

# Untersuchungen zur Struktur und Faltung der Phospholipase D aus Weißkohl

Dissertation  
zum Erlangen des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von Susanne Haufe  
geb. am 11. August 1977 in Halle

Gutachter:

1. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
2. Prof. Dr. Hans Bisswanger

Halle (Saale), den 12. April 2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010156**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010156>]

# Inhaltsverzeichnis

<b>Symbole und Abkürzungen</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung und Aufgabenstellung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Teil</b>	<b>3</b>
2.1 Struktur und Faltung von Proteinen . . . . .	3
2.1.1 Der native und der denaturierte Zustand eines Proteins . . . . .	3
2.1.2 Proteinfaltung . . . . .	4
2.1.3 Faltungsintermediate und der <i>molten globule</i> Zustand . . . . .	6
2.1.4 Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen . . . . .	7
2.1.5 Proteininstabilität . . . . .	9
2.2 Phospholipase D . . . . .	11
2.2.1 Vorkommen, Regulation und Funktion der PLD . . . . .	12
2.2.2 Strukturmerkmale der PLD . . . . .	13
2.2.3 Stabilitätsuntersuchungen an PLD . . . . .	17
2.2.4 Struktur und Funktion von C2-Domänen . . . . .	17
2.2.5 PLD2 aus Weißkohl . . . . .	19
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 Materialien . . . . .	21
3.1.1 Chemikalien . . . . .	21
3.1.2 Proteine . . . . .	22
3.1.3 Oligonukleotide . . . . .	23
3.1.4 Plasmide . . . . .	23
3.1.5 <i>E. coli</i> -Stämme . . . . .	24
3.1.6 Kulturmedien . . . . .	24
3.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	25
3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese . . . . .	25
3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) . . . . .	25
3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	25
3.2.4 Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> . . . . .	26
3.2.5 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	26
3.2.6 Agarosegelelektrophorese . . . . .	26
3.2.7 DNA-Reinigung aus Agarosegelen . . . . .	26
3.2.8 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA . . . . .	26
3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	27
3.2.10 DNA-Sequenzierung . . . . .	27
3.2.11 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen . . . . .	27
3.3 Proteinchemische Methoden . . . . .	27
3.3.1 Herstellung löslicher PLD2 . . . . .	27
3.3.2 Präparation von PLD2-Fragmenten . . . . .	29
3.3.2.1 Expression von PLD2-Fragmenten . . . . .	29
3.3.2.2 Methoden zur Evaluierung der Expressionsoptimierung . . . . .	30
3.3.2.3 Reinigung von PLD2-Fragmenten . . . . .	30
3.3.2.4 Präparation der C2-Domäne aus <i>inclusion bodies</i> . . . . .	31
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	32
3.3.3.1 BCA-Test . . . . .	32
3.3.3.2 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung . . . . .	32
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	33
3.3.5 Western-Blot-Techniken . . . . .	33

3.3.6	Limitierte Proteolyse . . . . .	33
3.3.7	Bestimmung der PLD2-Aktivität . . . . .	34
3.3.7.1	Standardaktivitätstest . . . . .	34
3.3.7.2	pH-Abhängigkeit der Aktivität . . . . .	34
3.3.7.3	Einfluss von Zusätzen auf die Aktivität . . . . .	35
3.3.7.4	Kinetik der Inaktivierung anhand der Restaktivität . . . . .	35
3.3.8	Analytische Gelfiltration . . . . .	35
3.3.9	Kristallisation der PLD2 . . . . .	36
3.4	Biophysikalische Methoden . . . . .	36
3.4.1	Analytische Ultrazentrifugation . . . . .	37
3.4.2	CD-Spektroskopie . . . . .	37
3.4.3	Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	38
3.4.4	<i>Stopped-flow</i> Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	41
3.4.5	Röntgenkleinwinkelstreuung . . . . .	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	Strukturbestimmung der PLD2 . . . . .	43
4.1.1	Herstellung der PLD2 . . . . .	43
4.1.2	Röntgenkleinwinkelstreuung . . . . .	44
4.1.3	Versuche zur Kristallisation der PLD2 . . . . .	47
4.2	Herstellung und Charakterisierung von Enzymfragmenten der PLD2 . . . . .	50
4.2.1	Auswahl der Fragmente . . . . .	50
4.2.2	Auswahl und Herstellung der Expressionskonstrukte . . . . .	51
4.2.3	Herstellung der Fragmente . . . . .	55
4.2.3.1	Lösliche Expression der PLD2-Fragmente . . . . .	55
4.2.3.2	Reinigung der PLD2-Fragmente . . . . .	57
4.2.3.3	Rückfaltung aus <i>inclusion bodies</i> . . . . .	58
4.2.4	Struktur- und Stabilitätsuntersuchung der Fragmente . . . . .	60
4.3	Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen der PLD2 . . . . .	65
4.3.1	Charakterisierung der PLD2 unter Nativbedingungen . . . . .	65
4.3.1.1	Prüfung auf Assoziation und Aggregation . . . . .	65
4.3.1.2	Charakterisierung der Aktivität gegenüber PpNp . . . . .	67
4.3.1.3	UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektren . . . . .	68
4.3.1.4	Einfluss von Salzen auf die Nativ-Spektren . . . . .	70
4.3.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität und Aktivität . . . . .	72
4.3.3	Temperatur-induzierte Entfaltung . . . . .	73
4.3.3.1	Charakterisierung der irreversiblen Entfaltung . . . . .	73
4.3.3.2	Kinetischer Vergleich von Inaktivierung und Entfaltung . . . . .	74
4.3.3.3	Einfluss von Salzen auf die thermische Entfaltung . . . . .	76
4.3.4	Denaturans-induzierte Entfaltung . . . . .	77
4.3.4.1	Einfluss von Denaturanzien auf die Aktivität . . . . .	78
4.3.4.2	Beschreibung der strukturellen Übergänge . . . . .	78
4.3.4.3	Charakterisierung der teilentfalteten PLD2 . . . . .	85
4.3.4.4	Reaktivierungsversuche anhand von Doppelsprungexperimenten . . . . .	92
4.3.4.5	Kinetische Betrachtung der Denaturans-induzierten Entfaltung . . . . .	95
4.4	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	102
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>119</b>

## Symbole und Abkürzungen

A	Absorption
<i>A</i>	aggregiertes Enzym
ANS	1-Anilino-8-naphtalensulfonat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
CTAB	(N-Cetyl-N,N,N-trimethyl)-ammoniumbromid
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GSH	Glutathion, reduziert
GST	Glutathion-S-Transferase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
<i>I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub></i>	Intermediate
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
<i>N</i>	natives Enzym
NATA	<i>N</i> -Acetyl-tryptophanamid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PH-Domäne	Pleckstrin Homologie Domäne
Pipes	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)
PLD	Phospholipase(n) D
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PpNp	Phosphatidyl-p-nitrophenol
PX-Domäne	Phox Homologie Domäne
R <sub>G</sub>	Gyrationsradius (Streumassenradius)
SDS	Natriumdodecylsulfat
$\tau$	Relaxationszeit $\tau = \frac{1}{k}$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>U</i>	denaturiertes/entfaltetes Enzym
UV	Ultraviolett
(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per volume</i>

## 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Das Interesse an Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen hat in den letzten Jahren durch das vermehrte Auftreten der bovinen spongiformen Encephalopathie (BSE) und der Entdeckung weiterer durch Proteinefehlfaltung ausgelöster Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington und zahlreicher Amyloidoseformen stetig zugenommen [54, 62, 178]. Jedoch nicht nur aus medizinischer, sondern auch aus biotechnologischer Sicht ist ein tieferes Verständnis für Ursachen und Mechanismen der Proteinefehlfaltung und Aggregation ein wichtiger Schritt zur Verbesserung von Herstellung, Transport und Lagerung therapeutischer Proteine oder industriell interessanter Enzyme [34, 53, 62, 132, 178].

Phospholipase D (PLD) katalysiert die Hydrolyse bzw. Umesterung des Kopfgruppenalkohols von Phospholipiden und ist damit ein wichtiger und umweltfreundlicher Biokatalysator für die Herstellung modifizierter Phospholipide [92, 100, 226, 228, 246]. Für die Biokatalyse werden aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihrer guten Transphosphatidylierungspotenz hauptsächlich PLD aus verschiedenen *Streptomyces* Stämmen und die PLD aus Weißkohl verwendet [225, 227].

Als Grundbausteine der Lipidmembranen und Vorläufer wichtiger Signalmoleküle haben Phospholipide eine zentrale Funktion im Zellstoffwechsel. Neben ihrer Bedeutung im Phospholipidkatabolismus und in der Membrandegradation kommt der PLD bei pflanzlichen Hormon- und Stressantworten eine Hauptrolle zu [235, 236]. Eine Multigenfamilie mit 12 verschiedenen *pld*-Genen in *Arabidopsis* und bisher 16 identifizierten *pld*-Genen in Reis wird räumlich und zeitlich streng reguliert, um mit der Freisetzung des Botenstoffs Phosphatidsäure oder der Kopfgruppe Vorgänge wie Cytoskelettorganisation, Sekretion und Endocytose oder die Stressantwort auf Kälte, Trockenheit, Salz und Verwundung zu kontrollieren [59, 148, 177, 234, 235, 236]. Auch in Säugern unterliegt das Enzym komplexen Regulationsmechanismen und ist an der zellulären Signaltransduktion und dem Vesikeltransport beteiligt [65, 134, 139]. Eine geringe Stabilität der Proteine kann von der Zelle zur Kontrolle ihrer Aktivität genutzt werden, ist jedoch für die Biokatalyse *in vitro* von Nachteil, da hier nur stabile und aktive Enzyme verwendet werden können.

Bei der Identifizierung, Sequenzierung, rekombinanten Gewinnung und biochemischen Charakterisierung zweier PLD-Isoenzyme aus Weißkohl wurde festgestellt, dass die PLD2 dem aus dem Weißkohl isolierten Enzym entsprach [190, 193, 238]. Für die PLD2 war eine lösliche Expression in *Escherichia coli* möglich, die Renaturierung der in großen Mengen anfallenden *inclusion bodies* scheiterte jedoch [189].

Erste strukturelle Untersuchungen der PLD2 zeigten eine zweistufige Denaturans-induzierte Entfaltung, bei der der erste Übergang irreversibel, der zweite jedoch reversibel zu verlaufen schien [91].

Somit war die Hauptaufgabe dieser Arbeit, die PLD2 aus Weißkohl strukturell zu charakterisieren und die thermodynamische und kinetische Stabilität zu bestimmen. Anhand von Denaturans-, Temperatur- und Säure-induzierten Entfaltungskurven und deren Kinetik sollten die einzelnen Übergänge untersucht, bestimmten Strukturänderungen zugeordnet und mit der Inaktivierung verglichen werden. Die Unterschiede des reversiblen und irreversiblen Übergangs wurden durch Charakterisierung des nativen, intermediären und vollständig entfalteten Proteins sowie systematische Doppelsprungexperimente analysiert, um Ursachen für die Fehlfaltung renaturierter PLD bzw. die Irreversibilität des ersten Prozesses zu finden.

Ein möglicher Grund für das Auftreten der zwei getrennten Entfaltungsschritte ist die separate Entfaltung einzelner Proteindomänen. Dies sollte durch die Herstellung und strukturelle Charakterisierung einzelner PLD2-Fragmente verifiziert werden.

Für die aus der Pflanze isolierte PLD wird in der Literatur eine geringe Stabilität sowie eine Sensitivität gegenüber hoher Ionenstärke beschrieben [4, 123]. Anhand der Enzymaktivität sowie spektroskopischer Eigenschaften der PLD2 wurden die Ursachen für die Sensitivität gegenüber höherer Ionenstärke untersucht, wobei das für die Aktivität notwendige Calcium in die Untersuchungen mit einbezogen wurde.

Außerdem müssen Nativbedingungen definiert werden, die zum einen die Eignung der PLD2 als Katalysator verbessern, und zum anderen eine Strukturbestimmung des nativen Enzyms ermöglichen. Dazu sollte die Molekülform mittels Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht werden. Mit der Kristallisation der PLD2 könnte die Bestimmung der 3D-Struktur durch Röntgenstrukturanalyse erfolgen.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Struktur und Faltung von Proteinen

#### 2.1.1 Der native und der denaturierte Zustand eines Proteins

Ein wichtiges Dogma der Proteinfaltung ist die Annahme, dass die native Faltung unter physiologischen Bedingungen in unendlich verdünnten Lösungen das globale Minimum der freien Enthalpie eines jeden Proteins darstellt [7].

Der native Zustand eines Proteins besitzt neben der biologischen Aktivität auch eine Reihe spektroskopischer und proteinchemischer Eigenschaften, durch die er identifiziert werden kann. Insbesondere die Reste der hydrophoben Aminosäuren sind im Inneren verborgen [181], so dass ein sehr kompaktes Molekül entsteht, welches z. B. durch einen kleinen Gyrationradius, geringe Zugänglichkeit aromatischer Aminosäuren und/oder eine begrenzte proteolytische Angreifbarkeit gekennzeichnet ist [57, 96, 195]. Spezifische und kooperative Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten führen zu definierten Sekundär- und Tertiärstrukturen, wodurch für den nativen Zustand eines Proteins charakteristische Fluoreszenz- und Circular dichroismus (CD)-Spektren (Nah- und Fern-UV) gemessen werden [107, 191]. Die räumliche Lage des Proteinrückgrats und der einzelnen Seitenketten ist festgelegt und kann mittels Röntgenstrukturanalyse oder Kernmagnetischer Resonanz (NMR) bestimmt werden [68]. Der Hauptteil der austauschbaren Amid-Protonen der Polypeptidkette ist im Inneren verborgen und/oder an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, so dass diese bei H/D-Austauschexperimenten mittels NMR geschützt sind [68, 146].

Die Denaturierung eines Proteins kann auf sehr unterschiedliche Weise erfolgen [68, 201]. Unter Solvensdenaturierung versteht man die präferenzielle Bindung von z. B. Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) an das Protein im denaturierten Zustand, so dass dieser durch die Solubilisierung stabilisiert wird. Weiterhin denaturieren Proteine bei sehr hohen oder niedrigen pH-Werten. Die Ursache dafür liegt auch in den veränderten  $pK_a$ -Werten verborgener Aminosäureseitenketten im nativen Enzym. Die  $pK_a$ -Werte im entfalteten Protein ähneln jedoch denen freier Aminosäuren. Die Protonierung oder Deprotonierung der funktionellen Gruppen verändert die nativen Wechselwirkungen, und dieser Effekt wird durch die Verschiebung des  $pK_a$ -Wertes weiter verstärkt. Die gegenüber dem nativen Zustand deutlich größere Entropie des denaturierten Zustands führt mit steigender Temperatur zu dessen Stabilisierung ( $-T \cdot \Delta S$ ). Durch die zunehmende Strukturierung des Lösungsmittels bei nied-

rigeren Temperaturen wird die Solvatisierung hydrophober Seitenketten entropisch möglich, so dass Proteine ebenfalls bei Kälte denaturieren [68, 201].

Der denaturierte Zustand eines Proteins stellt ein Gemisch vieler verschiedener Konformationen dar [50], dessen Eigenschaften extrem von den jeweiligen Lösungsbedingungen abhängen. Der als Pendant zum gefalteten Protein betrachtete *random coil*, in dem alle Seitenketten frei beweglich und nahezu vollständig vom Lösungsmittel solvatisiert sind, wird nur unter stark denaturierenden Bedingungen erreicht [201]. Bei einigen Proteinen können selbst bei 6 M GdnHCl oder 9 M Harnstoff noch Reststrukturen detektiert werden (Beispiele in [50]). Unter physiologischen oder mild denaturierenden Bedingungen ist der denaturierte Zustand eines Proteins relativ kompakt und weist beträchtliche Anteile an Sekundärstruktur auf; die jeweiligen Wechselwirkungen sind jedoch flexibel und dynamisch [155, 208]. Da die Eigenschaften eines denaturierten Proteins variieren, kann dieses somit am besten durch den Vergleich mit dem nativen Zustand und dem *random coil* Zustand charakterisiert werden.

In dieser Arbeit soll der Begriff Entfaltung für strukturelle Änderungen verwendet werden, die unter denaturierenden Bedingungen auftreten, spektroskopisch messbar sind und unter stark denaturierenden Bedingungen zu einem *random coil* führen. Unter Denaturierung werden Vorgänge zusammengefasst, die zu Entfaltung und/oder Aggregation unter Verlust der Aktivität führen.

Die thermodynamische Stabilität eines Proteins entspricht der Energiedifferenz zwischen dem nativen und dem denaturierten Zustand des Proteins. Aminosäureaustausche, die zu geringen Änderungen der nativen Struktur führen, können trotzdem großen Einfluss auf die Stabilität eines Proteins haben, je nachdem ob sie den denaturierten Zustand des Proteins stabilisieren oder destabilisieren [201]. Umgekehrt kann die Stabilität des Proteins unverändert sein, obwohl der Austausch zu Änderungen in der nativen Struktur führt.

### 2.1.2 Proteinfaltung

Anfinsen und Mitarbeiter [7] zeigten, dass allein die Aminosäuresequenz die dreidimensionale, native Struktur eines Proteins determiniert. Neben diesem wichtigen Grundsatz der Proteinfaltung sind jedoch die Fragen, wie und warum ein Protein zu einer bestimmten Struktur faltet, und ob sich diese vorhersagen lässt, noch nicht vollständig geklärt [54]. Für eine Polypeptidkette von 100 Aminosäuren würde die statistische Suche durch alle möglichen Konformationen etwa  $10^{52}$  Jahre dauern, weshalb Levinthal „Wege“ für die Proteinfaltung vorschlug [130].



Ausgehend von dem komplexen Gemisch des denaturierten Zustands ist das Ziel der Proteinfaltungsreaktion die native Struktur eines Proteins. Diese wird durch eine Vielzahl nichtkovalenter Wechselwirkungen wie hydrophobe, elektrostatische und van-der-Waals Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert [49]. Diesen Kräften wirkt die Verringerung der Entropie durch Einschränkung des Konformationsraums im gefalteten Protein entgegen [49]. Deshalb destabilisieren Disulfidbrücken meist den denaturierten Zustand eines Proteins und begünstigen somit den nativen Zustand [55].

Unter für die Rückfaltung günstigen Bedingungen kollabiert die Polypeptidkette schnell zu einem kompakten Knäuel. Infolge dieses Kollaps sind die hydrophoben Seitenketten im Inneren verborgen, wobei sich noch keine spezifischen Kontakte ausgebildet haben. Im Weiteren kommt es durch die Interaktion benachbarter Aminosäuren zur Bildung definierter Sekundärstrukturelemente, die u. a. durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Cluster stabilisiert werden. Der langsame Schritt der Faltung entspricht dabei der initialen Bildung eines Faltungskerns, der bereits eine Reihe nativ-ähnlicher Kontakte aufweist. Ausgehend von diesem Nukleus schreitet die Faltung rasch voran, so dass eine Kinetik erster Ordnung gemessen werden kann. Je instabiler das Protein ist, desto mehr nativ-ähnliche Kontakte werden für die Bildung des Übergangszustands benötigt und um so langsamer ist der Faltungsvorgang. Mit zunehmender Größe des Proteins wird der Vorgang komplizierter, da z. B. Faltungskerne für mehrere Domänen des Proteins notwendig sind oder bereits gebildete falsche Strukturen für einen erfolgreichen Faltungsprozess wieder aufgelöst werden müssen. Dabei kann eine komplexe Faltungskinetik mit mehreren Phasen entstehen.

Dieses allgemeine Szenario des Faltungsvorgangs entstand aus Simulationen und experimentellen Daten [24, 49, 54, 55, 160]. Ob sich Sekundärstrukturelemente bereits vor dem hydrophoben Kollaps bilden, Domänen parallel oder sequenziell falten, inwieweit die Seitenketten die Topologie bestimmen oder erst durch diese ihre Packung erhalten und welche speziellen Wechselwirkungen während der Faltung für die Bildung der nativen Struktur verantwortlich sind, kann und sollte für jedes Protein anders sein.

Der native Zustand eines Proteins ist gegenüber dem denaturierten Zustand nur vergleichsweise wenig stabilisiert (20 bis 60 kJ·mol<sup>-1</sup>, [68, 152]). Dieser Wert ist die Differenz zweier großer Energiebeträge. Dem Energie- und Entropiegewinn durch die intramolekularen Wechselwirkungen und dem Verbergen hydrophober Reste im Inneren des Proteins steht ein großer Entropieverlust durch die Beschränkung der Beweg-

lichkeit der freien Reste und des Proteinrückgrats gegenüber [49]. Die energetischen Zusammenhänge der Proteinfaltungsreaktion können z. B. durch Energieflächendiagramme oder Faltungstrichter dargestellt werden [51, 160]. Das Levinthal-Paradoxon wird umgangen, indem das Protein durch stabilisierende Wechselwirkungen immer weiter in für die Faltung produktive Konformationen gelenkt wird. Während des Faltungsprozesses kommt es somit zu einer fortschreitenden Beschränkung des Konformationsraums.

In einem *in vitro* Faltungsexperiment wird das gesamte Proteinmolekül denaturiert und anschließend renaturiert. Bei der zellulären Translation am Ribosom werden die Proteine jedoch vom N- zum C-Terminus synthetisiert und könnten somit sequenziell falten. Die um den Faktor 10 schnellere bakterielle Proteinbiosynthese begünstigt aber die post-translationale Faltung, wohingegen insbesondere eukaryontische Mehrdomänenproteine meist co-translational falten [154].

### 2.1.3 Faltungsintermediate und der *molten globule* Zustand

Wie in 2.1.2 ausgeführt, ist die Proteinfaltung keine zufällige Suche nach der richtigen Konformation. Vielmehr wird die Polypeptidkette durch eine Reihe zunehmend strukturierter Intermediate zur nativen Konformation gelenkt. Die immer zahlreicheren Beobachtungen von transienten oder Gleichgewichtsintermediaten, die sich vom kompakten Zustand des denaturierten Proteins und vom nativen Protein unterscheiden, führen zu der Annahme, dass Proteine unter bestimmten Bedingungen Faltungsintermediate bilden. Diese können sequenziell oder durch alternative Faltungswege auftreten. Diskrete Faltungsintermediate sind durch eine Energiebarriere vom nativen und denaturierten Zustand getrennt. Neben produktiven Intermediaten (*on-pathway*) wurde außerdem die Existenz von *off-pathway* Intermediaten gezeigt, die nur durch Reorganisation zur nativen Struktur gelangen können [69, 112, 172, 180]. Alternative Faltungswege entstehen durch die notwendige Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen, welche im denaturierten Zustand zu 30 % in der *cis*- und zu 70 % in der *trans*-Konfiguration vorliegen. Im nativen Zustand eines Proteins wird für jede Peptidyl-Prolyl-Bindung jedoch jeweils nur eine Konfiguration (*cis* oder *trans*) nachgewiesen [14]. Bei der Faltung reduktiv entfalteter disulfidverbrückter Proteine können zum einen falsch verbrückte *off-pathway* Intermediate und zum anderen *on-pathway* Intermediate entstehen, die bereits eine oder mehrere native Disulfidbrücken enthalten [38].

Zur strukturellen Charakterisierung von Faltungsintermediaten werden unterschiedliche Techniken verwendet. Spezifische Interaktionen werden anhand von Mutatio-

nen und Fluoreszenzsonden identifiziert [37, 98]. H/D-Austauschexperimente mittels NMR zeigen Bereiche stabiler Sekundärstrukturkontakte auf [36, 146]. Die CD-Spektroskopie gibt Informationen über die Sekundär- und Tertiärstruktur [107]. Die Kompaktheit der unterschiedlichen Faltungsintermediate ist mittels *stopped-flow* Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmbar [195]. Besonders flexible Bereiche können u. U. durch limitierte Proteolyse lokalisiert werden [73].

Im Gegensatz zum kondensierten denaturierten Zustand bilden sich in Faltungsintermediaten bereits spezifische Interaktionen aus, auch wenn weiterhin dynamische Bereiche vorhanden sind. In frühen Intermediaten können auch nicht-native Wechselwirkungen nachgewiesen werden [29]. Je später das Intermediat im Faltungsvorgang auftritt, desto stärker weist es nativ-ähnliche Eigenschaften auf.

Durch die detaillierte Untersuchung der Eigenschaften von kinetischen und Gleichgewichtsintermediaten konnten diese in Beziehung gesetzt werden. Dabei zeigt sich, dass unter definierten Bedingungen bestimmte transiente Intermediate äquivalent zu Gleichgewichtsintermediaten sind. Insbesondere der als *molten globule* bezeichnete Zustand wird als ein generelles Intermediat bei der Proteinfaltung diskutiert [120, 176].

Der *molten globule* Zustand ist eine intermediäre Konformation, die von vielen globulären Proteinen unter mild denaturierenden Bedingungen eingenommen wird [120, 175]. Trotz des wesentlichen Gehalts an Sekundärstruktur fehlen die meisten spezifischen Tertiärkontakte und eine feste Packung der Seitenketten. Locker gepackte hydrophobe Bereiche des Moleküls sind lösungsmittelzugänglich und können durch Bindungsexperimente mit dem hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS) detektiert werden. Das Molekül ist bereits kompakt, wobei der Radius nur um 10 bis 30 % gegenüber dem nativen Zustand vergrößert ist. Der *molten globule* Zustand ist heterogen und dynamisch; seine Stabilität kann bei verschiedenen Proteinen stark variieren.

#### 2.1.4 Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen

Aggregation von Proteinen tritt *in vivo* und *in vitro* hauptsächlich infolge von Proteinfehlfaltungsprozessen auf, die durch Mutationen, post-translationale Modifizierungen oder Milieuveränderungen (Temperatur, pH-Wert) verursacht werden. Wenn gleich sie bei der Überexpression von rekombinanten Proteinen in Form von *inclusion bodies* erwünscht sein kann [35], führt insbesondere die Ablagerung von Aggregaten im menschlichen oder tierischen Körper zu einer Reihe von tödlichen Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Rinderwahnsinn und der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit [54, 62].

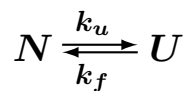
Neben diesen medizinischen Konsequenzen der Proteinaggregation sind Verluste bei Herstellung, Transport und Lagerung therapeutischer und industrieller Proteine eher von wirtschaftlicher Bedeutung [34, 132, 178].

Im vollständig entfalteten Protein sind die hydrophoben Seitenketten über das gesamte Molekül verteilt und diese ist daher nicht die zur Aggregation neigende Proteinspezies. Im Gegensatz dazu fallen native Proteine reversibel durch Aussalzen oder an ihrem isoelektrischen Punkt aus. Vielmehr aggregieren also Faltungsintermediate. Da verschiedene Aggregatformen eines Proteins die gleichen Sekundärstrukturanteile haben, wird angenommen, dass für die Aggregation jeweils ein spezifisches Faltungsintermediat verantwortlich ist [70]. Für ein Protein scheinen sich aus dem gleichen Faltungsintermediat *in vitro* Aggregate bei der Renaturierung (Faltung) bzw. thermischen Denaturierung (Entfaltung) oder *in vivo inclusion bodies* zu bilden [144, 145, 210]. Der nativ-ähnliche Sekundärstrukturanteil von Aggregaten liegt meist zwischen 50 und 70 %, wobei man oft einen höheren relativen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen auffindet und der  $\alpha$ -helikale Anteil abnimmt [70]. Hochmolekulare Aggregate können eine sehr regelmäßige Struktur aufweisen. Die häufig auftretenden und durch unterschiedlichste Proteine gebildeten Amyloidfibrillen bestehen ausschließlich aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die helikal verdrillt sind [53, 222]. Die Aggregation von Faltungsintermediaten kann zudem weitere Sekundärstrukturen induzieren [229]. Aggregation entsteht durch spezifische intermolekulare Interaktionen, z. B. zwischen exponierten hydrophoben Bereichen der Faltungsintermediate, die im nativen Protein im Inneren verborgen sind. Die Aggregationsneigung eines Proteins wird allein durch seine Aminosäuresequenz bestimmt [70]. Beeinflussen Mutationen die Lebensdauer oder Stabilität der Faltungsintermediate, so verändern sie die Aggregationsanfälligkeit des Proteins [145]. Dabei zeigen z. B. Punktmutationen *in vivo* die gleichen Effekte bei der *inclusion body* Bildung wie *in vitro* bei der Renaturierung [240]. Die thermodynamische Stabilität des nativen Proteins ist dabei von geringerer Bedeutung. Neben den durch die Sequenz bestimmten Eigenschaften der Polypeptidkette beeinflussen Faktoren wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und die Anwesenheit von Cosolvenzien die Ladung des Moleküls oder die Stärke der Wechselwirkungen und damit die Aggregation [70]. Liganden, die die Bildung des nativen Zustands beschleunigen, können die Aggregation verringern [70]. Je länger die Lebensdauer eines Faltungsintermediats ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Aggregationskeim bilden kann. Unter schwach destabilisierenden Bedingungen zu Beginn der Übergangsbereiche entstehen Faltungsintermediate in hohen Konzentrationen, so dass hier die Aggregation besonders stark begünstigt wird [70].

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Proteinkonzentration, da die Aggregation eine Reaktion höherer Ordnung ist. Nach einer initialen *lag*-Phase schreitet die Aggregation in einer exponentiellen Wachstumsphase schnell voran [45]. Dies deutet auf einen Nukleations-Polymerisations-Mechanismus hin [70]. Dabei ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, die Bildung des Nukleationskeims, wie auch die Polymerbildung bisher noch nicht vollständig verstanden. Die Aggregation stellt eine Konkurrenzreaktion zur Proteinfaltung dar. Nur in unendlich verdünnter Proteinlösung ist Aggregation ausgeschlossen. In der Zelle liegt die Konzentration an Makromolekülen bei über  $300 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  [60]. Osmolyte, Chaperone und Faltungshelfer binden an unvollständig oder fehlgefaltete Polypeptidketten und verhindern dadurch deren Aggregation [129]. Die Bildung von *inclusion bodies* bei der Überexpression kann durch die nicht ausreichend vorhandenen Chaperone verursacht werden [70]. Sie wird aber auch als ein Schutzmechanismus der Zelle bei Hitzestress diskutiert [138]. *In vivo* und *in vitro* entstehen Aggregationskeime, wenn die Löslichkeit des Intermediats überschritten wird. Die Aggregation scheint irreversibel, dies ist aber auf die langsame Dissoziationsgeschwindigkeit zurückzuführen, da das Gleichgewicht stark auf der Seite der Aggregate liegt [44, 70].

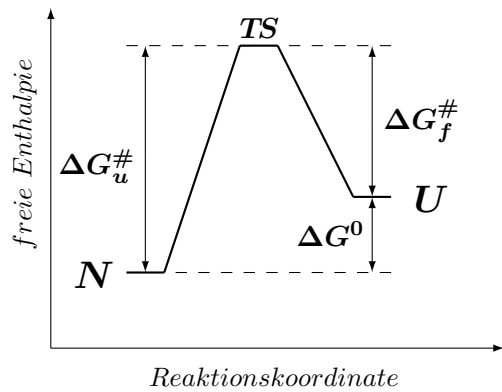
### 2.1.5 Proteinstabilität

Die Stabilität eines Proteins beschreibt dessen Fähigkeit, trotz denaturierender Einflüsse seine native Struktur aufrechtzuerhalten. Dabei unterscheidet man insbesondere zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität. Die thermodynamische Stabilität  $\Delta G^0$  entspricht der Differenz der freien Enthalpie des nativen ( $N$ ) und des entfalteten Zustands des Proteins ( $U$ ) und setzt ein reversibles Gleichgewicht voraus (Zweizustandsmodell) (Abb. 2.1).



Die kinetische Stabilität beschreibt die Energiebarriere zwischen nativem Zustand und Übergangszustand und entspricht der freien Aktivierungsenthalpie der Entfaltung  $\Delta G_u^\ddagger$  (Abb. 2.1). Für das Zweizustandsmodell ergibt sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Faltung und Entfaltung eine Gleichgewichtskonstante  $K = \frac{k_u}{k_f}$ , die die Berechnung der freien Enthalpie  $\Delta G^0$  nach Gleichung 1 ermöglicht ( $T$  – Temperatur).

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \cdot \ln K \tag{1}$$



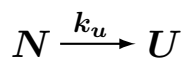
**Abbildung 2.1:** Energieschema eines Proteins unter nativen Bedingungen.

Das Energieprofil gilt für die Faltung nach einem reversiblen Zweizustandsmodell.  $N$  – nativer Zustand,  $TS$  – Übergangszustand,  $U$  – entfalteter Zustand,  $\Delta G^0$  – freie Enthalpie,  $\Delta G_f^\#$  bzw.  $\Delta G_u^\#$  – freie Aktivierungsenthalpie der Faltung bzw. Entfaltung.

Die freie Enthalpie  $\Delta G^0$  wird auch als Gibbs'sche Freie Enthalpie oder Gibbs-Energie bezeichnet und setzt sich aus der Reaktionsentropie ( $\Delta S^0$ ) und der Reaktionsenthalpie ( $\Delta H^0$ ) des Systems zusammen (Gleichung 2).

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (2)$$

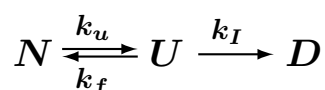
Betrachtet man nun jedoch ein System, bei dem die Rückfaltung nicht möglich ist,



so kann nur die Entfaltungskinetik betrachtet werden. Dabei entspricht die beobachtete Geschwindigkeitskonstante  $k_{obs}$  direkt  $k_u$  und die kinetische Stabilität berechnet sich nach Gleichung 3 ( $h$  – Plancksches Wirkungsquantum,  $k_b$  – Boltzmann-Konstante).

$$\Delta G_u^\# = -R \cdot T \cdot \ln \left( \frac{k_u \cdot h}{k_b \cdot T} \right) \quad (3)$$

Abweichungen vom Zweizustandsmodell können bei der Proteinfaltung durch das Vorkommen von Faltungsintermediaten (2.1.3) und/oder irreversibler Prozesse auftreten. Beispiele für irreversible Prozesse können u. a. Aggregation, Fehlfaltung oder proteolytischer Abbau sein. Ein irreversibler Prozess wird allgemein nach folgendem Schema beschrieben ( $D$  – Endzustand,  $k_I$  – Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Reaktion).

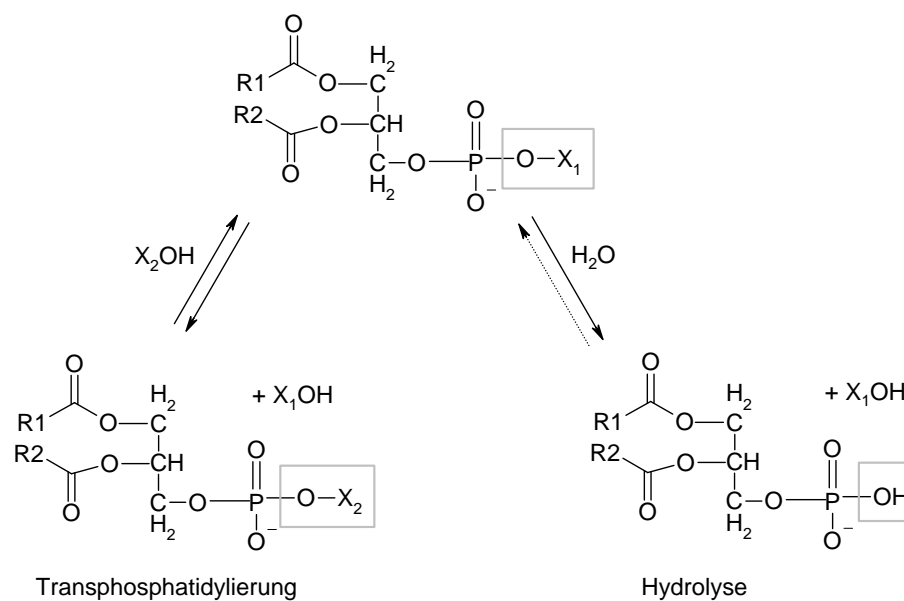


Das Gleichgewicht kann sich nicht einstellen, da ihm durch die nachgeschaltete Reaktion zu  $D$  kontinuierlich  $U$  entzogen wird. Trifft  $k_I \gg k_f$  zu, so ist  $k_u$  geschwindigkeitsbestimmend. Für den Entfaltungsprozess kann dann die kinetische Stabilität nach Gleichung 3 ermittelt werden [249].

## 2.2 Phospholipase D

Phospholipasen sind in der Natur für die enzymatische Spaltung der Esterbindungen in Phospholipiden verantwortlich. Phospholipase D (EC 3.1.4.4) katalysiert die Hydrolyse oder Umesterung der terminalen Phosphodiesterbindung der Glycerophospholipide (Abb. 2.2). Gerade die auch als Transphosphatidylierung bezeichnete Umesterung unterscheidet die PLD von anderen Phospholipasen, die gewöhnlich nur die Hydrolyse katalysieren [225]. Die Transphosphatidylierung durch PLD konnte bisher noch nicht *in vivo* nachgewiesen werden, findet jedoch *in vitro* in Gegenwart von geeigneten primären und sekundären Alkoholen als Konkurrenzreaktion der Hydrolyse statt [92, 246]. Sie wird in der Industrie zur gezielten Herstellung spezieller oder modifizierter Phospholipide eingesetzt [225].

Für die Umesterung wurde früher hauptsächlich PLD aus Weißkohl verwendet. Bei einigen mikrobiellen PLD ist jedoch das Verhältnis der Transphosphatidylierungsrate gegenüber der Hydrolyserate günstiger, so dass industriell heute meist PLD aus verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen eingesetzt werden. Obwohl die bakteriellen PLD ein breiteres Substratspektrum haben, ermöglicht die Weißkohl PLD die Herstellung modifizierter Phospholipide, die sich nicht vom Glycerolgrundgerüst herleiten [225]. Als Beispiel kann hier die Umesterung von Alkylphosphateestern genannt werden [12], für die eine cytostatische Wirkung nachgewiesen wurde. Eine deutliche Verbesserung der Umesterungsrate bzw. eine Verdrängung der Hydrolysereaktion der Weißkohl PLD durch Protein *engineering* gelang bisher nicht [128].



**Abbildung 2.2:** Hydrolyse und Transphosphatidylierung von Phospholipiden durch PLD.

R1 bzw. R2 sind gesättigte oder ungesättigte Alkylreste. X<sub>1</sub>OH und X<sub>2</sub>OH bezeichnen primäre oder sekundäre Alkohole wie Cholin, Glycerol, Inositol oder Serin.

### 2.2.1 Vorkommen, Regulation und Funktion der PLD

PLD ist ein weit verbreitetes Enzym, das in Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen nachgewiesen werden konnte [139]. Zunächst erfolgte der Nachweis und die Untersuchung der PLD-Aktivität im Gewebe, wobei auch erste Anreicherungen der betreffenden Proteine gelangen. Die Erforschung der PLD wurde mit der Isolierung der ersten PLD-Sequenz aus Rizinus 1994 [237] stark vorangetrieben. Innerhalb kürzester Zeit wurden aus verschiedensten Organismen die entsprechenden *pld*-codierenden Bereiche isoliert und sequenziert, um die Gene und Proteine zu charakterisieren [139]. Die zunehmende Anzahl an aufgedeckten Prozessen, bei denen die PLD aktiviert wird und/oder eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung besitzt, zeigt die Bedeutung der PLD im Zellstoffwechsel [236].

In Säugern wurden in nahezu allen Geweben zwei Isoenzyme (PLD1 und PLD2) in verschiedenen Spleißvarianten gefunden [143]. Während die streng regulierte PLD1 hauptsächlich an den Membranen des Golgi-Apparats und des Endoplasmatischen Retikulums vorkommt, zeigte sich die eher konstitutiv exprimierte PLD2 meist plasmamembranassoziiert. Beide Proteine sind im Grundzustand palmyliert und an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert [65]. Die Aktivität der Proteine wird u. a. durch Proteinkinase C, Ölsäure,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, verschiedene Phosphatidylinositolphosphate und eine Reihe von monomeren G-Proteinen (Rho, Arf) reguliert [139]. PLD scheint im Zellstoffwechsel beim Vesikeltransport für die strukturelle Integrität der Membran verantwortlich zu sein. Weitere Funktionen betreffen Exocytose, Apoptose, Cytoskelettorganisation und zelluläre Regulation [139]. Für letztere wird das Produkt der PLD-Reaktion (Phosphatidsäure) als intrazellulärer Botenstoff diskutiert [134].

In verschiedenen Hefen wurden zwei unterschiedliche PLD gefunden [134]. Das eine Enzym ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, besitzt nur eine Hydrolyseaktivität und gehört nicht zur PLD-Superfamilie (2.2.2). Das andere Enzym ist  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig, benötigt aber Phosphatidylinositolphosphat für beide Aktivitäten (Hydrolyse und Transphosphatidylierung) und wird im Cytoplasma nachgewiesen. Es ist für die Sporulation und Meiose essenziell und dann mit Spindelpolkörper und Sporenmembran assoziiert [134]. Die bakteriellen Enzyme kommen bei verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen extrazellulär vor [28, 89].

Die Analyse der kompletten Sequenzdaten von *Arabidopsis* und Reis zeigte eine große PLD-Isoenzymvielfalt (12 in *A. thaliana*, 16 in Reis) [59, 177]. Die pflanzlichen PLD wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige, konventionelle  $\text{PLD}\alpha$ , mikromolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen



und Phosphatidylinositol benötigende PLD $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , sowie Ca<sup>2+</sup>-unabhängige PLD $\zeta$  eingeteilt [177]. Insbesondere die Aktivität pflanzlicher PLD $\alpha$  wird durch die Anwesenheit von Phosphatidylinositolphosphaten, die Lipidvesikelzusammensetzung, die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und den pH-Wert moduliert [166]. Intrazellulär kann PLD im Cytosol oder membranständig nachgewiesen werden [234]. Einige Isoenzyme wurden in speziellen Organellen nachgewiesen, z. B. PLD4 und 5 aus Reis in Chloroplasten [140]. Neben den oben genannten Effektoren werden die PLD über die Expression und die intrazelluläre Lokalisierung streng reguliert. In *Arabidopsis* kommt PLD $\alpha$  in nahezu allen Geweben und Entwicklungsstadien vor, PLD $\gamma$  wurde nur in einigen Organen, z. B. in Blüten und alternden Blättern, gefunden. PLD $\beta$  konnte in den Pflanzen nur auf mRNA-Ebene detektiert werden [66].

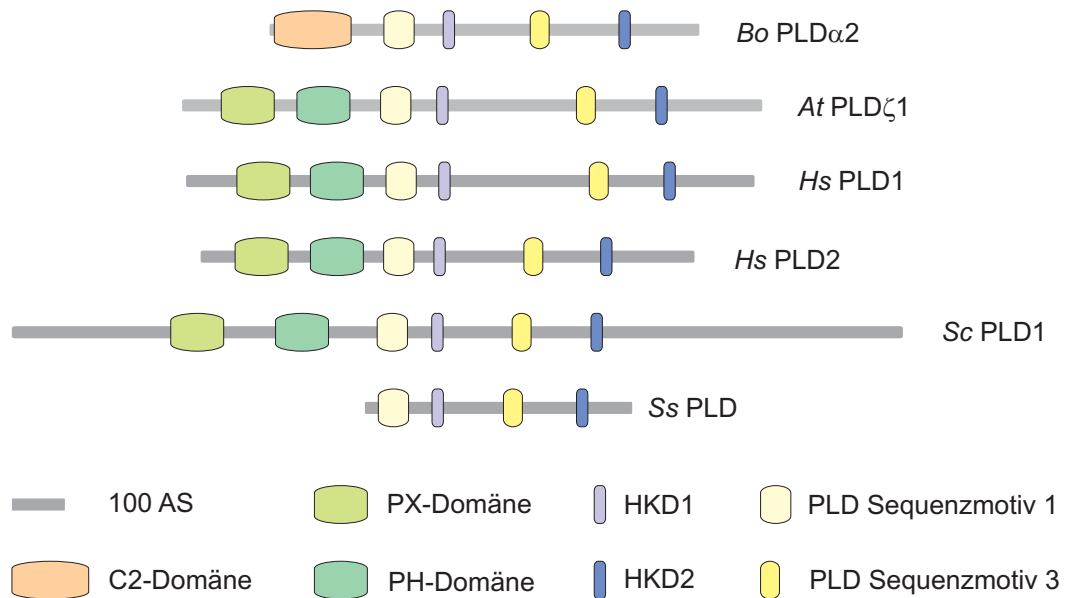
In Pflanzen wird PLD bei Verwundung durch Pathogenbefall, Tierfraß, Trockenheit oder Kälte aktiviert und ist an der nachfolgenden Lipiddegradation beteiligt [234]. Phosphatidsäure, das Produkt der PLD-Hydrolyse, wurde auch in Pflanzen als sekundärer Botenstoff identifiziert [148]. Bei Stress oder durch die Phytohormone Abscisinsäure und Ethylen wird in der Zelle PLD aktiviert und so Phosphatidsäure gebildet. Diese wiederum aktiviert u. a. Proteinkinasen und Phosphatasen [250]. So ist PLD direkt bei der Abscisinsäure-vermittelten Öffnung der Stomata beteiligt [250]. Desweiteren spielen PLD-Aktivierung und Phosphatidsäurebildung u. a. bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion und bei Wachstums- und Seneszenzprozessen eine wichtige Rolle [234].

### 2.2.2 Strukturmerkmale der PLD

Die Sequenzen aller eukaryontischen und bakteriellen *pld*-Gene, die Proteine mit Hydrolyse- und Transphosphatidylierungsaktivität kodieren, gehören zu der sogenannten PLD-Superfamilie [169]. Diese beinhaltet neben den PLD u. a. Phosphatidylserin-Synthasen, Endonukleasen und bakterielle Cardiolipin-Synthasen.

#### PLD-Superfamilie

Alle PLD-Vertreter enthalten vier konservierte Sequenzbereiche (Abb. 2.3). Über die Funktion der PLD-spezifischen Sequenzmotive eins und drei ist bisher wenig bekannt. Die Sequenzmotive zwei und vier enthalten jeweils die für alle Mitglieder der PLD-Superfamilie spezifische Sequenz HXX(X)<sub>4</sub>D(X)<sub>6</sub>GG/S und werden als HKD-Motive bezeichnet [139]. Neben diesen Sequenzbereichen bestehen keine signifikanten Sequenzhomologien zwischen den PLD aus Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien.



**Abbildung 2.3:** Strukturmodule ausgewählter PLD.

Die anhand von Sequenzvergleichen vorhergesagten Domänen und die PLD-spezifischen Sequenzmotive werden entsprechend ihrer Lage und Größe dargestellt. *Bo* – *Brassica oleracea*, *At* – *Arabidopsis thaliana*, *Hs* – *Homo sapiens*, *Sc* – *Saccharomyces cerevisiae*, *Ss* – *Streptomyces species*. Genbank-Accessionnummern: *Bo* PLD $\alpha$ 2 (P55939), *At* PLD $\zeta$ 1 (AF411833), *Hs* PLD1 (Q13393), *Hs* PLD2 (NP002654), *Sc* PLD1 (NP012956), *Ss* PLD (1V0YA).

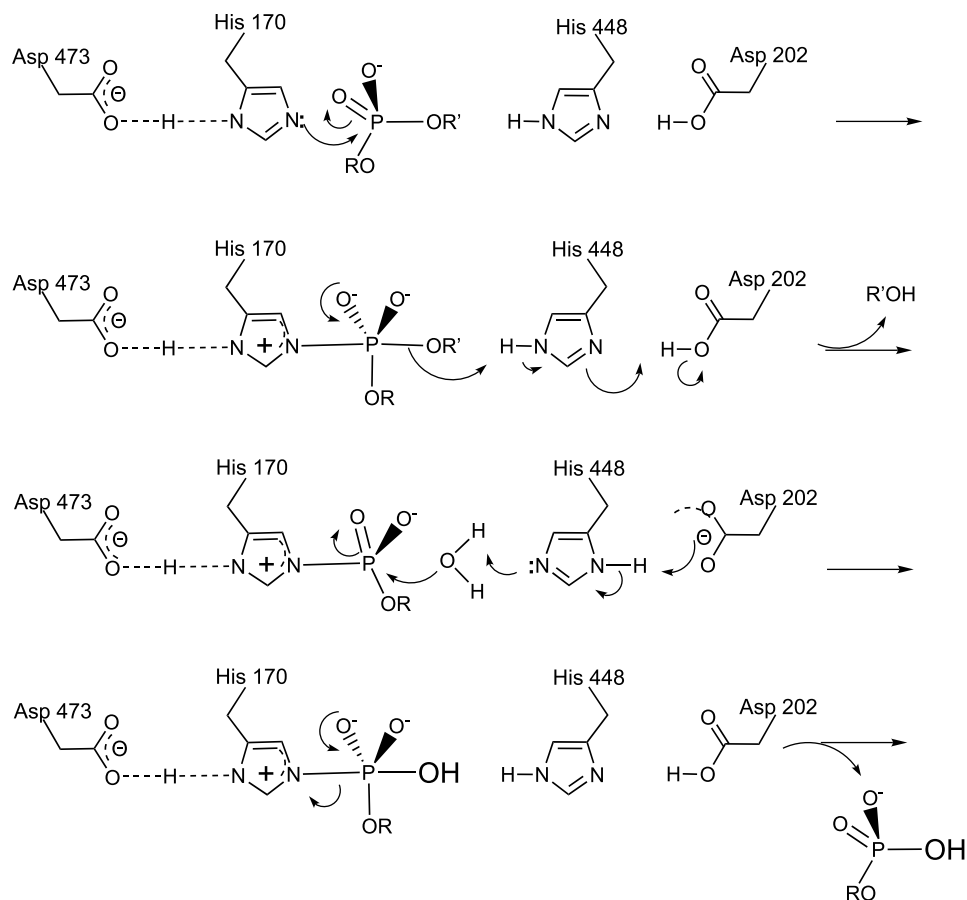
In den N-terminalen Sequenzen der eukaryontischen PLD konnten jedoch Homologien zu anderen Proteindomänen festgestellt werden. Am N-Terminus der pflanzlichen PLD $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  befindet sich jeweils eine C2-Domäne [177]. Auf diese Ca<sup>2+</sup>-bindende Domäne, die bei weiteren phospholipidbindenden Proteinen vorkommt, soll später noch näher eingegangen werden (2.2.4). Dagegen besitzen die Säuger- und Hefe-PLD sowie die PLD $\zeta$ -Isoformen der Pflanzen N-terminal eine Phox-Homologie (PX)- und eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne [139]. Die PX-Domäne ist ein verschiedene Phosphatidylinositolphosphate und Src Homologie 3 (SH3)-Domänen bindendes Modul und kommt in über 100 verschiedenen eukaryontischen Proteinen vor [63]. PH-Domänen sind weitverbreitete Proteinmodule, für die z.T. sehr spezifische Phosphatidylinositolphosphat- und Proteinbindung nachgewiesen wurde, so dass sie die Membranbindung von Proteinen vermitteln könnten [136].

