



Effekte von Arginin und von ionischen Flüssigkeiten auf Proteine

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Alexander Tischer

geboren am 15.01.1981 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. PD. Dr. habil. Hauke Lilie (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Dr. habil. Patrick Garidel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Hermann Weingärtner (Ruhr-Universität Bochum)

Halle (Saale), 22.09.2011
(Tag der öffentlichen Verteidigung)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Proteinfaltung <i>in vitro</i>	5
1.1.1 Stabilisierung des nativen Zustands	6
1.1.2 Beschleunigung der Kinetik der Faltung in den nativen Zustand	6
1.1.3 Unterdrückung von unspezifischer Aggregation	7
1.2 Arginin als Additiv für die <i>in vitro</i> -Rückfaltung von Proteinen	8
1.3 Ionische Flüssigkeiten	8
1.4 Die Hofmeisterreihe	11
1.5 Mechanismen für die Wirkung von Lösungsmitteladditiven	13
1.6 Konzepte für die Interaktionen von Lösungsmitteladditiven mit Proteinen	15
1.6.1 Präferentielle Hydratation und präferentielle Interaktion	15
1.6.2 Das Transfermodell	16
1.7 rPA als Modellprotein für Löslichkeitsmessungen	18
1.8 Zielstellung dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Geräte und Materialien	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1.1 Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	26
2.2.1.2 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.2.1.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	27
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese	27
2.2.2 Expression und Rückfaltung von rPA	27
2.2.2.1 Expression von rPA in <i>E.coli</i> K12 C600	27
2.2.2.2 <i>Inclusion body</i> -Präparation und Solubilisierung von rPA	28
2.2.2.3 Renaturierung von rPA aus solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	28
2.2.3 Proteinchemische und analytische Methoden	29
2.2.3.1 Natriumdesoxycholat-Fällung von Proteinen	29
2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	29
2.2.3.3 Inhibierung von rPA mit PMSF	29
2.2.3.4 Plasmin-Spaltung von rPA	30
2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.2.3.6 Ellman-Test	31
2.2.3.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von rPA und tc-rPA	32
2.2.3.8 Transmissionselektronenmikroskopie	33
2.2.3.9 Dynamische Differenzkalorimetrie	33
2.2.4 Löslichkeitsmessungen	33
2.2.4.1 Herstellung von dr-rPA und CM-rPA	33
2.2.4.2 Herstellung konzentrierter Proteinlösungen	34
2.2.4.3 Löslichkeitsmessungen mit rPA, tc-rPA und CM-rPA	34
2.2.4.4 Messung von Löslichkeitskinetiken	35
2.2.4.5 Oszillationsdensitometrie	35
2.2.4.6 Bestimmung der Löslichkeit von Aminosäuren mittels Oszillationsdensitometrie	36
2.2.4.7 Berechnung der freien Transferenergien aus Löslichkeitsmessungen	37
2.2.5 Spektroskopische und spektrometrische Methoden	37
2.2.5.1 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie	37
2.2.5.2 Refraktometrische Bestimmung von GuHCl-, EMIMCl-, EMIMDEP- und L-ArgHCl-Konzentrationen	38
2.2.5.3 Streulichtmessungen	39
2.2.5.4 Circular dichroismus	39
2.2.5.4.1 Messung von CD-Spektren im Nah-UV-Bereich	40
2.2.5.4.2 Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge von tc-rPA im Nah-UV-CD-Bereich	40

2.2.5.5 Dynamische Lichtstreuung	40
2.2.5.6 Messung von GuHCl-induzierten Übergangskurven mittels Fluoreszenz	42
2.2.5.7 Festkörper-NMR Spektrometrie	42
2.2.5.8 IR-Spektroskopie	43
2.2.5.9 Massenspektrometrie	43
2.2.6 Chromatographische Methoden	43
2.2.6.1 Reversed Phase - HPLC	43
2.2.6.2 Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung	44
3. Ergebnisse	45
3.1 Rekombinante Herstellung von rPA	45
3.1.1 Expression und <i>inclusion-body</i> -Präparation	45
3.1.2 Rückfaltung von rPA aus solubilisierten <i>inclusion bodies</i>	46
3.2 Charakterisierung von rPA, tc-rPA und CM-rPA	48
3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von rPA und CM-rPA	48
3.2.2 Thermodynamische Stabilität von rPA und CM-rPA	49
3.2.3 Autoproteolytische Aktivierung von rPA	50
3.2.4 Spaltung von rPA zu tc-rPA durch Plasmin	51
3.2.4.1 Einfluss der Plasminspaltung auf die Aktivität von rPA	52
3.2.4.2 Einfluss der Plasminspaltung auf die thermodynamische Stabilität von rPA	53
3.3 Einfluss von L-ArgHCl und ionischen Flüssigkeiten auf die Proteinlöslichkeit	55
3.3.1 Einfluss von L-ArgHCl auf die Löslichkeit und die Aggregation von rPA und CM-rPA	55
3.3.2 Einfluss von EMIMCl auf die Löslichkeit von Proteinen	60
3.4 Zustand von tc-rPA in hohen Konzentrationen ionischer Flüssigkeiten	62
3.4.1 Destabilisierung und Denaturierung von tc-rPA in ionischen Flüssigkeiten	63
3.4.2 Aggregation von tc-rPA und CM-rPA in ionischen Flüssigkeiten	69
3.5 Transferenergiemessungen von Aminosäuren	75
3.5.1 Transferenergiemessungen für L-ArgHCl-Lösungen	75
3.5.2 Transferenergiemessungen für EMIMCl-Lösungen	78
3.5.3 Transferenergiemessungen für EMIMDEP-Lösungen	80
3.5.4 Untersuchungen zur Chaotropizität und Kosmotropizität von ionischen Flüssigkeiten	83
4. Diskussion	88
4.1 rPA, tc-rPA und CM-rPA	89
4.2 Einflüsse von Additiven auf die oxidative Rückfaltung von rPA	90
4.3 Einflüsse von L-ArgHCl auf Proteine	92
4.3.1 Einflüsse von L-ArgHCl auf Löslichkeit und Aggregation von rPA	94
4.3.2 Einflüsse von L-ArgHCl auf die Löslichkeit von Aminosäuren	96
4.4 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf Proteine	97
4.4.1 Löslichkeit von Proteinen in EMIMCl	98
4.4.2 Stabilität und Aggregation von Proteinen in ionischen Flüssigkeiten	99
4.4.3 Einfluss von EMIMCl und EMIMDEP auf die Löslichkeit von Aminosäuren	101
4.5 Löslichkeit von DKP und Trp in ionischen Flüssigkeiten	103
4.6 Zusammenfassung	107
5. Literaturverzeichnis	109
6. Anhang	118
6.1 Löslichkeit von rPA, tc-rPA und CM-rPA	118
6.2 Löslichkeitsmessungen mit Aminosäuren und DKP	121
6.3 Primärstruktur von rPA	126
I Abkürzungen	127
II Abbildungsverzeichnis	129
III Tabellenverzeichnis	130
IV Lebenslauf	132
V Publikationen, Vorträge und Poster	133
VI Danksagung	134
VII Eidesstattliche Erklärung	135

1. Einleitung

Die komplexen Reaktionen und Interaktionen, durch welche sich Lebensprozesse auszeichnen, sind an das Vorhandensein von Proteinen in biologischen Systemen gebunden. Dabei dienen Proteine nicht nur als Biokatalysatoren, sondern auch als Struktur-, Speicher- und Transportmoleküle sowie molekulare Motoren. Für all diese Funktionen ist es essentiell, dass sich die entstehende Aminosäurekette korrekt in die biologisch aktive dreidimensionale Struktur faltet (Murphy, 2001). Dabei ist unter gegebenen Bedingungen die Strukturinformation von der Aminosäuresequenz vorgegeben (Anfinsen, 1973).

Aus den vielfältigen Aufgaben von Proteinen resultiert durch Fehlfunktionen auch eine Reihe von Krankheiten. So führt eine Fehlfaltung von Proteinen unter anderem zur Ausbildung von Fibrillen, welche mit Krankheiten wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder Chorea Huntington in Verbindung gebracht werden kann. Weiterhin kann eine Unterversorgung mit Proteinwirkstoffen zu Krankheiten führen, welche die Homöostase des Körpers massiv beeinflussen.

Da Proteine in regulatorischen Prozessen wichtige Rollen spielen, ist man seit geraumer Zeit bestrebt sie als Therapeutika einzusetzen. Allerdings war die Herstellung bzw. Isolierung solcher Therapeutika lange Zeit nicht wirtschaftlich oder die Applikation war mit Nebenwirkungen verbunden. Als Beispiel sei porcines Insulin genannt, welches zunächst aus dem Schweinepankreas isoliert wurde, allerdings aufgrund seiner mit humanem Insulin nicht identischen Aminosäure-Zusammensetzung – porcines Insulin hat in der B-Kette an Position 30 ein L-Alanin, während humanes Insulin an dieser Stelle ein L-Threonin hat – zu Nebenwirkungen führte (Huismans, 2005).

Erst durch die Nutzung der rekombinanten DNA-Technologie ist es möglich geworden, humane Proteine in großem Maßstab herzustellen, so dass sie als Therapeutika Anwendung finden können. Als weitere Beispiele seien hier rPA, G-CSF oder EPO genannt.

Für die Herstellung rekombinanter Proteine kommt eine Reihe von biologischen Produktionssystemen in Frage, welche jedoch alle Vor- und Nachteile aufweisen. So haben prokaryotische Systeme wie *Escherichia coli* (*E.coli*) geringe Anforderungen an Nährmedien und hohe Wachstums- und Expressionsraten, was eine relativ preisgünstige Herstellung von Therapeutika ermöglicht. Allerdings fehlen Mechanismen zur posttranslationalen Modifizierung von Proteinen (Makrides, 1996; Arya et al., 2008). Trotzdem ist die rekombinante Herstellung von Proteinen in *E.coli* ein gut etablierter Prozess, welcher nach wie vor breite Anwendung findet.

1.1 Proteinfaltung *in vitro*

Ein anderer Nachteil der rekombinanten Herstellung von therapeutisch relevanten Proteinen in *E.coli* besteht darin, dass es oft zur Bildung von intrazellulären, unlöslichen und inaktiven Proteinaggregaten kommt. Diese sogenannten *inclusion bodies* müssen nach Zellaufschluss mit Denaturierungsmitteln wie Guanidinhydrochlorid (GuHCl) oder Harnstoff solubilisiert und anschließend zurück in die korrekt gefaltete native Form gefaltet werden (Lim et al., 1989; Rudolph und Lilie, 1996; Fahnert et al., 2004; Burgess, 2009). Für Proteine, welche in ihrer nativen Form Disulfid-Brücken enthalten, ist während der Faltung weiterhin die Verwendung eines Redox-*Shuffling*-Systems unerlässlich. Dieses besteht üblicherweise aus reduziertem monomeren und oxidiertem dimeren Glutathion (Saxena und Wetlaufer, 1970; Patil et al., 2008).

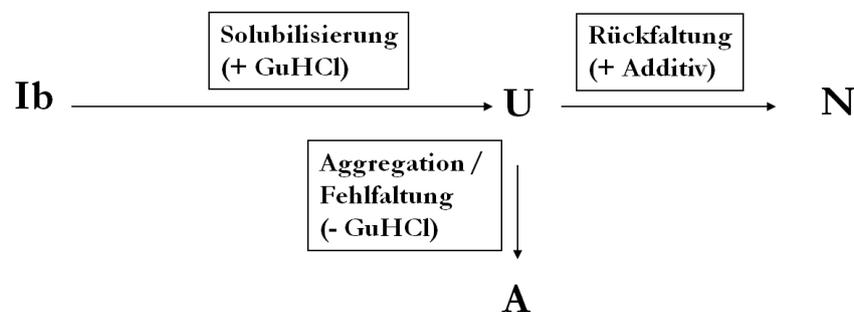


Abb. 1.1: Schema der *in-vitro* Proteinerückfaltung. Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die Proteinfaltung *in vitro* ausgehend von *inclusion bodies*. Dabei symbolisiert **Ib** unlösliche *inclusion bodies*, **U** ungefaltetes Protein, **A** den aggregierten Zustand und **N** den nativen Zustand.

Beim Prozess der Renaturierung können ungewollte Nebenreaktionen wie Aggregation oder Fehlfaltung die Ausbeute an nativem Protein reduzieren (Goldberg et al., 1991; Kiefhaber et al., 1991). Dies kann durch die Wahl geeigneter Lösungsmitteladditive verhindert werden. So kann entweder der native Zustand eines Proteins (**N**) stabilisiert, die Kinetik der Faltung in den nativen Zustand beschleunigt oder aber die unspezifische Aggregation (**A**) unterdrückt werden (Baynes und Trout, 2004; Buchfink et al., 2010). Eine Auswahl von Lösungsmitteladditiven, welche diese Effekte haben, soll nun nachfolgend vorgestellt werden.

1.1.1 Stabilisierung des nativen Zustands

Es ist bekannt, dass Polyole wie Glucose, Fructose, Mannose, Saccharose, Glycerin oder Ethylenglykol die thermodynamische Stabilität von Proteinen erhöhen (Ball et al, 1943; Tanford et al., 1962; Bradbury und Jakoby, 1972; Lee et al., 1981; Gekko und Timasheff, 1981). Auch für einige proteinogene Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure sowie für einige natürlich vorkommende Osmolyte wie Trimethylaminoxid (TMAO) oder Betain konnte eine stabilisierende Wirkung auf Proteine nachgewiesen werden (Arakawa und Timasheff, 1982; Yancey et al., 1982).

Eine mögliche Erklärung hierfür liefert das thermodynamische Konzept der „präferentiellen Hydratation/präferentiellen Interaktion“ (Timasheff und Inoue, 1968; Timasheff, 2002), welches weitergehend in Kapitel 1.6.1 thematisiert wird. Dieses besagt für die oben erwähnten Substanzen, dass in einer wässrigen Lösung ein Protein vorzugsweise mit Wasser interagiert, während die gelösten stabilisierenden Additive von der Proteinoberfläche verdrängt werden. Dies hat zur Folge, dass die Entfaltung eines Proteins in Gegenwart von stabilisierenden Additiven thermodynamisch unvorteilhafter ist als in deren Abwesenheit.

Auch Salze aus der Hofmeisterreihe können als stabilisierende Substanzen verwendet werden. Bekanntestes Beispiel hierfür ist Ammoniumsulfat, welches durch seine Einflüsse auf die Wasserstruktur stabilisierend wirkt (Kapitel 1.4).

1.1.2 Beschleunigung der Kinetik der Faltung in den nativen Zustand

Die Ausbeute an nativem Protein kann durch Faltungshelferproteine erhöht werden, welche geschwindigkeitsbestimmende Schritte bei der Faltung katalysieren und so die Kinetik der Faltung insgesamt beschleunigen. Beispiele hierfür sind die eukaryotischen Proteindisulfid-isomerasen und ihre prokaryotischen funktionellen Homologe DsbA und DsbC (Wunderlich et al., 1993; Rudolph et al., 1997; Gruber et al., 2006), sowie die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, welche die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolylpeptidbindungen bewirken (Fischer et al., 1984a; Fischer et al., 1984b; Fischer und Bang, 1985).

1.1.3 Unterdrückung von unspezifischer Aggregation

Eine Unterdrückung der Proteinaggregation kann durch molekulare Chaperone, insbesondere durch Hitzeschock- und Stressproteine erfolgen, welche an ungefaltete oder teilweise gefaltete Proteine binden können, um fehlerhafte Assoziationen infolge von hydrophoben Wechselwirkungen zu unterbinden (Hendrick und Hartl, 1993; Welch et al., 1993; Buchner, 1996).

Eine andere Möglichkeit, die Proteinaggregation zu unterdrücken, ist die Verwendung von niedermolekularen Additiven. Hierzu zählen beispielsweise Cyclodextrine. Bei diesen handelt es sich um Oligosaccharide, bestehend aus sechs bis acht Glucosemolekülen, welche über α -1,4 glykosidische Bindungen zu Ringen verknüpft sind. Je nach Anzahl der Glucosemoleküle erfolgt die Benennung mit α -Cyclodextrin (sechs Glucosemoleküle) bis γ -Cyclodextrin (acht Glucosemoleküle) (Villalonga et al., 2006). Durch den Ringschluss entsteht im Inneren der Cyclodextrine eine Kavität, in welcher hydrophobe Aminosäureseitenketten wie die von Phenylalanin oder Tryptophan komplexiert werden können. Dies führt zu einer Unterdrückung der Aggregation von ungefaltetem Protein (Wood et al., 1977; Karupiah und Sharma, 1995).

Ein anderes Lösungsmitteladditiv, welches bereits seit circa 20 Jahren für die *in-vitro*-Rückfaltung von rekombinanten Proteinen eingesetzt wird, ist L-Arginin. Dieses hat mit 10,76 den basischsten pI-Wert aller proteinogenen Aminosäuren. Die Seitenkette enthält neben drei Methylengruppen eine Guanidinogruppe. Üblicherweise wird L-Arginin als Hydrochlorid (L-ArgHCl) verwendet (Lange und Rudolph, 2009). Arginin hat keinen wesentlichen Effekt auf die Proteinstabilität, erhöht aber die Löslichkeit von aggregationsanfälligen, ungefalteten Proteinspezies und von Faltungsintermediaten (Arakawa und Tsumoto, 2003; Reddy K et al., 2005).

Andere Lösungsmitteladditive, welche die Rückfaltungsausbeute durch Unterdrückung der unspezifischen Aggregation erhöhen, sind ionische Flüssigkeiten. So konnten für scFv-Antikörperfragmente erhöhte Rückfaltungsausbeuten und eine Unterdrückung der Aggregation von denaturiertem reduziertem Lysozym festgestellt werden (Lange et al., 2005).

Im Folgenden sollen Arginin sowie die Klasse der ionischen Flüssigkeiten und ihre Einflüsse auf die Proteinrückfaltung näher vorgestellt werden.

1.2 Arginin als Additiv für die *in vitro*-Rückfaltung von Proteinen

Der positive Effekt von Arginin auf die Rückfaltungsausbeute wurde bereits für eine Reihe von Proteinen beschrieben. Dazu gehören beispielsweise Lysozym (Armstrong et al., 1999; Reddy K. et al., 2005), die HA1-Domäne des Hämagglutinins (Chiu et al., 2009), die humane Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Wang und Engel, 2009), rekombinante Fab-Fragmente (Buchner und Rudolph, 1991), der gewebsspezifische Plasminogenaktivator (t-PA) und das t-PA-Derivat BM 06.022 (Rudolph und Fischer, 1990; Stern et al., 1990; Stern et al., 1993).

Obwohl Arginin mittlerweile breite Verwendung als Rückfaltungsadditiv findet, sind die Wirkmechanismen nach wie vor nicht vollständig geklärt. So gibt es Ansätze, die Wirkung von Arginin über die Interaktion der basischen Seitenkette mit der Proteinoberfläche und insbesondere mit Tryptophan- und Tyrosin-Seitenketten zu erklären (Nozaki und Tanford, 1970; Tanaka et al., 2004; Ishibashi et al., 2005; Arakawa et al., 2007a). Das Problem hierbei ist, dass andere Substanzen wie beispielsweise GuHCl, welche ebenfalls mit der Proteinoberfläche interagieren, in hohem Maße destabilisierend sind, was auf Arginin nicht zutrifft.

Eine Möglichkeit diesen Widerspruch zu beseitigen, wäre zu postulieren, dass Arginin ausschließlich einen Effekt auf die Kinetik der Proteinaggregation hat. Bei einem solchen kinetischen Effekt würde selektiv die Energiebarriere zwischen dem ungefalteten und dem aggregierten Zustand eines Proteins erhöht werden, was in einer verlangsamten Aggregation resultiert. Mit dem sogenannten „Gap-Effekt“ wurde 2004 ein solches Postulat von Baynes und Trout veröffentlicht. Es besagt, dass die Wirkung von Arginin ausschließlich auf einem kinetischen Effekt beruht und die freie Energie des nativen und des ungefalteten Proteins nicht beeinflusst wird (siehe Kapitel 1.5).

Gegen dieses Postulat spricht allerdings, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wird, dass Arginin sehr wohl die Gleichgewichtslöslichkeit von nativen Proteinen erhöht, was einer Absenkung der freien Energie entspricht (Reddy K et al., 2005).

1.3 Ionische Flüssigkeiten

Als ionische Flüssigkeiten werden Salze mit einem Schmelzpunkt unter 100 °C bezeichnet. Ihre physikochemischen Eigenschaften sind sehr variabel und werden maßgeblich durch die jeweiligen Anionen und Kationen bestimmt (Kragl et al., 2002). So bestehen diese Salze üblicherweise aus Kombinationen von N,N'-substituierten Imidazolium-, N-substituierten Pyridinium-,

tetraalkylierten Ammonium- oder tetraalkylierten Phosphonium-Kationen (Abb. 1.2 A) und aus organischen (Abb. 1.2 B) oder anorganischen Anionen (Buchfink et al., 2010).

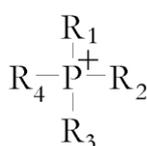
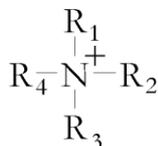
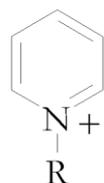
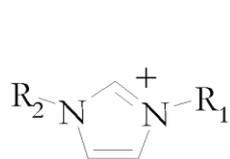
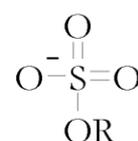
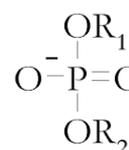
A**B**

Abb. 1.2: Häufige Kationen und organische Anionen in ionischen Flüssigkeiten. Gezeigt sind in (A) die Strukturformeln für N,N'-substituierte Imidazolium-, N-substituierte Pyridinium-, tetraalkylierte Ammonium- und tetraalkylierte Phosphonium-Kationen und in (B) auf Phosphat und Sulfat basierende organische Anionen. Dabei symbolisiert R_n Alkylreste.

Obwohl mit Ethylammoniumnitrat (Schmelzpunkt 12 °C) bereits 1914 die erste ionische Flüssigkeit synthetisiert werden konnte (Walden, 1914), wurden diese erst in den letzten Jahren für verschiedenste Prozesse eingesetzt. So werden ionische Flüssigkeiten zunehmend in der organischen Synthese verwendet. Ein Beispiel hierfür ist der von BASF etablierte BASIL (*biphasic acid scavenging using ionic liquids*)-Prozess. Bei diesem Prozess wird bei der Synthese von Alkoxyphenylphosphinen freiwerdende HCl mit Hilfe von 1-Methylimidazol eingefangen. Die entstehende ionische Flüssigkeit 1-Methylimidazoliumchlorid kann anschließend aus dem Reaktionsmedium entfernt und recycelt werden (Seddon, 2003; Rogers und Seddon, 2003).

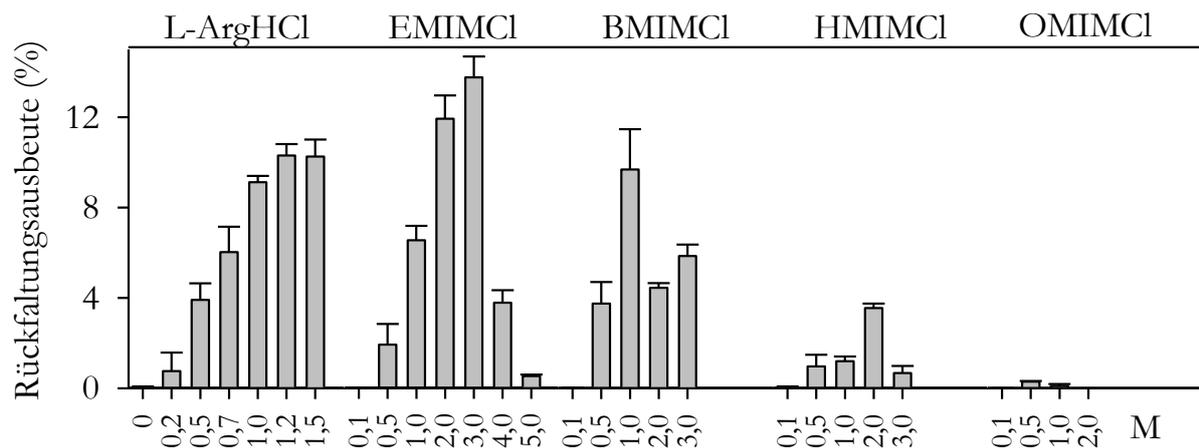
Andere Anwendungen von ionischen Flüssigkeiten ergeben sich aus der Möglichkeit Zellulose und komplexe Biopolymere wie Holz in 1-Ethyl-3-Methylimidazoliumacetat (EMIMAc) und 1-Butyl-3-Methylimidazoliumchlorid (BMIMCl) aufzulösen. Dies ermöglicht eine vollständige Acetylierung von Holz, wodurch dieses nach der Rückführung in den Feststoff resistenter gegen Insekten- und Pilzbefall wird (Kilpeläinen et al., 2007; Sun et al., 2009).

Weiterhin sind ionische Flüssigkeiten auch als pharmazeutisch aktive Stoffe denkbar. Als Beispiel seien hier Ranitidindokusat oder Lidocaindokusat genannt, welche Kombinationen aus Kationen und Anionen von pharmazeutisch relevanten Substanzen darstellen (Hough und Rogers, 2007; Hough et al., 2007).

Dass ionische Flüssigkeiten auch als Additive für die Proteinfaltung verwendet werden können, wurde erstmals von Summers und Flowers (2000) bei der Rückfaltung von Lysozym in Anwesenheit von 0,54 M Ethylammoniumnitrat gezeigt. Weiterhin konnte für verschiedene ionische Flüssigkeiten eine stabilisierende Wirkung auf die Aktivität und die Struktur von Proteinen nachgewiesen werden (De Diego et al., 2004; Baker et al., 2004; Byrne et al., 2007).

Untersuchungen der Einflüsse ionischer Flüssigkeiten auf die Rückfaltung von Lysozym, scFv-Antikörper-Fragmenten und von rPA (Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010) zeigten jedoch, dass nicht alle ionischen Flüssigkeiten als Additive für die oxidative Proteinerückfaltung geeignet sind. Exemplarisch ist ein solches Rückfaltungsscreening für rPA in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten abgebildet (Abb. 1.3). Eine Übersicht über die verwendeten ionischen Flüssigkeiten befindet sich in Kapitel 2.1.1.

A



B

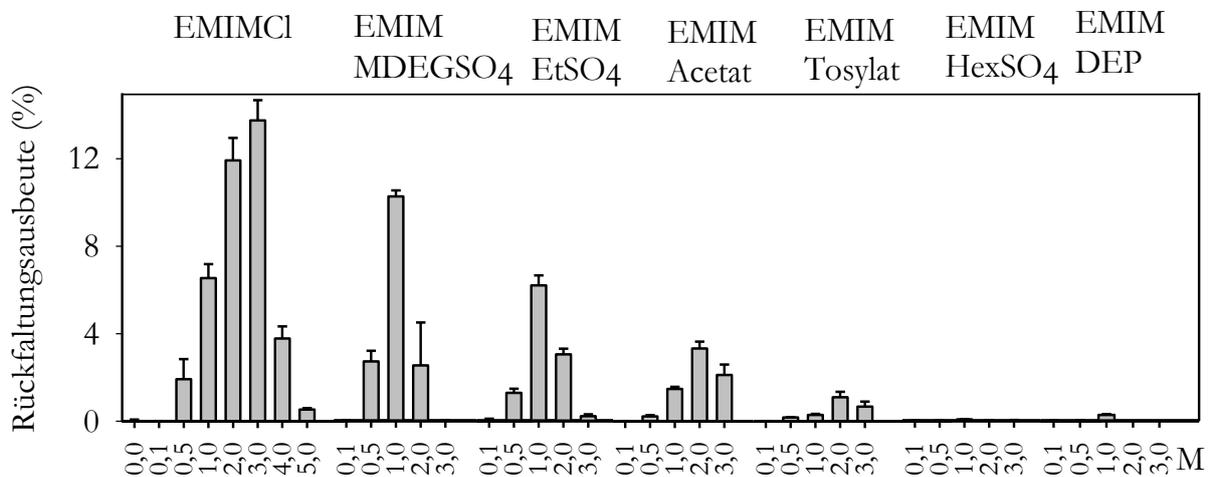


Abb. 1.3: Ausbeuten der oxidativen Rückfaltung von rPA in ionischen Flüssigkeiten. Gezeigt sind die Rückfaltungsausbeuten für rPA, ausgehend von denaturiertem reduziertem rPA, in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten nach 8 h. Dabei wurde bei den ionischen Flüssigkeiten in (A) das Kation und in (B) das Anion variiert. Zu Vergleichszwecken wurde die Rückfaltungsausbeute in ansteigenden L-ArgHCl-Konzentrationen gemessen (Abb. nach Buchfink et al., 2010).

So wurde bei der oxidativen Rückfaltung von rPA, ausgehend von denaturiertem reduziertem Protein, in L-ArgHCl und in ionischen Flüssigkeiten festgestellt, dass in der Reihe 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Chlorid (EMIMCl) – 1-Octyl-3-Methylimidazolium Chlorid (OMIMCl) die Rückfaltungsausbeute mit steigender Alkylkettenlänge abnimmt. Außerdem fiel insbesondere bei EMIMCl auf, dass bei höheren Konzentrationen die Rückfaltungsausbeuten zurückgingen.

Weiterhin wurde der Einfluss einiger Anionen auf die Rückfaltungsausbeute untersucht. Hierbei ergab sich, dass die Variation des Anions generell zu schlechteren Rückfaltungsausbeuten führte. Während in EMIMCl mit $13,7 \pm 0,9$ % höhere Rückfaltungsausbeuten als in L-ArgHCl erreicht werden konnten, bewirkte der Austausch des Chlorid- gegen das Diethylphosphat-Anion eine massive Verringerung der Rückfaltungsausbeute (maximal $0,26 \pm 0,04$ %).

Während die abnehmenden Rückfaltungsausbeuten bei steigender Alkylkettenlänge bei den Kationen auf eine zunehmende Hydrophobizität zurückzuführen sind, war für die Effekte der Anionen eine solche Korrelation nicht ohne Weiteres möglich.

Eine Einordnung von Salzen hinsichtlich ihrer Effekte auf Proteine wurde erstmals mit der Hofmeisterreihe publiziert. Da es sich bei den ionischen Flüssigkeiten um Salze handelt, lassen sich ihre Effekte analog zu normalen Salzen durch eine Einordnung in die Hofmeisterreihe beschreiben.

1.4 Die Hofmeisterreihe

In der Hofmeisterreihe (Hofmeister, 1888) wurden Salze hinsichtlich ihrer „eiweißfällenden Wirkung“ eingeordnet. Später wurden Versuche unternommen, diese auf empirischen Befunden basierende Reihe zu erklären. Dafür wurden für die zu klassifizierenden Ionen die Begriffe Chaotropizität und Kosmotropizität geprägt, welche den Einfluss von Ionen auf die Wasserstruktur wiedergeben.

Kosmotrope („Struktur machende“) Ionen sind üblicherweise kleine oder mehrfach geladene Ionen mit hoher Ladungsdichte, welche Wassermoleküle in ihrer Nähe in eine hochorganisierte Ordnung zwingen. Da kosmotrope Ionen stärker mit Wassermolekülen als mit sich selbst interagieren, können sie intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen (Zhao et al., 2006; Yang, 2009). Insgesamt ist die Entropie aufgrund der höheren Ordnung der Wassermoleküle in der Nähe der Ionen verringert.

Chaotrope („Struktur brechende“) Ionen umfassen große und einfach geladene Ionen, welche mit Wasser schwächere Interaktionen haben als mit sich selbst. Sie stören daher die Wasserstruktur weniger als kosmotrope Ionen, erhöhen aber insgesamt die Entropie der Lösung. Eine Konsequenz daraus ist, dass Proteine in solchen Lösungen leichter denaturieren können (Collins, 1997; Zhao et al., 2006).

Aus der Änderung der Viskosität einer Lösung mit der Salzkonzentration ist es möglich, eine Einordnung von Ionen hinsichtlich ihrer Chaotropizität bzw. Kosmotropizität vorzunehmen. Dies erfolgt über den sogenannten Viskositäts-B-Koeffizienten, welcher sich aus der Jones-Dole-Gleichung (Gleichung 1.1) ergibt (Jones und Dole, 1929):

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{1/2} + Bc \quad \text{Gleichung 1.1}$$

Dabei entspricht η der Viskosität der Salzlösung, η_0 der Viskosität von Wasser bei gleicher Temperatur und c der Salzkonzentration. Bei A handelt es sich um einen elektrostatischen Term und B ist ein Maß für die Interaktionen zwischen einem Ion und Wasser (Jones und Dole, 1929; Collins, 1997). Eine Übersicht über die Chaotropizität bzw. Kosmotropizität und die Viskositäts-B-Koeffizienten von Ionen gibt Tab. 1.1.

Tab. 1.1: Chaotropizität und Kosmotropizität von Ionen sowie Viskositäts-B-Koeffizienten

Kationen		Anionen		Wirkung auf Proteine	
Viskositäts-B-Koeffizient		Viskositäts-B-Koeffizient			
chaotrop		kosmotrop		stabilisierend/aussalzend	
Cs ⁺	-0,045	PO ₄ ³⁻	0,590		
NH ₄ ⁺	-0,007	CH ₃ COO ⁻	0,246		
K ⁺	-0,007	SO ₄ ²⁻	0,208		
Rb ⁺	-0,003	F ⁻	0,100		
Na ⁺	0,086	HCOO ⁻	0,052		
Ag ⁺	0,090	Cl ⁻	-0,007		
Li ⁺	0,150	Br ⁻	-0,033		
Ba ²⁺	0,220	NO ₃ ⁻	-0,046		
Ca ²⁺	0,285	I ⁻	-0,068		
Mg ²⁺	0,385	BF ₄ ⁻	-0,093		
Al ³⁺	0,744	SCN ⁻	-0,103		
kosmotrop		chaotrop		destabilisierend/einsalzend	

(Tabelle nach Collins, 1997; Zhao et al., 2006. Daten aus Robinson et al., 1981; Krestov, 1991)

Die Jones-Dole-Gleichung ist allerdings nur für Salzkonzentrationen bis ca. 100 mM (Collins, 1997) und für sphärische Ionen gültig (Tamaki et al., 1973). Daher ist eine Einordnung von einigen ionischen Flüssigkeiten über den Viskositäts-B-Koeffizienten nur eingeschränkt möglich.

Der Einfluss von Salzen auf die Oberflächenspannung wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Melander und Horváth (1977) führten die Hofmeister-Salzeffekte auf Veränderungen in der Oberflächenspannung zurück. So wurde für Salze mit einer starken Erhöhung der Oberflächenspannung ein Aussalzen von Proteinen (und damit eine verringerte Löslichkeit) festgestellt. Dagegen führen Salze, die die Oberflächenspannung nur geringfügig erhöhen, zum Einsalzen von Protein (erhöhte Löslichkeit). Allerdings existieren mittlerweile viele Ausnahmen von dieser Regel, so dass Änderungen der Oberflächenspannung nicht alleine für die Hofmeister-Salzeffekte verantwortlich sein können (Arakawa et al., 1990; Breslow und Guo, 1990; Broering und Bommarius, 2005).

1.5 Mechanismen für die Wirkung von Lösungsmitteladditiven

Die treibende Kraft für die Aggregation von Proteinen ist – analog zur Proteinfaltung – eine vorteilhafte freie Energie für die Verkleinerung der dem Lösungsmittel zugänglichen Fläche (Dill, 1990). Da beide Prozesse auf diese Weise miteinander verknüpft sind, entsteht eine kinetische

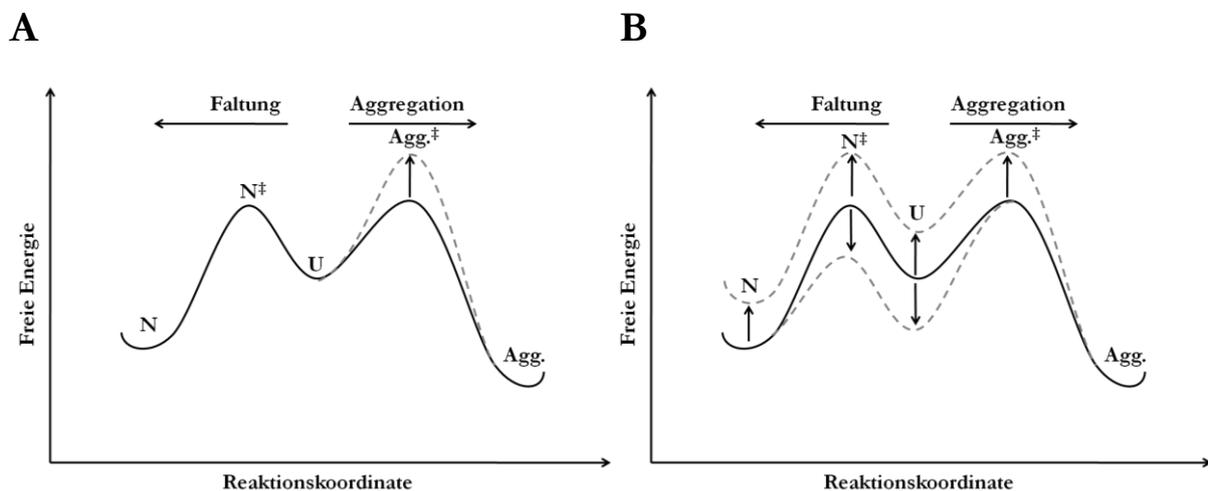


Abb. 1.4: Energiediagramme für einen kinetischen Effekt und für Gleichgewichtseffekte von Lösungsmitteladditiven. In den Energiediagrammen symbolisiert N natives Protein, U ungefaltetes Protein und Agg. aggregiertes Protein. Übergangszustände sind mit „ \ddagger “ markiert. In (A) sind ein kinetischer Effekt und in (B) mögliche Gleichgewichtseffekte (jeweils gestrichelte Linien) gezeigt, welche die Energiebarriere zwischen dem ungefalteten und dem aggregierten Zustand bzw. die freie Energie der zugänglichen Zustände beeinflussen. Abb. modifiziert nach Baynes und Trout, 2004.

Kompetition zwischen Faltung und Aggregation. So kann ein entfaltetes Proteinmolekül (**U**) – wie in Abb. 1.4 A schematisch dargestellt – entweder in einer unimolekularen Reaktion in den nativen Zustand (**N**) falten oder aber in einer konzentrationsabhängigen Reaktion zweiter Ordnung dimerisieren und letztlich aggregieren (**Agg.**) (Kiefhaber et al., 1991; Baynes und Trout, 2004).

Prinzipiell lassen sich die Wirkungen von Lösungsmitteladditiven auf Proteine in Lösung in kinetische Effekte und in Gleichgewichtseffekte unterteilen. Bei einem kinetischen Effekt wird selektiv die Energiebarriere zwischen zwei Zuständen verändert. Ein Modell, welches auf einem kinetischen Effekt basiert, wurde 2004 von Baynes und Trout mit dem „*Gap*-Effekt“ vorgestellt. Dabei handelt es sich um ein vereinfachtes rein kinetisches Modell für die aggregationshemmende Wirkung von L-ArgHCl. Dieses Modell geht davon aus, dass Additivmoleküle aus sterischen Gründen aus Spalten, welche im Übergangszustand während der Proteinaggregation auftreten, ausgeschlossen werden. Bedingung hierfür ist, dass sich L-ArgHCl als „*neutral crowder*“ verhält, d. h. sich in seiner Affinität zu Proteinmolekülen nicht von Wasser unterscheidet. Beim *Gap*-Effekt wird davon ausgegangen, dass L-ArgHCl die freie Energie eines einzelnen Proteinmoleküls nicht beeinflusst, aber selektiv die Energiebarriere für die Assoziation zweier Proteinmoleküle erhöht. Dadurch wird die Proteinaggregation verlangsamt, ohne dass der *neutral crowder* einen Einfluss auf unimolekulare Reaktionen wie die Rückfaltung eines Proteinmoleküls hat (Baynes und Trout, 2004; Baynes et al., 2005). Eine schematische Darstellung des *Gap*-Effekts zeigt Abb. 1.5.

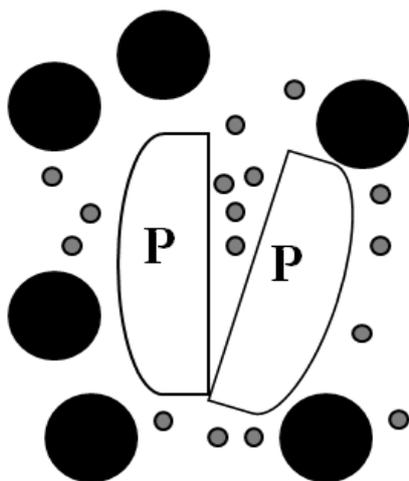


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des *Gap*-Effekts. Durch Anwesenheit von *neutral crowder*-Molekülen entsteht eine entropisch unvorteilhafte Situation für die Assoziation von Proteinmolekülen. Dabei symbolisiert P Proteinmoleküle, ● *neutral crowder*-Moleküle und ● Wassermoleküle. Abb. modifiziert nach Baynes und Trout, 2004.

Im Gegensatz zum kinetischen Effekt wird bei einem Gleichgewichtseffekt die freie Energie der zugänglichen Zustände relativ zum aggregierten Zustand – wie in Abb. 1.4 B – verändert. Etablierte Konzepte für Gleichgewichtseffekte von Lösungsmitteladditiven sollen nachfolgend erläutert werden.

1.6 Konzepte für die Interaktionen von Lösungsmitteladditiven mit Proteinen

1.6.1 Präferentielle Hydratation und präferentielle Interaktion

Wenn ein Makromolekül in einer gemischten Lösung (z.B. Wasser/Salz oder Wasser/organisches Lösungsmittel) gelöst ist, so hat es üblicherweise zu einer der beiden Komponenten eine höhere Affinität. Solche präferentielle Interaktionen beispielsweise mit Proteinmolekülen lassen sich durch Gleichgewichtsdialysen mit Hilfe von Messungen der Änderung des Brechungsindex, über Circular dichroismus- oder Streulichtmessungen oder mittels Oszillationsdensitometrie feststellen (Timasheff und Inoue, 1968; Inoue und Timasheff, 1968; Lee und Timasheff, 1974; Lee und Timasheff, 1981).

Die Hydrathülle eines Proteinmoleküls ist kein starres Gebilde, sondern stetigen Fluktuationen unterworfen. Wird nun ein Lösungsmitteladditiv in eine Lösung mit Proteinmolekülen gegeben, so kann sich dieses dabei neutral wie Wasser verhalten (Abb. 1.6 A), mit der Proteinoberfläche interagieren (Abb. 1.6 B) oder von ihr ausgeschlossen werden (Abb. 1.6 C). Die letzten beiden Möglichkeiten werden dabei als präferentielle Interaktion (*preferential interaction*) bzw. präferentielle Hydratation (*preferential hydration*) bezeichnet (Timasheff und Inoue, 1968; Timasheff, 2002; Arakawa et al., 2007a).

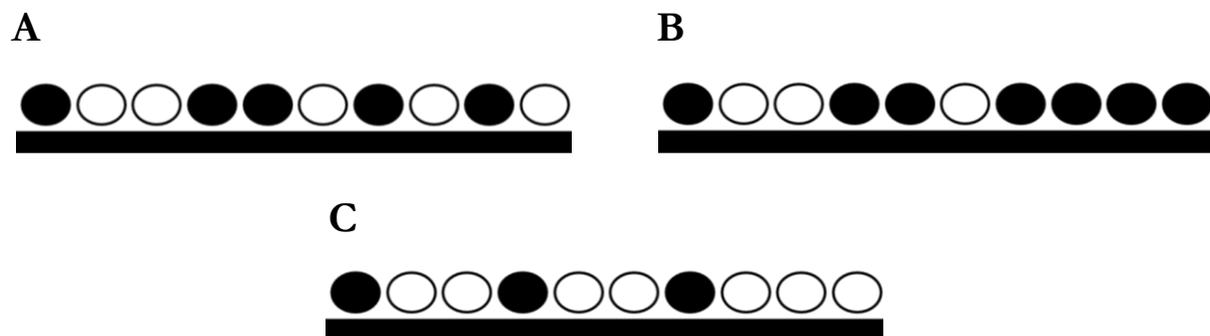


Abb. 1.6: Interaktion von Lösungsmitteladditiven mit Proteinoberflächen. Es sind die drei Möglichkeiten für die Interaktion eines Additivs mit der Proteinoberfläche (—) gezeigt. Dabei symbolisiert (●) Additivmoleküle und (○) Wassermoleküle. In (A) ist die Situation für ein neutrales, in (B) für ein mit der Proteinoberfläche interagierendes (präferentielle Interaktion) und in (C) für ein von der Proteinoberfläche ausgeschlossenes Additiv (präferentielle Hydratation) gezeigt (Abb. nach Timasheff, 2002).

Stabilisierende Lösungsmitteladditive wie Polyole, TMAO, Betain oder Salze mit chaotropen Kationen und kosmotropen Anionen (z.B. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, siehe Tab. 1.1) werden üblicherweise von der Proteinoberfläche von Wassermolekülen verdrängt, was dem in Abb. 1.6 C dargestellten Fall entspricht. Durch die präferentielle Hydratation des Proteins wird der kompakteste gefaltete Zustand mit der geringsten zugänglichen Oberfläche stabilisiert, welcher meistens der des nativen Proteins ist (Gekko und Timasheff, 1981; Broering und Bommarius, 2005).

Für denaturierende Additive wie Harnstoff oder Salze mit kosmotropen Kationen und neutralen bzw. chaotropen Anionen (z.B. GuHCl; GuHSCN) wird dagegen eine bevorzugte Interaktion (Abb. 1.6 B) mit Proteinen postuliert, was eine Vergrößerung der Proteinoberfläche und somit eine Denaturierung thermodynamisch begünstigt (Prakash und Timasheff, 1981; Arakawa und Timasheff, 1984; Timasheff, 1992).

1.6.2 Das Transfermodell

Die thermodynamische Stabilität von Proteinen wird unter anderem durch schwache, nicht kovalente Kräfte vermittelt. Hierzu zählen Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte sowie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen (Kauzmann, 1959; Alber, 1989; Dill, 1990).

Eine Möglichkeit, die Effekte von Additiven zu beschreiben, ist die Verwendung des Transfermodells, welches von Tanford (1964) aufgestellt wurde. Es beschreibt einen thermodynamischen Zyklus (Abb. 1.7), anhand dessen es möglich ist, die Wechselwirkungen zwischen Proteinen im nativen und im denaturierten Zustand und dem Lösungsmittel in An- und Abwesenheit von Additiven zu quantifizieren (Auton und Bolen, 2007).

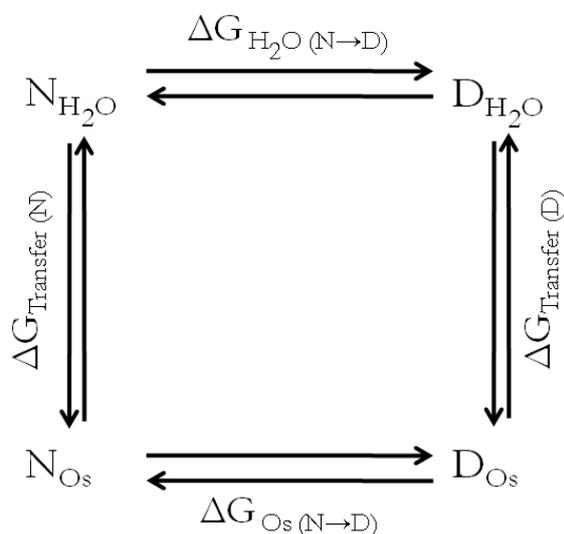


Abb. 1.7: Thermodynamisches Transfermodell. Aufgetragen sind die freien Energien für die Denaturierung eines Proteins in Anwesenheit ($\Delta G_{\text{O}_s(\text{N} \rightarrow \text{D})}$) und in Abwesenheit eines Osmolyten ($\Delta G_{\text{H}_2\text{O}(\text{N} \rightarrow \text{D})}$). Die vertikalen Gleichgewichte repräsentieren die freien Energien für den Transfer von nativem ($\Delta G_{\text{Transfer}(\text{N})}$) bzw. denaturiertem Protein ($\Delta G_{\text{Transfer}(\text{D})}$) für den Transfer aus Wasser in die Osmolytlösung.

Eine essentielle Bedingung für die Anwendbarkeit des Transfermodells ist, dass die Transferenergien für die einzelnen Gruppen eines Proteins, d. h. für Aminosäureseitenketten und für das Peptidrückgrat, additiv und messbar sind. So sollte es mit Hilfe eines geeigneten Modells möglich sein, aus der Summe der Transferenergien für den nativen ($\sum \Delta G_{\text{Transfer(N)}}$) und den denaturierten Zustand ($\sum \Delta G_{\text{Transfer(D)}}$) eines Proteins und der freien Energie für die Denaturierung in Wasser ($\Delta G_{\text{H}_2\text{O (N}\rightarrow\text{D)}}$) den Einfluss eines Additivs auf die Faltung bzw. Entfaltung eines Proteins zu berechnen. In der Praxis ist dies allerdings schwierig, da ein Proteinmodell für den nativen und für den denaturierten Zustand vereinfachende Annahmen erfordert, die eine exakte Berechnung der Beiträge der einzelnen Gruppen zu der Transferenergie des Gesamtproteins erschweren.

Die Berechnung der Transferenergien für ein Protein im nativen Zustand erfolgt durch Aufsummierung der Transferenergien für Aminosäureseitenketten, welche im nativen Zustand oberflächenexponiert sind. Das Peptidrückgrat und die Aminosäuren, welche den hydrophoben Kern formen, sind hingegen im nativen Zustand im Inneren des Proteins verborgen. Die zugängliche Proteinoberfläche wird dabei mit Hilfe des von Lee und Richards (1971) aufgestellten Algorithmus berechnet. Dagegen wird davon ausgegangen, dass im denaturierten Zustand eines Proteins alle Aminosäureseitenketten und das Peptidrückgrat gleichermaßen lösungsmittlexponiert sind.

Aus der Löslichkeit von Aminosäuren in Additivlösungen und in Wasser lassen sich die freien Transferenergien berechnen (siehe Kapitel 2.2.4.7). Subtrahiert man von Aminosäuren mit Seitenketten die Transferenergie für Glycin, so erhält man die Transferenergien für die Aminosäureseitenketten. Da Glycin als Aminosäure ohne Seitenkette aufgrund seiner Ladungen das Peptidrückgrat jedoch nur ungenügend beschreibt, wurde als Modellkomponente für das Rückgrat Diketopiperazin (DKP) verwendet (Liu und Bolen, 1995). Dieses besteht aus zwei Peptideinheiten, welche zyklisiert sind.

Eine Anwendung der Transferenergiemessungen von Aminosäuren und von DKP als Modell für das Peptidrückgrat ist die Untersuchung von Osmolyten. Diese werden von Organismen als evolutionäre Anpassung an extreme Lebensbedingungen intrazellulär eingelagert, um Proteine vor der Denaturierung durch osmotischen oder Temperaturstress zu schützen. Zu weit verbreiteten Osmolyten zählen beispielsweise TMAO, Prolin, Sarkosin, Glycerin, Saccharose oder Betain (Yancey et al., 1982). Für die Protein-stabilisierende Wirkung dieser Stoffe wurde 2001 von Bolen und Baskakov ein sogenannter osmophober Effekt als treibende Kraft verantwortlich gemacht. Dieser Effekt rührt von einer unvorteilhaften Interaktion mit dem Peptidrückgrat her, durch welche Proteine in ihrem nativen Zustand gehalten werden (Liu und

Bolen, 1995; Wang und Bolen, 1997; Qu et al., 1998). Vorteilhafte oder unvorteilhafte Interaktionen mit Aminosäureseitenketten und dem Peptidrückgrat ergeben sich dabei aus den freien Energien für den Transfer von Wasser in eine Additivlösung.

