

# Entfaltung und Autoproteolyse der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* und einer Disulfid-modifizierten Variante

## 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 Herrn

Peter Dürrschmidt

geboren am 02.03.1972 in Naumburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. Vincent Eijsink, Agricultural University of Norway
3. Prof. Dr. Hans Bisswanger, Eberhard Karls Universität Tübingen

Halle (Saale), den 15.08.2003

Verteidigungsdatum: 03.12.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000005999**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000005999>]

---

*Für Nicole, Larissa und Samuel.*

---

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. Theorie</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1. Proteinstabilität</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1.1. Determinanten und Definition der Proteinstabilität             | 3         |
| 2.1.2. Irreversible Denaturierung                                     | 5         |
| 2.1.3. Bestimmung von Stabilitätsparametern                           | 6         |
| <b>2.2. Proteinstabilisierung</b>                                     | <b>8</b>  |
| 2.2.1. Stabilisierungsstrategien                                      | 8         |
| 2.2.2. Der Effekt von Disulfidbrücken                                 | 10        |
| 2.2.3. Das Konzept von der Entfaltungsregion                          | 13        |
| <b>2.3. Autoproteolyse</b>  | <b>15</b> |
| <b>2.4. Die Gruppe der Thermolysin-ähnlichen neutralen Protetasen</b> | <b>17</b> |
| 2.4.1. Einteilung und Katalysemechanismus                             | 17        |
| 2.4.2. Struktur und Kalziumbindung                                    | 18        |
| 2.4.3. Entfaltung und Autoproteolyse                                  | 19        |
| 2.4.4. Die neutrale Protease aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>   | 21        |
| <b>3. Materialien und Methoden</b>                                    | <b>25</b> |
| <b>3.1. Materialien</b>   | <b>25</b> |
| 3.1.1. Chemikalien  | 25        |
| 3.1.2. Proteine und Kits  | 26        |
| 3.1.3. Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien                     | 26        |
| 3.1.4. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer                | 27        |
| 3.1.5. Reagenzien und Lösungen  | 27        |
| 3.1.6. Nährmedien   | 28        |
| <b>3.2. Methoden</b>  | <b>29</b> |
| 3.2.1. Computer-Modellierung  | 29        |
| 3.2.2. Molekularbiologische Methoden                                  | 29        |
| 3.2.3. Expression und Reinigung der Enzymvarianten                    | 30        |
| 3.2.4. Aktivitätsmessung  | 32        |
| 3.2.4.1. Caseintest   | 32        |
| 3.2.4.2. FAGLA-Test   | 33        |
| 3.2.4.3. Abz-AGLA-Nba-Test  | 33        |
| 3.2.5. Proteinchemische und biophysikalische Methoden                 | 33        |
| 3.2.5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test             | 33        |
| 3.2.5.2. NaDOC-Fällung  | 33        |
| 3.2.5.3. SDS-Gelelektrophorese  | 34        |
| 3.2.5.4. Isoelektrische Fokussierung                                  | 34        |
| 3.2.5.5. Carbamidomethylierung von Cysteinresten                      | 34        |
| 3.2.5.6. Gelfiltration  | 35        |
| 3.2.5.7. Reversed-phase-Chromatographie                               | 35        |
| 3.2.5.8. Analytische Ultrazentrifugation                              | 36        |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.5.9. Massenspektrometrie .....                                | 36 |
| 3.2.6. Spektroskopische Methoden .....                            | 36 |
| 3.2.6.1. Fluoreszenz-Spektroskopie .....                          | 37 |
| 3.2.6.2. CD-Spektroskopie .....                                   | 38 |
| 3.2.7. Bestimmung der kinetischen Konstanten .....                | 39 |
| 3.2.7.1. Kinetische Messungen unter Entfaltungsbedingungen .....  | 39 |
| 3.2.7.2. Kinetische Messungen unter Rückfaltungsbedingungen ..... | 40 |
| 3.2.7.3. Statistische Auswertung .....                            | 42 |

## **4. Ergebnisse und Diskussion .....** **43**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.1. Charakterisierung der Enzyme.....</b>   | <b>43</b> |
| 4.1.1. Enzymvarianten der neutralen Protease aus <i>B. stearothermophilus</i> .....   | 43        |
| 4.1.2. Nativspektren von pWT, G8C/N60C und W55F .....   | 44        |
| 4.1.3. Spektren der entfalteten und autoproteolytisch-abgebauten Enzyme – Anwendung für Entfaltungsmessungen.....   | 47        |
| 4.1.4. Prüfung auf Assoziation und Aggregation .....  | 50        |
| 4.1.5. Zugänglichkeit der Tryptophanreste .....   | 51        |
| <b>4.2. Temperatur-induzierte Inaktivierung, Entfaltung und Autoproteolyse.....</b>   | <b>55</b> |
| 4.2.1. Thermoinaktivierung .....  | 55        |
| 4.2.2. Temperaturabhängige Entfaltung und Autoproteolyse .....  | 57        |
| <b>4.3. GdnHCl-induzierte Inaktivierung, Entfaltung und Autoproteolyse.....</b>   | <b>62</b> |
| 4.3.1. Vergleich des Aktivitätsverhaltens von pWT in GdnHCl mit dem bei erhöhter Temperatur und in Isopropanol .....  | 62        |
| 4.3.2. Charakterisierung der Autoproteolyse und Entfaltung bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen .....   | 66        |
| 4.3.3. Autoproteolysekinetik in GdnHCl .....  | 69        |
| 4.3.3.1. Autoproteolyse ohne Inhibitor .....  | 69        |
| 4.3.3.2. Einfluss von Inhibitoren auf die Autoproteolyse .....  | 71        |
| 4.3.4. Entfaltungskinetik in GdnHCl .....   | 74        |
| 4.3.4.1. Entfaltungskinetik .....   | 74        |
| 4.3.4.2. Einfluss von CaCl <sub>2</sub> auf die Entfaltungskinetik.....   | 76        |
| 4.3.4.3. Einfluss von Isopropanol auf die Entfaltungskinetik .....  | 82        |
| 4.3.5. Rückfaltung aus GdnHCl .....   | 84        |
| 4.3.5.1. Aggregation und Autoproteolyse bei der Rückfaltung .....   | 84        |
| 4.3.5.2. Fragmentierung bei der Rückfaltung – Hinweise auf primäre Spaltstellen .....   | 86        |
| 4.3.5.3. Reaktivierung .....  | 88        |
| 4.3.5.4. Reaktivierungs- und Autoproteolysekinetiken.....   | 89        |
| 4.3.5.5. Fluoreszenzspektren der renaturierten Enzyme .....   | 91        |
| 4.3.5.6. Proteolyseanfälligkeit des Rückfaltungsintermediats .....  | 92        |
| 4.3.6. Zusammenfassende Diskussion: Gdn-induzierte Entfaltung von pWT und der Einfluss der Disulfidbrücke in G8C/N60C auf lokale und globale Strukturänderungen ..... | 94        |
| 4.3.6.1. Entfaltung und Autoproteolyse von pWT .....  | 94        |
| 4.3.6.3. Vergleich und Schlussfolgerungen aus der Entfaltung von pWT und G8C/N60C... ..   | 100       |
| 4.3.6.4. Rückfaltung von pWT und G8C/N60C und der stabilisierende Einfluss der Disulfidbrücke in G8C/N60C auf die Thermodynamik der Entfaltung.....                   | 101       |

## **5. Zusammenfassung.....** **104**

## **6. Literaturverzeichnis.....** **107**

## Abkürzungsverzeichnis

|                              |   |                                    |  |
|------------------------------|---|------------------------------------|--|
| Abb.                         | Abbildung   | IEF                                | isoelektrische Fokussierung  |
| Abz-AGLA- Nba                | 2-Aminobenzoyl- Ala-Gly-<br>Leu-Ala-4-Nitrobenzylamid | k<br>k <sup>0</sup>                | Geschwindigkeitskonstante<br>Geschwindigkeitskonstante<br>unter Standardbedingungen                                    |
| ACN                          | Acetonitril   |                                    |  |
| <i>B.</i>                    | <i>Bacillus</i>                                       | k <sub>0</sub>                     | Geschwindigkeitskonstante<br>in Abwesenheit von Kalzium  |
| BCA                          | Bichinchoninsäure                                     |                                    |  |
| BSA                          | Rinderserumalbumin                                    | K <sub>an</sub>                    | Kanamycin  |
| CaI bis CaIV                 | Kalziumbindungsstellen I<br>bis IV im Protein         | k <sub>B</sub><br>k <sub>cat</sub> | Boltzmann-Konstante<br>Katalysekonstante   |
| CD                           | Circulardichroismus                                   | K <sub>eff</sub>                   | effektive <i>Quench</i> -Konstante   |
| D                            | denaturiertes Enzym                                   | k <sub>ext</sub>                   | extrapolierte  |
| Da                           | Dalton  |                                    | Geschwindigkeitskonstante  |
| DMF                          | Dimethylformamid                                      | k <sub>F</sub>                     | Geschwindigkeitskonstante<br>der Faltung   |
| DMSO                         | Dimethylsulfoxid                                      |                                    |  |
| DNA                          | Desoxyribonukleinsäure                                | k <sub>I</sub>                     | Geschwindigkeitskonstante<br>der irreversiblen Inaktivie-<br>rung  |
| DTT                          | 1,4-Dithiothreitol                                    |                                    |  |
| ΔG                           | freie Enthalpie                                       |                                    |  |
| ΔG <sup>0</sup>              | freie Enthalpie unter<br>Standardbedingungen          | K <sub>m</sub><br>k <sub>obs</sub> | Michaelis-Menten-Konstante<br>beobachtete Geschwindig-<br>keitskonstante   |
| ΔG <sup>#</sup> <sub>U</sub> | freie Aktivierungsenthalpie<br>der Entfaltung         | k <sub>p</sub>                     | Geschwindigkeitskonstante<br>der Autoproteolyse  |
| ΔH                           | Enthalpie   |                                    |  |
| ΔH <sup>#</sup>              | Aktivierungsenthalpie                                 | K <sub>SV</sub>                    | Stern-Volmer-Konstante   |
| ΔS                           | Entropie  | k <sub>U</sub>                     | Geschwindigkeitskonstante<br>der Entfaltung  |
| ΔS <sup>#</sup>              | Aktivierungsentropie                                  |                                    |  |
| E                            | aktives Enzym   | LB                                 | Luria broth  |
| <i>E.</i>                    | <i>Escherichia</i>                                    | m                                  | Anstieg: $\partial \ln(k)/\partial [\text{GdnHCl}]$<br>oder $\partial \lg(k_{\text{obs}})/\partial \lg[\text{CaCl}_2]$ |
| E <sub>0</sub>               | Enzym-Ausgangs-<br>konzentration                      | MALDI-MS                           | Matrix-unterstützte Laser-<br>desorption-Ionisations-<br>Massenspektrometrie   |
| EDTA                         | Ethylendiamintetra-<br>essigsäure                     |                                    |  |
| ESI-MS                       | Elektrospray-Ionisations-<br>Massenspektrometrie      | m <sub>F</sub><br>M <sub>F</sub>   | $\partial \Delta G^{\#}_F / \partial [\text{GdnHCl}]$<br>molare Masse  |
| F                            | Fluoreszenzemission                                   | m <sub>u</sub>                     | $\partial \Delta G^{\#}_U / \partial [\text{GdnHCl}]$  |
| F0                           | Ausgangsfluoreszenz                                   | N                                  | natives Enzym  |
| FAGLA                        | <i>N</i> -(3-[2-furyl]acryloyl)-<br>Gly-Leu-amid      | NaDOC<br>NATA                      | Natriumdesoxycholat<br><i>N</i> -Acetyl-Tryptophanamid   |
| FPLC                         | <i>fast protein liquid<br/>chromatography</i>         | NMR<br>NPste                       | Kernmagnetische Resonanz<br>neutrale Protease aus <i>B.</i><br><i>stearothermophilus</i>                               |
| GdnHCl                       | Guanidinhydrochlorid                                  |                                    |  |
| h                            | Planksches<br>Wirkungsquantum                         | OD <sub>500</sub><br>oPA           | optische Dichte bei 500 nm<br><i>o</i> -Phenanthrolin  |
| HIV                          | <i>human immunodeficiency<br/>virus</i>               | P<br>PEG                           | Produkt<br>Polyethylenglycol   |
| HPLC                         | <i>high performance liquid<br/>chromatography</i>     | pET-28b(+)-<br>NPste               | Plasmid (NPste-Sequenz)  |
| I                            | Intermediat   | pGE501                             | Plasmid (NPste-Sequenz)  |

---

|                                      |   |                        |  |
|--------------------------------------|---|------------------------|--|
| pI                                   | isoelektrischer Punkt                           | T <sub>50</sub>        | Temperatur bei der nach 30-<br>minütiger Inkubation noch<br>50% der Ausgangsaktivität<br>vorliegen |
| pGE530                               | Plasmid (pWT-Sequenz)                           |                        |  |
| pWT                                  | Pseudowildtyp                                   |                        |  |
| Q                                    | <i>Quencher</i> (Acrylamid)                     |                        |  |
| ⊖ <sub>MRW</sub>                     | molare Elliptizität pro<br>Aminosäurerest       | TCA<br>TFA             | Trichloressigsäure<br>Trifluoressigsäure   |
| R                                    | molare Gaskonstante                             | TLPs                   | Thermolysin-ähnliche<br>Proteasen  |
| RF                                   | relative Fluoreszenz-<br>intensität             | Tris                   | Tris-(hydroxymethyl)-<br>aminomethan   |
| RF <sub>334</sub> /RF <sub>354</sub> | Quotient aus RF bei 334 nm<br>und RF bei 354 nm | TY                     | Trypton-Hefe   |
| RNase                                | Ribonuklease                                    |                        |  |
| RP                                   | <i>reversed phase</i>                           | UV                     | ultraviolett   |
| S <sub>0</sub>                       | Ausgangskonzentration an<br>Substrat            | ÜZ<br>ÜZ <sub>ID</sub> | Übergangszustand<br>ÜZ von I zu D  |
| SDS                                  | Natriumdodecylsulfat                            | ÜZ <sub>NI</sub>       | ÜZ von N zu I  |
| T                                    | absolute Temperatur                             | V                      | statische <i>Quench</i> -Konstante   |
| Tab.                                 | Tabelle   | Z                      | Endzustand   |

Anglizismen wurden in dieser Arbeit nur dann benutzt, wenn sie feste Bestandteile des Sprachgebrauchs in der heutigen Biochemie sind. Diese Wörter sind kursiv gedruckt.

## 1. Einleitung

Die Stabilisierung von Proteinen zum Erhalt ihrer biologischen Aktivität ist ein zentrales Thema in der biotechnologischen Forschung. Insbesondere bei Enzymen steht hierbei die Erhöhung der Thermostabilität im Mittelpunkt des Interesses. Das Arbeiten bei erhöhter Temperatur hat den Vorteil, dass Reaktionen schneller ablaufen. Zudem steigt mit der Temperatur auch die Löslichkeit von Substraten und Produkten an und die Viskosität des Mediums sinkt, was bessere Transporteigenschaften zur Folge hat. Bei hohen Temperaturen sinken außerdem die Risiken einer mikrobiellen Kontamination.

Bei industriellen Anwendungen ausschlaggebend für die Thermostabilität sind die Prozesse, die zu einer irreversiblen Denaturierung führen. Insbesondere Proteasen spielen bei biotechnologischen Anwendungen eine Schlüsselrolle und sind mit einem Anteil von 60% die am häufigsten genutzte Enzymgruppe. Mit dem Ziel, die Thermostabilität der neutralen Protease aus *Bacillus (B.) stearothermophilus* (NPste) zu erhöhen, wurden zahlreiche Enzymvarianten erzeugt, die aber z.T. sehr unterschiedliche Stabilisierungserfolge zeigten (Eijsink *et al.*, 1991c; Eijsink *et al.*, 1992a; Eijsink *et al.*, 1992c; Van den Burg *et al.*, 1994). Stark stabilisierende Mutationen sind in der begrenzten Oberflächenregion der Aminosäurepositionen 56-69 lokalisiert (Eijsink *et al.*, 1995; Veltman *et al.*, 1996; Veltman *et al.*, 1997a). Homologie-Modellierung auf der Basis der Röntgen-Kristallstruktur des gut charakterisierten Thermolysins, das eine 86%-ige Sequenzidentität mit NPste aufweist (Takagi *et al.*, 1985; Eijsink *et al.*, 1992b; Inouye *et al.*, 1998), zeigten, dass die Region 56-69 eine *Loop*-Region ist (Vriend & Eijsink, 1993).

Es wurde vermutet, dass an der kritischen Region 56-69 die Entfaltung des Enzyms beginnt (Vriend & Eijsink, 1993; Eijsink *et al.*, 1995; Veltman *et al.*, 1996). Nach dem Modell von der Entfaltungsregion (Schellenberger & Ulbrich, 1989; Ulbrich-Hofmann *et al.*, 1999) sollte eine lokale Stabilisierung dieser Region eine globale Stabilisierung des gesamten Moleküls zu Folge haben. Zur Verifizierung dieses Modells wurden für die gezielte Stabilisierung zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde eine gerichtete Immobilisierung der Protease über die potentielle Entfaltungsregion durchgeführt, die eine bedeutende Steigerung der Thermostabilität bewirkte (Mansfeld *et al.*, 1999; Mansfeld & Ulbrich-Hofmann, 2000). Zum anderen wurde versucht, den *Loop* in seiner Flexibilität einzuschränken. Dazu wurden zwei Cysteinreste in den Positionen 8 und 60 eingeführt, die spontan eine Disulfidbrücke ausbildeten, welche die Region 56-69 mit einer benachbarten Haarnadelschleife verband und auf diese Weise den flexiblen *Loop*-Bereich arretierte (Mansfeld *et al.*, 1997). Als Grundlage

für die Einführung der Disulfidbrücke diente der Cystein-freie Pseudowildtyp (pWT) C288L. Die Enzymvariante G8C/N60C zeigte eine extreme Steigerung der Thermostabilität: Die Temperatur, bei der nach 30-minütiger Inkubation noch 50% der Ausgangsaktivität vorhanden waren, wurde von 75,4°C (pWT) zu 92,1°C (G8C/N60C) verschoben (Mansfeld *et al.*, 1997).

Die bisherigen Untersuchungen an TLPste basieren fast ausschließlich auf Thermoinaktivierungsmessungen. Dabei wurde angenommen, dass - wie bei der neutralen Protease aus *B. subtilis* - eine Entfaltung des Enzyms zur Autoproteolyse durch die noch aktiven Moleküle führt und dass diese Autoproteolyse sich in den Inaktivierungsmessungen widerspiegelt (Eijsink *et al.*, 1991b). Zur Verifizierung der Hypothese, dass die Region 56-69 eine putative Entfaltungsregion darstellt, fehlten bisher separate Messungen der strukturellen Entfaltung und der Autoproteolyse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das Wechselspiel von Entfaltung und Autoproteolyse von pWT und G8C/N60C zu charakterisieren und aus dem Vergleich allgemeine Aussagen über den Inaktivierungsmechanismus der Proteasen und den Einfluss der eingeführten Disulfidbrücke auf die Entfaltung und Autoproteolyse zu erhalten.



## 2. Theorie

### 2.1. Proteinstabilität

#### 2.1.1. Determinanten und Definition der Proteinstabilität

Die **Proteinstruktur** ist in mehreren Ebenen organisiert: der Primärstruktur, der Sekundärstruktur, der Tertiärstruktur und bei oligomeren Proteinen außerdem der Quartärstruktur. Der nativ-gefaltete Zustand ist unter physiologischen Bedingungen durch eine Reihe von schwachen Wechselwirkungen um 20-60 kJ/mol gegenüber dem entfalteten Zustand energetisch begünstigt (Fersht, 1999). Zu diesen **Wechselwirkungen** zählen van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Kauzmann, 1959; Alber, 1989; Murphy, 1995). Außerdem werden Proteine auch entropisch durch bestimmte Strukturelemente (Einbau von Prolinen und Disulfidbrücken) stabilisiert, weil die Flexibilität und damit die Freiheitsgrade der Polypeptidkette verringert werden (Murphy, 1995).

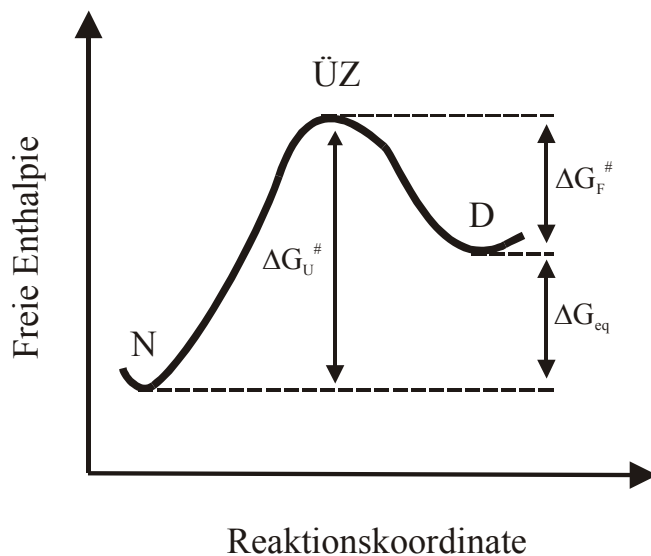
Bisher herrscht noch Unklarheit darüber, welche Wechselwirkungen die Stabilität dominieren. Nach Pace *et al.* (1996) sind es die Wasserstoffbrückenbindungen und die hydrophoben Effekte. Untersuchungen zur Thermostabilität an Kälteschockproteinen führten zum Schluss, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen hauptverantwortlich für die Stabilität sind (Perl *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu finden Chen *et al.* (2000b) bei Thermostabilitätsuntersuchungen an Staphylococcus-Nuklease, dass weder elektrostatische Wechselwirkungen, noch Wasserstoffbrückenbindungen zwingend notwendig, sondern die van der Waals-Wechselwirkungen entscheidend sind.

Unter denaturierenden Bedingungen (hoher Druck, hohe oder niedrige Temperaturen, saurer oder alkalischer pH-Wert, Zusatz chaotroper Salze oder organischer Lösungsmittel u.a.) führt eine - zumindest teilweise - Entfaltung der Polypeptidkette zum Verlust der nativen Konformation des Proteins. Die Stabilität eines Proteins kennzeichnet seine Fähigkeit, diese denaturierenden Einflüsse innerhalb gewisser Grenzen zu tolerieren und die native Konformation aufrecht zu erhalten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll unter **Entfaltung** die strukturelle Änderung des Proteins unter denaturierenden Bedingungen verstanden werden, die insbesondere spektroskopisch gemessen wird. **Autoproteolyse** bezeichnet den proteolytischen Abbau einer

Protease durch sich selbst. Sie ist im Allgemeinen an eine vorherige Entfaltung gebunden. Unter **Denaturierung** sollen die Prozesse verstanden werden, die zu einer Entfaltung oder Autoproteolyse führen. **Inaktivierung** charakterisiert die Aktivitätsabnahme infolge einer Inhibierung oder Denaturierung.

Prinzipiell muss zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität unterschieden werden (Braxton, 1996). In Abbildung (Abb.) 2-1 sind beide in einem Energieschema dargestellt.



**Abb. 2-1: Energieschema für die Änderung der freien Enthalpie der Entfaltung.**

Unter Nativbedingungen ist die Entfaltung des Nativzustandes (N) über den Entfaltungsübergangszustand (ÜZ) zum entfalteten Zustand (D) energetisch ungünstig. Die Differenzen der freien Enthalpien der Zustände beschreiben die Stabilität (weitere Erklärung siehe Text).

Die **thermodynamische Beschreibung der Stabilität** setzt ein reversibles Gleichgewicht zwischen nativem (gefaltetem) und denaturiertem (entfaltetem) Protein – im Folgenden als N und D bezeichnet – voraus (Zwei-Zustandsmodell):



Die freie Enthalpie des Entfaltungsgleichgewichts  $\Delta G_{eq}$  als Maß der thermodynamischen Stabilität ergibt sich aus den Gleichgewichtskonzentrationen an N und D ( $K_{eq} = [D]/[N]$ ) bzw. aus den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung  $k_U$  und der Faltung  $k_F$  (Pace, 1990):

$$\Delta G_{eq} = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq}) = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{[D]}{[N]}\right) = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{k_U}{k_F}\right) \quad [2-2]$$

Dabei bezeichnet R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Ist in Schema [2-1] die Rückfaltung nicht möglich, so kann nur die Entfaltungskinetik, d.h. die **kinetische Beschreibung der Stabilität** betrachtet werden:



Die freie Aktivierungsenthalpie der Entfaltung  $\Delta G^{\#}_U$  als Maß der kinetischen Stabilität beschreibt die Energiebarriere zwischen N und Entfaltungsübergangszustand (ÜZ) und ergibt sich aus der Entfaltungskinetik nach der Eyring-Gleichung zu:

$$\Delta G^{\#}_U = -R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{k_U \cdot h}{k_B \cdot T} \right) \quad [2-4]$$

Dabei stellt  $k_B$  die Boltzmann-Konstante und  $h$  das Planksche Wirkungsquantum dar. (Eine analoge Beziehung gilt auch für die freie Aktivierungsenthalpie der Faltung  $\Delta G^{\#}_F$ .)

Die thermodynamische und die kinetische Stabilität stehen dabei in folgender Relation:

$$\Delta G_{eq} = \Delta G^{\#}_U - \Delta G^{\#}_F \quad [2-5]$$

Die bisherigen Betrachtungen gelten streng genommen nur für reversibel entfaltende Systeme.

### 2.1.2. Irreversible Denaturierung

Wird dem Entfaltungsgleichgewicht zwischen N und D, in einer irreversiblen Folgereaktion D unter Bildung eines Endzustandes Z mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_I$  entzogen, kommt es zu einer irreversiblen Denaturierung, die allgemein mit folgendem Schema (Lumry & Eyring, 1954) beschrieben werden kann:



Der Endzustand Z kann u.a. aggregiertes, missgefaltetes oder proteolytisch abgebautes Protein darstellen. Das Protein kann aber auch als Folge von Deamidierung, Oxidation, Razemisierung und  $\beta$ -Eliminierung chemisch irreversibel verändert sein (Ahern & Klivanov, 1985; Zale & Klivanov, 1986). Durch das Auftreten einer irreversiblen Teilreaktion kommt es zu keiner Gleichgewichtseinstellung, und für die Beschreibung der Stabilität muss die Kinetik betrachtet werden. Nach [2-6] ist die zeitliche Abnahme von N unter stark denaturierenden Bedingungen nur durch die Entfaltung bestimmt (Zale & Klivanov, 1983) und [2-6] reduziert sich auf [2-3]. Gilt  $k_I \gg k_F$ , ist für die zeitliche Abnahme von N auch unter schwach denaturierenden Bedingungen nur die Entfaltung geschwindigkeitsbestimmend und [2-3]

kann unter allen Denaturierungsbedingungen zur Beschreibung der Entfaltung verwendet werden.

Stellt der irreversible Schritt eine Proteolyse dar, so kann die **proteolytische Stabilität** definiert werden. Sie spielt besonders bei Proteasen in Form der **Autoproteolysestabilität** eine Rolle (Sattler *et al.*, 1996; siehe auch 2.4.3.).

### 2.1.3. Bestimmung von Stabilitätsparametern

Zur Messung der Stabilität betrachtet man die Entfaltung unter verschiedenen stark denaturierenden Bedingungen. Für die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität ermittelt man die Gleichgewichtskonstante zwischen N und D bzw. die Geschwindigkeitskonstante der Entfaltungs- und Faltungsreaktion (Pace, 1990). Dabei wird vom Zwei-Zustandsmodell [2-1] ausgegangen, wobei nur N und D miteinander im Gleichgewicht stehen. Sollten Intermediate (I) in der Faltung/Entfaltung auftreten, ist das Zwei-Zustandsmodell nur dann anwendbar, wenn ihre Population vernachlässigbar ist. Zur Bestimmung der kinetischen Stabilität wird die Geschwindigkeitskonstante der Denaturierung gemessen. Sie kann damit zur Bestimmung der Stabilität von irreversibel entfaltenden Systemen verwendet werden.

Am häufigsten wird **Guanidinhydrochlorid** (GdnHCl) als stark chaotropes Salz zur Denaturierung eingesetzt. Die bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen bestimmten freien Enthalpie( $\Delta G$ )-Werte müssen zur Auswertung der Daten nach 0 M GdnHCl extrapoliert werden, um  $\Delta G$  in Wasser ( $\Delta G^0$ ) zu erhalten. Für diese Extrapolation haben sich drei Modelle bewährt: Tanford's Transfer-Modell, das Denaturanzbindungsmodell und das lineare Extrapolationsmodell (Pace, 1986). Alle führen zu sehr ähnlichen Werten für  $\Delta G^0$ , und es ist noch nicht klar, welches Modell die beste Schätzung liefert (Pace, 1986). Am häufigsten wird das lineare Extrapolationsmodell angewendet, das auf der Annahme einer linearen Abhängigkeit von  $\Delta G_{eq}$  bzw.  $\Delta G^\ddagger$  von der Denaturanzkonzentration basiert (Tanford, 1970):

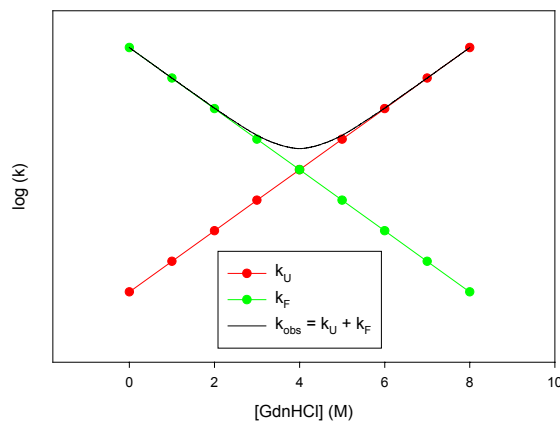
$$\Delta G = \Delta G^0 - m \cdot [GdnHCl] \quad [2-7]$$

Im Folgenden soll besonders auf die kinetische Stabilität eingegangen werden. Aus [2-4] und [2-7] ergibt sich:

$$\ln(k_U) = A \cdot [GdnHCl] - B \quad [2-8]$$

mit  $A = m_u/(R \cdot T)$ ,  $m_u = \partial\Delta G^\#_U/\partial[\text{GdnHCl}]$  und  $B = \Delta G^{0\#}_U/(R \cdot T) - \ln(h/(k_B \cdot T))$ . Eine zu [2-8] analoge Beziehung gilt auch für die Rückfaltungskinetik mit  $m_f = \partial\Delta G^\#_F/\partial[\text{GdnHCl}]$ .

Aus der Auftragung der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten gegen die GdnHCl-Konzentration (**Chevron-Auftragung**) kann  $\Delta G^{0\#}_U$  aus dem Absolutglied B ermittelt werden. Dabei kann die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  für  $k_U$  verwendet werden, wenn es sich um eine irreversible Entfaltung handelt bzw. bei einer reversiblen Entfaltung nach dem Übergangsbereich gemessen wird, weil dann die Rückfaltung vernachlässigt werden kann (Zale & Klibanov, 1983). In Abb. 2-2 ist eine theoretische Chevron-Auftragung für eine irreversible Entfaltungsreaktion in rot dargestellt. Bei einer reversiblen Entfaltung kann auch die Rückfaltung (grün) gemessen werden, und man beobachtet dann immer die Summe der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und Rückfaltung (schwarz).



**Abb. 2-2: Theoretische Chevron-Auftragung.**

Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und Rückfaltung  $k_U$  und  $k_F$  und die makroskopisch beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  sind dargestellt. In einem reversiblen System beobachtet man  $k_{\text{obs}} = k_U + k_F$  und in einem irreversiblen System nur  $k_{\text{obs}} = k_U$  als Geschwindigkeitskonstante.

Die **Temperatur-induzierte Entfaltung** gestattet es, den Enthalpie- und Entropieterm  $\Delta H$  und  $\Delta S$  der freien Enthalpie nach der Gibbs-Gleichung zu separieren:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [2-9]$$

Angewendet auf die freie Aktivierungsenthalpie für die Entfaltung ergibt sich aus [2-4] und [2-9]:

$$\ln(k_U/T) = A/T + B \quad [2-10]$$

mit  $A = -\Delta H^\#/R$  und  $B = \Delta S^\#/R - \ln(h/k_B)$

Aus der Auftragung von  $\ln(k_U/T)$  gegen  $1/T$  (**Eyring-Auftragung**) kann die Aktivierungsenthalpie  $\Delta H^\#$  aus dem Anstieg A und die Aktivierungsentropie  $\Delta S^\#$  aus dem Absolutglied B ermittelt werden. Dabei kann die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  für  $k_U$  verwendet werden, wenn es sich um eine irreversible Entfaltung handelt bzw. bei einer

reversiblen Entfaltung nach dem Übergangsbereich gemessen wird, weil dann die Rückfaltung vernachlässigt werden kann (Zale & Klibanov, 1983).

## **2.2. Proteinstabilisierung**

### **2.2.1. Stabilisierungsstrategien**

Die Steigerung der Proteinstabilität ist für industrielle biokatalytische Prozesse, aber auch für Arzneistoffe auf Proteinbasis von großem Interesse (Manning *et al.*, 1989). Es wird versucht, die chemische (Deamidierung, Oxidation, Razemisierung,  $\beta$ -Eliminierung und Proteolyse) und physikalische (Denaturierung, Aggregation, Präzipitation und Adsorption an Oberflächen) Instabilität von Proteinen zu verringern (Manning *et al.*, 1989). Als Methoden kommen dabei *Medium bzw. Protein Engineering*, chemische Modifizierung und Immobilisierung der Proteine zum Einsatz.

Unter **Medium Engineering** versteht man die Zugabe von Additiven wie Zucker, Glycerol oder stabilisierenden Salzen (Geisow & Epton, 1995), die Verwendung organischer Lösungsmittel (Klibanov, 1989; Fagain, 1995), aber auch die Koexpression des Proteins mit Chaperonen zur Unterdrückung der Aggregation (Schlieker *et al.*, 2002).

**Chemische Modifizierungen** der Proteine umfassen u.a. die Umwandlung von Aminosäureseitenketten durch gruppenspezifische Reagenzien (Cupo *et al.*, 1980), kovalente Verknüpfung mit Polyethylenglykol oder Zuckerresten (Rajalakshmi & Sundaram, 1995) und intra- oder intermolekulare Quervernetzung (Enns & Chan, 1978; Wong & Wong, 1992).

Bei **Immobilisierung** werden die Proteine auf einem Träger gebunden (Ulbrich, 1989) oder in Polymerstrukturen eingekapselt (Perez *et al.*, 2002).

Durch den Einsatz der rekombinanten Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Technologien war es in den letzten 25 Jahren möglich, auch gezielt die Primärsequenz der Proteine zu ändern, was als **Protein Engineering** (Leatherbarrow & Fersht, 1986) bezeichnet wird. Dabei können erhebliche Stabilisierungseffekte erzielt werden (Shortle, 1989). Neue Proteinvarianten können zum einen durch nicht rationales Design wie Neukombination homologer Genfragmente (*gene shuffling*) (Stemmer, 1994; Riechmann & Winter, 2000) oder Zufallsmutagenese (*random mutagenesis*) (Zhao & Arnold, 1999; Martin *et al.*, 2001) und zum anderen durch rationales Design mittels ortsspezifischer Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) erzeugt werden. Letztere Methode erfordert zumindest teilweise Kenntnis über

die Raumstruktur der Proteine für die erfolgversprechende Auswahl der zu mutierenden Stelle und der Art der Mutation. Hilfreich hierbei ist das *consensus concept* (Lehmann *et al.*, 2000). Es besagt, dass die aus einer Gruppe homologer Proteine ermittelte Konsensus-Sequenz (Sequenz mit größter Homologie zu allen Einzelproteinsequenzen) für eine neue funktionale Proteinvariante mit erhöhter Stabilität kodiert, da konservierte Sequenzbereiche mehr zur Stabilität beitragen als nicht konservierte. Für die Mutationsauswahl helfen oft auch Vergleiche der Primärsequenz homologer Proteine aus meso- und thermophilen Organismen (Pauptit *et al.*, 1988; Hollien & Marqusee, 1999; Knochel *et al.*, 2002). Allgemeine Schlussfolgerungen zur Stabilisierung können daraus allerdings nicht abgeleitet werden (Jaenicke, 2000). Einige Strategien jedoch haben sich als günstig erwiesen (Matthews, 1987; Lee & Vasmatzis, 1997; Jaenicke & Bohm, 1998), die im Einzelfall getestet werden müssen:

- Erhöhung der Packungsdichte durch Füllung von Hohlräumen (Kavitäten) in der Proteinstruktur (Ishikawa *et al.*, 1993),
- Stabilisierung von Helixbereichen (Mainfroid *et al.*, 1996) und *Loops* (Predki *et al.*, 1996),
- Ersetzen der thermolabilen Aminosäurereste Asn und Gln (Williams *et al.*, 1999),
- Einführung von Ionenbindungstaschen (Toma *et al.*, 1991; Braxton & Wells, 1992) bzw. Verbesserung der Affinität der Metallionenbindung (Pantoliano *et al.*, 1988),
- Verringerung der Konformationsentropie der entfalteten Polypeptidkette durch Einführung von Disulfidbrücken (Pantoliano *et al.*, 1987; Mitchinson & Wells, 1989; Mansfeld *et al.*, 1997) bzw. Substitution von Glyzin durch andere Aminosäuren (Margarit *et al.*, 1992),
- Einführung von Prolinresten (Muslin *et al.*, 2002),
- Multimerisierung und Quervernetzung (Sauer *et al.*, 1986),
- Deletion (Strausberg *et al.*, 1995) oder Insertion (Toma *et al.*, 1991; Braxton & Wells, 1992) einzelner Aminosäuren oder größerer Bereiche im Protein,
- Speziell bei Proteasen auch die Entfernung der primären Schnittstellen der Autoproteolyse (Bae *et al.*, 1995).

Eine Vielzahl dieser Strategien sind an Subtilisin (Bryan, 2000), Glukoamylase (Sauer *et al.*, 2000), Glukose-Isomerase (Hartley *et al.*, 2000) und  $\alpha$ -Amylasen (Nielsen & Borchert, 2000) als Modellenzyme erfolgreich angewendet worden und zeigen, dass oft nur wenige ausgewählte Mutationen nötig sind, um ein mesophiles in ein thermophiles Protein umzuwandeln (Arnold, 1998). Der größte Stabilisierungseffekt durch eine Punktmutation

wurde bisher für die Triosephosphat-Isomerase aus *Leishmania* beschrieben und verursacht eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 26°C (Williams *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren haben sich zunehmend auch Computeralgorithmen (Dahiyat, 1999; Arnold, 2001) zur Stabilitätsvorhersage bewährt (Malakauskas & Mayo, 1998). Auch Computersimulationen zur Flexibilität der Proteinstruktur (*molecular dynamic simulation*) haben sich zum Auffinden kritischer Regionen für die Mutagenese als günstig erwiesen (Colombo & Merz Jr, 1999; Pedone *et al.*, 2001).

### 2.2.2. Der Effekt von Disulfidbrücken

Die Reduktion von natürlich im Protein vorkommenden Disulfidbrücken bewirkt im Allgemeinen eine starke Destabilisierung (Pace *et al.*, 1988; Kuroki *et al.*, 1992; Pace *et al.*, 1998). Es wurde darum angenommen, dass die gentechnische Einführung von Disulfidbrücken die Proteinstabilität erhöht (Thornton, 1981). In der Praxis zeigte diese Strategie jedoch ganz unterschiedliche Erfolge (Pantoliano *et al.*, 1987; Gusev *et al.*, 1991; Kanaya *et al.*, 1991; Futami *et al.*, 2000; Zavodszky *et al.*, 2001; D'Amico *et al.*, 2002) und kann von Destabilisierung bis zu einer Stabilisierung von 17 kJ/mol pro Disulfidbrücke führen. Entscheidend für den Stabilisierungserfolg ist die richtige Position der Disulfidverbrückung innerhalb der Proteinstruktur (Creighton, 1988).

In der Literatur wird die Stabilisierung durch Disulfidbrücken oft nur thermodynamisch betrachtet oder nicht klar zwischen thermodynamischen und kinetischen Effekten getrennt. Die Effekte auf die thermodynamische und kinetische Stabilität müssen zudem nicht miteinander korrelieren (Wetzel *et al.*, 1988). Im Folgenden soll vorerst auf reversible und anschließend auf irreversible Systeme eingegangen werden.

Zwei Modelle zur Beschreibung des Einflusses von Disulfidbrücken auf die Stabilität sind verbreitet: das **Entropiemodell** (Flory, 1956; Pace *et al.*, 1988) und das **Enthalpiemodell** (Doig & Williams, 1991).

Nach Flory (1956) ergibt sich in **reversiblen Systemen** die Ursache der thermodynamischen Stabilisierung durch Disulfidverbrückung aus der Verringerung der Entropie des entfalteten Zustandes. Mit  $\Delta G$  ist damit eine Erhöhung der freien Enthalpie von D verbunden, was das Entfaltungsgleichgewicht zwischen N und D auf die Seite des nativen Enzyms verschiebt. Die Verringerung der Entropie wird aus der Wahrscheinlichkeit errechnet, dass sich die Enden der Polypeptidkette in einem Volumenelement  $\Delta v$  treffen. Die mathematische Beschreibung für



eine Polypeptidkette mit  $n$  statistischen Segmenten einer durchschnittlichen Länge  $l$  ( $3,8 \text{ \AA}$  für einen Aminosäurerest), die eine Verbrückung enthält, folgt aus der Polymer-Theorie zu:

$$\Delta S = -R \cdot \ln \left( \frac{3}{(2\pi \cdot l^2 \cdot n)^{3/2}} \right) \cdot \Delta v \quad [2-11]$$

Nach der Wahl von  $\Delta v$  ergeben sich verschiedene Werte für die Stabilisierung. Pace *et al.* (1988) wählten  $57,9 \text{ \AA}^3$  als engst möglichen Kontakt für zwei Thiole und erhielten:

$$\Delta S = -2,1 - 1,5 \cdot R \cdot \ln(n) \quad [2-12]$$

mit  $n$  als der Anzahl der überbrückten Aminosäurereste .

Obwohl nach dem Entropiemodell theoretisch und experimentell ermittelte freie Stabilisierungsenthalpien für Ribonuklease (RNase) T1 (Pace *et al.*, 1988), T4 Lysozym (Perry & Wetzel, 1984; Matsumura *et al.*, 1989b) und einige andere Modell-Proteine gut übereinstimmen, scheinen die thermodynamischen Effekte komplexer zu sein und über eine alleinige Entropiereduzierung hinauszugehen, denn eine eingehende Analyse aller bis dahin verfügbarer Daten über energetische Effekte von Disulfidbrücken in Proteinen zeigte überraschenderweise keine eindeutige Abhängigkeit des Stabilisierungseffektes von der Anzahl der überbrückten Aminosäuren (Betz, 1993).

Nach Doig & Williams (1991) ist die treibende Kraft für die Stabilisierung durch Disulfidbrücken enthalpischer Natur. Das Enthalpiemodell beschreibt sowohl Effekte auf N, als auch auf D. Disulfidbrücken destabilisieren N entropisch, aber stabilisieren zu einem größeren Maße enthalpisch. In D verursachen sie Reststrukturen, wodurch weniger Wassermoleküle zur Hydratisierung gebunden werden können. Dieser Stabilisierungseffekt der Hydratationsentropie auf D wird meist überkompensiert durch die erzwungenen ungünstigen Wasserstoffbrücken in der entfalteten Polypeptidkette und führt zu einer Destabilisierung von D, verbunden mit einer Verringerung der Entfaltungsenthalpie. In der Summe bewirkt die Stabilisierung von N und Destabilisierung von D nach Einführung einer Disulfidbrücke daher eine Verschiebung des Entfaltungsgleichgewichts auf die Seite von N.

Der Effekt einer Disulfidbrücke auf die Stabilität ergibt sich damit aus vielen Einzeleffekten, die sich wechselseitig bedingen und in der Summe zu einer Stabilisierung, Destabilisierung oder Kompensation (Betz & Pielak, 1992) führen. Sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte entropischer, als auch enthalpischer Natur auf D, aber auch auf N spielen eine Rolle (Betz & Pielak, 1992; Tidor & Karplus, 1993). Dieses komplizierte Wechselspiel erschwert die Vorhersage und Interpretation des Einflusses einer Disulfidbrücke auf die Proteinstabilität und weder das Entropie-Modell, noch das Enthalpie-Modell liefern allgemein eine gute Abschätzung (Betz, 1993; Zavodszky *et al.*, 2001). Es ist daher

sinnvoller, sowohl den entropischen als auch den enthalpischen Term gleichermaßen zu betrachten (Kuroki *et al.*, 1992).

Die sehr empfindliche Balance zwischen stabilisierenden und destabilisierenden Effekten wird auch deutlich am großen Einfluss, den externe Faktoren, wie beispielsweise Temperatur, Zusatz von Kalziumionen und organische Lösungsmittel auf das Stabilitätsverhalten haben. Während bei 25°C die Stabilisierungseffekte oft nur marginal sind, zeigen fast alle Disulfidbrücken bei höheren Temperaturen einen deutlichen stabilisierenden Einfluss (Betz, 1993). In Subtilisin BPN' wird ein extremer Stabilisierungseffekt einer eingeführten Disulfidbrücke nur in Abwesenheit von Kalzium beobachtet (Strausberg *et al.*, 1993), aber für eine Troponin C-Variante nur in Anwesenheit von Kalzium (Gusev *et al.*, 1991). Ebenso wird eine Disulfid-haltige Subtilisin E-Variante nur in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln stabilisiert (Takagi *et al.*, 2000).

Allgemeingültige Aussagen über den Stabilisierungseinfluss von Disulfidbrücken können also fast nicht getroffen werden, und der Einfluss ist oft von der Reaktionsbedingungen abhängig. Am effektivsten scheint eine Disulfidbrücke aber zu sein, wenn sie flexible Regionen – meist *Loops* - in der nativen Proteinstruktur überbrückt, was aus vergleichenden Untersuchungen an verschiedenen Modellproteinen abgeleitet wurde (Matsumura & Matthews, 1991).

**Kinetische Untersuchungen** an reversibel entfaltenden Systemen wie dem F<sub>c</sub>-Teil der leichten Kette von Immunglobulin G (Goto & Hamaguchi, 1982) und  $\Delta 75-83$  Subtilisin BPN' (Strausberg *et al.*, 1993) zeigen, dass besonders die Rückfaltungsgeschwindigkeit durch eine Disulfidbrücke erhöht wird.

Bei Betrachtung der Entfaltungs- oder Inaktivierungskinetik - insbesondere bei **irreversibel entfaltenden Systemen** - kann wegen der fehlenden Rückfaltung kein Einfluss der Disulfidbrücke auf D zum Tragen kommen, und nach dem Entropiemodell ist kein Stabilisierungseinfluss zu erwarten. Tatsächlich gibt es deutlich weniger Untersuchungen zum Einfluss von Disulfidbrücken auf die Entfaltungs- oder Inaktivierungskinetik, und oft wird keine (Mitchinson & Wells, 1989) bzw. nur eine verhältnismäßig geringe (Takagi *et al.*, 1990; Ikegaya *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1998; Ikegaya *et al.*, 2003) Stabilisierung gefunden. Oder der Stabilisierungseffekt ist von bestimmten Bedingungen wie einem Lösungsmittelzusatz abhängig (Takagi *et al.*, 2000). Eine deutlich höhere Thermostabilität nach Einführung einer Disulfidbrücke wird nur für eine Lipase aus *Penicillium camemertii* (Yamaguchi *et al.*, 1996) und für NPste (Mansfeld *et al.*, 1997) berichtet. Ein Stabilisierungseffekt kann hier nur auf die

Stabilisierung von N oder die Destabilisierung des Übergangszustandes zurückgeführt werden.

Einflüsse auf N werden vorwiegend an reversibel entfaltenden Proteinen diskutiert, jedoch ist eine separate Messung der Stabilisierung/Destabilisierung von N und D schwierig (Johnson *et al.*, 1978; Privalov & Gill, 1988; Matsumura *et al.*, 1989a; Betz & Pielak, 1992; Zavodszky *et al.*, 2001). Sollte die eingeführte Disulfidbrücke die native Proteinstruktur nicht ändern (z.B. keine Änderungen in den Circular dichroismus(CD)-Spektren), so wird angenommen, dass auch keine Spannungen und damit energetische Veränderungen in N induziert werden. Aber neben diesen enthalpischen Beiträgen können Disulfidbrücken - wie bereits angesprochen - auch entropische Beiträge zur freien Enthalpie von N liefern. Zur sensitiven Detektion des entropischen Beitrags verwendeten D'Amico *et al.*, (2002) für eine  $\alpha$ -Amylase das Acrylamid-*Quenchen* (Fluoreszenzlöschung durch Acrylamidzusatz) der Fluoreszenz und schlussfolgerte: je geringer die *Quench*-Konstante ist, desto kompakter ist die Struktur und desto geringer ist die Entropie dieses Zustandes verbunden mit einer Erhöhung der freien Enthalpie.

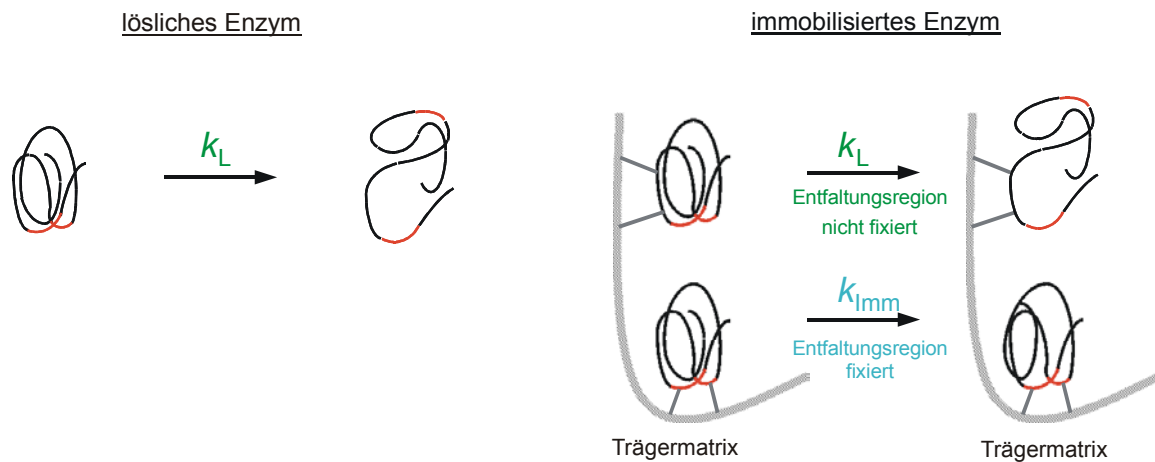
Am Beispiel von RNase A wurde gezeigt, dass die Position der Disulfidbrücke im Proteinmolekül für die Entfaltungs-/Rückfaltungs-Kinetik eine besondere Bedeutung hat. Es wird hier zwischen früh und spät entfaltenden Regionen unterschieden (Wedemeyer *et al.*, 2000). Zur Stabilisierung gegen Entfaltung muss die Disulfidbrücke Strukturelemente von früh entfaltenden Regionen verbrücken. Die Stabilisierung bestimmter Regionen im Molekül kann deshalb auch zur Akkumulation von teilentfalteten Zuständen (Intermediaten) führen (Villafranca *et al.*, 1987).

