

Das Lektin aus der Erbse *Pisum sativum*: Bindungsstudien, Monomer-Dimer-Gleichgewicht und Rückfaltung aus Fragmenten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von **Frank Küster**

Potsdam, im September 2002

Zusammenfassung

Das Lektin aus *Pisum sativum*, der Gartenerbse, ist Teil der Familie der Leguminosenlektine. Diese Proteine haben untereinander eine hohe Sequenzhomologie, und die Struktur ihrer Monomere, ein all- β -Motiv, ist hoch konserviert. Dagegen gibt es innerhalb der Familie eine große Vielfalt an unterschiedlichen Quartärstrukturen, die Gegenstand kristallographischer und theoretischer Arbeiten waren. Das Erbsenlektin ist ein dimeres Leguminosenlektin mit einer Besonderheit in seiner Struktur: Nach der Faltung in der Zelle wird aus einem Loop eine kurze Aminosäuresequenz herausgeschnitten, so dass sich in jeder Untereinheit zwei unabhängige Polypeptidketten befinden. Beide Ketten sind aber stark miteinander verschränkt und bilden eine gemeinsame strukturelle Domäne. Wie alle Lektine bindet Erbsenlektin komplexe Oligosaccharide, doch sind seine physiologische Rolle und der natürliche Ligand unbekannt. In dieser Arbeit wurden Versuche zur Entwicklung eines Funktionstests für Erbsenlektin durchgeführt und seine Faltung, Stabilität und Monomer-Dimer-Gleichgewicht charakterisiert. Um die spezifische Rolle der Prozessierung für Stabilität und Faltung zu untersuchen, wurde ein unprozessiertes Konstrukt in *E. coli* exprimiert und mit der prozessierten Form verglichen.

Beide Proteine zeigen die gleiche kinetische Stabilität gegenüber chemischer Denaturierung. Sie denaturieren extrem langsam, weil nur die isolierten Untereinheiten entfalten können und das Monomer-Dimer-Gleichgewicht bei mittleren Konzentrationen an Denaturierungsmittel auf der Seite der Dimere liegt. Durch die extrem langsame Entfaltung zeigen beide Proteine eine apparente Hysterese im Gleichgewichtsübergang, und es ist nicht möglich, die thermodynamische Stabilität zu bestimmen. Die Stabilität und die Geschwindigkeit der Assoziation und Dissoziation in die prozessierten bzw. nichtprozessierten Untereinheiten sind für beide Proteine gleich. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch unter nicht-denaturierenden Bedingungen die Untereinheiten zwischen den Dimeren ausgetauscht werden.

Die Renaturierung der unprozessierten Variante ist unter stark nativen Bedingungen zu 100 % möglich. Das prozessierte Protein dagegen renaturiert nur zu etwa 50 %, und durch die Prozessierung ist die Faltung stark verlangsamt, der Faltungsprozess ist erst nach mehreren Tagen abgeschlossen. Im Laufe der Renaturierung wird ein Intermediat populiert, in dem die längere der beiden Polypeptidketten ein Homodimer mit nativ-ähnlicher Untereinheitenkontaktfläche bildet. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Renaturierung ist die Assoziation der entfalteten kürzeren Kette mit diesem Dimer.

Abstract

The lectin from *Pisum sativum* (garden pea) is a member of the family of legume lectins. These proteins share a high sequence homology, and the structure of their monomers, an all- β -motif, is highly conserved. Their quaternary structures, however, show a great diversity which has been subject to cristallographic and theoretical studies. Pea lectin is a dimeric legume lectin with a special structural feature: After folding is completed in the cell, a short amino acid sequence is cut out of a loop, resulting in two independent polypeptide chains in each subunit. Both chains are closely intertwined and form one contiguous structural domain. Like all lectins, pea lectin binds to complex oligosaccharides, but its physiological role and its natural ligand are unknown. In this study, experiments to establish a functional assay for pea lectin have been conducted, and its folding, stability and monomer-dimer-equilibrium have been characterized. To investigate the specific role of the processing for stability and folding, an unprocessed construct was expressed in *E. coli* and compared to the processed form.

Both proteins have the same kinetic stability against chemical denaturant. They denature extremely slowly, because only the isolated subunits can unfold, and the monomer-dimer-equilibrium favors the dimer at moderate concentrations of denaturant. Due to the slow unfolding, both proteins exhibit an apparent hysteresis in the denaturation transition. Therefore it has not been possible to determine their thermodynamic stability. For both proteins, the stability and the rates of association and dissociation into processed or unprocessed subunits, respectively, are equal. Furthermore it could be shown that even under non-denaturing conditions the subunits are exchanged between dimers.

Renaturation of the unprocessed variants is possible under strongly native conditions with 100 % yield. The processed protein, however, can be renatured with yields of about 50 %, and its refolding is strongly decelerated. The folding process is finished only after several days. During renaturation, an intermediate is populated, in which the longer of the two polypeptide chains forms a homodimer with a native-like subunit interface. The rate limiting step of renaturation is the association of the unfolded short chain with this dimer.

Abkürzungen

λ_{em}	Emissions- bzw. Detektionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
ε	molarer Extinktionskoeffizient
A	Fluoreszenzanisotropie, siehe Seite 38
a	Kalibrierungsfaktor zur Berechnung von Konzentrationen aus dem Hämagglutinationsassay, siehe Seite 32
N	Anzahl der Vertiefungen mit Agglutination im Hämagglutinationsassay, siehe Seite 32
p	Fluoreszenzpolarisation, siehe Seite 38
S/R	Quotient aus Probensignal S und Referenzsignal R (um Lampenintensitätsschwankungen korrigiertes Fluoreszenzsignal)
Da	molekulare Masseneinheit, 1 Da entspricht 1/12 der Masse eines ^{12}C -Atoms und vom Zahlenwert 1 g/mol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> K12
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin, siehe Seite 91
amp	Ampicillin
AspAMC	L-Asparaginsäure-4-(4-methyl-7-cumarinylamid), siehe Seite 91
BA	<i>N</i> -(4-Amino-2,5-diethoxyphenyl)-benzoesäureamid, siehe Seite 91
BCAA	<i>N</i> -(<i>S</i> -Benzyl-L-cysteinyl)-2-aminoacridon, siehe Seite 91
CD	Circulardichroismus
ConA	Concanavalin A, ein Lektin aus <i>Canavalia ensiformis</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i> , Differentialkalorimetrie zur Bestimmung thermodynamischer Parameter von Makromolekülen
ECoRL	dimeres Lektin aus <i>Erythrina corallodendron</i>
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat, <i>N,N,N',N'</i> -Tetracarboxyethyl-1,2-diaminoethan
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
G-Faktor	Gerätefaktor bei der Messung von Anisotropie und Polarisation, siehe Seite 38
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
GS4	dimeres Lektin aus <i>Griffonia simplicifolia</i>

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LAA	<i>N</i> -(L-Leucyl)-2-aminoacridon, siehe Seite 91
LB	Luria-Bertani
Malt-AA	Produkt der reduktiven Aminierung von 2-Amino-10H-acridin-9-on mit Maltose
Malt-AMC	Produkt der reduktiven Aminierung von AMC mit Maltose
Malt-AspAMC	Produkt der reduktiven Aminierung von AspAMC mit Maltose
Malt-BA	Produkt der reduktiven Aminierung von BA mit Maltose
Malt-BCAA	Produkt der reduktiven Aminierung von BCAA mit Maltose, die unterschiedlichen Peaks wurden durchnummeriert, siehe Seite 92
Malt-LAA	Produkt der reduktiven Aminierung von LAA mit Maltose, die unterschiedlichen Peaks wurden durchnummeriert, siehe Seite 92
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
N125D	Bindungs-inaktive Mutante von PslS, in der Asparagin 125 durch Aspartat ersetzt ist
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Magnetische Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte, $\log_{10}(I_0/I)$, für Messungen, bei denen die Ursache des Lichtverlustes nicht allein Absorption ist
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pefabloc SC	4-(1-Aminoethyl)-benzylsulfonylefluorid-Hydrochlorid
PNA	<i>peanut agglutinin</i> , Lektin aus der Erdnuss <i>arachys hypogea</i> mit ungewöhnlicher Quartärstruktur
psi	<i>pounds per square inch</i> , 1 bar = 0.1 MPa = 14.5 <i>psi</i>
Psl	<i>Pisum-sativum</i> -Lektin (oder <i>pea seed lectin</i>), das hier untersuchte Erbsenlektin
PslP	Prozessierte Form des Lektins, siehe Seite 7
PslP- α	Die N-terminale α -Kette des prozessierten Lektins
PslP- α -A	Die Isoform A der α -Kette des prozessierten Lektins
PslP- α -B	Die Isoform B der α -Kette des prozessierten Lektins
PslP- β	Die C-terminale β -Kette des prozessierten Lektins
PslP-A	Isoform A des prozessierten Lektins
PslP-B	Isoform B des prozessierten Lektins
PslS	rekombinant gewonnene, unprozessierte <i>Single-chain</i> -Variante des Erbsenlektins
rpm	<i>revolutions</i> (Umdrehungen) <i>per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

UV Ultraviolett(-es Licht)
WBA *winged bean agglutinin* mit den Varianten I und II, tetrameres Lektin aus *Psophocarpus tetragonolobus*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Leguminosenlektine: Modelle für die Strukturbiologie	1
1.1.1 Die Struktur der Leguminosenlektine und ihre Rolle für die Saccharidbindung	1
1.1.1.1 Das Monomer der Leguminosenlektine	1
1.1.1.2 Gleiche Untereinheit – variable Quartärstruktur	3
1.1.1.3 Multivalenz: Bindung an mehrere Untereinheiten	5
1.1.2 Das Lektin aus <i>Pisum sativum</i>	6
1.1.2.1 Synthese und Prozessierung	6
1.1.2.2 Zuckerbindung und Funktion	7
1.1.2.3 Die dreidimensionale Struktur von Erbsenlektin	8
1.1.2.4 Rekombinantes Erbsenlektin	10
1.2 Proteinfaltung	11
1.2.1 Grundlagen	11
1.2.2 Stabilitäts- und Faltungsuntersuchungen an Leguminosenlektinen	15
1.2.3 Faltung und und Reassoziaton von Proteinfragmenten	16
1.3 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien und Geräte	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer und Medien	20
2.1.3 Biologisches Material, Organismen und Plasmide	20
2.1.4 Chromatographiemedien und Fertigsäulen	21
2.1.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien	21
2.1.6 Geräte	22
2.2 Proteinchemische und -analytische Methoden	23
2.2.1 Reinigung von Lektin aus der Erbse	23
2.2.1.1 Zellaufschluss, Extraktion und Säureschritt	23
2.2.1.2 Ammoniumsulfatfällung	23
2.2.1.3 Affinitätschromatographie	24
2.2.1.4 Ionenaustauschchromatographie	24
2.2.1.5 Konzentration und Aufbewahrung	24
2.2.2 Gewinnung isolierter α - und β -Ketten	24
2.2.3 Produktion und Reinigung von rekombinantem Lektin	25

2.2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	25
2.2.3.2	Anzucht, Induktion und Zellaufschluss	25
2.2.3.3	Reinigung aus <i>inclusion-bodies</i>	25
2.2.3.4	Konzentration und Aufbewahrung	25
2.2.3.5	Reinigung der Bindungsmutante PslS N125D	26
2.2.4	Analytische Gelfiltrationschromatographie	26
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Proteinfärbung	26
2.2.6	Konzentrationsbestimmung	27
2.2.6.1	Proteine	27
2.2.6.2	Denaturierungsmittel	27
2.3	Präparation von modifizierten Liganden	28
2.3.1	Synthese der gelabelten Zucker	28
2.3.2	Reinigung der gelabelten Zucker	28
2.4	Protein-Liganden-Bindung	29
2.4.1	Titrationen mit Detektion der Proteinfluoreszenz	29
2.4.2	Titrationen mit Detektion der Labelfluoreszenz	29
2.4.2.1	Konzentrationsbestimmung von Fluoreszenzfarbstoffen	29
2.4.2.2	Screening	29
2.4.2.3	Fluoreszenztitration	29
2.4.3	Affinitätschromatographie	30
2.4.3.1	Batchverfahren	30
2.4.3.2	Säulenchromatographie	30
2.4.4	Bindungsmessung durch Ultrafiltration	30
2.4.5	Isotherme Titrationskalorimetrie	31
2.4.6	Wechselwirkung von Erbsenlektin mit Erythrozyten	31
2.4.6.1	Hämagglutinationsassay	31
2.4.6.2	Hämagglutinationsexperimente mit photometrischer Auswertung	32
2.4.6.3	Hämolyseaktivität von Erbsenlektin	32
2.5	Charakterisierung von Proteinen mit Fluoreszenzspektroskopie	33
2.5.1	Spektren	33
2.5.2	Denaturierungskinetiken in Guanidiniumchlorid und Guanidiniumthiocyanat	33
2.5.3	Denaturierungskinetiken in Harnstoff	33
2.5.4	Renaturierungskinetiken	34
2.6	Circulardichroismus-Spektroskopie	34
2.6.1	Spektren	34
2.6.2	Denaturierungskinetiken	35
2.7	Methoden zur Renaturierung von Erbsenlektin	35
2.7.1	Denaturierungsansätze	35
2.7.2	Denaturierungsübergänge mit Fluoreszenzdetektion	35
2.7.3	Messung von Renaturierungskinetiken und Ausbeuten	36
2.7.4	Hämagglutinationsassay zur Bestimmung von Renaturierungsausbeuten	36
2.7.5	Quantifizierung nativen Proteins durch Doppelsprungexperimente	37

2.7.6	Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Assoziationskinetik	37
2.8	Datenanalyse	38
2.8.1	Polarisation und Anisotropie	38
2.8.2	Bindungstitrationen	39
2.8.3	Integration von Chromatogrammen	39
2.8.4	Nichtlineare Regression von Messdaten	40
3	Ergebnisse	43
3.1	Reinigung und Charakterisierung verschiedener Lektinvarianten	43
3.1.1	Reinigung von prozessiertem Lektin aus Erbsensamen	43
3.1.2	Reinigung von rekombinant erzeugtem Lektin	44
3.1.3	Charakterisierung der Erbsenlektin-Varianten	45
3.2	Faltungsuntersuchungen	46
3.2.1	Stabilität und Renaturierungsausbeuten	47
3.2.1.1	pH-Wert und Ionenstärke, Pufferwahl	47
3.2.1.2	Übergänge in Guanidiniumchlorid	48
3.2.2	Renaturierung von rekombinantem Lektin	52
3.2.2.1	Doppelsprungexperimente	53
3.2.2.2	Fluoreszenz-Renaturierungskinetiken	54
3.2.2.3	Gelfiltrationsexperimente	59
3.2.3	Gewinnung und Charakterisierung der isolierten α - und β -Ketten	60
3.2.4	Renaturierung von prozessiertem Lektin	62
3.2.4.1	Fluoreszenzkinetiken	62
3.2.4.2	Hämagglutinationsassay und Doppelsprungexperimente	64
3.2.4.3	Gelfiltration und Quervernetzung	71
3.2.5	Denaturierungskinetiken von prozessiertem und rekombinantem Lektin	78
3.2.5.1	Denaturierungskinetiken in Guanidiniumchlorid bei pH 6.8	78
3.2.5.2	Denaturierungskinetiken mit anderen Denaturierungsmitteln	82
3.3	Untersuchungen zur Stabilität und Dynamik des Lektin-Dimers	84
3.3.1	Folgerungen aus den Denaturierungskinetiken	84
3.3.2	Untersuchungen zum Untereinheitenaustausch	85
3.4	Versuche zur Entwicklung eines Funktionstests	87
3.4.1	Bindung an nichtfluoreszierende lösliche Saccharidliganden	88
3.4.1.1	Glucose	89
3.4.1.2	Andere und substituierte Saccharidliganden	89
3.4.2	Präparation und Reinigung fluoreszenzmarkierter Liganden	90
3.4.2.1	Modifikationsstrategie und Reaktionstyp	90
3.4.2.2	Markierung und Reinigung	91
3.4.3	Bindungsuntersuchungen mit modifizierten Liganden	93
3.4.3.1	Screening	93
3.4.3.2	Bindungstitrationen	94
3.4.3.3	Bindungsmessung durch Ultrafiltration	96
3.4.3.4	Titrationsskalorimetrie	97

Inhaltsverzeichnis

3.4.4	Affinitätschromatographie	98
3.4.5	Wechselwirkung von Erbsenlektin mit Erythrozyten	100
3.4.5.1	Agglutination	100
3.4.5.2	Hämolyse	102
4	Diskussion	103
4.1	Charakterisierung der Isoformen	103
4.2	Quartärstruktur und Stabilität	103
4.3	Stabilitätsuntersuchungen an Psl	106
4.4	Methoden zur Untersuchung der Faltung von Psl	106
4.5	Faltungskinetik von PslS	107
4.6	Die Faltung von PslP	109
4.6.1	Kinetik der Bildung von nativem PslP	109
4.6.2	Intermediate vor der ($\alpha\beta$)-Assoziation	110
4.6.3	Minimalmodelle für die Faltung von PslP	111
4.6.4	Mechanismus der α - β -Assoziation	113
4.7	Ausblick	114
	Literaturverzeichnis	117

Abbildungsverzeichnis

1.1	Struktur des Leguminosenlektin-Monomers am Beispiel von Psl	2
1.2	Unterschiedliche Quartärstruktur bei Leguminosenlektinen	3
1.3	Prozessierung von Erbsenlektin	6
1.4	Kristallstruktur von Psl	9
1.5	Die vorgeschlagene strukturelle Minimalregion bei prozessiertem Erbsenlektin	10
3.1	CD-Spektren von PslP-A, PslP-B und PslS	46
3.2	Renaturierungsausbeuten von PslS bei unterschiedlichem pH-Wert und Ionenstärke	48
3.3	GdmCl-induzierte De- und Renaturierungsübergänge von PslS nach verschiedenen Zeiten	49
3.4	pH-abhängige Übergänge von PslS	50
3.5	GdmCl-induzierte Übergänge von PslP und PslS	51
3.6	Übergänge von PslP bei verschiedenen Proteinkonzentrationen	52
3.7	Doppelsprungexperimente zur Messung der Renaturierung von PslS	53
3.8	Renaturierungskinetiken von PslS	54
3.9	Geschwindigkeit und Fluoreszenzamplitude der Renaturierung von PslS	56
3.10	Abhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit vom pH-Wert und der Proteinkonzentration	58
3.11	Gelfiltration mit renaturierendem PslS	60
3.12	Gelfiltrationslauf zur Trennung der Polypeptidketten von PslP-B	61
3.13	Fluoreszenzspektren von PslP und den einzelnen Polypeptidketten bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen	61
3.14	Fluoreszenz-Renaturierungskinetik von PslP	63
3.15	Einfluss des Rührens auf die Renaturierung von PslP	64
3.16	Renaturierungskinetik von PslP im Hämagglutinationstest und mit Doppelsprungexperimenten	66
3.17	Renaturierungsausbeuten von PslP nach separater Renaturierung der Ketten	66
3.18	Renaturierungskinetiken von PslP, gemessen mit Doppelsprungexperimenten	68
3.19	Renaturierungskinetiken von PslP bei verschiedenen Konzentrationen von PslP- α und PslP- β	70
3.20	Gelfiltrationsprofile von α - und β -Kette	71
3.21	Quervernetzung von PslP- β unter Nativbedingungen	73
3.22	Gelfiltrationsprofile der Renaturierung von PslP	74

Abbildungsverzeichnis

3.23 Renaturierung von PslP-B, beobachtet mit Gelfiltration	75
3.24 Renaturierung von PslP mit α - oder β -Überschuss	76
3.25 Fluoreszenz-Denaturierungskinetik von PslP-B in 3.5 M GdmCl	78
3.26 Vergleich von Daten und Regression für die Denaturierung von PslP-B in 4 M GdmCl	79
3.27 Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierungskinetik	80
3.28 Denaturierungskinetik von PslP in Fluoreszenz und Circular dichroismus	82
3.29 Denaturierungskinetiken mit verschiedenen Denaturierungsmitteln . . .	82
3.30 Denaturierung von PslP in 6.75 M Harnstoff, pH 1.8	83
3.31 Kinetik des Untereinheiten austauschs	85
3.32 Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Dimeren	86
3.33 Bindungstitration von PslP mit Glucose	89
3.34 Zuckerbindungsstelle von Psl	90
3.35 Reaktionsschema der reduktiven Aminierung.	91
3.36 Reinigung der gelabelten Maltose	93
3.37 Ergebnisse des Bindungsscreens mit gelabelter Maltose	95
3.38 Bindungstitration mit ausgewählten Liganden	96
3.39 Centrifree-Bindungsexperiment mit Malt-AspAMC	97
3.40 Bindung von Malt-AspAMC an Psl mittels Titrationskalorimetrie	98
3.41 Affinitätschromatographie mit Superdex 200	100
3.42 Photometrische Quantifizierung der Hämagglutination	101

1 Einleitung

1.1 Leguminosenlektine: Modelle für die Strukturbiologie

Lektine sind Proteine, die spezifisch Saccharide binden, aber keine enzymatische Aktivität besitzen und meistens Zellen agglutinieren oder komplexe Kohlenhydrate präzipitieren können (Goldstein *et al.*, 1980; Kocourek & Horejsi, 1981). Sie nehmen an einer Vielzahl von biologischen Prozessen teil, so bei Zell-Zell- und Zell-Pathogen-Interaktionen, Protein-Targeting innerhalb der Zelle, Regulierung des Serum-Glycoprotein-Umsatzes und der Gewebeentwicklung. Zuckerbindende Immunoglobuline werden nicht zu den Lektinen gezählt, aber einige Lektine spielen eine Rolle in der angeborenen Immunantwort mancher Organismen (Vijayan & Chandra, 1999; Weis & Drickamer, 1996; Rini, 1995). Vertreter dieser Klasse gibt es in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen (Liener *et al.*, 1986; Lis & Sharon, 1986; Sharon & Lis, 1989). Eine große Untergruppe stellt die Familie der Leguminosenlektine mit bereits 1998 über 50 publizierten Sequenzen (Loris *et al.*, 1998) dar. Sie haben untereinander paarweise Sequenzhomologie von mindestens 35 %, und von vielen ist bereits eine Kristallstruktur bekannt. Auch die Struktur ihrer Monomere ist hoch konserviert, während die Art der Assoziation zu Di- und Tetrameren eine große Vielfalt zeigt. Neben der allgemeinen Strukturdatenbank PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) gibt es eine auf Lektinstrukturen spezialisierte Datenbank mit einer Unterkategorie für Leguminosenlektine, auf die unter <http://www.cermav.cnrs.fr/lectines/> zugegriffen werden kann.