Dagegen ist die Einlagerung von Harnstoff als osmotisch aktive Substanz problematisch, da Harnstoff das Peptidrückgrat solubilisiert (Liu und Bolen, 1995) und daher destabilisierend wirkt. Dies lässt sich allerdings durch die stabilisierende Wirkung von TMAO kompensieren. So findet man beide Osmolyte beispielsweise im Verhältnis 2:1 in Haien und Rochen vor (Yancey und Somero, 1979).

1.7 rPA als Modellprotein für Löslichkeitsmessungen

Da es unpraktisch ist, für die Untersuchung der Effekte von Lösungsmitteladditiven gut lösliche Proteine wie z.B. Lysozym zu verwenden, war es erforderlich ein Protein mit einer niedrigen apparenten Löslichkeit einzusetzen. Die Wahl fiel auf den rekombinanten Plasminogenaktivator (rPA). Dieses Protein ist unter physiologischen Bedingungen schlecht löslich (Hu et al., 1996; Sinniger et al., 1999) und lässt sich nur in Gegenwart von Lösungsmitteladditiven wie L-ArgHCl in nennenswerten Ausbeuten oxidativ zurückfalten (Rudolph et al., 1987; Stern et al., 1990; Kohnert et al., 1992).

Das gegenwärtig als Therapeutikum eingesetzte rPA ist eine N-terminal verkürzte Deletionsmutante des gewebspezifischen Plasminogenaktivators (tPA). Bei tPA handelt es sich um eine Serinprotease mit fünf Domänen, welche eine wichtige Rolle in der Fibrinolyse spielt. Ihre physiologische Funktion ist die Aktivierung von Plasminogen zum enzymatisch aktiven Plasmin durch Spaltung der Arg561-Val562-Peptidbindung (Bode und Renatus, 1997). Das aktivierte Plasmin ist in eine Reihe von lebenswichtigen Prozessen involviert, zu welchen unter anderem die Spaltung von Fibrin und somit eine Auflösung von Blutgerinnseln gehört. Weiterhin spaltet Plasmin die Peptidbindung zwischen Arg275 und Ile276 von tPA. Dies führt zur sogenannten Zweikettenform von tPA (*two chain*-tPA, tc-tPA), bei welcher die Kringel 2-Domäne und die Serinproteasedomäne über die Disulfidbrücke kovalent verknüpft bleiben, welche durch Cys264 und 393 gebildet wird (Pennica et al., 1983; Hu et al., 1996).

Als es sich herausstellte, dass tPA als potentielles Therapeutikum gegen Herzinfarkte eingesetzt werden kann, wurden Versuche unternommen die Nachteile dieses Proteins zu minimieren. Zu diesen zählen beispielsweise die geringe Aktivität, die niedrige biologische Halbwertszeit und die nicht absolute Spezifität für Fibrin (Higgins und Bennett, 1990; Kohnert et al., 1992).

Um die biologische Halbwertszeit zu erhöhen, wurde eine Vielzahl von Mutanten von tPA hergestellt (Higgins und Bennett, 1990). Zu diesen Varianten zählt die tPA Deletionsmutante rPA (t-PA^{del} V4 E175, BM 06.022), welche nur aus der Kringel 2- und der Serinproteasedomäne besteht. Dieses Protein wurde erfolgreich aus *inclusion bodies* renaturiert und mittels Affinitätschromatographie über ETI (*Erythrina trypsin inhibitor*)-Sepharose gereinigt (Stern et al., 1990; Kohnert et al., 1992). Eine detaillierte Charakterisierung von rPA ergab, dass die Deletion der drei Domänen keinen nachteiligen Effekt auf die biochemischen Eigenschaften des Proteins hatte (Kohnert et al., 1992).

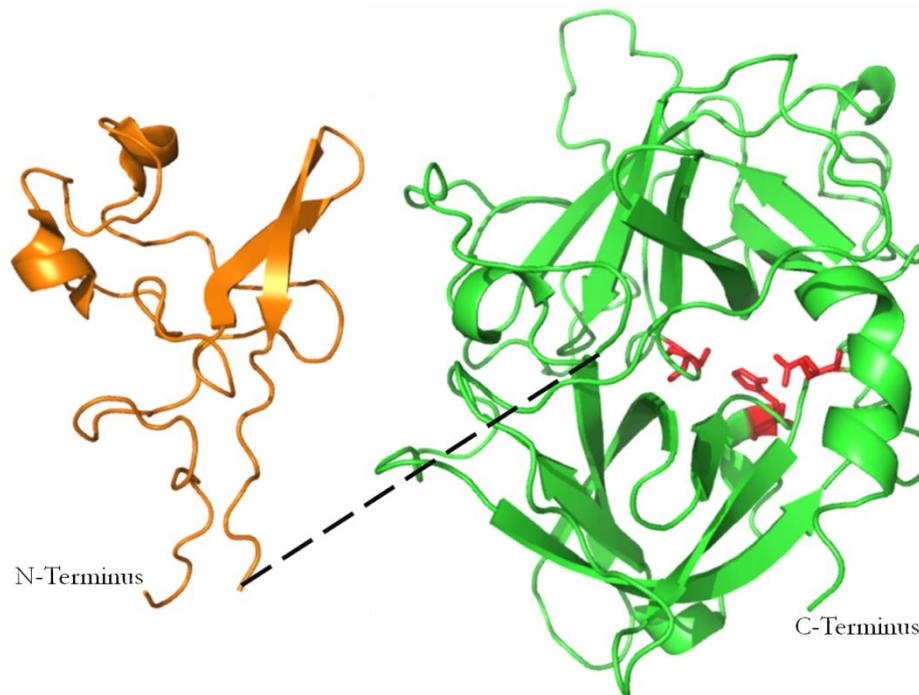


Abb. 1.8: Tertiärstrukturen der Serinproteasedomäne und der Kringel 2-Domäne. Die Tertiärstrukturen für die Kringel 2- (orange) und die Serinprotease-Domäne (grün) sind schematisch dargestellt. Die Bilder wurden aus den Dateien 1PK2.pdb bzw. 1BDA.pdb erstellt. Die Strukturen wurden von Byeon et al., 1991 bzw. Renatus et al., 1997 aufgeklärt. Die gestrichelte Linie stellt die Verbindung zwischen den beiden Domänen dar. Die an der katalytischen Triade im aktiven Zentrum beteiligten Aminosäuren His322, Asp371 und Ser478 sind mit (rot) gekennzeichnet.

Da rPA auch über die Plasminschnittstelle verfügt, kann es wie tPA in die Zweikettenform (tc-rPA) überführt werden, bei der die beiden Domänen nur über eine Disulfidbrücke kovalent verknüpft sind. Die Tertiärstrukturen für die Serinprotease-Domäne und die Kringel 2-Domäne sind in Abb. 1.8 dargestellt. Die Strukturen zeigen einen geringen α -helikalen und relativ hohen β -Faltblattanteil. rPA hat eine molare Masse von 39,6 kDa, die 18 Cysteine bilden im nativen Zustand neun Disulfidbrücken aus, deren korrekte Ausbildung für die enzymatische Aktivität (Obukowicz et al., 1990) essentiell ist.

1.8 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Durch geeignete Lösungsmitteladditive ist es möglich, die Rückfaltungsausbeuten von Proteinen zu erhöhen. Dies kann durch eine Beschleunigung der Faltung in den nativen Zustand, durch eine Unterdrückung der Aggregation oder durch Stabilisierung des nativen Zustands erfolgen.

Ein Beispiel für ein industriell in *E.coli* hergestelltes Protein, welches bei seiner Rückfaltung auf die Anwesenheit von Additiven angewiesen ist, ist der rekombinante Plasminogenaktivator (rPA). Hierbei erwiesen sich Arginin und einige ionische Flüssigkeiten als effektiv.

Da die molekularen Wirkmechanismen von Arginin und von ionischen Flüssigkeiten bisher nur teilweise aufgeklärt sind, sollte mit der vorliegenden Arbeit die begonnene Untersuchung der Wirkung von Arginin (Tischer, 2007) fortgesetzt und auf ionische Flüssigkeiten erweitert werden. Hierbei war insbesondere zu untersuchen, warum EMIMCl teilweise höhere Ausbeuten lieferte als L-Arginin und andererseits EMIMDEP völlig ungeeignet für die Rückfaltung war. Weiterhin sollte der Zustand von Proteinen in Lösungen mit hohen Konzentrationen ionischer Flüssigkeiten untersucht werden. Als Modellproteine für die Untersuchungen wurden rPA und die Zweikettenform tc-rPA verwendet. Vollständig carboxymethyliertes rPA wurde als Modell für den denaturierten Zustand von rPA verwendet.

Abschließend erfolgte mit Hilfe von Transferenergiemessungen eine Untersuchung der Effekte von Arginin, EMIMCl und EMIMDEP auf Aminosäureebene, um eventuelle vorteilhafte Interaktionen zu ermitteln.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

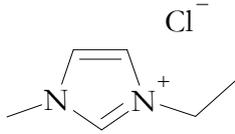
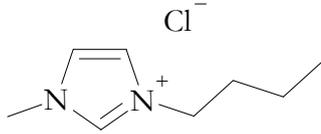
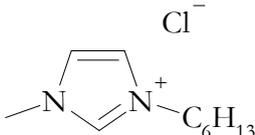
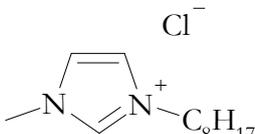
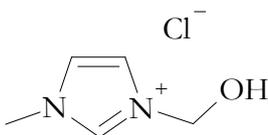
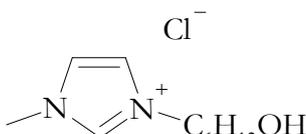
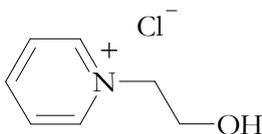
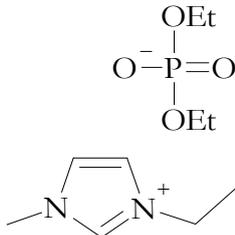
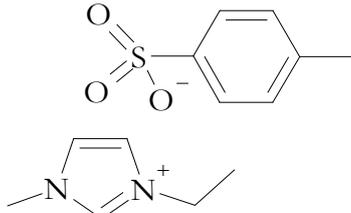
Nachfolgende Chemikalien wurden für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet. Wässrige Lösungen wurden stets mit ddH₂O angefertigt. Die Chemikalien besaßen höchstmögliche Reinheit.

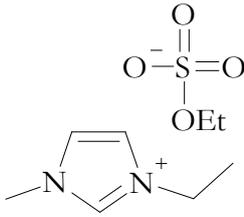
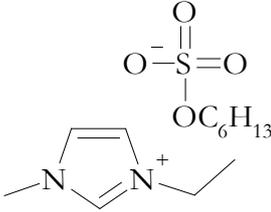
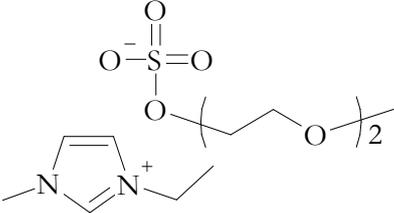
Tab. 2.1: Wichtige verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid 30%/Bisacrylamid 0,8%	Carl Roth, Karlsruhe
Agar Agar	Carl Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Arginin, L-ArgHCl	Sigma Aldrich, Steinheim; Carl Roth, Karlsruhe;
L-Asparagin	Ajinomoto Co., Tokio (Japan) Sigma Aldrich, Steinheim
L-Aspartat (Natriumsalz)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bacitracin	Roche (Mannheim)
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Chromozym tPA	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blau R250	Carl Roth, Karlsruhe
Diketopiperazin (DKP)	Sigma Aldrich, Steinheim
5, 5'-Dithiobis (2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	MP Biomedicals, Eschwege
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	MP Biomedicals, Eschwege
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamat (Natriumsalz)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion reduziert/oxidiert (GSH/GSSG)	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe; Sigma Aldrich, Steinheim
Guanidinhydrochlorid (GuHCl)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg
Guanidiniumbromid (GuHBr)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg
Guanidiniumfluorid (GuHF)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg
Guanidiniumformiat (GuH ₂ COO)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg
Guanidiniumiodid (GuHI)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
Guanidiniumnitrat (GuHNO ₃)	Bioselect Nigu, Waldkraiburg
Guanidiniumthiocyanat (GuHSCN)	Calbiochem, San Diego (USA)
Harnstoff	MP Biomedicals, Heidelberg
Hefeextrakt	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Iodessigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Appllichem, Darmstadt
L-Isoleucin	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Th.Geyer, Renningen
L-Leucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-LysinHCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
L-Methionin	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Amresco, Solon (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Darmstadt
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmono-Oleat (Tween 80)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Serin	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Sigma Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	MP Biomedicals, Eschwege
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, Steinheim; Carl Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Sigma Aldrich, Steinheim
Uranylacetat	Plano, Wetzlar
L-Valin	Sigma Aldrich, Steinheim

Tab. 2.2: Verwendete ionische Flüssigkeiten

Chemikalie	Strukturformel	Hersteller/Vertrieb
EMIMCl (1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid)		Sigma Aldrich, Steinheim; TCl, Tokio (Japan)
BMIMCl (1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid)		Iolitec, Heilbronn
HMIMCl (1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid)		Merck, Darmstadt
OMIMCl (1-Octyl-3-methylimidazoliumchlorid)		Merck, Darmstadt
OH-EMIMCl (1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazoliumchlorid)		Bioselect Nigu, Waldkraiburg
OH-HMIMCl (1-(6-Hydroxyhexyl)-3-methylimidazoliumchlorid)		Merck, Darmstadt
OH-EPyCl (1-(2-Hydroxyethyl)-pyridiniumchlorid)		Degussa GmbH, Essen
EMIMDEP (1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat)		Iolitec, Heilbronn
EMIMOTs (1-Ethyl-3-methylimidazoliumtosylat)		Merck, Darmstadt

Chemikalie	Strukturformel	Hersteller/Vertrieb
EMIMEtSO ₄ (1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat)		Merck, Darmstadt
EMIMHexSO ₄ (1-Ethyl-3-methylimidazoliumhexylsulfat)		Merck, Darmstadt
EMIMMDEGSO ₄ (1-Ethyl-3-methylimidazolium 2(2-methoxyethoxy)-ethylsulfat)		Merck, Darmstadt

Tab. 2.3: Verwendete Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller/Vertrieb
BamHI	NEB, Frankfurt/Main
Benzonase	Merck, Darmstadt
Lysozym aus Hühnerei	Merck, Darmstadt
Plasminogen aus humanem Plasma	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
rPA	Roche, Penzberg
Trypsin	Sigma Aldrich, Steinheim

Tab. 2.4: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Stamm/Plasmid	Referenz	Herkunft
<i>E.coli</i> XL-1 blue	-	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>E.coli</i> K12 C600	Kohnert et al., 1992	Dr. Ulrich Kohnert, Roche, Penzberg
pA27fd7	Stern et al., 1990, Amp ^R	Plasmidsammlung, Prof. Elisabeth Schwarz, MLU Halle Wittenberg
pUBS520	Brinkmann et al., 1989, Kan ^R	

Tab. 2.5: Verwendete Medien für die Zellanzucht

Medium	Zusammensetzung
SOC-Medium	20 g l ⁻¹ Trypton, 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g l ⁻¹ NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
LB-Medium	10 g l ⁻¹ Pepton, 5 g l ⁻¹ Hefeextrakt, 5 g l ⁻¹ NaCl
LB-Agarplatten	LB-Medium, 15 mg ml ⁻¹ Agar Agar

2.1.2 Geräte und Materialien

Nachfolgend werden ausgewählte verwendete Gerätschaften und Materialien tabellarisch aufgeführt. Alle übrigen Geräte entsprachen der Standard-Laboraausstattung.

Tab. 2.6: Ausgewählte Geräte und Materialien

Gerät/Material	Hersteller/Vertrieb
Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung	
AF4-Eclipse2 Separations-System mit Trennkanal	Wyatt Technology, Dernbach
Isokratische Pumpe und Pufferentgasungseinheit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Streulichtdetektor Minidawn Tristar	Wyatt Technology, Dernbach
UV/VIS - Detektor LKB 2151	LKB, Bromma (Schweden)
Gelelektrophorese	
Gelelektrophoreseapparatur SE-250	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Elektrophorese Stromversorgung EPS 200 und 600	Pharmacia Biotech, Cambridge (Großbritannien)
Hoefer Dual Gel Caster	Amersham Biosciences, Piscataway (USA)
RP-HPLC	
Gynkotec-HPLC Anlage mit Autosampler Gina 50, UV-Detektor 170S	Dionex, Idstein
HPLC-Säule Nucleosil 5µ C4 & C8 300Å (250×4 mm)	Phenomenex, Aschaffenburg
Spektroskopie/Spektrometrie	
Avance 750 NMR-Spektrometer	Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten
CD-Spektropolarimeter, Jasco J-810 mit PTC-4235 Peltierelement	Jasco Labor- und Datentechnik, Groß Umstadt
Fluoreszenzspektrofluorometer Fluoromax-3 mit Peltierelement	Horiba Jobin Yvon, München
Q-TOF 2 Massenspektrometer	Micromass, Manchester (Großbritannien)
Tensor 27 FTIR-Spektrometer mit BioATR II-Zelle	Bruker Optics GmbH, Karlsruhe
UV/Vis Spektrophotometer Ultrospec 4000	Pharmacia Biotech, Cambridge (Großbritannien)
Uvikon 942	Kontron Instruments, Neufahrn

Gerät/Material	Hersteller/Vertrieb
Zetasizer nano S	Malvern Instruments, Worchestershire (Großbritannien)
Sonstige Geräte und Materialien	
DMA 60 Densitometer mit DMA 602 H Messzelle	Anton Paar GmbH, Graz, Österreich
Elektronenmikroskop EM 900	Carl Zeiss, Jena
Feinanalysenwaage, Typ KB BA 100	Sartorius, Göttingen
Gaulin Micron Lab 40 Hochdruckhomogenisator	APV, Lübeck
Mikrokalorimeter VP-DSC	Microcal, Northhampton (USA)
Refraktometer	Carl Zeiss, Jena
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turrax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Ultrazentrifuge, Optima TLX, Rotor TLA 100.3	Beckman-Coulter, Fullerton (USA)
Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra-4 & 15, MWCO 10 kDa	Millipore, Schwalbach

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *E.coli* mit den Plasmiden pUBS520 und PA27fd7 wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Hierfür wurde ein Aliquot elektrokompente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl der Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) gegeben. Die Elektroporation wurde anschließend durch Setzen eines kurzen elektrischen Impulses am Elektroporator (Gene Pulser II, Biorad, München) mit einer Spannung von 2,5 kV, einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 400 kΩ durchgeführt. Danach wurden die Zellen in auf 37 °C temperiertem SOC-Medium verdünnt und für ca. 30 Minuten bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde zuletzt auf mit Antibiotika (70 µg ml⁻¹ Kanamycin, 100 µg ml⁻¹ Ampicillin) versetzte LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.2 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmide pA27fd7 und pUBS520, welche freundlicherweise von Prof. Elisabeth Schwarz zur Verfügung gestellt wurden, wurden zunächst in *E.coli* XL1-blue-Zellen transformiert und ausplattiert. Die Amplifikation der Plasmide erfolgte durch Animpfen von 4 × 5 ml LB-Medium

(+70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin) mit *E.coli* XL1-blue-Zellen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Plasmid-DNA mit dem Gene Jet Plasmid Miniprep-Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Vorschrift des Herstellers isoliert.

2.2.1.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Der Verdau von pA27fd7 und von pUBS520 mit der Restriktionsendonuklease BamHI erfolgte ausschließlich für analytische Zwecke. Hierfür wurden 5 – 10 μl Plasmid-DNA mit 2 μl NEB-2 Puffer (NEB, Frankfurt), 2 μl BamHI und mit 11 μl bzw. 6 μl ddH₂O versetzt und für 2 h bei 37 °C und 350 rpm in Eppendorf-Schüttlern inkubiert. Die gespaltene Plasmid-DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Gelelektrophorese analysiert. Hierfür wurden 1 % (w/v) Agarosegele [+ 0,1 % (v/v) einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in 1 \times TAE-Puffer (20 mM Tris/HCl, 40 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8))] verwendet. Die Auftrennung erfolgte für ca. 1 h in 1 \times TAE-Puffer bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 200 mA. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (302 nm).

2.2.2 Expression und Rückfaltung von rPA

2.2.2.1 Expression von rPA in *E.coli* K12 C600

Die rekombinante Herstellung von rPA erfolgte in mit den Plasmiden PA27fd7 und pUBS520 transformierten *E.coli* K12 C600-Zellen in 4 \times 1,5 l LB-Medium bei 37 °C in Schüttelkolben, welche außerdem noch 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin und 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin enthielten. Das LB-Medium wurde im Verhältnis 1:75 mit einer Übernachtskultur angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 wurde die rekombinante Genexpression durch Zugabe von 2,5 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 4 h nach der Induktion durch Zentrifugation (4.000 \times g, 15 min, 4°C) geerntet und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Zur Verfolgung der Expression von rPA wurden vor und nach IPTG-Zugabe Proben aus den Ansätzen entnommen und nach Normierung auf eine OD₆₀₀ von 1 nach dem Protokoll des Herstellers mit Bugbuster (Novagen, Bad Soden) aufgearbeitet.

2.2.2.2 *Inclusion body*-Präparation und Solubilisierung von rPA

Die *inclusion body*-Präparation nach Rudolph et al. (1997) diente der Gewinnung von rPA. Hierfür wurden *E.coli* K12 C600-Zellen in 5 ml pro Gramm Zellen 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 7,0 resuspendiert und mit 1,5 g pro Gramm Zellen Lysozym versetzt und zunächst für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion wurde die zelluläre DNA in der Suspension durch Zugabe von 3 mM CaCl₂ und 10 µg ml⁻¹ Benzonase verdaut (Inkubation 30 min bei 22 °C). Anschließend wurden 0,5 Volumen 6 % (v/v) Triton X-100, 1,5 M NaCl, 60 mM EDTA, pH 7 zugegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die *inclusion bodies* abzentrifugiert (31.000 × g, 10 min bei 4 °C), resuspendiert in 8 ml pro Gramm Zellen 20 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 7 und erneut bei 31.000 × g zentrifugiert. Der Resuspendier- und Waschschrift wurde 6-7 Mal wiederholt. Das fertige *inclusion body*-Pellet wurde bei -20 °C gelagert.

Bei der Solubilisierung wurden 330 mg *inclusion body*-Pellet eingewogen und für 12 h in 33 ml 7,7 M GuHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 inkubiert und am nächsten Tag mit 100 mM DTT versetzt. Nach zweistündiger Inkubation wurde der pH-Wert auf 3 abgesenkt, unlösliche Zellbestandteile bei 10.000 × g (15 min bei 4°C) abzentrifugiert und das DTT durch erschöpfende Dialyse gegen 4 M GuHCl, pH 3 entfernt. Abschließend wurde die Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode (Kapitel 2.2.3.2) bestimmt.

2.2.2.3 Renaturierung von rPA aus solubilierten *inclusion bodies*

Die Analyse der Effekte von Lösungsmitteladditiven erfolgte über die Renaturierung von rPA aus solubilierten *inclusion bodies*. Die Renaturierungsansätze (2 ml Gesamtvolumen) enthielten neben dem Additiv noch 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 sowie 7 mM GSH und 0,7 mM GSSG. Die Renaturierung der solubilierten *inclusion bodies* (825 µg ml⁻¹), vorliegend in 4 M GuHCl, pH 3, erfolgte bei 22 °C durch 1:20 Verdünnung in den jeweiligen Renaturierungspuffer, gefolgt von schnellem Mischen. Anschließend wurde nach bestimmten Zeitintervallen die rPA-Aktivität bestimmt (Kapitel 2.2.3.7).

2.2.3 Proteinchemische und analytische Methoden

2.2.3.1 Natriumdesoxycholat-Fällung von Proteinen

Die Natriumdesoxycholat-Fällung wurde verwendet um Salze (z.B. GuHCl oder EMIMCl), welche die SDS-PAGE stören, aus Proteinlösungen zu entfernen. Hierbei wird das Protein quantitativ durch die Kombination von Natriumdesoxycholat und TCA aus der Lösung ausgefällt (Bensadoun und Weinstein, 1976).

Bei der Fällung wurden 100 μl der salzhaltigen Probe mit ddH_2O auf 1 ml aufgefüllt und mit 100 μl 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat (in ddH_2O) sowie 200 μl 50 % (w/v) TCA versetzt. Das hierbei entstehende Präzipitat wurde abzentrifugiert (16.000 \times g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml Aceton resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Proteinpellet luftgetrocknet und in 40 μl ddH_2O und 10 μl 5 \times SDS-Proben-Puffer solubilisiert.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bradford-Proteinbestimmungsmethode wurde unter anderem verwendet, um die Konzentration von solubilisierten *inclusion bodies* zu bestimmen. Bei dieser Methode bindet Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 1:250 Verdünnung der solubilisierten *inclusion bodies* in 800 μl 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 200 μl Bradford-Reagenz. Über die nach 15 min gemessene pufferkorrigierte Absorption bei 595 nm wurde mit Hilfe einer Lysozym-Kalibriergerade die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.3.3 Inhibierung von rPA mit PMSF

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) ist eine chemische Verbindung, welche durch Sulfonylierung von Serinresten im aktiven Zentrum als Selbstmordsubstrat irreversibel Serinproteasen inhibiert (Gold und Fahrney, 1964).

Um zu überprüfen, ob die enzymatische Aktivität von rPA mit PMSF inhibiert werden kann, wurden 10 μM rPA und 10,6 μM Trypsin als Kontrolle mit maximal 1500-fachem molarem Überschuss an PMSF für 30 min bei 500 rpm und 22 °C in Eppendorf-Schüttlern inkubiert.

Danach wurde die Restaktivität beider Enzyme über die Spaltung von Chromozym-tPA ermittelt und auf die Aktivität in Abwesenheit von PMSF normiert.

2.2.3.4 Plasmin-Spaltung von rPA

Da rPA unter physiologischen Bedingungen einer langsamen Autokatalyse in die Zweikettenform unterliegt, wurde es für eine nähere Charakterisierung der Zweikettenform und um konstante Bedingungen für die Löslichkeitsmessungen zu schaffen, durch Spaltung mit Plasmin in seine Zweikettenform überführt.

Dafür wurden zu der rPA-Stammlösung (ca. 4 mg ml⁻¹) 0,2 % (v/v) einer Plasmin-Stammlösung (7 U gelöst in ddH₂O) hinzugegeben und über Nacht gegen ca. 10 Volumen 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 dialysiert.

Die Vollständigkeit der Spaltung wurde üblicherweise mittels reduzierender SDS-PAGE (Kapitel 2.2.3.5) überprüft.

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine und Proteingemische wurden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mittels reduzierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Bei dieser unter anderem von Laemmli (1970) beschriebenen Methode werden Proteine durch SDS-Bindung und Hitzebehandlung denaturiert und dadurch mit einer ihrer Größe entsprechenden negativen Nettoladung versetzt, wodurch sie im angelegten elektrischen Feld unterschiedliche Laufeigenschaften haben.

Tab. 2.7: Vorschrift für die Herstellung zweier diskontinuierlicher SDS-Gele

	Sammelgel		Trenngel
	6 % (w/v)	12 % (w/v)	15% (w/v)
Acrylamidkonzentration	6 % (w/v)	12 % (w/v)	15% (w/v)
Acrylamid 30 % (w/v)/Bisacrylamid 0,8 % (w/v)	1,2 ml	4 ml	5 ml
4× Puffer (für Sammel- bzw. Trenngel)	1,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
ddH ₂ O	3,3 ml	3,5 ml	2,5 ml
20 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in ddH ₂ O	40 µl	60 µl	60 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin in ddH ₂ O	7 µl	10 µl	10µl

Tab. 2.8: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
5× SDS Laufpuffer	1,25 M Glycin, 17,5 mM SDS, 125 mM Tris/HCl, pH 8,3
5× SDS Proben-Puffer (reduzierend)	5 % (w/v) SDS, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 250 mM Tris/HCl, pH 8
4× SDS Sammelgelpuffer	0,8 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4× SDS Trenngelpuffer	0,8 % (w/v) SDS, 1,5 M Tris/HCl, pH 8
Färbelösung A	10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
Färbelösung B	10 % (v/v) Essigsäure, 10 % (v/v) Isopropanol, 0,005 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
Färbelösung C	10 % (v/v) Essigsäure, 0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure

Es wurden diskontinuierliche SDS-Gele verwendet, bestehend aus einem 12- oder 15 % (w/v) Trenngel und 6 % (w/v) Sammelgelen. Als Referenz diente der LMW-Marker. Nach zufriedenstellender Auftrennung der Proteinproben wurden die SDS-Gele mittels Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Fairbanks et al. (1971) gefärbt und anschließend der Hintergrund entfärbt. Die Vorschrift zur Herstellung der diskontinuierlichen SDS-Gele ist in Tab. 2.7, die nötigen Puffer und Lösungen in Tab. 2.8 aufgeführt.

2.2.3.6 Ellman-Test

Der Ellman-Test wurde verwendet um die Vollständigkeit der Blockierung von Cysteinen mit Iodessigsäure zu überprüfen. Hierfür wurde DTNB eingesetzt, welches spezifisch mit freien Thiolgruppen unter Freisetzung von Thionitrobenzoat-Anionen reagiert und bei 410 nm spektroskopisch detektiert werden kann (Ellman, 1959).

Für die Überprüfung der vollständigen Carboxymethylierung wurde CM-rPA in 1 ml 6 M GuHCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8 auf ca. 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ verdünnt, mit 30 μl DTNB-Lösung (4 mg ml^{-1} in 100 mM Tris/HCl, pH 8) versetzt und nach 15 min Inkubation bei 22 °C die Absorption bei 410 nm bestimmt. Bei vollständiger Modifizierung entsprach diese dem Leerwert.

2.2.3.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten von rPA und tc-rPA

Die Spaltung des Enzymsubstrates Chromozym t-PA diente zur Bestimmung der Aktivitäten von rPA respektive tc-rPA. Es war so möglich, den Anteil an nativ gefaltetem Protein zu ermitteln. Die spektroskopische Quantifizierung erfolgte mittels Absorptionsmessung bei 405 nm. Die Hydrolysereaktion ist in Abb. 2.1 dargestellt.

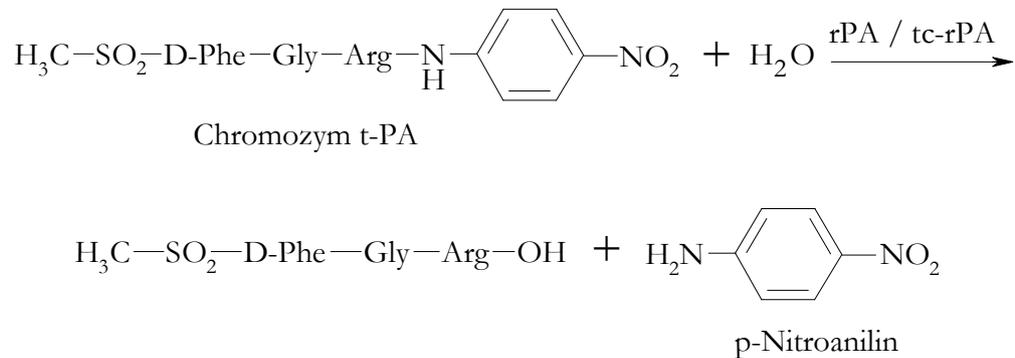


Abb. 2.1: Hydrolyse von Chromozym t-PA durch rPA und tc-rPA. Dargestellt ist das Schema der hydrolytischen Spaltung von Chromozym t-PA. Bei der Reaktion wird p-Nitroanilin freigesetzt, welches bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert werden kann.

Aktivitätsmessungen von rPA und tc-rPA wurden mit einer Substratlösung durchgeführt, welche durch 1:10 Verdünnung der wässrigen 4 mM Chromozym t-PA-Stammlösung in 0,15 % (w/v) Tween 80, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 hergestellt wurde. Üblicherweise wurden 10 µl Proteinlösung in einer geschwärzten Ultra-Mikroküvette vorgelegt und die Kinetik durch Zugabe von 120 µl Substratlösung gestartet. Es wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Die Quantifizierung der Enzymaktivität von rPA bzw. tc-rPA erfolgte mit Hilfe der Anfangsanstiege der Aktivitätskinetiken über selbst erstellte Kalibriergeraden (Abb. 2.2).

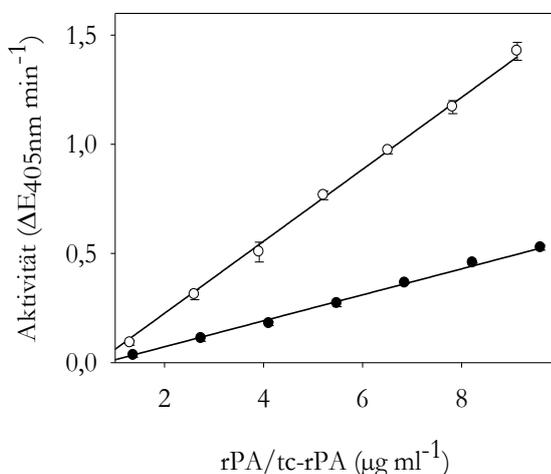


Abb. 2.2: Kalibriergeraden für die Bestimmung der Aktivität von rPA und tc-rPA. Gezeigt ist die Auftragung der proteolytischen Aktivität gegen die Konzentration von nativem rPA (●) bzw. tc-rPA (○).

2.2.3.8 Transmissionselektronenmikroskopie

Um zu überprüfen, ob in EMIMCl aggregiertes tc-rPA möglicherweise fibrilläre Strukturen ausgebildet hat, wurden mit einem EM900-Transmissionselektronenmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena) elektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt. Hierfür wurde die Proteinprobe auf ein kohlebeschichtetes Kupfer-Grid (Plano GmbH, Wetzlar) aufgetragen, welches zuvor mit 0,1 mg ml⁻¹ Bacitracin behandelt wurde. Die Proteinprobe (~ 1 mg ml⁻¹) wurde für 3 min auf dem Grid inkubiert, danach getrocknet, mit Wasser gewaschen und erneut getrocknet. Als Kontrastmittel wurde eine 1 % (w/v) Uranylacetat-Lösung verwendet.

Als Negativkontrolle wurde natives tc-rPA verwendet und analog behandelt. Die TEM-Bilder wurden freundlicherweise von Dr. Gerd Hause (Biozentrum, MLU Halle-Wittenberg) angefertigt.

2.2.3.9 Dynamische Differenzkalorimetrie

DSC-Messungen wurden durchgeführt, um rPA und tc-rPA hinsichtlich ihrer Stabilität zu untersuchen. Hierfür wurden beide Proteine gegen 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 dialysiert und anschließend auf eine Konzentration von ca. 0,5 mg ml⁻¹ eingestellt. Puffer und Proteinlösungen wurden entgast und anschließend in die Messkammern geladen. Es wurde zunächst in beide Messkammern Dialysepuffer geladen, um die Instrumentenbasislinien zu ermitteln und anschließend die Proteinlösung in die Probenzelle geladen. Es wurden Temperaturrampen von 25–95 °C gemessen mit einer Scanrate von 60 °C h⁻¹. Die Temperaturübergangskurven wurden pufferkorrigiert und die gemessenen Wärmekapazitäten anschließend auf die Proteinkonzentration normiert. Aus Darstellungsgründen wurden von den Kurven apparente Basislinien subtrahiert.

2.2.4 Löslichkeitsmessungen

2.2.4.1 Herstellung von dr-rPA und CM-rPA

Für die Herstellung von dr-rPA bzw. CM-rPA wurde natives rPA (Stammlösung mit 4 mg ml⁻¹) zunächst denaturiert und reduziert. Hierfür wurde die Proteinlösung zunächst mit 100 mM DTT versetzt und anschließend für 3-4 Stunden gegen 50-100 Volumen 6 M GuHCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 dialysiert. DTT wurde danach aus der dr-rPA-Lösung durch Dialyse gegen dreimal 50 Volumen 4 M GuHCl, pH 3 entfernt.

Für die Carboxymethylierung der freien Thiolgruppen wurden üblicherweise etwa 3 mg ml^{-1} dr-rPA in vier Volumen 6 M GuHCl , 1 mM EDTA , $100 \text{ mM Borsäure/NaOH}$, pH 9 und $12,5 \text{ mM Iodessigsäure}$ verdünnt und für eine Stunde bei 22 °C unter leichtem Rühren im Dunklen inkubiert (Reddy K et al., 2005). Anschließend erfolgten Dialysen gegen zweimal $5 \text{ l ddH}_2\text{O}$, pH 3. Hierbei präzipitierte CM-rPA quantitativ aus der Lösung, so dass es abzentrifugiert ($10 \text{ min bei } 2700 \times g$) und in geringen Volumen 4 M GuHCl , pH 3 solubilisiert werden konnte. Auf diese Weise war es möglich, relativ hoch konzentrierte Lösungen mit $< 6 \text{ mg ml}^{-1}$ CM-rPA zu erzeugen.

Die Vollständigkeit der Modifikation wurde üblicherweise mittels Ellman-Test (Kapitel 2.2.3.6) überprüft.

2.2.4.2 Herstellung konzentrierter Proteinlösungen

Für Löslichkeitsmessungen verwendete Lösungen mit rPA, tc-rPA und CM-rPA wurden entweder mittels Amicon-Ultra-Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert ($\text{MWCO} = 10 \text{ kDa}$) oder alternativ – im Falle von tc-rPA – durch erschöpfende Dialyse gegen 1 mM EDTA und 20 oder $50 \text{ mM Borsäure/NaOH}$, pH 8,5 ausgefällt. Das ausgefallene Protein wurde für $10 \text{ min bei } 16.000 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet anschließend in geringen Volumen 1 M L-ArgHCl oder $4,5 \text{ M EMIMCl}$, 1 mM EDTA , $100 \text{ mM Borsäure/NaOH}$, pH 8,5 solubilisiert.

2.2.4.3 Löslichkeitsmessungen mit rPA, tc-rPA und CM-rPA

Die Löslichkeit von rPA, tc-rPA und CM-rPA in Additiven wurde bestimmt, um Aufschluss über den Wirkmechanismus der Additive auf Proteine zu erhalten. Für die Löslichkeitsmessungen wurden die Proteine mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert und anschließend für 48 h (L-ArgHCl , NaCl+Glycin) bzw. 120 h (EMIMCl , EMIMDEP , HMIMCl) bei 4 °C gegen $100 \text{ mM Borsäure/NaOH}$ oder Tris/HCl , pH 8,5, 1 mM EDTA und entsprechende molare Konzentrationen an Additiv dialysiert.

Die Bestimmung der Löslichkeit erfolgte mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie (Kapitel 2.2.5.1) nach Abzentrifugieren ($150.000 \times g$, 4 °C und 20 min für rPA und tc-rPA bzw. 1 h für CM-rPA) und Verdünnen des Überstandes in 1 M L-ArgHCl , 1 mM EDTA , $100 \text{ mM Borsäure/NaOH}$, pH 8,5 für natives rPA und tc-rPA bzw. in 4 M GuHCl , pH 3 für CM-rPA.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den gemessenen Löslichkeiten um Gleichgewichtswerte handelt, wurden CM-rPA und tc-rPA zunächst per erschöpfender Dialyse für 24 h in Aggregate

überführt und anschließend gegen die oben beschriebenen Puffer dialysiert. Die Überführung in Aggregate erfolgte durch Entfernen des Additivs aus der Lösung (1 M L-ArgHCl bei tc-rPA; 4 M GuHCl bei CM-rPA).

2.2.4.4 Messung von Löslichkeitskinetiken

Die Messung von Löslichkeitskinetiken mit tc-rPA bzw. CM-rPA in niedrigen EMIMCl-Konzentrationen erfolgte analog zu der oben beschriebenen Prozedur durch Dialyse gegen 200 Volumen Puffer und Additiv. Bei der Messung von Löslichkeitskinetiken in Gegenwart von 5 M bzw. 6 M EMIMCl wurde tc-rPA, vorliegend in Puffer mit 3 M EMIMCl, gegen 60 Volumen Lösung dialysiert und nach bestimmten Zeiten ultrazentrifugiert ($150.000 \times g$, 4°C und 20 min). Der Überstand wurde zum einen 1:200 in 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 verdünnt, 1 h unter leichtem Schütteln bei 22°C inkubiert und erneut ultrazentrifugiert und zum anderen 1:200 in 7 M GuHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 verdünnt. Mit dieser Prozedur wurde die Konzentration an nativem tc-rPA und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt.

2.2.4.5 Oszillationsdensitometrie

Die Dichte von Lösungen wurde mittels Oszillationsdensitometrie bestimmt. Bei dieser Methode, welche nach dem Biegeschwingerprinzip funktioniert (Kratky et al., 1973), kommt ein hohler U-förmiger Glasoszillator zum Einsatz, welcher in einen Glashohlkörper eingebettet ist. Dieser Oszillator wird elektronisch zu einer ungedämpften Eigenschwingung angeregt, welche von der Masse des Oszillators abhängt. Die Periode der Schwingung ist proportional zu dieser Masse. Es ist daher möglich, aus den bekannten Dichten von Wasser und von Luft einen gerätespezifischen Proportionalitätsfaktor zu errechnen, mit welchem aus der Periode der Schwingung für eine Lösung mit unbekannter Dichte selbige errechnet werden kann.

Für die Bestimmung der Dichte einer Lösung wurden daher zunächst die Perioden von Luft und ddH₂O ermittelt. Der Proportionalitätsfaktor k ergibt sich aus:

$$k = \frac{\rho_{\text{H}_2\text{O}} - \rho_{\text{Luft}}}{T_{\text{H}_2\text{O}}^2 - T_{\text{Luft}}^2} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Dabei ist ρ die Dichte (in g cm^{-3}) und T die Periode der Eigenschwingung des Oszillators in kHz. Mit Hilfe von k lässt sich über Gleichung 2.2 die Dichte einer unbekanntes Lösung bestimmen:

$$\rho = k * (T_{Luft}^2 - T_{Lösung}^2)$$

Gleichung 2.2

Da die Dichten von Luft und von wässrigen Lösungen von der Temperatur abhängig sind, wurden alle Dichtemessungen bei 25 °C durchgeführt. Die Proportionalitätskonstante wurde jeweils im Vorfeld der eigentlichen Messungen bestimmt.

2.2.4.6 Bestimmung der Löslichkeit von Aminosäuren mittels Oszillationsdensitometrie

Löslichkeitsmessungen einzelner Aminosäuren wurden gemäß der Prozedur durchgeführt, wie sie von Nozaki und Tanford (1963), Liu und Bolen (1995) sowie von Auton und Bolen (2004) beschrieben wurde. In Gefäße mit festgelegtem Volumen an ddH₂O und Additiv wurden definierte Mengen einer Aminosäure eingewogen, um so eine Reihe von Mischungen mit steigendem Massenanteil der Aminosäure zu erhalten. Die Zusammensetzung der Mischungen wurde üblicherweise so gewählt, dass etwa die Hälfte gesättigt und die andere Hälfte ungesättigt vorlag.

Anschließend wurden die Mischungen für mindestens 48 h bei 25 °C unter leichtem Schütteln in einem Rotationswasserbad oder in Eppendorf-Schüttlern inkubiert. Danach wurde die Dichte der Lösungen bei 25 °C mit einem DMA-602 Densitometer (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) bestimmt. Dafür wurden die Lösungen entweder für 1 min bei 16.000 × g abzentrifugiert und injiziert oder durch Glasfaser-Spritzenvorsatzfilter direkt in den Glasoszillator des Densitometers gegeben. Die Dichte der Lösungen wurde üblicherweise aus fünf Messungen ermittelt (siehe Kapitel 2.2.4.5).

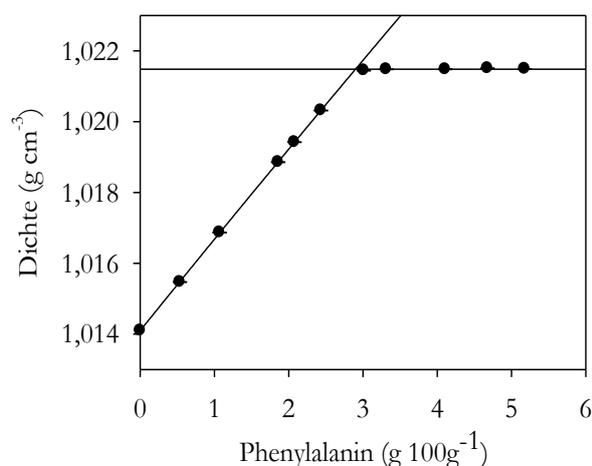


Abb. 2.3: Bestimmung der Löslichkeit mittels Oszillationsdensitometrie. Am Beispiel von Phenylalanin in 1M EMIMCl ist das Verfahren zur Bestimmung der Löslichkeit gezeigt. Die Dichten der Überstände wurden densitometrisch ermittelt (●) und die Löslichkeit über den Schnittpunkt der Kurvenäste im gesättigten bzw. ungesättigten Bereich bestimmt.

Die maximale Löslichkeit wurde ermittelt, indem – wie in Abb. 2.3 gezeigt – die Menge an eingewogener Aminosäure gegen die gemessene Dichte aufgetragen und der Schnittpunkt der Kurvenäste für die gesättigten bzw. die ungesättigten Lösungen bestimmt wurde.

Aus den ermittelten Löslichkeiten ließen sich die freien Transferenergien der Aminosäuren von Wasser in 1 M Additiv berechnen (siehe Kapitel 2.2.4.7). Für Tyr und Trp wurde zumeist auf eine Messung von Dichten verzichtet. Stattdessen wurde die Tyr- bzw. Trp-Konzentration mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bestimmt.

Dafür wurden für Tyr und Trp spezifische Extinktionskoeffizienten von $7,0644 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ bzw. $27,861 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ verwendet (Gill und von Hippel, 1989). Alle Messungen wurden pufferkorrigiert.

2.2.4.7 Berechnung der freien Transferenergien aus Löslichkeitsmessungen

Aus Löslichkeitsmessungen von Proteinen oder einzelnen Aminosäuren lassen sich die Effekte von Additiven über die Berechnung der Veränderung der freien Transferenergien vom Feststoff zum gelösten Zustand ($\Delta G_{\text{Transfer}}$) quantifizieren. So ist es möglich festzustellen, ob der Transfer einer Komponente in eine Lösung mit Additiv vorteilhaft ist oder nicht. Die Veränderung der freien Transferenergie ergibt sich wie folgt:

$$\Delta G_{\text{Transfer}} = -RT \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Hierbei ist R die universelle Gaskonstante in $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T die Temperatur in K, S die gemessene Löslichkeit in Anwesenheit und S_0 die Löslichkeit in Abwesenheit des Additivs. Die Löslichkeiten wurden stets als Molalitäten (mol kg^{-1} Lösung) in Gleichung 2.3 eingesetzt.

Als Referenzlöslichkeiten wurden die von Liu und Bolen (1995) in Wasser gemessenen Werte verwendet (siehe Anhang, Tab. 6.8).

2.2.5 Spektroskopische und spektrometrische Methoden

2.2.5.1 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

Mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie wurden tc-rPA, CM-rPA, Tyr und Trp quantifiziert. Hierfür wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und über das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 2.4) die Konzentration berechnet.

$$E = \epsilon * c * d \quad \text{Gleichung 2.4}$$

Dabei ist E die gemessene Extinktion, ϵ der molare Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c die Proteinkonzentration in M und d die Schichtdicke in cm.

Molare Extinktionskoeffizienten für denaturierte Proteine lassen sich nach Gleichung 2.5 aus der Anzahl der Trp (n_{Trp}), Tyr (n_{Tyr}) sowie Cystine ($n_{Cys-Cys}$) berechnen (Gill und von Hippel 1989).

$$\epsilon_{280\text{ nm}} = (5690 * n_{Trp} + 1280 * n_{Tyr} + 120 * n_{Cys-Cys}) \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden für tc-rPA, CM-rPA, Tyr bzw. Trp auf das jeweilige Molekulargewicht bezogen und sind in Tab. 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.9: Verwendete Extinktionskoeffizienten

Protein/Substanz	Extinktionskoeffizient (cm ² mg ⁻¹)
rPA/tc-rPA	1,704
CM-rPA	1,676
Trypsin	1,29
BSA	0,667
Tyr	7,064
Trp	27,861

Für die Quantifizierung mittels UV/Vis-Absorptionsspektroskopie wurden üblicherweise geschwärzte Ultra-Mikro-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Alle gemessenen Extinktionen wurden pufferkorrigiert.

2.2.5.2 Refraktometrische Bestimmung von GuHCl-, EMIMCl-, EMIMDEP- und L-ArgHCl-Konzentrationen

Die Konzentration von wässrigen GuHCl-, EMIMCl-, EMIMDEP- und L-ArgHCl-Lösungen wurde mit Hilfe eines Refraktometers und folgender empirisch ermittelter Gleichungen bestimmt:

$$C_{GuHCl} = 57,147 * (\Delta N) + 38,68 * (\Delta N)^2 - 91,6 * (\Delta N)^3 \quad \text{Gleichung 2.6*}$$

$$C_{EMIMCl} = 2,231e^{-2} * (\Delta N) + 1,109e^{-3} * (\Delta N)^2 - 8,190e^{-5} * (\Delta N)^3 \quad \text{Gleichung 2.7}$$

$$C_{EMIMDEP} = 3,482e^{-2} * (\Delta N) + 2,476e^{-3} * (\Delta N)^2 - 7,313e^{-4} * (\Delta N)^3 \quad \text{Gleichung 2.8}$$

$$C_{L-ArgHCl} = 3,997e^{-2} * (\Delta N) - 4,344e^{-3} * (\Delta N)^2 + 6,426e^{-5} * (\Delta N)^3 \quad \text{Gleichung 2.9}$$

*aus Nozaki, 1972

2.2.5.3 Streulichtmessungen

Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation in L-ArgHCl und EMIMCl wurde an einem Fluoromax 3 Spektrofluorimeter (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, NJ) untersucht. Alle Messungen wurden bei 20 °C mit einer Fluoreszenzküvette mit Sternrührer durchgeführt. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge betrug jeweils 600 nm.

Die bei den Messungen verwendeten Puffer wurden unmittelbar vorher gefiltert, Proteinlösungen wurden abzentrifugiert ($150.000 \times g$ für 20 min bei 4 °C).

Die Aggregation von rPA, dr-rPA, CM-rPA und tc-rPA wurde durch 1:22 Verdünnung in Puffer mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 oder 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und entsprechenden molaren Konzentrationen an EMIMCl bzw. L-ArgHCl initiiert. Die Messung der Aggregation von dr-rPA erfolgte in Gegenwart von 10 mM DTT, um eine Aggregation durch kovalente Disulfidverbrückung zu vermeiden.

Aus den gemessenen Aggregationskinetiken wurden die Anfangsanstiege ermittelt und doppelt logarithmisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Aus dem Anstieg einer solchen Auftragung lässt sich die apparente Ordnung einer Reaktion bestimmen.

Dies ist möglich, da für eine Reaktion der Form



folgende Gesetzmäßigkeit gilt:

$$\left(\frac{dB}{dt}\right)_0 = k * A_0^n \quad \text{Gleichung 2.10}$$

Hierbei ist $\left(\frac{dB}{dt}\right)_0$ die initiale Änderung des Lichtstreusignals, k die Geschwindigkeitskonstante für die Aggregation, A_0 die Proteinkonzentration zu Beginn des Aggregationsprozesses und n die apparente Reaktionsordnung. Durch ein Logarithmieren von Gleichung 2.10 erhält man eine Geradengleichung mit dem Anstieg n :

$$\log\left(\frac{dB}{dt}\right)_0 = \log k + n * \log A_0 \quad \text{Gleichung 2.11}$$

Dies gestattet eine Berechnung der apparenten Reaktionsordnung für die Aggregation.