### Katalysemechanismus

Wenige Mitglieder der PLD-Superfamilie enthalten nur ein HKD-Motiv. Anhand der Kristallstruktur des Dimers der Endonuklease Nuc wurde jedoch deutlich, dass auch hier zwei HKD-Motive (je eins aus jeder Untereinheit) ein aktives Zentrum bilden [213]. Mutagenesestudien zeigten zudem, dass jeweils beide Histidin-, Lysin- und Aspartatreste der HKD-Motive für die Aktivität der Enzyme essenziell sind [128, 216, 244]. Mechanistische Studien wiesen auf einen Zwei-Schritt-Mechanismus hin, da die Konfiguration am Phosphoratom des Phospholipids erhalten bleibt [25]. Der vorgeschla-

gene Ping-Pong-Mechanismus konnte durch die Isolierung eines kovalenten Phosphatidyl-Enzym-Intermediats bestätigt werden [81]. Die an der kovalenten Bindung beteiligte Aminosäure ist ein Histidinrest einer der HKD-Motive. Während im Dimer der Nuc beide Histidinreste das kovalente Intermediat bilden können [213], erfüllen bei den PLD die Histidinreste unterschiedliche Aufgaben bei der Reaktion, was durch die Aufklärung der Kristallstruktur einer bakteriellen PLD deutlich wurde [127]. Welcher Histidinrest (N- oder C-terminales HKD-Motiv) das kovalente Intermediat bildet, scheint innerhalb der PLD nicht konserviert zu sein [99, 126].

Da die HKD-Motive der PLD-Enzyme jedoch absolut konserviert sind, ist anzunehmen, dass der Reaktionsmechanismus der *Streptomyces species* PLD (Abb. 2.4) [126] auf alle Enzyme der PLD-Superfamilie übertragbar ist. Der erste Schritt des Ping-Pong-Mechanismus ist ein nukleophiler Angriff des Imidazol-Stickstoffs des His170 am Phosphoratom des Substrats (Abb. 2.4). Die Übertragung eines Protons vom His448 ermöglicht die Freisetzung der Kopfgruppe, so dass aus dem instabilen pentakoordinierten Phosphatidyl-Intermediat ein stabiles tetraedrales Intermediat gebildet wird. Der Imidazol-Stickstoff des His448 deprotoniert nachfolgend ein Wassermolekül, wo-



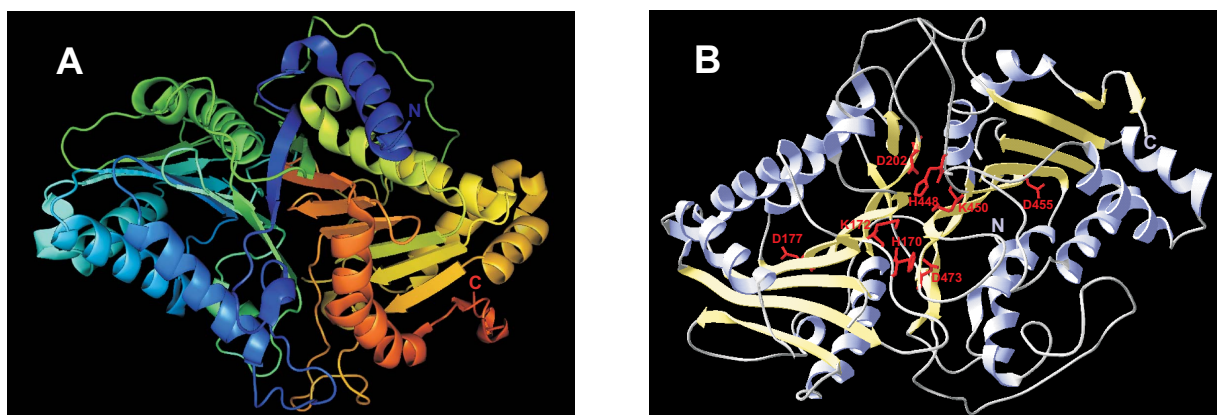
**Abbildung 2.4:** Reaktionsmechanismus der PLD aus *S. species*, Stamm PMF [126]. Das Substrat ist Phosphatidylcholin: R – Diacylglycerol, R' – Cholin.

bei sich das resultierende Hydroxidion an das Phosphatidyl-Histidin-Intermediat anlagert. Nach Umlagerung wird Phosphatidsäure freigesetzt. Die Rekonstruktion des aktiven Zentrums zeigt, dass u. a. die Lysinreste der HKD-Motive durch Wasserstoffbrücken an der Bindung des Substrats beteiligt sind [126, 127].

### Tertiärstruktur

Die Endonuklease Nuc war der erste Vertreter der PLD-Superfamilie, dessen Raumstruktur bestimmt wurde [213]. Sie setzt sich aus zwei identisch gefalteten Monomeren zusammen, wobei an der Kontaktfläche das aktive Zentrum gebildet wird. Die PLD aus *S. species* ist die bisher einzige PLD, deren Tertiärstruktur bekannt ist (Abb. 2.5) [127]. In Abb. 2.5A ist eine N- und eine C-terminale Domäne erkennbar, welche wahrscheinlich nacheinander falten. Lediglich die N-terminale Helix muss der C-terminalen Domäne zugeordnet werden. Die Faltungstopologie ist ähnlich der der Endonuklease Nuc und entspricht einem  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -sandwich. Die Sekundärstrukturanteile von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices sind relativ ausgeglichen (Abb. 2.5B). Anhand der in Abb. 2.5B dargestellten Seitenketten der für die Katalyse notwendigen Aminosäuren wird die Lage des aktiven Zentrums an der Grenzfläche beider Domänen deutlich. Die konservierten Aspartatreste der HKD-Motive sind etwa 30 Å vom aktiven Zentrum entfernt und in intramolekulare Interaktionen involviert. Die Histidin- und Lysinreste befinden sich dagegen in räumlicher Nähe. Das Enzym besitzt ausgedehnte Loopregionen, insbesondere im Bereich der Kontaktfläche der Domänen.

Diese bakterielle PLD ermöglichte erste wichtige Einblicke in die Funktionsweise und Faltungstopologie dieser Enzyme. Zwischen bakteriellen PLD und den eukaryontischen PLD besteht keine Homologie [169]. Die in eukaryontischen PLD vorkommen-



**Abbildung 2.5:** Raumstruktur der PLD aus *S. species*, Stamm PMF (1F0I) [127].

**A:** Verlauf der Aminosäuren vom N-Terminus (N, dunkelblau) über grün und gelb bis zum C-Terminus (C, rot). Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL erstellt [47]. **B:** Die Seitenketten der Histidin-, Lysin- und Aspartatreste der HKD-Motive und der in Abb. 2.4 bezeichneten Aspartatreste sind rot dargestellt.  $\alpha$ -Helices sind blau,  $\beta$ -Faltblätter gelb und Loopregionen grau eingefärbt. Die Abbildung wurde mit dem Programm Swiss-PdbViewer erstellt [85].

den weiteren Domänen und die sichtbar größeren Abstände der PLD-spezifischen konservierten Bereiche (Abb. 2.3) lassen daher keine direkte Übertragung der strukturellen Daten zu. Trotz der publizierten Kristallisation der Augenbohnen PLD im Jahr 2000 [1] konnten auf diesem Gebiet bisher keine Fortschritte erzielt werden.

Wang und Mitarbeiter untersuchten den strukturellen Aufbau der PLD $\beta$  aus *Arabidopsis* [167, 251, 252]. Die rekombinante Expression einzelner Domänen dieser PLD zeigte Sekundärstrukturveränderungen der C2-Domäne infolge von Ca<sup>2+</sup>-Bindung. Zudem wurden weitere Bindungsstellen für Phosphatidylinositolphosphate und Ca<sup>2+</sup>-Ionen an anderen Bereichen des Moleküls gefunden.

### 2.2.3 Stabilitätsuntersuchungen an PLD

Zur Stabilität von PLD-Enzymen gibt es bisher nur sehr wenige Arbeiten. Die PLD verschiedener *Streptomyces* Stämme wurden anhand ihrer Restaktivität untersucht. Die Temperatur-induzierte Denaturierung fand dabei im Bereich von 50 bis 75 °C statt [28, 89]. Unterhalb von pH 4,4 bzw. oberhalb von pH 9,0 kam es ebenfalls zu einer Inaktivierung [28]. Mutagenesestudien konnten für die Stabilität wichtige Aminosäuren identifizieren, so dass die Thermostabilität des thermolabilen Enzyms K1PLD aus *S. halstedii* deutlich gesteigert werden konnte [90]. Bei diesen Untersuchungen wurde neben der Restaktivität auch die Sekundärstruktur mittels Fern-UV-CD bei 222 nm analysiert. Die Denaturierung der bakteriellen PLD war irreversibel.

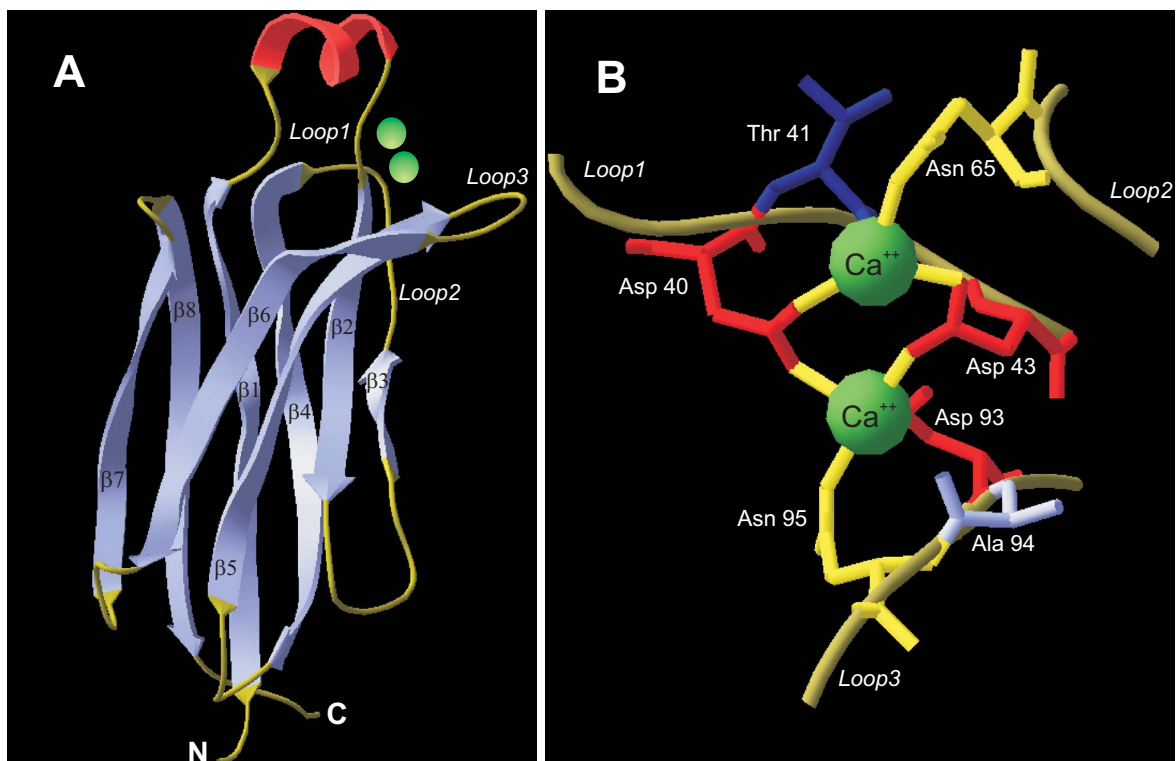
Die Untersuchungen zur Stabilität einer aus Möhren isolierten PLD mit auffällig niedriger molekularer Masse (60 kDa) wurden ebenfalls anhand der Restaktivität durchgeführt [197]. Die Temperatur-induzierte Denaturierung war bei 50 °C zu beobachten. Das Enzym war über einen ähnlichen pH-Bereich wie die bakteriellen Enzyme stabil. Für die aus dem Wirsingkohl isolierte PLD wurde eine starke Instabilität in wässrigen Lösungen beobachtet, die durch Zugabe mehrwertiger Alkohole gemindert werden konnte [4].

### 2.2.4 Struktur und Funktion von C2-Domänen

Die C2-Domäne wurde erstmalig als zweite der vier konservierten Domänen der  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Isoformen der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Proteinkinasen C in Säugern beschrieben [149]. Im Weiteren wurden C2-Domänen in einer Reihe eukaryontischer Proteine identifiziert, welche eine Beteiligung an der zellulären Signalweiterleitung und Membranwechselwirkungen gemein haben. Cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>, einige Phospholipasen C, weitere Isoformen der Proteinkinasen C und pflanzliche PLD besitzen jeweils eine C2-Domäne, wohingegen eine Reihe membranverankerter Proteine wie Synapto-

tagmin und Ferlin zwei oder mehrere C2-Domänen enthalten [170, 199]. In prokaryontischen Proteinen wurden bisher keine C2-Domänen gefunden.

Alle C2-Domänen sind aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, die aus jeweils vier  $\beta$ -Strängen bestehen (Abb. 2.6A). Drei Loops an einem Ende der Domäne sind für die  $\text{Ca}^{2+}$ - und/oder Phospholipidbindung verantwortlich (Abb. 2.6B). Vergleicht man Anordnung und Reihenfolge der  $\beta$ -Stränge, offenbaren sich zwei distinkte Topologien. Die C2-Domäne in Abb. 2.6A besitzt Topologie II (wie alle putativen C2-Domänen pflanzlicher PLD). Bei der Topologie I steht der hier mit  $\beta 8$  bezeichnete Strang an erster Stelle, gefolgt von  $\beta 1$  bis  $\beta 7$ . Bei der Strukturbestimmung der C2-Domänen wurden meist zwei bis drei gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gefunden, wobei vier symmetrische Bindungsstellen vorliegen [179]. Der erste  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsloop ist der variabelste innerhalb der C2-Domänen [149, 170], und u. a. bei den pflanzlichen PLD vergleichsweise lang (Abb. 4.6). Er wird z. B. bei der cytosolischen Phospholipase  $A_2$  (Abb. 2.6A) durch eine kurze  $\alpha$ -Helix unterbrochen [168]. Die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verantwortlichen Aminosäuren sind weitgehend konserviert, fehlen jedoch teilweise den C2-Domänen der pflanzlichen PLD $\alpha$  (vgl. Abb. 2.6B und Abb. 4.6).



**Abbildung 2.6:** Raumstruktur und  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstasche der C2-Domäne der cytosolischen Phospholipase  $A_2$  aus *Homo sapiens* (1RLW) [168].

**A:** Raumstruktur der C2-Domäne.  $\beta$ -Faltblätter sind blau, die  $\alpha$ -Helix rot, Loopregionen ocker und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen grün eingefärbt. Die drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsloops sowie die acht  $\beta$ -Faltblätter sind gekennzeichnet. **B:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungstasche der C2-Domäne. Zu den Loops und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus **A** sind die an der Bindung beteiligten Aminosäureseitenketten eingezeichnet. Asp (rot), Thr (blau), Ala (hellblau) und Asn (gelb). Beide Abbildungen wurden mit dem Programm Swiss-PdbViewer erstellt [85].

Malmberg *et al.* [179] und Shao *et al.* [196] zeigten, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Phospholipidbindung der C2-Domänen nicht auf Konformationsänderung infolge der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung basiert, sondern die entsprechenden Loopregionen durch das Calcium stabilisiert und elektrostatisch verändert werden. Für die Membranbindung der einzelnen C2-Domänen spielen neben der zusätzlichen Koordination der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die Kopfgruppen der Phospholipide (Erkennung spezifischer Kopfgruppen) auch elektrostatische Interaktionen und hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle [151]. Dabei können hydrophobe Seitenketten der C2-Domäne in den hydrophoben Bereich der Membran eindringen [42, 137].

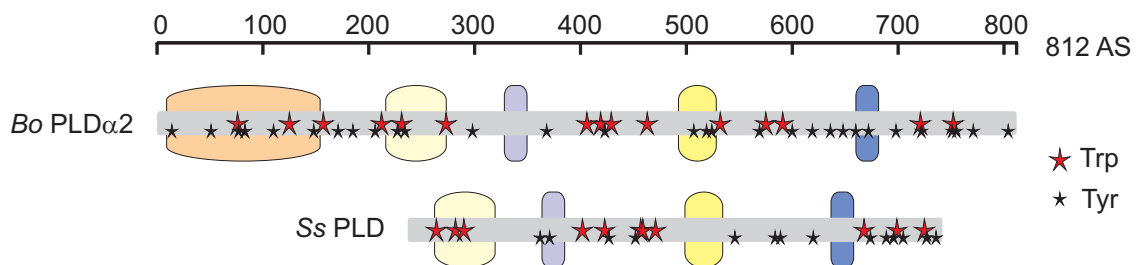
Die Funktionen der C2-Domänen in den einzelnen Proteinen sind vielfältig. Dazu zählt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Translokation löslicher Enzyme wie Phospholipase  $\text{A}_2$  oder Phospholipase C an die Membranen. Proteinkinasen C werden u. a. durch die  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phospholipidbindung der C2-Domäne aktiviert. Die C2-Domänen verschiedener Synaptotagmine können andere Proteine oder weitere C2-Domänen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig oder  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig binden [149]. Diese Proteine erfüllen wichtige Funktionen im Phospholipidmetabolismus, bei der Signaltransduktion oder dem regulierten Vesikeltransport.

### 2.2.5 PLD2 aus Weißkohl

Das aus dem Weiß- oder Wirsingkohl isolierte Enzym gehörte zu den ersten untersuchten PLD [4, 223]. Bisher haben vor allem die katalytischen Eigenschaften dieser PLD großes Interesse auf sich gezogen [52, 94, 122, 128, 202, 232]. Im Rahmen einer vorangegangenen Promotionsarbeit konnten zwei Isoenzyme PLD1 und PLD2 identifiziert, sequenziert und rekombinant in *E. coli* exprimiert werden [189]. Beide wurden den pflanzlichen  $\text{PLD}\alpha$  zugeordnet und die löslich exprimierten Proteine konnten effizient aus dem Rohextrakt isoliert werden [190]. Beide Proteine haben eine maximale Aktivität bei pH 5,5 und 40 mM  $\text{CaCl}_2$  [190] und zudem ähnliche spektroskopische Eigenschaften [91]. Eine Renaturierung aus bei der Expression anfallenden *inclusion bodies* war nicht möglich [189] und beide Isoenzyme entfalten bereits bei geringen Denaturationskonzentrationen irreversibel [91]. Diesem ersten Entfaltungsschritt folgt ein zweiter, der reversibel zu verlaufen scheint [91]. Das aus dem Weißkohl isolierte Enzym entspricht dem Isoenzym PLD2 [193].

Eine schematische Primärstruktur der PLD2 mit den PLD-spezifischen konservierten Sequenzbereichen und der N-terminalen C2-Domäne ist in Abb. 2.7 dargestellt. Das Enzym besteht aus 812 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 92,1 kDa. Für die strukturelle Untersuchung mittels Fluoreszenz- und Nah-UV-CD-Spektros-

kopie sind besonders die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin und deren Umgebung interessant. Die 15 Tryptophan-, 30 Tyrosin- und 34 Phenylalaninreste sind über das gesamte Molekül verteilt (Abb. 2.7). Der Vergleich mit der PLD aus *S. species* zeigt, dass sich Anzahl und Lage der aromatischen Aminosäuren stark unterscheiden, so dass deren Positionen in der Raumstruktur nicht auf die PLD2 aus Weißkohl übertragen werden können. 43 enthaltene Prolinreste könnten durch *cis/trans* Isomerisierung die Faltung erschweren. An dem aus der Pflanze isolierten Protein konnte gezeigt werden, dass alle acht Cysteinreste reduziert vorliegen [97]. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Valin, Isoleucin) ist relativ groß (21,4 %). Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,78 [91]. Im Weißkohl ist der N-Terminus des Proteins acetyliert [193], wohingegen bei rekombinanter Expression in *E. coli* das N-terminale Methionin abgespalten wird [189].



**Abbildung 2.7:** Schematische Darstellung der Primärstruktur der PLD2 aus Weißkohl (*Bo PLDα2*). Die Domänen und PLD-spezifischen Sequenzmotive sind wie in Abb. 2.3 dargestellt. Zudem ist die Position der 15 Tryptophan- und 30 Tyrosinreste markiert. Als Vergleich ist die PLD aus *S. species* Stamm PMF (*Ss PLD*) mit ihren 11 Tryptophan- und 14 Tyrosinresten abgebildet.



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Agar	Applichem, Darmstadt
1-Anilino-8-naphtalensulfonat (ANS)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Eurogentec, Groningen, NL
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Calciumacetat	Sigma, Taufkirchen
CaCl <sub>2</sub>	Applichem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G250, R250	Serva, Heidelberg
Dextranblau	Amersham Biosciences, Freiburg
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
Essigsäure, 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Glutathion, reduziert (GSH)	Applichem, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
GdnHCl, ultra pure	Sigma, Taufkirchen
Harnstoff	ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycinsulfat	Serva, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
MgCl <sub>2</sub>	Serva, Heidelberg
NaCl	Merck Biosciences, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka, Taufkirchen
Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (Pipes)	Applichem, Darmstadt
Triethanolamin	Sigma, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton <sup>®</sup> X-100	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien waren von höchster Reinheit. Es wurde nur deionisiertes Wasser verwendet.

## 3.1.2 Proteine

*Restriktionsendonukleasen*

<i>DpnI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>NcoI</i> , <i>NdeI</i> , <i>SapI</i>	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
<i>BamHI</i> , <i>PstI</i>	Hybaid AGS, Heidelberg
<i>EclIII</i> 136	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qbiogene, Heidelberg
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkalische Phosphatase	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA Polymerase I, Klenow Fragment ( <i>E. coli</i> )	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Thrombin (Rinderplasma)	Amersham Biosciences, Freiburg
Thermolysin ( <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> )	Merck Biosciences, Darmstadt
Proteinase K ( <i>Tritirachium album</i> )	Roche Diagnostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Pierce, Bonn
Lysozym (Hühnereiweiß)	Serva, Heidelberg
DNase I (Rinderpankreas)	Applichem, Darmstadt

*Markerproteine*

Protein Molecular Weight Standards	Serva, Heidelberg
Aldolase (Kaninchenmuskel)	150,0 kDa
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45,0 kDa
Chymotrypsinogen A (Rinderpankreas)	25,0 kDa
Cytochrom C (Pferdeherz)	12,3 kDa
LMW-SDS Marker Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	97,0 kDa
Rinderserumalbumin	66,0 kDa
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	45,0 kDa
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	30,0 kDa
Trypsin Inhibitor (Sojabohne)	20,1 kDa
$\alpha$ -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,4 kDa

*Antikörper*

Anti-Weißkohl-PLD2 Antikörper aus Kaninchen (Anti-PLD)	Dr. J. Rajcani, Comenius-Universität Bratislava
Anti-GST Antikörper aus Ziege	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-His Antikörper aus Maus	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Esel	Amersham Biosciences, Freiburg
Anti-Ziege IgG Antikörper aus Kaninchen	Sigma, Taufkirchen
Anti-Maus IgG Antikörper aus Schaf	Amersham Biosciences, Freiburg

### 3.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg) bzw. Metabion (Planegg-Martinsried) hergestellt. Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit IRD 800 modifiziert.

*Primer für die Klonierung der PLD2-Fragmente aus dem pRSET5a Plasmid in das pET15b Plasmid:*

PLD2C2 fw	5'-GGA ATT CCA TAT GGG GAC TTT GCA CGC TAC CAT-3'
PLD2C2 rv	5'-CGG GAT CCC TAC TCA ACG GCG AAG TAC TGG A-3'
PLD2CT fw	5'-GGA ATT CCA TAT GGC GGA TCG AAA CTG GAA CAT G-3'
PLD2CT rv	5'-CGG GAT CCC TAA GTT GTA AGG ATT GGA GGC AG-3'

*Primer für die ortsgerichtete Mutagenese:*

2C2mut fw	5'-CTT CGC CGT TGA GTA GGA TCC AAA CTG GAA C-3'
2C2mut rv	5'-GTT CCA GTT TGG ATC CTA CTC AAC GGC GAA G-3'
22ecl2 fw	5'-ACT CCA GTA CTT CGC AGT TGA GCT CGG ATC AGG CTG CTA ACA AAG-3'
22ecl2 rv	5'-CTT TGT TAG CAG CCT GAT CCG AGC TCA ACT GCG AAG TAC TGG AGT-3'
22nco1 fw	5'-GCG CGG CAG CCC CAT GGG GAC TTT GCA C-3'
22nco1 rv	5'-GTG CAA AGT CCC CAT GGG GCT GCC GCG C-3'

*Sequenzierprimer:*

T7 Prom	5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3'
T7 Term	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'
M13 unv	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
M13 rv	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
pQE fw	5'-CAT CAC CAT CAC CAC CAC GGA TCC ATG GGG ACT TTG CAC-3'
pQE rv	5'-TTC TGA GGT ATT ACT GGA TCT ATC-3'
pGEX 5'	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'
pGEX 3'	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'
PLD2mid fw	5'-GTT CAG GAC GTT GGA CAC-3'
PLD2mid rv	5'-GGA ACC ACA ACA TAA ACC CT-3'
Sonde2 fw	5'-GAG CAG AGA TGG AGA AAG-3'
Sonde2 rv	5'-TTA CCA CC(CT) TGC TTT CTC CAT CTC TGC TC-3'
Sonde4 fw	5'-TAA CCC TGA TGA CGG TGG TAG-3'

### 3.1.4 Plasmide

<i>pld2pRSET5a</i>	Dr. I. Schäffner, MLU, Halle
<i>pRSET5a</i>	von Dr. I. Schäffner übernommen
<i>pCR<sup>®</sup>4-TOPO</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>pET15b</i>	Merck Biosciences, Darmstadt
<i>pET22b(+)</i>	Merck Biosciences, Darmstadt

pQE30	Qiagen, Hilden
pGEX-2T	Amersham Biosciences, Freiburg
pTXB1	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
pTYB1	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
pUBS520	Dr. U. Brinkmann, Epidauros Biotechnology, Bernried

### 3.1.5 *E. coli*-Stämme

XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ] Stratagene, Heidelberg
TOP 10	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i> Invitrogen, Karlsruhe
BL21 (DE3)	B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal (DE3)</i> Stratagene, Heidelberg
ER 2566	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i> <i>R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i> New England Biolabs, Frankfurt (Main)
SG 13009	K12 <i>nal<sup>S</sup> str<sup>S</sup> rif<sup>S</sup> thi<sup>-</sup> lac<sup>-</sup> ara<sup>+</sup> gal<sup>+</sup> mtl<sup>-</sup> F<sup>-</sup> recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> lon<sup>+</sup></i> Qiagen, Hilden

### 3.1.6 Kulturmedien

M9 Medium	0,1 % NH <sub>4</sub> Cl, 0,3 % KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,6 % Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O, 0,05 % NaCl, 0,4 % Glucose, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7,4
LB Medium	1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt
LB Agar	1 % NaCl, 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Agar
TB Medium	1,2 % Trypton, 2,4 % Hefeextrakt, 0,4 % (v/v) Glycerol, 120 mM Kaliumphosphat, pH 7,5
2×YT Medium	1 % NaCl, 2 % Trypton, 1 % Hefeextrakt
SOC Medium	0,05 % NaCl, 2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,8 % Glucose

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Prozentangaben in (w/v) gemacht. Nach der Herstellung wurden die Medien bzw. der Agar autoklaviert und kurz vor der Benutzung mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Endkonzentration 25 bis 50 μg·ml<sup>-1</sup> Kanamycin bzw. 50 bis 100 μg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin).

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

Die Methoden wurden soweit nicht anders erwähnt den Standardwerken [13, 147, 185] entnommen.

### 3.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die verwendeten Mutageneseprimer sind unter 3.1.3 aufgeführt. Die Transformation der *DpnI*-behandelten DNA in *E. coli* XL1 Blue Zellen erfolgte abweichend von den Herstellerangaben unter Nutzung elektrokompenter Zellen wie unter 3.2.4 beschrieben. Zur Kontrolle der korrekten DNA-Sequenz wurde der codierende Bereich des Plasmids wie unter 3.2.10 beschrieben sequenziert.

### 3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Einfügen von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung der PLD2-Fragmente aus dem Plasmid pRSET5a in das Plasmid pET15b und die Selektion positiver Klone nach Ligationsexperimenten erfolgte mittels PCR in einem TRIO Thermoblock (Bioterra, Göttingen). Die Anlagerungstemperatur der Primer wurde entsprechend ihrer Schmelztemperatur zwischen 55 und 66 °C variiert.

#### *Klonierung der PLD2-Fragmente*

Der 50 µl-Reaktionsansatz enthielt 1 U *Pfu*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, 2 mM dNTP-Mix (Hybaid AGS, Heidelberg), 25 pmol der entsprechenden Primer sowie 20 ng parentale DNA. Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (1 min 95 °C) in 30 Zyklen (1 min 95 °C, 1 min Anlagerungstemperatur, 1 bzw. 4 min 72 °C).

#### *„Kolonie-PCR“ zur Selektion*

Der 20 µl-Reaktionsansatz enthielt 1 U *Taq*-DNA-Polymerase, Reaktionspuffer, 2 mM dNTP-Mix (Hybaid AGS, Heidelberg), 25 pmol der entsprechenden Primer sowie einen Kolonieabstrich als parentale DNA. Die Amplifizierung erfolgte nach einem initialen Denaturierungsschritt (3 min 94 °C) in 30 Zyklen (30 s 94 °C, 30 s Anlagerungstemperatur, 1 bzw. 4 min 72 °C).

### 3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des *QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden).

### 3.2.4 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

#### *Elektroporation*

In einer 2 mm-Elektroporationsküvette wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit der Plasmid-DNA auf Eis vorinkubiert. Die Elektroporation wurde an einem *Gene Pulser*<sup>®</sup> II der Firma Bio-Rad (München) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### *Transformation mittels Hitzeschritt*

Für die Transformation wurden 100 µl chemokompetente Zellen mit der Plasmid-DNA für 20 min auf Eis vorinkubiert. Der Hitzeschritt erfolgte im Wasserbad (RM6, Lauda, Lauda-Königshofen) bei 42 °C für 45 s. Anschließend wurden die Zellen nochmals für 5 min auf Eis inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (3.1.6) bei 37 °C für 1 h geschüttelt (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg), anschließend auf LB Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Brutschrank Kelvitron, Heraeus, Hanau).

### 3.2.5 Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers (*1 kb DNA Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe) im Agarosegel (3.2.6).

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm ( $A_{260}=1$  entspricht ca. 50 µg·ml<sup>-1</sup> doppelsträngiger DNA) unter Verwendung eines Ultrospec 3000 Spektrophotometers (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt.

### 3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1- bis 1,2%igen (w/v) Agarosegelen bei 80 V in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA). Die DNA wurde mit Ethidiumbromid (1 µg·ml<sup>-1</sup>) angefärbt.

### 3.2.7 DNA-Reinigung aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick*<sup>®</sup> *Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) isoliert.

### 3.2.8 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Die endonukleolytische Spaltung der DNA erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller des entsprechenden Enzyms empfohlenen Puffer und Zusätze über 1 bis 24 h.

### 3.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in den Vektor erfolgte durch Inkubation beider DNA-Stücke über Nacht bei 4 °C entsprechend den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen für überhängende bzw. glatte DNA-Enden. Glatte DNA-Enden wurden unter Verwendung der DNA Polymerase I (Klenow Fragment) nach Herstellerangaben erzeugt. Der Vektor wurde unter Verwendung von Shrimp Alkalische Phosphatase nach Herstellerangaben dephosphoryliert und gereinigt (3.2.7).

PCR-Produkte wurden, nach Anfügen eines zusätzlichen Adenosins an den 3'-Enden, unter Verwendung des *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> for Sequencing Kits* (Invitrogen, Karlsruhe) subkloniert und nach Verifizierung der korrekten DNA-Sequenz (3.2.10) ausgeschnitten und ligiert.

### 3.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem *SequiTherm EXCEL<sup>™</sup>LongRead<sup>™</sup>DNA Sequencing Kit* (Biozym, Oldendorf) nach dem Didesoxy-Verfahren [187] unter Verwendung eines LiCor 4000 DNA-Sequencer (MWG Biotech, Ebersberg) und der BaseImagIR (Version 4, 1997) Software zur Auswertung. Für die Sequenzierung wurden die unter 3.1.3 aufgeführten Oligonukleotide (IRD 800 markiert) und 200 fmol Plasmid-DNA eingesetzt.

### 3.2.11 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum (3.1.6) wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB Agarplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt (Schüttler Innova<sup>™</sup> 4300, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA).

## 3.3 Proteinchemische Methoden

### 3.3.1 Herstellung löslicher PLD2

Die Expression und Reinigung von PLD2 erfolgte in Anlehnung an Literaturprotokolle [2, 122, 190].

#### Expression

Für die Expressionskultur wurden 200 ml 2×YT Medium, das 100 µg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin und 50 µg·ml<sup>-1</sup> Kanamycin enthielt, mit Bakterienzellen aus einer Glycerolkultur (*pld2pRSET5a* und *pUBS520* in BL21 (DE3)) angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm etwa 15 h geschüttelt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) von

1 bis 2 wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt und die Zellen wurden weitere 24 bis 48 h geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 × g) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **Zellaufschluss**

Das Zellpellet von 1,2 l Kulturmedium wurde in 37 ml Lysepuffer (30 mM Na-Pipes, pH 6,2, 10 mM EDTA) resuspendiert (13500 rpm, Ultra-Turrax T25, Ika-Labortechnik, Staufen) und anschließend durch einen Homogenisator (Gaulin Micron Lab40, APV, Lübeck) in 2 Passagen bei 1200 bar aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 48000 × g) entfernt und der Rohextrakt aliquotiert bei -20 °C gelagert.

#### **Ca<sup>2+</sup>-vermittelte hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**

Nach Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 50 mM) wurde der Rohextrakt zentrifugiert (10 min, 4800 × g) und der Überstand an Octylsepharose (Octylsepharose CL-4B, Amersham Biosciences, Freiburg) gebunden, die mit 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM Na-Pipes, pH 6,2, äquilibriert war. Nach Waschen mit dem Auftragspuffer erfolgte die Elution mit 0,1 mM EDTA, 5 mM Na-Pipes, pH 6,2. Entsprechende Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (3.3.4) analysiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **Anionenaustauschchromatographie**

Die Elutionsfraktionen der HIC wurden umgepuffert (20 mM Tris/HCl, pH 7,5) und mittels Anionenaustauschchromatographie an einer Source 15Q-Säule (XK 16/20, Betthöhe 35 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) unter Verwendung einer Äkta FPLC™ (Amersham Biosciences, Freiburg) gereinigt. Mittels steigendem NaCl-Gradienten (Laufmittel A: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, Laufmittel B: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 M NaCl) wurde die PLD2 in 1 ml-Fraktionen eluiert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Reinheit des Proteins wurde elektrophoretisch (SDS-PAGE, 3.3.4) überprüft.

Die entsprechenden Fraktionen wurden zweimal gegen das hundertfache Volumen 10 mM Na-Pipes, pH 7,0, dialysiert (*Cut-off*: 20 kDa, Roth, Karlsruhe), zentrifugiert (30 min, 21460 × g) und anschließend bei -20 °C gelagert. Für die Konzentrierung wurden Vivaspin 4 ml Konzentratoren (*Cut-off*: 5 kDa, Vivascience, Hannover) nach Herstellerangaben verwendet.



### 3.3.2 Präparation von PLD2-Fragmenten

#### 3.3.2.1 Expression von PLD2-Fragmenten

Für die Expression der PLD2-Fragmente wurden unterschiedliche Expressionskonstrukte hergestellt, um verschiedene Expressionstrategien und -bedingungen zu untersuchen. Die verwendeten Expressionskonstrukte mit den entsprechenden *E. coli* Expressionsstämmen sind in Tab. 3.1 aufgeführt. Zur Optimierung der löslichen Ex-

**Tabelle 3.1:** Expressionskonstrukte zur Herstellung von PLD2-Fragmenten.

Für die verwendeten Vektoren sind die *E. coli* Expressionsstämmen und die untersuchten PLD2-Fragmente angegeben.

Vektor	Expressionsstamm	PLD2-Fragment
pET15b	BL21 (DE3)	C2-Domäne, PLD2-Rumpfprotein
pGEX-2T	BL21 (DE3)	C2-Domäne, PLD2-Rumpfprotein
pRSET5a	BL21 (DE3)	C2-Domäne, PLD2-Rumpfprotein
pET22b	BL21 (DE3)	C2-Domäne
pQE30	SG 13009	C2-Domäne
pTXB1, pTYB1	ER 2566	C2-Domäne

pression der PLD2-Fragmente wurden 20 bis 200 ml Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt, während die OD<sub>600</sub> verfolgt wurde. Die Kultivierungs- und Expressionsbedingungen wurden hinsichtlich Kulturmedium, OD<sub>600</sub> bei Induktion, Induktionszeitraum, Induktorkonzentration und -art variiert, um lösliches Protein zu erhalten. Eine starke Limitierung des Zellwachstums nach Induktion wurde durch Temperatur- und pH-Wertsenkung erreicht [117]. Für die Induktion zelleigener Chaperone zur Faltungsunterstützung nach [32] wurde eine halbstündige Temperaturerhöhung auf 42 °C vor Induktion durchgeführt. Alle variierten Bedingungen sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

#### Expression der Konstrukte im pGEX-2T-Vektor

Für die Vorkultur wurden 20 ml 2×YT Medium (100 µg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin) mit Bakterienzellen aus einer Glycerolkultur angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm etwa 12 h geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 400 ml 2×YT Medium in 2 l-Schikanekolben (100 µg·ml<sup>-1</sup> Ampicillin) mit 4 ml Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 130 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1 wurde die Temperatur auf 15 °C gesenkt und mit 0,5 mM IPTG für 4 h induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 × g) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 3.3.2.2 Methoden zur Evaluierung der Expressionsoptimierung

#### Trennung von löslichem und unlöslichem Protein mittels *B-PER*

Den Expressionskulturen wurde zu entsprechenden Zeiten je 1,5 ml Probe entnommen, mindestens 1 h bei -20 °C inkubiert, und entsprechend den Herstellerangaben mit *B-PER II Bacterial Protein Extraction Reagent* (Perbio Science Deutschland, Bonn) behandelt. Für die SDS-PAGE (3.3.4) wurden 15 µl der löslichen und 5 µl der unlöslichen Fraktion mit Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Detektion der rekombinanten Proteine erfolgte mittels Coomassie Brilliant Blau-Gelfärbung oder Western-Blot (3.3.5).

#### Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Zellen aus 20 ml Medium wurden durch Zentrifugation (10 min, 4800 × g) geerntet und die Masse bestimmt. Jeweils 0,3 g Feuchtmasse wurden in 850 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS: 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) und 75 µl Protease Inhibitor Cocktail (*for use with bacterial cell extracts* bzw. *for use in purification of poly(Histidine)-tagged proteins*, Sigma, Taufkirchen) resuspendiert und 3 × 1 min auf Eis beschallt (Ultraschallprozessor UP200s, Dr. Hielscher GmbH, Stuttgart, 70 % Amplitude, 0,5 Puls). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 21460 × g) entfernt. Für die SDS-PAGE (3.3.4) wurden 10 µl des Überstandes mit Probenpuffer (3.3.4) versetzt und mittels Western-Blot (3.3.5) analysiert.

#### Periplasmaaufschluss durch osmotischen Schock

Die N-terminale pelB-Sequenz (pET22b(+)) vermittelt die Sekretion ins Periplasma von *E. coli*. Nach Resuspendieren von 20 mg Zellen in 1,6 ml 30 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20 % (w/v) Sucrose und 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 8000 × g) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Volumen eiskalter MgSO<sub>4</sub>-Lösung (5 mM) resuspendiert und für 10 min bei 4 °C und 200 rpm geschüttelt. Der Überstand nach Zentrifugation (20 min, 8000 × g) enthält die periplasmatischen Proteine und wurde mittels SDS-PAGE (3.3.4) analysiert.

### 3.3.2.3 Reinigung von PLD2-Fragmenten

#### Reinigung der Intein-Chitinbindungsdomäne-Fusionsproteine

Die Expression des C2-Domäne-Intein-Chitinbindungsdomäne-Fusionsproteins erfolgte bei 30 °C und 6 h Induktion mit 0,5 mM IPTG. Das Zellpellet wurde in Bin-

dungspuffer (20 mM Hepes, pH 7,0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert, durch Hochdruck aufgeschlossen und der Rohextrakt von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt (s. 3.3.1 Zellaufschluss). Die Bindung an die *Chitin Beads* (New England Biolabs, Frankfurt (Main)) erfolgte nach Herstellerangaben in einer Leersäule (*laboratory column* (2,5 ml, 35  $\mu$ m Filter), MoBiTec, Göttingen bzw. Econo-Column (Durchmesser 25 mm, Höhe 20 cm), Bio-Rad, München) mittels Bindungspuffer. Nach Waschen mit demselben Puffer wurde die Abspaltung des rekombinanten Proteins durch Auftragen von DTT-haltigem Bindungspuffer (30 bzw. 50 mM DTT) und 17 h Inkubation bei 4 bzw. 23 °C durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, unter manueller Fraktionierung.

#### Reinigung der GST-Fusionsproteine

Das Zellpellet wurde in 37 ml PBS resuspendiert, durch Hochdruck aufgeschlossen und der Rohextrakt von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt (s. 3.3.1 Zellaufschluss). Bindung und Elution an eine Glutathion-Sepharose-Säule (GSTrap FF 1 ml bzw. XK 16/20 *column*, Betthöhe 25 mm, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte nach Herstellerangaben in PBS bzw. durch 10 mM GSH, 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, unter Verwendung einer Peristaltikpumpe P1 (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Elutionsfraktionen wurden manuell gesammelt und elektrophoretisch (SDS-PAGE, 3.3.4) überprüft. Falls erforderlich wurden die Elutionsfraktionen für eine nochmalige Reinigung zweimalig gegen das hundertfache Volumen PBS dialysiert, aufgetragen und eluiert.

Die Abspaltung des GST-Tags durch Thrombin (3.1.2) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Spaltung an der Säule und die Spaltung entsprechender Elutionsfraktionen für verschiedene Zeitintervalle (1 bis 24 h) durchgeführt wurde.

Für die Separierung von C2-Domäne bzw. PLD2-Rumpfenzym und GST wurden im *Batch*-Verfahren Anionenaustauschmedien (Q-, DEAE-Sepharose, Amersham Biosciences, Freiburg) und Octyl-Sepharose mit unterschiedlichen Puffern (2-[Bis-(2-hydroxyethyl)-imino]-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Bistris), pH 6,0 bis 7,0, Tris pH 7,5 bis 8,0) und NaCl-Konzentrationen (0 bis 2 M) getestet.

#### 3.3.2.4 Präparation der C2-Domäne aus *inclusion bodies*

##### Expression

Für die Vorkultur wurden 20 ml LB Medium (100  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> Ampicillin) mit Bakterienzellen aus einer Glycerolkultur (*pld2C2pET15b* in BL21 (DE3)) angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm etwa 12 h geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 1 l LB Medi-

um mit  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Ampicillin versetzt, mit 10 ml Vorkultur angeimpft und bei  $37^\circ\text{C}$  und 180 rpm geschüttelt. Nach Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 1 wurde mit 1 mM IPTG für 4 h induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min,  $6000 \times g$ ) geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### Präparation und Solubilisierung

Die Präparation und Solubilisierung der *inclusion bodies* erfolgte nach Rudolph *et al.* [184]. Auf eine Dialyse zur Entfernung des DTT wurde verzichtet, da kein positiver Effekt nachweisbar war und beide Cysteinreste der C2-Domäne frei vorliegen sollten [97].

### Renaturierung

Die Renaturierung der C2-Domäne erfolgte unter starkem Rühren durch schrittweise Zugabe des Solubilisats (Pulsrenaturierung) zum Renaturierungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M Arginin, 5 mM EDTA, 5 mM DTT) bis zu einer Proteinkonzentration von  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bei  $4^\circ\text{C}$ . Zur Optimierung wurde der Einfluss von pH-Wert, Puffer und verschiedener Zusätze untersucht. Die Auswertung erfolgte nach Zentrifugation (10 min,  $21460 \times g$ ) durch Messung der Proteinmenge im Überstand.

Die Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags durch Thrombin wurde während der Renaturierung oder nach Anreicherung und Umpufferung (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mittels einer Amicon-Zelle (400 ml, Millipore, Schwalbach) unter Verwendung einer 3 K Omega-Membran (Pall Filtron, Dreieich) durchgeführt.

## 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

### 3.3.3.1 BCA-Test

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Perbio Science Deutschland, Bonn) entsprechend der Anleitung in 96 Well Mikrotiterplatten (10  $\mu\text{l}$  Probe, 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagens). Als Proteinstandard für die Kalibrierkurve im Konzentrationsbereich von 0 bis  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  diente BSA. Die Detektion erfolgte bei 550 nm unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes MR 7000 (Dynatech, Denkendorf). Jede Proteinkonzentration stellt das Mittel einer Dreifachbestimmung dar.

### 3.3.3.2 Spektroskopische Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration einer PLD2-Stammlösung wurde ein Spektrum von 240 bis 340 nm aufgenommen (Ultrospec 3000 Spektrophotometer) und die Extinktion bei 280 nm unter Berücksichtigung der Grundabsorption bestimmt. Der Extinktionskoeffizient für die PLD2 ( $\epsilon = 123720 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  bei 280 nm)

wurde nach Gill und von Hippel [77] unter Verwendung eines Jasco V-560 Spektrophotometers (Jasco Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt) bestimmt.

### 3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde mit 0,75 mm dicken SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli [121] mit 10- bis 17,5%igem Trenngel unter Verwendung einer *Mighty-Small II Elektrophoresis unit* (Hoefer, San Francisco, CA, USA) gearbeitet.

Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Silberfärbung [153] bzw. Coomassie-Färbung (Fixierung: 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol; Färbung: 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau, 10 % (v/v) Essigsäure; Entfärbung: 10 % (v/v) Essigsäure). Zur quantitativen Auswertung der Bandenintensität wurde die Coomassie-Färbung über Nacht durchgeführt und das Gel nach Entfärben densitometrisch ausgewertet (CD 60, Desaga, Darmstadt).

### 3.3.5 Western-Blot-Techniken

Nach der SDS-PAGE (3.3.4) wurden die Gele in Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris/HCl, pH 8,3) äquilibriert und unter Verwendung einer Fastblot B33-Apparatur (Biometra, Göttingen) nach der *semi-dry* Methode bei  $2,5 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  auf Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup>Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences, Freiburg) für 2 h transferiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS gespült, und über Nacht in PBS, 0,05 % Tween<sup>®</sup>20, 4 % (w/v) Magermilchpulver (Oxoid, Wesel) bei 4 °C blockiert. Alle weiteren Schritte erfolgten in PBS, 0,05 % Tween<sup>®</sup>20 bei Raumtemperatur. Die Bindung der primären Antikörper (3.1.2, Verdünnung 1:500 bis 1:10 000) erfolgte in Gegenwart von 4 % (w/v) Magermilchpulver für 1 bis 2 h bzw. der sekundären Antikörper (3.1.2, Verdünnung 1:5 000 bis 1:10 000) in Gegenwart von 2 % (w/v) Magermilchpulver für 40 min. Vor und nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran dreimal 5 min gewaschen.

Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte über die gekoppelte Peroxidase unter Verwendung des ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers (HyperFilm-ECL, Amersham Biosciences, Freiburg und Entwickler, Fixierer, Sigma, Taufkirchen).

### 3.3.6 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse von PLD2 wurde in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0, in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> bei 23 °C durchgeführt (Gesamtvolumen 200 µl). Dem bei 23 °C vorinkubierten Puffer-Gemisch (z. T. Zugabe von 3 oder 5 M Harnstoff bzw. 0,3; 0,6 oder

1,0 M GdnHCl) wurde PLD2 ( $140 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) zugesetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von Proteaselösung (Thermolysin,  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , oder Proteinase K,  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) gestartet. Nach definierten Zeitintervallen wurden  $15 \mu\text{l}$  Probe entnommen und mit  $5 \mu\text{l}$  Stoppreagens (50 mM EDTA bzw. 50 mM PMSF in Isopropanol) gemischt. Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet, in Probenpuffer (3.3.4) aufgenommen und für die SDS-PAGE eingesetzt. GdnHCl-haltige Proben wurden zuvor mittels Natriumdesoxycholat präzipitiert [9].

### 3.3.7 Bestimmung der PLD2-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in Anlehnung an Schöffner *et al.* [190] unter Verwendung des artifiziellen Substrates Phosphatidyl-p-nitrophenol (PpNp), wobei das abgespaltene p-Nitrophenol bei 405 nm detektiert wurde (Ultrospec 3000 Spektrophotometer bzw. Mikrotiterplatten-Lesegerätes MR 7000). Das Substrat wurde von Dr. R. Schöps (MLU, Halle) nach D'Arrigo *et al.* [39] synthetisiert.

#### 3.3.7.1 Standardaktivitätstest

PLD2 ( $<5 \mu\text{g}$ ) wurde in  $220 \mu\text{l}$  in Gegenwart von 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 65 mM Na-Acetat, pH 5,5, bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert und die Messung durch Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  Substratlösung (10 bis 15 mM PpNp, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5% (v/v) Triton<sup>®</sup>X-100, 5 mM SDS) gestartet. Nach Abstoppen der Reaktion (nach 10 min) mit  $60 \mu\text{l}$  Stopplösung (1 M Tris/HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA) wurde die Absorption bei 405 nm in einer 1 cm Quarzglasküvette bestimmt. Eine Eichreihe im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mM p-Nitrophenol ermöglichte die Berechnung der Menge an freigesetztem p-Nitrophenol. Die gemessene Extinktionsänderung lag im linearen Bereich der Progresskurve. Eine Einheit (1 U) Enzym hydrolysiert  $1 \mu\text{mol}$  PpNp bei  $30^\circ\text{C}$  in einer Minute.

#### 3.3.7.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität

Für die Messung der pH-Abhängigkeit der Aktivität wurde PLD2 in  $495 \mu\text{l}$  (davon  $360 \mu\text{l}$  nachfolgend beschriebener Puffer) in Gegenwart von 10 bzw. 100 mM  $\text{CaCl}_2$  bei  $30^\circ\text{C}$  für 5 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von  $45 \mu\text{l}$  Substratlösung (3.3.7.1) gestartet (Endvolumen  $540 \mu\text{l}$ ). Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils  $120 \mu\text{l}$  Probe entnommen und in einer Mikrotiterplatte, in der Stopplösung vorgelegt wurde, gestoppt. Als Puffer wurden 30 mM Glycin, 30 mM Zitronensäure, 30 mM Triethanolamin und 300 mM HCl bzw. 300 mM NaOH für die entsprechenden pH-Werte gemischt und in einem Blindversuch der pH-Wert während der Reaktion und nach Abstoppen kontrolliert.