Stabilitätsuntersuchungen an chemisch quervernetztem  $\alpha$ -Chymotrypsin (Saidel *et al.*, 1964), Trypsin und Papain (Royer *et al.*, 1977) zeigen, dass speziell bei Proteasen eine Disulfidbrücke vor Autoproteolyse schützen kann, indem eine Schnittstelle durch die Einführung der Cysteinreste chemisch modifiziert oder die Zugänglichkeit der Schnittstelle verändert wird (Klibanov, 1983).

### 2.2.3. Das Konzept von der Entfaltungsregion

Wie unter 2.2.1. beschrieben, ist für eine erfolgreiche ortsspezifische Mutagenese neben der Wahl der Mutation auch die Position entscheidend, die verändert werden soll. Ein in der Arbeitsgruppe aufgestelltes Modell besagt, dass ein Proteinmolekül eine labilste Stelle besitzt, an der die Entfaltung beginnt. Die lokale Stabilisierung dieser labilen Strukturregion

(Entfaltungsregion) hat auch eine globale Stabilisierung des gesamten Proteins zur Folge (Schellenberger & Ulbrich, 1989; Ulbrich-Hofmann *et al.*, 1999). Dieses Modell wurde aus den Ergebnissen von Inaktivierungsstudien an immobilisierten Enzymen abgeleitet (Abb. 2-3). Die thermische Inaktivierung verschiedener immobilisierter Enzyme zeigte eine biphasige



Inaktivierungskinetik, wobei die schnelle Inaktivierungsphase identisch mit der des löslichen Enzyms ist. Dieses Verhalten wurde damit erklärt, dass zwei verschieden immobilisierte Spezies existieren: eine Spezies ist in der Entfaltungsregion immobilisiert und auf diese Weise stabilisiert, während die andere Spezies an einer anderen Stelle immobilisiert wurde, die nicht kritisch für die Stabilität ist und damit wie das lösliche Enzym entfaltet.

### Abb. 2-3: Konzept der Entfaltungsregion.

Lösliches Protein inaktiviert mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_L$ . Bei Immobilisierung am Träger inaktiviert die Fraktion, bei der die Entfaltungsregion (rot) stabilisiert ist, langsamer ( $k_{Imm}$ ) als die Fraktion, bei der die Entfaltungsregion nicht stabilisiert ist.

Das Konzept von der Entfaltungsregion basiert auf der Annahme, dass eine lokale Entfaltung der globalen Entfaltung vorausgeht. Transiente Fluktuationen in der nativen Struktur eines Proteins können zu einer lokalen Entfaltung (Kim & Baldwin, 1990) und damit zu einem teilentfalteten Zustand (Entfaltungsintermediat) führen. Tatsächlich konnten in den letzten Jahren kritische Strukturregionen in RNase A (Arnold *et al.*, 1996; Laity *et al.*, 1999) und das Auftreten von lokalen Flexibilitäten bzw. partiell gefalteten Zuständen u.a. in Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (Barbar *et al.*, 1997), humaner Carboanhydrase II (Hammarstrom *et al.*, 2001) und *human-immunodeficiency-virus*(HIV)-1 Protease (Panchal *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. Die labilen Strukturregionen können dabei auf verschiedene Weise „aufgespürt“ werden:

- Wasserstoff-Deuterium-Austausch und Kernmagnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie: Trypsininhibitor aus Rinderpankreas (Barbar *et al.*, 1997) und Flavodoxin aus *Azotobacter vinelandii* (van Mierlo & Steensma, 2000),
- Laser-Raman-Spektroskopie: RNase A (Gilbert *et al.*, 1982),
- proteolytische Zugänglichkeit: RNase A (Arnold *et al.*, 1996),
- B-Faktor aus der Röntgenkristallographie: RNase A (Gilbert *et al.*, 1982),
- zeitaufgelöste Röntgenkristallographie nach Temperatursprung: 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase (Hori *et al.*, 2000),
- Mutationsexperimente:  $\beta$ -Glukan-Endohydrolase aus Weizen (Stewart *et al.*, 2001), bakterielle  $\alpha$ -Amylasen (Nielsen & Borchert, 2000), Glucoamylase aus *Aspergillus awamori* (Li *et al.*, 1998) und NPste (Eijsink *et al.*, 1995),
- Computersimulationen zur Flexibilität der Proteinstruktur (*molecular dynamic simulations*): Subtilisin E (Colombo & Merz Jr, 1999),
- Effekte von Disulfidbrücken auf die Ent- und Rückfaltung zeigen früh und spät entfaltende Regionen im Proteinmolekül: Barnase (Clarke & Fersht, 1993) und RNase A (Li *et al.*, 1995; Wedemeyer *et al.*, 2000).

Bei den röntgenkristallographischen Methoden muss allerdings die Einschränkung gemacht werden, dass die kristallisierten Proteine sich in Lösung anders verhalten können.

### **2.3. Autoproteolyse**

Unter Autoproteolyse versteht man die hydrolytische Spaltung einer Protease durch sich selbst in einem meist intermolekularen Mechanismus. Aus strukturellen Vergleichen von Proteasen mit anderen Proteinen geht hervor, dass sie kompakter gepackt sind, was einen natürlichen Autoproteolysechutz darstellt (Stawiski *et al.*, 2000). Der native Zustand einer Protease ist daher unempfindlich gegen Autoproteolyse, jedoch tritt sie bei der Entfaltung auf, da entfaltete Moleküle ein Substrat für die noch nativen Moleküle darstellen. Insbesondere bei unspezifischen Proteasen stellt das ein Problem dar und führt zu einer Inaktivierung und Irreversibilität der Entfaltung (Tatsumi *et al.*, 1994). Das einfachste Modell zur Beschreibung der Entfaltung und Autoproteolyse ist eine Modifizierung des Lumry-Eyring-Modells [2-6], wobei N selbst den irreversiblen Schritt mit der Autoproteolysekonstante  $k_p$  katalysiert (Antonov *et al.*, 1970; Panchal *et al.*, 2001):



Zusätzlich zur strukturellen Stabilität muss bei Proteasen daher auch die **autoproteolytische Stabilität** (2.1.3.) betrachtet werden (van den Burg *et al.*, 1990). Diese Differenzierung wird in der Literatur bisher aber nur selten vorgenommen (Sattler *et al.*, 1996). Proteasen können stabilisiert werden, indem durch eingeführte Mutationen entweder die Entfaltungsgeschwindigkeit oder die Autoproteolyse verringert wird (Klibanov, 1983). Daher besitzen Proteasen ein hohes Stabilisierungspotential. Beispielsweise bewirkte die Einführung von sechs Einzelmutationen in Subtilisin BPN' eine um den Faktor 300 verminderte Geschwindigkeitskonstante für die irreversible Thermoinaktivierung (Pantoliano *et al.*, 1989). Einen noch größeren Stabilisierungseffekt zeigte eine Achtfach-Enzymvariante von NPste (Van den Burg *et al.*, 1998).

Die Irreversibilität der **Thermoinaktivierung** von Proteasen wird hauptsächlich durch die Autoproteolyse verursacht (Matsuzawa *et al.*, 1988; Eijsink *et al.*, 1991b; Braxton & Wells, 1992). Die mit steigender Temperatur erfolgende Erhöhung der Aktivität, aber auch der Autoproteolyse führt zu einem Temperaturoptimum der Proteaseaktivität (Tatsumi *et al.*, 1994). Bei sehr hohen Temperaturen wird die Autoproteolyse aber wieder zurückgedrängt, weil die Entfaltung und Inaktivierung dann schneller als die Autoproteolysereaktion werden. Ein solches Verhalten wird häufig bei der Thermoinaktivierung von Proteasen aus psychrophilen Bakterien wie *Pseudomonas fluoreszenz* (Stepaniak *et al.*, 1982; Kroll & Klostermeyer, 1984; Christen & T., 1985), aber auch bei Thermolysin (Barach & Adams, 1977), der extrazellulären Protease aus *Pseudomonas species* (Barach & Adams, 1977) und den neutralen Proteinase I und II aus *Aspergillus sojae* (Sekine, 1972) gefunden. Je nach Thermostabilität unterliegen sie einer schnellen Inaktivierung bei höheren Temperaturen, aber beim Kochen oder ultrahohen Erhitzen bis 150°C (Schokker & van Boekel, 1999) ist die irreversible Inaktivierung nur sehr langsam und u.a. eine Folge von Deamidierung, Kettenspaltung oder Aggregation (Ahern & Klibanov, 1985). In Abhängigkeit von der Temperatur durchläuft der Anteil an intaktem Protein auf diese Weise ein V-Profil, das durch die Autoproteolyse hervorgerufen wird (Sekine, 1972; Schokker & van Boekel, 1998). Unter verschiedenen Denaturierungsbedingungen sind also unterschiedliche Prozesse für die irreversible Inaktivierung verantwortlich.

In dem Bereich, in dem die Autoproteolyse für die irreversible Inaktivierung entscheidend ist, kann eine Stabilisierung durch Bestimmung und Entfernung der primären Spaltstellen erhalten werden, wie dies am Beispiel von Subtilisin J (Bae *et al.*, 1995), HIV-1 Protease (Tomasselli *et al.*, 1995), der alkalischen Protease aus *Pseudomonas species* (Ko *et al.*, 2002) oder einer Virus-Proteinase (Louis *et al.*, 1999) gezeigt wurde. Die Zugabe eines Inhibitors führt in der Regel nicht zu einer Stabilitätserhöhung, da sie die Autoproteolyse meist nicht ausreichend unterbindet (Narhi & Arakawa, 1989; Fujimura *et al.*, 2000).

Viele Proteasen werden durch **Kalziumionen** stabilisiert, und es ist ein Zusammenhang zwischen der Kalziumbindung und der Autoproteolyse zu sehen (Kortt & Stewart, 1994; Fujimura *et al.*, 2000; Ko *et al.*, 2002). Eine Analyse der Faktoren, die zur Autoproteolyse bei der Subtilisin-ähnlichen Protease aus *Ophiostoma piceae* führen, zeigte, dass durch die Kalziumbindung insbesondere *Loop*-Bereiche gegen lokale Entfaltung stabilisiert werden und so die Zugänglichkeit der primären Schnittstellen eingeschränkt wird (Abraham & Breuil, 1995). Eine Stabilisierung durch schlechtere Zugänglichkeit der primären Schnittstellen wird auch für die Quervernetzung von Proteasen angenommen (Saidel *et al.*, 1964; Royer *et al.*, 1977). Für die neutrale Proteinase II aus *Aspergillus oryzae* liegen die primären Schnittstellen innerhalb von Disulfidverbrückungen und die Öffnung bewirkt eine verstärkte Autoproteolyse (Tatsumi *et al.*, 1994).

Insgesamt führt das Auftreten von Autoproteolyse zu einem komplexeren Denaturierungsmechanismus. Zur Erhöhung der Autoproteolysestabilität von Proteasen sind zwei Strategien möglich: die Entfernung der primären Schnittstellen und die Einschränkung ihrer Zugänglichkeit.

## **2.4. Die Gruppe der Thermolysin-ähnlichen neutralen Protetasen**

### **2.4.1. Einteilung und Katalysemechanismus**

Die Thermolysin-ähnlichen Proteasen (TLPs) gehören zu den extrazellulären Endopeptidasen bakterieller Herkunft, deren Funktion in der Bereitstellung von Peptiden für den bakteriellen Stoffwechsel liegt. Sie sind einander strukturell sehr ähnlich und bilden neben 30 anderen Mitgliedern die Familie M4 der sehr heterogenen Gruppe der Metalloendopeptidasen (Rawlings & Barrett, 1995). Aufgrund ihres pH-Optimums für die Aktivität werden sie auch

als neutrale Proteasen bezeichnet. Der bekannteste Vertreter ist Thermolysin (EC 2.4.24.27.) aus *B. thermoproteolyticus*.

Allen Metallopeptidasen gemeinsam ist das Sequenzmotif HEXXH, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht, und ein essentielles Zinkion. Die Tertiärstruktur von Thermolysin zeigt, dass Zink hier von den beiden Histidinresten 142 und 146 sowie von Glu166 ligandiert wird (Matthews *et al.*, 1972b). Glu143 vermittelt den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der zu spaltenden Peptidbindung unter Bildung eines tetrahedralen Intermediats (Pangburn & Walsh, 1975). Das Intermediat wird durch His231 stabilisiert (Beaumont *et al.*, 1995). Thermolysin ist bezüglich der zu spaltenden Peptidsequenz eine recht unspezifische Protease (Heinrikson, 1977) und spaltet Peptidbindungen an der N-terminalen Seite (P1'-Position nach der Nomenklatur von Schechter & Berger (1967)) von hydrophoben und aromatischen Aminosäureresten (Moriyama & Tsuzuki, 1970; Feder *et al.*, 1974).

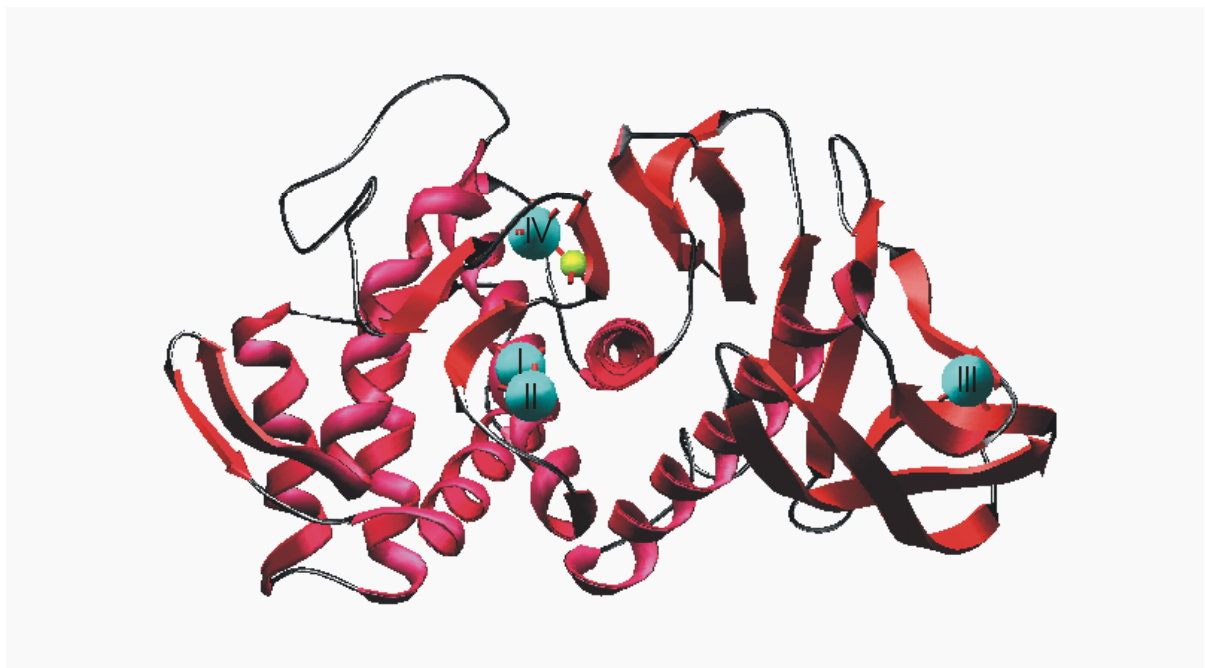
#### 2.4.2. Struktur und Kalziumbindung

TLPs werden als Präproenzyme gebildet. Die Präsequenz (ca. 20 Aminosäuren) dient als Sekretionssignal, während die Prosequenz (ca. 200 Aminosäuren) als Faltungshelfer und Inhibitor innerhalb der Zelle fungiert (Wetmore *et al.*, 1992; Marie-Claire *et al.*, 1998). Die reifen Enzyme besitzen mit 300-319 Aminosäuren eine molare Masse ( $M_r$ ) um etwa 35 kDa. Von Thermolysin (Colman *et al.*, 1972; Matthews *et al.*, 1972a; Matthews *et al.*, 1972b; Holmes & Matthews, 1982) und der neutralen Protease aus *B. cereus* (Pauptit *et al.*, 1988; Stark *et al.*, 1992) sind die Raumstrukturen bekannt. Sie zeigen zwei Domänen. Die N-terminale Domäne (1-155 für Thermolysin) besteht vorwiegend aus  $\beta$ -Faltblättern und die C-terminale (156-316 für Thermolysin) aus  $\alpha$ -Helices. Während die thermolabileren Vertreter, wie die TLP aus *B. subtilis* (Tajima *et al.*, 1976), zwei gebundene Kalziumionen in einer Doppelkalziumbindungsstelle (CaI/II) enthalten, besitzen die thermostabileren Vertreter wie Thermolysin (Matthews *et al.*, 1972a) noch zwei weitere in Einzelbindungsstellen (CaIII und IV; Abb. 2-4). Für Thermolysin sind die gebundenen Kalziumionen für die große Thermostabilität verantwortlich (Feder *et al.*, 1971; Dahlquist *et al.*, 1976). Die Doppelkalziumbindungsstelle, die CaI und CaII im Abstand von nur 3,8 Å bindet, wird durch die Reste Asp138, Glu177, Asp185, Glu190 und Asp191 gebildet (Matthews *et al.*, 1972a). CaIII wird über die Seitenketten von Asp57 und Asp59 gebunden und CaIV durch Asp200 (Matthews *et al.*, 1972a).



Über die Affinitäten der einzelnen Kalzium-Bindungsstellen gibt es jedoch höchst widersprüchliche Angaben, die letztendlich nur zeigen, dass eine separate Bestimmung sehr schwierig ist. Basierend auf Gelfiltrationsmessungen mit Analyse des Kalziumgehalts der Elutionsfraktionen schlussfolgerten Tajima *et al.* (1976), dass alle vier Kalziumionen gleich stark gebunden werden. Mit der gleichen Methode fanden Voordouw & Roche (1974) zwei Klassen von Bindungsstellen: die schwach affinere wurde der Doppelkalziumbindungsstelle I/II zugeordnet. Diffusionsexperimente an Thermolysinkristallen zeigten dagegen eine deutliche Abfolge der Bindungsaffinitäten:  $\text{CaI} \gg \text{CaIII} > \text{CaIV} \geq \text{CaII}$  (Weaver, 1976).

Roche & Voordouw (1978) postulierten aus Kalzium-vermittelten Autoproteolyse- bzw. Thermoinaktivierungsstudien die Rangfolge der Affinitäten zu:  $\text{CaIII} = \text{CaIV} > \text{CaI/II}$ . Dabei soll unter Thermoinaktivierungsbedingungen *eine* Bindungsstelle das Autoproteolyseverhalten bestimmen und bei Raumtemperatur *zwei* (Corbett & Roche, 1983).



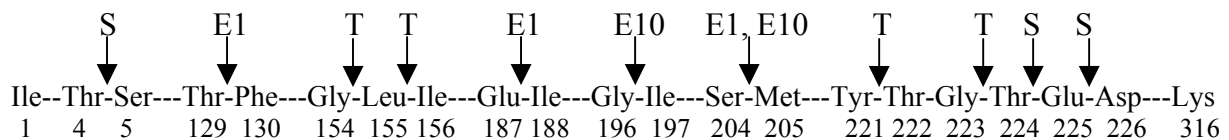
**Abb. 2-4: Raumstruktur von Thermolysin.**

Die PDB-Struktur 1LNF wurde verwendet und mit dem Swiss-PDB-Viewer dargestellt. Die Positionen der Kalziumionen (cyan) I-IV sind markiert. Das katalytische Zinkion ist grün dargestellt.

### 2.4.3. Entfaltung und Autoproteolyse

Während Thermolysin wie alle TLPs unter nativen Bedingungen gegen Autoproteolyse resistent ist, führt beispielsweise die Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als

Kalziumchelator (Corbett & Roche, 1986) oder die Inkubation bei hohen Temperaturen (Drucker & Borchers, 1971; Kubo, 1999) zur Autoproteolyse. Es wird angenommen, dass die thermische Inaktivierung durch die Autoproteolyse als Folge lokaler Entfaltungsprozesse bestimmt wird (Dahlquist *et al.*, 1976; Vriend & Eijnsink, 1993). Die Isolierung und Charakterisierung der Autoproteolysefragmente lässt Rückschlüsse auf die primären Schnittstellen und die involvierten Regionen zu. Für Thermolysin sind in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen mehrere Primärschnittstellen bekannt: 196-197, 204-205 (Fassina *et al.*, 1986), 221-224 und möglicherweise bei 154-156 und 129-130 (Fontana *et al.*, 1986), wobei dies nicht eindeutig Primärschnitte sind, da jeweils nur ein Fragment nachgewiesen wurde. Die bei Thermolysin unter verschiedenen Bedingungen gefundenen Schnittstellen sind in Abb. 2-5 zusammengefasst.



**Abb. 2-5: Darstellung der primären Schnittstellen von Thermolysin.**

Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von Thermolysin und der Stellen der limitierten Proteolyse durch Subtilisin (S) und der Autoproteolyse beim Erhitzen (T) oder in Gegenwart von EDTA (E1: 1 mM, E10: 10 mM). Die Darstellung wurde von Fontana (1988) übernommen.

Aus der Lage der Primärschnittstellen ergibt sich, dass beim Thermolysin die **EDTA-induzierte Autoproteolyse** durch CaIV und z.T. durch CaI/II bestimmt wird (Corbett & Roche, 1986; Fassina *et al.*, 1986). Für die **Temperatur-induzierte Autoproteolyse** spielen nach Dahlquist *et al.* (1976) CaIII und/oder CaIV die entscheidende Rolle, da sie am schwächsten gebunden sind. Auch Voordouw & Roche (1975b) weisen CaIII die bestimmende Rolle zu, gehen aber von der Voraussetzung aus, dass es am stärksten gebunden wird und die Autoproteolyse erst einsetzen kann, wenn das Enzym völlig kalziumfrei ist.

Autoproteolysefragmente von Thermolysin wurden auch hinsichtlich ihrer Struktur und Entfaltung untersucht. Es wurde gezeigt, dass die beiden Autoproteolysefragmente 1-187(204) und 187(204)-316 separat falten können (Corbett & Roche, 1986). Daraus wurde geschlossen, dass der erste Entfaltungsschritt beim Thermolysin eine Separation beider

Domänen darstellt und anschließend die Domänen separat entfalten, erst die N- und danach die stabilere C-terminale Domäne (Corbett *et al.*, 1986).

#### 2.4.4. Die neutrale Protease aus *Bacillus stearothermophilus*

NPste besitzt mit 319 Aminosäuren eine 86%-ige Sequenzidentität zum Thermolysin (Takagi *et al.*, 1985; Eijnsink *et al.*, 1992b; Inouye *et al.*, 1998). Für die Nummerierung der Aminosäuren wurde in der vorliegenden Arbeit die Primärsequenz von Thermolysin zugrunde gelegt, wodurch sich ein Einschub von drei Aminosäuren nach der Position 26 (als 26 A, B, C bezeichnet) ergibt (Abb. 2-6).

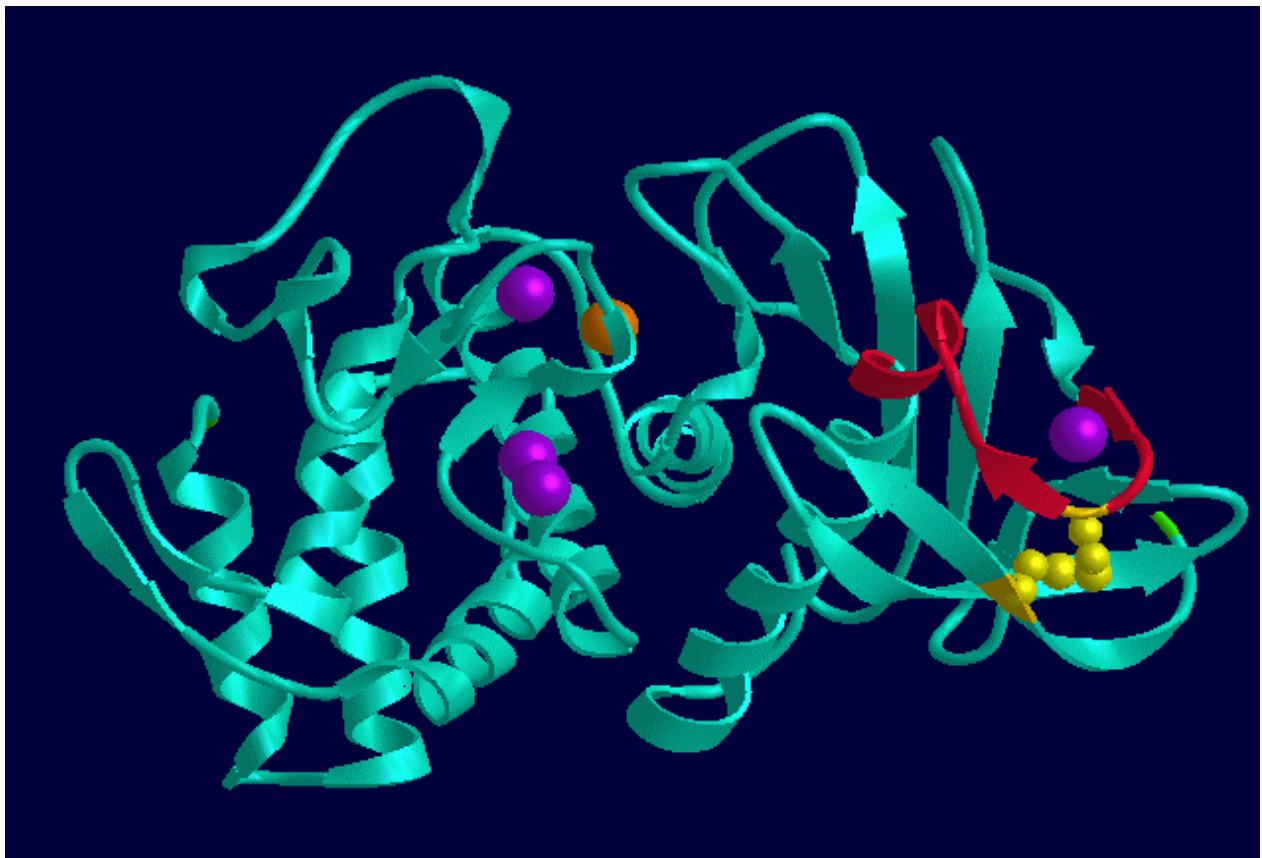
|       |                     |                  |                |               |             |            |          |
|-------|---------------------|------------------|----------------|---------------|-------------|------------|----------|
|       | 10                  | 20               | 30             | 40            | 50          |            |          |
| TLN   | ITGTSTVGVGRGVLGDQKN | INTTYS           | ---            | YYLQDNTRGD    | GIFTYDAKYRT | TLPGSLWAD  |          |
| NPste | VAGASTVGVGRGVLGDQKY | INTTYS           | SYG            | YYLQDNTRGS    | GIFTYDGRNRT | VLPGSLWTD  |          |
|       | 60                  | 70               | 80             | 90            | 100         | 110        |          |
| TLN   | ADNQFF              | ASYDAPAVDAHYAGVT | YDYKKNVHN      | RLSYDGNNAAIRS | SVHYSQ      | GYNNAFWNG  |          |
| NPste | GDNQFT              | ASYDAAAVDAHYAGVV | YDYKKNVHG      | RLSYDGSNAAIRS | TVHYGR      | GYNNAFWNG  |          |
|       | 120                 | 130              | 140            | 150           | 160         | 170        |          |
| TLN   | SEMVYGDGDGQTFI      | FLSGGIDVVA       | HELTHAVTDYTAGL | IYQNESGAIN    | EAT         | SDIFGTLVE  |          |
| NPste | SQMVYGDGDGQTFI      | FLSGGIDVVG       | HELTHAVTDYTAGL | VYQNESGAIN    | EAM         | SDIFGTLVE  |          |
|       | 180                 | 190              | 200            | 210           | 220         | 230        |          |
| TLN   | FYANK               | NPDWEIGEDV       | YTPGISGDS      | LRMSMDPAKYGDP | PDHYSKRYTGT | QDNGGVHINS | GI       |
| NPste | FYANR               | NPDWEIGEDI       | YTPGVAGDA      | LRMSMDPAKYGDP | PDHYSKRYTGT | QDNGGVHTN  | SGII     |
|       | 240                 | 250              | 260            | 270           | 280         | 290        |          |
| TLN   | NKAAYLI             | SQGGTHYGVS       | VVGIGRDKL      | GKIFYRAL      | TQYLTPTS    | NFSQLRAAAV | QSATDLYG |
| NPste | NKAAYLI             | SQGGVHYGVS       | VVGIGRDKM      | GKIFYRAL      | VYLTPTS     | NFSQLRAACV | QAADLYG  |
|       | 300                 | 310              |                |               |             |            |          |
| TLN   | STSQEVA             | SVKQAFDA         | AVGVK          |               |             |            | 316      |
| NPste | STSQEVN             | SVKQAFNA         | AVGVY          |               |             |            | 319      |

Abb. 2-6: Sequenzvergleich von NPste und Thermolysin.

Die identischen Aminosäuren sind grün und ähnliche Aminosäuren gelb dargestellt. Für den Sequenzvergleich wurde die Nummerierung von Thermolysin (TLN) zugrunde gelegt.

Das pH-Optimum der NPste liegt bei pH 7,0 (Fujii *et al.*, 1983) und die Thermostabilität ist geringer als die von Thermolysin (Veltman *et al.*, 1996). Eine Kristall- oder NMR-Struktur ist nicht vorhanden. Es konnte aber ein Computermodell von NPste durch Homologie-Modellierung auf der Basis von Thermolysin - aufgrund der hohen Sequenzidentität beider Proteine - erstellt werden (Vriend & Eijsink, 1993) (Abb. 2-7), das sich in zahlreichen Mutationsstudien zur Strukturvorhersage bewährt hat (Eijsink *et al.*, 1995).

NPste zeigt eine ausgesprochen starke Abhängigkeit der Thermostabilität von der Kalziumkonzentration (Veltman *et al.*, 1998). Aufgrund der konservierten Aminosäurereste für die Kalziumbindung in Thermolysin und NPste, der recht hohen Thermostabilität und aus den Modellierungsstudien (Vriend & Eijsink, 1993) ist anzunehmen, dass auch vier Kalziumionen gebunden werden (Abb. 2-7). Über die Bindungsaffinitäten der Kalziumionen von NPste ist wenig bekannt.



**Abb. 2-7: Raum-Modell von NPste mit der Doppelmutation G8C/N60C.**

Das Modell wurde auf der Grundlage von Thermolysin mittels Homologie-Modellierung mit dem Programm WHAT IF erstellt (Vriend & Eijsink, 1993). Die vier stabilisierenden Kalziumionen sind violett, das katalytische Zinkion orange, die potentielle Entfaltungsregion 56-69 rot und die eingeführte Disulfidbrücke (G8C/N60C) gelb dargestellt.

Zahlreiche Stabilisierungsstrategien (2.2.1.) wurden angewandt, um die Thermostabilität von NPste zu erhöhen:

- Helixstabilisierung und Erhöhung von hydrophoben Wechselwirkungen (Imanaka *et al.*, 1986),
- Substitution von Glyzinresten (Takagi & Imanaka, 1989),
- Veränderung von Schnittstellen der Autoproteolyse (Kubo *et al.*, 1992),
- Einführung von Prolinen (Hardy *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1997),
- Substitution von thermolabilen Asn-Resten (Eijsink *et al.*, 1991c),
- Optimierung der Wasserstoffbrückenbindungen (Eijsink *et al.*, 1992c),
- Erhöhung der Packungsdichte durch Füllung von Kavitäten in der Proteinstruktur (Eijsink *et al.*, 1992a),
- Verstärkung der Domänenwechselwirkung (Eijsink *et al.*, 1990; Eijsink *et al.*, 1992b),
- Immobilisierung (Mansfeld *et al.*, 1999; Mansfeld & Ulbrich-Hofmann, 2000),
- Verbesserung hydrophober Interaktionen an der Moleküloberfläche (Van den Burg *et al.*, 1994),
- Einführung einer Disulfidbrücke (Mansfeld *et al.*, 1997),
- Veränderung der Kalziumbindung (Veltman *et al.*, 1997b; Veltman *et al.*, 1998),
- Aminosäuresubstitutionen aufgrund von Vorhersagen mittels Computeralgorithmen zum Auffinden stabilisierender Mutationen (Nakai *et al.*, 1998)
- Aminosäuresubstitutionen aufgrund von Vergleichen mit thermostabileren homologen Enzymen (Imanaka *et al.*, 1986; Eijsink *et al.*, 1995; Veltman *et al.*, 1996).

Die Stabilisierungserfolge der einzelnen Strategien waren sehr verschieden. NPste unterscheidet sich in 43 Aminosäurepositionen vom thermostabileren Thermolysin. Das schrittweise Ersetzen einzelnen Aminosäuren in NPste durch die entsprechenden von Thermolysin und Analyse der räumlichen Verteilung besonders stabilisierender Mutationen führte zum Auffinden einer sehr sensitiven oberflächengelegenen *Loop*-Region um die Aminosäuren 56-69 (Eijsink *et al.*, 1995; Veltman *et al.*, 1996; Veltman *et al.*, 1997a). Strukturell ist sie auch in Thermolysin (Holmes & Matthews, 1982) und der neutralen Protease aus *B. cereus* (Stark *et al.*, 1992) konserviert (Veltman *et al.*, 1997a) und wahrscheinlich als eine Entfaltungsregion (2.2.3.) anzusehen (Vriend *et al.*, 1998). Die Kombination von acht stabilisierenden Mutationen in dieser Region lieferte eine voll aktive Enzymvariante (Boilysin), die sogar weit stabiler als Thermolysin ist (Van den Burg *et al.*,

1998; Van den Burg *et al.*, 1999). Die Halbwertszeit von NPste bei 100°C beträgt weniger als 30 s, die von Thermolysin 1 min und die von Boilysin 170 min (Van den Burg *et al.*, 1998). Ein entscheidender Beitrag zur Stabilisierung von Boilysin wird durch eine Disulfidbrücke zwischen den Resten 8 und 60 hervorgerufen, die die potentielle Entfaltungsregion mit dem benachbarten N-terminalen *Hairpin* 1-25 verbindet (Mansfeld *et al.*, 1997). Als Basis für die Einführung der Cysteinreste diente die Cystein-freie Enzymvariante C288L (Pseudowildtyp, pWT). Bezüglich ihrer Struktur (Dürschmidt *et al.*, 2001), Aktivität und Thermostabilität (Eijsink *et al.*, 1992) sind pWT und Wildtyp-Npste als identisch anzusehen. Die Disulfidbrücke in der Enzymvariante G8C/N60C (Abb. 2-7) bildete sich spontan aus und führte zu einer extremen Steigerung der Thermostabilität. Der  $T_{50}$ -Wert als Temperatur, bei der nach 30-minütiger Inkubation noch 50% der Ausgangsaktivität vorhanden sind, wurde von 75,4°C (pWT) zu 92,1°C (G8C/N60C) verschoben (Mansfeld *et al.*, 1997). Die Aktivität blieb von der Mutation unbeeinflusst.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Chemikalien

|   |   |
|---|---|
| 2-Aminobenzoyl-Ala-Gly-Leu-Ala-4-Nitrobenzylamid (Abz-AGLA-Nba) | Bachem, Heidelberg, Deutschland           |
| Acetonitril (ACN)   | Roth, Karlsruhe, Deutschland              |
| Acrylamid   | Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden   |
| Bacitracin  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Casein (nach Hammersten)  | Merck, Darmstadt, Deutschland             |
| Coomassie-Brilliant-Blue G-250                                  | Serva, Heidelberg, Deutschland            |
| Dimethylformamid (DMF)  | Kraemer und Martin, Siegburg, Deutschland |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Merck, Darmstadt, Deutschland             |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| EDTA  | Serva, Heidelberg, Deutschland            |
| <i>N</i> -(3-[2-furyl]acryloyl)-Gly-Leu-amid (FAGLA)            | Bachem, Heidelberg, Deutschland           |
| GdnHCl  | ICN Biomedicals, Irvine, USA              |
| Isopropanol   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Iodacetamid   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| CaCl <sub>2</sub> -Maßlösung (1 M)                              | Fluka, Ulm, Deutschland                   |
| <i>N,N'</i> -Methylen-Bis-Acrylamid                             | USB, Cleveland, USA                       |
| <i>N</i> -Acetyl-Tryptophanamid (NATA)                          | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Natriumdesoxycholat (NaDOC)                                     | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                                      | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| <i>o</i> -Phenanthrolin ( <i>o</i> PA)                          | Fluka, Ulm, Deutschland                   |
| Polyethylenglycol 100.000 (PEG 100.000)                         | Serva, Heidelberg, Deutschland            |
| Trichloressigsäure (TCA)  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Trifluoressigsäure (TFA)  | Sigma, Deisenhofen, Deutschland           |
| Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)                          | Merck, Darmstadt, Deutschland             |

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a. oder ultra pure. Zur Herstellung von Puffern wurde deionisiertes Wasser verwendet.

### 3.1.2. Proteine und Kits

|   |   |
|---|---|
| Bichinchoninsäure(BCA)-Kit                                | Pierce, Rockford, USA                   |
| <i>Low-Molecular-Weight</i> -Elektrophorese-Eichproteine: | Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden |
| $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa),                         |   |
| Sojabohnen-Trypsininhibitor (20,1 kDa),                   |   |
| Carboanhydrase (30,0 kDa),                                |   |
| Ovalbumin (45,0 kDa),                                     |   |
| Rinderserumalbumin (BSA; 66,0 kDa),                       |   |
| Phosphorylase B (97,0 kDa)                                |   |
| Enzymvarianten von NPste                                  | siehe 3.2.3.                            |
| Rinderserumalbumin  | Pierce, Rockford, USA                   |

### 3.1.3. Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| Hefe-Extrakt                         | Difco, Augsburg, Deutschland                      |
| Trypton                              | Difco, Augsburg, Deutschland                      |
| Select Agar                          | Difco, Augsburg, Deutschland                      |
| Casaminosäuren                       | Difco, Augsburg, Deutschland                      |
| Spurenelementelösung                 | Sigma, Deisenhofen, Deutschland                   |
| Chloramphenicol                      | Sigma, Deisenhofen, Deutschland                   |
| Kanamycin (Kan)                      | Sigma, Deisenhofen, Deutschland                   |
| Milchpulver                          | Oxoid, Unipath, England                           |
| MnCl <sub>2</sub>                    | Serva, Heidelberg, Deutschland                    |
| Alkalische Phosphatase (aus Shrimps) | USB, Cleveland, USA                               |
| <i>SalI</i> -Endonuklease            | New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| T4-DNA-Ligase                        | Invitrogen, Groningen, Niederlande                |
| Oligonucleotide                      | MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland            |



### 3.1.4. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide und Primer

|  |  |
|--|--|
| <b><i>Escherichia (E.) coli</i> XL1-Blue</b> | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZAM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i> , Stratagene (Heidelberg, Deutschland) |
| <b><i>B. subtilis</i> DB117</b>              | <i>cm<sup>r</sup> hisA4 ΔnprR2, ΔnprE18, ΔnprA3</i> (Eijsink <i>et al.</i> , 1990)   |
| <b>pET-28b(+)-NPste</b>                      | <i>E. coli</i> -Expressionsvektor mit der reifen Sequenz von Wildtyp-NPste, Kan-Resistenz-Gen, (Petermann, 2001)                                     |
| <b>pGE501</b>                                | <i>B. subtilis</i> -Expressionsvektor mit der Sequenz von Wildtyp-NPste, Chloramphenicol-Resistenz-Gen, (Eijsink <i>et al.</i> , 1992a)              |
| <b>pGE530</b>                                | <i>B. subtilis</i> -Expressionsvektor mit der Sequenz von pWT, Chloramphenicol-Resistenz-Gen, (Mansfeld <i>et al.</i> , 1997)                        |
| <b>T7-Promotor-Primer</b>                    | 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3'  |
| <b>T7-Terminator-Primer</b>                  | 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG-3'  |
| <b>W55F-Vorwärts-Primer</b>                  | 5'-GTT TTG CCC GGC AGC TTG TTT ACC GAT GGC GAC AAC CAA-3'  |
| <b>W55F- Rückwärts-Primer</b>                | 5'-TTG GTT GTC GCC ATC GGT AAA CAA GCT GCC GGG CAA AAC-3'  |

### 3.1.5. Reagenzien und Lösungen

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Standardpuffer</b> | 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM CaCl <sub>2</sub> , entgast und durch eine G4-Fritte bzw. einen Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) 0,45 µm filtriert |
|-----------------------|---|

#### Puffer für die Affinitätsreinigung an Bacitracin-Kieselgel

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>Startpuffer</b>    | 20 mM Natriumacetat, pH 5,3; 5 mM CaCl <sub>2</sub>                                     |
| <b>Elutionspuffer</b> | 20 mM Natriumacetat, pH 5,3; 5 mM CaCl <sub>2</sub> ; 2,5 M NaCl; 20% (v/v) Isopropanol |

**Lösungen für den Casein-Test**

|                            |  |
|----------------------------|--|
| <b>1%-ige Caseinlösung</b> | 1% (w/v) Casein; 0,08% Natriumazid in Standardpuffer |
| <b>TCA-Lösung</b>          | 0,1 M TCA; 0,22 M Natriumacetat; 0,33 M Essigsäure   |

**Puffer und Lösungen für die Elektrophorese**

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>SDS-Probenpuffer</b>         | 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 2% (w/w) SDS; 25% (v/v) Glycerin; 10 mM DTT; Bromphenolblau        |
| <b>Coomassie-Färbelösung</b>    | 0,25% (w/v) Coomassie G-250; 42,5% (v/v) Ethanol; 5% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure. |
| <b>Coomassie-Entfärbelösung</b> | 20% (v/v) Ethanol; 10% (v/v) Essigsäure  |

**3.1.6. Nährmedien**

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>LB-Kan-Medium</b>       | 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Nach Autoklavieren wurde Kan in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugesetzt.   |
| <b>LB-Kan-Agar</b>         | LB-Kan-Medium mit 1,5% (w/v) Select Agar  |
| <b>TY-Medium</b>           | 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl. Die Lösung wurde mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Nach Autoklavieren erfolgte die Zugabe von MnCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 0,1 mM) und Chloramphenicol (Endkonzentration 5 µg/ml).  |
| <b>TY-Milch-Agar</b>       | TY-Medium mit 1,5% (w/v) Select Agar und 0,8% (w/w) Milchpulver   |
| <b>Mineralsalzmedium</b>   | 16,0 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 19,74 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 4,0 g NH <sub>4</sub> Cl; 116,8 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 32,0 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O; 8,0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -Citrat in 8 l deionisiertem Wasser mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. |
| <b>Fermentationsmedium</b> | 600 ml einer 300 g/l Glukose- bzw. Casaminsäure-Lösung wurden getrennt autoklaviert und 8 l autoklaviertem Mineralsalzmedium zugesetzt. Über einen 0,2 µm Sterilfilter wurden außerdem 0,1 g/l Thiamin;   |

0,1 mM MnCl<sub>2</sub>; 5 mg/l Chloramphenicol; 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 16 ml Spurenelementlösung zugesetzt.

### **Feeding-Lösung**

500 ml einer 550 g/l Glukoselösung wurde autoklaviert und mit 50 ml 16-fach konzentriertem und autoklaviertem Mineralsalzmedium versetzt. Über einen 0,2 µm Sterilfilter wurden außerdem 0,1 g/l Thiamin; 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>; 5 mg/l Chloramphenicol; 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 2 ml Spurenelementlösung zugesetzt.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Computer-Modellierung**

Die Modellierung von Mutationen erfolgte mit dem Programm WHAT IF (Vriend, 1990) an einer Silicon Graphics Indigo2 Workstation. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Mutation keine möglichen konformellen Spannungen erzeugt oder die vorhandenen Wasserstoffbrückennetze bzw. elektrostatische Wechselwirkungen stört. Das Modell von NPste wurde durch Homologie-Modellierung auf der Basis von Thermolysin von Vriend & Eijsink (1993) erstellt.

### **3.2.2. Molekularbiologische Methoden**

Die Mutagenese zur Erzeugung der Enzymvariante W55F mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Matrizen-DNA diente das Plasmid pET-28b(+)-NPste (3.1.4.) mit der reifen Sequenz von NPste. Als Mutagenese-Primer wurden die W55F-Vorwärts- und -Rückwärts-Primer (3.1.4.) eingesetzt. Die Mutations-Polymerase-Kettenreaktion, der *DpnI*-Verdau der parentalen DNA und die Transformation von *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei auf Kan-Resistenz selektiert wurde. Die Zellen wurden in LB-Kan-Medium bei 37°C angezogen. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Kulturüberstand mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Sequenz der mutierten DNA-Fragmente

wurde nach der Sanger-Kettenabbruch-Methode (Sequitherm Excel™ II DNA-Sequenzierungskit-LC (Epicentre Technologies, Oldendorf, Deutschland)) mit einem LI-COR DNA Sequencer (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) nach Herstellerangaben ermittelt. Als Sequenzierprimer wurden T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer (3.1.4.) verwendet. Die Übertragung der W55F-Mutation in den *B. subtilis*-Expressionsvektor pGE501 erfolgte über einen Restriktionsverdau mit *SaII* und Ligation in den ebenfalls mit *SaII* geschnittenen Vektor pGE501. Die Plasmide wurden zur Transformation kompetenter *B. subtilis* DB117-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in TY-Medium bei 37°C angezogen, und es wurde auf Chloramphenicol-Resistenz selektiert. Positive Klone wurden anhand der Hofbildung durch Hydrolyse des im TY-Milchagar enthaltenen Caseins sichtbar. Sie wurden in TY-Medium angezogen und als Glycerinkultur bei -80°C gelagert.

Alle Routinemethoden wurden entsprechend Sambrook *et al.* (1989) bzw. Gassen & Schimpf (1999) durchgeführt.

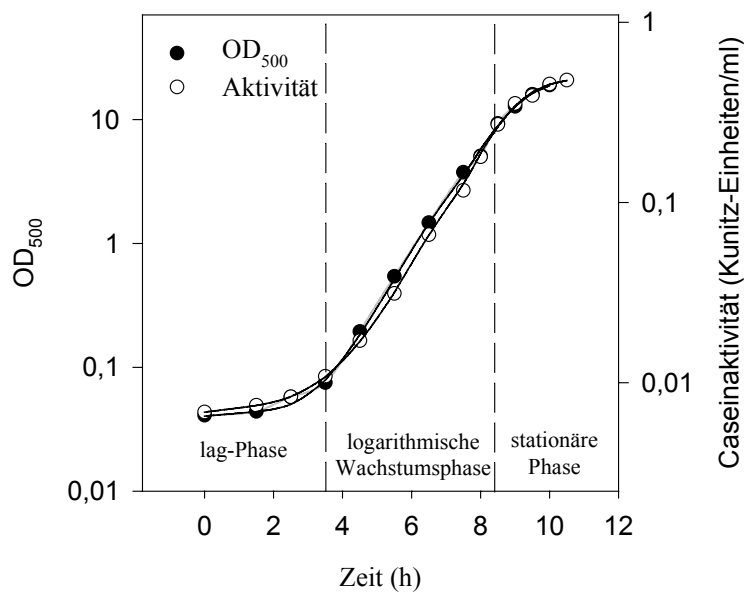
### 3.2.3. Expression und Reinigung der Enzymvarianten

Die Enzymvarianten von NPste wurden in dem Protease-defizienten *B. subtilis*-Stamm DB117 (Eijsink *et al.*, 1990), der das Plasmid pGE530 mit dem Gen für pWT und die Enzymvariante G8C/N60C bzw. das Plasmid pGE501 mit dem Gen für die Enzymvariante W55F trägt (3.1.4.), exprimiert. Die Zellen wurden auf TY-Milch-Agar bei 37°C angezogen. 20 ml TY-Medium wurden mit einer Einzelkultur beimpft und 6 h bei 37°C angezogen. 5 bzw. 2 ml Vorkultur wurden zu 500 ml TY-Medium für die Schüttelkolben-Anzucht oder zu 200 ml Fermentationsmedium als Starterkultur für die Fermentation zugegeben. Die Enzyme wurden ins Medium sekretiert und aus dem Kulturüberstand isoliert.

Die Anzucht im Schüttelkolben erfolgte über 24 h bei 32°C und unter Belüftung. Nach Zentrifugation (8.000 g, 10 min) wurden die Enzyme aus dem Kulturüberstand mittels Bacitracin-Affinitätschromatographie (Van Den Burg *et al.*, 1989; Eijsink *et al.*, 1991a; siehe nächste Seite) isoliert.

Die 8 l- Fermentation erfolgte wahlweise im *Batch*- oder *Fedbatch*-Verfahren und wurde in Anlehnung an Siebert (2000) durchgeführt. Das Fermentationsmedium wurde mit 200 ml Starterkultur im Fermentor (BIOSTAT C-Laborfermentor, B. Braun BIOTECH INTERNATIONAL, Melsungen, Deutschland) versetzt und der Fermentationsverlauf mittels

Prozessleitsystem MFCS-Win aufgezeichnet. Bei 32°C wurde die Anzucht über 8 h durchgeführt, bis eine optische Dichte bei 500 nm ( $OD_{500}$ ) von ca. 20 erreicht wurde. Die *Batch*-Fermentation wurde danach abgebrochen. Bei einer *Fed-Batch*-Fermentation wurde die Zufütterung bei einer  $OD_{500} = 15$  mit *Feeding*-Lösung (Flussrate 150 ml/h) gestartet und 2-3 h weitergeführt. Während der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationslösung über die Rührerdrehzahl und die Belüftungsrate auf 40% des Sauerstoffsättigungswertes eingestellt. Während der Fermentation wurden der Sauerstoffpartialdruck, die Rührergeschwindigkeit, die Belüftungsrate und der pH-Wert aufgezeichnet. Durch Zugabe von 25%-iger Ammoniaklösung während der Fermentation wurde der pH-Wert auf 7,2 gehalten. Nach jeweils 30-60 min wurden Kulturproben entnommen, bei 10.000 g für 10 min zentrifugiert und die Überstände auf Casein-Aktivität und Proteingehalt untersucht. Ein typischer Fermentationsverlauf ist in Abb. 3-1 dargestellt. Anhand der Wachstumskurve wurde der Fermentationsverlauf beurteilt und die Fermentation gegebenenfalls abgebrochen, wenn die Kulturen in die stationäre Phase übertraten.



**Abb. 3-1: Verlauf einer typischen Fermentation**

Batch-Fermentation zur Anzucht von pWT. Die Zunahme der Zelldichte bzw. Biomasse ist anhand der  $OD_{500}$  dargestellt. Die Zunahme der Aktivität gegen Casein (3.2.4.1.) im Überstand beschreibt die Expression von pWT. Die drei Wachstumsphasen sind gekennzeichnet.