2.2.5.4 Circular dichroismus

Circular dichroismus-Spektren und Kinetiken wurden im Nah-UV-Bereich (260 – 340 nm) an einem Jasco J-810 Spektropolarimeter bei 20 °C gemessen. Die gemessene Elliptizität Θ (in mdeg) wurde pufferkorrigiert und nach Gleichung 2.12 auf die molare residuelle Elliptizität

$[\Theta]_{MRW}$ (in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) umgerechnet (Kelly et al., 2005). Dabei ist MRW die mittlere molare Masse einer Aminosäure im Protein (in g mol^{-1}), c die Proteinkonzentration (in mg ml^{-1}) und d die Schichtdicke der Küvette (in cm).

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta * MRW}{10 * c * d} \quad \text{Gleichung 2.12}$$

CD-Signale wurden mittels Photomultiplier detektiert, bei welchem mit sinkender Lichtintensität die Detektionsempfindlichkeit durch Erhöhung der Verstärkerspannung verbessert wird. Messwerte mit einer Verstärkerspannung von mehr als 600 V wurden nicht ausgewertet.

2.2.5.4.1 Messung von CD-Spektren im Nah-UV-Bereich

Die Messung von Nah-UV-CD-Spektren von tc-rPA in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und verschiedenen EMIMCl-Konzentrationen erfolgte mit einer Proteinkonzentration von $3,4 \text{ mg ml}^{-1}$ in einer 1 mm Quarzglasküvette. Die Spektren wurden $64 \times$ akkumuliert. Bei den Messungen betrug die Scangeschwindigkeit 100 nm min^{-1} , die Schrittweite 0,2 nm, die Integrationszeit und die Bandbreite jeweils eine Sekunde. Die CD-Spektren wurden um die CD-Signale des entsprechenden Dialysepuffers korrigiert.

2.2.5.4.2 Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge von tc-rPA im Nah-UV-CD-Bereich

Zur Messung von Denaturierungsmittel-induzierten Übergängen von tc-rPA in EMIMCl, EMIMDEP und GuHCl wurde eine konzentrierte tc-rPA-Lösung in 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH bzw. Tris/HCl, pH 8,5 mit ansteigenden EMIMCl, EMIMDEP bzw. GuHCl-Konzentrationen verdünnt und nach 24 Stunden Inkubation Kinetiken bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen. Hierbei wurde für die Messungen in EMIMCl bzw. EMIMDEP eine 0,5 mm Quarzglasküvette und für die Messungen in GuHCl eine 1 cm Makro-Quarzglasküvette verwendet. Jeder Datenpunkt wurde 10 min (für tc-rPA in EMIMCl und GuHCl) bzw. 20 Minuten (für EMIMDEP) akkumuliert und anschließend über die gesamte Zeit integriert. Die Integrationszeit betrug 4 und die Schrittweite 5 Sekunden.

2.2.5.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde verwendet, um den Oligomerisierungszustand von tc-rPA und CM-rPA in hohen EMIMCl- und EMIMDEP-Konzentrationen zu analysieren. Weiterhin wurden Aggregationskinetiken gemessen, bei welchen die Proteinkonzentration variiert

wurde, um so Hinweise auf die Reaktionsordnung der Aggregation von tc-rPA und CM-rPA zu erhalten.

Bei der DLS werden Intensitätsfluktuationen im Streulicht analysiert, welche durch die Brownsche Molekularbewegung von Partikeln verursacht werden. Dabei wird mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion $g^2(\tau)$ der Form (Friskens, 2001)

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{Gleichung 2.13}$$

die Änderung des Streulichtintensitätsmusters zwischen verschiedenen Zeitpunkten t und $t+\tau$ miteinander korreliert. Diese Korrelation klingt mit der Zeit in Abhängigkeit vom Diffusionskoeffizienten der Partikel ab. Aus diesem Abklingen ist es möglich, die intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung und den intensitätsgewichteten mittleren hydrodynamischen Partikeldurchmesser (z-Mittelwert, M_z) zu berechnen. Mit Hilfe der Mie-Korrektur (Mie, 1908) lassen sich anschließend aus der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung die volumengewichteten und nummerngewichteten Partikelgrößenverteilungen berechnen.

Der Zusammenhang zwischen der Partikelgeschwindigkeit und der Partikelgröße ist durch die Stokes-Einstein-Gleichung (Einstein, 1905) gegeben:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad \text{Gleichung 2.14}$$

Diese besagt, dass der Diffusionskoeffizient umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius eines Partikels ist. Dabei ist in Gleichung 2.14 D der Diffusionskoeffizient, k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die Viskosität der Lösung und r der hydrodynamische Partikelradius.

DLS-Messungen wurden an einem Zetasizer nano S (Malvern Instruments, Worchestershire, Großbritannien) mit Hilfe eines HeNe-Lasers ($\lambda = 633 \text{ nm}$) durchgeführt.

Für die Messung von Aggregationskinetiken von tc-rPA und CM-rPA wurden beide Proteinvarianten aufkonzentriert und anschließend für 48 h bei 22 °C gegen 4,5 M EMIMCl, 1mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 (tc-rPA) bzw. 4 M GuHCl, pH 3 (CM-rPA) dialysiert. Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation von tc-rPA und CM-rPA wurde durch 1:2,5 Verdünnung (tc-rPA) bzw. 1:10 Verdünnung (CM-rPA) in 6 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 gestartet. Es wurden Kinetiken mit 20 bis 30 Datenpunkten gemessen. Pro Datenpunkt wurden 13 – 16 Messungen mit je 10 Sekunden Messdauer akkumuliert. Alle verwendeten Puffer und die Proteinlösung wurden zuvor bei $150.000 \times g$ für 20 min und bei 20 °C abzentrifugiert.

Da die Viskositäten der Lösungen nicht exakt messbar waren, wurden sie so eingestellt, dass der erste z-Mittelwert-Datenpunkt mit 5,7 nm dem theoretischen hydrodynamischen Durchmesser eines globulären, 39,5 kDa schweren Proteins entsprach. Für die Aggregationsmessungen von CM-rPA in EMIMCl wurde die Viskosität analog durch Normierung mit tc-rPA in demselben Puffer vorgenommen. Aus der Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Proteinaggregation wurde analog zu den Streulichtmessungen (Kapitel 2.2.5.3) die Reaktionsordnung der initialen Aggregationsreaktion bestimmt.

2.2.5.6 Messung von GuHCl-induzierten Übergangskurven mittels Fluoreszenz

Es wurden GuHCl-induzierte Übergangskurven von rPA, tc-rPA und CM-rPA gemessen, um unter anderem den Einfluss der Plasminspaltung auf die Stabilität des Proteins bzw. die Eignung von CM-rPA als Modellsystem für den denaturierten Zustand zu untersuchen. Für die Denaturierung wurden rPA, tc-rPA bzw. CM-rPA vorliegend in 1M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 bzw. in 4 M GuHCl, pH 3, 1:100 in 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl und ansteigende Konzentrationen GuHCl verdünnt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 22 °C inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzemissionsspektren erfolgte an einem Fluoromax 3 – Fluoreszenzspektrometer (Horiba Jobin Yvon Inc., Edison, USA) bei 20 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Spektren wurden von 290 – 440 nm gemessen und dreimal akkumuliert. Die Spaltbreiten für die Anregung und die Emission betragen 2 und 5 nm bzw. 5 und 5 nm, die Integrationszeit betrug 1 s und die Schrittweite 1 nm. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

2.2.5.7 Festkörper-NMR Spektrometrie

Festkörper-NMR-Messungen wurden mit präzipitiertem nativem tc-rPA (15 mg), CM-rPA (12 mg) und mit in 5,4 M EMIMCl-denaturiertem tc-rPA (11,5 mg) an einem Avance 750 NMR-Spektrometer (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinproben dreimal bei 4 °C gegen ca. 200 Volumen 1 mM EDTA, 50 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 dialysiert und die Präzipitate anschließend für 10 min bei $16.000 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert. Die Proteinpräzipitate wurden in kleine Messröhrchen transferiert. Es wurden ¹³C-NMR-Spektren aufgenommen. Die CP-MAS (*cross polarization – magic angle spinning*) – Frequenz betrug 7 kHz. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Holger Scheidt (Medizinische Fakultät der Universität Leipzig) durchgeführt.

2.2.5.8 IR-Spektroskopie

ATR-FTIR-Messungen wurden an einem Tensor 27 FTIR-Spektrometer (Bruker Optics GmbH, Karlsruhe) mit einer BioATR II-Zelle durchgeführt. tc-rPA wurde aufkonzentriert und gegen 100 Volumen 4,5 M EMIMCl bzw. gegen 250 Volumen 1 M EMIMCl und 50 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 dialysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden ATR-FTIR-Spektren von 4000 – 1000 cm^{-1} gemessen. Hierbei wurden 64 Einzelspektren akkumuliert, welche um die Beträge der jeweiligen Dialysepuffer korrigiert wurden. Die Kinetik von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl wurde durch 1:2,5 Verdünnung von tc-rPA, vorliegend in 4,5 M EMIMCl in Puffer mit 6 M EMIMCl gestartet. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Spektrometersoftware Opus 5.5. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Julian Ollesch (Max-Planck-Forschungsstelle für die Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) vorgenommen.

2.2.5.9 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen von mittels RP-HPLC entsalzten Proteinproben wurden mittels ESI-Q-TOF-Massenspektrometrie an einem Q-TOF 2 Massenspektrometer (Micromass, Manchester, Großbritannien) durchgeführt. Dies erfolgte freundlicherweise durch Dr. Angelika Schierhorn (Max-Planck-Forschungsstelle für die Enzymologie der Proteinfaltung, Halle).

2.2.6 Chromatographische Methoden

2.2.6.1 Reversed Phase - HPLC

Mittels RP-HPLC wurden unter anderem Proteinlösungen entsalzt und so für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Dafür wurden C4- oder C8-Säulen an einer HPLC-Anlage verwendet. Als Laufmittel kamen ddH_2O mit 0,1 % (v/v) TFA (Laufmittel A) und ein 1:1 Gemisch aus ACN und Isopropanol mit 0,1 % (v/v) TFA (Laufmittel B) zum Einsatz. Die Flussrate betrug $0,7 \text{ ml min}^{-1}$, der Gradient betrug üblicherweise entweder 0,5 oder 2 % (v/v) Laufmittel B min^{-1} .

2.2.6.2 Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung

Asymmetrische Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) wurde verwendet, um den Einfluss von L-ArgHCl auf die Aggregation von rPA und CM-rPA zu untersuchen.

Mittels AF4 können sowohl Proteine als auch große Partikel wie Virenpartikel oder Polymere ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Die Trennung findet hierbei in einem Kanal statt, welcher auf einer Seite eine Membran besitzt, durch welche die Trägerflüssigkeit den Kanal zusätzlich zur Auslassöffnung verlassen kann. Durch diesen zusätzlichen Querfluss wird ein regulierbares „Kraftfeld“ erzeugt, welches eine Verteilung von Partikeln entsprechend ihrer molaren Masse ermöglicht. Durch Anlegen eines parabolischen Flussprofils werden dann kleine Partikel, welche sich weiter in der Mitte des Kanals befinden, eher eluiert als größere Partikel, die sich nahe der Akkumulationswand sammeln.

In Kombination mit einem UV- und einem MALS-Detektor ist es mit dieser Methode möglich, das intensitätsgewichtete Mittel der molaren Massen (M_z) zu messen und daraus die anderen Molmassenmomente (M_w und M_n) zu bestimmen.

AF4-Messungen wurden an einem Wyatt Eclipse 2 Separationssystem (Wyatt Technology, Dernbach), gekoppelt mit einer isokratischen HPLC-Pumpe mit Entgaser (Agilent Technologies, Palo Alto, USA), durchgeführt. Die Kanalhöhe betrug 490 μm , die verwendete Membran bestand aus regenerierter Zellulose mit einem MWCO von 10 kDa. Die Detektion von Proteinen erfolgte mit Hilfe eines LKB 2152 UV-Detektors (LKB, Bromma, Schweden) und eines Mini Dawn Tristar MALS-Detektors (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA).

Für die Experimente wurden rPA und CM-rPA gegen 200 Volumen 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 100 mM, 200 mM oder 500 mM L-ArgHCl dialysiert. Um Aggregate aus den Lösungen zu entfernen, wurden die CM-rPA-Proben zunächst für 30 min, 4 °C bei $16.000 \times g$ und anschließend erneut für 1 h bei $150.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt. Die Proben wurden über eine 100 μl Probenschleife in den Trennkanal geladen. Als Laufmittel wurden die mit 0,1 μm Membranfiltern filtrierten Dialysepuffer eingesetzt. Der Injektionsfluss betrug $0,2 \text{ ml min}^{-1}$, der Kanalfluss 1 ml min^{-1} , der Fokusfluss betrug $0,75 \text{ ml min}^{-1}$ und der Querfluss während der Elutionsphase 2 ml min^{-1} . Die AF4-Messungen bestanden aus einer initialen Elutionsphase, einer Fokussierphase, deren Dauer zwischen 3 und 180 min betrug, und einer bis zu 120 min langen Elutionsphase. Für die Bestimmung der molaren Massen aus den UV- und MALS-Signalen wurde BSA als Molmassenstandard verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Rekombinante Herstellung von rPA

3.1.1 Expression und *inclusion-body*-Präparation

Der rekombinante Plasminogenaktivator rPA wurde in dieser Arbeit als Modellsystem verwendet, um die Effekte von Lösungsmitteladditiven auf die Renaturierung und die Löslichkeit des Proteins zu untersuchen. Um die von Buchfink et al. (2010) für denaturiertes, reduziertes rPA gezeigte Wirkung von Lösungsmitteladditiven wie L-ArgHCl oder ionischen Flüssigkeiten bei der Rückfaltung unter für die oxidative Rückfaltung typischen Bedingungen zu untersuchen, wurde rPA rekombinant in *E.coli* in Form von intrazellulären unlöslichen *inclusion bodies* hergestellt. Weiterhin konnte so untersucht werden, ob durch Kombination von Lösungsmitteladditiven, beispielsweise von L-ArgHCl mit einer ionischen Flüssigkeit, höhere Ausbeuten an nativem rPA bei der Rückfaltung erzielt werden können.

Für die rekombinante Herstellung von rPA in *inclusion bodies* wurden elektrokompente *E.coli* K12 C600-Zellen mit dem Plasmid pUBS520 (Brinkmann et al., 1989) und dem für rPA codierenden Plasmid PA27fd7 (Kohnert et al. 1992) transformiert und in insgesamt 6 l LB-Vollmedium in Schüttelkolben kultiviert.

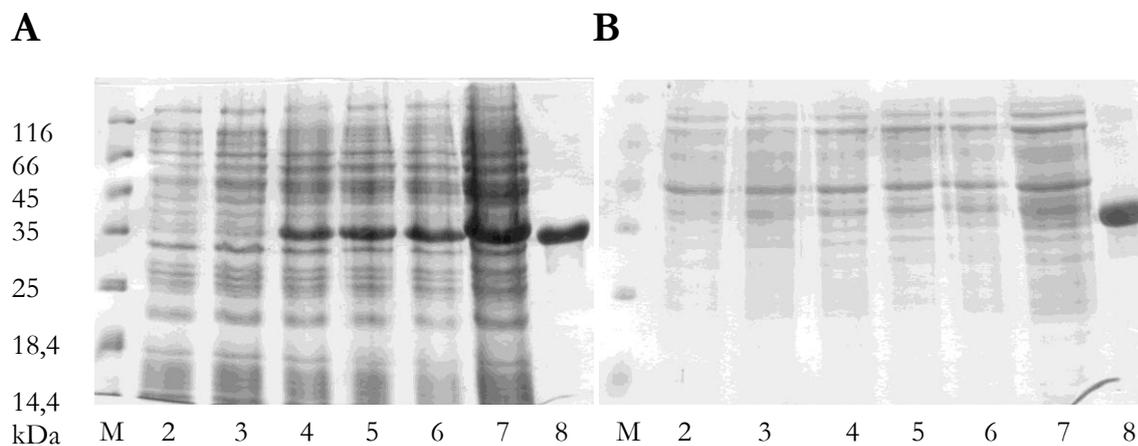


Abb. 3.1: Rekombinante Herstellung von rPA in *E.coli* K12 C600. (A und B) Unlösliche und lösliche Fraktion nach Zellaufschluss. Bahnen: M: LMW-Marker, 2: $t = 0$ h, 3: $t = 3$ h, 4-7: 1, 2, 3 und 4 Stunden nach Induktion mit 2,5 mM IPTG, 8: Referenz rPA. Zur Präparation der Proben wurden die Zellen vor Zellaufschluss auf eine OD_{600} von 1 eingestellt, so dass alle Proben etwa denselben Proteingehalt aufwiesen.

Die Induktion der rekombinanten Proteinproduktion erfolgte zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase mit 2,5 mM IPTG. Vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen (ca. 25 g

Biofeuchtmasse) geerntet. Die Zunahme an rekombinantem Protein während der Expression wurde mittels reduzierender SDS-PAGE verfolgt (Abb. 3.1 A und B).

Es war zu erkennen, dass rPA mit ca. 40 kDa ausschließlich in der unlöslichen Fraktion vorlag, weshalb sich der Expression eine *inclusion body*-Präparation anschloss (Abb. 3.2). Hierbei wurden die *E.coli*-Zellen mittels Hochdruckdispersion aufgeschlossen, die DNA verdaut und Membranbestandteile durch Waschen mit Triton X-100 Puffer entfernt. Das *inclusion body*-Pellet (ca. 2,1 g) wurde solubilisiert und nach Entfernen des DTT bei -20 °C gelagert.

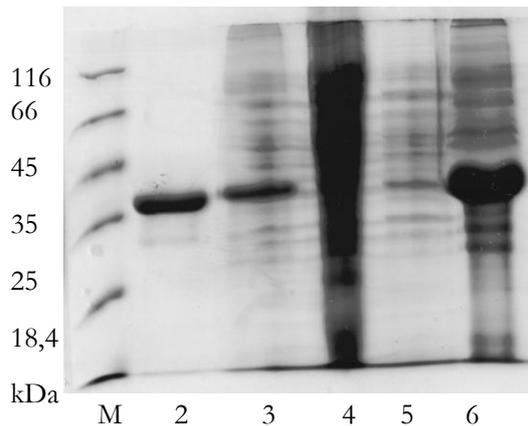


Abb. 3.2: *Inclusion body*-Präparation von rPA. Dargestellt ist ein reduzierendes SDS-Gel mit Proben von verschiedenen Schritten der *inclusion body*-Präparation. Bahnen: 1: LMW-Marker, 2: Referenz rPA (5 µg), 3: solubilisierte *inclusion bodies* (ca. 10 µg), 4: homogenisierte Zellen nach Hochdruckdispersion, 5 und 6: Überstand bzw. Pellet nach erstem Triton X-100-Waschschritt.

3.1.2 Rückfaltung von rPA aus solubilisierten *inclusion bodies*

Da es sich bei rPA um ein sehr schlecht lösliches und stark Disulfid-verbrücktes Protein handelt, war es erforderlich, eine Rückfaltung in Gegenwart von Lösungsmitteladditiven wie L-ArgHCl und eines Redox-Shuffling-Systems durchzuführen (Stern et al., 1990).

Buchfink et al. (2010) konnten zeigen, dass neben L-ArgHCl auch ionische Flüssigkeiten wie EMIMCl für die Rückfaltung von denaturiert reduziert vorliegendem rPA (dr-rPA) geeignet sind und dass sich bei höheren molaren EMIMCl-Konzentrationen sogar höhere Rückfaltungsausbeuten als mit L-ArgHCl erzielen lassen. Da diese Experimente aber mit industriell hergestelltem und gereinigtem rPA, welches in die denaturierte reduzierte Form überführt worden war, durchgeführt wurden, sollten die Ergebnisse nun mit rPA, welches aus *inclusion bodies* solubilisiert wurde, bestätigt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich möglicherweise die Kinetiken der Rückfaltung von rPA in den getesteten Additiven unterscheiden. Es wurden daher Rückfaltungskinetiken für rPA in 1 M L-ArgHCl, 1 M EMIMCl, 1 M EMIMDEP und 1 M NaCl gemessen. In Abb. 3.3 A ist zu erkennen, dass die Rückfaltungsausbeute in 1 M L-ArgHCl nach ca. 120 h bei $18,2 \pm 0,3$ % lag sowie in 1 M EMIMCl bei $6,5 \pm 2,5$ %, in 1 M EMIMDEP bei $0,9 \pm 0,05$ % und in 1 M NaCl bei $0,3 \pm 0,07$ %. Damit wurde der positive Effekt von EMIMCl und insbesondere von L-ArgHCl auf die Rückfaltung von rPA deutlich. Unterschiede in der Form der Kinetiken waren nicht erkennbar.

So war sowohl bei L-ArgHCl als auch bei EMIMCl ein starker initialer Anstieg der Rückfaltungsausbeute bis etwa 9 h und ein Abflachen der Kurve während der weiteren Inkubation erkennbar. EMIMDEP und NaCl, welches von vornherein als Negativkontrolle verwendet wurde, waren dagegen als Rückfaltungsadditive ungeeignet. Dies war auch an einer deutlichen Aggregatbildung in den Rückfaltungsansätzen erkennbar.

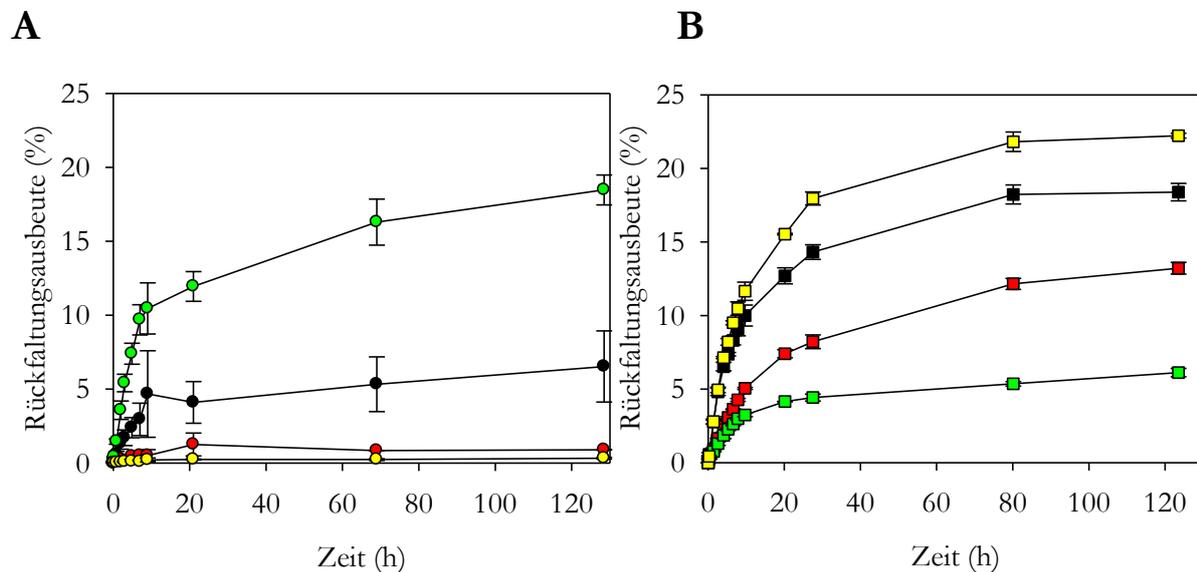


Abb. 3.3: Oxidative Rückfaltung von rPA in Gegenwart von Lösungsmitteladditiven. Gezeigt sind in (A) die Rückfaltungskinetiken von rPA in Gegenwart von 1M EMIMCl (●), 1M EMIMDEP (●), 1M Arginin (●) und 1M NaCl (●). Weiterhin sind in (B) Rückfaltungskinetiken von rPA aufgetragen in Gegenwart von (■) 1 M ArgHCl + 1M EMIMCl, (■) 1 M ArgHCl + 2 M EMIMCl, (■) 1 M ArgHCl + 1 M NaCl und (■) 1 M ArgHCl + 1 M EMIMDEP. Alle Ansätze enthielten neben dem Additiv noch 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 sowie 7 mM GSH und 0,7 mM GSSG. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Eine leichte Erhöhung der Rückfaltungsausbeute war durch Kombination von 2 M EMIMCl mit 1 M L-ArgHCl erreichbar (Abb. 3.3 B). So betrug die Rückfaltungsausbeute von rPA in 1 M L-ArgHCl + 2 M EMIMCl $21,3 \pm 1,3$ %. Dagegen führte eine Erhöhung der Ionenstärke durch Kombination von 1 M L-ArgHCl mit 1 M NaCl zu einer Verringerung der Rückfaltungsausbeute auf $13,2 \pm 0,4$ %. Die Kombination von 1 M EMIMDEP mit 1 M L-ArgHCl erwies sich als ungünstig. So betrug die Rückfaltungsausbeute von rPA hier lediglich $6,1 \pm 0,4$ %, da offenbar das DEP-Anion die Rückfaltung störte und die positiven Effekte des L-Arginin- und des EMIM-Kations teilweise neutralisierte.

Da sich rPA aufgrund seiner schlechten Löslichkeit hervorragend als Modellsystem für die Charakterisierung von Lösungsmitteladditiven eignete, wurde es in den nachfolgenden Experimenten zunächst im Hinblick auf seine spektroskopischen Eigenschaften und auf seine thermodynamische Stabilität charakterisiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Effekte

von L-ArgHCl, EMIMCl und EMIMDEP auf das Protein. Da eine Verwendung von selbst hergestelltem rPA insbesondere für die durchgeführten Löslichkeits- und Aggregationsmessungen nicht praktikabel gewesen wäre, wurde auf rPA zurückgegriffen, welches freundlicherweise von Roche Diagnostics zur Verfügung gestellt wurde.

3.2 Charakterisierung von rPA, tc-rPA und CM-rPA

3.2.1 Spektroskopische Charakterisierung von rPA und CM-rPA

Der rekombinante Plasminogenaktivator (rPA) wurde bereits während einer vorangegangenen Diplomarbeit hinsichtlich seiner spektroskopischen Eigenschaften und seiner thermodynamischen Stabilität charakterisiert (Tischer, 2007). Für die Herstellung eines Modellsystems für den denaturierten Zustand des Proteins wurde weiterhin rPA denaturiert, reduziert und die Cysteinreste mit Iodessigsäure carboxymethyliert. Das so erhaltene CM-rPA wurde unter anderem für Löslichkeitsmessungen als Modell für den denaturierten Zustand von rPA eingesetzt. Es sollte so überprüft werden, ob L-ArgHCl neben der Löslichkeit des nativen rPA auch die Löslichkeit des denaturierten Zustands von rPA erhöht. Um zu überprüfen, ob CM-rPA als Modellsystem für den denaturierten Zustand geeignet war, wurde es zunächst hinsichtlich seiner Struktur und seiner thermodynamischen Stabilität untersucht und mit dem nativen Protein verglichen. Hierfür wurden Fluoreszenzspektren von rPA und CM-rPA unter nicht denaturierenden und unter denaturierenden Bedingungen gemessen.

Es konnte hierbei festgestellt werden, dass die Fluoreszenzspektren von rPA und CM-rPA sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen ähnlich waren. Unter nativen Bedingungen betrug λ_{\max} aufgrund der in beiden Proteinen ähnlichen, hydrophoben Umgebung der Fluorophore ca. 348 nm, während durch die Denaturierung eine Rotverschiebung auf ca. 359 nm sowie eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität auftrat.

Weiterhin wurden Nah-UV-CD-Spektren gemessen, um Aussagen über die Tertiärstruktur von rPA und CM-rPA treffen zu können. Es stellte sich dabei heraus, dass CM-rPA wie auch denaturiertes reduziertes rPA über kein strukturiertes Bandenmuster verfügte und dass das Nah-UV-CD-Spektrum des nativen rPA vom Spektrum der Kringel 2-Domäne dominiert wurde (Cleary et al., 1989; Topf, 2010).

3.2.2 Thermodynamische Stabilität von rPA und CM-rPA

Um rPA und CM-rPA auf ihre thermodynamische Stabilität hin zu untersuchen, wurden Denaturierungsmittel-induzierte Strukturänderungen der Proteine anhand der Änderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz gemessen. Die Serinproteasedomäne von rPA zeigte dabei zwei kooperative Faltungsübergänge, wobei sich zunächst zwischen 0 M und 2 M GuHCl die Fluoreszenzintensität verringerte und λ_{\max} des Emissionsspektrums von 348 nm auf 345 nm blau verschoben wurde (Abb. 3.4).

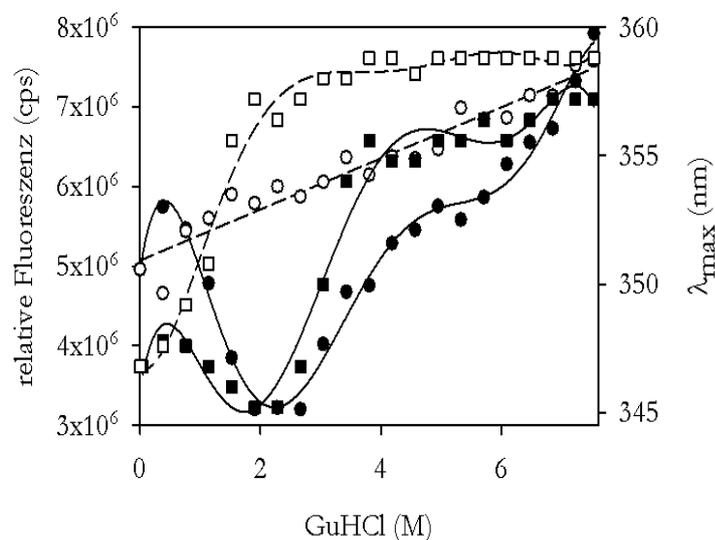


Abb. 3.4: Denaturierungsmittel-induzierte Fluoreszenzübergänge von rPA und CM-rPA. (A) Aufgetragen sind die Fluoreszenzübergänge für die Denaturierung von rPA (●) sowie für die Denaturierung von CM-rPA (○) in 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA und ansteigenden Konzentrationen GuHCl. Die Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt, die Übergänge wurden bei 359 nm gemessen. Die Proteinkonzentration betrug $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, die Blenden für die Anregung und die Emission betragen je 5 nm. Weiterhin sind die Wellenlängen der Maximalintensitäten für rPA (■) bzw. CM-rPA (□) aufgetragen. Die eingezeichneten Linien dienen der grafischen Illustration.

Der zweite Übergang zwischen 2 M und 4 M GuHCl zeichnete sich durch eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität sowie durch eine Rotverschiebung von λ_{\max} auf 356 nm aus. Für die Kringel 2-Domäne von rPA konnte unter den gewählten Bedingungen (Verwendung von GuHCl als Denaturierungsmittel, Messung bei 20°C) kein vollständiger Übergang beobachtet werden. Hier lag der Übergangsmittelpunkt bei ca. 7 M GuHCl, was durch Topf (2010) bestätigt werden konnte. Aufgrund der Form der Übergänge und wegen der unvollständigen Denaturierung der Kringel 2-Domäne in GuHCl bei 20°C war eine thermodynamische Auswertung der Übergänge trotz vollständiger Reversibilität, wie von Tischer (2007) gezeigt, nicht möglich.

Für CM-rPA konnte festgestellt werden, dass es über keine thermodynamische Stabilität verfügte, da es nicht kooperativ entfaltete und λ_{\max} durch die zunehmende Lösungsmittelexposition sukzessive rot-verschoben wurde.

3.2.3 Autoproteolytische Aktivierung von rPA

Während der Messung der rPA-Löslichkeit als Funktion der Zeit in niedrigen EMIMCl-Konzentrationen wurde festgestellt, dass die enzymatische Aktivität von rPA mit der Zeit anstieg. Dies ging mit der Beobachtung einher, dass rPA einem langsamen aber spezifischen Abbau unterlag, bei dem im SDS-Gel zwei zusätzliche Banden bei etwa 30 kDa und etwa 10 kDa auftraten.

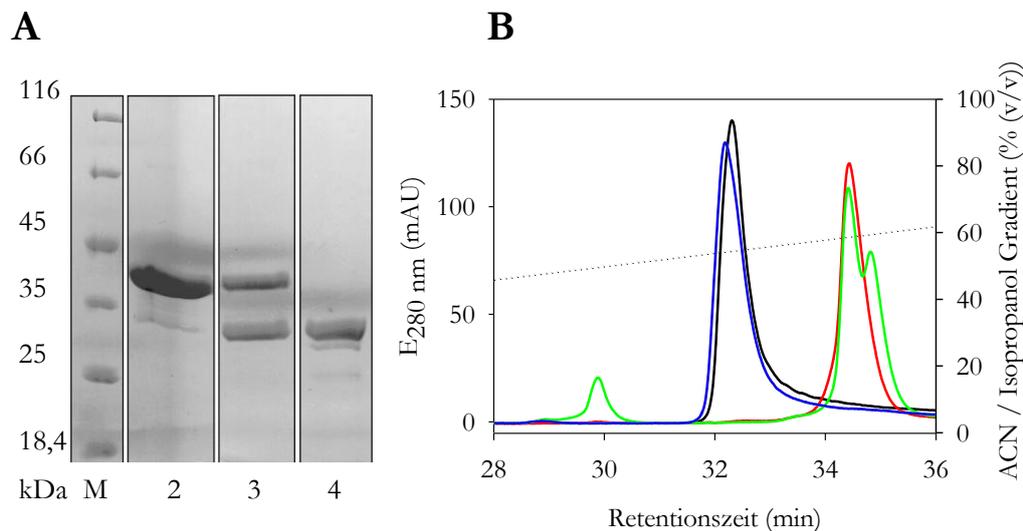


Abb. 3.5: Autokatalytischer Verdau von rPA. **(A)** Gezeigt ist ein reduzierendes SDS-Gel mit Proben von rPA aus der Stammlösung (Bahn 2), nach sieben Tagen (Bahn 3) und nach zwei Monaten in 400 mM EMIMCl bei 4 °C (Bahn 4). Als Molekulargewichtstandard ist der LMW-Marker aufgetragen (M). **(B)** RP-HPLC-Chromatogramme von nativem und denaturiertem reduziertem rPA aus der Stammlösung (—) bzw. (—), sowie von nativem (—) und denaturiertem, reduziertem rPA (—) nach 7 Tagen Inkubation in 400 mM EMIMCl bei 4 °C. Es wurden jeweils 65 µg injiziert. Es wurde eine Nucleosil C8 RP-HPLC-Säule verwendet. Der Acetonitril/Isopropanol-Gradient betrug 2 % (v/v) min⁻¹, die Flussrate 0,7 ml min⁻¹.

In Abb. 3.5 A wurde rPA aus der Stammlösung nach sieben Tagen bzw. nach zwei Monaten in 400 mM EMIMCl in einem reduzierenden SDS-Gel aufgetrennt. Es war zu erkennen, dass in der rPA-Stammlösung bereits eine Degradationsbande auftrat, welche mit steigender Inkubationszeit immer prominenter wurde. Eine nach zwei Monaten Inkubation bei 4 °C genommene Probe zeigte, dass rPA komplett verdaut vorlag. Für eine eingehendere Untersuchung des rPA-Abbaus wurde die nach 160 h genommene Probe in 6 M GuHCl und 100 mM DTT bei pH 8,5 denaturiert, reduziert und anschließend mittels RP-HPLC analysiert (Abb. 3.5 B). Wie bei der reduzierenden SDS-PAGE waren auch bei dem Chromatogramm des für 160 h inkubierten denaturierten reduzierten rPA zwei weitere Peaks zu erkennen, während das Chromatogramm der 160 h inkubierten, nativen nicht reduzierten Probe dem Chromatogramm des Referenz-rPA entsprach.

Eine massenspektrometrische Analyse ergab, dass durch den Verdau von rPA zusätzlich Fragmente von rPA mit 28,18 bzw. 11,49 kDa in der Lösung auftraten. Diese Fragmente entsprachen einer Spaltung von rPA in die Kringel 2- und die Serinproteasedomäne an der Plasminschnittstelle Arg 561-Val 562. Dies bedeutete, dass rPA offenbar eine Sekundärspezifität für sich selbst hatte und durch die Spaltung in die unter anderem von Hu et al. (1996) beschriebene Zweikettenform (tc-rPA, siehe Kapitel 1.7) überführt wurde.

Nachfolgend wurde versucht, die Autokatalyse von rPA zu unterdrücken. Hierfür sollte mit PMSF, welches ein Selbstmordsubstrat für Serinproteasen ist, die katalytische Aktivität und somit die Autokatalyse von rPA unterbunden werden. Allerdings scheiterte dies an dem offenbar für PMSF schlecht zugänglichen aktiven Zentrum von rPA. In Abb. 3.6 ist ein Versuch der rPA-Inhibierung in steigenden PMSF-Konzentrationen gezeigt.

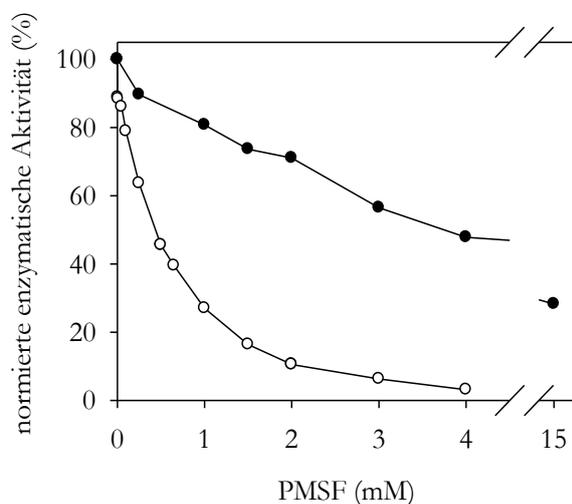


Abb. 3.6: Inhibierung von rPA und Trypsin mit PMSF. Aufgetragen sind die Aktivitäten von 10 μM rPA (●) und 10,6 μM Trypsin (○) nach 30-minütiger Inkubation in 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und ansteigenden PMSF-Konzentrationen. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch Verfolgen der Freisetzung von p-Nitroanilin aus Chromozym-tPA. Die Aktivitäten wurden auf die Referenzaktivität in Abwesenheit von PMSF umgerechnet.

Die Serinprotease Trypsin, welche Peptide und Proteine hinter den basischen Resten Lys oder Arg spaltet, wurde als Referenz verwendet. Es war zu erkennen, dass Trypsin in Gegenwart von 4 mM PMSF nahezu vollständig inhibiert war, während rPA in 15 mM PMSF noch eine Restaktivität von ca. 30 % hatte. Somit war eine Inhibierung von rPA nicht ohne Weiteres möglich. Daher wurde entschieden, nach einer Untersuchung der Unterschiede zwischen rPA und tc-rPA mit der Zweikettenform zu arbeiten.

3.2.4 Spaltung von rPA zu tc-rPA durch Plasmin

Da, wie unter Kapitel 3.2.3 beschrieben, rPA offenbar in Abwesenheit hoher L-ArgHCl-Konzentrationen einer langsamen proteolytischen Aktivierung unterlag, wurden alle Experimente in ionischen Flüssigkeiten mit der Zweikettenform von rPA (tc-rPA) durchgeführt. Diese wurde durch Spaltung mit Plasmin erhalten (Kapitel 2.2.3.4).

3.2.4.1 Einfluss der Plasminspaltung auf die Aktivität von rPA

Die Plasminspaltung der Peptidbindung zwischen Arg275 und Ile276 hatte verschiedene Effekte auf rPA. Zum einen war ein Anstieg der enzymatischen Aktivität auf ca. 300 % zu verzeichnen. So stieg die enzymatische Aktivität von rPA durch die Inkubation mit 3,5 mU Plasminogen in 1 M L-Arginin-Puffer und der daraus resultierenden Spaltung zu tc-rPA von 0,05 auf 0,14 $\Delta E_{405nm} \text{ min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ an (Abb. 3.7 A).

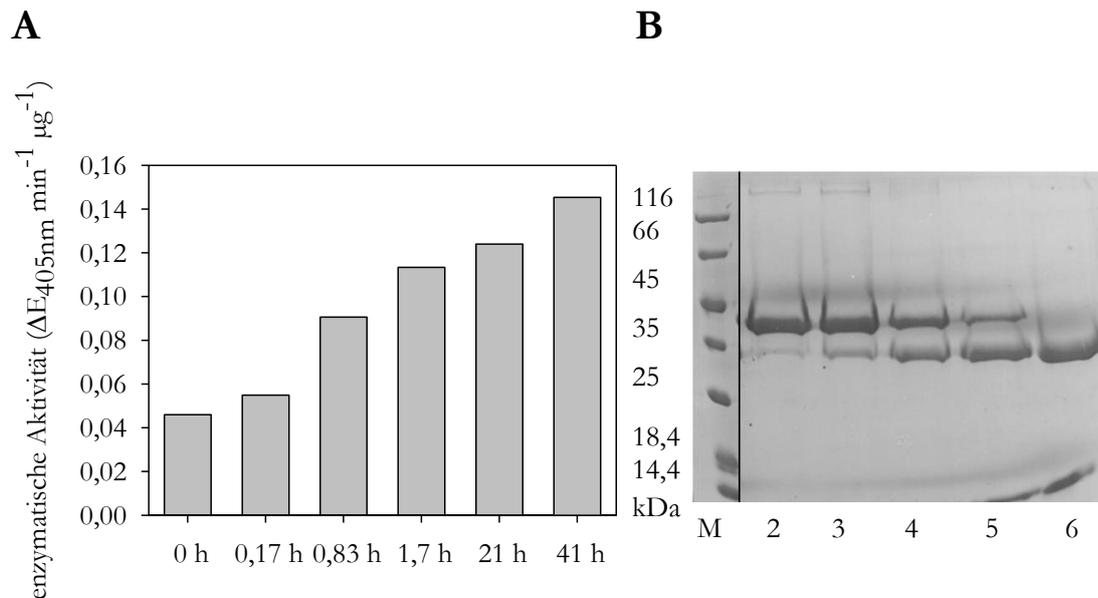


Abb. 3.7: Effekt der Plasminspaltung auf rPA. (A) Die Abbildung zeigt den Effekt der Inkubation von 3,7 mg ml⁻¹ rPA in 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 mit 3,5 mU Plasmin auf die enzymatische Aktivität. Die rPA-Konzentration im Messansatz betrug 3,42 $\mu\text{g ml}^{-1}$. **(B)** Reduzierendes SDS-Gel mit den Proben aus der Plasminspaltung, welche nach 0 - 21 h (Bahn 2 bis 6) durch Verdünnung in reduzierenden SDS-Probenpuffer abgestoppt wurde. Als Größenstandard wurde der LMW-Marker aufgetragen (M).

Da jedoch unter diesen Bedingungen erst nach 41 h die maximale Aktivität erreicht war, d.h. rPA komplett in die Zweikettenform überführt war, wurde für spätere Spaltungsansätze die Menge an Plasmin auf 14 mU erhöht.

Die Spaltung von rPA zu tc-rPA durch Plasmin konnte auch mittels reduzierender SDS-PAGE nachvollzogen werden (Abb. 3.7 B). Dabei wurden die Disulfidbrücken von rPA bzw. tc-rPA reduziert, so dass die voneinander getrennte Serinprotease- und Kringel 2-Domäne (28,2 kDa und 11,5 kDa) aufgrund ihrer geringeren apparenten Molekülmasse schneller durch das SDS-Gel migrierten als das noch nicht gespaltene rPA.

3.2.4.2 Einfluss der Plasminspaltung auf die thermodynamische Stabilität von rPA

Weiterhin wurde der Einfluss der Plasminspaltung auf die thermodynamische Stabilität untersucht. Zu diesem Zweck wurden Denaturierungsmittel-induzierte Fluoreszenzübergänge von rPA und tc-rPA gemessen (Abb. 3.8).

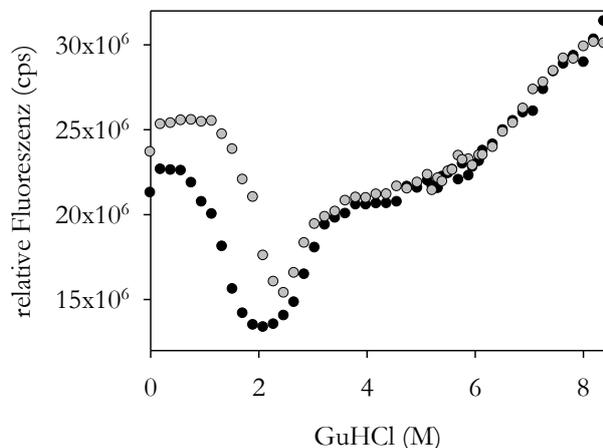


Abb. 3.8: Denaturierungsmittel-induzierte Fluoreszenzübergänge von rPA und tc-rPA. Aufgetragen ist die bei 359 nm gemessene Fluoreszenz von rPA (●) und tc-rPA (●) in Abhängigkeit von der GuHCl-Konzentration. Die Proteinkonzentration betrug $30 \mu\text{g ml}^{-1}$. Die Pufferbedingungen sind analog zu Abb. 3.4. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 280 nm. Die Blendenbreiten betragen für die Anregung 2 nm und für die Emission 5 nm.

Es war hierbei zu erkennen, dass tc-rPA im nativen Zustand eine höhere Fluoreszenzintensität zeigte als das native rPA, während die Fluoreszenzintensität beider Proteine im denaturierten Zustand nahezu identisch war. Der gemessene Übergang von rPA entspricht dem bereits unter Kapitel 3.2.2 gezeigten Übergang. Für tc-rPA konnte festgestellt werden, dass sich der Mittelpunkt des ersten Übergangs der Serinproteasedomäne von ca. 1 M auf 2 M GuHCl verschob, die restliche Denaturierungskurve sich aber nicht vom rPA-Übergang unterschied. Somit kam es durch die Spaltung von rPA zu seiner Zweikettenform offenbar zu einer Konformationsänderung und einer daraus resultierenden thermodynamischen Stabilisierung der Serinproteasedomäne, während die Kringel 2-Domäne unverändert vorlag.

Neben den Messungen der Fluoreszenzübergangskurven wurde die thermodynamische Stabilität von rPA und tc-rPA auch mittels dynamischer Differenzkalorimetrie untersucht (Abb. 3.9).

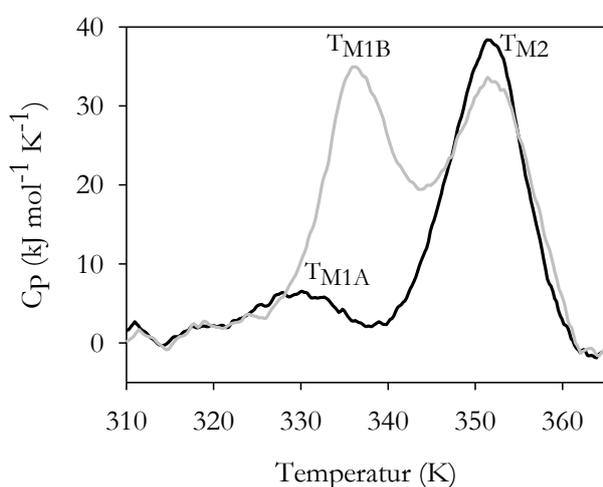


Abb. 3.9: DSC-Kurven von rPA und tc-rPA. Aufgetragen sind die DSC-Kurven von rPA (—) und tc-rPA (—) in 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5. Die Kurven wurden basislinienkorrigiert. Die Scanrate betrug $90 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$. Mit T_{M1A} bzw. T_{M1B} sind die Schmelzpunkte der Serinproteasedomäne in rPA bzw. tc-rPA und mit T_{M2} der Schmelzpunkt der Kringel 2-Domäne markiert.

Auch bei dieser Methode war eine detaillierte Auswertung aufgrund der irreversiblen Aggregation von rPA während der thermischen Denaturierung nicht möglich. Dies war auch für tc-rPA bei allen Messbedingungen, bei denen die Serinproteasedomäne nicht von vornherein denaturiert vorlag, der Fall. Es ist aus den DSC-Kurven erkennbar, dass sich der Schmelzpunkt des ersten Übergangs, welcher der Serinproteasedomäne zugeordnet werden kann (Hu et al., 1994), von etwa 330 K für rPA (TM1A) auf ca. 336 K für tc-rPA (TM1B) erhöhte und dass außerdem die Enthalpie für die Entfaltung erhöht war. Dagegen änderte sich die Schmelztemperatur (T_{M2}) der Kringel 2-Domäne durch die Spaltung nicht.

Der rekombinante Plasminogenaktivator (rPA) wurde bereits von Tischer (2007) als Modellprotein für Löslichkeits- und Stabilitätsmessungen verwendet. Hierfür war es erforderlich, mit CM-rPA ein Modell für den denaturierten Zustand einzuführen, um so die Wirkung von L-ArgHCl auf diesen zu untersuchen. Es zeigte sich dabei, dass CM-rPA über keine thermodynamische Stabilität verfügte und dass L-ArgHCl zwar die Gleichgewichtslöslichkeit erhöhte, jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität des nativen rPA hatte. Während der Weiterführung der Arbeit konnten zunächst die kooperativen Übergänge, welche mittels Fluoreszenz gemessen wurden, korrekt zugeordnet werden. So entfaltete rPA als Zweidomänenprotein mit drei kooperativen Übergängen, wobei die ersten beiden Entfaltungsereignisse der Serinprotease-Domäne und der dritte kooperative Übergang der äußerst stabilen Kringel 2-Domäne zugeordnet werden konnten.

Weiterhin wurde bei der Messung der Löslichkeit von rPA in geringen Konzentrationen EMIMCl festgestellt, dass das Protein unter den gegebenen Bedingungen einer langsamen autoproteolytischen Aktivierung unterlag. Hierbei entstand mit tc-rPA die Zweikettenform von rPA, welche sich durch ihre dreifach erhöhte enzymatische Aktivität und durch die stabilisierte Serinproteasedomäne von der Einkettenform unterschied. Da weitere Unterschiede (z. B. bei der Löslichkeit, Sekundär- oder Tertiärstruktur) nicht festgestellt werden konnten, wurde die durch Plasminspaltung erhaltene Zweikettenform der Einkettenform von rPA für alle Experimente, insbesondere in ionischen Flüssigkeiten, äquivalent gesetzt. Daher diente CM-rPA auch für tc-rPA als Modell für den denaturierten Zustand.

3.3 Einfluss von L-ArgHCl und ionischen Flüssigkeiten auf die Proteinlöslichkeit

Nachdem zuvor rPA, tc-rPA und CM-rPA charakterisiert wurden, werden in diesem Kapitel die Einflüsse von L-ArgHCl und von EMIMCl auf die Proteinlöslichkeit dargestellt. Die Experimente mit L-ArgHCl wurden dabei mit rPA durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit wurde festgestellt, dass sich rPA in EMIMCl zur Zweikettenform spaltete. Daher wurden die Experimente in ionischen Flüssigkeiten mit tc-rPA durchgeführt. Vollständig carboxymethyliertes rPA wurde als Modellsystem für den denaturierten Zustand von rPA respektive tc-rPA verwendet.

3.3.1 Einfluss von L-ArgHCl auf die Löslichkeit und die Aggregation von rPA und CM-rPA

Es konnte in Kapitel 3.1.2 bereits gezeigt werden, dass L-ArgHCl die Rückfaltungsausbeute von rPA erhöht. Für die Wirkung von L-ArgHCl werden in der Literatur verschiedene Modelle diskutiert (siehe Kapitel 1.2). Unter anderem wird eine Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen im ungefalteten Zustand für den die Aggregation unterdrückenden Effekt von L-ArgHCl verantwortlich gemacht (Reddy K. et al., 2005).