### 3.3.7.3 Einfluss von Zusätzen auf die Aktivität

Für die Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Zusätzen auf die Aktivität der PLD2 wurde 45 µl Substratlösung (3.3.7.1) in 50 mM Na-Acetat, pH 5,5, bei 30 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von PLD2 gestartet (Endvolumen 540 µl), und nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 120 µl Probe entnommen und in einer Mikrotiterplatte, in der Stopplösung vorgelegt wurde, gestoppt. Es wurde der Einfluss von GdnHCl\* (0 bis 1 M), Harnstoff\* (0 bis 4 M), CaCl<sub>2</sub> (0 bis 1,5 M), Ca-Acetat (0 bis 0,6 M), MgCl<sub>2</sub> (0 bis 0,8 M), SDS\* (0,42 bis 20 mM), Triton<sup>®</sup>X-100\* (0,0064 bis 20 mM) und Tween<sup>®</sup>20\* (0 bis 20 mM) in den angegebenen Konzentrationsbereichen untersucht. Bei den mit einem Stern gekennzeichneten Zusätzen enthielt der Reaktionsansatz 50 mM CaCl<sub>2</sub>.

Für die Bestimmung der Calciumdissoziationskonstanten wurde eine modifizierte Scatchard-Auftragung ( $\frac{PL}{L}$  vs.  $L$ ) genutzt. Dabei ist die Änderung der relativen Aktivität proportional der Menge gebundener Liganden (Protein-Ligand-Komplexe, PL) und die Menge freier Liganden (L) entspricht der eingesetzten Calciumionenkonzentration ( $L \gg PL$ ).

### 3.3.7.4 Kinetik der Inaktivierung anhand der Restaktivität

Die Messung der Inaktivierungskinetik bei GdnHCl-, Harnstoff- oder Temperatur-induzierter Entfaltung erfolgte anhand der Restaktivität gegen PpNp (3.3.7.1) nach Rücksprung unter Nativbedingungen. Dazu wurden den Entfaltungsansätzen nach verschiedenen Inkubationszeiten Aliquote entnommen. Diese wurden bei der Temperatur-induzierten Entfaltung schnell auf Eis abgekühlt bzw. bei der GdnHCl- bzw. Harnstoff-induzierten Entfaltung auf unter 20 mM GdnHCl bzw. 1 M Harnstoff verdünnt und für die Bestimmung der Restaktivität verwendet.

### 3.3.8 Analytische Gelfiltration

Die Gelfiltration wurde mit einer Superdex<sup>®</sup> 200 HR 10/30 *fast-performance-liquid-chromatography* (FPLC)-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) an einer *high-performance-liquid-chromatography* (HPLC)-Anlage (Knauer, Berlin), die mit einer Niederdruckgradienten-Pumpe betrieben wurde, durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Die Flussrate betrug 0,5 ml·min<sup>-1</sup> mit 140 mM NaCl, 10 mM Na-Pipes, pH 7,0, als Laufpuffer. Die Probenlösungen wurden vor Applikation zentrifugiert (20 min, 21460 × g). Die Trennung im Bereich von etwa 200 bis 12 kDa erfolgte entsprechend der Beziehung:  $K_{av} \sim -\log(M_r)$ .

Die folgenden Säulenparameter wurden ermittelt:

Ausschlussvolumen (mit Dextranblau gemessen):  $V_0 = 7,3 \text{ ml}$

geometrisches Säulenvolumen:  $V_t = 29,2 \text{ ml}$

effektiver Verteilungskoeffizient:  $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$

mit Elutionsvolumen  $V_e = \text{Retentionszeit} \times \text{Flussgeschwindigkeit}$

### 3.3.9 Kristallisation der PLD2

Die Proteinkristallisation wurde nach der Methode der Gasphasendiffusion mit sitzendem Tropfen in 24-Well-Kristallisationsplatten (Cryscem™-Platten, Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) durchgeführt. Für einen ersten Screen wurden die Factorial Solutions (Abt. Huber, MPI, Martinsried, hergestellt von AG Physikalische Biotechnologie, MLU, Halle) mit 96 verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet. Dafür wurde 1 ml Kristallisationspuffer in das Reservoir pipettiert, der Tropfen aus gleichen Volumina (je 2  $\mu\text{l}$ ) Proteinlösung und Kristallisationspuffer gebildet und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Die Platten wurden nach dem Befüllen mit Klebefolie CrystallClear (JenaBioscience, Jena) luftdicht verschlossen und bei 22 °C inkubiert. Die Kristallisation wurde mit dem Mikroskop beobachtet und zur Dokumentation fotografisch aufgenommen.

Für die Optimierung wurden die Kristallisationspuffer rational und mit dem Programm Crystool 4.1 [194] variiert und die Lösungen entsprechend hergestellt und filtriert (0,2  $\mu\text{m}$ , WiCom, Heppenheim). Die PLD2-Konzentration wurde zwischen 3 und 8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  variiert.

Die mit dem Programm Crystool berechneten Kristallisationspuffer wurden in einer 96-Well-Kristallisationsplatte (Crystalquick Platten, Greiner Bio-One, Frickenhausen) unter Verwendung des Pipettierroboters PixSys 4200 SynQuad (Genomic Solutions®, Huntingdon, GB) angesetzt. In einem Well wurden 110  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung und je drei Tropfen (PLD2-Konzentration: 3,3; 5,5; 7,7  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) mit einem Tropfenvolumen von 0,6  $\mu\text{l}$  bei 15 °C inkubiert. Die Dokumentation erfolgte automatisch unter Verwendung des Oasis LS3 *Protein Crystal Imaging System* (Veeco, Mannheim).

## 3.4 Biophysikalische Methoden

Die Enzymlösung wurde vor Verwendung zentrifugiert (20 min, 21460  $\times g$ ). Es wurde ausschließlich in Quarzglasküvetten und wenn nicht anders vermerkt bei 20 °C gemessen. Der jeweiligen Dialysepuffer (10 mM Na-Pipes, pH 7,0, 3.3.1) wurde filtriert, entgast und als Referenz verwendet.



### 3.4.1 Analytische Ultrazentrifugation

Die Untersuchungen wurden an einer analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman Instruments, Fullerton, USA) mit Doppelsektorzellen (für Probe und Puffer) bei einer Proteinkonzentration von  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  und  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten erfolgte mittels Sedimentationslauf über 4 h. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte mittels Gleichgewichtslauf über 24-48 h. Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. H. Lilie (MLU, Halle) durchgeführt.

### 3.4.2 CD-Spektroskopie

Die Messungen wurden an einem Jasco J-810 Spectropolarimeter (Jasco Labor- und Datentechnik, Gross-Umstadt) bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Molare Elliptizität pro Aminosäurerest  $[\Theta]_{MRW}$  bzw. die Molare Elliptizität  $[\Theta]$  wurde nach Gleichung 4 bzw. 5 berechnet. Die numerische Beziehung zwischen  $\Delta\varepsilon$  und  $[\Theta]_{MRW}$  ist in Gleichung 6 angegeben. Die Proteinkonzentrationen sind bei den entsprechenden Abbildungen angegeben.

$$[\Theta]_{MRW} (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A} \quad (4)$$

$$[\Theta] (\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = \frac{\Theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d} \quad (5)$$

$$\Delta\varepsilon (\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}) = \frac{[\Theta]_{MRW}}{3298} \quad (6)$$

$[\Theta]_{MRW}$	Molare Elliptizität pro Aminosäurerest
$[\Theta]$	Molare Elliptizität
$\Delta\varepsilon$	Differenz der Molaren Absorption von links und rechts polarisiertem Licht
$\Theta$	Elliptizität (mdeg)
$M$	molekulare Masse des Proteins ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
$c$	Proteinkonzentration ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
$d$	Schichtdicke der Küvette (cm)
$N_A$	Anzahl der Aminosäurereste im Protein

### Nativspektren

Die CD-Spektren wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Integrationszeit von 1 s und einer Schrittweite von 0,1 nm aufgenommen. Bei einer Messgeschwindigkeit von  $20 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$  wurden 10 Einzelspektren akkumuliert. Für den Nah-UV Bereich (340 bis 250 nm) wurden volumenreduzierte, geschwärzte Quarzküvetten mit 1 cm Weglänge, für den Fern-UV Bereich (260 bis 180 nm) Quarzküvetten mit 0,01 cm Weglänge verwendet. Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt (3.3.3.2).

### CD-Spektroskopie unter denaturierenden Bedingungen

In Gegenwart von Harnstoff (0 bis 9 M) bzw. GdnHCl (0 bis 6 M) wurde die PLD2 in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, für 14 h inkubiert. Die CD-Spektren wurden wie oben beschrieben im Fern-UV Bereich (250 bis 200 nm) unter Verwendung einer 0,01 cm Quarzküvette aufgenommen.

Für die Säure-induzierte Entfaltung wurde die PLD2 (in 10 mM Na-Pipes) mit HCl auf pH 2,0 eingestellt und für 30 min inkubiert. Die CD-Spektren wurden wie oben beschrieben im Fern-UV Bereich (260 bis 180 nm) unter Verwendung einer 0,01 cm Quarzküvette aufgenommen.

Die PLD2 wurde in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bzw. in Gegenwart von 2,8 bis 3,0 M GdnHCl für die thermische Entfaltung eingesetzt. Die Entfaltung wurde bei 220 nm unter Verwendung einer 0,1 cm Quarzküvette mit einer Heizrate von 1 K·min<sup>-1</sup> von 20 bis 70 °C verfolgt. Außerdem wurden Fern-UV-CD-Spektren (250 bis 180 nm) wie oben beschrieben bei 60 °C aufgenommen.

In Gegenwart von 40 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 300 mM NaCl oder 100 mM MgCl<sub>2</sub> wurde die PLD2 in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, für 30 min inkubiert. Die CD-Spektren wurden im Nah- und Fern-UV Bereich wie oben beschrieben aufgenommen.

### Messung der Ca<sup>2+</sup>-Bindung

Für die Messung der Bindung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen wurde das Signal der PLD2 bei 280 nm in 50 mM Na-Acetat, pH 5,5, über 5 min gemessen. Anschließend wurde schrittweise CaCl<sub>2</sub> zugegeben und wiederum das Signal bei 280 nm für 5 min gemessen. Der Verdünnungsfaktor durch die Ca<sup>2+</sup>-Zugabe wurde berücksichtigt.

### 3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Messungen wurden an einem FluoroMax-2<sup>®</sup> bzw. FluoroMax-3<sup>®</sup> mit Peltierelement (Horiba Jobin Yvon, München) unter Verwendung von 1 cm × 4 mm Fluoreszenzküvetten (teilweise rührbar, Hellma, Müllheim) durchgeführt.

### Fluoreszenzspektren

Für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurde als Anregungs- und Emissionsspalt jeweils 5 nm und als Schrittweite 1 nm bei einer Integrationszeit von 1 s gewählt. Die Anregung erfolgte bei 278 nm (Tryptophan und Tyrosin) bzw. 295 nm (selektiv Tryptophan). Zu jeder Probe wurde ein Pufferspektrum aufgenommen und zur Korrektur von dem Probenspektrum abgezogen.

Für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei verschiedenen pH-Werten wurden die unter Punkt 3.3.7.2 beschriebenen Puffer verwendet, die PLD2 (0,1  $\mu\text{M}$ ) für 14 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Emissionsspektren aufgezeichnet.

### Aufnahme chemisch-induzierter Übergangskurven

Zur Messung von chemisch-induzierten Übergangskurven wurde die PLD2 (6,25 bis 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) in GdnHCl (0 bis 6 M) bzw. Harnstoff (0 bis 10 M) und den entsprechenden Pufferbedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Messung der Fluoreszenzspektren wurde die genaue Denaturanskonzentration refraktometrisch nach Gleichung 7 bzw. 8 [200] bestimmt.  $\Delta N$  entspricht der Differenz des Brechungsindex mit und ohne Denaturans.

$$[\text{GdnHCl}] \text{ (M)} = 57,147 \cdot (\Delta N) + 38,68 \cdot (\Delta N)^2 - 91,6 \cdot (\Delta N)^3 \quad (7)$$

$$[\text{Harnstoff}] \text{ (M)} = 117,66 \cdot (\Delta N) + 29,753 \cdot (\Delta N)^2 + 185,56 \cdot (\Delta N)^3 \quad (8)$$

Für die Bestimmung der Denaturans-induzierten Übergangskurven wurde die Verschiebung des Wellenlängenmaximums aufgetragen und der betreffende Konzentrationsbereich nach einem Zweizustandsmodell [188] unter Verwendung von Gleichung 9 [68] mittels nicht-linearer Regression angepasst. Die Fraktion des nativen Proteins ( $f_N$ ) wurde nach Gleichung 10 berechnet.

$$y = \frac{(y_n + m_n \cdot [D]) + (y_d + m_d \cdot [D]) \cdot e^{-\frac{m \cdot ([D]_{\frac{1}{2}} - [D])}{R \cdot T}}}{1 + e^{-\frac{m \cdot ([D]_{\frac{1}{2}} - [D])}{R \cdot T}}} \quad (9)$$

$$f_N = \frac{y - (y_d + m_d \cdot [D])}{(y_n + m_n \cdot [D]) - (y_d + m_d \cdot [D])} \quad (10)$$

$y$	Signal des Proteins (Wellenlängenmaximum)
$y_n, y_d$	Signal des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins in Abwesenheit von Denaturans
$m_n, m_d$	Anstieg des Signals des nativen bzw. denaturierten Zustands des Proteins in Abhängigkeit von der Denaturanskonzentration
$[D]$	Denaturanskonzentration
$[D]_{\frac{1}{2}}$	Denaturanskonzentration im Übergangsmittelpunkt
$m$	Anstieg der freien Enthalpie in Abhängigkeit von der Denaturanskonzentration (Kooperativität)
$R$	Allgemeine Gaskonstante
$T$	Temperatur (K)

### Acrylamid-Quenchen

Die Lösungsmittelzugänglichkeit der Tryptophanreste wurde mittels Acrylamid-Quenchen untersucht. Dabei wurde die PLD2 (0,5  $\mu\text{M}$ ) mit den entsprechenden Zusätzen in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei 20 °C inkubiert (jeweils die für die jeweilige Denaturanskonzentration entsprechende Zeit,  $5 \times \tau$ , Relaxationszeit  $\tau = \frac{1}{k}$ ). In

einer 1 cm × 1 cm Küvette (mit Sternrührer) wurden 2 ml Enzymlösung eingesetzt, ein Emissionsspektrum bei einer Anregung von 295 nm aufgenommen, und dann schrittweise Acrylamid (5,82 M Stammlösung) zugegeben und wiederum ein Spektrum aufgenommen. Bei der Auswertung wurde der Verdünnungsfaktor durch das Acrylamid berücksichtigt. Die Daten wurden nach Gleichung 11 (Stern-Volmer-Auftragung [57]) und Gleichung 12 (Auftragung nach Lehrer [124]) angepasst.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV} \cdot [\text{Acrylamid}]) \cdot e^{V \cdot [\text{Acrylamid}]} \quad (11)$$

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f \cdot K_{eff} \cdot [\text{Acrylamid}]} + \frac{1}{f} \quad (12)$$

$F_0$	Ausgangsfluoreszenz
$F$	Fluoreszenz bei entsprechender Acrylamid-Konzentration
$K_{SV}$	Stern-Volmer-Konstante (dynamisch)
$V$	statische Quench-Konstante
$K_{eff}$	effektive Quench-Konstante
$[\text{Acrylamid}]$	Acrylamidkonzentration
$f$	Tryptophananteil, der dem Quencher bei niedrigen Konzentrationen zugänglich wird

### Kinetische Messungen

Für kinetische Messungen der chemisch- oder thermisch-induzierten Entfaltung wurde mit einer Anregung bei 278 nm die Emission bei 335 und 355 nm detektiert. Die Spaltbreite für die Anregung war 1 nm, für die Emission 10 nm. Die Integrationszeit lag bei 0,05 bis 1 s. Zusätzlich wurde die automatische Spektrenaufnahme (*batch-scan*) der Datamax-Software genutzt, wobei die Spaltbreiten wie oben stehend verändert wurden. Die Emission wurde von 320 bis 370 nm aufgezeichnet und die Verzögerungszeiten der Spektren variiert.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Daten entsprechend der Anzahl der auftretenden Phasen nach einer einfach- bzw. doppelt-exponentiellen Gleichung (13) angepasst, wobei  $S$  das Signal,  $A$  und  $B$  die jeweiligen Amplituden der Faltungsreaktion,  $C$  der Endpunkt und  $k$  bzw.  $k_1$  und  $k_2$  die Geschwindigkeitskonstanten darstellen.

$$S = A \cdot e^{-kt} + C \quad \text{bzw.} \quad S = A \cdot e^{-k_1 t} + B \cdot e^{-k_2 t} + C \quad (13)$$

### Thermische Entfaltung

Für thermisch-induzierte Übergangskurven wurde die Entfaltung der Probe mittels einer Kinetik oder eines *batch-scan* verfolgt. Die Heizrate (1 – 1,2 K·min<sup>-1</sup>) und die Äquilibrierungszeit (0 bis 30 s) wurden variiert. Für die Auswertung wurde das Wellenlängenmaximum bzw. die sich proportional verhaltende Differenz der Fluoreszenzemissionen bei 335 nm (natives Protein) und 355 nm (denaturiertes Protein) gegen

die Temperatur aufgetragen. Die Auswertung erfolgte durch nicht-lineare Regression nach der für das reversible Zweizustandsmodell gültigen Gleichung 14 [220] und wurde ausschließlich zur Bestimmung der Temperatur im Übergangsmittelpunkt genutzt.

$$y = \frac{(y_n + m_n \cdot T) + (y_u + m_u \cdot T) \cdot e^{\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}}}{1 + e^{\frac{\Delta H_m}{R \cdot T} \cdot \frac{T - T_m}{T_m}}} \quad (14)$$

$y$	Signal des Proteins (Emissionsmaximum bzw. Fluoreszenzdifferenz)
$y_n + m_n \cdot T$	Anstieg des Signal des nativen Zustands des Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur
$y_u + m_u \cdot T$	Anstieg des Signal des denaturierten Zustands des Proteins in Abhängigkeit von der Temperatur
$T$	Temperatur (K)
$T_m$	Temperatur im Übergangsmittelpunkt
$\Delta H_m$	Enthalpie bei $T_m$
$R$	Gaskonstante

#### 3.4.4 Stopped-flow Fluoreszenzspektroskopie

Die *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie wurde unter Verwendung eines BioSequential DX.17 MV *stopped-flow* Spektrometers (Applied Photophysics, Leatherhead, GB) bei 20 °C durchgeführt. Die Integrationszeit betrug 370  $\mu$ s und die Spaltbreite 5 nm. Die Anregung erfolgte bei 278 nm. Das Probenvolumen betrug 150  $\mu$ l. Die Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung durch PD Dr. R. Golbik (MLU, Halle) durchgeführt.

Zur Verfolgung von Entfaltungsreaktionen von PLD2 wurde die Verschiebung und Abnahme der Fluoreszenzemission unter Verwendung eines 305 nm *cut-off* Filters detektiert. In einem typischen Experiment wurden 2 bis 4 Einzelerperimente gemittelt. Das Probenvolumen betrug 150  $\mu$ l, die Endkonzentration der PLD2 25  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>, wobei ein Volumen Protein mit 10 Volumen Puffer (1,98 – 5,5 M GdnHCl in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5) gemischt wurden.

PLD2 (340  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>) wurde zur vollständigen Entfaltung für 14 h in Gegenwart von 4 M GdnHCl in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Rückfaltung wurde durch Mischen von einem Volumen Protein mit 10 Volumen Puffer (0 – 2,94 M GdnHCl, 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5) induziert.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Rückfaltung des ersten Entfaltungsschritts wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt. Dabei wurde die Entfaltung von PLD2 durch Mischen eines Volumens PLD2-Lösung (0,7 mg·ml<sup>-1</sup> in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0) mit einem Volumen 2 M GdnHCl in 50 Na-Acetat, pH 5,5, induziert. Nach bestimmten Zeiten (100 bzw. 200 s) wurde die Faltung durch Mischen

eines Volumens dieser Lösung mit 10 Volumen Puffer (0 – 110 mM GdnHCl, 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5) gestartet.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurden die Daten entsprechend der Anzahl der auftretenden Phasen nach einer einfach- bzw. doppelt-exponentiellen Gleichung 13 angepasst.

### 3.4.5 Röntgenkleinwinkelstreuung

Zur Formabschätzung des PLD2-Moleküls wurden Röntgenkleinwinkelstreuexperimente mit Synchrotronstrahlung durchgeführt. Die Messungen wurden am Messplatz X33 des EMBL (Außenstelle Hamburg) im HASYLAB am DESY bei einer Wellenlänge von 1,5 Å, einer Kameralänge von 2 m und 12 °C realisiert. Es wurde eine *image plate* als Detektor (Marresearch, Norderstedt) verwendet. Das Protein wurde mit einer Konzentration von 2 bis 4,7 mg·ml<sup>-1</sup> in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0, vermessen. Die Kalibrierung der Streuvektorachse (s) erfolgte mit Kollagen aus Truthahnsehne (d = 65 mm) bzw. Tripalmitat (d = 4,05 mm). Für die Auswertung wurden die in Tab. 3.2 beschriebenen Programme verwendet.

Die Durchführung und Auswertung der Messungen übernahm freundlicherweise PD Dr. S. König (MLU, Halle).

**Tabelle 3.2:** Verwendete Programme zur Auswertung der Röntgenkleinwinkelstreuungsdaten. Unter <http://www.embl-hamburg.de/ExternalInfo/Research/Sax/software.html> sind die verwendeten Programme frei zugänglich..

PRIMUS	Subtraktion des Detektorrauschens und der Pufferstreuung, Prozessierung der Primärdaten [115]
GNOM	Berechnung der Streuparameter $I(0)$ und $R_G$ [217]
DAMMIN	<i>ab initio</i> Formabschätzung [218]

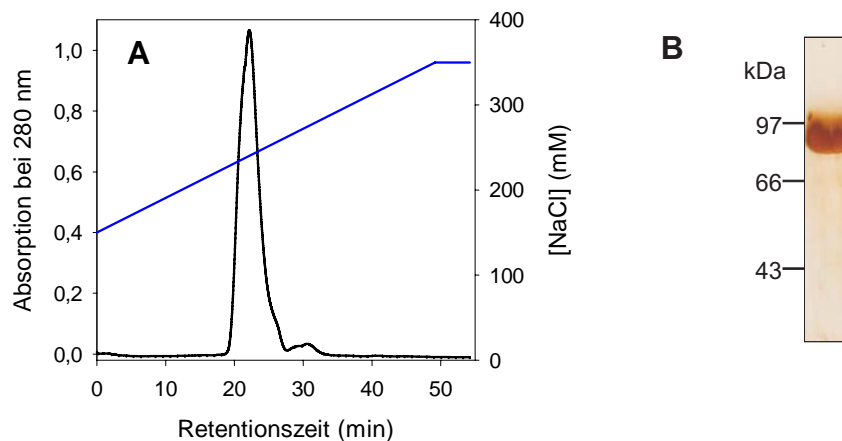
## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Strukturbestimmung der PLD2

Funktionsweise und Eigenschaften pflanzlicher PLD könnten durch die Kenntnis der Raumstruktur der PLD2 besser verstanden werden. Die Proteinstruktur kann durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Die Strukturaufklärung mittels NMR wäre trotz des hohen Molekulargewichts möglich [242], scheitert aber an der benötigten hohen Probenkonzentration (möglichst 1 mM, 92 mg·ml<sup>-1</sup>). Mittels Röntgenstrukturanalyse kann unter Verwendung von hochgeordneten Proteinkristallen sogar der molekulare Aufbau von größeren Proteinkomplexen ermittelt werden [16]. Aussagen über die äußere Proteinform und den Oligomerisierungsgrad sind mittels Röntgenkleinwinkelstreuung möglich [114, 219], wobei auch hierfür hochkonzentrierte Proteinlösungen notwendig sind. Da sowohl für die Proteinkristallisation als auch für die Röntgenkleinwinkelstreuung die Reinheit und Homogenität der verwendeten Proteinprobe essenziell ist, wird zuerst die PLD2-Präparation beschrieben.

#### 4.1.1 Herstellung der PLD2

Die Expression [190] und Reinigung [2, 122, 190] der PLD2 erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Im ersten Reinigungsschritt erfolgt die Anreicherung der PLD2 aus dem Rohextrakt mittels Ca<sup>2+</sup>-vermittelter HIC an Octyl-Sepharose. Für die darauffolgende Anionenaustauschchromatographie wurde das Säulenmaterial gewechselt (SourceQ<sup>TM</sup>15S anstatt MonoQ<sup>TM</sup> wie in [2] beschrieben). Ein typisches Chromatogramm der Reinigung ist in Abb. 4.1A dargestellt. Die PLD2 konnte bis zur Homogenität ge-



**Abbildung 4.1:** Reinigung der PLD2.

**A:** Elutionsprofil der Reinigung der PLD2 an einer SourceQ<sup>TM</sup>-Säule (3.3.1). Der NaCl-Gradient ist blau dargestellt. **B:** SDS-PAGE (Silberfärbung) der gereinigten PLD2.

reingt werden (Abb. 4.1B), wobei pro Liter Bakterienkultur 3,5 bis 5,0 mg gereinigte PLD2 mit einer spezifischen Aktivität von 10,2 bis 14,7 U·mg<sup>-1</sup> gegenüber dem Substrat PpNp erhalten wurde. Dieser Wert stimmt gut mit den in der Literatur angegebenen Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten für rekombinante PLD2 aus Weißkohl überein (10 bis 12,5 U·mg<sup>-1</sup> (Substrat PpNp); 2,8 mg pro Liter Kulturmedium) [190, 193]. Eine alternative Expressions- und Reinigungsstrategie unter Verwendung eines anderen Expressionsvektors (pET28B), Induktion mit IPTG und veränderter Reihenfolge der Reinigungsschritte führt zu ähnlichen spezifischen Aktivitäten (13,5 U·mg<sup>-1</sup>, Substrat PpNp), allerdings mit sehr geringen Ausbeuten (110 µg pro Liter Kulturmedium) [128].

#### 4.1.2 Röntgenkleinwinkelstreuung

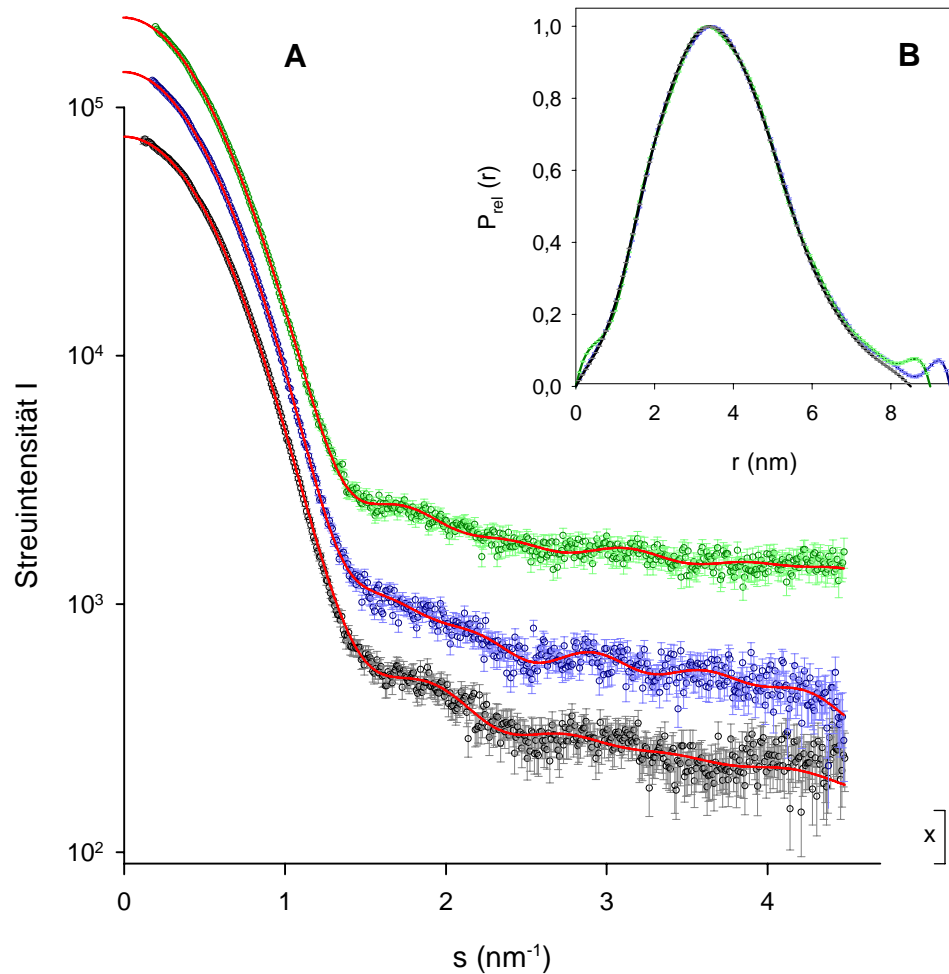
Die PLD2 konnte mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. Für diese Messungen ist im Gegensatz zur Röntgenkristallstrukturanalyse kein hochgeordneter Kristall sondern lediglich eine Konzentrierung des Proteins auf 5 mg·ml<sup>-1</sup> notwendig. Die Streuintensität  $I$  der Probe in Abhängigkeit vom Streuvektor  $s$  ermöglichte die Berechnung eines niedrigauflösenden dreidimensionalen Modells der PLD2. Die Messungen wurden wie in 3.4.5 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. In Abb. 4.2A sind Beispiele für experimentell erhaltene Streudaten der PLD2 sowie die mit dem Programm GNOM [217] angepassten Streukurven dargestellt. Die ermittelten Parameter sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Die Streuparameter  $\frac{I(0)}{[PLD2]}$  (auf den Streuwinkel 0 extrapolierte Streuintensität, bezogen auf die Proteinkonzentration) und  $R_G$  (Gyrationsradius (Streumassenradius); 2,870 ± 0,015 nm) verändern sich im untersuchten Konzentrationsbereich nur wenig. Die ermittelten molekularen Massen (95 bis 99 kDa) stimmen sehr gut mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten Wert von 91,942 kDa überein, so dass mit diesen Messungen gezeigt werden konnte, dass die PLD2 unter diesen Bedingun-

**Tabelle 4.1:** Aus den Messdaten ermittelte Streuparameter der PLD2.

Die Berechnung erfolgte mit dem Programm GNOM. Die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bestimmt. Die molekulare Masse wurde unter Verwendung von BSA als Standard berechnet.

[PLD2] (mg·ml <sup>-1</sup> )	$I(0)$	$R_G$ (nm)	$\frac{I(0)}{[PLD2]}$	$M$ (kDa)
4,70	82745 ± 83	2,930 ± 0,004	17610	98
4,70	83430 ± 98	2,910 ± 0,004	17750	99
4,30	75890 ± 76	2,850 ± 0,003	17650	99
2,15	36595 ± 97	2,840 ± 0,009	17020	95
2,00	34470 ± 107	2,830 ± 0,010	17240	96



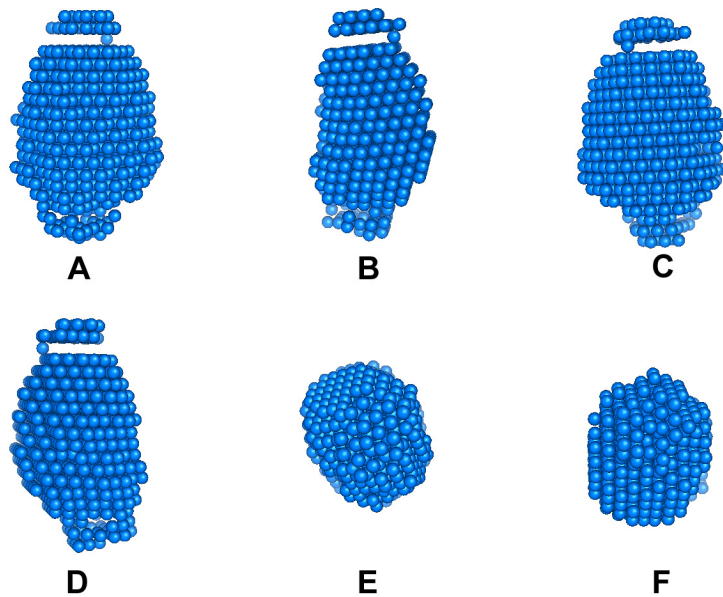


**Abbildung 4.2:** Streukurven und Abstandsverteilungsfunktion der PLD2.

**A:** Experimentelle Streudaten ( $\circ$ ) und die vom Programm GNOM angepassten Streukurven ( $—$ ) bei einer PLD2-Konzentration von 4,3 (grün) bzw. 4,7  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (blau und schwarz). Zur besseren Darstellung sind die unterschiedlichen Datensätze um  $x$  nach oben verschoben abgebildet. **B:** Aus den Streukurven erhaltene Abstandsverteilungsfunktionen (relative Population  $P_{rel}$  in Abhängigkeit vom Radius  $r$ ).

gen monomer vorliegt. Ein minimaler Anteil an Aggregaten wird bei den Abstandsverteilungsfunktionen durch die Schulter bei größerem Radius deutlich (Abb. 4.2B). Die maximale Ausdehnung des Moleküls beträgt somit etwa 8 nm.

Durch Überlagerung von 10 mit dem Programm DAMMIN [218] berechneten Modellen entstand ein Strukturmodell der PLD2 (Abb. 4.3). Allen 10 Modellen ist eine längliche Form gemein, die basal und apikal lockerer strukturiert scheint. Der besonders interessante deckelähnliche Bereich war nicht in allen Modellen sichtbar, könnte aber auf die Lage der C2-Domäne hinweisen. Anhand der Formabschätzung ergibt sich ein Porod-Volumen (Volumen eines hydratisierten gelösten Partikels in einer homogenen Lösung, abhängig von  $I(0)$  und  $Q$  (Porod-Variable) [171]) von  $126,7 \pm 3,5 \text{ nm}^3$ . Geht man jedoch von einem partiellen spezifischen Volumen eines Proteins von  $0,73 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$  aus [88], so hat ein PLD2-Molekül ein Volumen von  $111,45 \text{ nm}^3$ , die separate C2-Domäne (vgl. 4.2) ein Volumen von  $20,68 \text{ nm}^3$  und das Volumen des verbleibenden Proteinteils (A154 bis T812) beträgt  $90,79 \text{ nm}^3$ . Das Volumen des deckelähnlichen



**Abbildung 4.3:** Formabschätzung der PLD2.

Dargestellt ist ein Strukturmodell der PLD2 (jeweils um  $90^\circ$  gedreht (A, B, C, D) bzw. von oben (E) und unten (F)), welches aus 10 mit dem Programm DAMMIN *ab initio* berechneten Modellen überlagert wurde. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMOL erstellt [47].

Bereichs ist zu klein, um mindestens 16 % des Moleküls auszumachen, und kann somit nicht der separaten C2-Domäne zugeordnet werden. Der locker strukturierte Bereich am basalen Ende des Modells könnte der C2-Domäne entsprechen, welche somit stark mit dem Restmolekül in Wechselwirkung tritt. Die Auflösung ist nicht ausreichend, um die Grenzen weiterer Domänen zu erkennen.

Bei dem deckelähnlichen Bereich könnte sich um den C-terminalen Abschnitt des Proteins handeln. Vergleicht man die Position des zweiten HKD-Motivs in der Primärstruktur der PLD2 mit der der *S. species* PLD (Abb. 2.7) und geht man von einer ähnlichen Faltung der beiden die HKD-Motive enthaltenden Domänen aus, so wird ersichtlich, dass der C-terminal liegende Bereich der PLD2 wesentlich länger ist. Innerhalb dieses längeren C-Terminus wird entsprechend dem Strukturmodell eine weitere separat liegende C-terminale Domäne angenommen, die für die Aktivität des Enzyms wichtig zu sein scheint, da eine Verkürzung der Sequenz zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt [128]. Die Aktivität von Austauschmutanten (Austausch des C-terminalen Aminosäurerests) ist für alle aktiv erhaltenen Proteine in der gleichen Größenordnung [128], was gegen einen direkten Einfluss auf die Katalyse spricht. Vielmehr scheint die Faltung der Domäne bzw. der gesamten PLD2 beeinflusst.

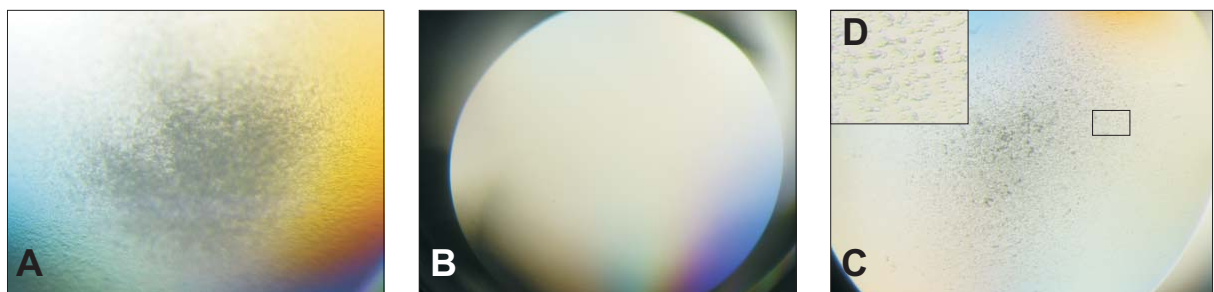
Es ist jedoch auch möglich, dass es sich bei dem deckelartigen Bereich um eine separate Domäne handelt, die weder am C- noch am N-Terminus des Proteins liegt. Denkbar wäre hier die von Zheng *et al.* [252] beschriebene phosphatidylinositolbindende Domäne.

Betrachtet man die von einer Kugel ausgehenden Streuparameter, so ergibt sich aus dem Gyrationradius ein Volumen von  $99 \text{ nm}^3$ . Ausgehend von der Abstandsverteilung (Radius 4 nm) beträgt das Volumen  $268 \text{ nm}^3$  und liegt damit deutlich höher als das berechnete theoretische Proteinvolumen ( $111,45 \text{ nm}^3$ ). Da auch das Porod-Volumen größer ist, deutet dies auf lockere Strukturbereiche innerhalb der PLD2 hin.

#### 4.1.3 Versuche zur Kristallisation der PLD2

Mit der Gewinnung hochreiner PLD2 in ausreichenden Mengen eröffnete sich die Möglichkeit, dieses Protein zu kristallisieren. Deshalb wurden in einem ersten Versuch mit Hilfe der Factorial Solutions (3.3.9) nach den Basisbedingungen gesucht. Dabei zeigte sich, dass eine eingesetzte Proteinkonzentration von  $8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ausreichend ist, da nach dem Ansetzen noch über 80 % der Tropfen, aber nach 2 Wochen jedoch lediglich 5 % der Tropfen klar waren. Die langsame Aggregation bei 75 % der Versuche führte auch zu Mischungen von Aggregaten und Mikrokristallen (Abb. 4.4). Zweiwertige Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), pH-Werte unter 5,0 bzw. über 9,0 und Isopropanol führten zu starker und schneller Präzipitation. Präzipitationshemmend wirkten sich geringe Konzentrationen verschiedener Salze (unterhalb von 0,3 M) und nichtionische Additive (2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) und PEG bis 30 % (w/v)) aus. Im Gegensatz dazu führten Konzentrationen von 30 % PEG und 0,2 M Salz zu einem Gleichgewicht zwischen Präzipitation und Mikrokristallbildung. Bei der Verwendung von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Na-Citrat in hohen Konzentrationen ( $>1,2 \text{ M}$ ) konnten bei 9 von 10 Ansätzen Mikrokristalle beobachtet werden (Abb. 4.4C und D).

Diese ersten Ergebnisse wurden in weiteren Versuchen bestätigt. Für die Bildung von Mikrokristallen scheint  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , unabhängig vom pH-Wert, sehr günstig zu sein. Die Kristallisation der PLD aus *Streptomyces species* (Stamm PMF) gelang in 0,2 M  $\text{NH}_4$ -Acetat, 30 % PEG 4000, 0,1 M Citrat/Phosphat, pH 5,4, bzw. 0,2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,



**Abbildung 4.4:** Exemplarische Ergebnisse der ersten Kristallisierungsversuche der PLD2 mit Hilfe der Factorial Solutions (3.3.9).

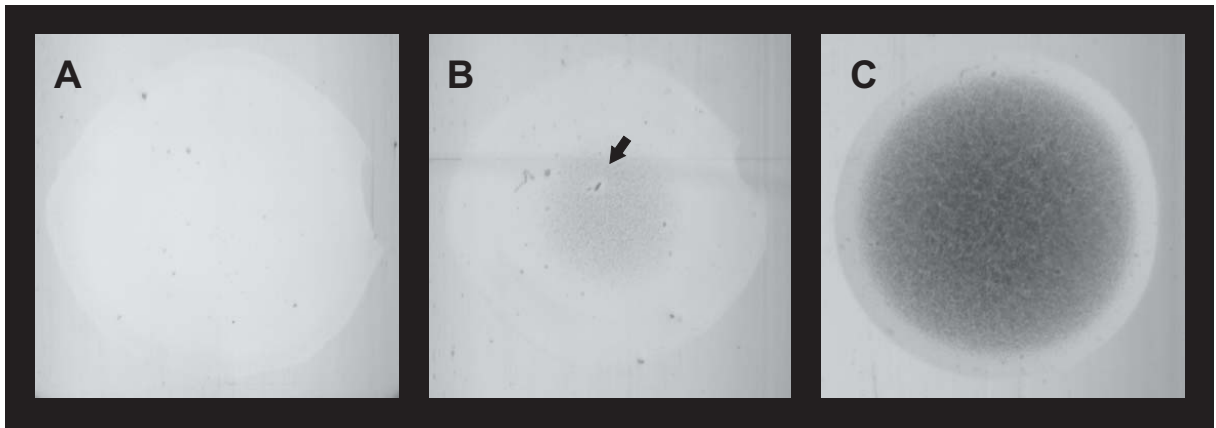
Die Aufnahmen wurden nach 4 Wochen Inkubation bei  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  gemacht. Die Mehrzahl der Tropfen zeigte Aggregation (A), etwa 5 % blieben klar (B). In einigen Ansätzen waren Mikrokristalle (C) erkennbar. Insert D stellt den in C markierten Bereich vergrößert dar.

30 % (w/v) PEG 4000, 0,1 M Na-Acetat, pH 5,4, bei einer Proteinkonzentration von  $12 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  [125]. In die Kristalle wurde das Schwermetall-Derivat Natriumwolframat eingefügt, und die erste PLD-Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmt [127]. Die Kristallisation der Augenbohnen-PLD in 1,6 – 1,7 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 M NaCl, 0,1 M Imidazol, pH 8,5, bei einer Proteinkonzentration von  $4,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  ist die einzige weitere Publikation auf diesem Gebiet [1]. Es zeigt sich, dass die bisher günstigsten Bedingungen zur Kristallisation der PLD2 den bisher publizierten sehr stark ähneln. Der erfolgreichen Kristallisation der Augenbohnen-PLD im Jahr 2000 folgte aber bis heute keine Kristallstruktur, da wahrscheinlich keine Kristalle mit Schwermetallderivaten gewonnen werden konnten.

Bei den folgenden Experimenten (Tab. 4.2) wurde durch Variation des pH-Wertes, der Pufferzusammensetzung sowie der  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - und PLD2-Konzentration versucht, Mikrokristalle ohne Aggregate zu erhalten bzw. zu vergrößern. Die erhaltenen Ergebnisse waren nicht zufriedenstellend, da keine größeren Kristalle sowie weiterhin auch Aggregate erhalten wurden. Um ein breiteres Spektrum an Bedingungen testen zu können, wurden mit dem Programm Crystool 4.1 [194] 96 verschiedene Lösungen generiert, bei denen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit anderen Präzipitantien variiert wurde (Tab. 4.2). Außerdem wurde der Einfluss von Calciumionen untersucht. Die Verwendung verschiedener Proteinkonzentrationen zeigte, dass bei  $3,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  PLD2 fast keine Präzipitate auftraten (Abb. 4.5A). Bei  $5,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  PLD2 und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen zwischen 1,7 und 2,1 M entstanden schnell große Aggregate, die ihrer Umgebung Mikroaggregate entzogen (Hofbildung, Pfeil Abb. 4.5B). Bei  $7,7 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  PLD2 war in der Mehrzahl der Ansätze schnell sehr starke Präzipitation zu beobachten (Abb. 4.5C). Calciumionen führten ebenfalls zu starker Präzipitation. Die Verwendung von PEG

**Tabelle 4.2:** Zusammenstellung der variierten Parameter für die weiteren Kristallisationsversuche. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen wurde rational kombiniert oder mit dem Programm Crystool 4.1 zufällig berechnet.

Parameter	Variation
Puffer (je 0,1 M)	Na-Acetat, Na-Citrat, Na-Pipes, Na-Hepes, Na-Mes, Tris/HCl, Tris/Maleat, Na-Imidazol, Imidazol/Maleat
pH-Wert	4,5 bis 9,0 (schrittweise 0,2 bis 0,5)
Salze als Präzipitant (0,5 bis 3 M)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $(\text{NH}_4)$ -Acetat, $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , NaCl
nicht ionische Präzipitantien (10 bis 60 %)	MPD, PEG 400, PEG 4000, PEG 6000, PEG 10000
Salze als Zusätze (<0,5 M)	$\text{CaCl}_2$ , Ca-Acetat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
weitere Additive (<10%)	Glycerol
PLD2-Konzentration	3,3 bis $8 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Temperatur	15 °C, 22 °C



**Abbildung 4.5:** Ergebnis weiterer Kristallisierungsversuche der PLD2.

Die Aufnahmen wurden nach 12 Tagen Inkubation bei 15 °C gemacht. Die Tropfen wurden aus jeweils einem Teil Puffer (2,01 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris/Maleat, pH 6,0) und einem Teil PLD2-Lösung (Proteinkonzentration: **A** - 3,3  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , **B** - 5,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  bzw. **C** - 7,7  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) gebildet. Der Pfeil zeigt die Hofbildung um ein größeres Aggregat.

oder MPD als Präzipitantien erwies sich als weniger günstig, da entweder keine oder starke Präzipitate entstanden.

Die bisherigen Experimente zeigen, dass eine Kristallisation möglich sein sollte. Vor weiteren *random screens* könnte die Durchführung eines *grid screen* zur Bestimmung der Konzentrationsbereiche für Präzipitantien und PLD2 sowie günstiger Puffer und pH-Werte sinnvoll sein [18, 19]. Außerdem sollten insbesondere andere Salze in Verbindung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in Analogie zur Kristallisation der Augenbohnen-PLD [1] getestet werden.

## 4.2 Herstellung und Charakterisierung von Enzymfragmenten der PLD2

### 4.2.1 Auswahl der Fragmente

Die Ergebnisse der vorangegangenen Diplomarbeit indizierten die Existenz von Intermediaten bei der Entfaltung der PLD2, woraufhin eine getrennte Entfaltung der einzelnen Domänen des Proteins vermutet wurde [91]. Um die verschiedenen Entfaltungsübergänge der einzelnen Domänen der PLD2 zu analysieren, ist es denkbar, dass Protein in seine Domänen zu zerlegen und deren Entfaltung separat zu untersuchen. So können mit der separaten Entfaltung einzelner Fragmente bzw. Domänen des Proteins deren Einfluss auf die Stabilität untersucht und die komplexen Entfaltungsvorgänge aufgeschlüsselt werden.

Für die Gewinnung einzelner Fragmente sind zwei Möglichkeiten denkbar. Auf der einen Seite kann das Protein einer enzymatischen Spaltung durch Proteasen oder einer chemischen Spaltung z.B. durch BrCN unterzogen werden. Die entstehenden Fragmente müssen anschließend identifiziert und angereichert werden. Diese Methode ist für die Identifizierung einzelner Domänen sehr gut geeignet und bei der Untersuchung nicht rekombinant gewonnener Proteine sehr erfolgreich [93, 224]. Durch rekombinante Expression besteht jedoch die alternative Möglichkeit, einzelne Enzymteile separat zu exprimieren, ohne den Umweg über die vorherige Gesamtproteinherstellung, Fragmentidentifikation und -reinigung zu gehen [105]. Mit dieser Methode können mittels limitierter Proteolyse identifizierte oder rational entworfene Fragmente untersucht werden.

Die Untersuchung der Primärstruktur der PLD2 mittels Blastp ergab das Vorhandensein einer C2-Domäne sowie zweier weiterer Domänen, welche jeweils ein HKD-Motiv enthalten. Die N-terminal gelegene C2-Domäne ist in der Literatur als eigenständig faltende Proteindomäne beschrieben [43] und sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit separat hergestellt werden. Da beide HKD-Motive ein aktives Zentrum bilden [127], sollte zudem dieser Teil ohne die N-terminale C2-Domäne gewonnen werden.

Erste Studien mittels limitierter Proteolyse von rekombinanter PLD2 aus Weißkohl zeigten, dass das Protein bereits im nativen Zustand sehr schnell und vollständig von verschiedenen Proteasen abgebaut wird (Trypsin, Chymotrypsin) [247]. In Gegenwart von Thermolysin konnten bei 20- bis 40fachem Überschuss der PLD2 transient Fragmente erhalten (Abb. 4.31), die primären Schnittstellen identifiziert und der Primärstruktur zugeordnet werden [247]. Sie liegen innerhalb der vermutlichen C2-Domäne (Position 40-41) bzw. inmitten der ersten wahrscheinlich für die Aktivität verantwort-

lichen Domäne (Pos. 323-324), 10 Aminosäurereste vor dem ersten HKD-Motiv (vgl. Abb. 2.7). Aminosäureaustausche an der zweiten Schnittstelle führten zu weiter N-terminal gelegenen Primärschnittstellen (Pos. 287-288 und 319-320). Außerdem wurde eine Schnittstelle am C-Terminus identifiziert (Pos. 798-799) [247]. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es sich jeweils um flexible Loopregionen handelt. Die aus dem Weißkohl isolierte PLD war von den Proteasen *Achromobacter* Lysyl Endopeptidase und *Staphylococcus aureus* V 8 Protease an über die gesamte Primärstruktur verteilten unterschiedlichen Schnittstellen angreifbar, die ebenfalls besonders flexiblen Loopregionen zugeordnet wurden [238].

Die Betrachtung der bisherigen Proteolysestudien an PLD führte zu dem Schluss, dass eine Präparation der einzelnen Domänen mittels limitierter Proteolyse wahrscheinlich nicht möglich ist. Zur Identifizierung der Domänengrenzen wurde ein multiples Alignment der C2-Domäne der PLD2 im Vergleich mit C2-Domänen pflanzlicher PLD $\alpha$  und anderer PLD-Typen und C2-Domänen mit bereits bekannter Struktur angefertigt (Abb. 4.6). Hierzu wurden die Proteinkinase C $\delta$  (Ratte), die humane cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> und die Phospholipase C $\delta$  (Ratte) ausgewählt, da deren C2-Domänen die gleiche Faltungstopologie (Topologie II, 2.2.4) aufweisen [170].