Nach Zentrifugation (6.000 g, 20 min) wurde der Kulturüberstand mit Natriumazid (Endkonzentration 0,067% (w/v)) versetzt, mit 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) auf pH 5,3 eingestellt und auf eine Bacitracin-Kieselgelsäule (Stepanov & Rudenskaya, 1983) aufgetragen. Nach Beladen wurde die Säule jeweils mit drei Säulenvolumina Startpuffer bzw. Startpuffer/2,5 M NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer und wurde anhand der Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese auf Reinheit geprüft, und NPste-haltige Fraktionen wurden vereinigt. Nachfolgend wurde die

Enzymlösung mittels Ultrafiltration (Amicon-Konzentrierungseinheit mit einer PM10-Membran von 10 kDa Ausschlussgrenze) konzentriert, bis eine Proteinkonzentration von ca. 500 µg/ml erreicht wurde und bei -20°C gelagert.

Unmittelbar vor Verwendung wurde die Enzymlösung für 3 h gegen Standardpuffer (3.1.5.) dialysiert (10 kDa Ausschlussgrenze). Eventuelle Protein-Verunreinigungen wurden durch einen Hitzeschritt (Inkubation der Probe im Dialyseschlauch im Wasserbad bei 65°C für 8 min) beseitigt. Nach einer weiteren Dialyse gegen Standardpuffer (3.1.5.) wurden die Enzymlösungen gegebenenfalls durch Überschichten des Dialyseschlauchs mit PEG 100.000 konzentriert. Eine eventuell noch auftretende leichte Braunfärbung durch Bestandteile des Kulturmediums wurde durch Zugabe von ca. 5% (v/v) Diethylaminoethyl-Sephacel (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gebunden. Das Chromatographiematerial wurde durch Zentrifugation (5 min, 20.400 g) abgetrennt, gewaschen und wiederverwendet. Die auf diese Weise präparierten Enzymlösungen wurden bei 4°C gelagert und innerhalb von einer Woche aufgebraucht.

### **3.2.4. Aktivitätsmessung**

#### 3.2.4.1. Caseintest

Der Caseintest wurde in Anlehnung an Fujii *et al.* (1983) durchgeführt. Dazu wurden 250 µl einer 1%-igen Caseinlösung (3.1.5.) bei 37°C vortemperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl Probe in einer entsprechenden Verdünnung gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl TCA-Lösung (3.1.5.) abgestoppt. Nach erfolgter Protein-Fällung (30 min bei Raumtemperatur) wurde die Probe für 10 min bei 20.400 g zentrifugiert und der Überstand bei 275 nm gegen Wasser vermessen. Zu jeder Probe wurde ein Blindwert als Kontrolle mitgeführt, wobei hier vor Enzymzugabe das Casein durch vorherige Zugabe der TCA-Lösung ausgefällt wurde. Die Enzym-Proben wurden so verdünnt eingesetzt, dass die Absorptionsänderung im Caseintest nicht größer als 0,5 Extinktionseinheiten (1 cm Lichtweg) betrug. Die Absorption ist ansonsten nicht mehr proportional zur Enzymkonzentration, da sie in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymmenge eine Sättigungskurve beschreibt. Die Aktivität gegen Casein wurde in Kunitzeinheiten ausgedrückt. Dabei entspricht einer Kunitz-Einheit diejenige Enzymmenge, die eine Absorptionsänderung im Casein-Test von einer Absorptionseinheit pro Minute Inkubationszeit hervorruft (Kunitz, 1947).

#### 3.2.4.2. FAGLA-Test

Der FAGLA-Test wurde in Anlehnung an die Methode nach Feder (1968) durchgeführt. Bei 25°C wurden 394 µl Probe mit 6 µl 125 mM FAGLA-Stammlösung (in DMSO) versetzt und die Absorptionsabnahme bei 345 nm über 5 min an einem Ultrospec 3000 UV-Spektrophotometer (Amersham Biosciences, Uppsala Schweden) verfolgt. Die genaue FAGLA-Konzentration wurde anhand des Extinktionskoeffizienten bei  $\Delta\epsilon_{345\text{ nm}} = 760\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Der Substratumsatz wurde anhand des Extinktionskoeffizienten bei  $\Delta\epsilon_{345\text{ nm}} = 317\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  berechnet.

#### 3.2.4.3. Abz-AGLA-Nba-Test

60 µl einer 1 mM Lösung des Fluoreszenzsubstrates Abz-AGLA-Nba (Nishino & Powers, 1980) (in DMF) wurden zu 2940 µl Probelösung in eine rührbare Fluoreszenz-Küvette gegeben und die Zunahme der Fluoreszenz bei 415 nm nach Anregung bei 340 nm gemessen. Die Anregungs- und Emissions-Spaltbreiten betragen jeweils 5 nm. Bei geringen Enzymaktivitäten werden die Messdaten von einer unkatalysierten Photooxidationsreaktion überlagert, die durch 5 min Vorbestrahlung der Substratlösung im Fluorimeter eliminiert werden konnte. Der Reaktionsstart erfolgte dann durch Enzymzugabe. Die Messungen wurden an einem FluoroMax2-Fluorimeter (Jobin Yvon spec., Grasbrunn, Deutschland) durchgeführt und der lineare Anfangsanstieg der Fluoreszenzänderung gegen die Zeit ermittelt.

### **3.2.5. Proteinchemische und biophysikalische Methoden**

#### 3.2.5.1. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die BCA-Methode wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. 50 µl Probe wurden mit 1 ml BCA-Reagenz bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm gegen Wasser gemessen. Eine BSA-Eichreihe im Bereich von 20-800 µg/ml wurde als Standard mitgeführt. Es wurde kontrolliert, dass Isopropanol und GdnHCl innerhalb der verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf den BCA-Test haben.

#### 3.2.5.2. NaDOC-Fällung

Die NaDOC-Fällung zur Konzentrierung von Proteinproben und zum Abtrennen von störenden Substanzen wurde in Anlehnung an Dürrschmidt *et al.* (2001) durchgeführt. Die

Probe wurde gegebenenfalls mit Wasser auf 2 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl einer 10%-igen NaDOC-Lösung und 50 µl einer 50%-igen (w/w) TCA-Lösung bildete sich ein milchiger Niederschlag. Die Fällung erfolgte mindestens für 15 min - meistens aber über Nacht - bei 4°C. Nach Zentrifugation (30 min, 20.400 g, 4°C) wurde das Pellet zunächst mit eiskaltem Aceton und nach erneuter Zentrifugation (30 min, 20.400 g, 4°C) mit eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend unter Vakuum (Vakuumzentrifuge Jouan RC 10.10., Unterhaching, Deutschland) getrocknet. Für die Elektrophorese wurde es in SDS-Probenpuffer (3.1.5.) aufgenommen. Es wurde gezeigt, dass die Fällung quantitativ für Proteinkonzentrationen  $\geq 0,05 \mu\text{g/ml}$  geeignet ist.

#### 3.2.5.3. SDS-Gelelektrophorese

Es wurden 0,75 mm-SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (1970) mit 15% Acrylamid und 0,4% N,N'-Methylenbisacrylamid im Trenngel verwendet. Die Proben wurden vor Zugabe von SDS-Probenpuffer (3.1.5.) mit oPA (Endkonzentration 1 mM) versetzt, wenn die Proben nicht vorher mit NaDOC gefällt worden waren. Die Gele wurden nach dem Lauf anschließend mit Silbernitrat (Nesterenko *et al.*, 1994) oder mit Coomassie (Rehm, 2000) gefärbt. Für die Coomassie-Färbung (3.1.5.) zur quantitativen Auswertung der Bandenintensität wurden die Gele zunächst über Nacht in der Färbelösung geschwenkt, anschließend mehrfach mit Entfärber (3.1.5.) behandelt und densitometrisch ausgewertet (CD 60, DESAGA, Darmstadt, Deutschland). Für Nativgele wurde der Zusatz von SDS weggelassen.

#### 3.2.5.4. Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt (pI) wurde durch isoelektrische Fokussierung (IEF) mit PhastGel-IEF-Flachbettgelen (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) mit immobilisiertem pH-Gradient von 3-9 am PhastSystem™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) nach dem Herstellerprotokoll bestimmt. 3 µl der Probe sowie ein IEF-Standard (Serva, Heidelberg, Deutschland) wurden jeweils an verschiedenen Stellen im Gel aufgebracht. Nach dem Färben des Gels wurde mit Hilfe der Laufstrecken der Standardproteine eine Eichgerade ( $\lg(\text{Laufstrecke im Gel})$  vs. pI der Standardproteine) erstellt und daraus der pI des Zielproteins berechnet.

#### 3.2.5.5. Carbamidomethylierung von Cysteinresten

Die Carbamidomethylierung wurde in Anlehnung an Hollecker (1997) durchgeführt. Dazu wurde die Disulfidbrücke in G8C/N60C in Gegenwart von 100 mM DTT für 1 h unter N<sub>2</sub>-



Begasung reduziert. Iodacetamid (Endkonzentration 1 M) wurde zugegeben und die Lösung für 30 min im Dunkeln unter N<sub>2</sub>-Begasung bei 37°C inkubiert. Nicht umgesetztes Iodacetamid wurde durch Dialyse gegen Standardpuffer (3.1.5.) entfernt.

#### 3.2.5.6. Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex<sup>TM</sup> 75 HR 10/30 *fast-protein-liquid-chromatography*(FPLC)-Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) an einer inerten *high-performance-liquid-chromatography*(HPLC)-Anlage (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland), die mit einer Niederdruckgradienten-Pumpe betrieben wurde, durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Flussrate betrug 0,6 ml/min. Das Laufmittel (Standardpuffer/20% (v/v) Isopropanol) wurde entgast und filtriert (G4-Fritte). Die Probenlösungen wurden vor Applikation zentrifugiert (5 min, 20.400 g). Die Trennung im Bereich von etwa 70 kDa bis 7 kDa erfolgte - entsprechend der Beziehung  $K_{av} \sim -\log(M_r)$ . Die folgenden Säulenparameter wurden ermittelt:

Ausschlußvolumen (mit Dextranblau gemessen):  $V_O = 8,07$  ml

Leervolumen (mit Tyrosin gemessen):  $V_L = 20,85$  ml

geometrisches Säulenvolumen:  $V_T = 23,56$  ml

effektiver Verteilungskoeffizient: 
$$K_{AV} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

mit Elutionsvolumen  $V_E = \text{Retentionszeit} \cdot \text{Flußgeschwindigkeit}$

#### 3.2.5.7. Reversed-phase-Chromatographie

Die *reversed-phase*-HPLC (RP-HPLC) wurde an einer inerten HPLC-Anlage (Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland), die mit einer Niederdruckgradienten-Pumpe betrieben wurde, durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 bzw. 214 nm. Das Laufmittel wurde entgast und filtriert (G4-Fritte). Die Probenlösungen wurden vor Applikation zentrifugiert (5 min, 20.400 g). Die Elution erfolgte mit steigender ACN-Konzentration von 0% auf 100% ACN in 15 min bei einer Flußrate von 1 ml/min.

Es wurde eine C<sub>3</sub>-Säule (125/4 Nucleosil 500-5 PPN mit 5 µm-Kieselgelpartikeln und einer Porengröße von 500 Å (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)) oder eine C<sub>8</sub>-Säule (250/4 Nucleosil 500-5 PPN mit 5 µm-Kieselgelpartikeln und einer Porengröße von 300 Å (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet.

### 3.2.5.8. Analytische Ultrazentrifugation

Die Untersuchungen wurden an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Inc., Fullerton, USA) mit Doppelsektorzellen (für Probe und Puffer) bei 20°C durchgeführt. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte mittels Sedimentationslauf über 4 h. Für die Analyse wurde das partielle spezifische Volumen von Thermolysin von 0,73 ml/mg (Vita *et al.*, 1989) verwendet. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Gleichgewichtslauf über 24-48 h. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Lilie (Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität, Halle) durchgeführt.

### 3.2.5.9. Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) zur Molekularmassenbestimmung wurden an einem Esquire-LC Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Die Elutionsfraktionen aus der RP-HPLC-Reinigung (3.2.5.7.) wurden nach Vakuum-Konzentrierung (Jouan RC 10.10., Unterhaching, Deutschland) direkt eingesetzt. Das Lösungsmittel war ein ACN-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 (v/v).

Die Matrix-unterstützten Laserdesorption-Ionisations-Massenspektren (MALDI-MS) wurden an einem Reflex Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Deutschland) aufgenommen. Nach erfolgter Ionisierung und Desorption durch N<sub>2</sub>-Laser-Beschuss (337 nm) wurden die Ionen linear bei einer Spannung von 28,4 kV beschleunigt und die Flugzeit vermessen (MALDI-TOF). Als Matrix für die Probe diente eine gesättigte Sinapinsäurelösung in einem ACN-Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 3:2:5 (v/v/v).

Die massenspektrometrischen Analysen wurde freundlicherweise von Frau Dr. Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

## **3.2.6. Spektroskopische Methoden**

Die Enzymlösungen wurden vor Verwendung wie in 3.2.3. beschrieben gegen Standardpuffer (3.1.5.) dialysiert und zentrifugiert (5 min; 20.400 g). Der Dialysepuffer wurde als Referenz für die spektroskopischen Messungen verwendet. Die verwendeten Puffer wurden entgast und filtriert (0,2 µm-Sterilfilter, Roth (Karlsruhe, Deutschland)). Alle Messungen wurden in Quarz-Küvetten durchgeführt. Soweit nicht anders ausgeführt wurde bei 25°C gemessen.

### 3.2.6.1. Fluoreszenz-Spektroskopie

Die **Fluoreszenzspektren** wurden an einem FluoroMax2-Fluorimeter (Jobin Yvon spec., Grasbrunn, Deutschland) aufgenommen. Die Anregungs- und Emissionsspaltbreite betrug jeweils 5 nm. Bei 278 nm wird sowohl Tyrosin als auch Tryptophan angeregt, aber bei 295 nm nur selektiv Tryptophan. Zu jeder Probe wurde ein Basislinienspektrum des Puffers aufgenommen und zur Korrektur von den Probenspektren abgezogen. Auf eine tägliche Eichung mit Rhodamin B wurde verzichtet und nur unkorrigierte relative Fluoreszenzintensitäten (RF) gemessen. Es wurde in rührbaren und verschließbaren 1 cm-Küvetten gemessen.

Für Messungen der **Entfaltungskinetik** wurde bei einer Anregung bei 295 nm die Emission gleichzeitig bei 334 und 354 nm detektiert. Es wurde der Intensitätsabfall bei 334 nm und der Quotient der Intensitäten bei 334 und 354 nm ( $RF_{334}/RF_{354}$ ) als Messgröße verwendet (4.1.3.). Einflüsse von Lösungsmittelzusätzen ( $CaCl_2$ , GdnHCl und Isopropanol) bzw. der Temperatur auf die Fluoreszenz wurden mit NATA als Modellsubstanz mittels Titrationsmessungen (Hamilton-Titrator Microlab 500, Bonaduz, Schweiz) überprüft.

**Aggregationsmessungen** wurden anhand der Zunahme des Streulichts bei gleichzeitiger Anregung und Emission bei 360 nm unter ständigem Rühren gemessen. Die Spaltbreiten betragen 1 nm. Eine Aggregatbildung führt zuerst zu einer Suspension mit einer Trübung der Lösung. Erst später erfolgt gegebenenfalls eine Polymerisation entstandener Aggregationskeime unter Präzipitation. Die Eichung der Methode erfolgte durch TCA-Fällung (2,5% (w/w) TCA-Endkonzentration) von nativem Enzym in verschiedenen Proteinkonzentrationen (Abb. 4-23). Die vollständige Präzipitation wurde anhand der SDS-Gelelektrophorese kontrolliert. Diese Streulichtzunahme wurde 100% gesetzt.

Die Lösungsmittelzugänglichkeit von Tryptophanresten wurde durch **Acrylamid-Quenchen** untersucht. Vor der Zugabe von Acrylamid als Quencher (Q) wurde die Ausgangsfluoreszenz ( $F_0$ ) bestimmt. Zu 3 ml Enzymlösung wurden anschließend in einer rührbaren Küvette schrittweise 10-mal 5  $\mu$ l und dann 20-mal 10  $\mu$ l einer 8 M Acrylamidlösung zugesetzt. Nach jedem Schritt wurde nach mischen die Fluoreszenzemission bei 334 nm (F) bei 295 nm-Anregung aufgezeichnet. Der Verdünnungsfaktor durch die Acrylamidzugabe wurde berücksichtigt, aber eine Korrektur der Daten aufgrund der Eigenabsorption von Acrylamid bei 295 nm war nicht notwendig. Die Auswertung der Daten erfolgte in Abhängigkeit der zugesetzten Acrylamid-Konzentration zum einen in der Stern-Volmer-Auftragung (Eftink & Ghiron, 1976b) und zum anderen in der Lehrer-Auftragung (Lehrer, 1971). Bei der Stern-Volmer-Auftragung ( $F/F_0$  vs. [Q]) wurde das statische Quenchen berücksichtigt:

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} \cdot [Q]) \cdot e^{V[Q]} \quad [3-1]$$

Mit  $K_{SV}$  als (dynamischer) Stern-Volmer-Konstante und  $V$  als statischer Quench-Konstante. In der Auftragung nach Lehrer ( $F_0/(F_0-F)$  vs.  $1/[Q]$ ) wurde der hintere Teil der Kurve (entsprechend niedrigen Acrylamid-Konzentrationen) folgendermaßen ausgewertet:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f \cdot K_{eff} \cdot [Q]} + \frac{1}{f} \quad [3-2]$$

wobei  $K_{eff}$  die effektive *Quench*-Konstante und  $f$  den Tryptophananteil, der dem *Quencher* bei niedrigen Acrylamid-Konzentrationen zugänglich wird, bedeuten. Die relative Zugänglichkeit wurde auf NATA bezogen.

### 3.2.6.2. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem 62A DS-CD-Spektrophotometer (Aviv, Lakewood, NJ, USA) bei 25°C aufgenommen. Für die Aufnahme von CD-Spektren im fernen ultravioletten(UV)-Bereich (180-250 nm) wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm und für den nahen UV-Bereich (250-320 nm) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Spaltbreite betrug 1 nm, die Zeitkonstante 2 s, und es wurden 5-10 Einzelspektren akkumuliert. Zu jeder Probe wurde ein Pufferspektrum aufgenommen. Bei längeren Messungen wurden zur Ermittlung der Signalstabilität mehrmals während der Messung Pufferspektren aufgenommen und verglichen. Für **kinetische Untersuchungen** wurde zuerst die Datenaufzeichnung am Gerät gestartet und dann die Messung durch Zugabe von Enzymlösung. Die Änderung der Sekundärstruktur wurde bei 222 nm verfolgt. Die erhaltenen Messwerte wurden in molare Elliptizitäten pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{MRW}$  nach [3-3] umgerechnet (Schmid, 1997):

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M_r}{d \cdot c \cdot n_{AS}} \quad [3-3]$$

- $\Theta$  : gemessene Elliptizität in Grad
- $M_r$  : molare Masse in g/mol
- $d$  : Schichtdicke der Küvette in cm
- $c$  : Proteinkonzentration in mg/ml
- $n_{AS}$  : Anzahl der Aminosäuren im Molekül

### 3.2.7. Bestimmung der kinetischen Konstanten

Für Messungen in Gegenwart von GdnHCl wurden Stammlösungen für GdnHCl (8,5 M in Wasser), Tris/HCl, pH 7,5 (4,0 M in Wasser) und CaCl<sub>2</sub> (1,0 M in Wasser) verwendet. Alle Lösungen wurden entgast und filtriert (0,2 µm-Sterilfilter, Roth (Karlsruhe, Deutschland)). Die GdnHCl-, CaCl<sub>2</sub>-, Tris/HCl- und gegebenenfalls Isopropanol-Konzentration jeder Probe wurde separat daraus eingestellt. Die genaue GdnHCl-Konzentration jeder Probe wurde refraktometrisch nach folgender Formel bestimmt (Nozaki, 1972):

$$[GdnHCl](M) = 57,147 \cdot x + 38,68 \cdot x^2 - 91,6 \cdot x^3 \quad [3-4]$$

x: Differenz der Brechungsindizes zwischen Standardpuffer (3.1.5.) und GdnHCl/Standardpuffer

#### 3.2.7.1. Kinetische Messungen unter Entfaltungsbedingungen

Die Messung der **Inaktivierungskinetik** bei GdnHCl- oder Temperatur-induzierter Entfaltung erfolgte anhand der Restaktivität gegen Casein (3.2.4.1.) oder Abz-AGLA-Nba (3.2.4.3.) nach Rücksprung unter Nativbedingungen. Dazu wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten den Entfaltungsansätzen Aliquote entnommen. Diese wurden bei der Temperatur-induzierten Entfaltung schnell auf Eis abgekühlt bzw. bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung 1:50 in Standardpuffer (3.1.5.) verdünnt und für die Bestimmung der Restaktivität verwendet.

Die **Entfaltungskinetiken** wurden mittels Fluoreszenz- bzw. CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich (3.2.6.1. und 3.2.6.2.) bestimmt.

Zur Untersuchung der **Autoproteolysekinetik** wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten Aliquote entnommen und die Proben nach einer vorherigen NaDOC-Fällung (3.2.5.2.) in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) aufgetrennt. Neben der Abtrennung von GdnHCl bewirkte die Fällung auch eine Inaktivierung der Protease sowie eine Konzentrierung. Nach Coomassie-Färbung (3.2.5.3.) der Gele wurde die Bande des intakten Proteins densitometrisch ausgewertet (CD60, Desaga, Darmstadt, Deutschland). Innerhalb des Fehlers lieferte diese Methode die gleichen Aussagen wie die Analyse durch RP-HPLC. Der störende Einfluss von Rest-GdnHCl, Isopropanol, CaCl<sub>2</sub> und oPA wurde untersucht und ein Grenzwert der Konzentration dieser Substanzen ermittelt, unterhalb dessen die Fällung nicht beeinträchtigt wird. In Gegenwart geringer Proteinkonzentrationen und hoher Rest-GdnHCl-Konzentrationen (> 1 M) versagt allerdings diese Methode, und es kann nur die Restaktivität

nach Rücksprung unter Nativbedingungen (siehe Inaktivierungskinetik) als Maß für die Autoproteolyse verwendet werden.

Da neben einer Reaktion 1. Ordnung für die Entfaltung auch das Auftreten einer Reaktion 2. Ordnung für die Autoproteolyse erwartet wurde, erfolgten die Untersuchungen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die Progresskurven wurden nach einer Reaktion 1. bzw. 2. Ordnung angepasst, je nachdem, ob eine Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{\text{obs}}$ ) von der Proteinkonzentration festgestellt wurde:

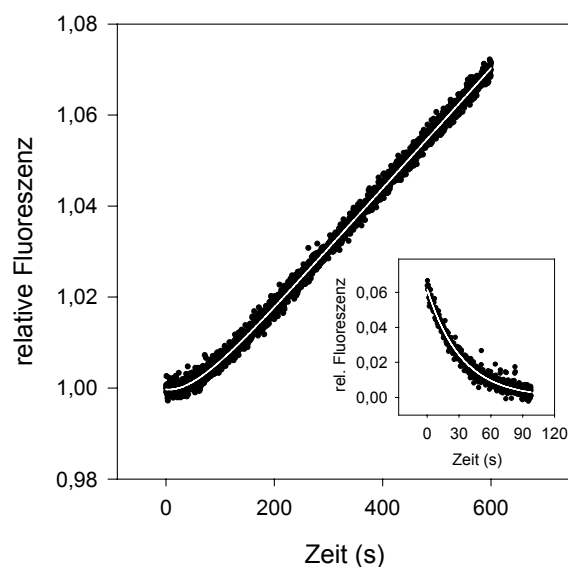
$$\text{Anpassung nach Reaktion 1. Ordnung: } \text{Messgröße}(t) = A \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} + C \quad [3-5]$$

$$\text{Anpassung nach Reaktion 2. Ordnung: } \text{Messgröße}(t) = \frac{A}{1 + k_{\text{obs}} \cdot t} + C \quad [3-6]$$

A, C und  $k_{\text{obs}}$  beschreiben die Amplitude, ein konstantes Glied (*Offset*) und die beobachtete Geschwindigkeitskonstante des zeitlichen Abfalls. Bei einer zeitlichen Zunahme des gemessenen Signals wurde  $A < 0$  gewählt. Bei einer Reaktion 2. Ordnung ist  $k_{\text{obs}}$  das Produkt aus der Enzymausgangskonzentration ( $E_0$ ) und der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.

### 3.2.7.2. Kinetische Messungen unter Rückfaltungsbedingungen

Die Rückfaltungskinetik wurde anhand der **Reaktivierung** verfolgt. War die Reaktivierung langsam (Halbwertszeit  $> 5$  min), so wurden dem Renaturierungsansatz Proben entnommen, die Aktivität gegen Casein (3.2.4.1.) oder Abz-AGLA-Nba (3.2.4.3.) gemessen und die erhaltenen Werte exponentiell angepasst.



**Abb. 3-2: Reaktivierungskinetik von entfaltetem pWT.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C durchgeführt. 5 µg/ml pWT wurden für 3 h in 8 M GdnHCl/Standardpuffer entfaltet und anschließend 1:50 in Standardpuffer verdünnt. Die Reaktivierung wurde anhand der Zunahme des Hydrolyseproduktes des Fluoreszenz-Substrats Abz-AGLA-Nba gemessen und nach [3-8] angepasst. Wird der lineare Endanstieg von den Messdaten abgezogen, kann die erhaltene Kurve exponentiell nach [3-5] angepasst werden (Insert).

Schnelle Reaktivierungskinetiken mit einer Halbwertszeit von weniger als 5 min wurden direkt aus einer Zeit-Umsatzkurve für die Abz-AGLA-Nba-Hydrolyse bestimmt. Dazu wurde zunächst mit nativem Enzym eine Enzymkonzentration ermittelt, die über den Messzeitraum zu einer linearen Zeit-Umsatz-Kurve führte. Die Zugabe von entfaltetem Enzym in der ermittelten Protein-Konzentration zu der Substratlösung (in Standardpuffer) bewirkte eine Rückfaltung. Die Wiedererlangung der Aktivität äußert sich in der Substrathydrolyse.

In einem exponentiellen Anstieg des Substratumsatzes spiegelt sich die Renaturierungskinetik wider. Das Ende der Reaktivierung zeigt sich an der mit der Zeit linearen Produktzunahme (Abb. 3-2). Wird der lineare Endanstieg gegen den Zeitpunkt 0 extrapoliert und von den Originaldaten abgezogen, so wird die Reaktivierungskinetik deutlich sichtbar und kann exponentiell angepaßt werden (Abb. 3-2, Insert).

Zur Ermittlung der scheinbaren Reaktivierungskonstante  $k_{obs}$ , die die Rückfaltung beschreibt, betrachtet man die Substratumsetzung. Die initiale Produktzunahme (P) ergibt sich nach der Michaelis-Menten-Gleichung mit E als aktivem Enzym und  $k_{cat}$  als Katalysekonstante zu:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot S_0}{S_0 + K_m}$$

Für die Substratkonzentration wurde  $S_0$  angenommen, da nur etwa bis zu einem 5-10%-igen Umsatz gemessen wurde. Es wurde bei einer Substratkonzentration von 20  $\mu\text{M}$ , d.h. unterhalb der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ -Wert) von 140  $\mu\text{M}$  (Nishino & Powers, 1980), gemessen, so dass  $S_0 < K_m$  gilt:

Daraus ergibt sich:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot S_0}{K_m} \quad \text{bzw.} \quad P(t) = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \int E(t) dt$$

da die wirksame Enzymkonzentration, wegen der ablaufenden Renaturierungskinetik, zeitabhängig ist. Wird die Renaturierungskinetik durch eine exponentielle Funktion mit A als Amplitude (Anteil des gesamten inaktiven Proteins) und  $k_{obs}$  als beobachtete Geschwindigkeitskonstante beschrieben:  $E(t) = A \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$ , so ergibt sich:

$$P(t) = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \int A \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) dt = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot A \cdot \left( \int dt - \int e^{-k_{obs} \cdot t} dt \right)$$

Eine Integration in den Grenzen von  $t_0 = 0$  bis t ergibt

$$P(t) = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot A \cdot \left( t + \frac{1}{k_{obs}} \cdot (e^{-k_{obs} \cdot t} - e^0) \right) \quad \text{bzw.}$$

$$P(t) = \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot A \cdot t - \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \frac{A}{k_{obs}} + \frac{k_{cat} \cdot S_0}{K_m} \cdot \frac{A}{k_{obs}} \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad [3-7]$$

[3-7] lässt sich in der allgemeinen Form

$$P(t) = C_1 \cdot t - C_2 + C_3 \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} \quad [3-8]$$

mit  $C_i$  ( $i = 1, 2, 3$ ) als Konstanten darstellen.

Zur Auswertung der Reaktivierungskinetiken wurden die Messwerte nach [3-8] angepasst und daraus die Reaktivierungskonstante  $k_{\text{obs}}$  bestimmt.

Die **Autoproteolyse**, die während der Rückfaltung auftrat, wurde analog zu 3.2.7.1. analysiert. Die Progresskurven wurden exponentiell nach [3-5] angepasst, wobei ein Absolutglied zugelassen wurde, das dem gebildeten N, das nicht proteolytisch angreifbar ist, Rechnung trägt.

Die **Herstellung der entfalteten Enzyme** erfolgte für Reaktivierungsmessungen durch mindestens dreistündige Inkubation der nativen Enzyme in 8,0 M GdnHCl/Standardpuffer bei einer Proteinendkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ .

Aufgrund der beschränkten Löslichkeit der Enzyme war es schwierig, die entfalteten Proteine in genügend hohen Proteinkonzentrationen herzustellen. Für Autoproteolysemessungen und für spektroskopische Untersuchungen wurden deshalb die Proteine mit NaDOC gefällt (3.2.5.2.) und anschließend in einem kleinen Volumen 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer aufgenommen. Auf diese Weise konnte denaturiertes Protein in Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml erhalten werden.

### 3.2.7.3. Statistische Auswertung

Wurden Daten aus Mehrfachbestimmungen ( $n \geq 3$ ) ermittelt, so wurde die Standardabweichung angegeben. Wurden Konstanten aus Primär- oder Sekundärauftragungen der Messdaten ermittelt, so wurde die Standardabweichung der Anpassung angegeben. Mittelwerte, die aus den Mittelwerten mehrerer Stichproben errechnet wurden, wurden mit dem Standardfehler versehen. Die mathematische Auswertung der Meßdaten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot, Version 7,0.

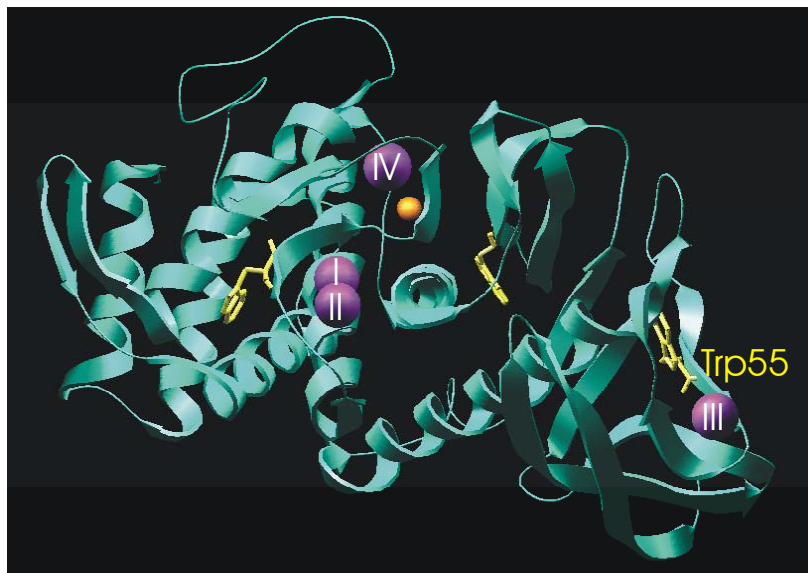


## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Charakterisierung der Enzyme

#### 4.1.1. Enzymvarianten der neutralen Protease aus *B. stearothermophilus*

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen ausgewählte Enzymvarianten von NPste mit dem Ziel, den Einfluss einer lokalen Strukturregion auf die Entfaltung und Stabilität des gesamten Moleküls zu analysieren. Dabei handelt es sich um eine Cystein-freie Enzymvariante von NPste (C288L), im folgenden als **pWT** bezeichnet, die sich vom Wildtyp-Enzym hinsichtlich Aktivität, Stabilität und Struktur nicht unterscheidet (Eijsink *et al.*, 1992a; Dürschmidt *et al.*, 2001). Sie diente als Basis für die Herstellung der Enzymvariante **G8C/N60C** (Mansfeld *et al.*, 1997), die spontan zwischen den Aminosäurepositionen 8 und 60 eine Disulfidbrücke ausbildete (Abb. 2-7), was zu einer extremen Erhöhung der Thermostabilität führte (2.4.4.). Die Gewinnung und Reinigung dieser beiden Enzymvarianten erfolgte nach den bereits vorliegenden Vorschriften (Mansfeld *et al.*, 1997; Siebert, 2000) und ergab vergleichbare Resultate.



**Abb. 4-1: Modell von NPste.**

Das Strukturmodell wurde durch Homologie-Modellierung mit dem Programm WHAT IF erstellt. Die Seitenketten der drei Tryptophane 55, 115 und 186 sind gelb, die vier stabilisierenden Kalziumionen violett und das katalytische Zinkion orange dargestellt.

Außerdem wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese – wie in 3.2.2. und 3.2.3. beschrieben – die Enzymvariante **W55F** erzeugt und für ausgewählte Experimente verwendet. Die Computer-Modellierung (3.2.1.) dieser Mutation zeigte keine bedeutende Veränderung der Struktur und keine ungünstigen Wechselwirkungen. Allerdings ist das Peptidrückgrad im Bereich von Trp55 an der Bindung von CaIII (Abb. 4-1) beteiligt, was für W55F eine

veränderte Kalziumbindung bewirken könnte. Die Auswahl dieser Enzymvariante beruht auf der Tatsache, dass NPste nur drei Tryptophanreste (in den Positionen 55, 115 und 186) besitzt (Abb. 4-1), die in der Fluoreszenzspektroskopie als lokale Sonden fungieren sollten. Da sich der Tryptophanrest 55 in der potentiellen Entfaltungsregion befindet, wurde erwartet, dass sich durch Einbeziehung der Enzymvariante W55F in die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen Rückschlüsse auf die lokale Entfaltung der *Loop*-Region um Trp55 ziehen lassen. Die spezifische Aktivität von W55F gegen Casein (3.2.4.1.) betrug 68.8 Kunitz-Einheiten/mg Protein und entspricht 83% der pWT-Aktivität (Tab. 4-1). Gegen FAGLA als Substrat (3.2.4.2.) ist der  $k_{cat}/K_m$ -Wert von  $18,25 \pm 1,23 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  auf 61% des pWT-Niveaus reduziert. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von FAGLA konnte nicht unter Substratsättigung gemessen werden.

**Tab. 4-1: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von pWT, G8C/N60C und W55F.** Die Aktivitäten gegen Casein (3.2.4.1.) und FAGLA (3.2.4.2.) wurden auf die eingesetzte Proteinmenge (3.2.5.1.) bezogen.

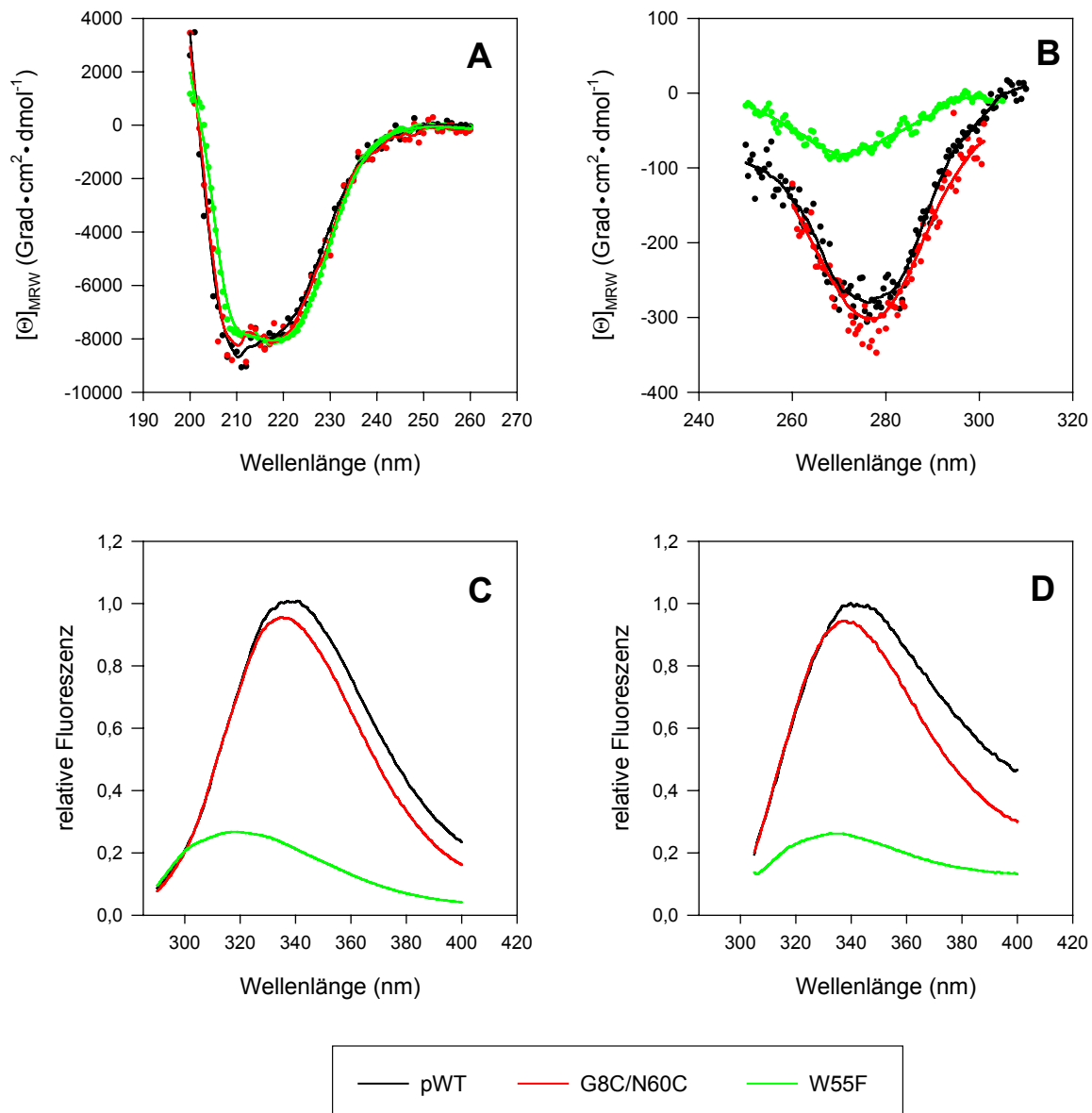
| Enzymvariante                            | Aktivität                     |   |
|--|-------------------------------|---|
|  | Casein ( $\text{U mg}^{-1}$ ) | FAGLA ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) |
| pWT (Mansfeld <i>et al.</i> , 1997)      | $81,5 \pm 5,3$                | $30,0 \pm 4,4 \cdot 10^3$               |
| G8C/N60C (Mansfeld <i>et al.</i> , 1997) | $82,4 \pm 6,2$                | $27,8 \pm 3,5 \cdot 10^3$               |
| W55F                                     | $68,8 \pm 5,9$                | $18,3 \pm 1,2 \cdot 10^3$               |

Alle verwendeten Enzyme waren mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) und Gelfiltration (3.2.5.6.) charakterisiert worden und erwiesen sich als homogen.

#### 4.1.2. Nativspektren von pWT, G8C/N60C und W55F

Spektroskopisch unterscheiden sich **pWT** und **G8C/N60C** nur wenig (Abb. 4-2). Die CD-Spektren im nahen und fernen UV-Bereich (Abb. 4-2 A, B) zeigen keine signifikanten Unterschiede. Das Fluoreszenzemissionsspektrum von G8C/N60C ist bezüglich pWT um 2 nm nach blau verschoben (Abb. 4-2 C, D), was eine leicht hydrophobere Umgebung der Tryptophane anzeigt. Wahrscheinlich ist durch die Ausbildung der Disulfidbrücke die lokale Umgebung von Trp55 geringfügig verändert. Dafür spricht auch die etwas geringere Fluoreszenzintensität. Sie könnte auf einen *quenched* Einfluss der Disulfidbrücke zurückzuführen sein (Schmid, 1997).

Die Emissionsmaxima bei 337-339 nm spiegeln nur eine moderat hydrophobe Umgebung wider. Das mag daran liegen, dass die Tryptophane zwar nicht oberflächlich, aber doch in den Außenbereichen des Proteins lokalisiert sind, was aus der Raumstruktur des strukturverwandten Thermolysins (Colman *et al.*, 1972) geschlossen werden kann.



**Abb. 4-2: Nativspektren von pWT, G8C/N60C und W55F.**

Alle Spektren wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.6.1. und 3.2.6.2. beschrieben, aufgenommen. **A)** CD-Spektren im fernen UV-Bereich, **B)** CD-Spektren im nahen UV-Bereich, **C)** Fluoreszenzemissionsspektren mit 278 nm-Anregung und **D)** Fluoreszenzemissionsspektren mit 295 nm-Anregung. Die Proteinkonzentration betrug 500  $\mu$ g/ml (A, B) bzw. 20  $\mu$ g/ml (C, D).

Auch der Zusatz von 10 mM DTT bewirkt keine Änderungen der Fluoreszenz- und CD-Spektren (Dürschmidt *et al.*, 2001). Allerdings scheint die Disulfidbrücke sehr stabil gegenüber reduzierenden Agenzien zu sein (Mansfeld *et al.*, 1997), so dass sie möglicherweise in Gegenwart von 10 mM DTT noch nicht geöffnet ist.

Es kann zusammengefasst werden, dass die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen den Positionen 8 und 60 keine bedeutenden konformellen Spannungen erzeugt, aber die lokale Umgebung um Trp55 leicht verändert ist.

Die Enzymvariante **W55F** zeigt ein anderes Verhalten. Trotz des annähernd gleichen CD-Spektrums im fernen UV-Bereich von pWT und W55F unterscheiden sich beide Enzyme im CD-Spektrum im nahen UV-Bereich (Abb. 4-2 A, B). Die Signal-Intensität ist um 70% vermindert und die größte negative Elliptizität tritt bei 270 nm - statt wie bei pWT bei 277 nm - auf. Die Sekundärstruktur der Enzyme ist demzufolge nicht beeinflusst, aber es könnten Unterschiede in der Tertiärstruktur existieren. Auch die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren zu pWT lassen auf eine veränderte Tertiärstruktur schließen (Abb. 4-2 C, D). Neben einer starken Rotverschiebung des Emissionsmaximums zu 320 nm (bei 278 nm-Anregung) bzw. 333 nm (bei 295 nm-Anregung) fällt die Intensität um etwa 70% ab. Solche extremen Auswirkungen beim Ersetzen eines Tryptophanrestes durch einen Phenylalaninrest wurden auch bei anderen Proteinen, wie einer Proteintyrosylphosphatase (Pokalsky *et al.*, 1995) gefunden, wo eine starke Blauverschiebung von 345 nach 320 nm beobachtet wurde.

Diese Unterschiede in den Spektren von pWT und W55F vor dem Hintergrund der gleichen Sekundärstruktur (Abb. 4-2 A) und der nur moderaten Beeinträchtigung der Enzymaktivität (4.1.1.) führen zu dem Schluss, dass die drei Tryptophanreste im Molekül nicht als gleichwertig anzusehen sind und Trp55 stark die optischen Eigenschaften der Enzyme dominiert. Es stellt somit eine „Sonde“ für die Entfaltungsregion dar. Über die Verwendung von einzelnen Tryptophanresten als „Sonden“ für verschiedene Bereiche des Proteins wird auch im Fall von humaner Carboanhydrase II (Andersson *et al.*, 1997) und T4-Lysozym (Harris & Hudson, 1990) berichtet. Die Tryptophanreste 115 und 186 liefern im Vergleich zu Trp55 nur einen geringen Beitrag zur Gesamtfluoreszenzintensität, was auf Wechselwirkungen mit dem Peptidrückgrat – speziell mit dem Carbonylsauerstoff – bzw. mit Asp- und Glu-Seitenketten und dem damit verbundenen Quenchen zurückgeführt werden kann (Lehrer, 1971; Burstein *et al.*, 1973; Ricci & Nesta, 1976).

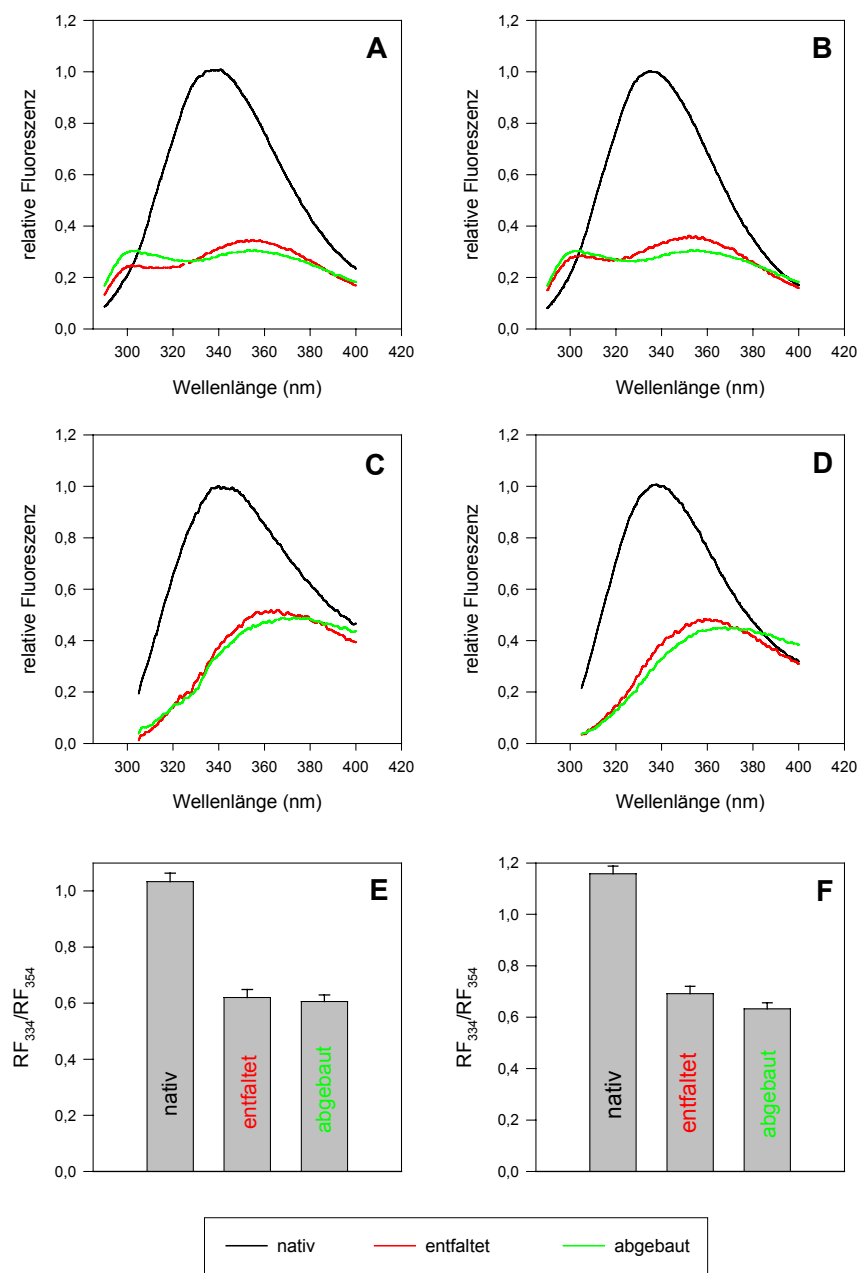
### 4.1.3. Spektren der entfalteten und autoproteolytisch-abgebauten Enzyme – Anwendung für Entfaltungsmessungen

Für Stabilitätsuntersuchungen ist eine Detektionsmethode wichtig, die neben einer hohen Sensitivität und geringen Störanfälligkeit möglichst eindeutige Aussagen über die Entfaltung der Enzyme zulässt. Dabei gilt es, bei Proteasen zwischen entfaltetem, intaktem Protein und den autoproteolytisch gebildeten Peptidfragmenten zu differenzieren. Die CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich zeigt deutliche Änderungen zwischen nativem und denaturiertem bzw. proteolytisch abgebautem Protein (nicht gezeigt). Wegen der begrenzten Löslichkeit der Enzyme und der benötigten hohen Proteinkonzentrationen im Messansatz (500 µg/ml) war aber eine umfangreichere Anwendung dieser Methode ausgeschlossen. Analoges gilt auch für eine Reihe anderer Methoden, wie NMR- und Infrarot-Spektroskopie oder Kalorimetrie (Ahern & Klibanov, 1988). Die sehr sensitive Fluoreszenzspektroskopie erwies sich als die Methode der Wahl.

Um die zu erwartenden Änderungen bei der Entfaltung und Autoproteolyse abzuschätzen, wurden die Fluoreszenzemissionsspektren der nativen Spezies jeweils mit denen der entfalteten, sowie autoproteolytisch abgebauten Spezies verglichen (Abb. 4-3 A-D). Dazu wurden die Enzyme 4 h in 8 M GdnHCl entfaltet. Die Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) zeigte, dass sich unter diesen Bedingungen kein Abbau ereignet. Dagegen kommt es zu einem intensiven und vollständigen Abbau bei vierstündiger Inkubation bei 75°C.

Die Unterschiede in den Fluoreszenzspektren zwischen (intaktem) entfaltetem und abgebautem Enzym sind gering im Vergleich zum Signal der nativen Spezies (Abb. 4-3 A-D) und könnten durch Reststrukturen im denaturierten Zustand verursacht worden sein (Doig & Williams, 1991). Verglichen mit den nativen Spektren zeigen sich Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, der Anzahl der beobachteten Emissionsmaxima und deren Wellenlänge. In den nativen Enzymen ist bei einer gleichzeitigen Anregung von Tyrosin- und Tryptophanresten (bei 278 nm) nur eine gemeinsame Emission zu sehen (Abb. 4-3 A, B). Dies zeigt einen strahlungslosen **Energietransfer** (Förstertransfer), bei dem die Tyrosinreste ihre Energie auf die Tryptophanreste übertragen und keine separate Emission zeigen (Schmid, 1997). Bei Entfaltung bzw. Autoproteolyse tritt eine separate Fluoreszenz für beide Aminosäuren auf (Abb. 4-3 A, B). NPste besitzt drei Tryptophanreste und 32 Tyrosinreste, die gleichmäßig über das gesamte Molekül verteilt sind. Die Entkopplung des Energietransfers sollte ein Maß für die globale Tertiärstrukturentfaltung sein. Im Gegensatz dazu werden bei 295 nm (Abb. 4-3 C und D) nur die Tryptophanreste angeregt. Es ergibt sich hier nur ein Maximum im entfaltetem bzw. abgebauten Zustand. Entsprechend 4.1.2. werden

bei dieser Anregung vor allem die lokalen Änderungen von Trp55 in der potentiellen Entfaltungsregion detektiert.