Aufgrund ihrer Eigenschaft, mit Zellen und komplexen Kohlenhydraten zu interagieren, werden Lektine für eine Vielzahl von technischen und analytischen Anwendungen verwendet, etwa zur Klassifizierung von Zellen und zur Reinigung von Sacchariden (Lis & Sharon, 1986).

1.1.1 Die Struktur der Leguminosenlektine und ihre Rolle für die Saccharidbindung

1.1.1.1 Das Monomer der Leguminosenlektine

Die Monomerstruktur aller Leguminosenlektine, von denen bisher eine Struktur bekannt wurde, ist hoch konserviert. Sie wurde zuerst in Concanavalin A (ConA) gefunden (Hardman & Ainsworth, 1972) und kann als *jelly-roll*-Motiv beschrieben werden (Vijayan & Chandra, 1999; Loris *et al.*, 1998). Dieses besteht aus einem flachen sechsträngigen β -Faltblatt, dem sogenannten *back sheet*, einem konkav gekrümmten siebensträngigen β -Faltblatt, dem sogenannten *front sheet*, sowie dem *top sheet* mit fünf kurzen Faltblattsträngen (siehe Abbildung 1.1 auf der nächsten Seite). Alle Faltblätter sind rein antiparallel. Die Stränge sind durch Loops verbunden, die vor allem auf der Seite des konkaven *front sheet* länger sind. Dadurch bildet sich ein zweiter hydrophober Core zwischen dem *front sheet* und den Loops, neben dem zentralen Core zwischen *back* und

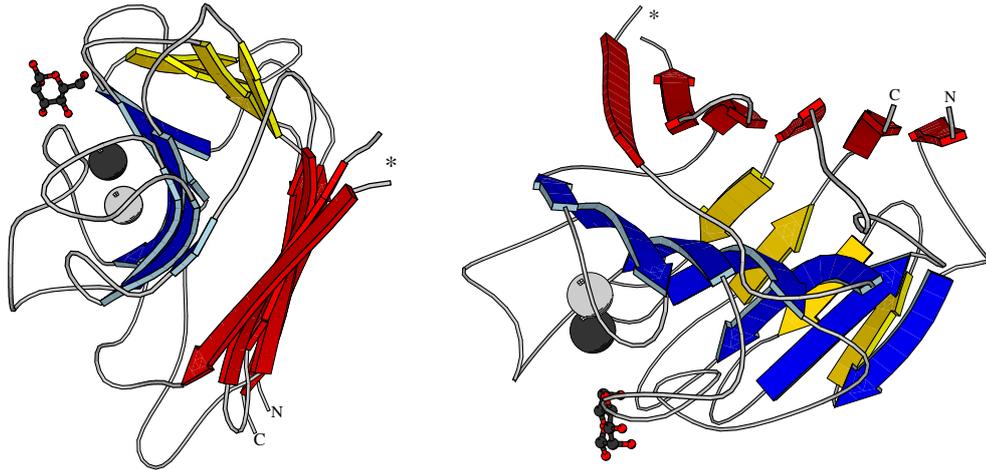


Abbildung 1.1: Struktur des Leguminosellectin-Monomers am Beispiel von Psl (1bqp.pdb). Das *front sheet* ist blau, das *back sheet* rot und das *top sheet* gelb dargestellt. Das Calciumion ist durch eine dunkelgraue, das Manganion durch eine hellgraue Kugel und eine gebundene Mannose als Kugel-Stäbchen-Modell dargestellt. Die ursprünglichen Termini in Psl und den unprozessierten Leguminosellectinen sind durch N bzw. C gekennzeichnet, die Prozessierungsstelle in Psl durch einen Stern. Die Untereinheitenkontaktfläche befindet sich im linken Bild vom Betrachter abgewandt, im rechten Bild auf der rechten Seite. Die Abbildung wurde mit Molscript (Kraulis, 1991) erzeugt.

front sheet. Auf der Seite des *front sheet* befinden sich die Bindestelle für den Zucker und für zwei Ionen, ein konserviertes Calcium und ein Übergangsmetallion (Loris *et al.*, 1998; Weis & Drickamer, 1996; Sharma & Surolia, 1997). An der Zuckerbindung nehmen dabei Aminosäuren aus vier Loops teil, von denen einige über Wasserbrücken durch die Metalle stabilisiert und fixiert werden. In einem dieser Loops befindet sich eine X-Pro-cis-Peptidbindung, die ebenfalls durch die Metalle stabilisiert wird (Loris *et al.*, 1998). Insgesamt ergibt sich eine für Lektine typische flache Bindungsgrube, im Gegensatz zu tiefen Taschen, wie sie bei Enzymen häufig sind.

Die Affinität gegenüber Monosacchariden ist aber für alle Vertreter gering (K_D um 1 mM), erst gegenüber Oligosacchariden ergeben sich Affinitäten im mikromolaren Bereich (Rini, 1995). Dabei wird ein Monosaccharid in der beschriebenen Bindungsstelle, der *primary site*, gebunden, während andere Teile des Zuckers an *secondary sites* auf der Proteinoberfläche binden. Da alle Leguminosellectine in Lösung mindestens als Dimere vorliegen, können sie an große Oligosaccharide oder an Zellen, die mehrere Kopien des Bindungspartners tragen, mehrfach binden und dabei nanomolare Dissoziationskonstanten erreichen (Rini, 1995).

Der selbe Strukturtyp wird auch in 14 weiteren Proteinfamilien beobachtet. Chandra *et al.* (2001) haben Proteine aus allen Familien analysiert, um strukturelle Kerneigenschaften oder minimale Strukturprinzipien herauszuarbeiten. Obwohl die paarweise Sequenzidentität dieser Proteine z. T. sehr klein ist (bis hinunter zu 2 %), ist die Übereinstimmung der Strukturen klar erkennbar. Allerdings haben die Faltblätter eine teilweise sehr unterschiedliche Größe und Stranganzahl. Die Konnektivität der Kern-Faltblattstränge, die in allen Strukturen beobachtet werden, und die Topologie der Struktur ist jedoch einheitlich, während die Länge der verbindenden Loops schwankt. Die Autoren

identifizieren so eine minimale Region, die den Strukturtyp bestimme, und beschreiben, wie diese als Gerüst des Proteins wirkt. Ein Vergleich dieser Minimalregion mit der Struktur und dem Prozessierungsmuster von Psl ist in Abbildung 1.5 auf Seite 10 zu sehen.

1.1.1.2 Gleiche Untereinheit – variable Quartärstruktur

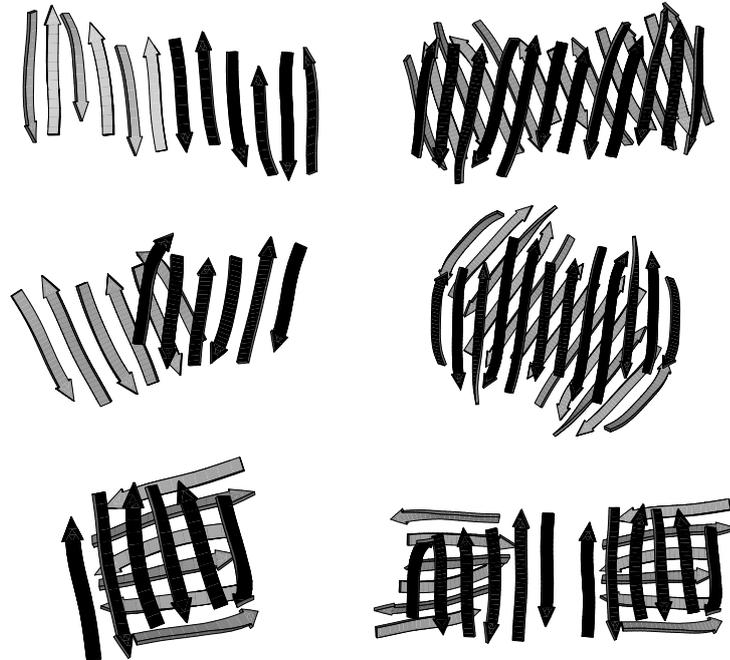


Abbildung 1.2: Untereinheitenassoziation einiger Leguminosenlektine. Dargestellt ist die relative Anordnung des *back sheet*. In der linken Spalte sind die Dimere von Psl (oben, kanonisches Dimer), WBA I (Mitte) und PNA (unten) zu sehen, in der rechten Spalte Tetramere aus kanonischen Dimeren von PHAL (oben) und ConA (Mitte) und aus den Dimeren von PNA (unten). Die Untereinheiten mit den schwarzen Faltblättern assoziieren im PNA-Tetramer ähnlich wie das kanonische Dimer, der größere Abstand macht jedoch deutlich, dass kein durchgehendes Faltblatt entsteht. Die Sicht auf die schwarzen Faltblätter ist jeweils vom *front sheet* her, auf die grauen vom Lösungsmittel her, außer in Psl, wo beide vom Lösungsmittel aus gesehen werden. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Manoj & Suguna (2001) mit Molscrip (Kraulis, 1991) erzeugt.

Aus der einheitlichen Monomerstruktur werden in den unterschiedlichen Vertretern der Gruppe vielfältige Oligomere gebildet. Im häufigsten Fall bildet sich ein sogenanntes „kanonisches Dimer“, bei dem die beiden Untereinheiten so assoziieren, dass sich aus den sechsträngigen ein durchgängiges 12-strängiges Faltblatt bildet (Abbildung 1.2 links oben). Das entstehende langgestreckte Dimer kann nun weiter zu einem Tetramer assoziieren, indem sich die Dimere entlang ihrer Längsachse (so in Soya-Agglutinin SBA und dem Lektin aus der Bohne *Phaseolus vulgaris*, PHAL, Abbildung 1.2 rechts oben) oder über Kreuz (z. B. in ConA, rechts Mitte) mit ihren *back sheets* aneinander legen.

Daneben existieren aber auch andere Dimerstrukturen, bei denen die Monomere mit den flachen Seiten der *back sheets* unterschiedlich starke Kontakte ausbilden. Beispiele sind ECorL aus *Erythrina corallodendron* und WBA I und II (*winged bean agglutinin*,

1 Einleitung

links Mitte) oder in anderer Weise GS4 aus *Griffonia simplicifolia*. Auch diese Dimere können zu Tetrameren assoziieren, etwa bei PHAL und SBA. Die Dimere von PNA (links unten) assoziieren zu einem Tetramer mit ungewöhnlicher Quartärstruktur ohne zweizählige Symmetrieachsen, wobei sich zwei Untereinheiten ähnlich wie im kanonischen Dimer zusammenlagern, ohne jedoch die Wasserstoffbrücken des durchgängigen 12-strängigen *back sheet* auszubilden. Eine ausführliche Diskussion der verschiedenen Assoziationsmodi sind in den Reviews Vijayan & Chandra (1999), Loris *et al.* (1998) und Manoj & Suguna (2001) zu finden.

Wegen der großen Variabilität ihrer Quartärstrukturen bei gleichzeitig hoher Homologie der Sequenzen und Tertiärstrukturen sind Leguminosenlektine interessante Modellproteine zur Untersuchung der Untereinheitenassoziation; Srinivas *et al.* (2001) bezeichnen sie als „natürliche Mutanten des Quartärzustands“. In der Literatur wurden unterschiedliche Erklärungsansätze für die unterschiedliche Assoziationsmodi vorgeschlagen. So wurde die sterische Hinderung durch Glycosylierung von ECorL als Ursache für seine nicht-kanonische Dimerassoziation angeführt. Allerdings ist GS4 an der Untereinheitenkontaktfläche für kanonische Dimerisierung nicht glycosyliert und assoziiert trotzdem nicht in kanonischer Art und Weise, sondern in einer dritten Form (vgl. Loris *et al.*, 1998). In ähnlicher Weise versuchen Srinivas *et al.* (2001) den Assoziationsstyp von ECorL, WBA I und WBA II mit einem einzelnen geladenen Aminosäurerest zu erklären, ohne jedoch eine detaillierte Begründung oder experimentelle Daten zu liefern.

Einen anderen Ansatz verfolgen die Arbeiten von Prabu *et al.* (1999) und Elgavish & Shaanan (2001). Dort wurden in einer Simulation aus den Untereinheiten verschiedener Leguminosenlektine Dimere mit der Quartärstruktur der jeweils anderen Typen gebildet und nach einer Energieminimierung verschiedene Parameter der artifiziellen Kontaktflächen mit den natürlichen verglichen. Untersucht wurde die Verteilung von polaren und hydrophoben Aminosäuren oder Atomen, die berechnete Solvatations- und Interaktionsenergie und die *shape complementarity* (Lawrence & Colman, 1993). Die erhaltenen Daten waren zwar in sich konsistent und mit der jeweiligen nativen Quartärstruktur korreliert, die Unterschiede sind aber nicht groß oder eindeutig genug, um eine Vorhersage der Quartärstruktur zu erlauben (Elgavish & Shaanan, 2001).

Wesentlich weiterführende Ergebnisse ergab eine Studie, die auf einer Sequenzanalyse von Leguminosenlektinen mit bekannter 3D-Struktur basiert (Manoj & Suguna, 2001). Aufgrund multipler Sequenzalignments wird ein Baumdiagramm der relativen Ähnlichkeit der Sequenzen aufgestellt. Darin besitzen die sich ergebenden Untergruppen nicht nur eine gemeinsame Quartärstruktur, sondern sie ähneln sich auch in ihrer Zuckerspezifität. In der Tat kann das Diagramm auch aus einem Alignment reproduziert werden, das sich auf die Zuckerbindungsloops beschränkt. Dies ist interessant, bedeutet es doch, dass die Untereinheitenassoziation und die Bindungsspezifität für Monosaccharide korreliert sind, obwohl daran unterschiedliche Regionen der Struktur beteiligt sind. Auch ein Strukturalignment der Monomerstrukturen liefert ein ähnliches Bild, aus dem man einen phylogenetischen Baum konstruieren kann. Aufgrund der Korrelation der Sequenzalignments mit der Quartärstruktur konnte nun erstmals die Rolle einzelner Aminosäuren für die Oligomerbildung schlüssig analysiert werden. Schließlich wagen die Autoren auf Grundlage der Sequenzalignments eine Vorhersage der Quartärstruktur, also des Typs der Dimerassoziation, für drei Lektine, von denen bisher keine Kristallstruktur vorliegt

Aufgrund der wachsenden Anzahl an Kristallstrukturen und publizierten Aminosäuresequenzen beginnt sich also langsam ein schlüssiges Bild der Faktoren abzuzeichnen, die die vielfältigen Quartärstrukturen in Leguminosenlektinen bedingen. Kristallstrukturen bieten jedoch immer ein statisches Bild. In Lösung dagegen können oligomere Proteine im Gleichgewicht mit niedrigeren Oligomeren oder Monomeren vorliegen. Für viele oligomere Proteine trägt die Interaktion zwischen den Untereinheiten den Großteil der freien Stabilisierungsenergie bei, so dass die isolierten Monomere nicht stabil sind, und die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation können sehr klein sein (für eine Übersicht siehe Seckler, 2000). Tetramere Leguminosenlektine jedoch sind häufig aus Dimeren zusammengesetzt, die es in anderen Arten auch als native Quartärstruktur gibt. Daher könnten hier die Dimere oder sogar die Monomere in Lösung stabil sein. In der Tat ist ConA nur oberhalb von pH 7.0 vollständig tetramer, darunter beginnt es zu dissoziieren und liegt unterhalb von pH 5 als kanonisches Dimer vor (McCubbin & Kay, 1971). Vom tetrameren Lektin aus der Erdnuss (PNA) ist beschrieben worden, dass es unter mäßig denaturierenden Bedingungen als strukturiertes, zuckerbindendes Monomer vorliegt (Reddy *et al.*, 1999b), auch wenn Zweifel an den Ergebnissen dieser Studie angebracht sind (siehe Abschnitt 1.2.2 auf Seite 15). Ebenso deuten kalorimetrische Untersuchungen der thermischen Denaturierung (Reddy *et al.*, 1999a) von PNA darauf hin, dass einige Leguminosenlektine bei der thermischen Denaturierung zunächst in strukturierte Monomere dissoziieren.

1.1.1.3 Multivalenz: Bindung an mehrere Untereinheiten

Lektine erreichen ihre hohe Affinität gegenüber komplexen, großen Oligosacchariden dadurch, dass sich die Kombination aus primärer Zuckerbindungsstelle und *secondary sites* in jeder Untereinheit wiederholt. Darüber hinaus ermöglicht diese Multivalenz erst die Phänomene, die von Beginn an mit Lektinen assoziiert wurden (Goldstein *et al.*, 1980; Kocourek & Horejsi, 1981): Die Bildung von ausgedehnten Gittern aus Lektinen und damit vernetzten Kohlenhydraten oder kohlenhydrattragenden Zellen. Die Quartärstruktur, das heißt die Zahl und relative Anordnung der Zuckerbindungsstellen, bildet dabei die Basis für die Spezifität gegenüber komplexen Oligosacchariden (Elgavish & Shaanan, 1997). Exakte strukturelle oder thermodynamische Daten sind darüber jedoch schwierig zu erhalten, da sich nicht definierte binäre oder ternäre Komplexe bilden, sondern ausgedehnte zwei- oder dreiminensionale Gitter. In einigen Fällen jedoch sind die entstehenden Präzipitate kristallin und führen zum Teil sogar zu makroskopischen Kristallen (Mandal & Brewer, 1992). So konnte die Struktur von Soya-Agglutinin mit dem Blutgruppe-I-Antigen $\text{Gal}\beta 1\text{—}4\text{—GlcNAc}\beta\text{—}[\text{Gal}\beta 1\text{—}4\text{—GlcNAc}\beta]\text{—Gal}\beta\text{—O}(\text{CH}_2)_5\text{COOCH}_3$ (Dessen *et al.*, 1995) und einigen anderen multivalenten Liganden (Olsen *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 1994) gelöst werden. Sie zeigt, dass sowohl die Symmetrieeigenschaften des Zuckers als auch des Proteins für die Ausbildung des Gitters entscheidend sind. Mittlerweile sind Komplexstrukturen von Soya-Agglutinin mit weiteren mehrwertigen Liganden verfügbar (Olsen *et al.*, 1997). Ansätze zu einer Erforschung der strukturellen Anforderungen an die Saccharide ergaben sich durch gezielte Synthese von di-, tri- und tetravalenten Liganden (Roy *et al.*, 1998).