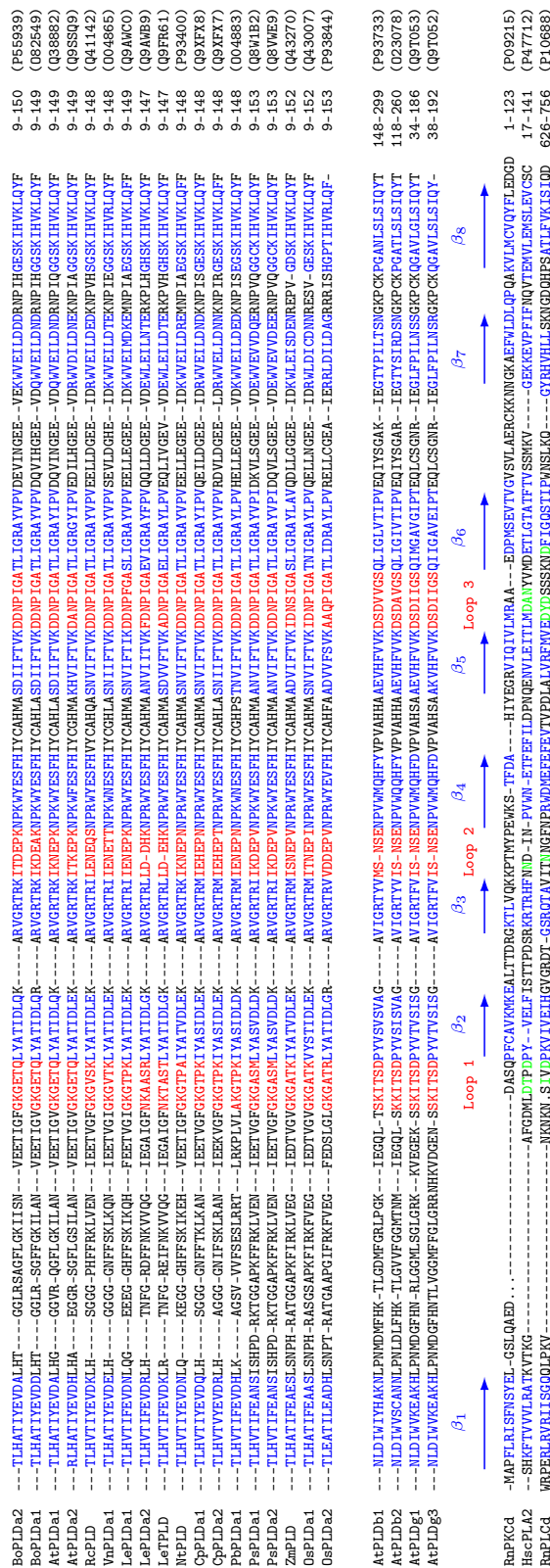
In Anlehnung an Zheng *et al.* und deren Untersuchungen der *A. thaliana* PLD $\alpha$  [251] wurde für die C2-Domäne der Weißkohl PLD2 der Aminosäurebereich G8 - E153 und für den verbleibenden Proteinteil, im Folgenden als PLD2-Rumpfprotein bezeichnet, der sich anschließende Aminosäurebereich A154 - T812 ausgewählt.

Für PLD $\beta$  aus *A. thaliana* [165] wurden ebenfalls Fragmentstudien durchgeführt, wobei aber eine Sequenzidentität von nur 43 % zwischen beiden Proteinen auf größere strukturelle Unterschiede weist. Das Protein besitzt ebenfalls eine N-terminale C2-Domäne (Pos. 18 bis 163). Diese wurde wie auch der verbleibende dem PLD2-Rumpfprotein entsprechende Teil PLD $\beta$ -cat (Pos. 158 bis 829) mittels N-terminaler GST-Fusion löslich und in großen Mengen exprimiert [252].

#### 4.2.2 Auswahl und Herstellung der Expressionskonstrukte

Die Herstellung der PLD2-Fragmente sollte rekombinant in *E. coli* erfolgen. Da die PLD2 löslich in *E. coli* gewonnen werden konnte, aber die Rückfaltung aus *inclusion bodies* erfolglos verlief, wurde die lösliche Expression der PLD2-Fragmente bevorzugt. Beide Fragmente wurden mittels PCR in den Vektor pET15b kloniert, der eine induzierbare Expression der Proteine mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht.

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte wurden ausgehend vom *pld2pRSET5a*-Plasmid für beide Fragmente mittels PCR unter Verwendung der Primer PLD2C2 fw



**Abbildung 4.6:** Multiples Alignment der Primärstrukturen der mit Blastp vorhergesagten C2-Domänen pflanzlicher PLD $\alpha$  unter Verwendung von ClustalW.

Das multiple Alignment der PLD $\alpha$  im Vergleich mit den PLD $\beta$  und  $\gamma$  wurde mit dem Programm ClustalW erstellt. Die Positionen der  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_1$  bis  $\beta_8$ ) in Anlehnung an Literaturarbeiten [59, 177, 251] sind blau, die für die Calciumbindung verantwortlichen Loops sind rot gekennzeichnet. Das Alignment der C2-Domänen mit bereits bekannter Struktur (RnPKC $\delta$  - Proteinkinase C $\delta$  aus Ratte (1BDY) [164], HscPLA2 - humane cytosolische Phospholipase A $_2$  (1RLW) [168] und RnPLC $\delta$  - Phospholipase C $\delta$  aus Ratte (1DJJ) [64]) folgte nach den angegebenen Quellen und wurde den C2-Domänen der PLD manuell zugeordnet. Die für die Calciumbindung verantwortlichen Aminosäuren sind grün dargestellt. Der verwendete Aminosäurebereich und die entsprechenden Genbank-Accessionnummern sind angegeben.

Spezies-Kurzformen: At - *Arabidopsis thaliana*, Bo - *Brassica oleracea*, Cp - *Craterostigma plantagineum*, Hs - *Homo sapiens*, Le - *Lycopersicon esculentum*, Nt - *Nicotiana tabacum*, Os - *Oryza sativa*, Pb - *Pimpinella brachycarpa*, Ps - *Papaver somniferum*, Rc - *Ricinus communis*, Rn - *Rattus norvegicus*, Vn - *Vigna unguiculata*, Zm - *Zea mays*  
 Isoformtypen-Kurzformen: a -  $\alpha$ -Typ, b -  $\beta$ -Typ, c - cytosolisch, d -  $\delta$ -Typ, g -  $\gamma$ -Typ



und PLD2C2 rv für die C2-Domäne (*pld2C2pET15b*) bzw. PLD2CT fw und PLD2CT rv für das PLD2-Rumpfenzym (*pld2CTpET15b*) die entsprechenden DNA-Abschnitte amplifiziert. Nach einer Zwischenklonierung in den pCR<sup>®</sup>4-TOPO-Vektor konnten die dabei eingeführten Restriktionsschnittstellen *NdeI* am 5'-Ende und *BamHI* am 3'-Ende für die Klonierung in pET15b verwendet werden (3.2). Wie bei allen weiteren Konstrukten wurde die Nukleotidsequenz durch DNA-Sequenzierung kontrolliert (3.2.10). Nach Überprüfung verschiedener Kultivierungs- und Expressionsbedingungen (4.2.3) schien eine lösliche Expression mit dem Vektor pET15b nicht möglich. Deshalb wurden mit den in Tab. 4.3 aufgeführten Vektoren weitere Expressionsstrategien erprobt. Die Verwendung eines schwächeren Promotors (T5-, tac-Promotor) bewirkt eine langsamere Proteinbiosynthese, welche eine Aggregation des Proteins deutlich verringern sollte. Eine Sekretion des synthetisierten Proteins ins Periplasma durch ein entsprechendes Transitpeptid (*pelB*) kann Schutz vor zellulären Proteasen bewirken, die geringe Mengen löslichen Proteins abbauen könnten. Durch N- bzw. C-terminale Fusion mit anderen Proteinen (Intein, Glutathion-S-Transferase), die die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöhen, konnten bereits eine große Anzahl von eukaryontischen Proteinen löslich in *E. coli* exprimiert werden [203, 209]. Die Expression einer löslichen C2-Domäne sollte auch mit Hilfe des Vektors pRSET5a möglich sein, der die Expression des gesamten Proteins (PLD2) in löslicher und aktiver Form gestattet [190]. Dieses Konstrukt sollte nach Einführung eines Stopcodon im Anschluss an die C2-Domäne genutzt werden. Abb. 4.7 zeigt die unterschiedlichen N- bzw. C-terminalen Sequenzen der in Tab. 4.3 aufgeführten geplanten C2-Domänen nach Abspaltung der jeweiligen Fusionsproteine, Transitpeptide oder Tags.

**Tabelle 4.3:** Expressionskonstrukte für die separate Herstellung der C2-Domäne der PLD2. Die angegebenen molekularen Massen entsprechen dem Zielprotein mit bzw. ohne (in Klammern) Fusionsteil.

Vektor	Promotor	Fusion	Reinigung	<i>M</i> (kDa)
pET15b	T7-lacUV5	N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag	His <sub>6</sub> -Tag	18,7 (16,8)
pQE30	T5	N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag*	His <sub>6</sub> -Tag	17,9
pET22b	T7-lacUV5	N-terminaler <i>pelB</i> - <i>leader</i>	—	18,7 (16,5)
pGEX-2T	tac	N-terminale GST aus <i>Schistosoma japonicum</i>	GST-Tag	42,8 (16,6)
pTXB1	T7-lac	C-terminales Intein aus <i>Mycobacterium xenopi</i> und Chitinbindungsdomäne aus <i>Bacillus circulans</i>	Chitinbindungsdomäne	44,3 (16,5)
pTYB1	T7-lac	C-terminales Intein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Chitinbindungsdomäne aus <i>B. circulans</i>	Chitinbindungsdomäne	74,0 (16,5)
pRSET5a	T7-lac	Normaler N-Terminus der PLD2*	—	17,2

\* – Fusionsteil nicht abspaltbar

Aminosäureposition	8	23	148	153
	↓	↓	↓	↓
pET15b	GSHM <b>GTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>			
pQE30	MRGSHHHHHH	GSM <b>GTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>		
pET22b	<b>MTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>			
pGEX-2T	GSM <b>GTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>			
pTXB1	<b>MTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>			
pTYB1	<b>MTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>			
pRSET5a	MAQHLLH	<b>GTLHATIYEVDALHTG</b> . . . <b>VKLQYFAVE</b>		

**Abbildung 4.7:** Aminosäuresequenz der rekombinanten Konstrukte zur Herstellung der C2-Domäne der PLD2 nach Abspaltung der Fusionensproteine, Tags oder Transitpeptide.

Neben den für die C2-Domäne essenziellen Aminosäuren (blau) sind die N-terminal zusätzlichen Aminosäuren schwarz dargestellt. Es ist davon auszugehen, dass bei den an zweiter Position liegenden Aminosäuren G (pTXB1, pTYB1) und A (pRSET5a) das N-terminale Methionin in *E. coli* abgespalten wurde [95].

Ausgehend vom dem Konstrukt *pld2C2pET15b* wurden 2 weitere Konstrukte durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt (3.2.1). Dabei wurde die *NdeI* Schnittstelle am 5'-Ende in eine *NcoI* Schnittstelle bzw. die *BamHI* Schnittstelle am 3'-Ende in eine *Ecl136II* Schnittstelle umgewandelt. Die Klonierung in den Expressionsvektor pET22b(+) erfolgte über *NcoI* und *BamHI*. Für die Klonierung in die Vektoren pTXB1 und pTYB1 wurde der Vektor mit *SapI* geschnitten, die Enden mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt und anschließend mit *NdeI* geschnitten. Aus dem am 3'-Ende modifizierten *pld2C2pET15b* Konstrukt wurde das entsprechende DNA-Stück mit *NdeI* und *Ecl136II* ausgeschnitten und nach dem Protokoll für glatte Enden ligiert (3.2.9). Die Vektoren pQE30 und pGEX-2T wurden mit *BamHI* geschnitten und die Enden mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt. Das Konstrukt *pld2C2pET15b* wurde mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten, die Enden mit DNA Polymerase I (Klenow Fragment) aufgefüllt und in beide Vektoren nach dem Protokoll für glatte Enden ligiert. Die sich ergebende zusätzliche Aminosäure ist in Abb. 4.7 angegeben. Das Einfügen eines Stopcodons im Anschluss an Glutamat in Position 153 erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese (3.2.1).

Die Klonierung des PLD2-Rumpfproteins in den Vektor pGEX-2T erfolgte analog unter Verwendung des *pld2CTpET15b* Konstrukts. Nach Abspaltung des GST-Tags bzw. des His<sub>6</sub>-Tags mittels Thrombin ergeben sich die in Abb. 4.8 angegebenen Primärstrukturen. Die Klonierung in den Vektor pRSET5a erfolgte nach Ausschneiden des *pld2*-Gens aus dem *pld2pRSET5a* Konstrukt mit *NdeI* und *BamHI* sowie des PLD2-Rumpfprotein-codierenden DNA-Abschnitts aus dem *pld2CTpET15b* Konstrukt mit den genannten Restriktionsendonukleasen und anschließender Ligation.

Aminosäureposition	154	169	804	812
	↓	↓	↓	↓
pET15b	GSHMADRNWNMGVKS <b>AK</b> FPG...DYLPPILTT			
pGEX-2T	GSMADRNWNMGVKS <b>AK</b> FPG...DYLPPILTT			
pRSET5a	MADRNWNMGVKS <b>AK</b> FPG...DYLPPILTT			

**Abbildung 4.8:** Aminosäuresequenz der rekombinanten Konstrukte zur Herstellung des PLD2-Rumpfproteins nach Abspaltung der Fusionsproteine bzw. Tags.

Die blau dargestellten Sequenzen entsprechen der PLD2, die schwarz dargestellten Sequenzen verbleiben nach Abspaltung. Das N-terminale Methionin des Konstruktes *pld2CT*pRSET5a sollte bei der Expression in *E. coli* aufgrund des nachfolgenden Alanins abgespalten werden.

## 4.2.3 Herstellung der Fragmente

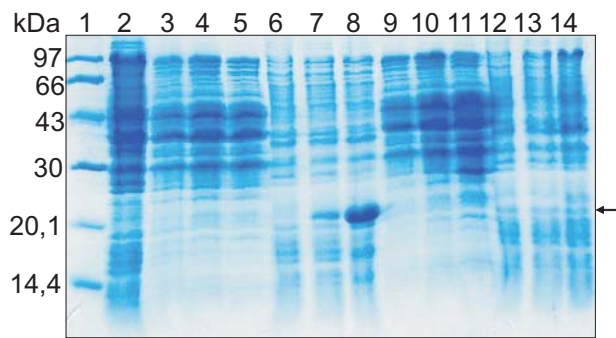
### 4.2.3.1 Lösliche Expression der PLD2-Fragmente

Die zunächst hergestellten Expressionskonstrukte in dem Vektor pET15b ermöglichen die Herstellung großer Mengen der gesuchten Proteinfragmente. Diese fielen jedoch in Form von unlöslichen *inclusion bodies* an, und müssten solubilisiert und renaturiert werden. Dabei ist nicht sicher, ob die native Faltung erreicht wird (4.2.3.3). Die Entstehung von *inclusion bodies* ergibt sich als Konkurrenzreaktion zwischen Faltung und Fehlfaltung mit nachfolgender Aggregation [110] (2.1.4). Eine verlangsamte Proteinexpression und eine geringere Proteinkonzentration sollte die korrekte Faltung begünstigen. Daher wurden unterschiedliche Strategien genutzt, die durch Variation der Kultivierungs- und Expressionsbedingungen die lösliche Expression des rekombinanten Proteins verbessern sollten [117] (Tab. 4.4). Bei der Optimierung der Expression wurde festgestellt, dass die Zelldichte zum Induktionszeitpunkt sowie die Verwendung verschiedener Vollmedien wenig Einfluss auf die Menge an unlöslichem Protein hat, und kein lösliches Protein gebildet wird. Die Limitierung des Wachstums von *E. coli* durch Temperatur- und pH-Wert-Senkung bzw. die Verwendung von M9 Minimalmedium verlangsamt die Proteinbiosynthese, was jedoch nur zu einer Verringerung der Ausbeute an unlöslichem Protein führte (Abb. 4.9). Eine schwächere In-

**Tabelle 4.4:** Variation der Kultivierungs- und Expressionsbedingungen.

Die aufgeführten Bedingungen wurden an den in Tab.3.1 aufgeführten Expressionskonstrukten untersucht, um lösliches Protein zu erhalten.

Parameter	Variation
Medium	LB, TB, 2×YT, M9 Medium, Zusatz von 1 % (w/v) Glucose bzw. 2 % (v/v) Glycerol
OD <sub>600</sub> bei Induktion	0,2 bis 2
Induktor	IPTG (0,1 bis 1 mM), 1 % (w/v) Lactose
Induktionszeitraum	0 h (keine Induktion) bis 72 h
T nach Induktion	10 bis 37 °C
pH-Wert nach Induktion	5,0 bis 7,0 mit 1 M Phosphat-Puffer eingestellt



**Abbildung 4.9:** Expression der C2-Domäne unter Verwendung des Vektors pET15b. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel zeigt in Bahn 1 den Proteingrößenstandard (3.1.2), in Bahn 2 die Zellen vor Induktion und in den Bahnen 3 bis 14 Expressionsproben. Die Zellen wurden in M9 Medium mit 2 % Glycerol angezogen und bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 mit 0,1 mM IPTG (Bahn 3 bis 8) bzw. 1 % Laktose (Bahn 9 bis 14) bei 24 °C induziert. Die Proben wurden jeweils 3, 6 und 20 h nach Induktion genommen. In Bahn 3 bis 5 bzw. 9 bis 11 ist lösliches Protein, in Bahn 6 bis 8 bzw. 12 bis 14 unlösliches Protein aufgetragen (3.3.2.2). Pfeil: Zielprotein.

duktion des Promotors wurde durch Verringerung der Induktorkonzentration (nicht-metabolisierbares IPTG bis 0,1 mM, metabolisierbare Laktose) erreicht, und bewirkte ebenfalls geringere *inclusion body* Mengen. Auch die Zugabe anderer Kohlenhydratquellen (Glucose, Glycerol), die die Verwertung anderer Kohlenstoffquellen (Glycerol) oder die Expression vor Induktion hemmen (Glucose) [214], führte nur zu verringerter Gesamtexpression. Die Induktion zelleigener Chaperone durch einen Hitzeschritt (42 °C) vor Induktion, wie sie von Chen *et al.* [32] beschrieben wird, führte ebenfalls nicht zu löslichem Protein.

Zusammengefasst muss festgestellt werden, dass mit den verwendeten Methoden die rekombinante Expression beider Fusionsproteine soweit zurückgedrängt wurde, dass gar keine Expression mehr detektiert werden konnte. Bei Verwendung von M9 Medium in Kombination mit einer Temperatursenkung und moderater Induktion durch Laktose konnte auch mittels Western-Blot (Anti-His Antikörper) kein rekombinantes Protein mehr nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Vektoren pQE30 und pET22b(+) konnte ebenfalls keine Expression von löslichem Protein detektiert werden. Auch eine Sekretion löslichen Proteins ins Periplasma durch Verwendung des Vektors pET22b(+) (Periplasmaaufschluss 3.3.2.2) war nicht nachweisbar. Es waren jedoch zwei Proteinspezies in der unlöslichen Fraktion vorhanden (nicht gezeigt), was auf eine teilweise Abspaltung des Transitpeptids zurückgeführt wurde. Das Anfügen kurzer Tags am N-Terminus scheint somit keine Möglichkeit für eine lösliche Expression der C2-Domäne zu sein.

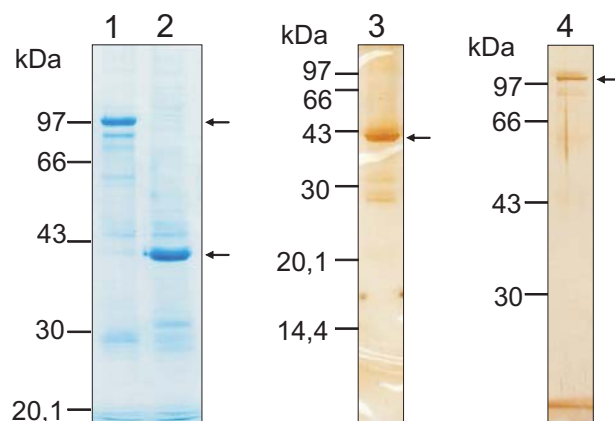
Der Vektor pRSET5a ermöglichte die Expression geringer Mengen löslicher C2-Domäne, die im Rohextrakt mittels Western-Blot (Anti-PLD-Antikörper) nachgewiesen werden konnte. Erste Reinigungsversuche analog zur PLD2 schlugen jedoch fehl. Das PLD2-Rumpfenzym war nach Expression in diesem Vektor ebenfalls in sehr geringen Mengen mittels Western-Blot (Anti-PLD-Antikörper) nachweisbar. Da die Reinigung mittels HIC jedoch auch hier nicht gelang und im Rohextrakt keine Aktivität detektierbar war, wurden die folgenden weiteren Expressionstrategien erprobt.

Mit den Vektoren pTXB1 und pTYB1 konnten in der löslichen Fraktion Induktionsbanden mit dem erwarteten Molekulargewicht für beide Konstrukte der C2-Domäne detektiert werden. Die anschließende Isolierung des Proteins durch selektive Bindung des Fusionsproteins an eine Chitin-Matrix mit nachfolgender Abspaltung der C2-Domäne mittels Zusatz reduzierender Agenzien erwies sich aber als nicht erfolgreich. Es erfolgte keine Bindung des jeweiligen Fusionsproteins an die Matrix.

Für die Konstrukte im Vektor pGEX-2T konnten beide Fusionsproteine in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden. Die Isolierung der Proteine durch Bindung an Glutathion-Sepharose und kompetitive Elution mit GSH gelang. Es zeigte sich jedoch, dass die deutlich stärker induzierte Bande im löslichen Gesamtprotein der nicht fusionierten GST entsprach. Für beide Konstrukte musste die Expression optimiert werden, wobei wiederum die entsprechenden Kultivierungs- und Expressionsbedingungen variiert wurden. Neben größeren Mengen an Fusionsprotein wurde dabei besonders auf die Verringerung von freier GST geachtet. Es konnte gezeigt werden, dass bereits bei 20 °C der Anteil an löslichem Protein deutlich geringer ist als bei 15 °C. Außerdem haben nährstoffreichere Medien wie TB und 2×YT einen positiven Einfluss auf die Proteinmenge. Das günstigste Verhältnis von Fusionsprotein zu freier GST zeigte sich, wenn bei einer  $OD_{600}$  von 1 (im Vergleich zu 0,5 und 2) mit 0,5 mM IPTG (im Vergleich zu 0,1 mM) induziert wurde. Der Anteil an Abbauprodukten und freier GST stieg bei längerer Expressiondauer deutlich an, so dass sich eine Induktionsdauer von 4 h (im Vergleich zu 20 h oder 28 h) als vorteilhaft erwies.

#### 4.2.3.2 Reinigung der PLD2-Fragmente

Beide GST-Fusionsproteine konnten unter Verwendung von GSH-Sepharose angereichert (Abb. 4.10) und mittels Western-Blot durch Anti-PLD- und Anti-GST-Antikörper nachgewiesen werden (gekennzeichnete Banden in Abb. 4.10). Eine Lagerung der erhaltenen Fusionsproteine war nur schwer möglich, da beide, besonders stark jedoch



**Abbildung 4.10:** SDS-PAGE der gereinigten GST-Fusionsproteine.

Die Proben wurden nach einmaliger GSH-Sepharosereinigung (Bahn 1 und 2, Coomassie-gefärbtes Gel) bzw. nach zweimaliger Chromatographie (Bahn 3 und 4, Silber-gefärbtes Gel) aufgetragen. Die Fusionsproteine sind mit einem Pfeil markiert (GST-C2-Domäne: 42,8 kDa, GST-PLD2-Rumpfprotein: 101,3 kDa).

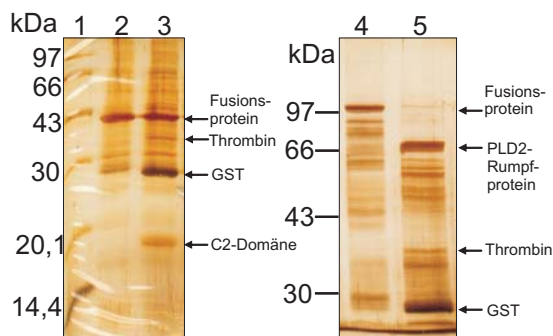
das GST-C2-Domäne-Fusionsprotein zu Aggregation neigten und insbesondere nach Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  präzipitierten.

Die Entfernung des GST-Tags durch die im *linker* befindliche Thrombinschnittstelle gelang (Abb. 4.11) und die entstandenen Fragmente konnten durch Western-Blot mit Anti-PLD-Antikörpern identifiziert werden. Wie Kontrollexperimente mit rekombinanter PLD2 zeigten, wird native PLD2 trotz einer Vielzahl möglicher Thrombinschnittstellen [103] von Thrombin nicht gespalten. Die PLD2-Aktivität (3.3.7.1) sowie die Gelbande sind nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur unverändert. Für die geringen Ausbeuten beider PLD2-Fragmente wird der Abbau nicht nativer Strukturen vermutet. Außerdem zeigten die PLD2-Fragmente eine hohe Tendenz zu Aggregation und die zunehmende Präzipitation erschwerte weitere Experimente. Die nachfolgende Trennung von GST und PLD2-Fragment erwies sich als sehr schwierig. Eine Separation mittels Anionenaustauschchromatographie (Q- und DEAE-Sepharose) war nicht möglich, da die Proteine ein ähnliches Bindungsverhalten zeigten. Da die PLD-Fragmente in Gegenwart von 50 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. maximal 0,5 M NaCl nicht an Octyl-Sepharose binden, war eine Reinigung mittels HIC nicht möglich. Warum eine Trennung durch nochmalige GSH-Sepharose-Bindung nicht gelang, konnte nicht abschließend geklärt werden. Beide Proteine wurden im Durchlauf und im Eluat gefunden. Auch eine Thrombinspaltung an der Säule nach Bindung der Fusionsproteine an GSH-Sepharose gelang nicht, da die gewünschten Proteine nicht selektiv eluiert werden konnten.

Aufgrund der großen Instabilität (Aggregationsanfälligkeit) der PLD-Fragmente wurden diese als GST-Fusionsproteine untersucht, welche mit ausreichender Reinheit gewonnen werden konnten (Abb. 4.10).

#### 4.2.3.3 Rückfaltung aus *inclusion bodies*

In der Literatur ist die separate Herstellung von C2-Domänen mittels löslicher Expression und Reinigung, vorwiegend als GST-Fusionsprotein [41, 43, 159] oder mit



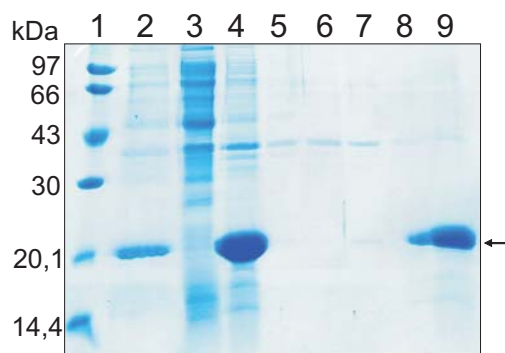
**Abbildung 4.11:** Thrombinspaltung der GST-Fusionsproteine.

Die Thrombinspaltung wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM GSH bei  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (3.3.2.3). In Bahn 1 ist der Proteingrößenstandard (3.1.2), in Bahn 2 und 4 die Probe vor, bzw. in Bahn 3 und 5 nach Thrombinzugabe und 2 h Inkubation aufgetragen. Die entsprechenden Proteinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet (GST-C2-Domäne: 42,8 kDa, Thrombin: 37 kDa, GST: 26,2 kDa, C2-Domäne: 16,5 kDa, GST-PLD2-Rumpfprotein: 101,3 kDa, PLD2-Rumpfprotein: 75,2 kDa).

His-Tag [159, 163] bzw. durch unlösliche Expression als *inclusion bodies* mit anschließender Solubilisierung und Renaturierung [5, 22, 150, 168, 251] beschrieben. Da bei der Expression der C2-Domäne der PLD2 große Mengen an *inclusion bodies* anfielen (4.2.3.1), wurde versucht, dieses Protein zu renaturieren. Die Präparation der *inclusion bodies* erfolgte nach dem Standard-Protokoll (3.3.2.4), wobei ein *inclusion body* Pellet erhalten wurde, das nur wenig Fremdprotein enthielt (Abb. 4.12). Nach der Solubilisierung wurde auf eine Dialyse zur Entfernung des DTT verzichtet, da für die PLD aus Weißkohl gezeigt werden konnte, dass alle acht vorhandenen Cysteinreste reduziert vorliegen [97].

Bei der Renaturierung der C2-Domäne konnte nur die Löslichkeit des Proteins nach Zentrifugation anhand der Proteinmenge im Überstand festgestellt werden, da keine funktionelle Detektion des Proteins möglich war. Die Renaturierungsoptimierung hinsichtlich pH-Wert und Puffer (Na-Acetat, Na-Pipes und Tris/HCl, pH 5,5 bis 8,0) sowie weiterer Zusätzen (EDTA, DTT, PEG 6000, CaCl<sub>2</sub>, Glycerol, GdnHCl, Tris, Arginin) (3.3.2.4) zeigte, dass sich die bereits in der Literatur für andere C2-Domänen beschriebenen Bedingungen [150] als günstig erwiesen. Bei Verwendung von 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,5 M Arginin, 5 mM EDTA, 5 mM DTT als Renaturierungspuffer trat nur sehr langsam Proteinpräzipitation auf. Während der Entfernung des Renaturierungspuffers mittels Dialyse gegen einen Arginin-freien Puffer aggregierte der Hauptteil des Proteins. Der erhaltene Überstand präzipitierte nach Lagerung bei -20 °C vollständig und bei 4 bzw. 23 °C mit zunehmender Lagerungszeit. Die Abspaltung des His<sub>6</sub>-Tags durch die Protease Thrombin konnte die Aggregationsneigung nicht verringern.

Um weitere Informationen über die Struktur der renaturierten C2-Domäne zu erlangen, wurden Fern-UV-CD-Spektren gemessen. Das Spektrum hat ein Minimum bei 200 nm, was auf eine *random coil* Struktur hindeutet (Abb. 4.13C). Die in der Literatur beschriebenen Fern-UV-CD-Spektren der C2-Domäne der *A. thaliana* PLD $\alpha$  und PLD $\beta$  weisen eindeutig die Merkmale für  $\beta$ -Faltblatt Strukturen auf (Minima bei 210



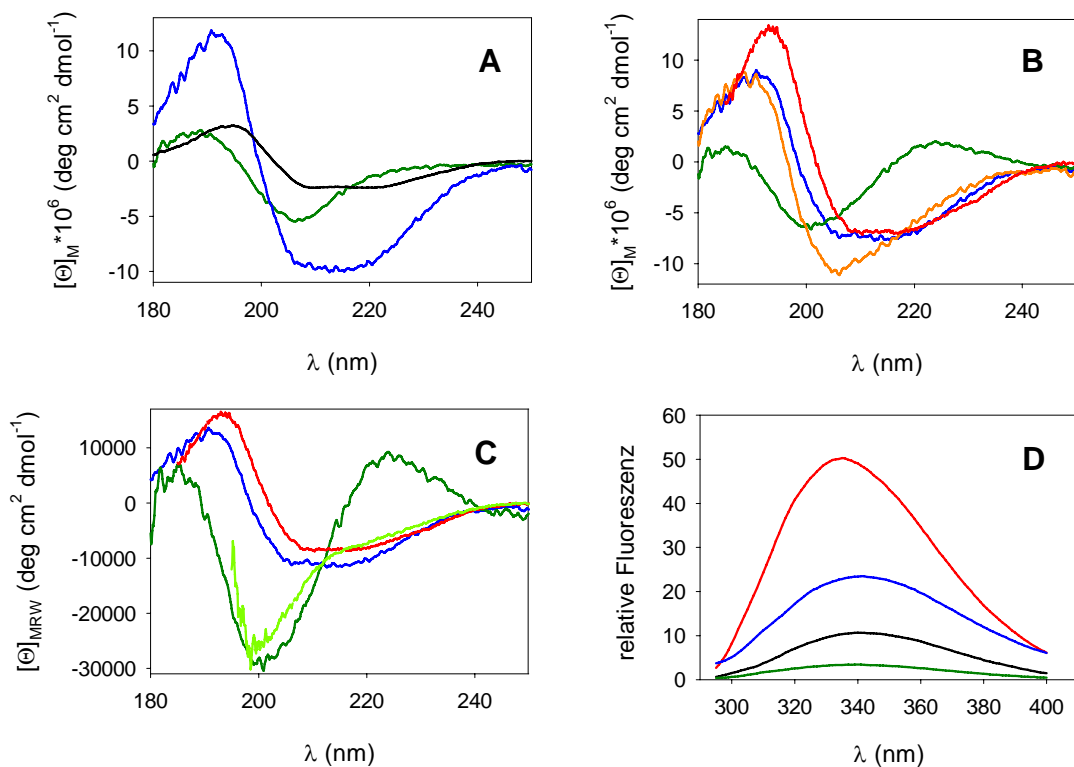
**Abbildung 4.12:** Präparation der C2-Domäne als *inclusion bodies*.

Die *inclusion body* Präparation wurde wie beschrieben (3.3.2.4) durchgeführt. In Bahn 1 ist der Proteingrößenstandard (3.1.2), in Bahn 2 Zellen nach Induktion, in Bahn 3 der Überstand und in Bahn 4 das Pellet nach Zellaufschluss aufgetragen. Die Bahnen 5 bis 8 zeigen die Überstände der Waschschritte mit 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 20 mM EDTA, Bahn 9 das entstehende *inclusion body* Pellet (Pfeil: Zielprotein).

und 218 nm) [251]. Neben der starken Neigung zu Aggregation ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass die während des Renaturierungsprozess erhaltene lösliche C2-Domäne ungefaltet ist.

#### 4.2.4 Struktur- und Stabilitätsuntersuchung der Fragmente

Aufgrund der hohen Aggregationsanfälligkeit der Fragmente nach Entfernen des GST-Fusionsteils erfolgten die weiteren Untersuchungen mit den Fusionsproteinen. Da diese ebenfalls zur Aggregation neigten, wurden sie frisch präpariert analysiert. Die CD- und Fluoreszenzspektren unter nativen Bedingungen sind in Abb. 4.13 dargestellt. Anhand der Fern-UV-CD-Spektren wurde deutlich, dass die C2-Domäne im GST-C2-Domäne-Fusionsprotein keine geordnete Sekundärstruktur hatte, sondern vielmehr *random coil* bzw. irreguläre Sekundärstrukturen [106] aufweist. Das Fern-UV-CD-Spektrum der C2-Domäne in Abb. 4.13C war dem Spektrum der aus den *inclusion bodies* gewonnenen separaten C2-Domäne ähnlich. Dahingegen glich das



**Abbildung 4.13:** Nativspektren von PLD2-Fragmenten im Vergleich mit PLD2.

**A bis C:** Fern-UV-CD-Spektren (Proteinkonzentration: 0,44 bis 1 mg·ml<sup>-1</sup>) und **D:** Fluoreszenzemissionsspektren nach Anregung bei 278 nm.

**A:** Die CD-Spektren der Fusionsproteine GST-C2-Domäne (grün) und GST-PLD2-Rumpfprotein (blau) bzw. der GST (schwarz) wurden direkt gemessen und auf die Proteinkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) normiert. In **B** wurde der Signalanteil der GST subtrahiert, die Spektren von PLD2-Rumpfprotein (blau) und C2-Domäne (grün) wurden addiert (PLD2-Rumpfprotein + C2-Domäne: orange) und zum Vergleich ist ein Spektrum der PLD2 (rot) dargestellt. Für **C** wurden die Spektren aus **B** in  $[\Theta]_{MRW}$  umgerechnet: C2-Domäne (grün), PLD2-Rumpfprotein (blau) und PLD2 (rot). Zusätzlich ist das Spektrum der renaturierten C2-Domäne (hellgrün) dargestellt (4.2.3.3). Die Fluoreszenzspektren (**D**) wurden bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  gemessen: PLD2 (rot), GST (schwarz), GST-PLD2-Rumpfprotein (blau), GST-C2-Domäne (grün).

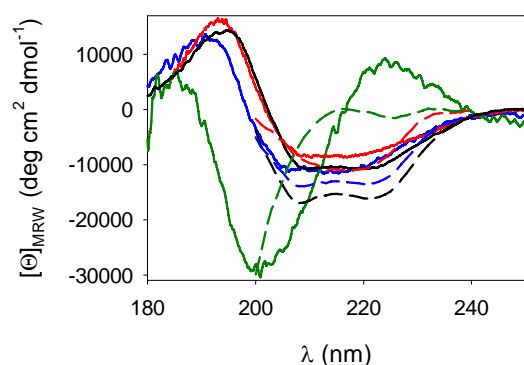
Alle Spektren wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei 20 °C, wie in 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben, gemessen.



Fern-UV-CD-Spektrum des GST-PLD2-Rumpfproteins stark dem der PLD2 und wies somit eine definierte Sekundärstruktur auf. Die gezeigten CD-Spektren wurden unter Verwendung der Programme K2d (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/> [6]) und Dichroweb (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html> [241]) einer Sekundärstrukturanalyse [30] unterzogen. Die mittels K2d errechneten Sekundärstrukturanteile sind in Tab. 4.5 aufgeführt und entsprachen theoretischen CD-Spektren, die ebenfalls mit dem Programm K2d erstellt wurden, und im Vergleich zu den gemessenen CD-Spektren in Abb. 4.14 dargestellt sind. Die *online* Version des Programms Dichroweb verwendet die Programme SELCON3 [211], CONTIN [174] und CDSSTR [212], so dass unterschiedliche Algorithmen genutzt werden konnten. Die Analyse der Fern-UV-CD-Spektren erfolgte unter Verwendung der Referenz-Sets 6 und 7 [241]. Die erhaltenen Anteile wurden gemittelt und zusammen mit den prozentualen Fehlern in Tab. 4.5 angegeben. Der Sekundärstrukturanteil der GST stimmt nicht mit den erwarteten Werten [119, 133] überein, die Abweichungen könnten auf Fehlfaltung der GST hinweisen. Der geringere helikale Anteil sowie der deutlich erhöhte  $\beta$ -Faltblatt-Anteil der PLD2 im Vergleich zum PLD2-Rumpfprotein (K2d) könnten auf den erwarteten  $\beta$ -Faltblatt-Anteil der C2-Domäne hinweisen. Die Berechnungen konnten jedoch nur als ein Hinweis gewertet werden.

Das Nah-UV-CD-Spektrum des GST-PLD2-Rumpfproteins (nicht gezeigt) zeigte keine Chiralität der Aromatenumgebungen. Der Vergleich mit dem Spektrum nativer PLD2 (Abb. 4.17D) lässt keine definierte Tertiärstruktur vermuten, sondern weist vielmehr auf eine flexible Umgebung der aromatischen Aminosäuren hin.

Im Vergleich zur PLD2 liegt die relative Fluoreszenzintensität der Fusionsproteine deutlich darunter: 47 % für GST-PLD2 Fusionsprotein, 7 % für GST-C2-Domäne bzw. 21 % für GST. Die Wellenlängenmaxima liegen bei 334 nm für die PLD2, bei 342 nm für die GST, bei 339 nm für die GST-C2-Domäne und bei 341 nm für das GST-PLD2-Rumpfprotein. Eine sehr apolare Umgebung im Inneren des Proteins bzw. eine Abschirmung vom hydrophilen Milieu der Lösung führt zu einer sogenannten



**Abbildung 4.14:** CD-Spektren und theoretische CD-Spektren entsprechend der ermittelten Sekundärstrukturanteile.

Die Fern-UV-CD-Spektren der Proteinvarianten PLD2 (rot), GST (schwarz), C2-Domäne (grün) und PLD2-Rumpfprotein (blau) entsprechen den in Abb. 4.13C gezeigten Spektren (durchgezogene Linie), bzw. den theoretisch von dem Programm K2d berechneten Spektren (unterbrochene Linie).

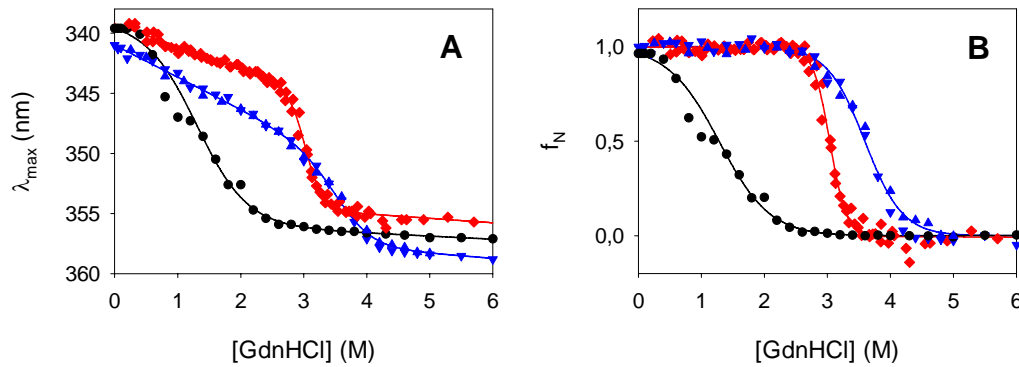
**Tabelle 4.5:** Berechnete Sekundärstrukturanteile anhand der Fern-UV-CD-Spektren.

Die Berechnung erfolgte mit den Programmen K2d bzw. Dichroweb. Für das Programm Dichroweb sind die Fehlerbereiche angegeben. Die theoretischen Kurven für die Sekundärstrukturanteile des Programmes K2d sind in Abb. 4.14 dargestellt. Die erwarteten Sekundärstrukturanteile der GST liegen bei 0,44 bzw. 0,51  $\alpha$ -Helix und 0,088 bzw. 0,14  $\beta$ -Faltblatt [119, 133].

Proteinvariante	K2d			Dichroweb				Fehler (%)
	$\alpha$	$\beta$	<i>random</i>	$\alpha$	$\beta$	<i>turn</i>	<i>random</i>	
PLD2-Rumpfprotein	0,25	0,25	0,50	0,199	0,293	0,215	0,293	4,4 - 14,2
C2-Domäne	0,00	0,00	1,00	0,047	0,229	0,213	0,493	20,1 - 80,2
GST	0,35	0,19	0,46	0,240	0,251	0,213	0,296	3,5 - 10,5
PLD2	0,08	0,45	0,47	0,200	0,279	0,208	0,302	5,7 - 10,5

Blauverschiebung des Emissionsmaximums, wie es bei der PLD2 beobachtet wird. Bei den Fusionsproteinen wird im Vergleich zur PLD2 hingegen eine Rotverschiebung beobachtet, die zum einen durch die beteiligte GST entstehen kann, jedoch auch auf eine polarere Umgebung der Tryptophanreste hindeuten könnte. Die Ursachen für die geringeren Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zur PLD2 können vielfältig sein [191]. Es wird vermutet, dass das Quenchen durch benachbarte Aminosäuren oder – besonders bei dem GST-C2-Domäne-Fusionsprotein – durch Mikroaggregatbildung verursacht wird. Die Fluoreszenzintensität und das Wellenlängenmaximum der Fusionsproteine können durch die fusionierte GST und/oder die relative Lage von GST und PLD2-Fragment zueinander beeinflusst werden. Ebenso kann eine geringere Effizienz des Resonanzenergietransfers von den Tyrosinen zu den Tryptophanen, die insbesondere bei ungefalteten Proteinen zu beobachten ist, die Fluoreszenzintensität senken [191].

Da die C2-Domäne als nicht gefaltet betrachtet werden muss, wurde nur die Entfaltung des GST-PLD2-Rumpfproteins untersucht. Die reversible Entfaltung des PLD2-Rumpfproteins durch GdnHCl ist in Abb. 4.15 dargestellt. Im Vergleich zum zweiten Entfaltungsschritt der PLD2 (4.3.4) entfaltet das Rumpfprotein weniger kooperativ, jedoch bei höheren Denaturationskonzentrationen. GST entfaltet bei sehr geringen GdnHCl-Konzentrationen und scheint wenig Einfluss auf das Fusionsprotein zu haben. Anhand der Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums ist keine getrennte Entfaltung von GST und PLD2-Rumpfprotein erkennbar. GST wird in der Literatur als Dimer beschrieben [133], was die Interpretation der Entfaltungsdaten zusätzlich erschwert. Faltung und Entfaltung des GST-PLD2-Rumpfproteins stimmen nicht mit dem zweiten Übergang der PLD2 (Abb. 4.26) überein, auch wenn beide Prozesse reversibel und in einem vergleichbaren Denaturationsbereich stattfinden. So sind die Unterschiede in Steilheit (Kooperativität) und Übergangsmittelpunkt ( $[D]_{\frac{1}{2}}$ ) zu groß (Abb. 4.15B), als dass die Entfaltung des GST-PLD2-Rumpfproteins dem zweiten



**Abbildung 4.15:** GdnHCl-induzierte Entfaltung von GST-PLD2-Rumpfprotein im Vergleich mit GST und PLD2.

**A:** Entfaltung von PLD2 (♦), GST (●) und GST-PLD2-Rumpfprotein (▼), sowie die Rückfaltung von GST-PLD2-Rumpfprotein (▲) nach 24 h Inkubation bei 5 M GdnHCl anhand der Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. Die Daten wurden nach Gleichung 9 angepasst. **B:** Normierte Übergangskurven aus **A**. Die Messung der Fluoreszenzspektren erfolgte in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei 20 °C nach 20 h Inkubation bei der entsprechenden GdnHCl-Konzentration (3.4.3) und einer Proteinkonzentration von 0,27 μM. Für die PLD2 ist nur der zweite reversible Übergang dargestellt (vgl. Abb. 4.26).

Übergang der PLD2 gleichgesetzt werden könnte. Ob die beobachteten Signaländerungen zudem die Strukturänderungen reflektieren, die von der nativen, auch in der PLD2 vorliegenden Struktur ausgehen, muss bezweifelt werden, da anhand der CD-Spektren nur auf eine nativ-ähnliche Sekundärstruktur geschlossen werden konnte. Der zweite Übergang der PLD2 könnte außerdem nicht ausschließlich die Entfaltung der katalytischen Domänen, sondern entweder auch andere Domänen oder das gesamte Protein betreffen. Letzteres spräche gegen die vermutete getrennte Entfaltung einzelner PLD-Domänen, wie sie z. B. in der Literatur für Factor VIIa beschrieben ist [75] oder bei Fusion zweier Domänen beobachtet werden konnte [33].

Für das Rumpfprotein war unter den getesteten Bedingungen (0 bis 1 M CaCl<sub>2</sub>) auch bei längeren Inkubationszeiten (3 h) keine Aktivität detektierbar. Dieses könnte auf eine Fehlfaltung hinweisen, da der entsprechende Sequenzbereich für die PLDβ aus *A. thaliana* aktiv war [167]. Eine umfassende Interpretation der Entfaltungsvorgänge der PLD2 erfolgt in Abschnitt 4.3.

Die in Abb. 4.15A dargestellten Kurven könnten nach einem Zweizustandsmodell entsprechend Gleichung 9 angepasst werden. Die entsprechenden apparenten thermodynamischen Parameter der thermodynamischen Stabilität (nicht gezeigt) wurden jedoch nur als erste Hinweise analysiert, da für keines der Proteine der Verlauf der Entfaltung nach dem Zweizustandsmodell nachgewiesen wurde. Trotz des geringeren  $[D]_{\frac{1}{2}}$ -Wertes der PLD2 im Vergleich zum GST-PLD2-Rumpfprotein besitzt diese die größere apparente thermodynamische Stabilität. Die Ursache liegt in der unterschiedlichen Kooperativität ( $m$ -Wert) der Entfaltungskurven.

Trotz der hohen Aggregationsanfälligkeit gelang die Herstellung einzelner PLD2-Fragmente, wobei das C2-Domäne-Fusionsprotein als fehlgefaltet betrachtet werden musste. Ebenso scheint es sich mit dem GST-PLD2-Rumpfprotein zu verhalten, da dieses keine definierte Tertiärstruktur oder PLD-Aktivität zeigte. Im Gegensatz dazu gelang Wang und Mitarbeitern die Herstellung und funktionelle Charakterisierung analoger Enzymfragmente der PLD $\beta$  aus *A. thaliana* [167, 251, 252], was auf wesentliche strukturelle Unterschiede zwischen dieser PLD $\beta$  und der PLD2 aus Weißkohl schließen lässt.

Die Schwierigkeiten bei der Gewinnung der Proteinfragmente wie auch die Ergebnisse ihrer strukturellen Charakterisierung sind ein deutliches Indiz dafür, dass die einzelnen PLD2-Domänen möglicherweise nicht sequenziell entfalten, sondern vielmehr gemeinsam für die kooperative Entfaltung *in vitro* (zweiter Übergang) bzw. eventuell auch für die korrekte Faltung des Proteins *in vivo* verantwortlich sein könnten.

### 4.3 Struktur- und Stabilitätsuntersuchungen der PLD2

Für die Erforschung der Proteinfaltung wie auch die Verifizierung neuer Thesen und Modelle werden meist einfache Modellproteine herangezogen. Neben dem einfachen Zweizustandsmodell eines Ein-Domänen-Proteins wurden jedoch auch komplexe Faltungswege mit verschiedenen Intermediaten identifiziert [108, 109, 161]. Besonders interessant sind die Betrachtungen irreversibler Entfaltungsvorgänge verbunden mit der Frage, wie diese Proteine *in vivo* ihre native Struktur erlangen. In dieser Arbeit sollen Faltungs- und Entfaltungsvorgänge der PLD2 genauer charakterisiert werden, deren Renaturierung aus *inclusion bodies* bisher nicht gelang, obwohl die Entfaltung zumindest teilweise reversibel zu verlaufen scheint.

#### 4.3.1 Charakterisierung der PLD2 unter Nativbedingungen

##### 4.3.1.1 Prüfung auf Assoziation und Aggregation

Zum Nachweis des Vorhandenseins eines signifikanten Anteils an Aggregaten oder Oligomeren in den Enzympräparationen wurden SDS-PAGE, analytische Ultrazentrifugation sowie Gelfiltration verwendet. Die Auswertung der Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen wies auf einen sehr kleinen Anteil an Aggregaten bei einer PLD2-Konzentration von  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  hin (4.1.2).

Die Gelfiltrationsexperimente wurden bei  $140 \text{ mM NaCl}$  in  $10 \text{ mM Na-Pipes}$ , pH 7,0, durchgeführt, um Wechselwirkungen mit der Matrix zu minimieren; aufgrund der Salzempfindlichkeit der PLD2 wurde die Ionenstärke nicht weiter erhöht. Für die PLD2 konnte in einem Konzentrationsbereich von  $50$  bis  $200 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  nur ein intensives Signal detektiert werden, dessen Symmetrie auf eine homogene Enzymspezies rückschließen lässt. Die Retentionszeit der PLD2 ist nicht von der Proteinkonzentration abhängig. Anhand der Retentionszeiten der Referenzproteine Aldolase, Ovalbumin, Chymotrypsinogen und Cytochrom c (3.1.2) wurde für die PLD2 eine molekulare Masse von  $85,8 \text{ kDa}$  bestimmt ( $R^2 > 0,99$ , berechnet:  $91,942 \text{ kDa}$ ). Die PLD2 kann in Übereinstimmung mit den Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen als Monomer angesehen werden.