**Abb. 4-3: Fluoreszenzspektren von pWT und G8C/N60C im nativen, entfaltenen und abgebauten Zustand und die daraus abgeleitete Messgröße  $RF_{334}/RF_{354}$ .**

Die Fluoreszenzmessungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml, wie in 3.2.6.1. beschrieben, durchgeführt. **A)** pWT, 278 nm-Anregung, **B)** G8C/N60C, 278 nm-Anregung, **C)** pWT, 295 nm-Anregung, **D)** G8C/N60C, 295 nm-Anregung. Aus den Emissionsspektren mit Anregung bei 295 nm wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei 334 und 354 nm ( $RF_{334}/RF_{354}$ ) für pWT (**E**) und G8C/N60C (**F**) ermittelt.

Die größten **Intensitätsunterschiede** zwischen nativem und entfaltetem bzw. abgebautem Enzym treten bei 334 nm auf. Hier ist auch der Unterschied zwischen abgebautem und entfaltetem Zustand vernachlässigbar, so dass die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei dieser Wellenlänge benutzt werden kann, um die nativen Moleküle zu quantifizieren, ohne dass der Zustand des Produktes (entfaltet oder abgebaut) unterschieden wird (Abb. 4-3, A-D).

Neben der oben beschriebenen Intensitätsänderung tritt bei Entfaltung und Autoproteolyse eine **Rotverschiebung** des Tryptophan-Emissionsmaximums nach 354-359 nm auf (Abb. 4-3 A-D). Bei kinetischen Untersuchungen ist es allerdings schwierig, die Wellenlängenverschiebung direkt zu bestimmen, weil nur bei diskreten Wellenlängen gemessen wird. Ein Maß für die Wellenlängenverschiebung kann man aber aus dem Quotienten der Intensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen erhalten (Jiang & London, 1990). Als erstes beschrieben Wharton *et al.* (1988) diese Methode, bei der dieser Quotient als Index für die Hydrophobizität der Umgebung von Tryptophanresten verwendet wird. Dabei ist die Wahl der beiden Detektionswellenlängen weniger entscheidend, und in der Literatur werden verschiedene Quotienten angegeben:  $RF_{330}/RF_{350}$  (Wharton *et al.*, 1988; Jiang & London, 1990; Pawar & Deshpande, 2000),  $RF_{340}/RF_{350}$  (Banik *et al.*, 1992) und  $RF_{320}/RF_{380}$  (Ort *et al.*, 1995).

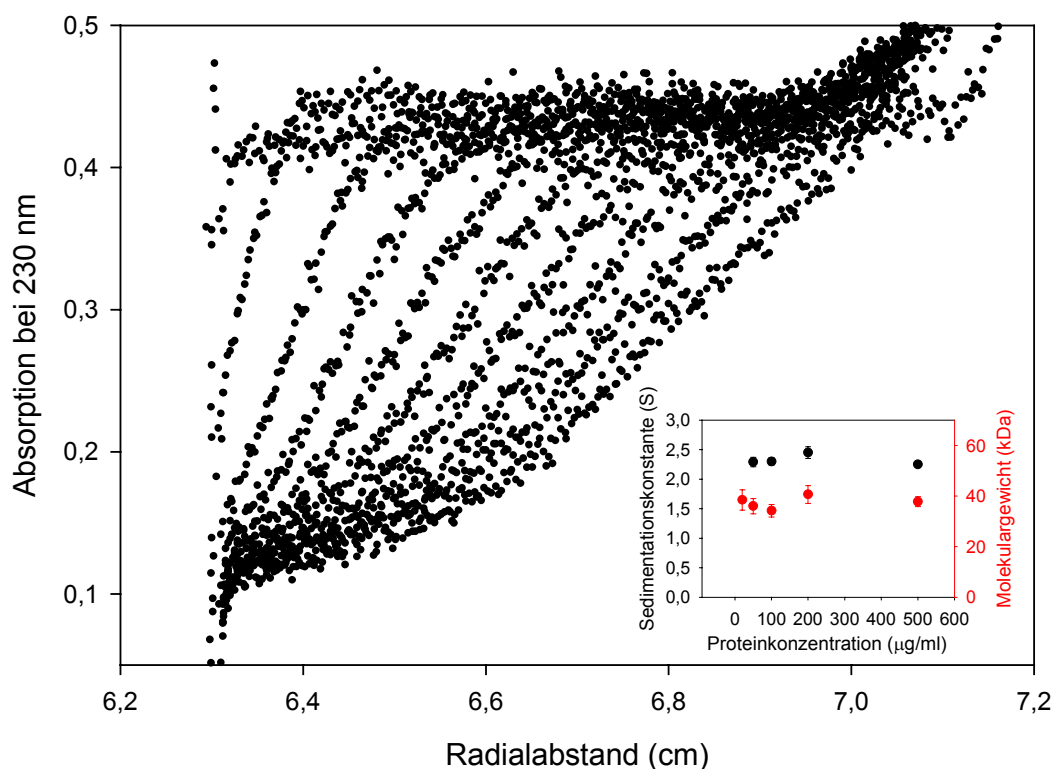
Aus dem Vergleich der Fluoreszenz-Eigenschaften der nativen mit den entfalteten bzw. abgebauten Enzymen können **Bedingungen für die Detektion der Entfaltung** abgeleitet werden. Für die späteren Fluoreszenzexperimente zur Untersuchung der Proteinstabilität wurde sowohl die Fluoreszenzintensität bei 334 nm als auch der Quotient der Intensitäten bei 334 und 354 nm betrachtet (Abb. 4-3 E, F).

Bei Messungen der Entfaltungskinetik waren lange Messzeiten nötig (4.2.2. und 4.3.4.). Dabei ist die Zerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe bei längerer Bestrahlung zu beachten (Eggeling *et al.*, 1998). Dieses *Photobleaching* infolge der Spaltung des Indolrings des Tryptophans in einer Photooxidationsreaktion überlagert die Messung und verursacht einen exponentiellen Abfall des Fluoreszenzsignals. Die Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion ist stark von der Energie des eingestrahlt Lichts abhängig. Um sie möglichst klein zu halten, wurde für Langzeitexperimente nicht bei 278 nm, sondern bei 295 nm angeregt. Diese Anregung hat darüber hinaus den Vorteil, die Signaländerungen auf die drei im Molekül vorkommenden Tryptophanreste zurückführen zu können. Für freies NATA in Lösung wurde eine Geschwindigkeitskonstante für das *Photobleaching* von  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  gefunden. Die native und entfaltete Form von pWT und G8C/N60C unterschieden sich nur

unerheblich in ihrer Geschwindigkeitskonstanten für das *Photobleaching* ( $1,25-1,87 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). Es stellt eine Grenze für die mittels Fluoreszenzmessung bestimmbaren Entfaltungskonstanten dar.

#### 4.1.4. Prüfung auf Assoziation und Aggregation

Zum Nachweis des Vorhandenseins eines merklichen Anteils an Aggregaten oder Oligomeren in den Enzympräparationen wurden die analytische Ultrazentrifugation, die Nativgelelektrophorese, sowie die IEF verwendet. Gelfiltration konnte nicht angewendet werden, da die Enzyme eine Wechselwirkung mit der Matrix zeigten. Die im Folgenden gezeigten Daten am Beispiel von pWT gelten auch für die anderen Enzyme.



**Abb. 4-4: Analytische Ultrazentrifugation von pWT: Sedimentationslauf.**

Der Geschwindigkeitslauf wurde bei 40.000 U/min (120.000 g bei 6,7 cm) in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.5.8. beschrieben, durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml. Die Messungen erfolgten im Abstand von 10 min. Jede dritte Messung ist dargestellt (von links nach rechts). Im Inset sind für verschiedene Proteinkonzentrationen die aus dem Sedimentationslauf ermittelten Sedimentationskonstanten und die aus dem Gleichgewichtslauf bei 20.000 rpm (30.000 g bei 6,7 cm) ermittelten Molekulargewichte aufgetragen.



Wie die Nativgelelektrophorese (nicht gezeigt) weist auch die analytische Ultrazentrifugation (3.2.5.8.) im **Sedimentationslauf** keine Anzeichen für Aggregate auf (Abb. 4-4). Aus den Daten kann auf das Vorhandensein nur einer Spezies mit einem Sedimentationskoeffizienten von  $2,32 \pm 0,04$  Svedberg-Einheiten, der unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration war (Abb. 4-4, Insert) geschlossen werden. Der Sedimentationskoeffizient für das sehr strukturverwandte Thermolysin wird mit 3,18 (Vita *et al.*, 1989) bzw. 3,5 (Voordouw & Roche, 1975b) angegeben. Auffällig war in der Sedimentationsanalyse eine konstante Grundabsorption in Meniskusnähe, die trotz intensiver Dialyse auftrat. Diese erhöhte Grundabsorption der Enzymlösungen, die nicht auf die Proteinabsorption zurückzuführen ist, stellt wahrscheinlich ein Artefakt aus der Reinigungsprozedur dar, das gelegentlich beobachtet wird (Eijsink *et al.*, 1991a).

Der **Gleichgewichtslauf** zeigte unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration eine Spezies mit einem scheinbaren Molekulargewicht von  $37.400 \pm 1.100$  Da (Abb. 4-4, Insert). Es korreliert befriedigend mit dem aus der Primärsequenz erwarteten Wert von 34.604 Da.

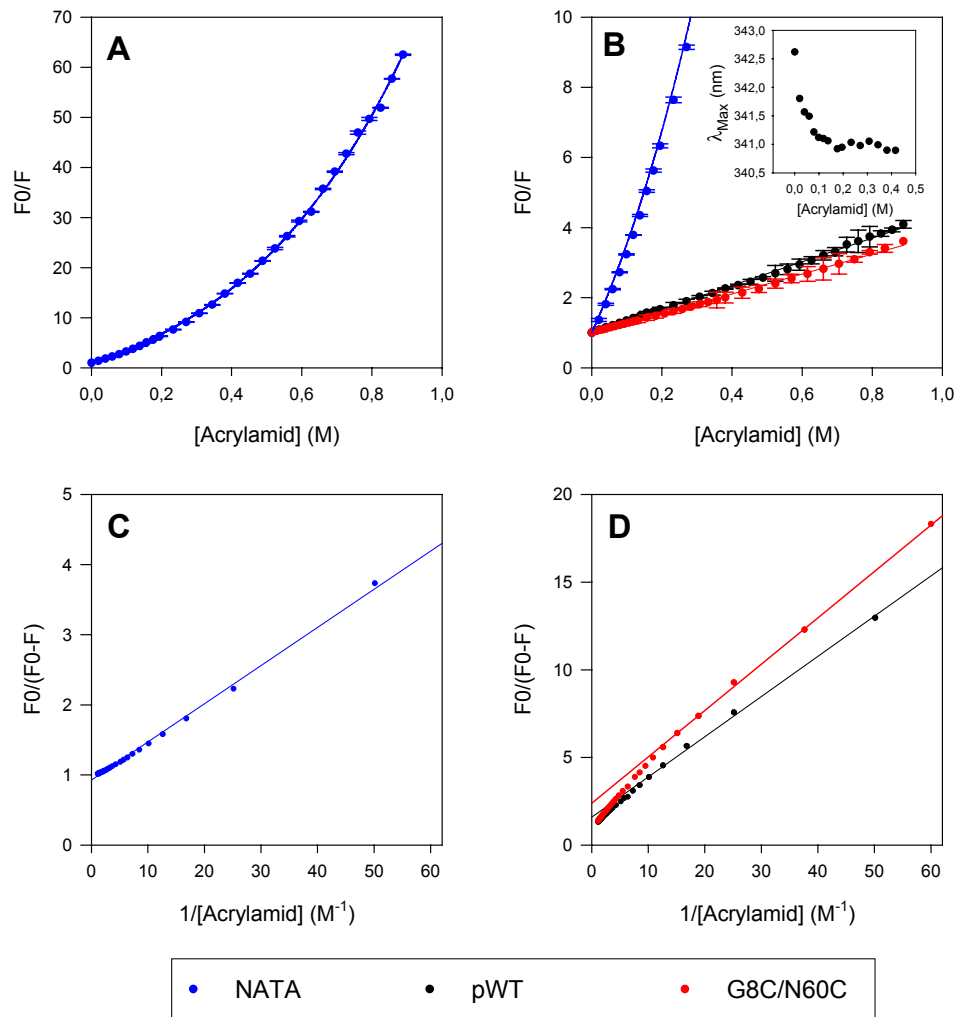
In der **IEF** zeigten sich bei Variation des Auftragungsortes der Probe auf das Gel keine Unterschiede im Laufverhalten (Daten nicht gezeigt). Am Auftragungsort blieb kein Protein liegen, sondern das gesamte Protein wanderte im angelegten Spannungsgradienten. Aggregate wären zu groß, um sich durch das Gelbett zu bewegen und würden am Auftragungsort verbleiben. Der isoelektrische Punkt für alle Enzymvarianten war gleich und lag bei  $\text{pH } 4,98 \pm 0,04$ . Er kommt dem aus der Aminosäuresequenz errechneten Wert von 5,05 ([http://www.us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.us.expasy.org/tools/pi_tool.html)) sehr nahe. Es ist daher anzunehmen, dass fast alle geladenen Reste an der Proteinoberfläche lokalisiert sind. Für das am nächsten strukturverwandte Thermolysin wurde ein sehr ähnlicher isoelektrischer Punkt von 5,1 gefunden (Inouye *et al.*, 1997).

Wie die Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation, der Nativgelelektrophorese und der IEF zeigen, liegen die Enzyme als Monomere vor und zeigen bis 500  $\mu\text{g/ml}$  keine Anzeichen für Aggregation.

#### 4.1.5. Zugänglichkeit der Tryptophanreste

In Ergänzung zu den bisher beschriebenen spektroskopischen Daten (4.1.2.) erlauben Fluoreszenz-*Quench*-Experimente (3.2.6.1.) ebenfalls Aussagen über die lokale Struktur um

Fluorophore bzw. deren Lösungsmittelzugänglichkeit (Eftink & Ghiron, 1981). Je stärker Fluorophore verborgen sind, desto weniger können sie durch zugesetzte *Quencher* in ihrer Fluoreszenz beeinflusst werden.



**Abb. 4-5: Acrylamid-*Quenchen* von pWT und G8C/N60C.**

Die Fluoreszenzmessungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.6.1. beschrieben, durchgeführt. Die Proteinkonzentration betrug 20 µg/ml für pWT und G8C/N60C sowie 50 µg/ml für W55F. NATA wurde in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. **A)** Stern-Volmer-Auftragung für NATA, **B)** Stern-Volmer-Auftragung für NATA, pWT und G8C/N60C, **C)** Lehrer-Auftragung für NATA, **D)** Lehrer-Auftragung für pWT und G8C/N60C. Die Stern-Volmer-Auftragungen wurden unter Berücksichtigung des statischen *Quenchens* nach [3-1] angepasst. In der Lehrer-Auftragung wurde der hintere Teil der Kurve (entsprechend niedrigen Acrylamidkonzentrationen) linear nach [3-2] angepasst. Die ermittelten Konstanten sind in Tab. 4-2 beschrieben. Die Wellenlängenverschiebung des Emissionsmaximums ( $\lambda_{\max}$ ) ist exemplarisch für pWT im Insert von **B** dargestellt.

Als *Quencher* wurde das ungeladene Acrylamid und als Referenz für völlig lösungsmittlexponierte Tryptophanreste wurde NATA verwendet. Die Auswertung erfolgte in der direkten Auftragung nach Stern-Volmer und einer nach Lehrer modifizierten Auftragung (3.2.6.1.).

Insbesondere NATA zeigt ein nichtlineares Verhalten in der **Stern-Volmer-Auftragung** (Abb. 4-5 A), was auf statisches *Quenchen* zurückzuführen ist (Eftink & Ghiron, 1976a). Statisches und dynamisches *Quenchen* können durch Einführung eines Exponentialterms voneinander separiert werden (Eftink & Ghiron, 1976a) ([3-1] und Tab. 4-2). Nur das dynamische *Quenchen* wurde zur Interpretation von strukturellen Effekten verwendet. Wie Abb. 4-5 B zeigt, verhalten sich pWT und G8C/N60C ähnlich und werden verhältnismäßig wenig *gequencht*, während freies NATA stark *gequencht* wird.

Bei beiden Enzymen wurde eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums mit steigender *Quencher*-Konzentration beobachtet. Exemplarisch ist sie im Insert von Abb. 4-5 B für pWT gezeigt, wo sie am stärksten ausgeprägt ist. Diese Blauverschiebung lässt sich damit erklären, dass zuerst die Anteile der lösungsmittlexponiertesten Reste *gequencht* werden und damit der Rotanteil im Spektrum abnimmt, wodurch der kurzwelligere Anteil stärker zum Tragen kommt. Die hier gezeigten Experimente lassen sich damit auf die Region um Trp55 übertragen, da es den Rotanteil im Spektrum liefert (4.1.2.).

Die **Darstellung nach Lehrer** gestattet eine Einteilung aller drei im Protein vorhandenen Tryptophanreste in zwei Klassen: dem *Quencher* zugängliche und verborgene (Eftink & Ghiron, 1976a). Es muss allerdings beachtet werden, dass diese Auswertung nur Mittelwerte der Gesamtheit aller Tryptophane liefert. Generell ist es nicht möglich, Aussagen über einen einzelnen Tryptophanrest in einem Multi-Tryptophan-Protein zu machen (Eftink & Ghiron, 1981). Sind in einem Protein alle Tryptophanreste gleich zugänglich, so ergibt sich in der Lehrer-Auftragung eine Gerade wie für NATA (Abb. 4-5 C). Die Kurven für pWT und G8C/N60C (Abb. 4-5 D) sind leicht gekrümmt und zeigen damit das Auftreten verschieden zugänglicher Tryptophanreste an. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate gibt dabei den reziproken Anteil der Tryptophanreste, welche dem *Quencher* zuerst zugänglich werden, an (Lehrer & Leavis, 1978).

Erst bei höheren Acrylamidkonzentrationen gelingt es, alle im Protein vorhandenen Tryptophanreste zu *quenchen* (Achsenabschnitt 1,0). In Tabelle 4-2 sind die aus den Auftragungen ermittelten Konstanten zusammengefasst.

**Tab. 4-2: Acrylamid-*Quenchen*.** Die Stern-Volmer-Auftragung wurde ausgewertet nach  $F_0/F = (1+K_{SV} \cdot [Q]) \cdot e^{-V \cdot [Q]}$  mit  $[Q]$  als Acrylamidkonzentration und  $K_{SV}$  und  $V$  als Stern-Volmer- und statische Quenckkonstante. Die Lehrer-Auftragung wurde ausgewertet nach  $F_0/(F_0-F) = 1/(f \cdot K_{eff} \cdot [Q]) + 1/f$  mit  $K_{eff}$  als effektive Quenckkonstante und  $f$  als Tryptophananteil, der dem Quencher zugänglich ist. Die relative Zugänglichkeit wurde auf  $K_{SV}$  bzw.  $K_{eff}$  von NATA bezogen.

|          | V(M <sup>-1</sup> )<br>(Stern-V.) | K <sub>SV</sub> (M <sup>-1</sup> )<br>(Stern-V.) | % NATA<br>(Stern-V.) | f<br>(Lehrer) | K <sub>eff</sub> (M <sup>-1</sup> )<br>(Lehrer) | % NATA<br>(Lehrer) |
|----------|-----------------------------------|--|----------------------|---------------|---|--------------------|
| NATA     | 1,799                             | 21,05  | 100,0                | 1,03          | 17,82   | 100,0              |
| pWT      | 0,098                             | 3,06   | 14,5                 | 0,63          | 6,92  | 38,8               |
| G8C/N60C | 0,188                             | 2,28   | 10,8                 | 0,38          | 9,97  | 55,9               |

Die ermittelten *Quenck*-Konstanten für NATA (Tab. 4-2) sind innerhalb eines Fehlers von 10% identisch mit Literaturangaben (Eftink & Ghiron, 1976b; Garcia *et al.*, 1998), was für die Zuverlässigkeit der Methode spricht.

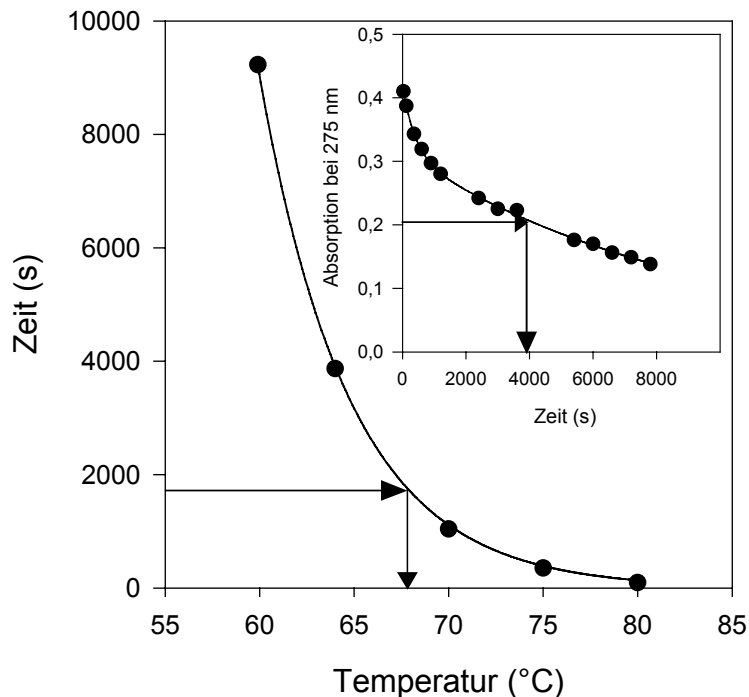
Aus den  $f$ -Werten der Auswertung nach Lehrer kann abgeleitet werden, dass bei niedrigen Acrylamid-Konzentrationen bei pWT zuerst nur 63%, also zwei der drei Tryptophanreste zugänglich sind (Tab. 4-2). Der dritte ist besonders schlecht zugänglich, während bei G8C/N60C zwei der Tryptophanreste verborgen sind (Tab. 4-2). Da die eingeführte Disulfidbrücke sich in der Nähe von Trp55 befindet, ist anzunehmen, dass dieser Tryptophanrest durch die Verbrückung stärker ins Proteininnere gedrückt wird und somit schlechter zugänglich ist. Diese Erklärung wird auch für andere disulfidverbrückte Proteine vorgeschlagen. Beispielsweise schützt eine Disulfidbrücke auch Tryptophanreste von Chymosin (Chen *et al.*, 2000a) und Papain (Edwin & Jagannadham, 2000) vor Acrylamid-*Quenchen*.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Tryptophanreste von pWT und G8C/N60C prinzipiell wenig exponiert sind und einen Beitrag zur Fluoreszenz-Signaländerung bei Entfaltung liefern können. Die Region um Trp55 wird kompakter durch die eingeführte Disulfidbrücke in G8C/N60C.

## 4.2. Temperatur-induzierte Inaktivierung, Entfaltung und Autoproteolyse

### 4.2.1. Thermoinaktivierung

Alle bisher in der Literatur durchgeführten Untersuchungen an pWT und G8C/N60C basieren auf Messungen der Thermoinaktivierung (Eijsink *et al.*, 1992a; Mansfeld *et al.*, 1997; Veltman *et al.*, 1998). Aus diesem Grunde wurden zunächst für verschiedene Temperaturen (60-96°C) Inaktivierungskurven aufgenommen. Daraus können die in der Literatur häufig verwendeten  $T_{50}$ -Werte (2.4.4. und Abb. 4-6) sowie die Aktivierungsenthalpie und –entropie der Inaktivierung ( $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$ ) bestimmt werden.



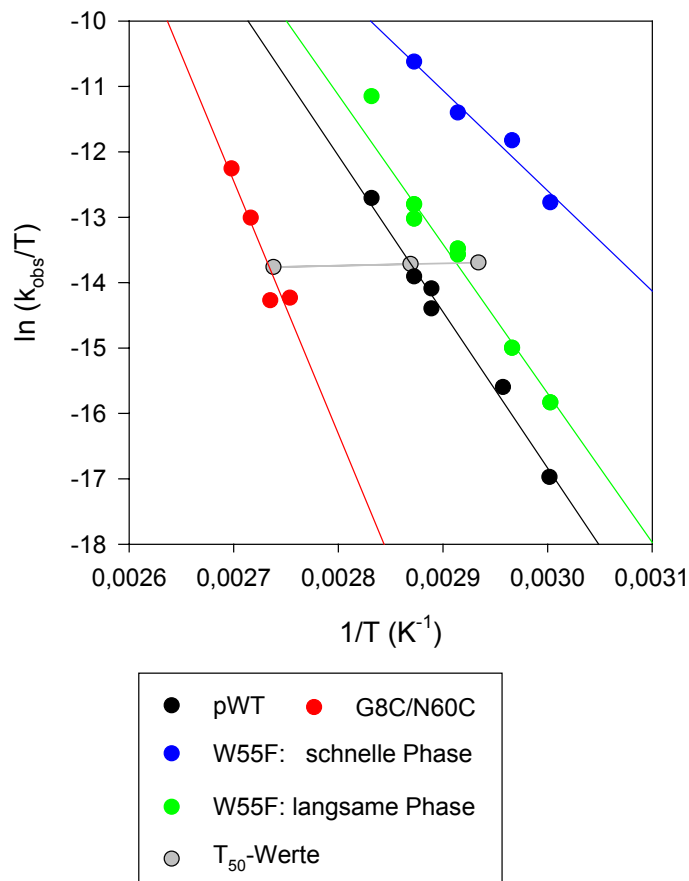
**Abb. 4-6: Ermittlung des  $T_{50}$ -Wertes von W55F.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) und bei einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Bei verschiedenen Temperaturen wurden Inaktivierungskinetiken (3.2.7.1.) durch Bestimmung der Restaktivität gegen Casein (3.2.4.1.) aufgenommen (Insert: Beispiel für 64°C) und daraus für jede Temperatur die Zeit bestimmt, nach der die

Inaktivierung 50% betrug. Die Auftragung dieser Zeiten gegen die Temperatur wurde exponentiell angepasst und der Wert für 30 min zu 67,8°C bestimmt.

Für die Enzymvariante W55F wurde ein  $T_{50}$ -Wert von 67,8°C ermittelt (Abb. 4-6). Die  $T_{50}$ -Werte für pWT und G8C/N60C betragen 75,4°C und 92,1°C (Mansfeld *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu pWT und G8C/N60C waren die Inaktivierungskinetiken aber biphasig (Abb. 4-6, Insert), obwohl Thermoinaktivierungen löslicher Enzyme meist einer Reaktion 1. Ordnung folgen (Ahern & Klivanov, 1988). Die Kinetik konnte auch nicht mit einer Reaktion 2. Ordnung beschrieben werden, sondern nur durch eine Linearkombination aus zwei

Reaktionen 1. Ordnung (Abb. 4-6, Insert). Wie Abb. 4-7 zeigt, ergibt die Auswertung der langsamen Phase in der Darstellung nach Eyring (2.1.3.) einen vergleichbaren Anstieg wie pWT und G8C/N60C, jedoch ist die Kurve zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Aus der Biphasigkeit erklärt sich, dass der  $T_{50}$ -Wert in der Eyring-Auftragung zwischen beiden Phasen liegt und zu der langsamen Phase hin verschoben ist, da sie den größeren Anteil an der Gesamtamplitude stellt.



**Abb. 4-7: Eyring-Auftragung der Thermoinaktivierung von pWT, G8C/N60C und W55F.**

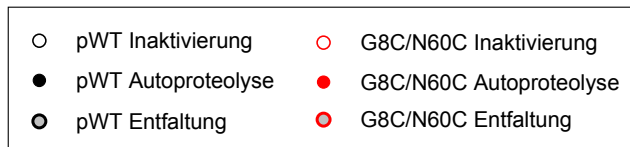
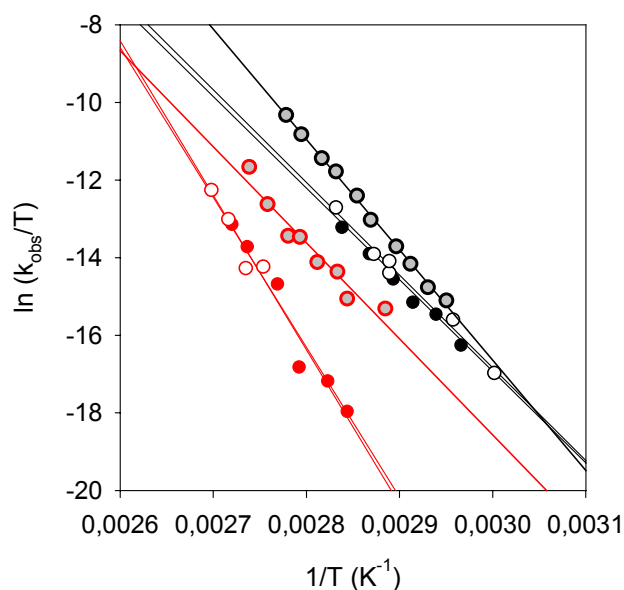
Die Inaktivierungskinetiken (3.2.7.1.) wurden in Standardpuffer (3.1.5.) und bei einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Während pWT und G8C/N60C einphasig-exponentiell inaktiviert werden, fällt die Aktivität von W55F biphasig. Die  $T_{50}$ -Werte (für pWT und G8C/N60C nach Mansfeld *et al.* (1997)) sind zum Vergleich mit dargestellt. Per Definition ergibt sich  $k(T_{50}) = 3,851 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Die Daten für die Inaktivierung von G8C/N60C und teilweise von pWT wurden freundlicherweise von Frau Dr. Mansfeld (Martin-Luther-Universität, Halle) zur Verfügung gestellt.

Die im Vergleich zu pWT geringere Thermostabilität von W55F ist nicht überraschend, da die Mutation in der sensitiven Region des Moleküls liegt (2.4.4.). Allerdings ist die Enzymvariante aus diesem Grund nicht für die ursprünglich geplanten Experimente geeignet, die auf eine separate Beobachtung der Regionen um die Reste 115 und 186 (ohne den starken Einfluss von Trp55) abzielte.

Die aus den Inaktivierungskonstanten  $k$  ermittelten Aktivierungsparameter  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  sind für alle Enzyme in Tab. 4-3 mit denen der Entfaltungs- und Autoproteolysekinetik zusammengefasst und werden dort diskutiert.

#### 4.2.2. Temperaturabhängige Entfaltung und Autoproteolyse

Inaktivierungsmessungen zeigen den irreversiblen Schritt der Entfaltung an. Da bei Proteasen hauptsächlich mit der Autoproteolyse als dem irreversiblen Schritt zu rechnen ist, wurde zunächst die Autoproteolyse von pWT und G8C/N60C unter Thermoinaktivierungsbedingungen verglichen. Für verschiedene Temperaturen (63-94°C) wurde die Autoproteolysekinetik durch quantitative Auswertung der SDS-Gele verfolgt und die Geschwindigkeitskonstanten entsprechend 3.2.7.1. ermittelt. Die Analyse dieser Daten nach Eyring (Abb. 4-8) zeigt, dass die thermische Inaktivierung mit der Autoproteolyse der Proteasen unter diesen Bedingungen zusammenfällt. Damit ist für die Inaktivierung ausschließlich die Autoproteolyse geschwindigkeitsbestimmend, obwohl eine irreversible Thermoinaktivierung auch durch eine Vielzahl anderer Prozesse hervorgerufen werden könnte (Zale & Klibanov, 1984; Ahern & Klibanov, 1985). Das deckt sich mit dem Befund, dass eine bei thermischer Entfaltung häufig auftretende Aggregation (Ahern & Klibanov, 1988) mittels Streulichtmessung (3.2.6.1.) nicht beobachtet wurde (nicht gezeigt). Die bisherige Auffassung, dass beim Thermolysin (Dahlquist *et al.*, 1976; Kidokoro *et al.*, 1995) bzw. bei NPste (Eijsink *et al.*, 1991b; Eijsink *et al.*, 1992b) die irreversible thermische Inaktivierung das Ergebnis der Autoproteolyse ist, wurde bisher nicht quantitativ durch Autoproteolysemessungen nachgewiesen. Die hier gezeigten Resultate liefern den Beweis.

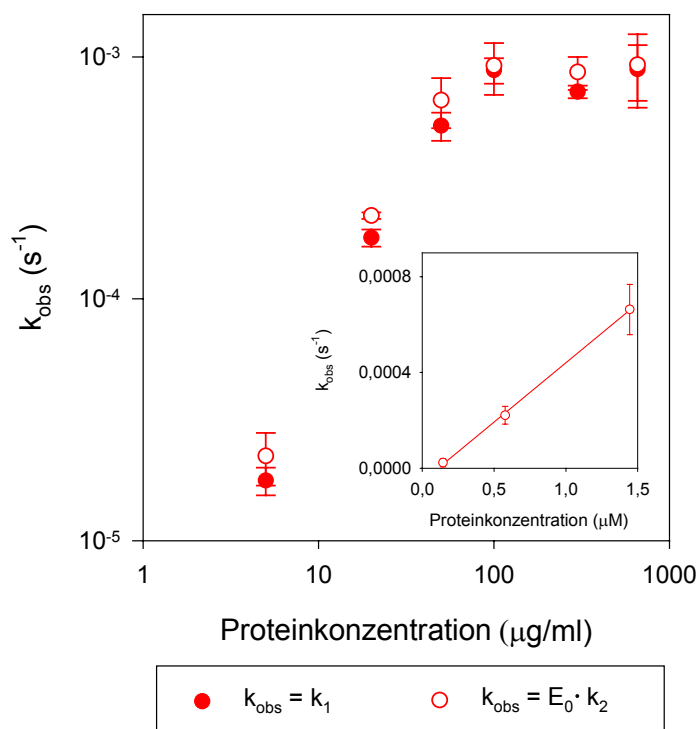


**Abb. 4-8: Eyring-Auftragung der thermischen Inaktivierung, Autoproteolyse und Entfaltung von pWT und G8C/N60C.**

Die Messungen der Entfaltungskinetik über die Fluoreszenzemission bei 334 nm nach Anregung bei 295 nm und der Autoproteolysekinetik wurden, wie in 3.2.7.1. beschrieben, in Standardpuffer (3.1.5.) bei einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml durchgeführt. Zum Vergleich sind die Inaktivierungsdaten aus Abb. 4-7 übernommen.

Entfaltungsmessungen mittels Fluoreszenzspektroskopie, die unter denselben Bedingungen wie für die Inaktivierungs- und Autoproteolysemessungen durchgeführt wurden, zeigten eine deutlich schnellere Entfaltung der Struktur (Abb. 4-8). Dieser Befund überrascht, da bisher die Entfaltung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Inaktivierung angesehen wurde (Eijsink *et al.*, 1991b; Vriend & Eijsink, 1993). Jedoch fehlten bisher separate Messungen der Entfaltungsgeschwindigkeit und der Proteolysegeschwindigkeit.

Ein wichtiges Indiz dafür, dass die Entfaltung der limitierende Schritt für die Inaktivierung und Autoproteolyse ist, wäre die Unabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für die beiden letzteren Prozesse von der Proteinkonzentration. Die Autoproteolysekinetiken wurden daher für Enzymkonzentrationen von 5-600  $\mu\text{g/ml}$  gemessen und nach einer Reaktion 2. Ordnung angepasst. Aber auch die Anwendung einer Reaktion 1. Ordnung lieferte eine gute Anpassung der Progresskurven und sehr ähnliche Geschwindigkeitskonstanten (Abweichungen <30%).



**Abb. 4-9: Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Autoproteolyse von G8C/N60C von der Proteinkonzentration.**

Bei 86,2°C wurde für G8C/N60C in den entsprechenden Konzentrationen in Standardpuffer (3.1.5.) die Geschwindigkeitskonstante der Autoproteolysekinetik, wie in 3.2.7.1. beschrieben, bestimmt. Die Auswertung erfolgte sowohl nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ( $k_1$ ) als auch 2. Ordnung ( $k_2$ ). Im Insert ist die lineare Abhängigkeit ( $k_{\text{obs}} = E_0 \cdot k_2$ ) der nach [3-6] bestimmten

Geschwindigkeitskonstanten von der Enzymkonzentration im Bereich von 5 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  dargestellt.

Entgegen der bisherigen Auffassung (Vriend & Eijsink, 1993; Vriend *et al.*, 1998), wurde eine Änderung der Autoproteolysegeschwindigkeitskonstanten bei Variation der Proteasekonzentration gefunden (Abb. 4-9). Im Bereich von 5 bis 50  $\mu\text{g/ml}$  ist die nach [3-6] ermittelte Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{obs}}$  proportional zur Enzymkonzentration (Abb. 4-9, Insert), wie es für eine Reaktion 2. Ordnung erwartet wurde. Bei hohen



Enzymkonzentrationen ( $>100 \mu\text{g/ml}$ ) läuft die Autoproteolysegeschwindigkeitskonstante gegen einen Grenzwert, der dann mit der Entfaltungsgeschwindigkeitskonstanten des Proteins (ermittelt mittels Fluoreszenzmessung) zusammenfällt. Letztere ist unabhängig von der Enzymkonzentration. Die Ergebnisse sprechen für die Annahme eines schnellen Entfaltungsgleichgewichts vor der Proteolyse (Wells & Powers, 1986). Bei niedrigen Proteasekonzentrationen stellt es sich schneller ein, als die Autoproteolyse nachfolgen kann. Bei Erhöhung der Proteasekonzentration wird auch die Protease-Aktivität im Ansatz erhöht, bis nicht mehr die Proteolyse die geschwindigkeitslimitierende Schritt ist, sondern die Entfaltung. Eine weitere Erhöhung der Proteasekonzentration hat dann keinen Einfluss mehr auf die Autoproteolysegeschwindigkeit.

Die Existenz und Lage eines schnellen reversiblen Gleichgewichts vor dem irreversiblen Schritt hat einen starken Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung. Werden beispielsweise die Stabilitäten zweier Enzyme über Inaktivierungsmessungen bestimmt, so ergeben sich verschiedene Stabilisierungsfaktoren, je nachdem, ob am Beginn oder am Ende des Entfaltungsübergangs gemessen wird (Zale & Klibanov, 1983).

**Tabelle 4-3: Aktivierungsparameter für die Inaktivierung, Autoproteolyse und Entfaltung von pWT, G8C/N60C und W55F.**

Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$ . Die Aktivierungsenergie  $E_A$  wurde aus der Arrhenius-Auftragung ( $\ln(k_{\text{obs}})$  vs.  $1/T$ ) und  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  aus der Eyring-Auftragung ( $\ln(k_{\text{obs}}/T)$  vs.  $1/T$ ) bestimmt. Die Standardabweichung betrug weniger als 5%.  $\Delta G^\ddagger_U$  wurde nach [2-9] berechnet.

| Enzymvariante        | Prozess        | $E_A$<br>(kJ/mol) | $\Delta H^\ddagger$<br>(kJ/mol) | $\Delta S^\ddagger$<br>(J/mol) | $\Delta G^\ddagger(75^\circ\text{C})$<br>(kJ/mol) |
|----------------------|----------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|---|
| pWT                  | Inaktivierung  | 201,40            | 198,56                          | 258,08                         | 108,71  |
|                      | Autoproteolyse | 197,08            | 194,21                          | 243,51                         | 109,43  |
|                      | Entfaltung     | 239,89            | 236,49                          | 373,49                         | 106,46  |
| G8C/N60C             | Inaktivierung  | 324,19            | 321,14                          | 565,97                         | 124,10  |
|                      | Autoproteolyse | 339,67            | 336,71                          | 609,09                         | 124,66  |
|                      | Entfaltung     | 204,20            | 202,79                          | 254,73                         | 114,10  |
| W55F, langsame Phase | Inaktivierung  | 192,54            | 189,70                          | 241,03                         | 105,78  |
| W55F, schnelle Phase | Inaktivierung  | 130,46            | 127,62                          | 80,55                          | 99,58   |

Aus den Eyring-Auftragungen (Abb. 4-8) wurden die Aktivierungsparameter  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  ermittelt und in Tabelle 4-3 zusammengefasst. Sie bewegen sich im für Proteine üblichen Bereich (D'Amico *et al.*, 2003). Mit  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  kann  $\Delta G^\ddagger_U$  nach [2-9] errechnet werden. Als Bezugstemperatur innerhalb des Messbereichs wurde 75°C gewählt, also eine Temperatur nahe am  $T_{50}$ -Wert von pWT. Wird die freie Aktivierungsenthalpie bei 92°C – nahe dem  $T_{50}$ -Wert von G8C/N60C – berechnet, ergeben sich die gleichen Aussagen (nicht gezeigt).

Aus den Daten kann abgeleitet werden, dass der stabilisierende Einfluss der Disulfidbrücke bei 75°C auf die Temperatur-induzierte Entfaltungsreaktion von 7,6 kJ/mol sich aus einer entropischen Stabilisierung ergibt, die eine enthalpische Destabilisierung überkompensiert. Demgegenüber wird die Autoproteolyse um 15,2 kJ/mol stabilisiert, wobei hier der enthalpische Beitrag die entropische Destabilisierung überkompensiert. Dieser Zahlenwert ist allerdings von der eingesetzten Enzymkonzentration abhängig, aber immer  $\geq 7,6$  kJ/mol, der freien Stabilisierungsenthalpie der Entfaltungsreaktion.

Eindeutige Aussagen erlaubt die Betrachtung der **Entfaltungsreaktion**. Da bei einer Enzymkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  die Autoproteolyse langsamer als die Entfaltung ist, gehen in die beobachtete Geschwindigkeitskonstante ( $k_{\text{obs}}$ ) die Teilkonstanten der Entfaltung ( $k_U$ ), der Rückfaltung und der Autoproteolyse ein (siehe auch Abb. 2-2). Erfolgen die Messungen nach dem Übergangsbereich der Entfaltung, so ist  $k_{\text{obs}}$  identisch mit  $k_U$  (Zale & Klibanov, 1983). Die genaue Lage des Übergangsbereichs von pWT und G8C/N60C ist nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass hier nach dem Übergangsbereich gemessen wurde, denn  $k_{\text{obs}}$  für die Entfaltung war unabhängig von der Proteasekonzentration. Diese Schlussfolgerung ist berechtigt, da nach dem Übergangsbereich die Rückfaltung zu vernachlässigen ist. Somit kann die stattfindende Autoproteolyse das Entfaltungs-/Rückfaltungsgleichgewicht nicht verschieben.

Die stark erhöhte Stabilität von G8C/N60C gegenüber Entfaltung zeigt, dass die Disulfidbrücke wahrscheinlich eine früh entfaltende Region stabilisiert (Wedemeyer *et al.*, 2000). Eine weiterführende Analyse des Stabilisierungseffektes scheitert, denn sowohl das Entropie- als auch das Enthalpiemodell (2.2.2.) zur Erklärung des Stabilisierungseffektes von Disulfidbrücken versagen, weil sie nur thermodynamische und keine kinetischen Aussagen machen.

Die Analyse der **Autoproteolyse- bzw. Inaktivierungsreaktion** lässt keine eindeutigen Aussagen zu, weil die Autoproteolyse eine nachgeschaltete Reaktion zum schnelleren

Entfaltungsgleichgewicht darstellt und somit von dessen Lage abhängt. Da die Einführung der Disulfidbrücke aber die Entfaltung entropisch hemmt, wäre auch eine entropische Hemmung der nachfolgenden Autoproteolyse zu erwarten gewesen. Die experimentellen Daten (Tab. 4-3) zeigen jedoch, dass die Autoproteolyse durch die Disulfidbrücke enthalpisch gehemmt wird, obwohl pWT und G8C/N60C keine Unterschiede in ihrer proteolytischen Aktivität zeigen (Mansfeld *et al.*, 1997). Möglicherweise stellt also die disulfidverbrückte Enzymvariante ein schlechteres Substrat dar, da die *Loop*-Flexibilität, als Voraussetzung für einen proteolytischen Schnitt (Fontana *et al.*, 1986), eingeschränkt wurde. Es ist allerdings verwunderlich, dass Änderungen in einer einzigen Region des Enzymmoleküls das Autoproteolyseverhalten drastisch beeinflussen, wenn nach [2-13] davon ausgegangen wird, dass nur der entfaltete Zustand das Substrat für die Autoproteolyse darstellt. Da die Proteasen recht unspezifisch (Heinrikson, 1977) sind und keine Fragmentakkumulation gefunden wurde, sollten sehr viele Schnittstellen im Molekül existieren und die Überbrückung einer Schnittstelle keine großen Effekte auf die Autoproteolysekinetik zeigen. Der Widerspruch kann dadurch gelöst werden, dass die Autoproteolyse als Folge von lokalen Entfaltungsprozessen (Vriend & Eijsink, 1993) angesehen wird. Diese Annahme ist konsistent mit der Beobachtung, dass die Fluoreszenzspektroskopie speziell die lokale Umgebung um Trp55 zeigt (4.1.2.). Trotzdem kann mittels Fluoreszenzspektroskopie prinzipiell nicht zwischen lokaler und globaler Entfaltung unterschieden werden.

Obwohl die hier gezeigten Untersuchungen keine direkte Differenzierung zwischen lokalen und globalen Entfaltungsprozessen zulassen, wird in Anlehnung an Eijsink *et al.* (1991b und 1992b) vorgeschlagen, dass durch die Disulfidbrücke in G8C/N60C bei hohen Temperaturen eine früh entfaltende Region stabilisiert wird, deren lokale Entfaltung zur nachfolgenden Autoproteolyse führt. Demzufolge sollte die Entfaltungsreaktion über ein Intermediat verlaufen, das einen lokal entfalteten Zustand darstellt.

### **4.3. GdnHCl-induzierte Inaktivierung, Entfaltung und Autoproteolyse**

Unter den Bedingungen der thermischen Entfaltung ist der entfaltete Zustand aufgrund der Autoproteolyse nicht zugänglich (4.2.). Um den Einfluss der Disulfidbrücke auf den denaturierten Zustand der Protease ohne die Störung von Autoproteolyse zu ermitteln, wurde die Entfaltung auch mit anderen Denaturanzien untersucht, und es wurden gegebenenfalls Inhibitoren zugesetzt. Neben GdnHCl wurden zur Entfaltung auch Harnstoff, Guanidinthiocyanat und Isopropanol verwendet, die sich aber als weniger günstig erwiesen haben. Da das Auftreten von Autoproteolyse u.a. von der Aktivität der Protease abhängt, wurde zunächst das Aktivitätsverhalten der Enzyme in Gegenwart von GdnHCl untersucht. Im Folgenden wurden Kurven aufgenommen, in denen der Grad der Autoproteolyse bzw. Entfaltung nach festen Zeiten in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration gemessen wurde. Anschließend wurden dazu kinetische Messungen durchgeführt.

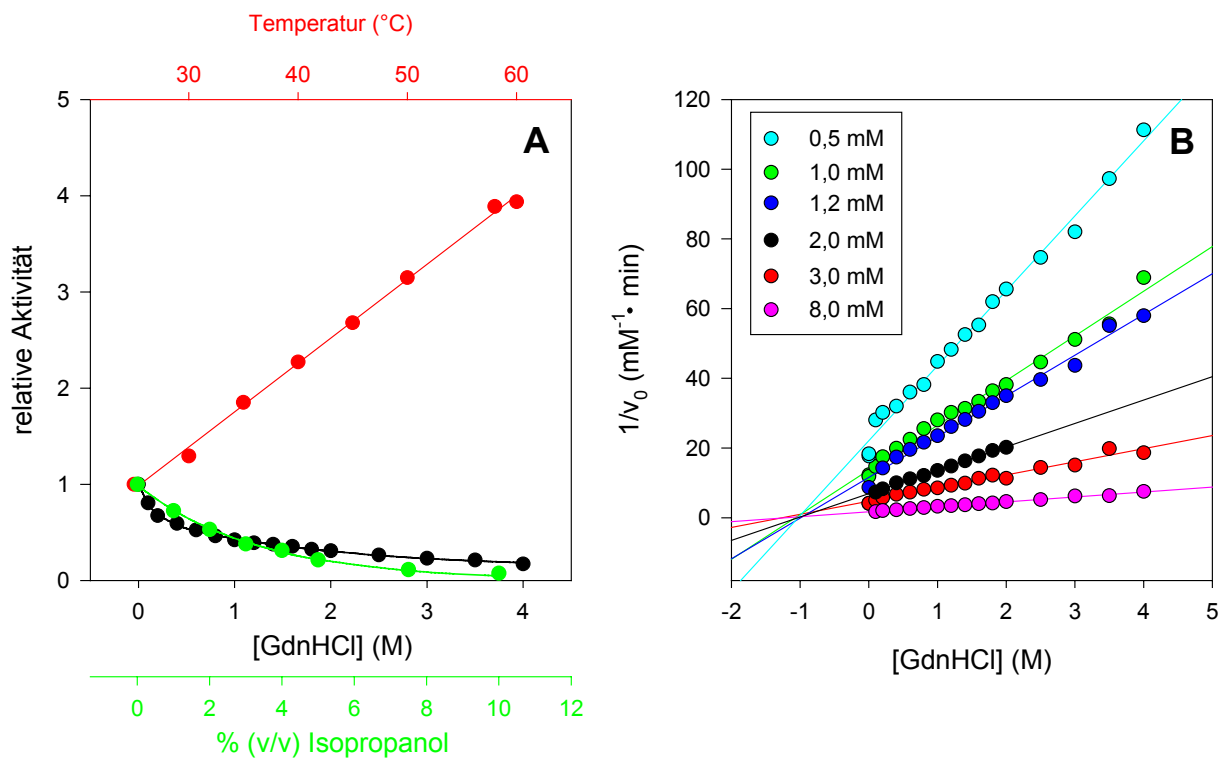
In Ergänzung zu den Entfaltungsmessungen mittels Fluoreszenzspektroskopie, welche die Umgebung der Tryptophanreste im Protein detektiert, wurde der Einfluss von GdnHCl auf die Fluoreszenzeigenschaften von Tryptophan an der Modellverbindung NATA bestimmt. Über den gesamten GdnHCl-Bereich von 0-8 M zeigte NATA eine lineare Zunahme der Fluoreszenz um etwa 40% (nicht gezeigt), was für die Fluoreszenzmessungen in diesem Kapitel zur Abschätzung von Basislinieneffekten verwendet wurde. Der Quotient  $RF_{334}/RF_{354}$  von NATA zeigte keine Abhängigkeit von GdnHCl, so dass hier keine Korrektur erforderlich war.

Die Ergebnisse werden für pWT dargestellt. G8C/N60C und W55F zeigten ein analoges Verhalten, falls nicht ausdrücklich über Abweichungen berichtet wird.

#### **4.3.1. Vergleich des Aktivitätsverhaltens von pWT in GdnHCl mit dem bei erhöhter Temperatur und in Isopropanol**

Ein wichtiger Faktor für die Autoproteolyse ist die spezifische Aktivität der Enzyme. Sie steigt mit der Temperatur an und wird durch Isopropanol oder GdnHCl gehemmt, wie dies in Abb. 4-10 A für pWT gezeigt ist. Die anderen Enzyme zeigten das gleiche Verhalten. Alle Inaktivierungen in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich waren vollständig reversibel.