Der Multivalenzeffekt ist auch die Grundlage des Hämagglutinationsassays, des gängigen Funktionstests für Erbsenlektin und viele andere Leguminosenlektine. Dazu werden

1 Einleitung

die Proteine in Mikrotiterplatten mit Erythrozyten inkubiert und binden an Oberflächensaccharide der Zellen. Wenn die Proteinkonzentration ausreichend ist, bildet sich ein zweidimensionales Gitter über den Querschnitt der Vertiefung aus, so dass die Zellen nicht absinken. In einem alternativen Test wird in analoger Weise die Trübung einer Lösung von Mannan bei der Zugabe von Lektinlösung beobachtet. Mannan ist ein Polysaccharid aus β -1—4-verknüpften Mannosebausteinen.

1.1.2 Das Lektin aus *Pisum sativum*

1.1.2.1 Synthese und Prozessierung

Das Lektin aus *Pisum sativum* (Psl) ist bereits in den siebziger Jahren isoliert und biochemisch charakterisiert worden (Trowbridge, 1973; Entlicher *et al.*, 1970). Eine Untereinheit der Isoform B (siehe unten) des reifen Lektins hat eine Molekularmasse von 25604 Da und enthält neun Tryptophane, fünf Tyrosine und keine Cysteine. Seine Kennung in der SWISS-PROT-Datenbank (<http://www.expasy.ch/>) lautet LEC_PEA. Das Protein wird in Wurzeln und Samen (Higgins *et al.*, 1983a; Buffard *et al.*, 1988) exprimiert und anschließend prozessiert. Die Prozessierung ist für die im Samen exprimierten Formen untersucht worden (Higgins *et al.*, 1983b). Das Protein wird als Prä-Pro-Lektin am rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) synthetisiert und ins Lumen des ER transloziert. Die *leader*-Sequenz wird cotranslational entfernt und das Pro-Protein in die Vakuole transportiert. Die Vakuole wird mit Speicherproteinen gefüllt und teilt sich in viele *protein bodies* auf.

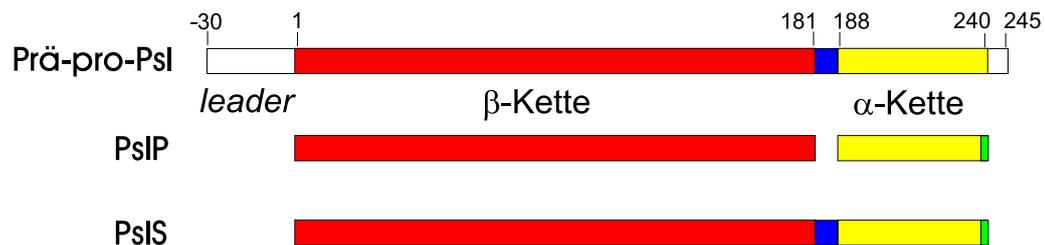


Abbildung 1.3: Prozessierung von Erbsenlektin. Schematische Darstellung des Prä-Pro-Lektins (oben) und der prozessierten Form (mitte) mit der β -Kette (rot) und der α -Kette (gelb). Die unterschiedlichen Isoformen sind durch den grünen Balken symbolisiert. Unten ist die Sequenz des in *E. coli* exprimierten Konstrukts gezeigt, die mit der längeren Isoform B übereinstimmt.

Während dieser Entwicklung werden am gefalteten Lektin zum einen die Aminosäuren 182 bis 187 herausgeschnitten (Sequenz Ser-Leu-Glu-Glu-Glu-Asn), so dass das native Protein aus zwei Polypeptidketten in einer einzigen strukturellen Domäne besteht. Die *N*-terminale, längere Kette von Aminosäure 1 bis 181 wird als β -Kette, die *C*-terminale, kürzere als α -Kette bezeichnet. Rini *et al.* (1987) berichten, dass die β -Kette noch *C*-terminal um die Aminosäuren Pro 180 und Asn 181 verkürzt wird und mit Tyr 179 endet; in der Kristallstruktur findet sich jedoch Elektronendichte für diese beiden Aminosäuren (vgl. die PDB-Einträge 2ltu (Prasthofer *et al.*, 1989), 2bqp (Pletnev *et al.*, 1997), 1rin (Rini *et al.*, 1993)), und neuere Untersuchungen ergaben eine einheitliche β -Kette bis Asn 181 (Hoedemaeker *et al.*, 1994). Außerdem wird der *C*-Terminus um einige Aminosäuren gekürzt, und zwar im Isolektin B soweit, dass Gln 241 oder (zu kleinerem Anteil) Lys 240 die letzte Aminosäure ist. Das Isolektin A endet mit einem der

Serine 239, 238 oder 237 oder mit Thr 236 (Hoedemaeker *et al.*, 1994). Durch die An- oder Abwesenheit von Lys 240 haben die beiden Fraktionen einen unterschiedlichen isoelektrischen Punkt und können durch Elektrophorese, Ionenaustauschchromatographie oder Chromatofokussierung getrennt werden. In der Wurzel wurde durch Sequenzierung ausschließlich die Isoform B identifiziert (Hoedemaeker *et al.*, 1994).

In dieser Arbeit wird für das fertig prozessierte Lektin, wie es aus reifen Samen gereinigt werden kann, die Abkürzung PslP verwendet. Die Isoformen werden mit PslP-A bzw. PslP-B abgekürzt, und die C-terminale α -Kette wird mit PslP- α oder, wenn auf die unterschiedlichen Isoformen hingewiesen werden soll, mit PslP-A- α bzw. PslP-B- α bezeichnet, die β -Kette mit PslP- β . Die Zählung der Aminosäuren erfolgt entweder wie im Pro-Lektin (oder der rekombinanten Variante, s.u.) durchgehend von 1 bis 241 oder wie in den PDB-Dateien für die α -Kette separat – der erste Aminosäurerest der α -Kette ist Val 188 im Prolektin.

In der Literatur wurde in Samen ein höherer Anteil der Isoform B gefunden (Trowbridge, 1974; Rini *et al.*, 1987), allerdings hängt das auch damit zusammen, dass PslP-A mit geringerer Ausbeute von der zur Trennung verwendeten Anionenaustauscher- oder Chromatofokussierungs-Säule eluiert als PslP-B (Rini *et al.*, 1987). Die beiden Isoformen unterscheiden sich nicht in ihren spektroskopischen Eigenschaften und ihrer Affinität gegenüber Zuckern (Bhattacharyya *et al.*, 1985).

Neben dem in dieser Arbeit untersuchten Lektin wurden in *Pisum sativum* noch zwei weitere Lektine gefunden, eines in den Knospen und Triebspitzen (SWISS-PROT LECN_PEA, Pak *et al.* (1992)) und eines in den Wurzelknöllchen (SWISS-PROT Q40987, Kardailsky *et al.* (1996)). Eine ähnliche Prozessierung wie beim Erbsenlektin wird auch bei den Lektinen aus der Linse (*lens culinaris*) und der Gattung *vicia* beobachtet (Young *et al.*, 1996).

1.1.2.2 Zuckerbindung und Funktion

Biophysikalische Charakterisierung der Bindung Die Bindungseigenschaften von Psl gegenüber Monosacchariden wurde durch Inhibitionsstudien der Trübungsreaktion von Mannan mit Psl (Van Wauwe *et al.*, 1975), Hämagglutinationstest und Gleichgewichtsdialyse (Trowbridge, 1974) untersucht, die thermodynamischen Parameter der Bindung wurden kalorimetrisch von Schwarz *et al.* (1996, 1993) untersucht. Psl ist ein für Mannose und Glucose spezifisches Lektin, die Methyl- α -pyranoside binden jeweils etwas fester als die unsubstituierten Monosaccharide. Substitutionen an den Positionen 2 und 4 haben nur geringen Einfluss, während hydrophobe Substituenten nicht nur an der 1-Position, sondern auch an C3 die Affinität erhöhen. Diese Daten sind im Einklang mit der Kristallstruktur von Psl mit Trimannose ($\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\alpha\text{-CH}_3$) (PDB 1rin, Rini *et al.* (1993)) und Mannose (1bqp, Pletnev *et al.* (1997)). In der Struktur mit dem Trisaccharid ist nur für ein Monosaccharid Elektronendichte zu erkennen (siehe auch Abbildung 3.34B auf Seite 90). Die anderen beiden tragen vermutlich wenig zur Bindung bei und sind nur dynamisch über verbrückende Wassermoleküle mit dem Protein verknüpft.

Die Affinität komplexer Glycopeptide aus IgG-Präparationen gegenüber Psl wurde in Kornfeld *et al.* (1981) durch die Bindung der Saccharide an Lektinsäulen untersucht. Darin kristallisierte sich die Struktur $\text{Man}\alpha 1-6[\text{Man}\alpha 1-3]\text{Man}\beta\text{-GlcNAc-}$

1 Einleitung

[Fuc]GlcNAc—Asn als Kern der fester bindenden Glycopeptide heraus; Bindungskonstanten liefert die verwendete Methode allerdings nicht. Auch lässt sie nicht unbedingt Schlüsse auf das physiologische Zielmolekül und die Rolle des Lektins in der Erbse zu, da die Experimente mit menschlichen IgG-Glycopeptiden durchgeführt wurden und die in der Erbse, in Symbionten oder Parasiten gefundenen Zielmoleküle eine andere Struktur haben können.

Funktion von Psl in den Wurzeln Der oder die physiologischen Bindungspartner von Erbsenlektin sind derzeit noch unbekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Psl eine Rolle für die Ausbildung der Wurzelknöllchen spielt, in denen die endosymbiontischen *Rhizobium*-Spezies bei Leguminosen leben. Normalerweise gehen die Rhizobien die Symbiose spezifisch nur mit einer Pflanzenart oder einer begrenzten Anzahl von Arten ein, so ist *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* spezifisch für Erbsen (*Pisum sativum*). Transformiert man jedoch weißen Klee mit dem Psl-Gen, so dass dieses in Wurzelzellen exprimiert wird, so wird der Klee von *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* infiziert (Diaz *et al.*, 1989). Ähnliche Effekte konnten auch in rotem Klee (Diaz *et al.*, 2000) und Alfalfa (van Rhijn *et al.*, 2001) gezeigt werden, und die Zuckerbindungsaktivität von Psl ist dafür notwendig (van Eijsden *et al.*, 1995). Allerdings zeigten die Experimente mit rotem Klee auch, dass die Infektion nicht zu voll ausgebildeten Wurzelknöllchen führt, es sind also noch weitere Faktoren für die Spezifität verantwortlich. Außerdem wird die Knöllchenbildung auch von Lipochitin-Oligosacchariden, die die Rhizobien sekretieren, induziert. Diese sind jedoch *O*-acetyliert und kommen daher nicht als direkte Bindungspartner für Psl in Frage. Offenbar interagiert das Lektin nicht direkt mit den Rhizobien, sondern reguliert den Zellstoffwechsel oder stimuliert die Aufnahme der Bakterien in die Zelle (Diaz *et al.*, 2000). Einen Übersichtsartikel über die Rolle von Lektinen bei der Ausbildung der Leguminosen-Rhizobien-Symbiose bietet Hirsch (1999).

Funktionen in Erbsensamen Die Rolle von Psl im Samen liegt noch mehr im Dunkeln als die in den Wurzeln. Wenzel *et al.* (1993) finden Psl in sich entwickelnden *protein bodies* der Pflanzensamen in räumlicher Nähe zum glycosylierten Speicherprotein Vicilin, mit dem Psl auch *in vitro* interagiert (Kummer & Rudiger, 1988). Daraus entwickeln sie die Hypothese, dass Psl, das zu diesem Zeitpunkt der Samenentwicklung noch hauptsächlich unprozessiert ist, Vicilin zur Vakuolenmembran dirigiert. Eine andere Funktion des Lektins in den Samen könnte der Schutz vor Pilzinfektionen (Broekaert *et al.*, 1989; Sharon & Lis, 1990) oder Fraßfeinden sein, indem sie mit Zelloberflächen fremder Organismen interagieren. In Hausschweinen, die rohe Hülsenfrüchte als Nahrung erhalten, binden Lektine an Darmepithelzellen und schädigen so das Verdauungssystem (Boulter *et al.*, 1990; Chrispeels & Raikhel, 1991).

1.1.2.3 Die dreidimensionale Struktur von Erbsenlektin

Die Struktur von Psl wurde zuerst von Meehan *et al.* (1982) bei einer Auflösung von nur 6 Å aufgeklärt und liegt mittlerweile bis zu einer Auflösung von 1.70 Å vor (PDB 2ltn). Das Psl-Monomer besitzt die typische Struktur der Leguminosenlektine mit zwei großen Faltblättern und einem kleinen. Durch die posttranslationale Prozessierung ergibt sich

jedoch eine strukturelle Untereinheit aus zwei miteinander verschränkten Polypeptidketten (siehe Abbildung 1.4). Die kürzere α -Kette beginnt mit einem Faltblattstrang am äußeren Ende des *back sheet* (links oben in der Abbildung) und führt in einem langen Loop an der Struktur entlang nach unten. Dort trägt sie einen Strang zum *front sheet* bei – den dritten von der Kontaktfläche der Untereinheiten her gezählt – und führt dann durch das kleine *top sheet* wieder nach oben zum *back sheet*, wo sie den zweiten Strang (von der Untereinheitenkontaktfläche her) beiträgt.

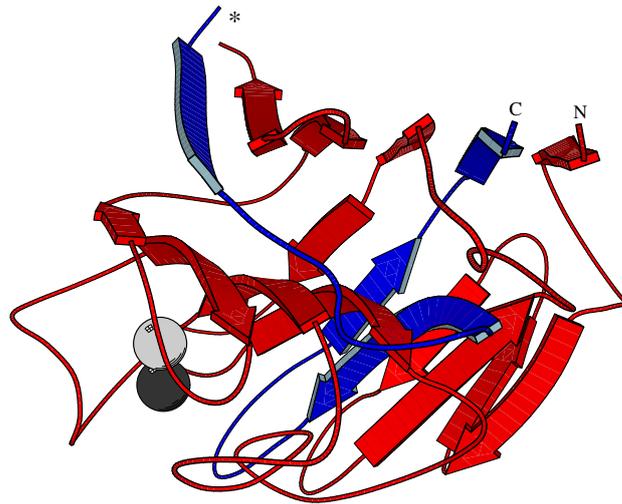


Abbildung 1.4: Cartoon der Kristallstruktur von Psl (1bqp.pdb). Die N-terminale β -Kette ist rot, die C-terminale α -Kette blau dargestellt, die Untereinheitenkontaktfläche ist auf der rechten Seite. Die natürlichen Termini sind mit N und C, die posttranslationale Schnittstelle mit einem Stern gekennzeichnet. Das Calcium und das Manganion sind durch eine dunkel- bzw. hellgraue Kugel dargestellt.

Wegen der komplexen Topologie führt die Prozessierung also dazu, dass die längere β -Kette keine eigenständige Domäne formt, sondern nur zusammen mit der α -Kette ihre native Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden kann. Allerdings besteht die in Chandra *et al.* (2001) beschriebene Minimalregion des Leguminosenlektin-Faltungstypus im wesentlichen aus der β -Kette (siehe Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite). Lediglich der äußerste Strang des *back sheet* wird von der α -Kette zur Minimalregion beigetragen.

In der Literatur zu Leguminosenlektinen, die ja zum großen Teil aus einer unprozessierten Polypeptidkette bestehen, wird die in Abbildung 1.4 abgebildete Struktur als das „Monomer“ bezeichnet. Daher wird auch in dieser Arbeit der Begriff so verwendet, obwohl dieses „Monomer“ in PslP aus zwei Polypeptidketten besteht. Damit bezeichnet der Begriff auch konsistent die selbe Struktur, wenn das prozessierte Lektin mit dem unprozessierten, rekombinanten verglichen wird. Die einzelnen Polypeptidketten innerhalb des Monomers werden mit α -Kette oder PslP- α bzw. β -Kette oder PslP- β bezeichnet.

Da auch das unprozessierte Erbsenlektin die gleichen Bindungseigenschaften wie das prozessierte Protein zeigt (Stubbs *et al.*, 1986; Prasthofer *et al.*, 1989) ist die Funktion der Prozessierung ungeklärt. In Dertinger (1996) wurde vorgeschlagen, dass die Funktion möglicherweise sein könnte, die Lebensdauer des Proteins zu begrenzen. Es wurde davon ausgegangen, dass das prozessierte Protein wegen der komplexen Topologie nie-

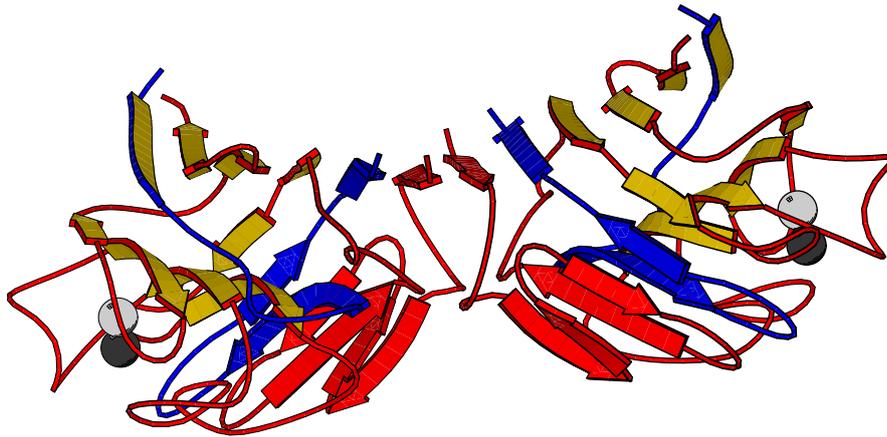


Abbildung 1.5: Die vorgeschlagene strukturelle Minimalregion bei prozessiertem Erbsenlektin. Die Faltblattstränge und Loops der α -Kette sind blau, die der β -Kette rot dargestellt. Im Bereich der von Chandra *et al.* (2001) vorgeschlagenen Minimalregion sind die Flächen der Faltblattstränge gelb gefärbt, die Kanten zeigen weiterhin die Kettenzuordnung an.

mals mehr die native Struktur einnehmen könne, wenn es einmal entfaltet sei, und daher degradiert würde. Allerdings ist auch für das verwandte ConA eine ähnliche proteolytische Prozessierung (an anderer Stelle in der Struktur) beschrieben worden, und die resultierenden Polypeptidketten werden bei ConA wieder an den ursprünglichen Termini miteinander verknüpft (Carrington *et al.*, 1985; Bowles *et al.*, 1986). Es entsteht ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zyklisch permutiert gegenüber der Sequenz der mRNA *mRNA mRNA* bzw. des primären Genprodukts. In diesem Fall müsste die Prozessierung eine andere, ebenfalls bisher unklare Funktion haben, die umgekehrt auch bei Psl eine Rolle spielen könnte. In diesem Zusammenhang ist die Frage interessant, ob das prozessierte Protein nach vollständiger Denaturierung wirklich nicht mehr zurück zur nativen Struktur falten kann.

