analysis of Lys49 phospholipases A2: clues towards identification of residues involved in a novel mechanism of membrane damage and in myotoxicity. *Protein Eng* **11**: 285-294.
- Ward, R.J., Chioato, L., de Oliveira, A.H., Ruller, R., and Sa, J.M. 2002. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem J* **362**: 89-96.
- Ward, R.J., de Oliveira, A.H., Bortoleto, R.K., Rosa, J.C., Faca, V.M., and Greene, L.J. 2001. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **21**: 134-140.
- White, S.P., Scott, D.L., Otwinowski, Z., Gelb, M.H., and Sigler, P.B. 1990. Crystal structure of cobra-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue. *Science* **250**: 1560-1563.
- Winstead, M.V., Balsinde, J., and Dennis, E.A. 2000. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1488**: 28-39.
- Zabriskie, D.W., Wareheim, D.A., and Polansky, M.J. 1987. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol* **2**: 87-95.

- Zavodszky, M., Chen, C.W., Huang, J.K., Zolkiewski, M., Wen, L., and Krishnamoorthi, R. 2001. Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Sci* **10**: 149-160.
- Zhong, X., Liu, J., Wu, X., and Zhou, Y. 2001. Expression, Purification and biochemical characterization of a recombinant phospholipase A<sub>2</sub> with anticoagulant activity from *Adkistrodon halys pallas*. *J Nat Toxins* **10**: 17-25.
- Zhu, H., Dupureur, C.M., Zhang, X., and Tsai, M.D. 1995. Phospholipase A2 engineering. The roles of disulfide bonds in structure, conformational stability, and catalytic function. *Biochemistry* **34**: 15307-15314.

## **7. Anhang**

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe von mir erstellt wurde. Es wurden nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Aus Publikationen und Werken entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, auch nicht veröffentlicht.

Yvonne Markert

Penzberg, den 21.03.2004

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen der Promotionsarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann danke ich für die Überlassung des interessanten biotechnologischen Themas und die Betreuung der Arbeit.

Frau Dr. Mansfeld danke ich für die Hilfestellung bei den alltäglichen kleinen Laborproblemen und für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Frau Dipl.-Biochem. Alexandra Lerchner möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit im Labor danken, für die Aufmunterung in schlechten Phasen und für die vielen konstruktiven Diskussionen zum Thema lösliche Expression kontra *inclusion bodies*.

Herrn Dr. Peter Dürschmidt möchte ich ebenfalls vor allem für die konstruktive Kritik bei der Auswertung und Interpretation spektroskopischer Daten sowie für die ständige Einsatzbereitschaft im Labor danken.

Dr. Jens Köditz und Dr. Ulrich Arnold danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem RNase-Gebiet.

Herrn Dipl.-Ing. Marco Jenzsch danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft bei der Fermentationsproblematik und für die Glucose-Bestimmung der Fermentationsproben.

Frau Dr. Schierhorn und Herrn Dr. Rücknagel danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und der Proteinsequenzierung.

Weiterhin gilt mein Dank der Bundesstiftung Deutsche Umwelt (DBU), für die finanzielle Unterstützung des Projekts.

Der Firma Lipoid und hier vor allem Frau Rebmann danke ich für die gute Zusammenarbeit im Projekt sowie für die Bereitstellung von Phospholipiden.

Allen Mitarbeitern der AG Ulbrich-Hofmann und des Instituts für Biotechnologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Besonders gilt hier mein Dank Frau Weichelt.

Besonders danke ich meiner Familie für die Unterstützung während der Promotionszeit.

## Lebenslauf

Name: Yvonne Markert  
Geburtsdatum: 25.04.1977  
Geburtsort: Halle

### Schulbildung

1983 – 1991 Polytechnische Oberschule in Kirchberg  
  
1991 – 1995 Gymnasium „Christoph-Graupner“ in Kirchberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Berufsausbildung

10/1995 – 07/2000 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle  
Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie in der Abteilung „Technische Enzymologie“ bei Prof. R. Ulbrich-Hofmann in Halle zum Thema: „Design einer proteasestabilen Ribonuclease A“  
Abschluss: Diplom-Biochemikerin (Prädikat: „Sehr Gut“)

09/2000 – 12/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biotechnologie, in der Abteilung „Technische Enzymologie“ bei Prof. R. Ulbrich-Hofmann in Halle  
Anfertigung der Promotionsarbeit zum Thema: „Gewinnung und gentechnische Modifizierung einer rekombinanten Phospholipase A<sub>2</sub> zur industriellen Anwendung“

06/2003 – 07/2003 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. T. Raines (Department of Biochemistry, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)

seit 03/2004                      Postdoc bei Roche Diagnostics GmbH, Department Centralized  
Diagnostics in Penzberg  
Tätigkeitsgebiet: Herstellung rekombinanter      Autoimmunanti-  
gene für den diagnostischen Einsatz

**Auszeichnungen**

2001                                      DECHEMA-Studentenpreis für Biotechnologie  
05/2002 – 05/2004                      Forschungsstipendium der Max-Buchner-Stiftung

Yvonne Markert

Penzberg, den 21.03.2004

## Publikationen

**Markert, Y.**, Köditz, J., Mansfeld, J., Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (2001). Increased proteolytic resistance of ribonuclease A by protein engineering. *Protein Eng.*, 14: 791-796.

Ulbrich-Hofmann, R., Mansfeld, J., Arnold, U., Köditz, J., **Markert, Y.** and Dürschmidt, P. (2002). Lokal contra global - Strukturloops als Determinanten der Proteinstabilität. *Bioforum.*,1-2, 14-17.

**Markert, Y.**, Köditz, J., Ulbrich-Hofmann, R. and Arnold U. (2003). Proline versus charge concept for protein stabilization against proteolytic attack. *Protein Eng.*, 16, 1041-1046.

## Patent

**Markert, Y.**, Mansfeld, J. und Ulbrich-Hofmann, R. (2003). Verfahren zur Herstellung von Phospholipase A<sub>2</sub>, DE 10355838.1. Patentanmeldung

## Posterpräsentationen

**Markert, Y.**, Köditz, J., Mansfeld, J., Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2000). The influence of the mutation Ala20Pro on the proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *GBM-Herbsttagung, München.*

Köditz, J., **Markert, Y.**, Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2001). The influence of mutations in the unfolding region of ribonuclease A on its thermodynamic stability. *DECHEMA-Tagung der Biotechnologen, Leipzig.*

**Markert, Y.**, Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Expression, refolding and purification of a synthetic gene encoding phospholipase A<sub>2</sub> from honey bee. *BIOCAT, Hamburg*.

**Markert, Y.**, Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Construction of a synthetic gene encoding phospholipase A<sub>2</sub> from honey bee and its expression in *E. coli*. *GVC-DECHEMA-Tagung, Wiesbaden*.

Köditz, J., **Markert, Y.**, Golbik, R., and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Ribonuclease A in trifluorethanol – A study on unfolding by proteolysis and stopped-flow fluorescence spectroscopy. *Falvertage 2002 – Self-organization and structure function relation of biomolecules, Wittenberg*.

**Markert, Y.**, Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. (2003). Scale up of the production of a recombinant phospholipase A<sub>2</sub> from honey bee. *DECHEMA-Tagung, München*.

Köditz, J., **Markert, Y.**, Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (2003). Probing the unfolding region of ribonuclease A by site-directed mutagenesis. *Falvertage, Wittenberg*.