Die Inhibitorkonzentration, die eine 50%-ige Hemmung der Aktivität bewirkt ( $IC_{50}$ -Wert), wurde für **Isopropanol** am Beispiel von pWT mit FAGLA als Substrat zu  $2,35 \pm 0,21\%$  (v/v) bestimmt und korreliert gut mit den von Eijnsink *et al.* (1991a) für pWT gefundenen Werten. Ein Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol wird auch während der Enzympräparation (3.2.3.) verwendet und erzeugt keine strukturellen Änderungen, die mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie detektierbar sind (nicht gezeigt). Die Restaktivität in 20% (v/v) Isopropanol beträgt nur noch 0,3%. Die Messung erfolgte unterhalb des  $K_m$ -Wertes von 30 mM (Feder, 1968), weshalb hier der Einfluss auf  $k_{cat}/K_m$  bestimmt wurde.



**Abb. 4-10: Einfluss von Temperatur, GdnHCl und Isopropanol auf die Aktivität von pWT.**

**A)** Zur Messung der Temperaturabhängigkeit der Aktivität ( $v_0$ ) wurden die Proben 1 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert und in vortemperiertem Standardpuffer (3.1.5.) mit 2,5 mM FAGLA (3.2.4.2.) vermessen. Für die Bestimmung des Einflusses von GdnHCl und Isopropanol auf die Aktivität wurden die Proben in den entsprechenden GdnHCl- bzw. Isopropanol-Konzentrationen 5 min vorinkubiert und in Gegenwart von GdnHCl bzw. Isopropanol in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C vermessen. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden auf die entsprechenden Werte bei 25°C bzw. ohne GdnHCl- bzw. Isopropanol-Zusatz bezogen. **B)** Dixon-Analyse für die Hemmung von pWT durch GdnHCl. Die Substratkonzentration wurde im Bereich von 0,5 bis 8 mM variiert. Die Proteinkonzentration betrug in allen Messungen 50 µg/ml.

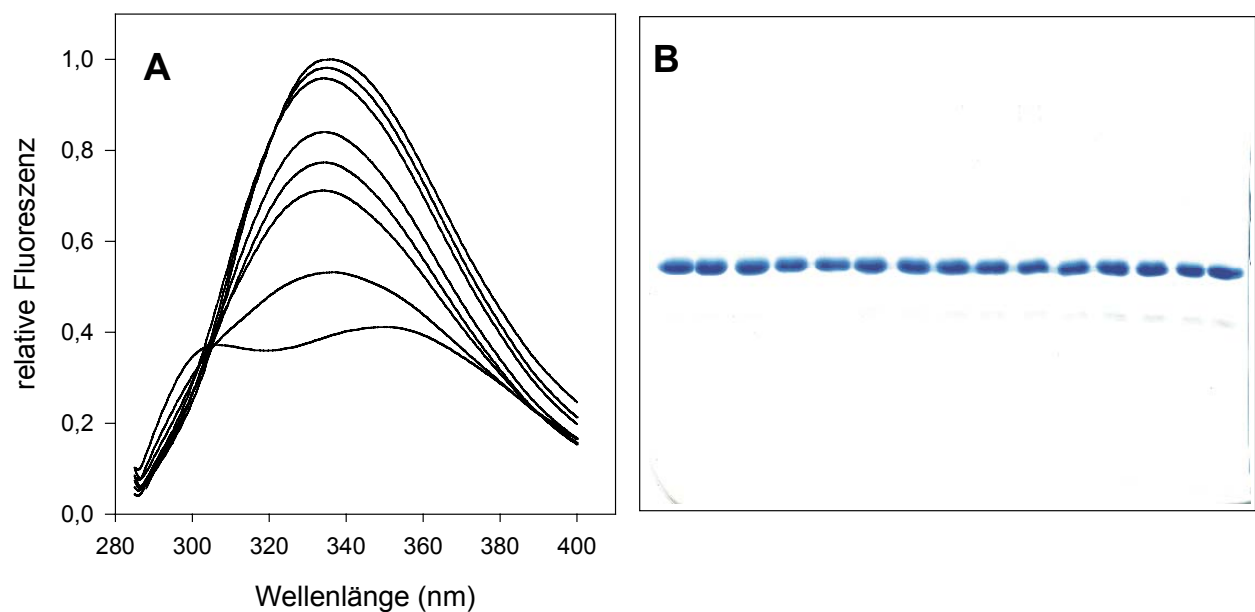
Die inhibierende Wirkung von Alkoholen auf die Thermolysin-Aktivität ist bekannt (Alam *et al.*, 1997b) und wird mit einer Änderung der Dielektrizitätskonstanten (Alam *et al.*, 1997a) bzw. einer direkten Bindung des Alkohols an das Enzym erklärt (Inouye *et al.*, 1997). Tatsächlich wurden in Diffusionsexperimenten an Thermolysinkristallen Bindungsstellen für Isopropanol im aktiven Zentrum gefunden (English *et al.*, 1999).

Da Isopropanol weder UV-aktiv ist, noch die NaDOC-Fällung zum Autoproteolysenachweis stört, stellt es einen idealen Inhibitor für spätere Stabilitätsuntersuchungen der Enzyme dar. Neben Isopropanol wurden als Inhibitoren auch oPA, Tetraethylenpentamin und Phosphoramidon in Konzentrationen von 0,1-10 mM verwendet. Jedoch sind oPA und Phosphoramidon UV-aktiv und stören damit spektroskopische Untersuchungen, während Tetraethylenpentamin bei der Detektion der Autoproteolyse durch Beeinträchtigung der NaDOC-Fällung stört.

Da **GdnHCl** für die Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt werden sollte, war es von Interesse zu wissen, worauf seine inaktivierende Wirkung zurückzuführen ist. Denkbar sind eine Inhibierung der Aktivität oder (lokale) Strukturänderungen des Enzyms. Nach der Lage des Schnittpunktes im Dixon-Diagramm (Abb. 4-10 B) wäre ein nicht kompetitiver Mechanismus denkbar, aber auch ein kompetitiver Mechanismus ist nicht auszuschließen. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Substrats konnte nur bei Substratkonzentrationen unterhalb des  $K_m$ -Wertes von ca. 30 mM (Feder, 1968) gemessen werden, weshalb wie ebenfalls für Thermolysin (Kam *et al.*, 1979), nicht zwischen diesen beiden Mechanismen unterschieden werden kann. Die unrealistisch hohe Inhibierungskonstante von ca. 1 M lässt allerdings eher auf unspezifische Wechselwirkungen und weniger auf eine spezifische Inhibierung (mit der Besetzung einer bestimmten Bindungsstelle) schließen.

Eine Inaktivierung durch niedrige GdnHCl-Konzentrationen wird auch für RNase A (Miller & Bolen, 1978), D-Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Xie & Tsou, 1987), Papain (Xiao *et al.*, 1993), Kreatin-Kinase (Zhou *et al.*, 1993), Fumarase (Kelly & Price, 1991), Tryptophan-Synthase (Fan *et al.*, 1999) und Aminoacylase (Wang *et al.*, 1995) berichtet. Meist wurden keine eindeutigen strukturellen Effekte gefunden. Die aktivitätshemmende Wirkung von GdnHCl, bevor es zu einer globalen Entfaltung kommt, scheint demnach ein allgemeines Phänomen zu sein. Obwohl der Effekt von GdnHCl auf Proteine noch nicht vollständig verstanden ist (Vanzi *et al.*, 1998), kann eine unspezifische Bindung von GdnHCl am Protein als sehr wahrscheinlich angesehen werden (Poland, 2002). Durch Diffusionsexperimente mit GdnHCl an RNase A-Kristallen wurden vier feste und über 40

lockere Bindungsstellen gefunden (Dunbar *et al.*, 1997), die nicht im aktiven Zentrum sind. Tatsächlich wurden auch Mobilitätsunterschiede in den Bindungsregionen anhand des Temperaturfaktors bei der Röntgenkristallanalyse beobachtet (Dunbar *et al.*, 1997). Aufgrund einer verringerten proteolytischen Angreifbarkeit von RNase A schlagen Arnold & Ulbrich-Hofmann (2000) eine Versteifung der Proteinstruktur vor. Um diese Möglichkeit im vorliegenden Fall zu überprüfen, wurden Entfaltung und Autoproteolyse, ebenfalls wie für die Inaktivierungsmessungen nach 5-minütiger Vorinkubation, in GdnHCl untersucht (Abb. 4-11).



**Abb. 4-11: Entfaltung und Autoproteolyse von pWT nach 5-minütiger Inkubation in GdnHCl.**

Enzymproben mit einer pWT-Konzentration von 50 µg/ml wurden 5 min in Standardpuffer (3.1.5.) mit verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen vorinkubiert. Anschließend wurden von den Proben Fluoreszenzemissionsspektren bei 278 nm-Anregung (3.2.6.1.) aufgenommen oder sie wurden für die Analyse in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) mit NaDOC gefällt (3.2.5.2.). **A)** Fluoreszenzemissionsspektren von pWT in 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 und 7,0 M GdnHCl (Reihenfolge mit sinkender Intensität). **B)** SDS-Gelelektrophorese von pWT in 0,0 bis 7,0 M GdnHCl (v.l.n.r. in Schritten von 0,5 M).

Wie die Fluoreszenzspektren zeigen, ändert sich die Tertiärstruktur der Enzyme bereits nach 5-minütiger Inkubation in GdnHCl (Abb. 4-11 A). Die Abnahme der Fluoreszenz mit steigender GdnHCl-Konzentration kann nicht mit einem Basislinienseffekt erklärt werden, da die Tryptophanemission in GdnHCl sogar ansteigt. Wie die Inaktivierung durch GdnHCl waren auch diese Effekte reversibel. Da keine Abnahme der Bande des intakten Proteins in

der SDS-Gelelektrophorese beobachtet werden konnte (Abb. 4-11 B), wurden die strukturellen Änderungen nicht von Autoproteolyse begleitet, wie bei Entfaltung so unspezifischer Proteasen wie NPste zu erwarten wäre. Eine Hemmung der Aktivität kann dafür nicht in Betracht gezogen werden, da nach längeren Inkubationszeiten bei noch höheren GdnHCl-Konzentrationen das Auftreten von Autoproteolyse beobachtet wurde (4.3.2.). Auch zeigten Streulichtmessungen (3.2.6.1.) keine Anzeichen für Aggregation, die auch zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt.

In Anlehnung an Arnold & Ulbrich-Hofmann (2000) wird deshalb vorgeschlagen, dass GdnHCl bei Konzentrationen bis mindestens 4 M zu einer reversiblen Versteifung der Proteinstruktur führt. Nach Bhuyan (2002) wirken Harnstoff und GdnHCl bei geringen Konzentrationen stabilisierend, da sie die Rigidität erhöhen und damit die thermische Fluktuation senken. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Zugabe von GdnHCl neben einer Intensitätsabnahme auch eine leichte Blauverschiebung des Tryptophanemissionsmaximums um 2 nm verursacht (Abb. 4-11 A), die dadurch erklärt werden kann, dass die Tryptophane in eine hydrophobere Umgebung - wahrscheinlich stärker ins Proteininnere - gedrückt werden. Erst bei GdnHCl-Konzentrationen  $> 6$  M setzt die für eine Entfaltung typische Aufspaltung in eine separate Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz ein. Ähnliche zweistufige Entfaltungen, die im ersten Schritt einen Intensitätsabfall und erst im zweiten Schritt die typische Rotverschiebung zeigen, wurden u.a. auch für die GdnHCl-induzierte Entfaltung von Papain (Xiao *et al.*, 1993), Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Xie & Tsou, 1987), Aminoacylase (Wang *et al.*, 1995) und Thermolysin (Khan *et al.*, 1980) gefunden.

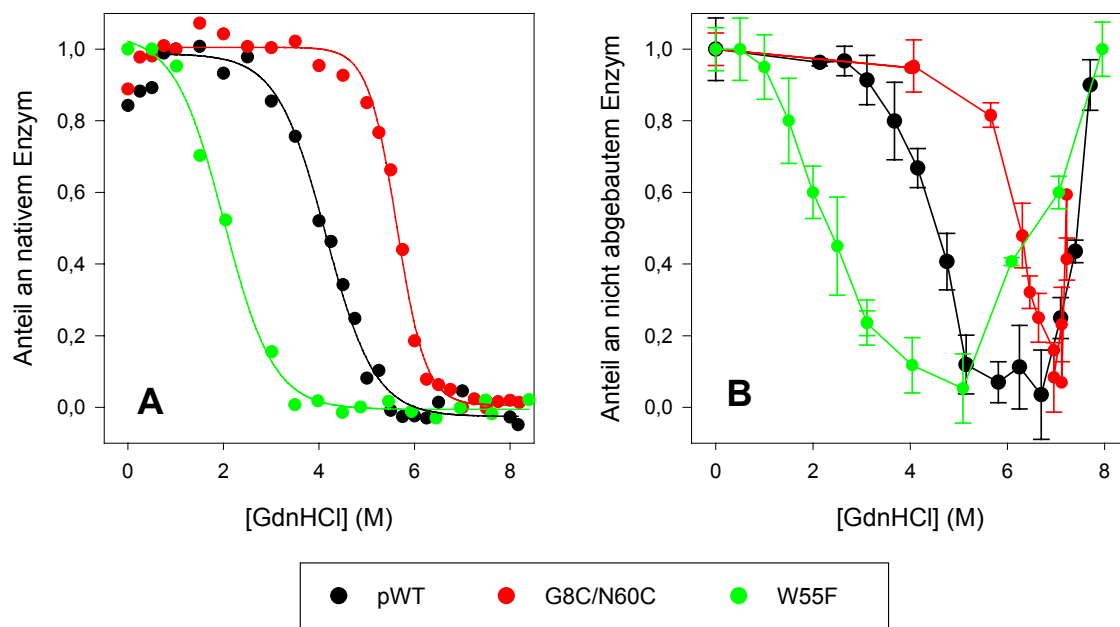
Eine Strukturverfestigung wird für pWT und G8C/N60C gleichermaßen beobachtet. Offensichtlich ist sie demnach nicht für die erhöhte Stabilität von G8C/N60C verantwortlich und soll im Folgenden nicht weiter analysiert werden.

#### **4.3.2. Charakterisierung der Autoproteolyse und Entfaltung bei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen**

Die Entfaltung der Enzymvarianten setzt erst bei hohen GdnHCl-Konzentrationen ein (4.3.1.), und deutliche Stabilitätsunterschiede treten erst bei längeren Inkubationszeiten ( $> 5$  min) auf. Zum Vergleich der Stabilität der Enzyme in GdnHCl wurde die Entfaltung und Autoproteolyse nach 3-stündiger Inkubation untersucht (Abb. 4-12).



Die Messung der **Entfaltung** über die Änderung der Fluoreszenzintensität ist überlagert vom Intensitätsabfall, der durch die Versteifung der Proteinstruktur hervorgerufen wird (4.3.1.). Als sicheres Anzeichen für die Entfaltung kann aber die Aufspaltung in eine separate Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz oder die Rotverschiebung des Tryptophanemissionsmaximums verwendet werden (Abb. 4-11 A und Abb. 4-3 A, B). Letztere kann durch den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 334 und 354 nm ( $RF_{334}/RF_{354}$ ) beschrieben werden (Abb. 4-3). Die Analyse der GdnHCl-induzierten Entfaltung der Enzyme zeigte deutliche Stabilitätsunterschiede. Bezüglich pWT ist W55F merklich instabiler und G8C/N60C stabiler (Abb. 4-12 A). Die Auswertung nach Anregung bei 295 nm ist dargestellt und fällt mit der Auswertung nach Anregung bei 278 nm zusammen (nicht gezeigt).



**Abb. 4-12: GdnHCl-induzierte Entfaltung und Autoproteolyse von pWT, G8C/N60C und W55F.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C durchgeführt. Nach dreistündiger Inkubation in den entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen wurden von den Proben Fluoreszenzspektren mit 295 nm-Anregung (3.2.6.1.) aufgenommen oder sie wurden für die Analyse in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) mit NaDOC (3.2.5.2.) gefällt. **A)** Aus den Fluoreszenzspektren anhand des Quotienten  $RF_{334}/RF_{354}$  ermittelter Anteil an nativem Enzym. Die Mittelpunkte der Entfaltungskurven liegen bei 4,10 M, 5,65 M und 2,05 M für pWT, G8C/N60C und W55F (Proteinkonzentration 5 µg/ml). **B)** Abnahme der Bande des intakten Proteins im SDS-Gel (Proteinkonzentration 100 µg/ml).

Da GdnHCl die Proteinfällung stört, wurden die **Autoproteolyseuntersuchungen** zunächst bei höheren Proteinkonzentrationen (100 µg/ml) durchgeführt, um die Proben genügend stark verdünnen zu können.

Bezüglich der Autoproteolyse (Abb. 4-12 B) zeigen die Enzyme die gleichen Unterschiede wie in der Entfaltung (Abb. 4-12 A). Der Übergangsbereich der Entfaltung fällt weitgehend mit der Autoproteolyse zusammen. Es zeigt sich aber in der Auftragung des nicht abgebauten Enzyms gegen die GdnHCl-Konzentration ein V-förmiges Profil (Abb. 4-12 B), das dadurch entsteht, dass bei hohen GdnHCl-Konzentrationen die Autoproteolyse „eingefroren“ wird und bei sehr hohen GdnHCl-Konzentrationen keine Autoproteolyse mehr auftritt. Unter diesen Bedingungen sollte der vollständig entfaltete Zustand ohne Überlagerung von Autoproteolyse zugänglich sein, was bei der temperaturinduzierten Entfaltung (4.2.) nicht möglich ist.

Interessanterweise ist die Autoproteolyse an der linken Flanke des V-Profiles nicht von der Enzymkonzentration im Bereich von 5-100 µg/ml abhängig (nicht gezeigt); hier ist offensichtlich die langsame Entfaltung limitierend. An der rechten Flanke bewirkt eine Verringerung der Enzymkonzentration eine zunehmend unvollständig verlaufende Autoproteolyse (nicht gezeigt). Bei hohen GdnHCl-Konzentrationen entfaltet die Protease schneller als die Autoproteolyse stattfinden kann, wodurch hier das aktive Enzym fehlt. Darum sollte es insbesondere bei Verwendung geringer Proteinkonzentrationen möglich sein, die Autoproteolyse bei hohen GdnHCl-Konzentrationen zu unterdrücken.

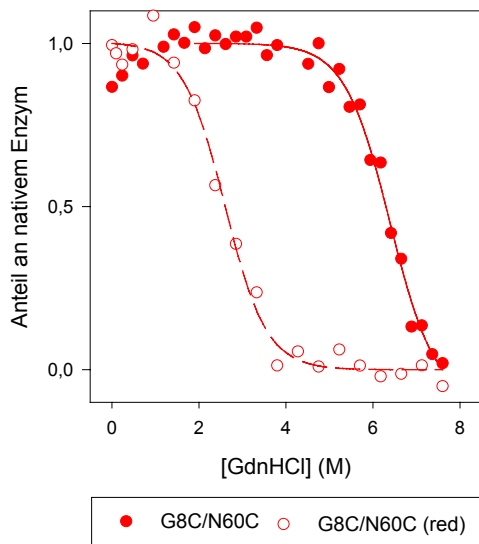
In Analogie zur Thermoaktivierung von einigen Proteasen, die ein ähnliches V-Profil auch in Abhängigkeit von der Temperatur zeigen (2.3.), kann man in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration drei Bereiche festlegen: In 1. niedrigen und 2. hohen Konzentrationen (> 8,0 M) erfolgt kein Abbau, während 3. im dazwischen liegenden Bereich Autoproteolyse stattfindet. Die auftretende Autoproteolyse gestaltet die Entfaltung irreversibel, und somit können keine thermodynamisch auswertbaren Übergangskurven erhalten werden.

#### Entfaltung von G8C/N60C mit geöffneter Disulfidbrücke

Der stabilisierende Effekt der Disulfidbrücke in G8C/N60C bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung (Abb. 4-12 A) kann zum einen durch die eingeführten Cysteinreste und zum anderen durch die Ausbildung der Disulfidverbrückung hervorgerufen werden. Um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Entfaltung von G8C/N60C mit geschlossener und geöffneter Disulfidbrücke untersucht.

Die Öffnung der Disulfidbrücke bewirkte eine so starke Destabilisierung, dass im Vergleich zu Abb. 4-12 A eine Verkürzung der Inkubationszeiten nötig war, um beide Formen

gleichzeitig vermessen zu können (Abb. 4-13). Wegen der starken Destabilisierung kann ausgeschlossen werden, dass die Einführung der Cysteinreste per se die große Stabilität von G8C/N60C verursacht. Auch die Enzymvarianten N60C und G8C sind in der Thermoaktivierung deutlich instabiler als pWT (Mansfeld *et al.*, 1997).



**Abb. 4-13: GdnHCl-induzierte Entfaltung von G8C/N60C und carbamidomethylierter G8C/N60C.** Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 20 µg/ml durchgeführt. Nach einer Vorinkubation von 5 min in den entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen wurden die Fluoreszenzspektren (3.2.6.1.) mit 278 nm-Anregung aufgenommen und daraus anhand des Quotienten  $RF_{334}/RF_{354}$  der Anteil an nativem Enzym ermittelt. Um die Disulfidbrücke zu öffnen, wurde G8C/N60C, wie in 3.2.5.5. beschrieben, reduziert und carbamidomethyliert (G8C/N60C (red)).

### 4.3.3. Autoproteolysekinetik in GdnHCl

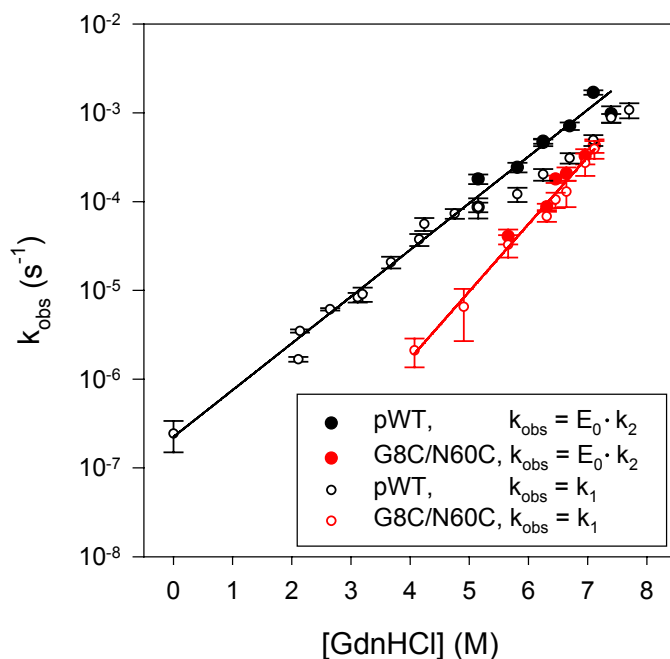
Die in 4.3.2. diskutierten Entfaltungskurven und Autoproteolyseprofile beschreiben nur „Momentaufnahmen“ einer irreversiblen Reaktion. Die korrekte Beschreibung kann nur durch kinetische Untersuchungen erfolgen. Da die Autoproteolyse nach einer Reaktion 2. Ordnung oder Pseudo-1. Ordnung verlaufen kann, wurden jeweils beide Anpassungen untersucht. Die Kinetiken wurden bis zu einem 60–80%-igen Umsatz gemessen. Zum einen wurde unter Bedingungen maximaler Autoproteolyse bei hohen Enzymkonzentrationen von 100 µg/ml gemessen, zum anderen wurde versucht, die Autoproteolyse durch Zugabe von Inhibitoren einzuschränken.

#### 4.3.3.1. Autoproteolyse ohne Inhibitor

Für verschiedene GdnHCl-Konzentrationen (0-8 M) wurde die Autoproteolysekinetik verfolgt. Bei pWT und G8C/N60C wurde keine vollständige Autoproteolyse mehr in 7,0 M und höheren GdnHCl-Konzentrationen erreicht (siehe auch Abb. 4-12 B). Je höher die

GdnHCl-Konzentration war, desto eher kam die Autoproteolyse zum Erliegen. In diesem GdnHCl-Bereich war die Autoproteolyse auch abhängig von der Enzymkonzentration (nicht gezeigt), und zur korrekten Beschreibung wäre eine Reaktion 2. Ordnung nötig.

Ab 5,0 M GdnHCl wurden für pWT Unterschiede in der Anpassung nach einer Reaktion Pseudo-1. bzw. 2. Ordnung beobachtet (Abb. 4-14). Während bei Auswertung nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung eine deutliche Nichtlinearität in der Chevron-Auftragung (logarithmierte Geschwindigkeitskonstante *vs.* Denaturanzkonzentration) auftrat, die von einer zunehmend unvollständigen Autoproteolyse bei hohen GdnHCl-Konzentrationen begleitet wurde (Abb. 4-12 B), zeigte die Anpassung nach einer Reaktion 2. Ordnung eine weitgehend lineare Abhängigkeit. In 8,0 M GdnHCl erfolgte kein Abbau mehr. Bei GdnHCl-Konzentrationen < 5,0 M lieferten sowohl die Anpassung nach einer Reaktion Pseudo-1. als auch 2. Ordnung innerhalb eines Fehlers von 30% die gleichen Ergebnisse. Es wurde in diesem Fall eine Anpassung Pseudo-1. Ordnung verwendet.



**Abb. 4-14: Geschwindigkeitskonstanten der Autoproteolyse von 100 µg/ml pWT und G8C/N60C in GdnHCl.**

Die Autoproteolysekinetiken wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ( $k_1$ ). Im Bereich unvollständiger Autoproteolyse wurde ein Absolutglied bei der Anpassung zugelassen und zusätzlich nach einer Reaktion 2. Ordnung ( $k_2$ ) ausgewertet. Die nach

[3-5] bzw. [3-6] bestimmten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}} = k_1$  bzw.  $E_0 \cdot k_2$  sind dargestellt.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass sich für pWT mit steigender GdnHCl-Konzentration die Reaktionsordnung ändert. Bis ca. 5,0 M GdnHCl kann die Autoproteolysekinetik offensichtlich nach einer Pseudo-1. Ordnungsreaktion beschrieben werden, weil die vorangehende langsame Entfaltung unter diesen Bedingungen geschwindigkeitsbestimmend ist. Im Gegensatz dazu ist – wie bereits unter 4.3.2. diskutiert – die vorhandene Aktivität bei höheren GdnHCl-Konzentrationen zunehmend weniger in der

Lage, alles entfaltete Protein abzubauen, und nicht abgebautes Enzym wird akkumuliert (vergleiche Abb. 4-12 B). Bei sehr hohen GdnHCl-Konzentrationen (8,0 M) ist die Entfaltung und damit Inaktivierung der Proteasen so schnell, dass es zu keinem Abbau mehr kommt.

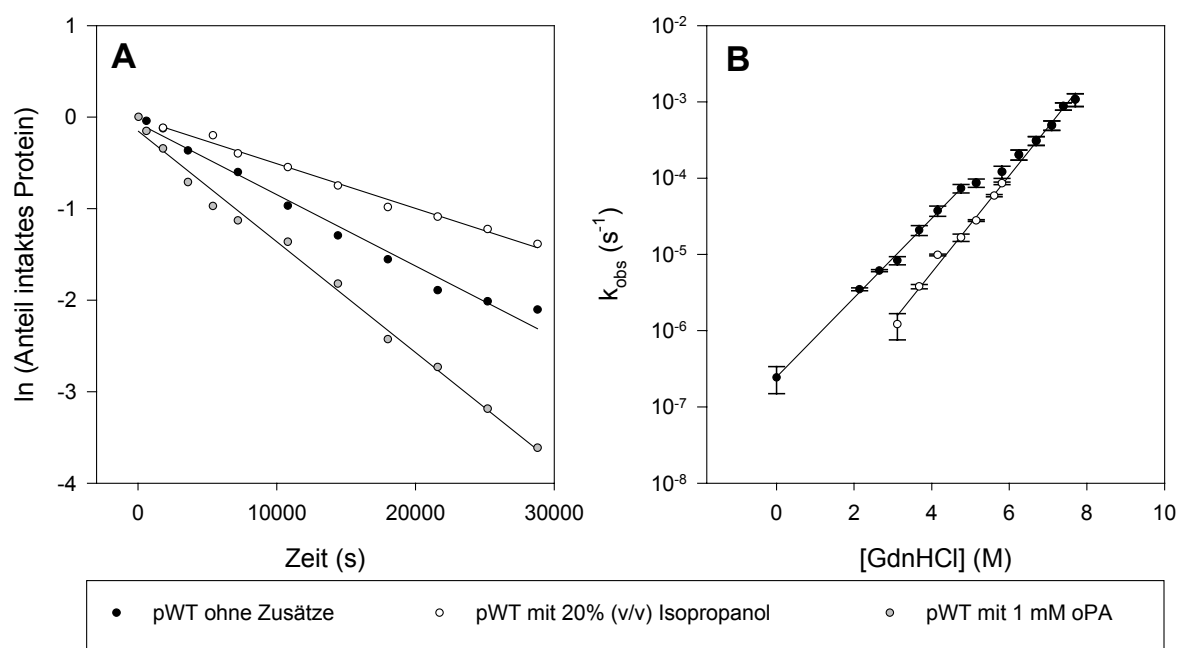
Für die Autoproteolyse von G8C/N60C ist offensichtlich bis 7,0 M GdnHCl die Entfaltung limitierend und die Anpassung der Progresskurven nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung sollte bevorzugt werden.

#### 4.3.3.2. Einfluss von Inhibitoren auf die Autoproteolyse

Um die strukturelle Entfaltung über einen längeren Zeitraum ohne Autoproteolyseeinfluss messen zu können, wurde versucht, die Autoproteolyse durch Zugabe von Inhibitoren zu unterbinden. Ein idealer Inhibitor sollte die NaDOC-Fällung zur Autoproteolyseerkennung nicht beeinträchtigen, nicht UV-aktiv sein, um die Fluoreszenzmessungen nicht zu stören und er sollte die Stabilität der Enzyme nicht verändern. Es soll vorerst nur auf die Inhibierung der Autoproteolyse von pWT und erst später auf G8C/N60C eingegangen werden.

Eine Inhibierung durch Verschiebung des pH-Wertes um 2 bis 3 Einheiten ins Saure oder Basische senkt die Aktivität etwa um den Faktor 5. Dies ist aber nicht zufriedenstellend. Bei pH 2,0 fallen außerdem die Enzyme aus (Säurefällung), was anhand der Zunahme des Streulichts (3.2.6.1.) verfolgt werden konnte (nicht gezeigt). Außerdem haben extreme pH-Werte ebenfalls eine Denaturierung zur Folge. Inhibitoren wie Phosphoramidon (Komiya *et al.*, 1975), Tetraethylenpentamin (Corbett *et al.*, 1986) und EDTA (Sidler & Zuber, 1972) sind UV-aktiv, stören die NaDOC-Fällung oder binden auch das stabilisierende Kalzium und wirken so destabilisierend. Als Inhibitoren wurden weiterhin Isopropanol und oPA (Holmquist & Vallee, 1974) – ein spezifischer Zink-Chelator – erprobt. Ihr Einfluss auf die Autoproteolysereaktion von pWT in 5,0 M GdnHCl ist in Abb. 4-15 A gezeigt. Während oPA die Proteolyse beschleunigt, hemmt Isopropanol den Abbau.

Es ist anzunehmen, dass die teilweise Entfernung von Zink durch oPA zu einer Destabilisierung führt. Eine zusätzliche Komplexierung von stabilisierenden Kalziumionen durch oPA ist auszuschließen, da sie um sechs Größenordnungen schlechter als Zinkionen gebunden werden (Auld, 1995). Trotz der teilweisen Entfernung von katalytischem Zink ist offensichtlich die Aktivität immer noch groß genug, um zu einem vollständigen Abbau zu führen. Dies wird auch für das strukturverwandte Thermolysin beschrieben (Dahlquist *et al.*, 1976).



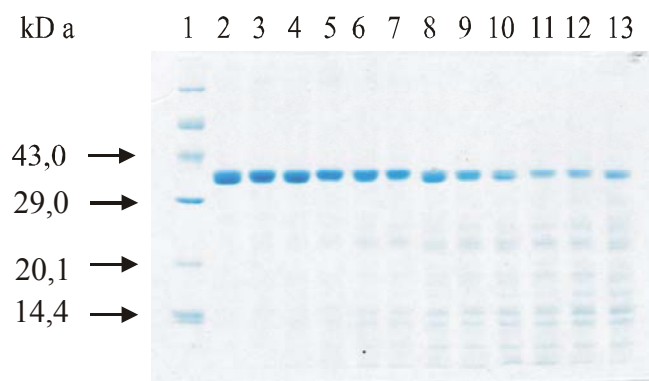
**Abb. 4-15: Einfluss von Inhibitoren auf die Autoproteolysekinetik von pWT in GdnHCl.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml, wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt. **A)** Einfluss von 20% (v/v) Isopropanol und 1 mM oPA auf die Autoproteolysekinetik von pWT in 5 M GdnHCl. **B)** Chevron-Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten bei Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol. Zum Vergleich sind die Werte ohne Isopropanolzusatz aus Abb. 4-14 übernommen. Alle Progresskurven wurden nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung angepasst.

**Isopropanol** hat sich als günstigster Inhibitor erwiesen und wurde deshalb bei spektroskopischen Untersuchungen (4.3.4.3.) zur Hemmung der Autoproteolyse eingesetzt. In Gegenwart von 20% (v/v) Isopropanol zeigen die Enzyme in den CD-Spektren keine Veränderungen in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur (nicht gezeigt), so dass diese Konzentration für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurde. Isopropanol kann aber auch Strukturen wie  $\alpha$ -Helices induzieren (Perez Won *et al.*, 1988), stabilisierend (Barteri *et al.*, 1998) aber auch denaturierend (Khmelnitsky *et al.*, 1991; Uversky *et al.*, 1997) wirken und fördert in Konzentrationen > 50% (v/v) die Aggregation (nicht gezeigt).

Falls die Progresskurven komplett nach einer Reaktion Pseudo-1. Ordnung ausgewertet werden (Abb. 4-15 A), führt der Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol zu einer Linearisierung in der Chevron-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 4-15 B). Allerdings wurde in Gegenwart von 20% (v/v) Isopropanol keine vollständige Inhibierung, sondern nur eine Reduzierung der Autoproteolysegeschwindigkeit von pWT um durchschnittlich den Faktor 3

bis 5 beobachtet (Abb. 4-15 B), obwohl der  $k_{cat}/K_m$ -Wert gegen FAGLA in Gegenwart von 20% (v/v) Isopropanol 300-fach vermindert ist (4.3.1.). Unter den betrachteten Bedingungen ist die Autoproteolyse ohne Isopropanolzusatz unabhängig von der Enzymkonzentration und deshalb offensichtlich die Entfaltung limitierend, weil sie langsamer als die nachfolgende Autoproteolyse ist. Auf dieser Grundlage können auch die Effekte des Isopropanolzusatzes erklärt werden. Die Katalysekonstante  $k_{cat}$  wird so stark vermindert, dass für die Autoproteolyse die Entfaltung nicht mehr limitierend wird. Erst dann hat eine weitere Reduzierung von  $k_{cat}$  auch tatsächlich eine Reduzierung der beobachteten Autoproteolysegeschwindigkeitskonstanten zur Folge. Gestützt wird diese Erklärung durch das Auftreten von Fragmenten bei Autoproteolyse in Gegenwart von 20% (v/v) Isopropanol (Abb. 4-16). Während ohne Isopropanolzusatz keine Fragment-Akkumulation erfolgte, weil entstandene Fragmente einem schnellen Folgeabbau unterlagen, bewirkte eine Hemmung der Proteaseaktivität einen verzögerten Fragmentabbau.



**Abb. 4-16: Fragmentierungsmuster von 100 µg/ml pWT bei Autoproteolyse in 5,5 M GdnHCl mit einem Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol.**

Die Autoproteolysekinetik wurde in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. In der

Bahn 1 ist der Größenmarker und ab Bahn 2 sind die Enzymproben nach steigender Zeit (0, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 und 480 min, v.l.n.r.) aufgetragen.

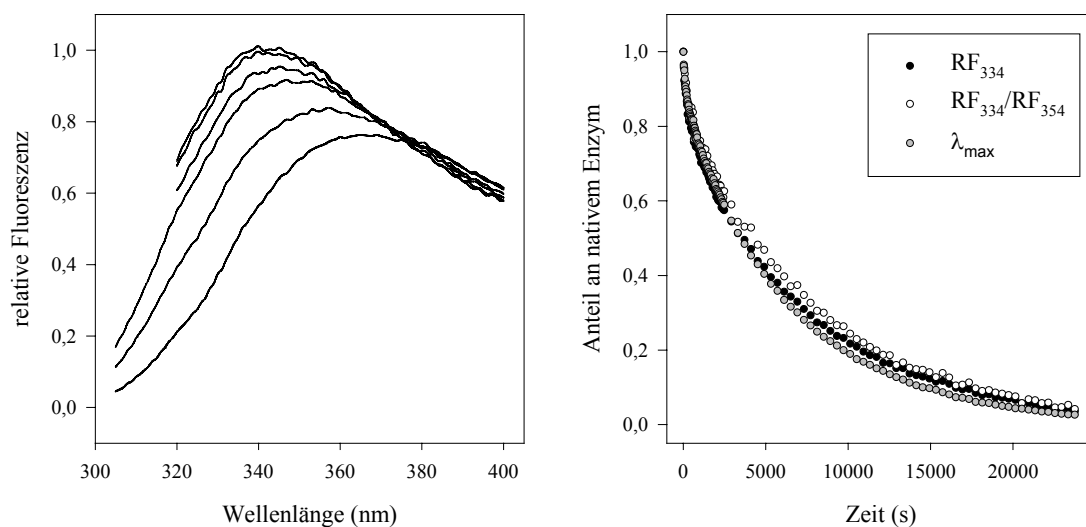
Auf die Autoproteolysekinetik von G8C/N60C hat ein Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol im untersuchten Konzentrationsbereich von 4,0 bis 7,2 M GdnHCl keinen Einfluss (nicht gezeigt). Offensichtlich ist hier die Entfaltung des Enzyms weiterhin limitierend.

#### 4.3.4. Entfaltungskinetik in GdnHCl

In Ergänzung zu den Autoproteolysekinetiken (4.3.3.) wurden die Entfaltungskinetiken untersucht, um das Zusammenspiel von Entfaltung und Autoproteolyse zu verstehen. Auch hier wurde die Enzymkonzentration zwischen 5 und 100  $\mu\text{g/ml}$  variiert, aber kein deutlicher Einfluss auf die Entfaltungskinetik gefunden (nicht gezeigt). Die Entfaltungskinetiken wurden entsprechend einer Reaktion 1. Ordnung (3.2.7.1.) durch einen exponentiellen Abfall nach [3-5] angepasst. Zuerst wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bestimmt und anschließend der Einfluss von Kalziumionen und Isopropanol untersucht.

##### 4.3.4.1. Entfaltungskinetik

Zur Untersuchung der Entfaltungskinetik wurden für verschiedene GdnHCl-Konzentrationen Progresskurven mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie im fernen UV-Bereich bei diskreten Wellenlängen aufgenommen.



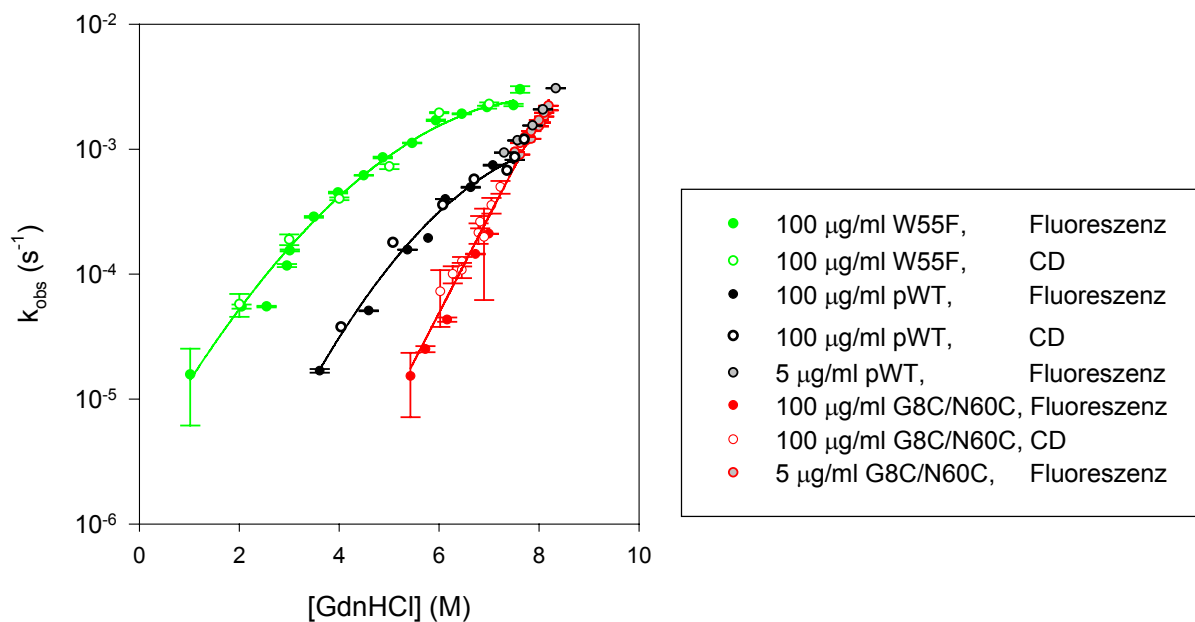
**Abb. 4-17: Progresskurven der Entfaltung von 20  $\mu\text{g/ml}$  pWT in 5,25 M GdnHCl.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C durchgeführt. **A)** Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit die Fluoreszenz-Emissionsspektren aufgezeichnet (3.2.6.1.). Mit abnehmender Fluoreszenzintensität sind sie nach 5, 34, 295, 971, 5000 und 23745 s dargestellt. **B)** Aus den Fluoreszenzspektren wurden die Fluoreszenzintensität bei 334 nm ( $\text{RF}_{334}$ ), der Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 334 und 354 nm ( $\text{RF}_{334}/\text{RF}_{354}$ ) und die Verschiebung der Wellenlänge des Emissionsmaximums ( $\lambda_{\text{max}}$ ) ermittelt und in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.



Exemplarisch wurden auch die Fluoreszenz-Spektren in Abhängigkeit von der Inkubationszeit aufgenommen. Sie sind am Beispiel von pWT in Abb. 4-17 A dargestellt. In Abb. 4-17 B sind die daraus abgeleiteten Entfaltungskinetiken gezeigt, wobei drei verschiedene Auswertungen der Fluoreszenzsignale verglichen wurden.

Wie für die Entfaltungskurven in Abb. 4-12 A wurde auch in den nachfolgenden Messungen der Quotient  $RF_{334}/RF_{354}$  verwendet. Für pWT, G8C/N60C und W55F wurden auf diese Weise die 1. Ordnungskonstanten der Entfaltungskinetik ermittelt und in der Chevron-Auftragung dargestellt (Abb. 4-18).



**Abb. 4-18: CD- und Fluoreszenz-Entfaltungskinetik von pWT, G8C/N60C und W55F in GdnHCl.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt. Die Sekundärstrukturänderung wurde über das CD-Signal bei 222 nm (3.2.6.2.) und die Entfaltung der Tertiärstruktur über den Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 334 und 354 nm nach Anregung bei 295 nm verfolgt. Die Progresskurven wurden nach einer Reaktion 1. Ordnung angepasst (3.2.6.1.).

Die drei Enzymvarianten zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Entfaltungskinetik (Abb. 4-18). Sekundärstrukturänderungen – gemessen über das CD-Signal im fernen UV-Bereich – und Tertiärstrukturänderungen – gemessen über die Fluoreszenz – erfolgen simultan. Die größten Unterschiede zwischen G8C/N60C und pWT bestehen innerhalb des untersuchten GdnHCl-Konzentrationsbereichs um 5,0 M. Bei sehr hohen GdnHCl-Konzentrationen (ab

8,0 M) verschwinden die Unterschiede. Es findet dann keine Autoproteolyse mehr statt (Abb. 4-12 B).

In der Chevron-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung für G8C/N60C zeigt sich eine lineare Abhängigkeit, für pWT eine leichte Krümmung und für W55F eine ausgesprochen extreme Nichtlinearität. Dieses nichtlineare Verhalten („rollover“) von pWT und W55F ließ sich auch nicht durch die Verwendung der GdnHCl-Aktivität (Parker *et al.*, 1995) anstelle der GdnHCl-Konzentration eliminieren. Es konnte aber gut nach einem empirisch gefundenen Polynom 2. Ordnung als Abwandlung des linearen Extrapolationsmodells (Matouschek & Fersht, 1993; Matouschek *et al.*, 1994) angepasst werden:

$$\ln(k_{obs}) = \ln(k^0) - m \cdot [GdnHCl] + c \cdot [GdnHCl]^2 \quad [4-1]$$

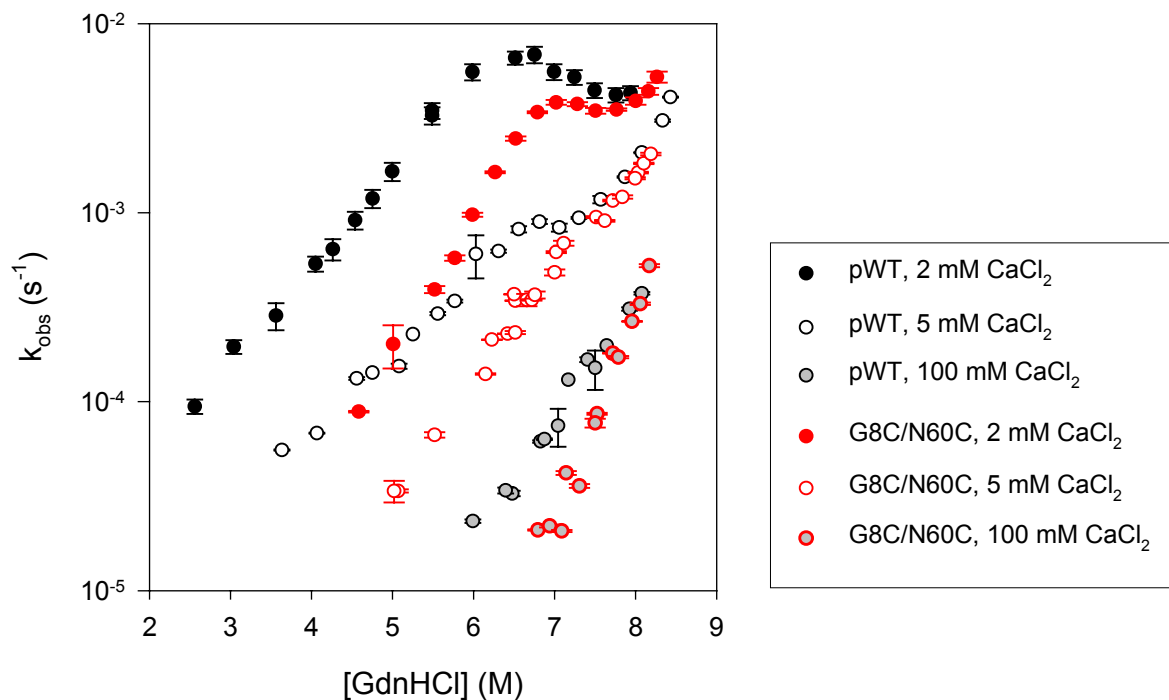
Dabei bezeichnen  $m$  und  $c$  Vorfaktoren und  $k^0$  die Geschwindigkeitskonstante unter Standardbedingungen ohne GdnHCl. Die Nichtlinearitäten in der Chevron-Auftragung von W55F und pWT deuten möglicherweise auf das Auftreten eines Entfaltungsintermediats (Bhuyan & Udgaonkar, 1999) oder Hammond-Verhalten des Übergangszustandes (Otzen *et al.*, 1999) hin. In der zusammenfassenden Diskussion (4.3.6.) soll noch einmal näher darauf eingegangen werden.

#### 4.3.4.2. Einfluss von $CaCl_2$ auf die Entfaltungskinetik

Die bisherigen Untersuchungen in Standardpuffer (3.1.5.) wurden bei einer Kalziumkonzentration von 5 mM durchgeführt. Da die Thermoinaktivierung von NPste stark kalziumabhängig ist (Veltman *et al.*, 1998), wurde auch bei der GdnHCl-induzierten Entfaltung eine Kalziumabhängigkeit der Entfaltungskinetik vermutet und für den Konzentrationsbereich 0-100 mM  $CaCl_2$  überprüft. Sowohl für pWT als auch für G8C/N60C wurde eine starke Abhängigkeit der Entfaltungsgeschwindigkeit von der  $CaCl_2$ -Konzentration beobachtet.

Die Untersuchung der Kalziumabhängigkeit erfolgte nach zwei Prinzipien: i)  $k_{obs}$  als Funktion der GdnHCl-Konzentration bei verschiedenen  $CaCl_2$ -Konzentrationen und ii)  $k_{obs}$  als Funktion der  $CaCl_2$ -Konzentration bei zwei verschiedenen GdnHCl-Konzentrationen. Die Auswertung erfolgte nur im Bereich, in dem das *Photobleaching* vernachlässigt werden konnte ( $k_{obs} > 2,5 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ , siehe 4.1.3.).

In der Chevron-Auftragung zeigte sich ein auffälliger Einfluss der Kalziumionen-Konzentration auf die Linearität der resultierenden Kurven (Abb. 4-19). Die Abweichungen von der Linearität waren um so größer, je kleiner die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration war. Bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$  wurde keine Abweichung mehr gefunden, weder für pWT noch für G8C/N60C. Nichtlineare Chevron-Auftragungen können auf ein Intermediat in der Entfaltung hinweisen (Bhuyan & Udgaonkar, 1999). Offensichtlich tritt das vermutete Intermediat nur auf, wenn Kalziumbindungsstellen nicht voll besetzt sind. Bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$  wird es kaum noch oder gar nicht mehr durchlaufen.