1.1.2.4 Rekombinantes Erbsenlektin

Erbsenlektin wurde zuerst von Stubbs *et al.* (1986) rekombinant in *E. coli* exprimiert. Es wird dort nicht prozessiert und besitzt daher nur eine Polypeptidkette pro Untereinheit (Stubbs *et al.*, 1986; Prasthofer *et al.*, 1989; Hoedemaeker *et al.*, 1993; van Eijsden *et al.*, 1992). Prasthofer *et al.* (1989) berichten auch von erfolgreicher Kristallisation des Proteins und ersten Röntgenbeugungsanalysen, es ist aber nie eine Struktur des rekombinanten Proteins publiziert oder in der PDB-Strukturdatenbank abgelegt worden¹. Da es sich aber nur um einen lokalen Unterschied handelt, kann man davon ausgehen, dass die beiden Proteine bis auf die Umgebung der Prozessierungsstelle praktisch identische Strukturen haben.

¹Der Eintrag 2ltn enthält zwar die Angabe, dass das Protein rekombinant erzeugt wurde. Beschreibung und Koordinaten beziehen sich jedoch auf einen Kristall des prozessierten Lektins (H. Einspahr, persönliche Mitteilung).

Da die rekombinant erzeugte, unprozessierte Variante des Erbsenlektins nur eine Polypeptidkette pro Untereinheit enthält, wird sie in dieser Arbeit als PslS (S für *single chain*) bezeichnet. Von PslS wurden in der Arbeitsgruppe von Jan W. Kijne verschiedene Mutanten hergestellt, so eine destabilisierte (Hoedemaeker *et al.*, 1993) und eine Bindungsmutante (van Eijsden *et al.*, 1992). Aus dieser Arbeitsgruppe stammen auch Plasmide für PslS und die Bindungsmutante PslS N125D. Davon ausgehend wurden in unserer Arbeitsgruppe Plasmide für PslS und PslS N125D synthetisiert, exprimiert und die Proteine charakterisiert (Dertinger, 1996; Pankoke, 1997), die auch in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.2 Proteinfaltung

1.2.1 Grundlagen

Der zweite genetische Code Dass die Information, welche dreidimensionale Struktur ein Protein einnehmen soll, in seiner chemischen Zusammensetzung enthalten ist, wurde in Einzelfällen bereits vor langer Zeit gezeigt (Anson, 1945; Anson & Mirsky, 1931; Anfinsen & Haber, 1961; Anfinsen, 1973). Mittlerweile ist allgemein anerkannt, dass die Strukturinformation in der Aminosäuresequenz kodiert ist (Jaenicke, 1991; Ptitsyn, 1991). Da die Funktion eines Proteins direkt von seiner Struktur abhängt, ist die Faltungsinformation mit dem genetischen Code verglichen worden (Kim & Baldwin, 1982; Ptitsyn, 1991), und die Entschlüsselung dieses Codes ist eine Herausforderung für die Grundlagenforschung. Erst im letzten Jahrzehnt gelangten zunehmend die praktischen Aspekte dieser Forschung ins Blickfeld, zum einen durch Probleme mit Fehlfaltungen bei der rekombinanten Expression und generell der Überexpression von Proteinen (Rudolph & Lilie, 1996), zum anderen, weil eine zunehmende Zahl von Krankheiten mit pathologischen Proteinstrukturen verknüpft werden (Raso & King, 2000).

Schnell stellte sich heraus, dass es bei der Ausbildung von Proteinstrukturen nicht nur um das *Was* geht, etwa welche Sekundärstrukturelemente wo gebildet werden, und in welcher Topologie sie sich anordnen, sondern auch um das *Wie*, um den Weg, den die Polypeptidkette dahin nimmt. Zwar ist es mittlerweile möglich, Proteinstrukturen aus der Sequenz mit einer gewissen Genauigkeit vorherzusagen, mit einiger Verlässlichkeit aber nur, wenn Strukturen homologer Proteine oder Domänen zuvor experimentell bestimmt wurden (Venclovas *et al.*, 2001). Um die Prozesse zu *verstehen*, die zur nativen Struktur führen, muss aber der Weg, den die Polypeptidkette nimmt, in den Blick genommen werden. Dazu werden eine Vielzahl von Methoden angewandt, z. B. Massenspektrometrie, H/D-Austausch, Aktivitätstests, Chromatographie, chemisches Quervernetzen und Markieren und Einsatz von Enzymen. Eine wesentliche Rolle spielten jedoch immer spektroskopische Methoden, neben Röntgenkleinwinkelstreuung, NMR und verschiedenen Methoden zur Beobachtung von prosthetischen Gruppen vor allem Circular dichroismus (CD-) und Fluoreszenzspektroskopie. Während Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie im nahen UV (250 – 350 nm) Informationen über die Tertiärstruktur in der Umgebung der Fluoro- und Chromophore liefern, ist das CD-Signal im UV-Bereich unter 250 nm sensitiv für die Sekundärstruktur (Shirley, 1995; Pain, 2000).

Faltungsprozesse und Intermediate Proteinfaltung beginnt in der Zelle nach Freisetzung der wachsenden Polypeptidkette aus dem Ribosomentunnel (Ban *et al.*, 2000). Das Protein hat zu Beginn eine undefinierte, im Mittel stark ausgestreckte Struktur ohne nennenswerte Kontakte zwischen nicht-benachbarten Aminosäureresten. Zur Untersuchung der Faltung *in vitro* wird von chemisch oder thermisch denaturierten Proteinen ausgegangen, die eine vergleichbare Struktur einnehmen wie die neu synthetisierte Polypeptidkette in der Zelle. Erst in jüngster Zeit ist es möglich geworden, einzelne Moleküle bei Konformationsänderungen zu beobachten (Kelley *et al.*, 2001). In der Regel beobachtet man aber in einem Experiment auch heute noch immer ein Ensemble von Konformationen. Das denaturierte Ensemble ist heterogen und im Mittel wenig kompakt mit wenigen, in der Regel instabilen Kontakten zwischen verschiedenen Bereichen der Polypeptidkette (Kataoka & Goto, 1996; Shortle, 1996; Smith *et al.*, 1996). Unter denaturierenden Bedingungen ist dieser Zustand der mit der niedrigsten freien Enthalpie. Wird das Protein in native Bedingungen überführt, etwa durch Verdünnung des chemischen Denaturierungsmittels oder einen Temperatursprung, so beginnt der Strukturbildungsprozess von diesem heterogenen Gemisch ausgehend. Unter diesen Bedingungen sind die Kräfte, die ein natives Protein stabilisieren, wieder stärker als die auseinander-treibende Kraft der Kettenentropie (Murphy, 1995). Dabei ist klar, dass auch teilweise ausgebildete Bruchstücke nativer Struktur bereits zur Stabilität beitragen. Strukturen mit solchen teilweise ausgebildeten nativen oder nativähnlichen Bereichen, sogenannte Faltungsintermediate, können zu „Sammelpunkten“ für die vielen Konformationen des denaturierten Ensembles werden, die so in einigen Schritten zur gemeinsamen, nativen Struktur finden.

Allerdings können sich im Faltungsprozess nicht nur native und nahezu native Substrukturen ausbilden, sondern es können auch Intermediate mit nicht-nativen Wechselwirkungen entstehen. Während nativ-ähnliche Intermediate als Landmarken auf dem Weg zum nativen Protein aufgefasst wurden („*on-pathway*“), müssen Intermediate mit nicht-nativen stabilisierenden Wechselwirkungen erst wieder entfalten, bevor das Protein einen neuen Anlauf nehmen kann, die native Struktur zu erreichen („*off-pathway*“) (Bieri & Kiefhaber, 2000).

Theoretische Entwicklungen Während sich experimentelle Faltungsforschung für lange Zeit darauf konzentrierte, Faltungswege entlang solcher Intermediate zu suchen und zu charakterisieren (Kim & Baldwin, 1982), entwickelte sich auch die Theorie weiter. Sie suchte – parallel zu entsprechenden experimentellen Untersuchungen – Modelle zu entwickeln, die beschreiben, welches die ersten Schritte im Faltungsprozess sind (Kim & Baldwin, 1982; Nath & Udgaonkar, 1997). Dabei ging es etwa um die Frage, ob der Strukturbildungsprozess an einem definierten Punkt der Kette beginnen muss (ein sogenannter Faltungsnucleus). Alternativ könnten zunächst wenig stabile, transiente Strukturen entstehen, die erst, wenn sie sich durch Kettendiffusion begegnen und gegenseitig stabilisieren, zur nativen Struktur zusammenwachsen. Solche Strukturen könnten einzelne α -Helices oder β -Hairpins sein, aber auch lokale hydrophobe Cluster. Überhaupt war das Verhältnis von hydrophobem Effekt und Sekundärstrukturbildung strittig; während der hydrophobe Effekt als relativ unspezifische Wechselwirkung aufgefasst wird, hängt die Präferenz von Aminosäureresten, Sekundärstruktur auszubilden, stark von ihren

Seitenketten ab (Baldwin & Rose, 1999a).

Eine andere theoretische Richtung übertrug Erkenntnisse aus der Polymertheorie auf die Proteinfaltung (Dill, 1999). Sie betont, dass es nicht *einen* Weg vom denaturierten Zustand – der ja auch nicht nur *eine* Konformation darstellt – zum nativen gibt, sondern eine Vielzahl von Wegen. Ein beliebtes Bild dafür ist ein Trichter mit dem denaturierten Ensemble am oberen Rand und dem nativen Zustand an der Spitze des Trichters². In der energetischen Interpretation bedeutet das Trichterbild, dass die denaturierte Kette einen Zustand niedrigerer Energie erreicht, wenn sie einen beliebigen nativen Kontakt ausbildet, sie ist damit in den oberen Teil des Trichters gerutscht. Von dort aus geht es nun entweder wieder aufwärts – aber dazu müsste der native Kontakt wieder gelöst werden – oder abwärts zu mehr nativen Kontakten und noch niedrigerer Energie, auf den nativen Zustand zu. In diesem Modell sind Intermediate unnötig und experimentell nicht beobachtbar, denn sie sind durch keine Energiebarriere vom nativen Zustand getrennt und werden daher nicht populiert. Sofern in Experimenten Intermediate beobachtet werden, wird dies als den Faltungsprozess bremsend aufgefasst, die Energiehyperfläche („Trichteroberfläche“) als uneben, so dass Teile des Ensembles in lokale Minima oder Ebenen gelangen (Dill & Chan, 1997).

Das Zwei-Zustands-Modell und seine Grenzen In der Tat gibt es viele Proteine, bei denen im Gleichgewicht und in der experimentell beobachteten Faltungskinetik nur zwei Zustände gefunden werden, der denaturierte und der native, und solche Proteine falten fast alle schnell bis sehr schnell, also im Bereich von Sekunden bis Mikrosekunden (Dobson, 2000). Proteine, die diesem Zwei-Zustands-Modell folgen, wurden daher zum Paradigma der Faltungsforschung und wurden experimentell und in Computersimulationen erforscht (Alm & Baker, 1999). In der Tat haben diese Untersuchungen interessante Informationen geliefert, sie haben geholfen, theoretische Fragen exakter zu stellen, und für Proteine dieser Klasse beginnt sich langsam eine einheitliche Vorstellung ihrer Faltung abzuzeichnen (Dobson, 2000). Eine wesentliche Schlussfolgerung ist, dass nicht eines der oben angeführten Modelle für die Ausbildung der ersten Strukturen das richtige ist, sondern dass die Details von Protein zu Protein variieren und dass reale Proteine in der Regel Aspekte von allen Modellen vereinigen.

Allerdings zeigte sich auch, dass viele Proteine eben nicht mit dem Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden können und dass daher wesentliche Aspekte der Proteinfaltung ausgeblendet werden, wenn man sich in Theorie und Praxis auf dieses Modell beschränkt. Als Beispiele seien das bakterielle Immunprotein Im7 genannt, das ein *on-pathway*-Intermediat mit nichtnativer Anordnung von α -Helices hat (Capaldi *et al.*, 2002), und das all- β -Protein β -Lactoglobulin, das über ein teilweise α -helicales Intermediat faltet. In diesem Fall konnte nicht nur experimentell, sondern auch durch Computersimulationen gezeigt werden, dass dieses Intermediat den schnelleren Weg zum nativen Zustand bildet als Alternativen ohne α -Helices (Chikenji & Kikuchi, 2000; Forge *et al.*, 2000).

Darüber hinaus konnte an Tendamiostat, einem Protein, das apparent nach dem Zwei-Zustands-Modell faltet, schlüssig gezeigt werden, dass trotzdem ein Intermediat existiert,

²Allerdings ist dies wieder nur ein zweidimensionales Bild, während der Konformationsraum mit etwa so vielen Dimensionen beschrieben werden müsste, wie die Polypeptidkette Drehwinkel hat.

1 Einleitung

das aber nicht stark populiert ist, da je nach den Bedingungen entweder die Energiebarriere davor oder danach sehr klein ist (Bachmann & Kiefhaber, 2001). Eine Analyse publizierter Daten, die nach dem Zwei-Zustands-Modell ausgewertet wurden, ergab, dass solche versteckten Intermediate wahrscheinlich auch noch bei anderen Proteinen vorliegen (Sanchez & Kiefhaber, Manuskript in Vorbereitung).

Die Faltung großer Proteine Alle bisher geschilderten Ansätze konzentrieren sich jedoch auf kleine Proteine, das heißt Proteine mit unter 150, meist wenig über 50 Aminosäureresten. Viele medizinisch oder technologisch interessante Proteine sind aber recht groß, so dass es wichtig ist, die Erkenntnisse von kleinen Proteinen auf große zu übertragen und die zusätzlichen Komplikationen zu erforschen.

Man kann zwar davon ausgehen, dass für große Proteine die selben Grundsätze gelten, in der Praxis ergeben sich jedoch bedeutende Unterschiede. Zum einen ist es nicht mehr selbstverständlich, dass unter Laborbedingungen 100 % Rückfaltungsausbeute bei kleinen Konzentrationen an Denaturierungsmittel erreicht werden, und bei mittleren Konzentrationen ist die Diskrepanz häufig noch höher (Jaenicke & Seckler, 1997).

Dadurch sind Denaturierungsübergänge, bei denen man den gemessenen Anteil nativen Proteins gegen die Denaturierungsmittelkonzentration oder die Temperatur aufträgt, nicht mehr reversibel, das heißt, die mit denaturierendem und mit renaturierendem Protein gemessenen Kurven fallen nicht mehr zusammen. Daher ist es nicht mehr möglich, die Übergänge thermodynamisch auszuwerten und die freie Stabilisierungsenthalpie zu errechnen (Pace & Scholtz, 1995).

Strukturen großer Proteine sind zwar oft in Domänen gegliedert, die häufig auch unabhängig voneinander falten können (Jaenicke, 1999). Es gibt aber auch viele Domänen mit mehreren 100 Aminosäureresten. Faltungsstudien an solchen Proteinen sind bisher selten durchgeführt worden.

Aggregation als Nebenreaktion Eine häufig bei großen Proteinen auftretende Nebenreaktion ist Aggregation, also die Bildung nicht-nativer großer Oligomere, die schließlich irreversibel präzipitieren. Während Aggregation bei kleinen Proteinen durch die richtige Wahl der Bedingungen herbeigeführt werden muss (bzw. kann, siehe Chiti *et al.*, 1999, 2001; Zurdo *et al.*, 2001), ist sie bei großen Proteinen eine häufige Nebenreaktion *in vitro* und *in vivo*. Da es sich dabei um einen Assoziationsprozess handelt, kann man Aggregation *in vitro* häufig durch Verringerung der Proteinkonzentration unterdrücken oder zumindest verringern (Kiefhaber *et al.*, 1991). Bei oligomeren Proteinen allerdings verringert dies auch die Assoziationsgeschwindigkeit der Untereinheiten, so dass bei ihnen dieser Technik Grenzen gesetzt sind.

Intermediate und die Faltungskinetik von großen Proteinen Große Proteine falten in der Regel viel langsamer als kleine (). In einigen Fällen wurde gezeigt, dass dabei stabile *off-pathway*-Intermediate populiert werden, die als „kinetische Fallen“ wirken (Herbst *et al.*, 1998). Welche Strukturen solche Intermediate einnehmen, wie groß ihre Stabilität ist und von welchen Faktoren es abhängt, ob sie ein kinetisches Hindernis darstellen oder das Protein auch schnelle Wege ohne Intermediate findet, darüber zeichnet sich noch kein einheitliches Bild ab. Dies ist auch nicht verwunderlich, denn selbst bei kleinen

Proteinen, von denen mittlerweile sehr viele untersucht sind, gibt es noch keinen Konsens über die Rolle von Intermediaten (Baldwin & Rose, 1999b; Rumbley *et al.*, 2001). Die zusätzliche Problematik bei großen Domänen ist aber noch zu wenig untersucht, als dass hier schon allgemeine Prinzipien erkennbar wären. Arbeiten an großen Proteinen bewegen sich daher auf weniger sicherem Boden, es geht nicht nur darum, Fragen zu beantworten, sondern auch, exakte Fragestellungen erst herauszuarbeiten. Gerade hier ist es jedoch wichtig, durch Untersuchungen an ausgewählten Systemen einzelne Bausteine beizutragen, die irgendwann zu einem Gesamtbild zusammengeführt werden können.

1.2.2 Stabilitäts- und Faltungsuntersuchungen an Leguminosenlektinen

Während es bereits viele Kristallstrukturen von Leguminosenlektinen gibt und ihre Quartärstruktur Gegenstand vieler Studien war, ist ihre Faltung und Stabilität wenig erforscht. Die Stabilität wurde vor allem von zwei Gruppen mit Hilfe der DSC³ untersucht, die zu widersprüchlichen Deutungen ihrer Daten kommen. Bei Temperaturscans von Leguminosenlektinen wurde nämlich bisher immer beobachtet, dass sich die Kurven nach dem Abkühlen nicht mehr reproduzieren lassen, weil das Protein im hitzedenaturierten Zustand irreversibel aggregiert. In der Gruppe um A. Surolia wird versucht, diese Daten trotzdem thermodynamisch auszuwerten (Reddy *et al.*, 1999a; Srinivas *et al.*, 1998; Surolia *et al.*, 1996; Schwarz *et al.*, 1991). Dazu nehmen die Autoren an, dass die beobachtbaren Prozesse im Gleichgewicht sind, und nur anschließende Vorgänge bei hohen Temperaturen, die kein thermisches Signal liefern, die Irreversibilität verursachen (Manly *et al.*, 1985).

Dieser Interpretation wird in Marcos *et al.* (1999) widersprochen. Die Gruppe findet beim Linsenlektin und verschiedenen anderen Proteinen (siehe z. B. Kurganov *et al.*, 1997) irreversible thermische Denaturierungsprozesse, deren DSC-Kurven sie mit dem „irreversiblen Zweizustandsmodell“ entsprechend der Gleichung $N \xrightarrow{k} U$ auswerten. Damit ist es zwar nicht mehr möglich, ΔG_{stab}^0 zu berechnen, aber man erhält zumindest Werte für die Enthalpie und die Aktivierungsenergie des Entfaltungsprozesses.

Daneben sind auch einige Untersuchungen mit Harnstoff- oder Guanidiniumchlorid-induzierter Denaturierung veröffentlicht worden (Reddy *et al.*, 1999b; Mitra *et al.*, 2002), eine auch an Erbsenlektin (Ahmad *et al.*, 1998). Allerdings wurden dort nur die Denaturierungsäste der Übergänge gemessen. Die Renaturierung wurde teilweise gar nicht (Mitra *et al.*, 2002) untersucht oder keine Daten gezeigt (Reddy *et al.*, 1999b), in Ahmad *et al.* (1998) wurden Spektren bei nur einer Denaturierungsmittelkonzentration gemessen, die zeigen, dass deutlich unter 100 % Rückfaltungsausbeute vorliegen. Damit ist aber die thermodynamische Auswertung nicht mehr gerechtfertigt (Pace & Scholtz, 1995), und die Werte, die die Autoren aus ihren Daten gewinnen, spiegeln wahrscheinlich eher die Denaturierungskinetik als die Gleichgewichtslage wider.