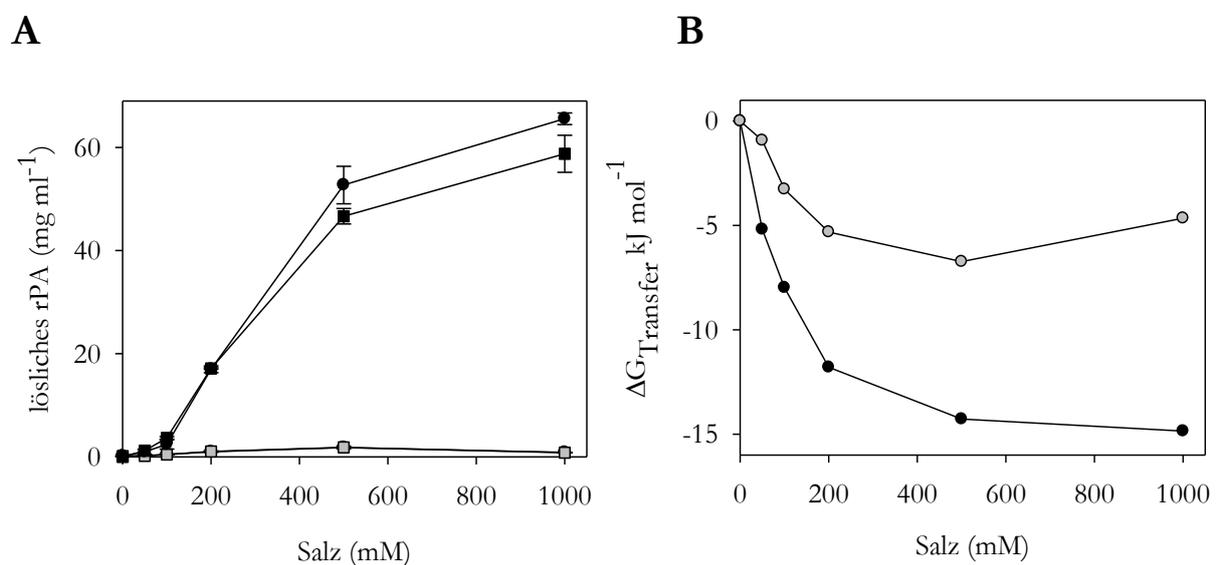


Abb. 3.10: Löslichkeit von rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin. (A) Gezeigt sind die Löslichkeitskurven von rPA in L-ArgHCl (●, ■) (Daten aus Tischer, 2007) und zum Vergleich in NaCl/Glycin (○, □) nach 48 h Inkubation bei 4 °C. Dabei wurde die Löslichkeit ausgehend von löslichem (○) und von aggregiertem Protein (□) gemessen. Neben den Additiven enthielten alle Lösungen noch 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 1 mM EDTA. In (B) sind die berechneten freien Energien für den Transfer aus Wasser L-ArgHCl bzw. NaCl/Glycin aufgetragen. Farb- und Formgebung der Symbole ist analog zu (A).

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Tischer, 2007) konnte gezeigt werden, dass L-ArgHCl die Löslichkeit von rPA im nativen Zustand auf maximal ca. $65 \pm 1,1 \text{ mg ml}^{-1}$ erhöhte, was mit einer Verringerung der freien Transferenergie um etwa 15 kJ mol^{-1} einherging (Abb. 3.10 A und B).

Dagegen betrug die Löslichkeit von rPA in NaCl, kombiniert mit einer äquimolaren Konzentration Glycin, maximal $1,8 \pm 0,3 \text{ mg ml}^{-1}$, was einer Verringerung der freien Transferenergie um maximal 6 kJ mol^{-1} entspricht. Die gemessenen Löslichkeiten stellten Gleichgewichtslöslichkeiten dar, da sowohl ausgehend vom löslichen rPA als auch vom aggregierten rPA ähnliche Löslichkeiten ermittelt wurden. Das mit L-ArgHCl aus den Aggregaten solubilierte rPA war dabei nativ und in seiner enzymatischen Aktivität nicht vom nicht ausgefallten rPA unterscheidbar.

Neben den Löslichkeitsmessungen mit nativem rPA wurde auch die Löslichkeit von CM-rPA in L-ArgHCl und zum Vergleich in Glycin/NaCl bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass die apparente Löslichkeit von CM-rPA in 1 M L-ArgHCl bis auf maximal $2,1 \pm 0,21 \text{ mg ml}^{-1}$ anstieg (Abb. 3.11 A). Es konnten allerdings keine Gleichgewichtslöslichkeiten gemessen werden, da ein Solubilisieren aus den Aggregaten mit L-ArgHCl größtenteils nicht möglich war. So betrug die apparente Löslichkeit von CM-rPA ausgehend von Aggregaten in 1 M L-ArgHCl lediglich $0,12 \pm 0,04 \text{ mg ml}^{-1}$. In Glycin und NaCl betrug die maximale apparente Löslichkeit ausgehend von löslichem CM-rPA $0,12 \pm 0,09 \text{ mg ml}^{-1}$ und ausgehend von aggregiertem Protein $0,031 \pm 0,004 \text{ mg ml}^{-1}$.

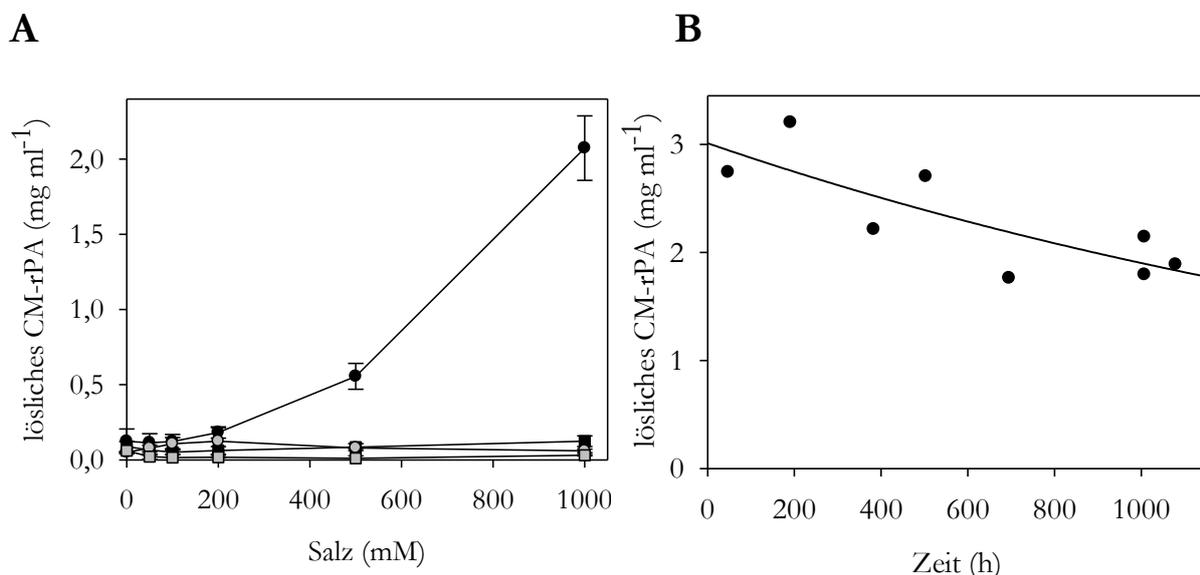


Abb. 3.11: Löslichkeit von CM-rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin und Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von CM-rPA in 1M L-ArgHCl. (A) Aufgetragen sind die Löslichkeitskurven von CM-rPA in L-ArgHCl (●, ■) (Daten aus Tischer, 2007) und zum Vergleich in NaCl/Glycin (○, □) nach 48 h Inkubation bei 4 °C. Dabei wurde die Löslichkeit ausgehend von löslichem (○) und von aggregiertem Protein (□) gemessen. In (B) ist die Änderung der CM-rPA Löslichkeit mit der Inkubationszeit in 1 M L-ArgHCl gezeigt (Daten aus Tischer, 2007). Neben den Additiven enthielten alle Lösungen noch 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 1 mM EDTA.

Um zu überprüfen, ob die apparente CM-rPA-Löslichkeit in L-ArgHCl konstant blieb, wurden bereits in Tischer (2007) Löslichkeitskinetiken in 1 M L-ArgHCl gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Löslichkeit langsam abnahm (Abb. 3.11 B).

Weiterhin wurde der Einfluss von L-ArgHCl auf die Aggregation von CM-rPA untersucht. Es sollte geklärt werden, ob L-ArgHCl einen Einfluss auf die Reaktionsordnung der Aggregation hatte. Hierfür wurden Streulichtmessungen durchgeführt und aus dem Messsignal der initialen Aggregationsreaktionen die Reaktionsordnung für die initiale Aggregation berechnet. Die Kinetiken sind in Abb. 3.12 A exemplarisch für CM-rPA in Abwesenheit von L-ArgHCl dargestellt. Dabei wurde eine deutliche Abhängigkeit der Aggregation von der eingesetzten CM-rPA-Konzentration festgestellt. So lag der Bereich, in dem Aggregation messbar war, zwischen 43 und 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CM-rPA im Messansatz. Dabei wurde bei 43 $\mu\text{g ml}^{-1}$ starke Aggregation festgestellt, während bei 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CM-rPA kaum aggregierte.

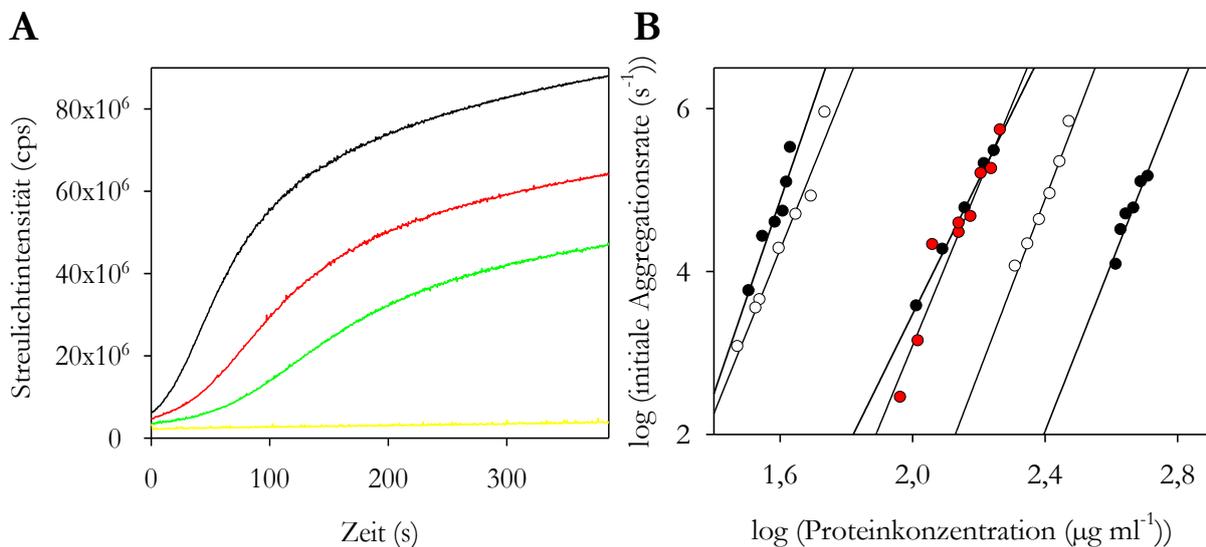


Abb. 3.12: Aggregationskinetiken von CM-rPA, dr-rPA und rPA in L-ArgHCl. (A) Aufgetragen sind die Streulichtkurven von CM-rPA in Abwesenheit von L-ArgHCl. Die Proteinkonzentration im Messansatz betrug dabei 43 (■), 41 (■), 35 (■) und 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (■). Die Aggregationsreaktion wurde durch Verdünnung (1:20) von CM-rPA aus 4 M GuHCl, pH 3 in den Messpuffer gestartet. Die Messung des Streulichts erfolgte bei 600 nm. In (B) sind die Anfangsanstiege doppelt logarithmisch gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen. Dabei symbolisiert (●) CM-rPA ohne sowie in 200 mM und 500 mM L-ArgHCl, (○) dr-rPA in 200 mM bzw. 500 mM L-ArgHCl und 1 mM DTT (jeweils von links nach rechts) und (●) rPA in Abwesenheit von L-ArgHCl. Alle Ansätze enthielten weiterhin noch 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5. Die Regressionsgeraden zur Bestimmung der Reaktionsordnung sind mit (—) gekennzeichnet.

Aus den in Abb. 3.12 B dargestellten doppelt logarithmischen Auftragungen der initialen Aggregationsrate gegen die Proteinkonzentration ist erkennbar, dass sich durch den Zusatz von L-ArgHCl nichts an den Anstiegen, welche dem n-Wert und somit der Reaktionsordnung

entsprechen (siehe Kapitel 2.2.5.3), änderte. Stattdessen verschoben sich die Kurven für 200 bzw. 500 mM L-ArgHCl zu höheren Proteinkonzentrationen.

Als Kontrolle wurde ebenfalls die Aggregation von denaturiertem reduziertem rPA (dr-rPA) in 200 und in 500 mM L-ArgHCl und von rPA in Abwesenheit von L-ArgHCl gemessen. Hierbei zeigte sich ein analoges Verhalten. Streulichtmessungen von rPA in Anwesenheit von L-ArgHCl waren aufgrund der gesteigerten Löslichkeit des rPA nicht möglich. Die ermittelten n-Werte sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: n-Werte für die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation

Proteinspezies	L-ArgHCl (M)	n-Wert
CM-rPA	0	$11,9 \pm 1,9$
	0,2	$8,2 \pm 0,2$
	0,5	$10,3 \pm 1,6$
dr-rPA	0,2	$10,1 \pm 0,9$
	0,5	$10,7 \pm 0,9$
natives rPA	0	$9,8 \pm 1,0$

Der Einfluss von L-ArgHCl auf die Aggregation von CM-rPA wurde weiterhin mittels asymmetrischer Flussfeld-Fluss-Fraktionierung (AF4) untersucht. Bei dieser Methode wurde eine Proteinlösung nach der Injektion in den Trennkanal in der Fokuszone aufkonzentriert und anschließend eluiert, wobei methodenbedingt kleine vor großen Partikeln eluierten. Aus der Retentionszeit, der während des Laufs bei 280 nm verfolgten Proteinkonzentration und der Winkelabhängigkeit des Streulichts der Proteinmoleküle ließen sich die Partikelgrößen und deren Verteilung in der Lösung berechnen. Durch die Aufkonzentrierung während der obligaten Fokusphase war es außerdem möglich, den Einfluss von L-ArgHCl auf die Aggregation von Proteinen zu untersuchen.

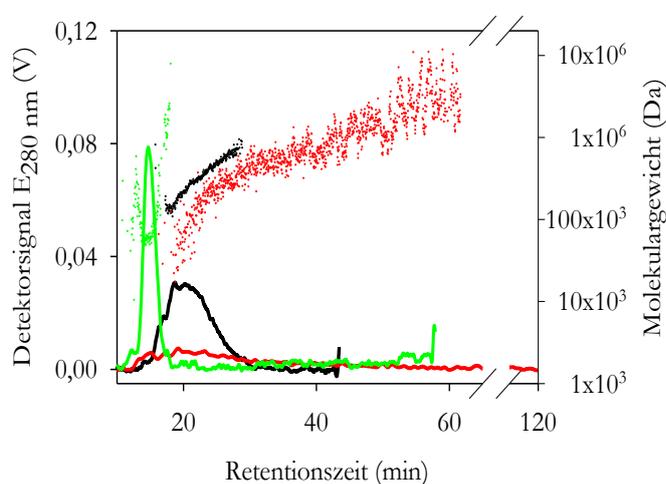


Abb. 3.13: Einfluss der Fokussierungszeit auf die Aggregation von CM-rPA. Gezeigt sind die Chromatogramme für 6 µg rPA (—) nach 3 min Fokussierung und für 7 µg CM-rPA nach 3 min (—) und nach 180 min (—) Fokussierung in 100 mM L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5. Der Kanalfluss betrug 1 ml min⁻¹, der Fokusfluss 0,75 ml min⁻¹ und der Querfluss 2 ml min⁻¹. Die zugehörigen Molekulargewichte wurden aus der Absorption bei 280 nm und aus dem mittels MALS gemessenen Streulichtsignal errechnet.

Bei den durchgeführten Fokussierungsexperimenten mittels AF4 wurde CM-rPA in den Trennkanaal injiziert und für definierte Zeit in diesem aufkonzentriert.

Zu Vergleichszwecken wurden Messungen mit rPA in 100 mM L-ArgHCl durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass rPA in 100 mM L-ArgHCl nach 3 min Fokussierungszeit bei einer Retentionszeit von ca. 16 min als monomeres Protein eluierte. Für CM-rPA hingegen war in 100 mM L-ArgHCl eine Abhängigkeit des apparenten Molekulargewichts der eluierenden Proteinspezies von der Fokussierungszeit erkennbar (Abb. 3.13).

So eluierte CM-rPA nach 3 min Fokussierung mit einer Retentionszeit von ca. 18 – 25 min und nach 180 min Fokussierung mit einer Retentionszeit von etwa einer Stunde. Aus den aufgetragenen Molekulargewichten war erkennbar, dass CM-rPA während der Fokussierungszeit in 100 mM L-ArgHCl aggregierte. Diese Aggregation geht auch aus der Auftragung der kumulativen Molmassenverteilungen nach 3, 60 und 180 min Fokussierungszeit in 100 mM L-ArgHCl hervor (Abb. 3.14 A und B).

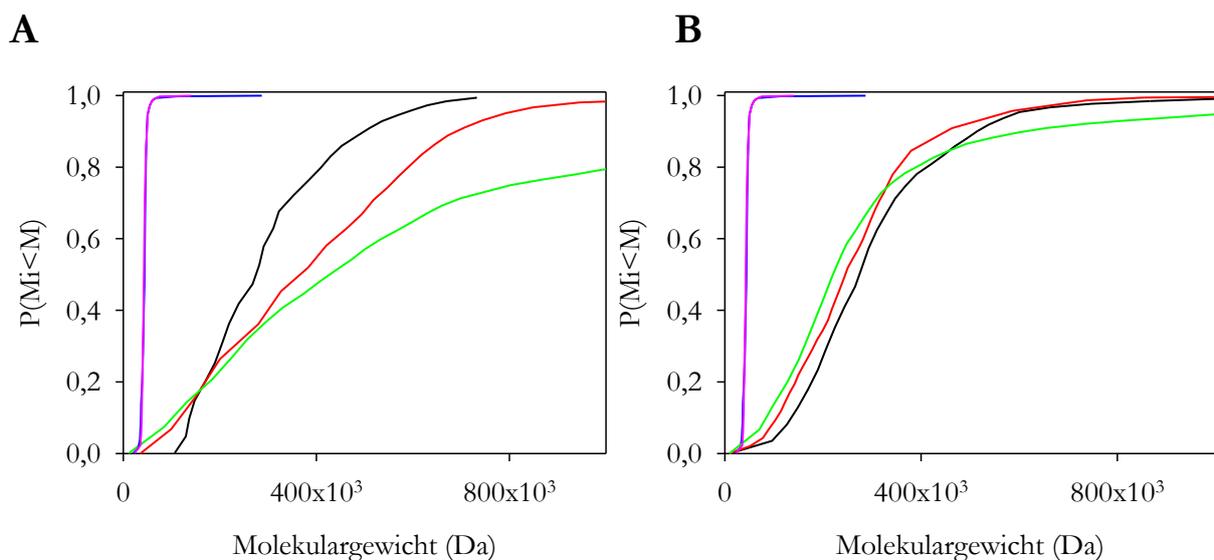


Abb. 3.14: Einfluss von L-ArgHCl auf die Molmassenverteilungen von CM-rPA. Aufgetragen sind die kumulativen Molmassenverteilungen von CM-rPA in 100 mM (A) und 500 mM L-ArgHCl (B) nach 3 min (—), 60 min (—) und nach 180 min Fokussierungszeit (—). Es wurden 6 µg CM-rPA in den Trennkanaal injiziert. Zum Vergleich sind die Verteilungen für 7 µg rPA in 200 mM L-ArgHCl nach 3 min (—) und nach 50 min (—) aufgetragen. Die Pufferbedingungen und experimentellen Einstellungen sind identisch zu Abb. 3.13.

Dagegen hatte in 500 mM L-ArgHCl die Fokussierungszeit keinen Einfluss auf die apparente Molmassenverteilung der Proteinspezies in Lösung. Der Quotient aus Gewichtsmittelwert und Zahlenmittelwert M_w/M_n stieg für CM-rPA in 100 mM L-ArgHCl von 1,2 nach 3 min auf 2,9 nach 180 min Fokussierungszeit an. Da für eine homogene Probe $M_w/M_n = 1$ ist, bedeutete dies

eine Anreicherung größerer Partikel mit steigender Fokussierungszeit. Dagegen blieb der Quotient in 500 mM L-ArgHCl konstant bei 1,2, was bedeutet, dass die Aggregation während der Fokussierungsphase komplett unterdrückt wurde. Für natives rPA in 200 mM L-ArgHCl war ebenfalls erkennbar, dass die Dauer der Fokussierungsphase keinen Einfluss auf die apparente Molmassenverteilung hatte und rPA stets als Monomer vorlag.

3.3.2 Einfluss von EMIMCl auf die Löslichkeit von Proteinen

Löslichkeitsmessungen in EMIMCl wurden mit tc-rPA und mit CM-rPA durchgeführt. Hierfür wurden tc-rPA und CM-rPA gegen ansteigende Konzentrationen an EMIMCl dialysiert und nach 120 h Inkubation die Proteinkonzentration in der löslichen Phase bestimmt. Um zu überprüfen, ob die gemessenen Löslichkeiten Gleichgewichtswerte waren, wurden die Löslichkeitsmessungen zum einen mit löslichem und zum anderen mit ausgefälltem Protein durchgeführt (Abb. 3.15 A). Hierbei fiel auf, dass tc-rPA-Lösungen mit mehr als 400 mM EMIMCl leicht zur Übersättigung neigten, weshalb eine Bestimmung der Löslichkeit ausgehend vom löslichen Protein schwer möglich war. Daher wurde für diese EMIMCl-Konzentrationen lediglich die Löslichkeit ausgehend von ausgefälltem Protein gemessen.

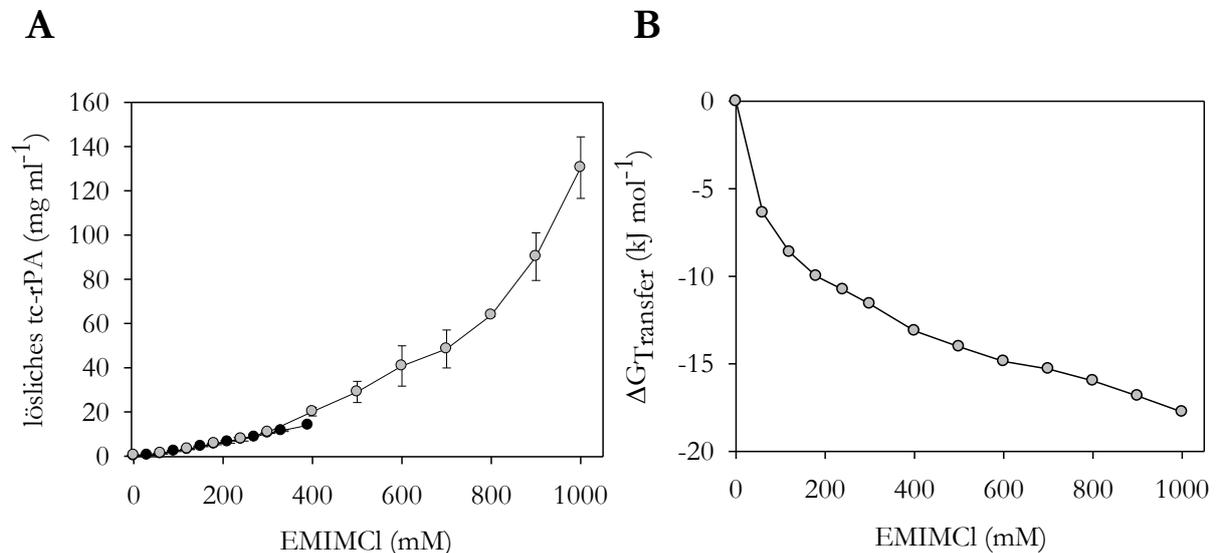


Abb. 3.15: Löslichkeitsmessungen von tc-rPA in EMIMCl und freie Energien für den Transfer aus Wasser in EMIMCl. (A) Aufgetragen sind die Löslichkeitskurven von tc-rPA in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und ansteigenden Konzentrationen EMIMCl nach 120 h Inkubation bei 4 °C. Hierbei wurde die Löslichkeit ausgehend von löslichem (●) und von aggregiertem (○) Protein bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen. In **(B)** sind die freien Energien für den Transfer von tc-rPA aus Wasser in EMIMCl gezeigt.

So wurden in 1 M EMIMCl $130,5 \pm 13,9 \text{ mg ml}^{-1}$ tc-rPA solubilisiert. Da es sich bei den gemessenen Werten um Gleichgewichtslöslichkeiten handelte, konnten die freien Transferenergien bestimmt werden. Diese betragen für EMIMCl maximal $-17,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ und lagen somit unter den maximal erreichten Werten in L-ArgHCl (Abb. 3.15 B). Oberhalb von 1 M EMIMCl war die Löslichkeit von tc-rPA nicht mehr bestimmbar, da sich die aufkonzentrierten L-ArgHCl-haltigen Proteinlösungen während der Gleichgewichtsdialysen verdünnten und daher kein unlösliches Protein mehr detektiert werden konnte. Weiterhin konnten analog zu EMIMCl auch für HMIMCl und EMIMDEP erhöhte Löslichkeiten festgestellt werden (siehe Anhang, Tab. 6.5 und 6.7).

Weiterhin wurde auch die Löslichkeit von CM-rPA in EMIMCl untersucht. Wie in L-ArgHCl konnten auch bei hohen EMIMCl-Konzentrationen keine Gleichgewichtslöslichkeiten gemessen werden, da es nicht möglich war, aggregiertes CM-rPA zu solubilisieren. So ist in Abb. 3.16 zu erkennen, dass die apparente Löslichkeit von CM-rPA zunächst mit der EMIMCl-Konzentration anstieg und bei 2 M einen Maximalwert von $1,54 \pm 0,22 \text{ mg ml}^{-1}$ erreichte. Bei höheren EMIMCl-Konzentrationen hingegen verringerte sich die Löslichkeit, bis oberhalb von etwa 4 M EMIMCl kein CM-rPA mehr in der löslichen Phase detektiert werden konnte.

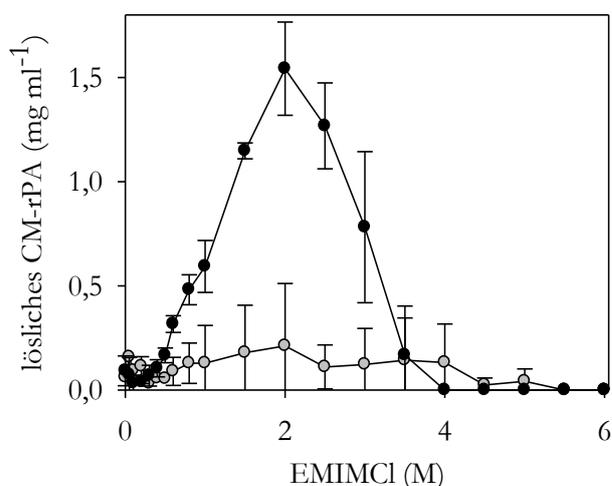


Abb. 3.16: Löslichkeitskurven von CM-rPA in EMIMCl. Aufgetragen ist die apparente Löslichkeit von CM-rPA in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und ansteigenden Konzentrationen EMIMCl ausgehend von löslichem (●) und von aggregiertem Protein (○) nach 120 h Inkubation bei 4 °C. Die Daten sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Löslichkeitsmessungen von CM-rPA in EMIMDEP zeigten hingegen, dass die Löslichkeit von CM-rPA mit zunehmender Salzkonzentration abnahm (siehe Anhang, Tab. 6.6). Somit war EMIMDEP im Gegensatz zu EMIMCl ungeeignet um CM-rPA in Lösung zu halten.

Um zu überprüfen, ob die Löslichkeit von CM-rPA in EMIMCl mit der Zeit abnahm, wurde eine Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von CM-rPA bei der zuvor bestimmten maximalen Löslichkeit in 2 M EMIMCl gemessen. Dabei war zu erkennen, dass die apparente Löslichkeit innerhalb von 100 Stunden auf ca. $1,6 \text{ mg ml}^{-1}$ absank und nach 1600 h bei $1,3 \text{ mg ml}^{-1}$ lag (Abb. 3.17 A).

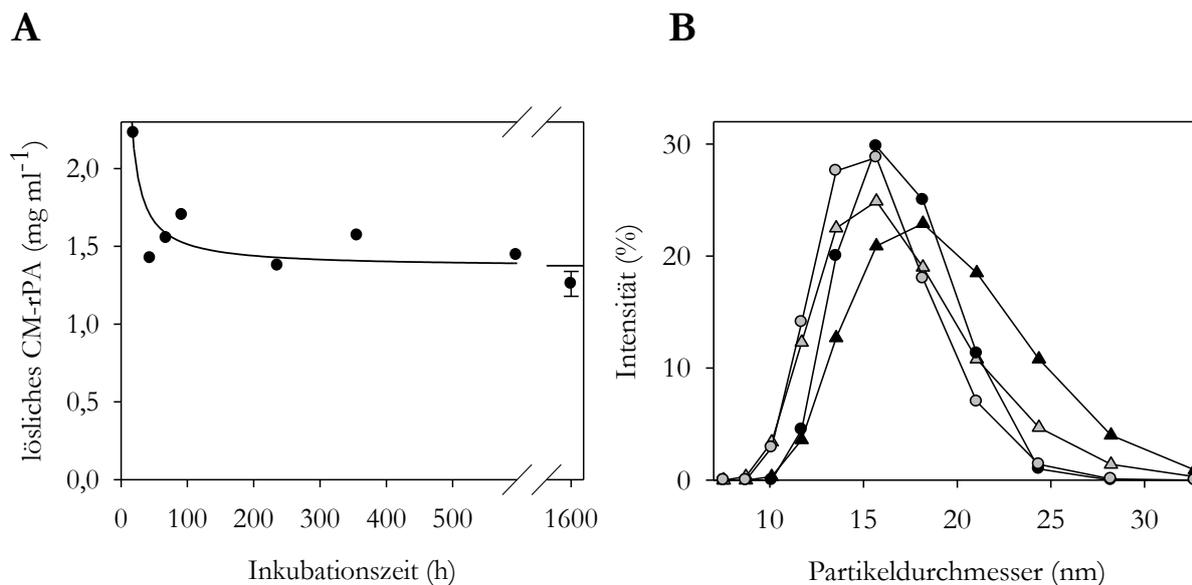


Abb. 3.17: Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von CM-rPA in 2 M EMIMCl. (A) Aufgetragen ist die apparente Löslichkeit von CM-rPA in 2 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 bei 4 °C gegen die Zeit. In (B) sind die auf monomeres tc-rPA normierten Partikelgrößenverteilungen für CM-rPA nach 19 h (○) und nach ca. 1600 h (△) aufgetragen. Dabei sind mit (— bzw. —) die intensitätsgewichtete und die volumengewichtete Partikelgrößenverteilung angegeben.

Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung nach 19 h und nach 1600 h zeigten dabei, dass mit steigender Inkubationszeit eine leichte Verschiebung zu größeren Partikeln in Lösung auftrat, wie an den intensitätsgewichteten und volumengewichteten Molmassenverteilungen zu erkennen war (Abb. 3.17 B).

3.4 Zustand von tc-rPA in hohen Konzentrationen ionischer Flüssigkeiten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass EMIMCl die Rückfaltungsausbeute von rPA erhöhte, EMIMDEP hingegen nicht als Additiv für die Rückfaltung geeignet war. Weiterhin konnte für EMIMCl eine Erhöhung der Gleichgewichtslöslichkeit von tc-rPA und eine gesteigerte apparente Löslichkeit von CM-rPA festgestellt werden. Nachfolgend sollte untersucht werden, welchen Einfluss höhere EMIMCl- und EMIMDEP-Konzentrationen auf die Struktur von gelöstem tc-rPA hatten.

3.4.1 Destabilisierung und Denaturierung von tc-rPA in ionischen Flüssigkeiten

Wie aus Buchfink et al. (2010) hervorgeht, sank die Ausbeute bei der oxidativen Rückfaltung von rPA in EMIMCl und einigen anderen ionischen Flüssigkeiten bei Erhöhung der Salzkonzentration wieder ab. Verantwortlich hierfür wurde eine zunehmende Destabilisierung von rPA gemacht.

In Kapitel 3.3.2 konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Löslichkeit von CM-rPA ähnlich verhielt wie die Rückfaltungsausbeuten. So konnte oberhalb von 4 M EMIMCl kaum noch lösliches CM-rPA detektiert werden. Die Ursachen für die Verringerung der Rückfaltungsausbeuten, die abnehmende Löslichkeit von CM-rPA sowie der Zustand von rPA in hohen Konzentrationen ionischer Flüssigkeiten sollten näher untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge von tc-rPA in EMIMCl gemessen.

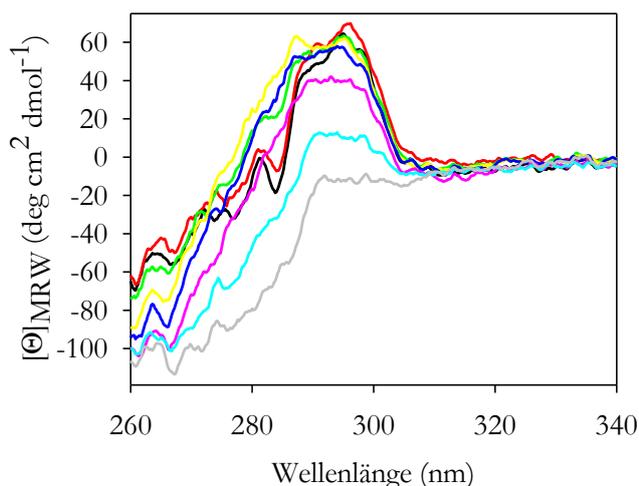


Abb. 3.18: Nah-UV-CD Spektren von tc-rPA in EMIMCl. Aufgetragen sind die Nah-UV-CD Spektren von tc-rPA in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und ansteigenden Konzentrationen an EMIMCl (— 4,4 M, — 4,7 M, — 4,9 M, — 5,2 M, — 5,4 M, — 5,6 M, — 5,8 M, — 6 M). Die Proteinkonzentration betrug 3,4 mg ml⁻¹. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert und auf molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet.

Da eine Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie hierfür aufgrund der starken Eigenfluoreszenz des EMIMCl nicht möglich war, wurde eine mögliche Denaturierung von tc-rPA mittels Circular dichroismus untersucht. Es stellte sich hierbei jedoch heraus, dass ein Messen im Fern-UV-Bereich (180 – 260 nm) wegen der Absorption des Imidazolium-Rings nicht möglich war. Daher wurde der Einfluss von EMIMCl auf tc-rPA im Nah-UV-CD Bereich untersucht. Abb. 3.18 zeigt Nah-UV-CD-Spektren von tc-rPA in verschiedenen Konzentrationen von EMIMCl.

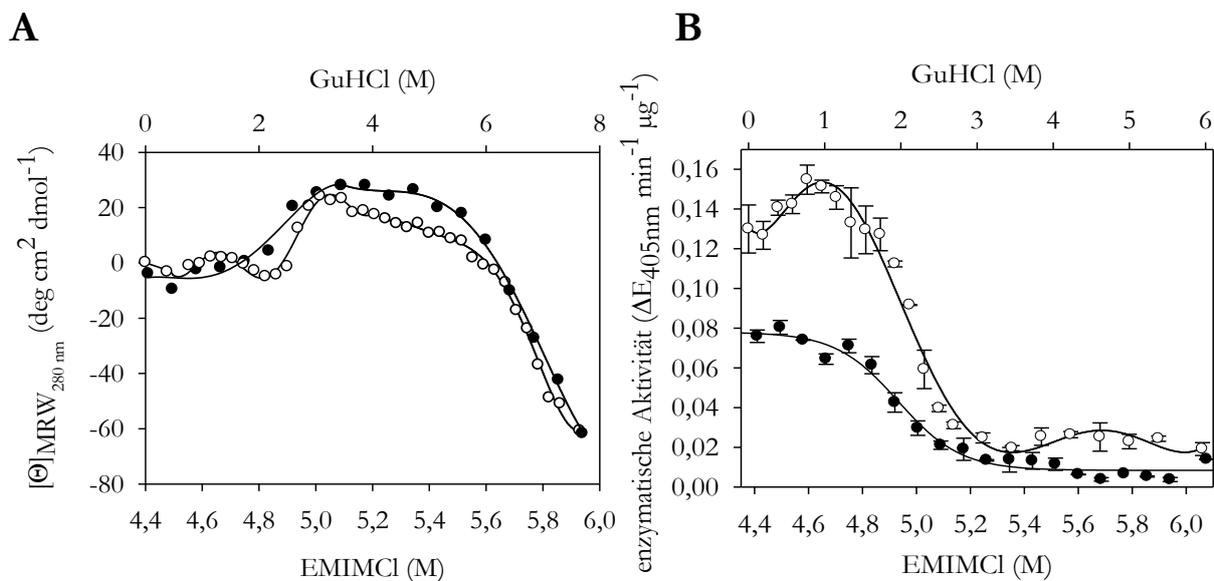


Abb. 3.19: Nah-UV-CD- und Aktivitäts-Übergänge von tc-rPA in EMIMCl und GuHCl. (A) Die Auftragungen zeigen die EMIMCl- (●) bzw. GuHCl-induzierte Denaturierung (○) von tc-rPA, gemessen bei 280 nm im Nah-UV-CD-Bereich. Neben den Additiven enthielten alle Lösungen 1 mM EDTA und 100 mM Borsäure/NaOH bzw. Tris/HCl, pH 8,5. Die CD-Signale wurden pufferkorrigiert und auf molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet. In (B) sind Aktivitätsübergänge mit tc-rPA gezeigt, welches aus 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 und ansteigenden Konzentrationen EMIMCl (●) bzw. GuHCl (○) verdünnt wurde. Hierbei wurden die Anfangsanstiege der Kinetiken aufgetragen. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 10 μg ml⁻¹.

Ausgehend von den in der Literatur verfügbaren Nah-UV-CD-Spektren für die Kringel 2- bzw. Serinproteasedomäne (Cleary et al., 1989; Werner et al., 1999) war bei den Spektren erkennbar, dass tc-rPA in 4,4 M EMIMCl noch nativ vorlag, während ab 4,9 M die Serinproteasedomäne und ab 5,6 M auch die Kringel 2-Domäne denaturierte. Dieser Umstand wird noch verdeutlicht, wenn man den Nah-UV-CD-Übergang von tc-rPA in EMIMCl sowie die Abnahme der Aktivität mit analogen Experimenten in steigenden GuHCl-Konzentrationen vergleicht (Abb. 3.19 A). Es war dabei sowohl bei der GuHCl- als auch bei der EMIMCl-induzierten Denaturierung zu erkennen, dass die Serinproteasedomäne ihren Übergangsmittelpunkt bei ca. 2 M GuHCl bzw. 4,9 M EMIMCl hatte und bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration die Kringel 2-Domäne ab ca. 6 M GuHCl bzw. 5,6 M EMIMCl (Abb. 3.19 A) denaturierte. Analoges ergab sich bei Untersuchung der Denaturierung von tc-rPA anhand der Aktivität (Abb. 3.19 B).

Sobald es zu einer Denaturierung der Serinproteasedomäne kam, trat bei Verdünnung in den Aktivitätsansatz eine Lag-Phase auf, da sich die Domäne erst wieder in ihre native Form falten musste. Die Mittelpunkte für die mittels Aktivität gemessenen Übergänge der Serinproteasedomäne von tc-rPA lagen hierbei ebenfalls bei etwa 2 M GuHCl bzw. 4,9 M EMIMCl. Die

Aktivität der aus EMIMCl verdünnten Proben war um ca. 50 % niedriger, da sich bei Verdünnung höhere Salzkonzentrationen im Aktivitätsansatz befanden.

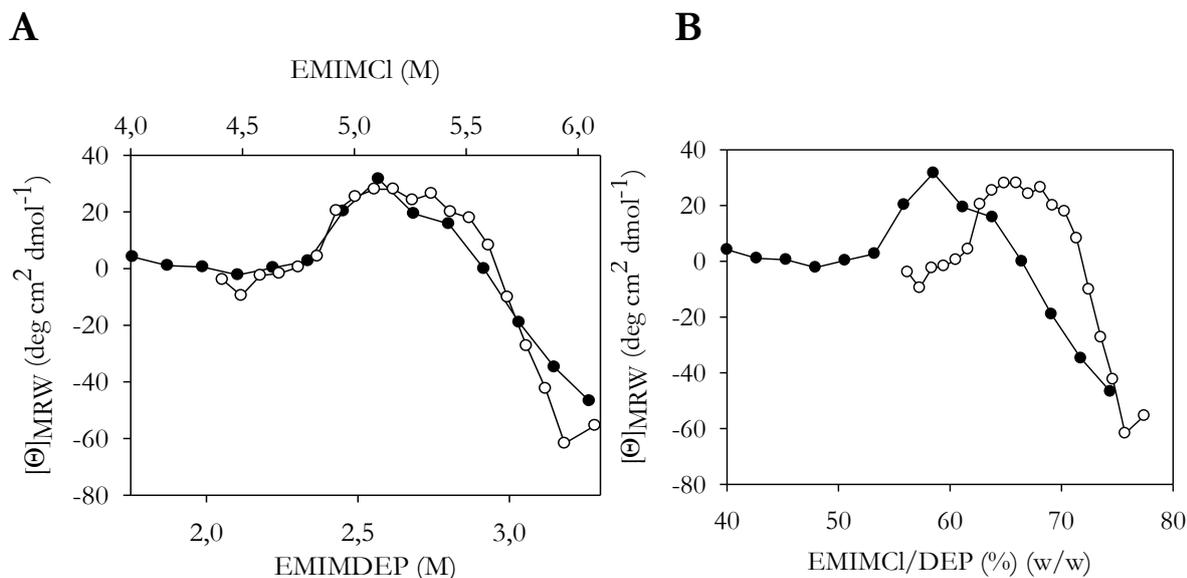


Abb. 3.20: Vergleich der Nah-UV-CD-Übergänge von tc-rPA in EMIMDEP und EMIMCl. Aufgetragen sind die Nah-UV-CD-Übergänge von tc-rPA in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und ansteigenden Konzentrationen EMIMDEP (●) und EMIMCl (○). Dabei wurden für die ionischen Flüssigkeiten in (A) die molare Konzentrationsskala und in (B) die Masseprozentkala (w/w) verwendet. Alle Messwerte wurden auf molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet.

Ähnlich wie bei EMIMCl wirkten auch hohe Konzentrationen EMIMDEP denaturierend auf tc-rPA. So hatte bei der Messung eines Nah-UV-CD-Überganges für die Denaturierung von tc-rPA in EMIMDEP die Serinproteasedomäne ihren Übergangsmittelpunkt bei etwa 2,4 M und die Kringel 2-Domäne bei etwa 3 M EMIMDEP. Rechnet man die Salzkonzentrationen auf Masseprozent (w/w) um, so ergab sich eine stärker denaturierende Wirkung für DEP⁻ als für Cl⁻ (Abb. 3.20 A und B).

Weiterhin wurde die Denaturierung von tc-rPA in EMIMCl auch mittels ATR-FTIR-Spektroskopie verfolgt. Hierfür wurden Spektren des Proteins in 1 M und 4,5 M sowie eine Zeitabhängigkeit der Spektren in 5,4 M EMIMCl gemessen. Bei den Spektren wurde die Amid I-Bande betrachtet, da ihre Form charakteristisch für die Sekundärstrukturelemente eines Proteins ist. Diese wird bei einer Denaturierung zunehmend symmetrisch, weil das Protein bei diesem Prozess in ein zufälliges, mit der Zeit variierendes Ensemble von Sekundärstrukturanteilen überführt wird. Abb. 3.21 A zeigt ein ATR-FTIR-Spektrum von tc-rPA in 1 M EMIMCl mit der Amid I-Bande bei ca. 1640 cm⁻¹ und der Amid II-Bande bei 1540 cm⁻¹. In Abb. 3.21 B sind die Amid I-Banden aus den ATR-FTIR-Spektren von nativem tc-rPA in 1 M sowie in 4,5 M EMIMCl dargestellt.

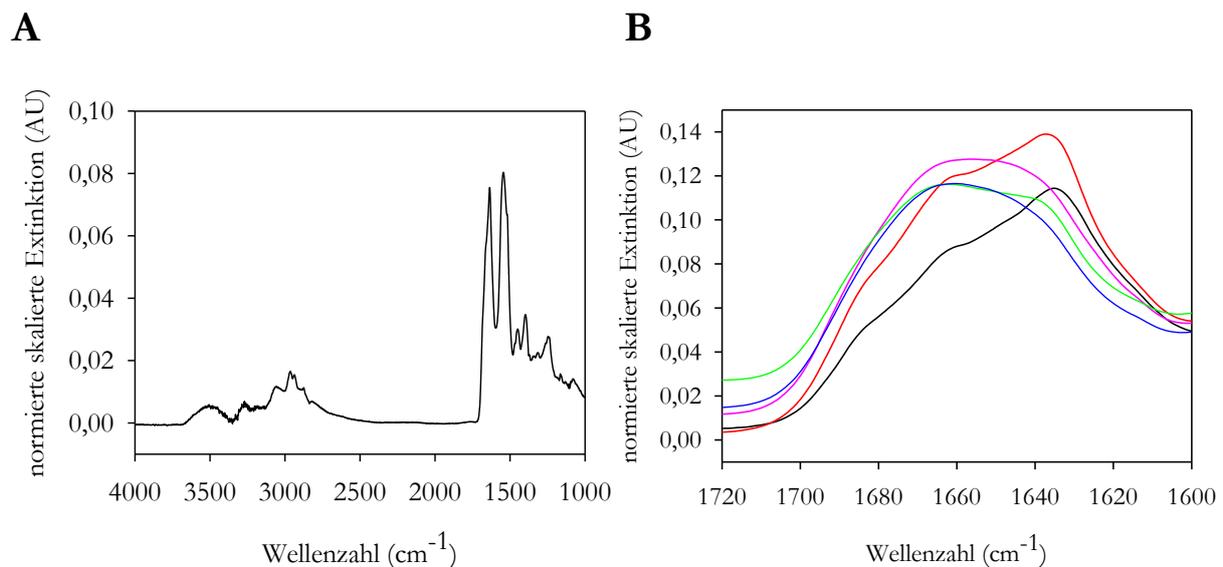


Abb. 3.21: ATR-FTIR-Spektren von tc-rPA in EMIMCl. In **(A)** ist ein komplettes ATR-FTIR-Spektrum von tc-rPA in 1 M EMIMCl gezeigt. Die Proteinkonzentration betrug 62,6 mg ml⁻¹. **(B)** Gezeigt sind die Spektren von tc-rPA im Bereich der Amid I-Bande. Hierbei ist (—) tc-rPA in 1 M EMIMCl, (—) in 4,5 M EMIMCl (92,3 mg ml⁻¹) und (—), (—) sowie (—) tc-rPA (36,9 mg ml⁻¹) in 5,4 M EMIMCl nach 5, 10 und nach 40 min. Alle verwendeten Lösungen enthielten zudem 1 mM EDTA und 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5. Alle Spektren wurden um die Beträge der Puffer korrigiert und auf eine Absorption von 1 normiert.

Es waren bei beiden Spektren Banden bei ca. 1680, 1660 sowie 1640 cm⁻¹ zu erkennen. Nach Butler und McNamee (1993) sind Peakmittelpunkte in diesen Bereichen charakteristisch für Turns (1683 cm⁻¹), α -Helices (1656 cm⁻¹) und β -Stränge (1638 cm⁻¹). Bei den Spektren von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl war erkennbar, dass die Amid I-Bande mit der Zeit ihre Form veränderte und symmetrisch wurde, was auf eine langsame Denaturierung von tc-rPA hindeutete.

Es konnte nun bereits mit den Nah-UV-CD-Übergängen gezeigt werden, dass sich die Tertiärstruktur von tc-rPA in hohen EMIMCl-Konzentrationen auflöste. Weiterhin deuteten die ATR-FTIR-Messungen auf eine zumindest partielle Denaturierung der Sekundärstruktur von tc-rPA hin. Da allerdings weder eine partielle noch eine komplette Denaturierung zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wurden Festkörper-NMR-Messungen durchgeführt. Hierfür wurden natives tc-rPA, CM-rPA und in 5,4 M EMIMCl denaturiertes tc-rPA (33 mg ml⁻¹, für ca. 1 Monat inkubiert) durch Dialyse gegen 50 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 ausgefällt und für die Messungen verwendet.

Mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden ¹³C-Spektren gemessen, für die der im Protein natürlich vorkommende ¹³C-Kohlenstoff ausreichend war, um qualitative Aussagen hinsichtlich der Reststruktur von tc-rPA im EMIMCl-denaturierten Zustand treffen zu können.

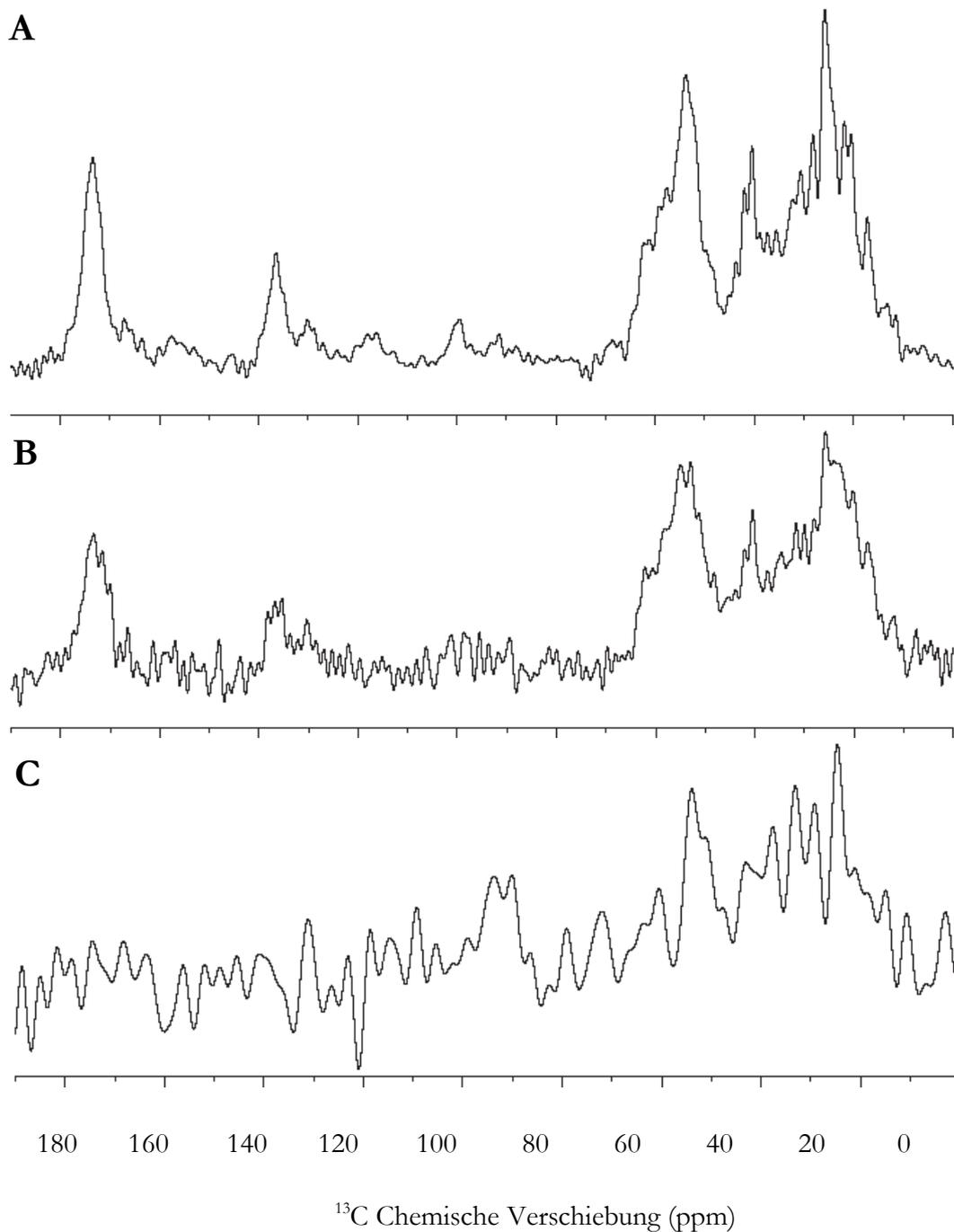


Abb. 3.22: ^{13}C -NMR-Spektren, gemessen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie. Gezeigt sind Festkörper-NMR-Spektren von nativem tc-rPA (**A**), von in 5,4 M EMIMCl denaturiertem tc-rPA (**B**) und von CM-rPA (**C**). Alle Proteinproben wurden durch erschöpfende Dialyse gegen 50 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 ausgefällt. Die CP-MAS-Frequenz betrug 7 kHz. Es wurden zwischen 4096 und 16530 Scans akkumuliert.