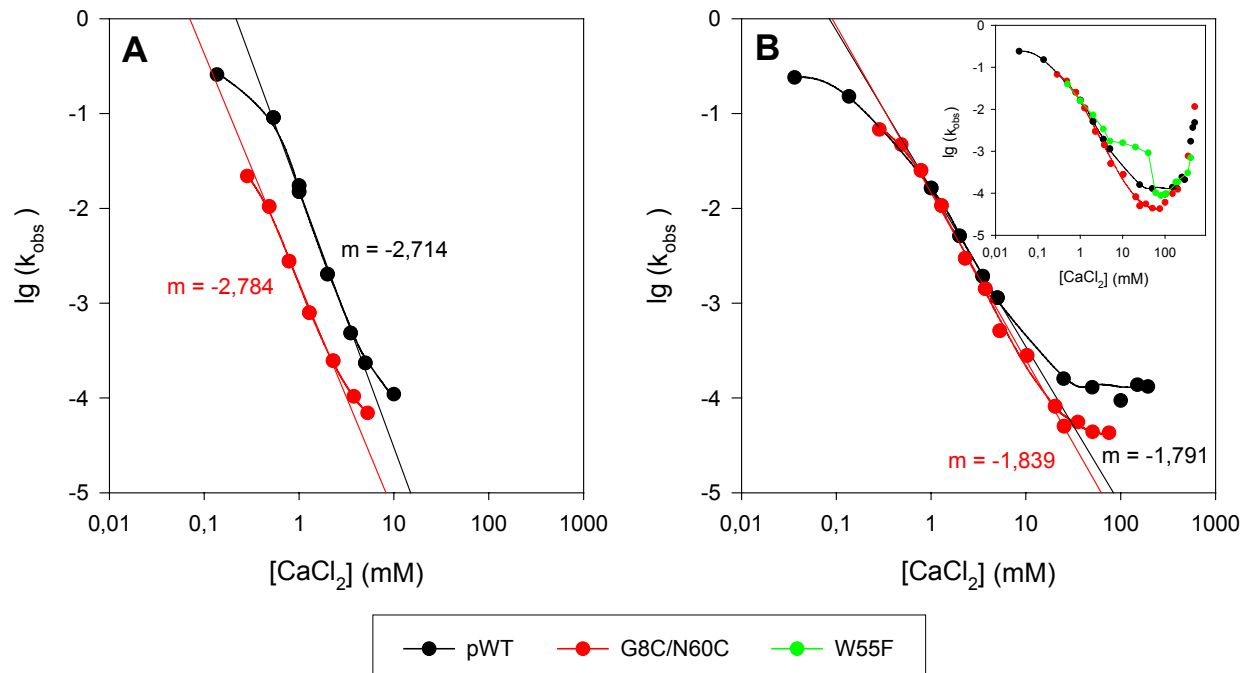
**Abb. 4-19: GdnHCl-induzierte Entfaltung von pWT und G8C/N60C in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an  $\text{CaCl}_2$ .**

Die Messungen der Entfaltungskinetik wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ , wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt. Die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration im Puffer wurde variiert (2, 5 und 100 mM). Die Fluoreszenzmessungen mit 295 nm-Anregung wurden nach  $\text{RF}_{334}/\text{RF}_{354}$  ausgewertet und nach einer Reaktion 1. Ordnung angepasst.

Um Unterschiede zwischen den Enzymvarianten hinsichtlich dieses Kalziumeffekts zu untersuchen, wurde die Kalzium-Abhängigkeit von  $k_{\text{obs}}$  bei 5,0 M GdnHCl (ausgeprägte Autoproteolyse, 4.3.2.) und 7,25 M GdnHCl (kaum Autoproteolyse, 4.3.2.) ermittelt (Abb. 4-20).

Unter Bedingungen ausgeprägter Autoproteolyse bei **5,0 M GdnHCl** (Abb. 4-20 A) entfaltet G8C/N60C immer um ca. eine Größenordnung langsamer als pWT. Wegen des

*Photobleachings* war es nicht möglich bei Kalzium-Konzentrationen  $> 10$  mM zu messen, da die Entfaltung dann zu langsam verlief. Eine ähnliche Beobachtung beschreiben auch Veltman et al. (1998) für die Kalzium-abhängige Thermoinaktivierung von Wildtyp-Npste und G8C/N60C, weshalb für die Temperatur- und GdnHCl-induzierte Entfaltung ein ähnlicher Einfluss der Disulfidbrücke auf die Kalziumabhängigkeit zu vermuten ist.



**Abb. 4-20: Abhängigkeit der Entfaltungskinetik von pWT und G8C/N60C in 5,0 und 7,25 M GdnHCl von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration.**

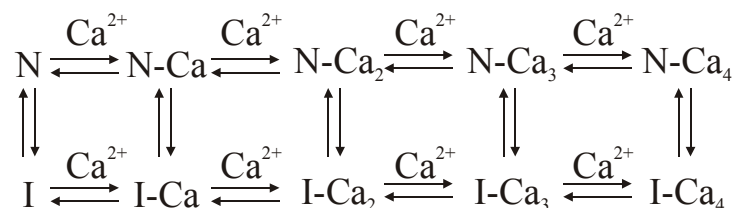
Die Fluoreszenzkinetiken mit 295 nm-Anregung wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$ , wie in 3.2.7.1. beschrieben, durchgeführt und über  $\text{RF}_{334}/\text{RF}_{354}$  nach einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet. Dabei wurde die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration zwischen 150  $\mu\text{M}$  und 500 mM variiert. **A)** 5,0 M GdnHCl, **B)** 7,25 M GdnHCl. Im Insert sind die Daten für pWT und G8C/N60C vergleichend mit denen von W55F dargestellt. Die Kurven wurden nach [4-2] angepasst und der Anstieg  $m = \partial \lg(k_{\text{obs}}) / \partial \lg[\text{CaCl}_2]$  im Wendepunkt der Kurven eingetragen.

Bei **7,25 M GdnHCl** (Abb. 4-20 B) zeigen alle Enzymvarianten ein Optimum der Stabilität bei ca. 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . Auch hier zeigen sich wieder Parallelen zur Thermoinaktivierung, da Wildtyp-NPste und G8C/N60C ebenfalls bei 100-200 mM  $\text{CaCl}_2$  ein Sättigungsverhalten zeigen (Veltman et al., 1996; Veltman et al., 1998). Bei höheren  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen wird die Entfaltung wieder beschleunigt (Abb. 4-20 B, Insert), was auf die denaturierende Wirkung von  $\text{CaCl}_2$  bei hohen Konzentrationen zurückgeführt werden kann (Burk, 1943; Timasheff, 1997).

Bis 2 mM  $\text{CaCl}_2$  verhalten sich alle Enzymvarianten gleich. Erst bei höheren  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen zeigen sich Unterschiede, die aber bei Konzentrationen  $> 200$  mM wieder verschwinden. Da die Enzymvarianten pWT, G8C/N60C und W55F sich jeweils nur in der potentiellen Entfaltungsregion unterscheiden, ist anzunehmen, dass die darin befindliche Kalziumbindungsstelle III (2.4.2.) betroffen ist und erst bei Kalziumkonzentrationen  $> 2$  mM in 7,25 M GdnHCl diese Bindungsstelle besetzt wird. Dass die Kalziumbindungsstelle III erst ab 2 mM  $\text{CaCl}_2$  besetzt wird, lässt sich auch aus dem Vergleich der Kalzium-abhängigen Thermoinaktivierung von Wildtyp-NPste und D57S, die Kalzium deutlich schlechter bindet, schließen (Veltman *et al.*, 1997b). Unterschiede in den Inaktivierungskonstanten treten erst zwischen 0,5 und 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Im Bereich von 2-60 mM  $\text{CaCl}_2$  ist für W55F die Kurve im Vergleich zu pWT zu höheren  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen hin verschoben (Abb. 4-20 B, Insert), was eine verminderte Kalziumaffinität als Ursache der Instabilität von W55F zeigt. Wie eingangs vermutet (4.1.1.), wird durch die Mutation W55F demnach die Kalziumbindung beeinflusst.

Um weitere Aussagen über die Kalziumbindung aus Abb. 4-20 abzuleiten, wurde ein allgemeines Modell zur Ligandenbindung bei Proteinen verwendet (Eftink, 1994). Dieses Modell wurde bereits erfolgreich bei der Untersuchung der Stöchiometrie der Kalziumbindung am strukturverwandten Thermolysin, das ebenfalls wie NPste vier gebundene Kalziumionen besitzt, eingesetzt (Voordouw & Roche, 1975a; Roche & Voordouw, 1977). Dabei wird angenommen, dass die Entfaltung über Intermediate verläuft, die unterschiedlich viele Kalziumionen gebunden haben und diese Intermediate nachfolgend weiter entfalten bzw. proteolytisch abgebaut werden. In Abb. 4-21 ist ein vereinfachtes Schema dargestellt:



**Abb. 4-21: Schema der Kalziumassoziation/-dissoziation.**

Natives Enzym (N) entfaltet über ein Intermediat (I), das entweder proteolytisch angegriffen wird oder weiter zum vollständig entfalteten Zustand entfaltet. Dabei können N und I bis zu 4 Kalziumionen binden. Schema vereinfacht nach Roche & Voordouw (1977).

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante ergibt sich zu:

$$k_{obs} = k_0 \cdot \prod_{i=1}^p \frac{1 + K_i' \cdot [Ca]}{1 + K_i \cdot [Ca]} \quad [4-2]$$

mit  $k_0$  als Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Kalzium,  $K_i$  und  $K_i'$  als Bindungskonstanten des Nativzustandes bzw. des Intermediats und  $p$  als Anzahl der gebundenen Kalziumionen (Voordouw & Roche, 1975a).

Wird dieses Schema auf die Daten von Abb. 4-20 angewandt, beschreibt in der Auftragung  $\lg(k_{obs})$  vs.  $\lg([Ca^{2+}])$  der Anstieg der Kurven im Wendepunkt die Anzahl der gebundenen Kalziumionen (Roche & Voordouw, 1978; Corbett & Roche, 1983). In Gegenwart von 5,0 M GdnHCl (Abb. 4-20 A) wurde ein Anstieg von 2,7-2,8 gefunden und für 7,25 M GdnHCl (Abb. 4.20 B) ein Anstieg von ca. 1,8. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass in 5,0 M GdnHCl – unter Bedingungen starker Autoproteolyse – die Stabilisierung durch drei Kalziumionen vermittelt wird und in Gegenwart von 7,25 M GdnHCl – unter Bedingungen ohne Autoproteolyse – nur zwei Kalziumionen an der Stabilisierung beteiligt sind. In 5,0 und 7,25 M GdnHCl liegen demzufolge andere Entfaltungsmechanismen vor, was sich mit der bisherigen Vermutung deckt, dass unter bestimmten Bedingungen ein Entfaltungsintermediat durchlaufen wird.

Aus dieser Analyse der Stöchiometrie der Kalziumbindung in 5,0 M GdnHCl geht hervor, dass nur drei Kalzium-Bindungsstellen in den betrachteten Prozessen involviert sind, aber anhand der Strukturvorhersage (4.1.1.) vier Bindungsstellen existieren. Um der interessanten Frage nachzugehen, ob die verbleibende Bindungsstelle keinen Einfluss auf die Stabilisierung hat, wurde der Stabilisierungsfaktor in Gegenwart von 5 mM  $CaCl_2$  in Bezug zum  $Ca^{2+}$ -freien Enzym untersucht.

Es wurde versucht, kalziumfreies Enzym durch Zugabe von EDTA zu präparieren und dessen Entfaltungsgeschwindigkeit zu bestimmen. In Gegenwart von GdnHCl ist die Entfaltung dabei so schnell, dass sie nicht durch Fluoreszenzmessungen verfolgt werden konnte. Unter Nativbedingungen in Gegenwart von 100 mM EDTA wurde die Entfaltung über die stattfindende Autoproteolyse von 100  $\mu\text{g/ml}$  pWT zu  $k_{100\text{ mM EDTA}}^0 = 0,003\text{ s}^{-1}$  bestimmt. In Gegenwart von 5 mM  $CaCl_2$  dagegen beträgt sie  $k_{5\text{ mM CaCl}_2}^0 = 2,44 \cdot 10^{-7}\text{ s}^{-1}$  (Abb. 4-15). Durch den Zusatz von 5 mM  $CaCl_2$  ergibt sich daraus ein Stabilisierungsfaktor  $k_{100\text{ mM EDTA}}^0/k_{5\text{ mM CaCl}_2}^0$  von ca. 12.500 gegen Entfaltung mit nachfolgender Autoproteolyse.

Ein Stabilisierungsfaktor ( $k_0/k_{5\text{ mM CaCl}_2}^0$ ) bezüglich 5 mM  $CaCl_2$  lässt sich auch aus den Daten aus Abb. 4-20 ermitteln: Aus der Kurven-Anpassung nach [4-2] kann der Wert  $k_0$  ermittelt werden, der die Entfaltungsgeschwindigkeit ohne zugesetztes Kalzium beschreibt (Tab. 4-4).

**Tabelle 4-4: Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung ( $k_0$ ) von pWT und G8C/N60C in Abwesenheit von zugesetztem  $\text{CaCl}_2$ .**

Die Daten aus Abb. 4-20 wurden nach [4-2] angepasst. Die Standardabweichung betrug weniger als 5%.

| Enzymvariante | $k_0$ ( $\text{s}^{-1}$ ) |               |
|---------------|---------------------------|---------------|
|               | 5,0 M GdnHCl              | 7,25 M GdnHCl |
| pWT           | 0,2830                    | 0,2960        |
| G8C/N60C      | 0,0352                    | 0,1070        |

Unter Autoproteolysebedingungen in Gegenwart von 5,0 M GdnHCl ergibt sich für pWT mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $2,34 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$  ein Stabilisierungsfaktor  $k_0/k_{5 \text{ mM } \text{CaCl}_2}$  von 1.200. Verglichen mit dem Stabilisierungsfaktor in Gegenwart von EDTA von 12.500 (und ohne GdnHCl) ergibt sich der Schluss, dass unter den Versuchsbedingungen aus Abb. 4-20 eine hochaffine Bindungsstelle immer besetzt bleibt.

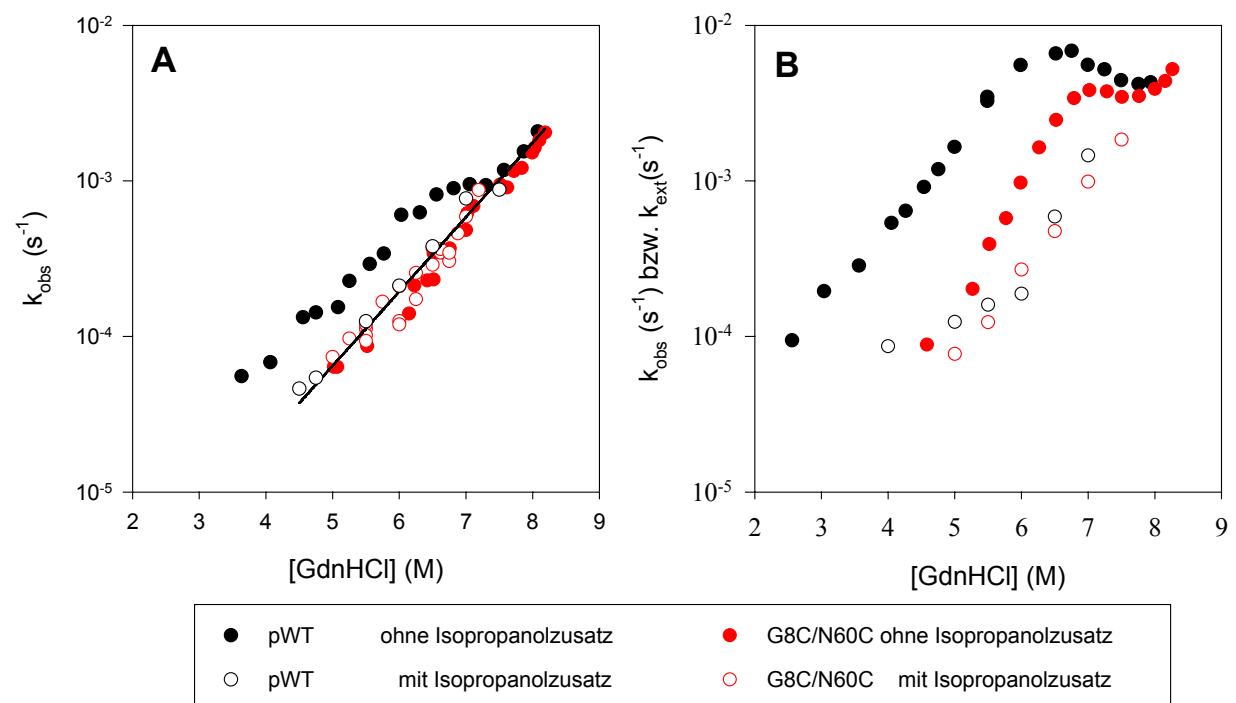
Zusätzlich zur 12.500-fachen Stabilisierung in Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (im Vergleich zum Kalzium-freien Enzym) bewirkt eine Erhöhung der Kalziumkonzentration von 5 auf 100 mM eine weitere Verringerung der Entfaltungsgeschwindigkeit um eine Größenordnung (Abb. 4-19 und 4-20 B). Die Bindung der vier Kalziumionen moduliert also die kinetische Stabilität um mehr als fünf Größenordnungen und damit ist die große Stabilität von NPste – ebenso wie beim Thermolysin (Voordouw *et al.*, 1976) – hauptsächlich durch das gebundene Kalzium bestimmt.

Ein Vergleich der  $k_0$ -Werte für 5,0 M GdnHCl aus Tab. 4-4 zeigt außerdem deutlich, dass sich pWT und G8C/N60C auch in Abwesenheit von Kalzium um den Faktor 8 in ihren Entfaltungskonstanten unterscheiden. Da auch in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  ein ähnlicher Faktor beobachtet wird (Abb. 4-20 A), scheint damit die Disulfidbrücke nicht die Kalziumaffinität zu beeinflussen, sondern nur einen ähnlichen Stabilisierungseffekt wie Kalzium hervorzurufen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die  $k_0$ -Werte in 7,25 M GdnHCl für pWT und G8C/N60C deutlich weniger. Möglicherweise ist unter stark denaturierenden Bedingungen oder unter Bedingungen, wo die Autoproteolyse keine Rolle spielt, der Stabilisierungseffekt der Disulfidbrücke geringer, weil sich der Entfaltungsweg ändert. Dafür spricht auch die Tatsache, dass in Gegenwart von 200 mM  $\text{CaCl}_2$  die sonst deutlichen Unterschiede in den kinetischen Konstanten beider Enzyme verschwinden. Anhand von

Thermoinaktivierungsmessungen an NPste-Varianten schlagen auch Veltman et al. (1998) bei sehr hohen Temperaturen einen veränderten Entfaltungsmechanismus vor.

#### 4.3.4.3. Einfluss von Isopropanol auf die Entfaltungskinetik

Um die Entfaltungskinetik bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen ohne den Einfluss von Autoproteolyse zu untersuchen, wurde in Gegenwart von Isopropanol, bei 4,0-7,5 M GdnHCl und geringen Enzymkonzentrationen gemessen. Allerdings konnte durch Isopropanolzusatz keine vollständige Inhibierung der Autoproteolyse erreicht werden (4.3.3.2.).



**Abb. 4-22: Vergleich der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten für die GdnHCl-induzierte Entfaltung von pWT und G8C/N60C mit und ohne Isopropanolzusatz in Gegenwart von 2 und 5 mM CaCl<sub>2</sub>.**

Die Fluoreszenzkinetiken mit 295 nm-Anregung wurden in Gegenwart von Isopropanol in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml, wie in 3.2.7.1. beschrieben, aufgenommen und über RF<sub>334</sub>/RF<sub>354</sub> nach einer Reaktion 1. Ordnung ausgewertet. Die Werte ohne Isopropanolzusatz wurden aus Abb. 4-19 zum Vergleich übernommen. **A)** 5 mM CaCl<sub>2</sub>, **B)** 2 mM CaCl<sub>2</sub>. Die Isopropanolkonzentration in **A)** betrug 20% (v/v). Die Geschwindigkeitskonstanten in Gegenwart von Isopropanol in **B)** sind extrapolierte Werte ( $k_{\text{ext}}$ ), die aus dem exponentiellen Abfall der Geschwindigkeitskonstanten, die für verschiedene Isopropanolkonzentrationen (2-20% (v/v)) experimentell ermittelt wurden.



Die Ergebnisse zeigten, dass die Nichtlinearitäten in den Chevron-Auftragungen ab einer bestimmten Isopropanolkonzentration verschwinden. Je stärker ausgeprägt die Nichtlinearitäten sind, desto mehr Isopropanol muss zugesetzt werden, um lineare Chevron-Kurven zu erhalten (Abb. 4-22).

Bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$  hat ein Isopropanolzusatz bis 20% (v/v) keinen Einfluss auf die Entfaltungsgeschwindigkeit (nicht gezeigt). In Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  reichen 20% (v/v) Isopropanol aus, um eine Linearisierung hervorzurufen (Abb. 4-22 A). Aber für die Entfaltung bei 2 mM  $\text{CaCl}_2$  waren Isopropanolkonzentrationen von z.T. > 30% (v/v) nötig. Gerade bei hohen GdnHCl-Konzentrationen konnte dies nicht realisiert werden. Es wurden deshalb jeweils bei einer konstanten GdnHCl-Konzentration die Entfaltungsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Isopropanolkonzentrationen bestimmt und  $k_{\text{obs}}$  vs. [Isopropanol] nach einem exponentiellen Abfall angepasst. Der Endwert dieser Anpassung ( $k_{\text{ext}}$ ) wurde für die Auswertung in Abb. 4-22 B verwendet.

In Gegenwart entsprechend hoher Konzentrationen an Isopropanol entfalten pWT und G8C/N60C gleich schnell (Abb. 4-22). Die Chevron-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten für die GdnHCl-induzierte Entfaltung in Gegenwart von Isopropanol scheint die direkte Verlängerung des Astes zu liefern, der ohne Isopropanolzusatz nur bei hohen GdnHCl-Konzentrationen um 8,0 M beobachtet werden kann (Abb. 4-22).

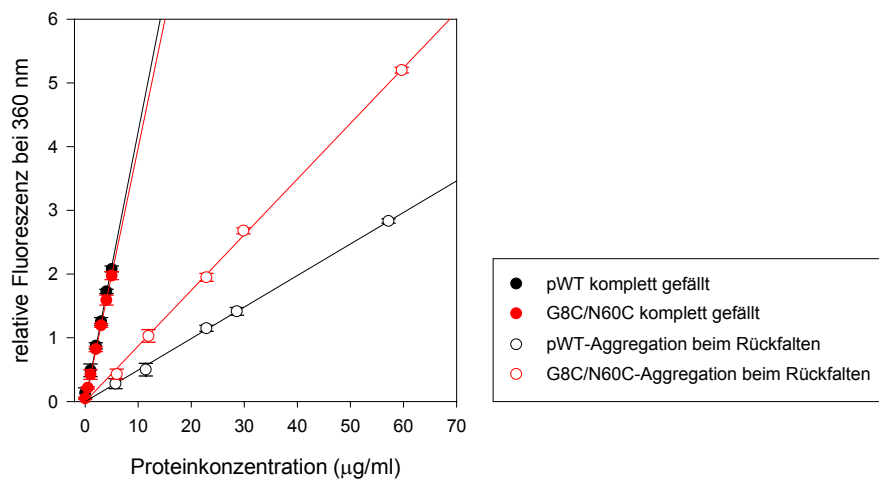
Der Zusatz von Isopropanol senkt die beobachtete Entfaltungsgeschwindigkeitskonstante (Abb. 4-22). Nach dem Zweizustandsmodell der Entfaltung mit nachfolgender Autoproteolyse [2-13] sollte eine Hemmung der Autoproteolyse keinen Einfluss auf die Entfaltungskinetik unter stark denaturierenden Bedingungen haben. Der hier gezeigte Einfluss von Isopropanol auf die Entfaltungskinetik kann nur damit erklärt werden, dass die Autoproteolyse erst eine vorgelagerte (lokale) Entfaltung, die spektroskopisch nicht zugänglich ist, sichtbar macht. Offensichtlich verläuft die Entfaltung daher über ein proteolyseanfälliges Intermediat und die beobachteten Unterschiede zwischen pWT und G8C/N60C manifestieren sich erst durch die Autoproteolyse.

### 4.3.5. Rückfaltung aus GdnHCl

Um thermodynamische Aussagen über die Entfaltung und Stabilität der Enzyme treffen zu können, ist es nötig, neben der Entfaltung auch die Rückfaltung zu betrachten. Rückfaltungsuntersuchungen von Proteasen gestalten sich schwierig. Zum einen ist der vollständig entfaltete Zustand schwer zugänglich, da die Autoproteolyse während der Entfaltung zum Abbau bereits entfalteter Spezies führt. Zum anderen sind Nebenreaktionen wie Missfaltung, Aggregation und Autoproteolyse während der Rückfaltung zu erwarten (Kramer *et al.*, 2000).

#### 4.3.5.1. Aggregation und Autoproteolyse bei der Rückfaltung

Wie bereits ausgeführt, kann durch Verdünnen der Enzymlösungen in hochmolare GdnHCl-Lösungen der entfaltete Zustand ohne Autoproteolyse erhalten werden (4.3.2.). Um genügend hohe Konzentrationen an D zu erhalten, wurden die Proteine mit NaDOC gefällt (3.2.5.2.) und anschließend in einem kleinen Volumen 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer aufgenommen (3.2.7.2.). Beim Verdünnen der entfalteten Enzyme in Standardpuffer (Renaturierung) traten Aggregation und Autoproteolyse ein.

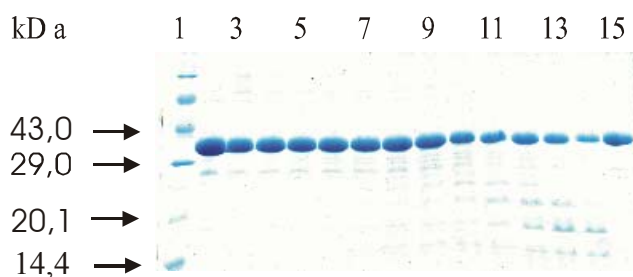


**Abb. 4-23: Aggregation von pWT und G8C/N60C beim Rückfalten aus GdnHCl.**

Die Streulicht-Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.6.1. beschrieben, durchgeführt. Die vollständig entfalteten Enzyme (5 mg/ml in 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer) wurden 1:1.000- bis 1:90-fach in Standardpuffer verdünnt und die Zunahme des Streulichtes gemessen. Als Referenz wurde natives Enzym durch Zugabe von TCA in einer Endkonzentration von 2,5% (w/w) vollständig ausgefällt und der dabei auftretende Anstieg des Streulichtes einer Änderung von 100% gesetzt.

Die **Aggregation** wurde anhand der Zunahme des Streulichts bei 360 nm verfolgt (Abb. 4-23). Eine Quantifizierung gelang durch Erstellen einer Eichkurve, bei der natives Enzym durch TCA-Zugabe ausgefällt und die Trübung durch die in Schwebelösung gehaltenen Aggregate gemessen wurde (3.2.6.1.). Dass die Fällung vollständig erfolgte, konnte nach Zentrifugation über SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Entsprechend dieser Eichkurven aggregiert pWT zu 12% und G8C/N60C zu 22% beim Verdünnen in Standardpuffer aus GdnHCl-haltigen Lösungen.



**Abb. 4-24: Fragmentierungsmuster von pWT bei Zugabe von 20% (v/v) Isopropanol während der Rückfaltung.**

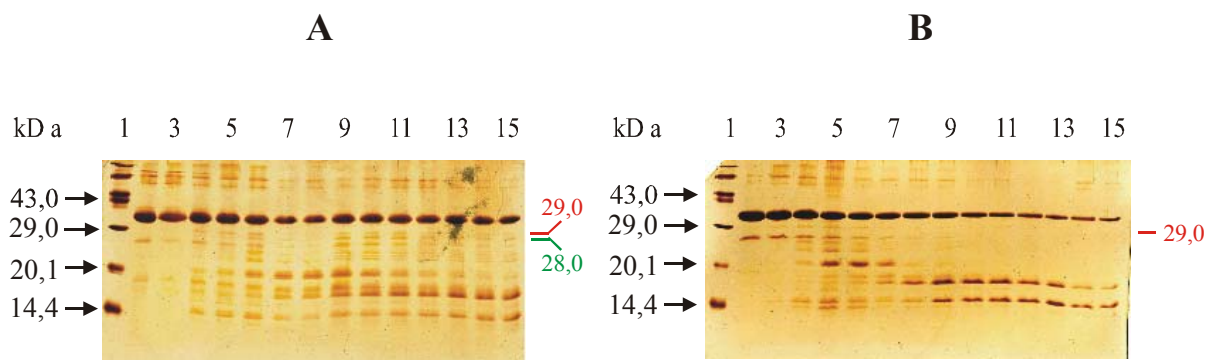
Die Autoproteolyse-Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C durchgeführt. Entfalteter pWT (5 mg/ml in 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer, siehe 3.2.7.2.) wurde 1:20 in Standardpuffer verdünnt. Nach verschiedenen Zeiten wurden dem Renaturierungsansatz Proben entnommen, mit NaDOC (3.2.5.2.) gefällt und in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) nach Coomassie-Färbung analysiert. In der Bahn 1 ist der Größenmarker, in Bahn 2 der Blindwert (Enzym vor Renaturierung) und ab Bahn 3 die Enzymproben nach steigender Inkubationszeit im Renaturierungsansatz (10, 30 s bzw. 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80 und 100 min, v.l.n.r.) aufgetragen. Bahn 15 zeigt das native Enzym vor der Präparation von entfaltetem pWT.

Als weitere Nebenreaktion bei der Rückfaltung der mit GdnHCl entfaltenen Enzyme wurde **Autoproteolyse** beobachtet, die auch durch Zusatz von 20% (v/v) Isopropanol zur Inhibierung der Aktivität (4.3.1.) nicht vollständig unterbunden werden konnte. Sie ist exemplarisch für pWT in Abb. 4-24 dargestellt.

Abb. 4-24 zeigt, dass das zur Präparation der entfaltenen Enzyme eingesetzte Protein elektrophoretisch homogen war, aber nach NaDOC-Fällung und Solubilisierung in 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer eine schwache Bande bei ca. 27 kDa auftrat, die nur ein Autoproteolysefragment sein kann. Interessanterweise konnte bei pWT während der Rückfaltung auch das Auftreten von zwei größeren Fragmenten bei 28 und 29 kDa beobachtet werden. Aufgrund ihrer Größe sind es sehr wahrscheinlich Primärfragmente. Ihr Auftreten bei pWT und G8C/N60C wurde im Weiteren untersucht.

#### 4.3.5.2. Fragmentierung bei der Rückfaltung – Hinweise auf primäre Spaltstellen

Die Autoproteolyse und Fragmentanreicherung, die während der Rückfaltung der entfalteten Enzyme aus GdnHCl durch Verdünnen in Standardpuffer beobachtet wurde (4.3.5.1.), eröffnete die Möglichkeit, Aussagen über die primären Spaltstellen zu erhalten. Es wurden deshalb in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration, der Rest-GdnHCl-Konzentration und Additiven im Renaturierungsansatz Bedingungen für die Fragmentakkumulation – insbesondere des 28 und 29 kDa-Fragments – gesucht. Der Zusatz von 1 mM oPA (Präparation von Zn<sup>2+</sup>-freiem Apoenzym), 10-100 mM EDTA (Induktion der Ca<sup>2+</sup>-vermittelten Autoproteolyse), die Zugabe von äquimolaren Mengen aktiver Protease zum entfalteten Enzym im Renaturierungsansatz mit anschließendem schnellem Abstoppen der Aktivität durch NaDOC-Fällung (3.2.5.2.) oder die Variation der GdnHCl-Konzentration von 1,0-7,5 M brachten keinen Erfolg. Bei GdnHCl-Konzentrationen > 1,6 M wurde eine langsame Autoproteolyse ohne Fragmentanreicherung beobachtet.

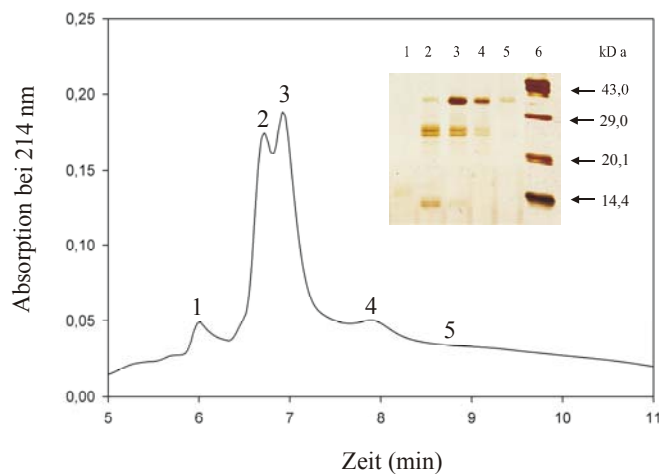


**Abb. 4-25: Fragmentierungsmuster von pWT und G8C/N60C beim Rückfalten aus GdnHCl.**

Die Autoproteolyse-Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C durchgeführt. Die entfalteten Enzyme (5 mg/ml in 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer, siehe 3.2.7.2.) wurden in Standardpuffer 1:100 verdünnt und die Rest-GdnHCl-Konzentration auf 420 mM eingestellt. Nach verschiedenen Zeiten wurden dem Renaturierungsansatz Proben entnommen, mit NaDOC gefällt (3.2.5.2.) und in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) nach Silber-Färbung analysiert. In der Bahn 1 ist der Größenmarker, in Bahn 2 der Blindwert (Enzym vor Rückfaltung) und ab Bahn 3 die Enzymproben nach steigender Inkubationszeit im Renaturierungsansatz aufgetragen. Die Lage des 28 kDa-Fragments (grün) und 29 kDa-Fragments (rot) sind gekennzeichnet. **A**) pWT, ab Bahn 3: 10, 30 s bzw. 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 min (v.l.n.r.), **B**) G8C/N60C, ab Bahn 3: 10, 30 s bzw. 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140 min (v.l.n.r.).

Günstigere Bedingungen für die Fragmentanreicherung wurden bis ca. 600 mM GdnHCl und Proteinkonzentrationen um 50 µg/ml gefunden. Eine Optimierung ergab, dass entfaltetes Enzym in einer Konzentration von 50 µg/ml in Gegenwart von 420 mM GdnHCl in Standardpuffer ohne weitere Additive beim Renaturieren am besten fragmentiert (Abb. 4-25). Doch auch hier mussten die Banden im Gel stark überfärbt werden, um die Fragmente sichtbar zu machen.

Ein Vergleich von pWT und G8C/N60C zeigt Abweichungen im Fragmentierungsmuster beider Enzyme, die auf ein verändertes Autoproteolyseverhalten nach Einführung der Disulfidbrücke schließen lassen. Bei G8C/N60C werden weniger Fragmente durchlaufen oder akkumuliert. Die beiden Fragmente, die bei pWT innerhalb der ersten Minuten bei 28 und 29 kDa akkumuliert werden, können aufgrund ihrer Größe nur aus dem nativen Enzym und nicht aus Folgefragmenten entstanden sein. Interessanterweise zeigte pWT beide Fragmente, während bei G8C/N60C nur das 29 kDa-Fragment gefunden wurde. Demzufolge könnte eine Schnittstelle zwischen den Positionen 8 und 60 liegen, die durch die Disulfidverbrückung in G8C/N60C nicht mehr zugänglich ist.



**Abb. 4-26: Trennung von Autoproteolyse-Fragmenten über RP-HPLC.**

Ein Fragmentierungsansatz von pWT (siehe Text) wurde über eine C<sub>4</sub>-Säule mit einem Acetonitril-Gradienten in Wasser von 0 auf 100% in 10 min (Start des Gradienten nach 2 min) getrennt (3.2.5.7.) und mittels SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.) analysiert

(Insert). Die Zahlen im Chromatogramm und über dem SDS-Gel bezeichnen die gesammelten Fraktionen.

Um die entstandenen Fragmente der Primärsequenz der Enzyme zuordnen zu können, wurden mehrere Renaturierungsansätze zur Fragmentanreicherung mit NaDOC (3.2.5.2.) gefällt. Das NaDOC sowie Salze und Puffersubstanzen wurden herausgewaschen und die Proteinfragmente in 50% (v/v) Acetonitril gelöst. Alternativ wurden die Renaturierungsansätze über RP-HPLC (3.2.5.7.) entsalzt und fraktioniert (Abb. 4-26). Die

Autoproteolyse der Proben wurde dazu nicht durch Ausfällen mit NaDOC abgestoppt, sondern durch Zugabe von 0,5% (v/v) 37%-iger Salzsäure und festem GdnHCl bis zur Sättigung der Lösung an GdnHCl. Die Salzsäure bewirkt dabei eine Verschiebung des pH-Wertes zu etwa pH 2 und verringert die Aktivität. Die im Sauren beobachtete Aggregation wurde durch Zugabe von GdnHCl verhindert. Die Trennung erfolgte über eine C<sub>4</sub>-Säule mit einem Acetonitril-Gradienten (Abb. 4-26).

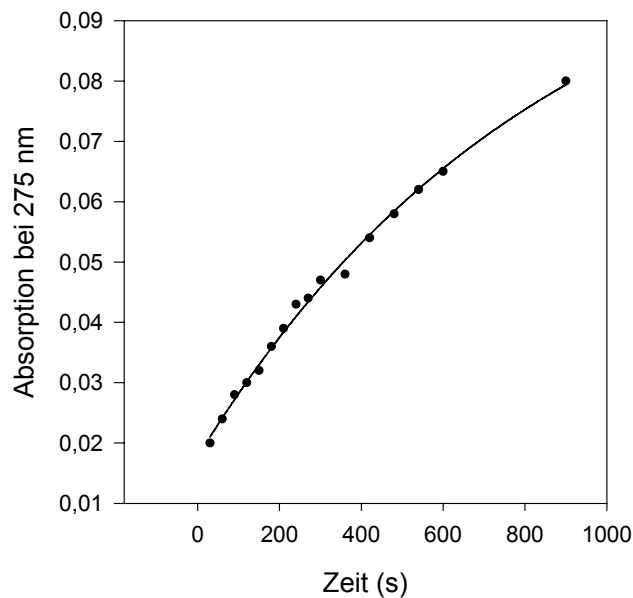
Die RP-HPLC-Trennung war nicht vollständig, erlaubte aber eine teilweise Separation und Anreicherung von Fragmenten, wie die SDS-Gelelektrophorese zeigte (Abb. 4-26, Insert). Doch weder die MALDI-MS-, noch die ESI-MS-Analyse (3.2.5.9.) lieferten eindeutige Ergebnisse, so dass keine Zuordnung der erhaltenen Fragmente möglich war.

Die primären Schnittstellen konnten somit nicht identifiziert werden. Anders als beim Thermolysin, bei dem man eine fast vollständige Umwandlung des nativen Enzyms in Primärfragmente findet (Corbett *et al.*, 1986; Fontana, 1988), ist bei NPste die Fragmentanreicherung schwierig. Konzentrationsprobleme scheinen die Hauptursache für die unzureichenden massenspektrometrischen Analysen zu sein. Aufgrund des Auftretens eines 28 und eines 29 kDa-Fragments bei pWT und des Fehlens des 28 kDa-Fragments bei G8C/N60C kann vermutet werden, dass eine primäre Spaltstelle in der Region um die Position 60 liegt. Tatsächlich könnte aufgrund der Primärspezifität von NPste (Kühn *et al.*, 2002) eine Spaltstelle bei Phe62 existieren, die in der vermuteten Entfaltungsregion liegt und ein Fragment von 27,98 kDa produzieren sollte. Weder beim strukturverwandten Thermolysin (Fontana, 1988), noch bei der neutralen Protease aus *B. subtilis* (van den Burg *et al.*, 1990) existiert eine primäre Spaltstelle in dieser Region. In der Literatur gibt es Hinweise auf mögliche Spaltstellen bei NPste bisher in den Positionen Tyr93 (Kubo *et al.*, 1992), Tyr110 und Tyr157 (Atsuo, 1993), da Aminosäuresubstitutionen in diesen Positionen eine erhöhte Autoproteolyseresistenz hervorriefen. Jedoch ist bisher unklar, wodurch die erhöhte Autoproteolyseresistenz hervorgerufen wird und ob es sich um primäre Spaltstellen handelt.

#### 4.3.5.3. Reaktivierung

Das Auftreten von Autoproteolyse beim Rückfalten der vollständig entfalteten Enzyme (4.3.5.1.) zeigt eine Wiedererlangung der Aktivität an. Es wurde daher untersucht, ob eine Reaktivierung der entfalteten Enzyme gegen Abz-AGLA-Nba (Abb. 3-2) bzw. Casein (Abb. 4-27) als Substrat gemessen werden kann (3.2.7.2.). Da Aggregation und Autoproteolyse als enzymkonzentrationsabhängige Nebenreaktionen bei der Rückfaltung auftraten (4.3.5.1.),

wurde versucht, bei sehr niedrigen Proteinendkonzentrationen (40–100 ng/ml) zu arbeiten. Die Rückfaltung wurde durch Verdünnen der entfalteten Enzyme in Standardpuffer gestartet und die zeitabhängige Wiedererlangung der Aktivität verfolgt (3.2.7.2.).



**Abb. 4-27: Reaktivierungskinetik von entfaltetem pWT.**

Die Reaktivierungsmessungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.7.2. beschrieben, durchgeführt. 5 µg/ml pWT wurden für 3 h in 6,87 M GdnHCl entfaltet. Nach Rücksprung durch 1:20-Verdünnung in Standardpuffer wurde die Wiedererlangung der Aktivität diskontinuierlich gegen Casein (3.2.4.1.) gemessen. Die Kinetik wurde nach [3-5] angepasst. Dabei wurde ein Absolutglied zugelassen, weil die Entfaltung noch nicht vollständig abgeschlossen war.

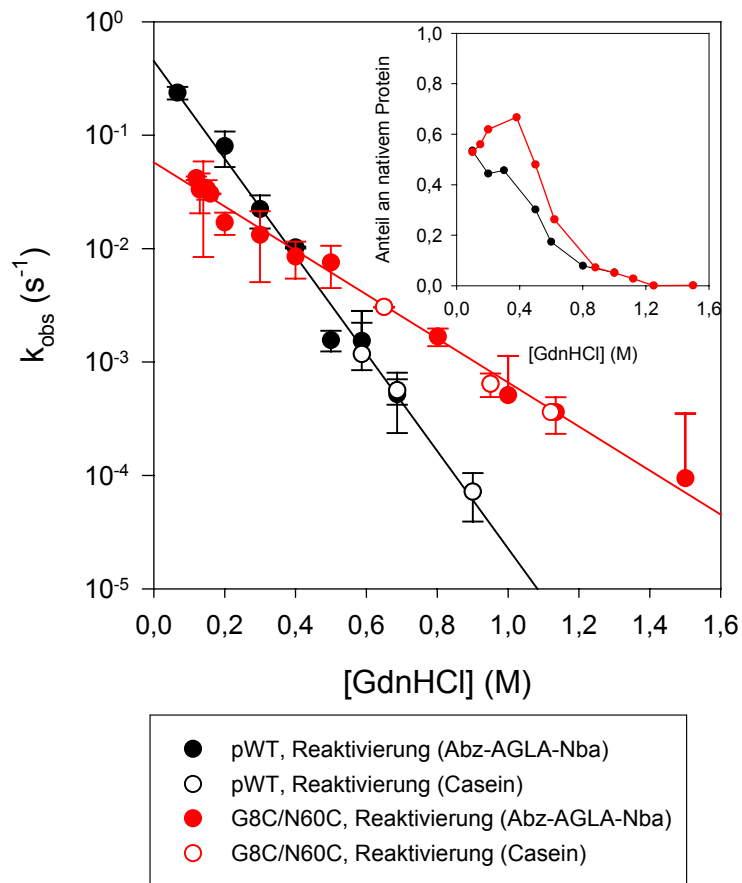
Tatsächlich wurde nach Rücksprung aus stark denaturierenden Bedingungen (> 6,5 M GdnHCl) eine Reaktivierung für pWT (Abb. 4-27) und G8C/N60C (nicht gezeigt) gefunden. Die Entfaltung ist damit zumindest teilweise reversibel. Bei mittleren GdnHCl-Konzentrationen (< 5,5 M) gestaltet die Autoproteolyse die Entfaltung irreversibel (4.3.2.). Auch für  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde eine Reversibilität nur unter stark denaturierenden Bedingungen gefunden und – wie auch hier angenommen – auf die sehr schnelle Entfaltung und damit schnelle Inaktivierung der Protease zurückgeführt (Martin, 1964).

#### 4.3.5.4. Reaktivierungs- und Autoproteolysekinetiken

Mittels der Reaktivierungsmessung ist eine Detektion der Rückfaltung möglich. Im Folgenden wurden dazu die Reaktivierungskinetiken für verschiedene GdnHCl-Konzentrationen aufgenommen und die nach [3-5] erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  in der Chevron-Auftragung dargestellt (Abb. 4-28).

Die nativen Enzyme werden schon in Gegenwart von geringen GdnHCl-Konzentrationen inaktiviert (4.3.1. und Abb. 4-10 A). Die messbare Amplitude der Renaturierung sinkt deshalb

mit der GdnHCl-Konzentration und ist nur bis zu einer Rest-GdnHCl-Konzentration von ca. 1 M detektierbar. Unter Berücksichtigung dieser Inaktivierung beträgt die maximale Renaturierungsausbeute 50-70% (Abb. 4-28, Insert).



**Abb. 4-28: Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung von entfaltetem pWT und G8C/N60C in Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration.**

Die Reaktivierungsmessungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C, wie in 3.2.7.2. beschrieben, gegen Casein bzw. Abz-AGLA-Nba als Substrat durchgeführt und nach einer Reaktion 1. Ordnung angepasst. Im Inset ist die erreichte Endaktivität bezüglich zur Aktivität der nicht entfaltenen Enzyme in Gegenwart der entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen dargestellt.

Die erhaltenen Reaktivierungskonstanten zeigen in der halblogarithmischen Auftragung eine lineare Abhängigkeit von der GdnHCl-Konzentration (Abb. 4-28).

Der Reaktivierungsast in der Chevron-Auftragung verläuft für pWT steiler als für G8C/N60C. Möglicherweise spiegelt sich hierin der Einfluss von Autoproteolyse und Aggregation - als Konkurrenzreaktionen zur Reaktivierung - auf die beobachtete Reaktivierungskonstante  $k_{\text{obs}}$  wider. Rückschlüsse auf die Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung  $k_U$  sind deshalb nur bedingt zulässig. Die sichersten Aussagen sind innerhalb des Bereichs von 0-400 mM GdnHCl möglich, da hier die Reversibilität zwischen 40% und 70% liegt. Die bei höheren GdnHCl-Konzentrationen erhaltenen Werte für  $k_{\text{obs}}$  passen sich jedoch gut in die übrigen Werte ein.

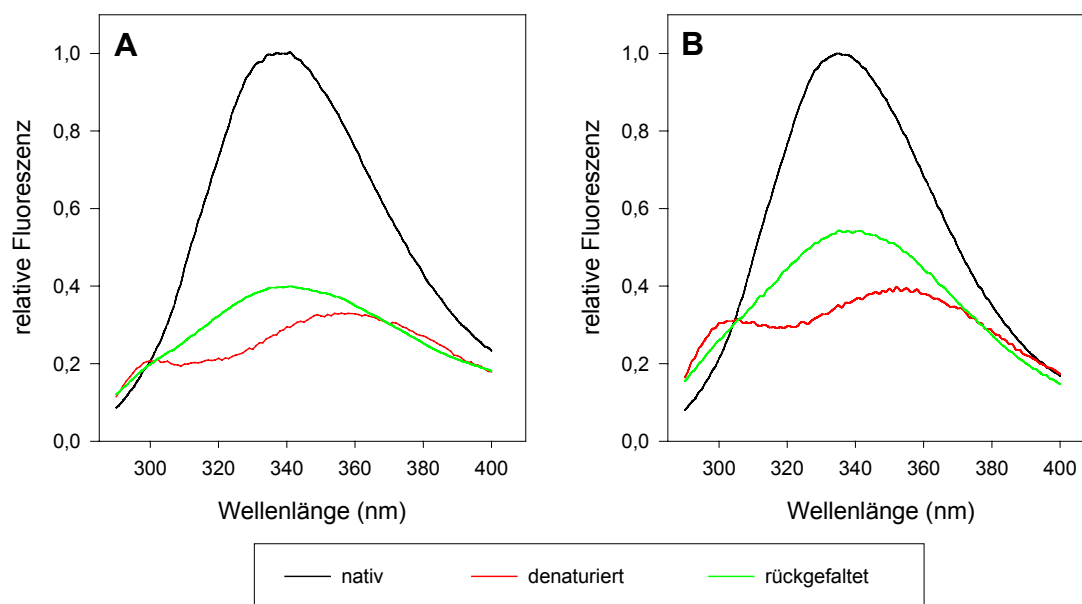
G8C/N60C zeigt einen höheren Grad an Reversibilität als pWT, was möglicherweise auch den flacheren Kurvenverlauf in der Chevron-Auftragung bedingt. Extrapoliert gegen 0 M



GdnHCl zeigen beide Enzyme etwa 50% Reversibilität (Abb. 4-28, Insert), aber die Enzymvariante G8C/N60C wird um eine Größenordnung langsamer reaktiviert. Die Energiebarriere, die zur Reaktivierung überwunden werden muss, ist folglich durch die eingeführte Disulfidbrücke erhöht worden.

#### 4.3.5.5. Fluoreszenzspektren der renaturierten Enzyme

Bei Verdünnung der entfalteten Enzyme aus 8,4 M GdnHCl in Standardpuffer ergab sich sofort ein nativähnliches Fluoreszenzspektrum (Abb. 4-29).



**Abb. 4-29 Vergleich der Fluoreszenzspektren von pWT und G8C/N60C im nativen, denaturierten und rückgefalteten Zustand.**

Die Fluoreszenzmessungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinendkonzentration von 5 µg/ml durchgeführt (3.2.6.1.). Die Anregung erfolgte bei 278 nm. Die Nativspektren wurden ohne GdnHCl-Zusatz gemessen. Der denaturierte Zustand wurde durch dreistündige Inkubation in 8,0 M GdnHCl/Standardpuffer erhalten. Durch Rücksprung aus diesem Zustand unter Bedingungen mit 8 mM Rest-GdnHCl wurde der rückgefaltete Zustand erhalten und sofort vermessen. **A)** pWT, **B)** G8C/N60C.

Das Spektrum zeigte keine Entkopplung der Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz. Im Vergleich mit den Nativspektren ist die Wellenlänge des Emissionsmaximums unverändert, aber die Fluoreszenzintensität vermindert, was teilweise, allerdings nicht vollständig, durch Aggregation (4.3.5.1.) erklärt werden kann. Die Bildung dieses Spektrums erfolgte innerhalb

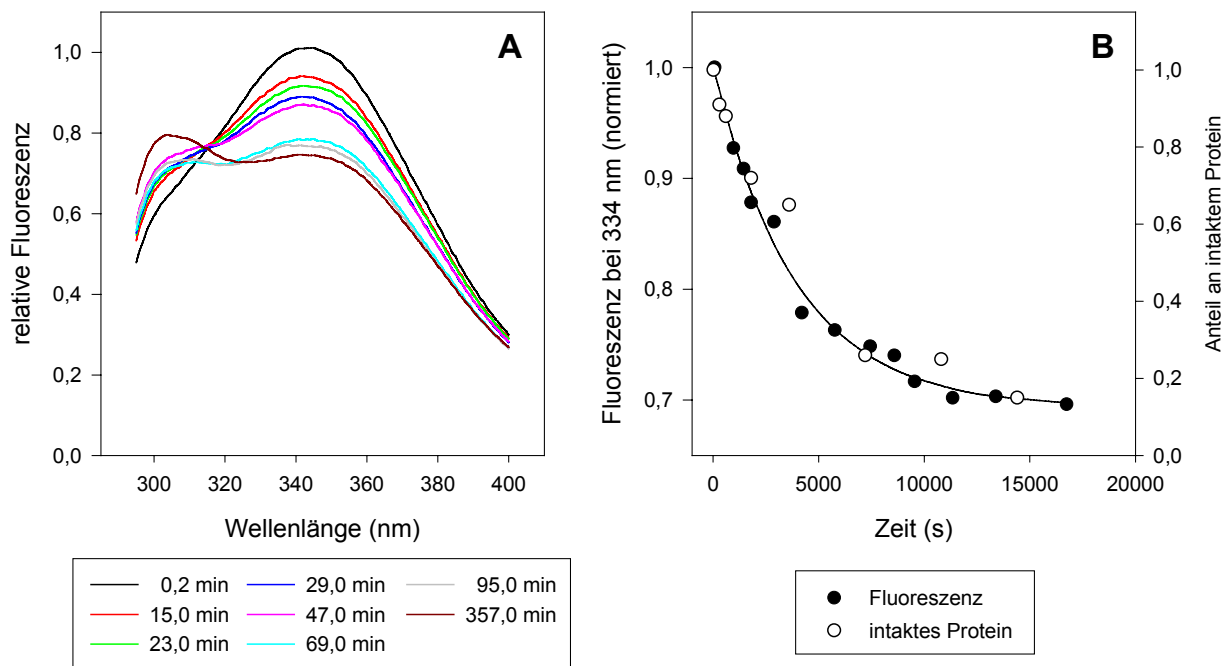
der Mischungstotzeit. Reaktivierung (4.3.5.4.) und Autoproteolyse (nicht gezeigt) waren im Gegensatz dazu deutlich langsamer. Demzufolge wird zuerst eine nativähnliche Struktur gebildet, die sich erst in einem zweiten Schritt zum aktiven Enzym umwandelt. Die Rückfaltung verläuft offensichtlich über ein inaktives Intermediat und die Reaktivierungsmessungen beschreiben die Faltung dieses Intermediats zum nativen Enzym.