Die bisher publizierten Daten sind also mit Vorsicht zu interpretieren. Es scheint sich jedoch herauszukristallisieren, dass bei der Denaturierung von Leguminosenlektinen häufig Intermediate mit niedrigerem Oligomerisierungsgrad auftreten. Ob es sich dabei um Gleichgewichts- oder kinetische Intermediate handelt, ist allerdings nicht zu

³*Differential Scanning Calorimetry*, Differentialkalorimetrie, bei der aus der Wärmekapazitätsänderung einer Probenlösung im Vergleich zur Referenz thermodynamische Parameter von Reaktionen biologischer Makromoleküle bestimmt werden können.

1 Einleitung

beurteilen. Zumindest bei ConA ist jedoch im Gleichgewicht bei pH 7 das Tetramer die stabilste Form, bei pH 5 dagegen das Dimer (McCubbin & Kay, 1971). Daten zum Faltungsweg von Leguminosenlektinen oder zur Kinetik ihrer Rückfaltung sind bisher nicht publiziert worden.

Bei ConA ist auch die Bindung des Calcium- und des Übergangsmetallions näher untersucht worden (Brewer *et al.*, 1983; Bouckaert *et al.*, 2000). Ohne Metallionen ist eine Konformation die stabilste, die nicht in der Lage ist, Zucker zu binden, und als *unlocked* bezeichnet wird. Entsprechend gering ist die Affinität der metallfreien Form gegenüber Zuckern. Die Metalle werden sequentiell aufgenommen, zunächst das Übergangsmetallion (normalerweise Mn^{2+}), dann das Calciumion. Dabei geht das Protein in die *locked* genannte Konformation über, die eine relativ hohe Affinität gegenüber Monosacchariden aufweist. Diese Konformationsänderung umfasst unter anderem die Isomerisierung einer Nicht-Prolyl-Peptidbindung von *trans* nach *cis*, der konservierten Konformation dieser Bindung in allen Leguminosenlektinen (Loris *et al.*, 1998). Der Prozess wurde im Kristall und in Lösung beobachtet und ist in beiden Fällen sehr langsam, nämlich im Bereich von Minuten unter normalen Bedingungen bis Tagen bei 5 °C, wenn auch Ca^{2+} durch Mn^{2+} ersetzt wird.

Da von ConA eine metallfreie Form hergestellt werden kann, ist es leicht möglich, Mangan und auch Calcium durch andere Übergangsmetalle zu ersetzen (Bouckaert *et al.*, 2000). Bei Erbsen- und Linsenlektin ist es nicht möglich, eine metallfreie Form zu isolieren, die Proteine aggregieren irreversibel. Durch Dialyse gegen Puffer, die hohe Konzentrationen an Ni^{2+} , Co^{2+} oder Cd^{2+} enthielten, konnten bei pH 4 jedoch auch bei diesen Proteinen Derivate hergestellt werden, in denen die Übergangsmetallionen und auch das Calciumion ersetzt wurden (Bhattacharyya *et al.*, 1985).

1.2.3 Faltung und Reassoziierung von Proteinfragmenten

Erbsenlektin ist nicht nur ein recht großes Protein, bei der Untersuchung seiner Faltung ergibt sich die zusätzliche Komplikation der proteolytischen Prozessierung. Entweder müssen die beiden Polypeptidketten sich ungefaltet begegnen und dann gemeinsam die komplexe Topologie ausbilden, oder die teilweise strukturierte β -Kette muss sich soweit öffnen, dass sich die α -Kette anlagern kann. In der Literatur sind bereits Faltungs- und Assoziationsprozesse von Proteinfragmenten beschrieben worden, die durch natürliche oder künstliche Prozessierung entstanden sind. Allerdings haben die untersuchten Strukturen meist eine einfachere Topologie, und die Bestandteile, zumindest der größere Anteil, können auch ohne den Partner native Topologie und nativähnliche Tertiärstruktur einnehmen.

Ein bekanntes Beispiel ist die Ribonuclease A aus Rinderpankreas. Durch Behandlung mit Subtilisin erhält man zwei Fragmente, RNase S oder S-Protein und das kürzere S-Peptid. In der Struktur entspricht dem S-Peptid eine α -Helix am Rande der RNase-Struktur (Kim *et al.*, 1992). Diese kann sich an das vorgeformte, nativähnliche S-Protein anlagern, ohne dass dieses erst entfalten müsste. Aber auch hier wird unter gewissen Bedingungen nach der Assoziation ein weiterer geschwindigkeitsbestimmender Schritt gefunden (Goldberg & Baldwin, 1998). Ein anderes Beispiel ist die α -Komplementation der β -Galactosidase aus *E. coli*. Diese seit langem bekannte und genutzte Reaktion (Ullmann *et al.*, 1965) ist erst in jüngerer Zeit strukturell aufgeklärt worden (Juers *et al.*,

2000). Bei dem Protein handelt es sich um ein sehr großes, tetrameres Multidomänenprotein. Das deletierte Peptid liegt in der nativen Struktur ohne reguläre Sekundärstruktur zwischen zwei Domänen und vermittelt außerdem die Assoziation zwischen den Untereinheiten des Tetramers. Die Mutante, in der dieses Peptid fehlt, kann keine Tetramere bilden und ist enzymatisch inaktiv; bei Zugabe eines entsprechenden Komplementpeptids inseriert dieses an die Fehlstelle und restauriert die Aktivität. Dazu sind jedoch keine größeren Entfaltungsschritte notwendig, sondern nur relative Bewegungen von Domänen und lokale Umordnungen.

Ein anderes Protein, an dem die Renaturierung aus Fragmenten untersucht wurde, ist das Insulin. Das aktive Hormon besteht aus zwei disulfidverbrückten Polypeptidketten, der A- und der B-Kette. Das ursprünglich zwischen beiden liegende C-Peptid wird zur Aktivierung proteolytisch entfernt. In diesem Fall konnte gezeigt werden, dass die Information aus der Sequenz von A- und B-Kette ausreichend für die Faltung ist: Auch Mischungen aus den vollständig reduzierten A- und B-Ketten können in die native Struktur falten (Wang & Tsou, 1991). Allerdings handelt es sich beim Insulin um ein kleines Protein mit simpler Topologie. Die kürzere Kette bildet ein in sich disulfidverbrücktes 2-Helix-Bündel, und die Oligomerisierung wird ausschließlich durch die längere Kette vermittelt.

In den Arbeiten von A. Fontana (für eine Übersicht siehe Tsai *et al.*, 2002) wird ebenfalls die Faltung von Proteinfragmenten untersucht, aber aus der umgekehrten Sicht. Es wird versucht, durch enzymatische Proteolyse Domänen und Subdomänen als Faltungseinheiten zu identifizieren. Damit soll unter anderem experimentell gestützt werden, dass der Faltungsprozess hierarchisch ist (Baldwin & Rose, 1999a,b). Als Faltungseinheiten ergeben sich in diesen Experimenten Bruchstücke mit simpler Topologie und hohem Anteil an lokalen Wechselwirkungen mit Partnern, die in der Sequenz benachbart sind.

Bei der Faltung von prozessiertem Erbsenlektin handelt es sich demnach um ein ungewöhnliches Problem, da ihm eine ungewöhnliche Struktur zugrundeliegt. Es gibt aber durchaus einige weitere Klassen von Proteinen mit ähnlich komplexer Topologie und Untereinheitenassoziation. Dazu gehören zum Beispiel einige Proteine in Schwanzfasern und Adhäsionsapparat von Bakteriophagen (Mitraki *et al.*, 2002), von denen es zum Teil bereits Faltungsuntersuchungen gibt (Burda & Miller, 1999; Seckler, 1998). Beim Tailspike-Protein von P22 wurde die hohe kinetische Stabilität und die langsame Kinetik der Reifung von bereits assoziierten Trimeren mit der Verschränkung der C-Termini erklärt – ein der PslP-Faltung analoges Problem. Allerdings zeigt eine neue Struktur eines ähnlichen Tailspike-Proteins diese Verschränkung nicht, obwohl es ebenfalls eine hohe kinetische Stabilität besitzt (Barbirz, Müller, Heinemann & Seckler, Manuskript in Vorbereitung). Eine Untersuchung der Kinetik von Faltung und Trimerreifung dieses Proteins wäre daher hochinteressant.

Weitere Proteine mit ähnlich komplexer Verschränkung von Untereinheiten sind die Cathepsin-L-ähnlichen Vertreter der Familie der Papain-Proteasen, die durch Entfernung eines Propeptids aktiviert werden. Ein Teil des Propeptids bleibt aber bei Cathepsin C und Cathepsin L in der nativen Struktur enthalten, und zwar eng mit der Hauptkette verschränkt. Die Rolle der Pro-Region für die Faltung von Cathepsin C und Cathepsin L wurde bereits untersucht (Schilling *et al.*, 2001; Ogino *et al.*, 1999), sie spielt wahrscheinlich eine Rolle als intramolekulares Chaperon. Studien zur Faltung des prozessierten Proteins sind jedoch nicht publiziert worden.

1.3 Aufgabenstellung

Aus Dertinger (1996) und Pankoke (1997) war bereits bekannt, dass sowohl rekombinantes, unprozessiertes Erbsenlektin (PslS) als auch prozessiertes (PslP) nach chemischer Denaturierung wieder native Struktur ausbilden und Erythrozyten agglutinieren können. Die Rückfaltung von PslP war dabei extrem langsam und dauerte Tage, während die von PslS nach einem Tag abgeschlossen war. Daneben war bekannt, dass bei der Denaturierung in Guanidiniumchlorid ein kinetisches Intermediat auftritt, das in Dertinger (1996) dem strukturierten Monomer zugeordnet worden war.

Daraus ergaben sich eine Reihe von Fragen, denen in dieser Arbeit nachgegangen werden sollte. Zum einen sollte die Stabilität des strukturierten Monomers und die Lage und Dynamik des Monomer-Dimer-Gleichgewichts untersucht werden. Zum anderen war zu klären, auf welche Weise die Prozessierung die außerordentlich langsame Kinetik der PslP-Faltung bewirkt, und auf welche Weise es dem prozessierten Protein überhaupt gelingen kann, die native Struktur wieder zu erreichen. Dazu sollte die Faltung von PslS und PslP kinetisch charakterisiert und verglichen werden.

Die zur Verfügung stehenden spektroskopischen Methoden erlauben immer nur globale Aussagen über die Struktur der Polypeptidkette, häufig begrenzt auf das dreidimensionale Umfeld der aromatischen Aminosäurereste. Daher ist eine Quantifizierung nativ gefalteter Proteine alleine aufgrund dieser Methoden problematisch, sobald Intermediate beobachtet werden. Dagegen geht man davon aus, dass nur das vollständig nativ gefaltete Protein in der Lage ist, seine Funktion auszuüben. Bei Enzymen verwendet man daher die spezifische Aktivität als sensibles Maß für den Anteil nativen Proteins. Erbsenlektin besitzt keine enzymatische Aktivität, und es ist kein hochaffin bindender löslicher Ligand bekannt. In einer parallel durchgeführten Arbeit sollte mittels kombinatorischer Synthese unterschiedlicher Saccharide und Glycopeptide die Spezifität von Psl systematisch untersucht werden. Es war jedoch unklar, ob dabei ein hochaffiner Ligand entwickelt werden könne, der sich für den Einsatz in Faltungsuntersuchungen eignet, und die Untersuchungen wurden bisher nicht zu Ende geführt.

Deswegen sollte am Beginn dieser Arbeit zunächst ein Funktionstest entwickelt werden, der die Bindungseigenschaften des Proteins ausnutzt. Mit diesem sollte die Menge vollständig renaturierten Lektins quantifiziert werden, das bereits native Bindungseigenschaften besitzt. Der Test sollte unter Renaturierungsbedingungen (Restkonzentrationen von Denaturierungsmittel, Anteile von Intermediaten und Aggregaten etc.) einsetzbar sein und eine ausreichende Zeitauflösung besitzen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril HPLC grade	Roth, Karlsruhe
AMC	Aldrich, Taufkirchen
Aminoacridin	Fluka, Taufkirchen
Aminoacridon	Fluka, Taufkirchen
Aminodiethoxyphenylbenzoesäureamid	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Asp-AMC	Fluka, Taufkirchen
Benzyl-cysteinyl-AMC	Fluka, Taufkirchen
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Yeast extract	Difco, Detroit (USA)
Coomassie Brilliantblau R 250	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd, 25 % (v/v) in Wasser	Serva, Heidelberg
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
Harnstoff (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
Leucylaminoacridon	Fluka, Taufkirchen
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Essigsäure z.S.	Roth, Karlsruhe
Essigsäure p.A.	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Maltose	Roth, Karlsruhe
Methanol z.S.	Roth, Karlsruhe
NaCNBH ₃	Aldrich, Taufkirchen
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30 (37.5 : 1)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien waren von Merck (Darmstadt) oder von Sigma (Taufkirchen) und hatten den Reinheitsgrad p.A.

Wasser

Zur Herstellung von LB-Medium zur Anzucht von *E.-coli*-Zellen wurde Leitungswasser verwendet. In allen anderen Fällen wurde ausschließlich Reinstwasser aus einer Millipore-Anlage (s.u.) verwendet und in Polyethylen- oder Glasgefäßen aufbewahrt.

2.1.2 Puffer und Medien

Für alle Experimente außer der Kultivierung von *E. coli* und der Dialyse wurden die Puffer sterilfiltriert und entgast. Einige Puffer, die nur für SDS-PAGE und Gelfärbung verwendet wurden, sind dort angegeben.

Denaturierungspuffer	MOPS-Nativpuffer mit zusätzlich etwa 8 M GdmCl
SourceQ-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 8.8
LB _{amp} -Medium	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 5 g/l NaCl (1.5 % (w/v) Bacto Agar für Kulturplatten) wurden mit 1 N NaOH auf pH 7.5 eingestellt, autoklaviert und mit Ampicillin-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml versetzt.
Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0.5 M Pefabloc SC pH 6.8
Nativpuffer	Zu Beginn der Arbeit und durchgängig bei allen Untersuchungen zur Bindung und Aktivität von Psl wurde ein Tris-Puffer, für die Faltungsuntersuchungen, soweit nicht anders angegeben, ein MOPS-Puffer verwendet:
Tris-Nativpuffer	10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ pH 6.8. Das Manganchlorid wurde als 1000-fach konzentrierte Stammlösung in Tris-Nativpuffer separat im Dunklen bei -20 °C gelagert und erst vor der Verwendung zugesetzt.
MOPS-Nativpuffer	10 mM MOPS, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ wurde mit NaOH auf pH 6.8 (soweit nicht anders angegeben) eingestellt. Das Manganchlorid wurde als 1000-fach konzentrierte Stammlösung in MOPS-Nativpuffer separat im Dunklen bei -20 °C gelagert und erst vor der Verwendung zugesetzt.
Harnstoffpuffer 1	50 mM Glycin/HCl pH 2.5, ≈ 9 M Harnstoff (mit Refraktometer bestimmt)
Harnstoffpuffer 2	0.45 mol Harnstoff wurden in 25 ml 1 N HCl gelöst, mit 37 % (w/v) HCl auf pH 1.8 eingestellt und anschließend mit etwas Wasser auf 50 ml aufgefüllt (Endkonzentration etwa 9 M Harnstoff).
PS-Puffer	10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 6.8
Reinigungspuffer	10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7.2

2.1.3 Biologisches Material, Organismen und Plasmide

Erbsensamen Prozessiertes Wildtyp-Lektin (PslP) wurde aus trockenen, ungeschälten grünen Erbsen aus dem örtlichen Lebensmittelhandel gereinigt.

Organismus Rekombinantes, nichtprozessiertes Lektin (PslS) wurde durch Expression in *E. coli* BL21 (DE3) gewonnen. Der Stamm (Dubendorff & Studier, 1991a,b) hat die Merkmale F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) und wurde von der Firma Novagene gekauft.

Plasmid-DNA Zur Expression wurde das von C. Pankoke hergestellte Plasmid pELwt verwendet (Pankoke, 1997).

2.1.4 Chromatographiemedien und Fertigsäulen

Fertigsäulen

präparative Reversed-Phase HPLC	Sil ODS 0 AB 5 µm (250x4.6mm), Säulenvolumen 3.14 ml, GROM, Herrenberg-Kay
Anionenaustausch-Chromatographie	Resource Q (1 ml), Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden) Source 15Q PE 4.6/100 (1.7 ml), Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)
Gelfiltration	Superdex 75 HR 10/30 (24 ml Bettvolumen), Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden) TSK-GEL G2000SW XL30 (5 µm) Partikelgröße, Dimensionen 7.8 × 300 mm, Toso Haas, Stuttgart TSK-GEL SW Guard column (7.5 × 75 mm), Toso Haas, Stuttgart Sephadex G-25 M, PD-10 Entsalzungssäule, Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)

Medien

Affinitätschromatographie	Sephadex G 100, Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden) Sephadex G 75, Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden) Superdex 200 prep grade, Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)
---------------------------	--

Leersäulen

HR 10/10, Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)	
Borosilikatglas-Niederdrucksäule, Sigma, St. Louis (USA)	

2.1.5 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Amicon Centrifree Ultrafiltrationsgerät	Millipore, Bedford (USA)
Centriplus YM 30	Millipore, Bedford (USA)
Dialyseschläuche SpectraPor (Ausschlußvolumen 12 – 14 kDa)	Spectrum, Houston (USA)
Kunststoff-Fluoreszenz-Makroküvetten	Semadeni, Ostermündigen (Schweiz)
Molekularmassen-Eichkit für Gelfiltration, low molecular weight	Amersham Biosciences, Uppsala (Schweden)
Sterilfilter (0.2 µm)	Renner, Darmstadt
Quarzglas-Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
Amicon DIAFLO Ultrafiltrationsmembran YM 30	Millipore, Bedford (USA)
Membranfilter RC-L55	Schleicher und Schüll, Dassel
Reaktionsgefäße 1.5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml (TPP centrifuge tubes)	Renner, Darmstadt

2 Material und Methoden

2.1.6 Geräte

Absorptionsspektrometer	UV-120-02 (Shimadzu) Cary 50 Probe (Varian) V-560 (Jasco)
Bakterienkultur-Schüttler	Innova 2300 Platform Shaker (New Brunswick Scientific)
Brutschränke	WB 540K (Mytron)
Circulardichroismus-Spektrometer	J-715 (Jasco) 62A-DS (Aviv)
Chromatographiesysteme	Äkta Purifier (Amersham Biosciences) RediFrac und GradiFrac, Highload-System (Amersham Biosciences) Biologic HR mit Signal Import Module (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Heizblock	BT 100 (Kleinfeld Labortechnik)
HPLC-Chromatographie	Kontron HPLC Pump 420 Kontron HPLC Gradientformer 425 Äkta Purifier (Amersham Biosciences)
Fluoreszenzdetektoren	L-7480 (Merck Hitachi) FP-920S (Jasco)
Elektrophoreseeinheiten	Mighty Small II SE250 (Hofer)
ELISA-Reader	Sunrise Remote (TECAN)
Fluoreszenzspektrometer	Spex Fluoromax™ (Yobin Ivon Inc.) Spex Fluoromax-2® (Yobin Ivon Inc.) FP-750 (Jasco)
French-Press	French Pressure Cell Press (SLM Aminco Instr. Inc.)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-4, LOC-1M (Christ)
Kryostaten	F1 und F3 digital (Haake)
Kühlbrutschrank	Kelvitron® (Heraeus)
Kühlgeräte	Liebherr Comfort Kühl-/Gefrierkombination ULTRA LOW (-70 °C) (Sanyo)
Mikrokalorimeter	VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal)
Mikro-Ultrazentrifuge	Sorvall Discovery M150 (Kendro)
Reinstwasseranlage	Milli-Q synthesis mit Kartuschen QUANTUM EX Ultrapure Organex und (H ₂ O) _{SMF} [∞]
pH-Meter	pH 597 (WTW) mit Einstabmesskette N 42 A (Schott)
Refraktometer	Zeiss Optron
Spannungsquellen	Bio 105, PP 4000 (Biometra)
Temperaturfühler	864 Thermometer (Keithley)
Vakuumentrifuge (Speedvac)	RVC 2-18 (Christ)
Vortex	REAX top (Heidolph)
Waagen	Feinwaage 434 (Kern) Analysenwaage BP 121 (Sartorius)
Zentrifugen	Sorvall RC-28S und RC 26Plus mit Rotoren F28/50, GSA, GS3 (Kendro) MR22i mit Rotoren AM2.19, AM50.14 (Jouan) Biofuge pico (Heraeus)

Fluoreszenzspektrometer

Es standen ein Spex Fluoromax 1 mit temperierbarem Probenhalter und ein Spex Fluoromax 2 mit Polarisations-einrichtung und Temperaturfühler am temperierbarem Probenhalter der Firma Yobin Ivon Inc. zur Verfügung. Beide Geräte können außer dem Probensignal (S) auch noch ein Referenzsignal (R) aufzeichnen, das vor der Probe aus dem Strahlengang abgezweigt wird und die Korrektur von Lampenschwankungen ermöglicht. Sie geben auf Wunsch sofort das korrigierte Signal S/R aus.