Zwar war eine exakte Auswertung der in Abb. 3.22 gezeigten Spektren nicht möglich, jedoch ließen sich aus dem Bandenmuster und dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis Schlüsse ziehen. So kann ein definiertes Bandenmuster als Maß für die Rigidität einer Proteinstruktur verwendet

werden. Die Spektren des nativen tc-rPA und des EMIMCl-denaturierten tc-rPA zeigten sehr ähnliche Bandenmuster, während diese im Spektrum von CM-rPA kaum auftraten. Dies bedeutet, dass CM-rPA – seinem Verwendungszweck in dieser Arbeit entsprechend – als vollständig denaturiertes Protein und damit als zufälliges Strukturen-Ensemble in den Aggregaten vorlag.

Die Signalintensität für das Spektrum des EMIMCl-denaturierten tc-rPA entsprach ca. 25 %, bezogen auf die Intensität des Spektrums des nativen tc-rPA. Dies bedeutete, dass tc-rPA im EMIMCl-denaturierten Zustand nur teilweise denaturiert vorlag. Dies stimmte mit den Nah-UV-CD- und Aktivitätsübergängen überein, aus welchen eine Denaturierung der Serinprotease-domäne bei ca. 4,9 M EMIMCl hervorging, während die stabilere Kringel 2-Domäne in 5,4 M EMIMCl noch nativ vorlag.

Weiterhin ließ sich aus den Festkörper-NMR-Messungen schlussfolgern, dass das tc-rPA nach Entfernung des EMIMCl aus der Proteinlösung nicht wieder in seine native Form zurückfalten konnte, wie dies bei einer reversiblen Denaturierung in GuHCl der Fall wäre.

Dies wurde ebenfalls bei der Messung der Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von tc-rPA in 5 M und 6 M EMIMCl festgestellt (Abb. 3.23). Hierbei wurde die Löslichkeit von tc-rPA verfolgt und die Gesamtproteinkonzentration durch Verdünnung in 7 M GuHCl und der Anteil des noch rückfaltbaren Proteins durch Verdünnung in 1 M L-ArgHCl bestimmt. Dabei war erkennbar, dass in 6 M EMIMCl der Anteil an Protein, welches nach Verdünnung in 1 M L-ArgHCl noch in den nativen Zustand falten konnte, mit der Zeit abnahm. Zudem kam es zu deutlicher Aggregatbildung.

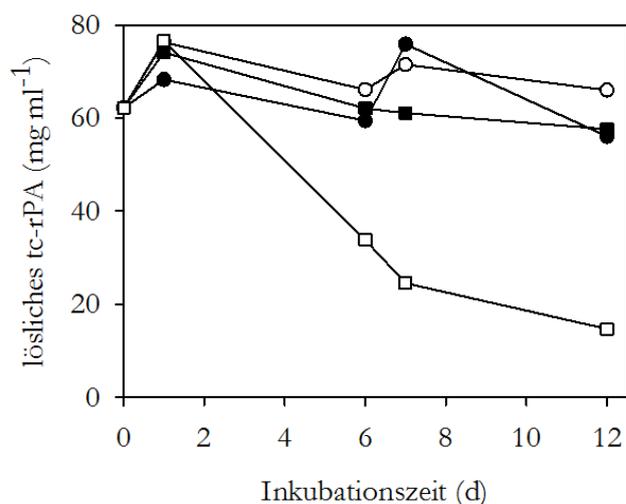
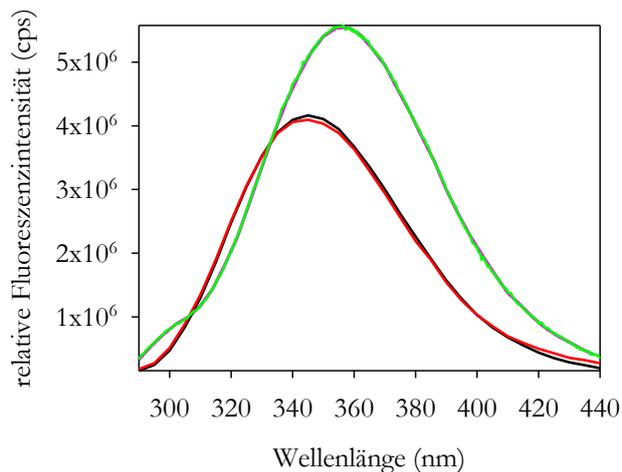


Abb. 3.23: Verlust der Renaturierbarkeit von tc-rPA durch Inkubation in 5 M und 6 M EMIMCl. Gezeigt ist die Abnahme der Renaturierbarkeit von tc-rPA durch Inkubation in 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 1 mM EDTA und 5 M (●) bzw. 6 M EMIMCl (○) bei 4°C. Die Gesamtproteinmenge wurde durch Verdünnung in 7 M GuHCl bestimmt. Der Anteil an renaturierbarem Protein wurde durch Verdünnung in 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 ermittelt (5 M EMIMCl (■), 6 M EMIMCl (□)).



	normierte enzymatische Aktivität (%)	normierte Fluoreszenz- intensität (%)
tc-rPA, nativ (Kontrolle)	100	100
tc-rPA aus EMIM- Denaturierung	100,3	99,1

Abb. 3.24 und Tab. 3.2: Fluoreszenzmissionsspektren und Aktivitätsmessungen von tc-rPA, renaturiert aus dem EMIMCl-denaturierten Zustand. **Abb. 3.24:** Gezeigt sind die Fluoreszenzmissionsspektren von tc-rPA, welches zuerst in 5,4 M EMIMCl vorlag und anschließend in 4 M GuHCl, pH 3 überführt wurde (denaturiert —, renaturiert —). Die Renaturierung erfolgte durch Verdünnung in 1 M L-ArgHCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5. Die Proteinkonzentration betrug jeweils $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, die Blenden für die Anregung und die Emission betragen je 5 nm. Die Spektren wurden pufferkorrigiert. Als Kontrolle wurde natives tc-rPA verwendet, denaturiert (—) und renaturiert (—). **Tab 3.2:** Auflistung der I_{max} und der Aktivität in % (normiert auf natives tc-rPA).

Da die Denaturierung von tc-rPA – wie bereits gezeigt – innerhalb von Minuten bis Stunden ablief, kann davon ausgegangen werden, dass andere Prozesse die Rückfaltung von tc-rPA in den nativen Zustand verhinderten.

Ausgehend von in 5,4 M EMIMCl irreversibel denaturiertem tc-rPA war es möglich, durch Dialyse gegen 4 M GuHCl, pH 3 und anschließende Renaturierung in Puffer mit 1 M L-ArgHCl wieder vollständig natives tc-rPA zu erhalten (Abb. 3.24 bzw. Tab. 3.2). Dies bedeutet, dass tc-rPA in 5,4 M EMIMCl einer Denaturierung unterlag, welcher die Aggregation als irreversibler Prozess nachgeschaltet war. Diese Aggregate konnten dann in 4 M GuHCl, pH 3 solubilisiert und durch Rückfaltung wieder in natives Protein überführt werden.

3.4.2 Aggregation von tc-rPA und CM-rPA in ionischen Flüssigkeiten

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 gezeigt wurde, denaturierte tc-rPA in hohen EMIMCl-Konzentrationen und unterlag anschließend einem irreversiblen Prozess, bei welchem es sich vermutlich um Aggregation handelte. Dies wurde nun näher untersucht. Hierfür wurden Messungen mit dynamischer Lichtstreuung durchgeführt. In dieser Arbeit wurde für Aggregationskinetiken stets der z-Mittelwert verwendet. Dabei handelt es sich um eine intensitätsgewichtete Messgröße, die nicht die exakte Partikelgrößenverteilung in Lösung

widerspiegelt. Diese ergibt sich, wenn zusätzlich zu der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung die auf das Partikelvolumen und auf die Partikelanzahl bezogenen Größenverteilungen berechnet werden.

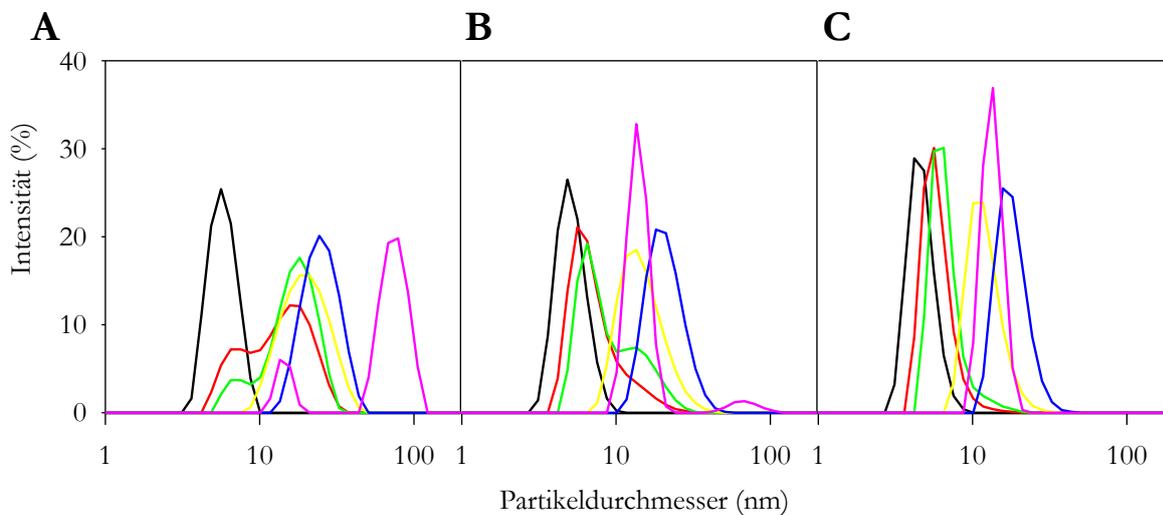


Abb. 3.25: Partikelgrößenverteilungen für die Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl. Gezeigt sind die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Partikelgrößenverteilungen für die Aggregation von 54 mg ml^{-1} tc-rPA in 5,4 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5. Hierbei ist in **(A)** die intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung und in **(B)** und **(C)** die berechneten volumengewichteten und ungewichteten Nummern-Partikelgrößenverteilungen nach 0 (—), 1 (—), 3 (—), 26 (—), 69 (—) und 214 h (—) aufgetragen.

Die Veränderungen in den Partikelgrößenverteilungen, welche durch die Aggregation von tc-rPA in 5,4 M (68 % (w/w)) EMIMCl hervorgerufen wurden, sind in Abb. 3.25 A – C am Beispiel von 54 mg ml^{-1} tc-rPA demonstriert. Hierbei wurden alle drei Partikelgrößenverteilungen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Es war erkennbar, dass sämtliches Protein innerhalb von wenigen Stunden aggregierte, jedoch in Lösung blieb. Dabei stieg der z-Mittelwert von 5,7 nm – dies entsprach nach der Korrektur um den Beitrag der Viskosität dem hydrodynamischen Durchmesser des 39,5 kDa großen tc-rPA – auf etwa 75 nm an, was bei globulären Aggregaten einem Molekulargewicht von etwa 12 MDa entsprechen würde. Die Berechnung der volumengewichteten und der ungewichteten Nummern-Partikelgrößenverteilungen war mit fortschreitender Aggregation durch die Präsenz großer Partikel in der Lösung zunehmend ungenau. Daher wurden diese Größenverteilungen nur der Vollständigkeit halber aufgeführt.

Nachdem die Aggregation von tc-rPA in EMIMCl nachgewiesen werden konnte, wurde nun die Konzentrationsabhängigkeit untersucht um die Reaktionsordnung zu bestimmen. Hierfür wurden bei steigender Proteinkonzentration Aggregationskinetiken in 5,4 M EMIMCl gemessen (Abb. 3.26 A). Aus der doppelt logarithmischen Auftragung der Anfangsanstiege der Kinetiken

gegen die Proteinkonzentration konnte eine Gerade ermittelt werden, deren Anstieg dem n-Wert, also der Reaktionsordnung der initialen Aggregation, entspricht (Abb. 3.26 B).

Der n-Wert für die Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl betrug $1,2 \pm 0,04$. Da eine Aggregation für gewöhnlich eine Reaktion zweiter Ordnung ist, konnte aus diesem n-Wert geschlussfolgert werden, dass die monomolekulare Denaturierung von tc-rPA der limitierende Schritt bei der Aggregation war.

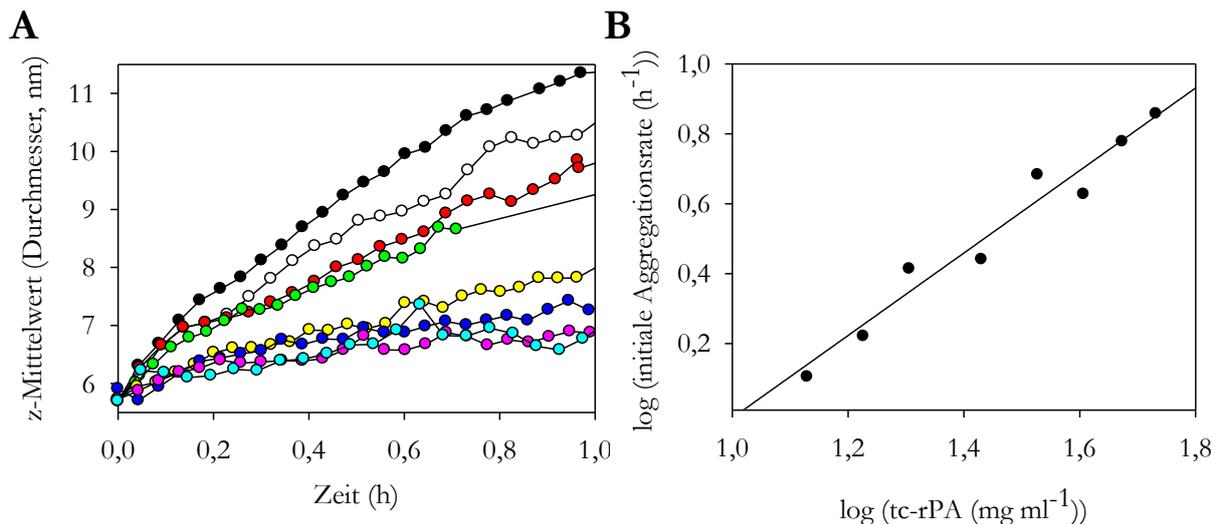


Abb. 3.26: Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl. (A) Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5 wurde mittels dynamischer Lichtstreuung gemessen. Hierbei wurden (●) 54, (○) 47, (●) 40, (●) 34, (●) 27, (●) 20, (●) 17 und (●) 14 mg ml⁻¹ tc-rPA eingesetzt. (B) zeigt die doppelt logarithmische Auftragung der initialen Aggregationsrate gegen die Proteinkonzentration.

Um dies zu überprüfen, wurde zusätzlich zu den Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung noch die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation über die Abnahme der enzymatischen Aktivität nach der Rückfaltung von tc-rPA verfolgt (Abb. 3.27 A und B). Hierfür wurde tc-rPA aus den Aggregationsansätzen 1:200 in Puffer mit 1 M L-ArgHCl verdünnt, dabei – soweit möglich – renaturiert und anschließend nach weiterer 1:13 Verdünnung die Restaktivität bestimmt. Aus den Anfangsanstiegen der Kinetiken ergab sich ein n-Wert von $1,1 \pm 0,4$. Dies bedeutet, dass auch der Verlust der enzymatischen Aktivität durch die Aggregation in 5,4 M EMIMCl eine Reaktion erster Ordnung war.

Da sich in der Literatur Beispiele einer Fibrillenbildung von Lysozym in ionischen Flüssigkeiten finden (Byrne und Angell, 2009), wurde überprüft, ob es sich bei den in 5,4 M EMIMCl produzierten tc-rPA-Aggregaten um Fibrillen handeln könnte.

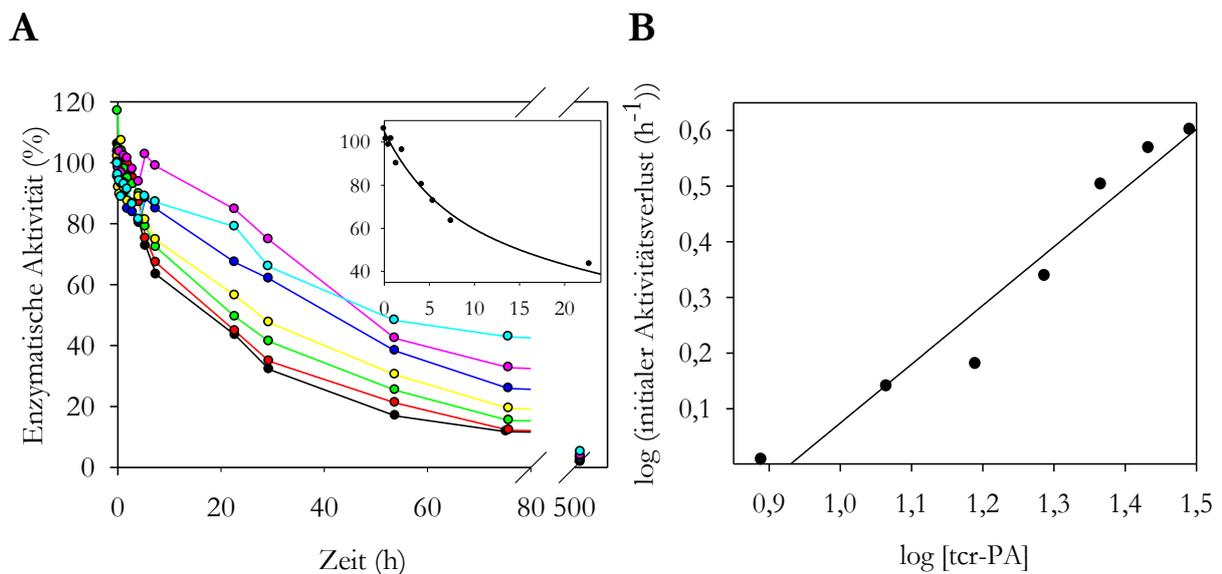


Abb. 3.27: Verlust der enzymatischen Aktivität von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl. (A) Aufgetragen ist die Abnahme der enzymatischen Aktivität mit steigender Inkubationszeit von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Hierbei ist (●) 31, (●) 27, (●) 23, (●) 19, (●) 15, (●) 12 und (●) 8 mg ml⁻¹ tc-rPA im Aggregationsansatz. Die Proteinlösungen wurden 1:2600 in den Assaypuffer verdünnt und die enzymatische Aktivität bestimmt und auf t_0 normiert. Die Anfangsanstiege wurden mit Hilfe von Regressionskurven bestimmt. Exemplarisch ist dies gezeigt für den Verlust der Aktivität bei 31 mg ml⁻¹ tc-rPA im Aggregationsansatz (eingelassene Grafik). (B) Doppelt logarithmische Auftragung der Anfangsanstiege der Kinetiken.

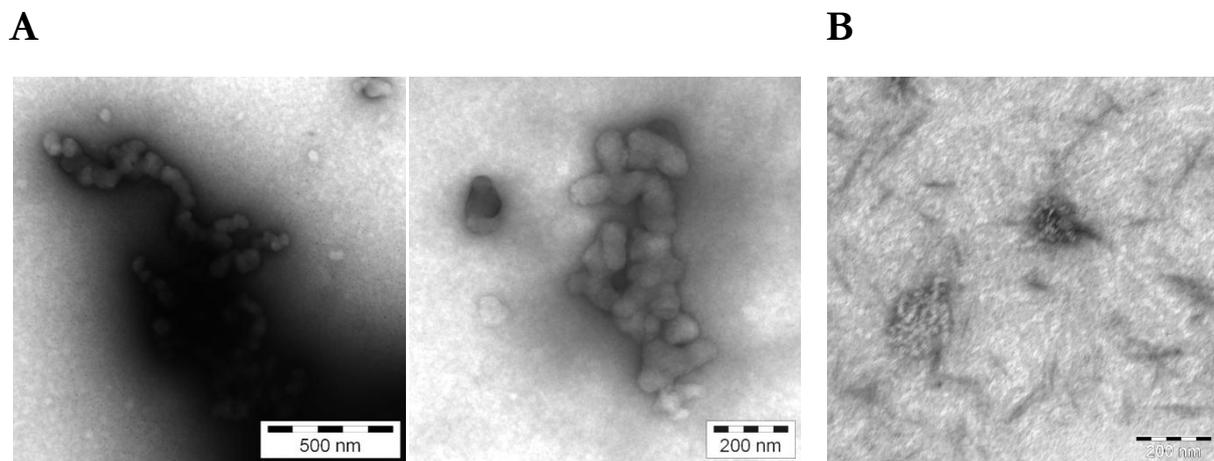


Abb. 3.28: TEM-Bilder von tc-rPA-Aggregaten aus 5,4 M EMIMCl. (A) Gezeigt sind maßstäblich unterschiedliche (500 und 200 nm) elektronenmikroskopische Aufnahmen von amorphen Aggregaten, welche in 5,4 M EMIMCl generiert wurden. (B) Natives tc-rPA wurde als Negativkontrolle verwendet und analog behandelt (Maßstab des Bildes 200 nm).

Allerdings waren auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.28 A) keine definierten Fibrillen zu erkennen, sondern lediglich amorphe Aggregate. Um auszuschließen, dass die Behandlung des Proteins für die Aggregation verantwortlich war, wurden als Negativkontrolle

ebenfalls TEM-Aufnahmen von nativem tc-rPA angefertigt. Hierbei konnten allerdings so gut wie keine Aggregate detektiert werden (Abb. 3.28 B).

Als nächstes wurde die Aggregation von CM-rPA in EMIMCl untersucht. Da das Protein als Modellsystem für den denaturierten Zustand verwendet wurde, sollte hier eine Denaturierung nicht limitierend für die Aggregation sein. Für 200 mM EMIMCl konnte analog zu den Messungen in L-ArgHCl mittels Streulichtmessungen eine Reaktionsordnung von 10 ermittelt werden (Abb. 3.29 A).

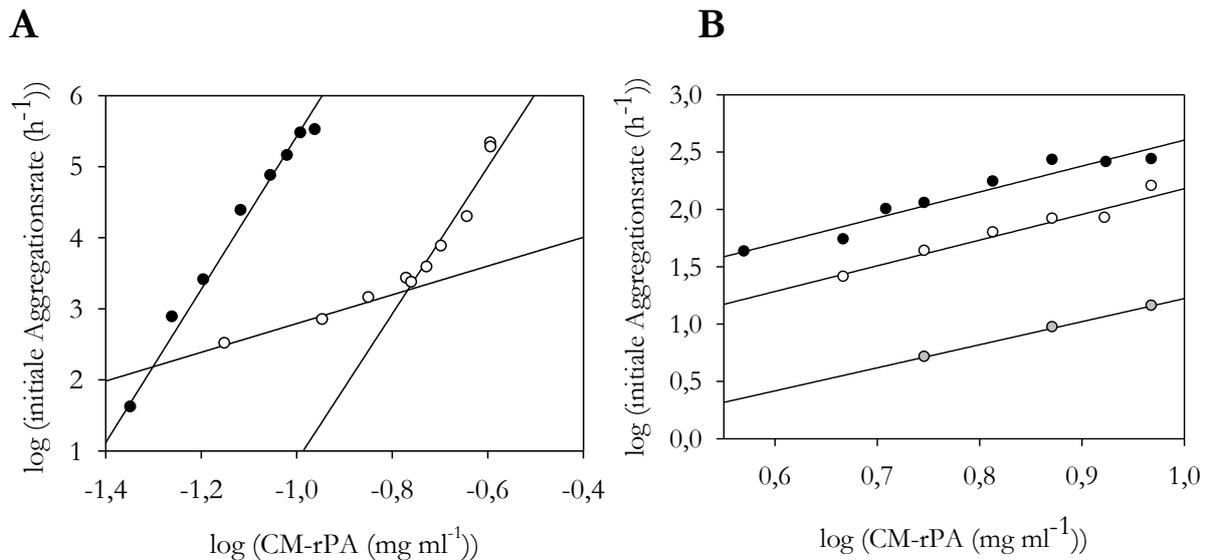


Abb. 3.29: Aggregation von CM-rPA. (A) Gezeigt sind doppelt logarithmische Auftrugungen der Anfangsanstiege der Aggregationsreaktion von CM-rPA in 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5, 200 mM (●) und 500 mM EMIMCl (○). Die Aggregation wurde mittels Streulichtmessungen verfolgt. In (B) sind die Anfangsanstiege der Aggregation von CM-rPA in 5,4 (●), 3,6 (○) und 2,7 M EMIMCl (◐) doppelt logarithmisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Die Messung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung.

Bei einer Erhöhung der EMIMCl-Konzentrationen auf 500 mM konnten zwei Phasen für die Aggregationsordnung ausgemacht werden. So betrug die Ordnung bei geringeren Proteinkonzentrationen $n = 2$ und bei Erhöhung der Proteinkonzentration $n = 10$. In höheren EMIMCl-Konzentrationen konnte mittels dynamischer Lichtstreuung ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aggregation von CM-rPA festgestellt werden (Abb. 3.29 B). Aus den doppelt logarithmischen Auftrugungen der Anfangsanstiege gegen die Proteinkonzentration ergab sich für CM-rPA in 5,4 M EMIMCl ein n -Wert von 2,31, in 3,6 M EMIMCl ein n -Wert von 2,35 und in 2,7 M ein n -Wert von 2,01. Dies bedeutete, dass CM-rPA in EMIMCl mit einer Reaktion zweiter Ordnung aggregierte. Eine Verringerung der EMIMCl-Konzentration führte zu einer Verschiebung der Kurven zu höheren Proteinkonzentrationen.

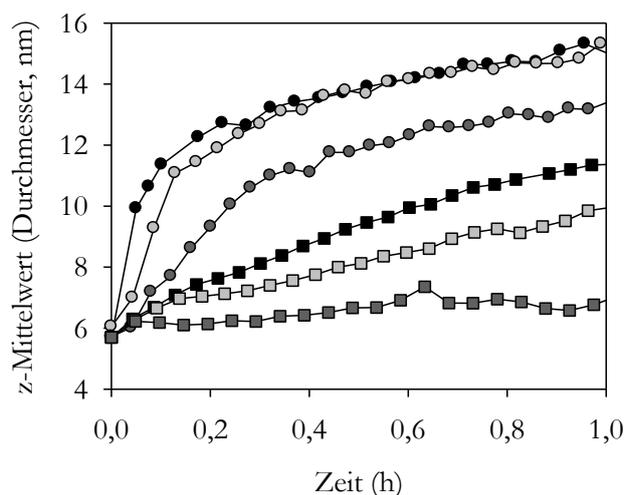


Abb. 3.30: Aggregation von tc-rPA in EMIMCl und EMIMDEP. Gezeigt sind die mittels dynamischer Lichtstreuung gemessenen Aggregationskinetiken von tc-rPA in 2,9 M EMIMDEP und zum Vergleich in 5,4 M EMIMCl, 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure/NaOH, pH 8,5. Die Proteinkonzentrationen betragen bei EMIMDEP (●) 50, (○) 25 und (●) 6 mg ml⁻¹ und in EMIMCl (■) 54, (□) 40 und (■) 7 mg ml⁻¹.

Weiterhin wurde überprüft, ob auch in EMIMDEP der Denaturierung von tc-rPA in 2,9 M (66 % (w/w)) die Aggregation folgte. Hierfür wurde – analog zu bereits beschriebenen Experimenten – die tc-rPA-Konzentration variiert. In Abb. 3.30 sind Aggregationskinetiken von tc-rPA bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in EMIMDEP und EMIMCl verglichen. Es wurde dabei festgestellt, dass tc-rPA auch in geringeren Konzentrationen in EMIMDEP schneller aggregierte als in EMIMCl. Vermutlich war dies der stärkeren Destabilisierung durch EMIMDEP und einer schlechteren Löslichkeit des denaturierten Proteins zuzuschreiben. Messungen mit CM-rPA in EMIMDEP waren nicht auswertbar, da es bereits in der Durchmischungsphase zu starker Aggregation kam. Eine Verringerung der Proteinkonzentration war gerätebedingt ebenfalls nicht möglich.

3.5 Transferenergiemessungen von Aminosäuren

Es konnte in den letzten Kapiteln gezeigt werden, dass sowohl L-ArgHCl als auch EMIMCl die Löslichkeit von Proteinen erhöhten. Zusätzlich dazu führten höhere EMIMCl- und EMIMDEP-Konzentrationen zu einer Denaturierung und Aggregation von tc-rPA. Weiterhin wurde festgestellt, dass der Austausch des Cl⁻ gegen das DEP⁻ zu einer starken Verringerung der Rückfaltungsausbeute sowie zu einer erhöhten Aggregationsneigung führte und dass dies mit einer stärkeren Destabilisierung von rPA bzw. tc-rPA einher ging. Um die Interaktionen von Lösungsmitteladditiven auf Aminosäureebene zu untersuchen, wurde die Löslichkeit von Aminosäuren gemessen und daraus die freie Energie für den Transfer aus Wasser in Additivlösungen berechnet. Mit Hilfe dieser Messungen sollten Erklärungen für die auf Proteinebene beobachteten Effekte von L-ArgHCl und der ionischen Flüssigkeiten gefunden werden.

3.5.1 Transferenergiemessungen für L-ArgHCl-Lösungen

Die Löslichkeiten von Aminosäuren in L-ArgHCl wurden mittels Oszillationsdensitometrie beziehungsweise für Trp und Tyr über die Absorption bei 280 nm bestimmt. In allen Fällen wurden definierte ungesättigte und gesättigte Lösungen erzeugt und nach 48 h Inkubation die maximale Löslichkeit der Aminosäure in dem Lösungsmitteladditiv bestimmt. Da für die Löslichkeit von Aminosäuren in Wasser bereits Daten existieren (Liu und Bolen, 1995), wurden eigene Löslichkeitsmessungen nur mit Additivlösungen durchgeführt und ausgehend davon die freien Energien für den Transfer von Wasser in die Additivlösung berechnet. Dabei entsprechen positive Werte für die freien Transferenergien einer besseren Löslichkeit der Aminosäure in Wasser und negative freie Transferenergien einer besseren Löslichkeit in der Additivlösung.

Es wurde die Löslichkeit aller proteinogenen Aminosäuren in L-ArgHCl bestimmt. Eine Ausnahme davon bildete Cystein, da dieses trotz Zugabe von 1 mM EDTA unter Argon-Atmosphäre in Lösung innerhalb der 48-stündigen Inkubationszeit zu Cystin oxidierte und so keine zuverlässigen Löslichkeitsmessungen möglich waren. Für die Aminosäuren mit sauren Seitenketten (Asp, Glu) wurden die Natriumsalze, für die Aminosäuren mit basischen Seitenketten (Arg und Lys) die Hydrochloride verwendet. Als Modell für das Peptidrückgrat wurde Diketopiperazin (DKP, Glycinanhydrid) eingesetzt, welches aus zwei zum Ring geschlossenen Peptiduntereinheiten besteht und somit zwei Peptidbindungen besitzt und im Gegensatz zu Gly keine Nettoladung hat. Alle freien Transferenergien wurden aus den Molalitäten (mol kg⁻¹ Lösungsmittel) berechnet.

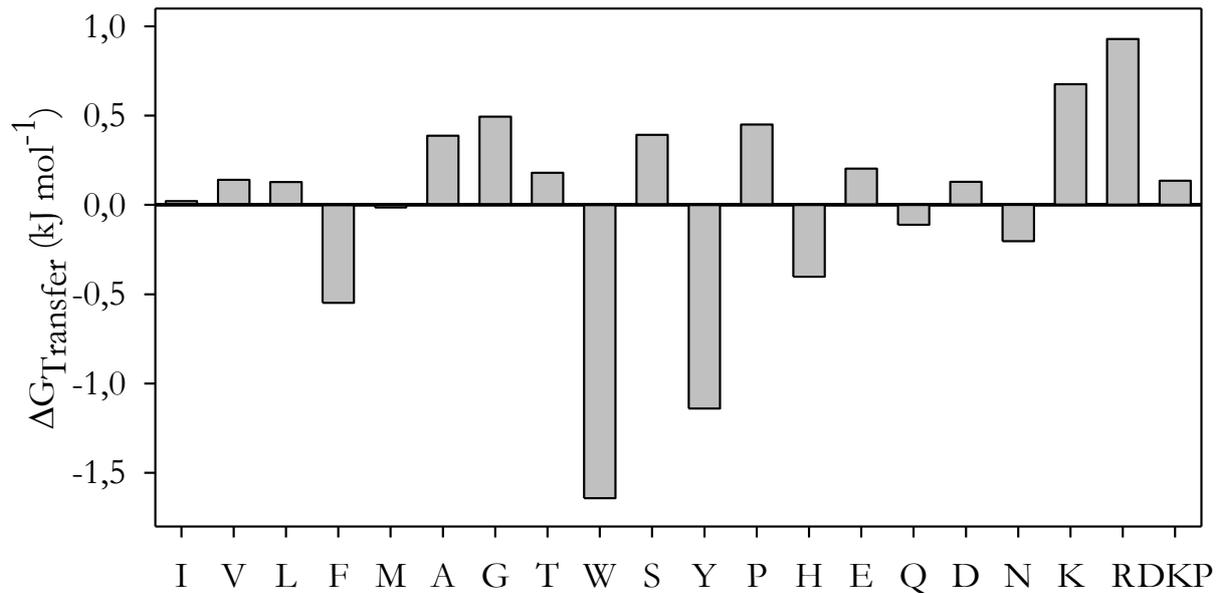
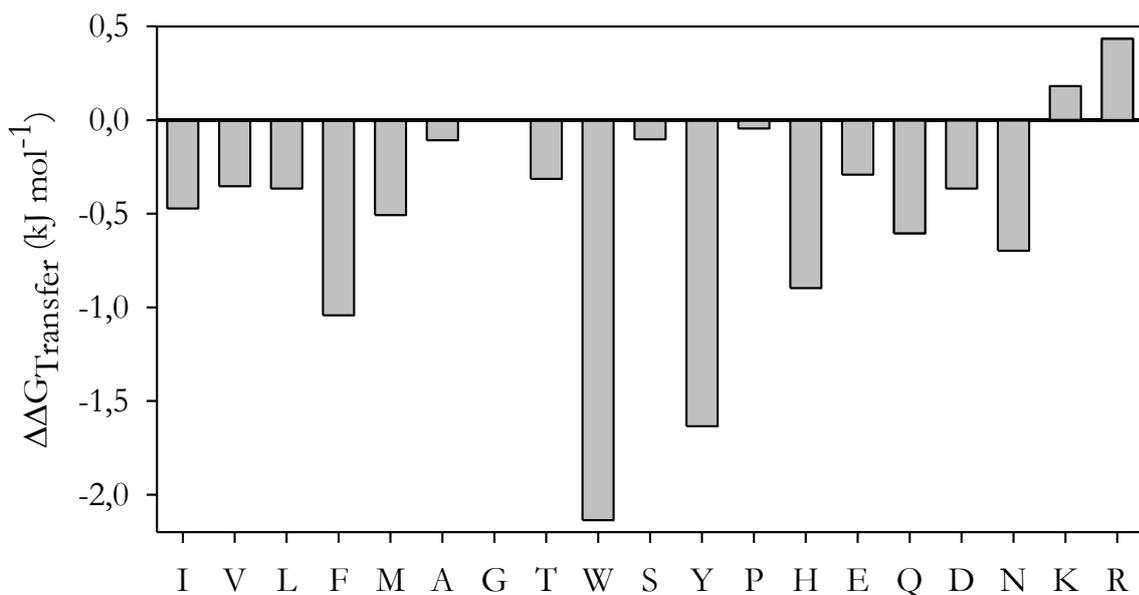
A**B**

Abb. 3.31: Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M L-ArgHCl. (A) Aufgetragen sind die freien Transferenergien für den Transfer von Aminosäuren von Wasser in 1 M L-ArgHCl. Die freien Transferenergien wurden aus den Aminosäure-Löslichkeiten berechnet. Für die Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet. DKP wurde als Modell für das Peptidrückgrat verwendet. Für die in **(B)** dargestellten freien Seitenketten-Transferenergien wurde von allen freien Transferenergien für die Aminosäure der Betrag von Glycin subtrahiert.

In Abb. 3.31 A sind die freien Energien für den Transfer von Aminosäuren von Wasser in 1 M L-ArgHCl dargestellt. Die Aminosäuren sind im Diagramm entsprechend ihrer Hydrophobizität nach Kyte und Doolittle (1982) angeordnet. Die freien Transferenergien für die Seitenketten

($\Delta\Delta G_{\text{Transfer}}$) wurden durch Subtraktion der freien Transferenergie von Glycin von den freien Transferenergien der übrigen Aminosäuren erhalten. Die gemessenen Löslichkeiten und freien Transferenergien sind im Anhang zusammen mit den zugehörigen Sättigungsdichten aufgeführt (Tab. 6.9). Diese werden zur Umrechnung der Molalitäten auf die Molaritäten benötigt.

Es ist aus Abb. 3.31 A erkennbar, dass L-ArgHCl insbesondere mit den aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und Phe sowie mit His interagiert. Hydrophobe, aliphatische Aminosäuren waren dagegen eher schlechter in L-ArgHCl löslich. Die Löslichkeit von Gly und von Aminosäuren, welche nur kleine Seitenketten haben, war in L-ArgHCl ebenfalls vermindert. Aminosäuren mit sauren Seitenketten waren schlechter, deren Amide etwas besser in L-ArgHCl löslich.

Aufgrund der unvorteilhaften Interaktion mit Glycin erhielt man bei der Berechnung der Beiträge der Seitenketten zu den freien Transferenergien für alle Aminosäuren außer für Lys und Arg negative freie Transferenergien. Dies bedeutete, dass L-ArgHCl mit diesen Aminosäureseitenketten vorteilhaft interagiert (Abb. 3.31 B).

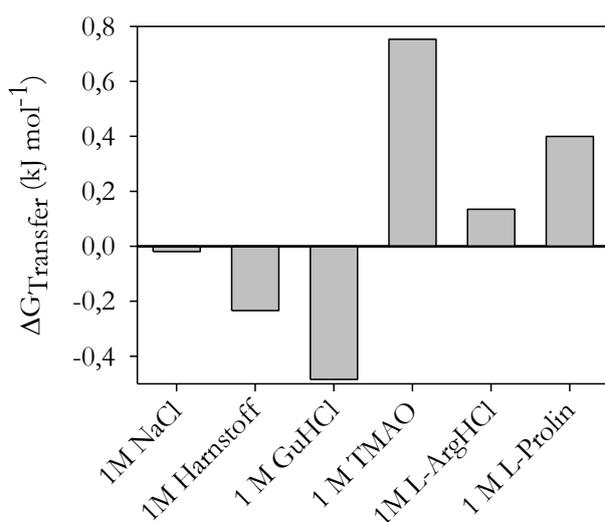


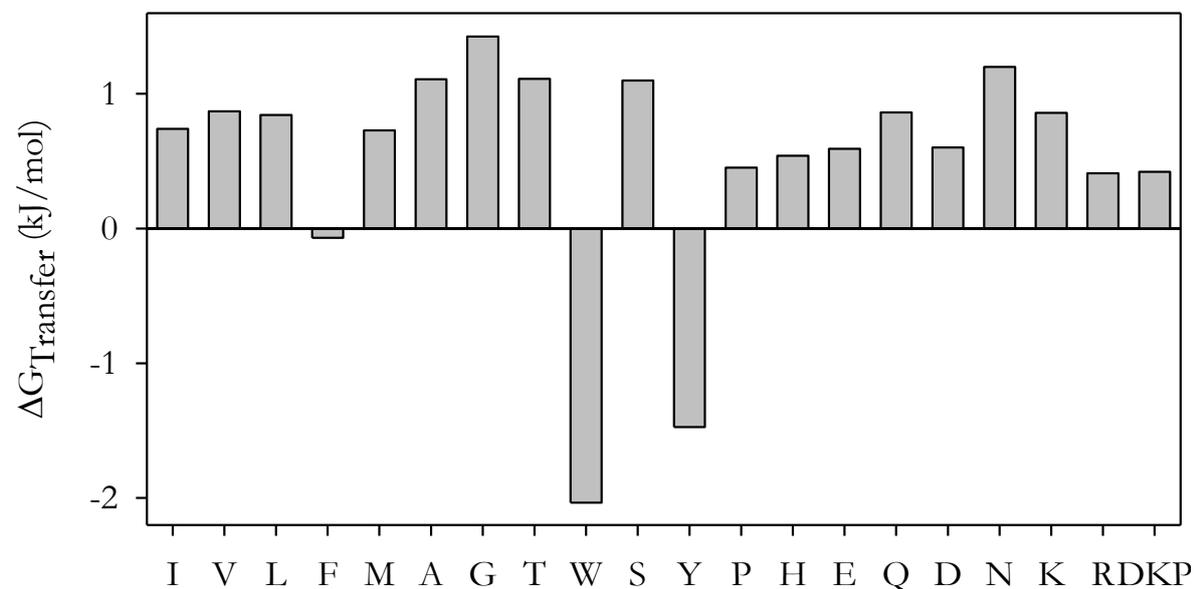
Abb. 3.32: Freie Energien für den Transfer von DKP aus Wasser in 1 M Additiv. Aufgetragen sind die aus den Löslichkeiten errechneten freien Transferenergien für DKP in verschiedene Additive. Die Löslichkeit für TMAO wurde aus Wang und Bolen (1997), die für Prolin aus Qu et al. (1998) entnommen. Die DKP-Löslichkeiten und Molalitäten sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

Aus Abb. 3.32 ist zu erkennen, dass GuHCl und Harnstoff vorteilhaft mit DKP, welches als Modellsystem für das Peptidrückgrat fungierte, interagierten. Aus diesem Grunde destabilisierten beide Additive Proteine. Während NaCl so gut wie keinen Einfluss auf die DKP-Löslichkeit hatte, ist der Transfer in TMAO oder Prolin, welche in der Natur weite Verwendung als Proteinstabilisatoren finden, und in L-ArgHCl unvorteilhaft. Die solubilisierende Wirkung von L-ArgHCl ist demnach ausschließlich vorteilhaften Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten zuzuschreiben.

3.5.2 Transferenergiemessungen für EMIMCl-Lösungen

Analog zu L-ArgHCl wurden auch die freien Energien für den Transfer von Aminosäuren von Wasser in 1 M EMIMCl bestimmt. Hierbei fiel auf, dass die Löslichkeiten abgesehen von Phe, Trp und Tyr schlechter waren als in Wasser (Abb. 3.33 A).

A



B

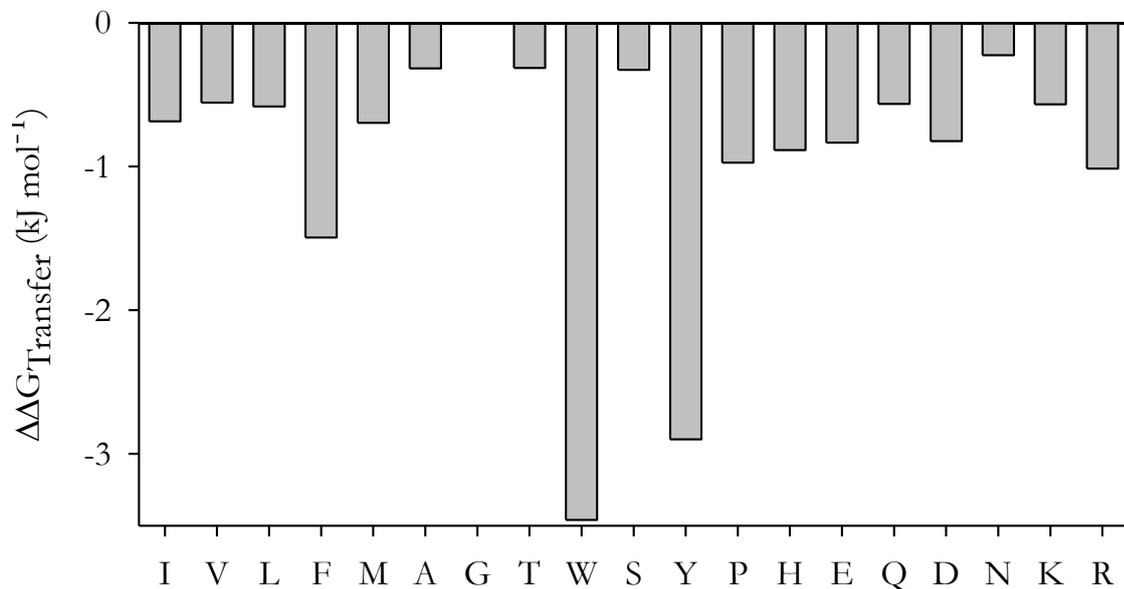


Abb. 3.33: Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M EMIMCl. (A) Aufgetragen sind die freien Energien für den Transfer von Aminosäuren von Wasser in 1 M EMIMCl. Die freien Transferenergien wurden aus den Aminosäure-Löslichkeiten berechnet. Für die Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet. DKP wurde als Modell für das Peptidrückgrat verwendet. Für die in **(B)** dargestellten freien Seitenketten-Transferenergien wurde von allen freien Transferenergien für die Aminosäure der Betrag von Glycin subtrahiert. Eine detaillierte Auflistung der Löslichkeiten findet sich im Anhang (Tab. 6.10).

Aus der Berechnung der freien Seitenketten-Transferenergien (Abb. 3.33 B) resultierten für alle Aminosäuren, insbesondere für jene mit aromatischen Seitenketten, vorteilhafte Interaktionen. Verantwortlich hierfür war die schlechte Löslichkeit von Gly in 1 M EMIMCl, aus welcher sich eine positive freie Transferenergie von $1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ergab.

Die Löslichkeit von DKP war in 1 M EMIMCl ebenfalls schlechter als in Wasser, was einer positiven freien Transferenergie ($0,42 \text{ kJ mol}^{-1}$) entsprach. Demnach solubilisierete EMIMCl nicht das Peptidrückgrat, so wie beispielsweise GuHCl oder Harnstoff. Dies erschien zunächst widersprüchlich, da in vorangegangenen Experimenten die denaturierende Wirkung von EMIMCl bei höheren Salzkonzentrationen nachgewiesen werden konnte. Daher wurde die Löslichkeit von DKP auch in höheren EMIMCl-Konzentrationen bestimmt um zu überprüfen, wie sich die Löslichkeit von DKP und somit die freien Transferenergien verhalten. Zum Vergleich wurde die Löslichkeit von DKP in ansteigenden NaCl-Konzentrationen bestimmt.

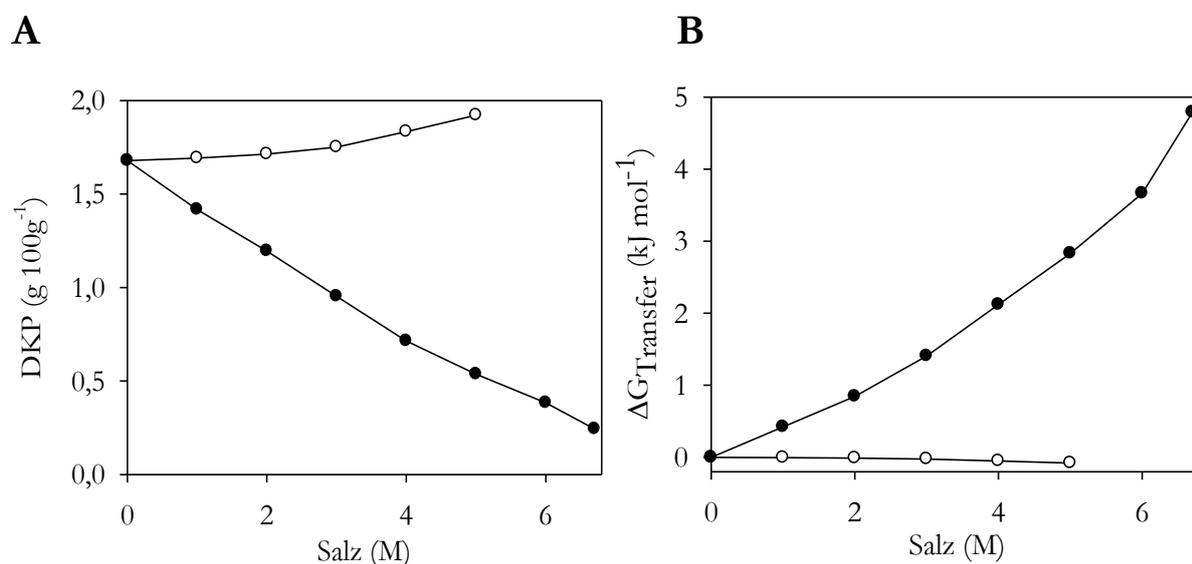


Abb. 3.34: Löslichkeit und freie Transferenergien von DKP in EMIMCl und NaCl. (A) Aufgetragen ist die Löslichkeit von DKP in steigenden Konzentrationen EMIMCl (●) und zum Vergleich in NaCl (○). In **(B)** sind die resultierenden freien Energien für den Transfer von Wasser in die jeweilige Salzlösung aufgetragen. Eine detaillierte Auflistung der Löslichkeiten findet sich im Anhang (Tab. 6.12).

Es ist in Abb. 3.34 A zu erkennen, dass mit steigender EMIMCl-Konzentration die DKP-Löslichkeit von $1,68 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ auf $0,24 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in 6,7 M absank, was einer freien Transferenergie von $4,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ entsprach. Dagegen stieg die Löslichkeit in NaCl leicht auf $1,92 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in 5 M an, woraus sich eine freie Transferenergie von $-0,08 \text{ kJ mol}^{-1}$ errechnen ließ. Die aus den Löslichkeiten berechneten freien Transferenergien sind in Abb. 3.34 B dargestellt. Es lässt sich somit folgern, dass auch in hohen EMIMCl-Konzentrationen das Peptidrückgrat nicht solubilisiert wird und dass im Gegenteil die Interaktion immer unvorteilhafter wird. Somit ist die

denaturierende Wirkung von EMIMCl einzig auf die stark vorteilhaften Interaktionen mit den Seitenketten, insbesondere bei den aromatischen Aminosäuren Trp und Tyr, zurückzuführen. Weiterhin ist die der Denaturierung nachfolgende Aggregation das Resultat der unvorteilhaften Interaktionen mit dem Peptidrückgrat.