Rückfaltungsintermediate werden auch bei anderen Proteasen wie Subtilisin BPN' (Eder *et al.*, 1993) und  $\alpha$ -lytischer Protease (Sohl *et al.*, 1998) gefunden. In beiden Fällen wird ohne die Zugabe des Propeptids schnell ein Intermediat gebildet, das dann sehr langsam oder gar nicht zum nativen Enzym faltet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die Faltung von NPste die Anwesenheit des Propeptids nicht nötig ist. Das belegen auch neuste Untersuchungen zur Renaturierung von NPste aus solubilisierten *inclusion bodies* (Mansfeld *et al.*, 2003).

#### 4.3.5.6. Proteolyseanfälligkeit des Rückfaltungsintermediats

Sollte das hier gefundene Rückfaltungsintermediat mit dem Entfaltungsintermediat identisch sein, so müsste es autoproteolytisch angreifbar sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Rest-GdnHCl-Konzentration im Renaturierungsansatz mit 640 mM so hoch gewählt, dass die Reaktivierung sehr langsam erfolgte. Tatsächlich zeigten die Fluoreszenzspektren die sofortige Bildung des Intermediats (exemplarisch für pWT in Abb. 4-30 A).

Mit fortschreitender Inkubationszeit im Renaturierungsansatz sank die Fluoreszenzintensität bei gleichzeitiger Aufspaltung in die separate Tyrosin- und Tryptophanfluoreszenz (Abb. 4-30 A). Dieser Effekt ist der Autoproteolyse zuzuschreiben, wie eine Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese zeigte (Abb. 4-30 B). Bei 640 mM GdnHCl überwiegt die Autoproteolyse in hohem Maße die Rückfaltung zu N (Abb. 4-28, Insert), und darum wird ein fast vollständiger Abbau beobachtet. Es lässt sich daraus folgern, dass das schnell gebildete Intermediat durch die bereits reaktivierten Moleküle abgebaut wird. Entsprechend sollte die Zugabe von aktivem Enzym zum Renaturierungsansatz den Abbau beschleunigen. Eine solche Beschleunigung wurde für pWT und G8C/N60C auch gefunden (nicht gezeigt).



**Abb. 4-30: Änderungen der Fluoreszenzemissionsspektren während der Rückfaltung von denaturiertem pWT.**

Die Messungen wurden in Standardpuffer (3.1.5.) bei 25°C und einer Proteinkonzentration von 30 µg/ml, wie in (3.2.6.1.) beschrieben, durchgeführt. Die entfalteten Enzyme (5 mg/ml in 8,4 M GdnHCl/Standardpuffer, siehe 3.2.7.2.) wurden in Standardpuffer verdünnt und die Rest-GdnHCl-Konzentration auf 640 mM eingestellt. Die zeitliche Änderung der Fluoreszenzspektren wurde verfolgt. **A**) Emissionsspektren bei 278 nm-Anregung, **B**) Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 334 nm (Anpassung nach [3-5]) und Abnahme der Bande des intakten Proteins nach Analyse in der SDS-Gelelektrophorese (3.2.5.3.).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Rückfaltung über ein Intermediat verläuft, das wahrscheinlich identisch mit dem Entfaltungsintermediat (4.3.4.) ist. Unter den untersuchten Bedingungen wird es innerhalb der Mischungstotzeit gebildet und ist nativähnlich, aggregationsanfällig, inaktiv und proteolyseempfindlich. Die Reaktivierungsmessungen beschreiben den Übergang vom Intermediat zum nativen Enzym. Das native Enzym greift das Intermediat an und baut es ab, wenn es sich nicht schnell genug selbst zum nativen Enzym faltet. Die stattfindende Autoproteolyse und die Aggregation stellen Nebenreaktionen bei der Reaktivierung dar und können die Reaktivierungskonstante beeinflussen. Bei niedrigen GdnHCl-Konzentrationen ist der Autoproteolyseeinfluss gering und die Entfaltung zu ca. 50% reversibel. Die Reaktivierung und Faltung von G8C/N60C ist

in Abwesenheit von GdnHCl 10-mal langsamer als für pWT. Die Disulfidbrücke stabilisiert damit entweder das Intermediat oder destabilisiert den Übergangszustand der Reaktivierung.

#### **4.3.6. Zusammenfassende Diskussion: Gdn-induzierte Entfaltung von pWT und der Einfluss der Disulfidbrücke in G8C/N60C auf lokale und globale Strukturänderungen**

Um Rückschlüsse auf den Stabilisierungsmechanismus der eingeführten Disulfidbrücke zu erhalten, muss zum Vergleich der Stabilität von pWT und G8C/N60C die strukturelle Entfaltung der Proteasen untersucht werden. Im Folgenden soll zuerst die GdnHCl-induzierte Entfaltung von pWT betrachtet werden und nachfolgend das Verhalten von G8C/N60C und W55F.

##### 4.3.6.1. Entfaltung und Autoproteolyse von pWT

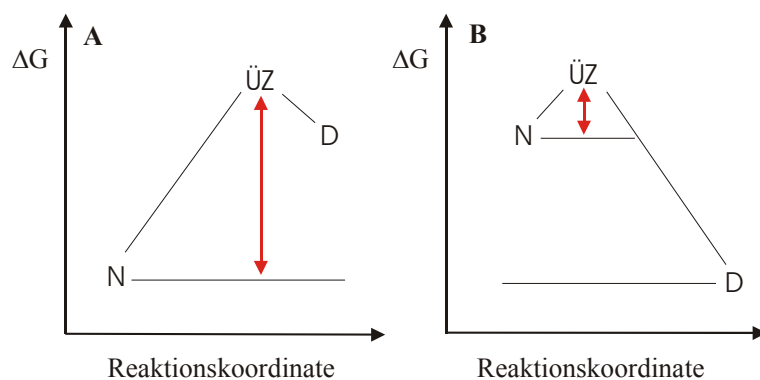
###### Entfaltung von pWT

Entfaltungsstudien von recht unspezifischen Proteasen gestalten sich wegen der auftretenden Autoproteolyse schwierig. Unter stark GdnHCl-denaturierenden Bedingungen kommt es zu keiner Autoproteolyse (Abb. 4-12 B) und somit ist der vollständig entfaltete Zustand zugänglich. Für pWT fallen in diesem Bereich (um 7,5 M GdnHCl) die Geschwindigkeitskonstanten der Sekundärstrukturentfaltung (gemessen über das CD-Signal im fernen UV-Bereich) mit dem der Tertiärstrukturentfaltung (gemessen über das Fluoreszenz-Signal) zusammen (Abb. 4-18) und zeigen eine kooperative Entfaltung von Sekundär- und Tertiärstruktur (globale Entfaltung) an (Abb. 4-18).

Bei GdnHCl-Konzentrationen  $< 7,5$  M tritt zunehmend Autoproteolyse ein und der Entfaltungsgast in der Chevron-Auftragung weicht von der Linearität, die bei höheren GdnHCl-Konzentrationen beobachtet wird, ab (Abb. 4-18). Entsprechend dem einfachen Zweizustandsmodell [2-1] sollte der Entfaltungsgast in der Chevron-Auftragung eine lineare Abhängigkeit beschreiben (Abb. 2-2). Auch die auftretende Autoproteolyse sollte zu keiner Verschiebung führen, da sie nur eine der Entfaltung nachgeschaltete Reaktion darstellt und die Entfaltung per se nicht beschleunigen kann. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von pWT zeigen aber ein nichtlineares Verhalten in der Chevron-Auftragung und sind bei mittleren GdnHCl-Konzentrationen schneller als

erwartet (Abb. 4-18). Solche Nichtlinearitäten können i) mit dem Auftreten eines Intermediats neben N und D (Sauder *et al.*, 1996; Zaidi *et al.*, 1997; Bhuyan & Udgaonkar, 1998) bzw. Reststrukturen in D (Sanchez & Kiefhaber, 2003) oder ii) mit Hammond-Verhalten des Übergangszustandes (Matouschek & Fersht, 1993; Matouschek *et al.*, 1995; Jonsson *et al.*, 1996; Dalby *et al.*, 1998) erklärt werden. Das Auftreten solcher Grundzustands- bzw. Übergangszustandseffekte für pWT soll nachfolgend betrachtet werden:

Ein **Intermediat** könnte z.B. ein lokal entfalteter Zustand sein. Wie bei RNase A könnte aber die Nichtlinearität in der Chevron-Auftragung auch auf *cis-trans*-Prolinisomerisierung zurückgeführt werden (Kiefhaber *et al.*, 1992; Juminaga *et al.*, 1998). Von den 8 Prolinen (Titani *et al.*, 1972) in Thermolysin befindet sich Pro51 in der *cis*-Konfiguration (Holmes & Matthews, 1982). Dieses Prolin ist auch in NPste vorhanden (Takagi *et al.*, 1985). Grundsätzlich wäre ein Einfluss auf das benachbarte Trp55 denkbar. Wenn darin allerdings die Ursache für das Abknicken in der Chevron-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten zu suchen wäre, sollte W55F diesen Effekt nicht zeigen, da diese Enzymvariante das Trp55 nicht besitzt. W55F zeigt aber sogar die am stärksten ausgeprägte Nichtlinearität (Abb. 4-18).



**Abb. 4-31: Hypothetische Energieprofile für eine Entfaltungs-/Faltungsreaktion.**

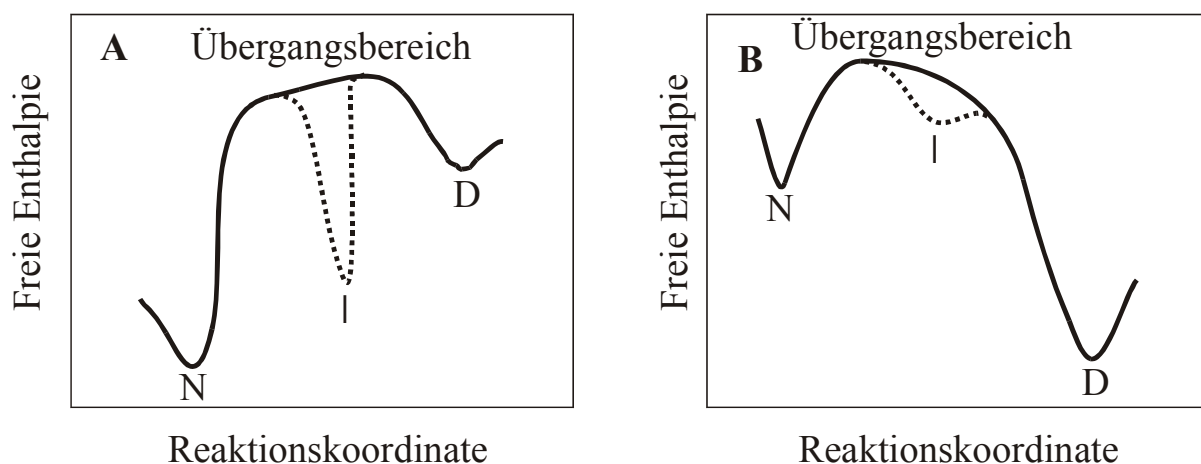
Unter Faltungsbedingungen (A) erscheint der Übergangszustand spät auf der Reaktionskoordinate und ist nach dem Hammond-Postulat dem entfalteten Zustand ähnlich. Umgekehrt erscheint der

Übergangszustand unter Entfaltungsbedingungen (B) zeitig (früh) in der Reaktionsabfolge und ist nativähnlich. Die roten Pfeile geben die freie Aktivierungsenthalpie an, die die beobachtete Geschwindigkeitskonstante bestimmt.

Das **Hammond-Verhalten** bezeichnet die Änderung der Struktur des Übergangszustandes in Abhängigkeit der Denaturanzkonzentration (Silow & Oliveberg, 1997). Der Übergangszustand der Proteinfaltung (Chan & Dill, 1998; Oliveberg *et al.*, 1998) bzw. Proteinentfaltung (Otzen *et al.*, 1999) wird dann nicht als definierter Zustand, sondern als breite, zerklüftete Energiebarriere beschrieben. Die Betrachtung der Struktur des Übergangszustandes wurde bereits allgemein von Hammond (1955) für das Abschätzen von Geschwindigkeiten für

chemische Reaktionen formuliert. Das Hammond-Postulat besagt, dass der Übergangszustand einer Reaktion dem energiereichsten Zustand der Reaktionssequenz strukturell ähnlich ist. Da sich das Energieprofil während der Entfaltung ändert (Abb. 4-31), verschiebt sich damit auch der Übergangszustand mit steigender Denaturanzkonzentration von einem späten zu einem frühen, nativähnlichen Zustand (Matouschek *et al.*, 1994; Jonsson *et al.*, 1996).

Ob Nichtlinearitäten in Chevron-Auftragungen durch das Auftreten von Intermediaten oder durch Hammond-Verhalten des Übergangszustandes hervorgerufen werden, ist schwer zu differenzieren (Otzen *et al.*, 1999). Energetisch unterscheiden sich beide Fälle nur dadurch, dass im zerklüfteten Übergangsbereich ein mehr oder weniger ausgeprägtes lokales Energieminimum existiert (Abb. 4-32). Clarke & Fersht (1993) umgehen diese Differenzierung, indem sie den Übergangszustand im Reaktionsschema wie einen separaten Gleichgewichtszustand behandeln.



**Abb. 4-32: Hypothetische Energieprofile für die Entfaltungs-/Rückfaltungsreaktion mit Hammond-Verhalten des Übergangszustandes bzw. einem Intermediat.**

In Abhängigkeit der Entfaltungsbedingungen ändert sich die Struktur des Übergangszustandes. Die Gesamtheit aller Einzelstrukturen bildet den Übergangsbereich. Lokale Energieminima im Übergangsbereich führen zu Intermediaten, die akkumuliert werden, wenn sie eine genügend energiearme Struktur darstellen. In der Darstellung würde unter Rückfaltungsbedingungen (A) das Intermediat akkumuliert, aber unter Entfaltungsbedingungen (B) nicht. Die Darstellungen wurden in Anlehnung an Sanchez & Kiefhaber (2003) erstellt.

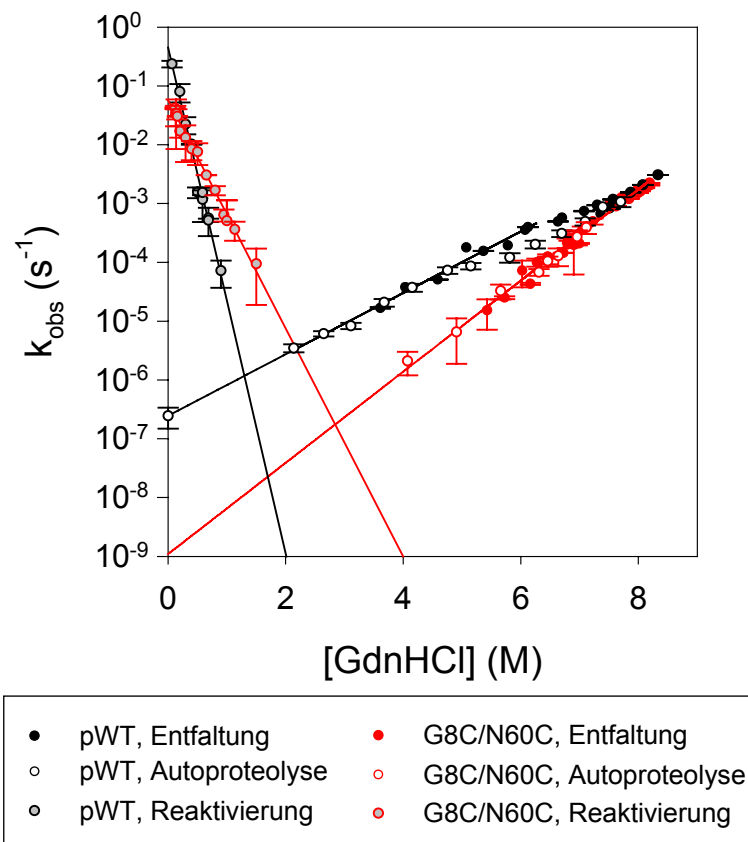
Obwohl Hammond-Verhalten des Übergangszustandes nicht ausgeschlossen werden kann, wird vorgeschlagen, dass die Entfaltung von pWT in GdnHCl über ein Intermediat verläuft, weil zum einen während der Entfaltung von Multidomänenproteinen jede Domäne separat entfalten kann und auf diese Weise teilentfaltete Zustände auftreten können (Jaenicke, 1999)

und weil zum anderen für das strukturverwandte Thermolysin - anhand von Stabilitätsuntersuchungen an Thermolysinfragmenten - ebenfalls eine mehrstufige, domänenweise Entfaltung vorgeschlagen wird (Corbett *et al.*, 1986).

Die Detektion dieses Intermediats erfolgte nur in dem Bereich, in dem auch Autoproteolyse beobachtet wurde und führt zu der Vermutung, dass eine enge Verbindung zwischen Autoproteolyse und dem Auftreten des Intermediats besteht. Darum wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung mit denen der Autoproteolyse verglichen (Abb. 4-33).

#### Autoproteolyse von pWT

Bis 5,0 M GdnHCl fallen für pWT Entfaltung und Autoproteolyse zusammen (Abb. 4-33). Da die Geschwindigkeitskonstante der Autoproteolyse unter diesen Bedingungen von der Enzymkonzentration im Bereich von 5-100  $\mu\text{g/ml}$  unabhängig ist (4.3.3.1.), muss die Entfaltungsgeschwindigkeit limitierend sein. Sollte unter diesen Bedingungen ein Intermediat durchlaufen werden, so zeigen demnach die kinetischen Messungen der Entfaltung und Autoproteolyse die Entfaltung dieses Intermediats an.



**Abb. 4-33: Chevron-Auftragung für die GdnHCl-induzierte Entfaltung, Autoproteolyse und Reaktivierung von pWT und G8C/N60C in 5 mM  $\text{CaCl}_2$ .**

Die Daten sind aus Abb. 4-14, 4-18 und 4-28 übernommen. Für die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und Autoproteolyse bis ca. 7,5 M GdnHCl wurden die Daten, die bei einer Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  gewonnen wurden, zugrunde gelegt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung wurden über die Reaktivierung der Enzyme nach Rücksprung aus 8,0 M GdnHCl bei 40-100 ng/ml Enzym ermittelt.

Bei GdnHCl-Konzentrationen  $> 5,0$  M wird die Autoproteolysegeschwindigkeit abhängig von der Enzymkonzentration (4.3.3.1.). Für die weitere Auswertung wurden deshalb nur die Geschwindigkeitskonstanten der Autoproteolyse für  $< 5,0$  M GdnHCl verwendet, die Pseudo-1. Ordnungskonstanten darstellen. Die Änderung der Reaktionsordnung der Autoproteolyse bei Erhöhung der GdnHCl-Konzentration äußert sich in einer Abweichung von der Linearität in der Chevron-Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Autoproteolyse (Abb. 4-14).

In dem Maße, wie der Einfluss der Autoproteolyse mit steigender GdnHCl-Konzentration oder durch Zugabe von Isopropanol als Inhibitor abnahm, verringerte sich auch die mittels Fluoreszenzmessung beobachtete Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung und näherte sich der Geschwindigkeitskonstanten der globalen Entfaltung an (Abb. 4-22, A). Es ist darum anzunehmen, dass die Zugabe von Isopropanol entweder die Bildung bzw. Entfaltung des Intermediats einschränkt oder die Detektion des Intermediats durch die Autoproteolyse erst möglich wird, wenn sie als „Signalverstärker“ wirkt und Strukturänderungen erst sichtbar macht, die mit spektroskopischen Methoden kaum oder gar nicht detektiert werden können. So könnten Fluktuationen in der Struktur des gefalteten Proteins zu lokalen Entfaltungsereignissen (Kim & Baldwin, 1990) und einem proteolytisch angreifbaren Zustand führen, dessen Autoproteolyse dann detektiert wird. Die Autoproteolyse könnte so genutzt werden, um lokale Entfaltungen sichtbar zu machen, was ebenfalls für die HIV-Protease beschrieben wurde (Panchal *et al.*, 2001). Erst wenn die Autoproteolyse zu langsam und das Intermediat nicht mehr abgebaut wird, kann es zum vollständig denaturierten Zustand weiterentfalten. Oder es wird möglicherweise unter stark denaturierenden Bedingungen gar nicht mehr durchlaufen (Abb. 4-32 B) und die globale Entfaltung des nativen Enzyms folgt dann dem Zwei-Zustandsmodell [2-1]. Derartige Änderungen in der Reaktionsabfolge sind von der energetischen Lage von N, I und D, sowie deren Übergangszuständen abhängig (Bachmann & Kiefhaber, 2001).

Die Beobachtung, dass das Intermediat erst durch die Autoproteolyse sichtbar wird, stellt einen deutlichen Unterschied zur reinen Domänenentfaltung dar, denn diese sollte unabhängig von der Autoproteolyse spektroskopisch sichtbar sein.

Zusammenfassend könnte die vermutete lokale Entfaltung oder Fluktuation in der Proteinstruktur, die das Intermediat charakterisiert, auf eine labile Stelle im nativen Enzym im Sinne einer Entfaltungsregion (2.2.3.) hinweisen. Die Kalziumabhängigkeit der



Proteinstabilität (4.3.4.2.) kann helfen, die Lage dieser potentiellen Entfaltungsregion im Proteinmolekül zu bestimmen.

#### Kalziumabhängigkeit der Entfaltung von pWT

Die Nichtlinearität in der Chevron-Auftragung wird um so ausgeprägter, je weniger Kalziumionen in Lösung vorhanden sind (Abb. 4-19). Die Erhöhung der Kalziumkonzentration bewirkt eine Stabilisierung, da wahrscheinlich lokale Fluktuationen oder Entfaltungsprozesse unterbunden werden. Eine Analyse der Kalziumbindung (Abb. 4-20) zeigte, dass in Gegenwart von 5,0 M GdnHCl – also unter Bedingungen, unter denen das Intermediat durchlaufen und durch Autoproteolyse vollständig abgebaut wird – drei der vier Kalziumbindungsstellen an der Stabilisierung beteiligt sind (Abb. 4-20 A), während die vierte Kalziumbindungsstelle auch ohne zugesetztes  $\text{CaCl}_2$  immer besetzt bleibt (4.3.4.2.). Ein Vergleich der Kalziumbindung von pWT mit W55F (Insert in Abb. 4-20 B) zeigte, dass offensichtlich die Kalziumbindungsstelle III (Abb. 4-1) am schwächsten affin ist und erst ab ca. 2 mM  $\text{CaCl}_2$  besetzt wird. Die Besetzung dieser Kalziumbindungsstelle ist auch für die Thermostabilität von NPste (Veltman *et al.*, 1998) und damit für die Temperatur-induzierte Autoproteolyse als Ursache der Thermoinaktivierung (4.2.2.) entscheidend.

Aus dieser Kalziumabhängigkeit der Entfaltung und aus Hinweisen auf eine primäre Spaltstelle bei Phe62 (4.3.5.2.) kann geschlossen werden, dass die Besetzung der Kalziumbindungsstelle III, die sonst labile Region 56-69 stabilisiert und so vor Autoproteolyse schützt. Die verminderte Kalziumaffinität von W55F (Abb. 4-20, Insert) führt demzufolge zur Akkumulation des Intermediats und damit zu der ausgeprägten Abweichung von der Linearität in der Chevron-Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 4-18).

#### 4.3.6.2. Entfaltung und Autoproteolyse von G8C/N60C

Für **G8C/N60C** zeigt die Darstellung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (Abb. 4-18) und Autoproteolyse (Abb. 4-14) in der Chevron-Auftragung eine lineare Abhängigkeit unter Standardbedingungen bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Erst bei niedrigeren Kalziumkonzentrationen (2 mM) ist auch für G8C/N60C eine Nichtlinearität zu beobachten (Abb. 4-19). Die Einführung der Disulfidbrücke zwischen den Positionen 8 und 60 führt also, ähnlich wie die Besetzung der Kalziumbindungsstelle III (Abb. 4-1), zu einer erhöhten Basisstabilität in dieser Region, die eine lokale Entfaltung und damit das Auftreten des Intermediats einschränkt. Dass Disulfidbrücken einen ähnlich stabilisierenden Effekt wie

Kalziumionen ausüben, wurde durch Stabilitätsmessungen bei vielen Proteinen gefunden (Pace, 1990; Almog *et al.*, 2002; Ikegaya *et al.*, 2003). Die erhöhte Rigidität führt zu einer Stabilisierung von G8C/N60C. Eine rigide Struktur ist besonders für Proteasen wichtig und stellt einen Autoproteolyseschutz und einen Schutz vor der Proteolyse durch andere Proteasen dar (Jaswal *et al.*, 2002).

#### 4.3.6.3. Vergleich und Schlussfolgerungen aus der Entfaltung von pWT und G8C/N60C

Bei hohen GdnHCl-Konzentrationen verschwinden die Unterschiede in den Entfaltungsgeschwindigkeiten von pWT und G8C/N60C (Abb. 4-18), was zeigt, dass die potentielle Entfaltungsregion 56-69 nur einen Einfluss auf die lokale, aber nicht auf die globale Entfaltung hat. Unter Bedingungen, die durch vorherige lokale Entfaltung zur Autoproteolyse führen, ist die Disulfidbrücke deshalb so stabilisierend, weil sie den Initialschritt der Entfaltung beeinflusst (eine früh entfaltende bzw. spät faltende Region nach Clarke & Fersht (1993), Laity *et al.* (1999) und Wedemeyer *et al.* (2000)).

Zusammenfassend wird vorgeschlagen, dass die Entfaltung der hier untersuchten Proteasen in GdnHCl über ein proteolyseanfälliges Intermediat verläuft. Es ist durch Fluktuationen oder eine lokale Entfaltung in der *Loop*-Region 56-69 charakterisiert, wie es bereits für die Thermoaktivierung von NPste diskutiert wurde (Eijsink *et al.*, 1992b; Mansfeld *et al.*, 1997; Mansfeld *et al.*, 1999; Mansfeld & Ulbrich-Hofmann, 2000). Die erhöhte Dynamik in dieser Region führt zur Autoproteolyse, die diese Strukturänderungen wahrscheinlich erst sichtbar macht. Die Besetzung der Kalziumbindungsstelle III bzw. die Disulfidbrücke in G8C/N60C führen zu einer Versteifung der potentiellen Entfaltungsregion und verhindern somit die vorzeitige Inaktivierung durch die Autoproteolyse.

Bei anderen Proteinen treten strukturell ähnliche Intermediate auf. Beispielsweise wurde für Barnase als Initialschritt der Entfaltung eine erhöhte Flexibilität eines großen *Loops* gefunden (Matouschek *et al.*, 1989). Meist sind diese Intermediate aber aufgrund der fehlenden Autoproteolyse nicht sichtbar.

#### 4.3.6.4. Rückfaltung von pWT und G8C/N60C und der stabilisierende Einfluss der Disulfidbrücke in G8C/N60C auf die Thermodynamik der Entfaltung

Eine **Reaktivierung** der vollständig entfalteten Enzyme war ohne Zusatz von Propeptid möglich (4.3.5.3.). Für die Faltung von Thermolysin (Marie-Claire *et al.*, 1999), Subtilisin BPN' (Ikemura *et al.*, 1987; Strausberg *et al.*, 1993) und  $\alpha$ -lytischer Protease (Baker *et al.*, 1992; Jaswal *et al.*, 2002) wird ein entscheidender Einfluss des Propeptids für die Rückfaltung und Reaktivierung diskutiert. Der Einfluss des Propeptids für die Rückfaltung wurde in der vorliegenden Arbeit zwar nicht untersucht, die Ergebnisse zeigen aber, dass der Zusatz von Propeptid nicht in jedem Fall für eine Rückfaltung nötig sein muss. Allerdings lagen die Maximalausbeuten nur bei 50-70%, so dass mit weiteren Nebenreaktionen zu rechnen ist. Die hier durchgeführte Quantifizierung der Rückfaltung mittels der Reaktivierung ist deshalb entsprechend vorsichtig zu werten.

Auch die Rückfaltung verläuft über ein Intermediat (4.3.5.5.). Es ist anzunehmen, dass dieses Faltungsintermediat identisch mit dem Entfaltungsintermediat ist, da beide autoproteolytisch angreifbar sind.

**Tab. 4-5: Kinetische und thermodynamische Parameter der GdnHCl-induzierten Entfaltung von pWT und G8C/N6C in Gegenwart von 5 mM CaCl<sub>2</sub>.**

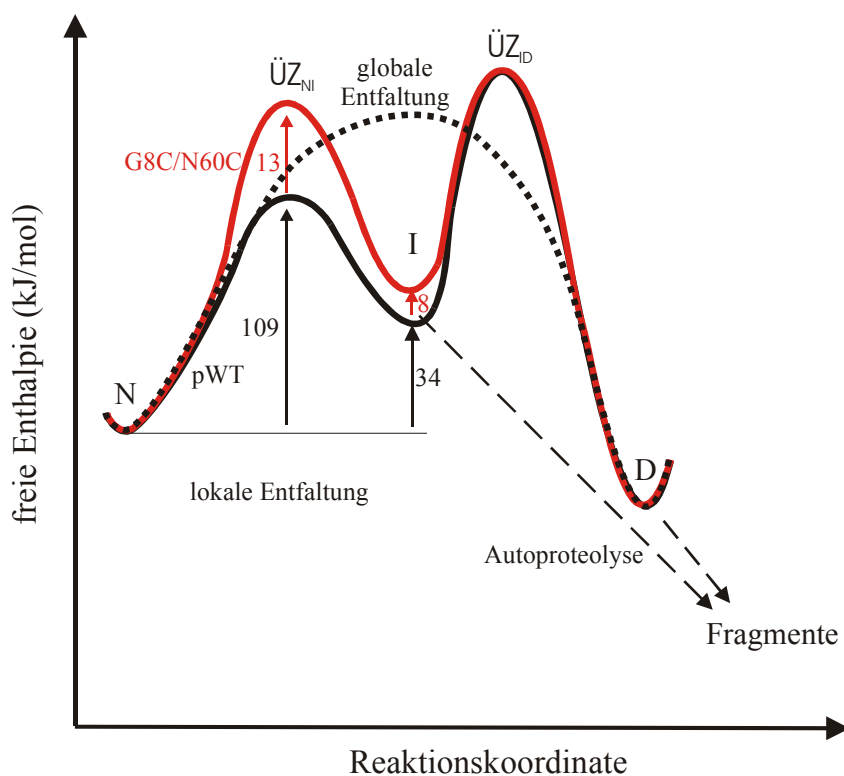
Die Angaben wurden aus den Daten von Abb. 4-33 mit [2-5] und [2-8] ermittelt. Dabei bedeuten  $m_u/RT$  und  $m_f/RT$  die Anstiege  $\partial \ln(k_{\text{obs}})/\partial [\text{GdnHCl}]$  für die Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsreaktion im Chevron-Diagramm und  $[D]_{0,5}$  die GdnHCl-Konzentration am Übergangsmittelpunkt. Die Teilreaktionen der Bildung des Intermediates und dessen Rückfaltung sind beschrieben. Für pWT wurden nur die Messungen bis 5,0 M GdnHCl verwendet, da dann eine Pseudo-1. Ordnungskinetik vorliegt.

| Variante | $m_u/RT$<br>(M <sup>-1</sup> ) | $m_f/RT$<br>(M <sup>-1</sup> ) | $\Delta G^{0\#}_U$<br>(kJ/mol) | $\Delta G^{0\#}_F$<br>(kJ/mol) | $[D]_{0,5}$<br>(M) | $\Delta G^{0}_{eq}$<br>(kJ/mol) |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Reaktion | N→I                            | I→N                            | N→I                            | I→N                            | N⇌I                | N⇌I                             |
| pWT      | 1,203                          | -9,897                         | 108,80                         | 74,97                          | 1,28               | 33,83                           |
| G8C/N60C | 1,785                          | -4,467                         | 121,99                         | 80,07                          | 2,84               | 41,92                           |

Die Reaktivierung beschreibt den Übergang von I zu N (4.3.5.5.) und die Entfaltungsmessungen unter Bedingungen maximaler Autoproteolyse den Übergang von N zu I (4.3.6.1.). Mit Rücksicht auf die angesprochenen Einschränkungen (keine vollständige Reversibilität, Faltungs- und Entfaltungsweg als gleich angenommen) kann mit den

Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung und der Entfaltung das komplette Chevron-Diagramm für die gegenseitige Umwandlung von N und I in Gegenwart von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  konstruiert werden (Abb. 4-33). Die daraus ermittelten freien Aktivierungsenthalpien sind in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Aus der freien Aktivierungsenthalpie der Entfaltung und Rückfaltung kann mit [2-5] die thermodynamische freie Enthalpie des Entfaltungs-/Rückfaltungsgleichgewichts errechnet werden.

Aus Tab. 4-5 kann das Energieprofil der Entfaltung von pWT und G8C/N60C unter der Annahme, dass der Energiegehalt beider Enzyme im Nativzustand annähernd gleich ist, konstruiert werden (Abb. 4-34). Dies kann angenommen werden, da Disulfidbrücken hauptsächlich den Übergangszustand beeinflussen (Wedemeyer *et al.*, 2000) und die geringen strukturellen Änderungen zwischen pWT und G8C/N60C (4.1.2. und 4.1.5.) im nativen Zustand keine großen energetischen Unterschiede hervorrufen sollten. Der Übergangszustand von I nach D ( $\ddot{U}Z_{ID}$ ) ist experimentell nicht zugänglich. Wahrscheinlich wird I nur durch die Autoproteolyse sichtbar. Wird sie durch Isopropanolzusatz unterbunden, so verläuft die Entfaltung entlang der globalen Route (Abb. 4-22). Demnach bringt das Durchlaufen des Intermediats keinen energetisch günstigeren Weg von N nach D, und  $\ddot{U}Z_{ID}$  muss energetisch höher liegen als der Übergangszustand der globalen Entfaltung. Es kann weder eine Aussage über den Energiegehalt von  $\ddot{U}Z_{ID}$  getroffen werden, noch kann entschieden werden, ob die Disulfidbrücke einen Einfluss darauf hat.



**Abb. 4-34: Energieschema der GdnHCl-induzierten Entfaltung von pWT und G8C/N60C in 5 mM  $\text{CaCl}_2$ .** Die Daten aus Tab. 4-5 wurden zugrunde gelegt. Alle Zahlenwerte beziehen sich auf die Änderung der freien Enthalpie in kJ/mol und sind abhängig von der Kalziumkonzentration. I und D können autoproteolytisch abgebaut werden (enzymkonzentrationsabhängig).

Wie Abb. 4-34 zeigt, wird durch die Einführung der Disulfidbrücke der Übergangszustand der lokalen Entfaltung  $\ddot{U}Z_{NI}$  energetisch ungünstiger, so dass der Weg über die globale Entfaltung eingeschlagen wird. Gleichzeitig kann damit das Phänomen des nicht additiven Verhaltens von einzelnen Stabilisierungseffekten (Vriend *et al.*, 1998) erklärt werden. Weil nach erfolgter Stabilisierung einer bestimmten Strukturregion die Entfaltung dann global oder über eine andere kritische Region verläuft, hat eine weitere Stabilisierung in derselben Region keine Effekte mehr zur Folge.

Die thermodynamische Stabilität von I ist relativ gering (Tab. 4-5, Abb. 4-34). Die hohe Stabilität der Proteasen wird deshalb durch die sehr langsame Entfaltung bestimmt. NPste ist deshalb thermodynamisch relativ instabil, aber kinetisch sehr stabil, und aufgrund der Autoproteolyse spielt die kinetische Stabilität die entscheidende Rolle.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Entfaltung und Autoproteolyse von punktmutierten Enzymvarianten der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* mit dem Ziel untersucht, den Einfluss der lokalen Strukturregion 56-69 auf das Stabilitätsverhalten zu ermitteln. Dazu wurden zwei Enzymvarianten verglichen, die sich durch eine Disulfidbrücke in der zu untersuchenden Strukturregion unterscheiden: die cysteinfreie Variante C288L (pWT) und die auf Basis von pWT erzeugte Enzymvariante G8C/N60C, die spontan eine Disulfidbrücke zwischen den Positionen 8 und 60 ausbildet. G8C/N60C zeigt eine extreme Steigerung der Halbwertszeit gegenüber Thermoinaktivierung, was zu der Vermutung führte, dass die *Loop*-Region, die durch die eingeführte Disulfidbrücke fixiert wurde, einen entscheidenden Einfluss auf das Inaktivierungsverhalten hat und eine labile Stelle im Proteinmolekül darstellt, an der die Entfaltung beginnt. Bei unspezifischen Proteasen wird die Entfaltung durch eine intensive Autoproteolyse begleitet, die zu einer irreversiblen Denaturierung führt. Zur Analyse des stabilisierenden Einflusses der Disulfidbrücke wurden deshalb neben der Inaktivierung sowohl die Entfaltung (mittels Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie) als auch die Autoproteolyse (mittels Gelelektrophorese) für die Temperatur- und GdnHCl-induzierte Denaturierung untersucht.

Wie die CD- und Fluoreszenzspektren sowie die unveränderte spezifische Aktivität zeigen, erzeugt die Einführung der Disulfidbrücke keine bedeutenden Spannungen und Deformationen im Protein, führt aber durch Einschränkung der Flexibilität zu einer leicht kompakteren Struktur, was aus *Quench*-Experimenten mit Acrylamid geschlussfolgert wurde.

Es konnte gezeigt werden, dass die Thermoinaktivierung ausschließlich durch die Autoproteolyse hervorgerufen wird und diese bei Verwendung geringer Enzymkonzentrationen zurückgedrängt, aber nicht vollständig unterbunden werden kann. Bei Enzymkonzentrationen von 5 µg/ml ist für pWT und G8C/N60C die Autoproteolyse langsamer als die Entfaltung. Damit existiert ein schnelleres Entfaltungsgleichgewicht vor dem irreversiblen Autoproteolyseschritt.

Die thermische Entfaltung war unter allen Bedingungen von Autoproteolyse begleitet. Im Gegensatz dazu kommt es bei hohen GdnHCl-Konzentrationen (ca. 8,0 M) zu keinem autoproteolytischen Abbau, und die Entfaltung kann ohne Überlagerung durch nachfolgende Autoproteolyse gemessen werden. Die Disulfidbrücke hat auf die bei hohen GdnHCl-Konzentrationen stattfindende globale Entfaltung keinen Einfluss. Ein Einfluss der

Disulfidbrücke auf die Entfaltung und Autoproteolyse zeigt sich aber bei niedrigeren GdnHCl-Konzentrationen. Aus der nichtlinearen Abhängigkeit der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung und Autoproteolyse von der GdnHCl-Konzentration wurde geschlossen, dass hier die Entfaltung über ein autoproteolyseanfälliges Intermediat verläuft, dessen Auftreten durch die eingeführte Disulfidbrücke und ebenso durch eine erhöhte  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration vermindert wird. Dieses Intermediat wird durch eine lokal in der *Loop*-Region 56-69 erhöhte Fluktuation charakterisiert bzw. stellt eine teilentfaltete Spezies dar. Kalziumionen modulieren die Stabilität der Enzyme über fünf Größenordnungen und die Besetzung der vier Bindungsstellen ist entscheidend für die hohe Stabilität der Enzyme. Die am schwächsten affine Kalziumbindungsstelle III stellt unter den Versuchsbedingungen bei 5 mM  $\text{CaCl}_2$  die kritische Region dar, an der die Entfaltung beginnt. Die der lokalen Entfaltung nachfolgende Autoproteolyse macht möglicherweise diese lokale Entfaltung erst sichtbar. Unter Entfaltungsbedingungen war kein Einfluss der Autoproteolyse auf die Entfaltungskinetik erwartet worden, weil die Autoproteolyse nur eine der Entfaltung nachgeschaltete Reaktion darstellt, die die Entfaltung nicht beschleunigen kann. Durch das Auftreten des autoproteolyseanfälligen Entfaltungsintermediats kam es jedoch zu einer Beschleunigung der Entfaltung und Inaktivierung, die durch Zugabe von Isopropanol als Inhibitor verringert werden konnte. Es wird vermutet, dass lokale Entfaltungsprozesse bei vielen Proteinen vor der globalen Entfaltung eintreten und besonders bei Proteasen zur vorzeitigen Inaktivierung durch Autoproteolyse führen. Die Verhinderung dieser lokalen Entfaltungen stellt damit ein großes Potential für die Proteinstabilisierung dar.

Überraschenderweise war eine Renaturierung der vollständig entfalteten Enzyme ohne Zusatz von Propeptid möglich. Die Rückfaltung verlief ebenfalls über ein Intermediat, das erst in einem zweiten Schritt zum aktiven Enzym faltete. Aufgrund der spektralen Eigenschaften und der Autoproteolyseanfälligkeit wurden Entfaltungs- und Rückfaltungsintermediat als identisch angesehen. Durch Analyse der Entfaltungs- und Reaktivierungskinetik war es möglich, die freie Enthalpie des Entfaltungsgleichgewichts  $\Delta G_{\text{eq}}$  für den reversiblen Entfaltungsschritt, der zum Intermediat führt, anzugeben. Es zeigte sich, dass die Enzyme in GdnHCl nur mäßig thermodynamisch stabil sind, aber eine sehr hohe kinetische Stabilität besitzen. Von 0 bis ca. 7 M GdnHCl wird das Stabilitätsverhalten der Enzyme durch das Auftreten des Intermediats bestimmt, das zur Autoproteolyse führt, bevor die globale Entfaltung einsetzen kann. Bei höheren GdnHCl-Konzentrationen wird das Intermediat möglicherweise nicht mehr durchlaufen und die Entfaltung verläuft global.

Ein Vergleich der thermischen Entfaltung und Autoproteolyse von pWT und G8C/N60C zeigte, dass der Übergangszustand der Entfaltung entropisch und der der Autoproteolyse enthalpisch durch die Disulfidbrücke beeinflusst wird. Die gesteigerte Thermostabilität von G8C/N60C resultiert somit aus einer verminderten Entfaltung, wobei ein zusätzlicher Einfluss der Disulfidbrücke in G8C/N60C auf die Autoproteolyse zu vermuten ist, da die Übergangszustände von Autoproteolyse und Entfaltung nicht gleichartig enthalpisch oder entropisch destabilisiert werden.

Die Ergebnisse der GdnHCl-induzierten und der Temperatur-induzierten Denaturierung sind weitgehend getrennt zu betrachten. Sie zeigen aber, dass die Region 56-69 sowohl bei thermischer als auch bei chemischer Denaturierung eine kritische Stelle im Proteinmolekül darstellt, deren Stabilisierung das Enzym vor Entfaltung und Inaktivierung durch Autoproteolyse schützt.



## 6. Literaturverzeichnis

- Abraham, L.D. and Breuil, C. (1995) Factors affecting autolysis of a subtilisin-like serine proteinase secreted by *Ophiostoma piceae* and identification of the cleavage site. *Biochim Biophys Acta*, **1245**, 76-84.
- Ahern, T.J. and Klibanov, A.M. (1985) The mechanisms of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, **228**, 1280-1284.
- Ahern, T.J. and Klibanov, A.M. (1988) Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes. *Methods Biochem Anal*, **33**, 91-127.
- Alam, M.N., Tadasa, K., Maeda, T. and Kayahara, H. (1997a) Correlation of inhibition of thermolysin by water-miscible alcoholic solvents with their physicochemical parameters and the status of monoalcoholic character of water in the peptide synthesis of Z-Phe-Phe-OMe in water organic one-phase reaction system. *Biotechnol Lett*, **19**, 1129-1133.
- Alam, M.N., Tadasa, K., Maeda, T. and Kayahara, H. (1997b) Kinetics of inhibition of thermolysin-catalyzed peptide synthesis by alcohols in aqueous organic one-phase system. *Biotechnol Lett*, **19**, 563-568.
- Alber, T. (1989) Mutational effects on protein stability. *Annu Rev Biochem*, **58**, 765-798.
- Almog, O., Gallagher, D.T., Ladner, J.E., Strausberg, S., Alexander, P., Bryan, P. and Gilliland, G.L. (2002) Structural basis of thermostability. Analysis of stabilizing mutations in subtilisin BPN'. *J Biol Chem*, **277**, 27553-27558.
- Andersson, D., Freskgard, P.O., Jonsson, B.H. and Carlsson, U. (1997) Formation of local native-like tertiary structures in the slow refolding reaction of human carbonic anhydrase II as monitored by circular dichroism on tryptophan mutants. *Biochemistry*, **36**, 4623-4630.
- Antonov, V.K., Vorotyntseva, T.I. and Kogan, G.A. (1970) Kinetics of irreversible thermal denaturation of chymotrypsin. Comparative stability of the protein molecule and its adsorption site. *Molekulyarnaya Biologiya*, **4**, 240-245.
- Arnold, F.H. (1998) Enzyme engineering reaches the boiling point [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2035-2036.
- Arnold, F.H. (2001) Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design. *Nature*, **409**, 253-257.
- Arnold, U., Rücknagel, K.P., Schierhorn, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (1996) Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *Eur J Biochem*, **237**, 862-869.
- Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (2000) Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride. *J Prot Chem*, **19**, 345-352.
- Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (2001) Proteolytic degradation of ribonuclease A in the pretransition region of thermally and urea-induced unfolding. *Eur J Biochem*, **268**, 93-97.
- Atsuo, A. (1993) New protease. Patentnummer JP5146292, Japan.
- Auld, D.S. (1995) Removal and replacement of metal ions in metallopeptidases. *Methods Enzymol*, **248**, 228-242.
- Bachmann, A. and Kiefhaber, T. (2001) Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J Mol Biol*, **306**, 375-386.
- Bae, K.H., Jang, J.S., Park, K.S., Lee, S.H. and Byun, S.M. (1995) Improvement of thermal stability of subtilisin J by changing the primary autolysis site. *Biochem Biophys Res Commun*, **207**, 20-24.
- Baker, D., Sohl, J.L. and Agard, D.A. (1992) A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature*, **356**, 263-265.
- Banik, U., Saha, R., Mandal, N.C., Bhattacharyya, B. and Roy, S. (1992) Multiphasic denaturation of the lambda repressor by urea and its implications for the repressor structure. *Eur J Biochem*, **206**, 15-21.
- Barach, J.T. and Adams, D.M. (1977) Thermostability at ultrahigh temperatures of thermolysin and a protease from a psychrotrophic *Pseudomonas*. *Biochim Biophys Acta*, **485**, 417-423.
- Barbar, E., LiCata, V.J., Barany, G. and Woodward, C. (1997) Local fluctuations and global unfolding of partially folded BPTI detected by NMR. *Biophys Chem*, **64**, 45-57.
- Barteri, M., Gaudiano, M.C., Mei, G. and Rosato, N. (1998) New stable folding of beta-lactoglobulin induced by 2-propanol. *Biochim Biophys Acta*, **1383**, 317-326.

- Beaumont, A., O'Donohue, M.J., Paredes, N., Rousselet, N., Assicot, M., Bohuon, C., Fournie-Zaluski, M.C. and Roques, B.P. (1995) The role of histidine 231 in thermolysin-like enzymes. A site-directed mutagenesis study. *J Biol Chem*, **270**, 16803-16808.
- Betz, S.F. (1993) Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci*, **2**, 1551-1558.
- Betz, S.F. and Pielak, G.J. (1992) Introduction of a disulfide bond into cytochrome c stabilizes a compact denatured state. *Biochemistry*, **31**, 12337-12344.
- Bhuyan, A.K. (2002) Protein stabilization by urea and guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, **41**, 13386-13394.
- Bhuyan, A.K. and Udgaonkar, J.B. (1998) Multiple kinetic intermediates accumulate during the unfolding of horse cytochrome c in the oxidized state. *Biochemistry*, **37**, 9147-9155.
- Bhuyan, A.K. and Udgaonkar, J.B. (1999) Observation of multistate kinetics during the slow folding and unfolding of barnase. *Biochemistry*, **38**, 9158-9168.
- Braxton, S. (1996) Protein engineering for stability. In Cleland, J.L. and Craik, C.S. (eds.), *Protein engineering*. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 299-316.
- Braxton, S. and Wells, J.A. (1992) Incorporation of a stabilizing Ca(2+)-binding loop into subtilisin BPN'. *Biochemistry*, **31**, 7796-7801.
- Bryan, P.N. (2000) Protein engineering of subtilisin. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 203-222.
- Burk, N.F. (1943) Effects of inorganic electrolytes on the liberation of -SH in proteins. *J Phys Chem*, **47**, 104-119.
- Burstein, E.A., Vedenkina, N.S. and Ivkova, M.N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem Photobiol*, **18**, 263-279.
- Chan, H.S. and Dill, K.A. (1998) Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins*, **30**, 2-33.
- Chen, H., Zhang, G., Zhang, Y., Dong, Y. and Yang, K. (2000a) Functional implications of disulfide bond, Cys206-Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry*, **39**, 12140-12148.
- Chen, J., Lu, Z., Sakon, J. and Stites, W.E. (2000b) Increasing the thermostability of staphylococcal nuclease: implications for the origin of protein thermostability. *J Mol Biol*, **303**, 125-130.
- Christen, G.L. and T., M.R. (1985) Effect of histidine in thermostability of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27. *Journal of Dairy Science*, **68**, 594-604.
- Clarke, J. and Fersht, A.R. (1993) Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry*, **32**, 4322-4329.
- Colman, P.M., Jansonius, J.N. and Matthews, B.W. (1972) The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol*, **70**, 701-724.
- Colombo, G. and Merz Jr, K.M.M. (1999) Stability and Activity of Mesophilic Subtilisin E and Its Thermophilic Homolog: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *J Am Chem Soc*, **121**, 6895-6903.
- Corbett, R.J., Ahmad, F. and Roche, R.S. (1986) Domain unfolding and the stability of thermolysin in guanidine hydrochloride. *Biochem Cell Biol*, **64**, 953-961.
- Corbett, R.J. and Roche, R.S. (1983) The unfolding mechanism of thermolysin. *Biopolymers*, **22**, 101-105.
- Corbett, R.J. and Roche, R.S. (1986) Independent folding of autolytic fragments of thermolysin and their domain-like properties. *Int J Pept Protein Res*, **28**, 549-559.
- Creighton, T.E. (1988) Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays*, **8**, 57-63.
- Cupo, P., El-Deiry, W., Whitney, P.L. and Awad, W.M., Jr. (1980) Stabilization of proteins by guanidination. *J Biol Chem*, **255**, 10828-10833.
- Dahiyat, B.I. (1999) In silico design for protein stabilization. *Curr Opin Biotechnol*, **10**, 387-390.
- Dahlquist, F.W., Long, J.W. and Bigbee, W.L. (1976) Role of Calcium in the thermal stability of thermolysin. *Biochemistry*, **15**, 1103-1111.
- Dalby, P.A., Oliveberg, M. and Fersht, A.R. (1998) Movement of the intermediate and rate determining transition state of barnase on the energy landscape with changing temperature. *Biochemistry*, **37**, 4674-4679.
- 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.