Im Titrationsmodus führen die Geräte Einzelmessungen wählbarer Dauer so oft aus, bis die daraus berechnete Standardabweichung einen wählbaren Wert unterschreitet. Sofern Werte mit höherem Fehler als dem gewählten auftreten, weil die Zahl der Einzelmessungen nach oben begrenzt wurde, wird gesondert darauf hingewiesen.

Liegen Messpunkte einer Kinetik 7 Sekunden oder mehr auseinander, so kann das Anregungslicht durch automatisches Schließen eines Shutters zwischen den Messungen völlig abgeblendet werden, um Intensitätsabnahmen durch Photoreaktionen der Fluorophore („Photobleach“) zu minimieren. Diese Bedingungen werden im folgenden als *Antibleach*-Einstellung bezeichnet.

Für einige Experimente wurde auch ein FP-750-Fluoreszenzspektrometer verwendet, bei dem keine Korrektur von Lampenschwankungen möglich ist. Bei damit erhaltenen Ergebnissen wird darauf jeweils hingewiesen.

2.2 Proteinchemische und -analytische Methoden

2.2.1 Reinigung von Lektin aus der Erbse

Bei allen Reinigungsschritten wurde auf fortwährende Kühlung geachtet. Aufbewahrung und Chromatographie erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei $6 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank oder Kühlraum.

2.2.1.1 Zellaufschluss, Extraktion und Säureschritt

500 g trockene, ungeschälte grüne Erbsen aus dem örtlichen Lebensmittelhandel wurden in einem Mixer zerkleinert. Grobe Teile wurden mit einem Haushalts-Mehlsieb abgetrennt und nochmals vermahlen. Das erhaltene feine Mehl wurde unter Rühren über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 2 l Wasser extrahiert. Die Suspension wurde mit 37%iger HCl auf pH 4.6 gebracht, um säurelabile Proteine auszufällen. Dann wurde im GS3-Rotor 30 min bei 3000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert und das Pellet verworfen.

2.2.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Zur Konzentrierung wurde das Protein aus dem Überstand der Säurefällung im Eisbad unter langsamem Rühren mit 60 % Ammoniumsulfat (390 g/l) gefällt (Cooper, 1981) und das Präzipitat im GS3-Rotor eine Stunde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml Reinigungspuffer suspendiert und mehrmals gegen je 5 l Reinigungspuffer dialysiert (Ausschlussgrenze 12 – 14 kDa). Verbleibende unlösliche Anteile wurden im F28/50-Rotor eine Stunde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5000 rpm abzentrifugiert. Der gelbliche Überstand wurde weiterverwendet.

2.2.1.3 Affinitätschromatographie

10 g Sephadex G-75 superfine oder G-100 superfine wurden zum Quellen sechs Stunden lang auf etwa 90 °C erhitzt und regelmäßig geschwenkt, aber zur Schonung der Gelpartikel nicht gerührt. Feine Partikel wurden durch Abdekantieren entfernt und das Gelmaterial in einer Leersäule über Nacht mit Reinigungspuffer äquilibriert (Flussrate ca. 2 ml/min unter Druck von 30 cm Wassersäule). Das Gelbettvolumen betrug etwa 70 ml. Bei 4 °C wurde das gesamte Protein bei einer Flussrate von etwa 0.4 ml/min mit einer hinter die Säule geschalteten Schlauchpumpe aufgetragen und nach dem Waschen mit 2 Säulenvolumina Reinigungspuffer mit 0.2 M Saccharose in Reinigungspuffer eluiert. Es wurden Fraktionen zu etwa 2 ml gesammelt und mit SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt analysiert. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt und mehrmals gegen je 5 l SourceQ-Puffer dialysiert (Ausschlussgrenze 12 – 14 kDa).

2.2.1.4 Ionenaustauschchromatographie

Bei diesem Schritt wurde die Chromatographie bei Raumtemperatur durchgeführt, die Lagerung von Fraktionen erfolgte weiterhin im Kühlschrank. Bei der ersten Reinigung wurde das Protein auf eine Resource-Q-Säule (1 ml Bettvolumen) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 200 mM NaCl in 40 Säulenvolumina SourceQ-Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt.

Bei den weiteren Reinigungen wurde eine Source 15Q PE 4.6/100 (1.7 ml Bettvolumen) und ein linearer Gradient von 0 – 100 mM NaCl in 20 Säulenvolumina verwendet. Damit ist eine Trennung der Isoformen PslP-A und PslP-B und des gemischten Dimers AB möglich (siehe Abschnitt 3.1.1 auf Seite 43).

Zur Analyse des Untereinheitenaustauschs wurden die selben Bedingungen verwendet. Dabei wurden jeweils 1100 µl auf eine 1000 µl-Probenschleife aufgetragen, um ein exakt gleiches Auftragsvolumen zu gewährleisten.

Die Methode wurde auch zur Analyse des Monomer-Dimer-Gleichgewichts eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.2 auf Seite 85). Dabei musste der Gradient teilweise variiert werden.

2.2.1.5 Konzentration und Aufbewahrung

Das erhaltene Protein wurde durch Ultrafiltration in MOPS-Nativpuffer umgepuffert und auf eine Konzentration von 8 – 12 mg/ml gebracht, aliquotiert, in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei –70 °C aufbewahrt. Zur Verwendung wurde die Lösung bei Raumtemperatur aufgetaut und in der Mini-Ultrazentrifuge bei 4 °C und 40000 rpm für 20 min zentrifugiert, um eventuelle Aggregate zu entfernen.

2.2.2 Gewinnung isolierter α - und β -Ketten

Zur Trennung von α - und β -Ketten wurde eine PslP-Stammlösung (\approx 10 mg/ml) im Verhältnis 1 : 4 mit Denaturierungspuffer verdünnt und mindestens 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden maximal 200 µl der Lösung auf eine mit 3 M Guanidiniumchlorid in MOPS-Nativpuffer äquilibrierte Superdex-75-Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte mit dem selben Puffer bei einer Flussrate von 0.5 ml/min, es wur-

den Fraktionen von 1 ml gesammelt und der Proteingehalt durch Absorptionsmessung bestimmt.

2.2.3 Produktion und Reinigung von rekombinantem Lektin

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

Zellen von *E. coli* BL21(DE3) wurden nach der Methode von Hanahan (1983) und Kiaoren *et al.* (1994) transformationskompetent gemacht und mit dem Plasmid pELwt transformiert. Da die DNA bereits in Pankoke (1997) sequenziert wurde, wurde zur Kontrolle lediglich der dort ebenfalls beschriebene Restriktionsverdau durchgeführt.

2.2.3.2 Anzucht, Induktion und Zellaufschluss

Zur Reinigung rekombinanten Lektins (PslS) aus *E. coli* wurden 5 l LB_{amp} im Verhältnis 1 : 40 mit einer stationären Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₅₀ von etwa 1 geschüttelt. Dann wurde die PslS-Synthese durch Zugabe von 1 M IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Zellen wurden über Nacht bei 30 °C geschüttelt und geerntet (Sorvall GS3, 5000 rpm, 4 °C, 10 min). Die Zellpellets wurden eingefroren und anschließend in 20 ml Lysepuffer resuspendiert und auf Eis durch zwei Durchgänge in der 45 ml French-Press-Zelle bei maximal 124 MPa (18000 *psi*) aufgeschlossen. Die lösliche und die unlösliche Fraktion wurden durch Zentrifugation im F28/50-Rotor (30 min bei 4 °C und 18000 rpm) getrennt.

2.2.3.3 Reinigung aus *inclusion-bodies*

Der unlösliche Anteil des Rohextraktes, der auch die *inclusion-bodies* enthielt, wurde in etwa 30 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Die zähe, trübe Lösung wurde im F28/50-Rotor abzentrifugiert (1 h, 4 °C, 28000 rpm). Der klare Überstand wurde rasch auf Eis im Verhältnis 1 : 200 in Tris-Nativpuffer mit 1.5 M Harnstoff verdünnt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Dieser Schritt dient der Renaturierung des Proteins.

Zur Konzentrierung wurde die Lösung bei 4 °C unter vorsichtigem Rühren auf 60 % Ammoniumsulfat gebracht und das Präzipitat im GSA Rotor 2 h bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in wenigen Millilitern Tris-Nativpuffer aufgenommen und viermal gegen je 1 l Tris-Nativpuffer dialysiert (Ausschlussgrenze 12 – 14 kDa). Anschließend wurde ausgefallenes Protein im F28/50-Rotor (30 min, 4 °C, 18000 rpm) abgetrennt und verworfen.

Die Affinitätschromatographie wurde wie bei der Reinigung aus Erbsen, jedoch mit Tris-Nativpuffer statt Reinigungspuffer durchgeführt.

2.2.3.4 Konzentration und Aufbewahrung

Das gereinigte Protein wurde zur Konzentration mit 60 % Ammoniumsulfat auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde in möglichst wenig Tris-Nativpuffer aufgenommen und mehrmals dialysiert. Dann wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 Reinigung der Bindungsmutante PslS N125D

In dieser Arbeit wurde die Bindungsmutante nicht neu gereinigt, sondern die in Dertinger (1996) gewonnene Präparation verwendet. Die Reinigung ist dort ausführlich beschrieben. Anzucht, Zellaufschluss und Renaturierung aus *inclusion bodies* wurden analog zur Reinigung des PslS-Wildtyps in dieser Arbeit durchgeführt. Daran wurde eine Anionenaustauschchromatographie mit Ressource Q, wie in Abschnitt 2.2.1 auf Seite 23 beschrieben, angeschlossen.

2.2.4 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Als Trennsäule wurde hierzu eine TSK-GEL G2000SW mit TSK-GEL-Vorsäule verwendet. Die Detektion erfolgte über einen Hitachi-Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm, die Detektion erfolgte bei 340 nm. Die Temperatur wurde auf etwa 15 °C gehalten.

Als Puffer wurde MOPS-Nativpuffer verwendet. Pro Lauf wurden auf eine 50 µl-Probenschleife mindestens 70 µl aufgetragen, um eine einheitliche Auftragsmenge zu gewährleisten. Die Säule wurde mit einem Pharmacia-Eichkit (*low molecular weight*) sowie Tryptophan zur Messung des Volumens der flüssigen Phase kalibriert.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Proteinfärbung

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach King & Laemmli (1971). Die Gele hatten eine Größe von $10 \times 8 \times 0.075$ cm. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel war 15 oder 12.5 % (Trenngelpuffer: 375 mM Tris/HCl, 0.2 % (w/v) SDS, pH 8.8), im Sammelgel 5 % (Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl, 0.2 % (w/v) SDS, pH 6.8), die Elektrophorese erfolgte mit 80 V, solange der Marker noch im Sammelgel war, dann mit 120 V. Es wurde der in Fling & Gregerson (1986) beschriebene Laufpuffer eingesetzt (0.25 M Tris, 1.9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.8). Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit 20 µl Auftragspuffer (160 mM Tris/HCl, 25 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8) je 30 µl Probe versetzt und 1 min auf 95 °C erhitzt.

Coomassie-Färbung Die Coomassie-Färbung wurde abgewandelt nach Fairbanks *et al.* (1971) durchgeführt. Dazu wurden die Gele zunächst 10 min in einer Mischung aus 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0.1 % (w/v) Serva Blau R250 in Wasser vorinkubiert. Dann wurde mindestens 2 Stunden, oft über Nacht in Färbelösung (25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Eisessig, 0.025 – 0.05 % (w/v) Coomassie Brilliantblau) inkubiert und anschließend mit 10 % (v/v) Eisessig entfärbt.

Silberfärbung Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven & Dernik (1985). Die Gele wurden nacheinander in folgenden Lösungen geschwenkt:

Fixierlösung 1	– 30 % <i>(v/v)</i> Ethanol, 10 % <i>(v/v)</i> Eisessig	–	30 min
Fixierlösung 2	– 30 % <i>(v/v)</i> Ethanol, 0.4 M Natriumacetat, 0.5 % <i>(v/v)</i> Eisessig; 0.5 % <i>(v/v)</i> Glutaraldehyd und 0.1 % <i>(w/v)</i> Na ₂ S ₂ O ₃ jeweils frisch zugegeben	–	> 60 min
H ₂ O	–	–	3 × 20 min
Färbelösung	– 6 mM AgNO ₃ , 0.01 % <i>(w/v)</i> Formaldehyd jeweils frisch hergestellt	–	45 min
H ₂ O	–	–	kurz waschen
Entwicklungslösung	– 25 g/l Na ₂ CO ₃ 0.015 % <i>(w/v)</i> Formaldehyd	–	1 – 5 min
Stopp-Lösung	– 50 mM EDTA pH 7.0	–	– 10 min bis Tage

2.2.6 Konzentrationsbestimmung

2.2.6.1 Proteine

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Absorptionsmessung, in der Regel wurden 1-cm-Halbmikroküvetten verwendet.

Die Extinktionskoeffizienten von Psl wurden mit der Methode nach Pace (Pace *et al.*, 1995; Pace & Schmidt, 1997) bestimmt. Dazu wurden je fünf Spektren des denaturierten und nativen Proteins, korrigiert gegen den entsprechenden Puffer, gemessen. Als Extinktionskoeffizient für die α - und β -Ketten in 3 M GdmCl wurde der für 6 M berechnete Extinktionskoeffizient verwendet. Die Berechnung erfolgte in allen Fällen nach der Methode von Gill & von Hippel (1989).

2.2.6.2 Denaturierungsmittel

Die Konzentration von GdmCl, Harnstoff und GdmSCN in ihren Stammlösungen und in den Proteinlösungen, mit denen Kinetiken oder Übergänge gemessen wurden, wurden über den Brechungsindex bestimmt. Dazu wurde der jeweilige Nativpuffer und für Proteinlösungen eine Nativkontrolle als Referenz verwendet. Bezeichnet man die Differenz der Brechungsindices der Denaturierungsmittel- und der Referenzlösung als Δn , so berechnet sich die Konzentration nach

Guanidiniumchlorid

$$c/M = 57.147\Delta n + 38.68(\Delta n)^2 - 91.60(\Delta n)^3 \quad (2.1)$$

(Nozaki, 1972)

Harnstoff

$$c/M = 117.66\Delta n + 29.753(\Delta n)^2 + 185.56(\Delta n)^3 \quad (2.2)$$

(John R. Warren, 1966)

Guanidiniumthiocyanat

$$c/M = 40.4\Delta n \quad (2.3)$$

(Takase *et al.*, 1974)

2.3 Präparation von modifizierten Liganden

2.3.1 Synthese der gelabelten Zucker

Die Synthese erfolgte nach der von Baxa *et al.* (1996) für kleine Ansätze modifizierten Vorschrift aus Prakash & Vijay (1983). Dazu wurden in der Regel ca. 4 mg Maltose mit Label in äquimolarer Menge oder in leichtem Unterschuss¹ in 500 µl Methanol gelöst, 20 µl Essigsäure zugegeben und mindestens 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Falls noch unlösliche Anteile sichtbar waren, wurde länger inkubiert. Dann wurde NaCNBH₃ im Überschuss, gelöst in 500 µl Methanol, zugegeben und über Nacht weiter bei 37 °C geschüttelt. Das Produkt wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge bei 35 – 40 °C getrocknet. Das Pellet wurde in 100 µl eines Wasser-Acetonitril-Gemischs (1 : 1), das etwas Essigsäure (0.5 %(*v/v*)) enthielt, aufgenommen. Alle Reagenzien, Reaktionsansätze und Produkte wurden grundsätzlich im Dunkeln aufbewahrt.

Da Benzyl-cysteinyl-acridon nicht in Methanol löslich ist, wurde hier Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel für alle Reaktanden verwendet. Statt in der Vakuumzentrifuge wurde das Produkt gefriergetrocknet.

2.3.2 Reinigung der gelabelten Zucker

Die Reinigung der Reaktionsprodukte erfolgte über präparative reversed-phase HPLC auf einer GROM Sil ODS-Säule mit Wasser (Laufmittel A) und Acetonitril-Wasser-Gemisch (70:30 (*v/v*), Laufmittel B) als Laufmittel. Beide Laufmittel wurden angesäuert, entweder mit 0.5 %(*v/v*) Essigsäure oder mit 0.1 %(*v/v*) Trifluoressigsäure (TFA). In der Regel führte TFA zu einer schärferen Auftrennung der Peaks. Die verwendeten Gradienten können Tabelle 2.1 entnommen werden, die Abkürzungen sind in Abschnitt 3.4.2 auf Seite 90 erläutert. Es wurden jeweils mehrere Läufe durchgeführt, um die Säule nicht zu überladen.

Tabelle 2.1: Gradienten zur Reinigung der gelabelten Maltose

	Anteil Laufmittel B	Länge	Flussrate / ml min ⁻¹
Malt-AspAMC	7 – 20 %	6.4 SV ^a	1.0
Malt-AMC	10 – 30 %	6.7 SV	1.0
Malt-Aminoacridin	10 – 30 %	10 SV	1.0
Malt-AA	10 – 30 %	12 SV	1.0
Malt-BA	20 – 35 %	12 SV	1.1
Malt-LAA	20 – 35 %	12 SV	1.1
Malt-BCAA	25 – 40 %	12 SV	1.2

^aSäulenvolumen SV = 3.14 ml

Es wurden Fraktionen zu 1 ml gesammelt und, sofern sie Label enthielten, entsprechend vereinigt, gefriergetrocknet oder in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei –20 °C in Eppendorf-Gefäßen eingefroren.

¹Diese Reaktionsbedingungen wurden aus der Literatur entnommen. Eine Optimierung fand in dieser Arbeit nur für AspAMC statt, zu den Ergebnissen siehe Abschnitt 3.4.2 auf Seite 90.

2.4 Protein-Liganden-Bindung

Alle Untersuchungen zur Protein-Liganden-Bindung wurden mit PslP durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, wurde die erste Präparation verwendet, bei der die Isoformen nicht getrennt wurden.

2.4.1 Titrations mit Detektion der Proteinfluoreszenz

Für nicht fluoreszierende Liganden wurde zur Untersuchung der Bindung die Proteinfluoreszenz detektiert. Dazu wurden aus einer Liganden-Stammlösung Verdünnungen hergestellt, in der Regel im Verhältnis 1 : 2, 1 : 3 und 1 : 8 zur Stammlösung. Dann wurden 2 ml einer Proteinlösung (20 µg/ml) in einer Makro-Fluoreszenzküvette vorgelegt und auf 20 °C temperiert. Durch Zugaben von je 5 µl der verschiedenen Verdünnungen wurde die Ligandenkonzentration stufenweise erhöht. Die Volumenzunahme betrug am Ende maximal 10 %.

Die Anregung erfolgte bei 280 nm mit einer Spaltbreite von 3 nm, die Detektion der Emission bei 349 nm mit 5 nm Spaltbreite, aufgezeichnet wurde grundsätzlich *S/R*.