Bei einer PLD2-Konzentration von  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  wurde zudem eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt. Dabei wurde für native PLD2 ein Sedimentationskoeffizient von  $5,06 \pm 0,14 \text{ Svedberg-Einheiten}$  bestimmt. Es waren keine Aggregate nachweisbar. Für die dem Weißkohl verwandte PLD aus Wirsingkohl wurde in  $50 \text{ \% (v/v)}$  Ethylenglykol ein Sedimentationskoeffizient von  $5,59 \text{ Svedberg-Einheiten}$  bestimmt [4].

Bei der PLD2-Präparation zeigte sich eine starke Salzeempfindlichkeit des Enzyms. Mittels SDS-PAGE konnte der Einfluss der Ionenstärke auf eine zeitabhängige Präzipitation der PLD2 bei 23 °C (Raumtemperatur) beobachtet werden (nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass das Protein in geringgepufferter Lösung bzw. unter Zugabe von 10 mM EDTA kaum zu Aggregation neigte, sondern in Lösung und aktiv blieb. Eine Erhöhung der Ionenstärke führt zu Präzipitation und Inaktivierung des Enzyms. Dabei konnte mittels SDS-PAGE gezeigt werden, dass die entstehenden Aggregate ausfallen, jedoch kein Abbau vorliegt. Anhand der Kinetik der Abnahme der Fluoreszenzintensität bzw. der Inaktivierung zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen steigender Ionenstärke und der Tendenz zu präzipitieren (Tab. 4.6). Eine Erhöhung der Salzkonzentration begünstigt hydrophobe Wechselwirkungen, und erklärt diesen Effekt, der auch für andere Proteine beschrieben ist [26].

Obwohl die Fluoreszenzspektren bei geringerer PLD2-Konzentration gemessen wurden, ist die Präzipitation schneller als die irreversible Inaktivierung. Durch Zusatz der Salze konnte jedoch keine Verschiebung des Emissionsmaximums der Fluoreszenzspektren und somit keine strukturellen Änderungen festgestellt werden. Da sich das aktive Zentrum der PLD2 im Interface zweier Domänen befindet, könnte eine Umorientierung bzw. Zerstörung dieser Kontaktstelle infolge der Präzipitation zur Inaktivierung führen [20].

Unter Nativbedingungen, welche in diesem Fall durch minimale Neigung zu Aggregation und geringe Aktivitätsverluste gekennzeichnet sein müssen, zeigte die PLD2 in niedriggepufferter Lösung (10 mM Na-Pipes, pH 7,0, oder 50 mM Na-Acetat, pH 5,5) ohne weitere Zusätze eine gute Lagerstabilität. Die Zugabe von EDTA im millimolarem Bereich konnte diese noch verbessern, so dass PLD2 bei 23 °C über Monate stabil ist. Der Aktivitätsverlust betrug nach 5 Monaten 17 % und ist damit deutlich geringer als

**Tabelle 4.6:** Kinetik der PLD2-Präzipitation und -Inaktivierung bei ausgewählten Bedingungen. Die PLD2 wurde bei einer Proteinkonzentration von 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  für die Fluoreszenzmessungen (Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 335 nm nach Anregung bei 278 nm, 3.4.3) bzw. 280  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  für die Inaktivierung (3.3.7.1) in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei Raumtemperatur inkubiert.

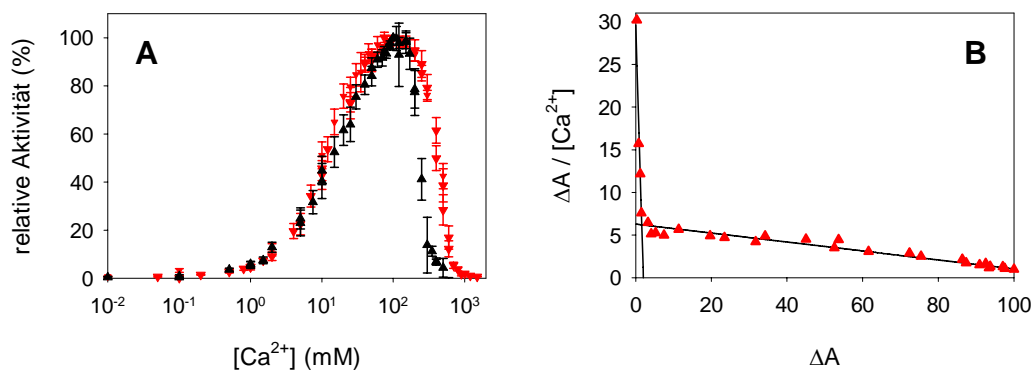
Zusatz	Inaktivierung $k_{obs}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Fluoreszenzabnahme $k_{obs}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
—	$2,5\cdot 10^{-7}$	$2,1\cdot 10^{-6}$
10 mM EDTA	n.m.	n.m.
120 mM NaCl	$6,5\cdot 10^{-7}$	$3,1\cdot 10^{-6}$
300 mM NaCl	$2,1\cdot 10^{-6}$	$1,2\cdot 10^{-5}$
40 mM $\text{CaCl}_2$	$6,5\cdot 10^{-7}$	$3,3\cdot 10^{-6}$
100 mM $\text{CaCl}_2$	$2,9\cdot 10^{-6}$	$1,2\cdot 10^{-5}$
n.m.	nicht messbar	

bei früheren Weißkohl-PLD-Präparationen (inaktiv nach 4 Tagen bei 8 °C [123]). Die PLD-Präparation aus Wirsingkohl gelang nur unter Zusatz von 50 % Ethylenglycol [4]. Es wird vermutet, dass diese geringere Stabilität der früheren Präparationen auf Kältedenaturierung [76, 155] zurückzuführen ist, da die Stabilität jeweils bei 4 oder 8 °C betrachtet wurde. Eigene Beobachtungen bestätigten eine deutlich geringere Lagerstabilität der PLD2 bei 4 °C.

#### 4.3.1.2 Charakterisierung der Aktivität gegenüber PpNp

PLD2 katalysiert die Abspaltung bzw. den Austausch der Kopfgruppe von Phospholipiden, wie z. B. Phosphatidylcholin. Für die Bestimmung der Aktivität wurde in dieser Arbeit das künstliche Substrat PpNp verwendet [39]. Das freigesetzte p-Nitrophenol war bei pH 8,0 direkt durch Absorptionmessung bei 405 nm nachweisbar. Die v/S-Charakteristik des Substrats in Gegenwart von 100 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und 40 mM CaCl<sub>2</sub> kann durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Es ergab sich ein apparenter  $K_m$ -Wert von  $0,11 \pm 0,01$  mM, welcher vergleichbar mit dem  $K_m$ -Wert für PC-SDS-Mischmicellen ist (0,1 mM, [122]). Die folgenden Aktivitätsbestimmungen erfolgten im Substratsättigungsbereich (ca. 1,2 mM).

PLD2-Aktivität war nur in Gegenwart von Calciumionen, nicht jedoch von anderen zweiwertigen Ionen wie Magnesiumionen messbar. Die Aktivität war dabei stark von der Calciumionenkonzentration abhängig (Abb. 4.16). Die maximale Aktivität wurde bei 100 mM Ca<sup>2+</sup>-Ionen gemessen. Bei Konzentrationen unterhalb von 1 mM Ca<sup>2+</sup>-Ionen konnte keine Hydrolyseaktivität mehr detektiert werden. Die Erhöhung der Aktivität in Abhängigkeit der Calciumionenkonzentration ( $\leq 100$  mM) sowie die spezifische Aktivität in Gegenwart von 100 mM Calciumionen wurden nicht durch das Gegenion beeinflusst (Abb. 4.16A). In der Literatur wurde die Aktivität der PLD bisher



**Abbildung 4.16:** Aktivität von PLD2 in Abhängigkeit von der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration.

**A:** Relative Aktivität in Abhängigkeit der CaCl<sub>2</sub>- (rot) bzw. Ca-Acetat-Konzentration (schwarz). **B:** Scatchard-Plot der Daten aus **A** im Konzentrationsbereich 0 bis 100 mM Ca<sup>2+</sup>-Salz mit den Regressionsgeraden ( $R^2 > 0,92$ ). Die Aktivität der PLD2 gegenüber PpNp wurde in 100 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei 30 °C bestimmt (3.3.7.3).

immer in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  untersucht, wobei für die aus Weißkohl isolierte PLD ein Optimum von 40 mM [113] bzw. 50 mM [202] bestimmt wurde.

Andere aus Pflanzen isolierte PLD haben Aktivitätsoptima zwischen 30 und 100 mM  $\text{CaCl}_2$  [156, 197, 232]. Für ein rekombinantes GST-PLD-Fusionsprotein, welches der PLD2 aus Weißkohl entspricht, steigt die Aktivität bis 50 mM  $\text{CaCl}_2$  an [111]. Schöffner *et al.* [190] detektierten für die PLD2 bei 45 mM und 100 mM  $\text{CaCl}_2$  ähnliche Aktivitäten.

Bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen oberhalb der optimalen Konzentration wird eine starke Inaktivierung beobachtet, die auch in der Literatur beschrieben [113, 197], bisher jedoch nicht diskutiert wurde. Eine mögliche Ursache könnte der Einfluss bzw. die Bindung des Gegenions sein, da für  $\text{Ca}^{2+}$ -Acetat die Aktivität viel schneller sinkt als für  $\text{CaCl}_2$ .

Betrachtete man nur den Bereich der calciumvermittelten Aktivierung (0 – 100 mM), so ergab sich ein hyperboler Verlauf. Die direkte Anpassung ergab einen  $K_D$ -Wert von  $17,4 \pm 0,7$  mM ( $R^2 > 0,99$ ). Der modifizierte Scatchard-Plot in Abb. 4.16B zeigte einen nichtlinearen Verlauf ( $\Delta A$  entspricht der Änderung der relativen Aktivität). Vielmehr konnten zwei lineare Abschnitte, die zwei separate Bindungsereignisse repräsentieren, beobachtet werden. Die berechneten Dissoziationskonstanten betragen hier  $K_{D1} = 19,1$  mM und  $K_{D2} = 0,069$  mM ( $R^2 > 0,92$ ).

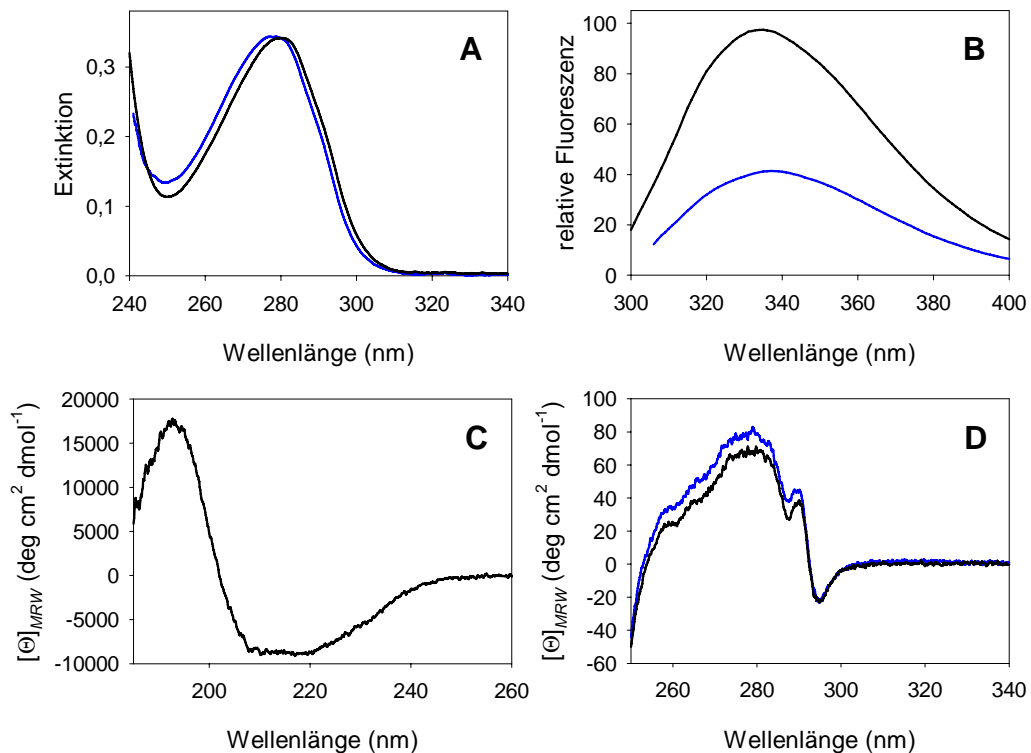
#### 4.3.1.3 UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektren

Das UV-Spektrum nativer PLD2 zeigte ein Maximum bei 280 nm mit einer Schulter im Bereich von 295 nm, die auf die Tryptophanreste zurückgeführt wurde [191], und ein Minimum bei 250 nm (Abb. 4.17A). Es ist kein Streulichtanteil (>310 nm) erkennbar, der auf Aggregate hinweisen würde [191]. Infolge vollständiger Denaturierung in 6 M GdnHCl kommt es zu einer für Proteine häufig beobachteten Blauverschiebung des Absorptionsmaximums (278 nm, Abb. 4.17A).

Die Fluoreszenzspektren (Abb. 4.17B) der nativen PLD2 zeigen anhand des Emissionwellenlängenmaximums (334 nm), dass sich die Tryptophanreste in einer sehr hydrophoben Umgebung befinden. Die Spektren beider Anregungswellenlängen zeigen nur geringe Unterschiede in Form und Wellenlängenmaximum, was auf einen vollständigen Resonanzenergietransfer von den Tyrosinresten zu den Tryptophanresten hinweist. Die Fluoreszenzintensität bei alleiniger Anregung der Tryptophanreste ist jedoch deutlich geringer (Abb. 4.17B).

Das Fern-UV-CD-Spektrum der PLD2 (Abb. 4.17C) zeigt ein breites Minimum bei 208 bis 220 nm und ein scharfes Maximum bei 192 nm. Anhand von Modellpeptiden wur-





**Abbildung 4.17:** Nativspektren von PLD2.

**A:** UV-Spektrum nativ (schwarz), 6 M GdnHCl (blau). **B:** Fluoreszenzemissionsspektren mit Anregung bei 278 nm (schwarz) bzw. 295 nm (blau). **C:** CD-Spektrum im fernen UV-Bereich, **D:** CD-Spektrum im nahen UV-Bereich. Zusätzlich ist das Nah-UV-CD-Spektrum in Gegenwart von 100 mM CaCl<sub>2</sub> in blau dargestellt. Alle Spektren wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei 20 °C, wie in 3.3.3.2, 3.4.2 bzw. 3.4.3 beschrieben, aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 253  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (A), 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (B), bzw. 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (C, D).

de festgestellt, dass  $\alpha$ -Helices (zwei Minima bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 190 nm) konzentrationsbezogen intensivere CD-Signale als  $\beta$ -Faltblätter (Minimum bei 218 nm, Maximum bei 195 nm) geben [106, 107]. Das CD-Spektrum der PLD2 im fernen UV-Bereich weist daher auf beide Sekundärstrukturen hin, wobei ein deutlich größerer Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen vorliegen sollte, da sonst die  $\alpha$ -Helices das Spektrum dominieren würden [191].

Das Nah-UV-CD-Spektrum (Abb. 4.17D) zeigt eine geordnete Struktur mit einem Minimum bei 295 nm, einem lokalen Maximum bei 290 nm, einem lokalen Minimum bei 288 nm und einem breiten Maximum bei 280 nm (274 bis 283 nm). Das CD-Spektrum kennzeichnet die chirale Umgebung der 15 Tryptophan- und 30 Tyrosinreste und weist auf eine geordnete Tertiärstruktur hin. Die geringe Intensität des Nah-UV-CD-Signals kann auf die sich kompensierenden positiven und negativen Beiträge der einzelnen Aromaten zurückgeführt werden. Ähnlich schwache Nah-UV-CD-Signale wurde auch bei anderen, viele Aromaten enthaltenden Proteinen beobachtet [74, 107].

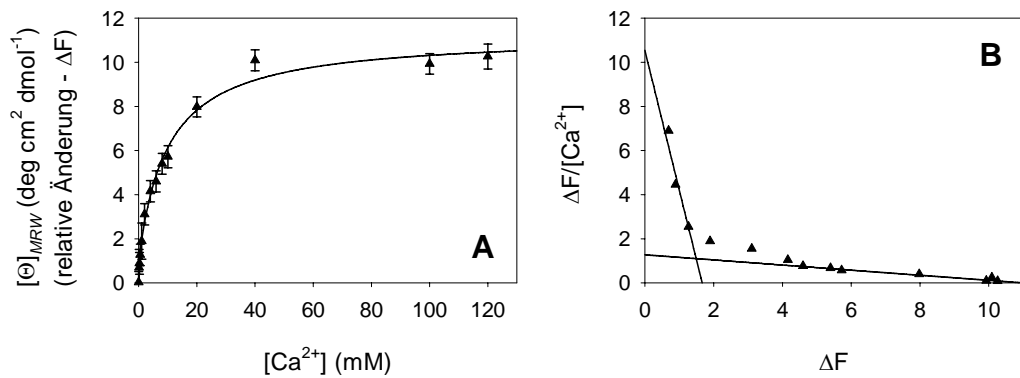
#### 4.3.1.4 Einfluss von Salzen auf die Nativ-Spektren

Fluoreszenzspektren in Gegenwart verschiedener Salze (120 mM NaCl, 40 mM CaCl<sub>2</sub> oder 40 mM MgCl<sub>2</sub>) zeigten keine Verschiebung des Wellenlängenmaximums und somit keine Veränderung der Hydrophobizität der Aromatenumgebung. Lediglich die Intensität der Spektren nimmt mit steigender Inkubationszeit ab, was auf Aggregation zurückgeführt wurde, die in Gegenwart der Salze verstärkt beobachtbar ist (4.3.1.1). In Gegenwart von 40 mM CaCl<sub>2</sub>, 40 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 120 mM NaCl konnten anhand der Fern-UV-CD-Spektren keine Veränderung der Sekundärstruktur detektiert werden. Das steht im Gegensatz zu Studien von Zheng *et al.* [251], die eine schwache Verringerung des Fern-UV-CD-Signals in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> für die C2-Domäne der *A. thaliana* PLD $\alpha$ , aber eine deutliche Verringerung für die PLD $\beta$  (1 mM CaCl<sub>2</sub> hier optimale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration) detektierten.

Nah-UV-CD-Spektren in Gegenwart der oben genannten Salze zeigten nur für Calciumionen eine Intensitätsverstärkung um bis zu 10 deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup> (Abb. 4.17D). Diese Intensitätserhöhung betrifft nicht das Minimum bei 295 nm, sondern tritt im Bereich von 258 bis 292 nm auf, wobei die maximale Erhöhung bei 280 nm liegt.

#### Spektroskopische Bestimmung der Dissoziationskonstante für Calciumionen

Die Intensitätsverstärkung des Nah-UV-CD-Signals tritt nur in Gegenwart von Calciumionen auf, während bei anderen zweiwertigen Ionen (Mg<sup>2+</sup>) oder gleicher Ionenstärke keine Veränderung zu beobachten war. CD-Signale im nahen UV-Bereich reflektieren die Asymmetrie der Aromatenumgebung [107]. Die Verstärkung des CD-Signals infolge der Calciumbindung könnte durch größere Ordnung bzw. Festigkeit der Tertiärstrukturumgebung bestimmter Aromaten verursacht werden. Eine Titration der PLD2 mit Calciumionen wurde für die spektroskopische Bestimmung der Dissoziationskonstante des Calciums genutzt (Abb. 4.18A, 3.4.2). Mit steigenden Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen vergrößerte sich die Intensität des CD-Signals, wobei ein Maximum erreicht wurde. Die in Abb. 4.18A dargestellte direkte Auftragung konnte nur doppelt-hyperbol angepasst werden. Es ergeben sich Dissoziationskonstanten von  $K_{D1} = 10,24$  mM und  $K_{D2} = 0,123$  mM. Die doppelt-reziproke Auftragung (nicht gezeigt) sowie die Scatchard-Auftragung verlaufen nicht linear (Abb. 4.18B). Bei letzterer ergeben sich mindestens zwei lineare Abschnitte.  $\Delta F$  entspricht der relativen Änderung des spektroskopischen Signals und kann als proportional zu der Menge an Protein-Ligand-Komplexen betrachtet werden [68]. Die dargestellten Regressionsgeraden ergeben Dissoziationskonstanten von  $K_{D1} = 8,64$  mM und  $K_{D2} = 0,158$  mM.



**Abbildung 4.18:** Messung der  $Ca^{2+}$ -Bindung über das CD-Signal bei 280 nm.

**A:** Direkte Auftragung mit doppelt-hyperboler Anpassung ( $R^2 > 0,99$ ). **B:** Scatchard-Plot mit den Regressionsgeraden ( $R^2 > 0,95$ ). Die Messung erfolgte wie in 3.4.2 beschrieben. Die Proteinkonzentration betrug etwa  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Die mittels Aktivität (4.3.1.2) und Nah-UV-CD-Spektroskopie bestimmten  $K_D$ -Werte liegen in ähnlichen Konzentrationsbereichen. Es konnten jeweils mindestens zwei verschiedene Bindungsereignisse festgestellt werden (Faktor 50 – 250 Unterschied). Für ein erstes Bindungsereignis wurde ein  $K_D$ -Wert im Bereich von ca. 0,1 mM  $CaCl_2$ , für ein zweites Bindungsereignis ein  $K_D$ -Wert von 10 – 20 mM  $CaCl_2$  bestimmt.

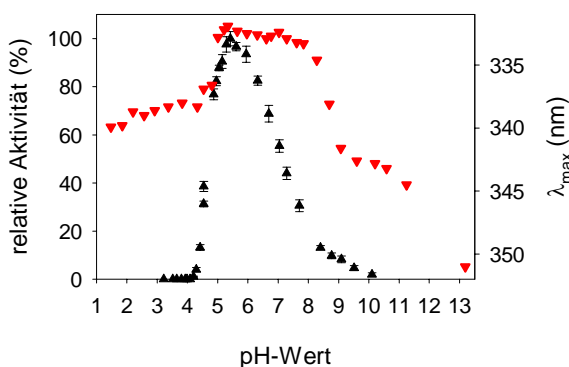
Neben der Bindung von meist zwei Calciumionen an C2-Domänen [149] wurde die Bindung von Calciumionen an die katalytischen Domänen der  $PLD\beta$  aus *A. thaliana* beschrieben [252]. Die für diese Bindung verantwortlichen Aminosäuren wurden identifiziert, und es zeigt sich, dass in den  $PLD$  des  $\alpha$ -Typs in diesem Sequenzabschnitt andere Aminosäuren konserviert sind [252]. Die zwei verschiedenen Bindungsereignisse könnten also an verschiedenen Stellen des Moleküls stattfinden. Für die C2-Domäne der  $PLD\alpha$  aus *A. thaliana* konnten ein bis drei schwach affine Calciumbindungsstellen mit  $K_D$ -Werten von etwa 0,5 mM kalorimetrisch bestimmt werden [251]. Es kann also vermutet werden, dass der hier ermittelte niedrige  $K_D$ -Wert (0,1 mM) der Calciumbindung an die C2-Domäne entspricht, und der hohe  $K_D$ -Wert (10 bis 20 mM) die Bindung an die katalytischen Domänen beschreibt.

Um die Calciumbindung an C2-Domänen anderer Proteine (cytosolische Phospholipase  $A_2$ , Proteinkinasen C, Phospholipase C und Synaptotagmin) zu messen, wurde die Bindung radioaktiver  $^{45}Ca$ -Ionen oder radioaktiver Membranvesikel verfolgt bzw. Veränderungen der intrinsischen Fluoreszenz, der Enzymaktivität bzw. der Membranbindung über Fluoreszenzresonanzenergietransfer nach Markierung der Phospholipide detektiert oder durch Kalorimetrie bestimmt [131, 135, 141, 142, 151, 245]. Dabei wurden  $K_D$ -Werte von 1 bis zu 100  $\mu\text{M}$  erhalten, die dem hier gefundenen niedrigeren Wert ähneln und der daher der Calciumbindung an die C2-Domäne entsprechen könnte.

### 4.3.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität und Aktivität

Die PLD2-Aktivität zeigt eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 4.19). PLD2 hat bei den hier untersuchten Bedingungen bei pH 5,5 die höchste Aktivität. Bei niedrigeren pH-Werten nimmt die Aktivität sehr schnell ab, bei pH-Werten unterhalb von 4,5 ist keine Aktivität mehr messbar. Bei höheren pH-Werten sinkt die relative Aktivität deutlich schwächer, erst bei pH-Werten über 9,0 ist keine Aktivität mehr detektierbar, bei pH 7,0 sind noch etwa 50 % der Aktivität vorhanden. Messungen in Gegenwart geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (10 mM) zeigten ebenfalls ein pH-Optimum bei pH 5,5 (nicht gezeigt) und bestätigten damit die Ergebnisse von Ulbrich-Hofmann und Mitarbeitern [123, 190], wohingegen Abousalham *et al.* [2] eine deutliche Verschiebung des pH-Optimums bei geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (pH 7,5 bei 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) beschrieben hatte. Für  $\text{PLD}\alpha$  aus Rizinus wurde gezeigt, dass diese bei saurem pH-Wert (4,5 – 5,5) sogar unter physiologischen Calciumionenkonzentrationen ( $\mu\text{M}$ ) bei Zugabe von Effektoren (Phosphatidylinositole) aktiv ist [166].

Anhand des Wellenlängenmaximums der Fluoreszenzspektren kann auf eine native Struktur im pH-Bereich von 5,0 bis 8,0 geschlossen werden (Abb. 4.19). Im pH-Bereich von pH 4,5 – 5,0 fällt die Aktivität sehr steil ab, gleichzeitig ist hier eine sehr kooperative Denaturierung der PLD2 zu beobachten. Bei sauren pH-Werten verursacht die zunehmende Protonierung die Denaturierung des Proteins. Betrachtet man den isoelektrischen Punkt der PLD2 ( $4,78 \pm 0,03$ , [91]), so fällt auf, dass dieser genau im Übergangsbereich liegt, und dass das Protein somit wahrscheinlich nur bei negativer Nettoladung in der nativen Konformation vorliegt. Das Wellenlängenmaximum des Fluoreszenzemissionsspektrums der PLD2 im Säure-denaturierten Zustand liegt bei 338,5 bis 339,5 nm. Die moderat hydrophobe Umgebung der Tryptophanreste weist auf einen beträchtlichen Anteil an Reststrukturen hin. In Übereinstimmung damit zeigt die Aufnahme von Fern-UV-CD-Spektren nativ-ähnliche Sekundärstrukturen (Abb. 4.33), wohingegen im Nah-UV-CD keine Tertiärstruktur mehr detektiert



**Abbildung 4.19:** pH-Abhängigkeit der Aktivität und Stabilität von PLD2.

Die Aktivitätsbestimmung (schwarz) erfolgte in einem 3-Puffer-System in Gegenwart von 100 mM  $\text{CaCl}_2$  gegenüber PpNp wie in (3.3.7.2) beschrieben. Die Stabilität wurde mit dem gleichen 3-Puffer-System durch die Aufnahme von Fluoreszenzspektren anhand des Wellenlängenmaximums der Fluoreszenzemissionsspektren (rot) untersucht (3.4.3).

werden konnte (nicht gezeigt). In der Literatur werden zwei Zustände der Säure-induzierten Entfaltung unterschieden. Zum einen der *acid-unfolded state*, der durch zumindest teilweise Sekundär- und Tertiärstrukturentfaltung entsteht, und der *acid-state*, bei dem es entweder durch Salzzugabe oder weitere pH-Wert-Senkung wieder zu einer Sekundärstrukturbildung kommt [71, 79, 80]. Nach der Nomenklatur von Fink und Mitarbeitern [71] ist die PLD2 den Proteinen Typ II zuzuordnen, die infolge einer pH-Wert-Senkung nicht vollständig entfalten, sondern direkt in den *acid-state*, einen *molten globule* ähnlichen Zustand, übergehen (vgl. 2.1.3, 4.3.4.3).

Für die alkalische Denaturierung wird im pH-Bereich von 9,0 bis 11,0 ein Zustand ähnlich dem *acid-state* gefunden, bei noch alkalischeren pH-Werten wird eine weitere Entfaltung beobachtet, die auch bei anderen sauren Proteinen auftritt [116]. Die geringen Aktivitäten oberhalb eines pH-Wertes von 9,0 können vermutlich auf eine Basen-katalysierte Hydrolyse des Phospholipids zurückgeführt werden.

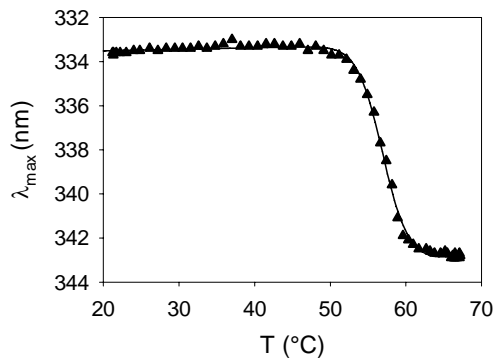
Die Hydrolyseaktivität der PLD2 zeigt ein sehr scharfes Optimum bei pH 5,5, bei höheren pH-Werten sinkt die Aktivität nicht so steil wie im sauren Bereich. Eine deutliche Inaktivierung findet bei geringeren pH-Werten, als für die Entfaltung notwendig, statt (20 % Aktivität bei pH 8,0). Eine Ursache dafür könnte die wahrscheinliche Deprotonierung des für die Katalyse notwendigen zweiten Aspartatrests sein (Abb. 2.4).

### 4.3.3 Temperatur-induzierte Entfaltung

#### 4.3.3.1 Charakterisierung der irreversiblen Entfaltung

Das Zuführen von thermischer Energie führt bei PLD2 zu einer irreversiblen Denaturierung, die mittels Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden konnte. Das Fluoreszenzemissionsmaximum liegt nach Abkühlung bei 342 nm im Vergleich zu 334 nm für das native Enzym. Der Temperatur-denaturierte Zustand ähnelt bezüglich des Fluoreszenzemissionsmaximums dem *acid-state* (4.3.2). Mittels alkalischer Entfaltung (4.3.2) und in Gegenwart starker Denaturanzien (5 M GdnHCl, 4.3.4) wurde hingegen eine Verschiebung bis zu einem Wellenlängenmaximum von 355 nm beobachtet.

Das Erwärmen der Probe auf bis zu 90 °C führte zu keinen weiteren spektroskopischen Änderungen. Der beobachtete Entfaltungsvorgang wurde im getesteten Bereich von 5 bis 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  nicht von der Proteinkonzentration beeinflusst, war jedoch sehr stark von der Heizrate während der Messung abhängig. Die in Abb. 4.20 dargestellte Schmelzkurve wurde bei einer kontinuierlichen Heizrate von 1,2  $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$  aufgenommen und ergibt eine mittlere Schmelztemperatur von 57,2 °C ( $R^2 > 0,99$ ).



**Abbildung 4.20:** Temperatur-induzierte Entfaltungskurve der PLD2.

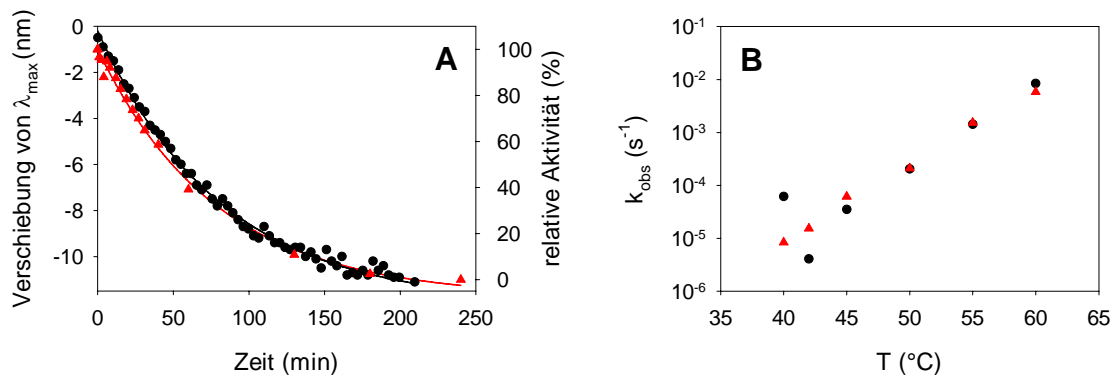
Die Messung (3.4.3) der thermischen Entfaltung erfolgte durch kontinuierliche Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 0,14  $\mu\text{M}$  und einer Heizrate von 1,2  $\text{K}\cdot\text{min}^{-1}$ . Die mittlere Schmelztemperatur wurde nach Gleichung 14 ermittelt.

Die Verfolgung der Temperatur-induzierten Entfaltung mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie war nicht möglich, da die aufgenommenen Spektren der Probe vor und nach dem Erwärmen sowie nach dem Abkühlen nur geringe Unterschiede aufwiesen (Abb. 4.33). Bei der thermischen Entfaltung kommt es wie auch bei der Säure-induzierten Denaturierung kaum zu Änderungen in der Sekundärstruktur der PLD2 (Abb. 4.33). Bei höheren Proteinkonzentrationen ( $\geq 0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) tritt während der thermischen Denaturierung eine starke Aggregation und Präzipitation auf, weswegen die Aufnahme von Nah-UV-CD-Spektren bzw. die Aufnahme einer Schmelzkurve anhand des Nah-UV-CD-Signals nicht möglich war. Bei Erwärmen bis 80 °C in Gegenwart von 2,5 – 3,0 M GdnHCl (Zustand bei 20 °C ähnlich dem Temperatur-denaturiertem Zustand, vgl. 4.3.4.2) konnte weder mit Fluoreszenz- noch mit CD-Spektroskopie eine weitere Entfaltung detektiert werden.

Der fast vollständige Erhalt der Sekundärstruktur im thermisch-denaturierten Zustand im Gegensatz zum chemisch-denaturierten Zustand (4.3.4) konnte ebenfalls bei anderen Proteinen festgestellt werden [84, 173, 221, 233]. Die damit verbundenen Hinweise auf die Bildung eines *molten globule* Zustands werden später diskutiert (4.3.4.3). Anhand der Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums konnte jedoch auf Änderungen der Tertiärstruktur geschlossen werden. Die Irreversibilität könnte durch einen der thermischen Entfaltung nachgeschalteten irreversiblen Prozess, wie z. B. Aggregation, erklärt werden [186, 231]. Diese Annahme wird durch das Auftreten von präzipitierenden Aggregaten bei höheren Proteinkonzentrationen unterstützt.

#### 4.3.3.2 Kinetischer Vergleich von Inaktivierung und Entfaltung

In Abb. 4.21A ist die Kinetik der Inaktivierung bzw. der Entfaltung bei 50 °C dargestellt. Die Progresskurven folgen einer Reaktion erster Ordnung, weil sie eintermig exponentiell angepasst werden können (Gleichung 13). Der Vergleich der Entfaltungs- und Inaktivierungskinetik bei verschiedenen Temperaturen zeigt, dass beide Prozes-

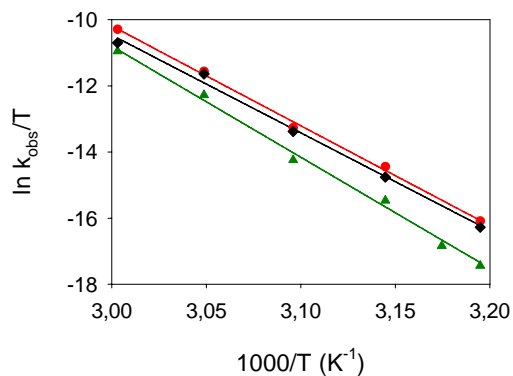


**Abbildung 4.21:** Temperatur-induzierte Entfaltungs- und Inaktivierungskinetik der PLD2.

**A:** Entfaltungs- (schwarz) und Inaktivierungskinetik (rot) der PLD2 bei 50 °C. **B:** Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (schwarz) bzw. Inaktivierung (rot) der PLD2 bei verschiedenen Temperaturen. Die Entfaltung wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie über die Verschiebung des Wellenlängenmaximums bei einer Anregung bei 278 nm in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und einer PLD2-Konzentration von 0,10  $\mu\text{M}$  gemessen (3.4.3). Für die Inaktivierungskinetik erfolgte die Inkubation bei der entsprechenden Temperatur in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und einer PLD2-Konzentration von 0,7  $\mu\text{M}$ . Die Restaktivität wurde wie beschrieben bestimmt (3.3.7.4).

se zusammenfallen (Abb. 4.21B). Infolge der detektierbaren Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften kommt es ebenfalls zur Inaktivierung. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{obs}}$  entsprechen direkt  $k_u$ , da es sich um einen irreversiblen Prozess handelt [249].

Die Entfaltungsgeschwindigkeit war im untersuchten Proteinkonzentrationsbereich (5 – 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) nicht von dieser abhängig, was zeigt, dass der irreversible Prozess (wahrscheinlich Aggregation) diese nicht beeinflusst. Aus den Inaktivierungskurven können die Aktivierungsenthalpie und -entropie der Inaktivierung ( $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$ ) bestimmt werden (Abb. 4.22). Die aus den Inaktivierungskonstanten  $k_{\text{obs}}$  ermittelten Aktivierungsparameter  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  liegen in einem für Proteine üblichen Bereich [8, 82, 87] und sind in Tab. 4.7 mit denen unter Einfluss von Salzen zusammengefasst (4.3.3.3).



**Abbildung 4.22:** Eyring-Plot für PLD2.

Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung nach Eyring in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, in Abwesenheit von Salzen (grün) bzw. in Gegenwart von 120 mM NaCl (schwarz) bzw. 40 mM  $\text{CaCl}_2$  (rot). Die Messungen wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,7  $\mu\text{M}$  durchgeführt.

### 4.3.3.3 Einfluss von Salzen auf die thermische Entfaltung

PLD2 ist nur in Gegenwart ausreichender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ( $\geq 40$  mM) aktiv. Bei diesen Ionenstärken zeigt sich aber bereits eine erhöhte Aggregationsneigung (4.3.1.1), was die Messungen zusätzlich beeinflusste. 120 mM NaCl bzw. 40 mM  $\text{CaCl}_2$  beschleunigten im Vergleich zur thermischen Inaktivierung in salzfreiem Puffer die Kinetik in gleicher Weise (Abb. 4.22). Die aus der Arrhenius- bzw. Eyring-Auftragung bestimmten Aktivierungsparameter (Tab. 4.7) zeigten eine Verringerung aller Parameter in Gegenwart der Salze. Die Aktivierungsparameter der Reaktionen sind für beide Salze sehr ähnlich, obwohl die Inaktivierung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  tendenziell immer etwas schneller verlief. Die geringfügige kinetische Destabilisierung durch die Salze entsteht durch entropische und enthalpische Destabilisierung. Es kann vermutet werden, dass die Ursache dafür in der Verstärkung der bereits im nativen Zustand auftretenden Aggregation (4.3.1.1), die durch die verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen hervorgerufen wird, liegt.

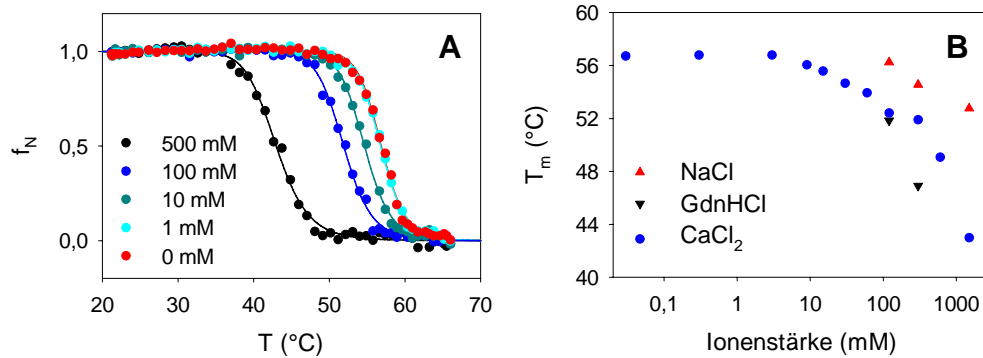
Die Aufnahme von thermischen Übergangskurven analog zu Abb. 4.20 in Gegenwart steigender  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zeigte eine Verschiebung der  $T_m$ -Werte zu niedrigeren Temperaturen (Abb. 4.23). Der Übergangsmittelpunkt sank ab einer Konzentration von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die Verschiebung des Übergangsmittelpunkts bei Verwendung von NaCl war deutlich schwächer als bei  $\text{CaCl}_2$  und erst ab einer Konzentration von 120 mM NaCl beobachtbar. GdnHCl führte bei Konzentrationen von 300 mM bereits bei Raumtemperatur zu messbarer Entfaltung (vgl. 4.3.4) und verringerte die thermische Stabilität stärker als  $\text{CaCl}_2$  (Abb. 4.23B).

Abb. 4.23B zeigt, dass ein reiner Ionenstärkeeffekt für die Destabilisierung durch Calciumionen ausgeschlossen werden muss. Calciumchlorid wirkt erst im Bereich des zweiten messbaren Bindungsereignisses ( $K_D$  von 10 bis 20 mM, 4.3.1.2, 4.3.1.4) destabilisierend, wohingegen das erste Bindungsereignis nur geringen Einfluss auf die Stabilität zu haben scheint. Das zweite Bindungsereignis verursacht leichte Verände-

**Tabelle 4.7:** Parameter der thermischen Inaktivierung für PLD2 bei verschiedenen Pufferbedingungen. Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 0,7  $\mu\text{M}$  in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5. Die Aktivierungsenergie  $E_A$  wurde aus der Arrhenius-Auftragung ( $\ln(k_{obs})$ ) vs.  $\frac{1}{T}$ ) und  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  aus der Eyring-Auftragung ( $\ln\left(\frac{k_{obs}}{T}\right)$  vs.  $\frac{1}{T}$ ) bestimmt ( $R^2 > 0,95$ ).  $\Delta G^\ddagger$  wurde mit Hilfe der Gleichung  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \cdot \Delta S^\ddagger$  berechnet.

Zusatz	$E_A$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^\ddagger$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\ddagger$ (J·mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\ddagger(20^\circ\text{C})$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
—	281	279	550	118
120 mM NaCl	246	246	452	114
40 mM $\text{CaCl}_2$	254	251	470	113





**Abbildung 4.23:** Einfluss von Salzen auf die thermische Entfaltung.

**A:** Normierte Temperatur-induzierte Entfaltungskurven bei ausgewählten  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen. **B:** Einfluss verschiedener Salze auf die mittlere Schmelztemperatur. Mittels *batch-scan* wurden Fluoreszenzspektren in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von  $0,135 \mu\text{M}$  und einer Heizrate von  $1,2 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$  aufgenommen und nach Gleichung 14 ausgewertet (3.4.3).

rungen in der Tertiärstruktur (Nah-UV-CD-Spektren, Abb. 4.17D), die zu einem voll aktiven Enzym führen (Optimum bei 100 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Denkbar wäre, dass infolge der Calciumbindung durch Ladungsabschirmung und Strukturänderungen die hydrophobe Oberfläche des Enzyms vergrößert wird. Bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen könnte wiederum der chaotrope Einfluss des  $\text{CaCl}_2$  die Destabilisierung verursachen oder zumindest verstärken [27]. Die fehlenden Sekundärstrukturänderungen infolge der thermischen Entfaltung (Abb.4.33) weisen zudem auf eine nativ-ähnliche Spezies hin, die durch Aggregation nach ersten Veränderungen der Enzymstruktur stabilisiert bzw. irreversibel gebildet wird. Erhöhte Temperaturen und Salze verstärken hydrophobe Wechselwirkungen, so dass die Aggregation des Enzyms der entscheidende Faktor bei der thermischen Denaturierung zu sein scheint und für die unterschiedlichen Wechselwirkung von Ionenstärke und Calciumspezifität bei der Destabilisierung verantwortlich sein könnte. Ähnliche Beobachtungen erfolgten auch beim  $\alpha$ -Crystallin, wo die Calcium-spezifische Verringerung der thermischen Stabilität und Aktivität ebenfalls auf eine erhöhte Aggregationsneigung zurückgeführt wurde [46].

#### 4.3.4 Denaturans-induzierte Entfaltung

Die unspezifische Bindung von Harnstoff bzw. GdnHCl führt zur Denaturierung von Proteinen [11, 243]. Der einsalzende Effekt der chemischen Denaturanzien GdnHCl und Harnstoff [157, 158] sollte im Gegensatz zur thermischen Entfaltung die Aggregation partiell entfalteter Spezies verhindern, so dass bei Faltungs- und Entfaltungsuntersuchungen auch der vollständig entfaltete Zustand des Proteins zugänglich wird.

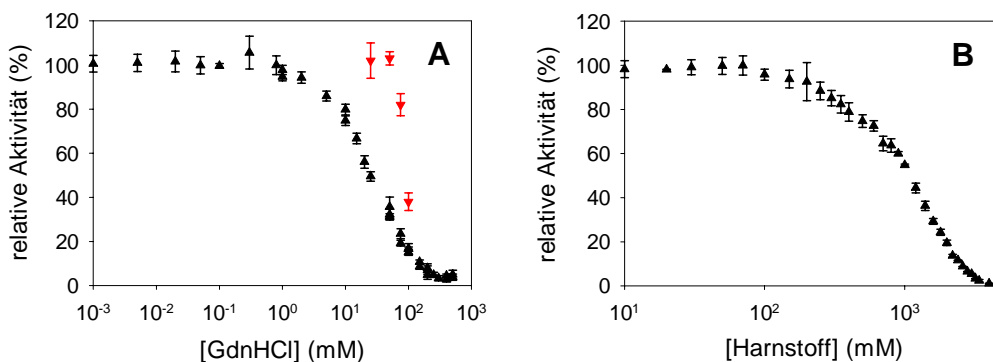
#### 4.3.4.1 Einfluss von Denaturanzien auf die Aktivität

Die enzymatische Aktivität ist ein wichtiges Merkmal des nativen Zustands eines Proteins. Die Aktivität der PLD2 sinkt jedoch in Gegenwart von GdnHCl und Harnstoff sehr schnell ab (Abb. 4.24). In Gegenwart geringer GdnHCl-Konzentrationen (bis 50 mM GdnHCl) kommt es zu einer vollständig reversiblen Inhibierung; bei höheren GdnHCl-Konzentrationen tritt eine irreversible Inaktivierung auf. Die Inaktivierung in Gegenwart von Harnstoff kann erst bei wesentlich höheren Denaturanzkonzentrationen (Faktor 50) beobachtet werden.

In dem Bereich, in dem die PLD2 reversibel inhibiert wird, liegt das Protein in der nativen oder einer reversibel veränderten Konformation vor. Eine inaktivierende Wirkung von GdnHCl und Harnstoff bei Konzentrationen unterhalb derer, die für strukturelle Veränderungen erforderlich sind, wurde bereits bei einer Reihe von Enzymen gefunden [10, 56, 239]. Neben der Lipidbindung ist für die Aktivität der PLD2 das Zusammenwirken von zwei Domänen (Bildung des aktiven Zentrums) wichtig. Daher ist es gut vorstellbar, dass die Bindung der Denaturanzien an das Enzym und/oder das Lipid die Interaktion der Domänen oder die Substrat-Enzym-Interaktion stört. Durch die Reversibilität der Aktivitätshemmung im Falle des GdnHCl bei geringen Denaturanzkonzentrationen (10 – 50 mM) ist auch eine Wirkung als Inhibitor möglich.

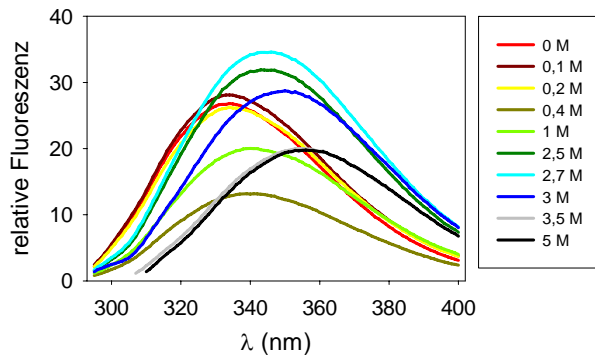
#### 4.3.4.2 Beschreibung der strukturellen Übergänge

Die Denaturierung durch chemische Denaturanzien wie GdnHCl und Harnstoff gibt Auskunft über die Stabilität von Proteinen. In Abb. 4.25 sind ausgewählte Fluoreszenzspektren der GdnHCl-induzierten Entfaltung dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 0,1 M GdnHCl veränderte sich das Fluoreszenzspektrum nicht. Bei 0,2 bis



**Abbildung 4.24:** Aktivität der PLD2 in Gegenwart von GdnHCl und Harnstoff.

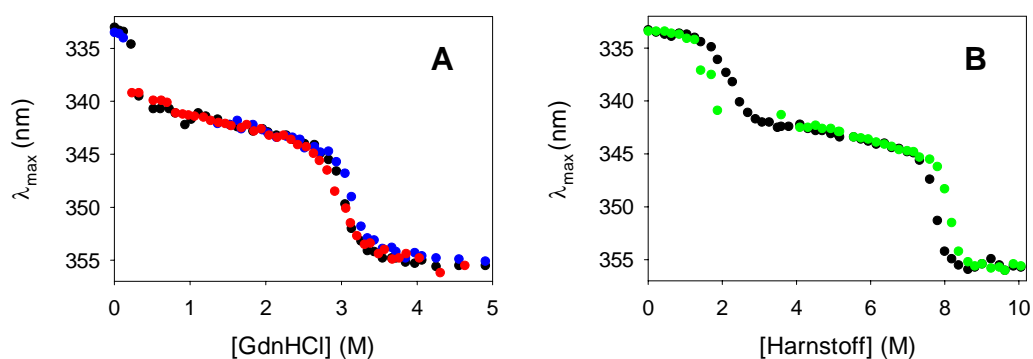
**A:** Aktivität in Gegenwart von GdnHCl (schwarz) und nach Rücksprung aus der entsprechenden GdnHCl-Konzentration (rot). **B:** Aktivität in Gegenwart von Harnstoff. Für die Messungen wurden 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, 40 mM CaCl<sub>2</sub> mit der entsprechenden Konzentration GdnHCl bzw. Harnstoff und dem Substrat PpNp bei 30 °C vorinkubiert, und durch Zugabe von PLD2 (5 µg) gestartet (3.3.7.3). Der Rücksprung erfolgte nach vierwöchiger Inkubation bei 23 °C zu nichtinhibierenden GdnHCl-Konzentrationen (≤ 10 mM).



**Abbildung 4.25:** Fluoreszenzspektren der PLD2. Fluoreszenzspektren in Gegenwart steigender GdnHCl-Konzentrationen nach Anregung bei 278 nm. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 0,27  $\mu$ M und den entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen nach 20 h Inkubation.