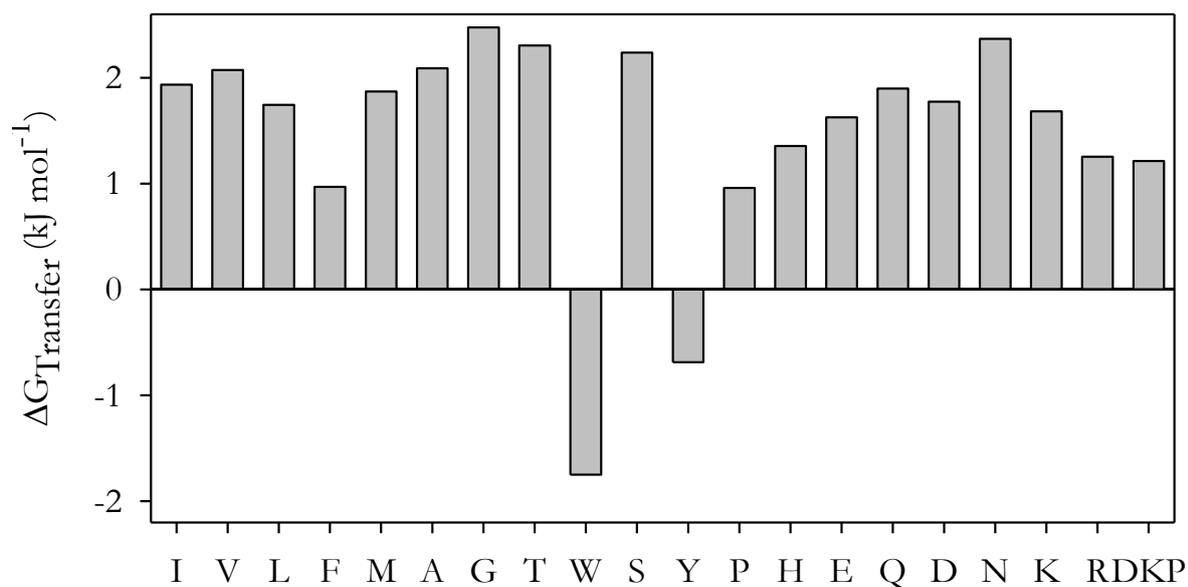
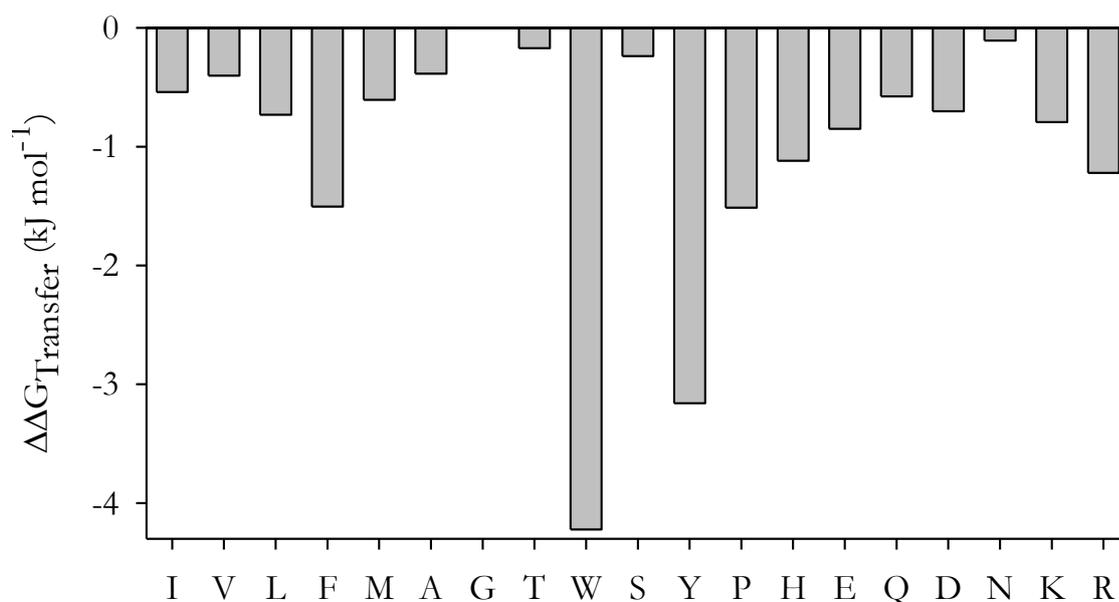
3.5.3 Transferenergiemessungen für EMIMDEP-Lösungen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass EMIMDEP sich nicht als Rückfaltungsadditiv eignete und dass es stärker denaturierend wirkte als EMIMCl. Der Unterschied zwischen beiden ionischen Flüssigkeiten, welche sich durch das Anion unterscheiden, sollte nun über die Bestimmung der freien Energien für den Transfer aus Wasser in EMIMDEP in Analogie zu L-ArgHCl und EMIMCl näher untersucht werden.

Die in EMIMDEP gemessenen Löslichkeiten waren, verglichen mit EMIMCl und mit Wasser bis auf Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten schlechter, was in positiven freien Transferenergien resultierte. Für Gly konnte mit $2,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ die am stärksten unvorteilhafte Interaktion bestimmt werden. Aminosäuren, welche über kleine Seitenketten verfügen, zeigten ähnlich unvorteilhafte Interaktionen mit EMIMDEP (Abb. 3.35 A).

Subtrahiert man den Betrag der freien Transferenergie für Gly in EMIMDEP von den freien Transferenergien der restlichen Aminosäuren, so erhält man für alle Seitenketten negative freie Transferenergien, welche jeweils vorteilhaften Interaktionen entsprechen (Abb. 3.35 B). Insgesamt ergaben sich bei den freien Seitenketten-Transferenergien ähnliche Werte wie für EMIMCl. Lediglich die freie Transferenergie für die Seitenkette von Trp lag mit $-4,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ über der freien Transferenergie für Trp aus Wasser in 1 M EMIMCl ($-3,5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Die Löslichkeit von DKP war in 1 M EMIMDEP deutlich verringert, was in einer freien Transferenergie von $1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ resultierte. Somit war der Transfer des Peptidrückgrates in 1 M EMIMDEP noch unvorteilhafter als in 1 M EMIMCl. Dies führte bei der Denaturierung von tc-rPA in EMIMDEP zu stärkerer Aggregation und ist vermutlich auch der Grund für die schlechten Ausbeuten, welche bei der Rückfaltung von rPA in 1 M EMIMDEP bzw. in 1 M L-ArgHCl in Kombination mit 1 M EMIMDEP erhalten wurden.

A**B****Abb. 3.35: Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M EMIMDEP. (A)**

Aufgetragen sind die freien Transferenergien für den Transfer von Aminosäuren von Wasser in 1 M EMIMDEP. Die freien Transferenergien wurden aus den Aminosäure-Löslichkeiten berechnet. Für die Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet. DKP wurde als Modell für das Peptidrückgrat benutzt. Für die in (B) dargestellten freien Seitenketten-Transferenergien wurde von allen freien Transferenergien für die Aminosäure der Betrag von Glycin subtrahiert. Eine detaillierte Auflistung der Löslichkeiten findet sich im Anhang (Tab. 6.11).

Da – wie auch für EMIMCl – die Interaktion von EMIMDEP mit DKP unvorteilhaft war, fand eine Denaturierung von Proteinen offenbar ausschließlich über starke Interaktionen mit den Seitenketten insbesondere von Trp und Tyr statt.

Die stärker denaturierende Wirkung von EMIMDEP verglichen mit EMIMCl, welche auch von Buchfink et al. (2010) festgestellt wurde, war zunächst nicht zu erklären und wurde daher näher untersucht. Hierfür wurden die Löslichkeiten von Trp und Gly gemessen, um den Einfluss von EMIMCl und EMIMDEP auf die Löslichkeit der Trp-Seitenkette zu untersuchen. Diese zeigte sowohl in EMIMCl als auch in EMIMDEP deutlich erhöhte Löslichkeiten.

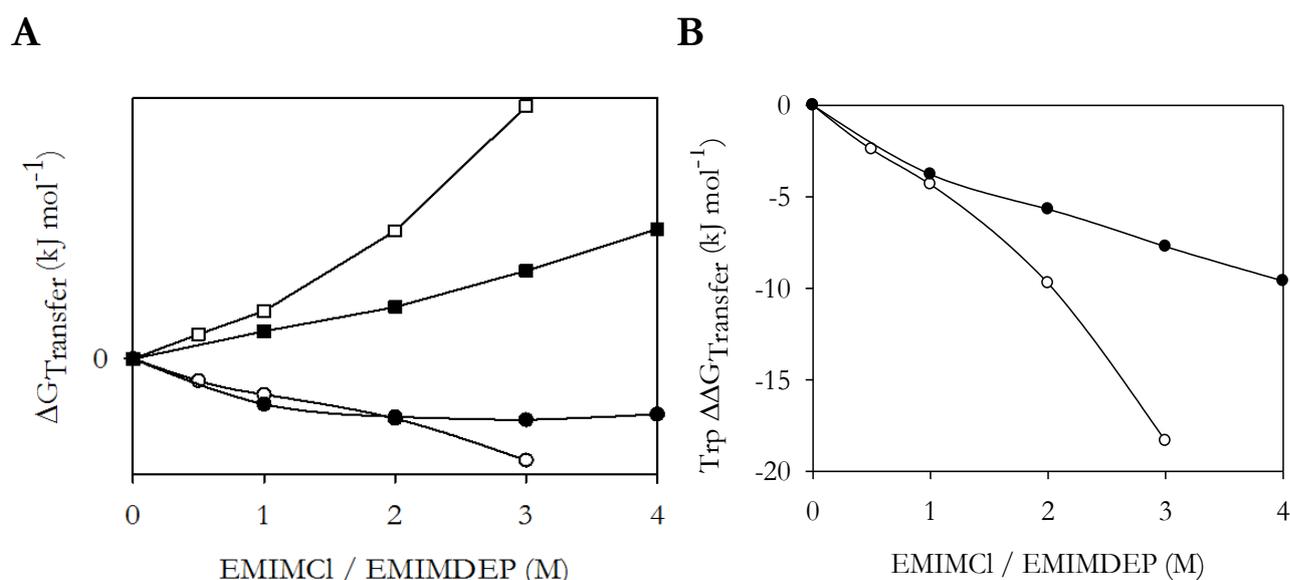


Abb. 3.36: Freie Energien für den Transfer von Gly und Trp aus Wasser in EMIMCl bzw. EMIMDEP. (A) Aufgetragen ist die Änderung der freien Energien für den Transfer aus Wasser bei Erhöhung der EMIMCl- bzw. der EMIMDEP-Konzentration. Dabei sind mit (■) die freien Transferenergien für Gly in EMIMCl und mit (□) die freien Transferenergien für EMIMDEP gekennzeichnet. Die freien Transferenergien für Trp in EMIMCl bzw. EMIMDEP sind mit (●) respektive (○) gekennzeichnet. Die verwendeten Löslichkeiten befinden sich in Tab. 6.13 und Tab. 6.14. In **(B)** ist die berechnete freie Seitenketten-Transferenergie für Trp in EMIMCl (●) und in EMIMDEP (○) aufgetragen.

Aus Abb. 3.36 A geht hervor, dass die freie Energie für den Transfer von Gly in 3 M EMIMDEP stärker unvorteilhaft war als für EMIMCl (13 kJ mol⁻¹ zu 4,6 kJ mol⁻¹). Dagegen betrug bei gleicher Salzkonzentration die freie Transferenergie für Trp in EMIMDEP -5,3 kJ mol⁻¹ und für EMIMCl lediglich -3,2 kJ mol⁻¹. Aus diesen Daten ergaben sich die in Abb. 3.36 B gezeigten freien Transferenergien für die Trp-Seitenkette. Diese betragen bei einer Salzkonzentration von 3 M -18,3 kJ mol⁻¹ für EMIMDEP und -7,7 kJ mol⁻¹ in EMIMCl. Somit interagierte die Trp-Seitenkette stärker vorteilhaft mit EMIMDEP als mit EMIMCl.

Da die Denaturierung von Proteinen in EMIMCl und in EMIMDEP durch starke Interaktionen mit den Seitenketten verursacht wurde, führte vermutlich eine Verstärkung der Interaktionen mit Seitenketten, wie sie am Beispiel von Trp gezeigt wurde, zu der beobachteten stärkeren Denaturierungswirkung des EMIMDEP.

3.5.4 Untersuchungen zur Chaotropizität und Kosmotropizität von ionischen Flüssigkeiten

Von Buchfink et al. (2010) wurden Rückfaltungen von rPA in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen gezeigt. Für die Reihe EMIMCl – OMIMCl ließ sich dabei ein eindeutiger Trend ausmachen. So waren EMIMCl und BMIMCl geeignete Additive für die rPA-Rückfaltung, HMIMCl und OMIMCl jedoch nicht. Eine Variation der Anionen in EMIM-Salzen ergab ausgehend von Cl^- sinkende Rückfaltungsausbeuten für MDEGSO_4^- , EtSO_4^- , Ac^- , OTs^- , DEP^- und HexSO_4^- . Als Ursache für die beobachteten Effekte wurden zum einen Unterschiede in der Hydrophobizität und zum anderen die Chaotropizität beziehungsweise Kosmotropizität der untersuchten Kationen und Anionen ausgemacht.

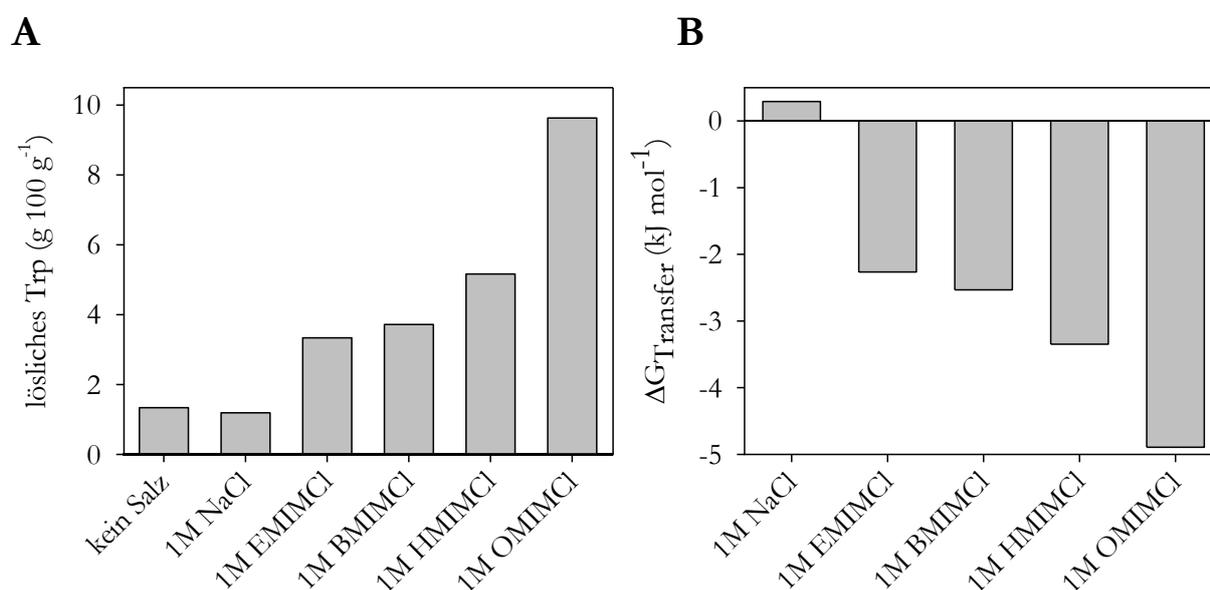


Abb. 3.37: Trp-Löslichkeiten in ionischen Flüssigkeiten, Variation des Kations. (A) Aufgetragen sind die Löslichkeiten von Trp in Lösungen mit 1 M N-Alkyl-N'-Methyl-Imidazoliumchlorid-Salzen. Die Löslichkeiten wurden über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die detaillierten Löslichkeiten befinden sich im Anhang (Tab. 6.15). In (B) sind die aus (A) errechneten freien Transferenergien dargestellt.

Um diese Effekte näher zu untersuchen, erschien Trp als schlecht lösliche, relativ hydrophobe und einfach detektierbare Aminosäure als geeignetes Modellsystem. Daher wurde die Löslichkeit von Trp in Abwesenheit von Salz und in Gegenwart von 1 M der ionischen Flüssigkeiten untersucht. Für die Reihe EMIMCl – OMIMCl ergab sich dabei eine mit der Alkylkettenlänge zunehmende Trp-Löslichkeit. So betrug die Trp-Löslichkeit in 1 M EMIMCl $3,33 \pm 0,03 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ und stieg bis auf maximal $9,63 \pm 0,46 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in 1 M OMIMCl an (Abb. 3.37 A). NaCl wurde als Kontrolle für die Ionenstärke verwendet und hatte einen negativen Effekt, da die Löslichkeit von Trp auf $1,19 \pm 0,04 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ absank. Die aus den Löslichkeiten berechneten freien Transferenergien sind in Abb. 3.37 B aufgetragen. Es ist erkennbar, dass die freie Energie für den Transfer von Trp aus Wasser in 1 M EMIMCl – OMIMCl von $-2,3$ auf $-4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ abnahm.

Bei der Variation der Anionen fiel auf, dass sich die Trp-Löslichkeit nur bedingt entsprechend der Hydrophobizität der Lösung verhielt. So war beispielsweise die Löslichkeit von Trp in 1 M EMIMDEP oder EMIMEtSO₄ geringer als in EMIMCl, obwohl für alkylierte Anionen eigentlich eine höhere Hydrophobizität und damit eine höhere Trp-Löslichkeit zu erwarten gewesen wäre (Abb. 3.38 A).

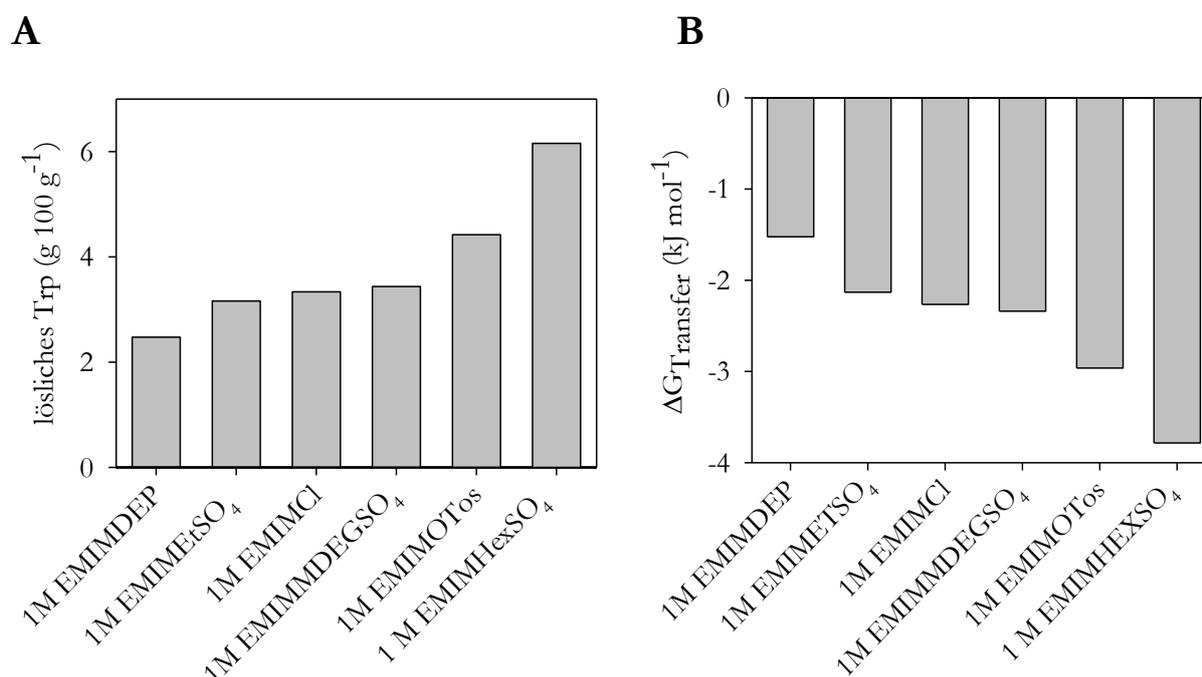


Abb. 3.38: Trp-Löslichkeit in ionischen Flüssigkeiten, Variation des Anions. (A) Aufgetragen ist die Löslichkeit von Trp in 1M Konzentrationen von verschiedenen EMIM-Salzen. Die detaillierten Löslichkeiten befinden sich im Anhang (Tab. 6.15). In (B) sind die freien Energien für den Transfer von Wasser in Additiv, bezogen auf die Trp-Löslichkeit in Abwesenheit von Additiv gezeigt.

So ergab sich für 1 M EMIMDEP eine Trp-Löslichkeit von $2,47 \pm 0,11 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$. Die Löslichkeit in 1 M EMIMCl lag bei $3,33 \pm 0,03 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ und in 1 M EMIMOTs bei $4,42 \pm 0,11 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$.

Für Anionen mit gleicher Basis – wie bei den Sulfaten – konnte eine Erhöhung der Trp-Löslichkeit mit steigender Alkylkettenlänge festgestellt werden. So betrug die Trp-Löslichkeit in EMIMEtSO₄ $3,16 \pm 0,06 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, in EMIMMDEGSO₄ $3,44 \pm 0,09 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ und in EMIMHexSO₄ $6,16 \pm 0,49 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$. Somit war eine Einordnung der ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Hydrophobizität nur eingeschränkt und bei gleicher Basis möglich. Für eine Klassifizierung der ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Chaotropizität und Kosmotropizität war es erforderlich, ein anderes Modellsystem zu verwenden, da Trp offenbar sehr spezifisch mit EMIM-Kationen interagierte und dazu noch recht sensibel auf die Anwesenheit von Alkylketten und somit auf eine erhöhte Hydrophobizität der Anionen und Kationen in der Lösung reagierte.

Daher wurde die Löslichkeit von DKP, welches als Modellsystem für das Peptidrückgrat fungierte, näher untersucht. Um zu prüfen, inwieweit die DKP-Löslichkeit den Gesetzmäßigkeiten der Hofmeisterreihe folgte, wurden zunächst verschiedene monovalente Guanidinium-Salze ausgewählt und hinsichtlich ihrer Interaktionen mit DKP charakterisiert. Anschließend wurde die DKP-Löslichkeit in ionischen Flüssigkeiten untersucht. Dadurch sollte es möglich sein, Korrelationen zwischen der Art der Anionen und Kationen und der Effektivität bei der Proteinrückfaltung zu erstellen.

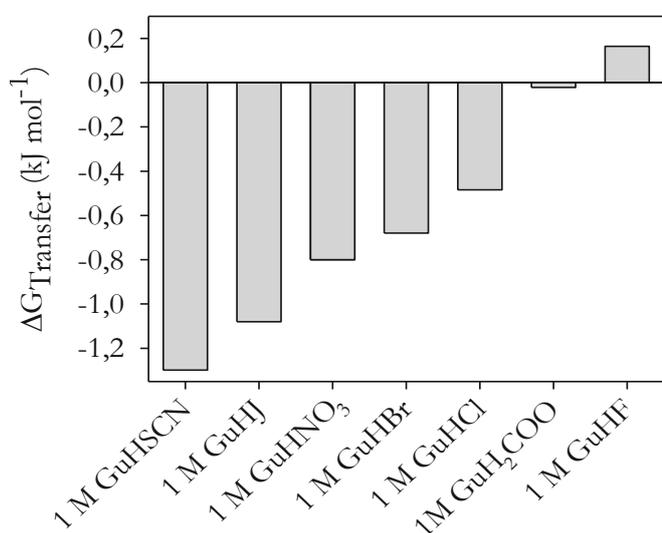


Abb. 3.39: Freie Transferenergien für DKP in verschiedenen Guanidinium-Salzen. Die Auftragung zeigt die freien Energien für den Transfer von DKP in Lösungen mit 1 M verschiedener Guanidinium-Salze. Die detaillierten Löslichkeiten befinden sich im Anhang (Tab. 6.16).

Für die Guanidinium-Salze konnte festgestellt werden, dass die freien Transferenergien je nach der Position der Anionen in der Hofmeisterreihe Unterschiede zeigten. So wurden für Guanidinium-Salze mit dem chaotropen SCN⁻ oder dem neutralen Cl⁻ negative freie Transferenergien gemessen, was eine Solubilisierung des Peptidrückgrates begünstigen würde (Abb. 3.39). Die kosmotropen Formiat- und Fluorid-Anionen kompensierten dagegen die destabilisierende

Wirkung des Guanidinium-Kations. Da sich offenbar die getesteten Guanidinium-Salze über die DKP-Löslichkeit hinsichtlich ihrer Chaotropizität bzw. Kosmotropizität einordnen ließen, wurde auch die Löslichkeit von DKP in ionischen Flüssigkeiten gemessen, um diese so näher zu charakterisieren.

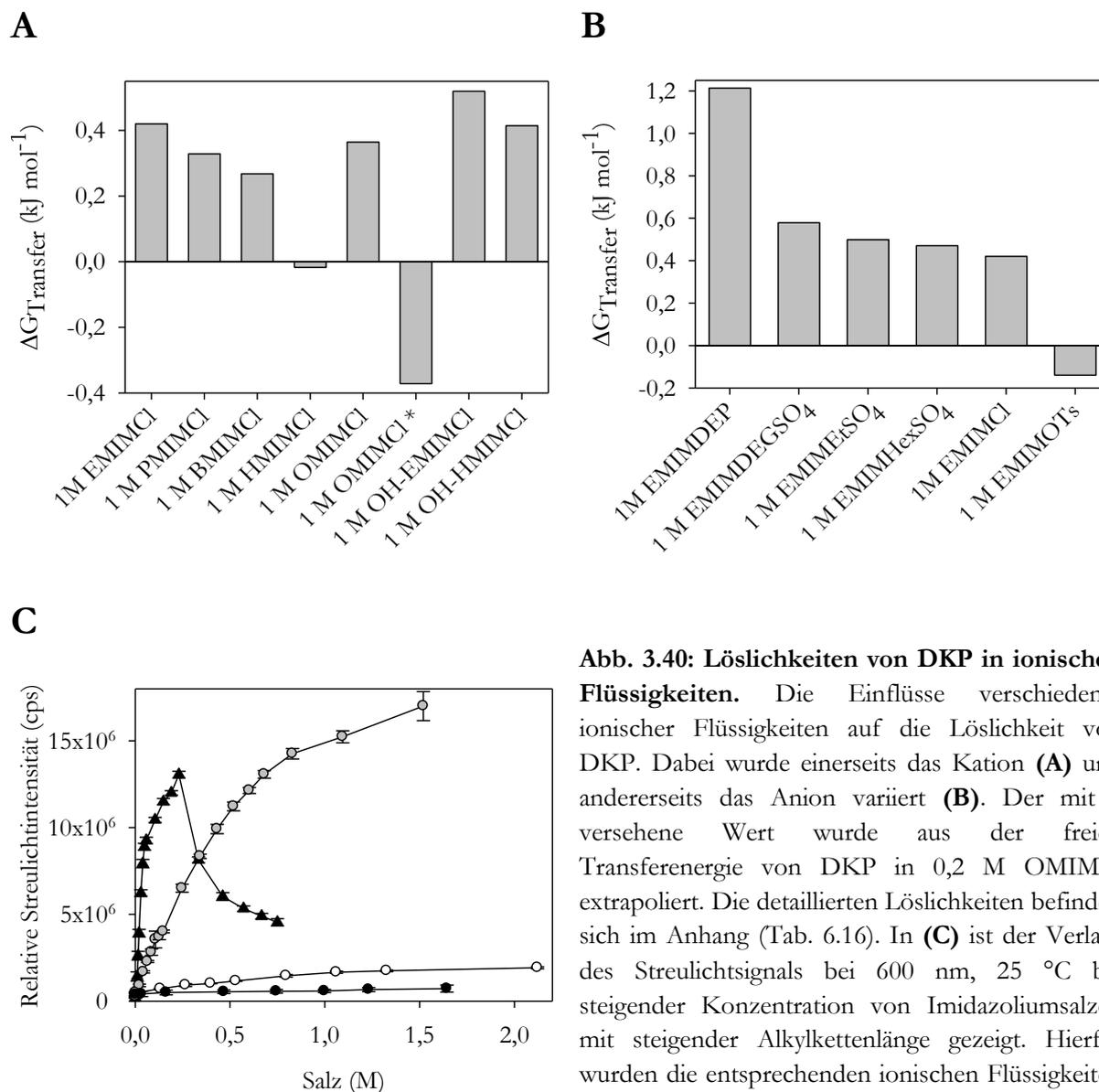


Abb. 3.40: Löslichkeiten von DKP in ionischen Flüssigkeiten. Die Einflüsse verschiedener ionischer Flüssigkeiten auf die Löslichkeit von DKP. Dabei wurde einerseits das Kation (**A**) und andererseits das Anion variiert (**B**). Der mit * versehene Wert wurde aus der freien Transferenergie von DKP in 0,2 M OMIMCl extrapoliert. Die detaillierten Löslichkeiten befinden sich im Anhang (Tab. 6.16). In (**C**) ist der Verlauf des Streulichtsignals bei 600 nm, 25 °C bei steigender Konzentration von Imidazoliumsalzen mit steigender Alkylkettenlänge gezeigt. Hierfür wurden die entsprechenden ionischen Flüssigkeiten unter Rühren zu Wasser titriert. Dabei symbolisiert (●) EMIMCl, (○) BMIMCl, (●) HMIMCl und (▲) OMIMCl.

Bei der Messung der DKP-Löslichkeiten in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten wurden sowohl die Kationen als auch die Anionen variiert (Abb. 3.40 A und B). Für die Imidazolium-Kationen wurde dabei festgestellt, dass eine steigende Alkylkettenlänge (EMIM⁺ – HMIM⁺) eine zunehmend vorteilhafte Interaktion zwischen DKP und der Lösung bewirkte (0,42 bis -0,02 kJ mol⁻¹).

OMIMCl hingegen fiel aus dieser Reihe heraus. Dies war möglicherweise auf Cluster- und Mizellenbildung zurückzuführen. Entsprechende Hinweise hierauf lieferten Streulichtmessungen. So sind in Abb. 3.40 C für die Reihe EMIMCl – OMIMCl die Streulichtintensitäten bei steigender Salzkonzentration gezeigt. Es ist dabei zu erkennen, dass sowohl HMIMCl als auch OMIMCl zu deutlichen Erhöhungen der Streulichtintensitäten führten. Die kritische Konzentration für die Mizellenbildung von OMIMCl war durch die schlagartige Abnahme des Streulichtsignals bei etwa 230 mM zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob die Mizellenbildung für das unerwartete Verhalten von OMIMCl verantwortlich war, wurde die DKP-Löslichkeitsmessung in 200 mM OMIMCl, also unterhalb der kritischen Konzentration für die Mizellenbildung durchgeführt. Hierbei konnte eine vorteilhafte Interaktion von OMIMCl mit DKP festgestellt werden, welche nach Extrapolation auf 1 M OMIMCl eine theoretische freie Transferenergie von $-0,37 \text{ kJ mol}^{-1}$ ergab.

Eine Hydroxylierung der Alkylkette führte im Falle von OH-EMIMCl und OH-HMIMCl zu unvorteilhafteren Interaktionen mit DKP ($0,52$ bzw. $0,41 \text{ kJ mol}^{-1}$), verglichen mit den nicht hydroxylierten ionischen Flüssigkeiten. Ein Austausch des Imidazolium-Kations gegen ein Pyridinium-Kation führte dagegen zu einer vorteilhafteren Interaktion mit DKP ($0,34 \text{ kJ mol}^{-1}$). Insgesamt konnte für die Kationen mit Ausnahme von HMIM^+ und OMIM^+ festgestellt werden, dass diese unvorteilhaft mit DKP und somit mit dem Peptidrückgrat interagierten.

Bei der Variation der Anionen konnte eine der Hofmeisterreihe konforme starke Abhängigkeit von der Anionen-Basis festgestellt werden. So führte der Austausch des Anions von Chlorid über die alkylierten Sulfate bis hin zum alkylierten Phosphat zunehmend zu unvorteilhafter Interaktion mit DKP. Es überwog dabei, wie an den verschiedenen alkylierten Sulfat-Anionen zu erkennen, der Effekt der Anionen-Basis den Einfluss der Alkyl-Seitenketten. Im Gegensatz zu den unvorteilhaften Interaktionen der alkylierten Phosphate und Sulfate konnte für EMIMOTs mit $-0,14 \text{ kJ mol}^{-1}$ eine vorteilhafte Interaktion mit DKP festgestellt werden.

Es war somit über die Bestimmung der freien Transferenergien für DKP möglich, die Anionen und Kationen in ionischen Flüssigkeiten hinsichtlich ihrer Chaotropizität bzw. Kosmotropizität relativ zueinander einzuordnen.

4. Diskussion

Die Produktion rekombinanter Proteine ist mittlerweile eine bewährte Methode, um im großen Maßstab Proteine von therapeutischem Interesse herzustellen. Ein hierfür typischerweise verwendetes prokaryotisches Expressionssystem ist *E.coli*. Allerdings führt die Produktion von für die pharmazeutische Industrie interessanten Proteinen in diesem Expressionssystem oftmals zur Ausbildung von intrazellulären *inclusion bodies*. Proteine, welche in dieser Form vorliegen, müssen nach dem Zellaufschluss solubilisiert und anschließend in ihren nativen Zustand überführt werden (Lim et al., 1989; Rudolph et al., 1987; Burgess, 2009). Hierbei ist die Wahl geeigneter Bedingungen essentiell um die Proteinaggregation, welche eine unerwünschte Nebenreaktion während des Rückfaltungsprozesses darstellt, zu unterdrücken. Eine Möglichkeit, um Proteine bei der Rückfaltung zu unterstützen, besteht in der Verwendung von Lösungsmitteladditiven und Faltungshelferproteinen (Rudolph und Lilie, 1996). Diese können entweder den nativen Zustand stabilisieren, die Faltung in den nativen Zustand beschleunigen oder aber die unspezifische Aggregation von ungefaltetem Protein und von Faltungsintermediaten unterdrücken (siehe Kapitel 1.1).

L-ArgHCl wird bereits seit ca. 20 Jahren als Lösungsmitteladditiv verwendet, um die Aggregation von Proteinen während der Rückfaltung zu unterdrücken. Trotzdem sind die molekularen Wirkmechanismen nach wie vor nicht vollständig geklärt (Rudolph et al., 1987, Reddy K. et al. 2005). Für andere bei der Rückfaltung von Proteinen effektive Additive wie einige ionische Flüssigkeiten sind die molekularen Mechanismen ebenfalls weitgehend unverstanden (Summers und Flowers, 2000; Lange et al., 2005; Buchfink et al., 2010).

Es war daher Ziel dieser Arbeit, die Wirkmechanismen von L-ArgHCl und ausgewählter ionischer Flüssigkeiten besser zu verstehen. Hierfür wurde untersucht, wie sich L-ArgHCl und ionische Flüssigkeiten auf die Rückfaltung und die Aggregation eines Modellproteins auswirken und zudem wurde die Löslichkeit von nativen und nicht nativen Proteinspezies analysiert. Essentielle Anforderungen an das Modellprotein waren somit ein durch die Aggregation limitierter Rückfaltungsprozess (Stern et al., 1990), die Existenz eines Modellsystems für den denaturierten Zustand (Tischer, 2007) und schlechte Löslichkeit im nativen Zustand (Hu et al., 1996; Sinniger et al. 1999). Diese Kriterien für ein Modellprotein wurden erfüllt durch Verwendung von rPA bzw. seiner Zweikettenform tc-rPA.

Über die Korrelation der gewonnenen Daten mit quantitativen Messungen der Transferenergien von Aminosäureseitenketten und des Peptidrückgrats in Additiv-Lösungen sollte es weiterhin möglich sein, die molekularen Mechanismen hinter den Effekten von L-ArgHCl und der

ionischen Flüssigkeiten bei der oxidativen Rückfaltung zu verstehen und Vorhersagen bezüglich der Effektivität eines Additivs bei der Rückfaltung zu treffen.

4.1 rPA, tc-rPA und CM-rPA

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Tischer, 2007) wurden die Effekte von L-ArgHCl auf rPA untersucht. Es zeigte sich dabei, dass L-ArgHCl die Löslichkeit des nativen Proteins deutlich erhöhte. Als Modell für den denaturierten Zustand wurde CM-rPA verwendet. Für dieses konnte ebenfalls eine Erhöhung der apparenten Löslichkeit festgestellt werden. Es konnten allerdings keine Gleichgewichtslöslichkeiten ermittelt werden. CM-rPA lag in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln in einem nicht nativen, zur Aggregation neigenden, niedrig oligomerisierten Zustand vor, welcher über keine thermodynamische Stabilität und über keine Tertiärstruktur verfügte. Auch enzymatische Aktivität war nicht nachweisbar (Tischer, 2007). Somit kam dieser Zustand einem *molten globule* recht nahe, welches sich nach Fink (1995) unter anderem durch diese Merkmale auszeichnet. Daher war CM-rPA als Modell für den denaturierten Zustand von rPA hinreichend geeignet und wurde auch in dieser Arbeit als solches eingesetzt.

Die Verwendung von rPA für Löslichkeitsmessungen in ionischen Flüssigkeiten erwies sich als problematisch, da es in Abwesenheit hoher L-ArgHCl-Konzentrationen offenbar einer langsamen Autoproteolyse unterlag. Hierdurch entstand analog zu tPA die Zweikettenform des Proteins, bei welcher die beiden Proteindomänen nur über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft waren (Hu et al., 1996).

Die Spaltung von rPA zu tc-rPA führte zu einer dreifach erhöhten enzymatischen Aktivität. Dies geht konform mit Ergebnissen von Ichinose et al. (1984), Stürzebecher et al. (1992) und Hu et al. (1996), welche für verschiedene Enzymsubstrate und für auf Benzamidin-basierende tPA-Inhibitoren deutlich erhöhte Affinitäten der Zweikettenform, verglichen mit der nicht gespaltenen Einkettenform von rPA bzw. tPA, feststellten. Als Ursache hierfür wurde von Hu et al. (1996) vermutet, dass die Kringel 2-Domäne die Inhibitor-Bindung blockiert, indem sie das aktive Zentrum der Serinproteasedomäne teilweise verdeckt. Dagegen führt die Spaltung zur Zweikettenform dazu, dass die beiden Domänen ihre Position zueinander so verändern, dass das aktive Zentrum besser zugänglich ist. Eine weitere Ursache für die verbesserte Inhibitor-Bindung ist, dass die Spaltung zu einer Konformationsänderung in der Serinproteasedomäne führt, wodurch diese von einem kompakten in einen relaxierten Zustand übergeht (Hu et al., 1994).

Weiterhin wurden von Hu et al. (1994) Messungen zur Stabilität von rPA und tc-rPA vorgenommen. Dabei wurde bei der mittels $^1\text{H-NMR}$ verfolgten thermischen Denaturierung eine Destabilisierung der Serinproteasedomäne um 4 K und der Kringel 2-Domäne um 3 K festgestellt. Die Messung von Säure-induzierten Übergängen zeigte jedoch eine Stabilisierung der Serinproteasedomäne (pH 3,4 zu pH 3,2), wohingegen die Kringel 2-Domäne keine Veränderung in ihrer Stabilität aufwies.

Eigene Versuche zum Einfluss der Spaltung auf die Stabilität ergaben für die thermische Denaturierung, welche mittels dynamischer Differenzkalorimetrie untersucht wurde, dass die Serinproteasedomäne eine Stabilisierung von 6 K erfuhr, während die Stabilität der Kringel 2-Domäne unverändert blieb. Weiterhin waren bei den gemessenen Fluoreszenzübergangskurven sowohl der erste Übergang zwischen 0 und 2 M GuHCl als auch der zweite Übergang zwischen 2 und 4 M GuHCl der Serinproteasedomäne zuzuordnen (siehe Kapitel 3.2.4.2).

Insgesamt führte die Spaltung von rPA zu tc-rPA zu einer Entkopplung der beiden Domänen voneinander, zu einer Stabilisierung der Serinproteasedomäne und zur Freilegung des aktiven Zentrums.

Die Einkettenform von tPA, von welcher rPA als Deletionsmutante abgeleitet wurde, wurde unter anderem von Tate et al. (1987) und von Andreasen et al. (1991) als Zymogen, d.h. als weitgehend inaktive Vorstufe von tc-tPA beschrieben. Die Aktivierung von Serinproteasen der Chymotrypsin-Familie durch Spaltung der Zymogenform ist eine physiologisch weit verbreitete Form der Regulation. Somit besitzt die Spaltung von tPA zu tc-tPA und auch die Autoproteolyse möglicherweise physiologische Relevanz.

Da eine vollständige Inhibierung von rPA aufgrund des Zymogen-Charakters und der daraus resultierenden schlechten Bindung von PMSF nicht möglich war, wurden Löslichkeits- und Aggregationsexperimente in ionischen Flüssigkeiten ausschließlich mit der durch Plasminspaltung erhaltenen Zweikettenform von rPA durchgeführt.

4.2 Einflüsse von Additiven auf die oxidative Rückfaltung von rPA

Die Rückfaltung von rPA ist ein seit langem etablierter industrieller Prozess, bei welchem es aufgrund der schlechten Löslichkeit von rPA zwingend erforderlich ist, dass er in Gegenwart von Löslichkeit-vermittelnden Additiven wie L-ArgHCl abläuft. Ferner ist die Anwesenheit eines Redox-Shuffling-Systems obligat, da rPA über neun Disulfidbrücken verfügt, welche bei der oxidativen Rückfaltung korrekt ausgebildet werden müssen, um natives, enzymatisch aktives

Protein zu erhalten. Somit stellte rPA ein gutes Modellsystem dar, um die Effekte von Lösungsmitteladditiven zu studieren.

Eine systematische Untersuchung der Einflüsse von Lösungsmitteladditiven auf die Rückfaltung von rPA wurde von Buchfink et al. (2010) publiziert. Dabei wurde denaturiertes reduziertes rPA oxidativ zurückgefaltet und nach acht Stunden die enzymatische Aktivität bestimmt. Hierbei wurde festgestellt, dass L-ArgHCl die Rückfaltungsausbeute deutlich erhöhte, wobei das Maximum bei 1,2 M lag. Für die getesteten ionischen Flüssigkeiten war das Ergebnis heterogener. So war EMIMCl bei Konzentrationen um 2-3 M effektiver als L-ArgHCl, EMIMDEP als Rückfaltungsadditiv aber völlig ungeeignet.

Die von Buchfink et al. (2010) veröffentlichten Rückfaltungsexperimente wurden in der vorliegenden Arbeit mit aus *inclusion bodies* solubilisiertem rPA wiederholt, um die Unterschiede zwischen den Additiven unter für die oxidative Rückfaltung typischen Bedingungen zu verifizieren. Es wurde dabei eine vollständige Übereinstimmung festgestellt. So führte die Anwesenheit von 1 M L-ArgHCl im Rückfaltungsansatz zu deutlich höheren Ausbeuten als äquimolare Konzentrationen EMIMCl. Diese Beobachtung ging konform mit den Löslichkeitsmessungen mit CM-rPA. Dabei ergab sich, dass L-ArgHCl die apparente Löslichkeit von CM-rPA stärker erhöhte als EMIMCl. Dies bedeutet, dass sich zwischen der Rückfaltungsausbeute von rPA und der Löslichkeit von CM-rPA, d.h. der Löslichkeit der denaturierten Spezies, ein grober Zusammenhang finden lässt. Dies hat insofern Sinn, als dass im Falle von rPA denaturiertes reduziertes Protein, welches durch ein Additiv solubilisiert wird, effektiver und über einen längeren Zeitraum zurückfalten kann, da eine Unterdrückung der Aggregation stattfindet. Dabei ist es jedoch essentiell, dass das Additiv die Faltung des Proteins nicht behindert, wie dies beispielsweise bei GuHCl der Fall ist.

Die Rückfaltungsausbeute von rPA in 1 M EMIMDEP entsprach dagegen der Ausbeute in Gegenwart von 1 M NaCl, welches als Negativkontrolle verwendet wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass das DEP-Anion die aggregationshemmende Wirkung des EMIM-Kations vollständig neutralisierte und im Gegenteil die Proteinaggregation förderte. So war in Rückfaltungsansätzen, welche NaCl oder EMIMDEP enthielten, eine deutliche Aggregatbildung erkennbar. Es konnte weiterhin auch für EMIMDEP ein Zusammenhang zwischen der geringen Rückfaltungsausbeute und einer schlechten Löslichkeit von CM-rPA festgestellt werden. Dagegen konnte in L-ArgHCl und EMIMCl das komplette für die oxidative Rückfaltung eingesetzte rPA – auch nicht native Spezies – über mehrere Tage in Lösung gehalten werden.

Weiterhin wurde bei der Kombination von L-ArgHCl mit 1 M bzw. 2 M EMIMCl ein leicht positiver Effekt auf die Rückfaltungsausbeute festgestellt. Dagegen führte die Kombination von

L-ArgHCl mit EMIMDEP zu einer noch stärkeren Verringerung der Rückfaltungsausbeute von rPA als bei der Kombination mit NaCl. Die Ursachen für die bei der oxidativen Rückfaltung von rPA beobachteten Effekte von L-ArgHCl und der ionischen Flüssigkeiten wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

4.3 Einflüsse von L-ArgHCl auf Proteine

Arginin wurde 1982 von Yancey et al. als eine Substanz eingeordnet, welche die Aktivität und die Stabilität von Enzymen negativ beeinflusst und deshalb nicht in großen Mengen intrazellulär in Tieren als Osmolyt vorkommt, wie dies beispielsweise für Harnstoff, Trimethylaminoxid, Sarkosin oder Betain der Fall ist.

Für technische Prozesse wurde Arginin ursprünglich verwendet um die autokatalytische Aktivität von tPA zu unterdrücken. Dabei zeigte sich allerdings, dass Arginin auch als Additiv für die oxidative Rückfaltung geeignet war, da es die Ausbeute an nativem tPA deutlich erhöhte (Rudolph et al., 1987; Lange und Rudolph, 2009). Mittlerweile findet L-ArgHCl als Additiv in der Proteinfaltung breite Verwendung. Zu den wichtigsten Anwendungen zählen neben der Rückfaltung auch die Solubilisierung von Proteinen sowie die Unterdrückung der Proteinaggregation und von unspezifischen Wechselwirkungen (Ishibashi et al., 2005; Arakawa et al., 2007b; Lange und Rudolph, 2009).

Eine Solubilisierung von Protein aus *inclusion bodies* konnte für GFP und β 2-Mikroglobulin gezeigt werden. Hierbei lagen beide Proteine in einer – für *inclusion bodies* eher untypischen – weniger dicht gepackten Form und in nativer bzw. nativ-ähnlicher Form vor, was für GFP aus der bereits bei den *inclusion bodies* vorhandenen intrinsischen Fluoreszenz geschlussfolgert werden konnte (Tsumoto et al., 2003; Umetsu et al., 2005).

Einer Unterdrückung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und der Proteinaggregation ließ sich der positive Effekt von L-ArgHCl auf die Ausbeute von Proteinen bei ihrer Reinigung mittels Säulenchromatographie zuschreiben. So konnte unter anderem für zwei humanisierte monoklonale Antikörper gezeigt werden, dass die Zugabe von 0,5 M bzw. 2 M L-ArgHCl die Ausbeute der Proteine bei Elution unter weniger sauren Bedingungen von der Protein A-Affinitätssäulenmatrix deutlich erhöhte (Arakawa et al., 2004; Ejima et al., 2005). Weiterhin konnten auch bei der hydrophoben Interaktionschromatographie und bei der Ionenaustauschchromatographie erhöhte Ausbeuten für Interleukin-6 sowie für verschiedene

monoklonale Antikörper durch Zugabe von L-ArgHCl während des Beladens der Säulen und bei der Elution erhalten werden (Arakawa et al., 2007c).

Da die Wirkmechanismen von L-ArgHCl nach wie vor nicht komplett verstanden sind, wurde 2004 von Baynes und Trout mit dem „Gap-Effekt“ ein Mechanismus für die Wirkung von Additiven wie L-Arginin vorgeschlagen, welcher auf einem rein kinetischen Effekt beruht. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Additivmoleküle aus Spalten, welche im Übergangszustand bei der Proteinassoziation bzw. -aggregation auftreten, aufgrund ihrer Größe ausgeschlossen werden. Dies ruft eine entropisch ungünstige Situation hervor, welche letztlich zu einer verlangsamten Proteinaggregation führt. Bedingung für dieses Postulat war, dass sich L-Arginin als „neutral crowder“ verhält, d.h. sich in seiner Affinität zu Proteinen nicht von Wassermolekülen unterscheidet. Allerdings war diese Bedingung problematisch, da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass L-ArgHCl bevorzugt mit der Proteinoberfläche interagiert (Timasheff, 2002; Arakawa und Tsumoto, 2003), d.h. sich nicht als „neutral crowder“ verhält. Mittlerweile wurde in aktuelleren Publikationen von Schneider und Trout (2009) ebenfalls mittels Dampfdruckosmometrie eine vorteilhafte Interaktion von L-ArgHCl mit der Proteinoberfläche festgestellt.

Ein Versuch Interaktionen von L-ArgHCl mit Lysozym mit Hilfe von Röntgenkristallstrukturen zu zeigen, wurde von Nakakido et al. (2008) publiziert. Es stellte sich dabei allerdings heraus, dass die Röntgenkristallographie nicht geeignet war, um eine bevorzugte Interaktion von L-ArgHCl mit Proteinen zu messen. So konnten weder Interaktionen mit Aminosäureseitenketten noch mit dem Peptidrückgrat gezeigt werden und auch kein stabil gebundenes L-ArgHCl in der Kristallstruktur nachgewiesen werden. Ein anderer Ansatz für die Wirkung von L-ArgHCl wurde 2007 von Das et al. publiziert, welcher davon ausgeht, dass L-ArgHCl molekulare Cluster in Lösung formt, welche über die drei Methylengruppen des L-Arginins mit hydrophoben Aminosäureseitenketten auf der Proteinoberfläche wechselwirken.

Ähnlich wie L-ArgHCl interagiert auch GuHCl vorteilhaft mit der Proteinoberfläche, was in diesem Fall zur Denaturierung von Proteinen führt. Für L-ArgHCl wurde allerdings lediglich eine schwach destabilisierende Wirkung gezeigt. So führte die Verwendung von L-Arginin zu einer leichten Destabilisierung von Cytochrom c und von RNase A (Taneja und Ahmad, 1994; Arakawa und Tsumoto, 2003). Für Lysozym konnte hingegen keine Destabilisierung nachgewiesen werden (Arakawa und Tsumoto, 2003; Reddy K. et al., 2005). Auch für rPA konnte in der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit (Tischer, 2007) keine destabilisierende Wirkung von L-ArgHCl gezeigt werden. Der Unterschied zwischen L-ArgHCl und GuHCl wurde von Arakawa et al. (2007a) in erster Linie an Unterschieden bei der Erhöhung der

Oberflächenspannung bei steigender Additivkonzentration festgemacht. So führte L-ArgHCl zu einer stärkeren Erhöhung der Oberflächenspannung als GuHCl (Kita et al., 1994; Collins, 2006).

Dies geht konform mit der Feststellung von Melander und Horváth (1977), dass Salze, welche die Oberflächenspannung nur geringfügig erhöhen, zum Einsalzen und Salze mit stärkerer Erhöhung der Oberflächenspannung zum Aussalzen von Proteinen aus einer Lösung führen. Allerdings existieren mittlerweile zahlreiche Ausnahmen von dieser Regel (Arakawa et al., 1990; Breslow und Guo, 1990; Broering und Bommarius, 2005), so dass Unterschiede in der Oberflächenspannung als alleinige Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von L-ArgHCl und GuHCl nicht ausreichend sind.