2.4.2 Titrations mit Detektion der Labelfluoreszenz

2.4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Fluoreszenzfarbstoffen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Absorptionsmessung, in der Regel wurden 1-cm-Halbmikroküvetten verwendet. Sofern die Extinktionskoeffizienten nicht aus der Literatur bekannt waren, wurden die Farbstoffe im Milligramm-Maßstab in Methanol eingewogen und die Absorptionsspektren vermessen.

2.4.2.2 Screening

Um einen Überblick über das Verhalten der verschiedenen gelabelten Zucker zu erhalten, wurden Zweipunktmessungen durchgeführt. Dazu wurde in einer Halbmikroküvette der Ligand in einer für Fluoreszenzmessungen geeigneten Konzentration (siehe Tabelle 3.4 auf Seite 94) in Nativpuffer in einem Gesamtvolumen von 834 µl vorgelegt und auf 20 °C temperiert. Von dieser Lösung wurden Emissions- und Anregungsspektren aufgenommen und bei den Wellenlängen der Maxima, teilweise auch von Emissionsschultern, alle Kombinationen der Anregungs- und Emissionspolarisatoren in den Stellungen 0 ° und 90 ° mehrmals vermessen. Dann wurden 200 µl einer Psl-Stammlösung (etwa 10 mg/ml) zugegeben und erneut gemessen. Von allen Mehrfachbestimmungen wurden Mittelwerte gebildet und daraus G-Faktor, Gesamtintensität und Anisotropie berechnet (siehe Abschnitt 2.8.1 auf Seite 38). Die verwendeten Wellenlängen sind in Tabelle 3.4 auf Seite 94 aufgeführt.

2.4.2.3 Fluoreszenztitration

Dazu wurde der Ligand wie beim Screening in einer gerührten Küvette in einem Volumen von 834 µl (für Malt-AMC: 1000 µl und für Malt-AspAMC: 600 µl) bei 20 °C vorgelegt und von der Protein-Stammlösung (Konzentration etwa 10 mg/ml) Verdünnungen hergestellt. Von allen Lösungen wurden in der Regel je viermal 3 µl zugegeben,

anschließend von der Stammlösung auch größere Volumina. Eine Volumenkorrektur der Intensität wurde in jedem Fall durchgeführt. Die Anregung erfolgte im langwelligsten Maximum des jeweiligen Anregungsspektrums, die Detektion an den Peaks bzw. Schultern der Fluoreszenzemission. Bei den Aminoacridon-Derivaten, die mehrere Peaks bzw. deutliche Schultern besitzen, wurden zwei Emissionswellenlängen untersucht (siehe Tabelle 3.4 auf Seite 94). Pro Messpunkt wurden mindestens drei Werte bei je einer Sekunde Integrationszeit gemessen, so dass die relative Standardabweichung, wie sie von der Software (siehe Abschnitt 2.1.6 auf Seite 22) berechnet wurde, unter 0.1 % lag. Nach jeder Zugabe wurde 5 Minuten gewartet, um die Gleichgewichtseinstellung sicherzustellen.

Es wurden sämtliche Kombinationen der Polarisatorstellungen vermessen, daraus die G-Faktoren, Gesamtintensität und Polarisation berechnet und die Intensitätswerte volumenkoriert.

2.4.3 Affinitätschromatographie

2.4.3.1 Batchverfahren

Zur Abschätzung der Bindekapazität von Sephadex G 100 wurde eine Suspension mit einer Konzentration von etwa 33 mg/ml Sephadex in Nativpuffer hergestellt und davon 150 μ l (5 mg) mit Psl in Nativpuffer in Konzentrationen von 3 ng/ml bis 100 μ g/ml über Nacht inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (15 min bei 14000 rpm in der Eppendorf-Zentrifuge) und der Überstand auf einem silbergefärbten SDS-Gel (siehe Abschnitt 2.2.5 auf Seite 26) analysiert.

2.4.3.2 Säulenchromatographie

Superdex 200 prep grade wurde in eine Leersäule des Typs Pharmacia HR 10/10 gegossen und äquilibriert. Das aus den Maßen des Gelbetts berechnete Säulenvolumen betrug 6.5 ml. Nach dem Auftrag der Probe wurde zunächst mit Nativpuffer gewaschen, dann mit 0.2 M Glucose eluiert. Nach einem Zwischenschritt mit Nativpuffer wurde unspezifisch gebundenes Protein durch Waschen mit 0.5 M NaOH ausgewaschen. Die verwendeten Säulen- und Puffervolumina sowie Flussraten sind bei den einzelnen Ergebnissen angegeben.

2.4.4 Bindungsmessung durch Ultrafiltration

Das Prinzip des Assays ist die Trennung von gebundenem und nichtgebundenem Liganden durch Ultrafiltration an einer Membran, die den freien Liganden durchlässt, das Protein und den proteingebundenen Liganden jedoch zurückhält. Die Lösung wird durch Zentrifugieren in „Centrifree“-Röhrchen durch die Membran getrieben, für jede Ligandenkonzentration wurde bei gleicher Proteinkonzentration ein eigenes Röhrchen verwendet.

Vom zu untersuchenden fluoreszierenden Liganden wurden Lösungen mit den Konzentrationen 0.25, 0.5, 1, 2 und 4 μ M hergestellt (je 4 ml in Nativpuffer) und zur Kontrolle, ob das Maltosekonjugat an die Membran bindet, bzw. zur Absättigung der Membran zweimal etwa 100 μ l davon durch je zwei mit Nativpuffer äquilibrierte Centrifree-

Röhrchen zentrifugiert (5 – 8 min). Die Konzentration des Liganden in Überstand und Filtrat wurde mit Fluoreszenz vermessen und mit einer Kalibrationsgerade verglichen. Bei der ersten Zentrifugation ging dabei eine geringe Menge Ligand verloren, beim zweiten Mal war die Membran offensichtlich abgesättigt. Als weiteres Kontrollexperiment wurden einige der Ligandenlösungen parallel zu den proteinhaltigen Lösungen in Eppendorf-Gefäßen inkubiert und wiederum vermessen, um einen Verlust durch Ablagerung an die Reaktionsgefäße auszuschließen.

Zur Bindungsmessung wurde zu je 350 µl jeder Ligandenlösung die im Ergebnisteil angegebene Proteinmenge hinzugefügt. Die Lösungen wurden mindestens 15 min bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Gefäß inkubiert, dann wurden zur Doppelbestimmung von jeder Lösung zweimal 300 µl in je ein Centrifree-Röhrchen, das mit der selben Ligandenkonzentration vorbehandelt war, überführt. Nachdem mindestens 100 µl durchzentrifugiert waren, wurde die Konzentration an Ligand im Filtrat mit der Kalibrationsgerade verglichen.

2.4.5 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Proteinstammlösung wurde gegen Nativpuffer dialysiert und alle weiteren Arbeiten mit diesem Dialysepuffer durchgeführt. Das lyophilisierte Malt-AspAMC wurde in Puffer aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Der Ligand wurde in die Probenspritze des Titrationskalorimeters überführt und schrittweise in die vorgelegte Proteinlösung sowie zur Bestimmung der Verdünnungsenthalpie des Liganden in Dialysepuffer titriert und die Wärmeentwicklung registriert. Die Messung fand bei 25 °C statt, das Volumen der Messzelle betrug 1.4478 ml.

2.4.6 Wechselwirkung von Erbsenlektin mit Erythrozyten

2.4.6.1 Hämagglutinationsassay

Der Hämagglutinationsassay wurde in Anlehnung an die Vorschriften in van Eijsden *et al.* (1992) und Prasthofer *et al.* (1989) durchgeführt. Einer abgelaufenen Blutkonserve (bis zu einem Monat abgelaufen, Typ AB+) wurden 2 ml mit einer sterilen Plastikspritze entnommen und vier mal mit ungefähr 25 ml PS-Puffer gewaschen. Die Blutzellen wurden dazu in 50 ml-Kunststoff-Zentrifugenröhrchen durch vorsichtiges Schwenken im Puffer suspendiert, im AM50.14-Rotor 20 min bei 4 °C und 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette möglichst vollständig abgenommen. Nach dem letzten Waschen wurde die Zellsuspension mit PS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 ml eingestellt. Dies wird im Folgenden als 10 % (v/v) Erythrozytenlösung bezeichnet, da die verwendeten Blutkonserven laut Etikett 50 % (v/v) Erythrozyten enthielten. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und möglichst frisch verwendet.

Für den Assay wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit rundem Boden verwendet. In die erste Vertiefung wurden 250 µl PS-Puffer gegeben, in Vertiefung 4 – 12 je 125 µl. In die Vertiefungen 2 und 3 wurden je 250 µl der Probe gegeben. Ausgehend von Vertiefung 3 wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, indem je 125 µl aus jeder Vertiefung in die jeweils nächste überführt und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt wurden. Für eine Verdünnungsreihe wurde immer die gleiche Spitze verwendet. Anschließend wurden in Vertiefung 3 – 11 noch 125 µl PS-Puffer zugegeben, um überall

das gleiche Endvolumen zu erhalten. Nach Zugabe von 25 µl 10%iger Erythrozytenlösung in jede Vertiefung (Endkonzentration 0.9 %) wurden die Assays bei Raumtemperatur 1.5 bis 2 Stunden inkubiert und anschließend ausgewertet.

Zur Auswertung wurden die Mikrotiterplatten zum einen fotografiert oder eingescannt, zum anderen mit dem Auge beurteilt. In den Vertiefungen mit ausreichender Konzentration an aktivem Psl bildet sich ein hellrotes Häutchen aus quervernetzten Erythrozyten auf der Lösung, das den ganzen Querschnitt der Vertiefung überspannt. Ist die Konzentration nicht hoch genug, so sinken die Blutzellen ab und bilden einen dunklen Punkt am Boden der halbkugeligen Vertiefung. Zählt man nun die Vertiefungen, bei denen noch Hämagglutination beobachtet wird, so erhält man aus der entsprechenden Verdünnung ein halbquantitatives Maß für die Konzentration an aktivem Lektin; dies ist die in der Literatur beschriebene Auswertemethode.

Bei gründlicher Inspektion der Verdünnungsreihen kann man jedoch auch Zwischenstufen zwischen keiner und vollständiger Agglutination unterscheiden. Dabei reicht die Lektinkonzentration offenbar nur aus, um einen Teil der Zellen zu vernetzen, der Rest sinkt auf den Boden. Solches Verhalten wurde jeweils in höchstens einer Vertiefung je Verdünnungsreihe beobachtet. Je nachdem ob hier eher „schon etwas Sedimentation“ oder eher „noch etwas Agglutination“ zu sehen waren, wurde der Verdünnungsreihe Agglutination in $n + 0.7$ oder $n + 0.3$ Vertiefungen zugeordnet.

Von jeder Proteinprobe und einer parallelen Nativkontrolle bekannter Konzentration wurden mehrere Verdünnungsreihen angefertigt und ein Mittelwert N der wie oben bestimmten gebrochenen Anzahl von Vertiefungen mit Agglutination berechnet. Daraus ergibt sich näherungsweise die Konzentration c mit Hilfe der Formel

$$\ln c = (N + a) \ln 2 \quad (2.4)$$

Der Faktor a wird aus dem Vergleich mit der Nativkontrolle errechnet. Siehe dazu auch Abschnitt 3.2.4.2 auf Seite 64.

2.4.6.2 Hämagglutinationsexperimente mit photometrischer Auswertung

Dazu wurden eine Erythrozytenlösungen verschiedener Konzentration in PS-Puffer mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen in Halbmikro-Plastikküvetten bzw. in Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Küvetten wurden teilweise ruhend aufbewahrt, teilweise wie die Mikrotiterplatten auf einem ELISA-Schüttler gerüttelt und regelmäßig vermessen. Gemessen wurde die Lichtstreuung bei 620 nm oder 490 nm im Absorptionsspektrometer bzw. im Absorptions-ELISA-Reader.

2.4.6.3 Hämolyseaktivität von Erbsenlektin

Zum einen wurden die Überstände von 2 Tage alten Hämagglutinationsassay verwendet, zum anderen wurde eine 1%ige Erythrozytenlösung 3 Tage lang mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen unter leichtem Schütteln in Eppendorf-Gefäß bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 30 min bei 4 °C mit 1000 rpm abzentrifugiert. Von den Überständen wurde die Absorption bei 413 nm bestimmt.

2.5 Charakterisierung von Proteinen mit Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spex-Fluoromax-Spektrofluorometer mit thermostatisiertem Probenhalter durchgeführt. Für Spektren, Titrations-, Übergangs- und Denaturierungskinetiken wurden Quarzküvetten und für Renaturierungskinetiken UV-durchlässige, fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvetten verwendet. Bei Messungen unter Raumtemperatur wurde der Probenraum mit trockener Druckluft gespült, um Kondensation zu verhindern.

Die Bedingungen für die Messung von De- und Renaturierungsübergängen mit Fluoreszenzspektroskopie sind in Abschnitt 2.7.2 auf Seite 35 beschrieben.

2.5.1 Spektren

Fluoreszenzspektren wurden bei 10 °C mit einer Anregungswellenlänge von 282 nm und Detektion der Emission von 290 bis 450 nm aufgenommen, dabei wurde alle 0.5 nm mit 0.5 s gemessen. Die spektrale Bandbreite betrug 3 nm für die Anregung und 5 nm für die Emission. Alle Spektren wurden gegen die jeweilige Pufferfluoreszenz korrigiert².

2.5.2 Denaturierungskinetiken in Guanidiniumchlorid und Guanidiniumthiocyanat

Denaturierungspuffer mit entsprechender Menge Denaturierungsmittel wurde in einer rührbaren Vollküvette vorgelegt und temperiert. Dann wurde eine ProteinstammLösung geeigneter Konzentration im Verhältnis von 1 : 7 bis 1 : 130 zu einem Endvolumen von 2.5 ml im Probenraum zupipettiert, um die gewünschte Konzentration an Protein (2.5 – 100 µg/ml) und GdmCl zu erhalten. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette durchmischt und die Messung gestartet, sobald der Deckel geschlossen war. Der erste Messpunkt der Kinetik liegt dadurch 3 bis 5 Sekunden nach dem Beginn des Pipettierens.

Die Anregungswellenlänge war 280 nm mit einer Bandbreite von 3 nm, die Emission wurde bei 315 nm mit einer Bandbreite von 4 nm detektiert. Es wurde grundsätzlich das rohe Signal S und das um die Lampenintensität korrigierte Signal S/R aufgezeichnet. Während der ersten 510 s wurde alle 10 s mit einer Integrationszeit von 1 s gemessen. Dann wurde, je nach erwarteter Denaturierungszeit, 14000 – 50400 s, also knapp 4 bis 14 Stunden, mit einem Messpunktabstand von 60 s gemessen, in beiden Fällen mit Antibleach. Die beiden Messdateien wurden anschließend zu einem Datensatz vereinigt. War die Denaturierung nach dem Ende der zweiten Messung noch nicht abgeschlossen, so wurde eine dritte Messung mit den gleichen Parametern wie die zweite angeschlossen.

2.5.3 Denaturierungskinetiken in Harnstoff

Zur Quantifizierung nativ strukturierter Proteine in Renaturierungsansätzen wurden Denaturierungskinetiken in Harnstofflösung bei pH 2.5 oder 1.8 durchgeführt (siehe auch

²Auf die Korrektur der Gerätecharakteristik, d.h. der Abhängigkeit der Photomultiplier-Sensitivität und der Lichtdurchlässigkeit der Optik von der Wellenlänge, wurde verzichtet.

Abschnitt 2.7.5 auf Seite 37 und Abschnitt 3.2.4.2 auf Seite 64). Dazu wurde Harnstoffpuffer 1 oder 2 vorgelegt und auf 25 °C (Harnstoffpuffer 1) bzw. 10 °C (Harnstoffpuffer 2) temperiert. Die Denaturierung wurde durch Verdünnung der gleich temperierten Probenlösung im Verhältnis 1 : 10 (Ausbeuten mit Puffer 2) oder 1 : 4 (Kinetiken mit Puffer 1 und 2) eingeleitet und die Messung während des Aufziehens gestartet. Da die Proteinkonzentration bei der Renaturierung in der Regel 10 µg/ml betrug, ergab sich durch die Verdünnung in Harnstoffpuffer eine Konzentration von 2.5 µg/ml, bei den Ausbeuten 2 oder 4 µg/ml.

Die Anregung erfolgte bei 282 nm (3 nm Spaltbreite), die Detektion (nur *S/R*) bei 315 nm (5 nm Spaltbreite) mit Antibleach. Es wurde 600 s (Puffer 1) bzw. 400 s (Puffer 2) lang alle 10 s für 1 s gemessen. Da bei der ersten Messung die Abdeckung der Probenkammer geöffnet war, wurde der erste Messpunkt grundsätzlich verworfen.

In einigen Fällen wurden Denaturierungskinetiken unter den selben Bedingungen mit anderen Puffern durchgeführt. Abweichende Details sind dann bei den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt.

2.5.4 Renaturierungskinetiken

Dazu wurden in einer gerührten Kunststoffküvette entsprechende Renaturierungspuffer vorgelegt und auf 10 °C temperiert. Die Renaturierung wurde durch Verdünnung (mit dreimaligem Aufziehen der Pipette) einer Lösung von denaturiertem Protein in mindestens 3 M GdmCl initiiert. Die Messung wurde während des Mischens gestartet und der erste Messpunkt, wenn nötig, verworfen. Das Verdünnungsverhältnis betrug zwischen 1 : 100 und 1 : 40 bei einer Zielkonzentrationen von 10 µg/ml Psl, bei konzentrationsabhängigen Messungen (1 – 30 µg/ml) auch bis zu 1 : 230 bzw. 1 : 17. Für Nativkontrollen wurden entsprechend konzentrierte native Proteinlösungen verwendet.

Die Anregungswellenlänge war 282 nm mit einer Bandbreite von 3 nm, die Emission wurde bei 315 nm mit einer Bandbreite von 5 nm detektiert und dabei *S* und *S/R* aufgezeichnet. Wie bei den Denaturierungen in GdmCl wurde die Messzeit je nach erwarteter Reaktionsdauer variiert und bei mehrstündigen Kinetiken eine zweite Phase mit längerem Messpunktabstand (1, 5 oder 10 min) angeschlossen. Zu Beginn wurde alle 10 s für 1 s gemessen, in allen Fällen mit Antibleach.

2.6 Circular dichroismus-Spektroskopie

2.6.1 Spektren

Die in dieser Arbeit diskutierten Spektren wurden in Dertinger (1996); Pankoke (1997) an einem AVIV CD Spektropolarimeter 62 DS mit thermostatisiertem Probenhalter (Aviv, Lakewood, USA) aufgenommen. Die Messbedingungen waren: Bandbreite 1 nm, ein Messpunkt pro 0.5 nm, Wellenlängenvorschub 0.5 nm/s, Akkumulierung von 9 Wiederholungen, 25 °C.

2.6.2 Denaturierungskinetiken

Nach der Initiation der Denaturierung in einem Eppendorf-Gefäß wurden 200 µl der Lösung sofort in eine vortemperierte Küvette mit 1 mm Schichtdicke überführt, in das Spektrometer gestellt und die Messung gestartet. Die Proteinkonzentration betrug 85 µg/ml. Bei 228 nm (Bandbreite 10 nm) wurde alle 20 s ein Messpunkt aufgenommen. Die Empfindlichkeit war $5 \cdot 10^{-3}$ degree, die Response-Zeit 16 s.

2.7 Methoden zur Renaturierung von Erbsenlektin

2.7.1 Denaturierungsansätze

Konzentrierte denaturierte Proteinlösungen für Renaturierungsexperimente wurden hergestellt, indem einige hundert Mikroliter der nativen Stammlösung (ungefähr 10 mg/ml) mit dem vierfachen Volumen Denaturierungspuffer (etwa 8 M GdmCl) vermischt, mindestens fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

Daraus wurden für die einzelnen Experimente Verdünnungen mit mindestens 3 M GdmCl hergestellt, indem die denaturierte Stammlösung in ein berechnetes Gemisch aus Nativ- und Denaturierungspuffer verdünnt wurde. Anschließend wurde ein UV-Spektrum aufgenommen und die Konzentration bestimmt. Das Spektrum liefert eine zusätzliche Kontrolle, ob die Lösung vollständig denaturiert ist, weil das denaturierte Spektrum eine deutlich erkennbare andere Gestalt als das native hat.