0,4 M GdnHCl wurde eine zunehmende Rotverschiebung des Emissionsmaximums beobachtet (334 – 341 nm), die mit einer starken Intensitätsabnahme einherging. Für letztere konnte im Folgenden Präzipitation der teilentfalteten PLD2 verantwortlich gemacht werden, die mit weiter steigender GdnHCl-Konzentration wieder abnahm, so dass bis 2,7 M GdnHCl die Fluoreszenzintensität wieder anstieg. Die dabei beobachtete leichte Wellenlängenverschiebung (341 – 344 nm) kann auf Lösungsmittelleffekte des GdnHCl zurückgeführt werden. Im Bereich um 3 M GdnHCl kam es zu einer weiteren Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums (344 – 355 nm), wiederum verbunden mit einer Intensitätsabnahme. Für die Harnstoff-induzierte Entfaltung der PLD2 wurden ähnliche Fluoreszenzspektren gemessen (nicht gezeigt).

Beide Denaturanzien führten bei der PLD2 zu einer stufenartigen Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums von 334 bis 355 nm mit einer bei 0,3 bis 2,8 M GdnHCl bzw. 2,5 bis 7,5 M Harnstoff stabilen teilentfalteten PLD2 mit einem Emissionsmaximum von 341 bis 344 nm (Abb. 4.26). Es ergeben sich zwei strukturelle Übergänge; der erste irreversible Übergang hat einen Übergangsmittelpunkt bei 0,2 M



**Abbildung 4.26:** GdnHCl- und Harnstoff-induzierte Übergangskurven der PLD2 mittels Fluoreszenzspektroskopie.

**A:** GdnHCl-induzierte Faltung (rot), Entfaltung (schwarz) nach 20 h Inkubation bzw. Entfaltung nach 4 Wochen Inkubation (blau). Für die Faltungsexperimente wurde das Protein zuvor für 3 d bei 5 M GdnHCl inkubiert. **B:** Harnstoff-induzierte Entfaltung nach 20 h (schwarz) und nach 1 Woche (grün) Inkubation. Die Messungen wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und den entsprechenden GdnHCl- bzw. Harnstoff-Konzentrationen durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 278 nm bei einer Proteinkonzentration von 0,068  $\mu$ M durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand des Fluoreszenzemissionsmaximums (3.4.3).

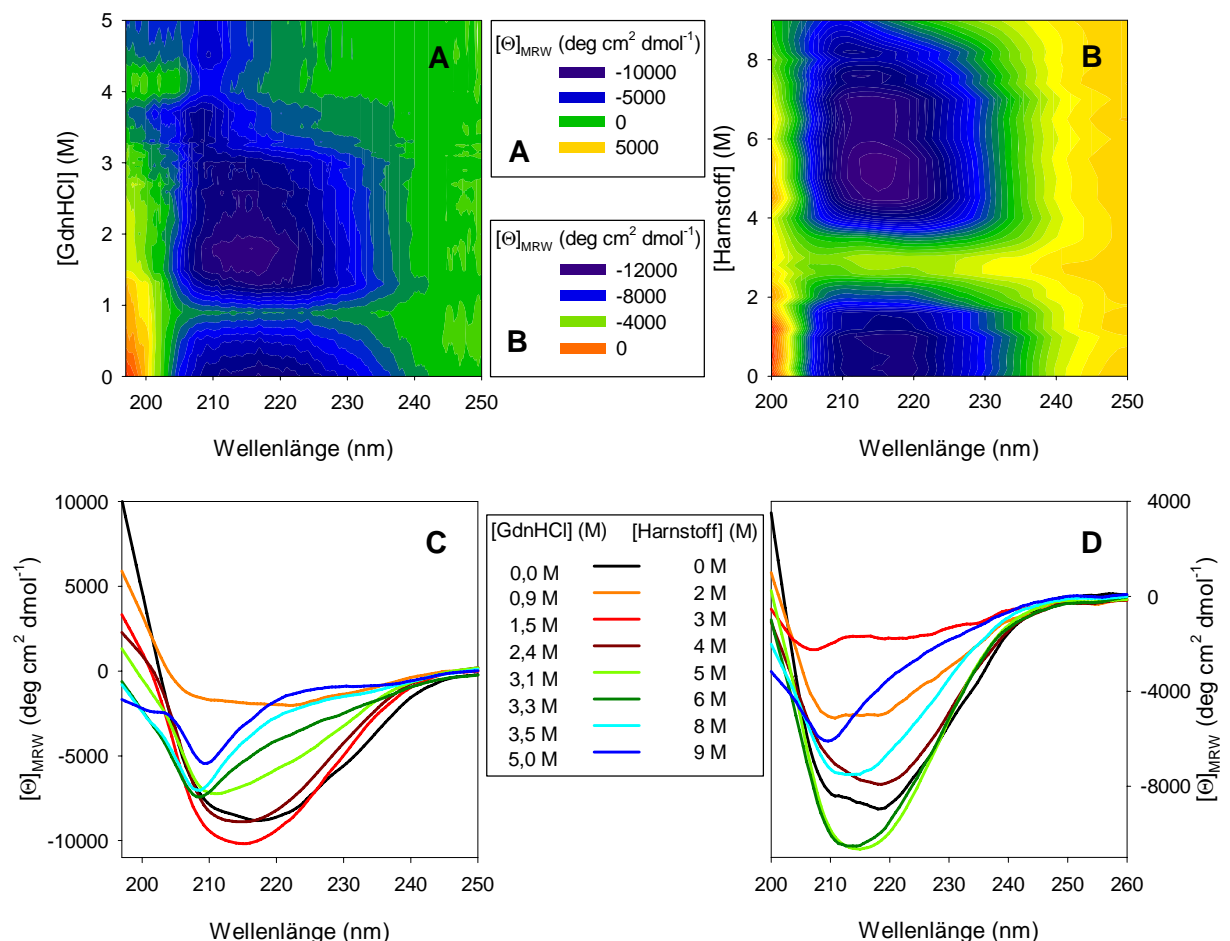
GdnHCl bzw. 2 M Harnstoff, der zweite reversible Übergang bei 3 M GdnHCl bzw. 8 M Harnstoff.

Die Fluoreszenzspektren der PLD2 werden durch die Tryptophanreste dominiert und da die 15 Tryptophanreste über das gesamte Molekül verteilt sind (Abb. 2.7), spiegelt die zunehmende Rotverschiebung die Gesamtheit aller Veränderungen der Tryptophanumgebungen wider. Anhand des Fluoreszenzmissionsmaximums (341 – 344 nm) konnte festgestellt werden, dass die Tryptophanreste der teilentfalteten PLD2 bereits stärker dem wässrigen Lösungsmittel zugänglich sind als im nativen Enzym. Ein Fluoreszenzmissionsmaximum von 355 nm entspricht Tryptophanresten in denaturierten Proteinen [191], so dass erst nach dem zweiten Übergang die Tryptophanreste vollständig dem wässrigen Lösungsmittel zugänglich waren. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der nativen, teilentfalteten und vollständig entfaltenen PLD2 können neben der Präzipitation zusätzlich durch quenchende Einflüsse benachbarter Aminosäuren oder eine veränderte Effizienz des strahlungslosen Energietransfers verursacht werden [182, 191].

PLD2 ist bis 0,1 M GdnHCl bzw. 1 M Harnstoff strukturell als nativ anzusehen, bei höheren Denaturationskonzentrationen trat eine Verschiebung des Fluoreszenzmissionsmaximums von 7 nm ein (334 – 341 nm). Dieser Entfaltungsvorgang benötigte mindestens 4 Wochen bis zum Erreichen des endgültigen Wertes (Abb. 4.26). Unterhalb von 0,1 M GdnHCl oder 1 M Harnstoff blieb nach 4 Wochen Inkubation neben dem nativen Fluoreszenzsignal auch die Aktivität (100 % Aktivität bei 0,05 M GdnHCl bzw. 1 M Harnstoff) erhalten. Bei Denaturationskonzentrationen von Beginn des ersten Übergangs ( $\geq 0,1$  M GdnHCl bzw. 1 M Harnstoff) bis etwa 1,5 M GdnHCl bzw. 4 M Harnstoff kam es zur Aggregation bis hin zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Der zweite Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei etwa 3 M GdnHCl bzw. 8 M Harnstoff war vollständig reversibel (Abb. 4.26A für GdnHCl). Für diesen Übergang ist allerdings mit steigender Inkubationszeit (mehrere Wochen) eine Verschiebung des Übergangsmittelpunkts um etwa 0,2 M GdnHCl bzw. 0,4 M Harnstoff zu höheren Denaturationskonzentrationen zu beobachten (Tab. 4.8).

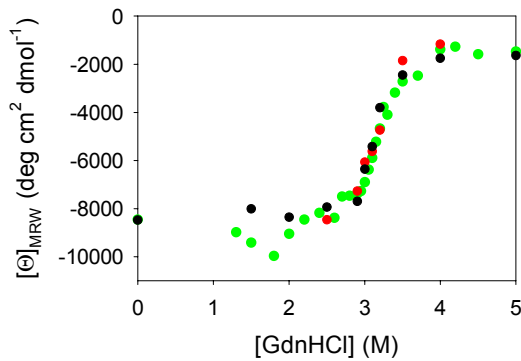
Mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie kann die chirale Umgebung aller aromatischen Aminosäuren untersucht werden [107]. Bereits in Gegenwart von 1 M GdnHCl konnte kein geordnetes Nah-UV-CD-Spektrum mehr gemessen werden. Daher wird angenommen, dass die PLD2 nach dem ersten mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierten Übergang locker strukturiert und die Umgebung der aromatischen Aminosäuren flexibel ist. Bereits die Bildung der teilentfalteten PLD2 führte zum Verlust definierter Tertiärstruktur.

Betrachtet man die Fern-UV-CD-Spektren in Gegenwart steigender Denaturanskonzentrationen (Abb. 4.27), so scheint es, dass der mittels Fluoreszenz detektierte erste Übergang bei Harnstoff (2 M Harnstoff, Abb. 4.26B) mit Sekundärstrukturänderungen (Abb. 4.27B) einhergeht, bei GdnHCl in diesem Bereich (0,2 M) aber keine Sekundärstrukturänderungen auftreten (Abb. 4.26A und Abb. 4.27A). Eine genauere Analyse zeigte, dass die beobachteten Fern-UV-CD-Signaländerungen bei 1 M GdnHCl bzw. 2 bis 4 M Harnstoff (Abb. 4.27A und B) auf Aggregation und Präzipitation der PLD2 zurückzuführen waren. Infolge der geringeren Proteinkonzentration für die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen trat diese dort erst nach längerer Inkubationszeit auf. Bei 5 M GdnHCl konnten keine geordneten Sekundärstrukturen mehr detektiert werden; ein Vergleich mit dem nativen Fern-UV-CD-Spektrum zeigte die größte Änderung bei 220 nm. Die sich daraus ergebende Übergangskurve (Abb. 4.28) zeigte, dass sich die Sekundärstruktur mit einem Übergangsmittelpunkt bei etwa 3,2 M GdnHCl kooperativ und reversibel faltet bzw. entfaltet. Dies ist in Übereinstimmung



**Abbildung 4.27:** Fern-UV-CD-Spektren bei steigenden Denaturanskonzentrationen.

**A** und **B**: Kontur-Plot der Fern-UV-CD-Spektren in Gegenwart steigender GdnHCl- (**A**) bzw. Harnstoffkonzentrationen (**B**). **C** und **D**: Ausgewählte Fern-UV-CD-Spektren (GdnHCl: **C**, Harnstoff: **D**). Die Spektren wurden für die Darstellung in **C** und **D** mit dem Programm SigmaPlot geglättet. Die Messungen wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und den entsprechenden Denaturanskonzentrationen bei einer Proteinkonzentration von 9,8  $\mu$ M (GdnHCl) bzw. 5  $\mu$ M (Harnstoff) nach 20 h Inkubation durchgeführt (3.4.2).



**Abbildung 4.28:** GdnHCl-induzierte Übergangskurve der PLD2 mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie. GdnHCl-induzierte Faltung (rot, 9,5  $\mu\text{M}$  PLD2, zuvor für 24 h bei 5 M GdnHCl inkubiert) bzw. Entfaltung (schwarz, 4,5  $\mu\text{M}$  PLD2, grün, 9,8  $\mu\text{M}$  PLD2). Für die Messungen wurde die PLD2 für 20 h in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, und den entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen inkubiert. Aufgetragen ist die Molare Elliptizität bei 220 nm.

mit dem zweiten Übergang der mittels Fluoreszenz detektierten Tertiärstrukturfaltung (3,1 M GdnHCl, Abb. 4.26A, Tab. 4.8), die jedoch bei hundertfach geringerer Proteinkonzentration untersucht wurde. Der erste Übergang war mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie nicht detektierbar; die Spektren des nativen Enzyms und der teilentfalteten PLD2 unterscheiden sich im Bereich von 1,5 bis 2,8 M GdnHCl nicht signifikant (Abb. 4.27). In 4 M bis 8 M Harnstoff waren die Fern-UV-CD-Spektren ebenfalls dem Nativspektrum der PLD2 ähnlich. Zwischen 4 und 6 M Harnstoff sinkt die Intensität der Elliptizität bei 205 – 230 nm sogar. Außerdem wurde eine leichte Verschiebung des globalen Minimums zu niedrigeren Wellenlängen detektiert (5 nm). Eine Erklärung hierfür wäre eine Strukturinduktion und Versteifung durch das Denaturans. In dem Kontur-Plot in Abb. 4.27A ist der Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 3,2 M GdnHCl anhand der Abnahme der Elliptizität bei Wellenlängen größer als 210 nm ersichtlich. Im Gegensatz dazu verlief in Gegenwart von Harnstoff (Abb. 4.27B) der mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie beobachtbare Übergang weniger steil bei Konzentrationen von 8 bis über 9 M, wohingegen mittels Fluoreszenzspektroskopie ein sehr steiler Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 8 M Harnstoff (Abb. 4.26B) beobachtet wurde. Um den zweiten reversiblen Übergang der PLD2 anhand der Übergangsmittelpunkte vergleichen zu können, wurden die nach unterschiedlichen Inkubationszeiten und bei verschiedenen PLD2-Konzentrationen mittels Fluoreszenz- bzw. Fern-UV-CD-Spektroskopie aufgenommenen Übergangskurven nach einem Zweizustandsmodell unter Verwendung von Gleichung 9 ausgewertet und die Übergangsmittelpunkte sind in Tab. 4.8 angegeben. Die Betrachtung der Übergangsmittelpunkte der detektierten (zweiten) Übergänge zeigt eine leichte Verschiebung der Übergangsmittelpunkte in GdnHCl und eine deutlichere Verschiebung bei Harnstoff, die von der Inkubationszeit und der Proteinkonzentration beeinflusst wird. Mit zunehmender Inkubationszeit kommt es zu einer Verschiebung des Übergangsmittelpunkts zu höheren Denaturanskonzentrationen, die durch höhere Proteinkonzentrationen beschleunigt, möglicherweise sogar verstärkt wird. Das weist klar

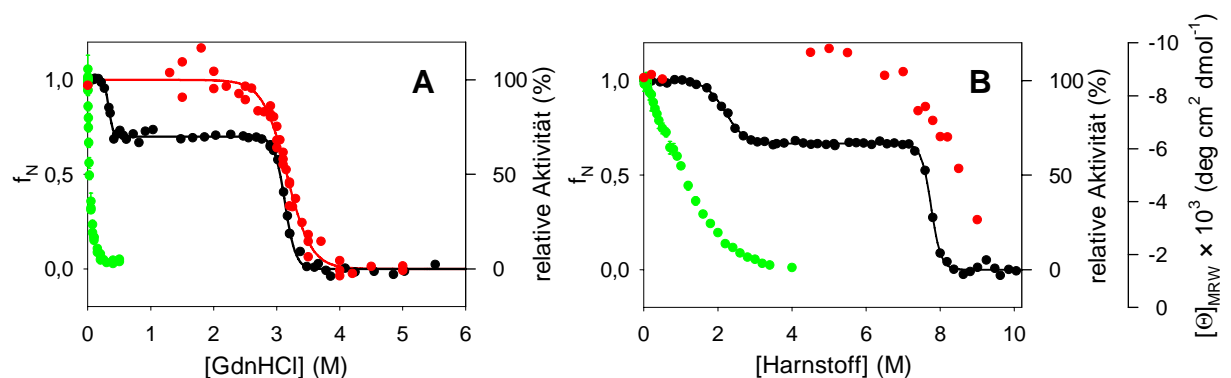
**Tabelle 4.8:** Übergangsmittelpunkte des zweiten Übergangs der PLD2.

Die Übergangsmittelpunkte wurden aus den GdnHCl-induzierten (schwarz) bzw. Harnstoff-induzierten (blau) Übergangskurven unter Verwendung von Gleichung 9 ermittelt. Die Korrelationskoeffizienten der Anpassung lagen jeweils über 0,98.

[PLD2] ( $\mu\text{M}$ )	Methode	Inkubationszeit	$[\text{Denaturans}]_{\frac{1}{2}}$ (M)
0,068	Fluoreszenz (Entfaltung)	20 h	3,051
0,068	Fluoreszenz (Faltung)	20 h	2,987
0,068	Fluoreszenz (Entfaltung)	4 Wochen	3,166
0,068	Fluoreszenz (Faltung)	4 Wochen	3,128
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	20 h	3,130
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	3 d	3,186
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	1 Woche	3,251
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	2 Wochen	3,308
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	3 Wochen	3,321
0,272	Fluoreszenz (Entfaltung)	4 Wochen	3,321
4,5	Fern-UV-CD (Entfaltung)	20 h	3,107
9,8	Fern-UV-CD (Entfaltung)	20 h	3,171
9,5	Fern-UV-CD (Faltung)	20 h	3,209
0,1	Fluoreszenz (Entfaltung)	20 h	7,749
0,1	Fluoreszenz (Entfaltung)	1 Woche	8,136

auf eine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und daher auf die Beteiligung von Aggregationsprozessen hin.

Die in den GdnHCl- und Harnstoff-induzierten Entfaltungsstudien von PLD2 beobachteten Zweischridentfaltungen mit der Bildung einer über größere Denaturansbereiche vorhandenen teilweise denaturierten Spezies, die im Folgenden als teilentfaltete PLD2 bezeichnet wird, sind in Abb. 4.29 in Form normierter Übergänge zusammengefasst.

**Abbildung 4.29:** Sekundär- und Tertiärstrukturentfaltung der PLD2 im Vergleich zur Aktivität.

Die Sekundärstrukturentfaltung (rot) entspricht den Datenpunkten bei 220 nm aus Abb. 4.27 für GdnHCl (A) bzw. Harnstoff (B) und wurde im Falle von GdnHCl unter Verwendung von Gleichung 9 und 10 normiert. Die Tertiärstrukturentfaltung (schwarz) entspricht den Datenpunkten nach 20 h Inkubation aus Abb. 4.26. Zum besseren Vergleich wurden die mittels Fluoreszenzspektroskopie erhaltenen Übergänge anhand ihrer Amplituden mit den oben genannten Gleichungen umgerechnet. Die Aktivität (grün) entspricht den Datenpunkten aus Abb. 4.24.

Zweischrittentfaltungen wurden in der Literatur z. B. für Glycyl-tRNA Synthetase [48], Faktor VIIa [75], SecA Protein [205] und Lipoxygenase-1 [215] beschrieben. Im Falle des SecA Proteins wie auch des Faktor VIIa konnten den einzelnen Übergängen die Entfaltung separater Domänen zugeordnet werden, und die Entfaltung verlief vollständig reversibel [75, 205]. Im Fall der Lipoxygenase-1 wurde die irreversible Harnstoff-induzierte Entfaltung bei drei pH-Werten untersucht, wobei in allen Fällen zwei getrennte Übergänge erhalten wurden, deren Lage und Amplitude sich aber stark voneinander unterschieden [215]. Dies wurde auf die sequenzielle Entfaltung der beiden Domänen zurückgeführt, wobei ionische Wechselwirkungen die Domäneninteraktion stark verändern und die Ergebnisse bei den verschiedenen pH-Werten erklären [215]. Die dimere Glycyl-tRNA Synthetase dissoziiert bei geringen Denaturationskonzentration reversibel zu Monomeren, ohne dass strukturelle Änderungen detektiert werden konnten [48]. Diese nativ-ähnlichen Monomere aggregierten infolge des irreversibel verlaufenden ersten Überganges und das betrachtete Intermediat stellte ein polydisperses Aggregat dar [48]. Der zweite Übergang verlief sehr steil und reversibel, die Proteinaggregate dissoziierten wieder in Monomere [48]. Die Entfaltung der Glycyl-tRNA Synthetase ähnelt damit der Entfaltung der PLD2.

Domänen werden als selbstständig und reversibel faltende Module betrachtet [101, 162]. Die Tatsache, dass mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie nur ein Übergang beobachtet wird, ist ein wichtiger Hinweis, dass bei der PLD2 keine getrennte Domänenentfaltung auftritt. Der fast vollständige Erhalt der nativen Sekundärstruktur nach dem mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierten ersten Übergang (Abb. 4.29) könnte durch eine Reorganisation der einzelnen Domänen zustande kommen und die Proteinoberfläche verändern, was im Weiteren zu der beobachteten Aggregation und Präzipitation führt. Diese zunehmende Aggregation erklärt die langsame Verschiebung des ersten Überganges zu geringeren Denaturationskonzentrationen bei steigender Inkubationszeit. Ein Vergleich der mittels Fluoreszenz detektierten Übergangskurven der beiden Denaturanzien zeigte, dass der erste Übergang in GdnHCl bei sehr geringen Konzentrationen im Gegensatz zu Harnstoff stattfand. Dabei muss der Salzcharakter des GdnHCl in die Betrachtung einbezogen werden, da er eine Erhöhung der Ionenstärke bewirkt und dadurch die PLD-Aggregation beschleunigt (4.3.1.1). Ähnlich wie bei der Lipoxygenase-1 [215] unterscheiden sich die Entfaltungskurven der PLD2 bei pH 5,5 und pH 7,0 [91] hinsichtlich Steilheit und Lage der Übergangsmittelpunkte, was somit ebenfalls auf die Beteiligung von ionischen Wechselwirkungen hinweist. Die auftretende Präzipitation im Bereich von 0,1 bis 1,5 M GdnHCl bzw. 2 bis 4 M Harnstoff führte zu der Vermutung, dass es sich bei höheren Denaturationskonzentrationen



onen, bei denen die teilentfaltete Spezies stabil ist, auch um lösliche Proteinaggregate handeln könnte. Diese Annahme wird durch den oben beschreibenden Einfluss der Proteinkonzentration auf die Lage des Übergangsmittelpunkts des reversiblen Übergangs bestätigt. Während für Harnstoff der reversible Übergang große Unterschiede bei der Sekundär- und Tertiärstrukturentfaltung zeigt (Abb. 4.29B), welche auf die um zwei Größenordnungen unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zurückgeführt werden, zeigt sich für GdnHCl (Abb. 4.29A) nur ein geringer Unterschied (3,1 M Tertiärstruktur- bzw. 3,2 M Sekundärstrukturentfaltung). Eine Ursache könnte hier wiederum der Salzeffekt des GdnHCl sein (wie oben diskutiert). Der zweite Übergang verlief für beide Denaturanzien sehr steil, und bekräftigt die Vermutung, dass bei höheren Denaturanzkonzentrationen lösliche Proteinaggregate vorliegen, die ähnlich wie für die Glycyl-tRNA Synthetase [48] während des zweiten Übergangs dissoziieren und vollständig entfalten.

Die mit zunehmender Inkubationszeit auftretende Verschiebung des zweiten Übergangsbereichs zu höheren Denaturanzkonzentrationen (Tab. 4.8) wäre somit auch erklärbar. Durch die solubilisierende Wirkung des Denaturans wird die Aggregation mit steigenden Denaturanzkonzentrationen immer stärker verlangsamt. Dem Gleichgewicht zwischen monomerer teilentfalteter und vollständig entfalteter Spezies wird durch Aggregation der teilentfalteten Spezies diese entzogen. Die von der Proteinkonzentration abhängige Aggregation könnte somit das Gleichgewicht zu höheren Denaturanzkonzentrationen verschieben. Die teilentfaltete, über große Denaturanzbereiche vorhandene Enzymspezies könnte z. B. durch ein aggregationsanfälliges Faltungsintermediat entstehen und wurde deshalb genauer untersucht.

#### 4.3.4.3 Charakterisierung der teilentfalteten PLD2

Im Folgenden werden die Eigenschaften der teilentfalteten Proteinspezies (bei 0,3 – 2,8 M GdnHCl bzw. bei 2,5 – 7,5 M Harnstoff) mit den Eigenschaften des nativen und des vollständig entfalteten Enzyms verglichen.

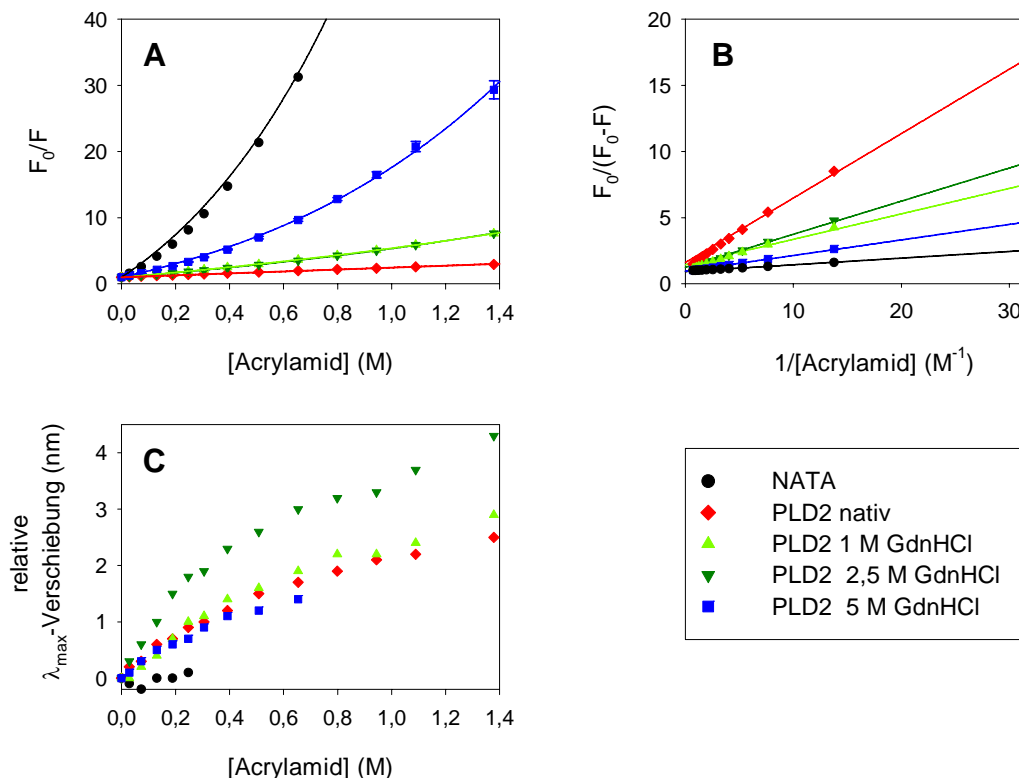
##### Analytische Ultrazentrifugation

Um die Molekülform zu untersuchen, wurde die analytische Ultrazentrifugation angewendet. Die Sedimentation bzw. der Sedimentationskoeffizient eines Partikels ist abhängig von dessen Molekulargewicht und Form. Anhand der apparenten molekularen Masse von 86,7 kD (Gleichgewichtslauf) konnte die vollständig denaturierte PLD2 bei 5,6 M GdnHCl bei einer Proteinkonzentration von  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  wie das native Enzym als monomer identifiziert werden. Bei 1,0 und 2,5 M GdnHCl bzw. 5,0 und

6,0 M Harnstoff konnte dagegen keine monomere Enzymspezies detektiert werden. Sedimentationskonstanten im Bereich von 13,05 bis 20,22 Svedberg-Einheiten (nativ: 5,06, 4.3.1.1) wiesen auf extrem heterogene Oligomere oder vielmehr Aggregate hin. Die teilentfaltete PLD2 ist also im Gegensatz zum nativen und vollständig denaturierten Enzym als hochaggregierte Spezies anzusehen. Trotz der Heterogenität der Aggregate konnte anhand der Sedimentationskonstanten festgestellt werden, dass die Aggregate in GdnHCl größer waren als in Harnstoff.

### Acrylamid-Quenchen

Fluoreszenz-Quench-Experimente mit Acrylamid wurden als Ergänzung zu den bisherigen spektroskopischen Untersuchungen durchgeführt, um weitere Informationen über die Umgebung und insbesondere über die Zugänglichkeit der Tryptophanreste zu bekommen. Neben dem nativen und vollständig denaturierten Protein (5 M GdnHCl) wurden die teilentfaltete PLD2 bei 1,0 M und 2,5 M GdnHCl untersucht. Der Vergleich mit *N*-Acetyl-Tryptophanamid (NATA) als Referenz für völlig lösungsmittel-exponierte Tryptophanreste zeigte, dass die Tryptophanreste sogar im vollständig denaturierten Zustand nicht voll zugänglich waren (Abb. 4.30).



**Abbildung 4.30:** Acrylamid-Quenchen von PLD2 unter Nativ- und Entfaltungsbedingungen.

**A:** Stern-Volmer-Auftragung. **B:** Auftragung nach Lehrer. **C:** Relative Wellenlängenverschiebung des Fluoreszenz-emissionsmaximums. Die Messungen wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei den entsprechenden Denaturationskonzentrationen und bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M PLD2 bzw. 12,5  $\mu$ M NATA durchgeführt (3.4.3). Die Anpassung nach Stern-Volmer erfolgte nach Gleichung 11 bzw. nach Lehrer-Auftragung nach Gleichung 12, wobei bei letzterer für die Anpassung nur die niedrigen Acrylamidkonzentrationen ( $\leq 0,25$  M Acrylamid) berücksichtigt wurden ( $R^2 > 0,998$ ). Die ermittelten Konstanten sind in Tab. 4.9 zusammengefasst.

**Tabelle 4.9:** Acrylamid-Quenchen.

Die Stern-Volmer-Auftragung wurde nach Gleichung 11 bzw. die Auftragung nach Lehrer nach Gleichung 12 ausgewertet. Die relative Zugänglichkeit wurde auf  $K_{SV}$  bzw.  $K_{eff}$  von NATA bezogen.

Probe	$V$ ( $M^{-1}$ )	$K_{SV}$ ( $M^{-1}$ )	% NATA	$f$	$K_{eff}$ ( $M^{-1}$ )	% NATA
	Stern-Volmer	Stern-Volmer	Stern-Volmer	Lehrer	Lehrer	Lehrer
NATA	0,849	26,42	100,0	1,07	18,45	100,0
PLD2 nativ	<0,01	1,46	5,5	0,62	3,31	17,9
PLD2 1,0 M GdnHCl	0,237	3,26	12,3	0,69	7,48	40,5
PLD2 2,5 M GdnHCl	0,298	2,96	11,2	0,80	4,98	27,0
PLD2 5,0 M GdnHCl	0,618	8,49	32,1	1,03	8,24	44,7

Die Stern-Volmer-Auftragung (Abb. 4.30A) zeigte anhand des nichtlinearen Kurvenverlaufs Anteile statischen Quenchens ( $V$ ), die durch die Anpassung nach Gleichung 11 vom dynamischen Quenchen ( $K_{SV}$ ) separiert werden konnten (Tab. 4.9) [57]. Die Tryptophanreste des nativen Enzyms sind am wenigsten zugänglich. Bei 1,0 bzw. 2,5 M GdnHCl zeigte die teilentfaltete PLD2 ein sehr ähnliches Quenchverhalten, das zwischen dem des nativen und des denaturierten Enzyms lag. Die Tryptophanreste der teilentfalteten PLD2 bei 1,0 M GdnHCl waren jedoch geringfügig stärker zugänglich als die der teilentfalteten PLD2 bei 2,5 M GdnHCl.

Durch die Auftragung nach Lehrer (Abb. 4.30B) wird insbesondere der Anteil leicht zugänglicher Tryptophanreste ermittelt [58, 124]. Aus der Quench-Konstante ( $K_{eff}$ , Tab. 4.9) lässt sich ablesen, dass die Tryptophanreste des nativen Enzyms am wenigsten zugänglich sind, dann folgen die teilentfaltete PLD2 bei 2,5 M, dann die teilentfaltete PLD2 bei 1,0 M und am stärksten können die Tryptophanreste des Enzyms in 5,0 M GdnHCl gequenchet werden. Die geringere Zugänglichkeit der Tryptophanreste der teilentfalteten PLD2 bei 2,5 M GdnHCl im Vergleich zu 1,0 M GdnHCl könnte auf größere Aggregate bei höheren GdnHCl-Konzentrationen hindeuten. Aus dem  $f$ -Wert der Lehrer-Auftragung kann abgeleitet werden, dass von den quenkbaren Tryptophanresten beim nativen Enzym 62 %, bei 1,0 M GdnHCl 69 %, bei 2,5 M GdnHCl 80 % und bei 5,0 M GdnHCl 100 % der Tryptophanreste initial zugänglich waren. Der Anteil sofort zugänglicher Tryptophanreste nahm erwartungsgemäß mit steigender GdnHCl-Konzentration zu, auch wenn die Enzymspezies bei 2,5 M GdnHCl weniger gequenchet wurde als bei 1,0 M GdnHCl.

Bei den Fluoreszenz-Quench-Experimenten ergab sich eine Blauverschiebung der Fluoreszenzemissionsmaxima (Abb. 4.30C), die sich aus der Tatsache ergibt, dass zuerst die dem Medium zugewandten Tryptophanreste gequenchet werden, welche durch die hydrophilere Umgebung bei längeren Wellenlängen emittieren [58]. Die Verschiebung der Emissionsmaxima für die teilentfaltete PLD2 bei 2,5 M GdnHCl war doppelt so stark im Vergleich zu allen anderen Bedingungen, was darauf hinweist, dass

hier der Anteil der gequenchten (und dem Medium zugewandten) Tryptophanreste zu nicht-gequenchten (und in hydrophober Umgebung liegenden) Tryptophanresten besonders hoch ist. Diese Beobachtung verstärkt die Annahme, dass sich bei dieser GdnHCl-Konzentration große Aggregate bilden, wobei nur die oberflächennah liegenden und dem Medium zugewandten Tryptophanreste gequenchet werden konnten.

#### Limitierte Proteolyse

Bei der Faltung und Entfaltung auftretende Unterschiede in der Enzymstruktur können mittels limitierter Proteolyse sichtbar gemacht werden, wenn sich diese auf die proteolytische Angreifbarkeit des Proteins auswirken [72, 73, 96]. Bisherige Proteolysestudien an PLD2 zeigten, dass dieses Enzym auch unter Nativbedingungen sehr leicht von Proteasen angegriffen wird [247]. Um die Struktur der teilentfalteten PLD2 zu untersuchen, wurden neben dem nativen Enzym auch Proteolysestudien in Gegenwart von GdnHCl-Konzentrationen (0,3; 0,6; 1,0 M) bzw. Harnstoff (3,0; 5,0 M) durchgeführt. Thermolysin und Proteinase K haben bei diesen Denaturationskonzentrationen noch eine ausreichende Aktivität (U. Arnold, persönliche Mitteilung).

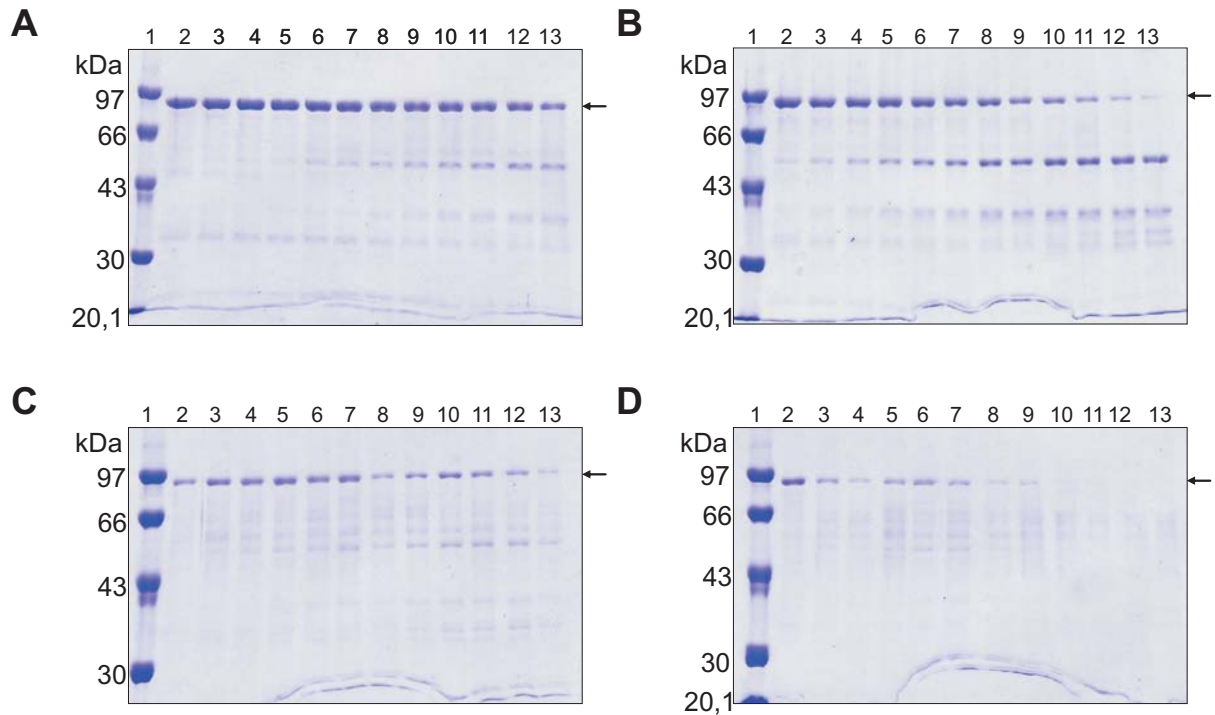
Die von Younus *et al.* [247] bei Proteolysestudien mit Thermolysin identifizierten transienten Fragmente der PLD2 konnten bestätigt werden (Abb. 4.31A). Zudem konnten bei Proteinase K (Abb. 4.31B) ähnliche transiente Fragmente (Abbau nicht gezeigt) wie bei Thermolysin detektiert werden.

Thermolysin (Abb. 4.31C und D) und Proteinase K (nicht gezeigt) bauten die PLD2 mit steigenden GdnHCl-Konzentrationen immer schneller ab. Dabei entstanden in geringerem Umfang die gleichen definierten Fragmente wie unter Nativbedingungen (Abb. 4.31A). In Gegenwart von Harnstoff war der Abbau der PLD2 für beide Proteasen fragmentlos (nicht gezeigt).

Bei den durchgeführten Proteolysestudien traten ähnliche Fragmentmuster auf. Das könnte darauf hinweisen, dass die gleichen Strukturen angreifbar sind und diese sich im untersuchten Denaturationskonzentrationsbereich nicht ändern. Der beschleunigte Abbau in Gegenwart der Denaturanzien weist jedoch auf eine Destabilisierung des nativen Proteins und der Fragmente hin.

#### Bindung von ANS

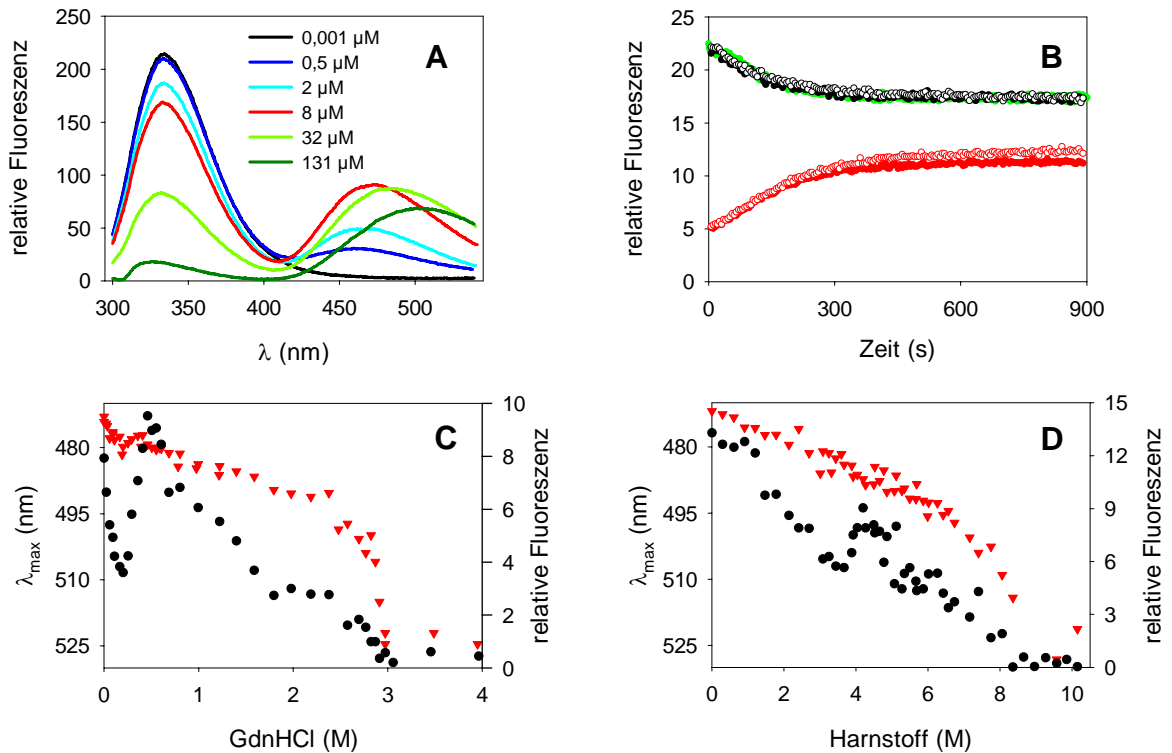
Der Fluoreszenzmarker ANS wird verwendet, um strukturelle Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen [230]. Die Bindung von ANS an lösungsmittel-exponierte hydrophobe Bereiche des Proteins ist mit einer sehr starken Erhöhung der ANS-Fluoreszenz (> 420 nm) verbunden [230]. Insbesondere Proteine im *molten globule* Zustand besitzen eine meist hohe Bindungsfähigkeit für ANS [120].



**Abbildung 4.31:** Limitierte Proteolyse von PLD2 unter nativen und denaturierenden Bedingungen. Die limitierte Proteolyse wurde in 10 mM Na-Pipes, pH 7,0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (**A**, **B**) und unter Zugabe von 0,6 M GdnHCl (**C**) bzw. 1 M GdnHCl (**D**) bei Raumtemperatur durchgeführt (3.3.6). In **A**, **C** und **D** wurde mit  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Thermolysin, in **B** mit  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Proteinase K und jeweils  $140 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  PLD2 (Pfeil) inkubiert. In Bahn 1 wurde der Proteingrößenstandard (3.1.2) aufgetragen. Die Proben in Bahn 2 bis 13 wurden zu den folgenden Zeitpunkten genommen (2: 50 s; 3: 95 s; 4: 160 s; 5: 225 s; 6: 6 min; 7: 8 min; 8: 11,5 min; 9: 15,25 min; 10: 20 min; 11: 27 min; 12: 38,5 min; 13: 50 min).

ANS bindet bereits native PLD2 sehr stark (Abb. 4.32A), was auf ausgedehnte hydrophobe (amphiphile) Bereiche der PLD2 hinweist. Diese Bereiche sind vermutlich auch für die hohe Aggregationsneigung verantwortlich, ihre Funktion könnte in der Membran- bzw. Substratbindung liegen. Anhand der sich verändernden Eigenschaften der Protein- und ANS-Fluoreszenz wurde abgeschätzt, dass die Dissoziationskonstante für den PLD2-ANS-Komplex im Bereich von  $10 \mu\text{M}$  liegt. Für weitere Messungen wurden  $10 \mu\text{M}$  ANS verwendet, da bei dieser ANS-Konzentration Protein- und ANS-Fluoreszenz gut detektierbar waren.

Zur Charakterisierung der teilgefalteten PLD2 wurde die Entfaltungskinetik bei 1 M GdnHCl in Gegenwart von ANS gemessen (Abb. 4.32B). Im Vergleich zur Entfaltungskinetik in Abwesenheit von ANS veränderte die Gegenwart von ANS nicht die Entfaltungsgeschwindigkeit; unabhängig vom Zeitpunkt der ANS-Zugabe (ANS-Bindung an das native Enzym oder ANS-Zugabe gekoppelt mit Denaturanzugabe). Die Entfaltung konnte auch über die Zunahme der ANS-Fluoreszenz bei 480 nm detektiert werden (Abb. 4.32B), was zeigt, dass bei der teilentfalteten PLD2 im Gegensatz zum nativen Enzym weitere hydrophobe Bereiche exponiert oder die bereits gebundenen ANS-Moleküle abgeschirmt werden.



**Abbildung 4.32:** ANS-Bindung an PLD2.

**A:** Fluoreszenzspektren in Gegenwart steigender ANS-Konzentrationen. **B:** Entfaltungskinetik bei 1 M GdnHCl in Abwesenheit von ANS (grün) und in Gegenwart von 10 µM ANS (rot und schwarz), verfolgt über die Abnahme der Proteinfluoreszenz bei 335 nm (grün und schwarz), bzw. die Zunahme der ANS-Fluoreszenz bei 480 nm (rot). Die PLD2 wurde zuvor mit ANS inkubiert (geschlossene Symbole) bzw. die Zugabe von ANS und GdnHCl erfolgten simultan (offene Symbole). **C** und **D:** Verschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums des ANS (rot) und maximale ANS-Fluoreszenzintensität (schwarz) in Abhängigkeit von der GdnHCl- (**C**) bzw. Harnstoffkonzentration (**D**). Die Aufnahme der Spektren bzw. Kinetik erfolgte in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 0,1 µM nach Anregung bei 278 nm.

Durch die Bindung an hydrophobe Oberflächen des Proteins kann ANS die Aggregationsanfälligkeit von Proteinen verändern (verringern oder vergrößern) [3, 118]. Dass sich in Gegenwart von ANS die Entfaltungsgeschwindigkeit der PLD2 nicht verändert, kann als ein Indiz gewertet werden, dass die veränderten Fluoreszenzeigenschaften der teilentfalteten PLD2 nicht erst durch die Aggregation entstehen. Die unterschiedliche Potenz der Faltungsintermediate bzw. des nativen Enzyms ANS zu binden, wurde durch die Aufnahme von Übergangskurven in Gegenwart von ANS untersucht.

Die erhaltenen Übergangskurven wurden anhand der maximalen ANS-Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzemaxima der ANS-Fluoreszenz ausgewertet (Abb. 4.32C und D). Die ANS-Fluoreszenzintensität nahm mit steigender Denaturationskonzentration sukzessive ab, jedoch stieg bei 0,3 bis 2,5 M GdnHCl bzw. 4 bis 6 M Harnstoff die Intensität nochmals an. Mit der vollständigen Entfaltung des Proteins im zweiten strukturellen Übergang geht die Fähigkeit, ANS zu binden, verloren. Betrachtet man das Fluoreszenzemissionsmaximum des ANS, so war im Falle von GdnHCl eine Schulter bei 0,3 bis 0,8 M zu beobachten, die bei Harnstoff nicht auftrat. Die PLD2-Entfaltung in Anwesenheit von ANS ähnelte der in Abwesenheit von

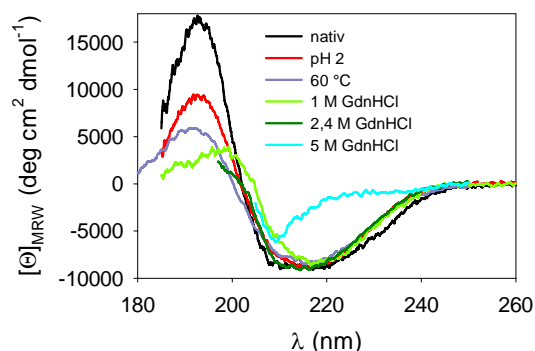
ANS, was anhand der Proteinfluoreszenz sichtbar wurde (nicht gezeigt). Über den gesamten Konzentrationsbereich (0,3 – 2,8 M GdnHCl bzw. 2,5 – 7,5 M Harnstoff) verändert sich das ANS-Fluoreszenzemissionsmaximum und damit auch das ANS-Bindungsverhalten der teilentfalteten PLD2 nur sehr wenig und ist im Vergleich zum vollständig entfalteten Protein relativ nativ-ähnlich. Die beobachteten Intensitätsänderungen der maximalen ANS-Fluoreszenzintensität weisen jedoch auf strukturelle Veränderungen der Proteinoberfläche hin.

Die entstehende teilentfaltete PLD2 in der Kinetik zeigt stärkere ANS-Fluoreszenz als das native Enzym (Abb. 4.32B). Die in diesem Denaturansbereich bei den Übergangskurven in Abb. 4.32C und D vorliegenden heterogenen Aggregate der teilentfalteten PLD2 zeigen jedoch keine stärkere ANS-Fluoreszenzintensität als das native Enzym. Somit existieren mindestens drei verschiedene ANS-bindende Enzymspezies mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften. Die scheinbar schwächere Bindung an die teilentfaltete PLD2 könnte aber auch auf eine verminderte Anzahl an Bindungsstellen infolge der Aggregation zurückgeführt werden.

Für eine Vielzahl von Proteinen konnten Faltungsintermediate nachgewiesen werden, die ANS stark binden und weitere für den *molten globule* Zustand typische Eigenschaften aufwiesen [15, 67, 86, 198]. Dabei zeigte jeweils das Intermediat die höchste Bindung an ANS verglichen mit dem nativen und dem denaturierten Protein. Für die apikale Domäne von GroEL wurde ebenfalls ein Faltungsintermediat vermutet, obwohl ähnlich wie bei der PLD2 lediglich eine Schulter im ANS-Bindungsverhalten detektiert wurde, da auch das native Protein bereits stark ANS bindet [78].