4.3.1 Einflüsse von L-ArgHCl auf Löslichkeit und Aggregation von rPA

Eigene, in dieser Arbeit vorgestellte Ergebnisse zeigen, dass L-ArgHCl die Löslichkeit des nativen Zustands von rPA erhöht. Für rPA in 1 M L-ArgHCl konnte eine Verringerung der freien Energie für den Transfer von Wasser in Additiv um 15 kJ mol^{-1} festgestellt werden, während analoge Löslichkeitsmessungen in äquimolaren Konzentrationen von Glycin und NaCl lediglich in einer Verringerung der freien Transferenergie um ca. 5 kJ mol^{-1} resultierten. Dies bedeutet, dass sich L-ArgHCl nicht als „*neutral crowder*“ verhält und die Assoziation von nativem rPA nicht durch eine Erhöhung der kinetischen Barriere zwischen dem assoziierten und dem löslichen Zustand verhindert wird. Dies geht konform mit den Ergebnissen von Schneider und Trout (2009) und den Arbeiten von Arakawa und Timasheff zu L-ArgHCl (siehe z.B. Timasheff, 2002; Arakawa und Tsumoto, 2003; Arakawa et al., 2007a).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass L-ArgHCl außerdem die Löslichkeit des denaturierten Zustands von rPA erhöht. Für diese Löslichkeitsmessungen wurde CM-rPA verwendet, welches als Modell für den denaturierten Zustand von rPA fungierte. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen, welche 2005 von Reddy K. et al. für Iodacetamid-modifiziertes Lysozym publiziert wurden. Bei der Messung der Löslichkeit von CM-rPA ausgehend von aggregiertem Protein stellte sich allerdings heraus, dass die gemessenen Löslichkeiten keine Gleichgewichtswerte darstellten. Dies bedeutet, dass in Gegenwart von L-ArgHCl eine kinetische Barriere zwischen dem ungefalteten und dem aggregierten Zustand eines Proteins vorhanden sein musste, welche möglicherweise durch das Unvermögen von L-ArgHCl aggregierte, nicht native Proteinstrukturen zu solubilisieren zustande kam.

Der Einfluss von L-ArgHCl auf die Löslichkeit nicht-nativer Proteinspezies lässt sich weiterhin durch die Messung von Aggregationskinetiken bestimmen. So konnte 2005 von Reddy K. et al.

gezeigt werden, dass steigende L-ArgHCl-Konzentrationen die Aggregation von Lysozym während der oxidativen Rückfaltung verringern bzw. vollständig unterdrücken. Auch für CM-rPA konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der asymmetrischen Flussfeld-Fluss-Fraktionierung gezeigt werden, dass L-ArgHCl die Aggregation unterdrückte. Hierfür wurde CM-rPA im Trennkanal fokussiert und dadurch aufkonzentriert. Der die Aggregation unterdrückende Effekt von L-ArgHCl war daran ersichtlich, dass in 100 mM L-ArgHCl die Anteile von größeren Proteinspezies mit steigender Fokussierungszeit zunahm, während dies in 500 mM nicht der Fall war.

Aus der Konzentrationsabhängigkeit von Aggregationskinetiken lässt sich die Reaktionsordnung für die initiale Aggregationsreaktion bestimmen, sofern man davon ausgeht, dass die Aggregation einem Nukleations-Polymerisations-Mechanismus folgt, wie von Hofrichter et al. (1974) vorgeschlagen (Abb. 4.1).

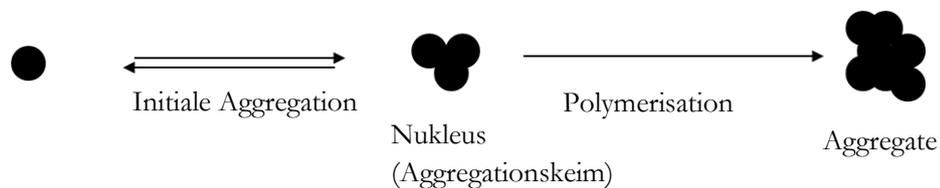


Abb. 4.1: Nukleations-Polymerisations-Mechanismus. Aus einzelnen Proteinmolekülen bildet sich über Gleichgewichtsreaktionen ein Aggregationskeim, welcher anschließend durch irreversible Reaktionen polymerisiert. Dabei symbolisiert (●) Proteinmoleküle.

Dabei konnte für L-ArgHCl festgestellt werden, dass die Reaktionsordnung bei Verwendung von rPA, CM-rPA oder dr-rPA unabhängig von der L-ArgHCl-Konzentration zwischen 8 und 12 lag. Dies bedeutet, dass L-ArgHCl die Reaktionsordnung der Aggregation nicht beeinflusst. Weiterhin ist eine Aggregation bzw. Assoziation von Proteinmolekülen in der Regel eine Reaktion zweiter Ordnung, was bedeutet, dass eine solche hohe Reaktionsordnung, wie sie im gegebenen Fall vorliegt, möglicherweise das Resultat von einer Vielzahl von schnellen Gleichgewichtsreaktionen ist, welche zur Ausbildung des Nukleus führen, aber nicht zeitlich auflösbar sind. Die Erhöhung der apparenten Löslichkeit von CM-rPA lässt sich somit über eine Verschiebung der Vorgleichgewichte, welche zum Nukleus führen, hin zur Dissoziation erklären. Dadurch befinden sich weniger Aggregationskeime in der Lösung, obwohl keine Änderung des Mechanismus stattfindet.

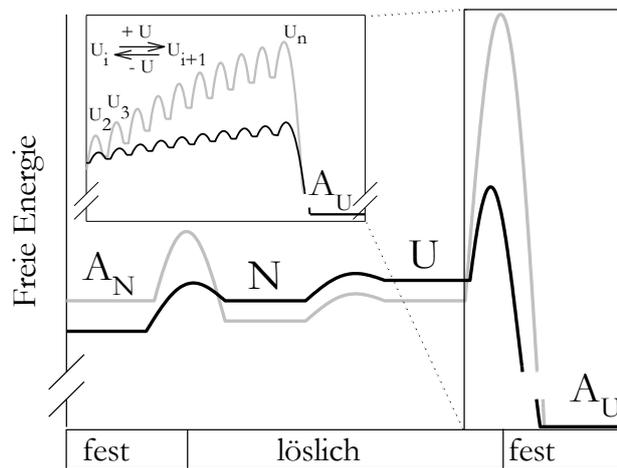


Abb. 4.2: Wirkung von L-ArgHCl. Gezeigt ist ein mögliches Energieschema für die verschiedenen Proteinzustände in Lösung in Abwesenheit (—) und in Anwesenheit von L-ArgHCl (---). Dabei symbolisiert N den nativen, U den denaturierten, A_U den aggregierten ungefalteten und A_N den präzipitierten nativen Zustand. Die eingelassene Grafik soll den inhibierenden Einfluss von L-ArgHCl auf die Ausbildung des Nukleus verdeutlichen. Dabei symbolisieren $U_2 - U_n$ oligomere Spezies, welche durch Gleichgewichtsreaktionen ineinander überführbar sind.

Die Wirkung von L-ArgHCl lässt sich zusammenfassen wie in Abb. 4.2 gezeigt. So wird durch vorteilhafte Interaktionen mit den oberflächenexponierten Aminosäureseitenketten die freie Energie des nativen Zustands (N) durch Erhöhung der Löslichkeit verringert. Da L-ArgHCl über keinen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität verfügt, muss in gleichem Maße auch die freie Energie des ungefalteten Proteins (U) verringert sein. Zwischen dem ungefalteten Zustand und dem aggregierten Zustand (A_U) vergrößert sich bei Erhöhung der L-ArgHCl-Konzentration die Energiebarriere, was möglicherweise dadurch zustande kommt, dass L-ArgHCl die Gleichgewichtsreaktionen, welche zur Bildung des Aggregationsnukleus führen, in Richtung Dissoziation verschiebt (Abb. 4.2; eingelassene Grafik). Dadurch wird die Ausbildung von Aggregationskeimen thermodynamisch unvorteilhafter, was ihre Konzentration in Lösung reduziert. Präzipitiertes, aber natives Protein (A_N) entsteht bei ausreichend hoher Proteinkonzentration spontan in Abwesenheit eines Löslichkeit-vermittelnden Additivs und wird durch Zugabe von L-ArgHCl solubilisiert. Somit wird A_N durch L-ArgHCl destabilisiert, was seine Ursache zum einen in einer dem *Gap*-Effekt analogen Ungleichverteilung von Wasser und Additivmolekülen haben kann und zum anderen durch die Löslichkeit-vermittelnde Interaktion von L-ArgHCl mit der Proteinoberfläche hervorgerufen werden kann.

4.3.2 Einflüsse von L-ArgHCl auf die Löslichkeit von Aminosäuren

Die Wirkung von L-ArgHCl auf Aminosäure-Ebene wurde von Arakawa et al. (2007a) für eine Reihe von Aminosäuren publiziert. Hierbei wurde die Löslichkeit von proteinogenen Aminosäuren in 1 M L-ArgHCl gemessen und die freie Energie für den Transfer ausgehend von Wasser errechnet. Die gezeigten freien Transferenergien waren mit Ausnahme von Val und Ile durchweg negativ, was eine vorteilhafte Interaktion der Aminosäuren mit L-ArgHCl bedeutete.

Analoge Messungen mit GuHCl zeigten ähnliche freie Transferenergien wie für L-ArgHCl. Allerdings war auch der Transfer von DKP, welches als Modell für das Peptidrückgrat verwendet wurde, in 1 M L-ArgHCl vorteilhaft – wenn auch in geringerem Maße als bei 1 M GuHCl. Dies würde bedeuten, dass L-ArgHCl – ähnlich wie GuHCl – eine Affinität zum Peptidrückgrat hat und somit die Denaturierung von Proteinen fördern müsste. Ausgehend von diesem offensichtlichen Widerspruch wurden eigene Transferenergiemessungen durchgeführt. Hierfür wurde die Löslichkeit aller proteinogenen Aminosäuren (mit Ausnahme von Cystein) und von DKP mittels Oszillationsdensitometrie nach dem unter anderem von Auton und Bolen (2004) beschriebenen Verfahren bestimmt. Die freien Transferenergien wurden aus den Molalitäten der Lösungen errechnet. Dabei ergaben sich für die Aminosäureseitenketten mit Ausnahme von Lys und Arg negative freie Transferenergien und für DKP eine positive freie Transferenergie. Somit interagiert L-ArgHCl in erster Linie mit den Aminosäureseitenketten – insbesondere mit denen von Phe, Trp, Tyr und His – nicht aber mit dem Peptidrückgrat. L-ArgHCl ist damit nicht als Denaturierungsmittel zu klassifizieren wie Harnstoff oder GuHCl – beide interagierten vorteilhaft mit DKP – sondern als eine den nativen Zustand schwach stabilisierende Substanz.

Die aggregationshemmende Wirkung von L-ArgHCl, die Vermittlung von Proteinlöslichkeit, die Verringerung von Enzymaktivität und thermodynamischer Stabilität resultieren somit aus vorteilhaften Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten. Diese Eigenschaften von L-ArgHCl sind daher von der Faltung eines nativen Proteins sowie von den oberflächenexponierten Aminosäuren sämtlicher Faltungsintermediate und Faltungszustände und somit generell von der Primärstruktur eines Proteins abhängig.

4.4 Einfluss ionischer Flüssigkeiten auf Proteine

Ionische Flüssigkeiten sind Salze, welche einen Schmelzpunkt von unter 100 °C haben. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser Salze können maßgeblich durch Variation der Anionen und Kationen beeinflusst werden. Der positive Effekt von ionischen Flüssigkeiten auf die Stabilität und auf die Aktivität von Proteinen wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. So konnten beispielsweise für α -Chymotrypsin, immobilisierte Penicillin G Amidase, Meerrettich-Peroxidase oder Subtilisin höhere Stabilitäten oder Enzymaktivitäten in Gegenwart von ionischen Flüssigkeiten gezeigt werden (Lozano et al., 2001; De Diego et al., 2004; Machado et al., 2005; Basso et al., 2005; Noritomi et al., 2007). Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass ionische Flüssigkeiten die Ausbeute an nativem Protein bei der oxidativen Rückfaltung erhöhen können. Hierzu zählen Lysozym, ScFvOx und rPA (Summers und Flowers, 2000; Lange et al.,

2005; Buchfink et al., 2010). Weiterhin eignen sich ionische Flüssigkeiten wie BMIMCl, BMIMBr oder BMIMI als Additive für die Proteinkristallisation und können die Löslichkeit von Proteinen erhöhen (Pusey et al., 2007; Wang et al., 2010).

Die Wirkmechanismen, mit welchen Lösungsmitteladditive die Rückfaltungsausbeuten von Proteinen erhöhen, sind komplex und nicht ausreichend verstanden. Während es für L-ArgHCl mittlerweile einige Modelle gibt, welche die positiven Effekte bei der Rückfaltung erklären, ist dies für ionische Flüssigkeiten nicht der Fall. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt von EMIMCl und EMIMDEP auf tc-rPA und auf CM-rPA untersucht.

4.4.1 Löslichkeit von Proteinen in EMIMCl

Analog zu L-ArgHCl wurde auch für EMIMCl der Einfluss auf die Löslichkeit von tc-rPA und von CM-rPA untersucht. Es stellte sich dabei heraus, dass EMIMCl massiv die Gleichgewichtslöslichkeit von tc-rPA erhöhte. So konnten in 1 M EMIMCl $130 \pm 14 \text{ mg ml}^{-1}$ tc-rPA in Lösung gebracht werden. Höhere EMIMCl-Konzentrationen konnten aufgrund der hohen Löslichkeit von tc-rPA nicht verwendet werden. Eine solche Erhöhung der Löslichkeit entspricht einer freien Energie für den Transfer von Wasser in 1 M EMIMCl von -18 kJ mol^{-1} und liegt somit unter den mit L-ArgHCl erzielten Werten. Auch für CM-rPA konnte eine Erhöhung der apparenten Löslichkeit in Gegenwart von EMIMCl ermittelt werden. So betrug in 2 M EMIMCl die apparente Löslichkeit $1,5 \pm 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Dieser Wert änderte sich auch bei längerer Inkubationsdauer nicht wesentlich. Auch der Oligomerenzustand von CM-rPA blieb in etwa gleich, was analog zu L-ArgHCl eine Unterdrückung der Proteinaggregation bedeutete. Ebenso konnte festgestellt werden, dass die mit CM-rPA erzielten Löslichkeiten keine Gleichgewichtswerte waren, da ein Solubilisieren der CM-rPA-Aggregate mit EMIMCl nicht möglich war. Oberhalb von 2 M EMIMCl zeigte sich, dass die apparente CM-rPA Löslichkeit ausgehend von löslichem Protein wieder sank. Ab 4 M konnte kein Protein mehr in Lösung detektiert werden. Hierbei ist eine Übereinstimmung zwischen den für EMIMCl publizierten Rückfaltungsausbeuten von rPA (Buchfink et al., 2010) und der CM-rPA-Löslichkeit erkennbar. So konnte die maximale Rückfaltungsausbeute in 2-3 M EMIMCl erzielt werden, wo auch das Maximum der apparenten CM-rPA-Löslichkeit lag. Es ist daher anzunehmen, dass EMIMCl analog zu L-ArgHCl die Aggregation von Proteinen während der Rückfaltung unterdrückt.

4.4.2 Stabilität und Aggregation von Proteinen in ionischen Flüssigkeiten

Neben für die Rückfaltung vorteilhaften Effekten von EMIMCl konnte auch nachgewiesen werden, dass hohe Konzentrationen des Salzes analog wie bei Verwendung von GuHCl oder Harnstoff zur Denaturierung von tc-rPA führten. Ein solcher Effekt ist bereits für verschiedene Proteine und ionische Flüssigkeiten beschrieben. So konnte von Constantinescu et al. (2010) gezeigt werden, dass 1-Ethyl-3-Methylimidazoliumdicyanamid und 1-Butyl-3-Methylimidazoliumbromid destabilisierend auf RNase A wirken, während andere ionische Flüssigkeiten wie Cholidihydrogenphosphat diese stabilisierten. Auch für die Reihe EMIMCl bis HMIMCl konnte von Lange et al. (2005) eine zunehmende Destabilisierung von Lysozym gezeigt werden. Für eine Serie von EMIM⁺ basierten ionischen Flüssigkeiten konnte bei Variation des Anions von Buchfink et al. (2010) eine zunehmende Destabilisierung in der folgenden Reihe gezeigt werden:



Es erschien hierbei überraschend, dass EMIMDEP stärker destabilisierend wirkte als EMIMCl, obwohl das dem DEP-Anion zugrundeliegende Phosphat-Anion als kosmotrop eingeordnet wurde und somit eigentlich stabilisieren sollte. Daher wurde auch für tc-rPA der Einfluss von EMIMCl und von EMIMDEP auf die thermodynamische Stabilität untersucht.

Die Messung des Einflusses von EMIMCl auf die Stabilität von rPA bzw. tc-rPA erwies sich als problematisch, da weder dynamische Differenzkalorimetrie angewendet noch Denaturierungsmittel-induzierte Übergänge im Fern-UV-CD-Bereich oder mittels Fluoreszenz gemessen werden konnten. Dies lag einerseits an der Irreversibilität der Denaturierung von tc-rPA durch Aggregation der Serinproteasedomäne und zum anderen an fluoreszierenden, lichtabsorbierenden Verunreinigungen und an der starken Eigenabsorption der ionischen Flüssigkeiten im Fern-UV-CD-Bereich. Es wurde daher der Einfluss von EMIMCl und EMIMDEP auf tc-rPA im Nah-UV-CD-Bereich untersucht. Dabei zeigten sich den GuHCl-induzierten Übergängen analoge Denaturierungskurven. So denaturierte in 4,9 M EMIMCl und in 2,5 M EMIMDEP die Serinproteasedomäne und ab 5,4 M EMIMCl bzw. 2,8 M EMIMDEP die Kringel 2-Domäne. Eine Umrechnung der molaren Salzkonzentrationen auf Masseprozent zeigte dabei in Übereinstimmung mit Buchfink et al. (2010) eine stärker destabilisierende Wirkung von EMIMDEP als von EMIMCl. Messungen in 5,4 M EMIMCl mittels ATR-FTIR-Spektroskopie zeigten in Übereinstimmung mit den Nah-UV-CD-Daten, dass tc-rPA langsam denaturierte.

Zeitabhängige Löslichkeitsmessungen ergaben, dass die Denaturierung von tc-rPA in 6 M EMIMCl anders als für GuHCl mit der Zeit irreversibel wurde. So wurde bei Verdünnung in 1 M L-ArgHCl – wie auch für CM-rPA bei den Löslichkeitsmessungen – festgestellt, dass mit

zunehmender Inkubationszeit von tc-rPA immer mehr Protein aggregierte anstatt bei Verdünnung aus GuHCl in seinen nativen Zustand zu falten. Es wurde daher mittels Festkörper-NMR der EMIMCl-denaturierte Zustand mit nativem tc-rPA und mit CM-rPA verglichen. Dabei zeigte sich, dass CM-rPA – entsprechend seines Charakters als Modell für den denaturierten Zustand – als zufälliges Strukturensemble in den untersuchten Aggregaten vorlag. Der EMIMCl-denaturierte Zustand war dagegen dem nativen Protein ähnlich, allerdings war die Signalintensität geringer, was auf eine partielle Denaturierung hindeutete.

In Analogie zu CM-rPA war es möglich, die Aggregate des EMIMCl-denaturierten tc-rPA in hohen GuHCl-Konzentrationen zu solubilisieren. Nach anschließender Verdünnung in 1 M L-ArgHCl lag das Protein wieder nativ vor. Somit laufen neben der Denaturierung in hohen EMIMCl-Konzentrationen irreversible Prozesse ab, welche von der Proteinkonzentration abhängig sind. Dass es sich hierbei um die Aggregation des tc-rPA in EMIMCl handelte, konnte mittels dynamischer Lichtstreuung gezeigt werden. Dabei ist vermutlich die Denaturierung von tc-rPA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, da aus der Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation hervorging, dass es sich um eine Reaktion erster Ordnung handelte. Dies konnte durch die Messung der Abnahme der Enzymaktivität während der Inkubation in 5,4 M EMIMCl bestätigt werden. Weiterhin konnte für die Aggregation von CM-rPA gezeigt werden, dass die initiale Aggregation eine Reaktion zweiter Ordnung war. Dabei war bei Erhöhung der EMIMCl-Konzentration eine Verschiebung der Ausgleichsgeraden zu geringeren Proteinkonzentrationen erkennbar, was – wie bereits bei den Löslichkeitsmessungen mit CM-rPA festgestellt – auf eine geringere Proteinlöslichkeit hindeutete.

Eine Aggregation bzw. Fibrillenbildung in hohen Konzentrationen ionischer Flüssigkeiten konnte unter anderem für Lysozym und RNase A nachgewiesen werden (Constantinescu et al., 2007; Byrne und Angell, 2009; Constantinescu et al., 2010). Bei den selbst durchgeführten Aggregationsmessungen konnten jedoch keine definierten Strukturen wie Fibrillen detektiert werden.

Für EMIMDEP wurde ebenfalls festgestellt, dass tc-rPA nach der Denaturierung aggregierte. Allerdings konnten die Kinetiken nicht ausgewertet werden, da die Aggregation auch bei geringeren Proteinkonzentrationen schneller und stärker ablief als in EMIMCl. Dies deutet zum einen – wie bereits bei den Nah-UV-CD-Übergängen in Kapitel 3.4.1 gezeigt – auf eine stärkere Destabilisierung von tc-rPA und zum anderen auf eine geringere Löslichkeit der denaturierten Spezies in EMIMDEP im Vergleich zu EMIMCl hin.

Analog wie für L-ArgHCl gezeigt, betrug die Reaktionsordnung für die initiale Aggregationsreaktion von CM-rPA etwa 10, wenn geringe, submolare EMIMCl-Konzentrationen verwendet wurden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch der Wirkmechanismus analog ist. So verschieben geringe EMIMCl-Konzentrationen analog zu L-ArgHCl die Gleichgewichtsreaktionen, welche für die Bildung des Nukleus nötig sind, in Richtung Dissoziation. Eine Erhöhung der EMIMCl-Konzentration führte zu einem Mechanismuswechsel. So konnten oberhalb von etwa 400 mM EMIMCl keine Löslichkeiten ausgehend von löslichem tc-rPA gemessen werden, weil die Lösungen übersättigt vorlagen. Dies äußerte sich durch schlagartige Ausbildung von Proteinpräzipitat nach etwa 2-4 Tagen, je nach EMIMCl- und Proteinkonzentration. Für CM-rPA konnte eine langsame Aggregation beobachtet werden. So konnten die einzelnen Reaktionen für die Bildung des Nukleus aufgelöst und so eine Reaktion zweiter Ordnung für die Aggregation von CM-rPA beobachtet werden. Dies bedeutet, dass möglicherweise die Bildung des Nukleus zwar wie bei L-ArgHCl verlangsamt wird, ab ca. 400 mM EMIMCl aber keine Gleichgewichtsreaktion mehr darstellt und somit irreversibel ist. Ursache hierfür könnte die zunehmende Destabilisierung des nativen Zustands sein. Die Untersuchung der Ursachen für die Destabilisierung und die anschließende Aggregation von tc-rPA in EMIMCl und EMIMDEP war Gegenstand der durchgeführten Transferenergiemessungen.

4.4.3 Einfluss von EMIMCl und EMIMDEP auf die Löslichkeit von Aminosäuren

Analog zu L-ArgHCl wurde auch in EMIMCl und EMIMDEP die Löslichkeit von proteinogenen Aminosäuren bestimmt. Dabei fand DKP als Modellsystem für das Peptidrückgrat Verwendung. Es wurde festgestellt, dass die Löslichkeit der Aminosäuren in 1 M EMIMCl und 1M EMIMDEP deutlich geringer war im Vergleich zur Löslichkeit in Wasser. Eine Ausnahme bildeten Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten. Am unvorteilhaftesten war die Interaktion mit Glycin, weshalb bei beiden ionischen Flüssigkeiten nach Subtraktion der freien Transferenergie für Glycin von den freien Transferenergien der übrigen Aminosäuren vorteilhafte Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten ermittelt wurden. Ausgehend hiervon lässt sich sagen, dass der Löslichkeit-vermittelnde Effekt von EMIMCl und auch von EMIMDEP durch vorteilhafte Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten, insbesondere jenen mit aromatischen Systemen, zustande kommt.

Summiert man die freien Transferenergien für die Aminosäureseitenketten aller gemessenen Aminosäuren auf, so erhält man für EMIMCl und EMIMDEP mit $-17,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ bzw. $-18,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ deutlich niedrigere Werte als z.B. für L-ArgHCl ($-9,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Abb. 4.3). Dies bedeutet, dass die getesteten ionischen Flüssigkeiten wahrscheinlich insgesamt stärker mit der Proteinoberfläche interagieren und daher deutlich destabilisierend wirken.

Dagegen weisen stabilisierende Additive wie Prolin, Saccharose oder TMAO eher geringe Interaktionen mit den Aminosäureseitenketten auf, was übereinstimmt mit der Feststellung, dass diese Additive von der Proteinoberfläche verdrängt werden (Lee und Timasheff, 1981; Arakawa und Timasheff, 1985).

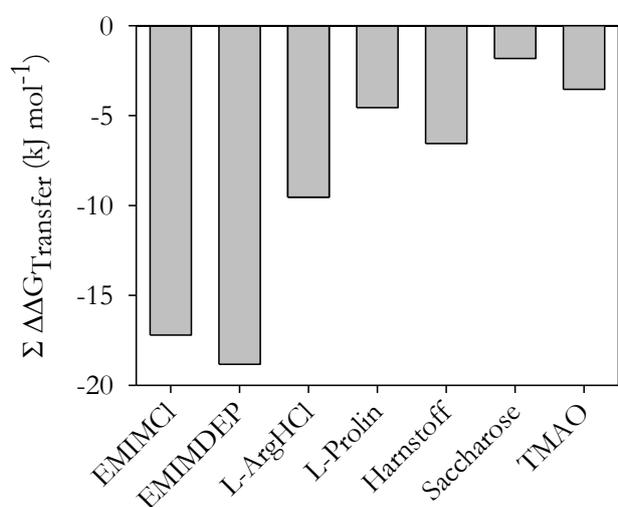


Abb. 4.3: Aufsummierung der freien Transferenergien. Aufgetragen sind die Summen für die freien Transferenergien von Aminosäureseitenketten aus Wasser in 1 M Additiv ($\Sigma \Delta \Delta G_{\text{Transfer}}$). Die Daten wurden entnommen aus: Qu et al., 1998 (L-Prolin); Nozaki und Tanford, 1963; Wang und Bolen, 1997 (Harnstoff, TMAO); Liu und Bolen, 1995 (Saccharose).

Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die in Abb. 4.3 für die verschiedenen Additive gezeigten aufsummierten freien Transferenergien mit keiner real existierenden Proteinoberfläche erreicht werden können, da bei der Berechnung der freien Seitenketten-Transferenergien vereinfachend davon ausgegangen wird, dass sämtliche Aminosäureseitenketten vollständig oberflächenexponiert sind, das Peptidrückgrat jedoch komplett im Inneren des Proteins verborgen ist.

Neben der Interaktion mit Aminosäureseitenketten spielen besonders Interaktionen mit dem Peptidrückgrat eine wichtige Rolle. So liegen die aufsummierten freien Transferenergien für Harnstoff und Prolin bei Interaktion mit den Aminosäureseitenketten zwar recht nah beieinander ($-6,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ bzw. $-4,6 \text{ kJ mol}^{-1}$), allerdings unterscheiden sich beide Additive hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem Peptidrückgrat. Diese ist bei Harnstoff mit $-0,23 \text{ kJ mol}^{-1}$ vorteilhaft und bei Prolin mit $0,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ unvorteilhaft. Als Konsequenz ist Harnstoff wie GuHCl oder GuHSCN als Denaturierungsmittel einzuordnen, Prolin hingegen als Protein stabilisator.

Bei der Messung der DKP-Löslichkeit zeigte sich, dass diese in EMIMCl und insbesondere in EMIMDEP verringert war. Dies bedeutet, dass beide ionische Flüssigkeiten in Analogie zu L-ArgHCl nicht als Denaturierungsmittel, sondern als stabilisierende Stoffe zu klassifizieren sind, da sie unvorteilhaft mit dem Peptidrückgrat interagierten. Es ist daher zu vermuten, dass die destabilisierende Wirkung der getesteten ionischen Flüssigkeiten durch die starken Wechselwirkungen mit den aromatischen Aminosäureseitenketten verursacht wurde, welche den Übergang in nicht native Proteinstrukturen begünstigten. Auf der anderen Seite wurde die Interaktion von DKP mit EMIMCl bei Erhöhung der Salzkonzentration immer unvorteilhafter. Dies ist vermutlich die Ursache für die beobachtete Aggregation von tc-rPA und CM-rPA.

Die Interaktionen von DKP mit 1 M EMIMDEP waren mit $1,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ deutlich unvorteilhafter als für EMIMCl ($0,42 \text{ kJ mol}^{-1}$). Dies bedeutet, dass, wenn man nur die Interaktion mit dem Peptidrückgrat betrachtet, EMIMDEP stärker stabilisierend wirken müsste als TMAO mit $0,75 \text{ kJ mol}^{-1}$ (Wang und Bolen, 1997). Auf der anderen Seite waren die Interaktionen mit der Seitenkette von Trp bei höheren Salzkonzentrationen deutlich stärker in EMIMDEP als in EMIMCl. Die Ursache hierfür sind möglicherweise die zusätzlichen Alkylketten des DEP-Anions, welche für eine erhöhte Hydrophobizität der Lösung verantwortlich sind. Somit sind die starken Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche, insbesondere mit den aromatischen Aminosäureseitenketten, vermutlich die Ursache für die stärkere Denaturierungswirkung einerseits und die Ineffektivität bei der oxidativen Rückfaltung andererseits.

4.5 Löslichkeit von DKP und Trp in ionischen Flüssigkeiten

Um die verwendeten ionischen Flüssigkeiten auf ihre Hydrophobizität hin zu überprüfen, wurde zunächst versucht eine Korrelation mit der Trp-Löslichkeit zu erstellen. Dies gelang für die Serie EMIMCl – OMIMCl, jedoch zeigte sich bei der Variation der Anionen, dass bei Verwendung von 1 M Lösungen die Hydrophobizität noch durch einen anderen Effekt überlagert wurde. So war beispielsweise die Trp-Löslichkeit in 1 M EMIMDEP oder EMIMEtSO₄ geringer als in EMIMCl, obwohl für beide Anionen aufgrund der Alkylketten eine höhere Hydrophobizität zu erwarten gewesen wäre. Dies deutete darauf hin, dass neben der Hydrophobizität auch die Art bzw. Struktur des Anions eine wesentliche Rolle spielte. So lassen sich die Abweichungen bei den Trp-Löslichkeiten über die Kosmotropizität der Anionen erklären. In der Literatur existieren mittlerweile auch für Anionen und Kationen von ionischen Flüssigkeiten Daten bezüglich der Chaotropizität bzw. Kosmotropizität der Salze. Übersichten hierzu liefern z. B. Zhao (2006) und Yang (2009). Eine aussagekräftige Größe ist hierbei der Viskositäts-B-Koeffizient, welcher mit

Hilfe der Jones-Dole-Gleichung (Jones und Dole, 1929) aus Viskositätsmessungen von Salzlösungen erhalten wurde. Da jedoch der Viskositäts-B-Koeffizient nur für verdünnte Salzlösungen und nur für sphärische Ionen aussagekräftig ist, wurde nach einem Modellsystem gesucht, welches weniger stark auf die Hydrophobizität von Ionen reagierte, sondern eher die Chaotropizität bzw. Kosmotropizität zeigen konnte. Hierbei erwies sich die Verwendung von DKP als Modellsystem vorteilhaft, da aus den Transferenergiemessungen recht einfach und schnell hervorging, ob ein Additiv denaturierend wirkte, also mit DKP vorteilhaft interagiert, oder nicht. Die Verwendbarkeit von DKP wurde zunächst mit verschiedenen Guanidinium-Salzen getestet. Es zeigte sich dabei eine der Hofmeisterreihe und den für die Anionen ermittelten Viskositäts-B-Koeffizienten konforme Serie:



Das Guanidinium-Kation wurde von Zhao et al. (2006) als chaotropes Kation beschrieben, so dass es eigentlich Protein-stabilisierend wirken müsste. Allerdings wird dieser Effekt durch eine sehr schwache Hydratation und durch daraus resultierende Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche und dem Peptidrückgrat neutralisiert, so dass Guanidinium-Salze mit chaotropen oder neutralen Anionen als Denaturierungsmittel für Proteine verwendet werden können (Mason et al., 2003). Entsprechend stark vorteilhaft war die Interaktion von DKP mit 1 M GuHSCN bzw. GuHCl. HCOO^- und F^- sind dagegen eher als kosmotrope und somit Protein-stabilisierende Anionen einzuordnen. Daher kompensierten sie die destabilisierende Wirkung des Guanidinium-Kations weitestgehend.

Die Messung der DKP-Löslichkeit und die Berechnung der freien Transferenergie für verschiedene ionische Flüssigkeiten ergab für die Kationen die folgende Serie mit zunehmender Chaotropizität:



Für die Kationen ließ sich für die Reihe EMIM⁺ bis OMIM⁺ ein analoger Trend zu den Trp-Löslichkeiten ausmachen. So nimmt offenbar mit steigender Alkylkettenlänge nicht nur die Hydrophobizität, sondern auch die Kosmotropizität zu. Dies deckt sich mit in der Literatur verfügbaren Daten, welche für die Reihe EMIM⁺ bis HMIM⁺ zunehmende Kosmotropizität, d.h. eine zunehmende Destabilisierung zeigten (Zhao, 2006; Yang, 2009). Die zunehmende Destabilisierung wurde auch von Lange et al. (2005) und von Constantinescu et al. (2007) für Lysozym und RNase A gezeigt. Für 1 M OMIMCl wäre zu erwarten gewesen, dass es vorteilhafter als HMIMCl mit DKP interagiert und sich somit in die Reihe zunehmender Kosmotropizität einfügt. Allerdings wurde festgestellt, dass OMIMCl aus dieser Reihe herausfiel,

da es offenbar ab etwa 230 mM Mizellen in Lösung bildete. Dieser Wert geht konform mit den Daten von Blesic et al. (2007) und Luczak et al. (2009) für OMIMCl, welche eine kritische Konzentration für die Ausbildung von Mizellen zwischen etwa 220 mM und 230 mM OMIMCl gemessen haben. Es ist zu vermuten, dass die Mizellenbildung zur weitgehenden Maskierung der Octylketten führte, so dass für die Interaktion mit DKP nur der Methylimidazolium-Teil des OMIM-Kations zur Verfügung stand. Bleibt man mit 200 mM OMIMCl unter der kritischen Mizellenkonzentration und extrapoliert die freie Transferenergie für 1 M OMIMCl, so passt OMIMCl in die Reihe.

Die Hydroxylierung der Alkylkette führte zu einer unvorteilhafteren Interaktion mit DKP, da durch sie vermutlich die Hydrophobizität reduziert wurde. Dies geht konform mit den Daten von Lange et al. (2005), welche bei Lysozym feststellten, dass die Hydroxylierung zu einer Verringerung der destabilisierenden Wirkung der 1-Alkyl-3-Methylimidazoliumchloride führte.

Für die getesteten Anionen konnte die folgende Reihe aufgestellt werden:



Dabei nimmt die Kosmotropizität der Anionen in der Reihe zu. Die Reihenfolge der Ionen stimmt mit den Daten von Zhao (2006) überein. So wird dort OTs^- als destabilisierendes, chaotropes Derivat der Sulfonsäure beschrieben. Für die anderen Ionen zeigte sich, dass offenbar die Art des Anions wichtiger ist als die Menge und die Art der Alkylreste. So zeigten die alkylierten Sulfate leicht unvorteilhaftere Interaktionen mit DKP als Cl^- . Das DEP-Anion hingegen zeigte von allen getesteten Anionen die unvorteilhaftesten Interaktionen mit DKP.

Die Verwendung ionischer Flüssigkeiten für die Rückfaltung von rPA zeigte, dass nicht alle Kationen und Anionen für die Rückfaltung geeignet sind. Als ungünstig für die oxidative Rückfaltung von Proteinen lassen sich Kationen wie HMIM^+ oder OMIM^+ einordnen, welche aufgrund ihrer destabilisierenden Wirkung und der Mizellenbildung eher in recht geringen Konzentrationen und in Kombination mit anderen Rückfaltungsadditiven wie EMIMCl oder L-ArgHCl verwendet werden sollten. Bei den Anionen ist OTs^- nicht geeignet, da es wie SCN^- das Peptidrückgrat solubilisiert und somit Proteine denaturiert. Auf der anderen Seite ist die Verwendung von stabilisierenden Anionen wie den alkylierten Sulfaten und Phosphaten ebenfalls als kritisch zu betrachten, da sie kosmotrop sind und deshalb bei der oxidativen Rückfaltung eher die Aggregation als die Faltung in den nativen Zustand fördern. Dies wird auch durch die Alkylierung nicht verbessert, da hierdurch die Kosmotropizität und somit die aussalzende Wirkung des Anions erhöht wird. So steigt bei alkylierten Phosphaten und Sulfaten der Viskositäts B-Koeffizient mit zunehmender Alkylkettenlänge an (Tamaki et al., 1973; Tamaki et

al., 1987). Dies ist auch der Fall, wenn man Formiat- mit Acetat-Anionen vergleicht (Collins, 1997). Hinzu kommt, dass zusätzliche Alkylketten an den Anionen zu erhöhter Hydrophobizität und zu einer erhöhten Destabilisierung des nativen Zustands führen.

Somit lässt sich mit den Rückfaltungsausbeuten von rPA in den ionischen Flüssigkeiten und mit den freien Transferenergiemessungen für DKP und Trp ein optimaler Bereich definieren, in welchem ionische Flüssigkeiten als Rückfaltungsadditive effektiv wirken können (Abb. 4.4).

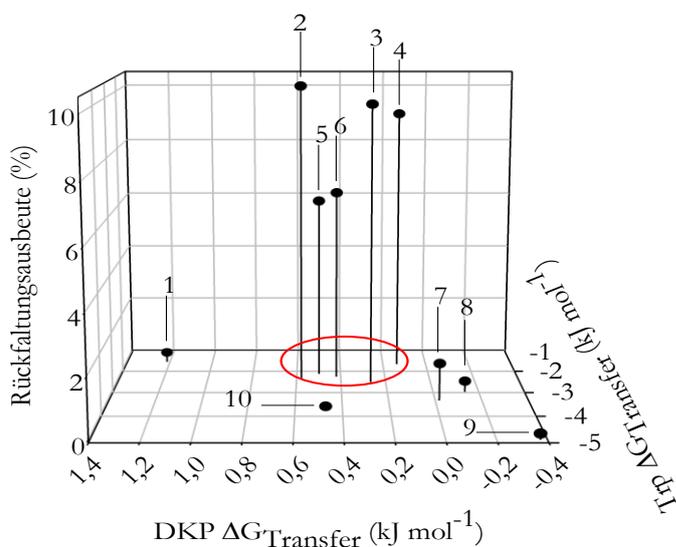


Abb. 4.4: Korrelation der freien Transferenergien mit den Rückfaltungsausbeuten von rPA. Gezeigt sind die in dieser Arbeit bestimmten freien Transferenergien für DKP und für Trp in Abhängigkeit von den Rückfaltungsausbeuten in 1 M Additiv. Dabei ist (1) EMIMDEP, (2) EMIMMDEGSO₄, (3) BMIMCl, (4) L-ArgHCl, (5) EMIMEtSO₄, (6) EMIMCl, (7) HMIMCl, (8) EMIMOTs, (9) OMIMCl, (10) EMIMHexSO₄. Der optimale Bereich für Rückfaltungsadditive ist mit (○) markiert. Die Rückfaltungsausbeuten wurden von Buchfink et al. (2010) übernommen.

In diesen Bereich fallen die ionischen Flüssigkeiten EMIMCl, EMIMEtSO₄, EMIMMDEGSO₄, BMIMCl und auch L-ArgHCl. Bei ihnen beträgt die freie Transferenergie für Trp ca. -2 kJ mol⁻¹ und für DKP 0,15-0,6 kJ mol⁻¹. Somit erscheint eine Mischung aus einer mittelstarken Solubilisierung der Seitenketten und leicht unvorteilhaften Interaktionen mit dem Peptidrückgrat effektiv, um Proteine bei ihrer Faltung in den nativen Zustand zu unterstützen.

4.6 Zusammenfassung

Es ist durch die Verwendung geeigneter Lösungsmitteladditive möglich, die Rückfaltungsausbeute von Proteinen zu erhöhen. Dabei können Additive unter anderem durch eine Unterdrückung von Protein-Protein-Interaktionen wirken und so die Aggregation von Proteinen während der Faltung verhindern.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkmechanismen und Ursachen für die Effekte von Lösungsmitteladditiven wie L-ArgHCl und von ionischen Flüssigkeiten zu untersuchen. Hierfür wurden unter anderem Löslichkeitsmessungen mit dem rekombinanten Plasminogenaktivator rPA bzw. seiner aktivierten Form, der Zweikettenform tc-rPA vorgenommen. Dabei unterlag rPA offenbar einer langsamen autoproteolytischen Aktivierung zu tc-rPA, welche durch die Erhöhung der Enzymaktivität messbar war und zu einer apparenten thermodynamischen Stabilisierung der Serinproteasedomäne führte. Als Modell für den denaturierten Zustand diente vollständig carboxymethyliertes rPA.

Die Löslichkeitsmessungen zeigten für L-ArgHCl und EMIMCl eine deutliche Erhöhung der rPA- bzw. tc-rPA-Gleichgewichtslöslichkeit. So war die Löslichkeit von rPA in 1 M L-ArgHCl ca. 1000-fach und in 1 M EMIMCl um einen Faktor von ca. 2000 erhöht. Die CM-rPA-Löslichkeit war ebenfalls erhöht, allerdings konnten sowohl für L-ArgHCl als auch für EMIMCl keine Gleichgewichtslöslichkeiten gemessen werden, was auf eine kinetische Barriere hindeutete, welche mit Erhöhung der L-ArgHCl bzw. EMIMCl-Konzentration entstand. Die Ursache hierfür war möglicherweise, dass sowohl L-ArgHCl als auch geringe EMIMCl-Konzentrationen die Gleichgewichtsreaktionen, welche zur Ausbildung des Aggregationsnukleus führten, in Richtung Dissoziation verschoben und so die Konzentration an aggregationsanfälligen Proteinspezies in Lösung reduzierten. Es war weiterhin für höhere EMIMCl-Konzentrationen ein Wechsel in diesem Mechanismus zu verzeichnen. So wurde oberhalb von etwa 400 mM EMIMCl zwar die Aggregationsreaktion verlangsamt, allerdings wurde diese auch irreversibel. Als Ursache hierfür war die zunehmende destabilisierende Wirkung von EMIMCl zu sehen, welche oberhalb von 5 M zur Denaturierung und langsamen unspezifischen Aggregation von tc-rPA führte.

Abschließend erfolgte mit Hilfe von Transferenergiemessungen eine Untersuchung der Effekte von L-ArgHCl, EMIMCl und EMIMDEP auf Aminosäureebene, um eventuelle vorteilhafte Interaktionen zu ermitteln. Es zeigte sich dabei, dass alle drei Additive in erster Linie mit Aminosäureseitenketten, insbesondere denen von aromatischen Aminosäuren, vorteilhaft interagierten. Ebenfalls konnte mit Hilfe der Transferenergiemessungen für weitere ionische

Flüssigkeiten gezeigt werden, dass Lösungsmitteladditive nur in einem gewissen Hydrophobizitätsbereich effektiv für die Rückfaltung von rPA waren.

Neben der Hydrophobizität war jedoch auch die Chaotropizität bzw. Kosmotropizität der Anionen und der Kationen relevant. Als Maß hierfür diente die Löslichkeit von DKP, welches als Modell für das Peptidrückgrat verwendet wurde. Es zeigte sich dabei, dass Lösungsmitteladditive, welche das Peptidrückgrat solubilisierten oder stark unvorteilhaft mit selbigem interagierten, für die Rückfaltung von rPA ungeeignet waren. Effektive Rückfaltungsadditive wie L-ArgHCl oder EMIMCl hingegen zeigten leicht unvorteilhafte Interaktionen mit dem Peptidrückgrat und eine relativ geringe Hydrophobizität.

Der optimale Bereich für die Effektivität eines Additivs während der Rückfaltung eines Proteins war somit einerseits von dessen Fähigkeit der Löslichkeitsvermittlung durch vorteilhafte, nicht bzw. nur schwach hydrophobe Interaktionen mit Aminosäureseitenketten und andererseits von leicht unvorteilhaften Interaktionen mit dem Peptidrückgrat abhängig. Abweichungen von diesem Bereich, z.B. durch stark unvorteilhafte oder vorteilhafte Interaktionen mit dem Peptidrückgrat oder aber durch eine zu hohe bzw. zu geringe Hydrophobizität, führten dagegen zu schlechteren Ergebnissen bei der oxidativen Rückfaltung von rPA.

5. Literaturverzeichnis

- Alber, T. (1989): Mutational effects on protein stability. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 765-798.
- Andreasen, P. A.; Petersen, L.C.; Dano, D. (1991): Diversity in Catalytic Properties of Single Chain and Two Chain Tissue-Type Plasminogen Activator. *Fibrinolysis* **5**: 207-215.
- Anfinsen, C. B. (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
- Arakawa, T.; Bhat, R.; Timasheff, S. N. (1990): Preferential interactions determine protein solubility in three-component solutions: The MgCl₂ system. *Biochemistry* **29**: 1914-1923.
- Arakawa, T.; Ejima, D.; Tsumoto, K.; Obeyama, N.; Tanaka, Y.; Kita, Y.; Timasheff, S. N. (2007a): Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry* **127**: 1-8.
- Arakawa, T.; Philo, J. S.; Tsumoto, K.; Yumioka, R.; Ejima, D. (2004): Elution of antibodies from a Protein-A column by aqueous arginine solutions. *Protein expression and purification* **36**: 244-248.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1984): Protein stabilization and destabilization by guanidinium salts. *Biochemistry* **23**: 5924-5929.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1985): The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal* **47**: 411-414.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. (1982): Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* **21**: 6545-6552.
- Arakawa, T.; Tsumoto, K. (2003): The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 148-152.
- Arakawa, T.; Tsumoto, K.; Kita, Y.; Chang, B.; Ejima, D. (2007b): Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids* **33**: 587-605.
- Arakawa, T.; Tsumoto, K.; Nagase, K.; Ejima, D. (2007c): The effects of arginine on protein binding and elution in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography. *Protein expression and purification* **54**: 110-116.
- Armstrong, N.; de Lencastre, A.; Gouaux, E. (1999): A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Science* **8**: 1475-1483.
- Arya, R.; Bhattacharya, A.; Saini, A. S. (2008): *Dictyostelium discoideum* - a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *The FASEB Journal* **22**: 4055-4066.
- Auton, M.; Bolen, D. W. (2004): Additive transfer free energies of the peptide backbone unit that are independent of the model compound and the choice of concentration scale. *Biochemistry* **43**: 1329-1342.
- Auton, M.; Bolen, D. W. (2007): Application of the transfer model to understand how naturally occurring osmolytes affect protein stability. *Methods in Enzymology* **428**: 397-418.
- Baker, S. N.; McCleskey, T. M.; Pandey, S.; Baker, G. A. (2004): Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids. *Chemical Communications* **8**: 940-941.
- Ball, C. D.; Hardt, C. R.; Duddles, W. J. (1943): The influence of sugars on the formation of sulfhydryl groups in heat denaturation and heat coagulation of Hen Albumin. *The Journal of Biological Chemistry* **151**: 163-169.
- Basso, A.; Cantone, S.; Linda, P.; Ebert, C. (2005): Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled a_w. *Green Chemistry* **7**: 671-676.