- D'Amico, S., Marx, J.C., Gerday, C. and Feller, G. (2003) Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J Biol Chem*, **278**, 7891-7896.
- 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.
- Drucker, H. and Borchers, S.L. (1971) The role of calcium in thermolysin: effect on kinetic properties and autodigestion. *Arch Biochem Biophys*, **147**, 242-248.
- Dunbar, J., Yennawar, H.P., Banerjee, S., Luo, J. and Farber, G.K. (1997) The effect of denaturants on protein structure. *Protein Sci*, **6**, 1727-1733.
- Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2001) Differentiation between conformational and autoproteolytic stability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* containing an engineered disulfide bond. *Eur J Biochem*, **268**, 3612-3618.
- Eder, J., Rheinhecker, M. and Fersht, A.R. (1993) Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry*, **32**, 18-26.
- Edwin, F. and Jagannadham, M.V. (2000) Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochim Biophys Acta*, **1479**, 69-82.
- Eftink, M.R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J*, **66**, 482-501.
- Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. (1976a) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*, **15**, 672-680.
- Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. (1976b) Fluorescence Quenching of Indole and Model Micelle Systems. *J Phys Chem*, **80**, 486-493.
- Eftink, M.R. and Ghiron, C.A. (1981) Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal Biochem*, **114**, 199-227.
- Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R. and Seidel, C.A.M. (1998) Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis. *Anal Chem*, **70**, 2651-2659.
- Eijsink, V.G., Dijkstra, B.W., Vriend, G., van der Zee, J.R., Veltman, O.R., van der Vinne, B., van den Burg, B., Kempe, S. and Venema, G. (1992a) The effect of cavity-filling mutations on the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease. *Protein Eng*, **5**, 421-426.
- Eijsink, V.G., van den Burg, B. and Venema, G. (1991a) High performance affinity chromatography of *Bacillus* neutral proteases. *Biotechnol Appl Biochem*, **14**, 275-283.
- Eijsink, V.G., van den Burg, B., Vriend, G., Berendsen, H.J. and Venema, G. (1991b) Thermostability of *Bacillus subtilis* neutral protease. *Biochem Int*, **24**, 517-525.
- Eijsink, V.G., van der Zee, J.R., van den Burg, B., Vriend, G. and Venema, G. (1991c) Improving the thermostability of the neutral protease of *Bacillus stearothermophilus* by replacing a buried asparagine by leucine. *FEBS Lett*, **282**, 13-16.
- Eijsink, V.G., Veltman, O.R., Aukema, W., Vriend, G. and Venema, G. (1995) Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. *Nat Struct Biol*, **2**, 374-379.
- Eijsink, V.G., Vriend, G., Van Den Burg, B., Venema, G. and Stulp, B.K. (1990) Contribution of the C-terminal amino acid to the stability of *Bacillus subtilis* neutral protease. *Protein Eng*, **4**, 99-104.
- Eijsink, V.G., Vriend, G., van der Vinne, B., Hazes, B., van den Burg, B. and Venema, G. (1992b) Effects of changing the interaction between subdomains on the thermostability of *Bacillus* neutral proteases. *Proteins*, **14**, 224-236.
- Eijsink, V.G., Vriend, G., Van der Zee, J.R., Van den Burg, B. and Venema, G. (1992c) Increasing the thermostability of the neutral proteinase of *Bacillus stearothermophilus* by improvement of internal hydrogen-bonding. *Biochem J*, **285**, 625-628.
- English, A.C., Done, S.H., Caves, L.S., Groom, C.R. and Hubbard, R.E. (1999) Locating interaction sites on proteins: the crystal structure of thermolysin soaked in 2% to 100% isopropanol. *Proteins*, **37**, 628-640.
- Enns, C.A. and Chan, W.W. (1978) Stabilization of the relaxed state of aspartate transcarbamoylase by modification with a bifunctional reagent. *J Biol Chem*, **253**, 2511-2513.
- Fagain, C.O. (1995) Understanding and increasing protein stability. *Biochim Biophys Acta*, **1252**, 1-14.

- Fan, Y.X., McPhie, P. and Miles, E.W. (1999) Guanidine hydrochloride exerts dual effects on the tryptophan synthase alpha 2 beta 2 complex as a cation activator and as a modulator of the active site conformation. *Biochemistry*, **38**, 7881-7890.
- Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M., Zambonin, M. and Fontana, A. (1986) Autolysis of thermolysin. Isolation and characterization of a folded three-fragment complex. *Eur J Biochem*, **156**, 221-228.
- Feder, J. (1968) A spectrophotometric assay for neutral protease. *Biochem Biophys Res Commun*, **32**, 326-332.
- Feder, J., Brougham, L.R. and Wildi, B.S. (1974) Inhibition of Thermolysin by Dipeptides. *Biochemistry*, **13**, 1186-1189.
- Feder, J., Garrett, L.R. and Wildi, B.S. (1971) Studies on the role of calcium in thermolysin. *Biochemistry*, **10**, 4552-4556.
- 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.
- Fontana, A. (1988) Structure and stability of thermophilic enzymes. Studies on thermolysin. *Biophys Chem*, **29**, 181-193.
- Fontana, A., Fassina, G., Vita, C., Dalzoppo, D., Zamai, M. and Zambonin, M. (1986) Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry*, **25**, 1847-1851.
- Fujii, M., Takagi, M., Imanaka, T. and Aiba, S. (1983) Molecular cloning of a thermostable neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus* in a vector plasmid and its expression in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **154**, 831-837.
- Fujimura, S., Oshikawa, K., Terada, S. and Kimoto, E. (2000) Primary structure and autoproteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Glyodyus halys brevicaudus*. *J Biochem (Tokyo)*, **128**, 167-173.
- Futami, J., Tada, H., Seno, M., Ishikami, S. and Yamada, H. (2000) Stabilization of human RNase 1 by introduction of a disulfide bond between residues 4 and 118. *J Biochem (Tokyo)*, **128**, 245-250.
- Garcia, P., Merola, F., Receveur, V., Blandin, P., Minard, P. and Desmadril, M. (1998) Steady state and time-resolved fluorescence study of residual structures in an unfolded form of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry*, **37**, 7444-7455.
- Gassen, H.G. and Schrimpf, G. (1999) *Gentechnische Methoden*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
- Geisow, M.J. and Epton, R. (1995) *Perspectives on protein engineering & complementary technologies*. Mayflower Worldwide, Oxford.
- Gilbert, W.A., Lord, R.C., Petsko, G.A. and Thamann, T.J. (1982) Laser-Raman Spectroscopy of Biomolecules. 16-Temperature Dependence of the Conformation of Crystalline Ribonuclease A from X-Ray Diffraction and Raman Spectroscopy. *J Raman Spec*, **12**, 173-179.
- Goto, Y. and Hamaguchi, K. (1982) Unfolding and refolding of the reduced constant fragment of the immunoglobulin light chain. Kinetic role of the intrachain disulfide bond. *J Mol Biol*, **156**, 911-926.
- Gusev, N.B., Grabarek, Z. and Gergely, J. (1991) Stabilization by a disulfide bond of the N-terminal domain of a mutant troponin C (TnC48/82). *J Biol Chem*, **266**, 16622-16626.
- Hammarstrom, P., Owenius, R., Martensson, L.G., Carlsson, U. and Lindgren, M. (2001) High-resolution probing of local conformational changes in proteins by the use of multiple labeling: unfolding and self-assembly of human carbonic anhydrase II monitored by spin, fluorescent, and chemical reactivity probes. *Biophys J*, **80**, 2867-2885.
- Hammond, G.S. (1955) A correlation of reaction rates. *J Am Chem Soc*, **77**, 334-338.
- Hardy, F., Vriend, G., Veltman, O.R., van der Vinne, B., Venema, G. and Eijsink, V.G. (1993) Stabilization of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introduction of prolines. *FEBS Lett*, **317**, 89-92.
- Harris, D.L. and Hudson, B.S. (1990) Photophysics of tryptophan in bacteriophage T4 lysozymes. *Biochemistry*, **29**, 5276-5285.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J. and Rangarajan, M. (2000) Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 294-335.

- Heinrikson, R.L. (1977) Applications of thermolysin in protein structural analysis. *Methods Enzymol*, **47**, 175-189.
- Hollecker, M. (1997) Counting integral numbers of residues by chemical modification. In Creighton, T.E. (ed.), *Protein Structure*. Oxford University Press Inc., New York, p. 150 ff.
- Hollien, J. and Marqusee, S. (1999) A thermodynamic comparison of mesophilic and thermophilic ribonucleases H. *Biochemistry*, **38**, 3831-3836.
- Holmes, M.A. and Matthews, B.W. (1982) Structure of thermolysin refined at 1.6 Å resolution. *J Mol Biol*, **160**, 623-639.
- Holmquist, B. and Vallee, B.L. (1974) Metal substitutions and inhibition of thermolysin: spectra of the cobalt enzyme. *J Biol Chem*, **249**, 4601-4607.
- Hori, T., Moriyama, H., Kawaguchi, J., Hayashi-Iwasaki, Y., Oshima, T. and Tanaka, N. (2000) The initial step of the thermal unfolding of 3-isopropylmalate dehydrogenase detected by the temperature-jump Laue method. *Protein Eng*, **13**, 527-533.
- Ikegaya, K., Ishida, Y., Murakami, K., Masaki, A., Sugio, N., Takechi, K., Murakami, S., Tatsumi, H., Ogawa, Y., Nakano, E. and et al. (1992) Enhancement of the thermostability of the alkaline protease from *Aspergillus oryzae* by introduction of a disulfide bond. *Biosci Biotechnol Biochem*, **56**, 326-327.
- 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.
- Ikemura, H., Takagi, H. and Inouye, M. (1987) Requirement of pro-sequence for the production of active subtilisin E in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **262**, 7859-7864.
- Imanaka, T., Shibasaki, M. and Takagi, M. (1986) A new way of enhancing the thermostability of proteases. *Nature*, **324**, 695-697.
- Inouye, K., Lee, S.B., Nambu, K. and Tonomura, B. (1997) Effects of pH, temperature, and alcohols on the remarkable activation of thermolysin by salts. *J Biochem (Tokyo)*, **122**, 358-364.
- Inouye, K., Mazda, N. and Kubo, M. (1998) Need for aromatic residue at position 115 for proteolytic activity found by site-directed mutagenesis of tryptophan 115 in thermolysin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **62**, 798-800.
- Ishikawa, K., Nakamura, H., Morikawa, K. and Kanaya, S. (1993) Stabilization of *Escherichia coli* ribonuclease HI by cavity-filling mutations within a hydrophobic core. *Biochemistry*, **32**, 6171-6178.
- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, **71**, 155-241.
- Jaenicke, R. (2000) Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J Biotechnol*, **79**, 193-203.
- Jaenicke, R. and Bohm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 738-748.
- Jaswal, S.S., Sohl, J.L., Davis, J.H. and Agard, D.A. (2002) Energetic landscape of alpha-lytic protease optimizes longevity through kinetic stability. *Nature*, **415**, 343-346.
- Jiang, J.X. and London, E. (1990) Involvement of denaturation-like changes in *Pseudomonas* exotoxin a hydrophobicity and membrane penetration determined by characterization of pH and thermal transitions. Roles of two distinct conformationally altered states. *J Biol Chem*, **265**, 8636-8641.
- Johnson, R.E., Adams, P. and Rupley, J.A. (1978) Thermodynamics of protein cross-links. *Biochemistry*, **17**, 1479-1484.
- Jonsson, T., Waldburger, C.D. and Sauer, R.T. (1996) Nonlinear free energy relationships in Arc repressor unfolding imply the existence of unstable, native-like folding intermediates. *Biochemistry*, **35**, 4795-4802.
- Juminaga, D., Wedemeyer, W.J. and Scheraga, H.A. (1998) Proline isomerization in bovine pancreatic ribonuclease A. I. Unfolding conditions. *Biochemistry*, **37**, 11614-11620.
- Kam, C.M., Nishino, N. and Powers, J.C. (1979) Inhibition of thermolysin and carboxypeptidase A by phosphoramidates. *Biochemistry*, **18**, 3032-3038.
- Kanaya, S., Katsuda, C., Kimura, S., Nakai, T., Kitakuni, E., Nakamura, H., Katayanagi, K., Morikawa, K. and Ikehara, M. (1991) Stabilization of *Escherichia coli* ribonuclease H by introduction of an artificial disulfide bond. *J Biol Chem*, **266**, 6038-6044.

- Kauzmann, W. (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem*, **14**, 1-63.
- Kelly, S.M. and Price, N.C. (1991) The unfolding and refolding of pig heart fumarase. *Biochem J*, **275**, 745-749.
- Khan, S.M., Darnall, D.W. and Birnbaum, E.R. (1980) Tyrosine fluorescence as a measure of denaturation in thermolysin. *Biochim Biophys Acta*, **624**, 1-12.
- Kidokoro, S., Miki, Y., Endo, K., Wada, A., Nagao, H., Miyake, T., Aoyama, A., Yoneya, T., Kai, K. and Ooe, S. (1995) Remarkable activity enhancement of thermolysin mutants. *FEBS Lett*, **367**, 73-76.
- Kiefhaber, T., Kohler, H.H. and Schmid, F.X. (1992) Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. I. Theoretical models. *J Mol Biol*, **224**, 217-229.
- Kim, P.S. and Baldwin, R.L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem*, **59**, 631-660.
- Klibanov, A.M. (1983) Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol*, **29**, 1-28.
- Klibanov, A.M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci*, **14**, 141-144.
- Khmelnitsky, Y.L., Mozhaev, V.V., Belova, A.B., Sergeeva, M.V. and Martinek, K. (1991) Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *Eur J Biochem*, **198**, 31-41.
- Knochel, T., Pappenberger, A., Jansonius, J.N. and Kirschner, K. (2002) The crystal structure of indoleglycerol-phosphate synthase from *Thermotoga maritima*. Kinetic stabilization by salt bridges. *J Biol Chem*, **277**, 8626-8634.
- Ko, J.H., Park, S., Kim, E.K., Jang, W.H., Kang, J.H. and Yoo, O.J. (2002) Thermostability of an alkaline protease, AprP, is enhanced by replacement of Ser307 and Ser331 at the cleavage sites. *Biotechnol Lett*, **24**, 1749-1755.
- Köditz, J., Arnold, U. and Ulbrich-Hofmann, R. (2002) Dissecting the effect of trifluoroethanol on ribonuclease A. Subtle structural changes detected by nonspecific proteases. *Eur J Biochem*, **269**, 3831-3837.
- Komiyama, T., Suda, H., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1975) Studies on inhibitory effect of phosphoramidon and its analogs on thermolysin. *Arch Biochem Biophys*, **171**, 727-731.
- Kortt, A.A. and Stewart, D.J. (1994) Properties of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. Stability and specificity of peptide bond cleavage. *Biochem Mol Biol Int*, **34**, 1167-1176.
- Kramer, R.A., Zandwijken, D., Egmond, M.R. and Dekker, N. (2000) In vitro folding, purification and characterization of *Escherichia coli* outer membrane protease ompT. *Eur J Biochem*, **267**, 885-893.
- Kroll, S. and Klostermeyer, H. (1984) Heat inactivation of exogenous proteinases from *Pseudomonas fluorescens*. I. Possibility of inactivation in milk. *Z Lebensm Unters Forsch*, **179**, 288-295.
- Kubo, M., Itoh, K., Nishikawa, K., Hasumi, F. and Inouye, K. (1999) Mechanism of thermostability in thermolysin - analysis of subsite S2 mutant enzymes of thermolysin. *Lett Appl Microbiol*, **28**, 431 - 434.
- Kubo, M., Mitsuda, Y., Takagi, M. and Imanaka, T. (1992) Alteration of specific activity and stability of thermostable neutral protease by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 3779-3783.
- Kühn, D., Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2002) Boilylin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study. *Biotechnol Appl Biochem*, **36**, 71-76.
- Kunitz, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen Physiol*, **30**, 291-299.
- Kuroki, R., Inaka, K., Taniyama, Y., Kidokoro, S., Matsushima, M., Kikuchi, M. and Yutani, K. (1992) Enthalpic destabilization of a mutant human lysozyme lacking a disulfide bridge between cysteine-77 and cysteine-95. *Biochemistry*, **31**, 8323-8328.
- Laco, G.S., Fitzgerald, M.C., Morris, G.M., Olson, A.J., Kent, S.B. and Elder, J.H. (1997) Molecular analysis of the feline immunodeficiency virus protease: generation of a novel form of the

- protease by autoproteolysis and construction of cleavage-resistant proteases. *J Virol*, **71**, 5505-5511.
- Laity, J.H., Montelione, G.T. and Scheraga, H.A. (1999) Comparison of local and global stability of an analogue of a disulfide-folding intermediate with those of the wild-type protein in bovine pancreatic ribonuclease A: identification of specific regions of stable structure along the oxidative folding pathway. *Biochemistry*, **38**, 16432-16442.
- Leatherbarrow, R.J. and Fersht, A.R. (1986) Protein engineering. *Protein Eng*, **1**, 7-16.
- Lee, B. and Vasmatazis, G. (1997) Stabilization of protein structures. *Curr Opin Biotechnol*, **8**, 423-428.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F. and Wyss, M. (2000) The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 408-415.
- Lehrer, S.S. (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*, **10**, 3254-3263.
- Lehrer, S.S. and Leavis, P.C. (1978) Solute quenching of protein fluorescence. *Methods Enzymol*, **49**, 222-236.
- 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.
- Li, Y.J., Rothwarf, D.M. and Scheraga, H.A. (1995) Mechanism of reductive protein unfolding. *Nat Struct Biol*, **2**, 489-494.
- Louis, J.M., Oroszlan, S. and Toezser, J. (1999) Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *J Biol Chem*, **274**, 6660-6666.
- Lumry, R. and Eyring, H. (1954) Conformation Changes of Proteins. *J Phys Chem*, **58**, 110-120.
- Mainfroid, V., Mande, S.C., Hol, W.G., Martial, J.A. and Goraj, K. (1996) Stabilization of human triosephosphate isomerase by improvement of the stability of individual alpha-helices in dimeric as well as monomeric forms of the protein. *Biochemistry*, **35**, 4110-4117.
- Malakauskas, S.M. and Mayo, S.L. (1998) Design, structure and stability of a hyperthermophilic protein variant. *Nat Struct Biol*, **5**, 470-475.
- Manning, M.C., Patel, K. and Borchardt, R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*, **6**, 903-918.
- Mansfeld, J., Petermann, E., Dürrschmidt, P. and Ulbrich-Hofmann, R. (2003) The propeptide is not required to generate catalytically active neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, **in press**.
- Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2000) Site-specific and random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics. *Biotechnol Appl Biochem*, **32**, 189-195.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Dijkstra, B.W., Veltman, O.R., Van den Burg, B., Venema, G., Ulbrich-Hofmann, R. and Eijsink, V.G. (1997) Extreme stabilization of a thermolysin-like protease by an engineered disulfide bond. *J Biol Chem*, **272**, 11152-11156.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijsink, V.G. and Ulbrich-Hofmann, R. (1999) Probing the unfolding region in a thermolysin-like protease by site-specific immobilization. *Biochemistry*, **38**, 8240-8245.
- Margarit, I., Campagnoli, S., Frigerio, F., Grandi, G., De Filippis, V. and Fontana, A. (1992) Cumulative stabilizing effects of glycine to alanine substitutions in *Bacillus subtilis* neutral protease. *Protein Eng*, **5**, 543-550.
- Marie-Claire, C., Roques, B.P. and Beaumont, A. (1998) Intramolecular processing of prothermolysin. *J Biol Chem*, **273**, 5697-5701.
- Marie-Claire, C., Ruffet, E., Beaumont, A. and Roques, B.P. (1999) The prosequence of thermolysin acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **285**, 1911-1915.
- Martin, A., Sieber, V. and Schmid, F.X. (2001) In-vitro selection of highly stabilized protein variants with optimized surface. *J Mol Biol*, **309**, 717-726.
- Martin, C.J. (1964) Alteration in the Physical and Enzymic Properties of alpha-Chymotrypsin in Urea and Guanidinium Chloride. *Biochemistry*, **3**, 1635-1643.

- Matouschek, A. and Fersht, A.R. (1993) Application of physical organic chemistry to engineered mutants of proteins: Hammond postulate behavior in the transition state of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7814-7818.
- Matouschek, A., Kellis, J.T., Jr., Serrano, L. and Fersht, A.R. (1989) Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature*, **340**, 122-126.
- Matouschek, A., Matthews, J.M., Johnson, C.M. and Fersht, A.R. (1994) Extrapolation to water of kinetic and equilibrium data for the unfolding of barnase in urea solutions. *Protein Eng*, **7**, 1089-1095.
- Matouschek, A., Otzen, D.E., Itzhaki, L.S., Jackson, S.E. and Fersht, A.R. (1995) Movement of the position of the transition state in protein folding. *Biochemistry*, **34**, 13656-13662.
- Matsumura, M., Becktel, W.J., Levitt, M. and Matthews, B.W. (1989a) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6562-6566.
- Matsumura, M. and Matthews, B.W. (1991) Stabilization of functional proteins by introduction of multiple disulfide bonds. *Methods Enzymol*, **202**, 336-356.
- Matsumura, M., Signor, G. and Matthews, B.W. (1989b) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, **342**, 291-293.
- Matsuzawa, H., Tokugawa, K., Hamaoki, M., Mizoguchi, M., Taguchi, H., Terada, I., Kwon, S.T. and Ohta, T. (1988) Purification and characterization of aqualysin I (a thermophilic alkaline serine protease) produced by *Thermus aquaticus* YT-1. *Eur J Biochem*, **171**, 441-447.
- Matthews, B.W. (1987) Genetic and structural analysis of the protein stability problem. *Biochemistry*, **26**, 6885-6888.
- Matthews, B.W., Colman, P.M., Jansonius, J.N., Titani, K., Walsh, K.A. and Neurath, H. (1972a) Structure of Thermolysin. *Nature*, **238**, 41-43.
- Matthews, B.W., Jansonius, J.N., Colman, P.M., Schoenborn, B.P. and Dupourque, D. (1972b) Three-dimensional Structure of Thermolysin. *Nature*, **238**, 37-41.
- Miller, J.F. and Bolen, D.W. (1978) A guanidine hydrochloride induced change in ribonuclease without gross unfolding. *Biochem Biophys Res Commun*, **81**, 610-615.
- Mitchinson, C. and Wells, J.A. (1989) Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN'. *Biochemistry*, **28**, 4807-4815.
- Morihara, K. and Tsuzuki, H. (1970) Thermolysin: kinetic study with oligopeptides. *Eur J Biochem*, **15**, 374-380.
- Murphy, K.P. (1995) Noncovalent forces important to the conformational stability of protein structure. In Shirley, B.A. (ed.), *Protein stability and folding*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 1-34.
- Muslin, E.H., Clark, S.E. and Henson, C.A. (2002) The effect of proline insertions on the thermostability of a barley alpha-glucosidase. *Protein Eng*, **15**, 29-33.
- Nakai, S., Nakamura, S. and Scaman, C.H. (1998) Optimization of Site-Directed Mutagenesis. 2. Application of Random-Centroid Optimization to One-Site Mutation of *Bacillus stearothermophilus* Neutral Protease To Improve Thermostability. *J Agric Food Chem*, **46**, 1655-1661.
- Nakamura, S., Tanaka, T., Yada, R.Y. and Nakai, S. (1997) Improving the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease by introducing proline into the active site helix. *Protein Eng*, **10**, 1263-1269.
- Narhi, L.O. and Arakawa, T. (1989) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis as a method for studying the stability of subtilisin. *Biochim Biophys Acta*, **990**, 144-149.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M. and Upton, S.J. (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods*, **28**, 239-242.
- Nielsen, J.E. and Borchert, T.V. (2000) Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 253-274.
- Nishino, N. and Powers, J.C. (1980) *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Development of a new substrate, inhibitors, and an affinity ligand. *J Biol Chem*, **255**, 3482-3486.
- Nozaki, Y. (1972) The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods Enzymol*, **26**.
- Oliveberg, M., Tan, Y.J., Silow, M. and Fersht, A.R. (1998) The changing nature of the protein folding transition state: implications for the shape of the free-energy profile for folding. *J Mol Biol*, **277**, 933-943.



- Ort, P., Zalunin, I.A., Gasparov, V.S., Chestukhina, G.G. and Stepanov, V.M. (1995) Domain organization of Bacillus thuringiensis CryIII $\Delta$  delta-endotoxin studied by denaturation in guanidine hydrochloride solutions and limited proteolysis. *J Protein Chem*, **14**, 241-249.
- Otzen, D.E., Kristensen, O., Proctor, M. and Oliveberg, M. (1999) Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots. *Biochemistry*, **38**, 6499-6511.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*, **131**, 266-280.
- Pace, C.N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *TIBTECH*, **8**, 93-97.
- 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., Hebert, E.J., Shaw, K.L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K.S., Dauter, Z., Hartley, R.W. and Grimsley, G.R. (1998) Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *J Mol Biol*, **279**, 271-286.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., McNutt, M. and Gajiwala, K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *Faseb J*, **10**, 75-83.
- Panchal, S.C., Bhavesh, N.S. and Hosur, R.V. (2001) Real time NMR monitoring of local unfolding of HIV-1 protease tethered dimer driven by autolysis. *FEBS Lett*, **497**, 59-64.
- Pangburn, M.K. and Walsh, K.A. (1975) Thermolysin and Neural Protease: Mechanistic Considerations. *Biochemistry*, **14**, 4050-4054.
- Pantoliano, M.W., Ladner, R.C., Bryan, P.N., Rollence, M.L., Wood, J.F. and Poulos, T.L. (1987) Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry*, **26**, 2077-2082.
- Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Dodd, S.W., Hardman, K.D., Rollence, M.L. and Bryan, P.N. (1989) Large increases in general stability for subtilisin BPN' through incremental changes in the free energy of unfolding. *Biochemistry*, **28**, 7205-7213.
- Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L. and Bryan, P.N. (1988) The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry*, **27**, 8311-8317.
- Parker, M.J., Spencer, J. and Clarke, A.R. (1995) An integrated kinetic analysis of intermediates and transition states in protein folding reactions. *J Mol Biol*, **253**, 771-786.
- Paupit, R.A., Karlsson, R., Picot, D., Jenkins, J.A., Niklaus-Reimer, A.S. and Jansonius, J.N. (1988) Crystal structure of neutral protease from Bacillus cereus refined at 3.0 Å resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin. *J Mol Biol*, **199**, 525-537.
- Pawar, S.A. and Deshpande, V.V. (2000) Characterization of acid-induced unfolding intermediates of glucose/xylose isomerase. *Eur J Biochem*, **267**, 6331-6338.
- Pedone, E., Saviano, M., Rossi, M. and Bartolucci, S. (2001) A single point mutation (Glu85Arg) increases the stability of the thioredoxin from Escherichia coli. *Protein Eng*, **14**, 255-260.
- Perez, C., Castellanos, I.J., Costantino, H.R., Al-Azzam, W. and Griebenow, K. (2002) Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Pharm Pharmacol*, **54**, 301-313.
- Perez Won, M., Iyama, S., Shinohara, K., Murakami, H. and Omura, H. (1988) A circular dichroism study of the effect of some organic solvents on the actomyosin of sardine (Sardinops melanosticta). *Int J Food Sci Tech*, **23**, 403-409.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. and Schmid, F.X. (2000) Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol*, **7**, 380-383.
- Perry, L.J. and Wetzel, R. (1984) Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation. *Science*, **226**, 555-557.
- Petermann, E. (2001) Gewinnung einer proteolytisch inaktiven neutralen Protease aus Bacillus stearothermophilus durch gerichtete Mutagenese für Studien zur Strukturstabilität. Diplomarbeit, Institut für Biotechnologie, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie. Martin-Luther-Universität, Halle.

- Pokalsky, C., Wick, P., Harms, E., Lytle, F.E. and Van Etten, R.L. (1995) Fluorescence resolution of the intrinsic tryptophan residues of bovine protein tyrosyl phosphatase. *J Biol Chem*, **270**, 3809-3815.
- Poland, D. (2002) Protein denaturant binding polynomials. *J Protein Chem*, **21**, 479-487.
- Predki, P.F., Agrawal, V., Brunger, A.T. and Regan, L. (1996) Amino-acid substitutions in a surface turn modulate protein stability. *Nat Struct Biol*, **3**, 54-58.
- Privalov, P.L. and Gill, S.J. (1988) Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem*, **39**, 191-234.
- Rajalakshmi, N. and Sundaram, P.V. (1995) Stability of native and covalently modified papain. *Protein Eng*, **8**, 1039-1047.
- Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. In *Proteolytic enzymes*, pp. 183-193.
- Rehm, H. (2000) *Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heideberg, Berlin.
- Ricci, R.W. and Nesta, J.M. (1976) Inter- and Intramolecular Quenching of Indole Fluorescence by Carbonyl Compounds. *J Phys Chem*, **80**, 974-980.
- Riechmann, L. and Winter, G. (2000) Novel folded protein domains generated by combinatorial shuffling of polypeptide segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10068-10073.
- Roche, R.S. and Voordouw, G. (1977) The Role of calcium as a Conformational Lock in the Structure of Thermostable Extracellular Proteases.
- Roche, R.S. and Voordouw, G. (1978) The structural and functional roles of metal ions in thermolysin. *CRC Crit Rev Biochem*, **5**, 1-23.
- Rose, J.R., Salto, R. and Craik, C.S. (1993) Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions. *J Biol Chem*, **268**, 11939-11945.
- Royer, G.P., Ikeda, S. and Aso, K. (1977) Cross-linking of reversibly immobilized enzymes. *FEBS Lett*, **80**, 89-94.
- Saidel, L.J., Leitzes, S. and Elfring, W.H., Jr. (1964) The stability of chymotrypsin cross-linked with formaldehyde. *Biochem Biophys Res Commun*, **15**, 409-413.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbour, N. Y.
- Sanchez, I.E. and Kiefhaber, T. (2003) Hammond Behavior versus Ground State Effects in Protein Folding: Evidence for Narrow Free Energy Barriers and Residual Structure in Unfolded States. *J Mol Biol*, **327**, 867-884.
- Sattler, A., Kanka, S., Maurer, K.H. and Riesner, D. (1996) Thermostable variants of subtilisin selected by temperature-gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **17**, 784-792.
- Sauder, J.M., MacKenzie, N.E. and Roder, H. (1996) Kinetic mechanism of folding and unfolding of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome c2. *Biochemistry*, **35**, 16852-16862.
- Sauer, J., Sigurskjold, B.W., Christensen, U., Frandsen, T.P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P. and Svensson, B. (2000) Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 275-293.
- Sauer, R.T., Hahir, K., Stearman, R.S., Weiss, M.A., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E.G. and Pabo, C.O. (1986) An engineered intersubunit disulfide enhances the stability and DNA binding of the N-terminal domain of lambda repressor. *Biochemistry*, **25**, 5992-5998.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-162.
- Schellenberger, A. and Ulbrich, R. (1989) Protein stabilization by blocking the native unfolding nucleus. *Biomed Biochim Acta*, **48**, 63-67.
- Schlieker, C., Bukau, B. and Mogk, A. (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol*, **96**, 13-21.
- Schmid, F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton, T.E. (ed.), *Protein Structure*. Oxford University Press Inc., New York, p. 261 ff.
- Schokker, E.P. and van Boekel, M.A. (1998) Mechanism and kinetics of inactivation at 40-70 degrees C of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F. *J Dairy Res*, **65**, 261-272.

- Schokker, E.P. and van Boekel, M.A. (1999) Kinetics of thermal inactivation of the extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22F: influence of pH, calcium, and protein. *J Agric Food Chem*, **47**, 1681-1686.
- Sekine, H. (1972) Neutral Proteinase I and II of *Aspergillus sojae*. *Agr Biol Chem*, **36**, 207-216.
- Shortle, D. (1989) Probing the determinants of protein folding and stability with amino acid substitutions. *J Biol Chem*, **264**, 5315-5318.
- Sidler, W. and Zuber, H. (1972) Neutral proteases with different thermostabilities from a facultative strain of *Bacillus stearothermophilus* grown at 40 degrees and at 50 degrees. *FEBS Lett*, **25**, 292-294.
- Siebert, D. (2000) Entwicklung eines Fermentationsprozesses zur Gewinnung einer extrem thermostabilen Mutante der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* für Stabilitätsstudien. Dipolmarbeit, Institut für Biotechnologie, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie. Martin-Luther-Universität, Halle.
- Silow, M. and Oliveberg, M. (1997) High-energy channeling in protein folding. *Biochemistry*, **36**, 7633-7637.
- Sohl, J.L., Jaswal, S.S. and Agard, D.A. (1998) Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature*, **395**, 817-819.
- Stark, W., Pauptit, R.A., Wilson, K.S. and Jansonius, J.N. (1992) The structure of neutral protease from *Bacillus cereus* at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem*, **207**, 781-791.
- Stawiski, E.W., Baucom, A.E., Lohr, S.C. and Gregoret, L.M. (2000) Predicting protein function from structure: unique structural features of proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3954-3958.
- Stemmer, W.P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, **370**, 389-391.
- Stepaniak, L., Fox, P.F. and Daly, C. (1982) Isolation and general characterization of a heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* aft 36. *Biochim Biophys Acta*, **717**, 376-383.
- Stepanov, V.M. and Rudenskaya, G.N. (1983) Proteinase affinity chromatography on bacitracin-Sepharose. *J Appl Biochem*, **5**, 420-428.
- Stewart, R.J., Varghese, J.N., Garrett, T.P., Hoj, P.B. and Fincher, G.B. (2001) Mutant barley (1--&gt;3,1--&gt;4)-beta-glucan endohydrolases with enhanced thermostability. *Protein Eng*, **14**, 245-253.
- Strausberg, S., Alexander, P., Wang, L., Gallagher, T., Gilliland, G. and Bryan, P. (1993) An engineered disulfide cross-link accelerates the refolding rate of calcium-free subtilisin by 850-fold. *Biochemistry*, **32**, 10371-10377.
- Strausberg, S.L., Alexander, P.A., Gallagher, D.T., Gilliland, G.L., Barnett, B.L. and Bryan, P.N. (1995) Directed evolution of a subtilisin with calcium-independent stability. *Biotechnology (N Y)*, **13**, 669-673.
- Tajima, M., Urabe, I., Yutani, K. and Okada, H. (1976) Role of calcium ions in the thermostability of thermolysin and *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus* neutral protease. *Eur J Biochem*, **64**, 243-247.
- Takagi, H., Hirai, K., Maeda, Y., Matsuzawa, H. and Nakamori, S. (2000) Engineering subtilisin E for enhanced stability and activity in polar organic solvents. *J Biochem (Tokyo)*, **127**, 617-625.
- Takagi, H., Takahashi, T., Momose, H., Inouye, M., Maeda, Y., Matsuzawa, H. and Ohta, T. (1990) Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *J Biol Chem*, **265**, 6874-6878.
- Takagi, M. and Imanaka, T. (1989) Addition of a methyl group changes both the catalytic velocity and thermostability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *FEBS Lett*, **254**, 43-46.
- Takagi, M., Imanaka, T. and Aiba, S. (1985) Nucleotide sequence and promoter region for the neutral protease gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol*, **163**, 824-831.
- Tanford, C. (1970) Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv Protein Chem*, **24**, 1-95.
- Tatsumi, H., Ikegaya, K., Murakami, S., Kawabe, H., Nakano, E. and Motai, H. (1994) Elucidation of the thermal stability of the neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Biochim Biophys Acta*, **1208**, 179-185.
- Thornton, J.M. (1981) Disulphide bridges in globular proteins. *J Mol Biol*, **151**, 261-287.

- Tidor, B. and Karplus, M. (1993) The contribution of cross-links to protein stability: a normal mode analysis of the configurational entropy of the native state. *Proteins*, **15**, 71-79.
- Timasheff, S., N. (1997) Stabilization of protein structures by solvents. In Creighton, T.E. (ed.), *Protein Structure*. Oxford University Press Inc., New York, p. 356.
- Titani, K., Hermodson, M.A., Ericsson, L.H., Walsh, K.A. and Neurath, H. (1972) Amino acid sequence of thermolysin. Isolation and characterization of the fragments obtained by cleavage with cyanogen bromide. *Biochemistry*, **11**, 2427-2435.
- Toma, S., Campagnoli, S., Margarit, I., Gianna, R., Grandi, G., Bolognesi, M., De Filippis, V. and Fontana, A. (1991) Grafting of a calcium-binding loop of thermolysin to *Bacillus subtilis* neutral protease. *Biochemistry*, **30**, 97-106.
- Tomasselli, A.G., Mildner, A.M., Rothrock, D.J., Sarcich, J.L., Lull, J., Leone, J. and Henrikson, R.L. (1995) Mutants of HIV-1 protease with enhanced stability to autodegradation. *Adv Exp Med Biol*, **362**, 387-398.
- Ulbrich, R. (1989) Immobilisierte Enzyme. In Schellenberger, A. (ed.), *Enzymkatalyse*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 298-341.
- Ulbrich-Hofmann, R., Arnold, U. and Mansfeld, J. (1999) The concept of the unfolding region of approaching the mechanism of enzyme stabilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **7**, 125-131.
- Uversky, V.N., Narizhneva, N.V., Kirschstein, S.O., Winter, S. and Lober, G. (1997) Conformational transitions provoked by organic solvents in beta-lactoglobulin: can a molten globule like intermediate be induced by the decrease in dielectric constant? *Fold Des*, **2**, 163-172.
- Van den Burg, B., de Kreij, A., Van der Veek, P., Mansfeld, J. and Venema, G. (1999) Characterization of a novel stable biocatalyst obtained by protein engineering. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 35-40.
- Van den Burg, B., Dijkstra, B.W., Vriend, G., Van der Vinne, B., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1994) Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface. *Eur J Biochem*, **220**, 981-985.
- Van den Burg, B., Eijnsink, V.G., Stulp, B.K. and Venema, G. (1990) Identification of autodigestion target sites in *Bacillus subtilis* neutral proteinase. *Biochem J*, **272**, 93-97.
- Van den Burg, B., Eijnsink, V.G.H., Stulp, B.K. and Venema, G. (1989) One-step affinity purification of *Bacillus* neutral proteases using Bacitracin-silica. *J Biochem Biophys Methods*, **18**, 209-220.
- Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman, O.R., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2056-2060.
- Van Mierlo, C.P. and Steensma, E. (2000) Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *J Biotechnol*, **79**, 281-298.
- Vanzi, F., Madan, B. and Sharp, K. (1998) Effect of the Protein Denaturants Urea and Guanidinium on Water Structure: A Structural and Thermodynamic Study. *J Am Chem Soc*, **120**, 10748-10753.
- Veltman, O.R., Vriend, G., Berendsen, H.J., Van den Burg, B., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1998) A single calcium binding site is crucial for the calcium-dependent thermal stability of thermolysin-like proteases. *Biochemistry*, **37**, 5312-5319.
- Veltman, O.R., Vriend, G., Hardy, F., Mansfeld, J., van den Burg, B., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1997a) Mutational analysis of a surface area that is critical for the thermal stability of thermolysin-like proteases. *Eur J Biochem*, **248**, 433-440.
- Veltman, O.R., Vriend, G., Middelhoven, P.J., van den Burg, B., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1996) Analysis of structural determinants of the stability of thermolysin-like proteases by molecular modelling and site-directed mutagenesis. *Protein Eng*, **9**, 1181-1189.
- Veltman, O.R., Vriend, G., van den Burg, B., Hardy, F., Venema, G. and Eijnsink, V.G. (1997b) Engineering thermolysin-like proteases whose stability is largely independent of calcium. *FEBS Lett*, **405**, 241-244.
- Villafranca, J.E., Howell, E.E., Oatley, S.J., Xuong, N.H. and Kraut, J. (1987) An engineered disulfide bond in dihydrofolate reductase. *Biochemistry*, **26**, 2182-2189.
- Vita, C., Fontana, A. and Jaenicke, R. (1989) Folding of thermolysin fragments. Hydrodynamic properties of isolated domains and subdomains. *Eur J Biochem*, **183**, 513-518.

- Voordouw, G., Milo, C. and Roche, R.S. (1976) Role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. Separation of intrinsic and calcium ion contributions to the kinetic thermal stability. *Biochemistry*, **15**, 3716-3724.
- Voordouw, G. and Roche, R.S. (1974) The cooperative binding of two calcium ions to the double site of apothermolysin. *Biochemistry*, **13**, 5017-5021.
- Voordouw, G. and Roche, R.S. (1975a) The role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. I. Studies on thermomycolase, the thermostable protease from the fungus *Malbranchea pulchella*. *Biochemistry*, **14**, 4659-4666.
- Voordouw, G. and Roche, R.S. (1975b) The role of bound calcium ions in thermostable, proteolytic enzymes. II. Studies on thermolysin, the thermostable protease from *Bacillus thermoproteolyticus*. *Biochemistry*, **14**, 4667-4673.
- Vriend, G. (1990) WHAT IF: A molecular modelling and drug design program. *J Mol Graphics*, **8**, 52-56.
- Vriend, G., Berendsen, H.J., van den Burg, B., Venema, G. and Eijsink, V.G. (1998) Early steps in the unfolding of thermolysin-like proteases. *J Biol Chem*, **273**, 35074-35077.
- Vriend, G. and Eijsink, V. (1993) Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of thermolysin-like proteases. *J Comput Aided Mol Des*, **7**, 367-396.
- Wang, H.R., Zhang, T. and Zhou, H.M. (1995) Comparison of inactivation and conformational changes of aminoacylase during guanidinium chloride denaturation. *Biochim Biophys Acta*, **1248**, 97-106.
- Weaver, L.H., Kester, W. R., Ten Eyck, L. F., Matthews, B. W. (1976) Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. In Zuber, H. (ed.), *Symposium on enzymes and proteins from thermophilic microorganisms*. Birkhäuser Verlag, Basel, p. 31.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M. and Scheraga, H.A. (2000) Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, **39**, 4207-4216.
- Wells, J.A. and Powers, D.B. (1986) In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *J Biol Chem*, **261**, 6564-6570.
- Wetmore, D.R., Wong, S.L. and Roche, R.S. (1992) The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*. *Mol Microbiol*, **6**, 1593-1604.
- Wetzel, R., Perry, L.J., Baase, W.A. and Becktel, W.J. (1988) Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 401-405.
- Wharton, S.A., Martin, S.R., Ruigrok, R.W., Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (1988) Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J Gen Virol*, **69**, 1847-1857.
- Williams, J.C., Zeelen, J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A., Lambeir, A.M. and Wierenga, R.K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng*, **12**, 243-250.
- Wong, S.S. and Wong, L.J. (1992) Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb Technol*, **14**, 866-874.
- Xiao, J., Liang, S.J. and Tsou, C.L. (1993) Inactivation before significant conformational change during denaturation of papain by guanidine hydrochloride. *Biochim Biophys Acta*, **1164**, 54-60.
- Xie, G.F. and Tsou, C.L. (1987) Conformational and activity changes during guanidine denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, **911**, 19-24.
- Yamaguchi, S., Takeuchi, K., Mase, T., Oikawa, K., McMullen, T., Derewenda, U., McElhaney, R.N., Kay, C.M. and Derewenda, Z.S. (1996) The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono- and diglyceride specific lipase. *Protein Eng*, **9**, 789-795.
- Zaidi, F.N., Nath, U. and Udgaonkar, J.B. (1997) Multiple intermediates and transition states during protein unfolding. *Nat Struct Biol*, **4**, 1016-1024.
- Zale, S.E. and Klibanov, A.M. (1983) On the Role of Reversible Denaturation (Unfolding) in the Irreversible Thermal Inactivation of Enzymes. *Biotechnol Bioeng*, **XXV**, 2221-2230.
- Zale, S.E. and Klibanov, A.M. (1984) Mechanisms of irreversible thermoinactivation of enzymes. *Ann N Y Acad Sci*, **434**, 20-26.

- Zale, S.E. and Klibanov, A.M. (1986) Why does ribonuclease irreversibly inactivate at high temperatures? *Biochemistry*, **25**, 5432-5444.
- 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.
- Zhao, H. and Arnold, F.H. (1999) Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Eng*, **12**, 47-53.
- Zhou, H.M., Zhang, X.H., Yin, Y. and Tsou, C.L. (1993) Conformational changes at the active site of creatine kinase at low concentrations of guanidinium chloride. *Biochem J*, **291**, 103-107.

---

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Erstellung der Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ulbrich-Hofmann für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Betreuung und die anregenden Diskussionen. Auch möchte ich ihr für die gebotene Möglichkeit, die Ergebnisse öffentlich bei Kongressen zu präsentieren, danken.

Frau Dr. Mansfeld danke ich für die Bereitstellung der Enzym-Mutanten (in Zusammenarbeit mit Frau Sonntag), für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung von molekularbiologischen Arbeiten und für die Unterstützung bei der kritischen Bewertung dieser Ergebnisse.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Golbik, bei Dr. Uli und Dipl.-Biochem. Jens für die interessanten Diskussionen und Anregungen bedanken.

Bei Herrn Dr. Lilie bedanke ich mich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und die anregenden Hinweise zum Gestalten meiner Arbeit.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Vriend (Universität Nijmegen, Niederlande) für die Einführung und Hilfe bei der Strukturmodellierung.

Allen Mitarbeitern der AG Ulbrich-Hofmann und des Instituts für Biotechnologie danke ich für die freundliche Atmosphäre und die zahlreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Weichelt für ihre Unterstützung bei den „kleinen Dingen des Alltags“.

Besonders danke ich meiner Gattin für ihr Verständnis und ihre Hilfsbereitschaft.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

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

Peter Dürrschmidt

Halle (Saale), den 15.08.2003



---

## Lebenslauf

Name: Peter Dürrschmidt

Geburtstag: 02.03.1972

Geburtsort: Naumburg

09/1978 – 08/1988 Polytechnische Oberschule in Naumburg  
Abschluss der 10. Klasse

09/1988 – 08/1990 Erweiterte Oberschule in Schulpforte  
Hochschulreife mit Auszeichnung

09/1990 – 08/1991 Wehrersatzdienst im Alters- und Pflegeheim „Luisenhaus“ in  
Naumburg

09/1991 – 09/1993 Studium der Physik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
in Halle

10/1993 – 09/1998 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg in Halle  
Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie zum Thema: „Studien zur  
Struktur, Entfaltung und Autoproteolyse von punktmutierten neutralen  
Proteasen des Thermolysintyps aus *Bacillus stearothermophilus*.“

09/1998 – 11/1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathophysiologie der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle

12/1998 – 04/2003 Promotion am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-  
Universität Halle-Wittenberg in Halle

seit 07/2003 Mitarbeiter der Firma IBFB Pharma GmbH in Leipzig

Peter Dürrschmidt

Halle, den 15.08.2003

---

## Publikationen und Tagungsbeiträge

### Publikationen

- 1) Aurich, I., **Dürschmidt, P.**, Hirche, F. and Ulbrich-Hofmann, R. (1997). Transesterification of alkylphosphate esters by phospholipase D. *Biotechnol. Lett.*, **19(9)**, 875-879.
- 2) **Dürschmidt, P.**, Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2001). Differentiation between conformational and autoproteolytic stability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* containing an engineered disulfide bond. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3612-3618.
- 3) Aurich, I., **Dürschmidt, P.**, Schierhorn, A. and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Production of octadecylphospho-L-serine by phospholipase D. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 585-590.
- 4) Kühn, D., **Dürschmidt, P.**, Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2002). Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **36**, 71-76.
- 5) Ulbrich-Hofmann, R., Mansfeld, J., Arnold, U., Köditz, J., **Dürschmidt, P.** and Markert, Y. (2002). Lokal contra global - Strukturloops als Determinanten der Proteinstabilität. *Bioforum.*, **1-2**, 14-17.
- 6) Mansfeld, J., Petermann, E., **Dürschmidt, P.** and Ulbrich-Hofmann, R. (2003). The propeptide is not required to generate catalytically active neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, submitted.
- 7) **Dürschmidt, P.**, Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2003). Kinetics of thermal unfolding, autoproteolysis and inactivation of wild-type and disulfide-engineered neutral protease from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in preparation.

- 
- 8) **Dürschmidt, P.**, Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. (2003). The loop region 56-69 as determinant of the kinetic stability of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* in guanidine hydrochloride denaturation. *Biochemistry*, in preparation.

## **Tagungsbeiträge**

### Poster:

**1) Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Hamburg (1999)**

Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. Conformational Study of Neutral Protease (*B. stearothermophilus*) stabilized by an Engineered Disulfide Bond.

**2) 2<sup>nd</sup> International Conference on Protein Stabilisation in Lissabon, Portugal (2000)**

Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. The influence of an Engineered Disulphide Bond on the Autoproteolysis of the Thermolysin-like Neutral Protease from *B. stearothermophilus*.

**3) Self-Organization and Structure-Function Relation of Biomolecules in Wittenberg (2002)**

Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. The contribution of calcium ions to the interplay of unfolding and autoproteolysis in neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* and its disulfide stabilized mutant.

**4) 3<sup>rd</sup> International Conference on Protein Stabilisation in Toulouse, Frankreich (2002)**

Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. The contribution of calcium ions to the interplay of unfolding and autoproteolysis in neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* and its disulfide stabilized mutant.

**5) Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiochemie in Halle (2002)**

Dürschmidt, P., Mansfeld, J. and Ulbrich-Hofmann, R. Identification of an intermediate in the unfolding of neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* by fluorescence spectroscopy.

---

Vorträge:

**1) Kolloquium „Struktur und Funktion von Proteinen“ in Wittenberg (1999)**

Dürschmidt, P. Einfluss einer gentechnisch eingeführten Disulfidbrücke mit extrem stabilisierender Wirkung auf die Entfaltung der neutralen Protease von *Bacillus stearothermophilus*.

**2) Faltertage at the Leucorea Wittenberg in Wittenberg (2003)**

Dürschmidt, P. Extreme stabilization of the neutral protease from *Bacillus stearothermophilus* by an engineered disulfide bond is due to hindrance of local unfolding.