### Fern-UV-CD-Spektren

Abschließend sollen die Fern-UV-CD-Spektren der PLD2 unter nativen und verschiedenen denaturierenden Bedingungen verglichen werden (Abb. 4.33). Die Fern-UV-CD-Spektren von PLD2 in Gegenwart von 1 bzw. 2,4 M GdnHCl, bei pH 2,0 sowie des thermisch denaturierten Proteins unterscheiden sich im Bereich von 205 bis 260 nm nur geringfügig vom nativen Enzym (Abb. 4.33), was für eine sehr ähnliche Sekun-



**Abbildung 4.33:** Fern-UV-CD-Spektren der PLD2. Fern-UV-CD-Spektren unter nativen und verschiedenen denaturierenden Bedingungen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ M und den entsprechenden GdnHCl-Konzentrationen (20 h Inkubation), bei der entsprechenden Temperatur (60  $^{\circ}$ C, sonst 20  $^{\circ}$ C) bzw. durch Zugabe von HCl.

därstruktur spricht. Unterhalb von 205 nm sinkt die Elliptizität der verschiedenen teilentfalteten Zustände unterschiedlich stark ab. Die Bande bei 190 nm entspricht dem  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang, welcher bei  $\beta$ -Faltblattstrukturen im Vergleich zu  $\alpha$ -Helices zu größeren Wellenlängen verschoben ist. Zudem ist das Signal von  $\alpha$ -helikalen Bereichen konzentrationsbezogen wesentlich intensiver [106, 107]. Die geringere Elliptizität bei Wellenlängen unterhalb von 205 nm und die insbesondere in 1 M GdnHCl beobachtete Verschiebung des Maximums zu längeren Wellenlängen könnte somit auf einen verringerten helikalen Anteil verbunden mit einer Zunahme an  $\beta$ -Faltblattstrukturen hinweisen. Diese Veränderungen des Sekundärstrukturgehalts werden häufig bei Proteinaggregation beobachtet (2.1.4). Aggregate führen außerdem zu Streulicht, welches die CD-Messungen stören kann [107]. Da der Streulichtanteil mit abnehmender Wellenlänge exponentiell steigt, könnte gerade der betrachtete Wellenlängenbereich (unterhalb 205 nm) durch streulichtverursachende Aggregate verfälscht werden und daher ebenfalls zu der beobachteten Abnahme der Elliptizität führen.

Die mittels Fluoreszenz-Quench-Experimenten, limitierter Proteolyse, ANS-Bindung und Fern-UV-CD-Spektroskopie festgestellten wenigen strukturellen Veränderungen der teilentfalteten PLD2 gegenüber dem nativen Enzym weisen auf einen nativ-ähnlichen Zustand hin, welcher jedoch sehr aggregationsanfällig (Analytische Ultrazentrifugation) ist. Die teilentfaltete PLD2 der Denaturans-induzierten Entfaltung sowie Temperatur- und Säure-entfaltete PLD2 besitzt Eigenschaften, die dem *molten globule* Zustand entsprechen.

#### 4.3.4.4 Reaktivierungsversuche anhand von Doppelsprungexperimenten

Um die Irreversibilität des ersten Entfaltungsschritts (4.3.4) zu überprüfen, wurden umfangreiche Renaturierungsversuche und Doppelsprungexperimente durchgeführt. Für die Renaturierungsversuche wurde die PLD2 in Form von *inclusion bodies* hergestellt, mittels GdnHCl oder Harnstoff solubilisiert [91, 189] und für Rückfaltungsversuche die in Tab. 4.10 aufgeführten Bedingungen getestet. In Übereinstimmung mit Schöffner [189] konnte in keinem Fall PLD-Aktivität gefunden werden.

Für die Doppelsprungexperimente wurden verschiedene denaturierte Zustände der PLD2 untersucht: Die vollständig entfaltete PLD2 in 5 M GdnHCl und 9 M Harnstoff, die teilentfaltete PLD2 (1 und 2 M GdnHCl bzw. 4 und 6 M Harnstoff), der Säure- (pH 2,0) und Temperatur-induzierte Zustand (60 °C) sowie mittels 2 M CaCl<sub>2</sub>, 5 mM (N-Cetyl-N,N,N-trimethyl)-ammoniumbromid (CTAB) und 10 mM SDS dena-



turierte PLD2. Nach Inkubation (entsprechend der jeweiligen Inaktivierungs- bzw. Entfaltungskinetik  $5 \times \tau$ , 4.3.4.5) bei den jeweiligen denaturierenden Bedingungen erfolgt der Rücksprung zu Nativbedingungen, wobei eine Reihe von Zusätzen untersucht wurde (Tab. 4.10). Das nativ gefaltete Protein sollte durch Aktivitätsmessungen detektiert werden.

Es konnte in keinem Fall eine Reaktivierung gemessen werden. Weder der Zusatz faltungsunterstützender Salze wie Arginin, Tris oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bzw. des für die Aktivität notwendigen  $\text{CaCl}_2$  noch einer Reihe anderer Additive (Tab. 4.10) [35, 184] in Verbindung mit der Variation von Puffer, PLD2-Konzentration, Temperatur und Inkubationszeit konnten eine Faltung des Enzyms ermöglichen. Der Zusatz von Detergenzien (Tab. 4.10) zur Hemmung der Aggregation teilgefalteter Spezies wurde über einen breiten Konzentrationsbereich getestet (0,0005 % bis 0,3 % (w/v)) und zeigte keine positiven Einflüsse. Vielmehr wurde festgestellt, dass 10 mM SDS und 5 mM CTAB die PLD2 irreversibel denaturieren. Auch der Zusatz von DTT zur Verhinderung der Oxidation freier Cysteinreste, von EDTA zur Verhinderung der Bindung zweiwertiger Ionen oder des Substrats PpNp führte nicht zur Faltung der nativen Struktur.

Gellman und Mitarbeiter haben ein künstliches Chaperon-System entworfen [40, 183], bei dem das Protein in einem ersten Schritt bei der Verdünnung in nicht-denaturierende GdnHCl-Konzentrationen durch Detergenzien stabilisiert wird. In einem zweiten Schritt werden die Detergenzien mit Hilfe von Cyclodextrinen vom Protein ent-

**Tabelle 4.10:** Parameter der experimentellen Bedingungen bei Faltungs- und Doppelsprungexperimenten.

Die Zugabe der mit einem Stern markierten Substanzen wurde zusätzlich auch für die denaturierenden Bedingungen getestet. Die apikale Domäne von GroEL wurde freundlicher Weise von PD Dr. R. Golbik (MLU, Halle) zur Verfügung gestellt.

Parameter	Variation
Puffer	50 – 100 mM Na-Acetat, pH 5,5; 10 – 100 mM Na-Pipes, pH 7,0
Salze	Arginin (0,1 – 1,0 M), Tris (0,01 – 1 M), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1 – 1,0 M), $\text{CaCl}_2$ (1 – 100 mM)
Detergenzien	Brij 58P* (0,0005 – 0,2 % (w/v)), Triton <sup>®</sup> X-100* (0,01 – 1 mM), Tween <sup>®</sup> 20* (0,01 – 1 mM), CTAB* (0,1 – 1 mM), SDS* (0,001 – 1 mM)
weitere Additive	Glycerol (5 – 40 % (v/v)), DTT* (1– 10 mM), GSH* (1 – 10 mM), EDTA* (1 – 10 mM), PEG 6000 (0,1 – 0,5 g·l <sup>-1</sup> ), PpNp (12 mM), BmimCl (1 % (v/v)), apikale Domäne von GroEL (191-372) (15 µM), Cyclodextrin (8 mM)
PLD2-Konzentration	5 – 100 µg·ml <sup>-1</sup>
Zeit	5 min – 1 Woche
Temperatur	4 °C, 10 °C, 22 °C

fernt, und dabei die Rückfaltung ermöglicht. Auch diese Methode führte bei der PLD2 nicht zum Erfolg.

Für die apikale Domäne von GroEL konnte gezeigt werden, dass sie die Faltung von einer Reihe von Proteinen beschleunigt [31, 78, 248]. Die Faltung von bisher irreversibel denaturierten Proteinen wurde jedoch durch die alleinige Zugabe von GroEL kaum verbessert und auch *in vivo* ist das komplette GroEL<sub>14</sub>·(GroES<sub>7</sub>)<sub>2</sub> Oligomer für das Überleben der Zellen essenziell [17, 31]. Damit übereinstimmend konnte in dieser Arbeit durch Zugabe der apikalen Domäne von GroEL (191-372) keine PLD-Aktivität im Renaturierungsansatz der PLD2 detektiert werden.

Als Ursache für die irreversible Entfaltung der PLD2 wäre z. B. die *cis/trans* Isomerisierung der 43 Prolinreste denkbar [102]. Im denaturierten Zustand liegen 10 bis 30 % der Peptidyl-Prolylbindungen eines Proteins in der *cis*-Konfiguration vor [23], für die Ausbildung der nativen Struktur ist jedoch eine 100%ige Isomerisierung in die jeweilige *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration erforderlich. Das *cis/trans*-Gemisch der 43 Prolinreste der entfalteten PLD2 könnte die Faltung *in vitro* so stark verlangsamen, dass die Bildung des nativen Enzyms scheinbar vollständig verhindert wird. Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der Peptidbindung besitzt die *cis/trans*-Isomerisierung von X-Pro-Peptidbindungen eine hohe Aktivierungsenthalpie von ungefähr 83,7 kJ·mol<sup>-1</sup> (20 kcal·mol<sup>-1</sup>) und ist eine langsame Reaktion mit Halbwertzeiten von 10 bis 100 s [14, 23]. Da die PLD2 in 5 M GdnHCl bereits nach weniger als 3 s vollständig irreversibel entfaltet war, kann die *cis/trans*-Isomerisierung der 43 Peptidyl-Prolylbindungen als möglicher Grund für die irreversible Reaktion ausgeschlossen werden.

Native PLD2 besitzt keine Disulfidbrücken, vielmehr liegen alle acht Cysteine reduziert vor [97]. Eine Oxidation der Thiolgruppen der Cysteinreste und die Bildung von inter- oder intramolekularen Cystinresten könnte die Rückbildung der nativen Struktur verhindern. Dieser Grund scheidet aber ebenfalls aus, da auch Entfaltung und anschließende Rückfaltungsversuche unter stark reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT) nicht zu nativem Protein führten.

Die Hauptaufgabe zellulärer Faltungshelfer (Chaperone) ist die Bindung und Stabilisierung aggregationsanfälliger Faltungsintermediate, die entweder bei der Translation oder dem Transport in andere Kompartimente und infolge zellulären Stresses entstehen, damit diese die native Faltung (zurück)erlangen können [129]. Da möglicherweise allein das Verhindern der Aggregation, z. B. durch Detergenzien, Glycerol oder die apikale Domäne von GroEL, nicht zur Faltung der PLD2 führte, wird vermutet, dass die Verhinderung der Aggregation vielleicht nicht ausreichend für das

Erlangen der nativen Struktur der PLD2 ist. Netzer und Hartl [154] fusionierten zwei Ein-Domänen-Proteine durch einen flexiblen *linker*. Obwohl beide Proteine einzeln effizient aus Denaturanzien renaturiert werden konnten, zeigte sich, dass das Fusionsprotein *in vitro* und im bakteriellen Expressionssystem zu einem nicht-nativen Intermediat faltete, wohingegen in eukaryontischen Expressionssystemen die Domänen sequenziell falten konnten und ein intaktes Fusionsprotein gebildet wurde [154]. Die wachsende Bedeutung co-translationaler Faltung zeigt sich auch in der Zunahme der durchschnittlichen Größe der Proteine eukaryontischer Organismen im Vergleich zu prokaryontischen Organismen [154]. Als Ursachen wurden die unterschiedlichen Chaperon-Systeme und die 5- bis 10fach schnellere bakterielle Translation vermutet [61, 154]. Die reduzierte Effizienz co-translationaler Faltung in *E. coli* wird von Ellis und Hartl [61] für die häufige Fehlfaltung oder *inclusion body* Bildung eukaryontischer Mehrdomänenproteine verantwortlich gemacht [61, 154]. Die rekombinante Expression intakter PLD2 in *E. coli* ist nur unter Bedingungen möglich, die das Wachstum und damit auch die Proteinbiosynthese stark verlangsamen (ohne Induktion bei 15 °C). Weiterhin zeigte die fehlgeschlagene Herstellung funktionaler Domänen der PLD2, dass möglicherweise nur die komplette Primärstruktur zur Bildung nativer PLD2 führt, erklärt jedoch nicht, warum ausgerechnet die N-terminal liegende C2-Domäne nicht hergestellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die notwendige Stabilisierung durch die folgende Domäne oder der Einfluss der fehlenden N-terminalen Aminosäuren sein (Abb. 4.7). Es wird vermutet, dass die PLD2 co-translational in die native Struktur faltet. Dabei ist die Ausbildung der Wechselwirkungen zwischen den Domänen sehr wichtig und bereits geringe Strukturänderungen einzelner Bereiche zerstören diese irreversibel.

#### 4.3.4.5 Kinetische Betrachtung der Denaturans-induzierten Entfaltung

In Abhängigkeit von der Denaturanskonzentration ergeben sich keine linearen Veränderungen der einzelnen Fluoreszenzintensitäten; mit fortschreitender Entfaltung sank die Fluoreszenz überwiegend bei 335 nm, wohingegen die Emission bei 355 nm meist anstieg (Abb. 4.25). Der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten bei zwei verschiedenen Wellenlängen kann als Maß für die Wellenlängenverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums genutzt werden [56, 104]. Zur Verfolgung der Faltung und Entfaltung wurde deshalb das Verhältnis der maximalen Fluoreszenzintensitäten des nativen Enzyms (335 nm) bzw. denaturierten Proteins (355 nm) herangezogen. Eine Analyse der Übergangskurven hatte gezeigt, dass sich das Verhältnis der Fluoreszenzemissionen von  $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$  proportional zur Wellenlängenverschiebung des

Fluoreszenzmaximums verhielt, und somit als Sonde für die Faltung bzw. Entfaltung verwendet werden kann. Der Wert 1,3 entsprach dabei dem nativen Enzym, 1,1 bis 1,0 der teilentfalteten PLD2 nach dem ersten Übergang und 0,7 dem vollständig entfalteten Protein.

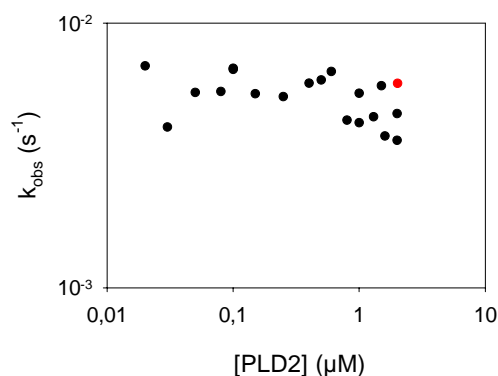
Für die Aufnahme einer Entfaltungskinetik mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie konnte mit Hilfe eines *cut-off* Filters von 305 nm eine Abnahme der Fluoreszenzemissionsintensität detektiert werden.

### Vergleich von Inaktivierung und Entfaltung

Bei ersten Experimenten zeigte sich, dass die GdnHCl-induzierte Entfaltung und Inaktivierung (bei 1 M GdnHCl) in dem getesteten Proteinkonzentrationsbereich von 0,02 bis 2,00  $\mu\text{M}$  von dieser unabhängig war (Abb. 4.34). Die gleichen Ergebnisse wurden in 5 M Harnstoff erhalten (nicht gezeigt). Die mittels Fluoreszenz beobachtbare Entfaltung führt gleichzeitig zur Inaktivierung des Proteins.

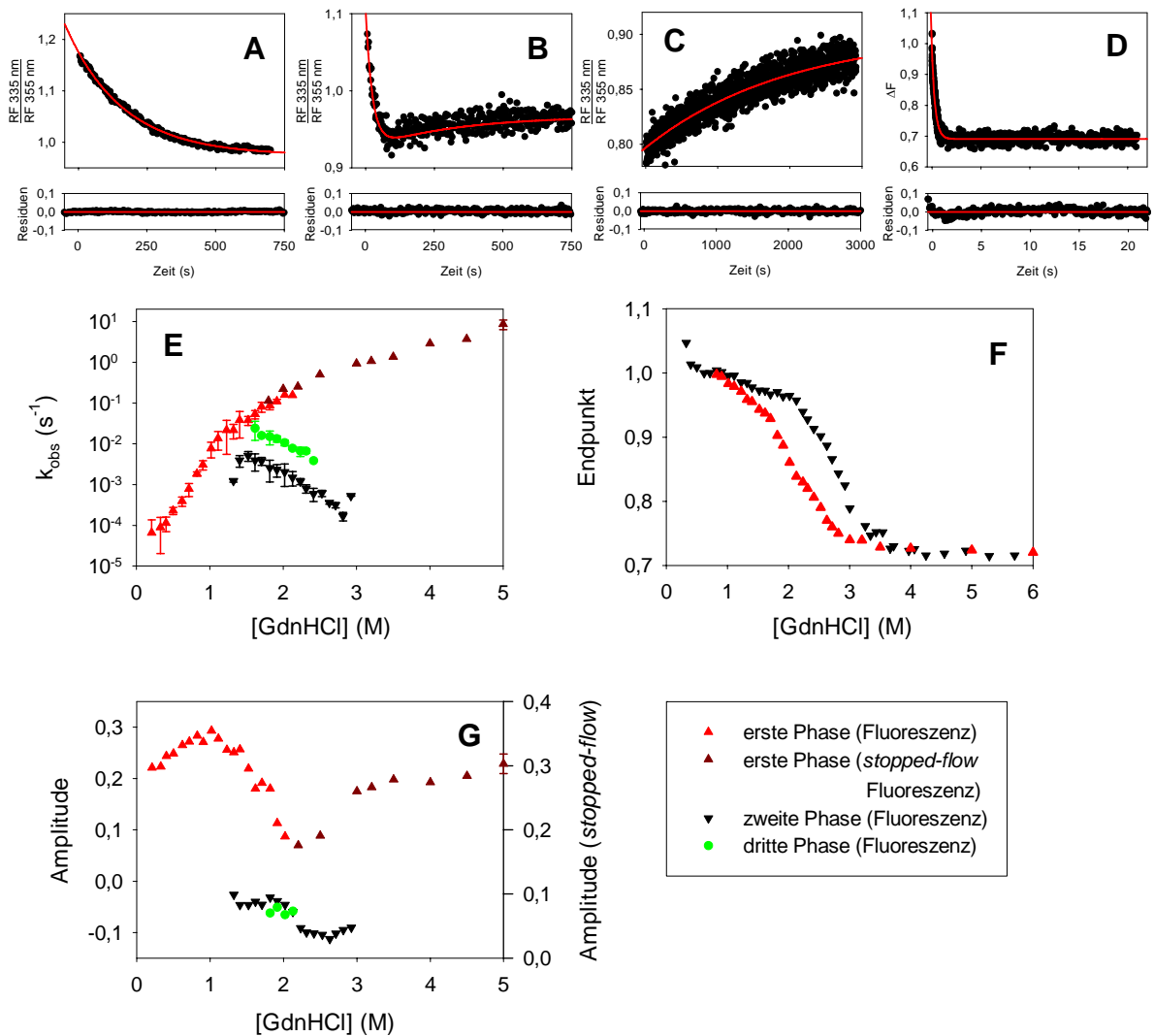
### Kinetik der GdnHCl-induzierten Entfaltung

Bis zu einer GdnHCl-Konzentration von 1 M verlief die Entfaltung einphasig und es entstand eine Enzymspezies, deren Fluoreszenzeigenschaften der teilentfalteten PLD2 der Übergangskurve entsprachen (Abb. 4.35A). Mit steigender GdnHCl-Konzentration (0,2 – 3 M GdnHCl) stieg die Geschwindigkeitskonstante der ersten Phase an (Abb. 4.35E) und war zudem durch zunehmendes Absinken des Endpunkts der Progresskurve hin zum denaturierten Protein ( $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$  von 1,0 bis 0,7, Abb. 4.35F) gekennzeichnet. Somit wurde die hier entstehende Enzymspezies der vollständig entfalteten PLD2 immer ähnlicher. Ab einer Konzentration von 2 M GdnHCl konnte die erste Entfaltungsphase nicht mehr manuell detektiert werden (Abb. 4.35C), sondern wurde mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie gemessen (Abb. 4.35D). Oberhalb einer Konzentration von 1 M GdnHCl war die Entfaltung zwei- (Abb. 4.35B) bzw. dreiphasig und bei Auswertung über das Verhältnis der Fluoreszenzemissionen ( $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$ ) ergab sich ein Wendepunkt in den Progresskurven. Die zusätzlich auftretenden Pha-



**Abbildung 4.34:** Vergleich der GdnHCl-induzierten Entfaltungs- und Inaktivierungskinetik.

Dargestellt sind die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (schwarz) und Inaktivierung (rot) in 1 M GdnHCl in Abhängigkeit der PLD2-Konzentration in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, (3.3.7.4, 3.4.3).



**Abbildung 4.35:** Kinetik der GdnHCl-induzierten Entfaltung der PLD2.

Entfaltungskinetik der PLD2 in 1,0 M (A), 1,6 M (B), 2,5 M (C) und 4,0 M GdnHCl (D) mit den Anpassungen (oben) und den Residuen (unten). Die Kinetik wurden in 50 mM Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  durch Anregung bei 278 nm und Aufnahme der Fluoreszenzemission bei 335 und 355 nm (A bis C) bzw. durch einen *cut-off*-Filter bei 305 nm (D, *stopped-flow*) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte für A, B und C anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$ .

E: Chevron-Auftragung für die GdnHCl-induzierte Entfaltung der PLD2. Die einzelnen Phasen wurden mittels Fluoreszenz bei 335 und 355 nm detektiert und direkt sowie über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$  ausgewertet. F: Endpunkte der ersten Phase (rot) und der gesamten Kinetik (schwarz). G: Amplituden der einzelnen Phasen aus E. Für F und G wurde die Kinetik anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$  ausgewertet.

sen zeigten mit steigender Denaturationskonzentration sinkende Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 4.35E) sowie eine Verschiebung der Endpunkte der Progresskurven ( $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}$ ) hin zur teilentfalteten PLD2 (Abb. 4.35F). Die Fluoreszenzeigenschaften des Endzustands dieser Progresskurven entsprachen denen der teilentfalteten Spezies der Übergangskurve und ähnelten auch denen des Endzustands der einphasigen Entfaltung (0,2 – 1 M GdnHCl; 4.3.4.2). Ab 3 M GdnHCl konnte nur noch eine Entfaltungsphase mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden (Abb. 4.35D). Die fortschreitende Entfaltung der PLD2 führte bei Denaturationskonzentrationen von 1 bis 3 M zur Bildung von sehr heterogenen Oligomeren bzw. Aggregaten (4.3.4.3, S. 85).

Es wird vermutet, dass ein entstehendes transientes Intermediat aggregiert, und dass infolge der Aggregation Strukturen induziert werden. Die beobachtete Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten für diesen Prozess wird durch die zunehmend solubilisierende Wirkung des Salzes GdnHCl erklärt, die die Aggregation stärker verlangsamt als ihn die denaturierende Wirkung verbunden mit der schnelleren Bildung des transienten Intermediats beschleunigt.

Die Chevron-Auftragung (Abb. 4.35E) für die erste Phase zeigt zwei lineare Bereiche (0,5 – 1,2 M und 2,0 – 5,0 M GdnHCl), die im Konzentrationsbereich 1,2 bis 2 M (Auftreten der weiteren Phasen) ineinander übergehen und auf unterschiedliche Entfaltungsvorgänge hinweisen. Neben der partiellen Entfaltung bei geringeren Denaturationskonzentrationen führen höhere Denaturationskonzentrationen zur vollständigen Entfaltung der PLD2. Wegen der beteiligten Aggregationsprozesse wurde  $k_u^0$  für die globale Entfaltung jedoch lediglich anhand der Linearität in der Chevron-Auftragung (2,0 – 5,0 M GdnHCl) durch Extrapolation auf 0 M GdnHCl abgeschätzt und sollte im Bereich von  $10^{-2} \text{ s}^{-1}$  liegen.

Die Endpunkte der Progresskurven (Abb. 4.35F) besitzen einen Übergangsmittelpunkt bei 2,85 M GdnHCl und entsprechen der mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessenen Übergangskurve (Abb. 4.26A). Die Unterschiede bei der Kooperativität und dem Übergangsmittelpunkt werden auf die weitere Verschiebung des Gleichgewichts infolge der Aggregation zurückgeführt (wie oben diskutiert). Die Endpunkte der ersten Phase ergeben eine Übergangskurve mit einem Übergangsmittelpunkt bei 2,1 M GdnHCl (Abb. 4.35F), welche die Entfaltung des transienten Intermediats ohne dessen nachfolgende Aggregation betrachtet.

Die Amplitude der ersten Entfaltungsphase zeigte bei 1 M GdnHCl ein Maximum (Abb. 4.35G). Dies lässt sich jedoch durch die Überlagerung mit den im Folgenden auftretenden weiteren Phasen erklären, so dass nicht mehr die komplette Amplitude gemessen werden konnte. Mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie nimmt die Amplitude mit steigender GdnHCl-Konzentration zu (Abb. 4.35G). Die Amplitude der zweiten Phase vergrößerte sich im Übergangsbereich der Entfaltung des transienten Intermediats (2,1 M GdnHCl), wobei sie sich unterhalb von 2 M und oberhalb von 2,3 M GdnHCl nur sehr wenig veränderte (Abb. 4.35G). Die Amplitude der dritten Phase änderte sich nicht (Abb. 4.35G).

Bei der kinetischen Betrachtung des reversiblen Vorgangs bei 3 M GdnHCl ergab sich folgendes Bild. Die teilentfaltete PLD2 in 2,5 M GdnHCl konnte erst ab einer Konzentration von 3,5 M GdnHCl messbar entfaltet werden, bei 4,0 M wurde eine Geschwindigkeit von  $6,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  gemessen, ab 4,5 M GdnHCl war dieser Vorgang bereits zu

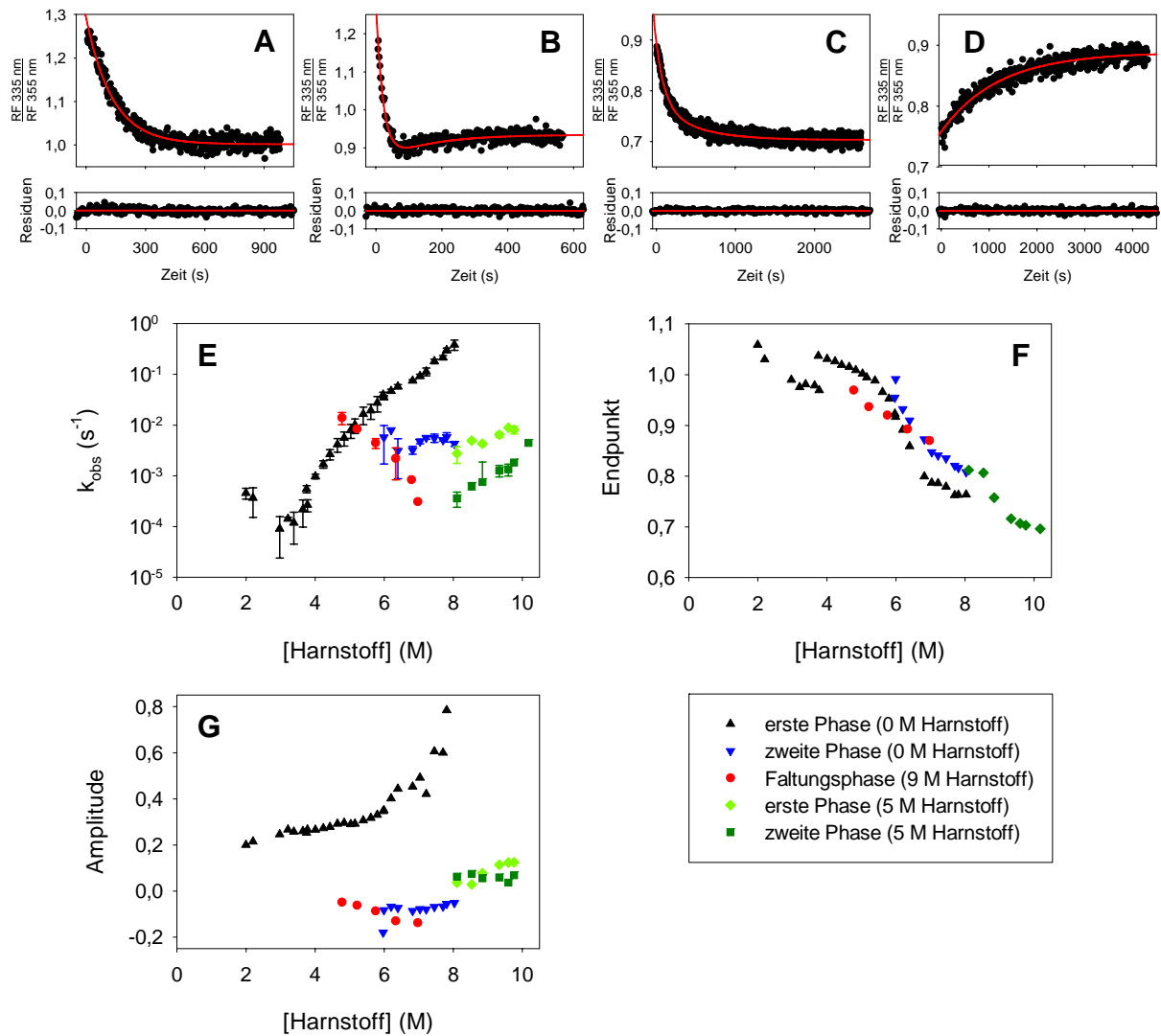
schnell, und konnte manuell nicht mehr ausgewertet werden (nicht gezeigt). Die weitere Entfaltung der teilentfalteten PLD2 verläuft also wesentlich langsamer als die der nativen PLD2, was durch die zusätzlich erforderliche Dissoziation der Aggregate erklärbar ist.

Die Bildung des teilgefalteten Zustands aus dem vollständig entfaltetem Protein verlief über den gesamten Konzentrationsbereich so schnell, dass sie auch mittels *stopped-flow* Fluoreszenzspektroskopie nicht detektiert werden konnte. Derartige ultraschnelle Phasen werden auch als *burst*-Phasen bezeichnet [207]. Die geringere Löslichkeit des denaturierten Proteins sowie die höhere Stabilität hydrophober Wechselwirkungen führen zum Kollaps des entfaltetem Proteins entsprechend der veränderten Lösungsmittelbedingungen [206, 207]. Bei diesem initialen Kollaps besteht insbesondere für größere Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit für Fehlfaltung, die zu einer Reorganisationsbarriere führt [206]. Es wird angenommen, dass die monomere entfaltete PLD2 bei diesem Schritt kollabiert und sich dabei Sekundärstrukturelemente ähnlich der teilentfalteten PLD2 bilden.

#### Kinetik der Harnstoff-induzierten Faltung und Entfaltung

Die Kinetik der Harnstoff-induzierten Entfaltung (Abb. 4.36) ähnelte der Kinetik der GdnHCl-induzierten Entfaltung (Abb. 4.35). Die Entfaltung, die oberhalb von 2,0 M Harnstoff beobachtet werden konnte, verlief zunächst einphasig (Abb. 4.36A), ab 5,6 M Harnstoff zweiphasig (wiederum über ein transientes Faltungsintermediat) zur teilentfalteten PLD2 (Abb. 4.36B). Wie bei der Kinetik der GdnHCl-induzierten Entfaltung (Abb. 4.35) war die erste Phase der Kinetik der Harnstoff-induzierten Entfaltung durch eine Verringerung (zunehmende Entfaltung) und die zweite Phase durch eine Erhöhung (Bildung der teilentfalteten PLD2 aus dem transienten Intermediat) des betrachteten Verhältnisses  $\left(\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}}\right)$  gekennzeichnet, wobei sich wiederum ein Wendepunkt in den Progresskurven ergab. Im Gegensatz zur GdnHCl-induzierten Entfaltung (Abb. 4.35E) trat bei der Harnstoff-induzierten Entfaltung nur eine weitere Phase mit einer sehr kleinen Amplitude auf, deren Geschwindigkeitskonstante zudem nicht von der Harnstoffkonzentration abhängig war (Abb. 4.36E).

Die Endpunkte der Progresskurven (Abb. 4.36F) unterscheiden sich aufgrund der geringen Amplitude der zweiten Phase nur sehr wenig von den Endpunkten der ersten Phase. Trotzdem entsteht wieder (vgl. Abb. 4.35F) die zu geringeren Denaturationskonzentrationen verschobene Übergangskurve des transienten Intermediats mit einem Übergangsmittelpunkt bei 6,0 M Harnstoff. Für die Endpunkte der ersten Phase wird ein Sprung bei 4,0 M Harnstoff ersichtlich, welcher ein Hinweis sein könnte, dass



**Abbildung 4.36:** Kinetik der Harnstoff-induzierten Faltung und Entfaltung der PLD2.

Entfaltungskinetik der nativen PLD2 bei 5,0 M (A) bzw. 6,6 M Harnstoff (B), Entfaltungskinetik bei 9,8 M Harnstoff nach 24 h Inkubation bei 5 M Harnstoff (C), Faltungskinetik bei 6,5 M Harnstoff nach 24 h Inkubation bei 9 M Harnstoff (D) mit den Anpassungen (oben) und den Residuen (unten). Die Kinetik wurde in 50 mM N-Acetat-Puffer, pH 5,5, bei einer Proteinkonzentration von 0,1  $\mu$ M durch Anregung bei 278 nm und Aufnahme der Fluoreszenzemission bei 335 und 355 nm aufgenommen. Die Auswertung erfolgte anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF\ 335\ nm}{RF\ 355\ nm}$ .

**E:** Chevron-Auftragung für die Harnstoff-induzierte Faltung und Entfaltung der PLD2. Für die einzelnen Experimente ist die Startkonzentration in Klammern angegeben. Die einzelnen Phasen wurden mittels Fluoreszenz bei 335 und 355 nm detektiert und direkt sowie über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF\ 335\ nm}{RF\ 355\ nm}$  ausgewertet. **F:** Endpunkte und **G:** Amplituden der entsprechenden Phasen. Für **F** und **G** wurde die Kinetik anhand des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten  $\frac{RF\ 335\ nm}{RF\ 355\ nm}$  ausgewertet.

oberhalb dieser Konzentration bereits beide Phasen vorliegen und aufgrund ähnlicher Geschwindigkeiten überlagert werden.

Die Amplitude der ersten Phase (Abb. 4.36G) nimmt mit steigender Harnstoffkonzentration zunächst langsam zu, mit Auftreten der zweiten Phase dann deutlich stärker. Die Amplitude der zweiten Phase ist im detektierten Bereich von der Harnstoffkonzentration unabhängig.

Die Entfaltung ( $\geq 8$  M Harnstoff) der teilentfalteten PLD2 aus 5 M Harnstoff zum vollständig entfalteten Protein (Abb. 4.36C) verlief langsamer als die vollständige Entfal-



tung der nativen Spezies (Abb. 4.36E). Dabei traten zwei Phasen auf, deren Geschwindigkeitskonstanten mit zunehmender Harnstoffkonzentration anstiegen (Abb. 4.36E), wobei sich die Amplitude der schnelleren Phase im Bereich um 9,0 M Harnstoff vergrößerte, die der langsamen Phase sich jedoch nicht veränderte (Abb. 4.36G). In diesem Konzentrationsbereich veränderte sich zusätzlich der Endpunkt der beobachteten Progresskurven (0,8 – 0,7; Abb. 4.36F). Erst oberhalb von 9,0 M Harnstoff liegt die PLD2 vollständig entfaltet vor, da für diese der Wert bei 0,7 liegen muss (vgl. 4.3.4.5, S. 96).

Im Gegensatz zu GdnHCl ist die Bildung der teilgefalteten PLD2 aus dem entfaltenen Protein in Harnstoff messbar (Abb. 4.36D). Dabei verringert sich die Geschwindigkeitskonstante der detektierten Faltungsreaktion mit steigender Denaturanskonzentration (Abb. 4.36E), wie es für einen Faltungsvorgang erwartet wird [21]. Es muss jedoch eine zweite, wesentlich schnellere Phase vorhanden sein, da von einem identischen Anfangswert (9 M Harnstoff,  $\frac{RF_{335\text{ nm}}}{RF_{355\text{ nm}}} = 0,7$ ) ausgehend die gemessenen Amplituden (Abb. 4.36G) sich verkleinerten, obwohl sich die Gesamtamplitude vergrößerte (Endpunkt minus Anfangswert). Diese *burst*-Phase wurde auch bei der GdnHCl-induzierten Faltungskinetik beobachtet und als Ursache wird das Kollabieren des entfaltenen Proteins infolge der veränderten Lösungsmittelbedingungen, ein als hydrophober Kollaps bezeichneter Vorgang, angenommen (wie oben diskutiert). Da insbesondere hydrophobe Wechselwirkung in Gegenwart von Salzen verstärkt werden, wird für die beschleunigte Bildung der teilgefalteten PLD2 aus dem GdnHCl-induzierten entfaltenen Zustand der Salzcharakter des Denaturans vermutet. Die entstehende Proteinspezies glich wiederum der teilentfalteten PLD2 der Übergangskurve.

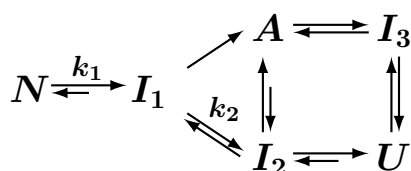
Die Diskussion der kinetischen Untersuchungen erfolgt im Zusammenhang mit dem aufgestellten Modell (4.4).

#### 4.4 Zusammenfassende Diskussion

Abschließend sollen die kinetischen Untersuchungen in Verbindung mit den proteinchemischen und spektroskopischen Daten der PLD2 diskutiert werden.

Die native PLD2 wurde im Rahmen dieser Arbeit eindeutig als Monomer identifiziert (4.1.2, 4.3.1.1). In den Entfaltungskurven war eine Zweistufenentfaltung mit einer teilentfalteten Spezies bei 0,3 bis 2,8 M GdnHCl bzw. 2,5 bis 7,5 M Harnstoff erkennbar (Abb. 4.26). Die Entfaltungskinetik wies zudem auf ein transientes Faltungsintermediat hin (Abb. 4.35B, Abb. 4.36B). Die teilentfaltete Enzymspezies hatte eine nativ-ähnliche Sekundärstruktur (Abb. 4.27), wohingegen mittels Nah-UV-CD-Spektroskopie keine geordnete Tertiärstruktur mehr detektiert werden konnte (4.3.4.2, S. 80). Das Fluoreszenzemissionsmaximum dieser teilentfalteten Enzymspezies war gegenüber nativer PLD2 zu längeren Wellenlängen verschoben (Abb. 4.25) und die Tryptophanreste sind leichter dem Lösungsmittel zugänglich als im nativen Enzym (Abb. 4.30). Die weitere Charakterisierung des teilentfalteten Proteins mittels analytischer Ultrazentrifugation ergab, dass hier heterogene Aggregate vorliegen; das vollständig entfaltete Protein war aber wiederum ein Monomer (4.3.4.3, S. 85). Die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektierte erste Entfaltungsphase führte zur Inaktivierung (Abb. 4.34) und verlief irreversibel (4.3.4.4). Die Ergebnisse der Sekundärstrukturentfaltung der PLD2 (Abb. 4.27) und die Fragmentstudien (4.2) schließen eine separate Entfaltung einzelner Domänen als Erklärung für die verschiedenen Übergänge aus. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Modell für die Entfaltung der PLD2 aufgestellt (Abb. 4.37). Dabei bezeichnet  $N$  das native Protein,  $I_1$  bis  $I_3$  Intermediate,  $A$  das aggregierte und  $U$  das vollständig entfaltete Protein.

Der erste Übergang der Denaturans-induzierten Entfaltung wird durch die irreversible Bildung von  $A$  aus  $N$  über  $I_1$  beschrieben. Das dabei entstehende Aggregat  $A$  sowie  $I_1$  besitzen *molten globule* ähnliche Eigenschaften, wie nativ-ähnliche Sekundärstruktur (Abb. 4.27), eine kaum definierte Tertiärstruktur (4.3.4.2, S. 80) und ANS-bindende exponierte hydrophobe Bereiche (Abb. 4.32). Letztere werden für die hohe Aggregationsneigung von  $I_1$  verantwortlich gemacht, die bis zur vollständigen Präzipitation führen kann. Da gegenteilige Beweise fehlen, wird die Bildung von  $I_1$  aus  $N$  als reversibel angenommen und nur durch die schnelle Aggregation zu  $A$  irre-



**Abbildung 4.37:** Modell für die PLD2-Entfaltung.  $N$  bezeichnet das native Protein;  $I_1$  bis  $I_3$  Intermediate,  $A$  das aggregierte und  $U$  das vollständig entfaltete Protein.

versibel. Der Verlauf  $N \rightleftharpoons I_1 \rightarrow A$  beschreibt außerdem die Vorgänge der Säure- und Temperatur-induzierten Entfaltung (4.3.2, 4.3.3), welche diesem ersten Übergang der Denaturans-induzierten Entfaltung ähnelten (4.3.4.2). Da die einphasige Kinetik im entsprechenden Denaturansbereich (bis 1 M GdnHCl bzw. 5 M Harnstoff; 4.3.4.5) bzw. der Temperatur-induzierten Entfaltung (4.3.3.2) nicht durch höhere Proteinkonzentrationen beschleunigt werden, kann geschlussfolgert werden, dass die Aggregation ein der Strukturänderung nachgeschalteter Prozess sein muss, der jedoch wesentlich schneller verläuft. Die Irreversibilität der Reaktion  $N \rightarrow I_1$  entsteht durch den schnelleren irreversiblen Prozess  $I_1 \rightarrow A$  im Gegensatz zur (möglichen) langsameren Reaktion  $I_1 \rightarrow N$ . Desweiteren bestehen offensichtlich keine spektroskopischen Unterschiede zwischen  $I_1$  und  $A$ , so dass der Grad der Aggregation nicht festgestellt werden kann, sondern lediglich die großen unlöslichen Aggregate durch Präzipitation zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität führten.

Bei Denaturanskonzentrationen oberhalb von 1 M GdnHCl bzw. 5 M Harnstoff kommt es zur weiteren Entfaltung von  $I_1 \rightarrow I_2$  (Abb. 4.35B, Abb. 4.36B). Aus diesen kinetischen Untersuchungen kann abgeleitet werden, dass  $I_2$  nur ein transientes Intermediat ist, welches nicht im Gleichgewicht akkumuliert wird. Entweder entfaltet es weiter zu  $U$  oder aggregiert zu  $A$ . Es wäre möglich, dass  $I_1 \rightarrow I_2$  reversibel verläuft, jedoch lässt sich dies nicht nachweisen, da zwischen  $I_1$  und  $A$  spektroskopisch nicht unterschieden werden kann.

Die Nichtlinearität der ersten detektierten Phase in der Chevron-Auftragung beider Denaturanzien (Abb. 4.35E, Abb. 4.36E) weist auf unterschiedliche Vorgänge hin. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  beschreibt  $N \rightarrow I_1$  und die Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  beschreibt  $I_1 \rightarrow I_2$  (Abb. 4.37). In Harnstoff überlagern sich die beiden Geschwindigkeitskonstanten und können nicht voneinander separiert werden (Abb. 4.36E). Oberhalb von 1,5 M einer GdnHCl unterscheiden sich  $k_1$  und  $k_2$  so stark, dass nur noch  $k_2$  detektiert werden kann (Abb. 4.35E). Die denaturierende Wirkung von GdnHCl ist bezogen auf die Molarität etwa zweimal so effektiv wie Harnstoff und kann durch die gleichzeitige Erhöhung der Ionenstärke bei GdnHCl erklärt werden [83, 192, 204]. Es wird daher vermutet, dass die Bildung von  $I_1$  stärker durch den Salzcharakter beschleunigt wird, als die Bildung von  $I_2$ , so dass in GdnHCl nur noch  $k_2$  gemessen werden konnte.

Für die Bildung von  $A$  aus  $I_2$  werden bei GdnHCl zwei Phasen detektiert, deren Geschwindigkeitskonstante mit steigender GdnHCl-Konzentration abnahm (Abb. 4.35E), wohingegen in Harnstoff nur eine Phase gefunden wurde, welche unabhängig von der Harnstoffkonzentration war (Abb. 4.36E).  $I_2 \rightarrow A$  kann zum einen über eine reversible

Reaktion über  $I_1$  mit nachfolgender irreversibler Aggregation zu  $A$  und zum anderen durch Aggregation und Strukturinduktion direkt von  $I_2 \rightarrow A$  verlaufen. Während erste Reaktion nicht von der Proteinkonzentration abhängig sein sollte, müsste die zweite Reaktion durch höhere Proteinkonzentrationen beschleunigt werden. Wegen der zwei verschiedenen Phasen wird angenommen, dass in GdnHCl beide Vorgänge stattfinden, und für die jeweiligen Phasen verantwortlich sind und in Harnstoff entweder ein Weg dominiert oder aber beide Vorgänge überlagert werden. Wie bereits oben diskutiert, verstärkt der Salzeffekt des GdnHCl dessen denaturierende Eigenschaften und es wird daher vermutet, dass die denaturierende Wirkung des GdnHCl die Reaktion  $I_2 \rightarrow A$  stärker verlangsamt als sie die schnellere Bildung von  $I_2$  beschleunigt, wohingegen sich in Harnstoff die schnellere Bildung von  $I_2$  und die stärker denaturierende Wirkung des Denaturans ausgleichen.

Bei höheren Denaturanskonzentrationen (3,5 M GdnHCl bzw. 9 M Harnstoff) reagiert  $I_2$  sofort weiter zu  $U$ , der vollständig entfalteten PLD2 (Abb. 4.35D und E, Abb. 4.36E). Obwohl die Endpunkte der kinetischen Analysen zeigen, dass sich die Fluoreszenzeigenschaften von  $I_2$  und  $U$  ähneln (Abb. 4.35F), kann ausgeschlossen werden, dass  $I_2$  direkt  $U$  entspricht, denn dann müsste  $U \rightarrow A$  ähnlich verlaufen wie  $I_2 \rightarrow A$ . Die unterschiedlichen Geschwindigkeiten dieser beiden Prozesse in GdnHCl und in Harnstoff (4.3.4.5) begründen die Existenz von  $I_2$  neben  $U$ . Die Linearität der Geschwindigkeitskonstanten für die Prozesse  $N \rightarrow I_2$  und  $N \rightarrow U$  (Abb. 4.35E) zeigen jedoch, dass die Bildung von  $U$  durch die Reaktion  $N \rightarrow I_2$  limitiert wird bzw. die Reaktion  $I_2 \rightarrow U$  schneller verläuft als  $N \rightarrow I_2$ .

Die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten, Endpunkte und Amplituden, die für die Prozesse  $I_2 \rightarrow A$  bzw.  $U \rightarrow A$  erhalten wurden (Abb. 4.36E, F und G), zeigen die Existenz eines weiteren Intermediats  $I_3$  auf. Rücksprungexperimente aus GdnHCl-induziertem  $U$  führten innerhalb von Mikrosekunden zu einem Intermediat, dessen Eigenschaften denen von  $I_1$  bzw.  $A$  ähnelt (4.3.4.5, S. 99). Dass dieses Intermediat auch bei GdnHCl-Konzentrationen auftrat, bei denen die Entfaltung nachweisbar über  $I_2$  verlief, bestärkt die Existenz von  $I_3$ . Obwohl bei Rücksprungexperimenten aus Harnstoff-induziertem  $U$  vergleichsweise langsame Geschwindigkeitskonstanten ( $10^{-4} - 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) bestimmt wurden (Abb. 4.36D und E), weisen die Differenzen von Anfangswert (0,7) und Amplitude (Abb. 4.36G) auf eine zusätzliche *burst*-Phase hin. Diese *burst*-Phase wird, wie bereits oben diskutiert, auf das Kollabieren des Moleküls infolge der Verringerung der Denaturanskonzentration zurückgeführt. Die strukturbildende Phase könnte durch die erhöhte Ionenstärke bei mittleren GdnHCl-Konzen-

trationen sehr stark beschleunigt werden, bis sie bei sehr geringen Denaturationskonzentration für beide Denaturanzien sehr schnell verläuft.

Die Endpunkte der Rückfaltung aus 9 M Harnstoff (Abb. 4.36F) entsprechen weder den Endpunkten der Bildung von  $I_2$  noch denen von  $A$ . Da jedoch die Faltungskurven in GdnHCl (Abb. 4.26A) und Harnstoff (nicht gezeigt) mit Ausnahme des ersten Übergangs exakt den Entfaltungskurven nach jeweils 20 h Inkubation entsprachen und sich die Übergangsmittelpunkte ebenso mit weiter zunehmender Inkubationszeit zu höheren Denaturationskonzentrationen verschoben (Tab. 4.8), wird vermutet, dass die Bildung des heterogenen  $A$  bei dieser Kinetik nur zu einem geringen Anteil auftritt. Vielmehr wird angenommen, dass bei der Entfaltung der nativen PLD2 durch die sequenzielle Bildung der aggregationsanfälligen Intermediate  $I_1$  und  $I_2$  die Aggregation zu  $A$  bereits während der Entfaltung auftritt, wohingegen sie bei der Bildung von  $A$  aus  $U$  erst später auftritt. Da die teilentfaltete PLD2 ( $A$ ) nach Faltung (aus  $U$ ) und nach Entfaltung (aus  $N$ ) weder mittels Fluoreszenz- noch mittels CD-Spektroskopie zu unterscheiden war, wird geschlossen, dass bei der Aggregation von  $I_3 \rightarrow A$  weitere Strukturänderungen auftreten, und  $I_3$  lediglich  $A$ -ähnliche Eigenschaften hat. Diese Annahme wäre mit der Beobachtung der sehr schnellen Rückfaltung aus dem GdnHCl-induzierten Zustand vereinbar, wenn man die aggregationssteigernde Wirkung des GdnHCl als Salz in Betracht zieht.

Für  $A \rightarrow U$  ist die Dissoziation der Aggregate notwendig (4.3.4.3), und der Prozess verläuft erwartungsgemäß in beiden Denaturanzien langsamer als  $N \rightarrow U$  (Abb. 4.36C und E). Die Endpunkte dieser Entfaltungsphasen (Abb. 4.36F) weisen darauf hin, dass erst ab 9 M Harnstoff die PLD2 vollständig entfaltet wird. Es wird vermutet, dass die langsamere Phase einer Strukturänderung entspricht, die infolge der Auflösung der Aggregate auftritt. Bis zu einer Harnstoffkonzentration von ungefähr 9 M tritt diese ebenso wie die Entfaltung nur teilweise auf, wie an den Endpunkten der Kinetik sichtbar wird (Abb. 4.36F). Erst ab einer Harnstoffkonzentration von ungefähr 9 M können die Aggregate vollständig aufgelöst und das Protein entfaltet werden. Die Vermutung, dass der Vorgang  $A \rightarrow U$  über  $I_3$  verläuft, entsteht durch folgende Beobachtungen: Infolge der Aggregatlösung kommt es wiederum zu einer Strukturänderung. Die Geschwindigkeit des Vorganges  $I_3 \rightarrow U$  liegt in einem ähnlichen Bereich wie  $U \rightarrow I_3$ . In GdnHCl konnte die Bildung von  $I_3$  nicht detektiert werden. Der reversible zweite Übergang entspricht demnach  $A \rightleftharpoons I_3 \rightleftharpoons U$ . Folglich kann über die Reversibilität der Vorgänge  $I_2 \rightleftharpoons A$  und  $I_2 \rightleftharpoons U$  keine endgültige Aussage getroffen werden, die Pfeile für diese nicht detektierten Prozesse sind deshalb verkürzt dargestellt.