-
- Baynes, B. M.; Trout, B. L. (2004): Rational design of solution additives for the prevention of protein aggregation. *Biophysical Journal* **87**: 1631-1639.
- Baynes, B. M.; Wang, D. I.; Trout, B. L. (2005): Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* **44**: 4919-4925.
- Bensadoun, A.; Weinstein D. (1976): Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* **70**: 241-250.
- Blesic, M.; Marques, M. H.; Plechkova, N. V.; Seddon, K. R.; Rebelo, L. P. N.; Lopes, A. (2007): Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. *Green Chemistry* **9**: 481-490.
- Bode, W.; Renatus, M. (1997): Tissue-type plasminogen activator: variants and crystal/solution structures demarcate structural determinants of function. *Current Opinion in Structural Biology* **7**: 865-872.
- Bolen, D. W.; Baskakov, I. V. (2001): The Osmophobic Effect: Natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of Molecular Biology* **310**: 955-963.
- Bradbury, S. L.; Jakoby, W. B. (1972): Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: Effects on Aldehyde Dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **69**: 2373-2376.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Breslow, R.; Guo, T. (1990): Surface tension measurements show that chaotropic salting-in denaturants are not just water-structure breakers. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **87**: 167-169.
- Brinkmann, U.; Mattes, R. E.; Buckel, P. (1989): High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**:109-114.
- Broering, J. M.; Bommarius, A. S. (2005): Evaluation of Hofmeister effects on the kinetic stability of proteins. *The Journal of Physical Chemistry. B.* **109**: 20612-20619.
- Buchfink, R.; Tischler, A.; Patil, G.; Rudolph, R.; Lange, C. (2010): Ionic liquids as refolding additives: Variation of the anion. *Journal of Biotechnology* **150**: 64-72.
- Buchner, J. (1996): Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. *The FASEB Journal* **10**: 10-19.
- Buchner, J.; Rudolph, R. (1991): Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 157-162.
- Burgess, R. R. (2009): Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods in Enzymology* **463**: 259-82.
- Butler, D. H.; McNamee, M. G. (1993): FTIR analysis of nicotinic acetylcholine receptor secondary structure in reconstituted membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1150**: 17-24.
- Byeon, I. J.; Llinas, M. (1991): Solution structure of the tissue-type plasminogen activator kringle 2 domain complexed to 6-aminohexanoic acid an antifibrinolytic drug. *Journal of Molecular Biology* **222**: 1035-1051.
- Byrne, N.; Angell, C. A. (2009): Formation and dissolution of hen egg white lysozyme amyloid fibrils in protic ionic liquids. *Chemical Communications* **2009**: 1046-1048.
- Byrne, N.; Wang L. M.; Belieres J. P.; Angell, C. A. (2007): Reversible folding - unfolding, aggregation protection, and multi-year stabilization, in high concentration protein solutions, using ionic liquids. *Chemical Communications* **26**: 2714-2716.
- Chiu, F. F.; Venkatesan, N.; Wu, C. R.; Chou, A. H.; Chen, H. W.; Lian, S. P.; Liu, S. J.; Huang, C. C.; Lian, W. C.; Chong, P.; Leng, C. H.; (2009): Immunological study of HA1 domain of hemagglutinin of influenza H5N1 virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **383**: 27-31.
-

-
- Cleary, S.; Mulkerrin, M. G.; Kelley, R. F. (1989): Purification and characterization of tissue plasminogen activator kringle-2 domain expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**: 1884-1891.
- Collins, K. D. (1997): Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal* **72**: 65-76.
- Collins, K. D. (2006): Ion hydration: implications of cellular function, polyelectrolytes, and protein crystallization, *Biophysical Chemistry* **119**: 271-281.
- Constantinescu, D.; Herrmann, C.; Weingärtner, H. (2007): Protein denaturation by ionic liquids and the Hofmeister series: A Case Study of Aqueous Solutions of Ribonuclease A. *Angewandte Chemie* **46**: 8887-8889.
- Constantinescu, D.; Herrmann, C.; Weingärtner, H. (2010): Patterns of protein unfolding and protein aggregation in ionic liquids. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**: 1756-1763.
- Das U.; Gururao, H.; Abdul, E. S.; Pallavi, M.; Das, T.; Pasha S.; Mann, M.; Ganguli, M.; Verma, A. K.; Bhat, R.; Chandrayan, S. K.; Ahmed, S.; Sharma, S.; Kaur, P.; Singh, T. P.; Srinivasan, A. (2007): Inhibition of protein aggregation: Supramolecular assemblies of arginine hold the key. *Plos One* **11**: e1176.
- De Diego, T.; Lozano, P.; Gmouh, S.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. (2004): Fluorescence and CD spectroscopic analysis of the α -Chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium Bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. *Biotechnology and Bioengineering* **88**: 916-924.
- Dill, K. A. (1990): Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**: 7133-7155.
- Einstein, A. (1905): Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* **322**: 549-560.
- Ejima, D.; Yumioka, R.; Tsumoto, K.; Arakawa, T. (2005): Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography. *Analytical Biochemistry* **345**: 250-257.
- Ellman, G. L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**: 70-77.
- Fahnert, B.; Lilie, H.; Neubauer, P. (2004): Inclusion Bodies: formation and utilization. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology* **89**: 93-142.
- Fairbanks, G.; Steck, T. L.; Wallach, D. F. H. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**: 2606-2617.
- Fink, A. L. (1995): Compact intermediate states in protein folding. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* **24**: 495-522.
- Fischer, G.; Bang, H. (1985): The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta* **828**: 39-42.
- Fischer, G.; Bang, H.; Berger E.; Schellenberger, A. (1984a): Conformational specificity of Chymotrypsin toward Proline-containing substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **791**: 87-97.
- Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. (1984b): Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomedica Biochimica Acta* **43**: 1101-1111.
- Frisken, B. J. (2001): Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics* **40**: 4087-4091.
- Gekko, K.; Timasheff, S. N. (1981): Mechanism of Protein stabilization by Glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**: 4667-4676.
-

-
- Gill, S. C.; von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182**: 319-326.
- Gold, A. M.; Fahrney, D. (1964): Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. II. Formation and Reactions of Phenylmethanesulfonyl α -Chymotrypsin. *Biochemistry* **3**: 783-91.
- Goldberg, M. E.; Rudolph, R.; Jaenicke, R. (1991): A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced Egg White Lysozyme. *Biochemistry* **30**: 2790-2797.
- Gruber, C. W.; Cemazar, M.; Heras, B.; Martin J. L.; Craik D. J. (2006): Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences* **31**: 456-464.
- Hendrick, J. P.; Hartl, F. U. (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* **62**: 349-384.
- Higgins, D. L.; Bennett, W. F. (1990): Tissue plasminogen activator: The biochemistry and pharmacology of variants produced by mutagenesis. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* **30**: 91-121.
- Hofmeister, F. (1888): Zur Lehre von der Wirkung der Salze. II. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **24**: 247-260.
- Hofrichter, J.; Ross, P. D.; Eaton, W. A. (1974): Kinetics and Mechanism of Deoxyhemoglobin S Gelation: A New Approach to Understanding Sickle Cell Disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **71**: 4864-4868.
- Hough, W. L.; Rogers, R. D. (2007): Ionic Liquids then and now: From solvents to materials to active pharmaceutical ingredients. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **80**: 2262-2269.
- Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodriguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D.; Davis, J. H.; Rogers, R. D. (2007): The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients. *New Journal of Chemistry* **31**: 1429-1436.
- Hu, C. K.; Kohnert, U.; Stürzebecher, J.; Fischer, S.; Llinás, M. (1996): Complexation of tissue plasminogen activator protease with benzamidine-type inhibitors: Interference by the kringle 2 module. *Biochemistry* **35**: 3270-3276.
- Hu, C. K.; Kohnert, U.; Wilhelm, O.; Fischer, S.; Llinás, M. (1994): Tissue-type plasminogen domain-deletion mutant BM 06.022: Modular stability, inhibitor binding and activation cleavage. *Biochemistry* **33**: 11760-11766.
- Huisman, H. (2005): Lexikon der klinischen Diabetologie. Eine praxisorientierte interdisziplinäre Darstellung. *Deutscher Ärzte Verlag GmbH, Köln*.
- Ichinose, A.; Kisiel, W.; Fujikawa, K. (1984): Proteolytic activation of tissue plasminogen activator by plasma and tissue enzymes. *FEBS Letters* **175**: 412-418.
- Inoue, H.; Timasheff, S. N. (1968): The interaction of β -Lactoglobulin with solvent components in mixed water-organic solvent systems. *Journal of the American Chemical Society* **90**: 1890-1898.
- Ishibashi, M.; Tsumoto, K.; Tokunaga, M.; Ejima, D.; Kita, Y.; Arakawa, T. (2005): Is arginine a protein-denaturant? *Protein Expression and Purification* **42**: 1-6.
- Jones, G.; Dole, M. (1929): The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride. *The Journal of the American Chemical Society* **51**: 2950-2964.
- Karuppiah, N.; Sharma, A. (1995): Cyclodextrins as protein folding aids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **211**: 60-66.
- Kauzmann, W. (1959): Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry* **14**: 1-63.
-

-
- Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. (2005): How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1751**: 119-139.
- Kiefhaber, T.; Rudolph, R.; Kohler, H. H.; Buchner, J. (1991): Protein aggregation in vivo: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N. Y.)* **9**: 825-829.
- Kilpeläinen, I.; Xie, H.; King, A.; Granstrom, M.; Heikkinen, S.; Argyropoulos, D. S. (2007): Dissolution of wood in ionic liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 9142-9148.
- Kita, Y.; Arakawa, T.; Lin, T. -Y.; Timasheff, S. N. (1994): Contribution of the surface free energy perturbation to protein-solvent interactions. *Biochemistry* **33**: 15178-15189.
- Kohnert, U.; Rudolph, R.; Verheijen, J. H.; Weening-Verhoeff, E. J. D.; Stern, A.; Prinz, H.; Lechner, M.; Kresse, G. B.; Buckel, P.; Fischer, S. (1992): Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022. *Protein Engineering* **5**: 93-100.
- Kragl, U.; Eckstein, M.; Kaftzik, N. (2002): Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 565-571.
- Kratky, O.; Leopold, H.; Stabinger, H. (1973): The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique. *Methods in Enzymology* **27**: 98-110.
- Krestov, G. A. (1991): Thermodynamics of solvation: Solution and dissolution, ions and solvents, structure and energetic. *Ellis Horwood Series in Physical Chemistry, New York*.
- Kyte, J.; Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lange, C.; Patil, G.; Rudolph, R. (2005): Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. *Protein Science* **14**: 2693-2701.
- Lange, C.; Rudolph, R. (2009): Suppression of protein aggregation by L-Arginine. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10**: 408-414.
- Lee, B.; Richards, F. M. (1971): The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. *Journal of Molecular Biology* **55**: 379-400.
- Lee, J. C.; Timasheff, S. N. (1974): Partial specific volumes and interactions with solvent components of proteins in guanidine hydrochloride. *Biochemistry* **13**: 257-265.
- Lee, J. C.; Timasheff, S. N. (1981): The stabilization of proteins by sucrose. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 7193-7201.
- Lim, W. K.; Smith-Somerville H. E.; Hardman, J. K. (1989): Solubilization and renaturation of overexpressed aggregates of mutant tryptophan synthase alpha-subunits. *Applied Environmental Microbiology* **55**: 1106-1111.
- Liu, Y.; Bolen, D. W. (1995): The peptide backbone plays a dominant role in protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Biochemistry* **34**: 12884-12891.
- Lozano, P.; de Diego, T.; Guegan, J. -P.; Vaultier, M.; Iborra, J. L. (2001): Stabilization of α -Chymotrypsin by Ionic Liquids in Transesterification Reactions. *Biotechnology and Bioengineering* **75**: 563-569.
- Luczak, J.; Jungnickel, C.; Joskowska, M.; Thöming, J.; Hupka, J. (2009): Thermodynamics of micellization of imidazolium ionic liquids in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **336**: 111-116.
-

-
- Machado, M. F.; Saraiva, J. M. (2005): Thermal stability and activity regain of horseradish peroxidase in aqueous mixtures of imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnology Letters* **27**: 1233-1239.
- Makrides, S. C. (1996): Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **60**: 512-538.
- Mason, P. E.; Neilson, G. W.; Dempsey, C. E.; Barnes, A. C.; Cruickshank, J. M. (2003): The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: Implications for protein stability in aqueous solution. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **100**: 4557-4561.
- Melander, W.; Horváth, C. (1977): Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **183**: 200-215.
- Mie, G. (1908): Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik* **4. Folge, Band 25**: 377-445.
- Murphy, K. P. (2001): Stabilization of protein structure. In: *Methods in Molecular Biology: Protein Structure Stability and Folding*, Humana Press, Totowa, New Jersey. 1-16.
- Nakakido, M.; Tanaka, Y.; Mitsuho, M.; Kudou, M.; Ejima, D.; Arakawa, T.; Tsumoto, K. (2008) Structure-based analysis reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride. *Biophysical Chemistry* **137**: 105-109.
- Noritomi, H.; Nishida, S.; Kato, S. (2007): Protease-catalyzed esterification of amino acid in water-miscible ionic liquid. *Biotechnology Letters* **29**: 1509-1512.
- Nozaki, Y. (1972): The preparation of guanidine hydrochloride. *Methods in Enzymology* **26**: 43-50.
- Nozaki, Y.; Tanford, C. (1970): The solubility of amino acids, diglycine and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *Journal of biological chemistry* **245**: 1648-1652.
- Nozaki, Y.; Tanford, C. (1963): The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. *Journal of biological chemistry* **238**: 4074-4081.
- Obukowicz, M. G.; Gustavson, M. E.; Junger, K. D.; Leimgruber, R. M.; Wittwer, A. J.; Wun, T.-C.; Warren, T. G.; Bishop, B. F.; Mathis, K. J.; McPherson, D. T.; Siegel, N. R.; Jennings, M. G.; Brightwell, B. B.; Diaz-Collier, J. A.; Bell, L. D.; Craik, C. S.; Tacon, W. C. (1990): Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 9737-9745.
- Patil, G.; Rudolph, R.; Lange, C. (2008): *In vitro*-refolding of a single-chain Fv fragment in the presence of heteroaromatic thiols. *Journal of Biotechnology* **134**: 218-221.
- Pennica, D.; Holmes, W. E.; Kohr, W. J.; Harkins, R. N.; Vehar, G. A.; Ward, C.A.; Bennett W. F.; Yelverton E.; Seeburg, P. H.; Heyneker, H. L.; Goeddel, D. V.; Collen, D. (1983): Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E.coli. *Nature* **301**: 214-221.
- Prakash, V.; Timasheff, S. N. (1981): The calculation of partial specific volumes of proteins in 8 M urea solution. *Analytical Biochemistry* **117**: 330-335.
- Pusey, M. L.; Paley, M. S.; Turner, M. B.; Rogers, R. D. (2007): Protein Crystallization Using Room Temperature Ionic Liquids. *Crystal Growth & Design* **7**: 787-793.
- Qu, Y.; Bolen, C. L.; Bolen, D. W. (1998): Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **95**: 9268-9273.
- Reddy K, R. C.; Lilie, H.; Rudolph, R.; Lange, C. (2005): L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Science* **14**: 929-935.
-

-
- Renatus, M.; Engh, R. A.; Stubbs, M. T.; Huber, R.; Fischer, S.; Kohnert, U.; Bode, W. (1997): Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO Journal* **16**: 4797-4805.
- Robinson, J. B.; Strottmann, J. M.; Stellwagen, E. (1981): Prediction of neutral salt elution profiles for affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **78**: 2287-2291.
- Rogers, R. D.; Seddon, K. R. (2003): Ionic Liquids - Solvents of the future? *Science* **302**: 792-793.
- Rudolph, R.; Böhm, G.; Lilie, H.; Jaenicke, R. (1997): Folding Proteins. In: *Protein Function: A practical approach*. Oxford University press, Oxford.
- Rudolph, R.; Fischer, S. (1990): Process for obtaining renatured proteins. *US Patent 4,933,434*.
- Rudolph, R.; Fischer, S.; Mattes, R. (1987): Verfahren zur Aktivierung von t-PA nach Expression in Prokaryonten. *Deutsches Patent, DE3537708A1*.
- Rudolph, R.; Lilie, H. (1996): *In vitro* folding of inclusion body proteins. *The FASEB Journal* **10**: 49-56.
- Saxena, V. P.; Wetlaufer, D. B. (1970): Formation of the three dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry* **9**: 5015-5023.
- Schneider, C. P.; Trout, B. L. (2009): Investigation of cosolute-protein preferential interaction coefficients: New insight into the mechanism by which arginine inhibits aggregation. *Journal of Physical Chemistry B* **113**: 2050-2058.
- Seddon, K. R. (2003): Ionic liquids: A taste of the future. *Nature Materials* **2**: 363-365.
- Sinniger, V.; Merton, R. E.; Fabregras, P.; Longstaff, C. (1999): Regulation of tissue plasminogen activator by cells. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 12414-12422.
- Stern, A.; Kohnert, U.; Rudolph, R.; Fischer, S.; Martin, U. (1990): Europäische Patentschrift zu einem Gewebs-Plasminogenaktivator Derivat. *European Patent Application 382174*.
- Stern, A.; Kohnert, U.; Rudolph, R.; Fischer, S.; Martin, U. (1993): Thrombolytically active non-glycosylated protein. *United States Patent 5.223.256*.
- Stürzebecher, J.; Neumann, U.; Kohnert, U.; Kresse, G. B.; Fischer, S. (1992): Mapping of the catalytic site of CHO-t-PA and the t-PA variant BM 06.022 by synthetic inhibitors and substrates. *Protein Science* **1**: 1007-1013.
- Summers, C. A.; Flowers, R. A. (2000): Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate. *Protein Science* **9**: 2001-2008.
- Sun, N.; Rahman, M.; Qin, Y.; Mirela, M. L.; Rodriguez, H.; Rogers, R. D. (2009): Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chemistry* **11**: 646-655.
- Tamaki, K.; Ohara, Y.; Isomura, Y. (1973): Viscosity B coefficients for some alkyl sulfates in aqueous solution. *Bulletin of chemical society of Japan* **46**: 1551-1552.
- Tamaki, K.; Suga, K.; Tanihara, E. (1987): Solution properties of dialkyl phosphate salts. Apparent molar volumes, viscosity B coefficients, heats of solution, and osmotic coefficients. *Bulletin of chemical society of Japan* **60**: 1225-1229.
- Tanaka, Y.; Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Nakanishi, T.; Yasutake, Y.; Sakai, N.; Yao, M.; Tanaka, I.; Arakawa, T.; Kumagai, I. (2004): Structural evidence for guanidine-protein side chain interactions: crystal structure of CutA from *Pyrococcus horikoshii* in 3 M guanidine hydrochloride. *Biochemical and biophysical research communications* **323**: 185-191.
-

-
- Taneja, S.; Ahmad, F. (1994): Increased thermal stability of proteins in the presence of amino acids. *Biochemical Journal* **303**: 147-153.
- Tanford, C. (1964): Isothermal unfolding of globular proteins in aqueous urea solutions. *Journal of the American Chemical Society* **86**: 2050-2059.
- Tanford, C.; Buckley, C. E.; De, P. K.; Lively, E. P. (1962): Effect of ethylene glycol on the conformation of γ -globulin and β -lactoglobulin. *Journal of biological chemistry* **237**: 1168-1171.
- Tate, K. M.; Higgins, D. L.; Holmes, W. E.; Winkler, M. E.; Heyneker, H. L.; Vehar, G. A. (1987): Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **26**: 338-343.
- Timasheff, S. N. (1992): Water as ligand: Preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry* **31**: 9857-9864.
- Timasheff, S. N. (2002): Protein hydration, thermodynamic binding, and preferential hydration. *Biochemistry* **41**: 13473-13482.
- Timasheff, S. N.; Inoue, H. (1968): Preferential binding of solvent components to proteins in mixed water-organic solvent systems. *Biochemistry* **7**: 2501-2513.
- Tischer, A. (2007): Löslichkeitsstudien am rekombinanten Plasminogenaktivator. *Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.
- Topf, A. (2010): Rekombinante Expression und Charakterisierung der Kringle 2-Domäne aus dem Plasminogenaktivator rPA. *Diplomarbeit, MLU Halle-Wittenberg*.
- Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Kumagai, I.; Ejima, D.; Arakawa, T. (2003): Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **312**: 1383-1386.
- Umetsu, M.; Tsumoto, K.; Nitta, S.; Adschiri, T.; Ejima, D.; Arakawa, T.; Kumagai, I. (2005): Nondenaturing solubilization of β 2 microglobulin from inclusion bodies by L-arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**: 189-197.
- Villalonga, R.; Cao, R.; Fragoso, A. (2006): Supramolecular Chemistry of Cyclodextrins in Enzyme Technology. *Chemical Reviews* **107**: 3088-3116.
- Walden, P. (1914): Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*: 405-422.
- Wang, A.; Bolen, D. W. (1997): A naturally occurring protective system in urea-rich cells: Mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* **36**: 9101-9108.
- Wang, X. T.; Engel, P. C. (2009): An optimised system for refolding of human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *BMC Biotechnology* **9**: 19-29.
- Wang, Z.; Dang, L.; Han, Y.; Jiang, P.; Wei, H. (2010): Crystallization Control of Thermal Stability and Morphology of Hen Egg White Lysozyme Crystals by Ionic Liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**: 5444-5448.
- Welch, W. J.; Gething, M. J.; Clarke, A. R.; Viitanen, P.; Lund, P.; Haas, I. G.; Georgopoulos, C. (1993): Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: Their roles in normal and stressed cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **339**: 327-333.
- Werner, F.; Razzaq, T. M.; Ellis, V. (1999): Tissue plasminogen activator binds to human vascular smooth muscle cells by another mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 21555-21561.
-

- Wood, D. J.; Hruska, F. E.; Saenger, W. (1977): ^1H NMR study of the inclusion of aromatic molecules in α -Cyclodextrin. *Journal of the American Chemical Society* **99**: 1735-1740.
- Wunderlich, M.; Otto, A.; Seckler, R.; Glockshuber, R. (1993): Bacterial protein disulfide isomerase: efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry* **32**: 12251-12256.
- Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D.; Somero, G. N. (1982): Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yancey, P. H.; Somero, G. N. (1979): Counteraction of urea destabilization of protein structure by Methylamine osmoregulatory compounds of Elasmobranch fishes. *Biochemical Journal* **183**: 317-323.
- Yang, Z. (2009): Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **144**: 12-22.
- Zhao, H. (2006): Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**: 877-891.
- Zhao, H.; Olubajo, O.; Song, Z.; Sims, A. L.; Person, T. E.; Lawal, R. A.; Holley, L. A. (2006): Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorganic Chemistry* **34**: 15-25.

6. Anhang

6.1 Löslichkeit von rPA, tc-rPA und CM-rPA

Tab. 6.1: Löslichkeit von rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin

Additiv (M)	lösliches rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	lösliches rPA ausgehend von aggregiertem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler
L-ArgHCl				
0	0,147	0,038	0,121	0,020
0,05	0,985	0,488	1,190	0,120
0,1	2,407	0,906	3,680	0,255
0,2	16,975	0,665	17,133	0,153
0,5	52,700	3,649	46,650	1,498
1,0	65,553	1,125	58,750	3,591
NaCl/Glycin				
0	0,121	0,023	0,121	0,023
0,05	0,223	0,026	0,176	0,010
0,1	0,442	0,087	0,452	0,031
0,2	0,986	0,132	1,035	0,057
0,5	1,796	0,300	1,829	0,034
1,0	0,861	0,022	0,791	0,048

Tab. 6.2: Löslichkeit von CM-rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin

Additiv (M)	lösliches CM-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	lösliches CM-rPA ausgehend von aggregiertem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler
L-ArgHCl				
0	0,123	0,083	0,089	0,034
0,05	0,114	0,060	0,065	0,033
0,1	0,122	0,047	0,051	0,018
0,2	0,183	0,037	0,062	0,026
0,5	0,556	0,086	0,085	0,023
1,0	2,073	0,214	0,125	0,036
NaCl/Glycin				
0	0,051	0,009	0,061	0,019
0,05	0,078	0,039	0,022	0,017
0,1	0,107	0,042	0,016	0,022
0,2	0,124	0,091	0,018	0,002
0,5	0,080	0,004	0,011	0,016
1,0	0,060	0,011	0,031	0,004

Tab. 6.3: Löslichkeit von tc-rPA in EMIMCl

Additiv (M)	lösliches tc-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	lösliches tc-rPA ausgehend von aggregiertem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
EMIMCl					
0	0,073	0,006	0,441	0,028	0
0,06	1,061	0,081	1,331	0,095	-6,384
0,12	3,034	0,038	3,286	0,228	-8,625
0,18	5,433	0,279	5,720	0,885	-9,998
0,24	7,632	0,748	7,789	0,409	-10,763
0,3	10,395	0,092	10,830	0,320	-11,580
0,4	14,030	1,019	20,163	1,962	-13,121
0,5			29,048	4,769	-14,026
0,6			40,785	9,129	-14,867
0,7			48,503	8,588	-15,297
0,8			63,790	0,750	-15,976
0,9			90,225	10,741	-16,835
1,0			130,483	13,905	-17,750

Tab. 6.4: Löslichkeit von CM-rPA in EMIMCl

Additiv (M)	lösliches CM-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	lösliches CM-rPA ausgehend von aggregiertem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler
EMIMCl				
0	0,092	0,072	0,061	
0,05	0,073	0,083	0,158	
0,1	0,032	0,039	0,093	
0,2	0,037	0,007	0,114	0,046
0,3	0,068	0,050	0,031	
0,4	0,104	0,041	0,056	
0,5	0,166	0,036	0,054	
0,6	0,316	0,040	0,090	0,067
0,8	0,481	0,072	0,128	0,097
1,0	0,593	0,125	0,128	0,181
1,5	1,148	0,038	0,179	0,228
2,0	1,542	0,224	0,212	0,300
2,5	1,268	0,206	0,110	0,105
3,0	0,782	0,363	0,122	0,173
3,5	0,167	0,236	0,143	0,203
4,0	0	0	0,131	0,186
4,5	0	0	0,024	0,034
5,0	0	0	0,042	0,059
5,5	0	0	0	0
6,0	0	0	0	0

Tab. 6.5: Löslichkeit von tc-rPA in EMIMDEP

Additiv (M)	lösliches tc-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)
EMIMDEP	
0	0,110
0,05	0,380
0,1	0,810
0,2	2,770
0,3	5,320
0,4	10,850
0,5	19,540
0,6	24,770
1,0	35,800

Tab. 6.6: Löslichkeit von CM-rPA in EMIMDEP

Additiv (M)	lösliches CM-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)
EMIMDEP	
0	0,047
0,1	0,122
0,2	0,045
0,5	0,032
1,0	0,003
1,5	0
2,0	0,047
2,5	0
3,0	0

Tab. 6.7: Löslichkeit von tc-rPA in HMIMCl

Additiv (M)	lösliches tc-rPA ausgehend von löslichem Protein (mg ml ⁻¹)	Standardfehler	lösliches tc-rPA ausgehend von aggregiertem Protein (mg ml ⁻¹)
HMIMCl			
0	0,049	0,043	0,049
0,05	0,562	0,379	0,352
0,1	1,392	0,512	0,986
0,15	2,575	1,002	1,702
0,2	2,758	0,315	3,623
0,3	6,019	0,321	6,267
0,4	14,780	2,715	11,769
0,5	17,720	2,036	22,770

6.2 Löslichkeitsmessungen mit Aminosäuren und DKP

Tab. 6.8: Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in Wasser sowie ermittelte Sättigungsdichten und Molalitäten

Aminosäure	Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)*	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)*	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)
Alanin	16,60	1,04295	1,86308
Phenylalanin	2,82	1,00528	0,17070
Leucin	2,16	1,00090	0,16465
Isoleucin	3,35	1,00345	0,25535
Valin	5,73	1,00951	0,48907
Prolin	181,50	1,19459	15,76342
Methionin	5,75	1,01340	0,38531
Tryptophan	1,33	1,01000	0,06512
Glycin	25,10	1,08302	3,34310
Serin	42,90	1,12805	4,08183
Threonin	9,73	1,02896	0,81675
Tyrosin	0,05	0,99705	0,00259
Glutamin	4,08	1,01133	0,27915
Asparagin	2,76	1,00746	0,20889
NaAspartat	77,90	1,28523	5,02257
NaGlutamat	62,40	1,21785	3,69012
Histidin	4,30	1,01206	0,27712
LysinHCl	71,30	1,12780	3,90471
ArgininHCl	68,05	1,15581	4,04841
DKP	1,68	1,00140	0,14724

(* Daten aus Liu und Bolen, 1995)

Tab. 6.9: Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M L-ArgHCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Aminosäure	Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (Seitenketten) (kJ mol ⁻¹)
Alanin	14,2	1,08960	1,59352	0,38737	-0,10706
Phenylalanin	3,52	1,06310	0,21298	-0,54846	-1,04289
Leucin	2,05	1,05810	0,15635	0,12823	-0,3662
Isoleucin	3,32	1,06080	0,25311	0,02185	-0,47258
Valin	5,41	1,06510	0,46203	0,14098	-0,35345
Prolin	151,37	1,20870	13,14617	0,45004	-0,04439
Methionin	5,78	1,06970	0,38744	-0,01367	-0,5081
Tryptophan	2,58	1,06290	0,12630	-1,64183	-2,13626
Glycin	20,56	1,12140	2,73855	0,49443	0
Serin	36,63	1,16330	3,48486	0,39192	-0,10251

Aminosäure	Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (Seitenketten) (kJ mol ⁻¹)
Threonin	9,05	1,08230	0,75944	0,18035	-0,31408
Tyrosin	0,07	1,05810	0,00410	-1,14043	-1,63486
Glutamin	4,27	1,06920	0,29191	-0,11085	-0,60528
Asparagin	3,0	1,06740	0,22675	-0,20345	-0,69788
NaAspartat	73,95	1,28150	4,76812	0,12886	-0,36557
NaGlutamat	57,5	1,22754	3,40028	0,20276	-0,29167
Histidin	5,06	1,07259	0,32599	-0,40263	-0,89706
LysinHCl	54,29	1,14806	2,97293	0,67578	0,18135
ArgininHCl	46,8	1,15581	3,03969	0,71032	0,21589
DKP	1,59	1,06051	0,13937	0,13616	

Tab. 6.10: Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M EMIMCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Aminosäure	Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (Seitenketten) (kJ mol ⁻¹)
Alanin	10,61	1,04495	1,19113	1,10879	-0,31646
Phenylalanin	2,90	1,02148	0,17551	-0,06878	-1,49402
Leucin	1,54	1,01688	0,11718	0,84291	-0,58234
Isoleucin	2,49	1,01878	0,18948	0,73954	-0,68571
Valin	4,03	1,02281	0,34436	0,86963	-0,55562
Prolin	151,22	1,18671	13,13330	0,45246	-0,97278
Methionin	4,29	1,02597	0,28715	0,72884	-0,6964
Tryptophan	3,02	1,02289	0,14801	-2,0351	-3,46035
Glycin	14,12	1,06458	1,88118	1,42524	0
Serin	27,54	1,10409	2,62014	1,09885	-0,3264
Threonin	6,21	1,03446	0,52141	1,11246	-0,31278
Tyrosin	0,085	1,01450	0,00469	-1,47408	-2,89932
Glutamin	2,88	1,02376	0,19714	0,86209	-0,56315
Asparagin	1,70	1,02078	0,12870	1,20043	-0,22481
NaAspartat	61,11	1,22383	3,93997	0,60175	-0,8235
NaGlutamat	49,16	1,17707	2,90693	0,59132	-0,83392
Histidin	3,46	1,02587	0,22286	0,54006	-0,88519
LysinHCl	50,43	1,11158	2,76167	0,85849	-0,56675
ArgininHCl	57,66	1,13568	2,73659	0,41063	-1,01461
DKP	1,42	1,01864	0,12421	0,42155	

Tab. 6.11: Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M EMIMDEP sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Aminosäure	Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (Seitenketten) (kJ mol ⁻¹)
Alanin	7,15	1,06227	0,80192	2,0895	-0,38458
Phenylalanin	1,91	1,04795	0,11546	0,96921	-1,50487
Leucin	1,07	1,04520	0,08151	1,74275	-0,73133
Isoleucin	1,54	1,04629	0,11702	1,93422	-0,53986
Valin	2,48	1,04784	0,21196	2,07249	-0,40159
Prolin	123,24	1,18573	10,70352	0,95955	-1,51453
Methionin	2,71	1,04981	0,18128	1,86891	-0,60517
Tryptophan	2,69	1,04932	0,13189	-1,74914	-4,22322
Glycin	9,25	1,07456	1,23215	2,47408	0
Serin	17,40	1,10100	1,65547	2,23692	-0,23716
Threonin	3,84	1,05481	0,32246	2,30363	-0,17045
Tyrosin	0,062	1,04331	0,00341	-0,68624	-3,16032
Glutamin	1,90	1,04906	0,12978	1,8984	-0,57568
Asparagin	1,06	1,04723	0,08034	2,3683	-0,10578
NaAspartat	38,10	1,18406	2,45622	1,77305	-0,70103
NaGlutamat	32,39	1,15513	1,91543	1,62533	-0,84875
Histidin	2,49	1,05104	0,16034	1,35616	-1,11792
LysinHCl	36,17	1,11382	1,98094	1,68208	-0,792
ArgininHCl	51,44	1,14639	2,44139	1,25362	-1,22046
DKP	1,03	1,04627	0,09019	1,21495	

Tab. 6.12: Löslichkeit von DKP in EMIMCl und NaCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Additiv- konzentration (M)	DKP-Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
EMIMCl				
1	1,42	1,01864	0,12421	0,42155
2	1,20	1,03737	0,10473	0,84438
3	0,95	1,05817	0,08350	1,40615
4	0,71	1,08035	0,06263	2,11892
5	0,54	1,10252	0,04702	2,82935
6	0,38	1,12191	0,03360	3,66227
6,7	0,24	1,13224	0,02131	4,7907

Additiv- konzentration (M)	DKP-Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
NaCl				
1	1,69	1,04338	0,14829	-0,0176
2	1,71	1,08252	0,15014	-0,04844
3	1,75	1,12015	0,15340	-0,10153
4	1,83	1,15831	0,16071	-0,21692
5	1,92	1,18893	0,16843	-0,33333

Tab. 6.13: Löslichkeit von Glycin in EMIMCl und EMIMDEP sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Additiv- konzentration (M)	Glycin-Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
EMIMCl				
1	14,12	1,06458	1,88118	1,42524
2	8,52	1,06210	1,13485	2,67798
3	3,99	1,06720	0,53079	4,56152
4	1,66	1,08159	0,22110	6,73227
EMIMDEP				
0,5	15,03	1,07218	2,00208	1,27086
1	9,25	1,07456	1,23215	2,47408
2	1,73	1,10261	0,23086	6,62516
3	0,1276	1,13257	0,01700	13,09179

Tab. 6.14: Löslichkeit von Tryptophan in EMIMCl und EMIMDEP und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Additivkonzentration (M)	Tryptophan- Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
EMIMCl			
1	3,02	0,14801	-2,03510
2	4,52	0,22144	-3,03361
3	4,81	0,23555	-3,18670
4	4,35	0,21319	-2,93956
EMIMDEP			
0,5	2,12	0,10373	-1,15387
1	2,84	0,13884	-1,87648
2	4,68	0,22935	-3,12060
3	11,20	0,54833	-5,28110

Tab. 6.15: Löslichkeit von Tryptophan in 1 M ionischer Flüssigkeiten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Additivkonzentration (M)	Tryptophan-Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
NaCl	1,14	0,05605	0,37174
BMIMCl	3,71	0,18161	-2,54208
HMIMCl	5,10	0,24981	-3,3324
OMIMCl	9,15	0,44785	-4,7794
EMIMEtSO ₄	3,21	0,15723	-2,18476
EMIMHexSO ₄	5,61	0,27463	-3,56721
EMIMMDEGSO ₄	3,34	0,16347	-2,28123
EMIMOTs	4,39	0,21497	-2,96009

Tab. 6.16: Löslichkeit von DKP in 1 M Lösungen, ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

Additiv (1 M)	DKP-Löslichkeit (g 100 g ⁻¹)	Sättigungsdichte (g cm ⁻³)	Molalität (mol kg ⁻¹ Lösung)	$\Delta G_{\text{Transfer}}$ (kJ mol ⁻¹)
Harnstoff	1,84	1,01764	0,16170	-0,23363
GuH ₂ COO	1,69	1,02871	0,14846	-0,00219
GuHBr	2,21	1,06762	0,19360	-0,68001
GuHCl	2,04	1,02918	0,17891	-0,48440
GuHF	1,57	1,02933	0,13772	0,16426
GuHI	2,60	1,10717	0,22752	-1,08021
GuHNO ₃	2,31	1,04584	0,20256	-0,79207
GuHSCN	2,84	1,03236	0,24849	-1,29872
PMIMCl	1,47	1,01623	0,12889	0,32847
BMIMCl	1,51	1,01525	0,13209	0,26765
HMIMCl	1,69	1,01225	0,14817	-0,01711
OMIMCl	1,45	1,00379	0,12704	0,36428
0,2 M OMIMCl	1,73	1,00266	0,15163	-0,00744
OH-EMIMCl	1,36	1,03322	0,11934	0,51919
OH-HMIMCl	1,42	1,02523	0,12451	0,41419
OH-EPyCl	1,47	1,03287	0,12855	0,33508
EMIMEtSO ₄	1,37	1,04424	0,12033	0,49868
EMIMOTs	1,78	1,04706	0,15567	-0,13948
EMIMMDEGSO ₄	1,33	1,04867	0,11652	0,57848
EMIMHexSO ₄	1,39	1,03463	0,12170	0,47076

6.3 Primärstruktur von rPA

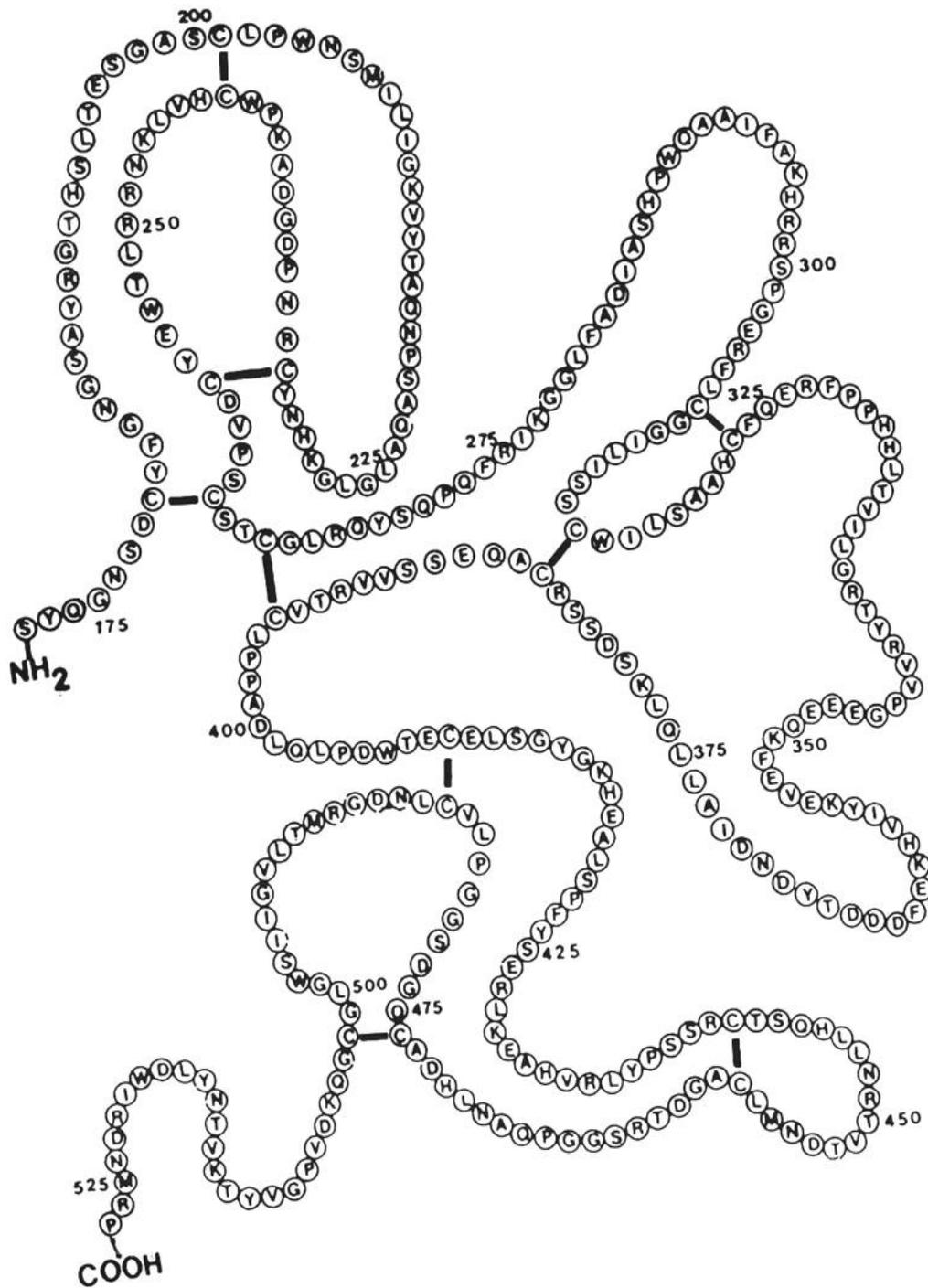


Abb. 6.1: Primärstruktur von rPA. Die Aminosäurereste wurden mit dem Einbuchstabencode bezeichnet. Disulfidbrücken sind mit (—) gekennzeichnet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Hu et al. (1994). Die Nummerierung der Aminosäuren wurde von Pennica et al. (1983) übernommen.

Ionische Flüssigkeiten:

BMIMCl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
EMIMAc	1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat
EMIMCl	1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid
EMIMDEP	1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat
EMIMEtSO ₄	1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulfat
EMIMHexSO ₄	1-Ethyl-3-methylimidazoliumhexylsulfat
EMIMMDEGSO ₄	1-Ethyl-3-methylimidazolium 2(2-methoxyethoxy)-ethylsulfat
EMIMOTs	1-Ethyl-3-methylimidazoliumtosylat
HMIMCl	1-Hexyl-3-methylimidazoliumchlorid
OH-EMIMCl	1-(2-Hydroxyethyl)-3-methylimidazoliumchlorid
OH-EPyCl	1-(2-Hydroxyethyl)-pyridiniumchlorid
OH-HMIMCl	1-(6-Hydroxyhexyl)-3-methylimidazoliumchlorid
OMIMCl	1-Octyl-3-methylimidazoliumchlorid

Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

II Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Schema der *in-vitro* Proteinrückfaltung.
- Abb. 1.2 Häufige Kationen und organische Anionen in ionischen Flüssigkeiten.
- Abb. 1.3 Ausbeuten der oxidativen Rückfaltung von rPA in ionischen Flüssigkeiten.
- Abb. 1.4 Energiediagramme für einen kinetischen Effekt und für Gleichgewichtseffekte von Lösungsmitteladditiven.
- Abb. 1.5 Schematische Darstellung des *Gap*-Effekts.
- Abb. 1.6 Interaktion von Lösungsmitteladditiven mit Proteinoberflächen.
- Abb. 1.7 Thermodynamisches Transfermodell.
- Abb. 1.8 Tertiärstrukturen der Serinproteasedomäne und der Kringel 2-Domäne.
-
- Abb. 2.1 Hydrolyse von Chromozym tPA durch rPA und tc-rPA.
- Abb. 2.2 Kalibriergeraden für die Bestimmung der Aktivität von rPA und tc-rPA.
- Abb. 2.3 Bestimmung der Löslichkeit mittels Oszillationsdensitometrie.
-
- Abb. 3.1 Rekombinante Herstellung von rPA in *E.coli* K12 C600.
- Abb. 3.2 *Inclusion body*-Präparation von rPA.
- Abb. 3.3 Oxidative Rückfaltung von rPA in Gegenwart von Lösungsmitteladditiven.
- Abb. 3.4 Denaturierungsmittel-induzierte Fluoreszenzübergänge von rPA und CM-rPA.
- Abb. 3.5 Autokatalytischer Verdau von rPA.
- Abb. 3.6 Inhibierung von rPA und Trypsin mit PMSF.
- Abb. 3.7 Effekt der Plasminspaltung auf rPA.
- Abb. 3.8 Denaturierungsmittel-induzierte Fluoreszenzübergänge von rPA und tc-rPA.
- Abb. 3.9 DSC-Kurven von rPA und tc-rPA.
- Abb. 3.10 Löslichkeit von rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin.
- Abb. 3.11 Löslichkeit von CM-rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin und Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von CM-rPA in 1M L-ArgHCl.
- Abb. 3.12 Aggregationskinetiken von CM-rPA, dr-rPA und rPA in L-ArgHCl.
- Abb. 3.13 Einfluss der Fokussierungszeit auf die Aggregation von CM-rPA.
- Abb. 3.14 Einfluss von L-ArgHCl auf die Molmassenverteilungen von CM-rPA.
- Abb. 3.15 Löslichkeitsmessungen von tc-rPA in EMIMCl und freie Energien für den Transfer aus Wasser in EMIMCl.
- Abb. 3.16 Löslichkeitskurven von CM-rPA in EMIMCl.
- Abb. 3.17 Zeitabhängigkeit der Löslichkeit von CM-rPA in 2 M EMIMCl.
- Abb. 3.18 Nah-UV-CD Spektren von tc-rPA in EMIMCl.
- Abb. 3.19 Nah-UV-CD- und Aktivitäts-Übergänge von tc-rPA in EMIMCl und GuHCl.
- Abb. 3.20 Vergleich der Nah-UV-CD-Übergänge von tc-rPA in EMIMDEP und EMIMCl.
- Abb. 3.21 ATR-FTIR-Spektren von tc-rPA in EMIMCl.

Abb. 3.22	^{13}C -NMR-Spektren, gemessen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie.
Abb. 3.23	Verlust der Renaturierbarkeit von tc-rPA durch Inkubation in 5 M und 6 M EMIMCl.
Abb. 3.24	Fluoreszenzemissionsspektren von tc-rPA, renaturiert aus dem EMIMCl-denaturierten Zustand.
Abb. 3.25	Partikelgrößenverteilungen für die Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl.
Abb. 3.26	Aggregation von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl.
Abb. 3.27	Verlust der enzymatischen Aktivität von tc-rPA in 5,4 M EMIMCl.
Abb. 3.28	TEM-Bilder von tc-rPA-Aggregaten aus 5,4 M EMIMCl.
Abb. 3.29	Aggregation von CM-rPA.
Abb. 3.30	Aggregation von tc-rPA in EMIMCl und EMIMDEP.
Abb. 3.31	Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M L-ArgHCl.
Abb. 3.32	Freie Energien für den Transfer von DKP aus Wasser in 1 M Additiv.
Abb. 3.33	Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M EMIMCl.
Abb. 3.34	Löslichkeit und freie Transferenergien von DKP in EMIMCl und NaCl.
Abb. 3.35	Freie Energien für den Transfer von Aminosäuren aus Wasser in 1 M EMIMDEP.
Abb. 3.36	Freie Energien für den Transfer von Gly und Trp aus Wasser in EMIMCl bzw. EMIMDEP.
Abb. 3.37	Trp-Löslichkeiten in ionischen Flüssigkeiten, Variation des Kations.
Abb. 3.38	Trp-Löslichkeit in ionischen Flüssigkeiten, Variation des Anions.
Abb. 3.39	Freie Transferenergien für DKP in verschiedenen Guanidinium-Salzen.
Abb. 3.40	Löslichkeiten von DKP in ionischen Flüssigkeiten.
Abb. 4.1	Nukleations-Polymerisations-Mechanismus.
Abb. 4.2	Wirkung von L-ArgHCl.
Abb. 4.3	Aufsummierung der freien Transferenergien.
Abb. 4.4	Korrelation der freien Transferenergien mit den Rückfaltungsausbeuten von rPA.
Abb. 6.1	Primärstruktur von rPA.

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Chaotropizität und Kosmotropizität von Ionen sowie Viskositäts-B-Koeffizienten
Tab. 2.1	Wichtige verwendete Chemikalien
Tab. 2.2	Verwendete ionische Flüssigkeiten
Tab. 2.3	Verwendete Enzyme und Restriktionsendonukleasen
Tab. 2.4	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide
Tab. 2.5	Verwendete Medien für die Zellanzucht
Tab. 2.6	Ausgewählte Geräte und Materialien
Tab. 2.7	Vorschrift für die Herstellung zweier diskontinuierlicher SDS-Gele

Tab. 2.8	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE
Tab. 2.9	Verwendete Extinktionskoeffizienten
Tab. 3.1	n-Werte für die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation.
Tab. 3.2	Fluoreszenzemissionsspektren und Aktivitätsmessungen von tc-rPA, renaturiert aus dem EMIMCl-denaturierten Zustand.
Tab. 6.1	Löslichkeit von rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin
Tab. 6.2	Löslichkeit von CM-rPA in L-ArgHCl und NaCl/Glycin
Tab. 6.3	Löslichkeit von tc-rPA in EMIMCl
Tab. 6.4	Löslichkeit von CM-rPA in EMIMCl
Tab. 6.5	Löslichkeit von tc-rPA in EMIMDEP
Tab. 6.6	Löslichkeit von CM-rPA in EMIMDEP
Tab. 6.7	Löslichkeit von tc-rPA in HMIMCl
Tab. 6.8	Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in Wasser sowie ermittelte Sättigungsdichten und Molalitäten
Tab. 6.9	Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M L-ArgHCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.10	Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M EMIMCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.11	Löslichkeit von Aminosäuren und DKP in 1 M EMIMDEP sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.12	Löslichkeit von DKP in EMIMCl und NaCl sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.13	Löslichkeit von Glycin in EMIMCl und EMIMDEP sowie ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.14	Löslichkeit von Tryptophan in EMIMCl und EMIMDEP und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.15	Löslichkeit von Tryptophan in 1 M ionischer Flüssigkeiten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien
Tab. 6.16	Löslichkeit von DKP in 1 M Lösungen, ermittelte Sättigungsdichten und aus den Molalitäten errechnete Transferenergien

IV Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Alexander Tischer

Geburtsdatum: 15.1.1981

Geburtsort: Halle (Saale)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Werdegang:

09.1987 – 07.1991	Grundschule der Polytechnischen Oberschule Wittekind, Halle (Saale)
08.1991 – 06.1999	Thomas-Müntzer-Gymnasium in Halle (Saale), Abschluss: Abitur
12.1999 – 12.2000	Zivildienst am Landesbildungszentrum für Körperbehinderte in Halle (Saale)
04.2001 – 09.2001	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Gasthörer am Institut für Biochemie und Biotechnologie
10.2001 – 08.2007	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Studium der Biochemie, Abschluss: Diplom-Biochemiker
07.2005 – 10.2005	Universität Liège, Belgien, Centre d'Ingénierie des Protéines : Praktikum in der Gruppe von Prof. Dr. André Matagne
09.2007 – 11.2010	Promotion am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04.2010 – 06.2010	Forschungsaufenthalt in den USA am Baylor College of Medicine, Houston (TX), Labor von Prof. Dr. Matthew Auton
seit 11.2010	wissenschaftlicher Mitarbeiter der Scil Proteins Production GmbH, Halle (Saale)

Halle an der Saale, 11.02.2011

Alexander Tischer

V Publikationen, Vorträge und Poster

Publikationen:

Buchfink, R.; Tischer, A.; Patil, G.; Rudolph, R.; Lange, C. (2010): Ionic liquids as refolding additives: Variation of the anion. *Journal of Biotechnology* **150**: 64-72.

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

Vorträge:

Tischer, A. (2009): Protein folding *in vitro*. Vortrag im Rahmen der Gesamtarbeitsbesprechung des Biowissenschaftlichen Netzwerks „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“, Halle (Saale).

Tischer, A. (2010): Recombinant Plasminogen Activator (rPA): Studies of folding, stability and solubility. Vortrag am Baylor College of Medicine, Houston, (TX).

Poster:

Tischer, A.; Patil, G.; Schröder, T.; Rudolph, R.; Lange, C. (2008): Efficient control of protein folding *in vitro*. Posterpräsentation des Forschungsclusters E, Teilprojekt 1 im Rahmen der Gesamtarbeitsbesprechung des Biowissenschaftlichen Netzwerks „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“.

Tischer, A.; Lilie, H.; Lange, C.; Rudolph, R. (2008): L-Arginine increases the solubility of folded and unfolded recombinant Plasminogen Activator (rPA). Posterpräsentation, 20. Faltertage, Wittenberg.

Tischer, A.; Neubauer, M.; Schröder, T.; Rudolph, R.; Lange, C. (2010): Efficient control of protein folding *in vitro*. Posterpräsentation des Forschungsclusters E, Teilprojekt 1 im Rahmen der Gesamtarbeitsbesprechung des Biowissenschaftlichen Netzwerks „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“.

VI Danksagung

Das Zustandekommen dieser Arbeit war nur durch die Unterstützung vieler Leute möglich. Zuallererst sei an dieser Stelle Prof. Dr. Rainer Rudolph erwähnt, welcher leider im Dezember 2009 verstarb. Ihm verdanke ich eine richtungsweisende Vorlesung und während meines Studiums einen Praktikumsaufenthalt in Liège, Belgien. Auch durfte ich meine Diplomarbeit und später meine Doktorarbeit an seinem Institut anfertigen. Ich habe in ihm einen Mentor und Förderer gesehen, welcher stetes Interesse an meiner Arbeit zeigte. Ich danke ihm dafür und werde ihn nie vergessen.

Die Betreuung meiner Doktorarbeit wurde freundlicherweise von Dr. Christian Lange übernommen, welcher mir in seiner gutmütigen, geduldigen Art stets mit Rat beistand und auch an der Korrektur dieser Arbeit maßgeblich beteiligt war.

Durch die Arbeitsplatznähe zu Dr. Hauke Lilie erhielt ich von ihm über die Jahre viel Rat und oft auch Hilfe bei praktischen Problemen sowie neue Denkanstöße. Seine pragmatische, laborerfahrene Art und Weise Probleme zu lösen, stieß bei mir regelmäßig auf sehr viel Gegenliebe.

Meinen Kollegen der Arbeitsgruppen Lilie und Lange, mit denen ich von 2006 bis 2010 das Labor teilte, danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die hilfreichen Diskussionen. Ich danke ihnen auch, dass sie mein etwas ungewöhnliches Thema bei Vorträgen in zahlreichen Montags- und Mittwochsseminaren so geduldig „ertragen“ haben.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich der Roche Diagnostics GmbH (Penzberg), welche mir auf Bitte von Prof. Dr. Rainer Rudolph eine große Menge rPA zukommen ließ. Durch diese großzügige Spende waren die vielen Löslichkeitsmessungen, die ich durchgeführt habe, überhaupt erst möglich geworden.

Mein Forschungsaufenthalt von April bis Juni 2010 in Houston, TX war mir ebenfalls durch Prof. Dr. Rainer Rudolph ermöglicht worden, indem er mich an Prof. Dr. David Wayne Bolen und Prof. Dr. Matthew Auton empfohlen hatte. Dieser Forschungsaufenthalt war wichtig für die vorliegende Arbeit, da ich von Prof. Dr. Matthew Auton in die Methodik der Transferenergiemessungen eingewiesen wurde.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Geduld und ihre Unterstützung während der letzten (dreißig) Jahre danken. Meinen langjährigen Freunden Alexander Lecke, Franziska Straube und Roland Hellmund und meiner Freundin Sandra Holtermann danke ich ebenfalls für ihre Geduld und dafür, dass sie mich in den letzten Jahren ab und zu mal aus dem Elfenbeinturm herausholten.

Dem Landesexzellenznetzwerk „Strukturen und Mechanismen der biologischen Informationsverarbeitung“ danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Doktorarbeit.

VII Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angeführten Literatur sowie der genannten Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher noch keiner Prüfungskommission zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt.

Halle an der Saale, 11.02.2011

Alexander Tischer