## 5 Zusammenfassung

Pflanzliche Phospholipasen D (PLD) des  $\alpha$ -Typs sind durch ihr breites Substratspektrum eine interessante Alternative für die industrielle Herstellung modifizierter Phospholipide. Das Ziel der Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der PLD2 aus Weißkohl. Neben den Eigenschaften des nativen Enzyms sollten insbesondere die irreversible Denaturierung und die Calciumbindung analysiert werden. Die Herstellung und Untersuchung einzelner Enzymfragmente bzw. Domänen sollte das Verständnis für die Struktur und Faltung der PLD2 vertiefen.

Auf der Grundlage von Sequenzvergleichen und Alignments sowie den Fragmentstudien einer homologen PLD $\beta$  aus *Arabidopsis thaliana* wurden die Expressionskonstrukte für zwei Fragmente der PLD2 hergestellt: Die N-terminal gelegene C2-Domäne, welche Phospholipide und Calciumionen binden sollte und der verbleibende Molekülteil (PLD2-Rumpfprotein), der die beiden für die katalytische Aktivität notwendigen Domänen enthält. Die Überprüfung verschiedenster Expressionsstrategien zeigte, dass beide Fragmente nur als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) löslich gewonnen werden konnten. Die PLD2-Fragmente erwiesen sich als instabil, aggregationsanfällig und inaktiv. Für das GST-C2-Domäne-Fusionsprotein konnte keine definierte Sekundärstruktur nachgewiesen werden. Circular dichroismus (CD)-Spektren zeigten, dass das GST-PLD2-Rumpfprotein eine PLD2-ähnliche Sekundärstruktur jedoch keine definierte Tertiärstruktur hatte. Steigende Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl)-Konzentrationen führten zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionsmaximums und ermöglichten die Aufnahme einer Übergangskurve. Die GdnHCl-induzierte Entfaltung des GST-PLD2-Rumpfprotein war reversibel, und es wurde ein unkooperativer Übergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 3,6 M GdnHCl detektiert, der sich jedoch keinem der beiden Übergänge der PLD2 zugeordnen ließ.

Native PLD2 konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation, Gelfiltration und Röntgenkleinwinkelstreuung übereinstimmend als Monomer identifiziert werden. Die von PD Dr. S. König (MLU, Halle) durchgeführten und ausgewerteten Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen wiesen auf eine längliche Molekülform mit locker strukturierten apikalen und basalen Bereichen hin.

Ohne Zusatz spezifischer Effektoren sind Calciumionen für die Aktivität der PLD2 essenziell. Ein Aktivitätsoptimum wurde bei pH 5,5 und 100 mM Ca<sup>2+</sup>-Salz festgestellt. Steigende Calciumionenkonzentrationen führten in dem gleichen Konzentrationsbereich zu einer Aktivitätszunahme bzw. einer Erhöhung der Molaren Elliptizität

im Nah-UV-CD-Spektrum (280 nm). Anhand modifizierter Scatchard-Plots konnten zwei getrennte Calciumbindungsereignisse identifiziert werden, deren Dissoziationskonstanten bei 0,069 bzw. 0,158 mM und 19,1 bzw. 8,64 mM lagen.

In schwachgepufferter Lösung, pH-Wert 5,0 bis 8,0, besitzt die PLD2 bei 20 °C eine gute Lagerstabilität. Die Zugabe von Salzen führte zur Aggregation des nativen Enzyms, ohne dass strukturelle Änderungen detektierbar waren. Dieses Verhalten wurde auch für die Aktivitätsabnahme bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration oberhalb des Optimums (100 mM) verantwortlich gemacht.

Der erste Übergang der GdnHCl- bzw. Harnstoff-induzierten Entfaltung sowie die Säure- und Temperatur-induzierte Entfaltung führten zu einer teilentfalteten PLD2. Die teilentfaltete PLD2 bindet den hydrophoben Farbstoff 1-Anilino-8-naphthalensulfonat, weist eine nativ-ähnliche Sekundärstruktur auf, zeigte jedoch keine definierte Tertiärstruktur mehr. Dieses Intermediat hatte somit *molten globule* ähnliche Eigenschaften. Die Tryptophanreste waren stärker lösungsmittelzugänglich als im nativen Enzym. Der proteolytische Abbau erfolgte zunehmend schneller, wobei jedoch keine veränderten transienten Fragmente entstanden. Desweiteren wurde die teilentfaltete PLD2 als heterogenes Aggregatgemisch identifiziert, wobei die monomere Spezies nicht gefunden werden konnte. Die Bildung dieser Aggregate verursachte die Irreversibilität des ersten Entfaltungsvorgangs, wobei die detektierten strukturellen Änderungen mit einer Enzyminaktivierung einhergingen. Systematische Doppelsprungexperimente bestätigten die Irreversibilität des ersten Übergangs.

Die Entfaltung der Sekundärstruktur der PLD2 konnte durch Harnstoff und GdnHCl induziert und mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Der zweite Übergang der PLD2 verlief kooperativ und reversibel zu einer *random coil* ähnlichen Konformation. Da der erste Entfaltungsschritt durch nur minimale Sekundärstrukturänderungen gekennzeichnet war und zudem irreversibel verlief, wurde eine getrennte Domänenentfaltung als Ursache für die zwei Übergänge der Denaturans-induzierten Entfaltung ausgeschlossen. In Verbindung mit den Ergebnissen der PLD2-Fragmente wird der erste Übergang so interpretiert, dass insbesondere die spezifischen Domäneninteraktionen zerstört werden, welche sich möglicherweise nur bei co-translationaler Faltung korrekt ausbilden können.

Die Aufnahme von kinetischen Faltungs- und Entfaltungskurven ermöglichte die Aufstellung eines Entfaltungsmodells für die PLD2. Die Entfaltungskinetik zeigte, dass die aggregierte teilentfaltete PLD2 der Übergangskurve (A) auf zwei verschiedenen Wegen entstand. Bei der Säure- und der Temperatur-induzierten Entfaltung sowie Konzentrationen bis 1 M GdnHCl oder 5 M Harnstoff entstand ein teilentfaltetes,

aggregationsanfälliges Intermediat  $I_1$ , dessen Eigenschaften denen der Aggregate ( $A$ ) gleich und welches nachfolgend irreversibel zu  $A$  aggregierte. Bei höheren Denaturationskonzentrationen entfaltet  $I_1$  weiter zu  $I_2$ , dessen Eigenschaften eher dem vollständig entfalteten Protein ( $U$ ) entsprechen. Trotzdem bildet sich aus  $I_2$  durch Strukturinduktion wiederum  $A$ . Erst bei höheren Denaturationskonzentration (>3,5 M GdnHCl bzw. >9,0 M Harnstoff) entfaltet  $I_2$  vollständig zu  $U$ . Der reversible zweite Übergang zwischen  $A$  und  $U$  verlief über ein weiteres Intermediat  $I_3$ . Dessen spektroskopische Eigenschaften ähneln lediglich  $A$ . Bei dem reversiblen zweiten Übergang der PLD2 ist die Entfaltung mit der Aggregatdissoziation gekoppelt.



## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Abergel, C., A. Abousalham, S. Chenivresse, M. Rivière, A. M. Moustacas-Gardies, and R. Verger. 2001. Crystallization and preliminary crystallographic study of a recombinant phospholipase D from cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**:320-2.
- [2] Abousalham, A., M. Rivière, M. Teissere, and R. Verger. 1993. Improved purification and biochemical characterization of phospholipase D from cabbage. *Biochim Biophys Acta* **1158**:1-7.
- [3] Acharya, P., and N. M. Rao. 2003. Stability studies on a lipase from *Bacillus subtilis* in guanidinium chloride. *J Protein Chem* **22**:51-60.
- [4] Allgyer, T. T., and M. A. Wells. 1979. Phospholipase D from savoy cabbage: purification and preliminary kinetic characterization. *Biochemistry* **18**:5348-53.
- [5] Ananthanarayanan, B., S. Das, S. G. Rhee, D. Murray, and W. Cho. 2002. Membrane targeting of C2 domains of phospholipase C- $\delta$  isoforms. *J Biol Chem* **277**:3568-75.
- [6] Andrade, M. A., P. Chacon, J. J. Merelo, and F. Moran. 1993. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* **6**:383-90.
- [7] Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**:223-30.
- [8] Arnold, U., and R. Ulbrich-Hofmann. 1997. Kinetic and thermodynamic thermal stabilities of ribonuclease A and ribonuclease B. *Biochemistry* **36**:2166-72.
- [9] Arnold, U., and R. Ulbrich-Hofmann. 1999. Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate/trichloroacetic acid. *Anal Biochem* **271**:197-9.
- [10] Arnold, U., and R. Ulbrich-Hofmann. 2000. Differences in the denaturation behavior of ribonuclease A induced by temperature and guanidine hydrochloride. *J Protein Chem* **19**:345-352.
- [11] Aune, K. C., and C. Tanford. 1969. Thermodynamics of the denaturation of lysozyme by guanidine hydrochloride. II. Dependence on denaturant concentration at 25 degrees. *Biochemistry* **8**:4586-4590.
- [12] Aurich, I., P. Dürrschmidt, F. Hirche, and R. Ulbrich-Hofmann. 1997. Transesterification of alkylphosphate esters by phospholipase D. *Biotechnol Lett* **19**:875-9.
- [13] Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [14] Balbach, J., and F. X. Schmid. 2000. Proline isomerization and its catalysis in protein folding. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 8**:212-49 Oxford University Press, New York.
- [15] Bam, N. B., J. L. Cleland, and T. W. Randolph. 1996. Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants. *Biotechnol Prog* **12**:801-9.
- [16] Ben-Shem, A., F. Frolov, and N. Nelson. 2003. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**:630-5.
- [17] Ben-Zvi, A. P., J. Chatellier, A. R. Fersht, and P. Goloubinoff. 1998. Minimal and optimal mechanisms for GroE-mediated protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:15275-80.
- [18] Bergfors, T. M. 1999. Precipitants. in *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips (A Laboratory Manual)*. (Hg. T. M. Bergfors). **Kap. 5**:39-50. International University Line, La Jolla, CA.
- [19] Bergfors, T. M., and K. Fridborg. 1999. Buffers and pH. in *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips (A Laboratory Manual)*. (Hg. T. M. Bergfors). **Kap. 6**:51-61. International University Line, La Jolla, CA.
- [20] Bhattacharyya, A. M., and P. M. Horowitz. 2002. Isolation and characterization of rhodanese intermediates during thermal inactivation and their implications for the mechanism of protein aggregation. *Biochemistry* **41**:422-9.
- [21] Bieri, O., and T. Kiefhaber. 2000. Kinetic models in protein folding. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 2**:34-64 Oxford University Press, New York.
- [22] Bittova, L., M. Sumandea, and W. Cho. 1999. A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem* **274**:9665-72.
- [23] Brandts, J. F., H. R. Halvorson, and M. Brennan. 1975. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**:4953-63.
- [24] Brockwell, D. J., D. A. Smith, and S. E. Radford. 2000. Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas. *Curr Opin Struct Biol* **10**:16-25.

- [25] Bruzik, K., and M. D. Tsai. 1984. Phospholipids chiral at phosphorus. Synthesis of chiral phosphatidylcholine and stereochemistry of phospholipase D. *Biochemistry* **23**:1656-61.
- [26] Buchner, J., M. Renner, H. Lilie, H. J. Hinz, R. Jaenicke, T. Kiefhaber, and R. Rudolph. 1991. Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry* **30**:6922-9.
- [27] Burk, N. 1943. Effects of inorganic electrolytes on the liberation of -SH in proteins. *J Phys Chem* **47**:104-18.
- [28] Carrea, G., P. D'Arrigo, V. Piergianni, S. Roncaglio, F. Secundo, and S. Servi. 1995. Purification and properties of two phospholipases D from *Streptomyces* sp. *Biochim Biophys Acta* **1255**:273-9.
- [29] Chaffotte, A. F., C. Cadieux, Y. Guillou, and M. E. Goldberg. 1992. A possible initial folding intermediate: the C-terminal proteolytic domain of tryptophan synthase  $\beta$  chains folds in less than 4 milliseconds into a condensed state with non-native-like secondary structure. *Biochemistry* **31**:4303-8.
- [30] Chang, C. T., C. S. Wu, and J. T. Yang. 1978. Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the  $\beta$ -turns. *Anal Biochem* **91**:13-31.
- [31] Chatellier, J., F. Hill, P. A. Lund, and A. R. Fersht. 1998. *In vivo* activities of GroEL minichaperones. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9861-6.
- [32] Chen, J., T. B. Acton, S. K. Basu, G. T. Montelione, and M. Inouye. 2002. Enhancement of the solubility of proteins overexpressed in *Escherichia coli* by heat shock. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**:519-24.
- [33] Chenal, A., P. Nizard, V. Forge, M. Pugnère, M. O. Roy, J. C. Mani, F. Guillain, and D. Gillet. 2002. Does fusion of domains from unrelated proteins affect their folding pathways and the structural changes involved in their function? A case study with the diphtheria toxin T domain. *Protein Eng* **15**:383-91.
- [34] Clark, E. D. B. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* **12**:202-7.
- [35] Clark, E. D. B. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol* **9**:157-63.
- [36] Clarke, J., and L. S. Itzhaki. 1998. Hydrogen exchange and protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **8**:112-8.
- [37] Colón, W., G. A. Elöve, L. P. Wakem, F. Sherman, and H. Roder. 1996. Side chain packing of the N- and C-terminal helices plays a critical role in the kinetics of cytochrome c folding. *Biochemistry* **35**:5538-49.
- [38] Creighton, T. E. 2000. Protein folding coupled to disulphide-bond formation. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 9**:250-78 Oxford University Press, New York.
- [39] D'Arrigo, P., V. Piergianni, D. Scarcelli, and S. Servi. 1995. A spectrophotometric assay for phospholipase D. *Anal Chimica Acta* **304**:249-54.
- [40] Daugherty, D. L., D. Rozema, P. E. Hanson, and S. H. Gellman. 1998. Artificial chaperone-assisted refolding of citrate synthase. *J Biol Chem* **273**:33961-71.
- [41] Davis, D. B., K. R. Doherty, A. J. Delmonte, and E. M. McNally. 2002. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *J Biol Chem* **277**:22883-8.
- [42] Davletov, B., O. Perisic, and R. L. Williams. 1998. Calcium-dependent membrane penetration is a hallmark of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2 whereas the C2A domain of synaptotagmin binds membranes electrostatically. *J Biol Chem* **273**:19093-6.
- [43] Davletov, B. A., and T. C. Südhof. 1993. A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity  $Ca^{2+}$ /phospholipid binding. *J Biol Chem* **268**:26386-90.
- [44] De Young, L. R., K. A. Dill, and A. L. Fink. 1993. Aggregation and denaturation of apomyoglobin in aqueous urea solutions. *Biochemistry* **32**:3877-86.
- [45] De Young, L. R., A. L. Fink, and K. A. Dill. 1993. Aggregation of Globular Proteins. *Acc Chem Res* **26**:614-20.
- [46] del Valle, L. J., C. Escribano, J. J. Pérez, and P. Garriga. 2002. Calcium-induced decrease of the thermal stability and chaperone activity of  $\alpha$ -crystallin. *Biochim Biophys Acta* **1601**:100-9.
- [47] DeLano, W. L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific LLC*, San Carlos, CA, USA.
- [48] Dignam, J. D., X. Gu, and J. B. Chaires. 2001. Equilibrium unfolding of *Bombyx mori* glycyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **276**:4028-37.
- [49] Dill, K. A. 1990. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**:7133-55.
- [50] Dill, K. A., and D. Shortle. 1991. Denatured states of proteins. *Annu Rev Biochem* **60**:795-825.
- [51] Dinner, A. R., A. Šali, L. J. Smith, C. M. Dobson, and M. Karplus. 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem Sci* **25**:331-9.
- [52] Dittrich, N., R. Haftendorn, and R. Ulbrich-Hofmann. 1998. Hexadecylphosphocholine and 2-modified 1,3-diacylglycerols as effectors of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* **1391**:265-72.

- [53] Dobson, C. M. 1999. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* **24**:329-32.
- [54] Dobson, C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* **426**:884-90.
- [55] Dobson, C. M., A. Šali, and M. Karplus. 1998. Proteinfaltung aus theoretischer und experimenteller Sicht. *Angew Chem* **110**:908-35.
- [56] Dürschmidt, P. 2003. Entfaltung und Autoproteolyse der neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* und einer Disulfid-modifizierten Variante. *Dissertation*. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
- [57] Eftink, M. R., and C. A. Ghiron. 1976. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* **15**:672-80.
- [58] Eftink, M. R., and C. A. Ghiron. 1981. Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal Biochem* **114**:199-227.
- [59] Eliáš, M., M. Potocký, F. Cvrčková, and V. V. Žárský. 2002. Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms. *BMC Genomics* **3**:2.
- [60] Ellis, R. J. 2001. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **11**:114-9.
- [61] Ellis, R. J., and F. U. Hartl. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **9**:102-10.
- [62] Ellis, R. J., and T. J. Pinheiro. 2002. Medicine: danger—misfolding proteins. *Nature* **416**:483-4.
- [63] Ellson, C. D., S. Andrews, L. R. Stephens, and P. T. Hawkins. 2002. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J Cell Sci* **115**:1099-105.
- [64] Essen, L. O., O. Perisic, R. Cheung, M. Katan, and R. L. Williams. 1996. Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C  $\delta$ . *Nature* **380**:595-602.
- [65] Exton, J. H. 2002. Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett* **531**:58-61.
- [66] Fan, L., S. Zheng, D. Cui, and X. Wang. 1999. Subcellular distribution and tissue expression of phospholipase D $\alpha$ , D $\beta$ , and D $\gamma$  in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **119**:1371-8.
- [67] Favilla, R., M. Goldoni, F. Del Signore, P. Di Muro, B. Salvato, and M. Beltramini. 2002. Guanidinium chloride induced unfolding of a hemocyanin subunit from *Carcinus aestuarii*. II. Holo form. *Biochim Biophys Acta* **1597**:51-9.
- [68] Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company, New York.
- [69] Fink, A. L. 1995. Compact intermediate states in protein folding. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**:495-522.
- [70] Fink, A. L. 1998. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des* **3**:R9-23.
- [71] Fink, A. L., L. J. Calciano, Y. Goto, T. Kurotsu, and D. R. Palleros. 1994. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry* **33**:12504-11.
- [72] Fontana, A., G. Fassina, C. Vita, D. Dalzoppo, M. Zamai, and M. Zambonin. 1986. Correlation between sites of limited proteolysis and segmental mobility in thermolysin. *Biochemistry* **25**:1847-51.
- [73] Fontana, A., P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella, and M. Zambonin. 1997. Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold Des* **2**:R17-26.
- [74] Freskgård, P. O., L. G. Mårtensson, P. Jonasson, B. H. Jonsson, and U. Carlsson. 1994. Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **33**:14281-8.
- [75] Freskgård, P. O., L. C. Petersen, D. A. Gabriel, X. Li, and E. Persson. 1998. Conformational stability of factor VIIa: biophysical studies of thermal and guanidine hydrochloride-induced denaturation. *Biochemistry* **37**:7203-12.
- [76] Gast, K., G. Damaschun, M. Desmadril, P. Minard, M. Müller-Frohne, W. Pfeil, and D. Zirwer. 1995. Cold denaturation of yeast phosphoglycerate kinase: which domain is more stable? *FEBS Lett* **358**:247-50.
- [77] Gill, S. C., and P. H. von Hippel. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**:319-26.
- [78] Golbik, R., R. Zahn, S. E. Harding, and A. R. Fersht. 1998. Thermodynamic stability and folding of GroEL minichaperones. *J Mol Biol* **276**:505-15.
- [79] Goto, Y., L. J. Calciano, and A. L. Fink. 1990. Acid-induced folding of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:573-7.
- [80] Goto, Y., N. Takahashi, and A. L. Fink. 1990. Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**:3480-8.

- [81] Gottlin, E. B., A. E. Rudolph, Y. Zhao, H. R. Matthews, and J. E. Dixon. 1998. Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9202-7.
- [82] Gouda, M. D., S. A. Singh, A. G. Rao, M. S. Thakur, and N. G. Karanth. 2003. Thermal inactivation of glucose oxidase. Mechanism and stabilization using additives. *J Biol Chem* **278**:24324-33.
- [83] Greene, R. F., Jr., and C. N. Pace. 1974. Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme,  $\alpha$ -chymotrypsin, and  $\beta$ -lactoglobulin. *J Biol Chem* **249**:5388-93.
- [84] Griko, Y., N. Sreerama, P. Osumi-Davis, R. W. Woody, and A. Y. Woody. 2001. Thermal and urea-induced unfolding in T7 RNA polymerase: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study. *Protein Sci* **10**:845-53.
- [85] Guex, N., and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-23.
- [86] Guo, Q., F. Zhao, Z. Guo, and X. Wang. 2004. Intermediates in the inactivation and unfolding of dimeric arginine kinase induced by GdnHCl. *J Biochem (Tokyo)* **136**:49-56.
- [87] Gursky, O., Ranjana, and D. L. Gantz. 2002. Complex of human apolipoprotein C-1 with phospholipid: thermodynamic or kinetic stability? *Biochemistry* **41**:7373-84.
- [88] Harding, S. E. 1997. Hydrodynamic properties of proteins. in *Protein Structure: A Practical Approach* (Hg. T. E. Creighton). **Kap. 9**:219-51. Oxford University Press, New York.
- [89] Hatanaka, T., T. Negishi, M. Kubota-Akizawa, and T. Hagishita. 2002. Purification, characterization, cloning and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2. *Enzyme Microb Technol* **31**:233-41.
- [90] Hatanaka, T., T. Negishi, and K. Mori. 2004. A mutant phospholipase D with enhanced thermostability from *Streptomyces sp.* *Biochim Biophys Acta* **1696**:75-82.
- [91] Haufe, S. 2001. Vergleich von zwei rekombinanten Phospholipase D - Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata). *Diplomarbeit*. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
- [92] Heller, M. 1978. Phospholipase D. *Adv Lipid Res* **16**:267-326.
- [93] Heller, M., P. Bütikofer, and U. Brodbeck. 1994. Generation by limited proteolysis of a catalytically active 39-kDa protein from the 115-kDa form of phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D from bovine serum. *Eur J Biochem* **224**:823-33.
- [94] Hirche, F., and R. Ulbrich-Hofmann. 1999. The interfacial pressure is an important parameter for the rate of phospholipase D catalyzed reactions in emulsion systems. *Biochim Biophys Acta* **1436**:383-9.
- [95] Hirel, P. H., M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, and S. Blanquet. 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:8247-51.
- [96] Hubbard, S. J. 1998. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim Biophys Acta* **1382**:191-206.
- [97] Hwang, I. S., S. J. Park, T. Roh, M. Choi, and H. J. Kim. 2001. Investigation of sulfhydryl groups in cabbage phospholipase D by combination of derivatization methods and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**:110-5.
- [98] Itzhaki, L. S., P. A. Evans, C. M. Dobson, and S. E. Radford. 1994. Tertiary interactions in the folding pathway of hen lysozyme: kinetic studies using fluorescent probes. *Biochemistry* **33**:5212-20.
- [99] Iwasaki, Y., S. Horiike, K. Matsushima, and T. Yamane. 1999. Location of the catalytic nucleophile of phospholipase D of *Streptomyces antibioticus* in the C-terminal half domain. *Eur J Biochem* **264**:577-81.
- [100] Iwasaki, Y., and T. Yamane. 2004. Enzymatic synthesis of structured lipids. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **90**:151-71.
- [101] Jaenicke, R. 1991. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* **30**:3147-3161.
- [102] Jaenicke, R. 2000. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J Biotechnol* **79**:193-203.
- [103] Jenny, R. J., K. G. Mann, and R. L. Lundblad. 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr Purif* **31**:1-11.
- [104] Jiang, J. X., and E. London. 1990. Involvement of denaturation-like changes in *Pseudomonas* exotoxin a hydrophobicity and membrane penetration determined by characterization of pH and thermal transitions. Roles of two distinct conformationally altered states. *J Biol Chem* **265**:8636-41.

- [105] Jiang, Z. G., M. Carraway, and C. J. McKnight. 2005. Limited proteolysis and biophysical characterization of the lipovitellin homology region in apolipoprotein B. *Biochemistry* **44**:1163-73.
- [106] Johnson, W. C., Jr. 1990. Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins* **7**:205-14.
- [107] Kelly, S. M., and N. C. Price. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci* **1**:349-84.
- [108] Kiefhaber, T., R. Quaas, U. Hahn, and F. X. Schmid. 1990. Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* **29**:3053-61.
- [109] Kiefhaber, T., R. Quaas, U. Hahn, and F. X. Schmid. 1990. Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry* **29**:3061-70.
- [110] Kiefhaber, T., R. Rudolph, H. H. Kohler, and J. Buchner. 1991. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (NY)* **9**:825-9.
- [111] Kim, D. U., T. Y. Roh, J. Lee, J. Y. Noh, Y. J. Jang, K. L. Hoe, H. S. Yoo, and M. U. Choi. 1999. Molecular cloning and functional expression of a phospholipase D from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Biochim Biophys Acta* **1437**:409-14.
- [112] Kim, P. S., and R. L. Baldwin. 1990. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* **59**:631-60.
- [113] Kirsten, R. 1988. Untersuchungen zur Reinigung, Charakterisierung und Immobilisierung von Phospholipase D aus Weißkohl. Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
- [114] Koch, M. H., P. Vachette, and D. I. Svergun. 2003. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* **36**:147-227.
- [115] Konarev, P. V., V. V. Volkov, A. V. Sokolova, M. H. J. Koch, and D. I. Svergun. 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst* **36**:1277-82.
- [116] Konno, T., Y. O. Kamatari, N. Tanaka, H. Kamikubo, C. M. Dobson, and K. Nagayama. 2000. A partially unfolded structure of the alkaline-denatured state of pepsin and its implication for stability of the zymogen-derived protein. *Biochemistry* **39**:4182-90.
- [117] Kopetzki, E., G. Schumacher, and P. Buckel. 1989. Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast  $\alpha$ -glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Mol Gen Genet* **216**:149-55.
- [118] Kundu, B., and P. Guptasarma. 1999. Hydrophobic dye inhibits aggregation of molten carbonic anhydrase during thermal unfolding and refolding. *Proteins* **37**:321-4.
- [119] Kursula, I., A. M. Heape, and P. Kursula. 2003. Non-Fusion GST From *S. japonicum* In Complex With Glutathione. nicht publiziert.
- [120] Kuwajima, K., and M. Arai. 2000. The molten globule state: the physical picture and biological significance. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 6**:138-74 Oxford University Press, New York.
- [121] Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
- [122] Lambrecht, R., and R. Ulbrich-Hofmann. 1992. A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**:81-8.
- [123] Lambrecht, R., and R. Ulbrich-Hofmann. 1993. The Adsorptive Immobilization of Phospholipase D mediated by Calcium Ions. *Biotechnology and Bioengineering* **41**:833-6.
- [124] Lehrer, S. S. 1971. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry* **10**:3254-63.
- [125] Leiros, I., E. Hough, P. D'Arrigo, G. Carrea, G. Pedrocchi-Fantoni, F. Secundo, and S. Servi. 2000. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of phospholipase D from *Streptomyces* sp. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56** ( Pt 4):466-8.
- [126] Leiros, I., S. McSweeney, and E. Hough. 2004. The Reaction Mechanism of Phospholipase D from *Streptomyces* sp. Strain PMF. Snapshots along the Reaction Pathway Reveal a Pentacoordinate Reaction Intermediate and an Unexpected Final Product. *J Mol Biol* **339**:805-20.
- [127] Leiros, I., F. Secundo, C. Zambonelli, S. Servi, and E. Hough. 2000. The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure Fold Des* **8**:655-67.
- [128] Lerchner, A. 2005. Studien zur Gewinnung und gentechnischen Modifizierung von Phospholipase D aus Schlafmohn (*Papaver somniferum* L.) und Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata). *Dissertation*. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
- [129] Leroux, M. R., and F. U. Hartl. 2000. Cellular functions of molecular chaperones. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 14**:364-405. Oxford University Press, New York.
- [130] Levinthal, C. 1968. Are there pathways for protein folding? *J Chim Phys* **65**:44-5.

- [131] Li, C., B. Ullrich, J. Z. Zhang, R. G. Anderson, N. Brose, and T. C. Südhof. 1995. Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**:594-9.
- [132] Lilie, H., E. Schwarz, and R. Rudolph. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* **9**:497-501.
- [133] Lim, K., J. X. Ho, K. Keeling, G. L. Gilliland, X. Ji, F. Rüker, and D. C. Carter. 1994. Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci* **3**:2233-44.
- [134] Liscovitch, M., M. Czarny, G. Fiucci, and X. Tang. 2000. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345**:401-15.
- [135] Lomasney, J. W., H. F. Cheng, S. R. Roffler, and K. King. 1999. Activation of phospholipase C  $\delta$ 1 through C2 domain by a Ca(2+)-enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J Biol Chem* **274**:21995-2001.
- [136] Maffucci, T., and M. Falasca. 2001. Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett* **506**:173-9.
- [137] Malmberg, N. J., D. R. Van Buskirk, and J. J. Falke. 2003. Membrane-docking loops of the cPLA2 C2 domain: detailed structural analysis of the protein-membrane interface via site-directed spin-labeling. *Biochemistry* **42**:13227-40.
- [138] Markossian, K. A., and B. I. Kurganov. 2004. Protein folding, misfolding, and aggregation. Formation of inclusion bodies and aggresomes. *Biochemistry (Mosc)* **69**:971-84.
- [139] McDermott, M., M. J. Wakelam, and A. J. Morris. 2004. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol* **82**:225-53.
- [140] McGee, J. D., J. L. Roe, T. A. Sweat, X. Wang, J. A. Guikema, and J. E. Leach. 2003. Rice phospholipase D isoforms show differential cellular location and gene induction. *Plant Cell Physiol* **44**:1013-26.
- [141] Medkova, M., and W. Cho. 1998. Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C- $\alpha$ . Differential roles of Ca $^{2+}$  ligands and membrane binding residues. *J Biol Chem* **273**:17544-52.
- [142] Medkova, M., and W. Cho. 1999. Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C- $\alpha$  in its membrane binding and activation. *J Biol Chem* **274**:19852-61.
- [143] Meier, K. E., T. C. Gibbs, S. M. Knoepp, and K. M. Ella. 1999. Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1439**:199-213.
- [144] Mitraki, A., M. Danner, J. King, and R. Seckler. 1993. Temperature-sensitive mutations and second-site suppressor substitutions affect folding of the P22 tailspike protein *in vitro*. *J Biol Chem* **268**:20071-5.
- [145] Mitraki, A., and J. King. 1992. Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. *FEBS Lett* **307**:20-5.
- [146] Morozova-Roche, L. A., C. C. Arico-Muendel, D. T. Haynie, V. I. Emelyanenko, H. Van Dael, and C. M. Dobson. 1997. Structural characterisation and comparison of the native and A-states of equine lysozyme. *J Mol Biol* **268**:903-21.
- [147] Mülhardt, C. 2003. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [148] Munnik, T. 2001. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci* **6**:227-33.
- [149] Nalefski, E. A., and J. J. Falke. 1996. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* **5**:2375-90.
- [150] Nalefski, E. A., M. M. Slazas, and J. J. Falke. 1997. Ca $^{2+}$ -signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry* **36**:12011-8.
- [151] Nalefski, E. A., M. A. Wisner, J. Z. Chen, S. R. Sprang, M. Fukuda, K. Mikoshiba, and J. J. Falke. 2001. C2 domains from different Ca $^{2+}$  signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry* **40**:3089-100.
- [152] Neet, K. E., and D. E. Timm. 1994. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci* **3**:2167-74.
- [153] Nesterenko, M. V., M. Tilley, and S. J. Upton. 1994. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28**:239-42.
- [154] Netzer, W. J., and F. U. Hartl. 1997. Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**:343-9.
- [155] Nölting, B., R. Golbik, A. S. Soler-González, and A. R. Fersht. 1997. Circular dichroism of denatured barstar suggests residual structure. *Biochemistry* **36**:9899-905.

- [156] Novotná, Z., J. Káš, J. Daussant, J. Sajdok, and O. Valentová. 1999. Purification and characterisation of rape seed phospholipase D. *Plant Physiol Biochem* **37**:531-7.
- [157] Nozaki, Y., and C. Tanford. 1963. The Solubility of Amino Acids and Related Compounds in Aqueous Urea Solutions. *J Biol Chem* **238**:4074-81.
- [158] Nozaki, Y., and C. Tanford. 1970. The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem* **245**:1648-52.
- [159] Ochoa, W. F., J. Garcia-Garcia, I. Fita, S. Corbalan-Garcia, N. Verdaguer, and J. C. Gomez-Fernandez. 2001. Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca(2+)-independent C2 domains. *J Mol Biol* **311**:837-49.
- [160] Onuchic, J. N., and P. G. Wolynes. 2004. Theory of protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **14**:70-5.
- [161] Otzen, D. E., L. S. Itzhaki, N. F. elMasry, S. E. Jackson, and A. R. Fersht. 1994. Structure of the transition state for the folding/unfolding of the barley chymotrypsin inhibitor 2 and its implications for mechanisms of protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:10422-5.
- [162] Panchenko, A. R., Z. Luthey-Schulten, and P. G. Wolynes. 1996. Foldons, protein structural modules, and exons. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:2008-13.
- [163] Pappa, H., L. V. Dekker, P. J. Parker, and N. Q. McDonald. 1998. Preliminary X-ray analysis of a C2-like domain from protein kinase C- $\delta$ . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **54** ( Pt 4):693-6.
- [164] Pappa, H., J. Murray-Rust, L. V. Dekker, P. J. Parker, and N. Q. McDonald. 1998. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C- $\delta$ . *Structure* **6**:885-94.
- [165] Pappan, K., W. Qin, J. H. Dyer, L. Zheng, and X. Wang. 1997. Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD $\beta$ , from *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **272**:7055-61.
- [166] Pappan, K., and X. Wang. 1999. Plant phospholipase D $\alpha$  is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca(2+) concentrations. *Arch Biochem Biophys* **368**:347-53.
- [167] Pappan, K., L. Zheng, R. Krishnamoorthi, and X. Wang. 2004. Evidence for and characterization of Ca<sup>2+</sup> binding to the catalytic region of *Arabidopsis thaliana* phospholipase D $\beta$ . *J Biol Chem* **279**:47833-9.
- [168] Perisic, O., S. Fong, D. E. Lynch, M. Bycroft, and R. L. Williams. 1998. Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **273**:1596-604.
- [169] Ponting, C. P., and I. D. Kerr. 1996. A novel family of phospholipase D homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Sci* **5**:914-22.
- [170] Ponting, C. P., and P. J. Parker. 1996. Extending the C2 domain family: C2s in PKCs  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ , phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci* **5**:162-6.
- [171] Porod, G. 1951. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *I Kolloidnyi Zhurnal* **124**:83-114.
- [172] Privalov, P. L. 1996. Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol* **258**:707-25.
- [173] Privalov, P. L., E. I. Tiktopulo, S. Venyaminov, V. Griko Yu, G. I. Makhataдзе, and N. N. Khechinashvili. 1989. Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state. *J Mol Biol* **205**:737-50.
- [174] Provencher, S. W., and J. Glockner. 1981. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**:33-7.
- [175] Ptitsyn, O. B. 1995. Molten globule and protein folding. *Adv Protein Chem* **47**:83-229.
- [176] Ptitsyn, O. B., R. H. Pain, G. V. Semisotnov, E. Zerovnik, and O. I. Razgulyaev. 1990. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Lett* **262**:20-4.
- [177] Qin, C., and X. Wang. 2002. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD  $\zeta$  1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiol* **128**:1057-68.
- [178] Raso, S. W., and J. King. 2000. Protein folding and human disease. in *Mechanisms of Protein Folding*. (Hg. R. H. Pain) **Kap. 15**:406-28 Oxford University Press, New York.
- [179] Rizo, J., and T. C. Südhof. 1998. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem* **273**:15879-82.
- [180] Roder, H., and W. Colón. 1997. Kinetic role of early intermediates in protein folding. *Curr Opin Struct Biol* **7**:15-28.
- [181] Rose, G. D., A. R. Geselowitz, G. J. Lesser, R. H. Lee, and M. H. Zehfus. 1985. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins. *Science* **229**:834-8.
- [182] Royer, C. A. 1995. Fluorescence Spectroscopy. in *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. (Hg. B. A. Shirley). **Kap. 3**:65-89. Humana Press, Totowa, NJ.

- [183] Rozema, D., and S. H. Gellman. 1996. Artificial chaperone-assisted refolding of denatured-reduced lysozyme: modulation of the competition between renaturation and aggregation. *Biochemistry* **35**:15760-71.
- [184] Rudolph, R., G. Böhm, H. Lilie, and R. Jaenicke. 1997. Folding proteins. in *Protein Function: A Practical Approach*. (Hg. T. E. Creighton). **Kap. 3**:57-99. Oxford University Press, New York.
- [185] Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [186] Sánchez-Ruiz, J. M., J. L. López-Lacomba, M. Cortijo, and P. L. Mateo. 1988. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* **27**:1648-52.
- [187] Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-7.
- [188] Santoro, M. M., and D. W. Bolen. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**:8063-8.
- [189] Schäffner, I. 2001. Identifizierung und rekombinante Herstellung von Phospholipase D - Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata). Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle (Saale).
- [190] Schäffner, I., K.-P. Rücknagel, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann. 2002. Genomic structure, cloning and expression of two phospholipase D isoenzymes from white cabbage. *Eur J Lipid Sci Technol* **104**:79-87.
- [191] Schmid, F. X. 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. in *Protein Structure: A Practical Approach*. (Hg. T. E. Creighton). **Kap. 11**: 261-98. Oxford University Press, New York.
- [192] Scholtz, J. M., D. Barrick, E. J. York, J. M. Stewart, and R. L. Baldwin. 1995. Urea unfolding of peptide helices as a model for interpreting protein unfolding. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:185-9.
- [193] Schöps, R., A. Schierhorn, I. Schäffner, J. Mansfeld, and R. Ulbrich-Hofmann. 2002. Identification of phospholipase D from cabbage as N-terminally acetylated PLD2. *J Protein Chem* **21**:407-11.
- [194] Segelke, B. W. 2001. Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening. *J Crystal Growth* **232**:553-62.
- [195] Semisotnov, G. V., H. Kihara, N. V. Kotova, K. Kimura, Y. Amemiya, K. Wakabayashi, I. N. Serdyuk, A. A. Timchenko, K. Chiba, K. Nikaido, T. Ikura, and K. Kuwajima. 1996. Protein globularization during folding. A study by synchrotron small-angle X-ray scattering. *J Mol Biol* **262**:559-74.
- [196] Shao, X., B. A. Davletov, R. B. Sutton, T. C. Südhof, and J. Rizo. 1996. Bipartite  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* **273**:248-51.
- [197] Sharma, S., and M. N. Gupta. 2001. Purification of phospholipase D from *Dacus carota* by three-phase partitioning and its characterization. *Protein Expr Purif* **21**:310-6.
- [198] Shi, L., D. R. Palleros, and A. L. Fink. 1994. Protein conformational changes induced by 1,1'-bis(4-anilino-5-naphthalenesulfonic acid): preferential binding to the molten globule of DnaK. *Biochemistry* **33**:7536-46.
- [199] Shin, O. H., W. Han, Y. Wang, and T. C. Südhof. 2005. Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual  $\text{Ca}^{2+}$  binding properties. *J Biol Chem* **280**:1641-51.
- [200] Shirley, B. A. 1995. Urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. in *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. (Hg. B. A. Shirley). **Kap. 8**:177-90. Humana Press, Totowa, NJ.
- [201] Shortle, D. 1996. The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability. *Faseb J* **10**:27-34.
- [202] Shumilina, E. V., N. Y. Zonova, O. G. Mukhaneva, and Y. A. Shchipunov. 1999. Influence of coprecipitation and interactions with anionic surfactants on the activity of plant phospholipase D. *Biochemistry (Mosc)* **64**:883-9.
- [203] Smith, D. B., and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**:31-40.
- [204] Smith, J. S., and J. M. Scholtz. 1996. Guanidine hydrochloride unfolding of peptide helices: separation of denaturant and salt effects. *Biochemistry* **35**:7292-7.
- [205] Song, M., and H. Kim. 1997. Stability and solvent accessibility of SecA protein of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)* **122**:1010-8.
- [206] Sosnick, T. R., L. Mayne, and S. W. Englander. 1996. Molecular collapse: the rate-limiting step in two-state cytochrome c folding. *Proteins* **24**:413-26.



- [207] Sosnick, T. R., M. D. Shtilerman, L. Mayne, and S. W. Englander. 1997. Ultrafast signals in protein folding and the polypeptide contracted state. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:8545-50.
- [208] Sosnick, T. R., and J. Trehwella. 1992. Denatured states of ribonuclease A have compact dimensions and residual secondary structure. *Biochemistry* **31**:8329-35.
- [209] Southworth, M. W., K. Amaya, T. C. Evans, M. Q. Xu, and F. B. Perler. 1999. Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the Mycobacterium xenopi gyrase A intein. *Biotechniques* **27**:110-20.
- [210] Speed, M. A., T. Morshead, D. I. Wang, and J. King. 1997. Conformation of P22 tailspike folding and aggregation intermediates probed by monoclonal antibodies. *Protein Sci* **6**:99-108.
- [211] Sreerama, N., S. Y. Venyaminov, and R. W. Woody. 1999. Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci* **8**:370-80.
- [212] Sreerama, N., and R. W. Woody. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**:252-60.
- [213] Stuckey, J. A., and J. E. Dixon. 1999. Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* **6**:278-84.
- [214] Studier, F. W. 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**:207-34.
- [215] Sudharshan, E., S. Srinivasulu, and A. G. Appu Rao. 2000. pH-induced domain interaction and conformational transitions of lipoxygenase-1. *Biochim Biophys Acta* **1480**:13-22.
- [216] Sung, T. C., R. L. Roper, Y. Zhang, S. A. Rudge, R. Temel, S. M. Hammond, A. J. Morris, B. Moss, J. Engebrecht, and M. A. Frohman. 1997. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *Embo J* **16**:4519-30.
- [217] Svergun, D. I. 1992. Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *J Appl Cryst* **25**:495-503.
- [218] Svergun, D. I. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* **76**:2879-86.
- [219] Svergun, D. I., and M. H. Koch. 2002. Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution. *Curr Opin Struct Biol* **12**:654-60.
- [220] Takano, K., J. M. Scholtz, J. C. Sacchettini, and C. N. Pace. 2003. The contribution of polar group burial to protein stability is strongly context-dependent. *J Biol Chem* **278**:31790-5.
- [221] Tani, F., N. Shirai, T. Onishi, F. Venelle, K. Yasumoto, and E. Doi. 1997. Temperature control for kinetic refolding of heat-denatured ovalbumin. *Protein Sci* **6**:1491-502.
- [222] Thirumalai, D., D. K. Klimov, and R. I. Dima. 2003. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation. *Curr Opin Struct Biol* **13**:146-59.
- [223] Tookey, H. L., and A. K. Balls. 1956. Plant phospholipase D. I. Studies on cottonseed and cabbage phospholipase D. *J Biol Chem* **218**:213-24.
- [224] Tozawa, K., M. Miyauchi, and M. Yoshida. 1993. Structure of the  $\alpha$  subunit of F1-ATPase probed by limited proteolysis. *J Biol Chem* **268**:19044-54.
- [225] Ulbrich-Hofmann, R. 2000. Phospholipases used in Lipid transformations. in *Enzymes in Lipid Modification*. (Hg. U. Bornscheuer) **Kap. 12**:219-62 Wiley-VCH, Weinheim.
- [226] Ulbrich-Hofmann, R. 2001. Phospholipasen zur umweltschonenden Herstellung von Phospholipiden. *Sonderausgabe der DBU in Kooperation mit BIOSpektrum* 40-4. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [227] Ulbrich-Hofmann, R. 2003. Enzyme-catalysed transphosphatidylolation. *Eur J Lipid Sci Technol* **105**:305-7.
- [228] Ulbrich-Hofmann, R., A. Lerchner, M. Oblozinsky, and L. Bezakova. 2005. Phospholipase D and its application in biocatalysis. *Biotechnol Lett* **27**:535-44.
- [229] Uversky, V. N., A. S. Karnoup, R. Khurana, D. J. Segel, S. Doniach, and A. L. Fink. 1999. Association of partially-folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability. *Protein Sci* **8**:161-73.
- [230] Uversky, V. N., S. Winter, and G. Löber. 1998. Self-association of 8-anilino-1-naphthalene-sulfonate molecules: spectroscopic characterization and application to the investigation of protein folding. *Biochim Biophys Acta* **1388**:133-42.
- [231] Vermeer, A. W., and W. Norde. 2000. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* **78**:394-404.
- [232] Virto, C., I. Svensson, and P. Adlercreutz. 2000. Hydrolytic and transphosphatidylolation activities of phospholipase D from Savoy cabbage towards lysophosphatidylcholine. *Chem Phys Lipids* **106**:41-51.

- [233] Wang, C., I. Lascu, and A. Giartosio. 1998. Bovine serum fetuin is unfolded through a molten globule state. *Biochemistry* **37**:8457-64.
- [234] Wang, X. 2000. Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res* **39**:109-49.
- [235] Wang, X. 2002. Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**:408-14.
- [236] Wang, X. 2004. Lipid signaling. *Curr Opin Plant Biol* **7**:329-36.
- [237] Wang, X., L. Xu, and L. Zheng. 1994. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L. *J Biol Chem* **269**:20312-7.
- [238] Watanabe, T., H. Sato, Y. Sagana, Y. Nakazawa, and K. Takano. 1999. Primary structure of phospholipase D purified from cabbage leaves. *Jpn J Electroph* **43**:159-164.
- [239] West, S. M., S. M. Kelly, and N. C. Price. 1990. The unfolding and attempted refolding of citrate synthase from pig heart. *Biochim Biophys Acta* **1037**:332-336.
- [240] Wetzel, R., and B. A. Chrnyk. 1994. Inclusion body formation by interleukin-1  $\beta$  depends on the thermal sensitivity of a folding intermediate. *FEBS Lett* **350**:245-8.
- [241] Whitmore, L., and B. A. Wallace. 2004. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* **32**:W668-73.
- [242] Wider, G., and K. Wüthrich. 1999. NMR spectroscopy of large molecules and multimolecular assemblies in solution. *Curr Opin Struct Biol* **9**:594-601.
- [243] Wu, J. W., and Z. X. Wang. 1999. New evidence for the denaturant binding model. *Protein Sci* **8**:2090-2097.
- [244] Xie, Z., W. T. Ho, and J. H. Exton. 2000. Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D. Contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. *J Biol Chem* **275**:24962-9.
- [245] Xu, G. Y., T. McDonagh, H. A. Yu, E. A. Nalefski, J. D. Clark, and D. A. Cumming. 1998. Solution structure and membrane interactions of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *J Mol Biol* **280**:485-500.
- [246] Yang, S. F., S. Freer, and A. A. Benson. 1967. Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J Biol Chem* **242**:477-84.
- [247] Younus, H., R. Schöps, A. Lerchner, K. P. Rücknagel, A. Schierhorn, M. Saleemuddin, and R. Ulbrich-Hofmann. 2003. Proteolytic sensitivity of a recombinant phospholipase D from cabbage: identification of loop regions and conformational changes. *J Protein Chem* **22**:499-508.
- [248] Zahn, R., A. M. Buckle, S. Perrett, C. M. Johnson, F. J. Corrales, R. Golbik, and A. R. Fersht. 1996. Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:15024-9.
- [249] Zale, S. E., and A. M. Klibanov. 1983. On the Role of Reversible Denaturation (Unfolding) in the Irreversible Thermal Inactivation of Enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* **25**:2221-30.
- [250] Zhang, W., L. Yu, Y. Zhang, and X. Wang. 2005. Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* **1736**:1-9.
- [251] Zheng, L., R. Krishnamoorthi, M. Zolkiewski, and X. Wang. 2000. Distinct Ca<sup>2+</sup> binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D $\alpha$  and  $\beta$ . *J Biol Chem* **275**:19700-6.
- [252] Zheng, L., J. Shan, R. Krishnamoorthi, and X. Wang. 2002. Activation of plant phospholipase D $\beta$  by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: characterization of binding site and mode of action. *Biochemistry* **41**:4546-53.

## A Anhang

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und diese Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Halle, den 24. Januar 2006

## Danksagung

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

Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann für das Ermöglichen dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe, für das stetige Interesse am Vorschreiten der Arbeit, die Diskussionsbereitschaft und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugation und für wichtige oder anregende Hinweise und Diskussionen.

Bei Herrn PD Dr. Ralph Golbik bedanke ich mich für seine Hilfe bei den *stopped-flow* Messungen und seine Diskussionsbereitschaft.

Ein herzliches Danke an Herrn PD Dr. Stephan König für die Durchführung und Auswertung der SAXS-Messungen.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Regina Schöps und Frau Christa Kuplens für die Bereitstellung des PpNp-Substrats und die Durchführung des HIC-Reinigungsschritts der PLD2.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeitern der Abteilung „Technische Enzymologie“ für das angenehme und produktive Arbeitsklima. Die nicht immer fachbezogenen Diskussionen in den Teepausen haben so manche Durststrecke erträglicher gemacht, Fragen geklärt oder aufgeworfen.

Außerdem sei an dieser Stelle noch den fleißigen Korrekturlesern Diana Kühn, Knut Kölbl und Dr. Ulrich Arnold gedankt.

Für immer wird mir mit dieser Zeit auch die unverwüstlich stattfindende mittwochabendliche Kneipenrunde und ihre zahlreichen Teilnehmer in schöner Erinnerung bleiben, bei der das einleitende Schwimmen später ja leider wegfiel.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie für deren ständige Unterstützung und Verständnis bedanken. Ohne meinen lieben und geduldigen Mann Micha wäre das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

LEBENS LAUF

Name: Haufe  
 Vorname: Susanne  
 Geburtsdatum: 11.08.1977  
 Geburtsort: Halle (Saale)  
 Wohnanschrift: Scharrenstr. 7, 06108 Halle (Saale)  
 Familienstand: verheiratet  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

**Schulbildung**

09/1984 – 07/ 1986 Besuch der Polytechnischen Oberschule M.W. Frunse in Halle  
 09/1986 – 07/1991 Besuch der Polytechnischen Oberschule S.M. Kirow in Halle, Klasse mit erweitertem Russischunterricht  
 09/1991 – 07/1996 Besuch des Südstadtgymnasiums in Halle mit Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Durchschnittsnote: 1,4)

**Studium**

10/1996 – 09/2001 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit zum Thema „Vergleich von zwei rekombinanten Phospholipase D – Isoenzymen aus Weißkohl (*Brassica oleracea* var. capitata)“ in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie bei Prof. R. Ulbrich-Hofmann  
 Abschluss: Diplom Biochemikerin („Mit Auszeichnung“)  
 11/2001 – 01/2006 Promotion Biochemie bei Prof. R. Ulbrich-Hofmann in der Abteilung „Technische Enzymologie“ des Instituts für Biotechnologie am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 03/2002 – 12/2004 Stipendiat nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt  
 01/2005 – 03/2005 Stipendiat des GRK 1026