2.7.2 Denaturierungsübergänge mit Fluoreszenzdetektion

Zur Messung von Übergängen wurden möglichst gleich konzentrierte Lösungen von denaturiertem und nativem Protein hergestellt (etwa 1 mg/ml für Übergänge bei 10 µg/ml) und Lösungen mit den gewünschten GdmCl-Konzentrationen in 2-ml-Eppendorf-Gefäß vorbereitet und auf 10 °C temperiert. Dann wurden je 5 Reaktionsgefäße aus dem Wasserbad genommen, die Deckel geöffnet und die Proteinlösung in die Deckel pipettiert. Sofort danach wurden die Deckel geschlossen und die Gefäße auf dem Kopf auf einen Vortex (höchste Stufe) gedrückt. Anschließend wurden sie wieder ins Wasserbad überführt.

Bei den Übergängen mit 2.5 und 40 µg/ml wurden zum Starten abweichend einzelne Gefäße geöffnet, die Proteinlösung direkt in die Lösung pipettiert und zwei bis dreimal aufgezogen. Das Gefäß wurde verschlossen und kurz auf dem Vortex gemischt. Dann wurden die Ansätze die angegebene Zeit bei 10 °C im Wasserbad und nach mehr als einer Woche im auf 10 °C temperierten Kühlbrutschrank inkubiert.

Zur Messung wurden die Lösungen nacheinander, beginnend mit der kleinsten GdmCl-Konzentration, in eine auf 10 °C vortemperierte gerührte Halbmikro-Quarzglasküvette überführt und für 2 – 5 min temperaturäquilibriert³. Die Messung wurde mit 282 nm Anregungswellenlänge (Spaltbreite 3 nm) und 315 nm Emissionswellenlänge (Spaltbreite 5 nm) im Titrationsmodus mit maximaler Standardabweichung von 0.1 % und maximal

³Die notwendige Äquilibrierzeit war von der Außentemperatur abhängig und wurde jeweils mit einem elektronischen Temperaturfühler in der Küvette ermittelt.

10 Einzelmessungen durchgeführt. Die genaue GdmCl-Konzentration jeder Probe wurde über den Brechungsindex der Lösung bestimmt. Die Küvette wurde erst nach Erreichen der höchsten GdmCl-Konzentration einer De- oder Renaturierungsmessreihe mit Wasser ausgespült.

2.7.3 Messung von Renaturierungskinetiken und Ausbeuten

Das Vorgehen bei Kinetiken, die ununterbrochen im Fluoreszenzspektrometer beobachtet wurden, ist in Abschnitt 2.5.4 auf Seite 34 beschrieben. Ansonsten wurde die Renaturierung in Reaktionsgefäßen durchgeführt und in Intervallen Proben genommen und untersucht. Auf die gleiche Weise wurden auch die Renaturierungsausbeuten bei verschiedenen Pufferbedingungen untersucht.

Dazu wurde denaturiertes Protein typischerweise im Verhältnis 1 : 40 mit dem jeweiligen Renaturierungspuffer in auf 10 °C vortemperierten Reaktionsgefäßen verdünnt, gevortext und bei 10 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 0.4 µM (10 µg/ml für komplettes Psl). Zu den jeweils angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und mittels Fluoreszenz-Denaturierungskinetik, analytischer Gelfiltration, Glutaraldehyd-Quervernetzung oder Hämagglutinationsassay oder Kombinationen dieser Methoden analysiert. Fluoreszenzmessungen bei langsamen (d. h. Tage dauernden) Kinetiken und zur Bestimmung von Renaturierungsausbeuten wurden bei 20 °C mit Harnstoffpuffer 1 durchgeführt, schnellere Kinetiken direkt aus dem Renaturierungsansatz bei 10 °C mit Harnstoffpuffer 2 (Abschnitt 2.7.5 auf der nächsten Seite). Für den Hämagglutinationsassay wurden die Renaturierungsansätze wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben aufgearbeitet. Die Quervernetzung (Abschnitt 2.7.6 auf der nächsten Seite) und Gelfiltration (Abschnitt 2.2.4 auf Seite 26) erfolgte direkt aus dem bei 10 °C inkubierten Renaturierungsansatz.

2.7.4 Hämagglutinationsassay zur Bestimmung von Renaturierungsausbeuten

Dazu wurden 20 nmol (bezogen auf Monomere) denaturiertes Protein (0.5 mg) in 50 ml Nativpuffer verdünnt, um die Endkonzentration von 0.4 µM Protein (10 µg/ml) zu erhalten. Zur Untersuchung des Verhaltens der Einzelketten am Beginn der Renaturierung wurden je 20 nmol PslP- α -B und PslP- β getrennt in Erlenmeyerkolben in 25 ml Nativpuffer verdünnt, durch kräftiges Schwenken gemischt und für die angegebene Zeit separat inkubiert. Danach wurden die Lösungen im Erlenmeyerkolben vereinigt, vermischt und in ein Kunststoff-Reaktionsgefäß überführt. Diese Schritte fanden im Kühlraum bei etwa 4 °C statt.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in einem Kryostaten bei 10 °C inkubiert. Nach der angegebenen Zeit bzw. Abschluss der Reaktion wurde die Lösung mittels Centriplus-Zentrifugation aufkonzentriert und in den Hämagglutinationstest eingesetzt. Ein Teil der nicht konzentrierten Renaturierungsansätze wurde für Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken (siehe Abschnitt 2.7.5 auf der nächsten Seite) verwendet.

Zur Konzentrierung wurde pro Reaktionsansatz ein Centriplus-YM-30-Röhrchen zweimal mit einige Millilitern Nativpuffer gewaschen. Dann wurden die Röhrchen vollständig mit der jeweiligen Proteinlösung gefüllt (etwa 10 ml) und im F28/50-Rotor bei 4840 rpm

und 4 °C so lange zentrifugiert (bis zu 2 Stunden), bis nur noch etwa 1 ml über der Membran stand. Dann wurde mit neuer Proteinlösung aufgefüllt und die Prozedur wiederholt, bis der ganze Renaturierungsansatz auf 1 – 2 ml eingengt war. Insgesamt dauerte das Aufkonzentrieren von 50 ml etwa 12 Stunden. Einige Milliliter der Ausgangslösung wurden aufbewahrt, um UV-Spektren und Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken zur Quantifizierung nativen Proteins (siehe Abschnitt 2.7.5) durchführen zu können.

Die konzentrierten Proben wurden (teilweise nach einigen Stunden Lagerung im Kühlschrank) innerhalb einer Messreihe auf gleiches Volumen gebracht und in den Hämagglutinationsassay (siehe Abschnitt 2.4.6 auf Seite 31) eingesetzt.

2.7.5 Quantifizierung nativen Proteins durch Doppelsprungexperimente

Hierzu wird denaturiertes Protein in Renaturierungspuffer verdünnt und für eine gewisse Zeit inkubiert. Dann erfolgt der zweite Sprung in Denaturierungsbedingungen, die Amplitude der Denaturierungskinetik ist ein Maß für die Konzentration nativen Proteins (siehe Abschnitt 3.2 auf Seite 46).

Die Methode wurde in zwei Varianten angewandt. Zur Messung von Ausbeuten am Renaturierungsendpunkt und für Langzeitkinetiken, die auch mit dem Hämagglutinationstest vermessen werden konnten, wurde bei 20 °C und in Harnstoffpuffer 1 gearbeitet. Die Proben, deren Renaturierung wie in Abschnitt 2.7.3 auf der vorigen Seite beschrieben eingeleitet worden war, wurden dazu für einige Minuten in ein Wasserbad mit 20 °C überführt und anschließend vermessen.

Für schnellere Kinetiken wurden Kunststoff-Reaktionsgefäße mit 10 – 30 ml Nativpuffer gefüllt und im Kryostaten auf 10 °C temperiert. Dann wurde denaturierte Proteinlösung zu einer Endkonzentration von 0.39 µM (10 µg/ml für komplettes Protein) zugegeben, gevortext und das Gefäß sofort wieder ins Wasserbad gestellt. Die Proben wurden sofort bzw. nach der angegebenen Zeit mit einer Pipette entnommen und sofort im Spektrometer bei 10 °C in Harnstoffpuffer 2 denaturiert.

In beiden Fällen wurden Nativkontrollen mit ebenfalls 10 µg/ml ebenso vermessen. Die spektroskopischen Parameter sind in Abschnitt 2.5.3 auf Seite 33 angegeben.

2.7.6 Quervernetzungsexperimente zur Untersuchung der Assoziationskinetik

Die Quervernetzung mit Glutaraldehyd wurde nach der Vorschrift in Rudolph *et al.* (1997) durchgeführt. In 2-ml-Eppendorf-Gefäßen wurden 60 µl 25%igen (*v/v*) Glutaraldehyds vorgelegt und jeweils 1.5 ml der Proteinlösung (10 µg/ml) zugegeben und gevortext. Nach 2 min wurden 50 µl NaBH₄-Lösung (2 M in 0.1 M NaOH) zugegeben, gevortext und mindestens 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden nacheinander 7.5 µl einer 10 %(*w/v*) Natriumdeoxycholatlösung und 19 µl H₃PO₄ zugegeben. Die Mischung wurde kurz bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einer Eppendorf-Zentrifuge 10 min bei 4 °C und 9900 rpm zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 25 µl Crosslink-Auftragspuffer (0.6 M Tris/HCl pH 8.8, 2 %(*w/v*) SDS, 10 %(*w/v*) Glycerin, 0.1 %(*w/v*) Bromphenolblau, 0.5 %(*v/v*) Mercaptoethanol) aufgenommen und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Da der saure Überstand nach der Zentrifugation nicht vollständig entfernt werden konnte,

ergab sich ein Lösung mit einem pH-Wert, bei dem das Bromphenolblau gerade blau gefärbt oder im Umschlagsbereich (pH 3 – 4.6, Lide (1998)) war und die eine recht hohe Salzkonzentration hatte.

2.8 Datenanalyse

2.8.1 Polarisation und Anisotropie

Wird Fluoreszenz mit linear polarisiertem Licht angeregt und werden linear polarisierte Komponenten der Emission gemessen, so können Informationen über Größe und Form von Makromolekülen gewonnen werden. Damit eignet sie sich auch zur Detektion von Interaktionen zwischen Biomolekülen, bei denen sich die effektive Größe ändert (Jameson & Sawyer, 1995).

Die Fluoreszenzpolarisierung p und Fluoreszenzanisotropie A (siehe Cantor & Schimmel, 1980) sind definiert als

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2.5)$$

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 I_{\perp}} \quad (2.6)$$

wobei $I_{\parallel} = I_{vv}$ die Intensität bei vertikalen Anregungs- und Emissionspolarisatoren⁴ und $I_{\perp} = I_{vh}$ die Intensität bei vertikalem Anregungs- und horizontalem Emissionspolarisator ist. Beide Größen enthalten die selbe Information und können gleichwertig verwendet werden. Allerdings hat die Anisotropie den Vorteil, dass sie additiv ist. Das heisst, dass die Anisotropie einer Mischung von fluoreszierenden Molekülen gleich der gewichteten Summe der Anisotropien der Komponenten ist. Gleichzeitig ist der Nenner ihrer Definitionsgleichung die Gesamtintensität des Fluoreszenzlichtes ohne Polarisatoren.

Die Anisotropie für ein starres System ist

$$A_0 = (3\cos^2\zeta - 1)/5 \quad (2.7)$$

wobei ζ der Winkel zwischen dem Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment ist. Sind diese parallel, so ergibt sich 0.4, was als Maximalwert für unbekannte Fluorophore verwendet werden kann für den Grenzfall, dass die Molekülbewegung viel langsamer als die Fluoreszenzlebensdauer ist.

Bei der Messung von Anisotropie oder Polarisation in einem üblichen Fluoreszenzspektrometer muss berücksichtigt werden, dass Spiegel und Monochromatorgitter selbst schon einen Einfluß auf die Polarisierung haben (Chen *et al.*, 1969). Daher berechnet man den G-Faktor $G = I_{hv}/I_{hh}$ und korrigiert damit die Messwerte. Der erste bzw. zweite Index steht dabei wieder für die horizontale (h) oder vertikale (v) Stellung des Anregungs- bzw. Emissionspolarisators. Die gerätekorrigierte Anisotropie erhält man danach mit folgender Formel:

$$A = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}} \quad (2.8)$$

⁴bei horizontaler Anordnung des Lichtwegs

2.8.2 Bindungstitrationen

Bindungstiteration mit Liganden im Überschuss Titriert man eine gegebene Menge Protein P der Konzentration $[P]_0$ mit einem Liganden L, so dass dieser die Gesamtkonzentration $[L]_0$ annimmt, und detektiert die Proteinfluoreszenz, so gilt für die gemessene Fluoreszenz F :

$$F = a_f[P]_f + a_b[P]_b \quad (2.9)$$

Dabei bezeichnet der Index b die gebundene, f die freie Spezies, der Faktor a steht für die spezifische Fluoreszenz unter den gegebenen Bedingungen. Detektiert man stattdessen das Ligandensignal, so gilt das folgende analog, jedoch wieder mit der nicht-detektierten Spezies, also hier dem Protein, im Überschuss.

Die Dissoziationskonstante für das Bindungsgleichgewicht ist (bei einer Bindungsstelle, hier pro Untereinheit)

$$K_D = \frac{[L]_f[P]_f}{[L] \cdot [P]}$$

Aus der Annahme, dass der Ligand im Überschuss vorliegt, folgt $[L]_f = [L]_0$ und damit

$$\begin{aligned} K_D &= \frac{[L]_0([P]_0 - [P]_b)}{[P]_b} \\ K_D[P]_b &= [L]_0[P]_0 - [L]_0[P]_b \\ [P]_b &= \frac{[L]_0[P]_0}{K_D + [L]_0} \end{aligned} \quad (2.10)$$

Mit $[P]_0 = [P]_b + [P]_f$ ergibt Einsetzen von (2.10) in (2.9)

$$F = F_{[L]_0=0} - \Delta F_{max} \frac{[L]_0}{K_D + [L]_0} \quad (2.11)$$

Mit Liganden im Überschuss erhält man statt Gleichung (2.10)

$$[L]_b = \frac{[L]_0[P]_0}{K_D + [L]_0}$$

und damit den Anteil an gebundenem Liganden, $p = [L]_b/[L]_0$ zu

$$p = \frac{[P]_0}{K_D + [L]_0} \quad (2.12)$$

Die Auswertung von Fluoreszenztitrationen erfolgte durch nichtlineare Regression der Daten mit Gleichung (2.11), Gleichung (2.12) diente zur Abschätzung des Dissoziationsgrades zur Konzeption von Bindungsexperimenten.

2.8.3 Integration von Chromatogrammen

Die Chromatogramme von Läufen mit der Anionenaustauscher-Säule, die an der Äkta-Anlage aufgenommen wurden, lagen im Format der Steuersoftware Unicorn vor und

konnten daher mit der darin integrierten Funktion numerisch integriert werden. Die Wahl der Basislinie erfolgte automatisch.

Chromatogramme der Gelfiltration mit der TSK-Säule wurden an der Anlage der Firma Biologic aufgenommen, die keine numerische Integration bietet. Die Daten wurden als ASCII-Dateien exportiert und mit dem Programm Peakfit Version 4 des Herstellers SPSS Inc. ausgewertet. Dabei wurde eine lineare Basislinie und die Peakform „Chromatography, EVal4 Area Tailed“ ausgewählt. Die Breite und Form wurden manuell angepasst und anschließend als variable Parameter belassen.

2.8.4 Nichtlineare Regression von Messdaten

In der Regel wurde die nichtlineare Regression von Messdaten mit dem Programm SigmaPlot (SPSS Software) durchgeführt, das den Marquardt-Levenberg-Algorithmus mit expliziten Funktionen verwendet. In einigen Fällen war keine analytische Lösung der Gleichungen möglich, die sich aus dem verwendeten Modell ergaben, und es sollten mehrere Datensätze global analysiert werden. In diesem Fall wurde das Programm Dynafit (Kuzmic, 1996) verwendet. Von den verwendeten Skripten sind auf den folgenden Seiten beispielhaft je eines für die Auswertung der Denaturierungskinetiken (Abschnitt 3.2.5 auf Seite 78) und eines für die Analyse des Gleichgewichts der reinen und gemischten Isoformen (Abschnitt 3.3.2 auf Seite 85) wiedergegeben.

Denaturierungskinetik

```

[task]
task = fit
data = progress
[mechanism]
N2 <==> N + N : kd
ka N -> U : k_unf

[constants]
kd = 1e-3 ?
ka = 0.001 ?
k_unf = 1.1e-4 ?

[response]
N2 = 24200000 ?
N = 14600000 ?
U = 4300000
[progress]
;error linear 10000, 0.01

directory
./users/denat/pslp-a
extension txt
file 3m2.5ug, 3m5ug, 3m10ug, 3m25ug, 3m50uglate, 3m100ug
vary conc. N2 = 0.11,
0.205, 0.38, 0.85, 1.8,
3.5

[output]
directory
./users/denat/pslp-a/3m
[settings]
<Filter>
  TMax = 100000
[end]

```

Es stehen auch simulate und compare zur Verfügung. Kinetik im Gegensatz zu equilibria.

Nach dem Doppelpunkt stehen die Geschwindigkeitskonstanten, kd für die Reaktion nach rechts, ka nach links.

Werte mit nachfolgendem Fragezeichen sind variable Parameter für die Regression. Die Einheit der Konzentration ist 10^{-6} M.

response bezeichnet das spezifische Signal der betreffenden Spezies.

Hier werden die Daten eingelesen. Die Daten werden gemäß ihrem Fehler gewichtet. Meist wurden keine Fehler zugeordnet und daher keine Gewichtung vorgenommen. In einigen Fällen wurde diese Zeile verwendet. Damit erhalten die Daten einen konstanten Fehler von 10000 zuzüglich 0.01 mal dem Signal. Dadurch werden die Datensätze mit hoher Konzentration geringer gewichtet.

Die Proteinkonzentration wurde anhand der Endwerte angepasst.

In der Default-Einstellung würden die späten Datenpunkte der längeren Kinetiken nicht berücksichtigt.

Isoformgleichgewicht

```
[task]
task = fit
data = equilibria

[mechanism]
A + A <==> AA : Ka dissoc
B + B <==> BB : Kb dissoc
A + B <==> AB : Kab dissoc
[constants]
Ka = 0.5 ?
Kb = 0.2 ?
Kab = 0.3 ?

[concentrations]
B = 4.46

[equilibria]
directory = ./users/dimer
variable A

file 4.46uMBB-Juli.BB
response BB = 6
response AB = 0
response AA = 0
file 4.46uMBB-Juli.AB

response AB = 6
response AA = 0
response BB = 0
file 4.46uMBB-Juli.AA.scaled
response AA = 0.12
response AB = 0
response BB = 0

[output]
directory
./users/dimer/JuliA-out/
[end]
```

Bei `equilibria` stehen nach dem Doppelpunkt die Gleichgewichtskonstanten.

Die Einheit der Konzentration ist 10^{-6} M.

Die Konzentration einer Isoform wurde festgehalten und wird hier als Monomerenkonzentration angegeben.

Die erste Spalte der Dateien ist die Konzentration der monomeren Isoform A.

In dieser Datei sind die Peakflächen des BB-Dimers, daher stammt das Signal hier nur von BB. Der response-Faktor wurde aus den Peakflächen von AA ermittelt.

Hier werden die Peakflächen des AB-Dimers eingelesen.

Die Peakflächen des in der Konzentration variierten AA-Dimers wurden durch 50 geteilt, um während der Regression eine Darstellung in einem Plot zu ermöglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung und Charakterisierung verschiedener Lektinvarianten

3.1.1 Reinigung von prozessiertem Lektin aus Erbsensamen

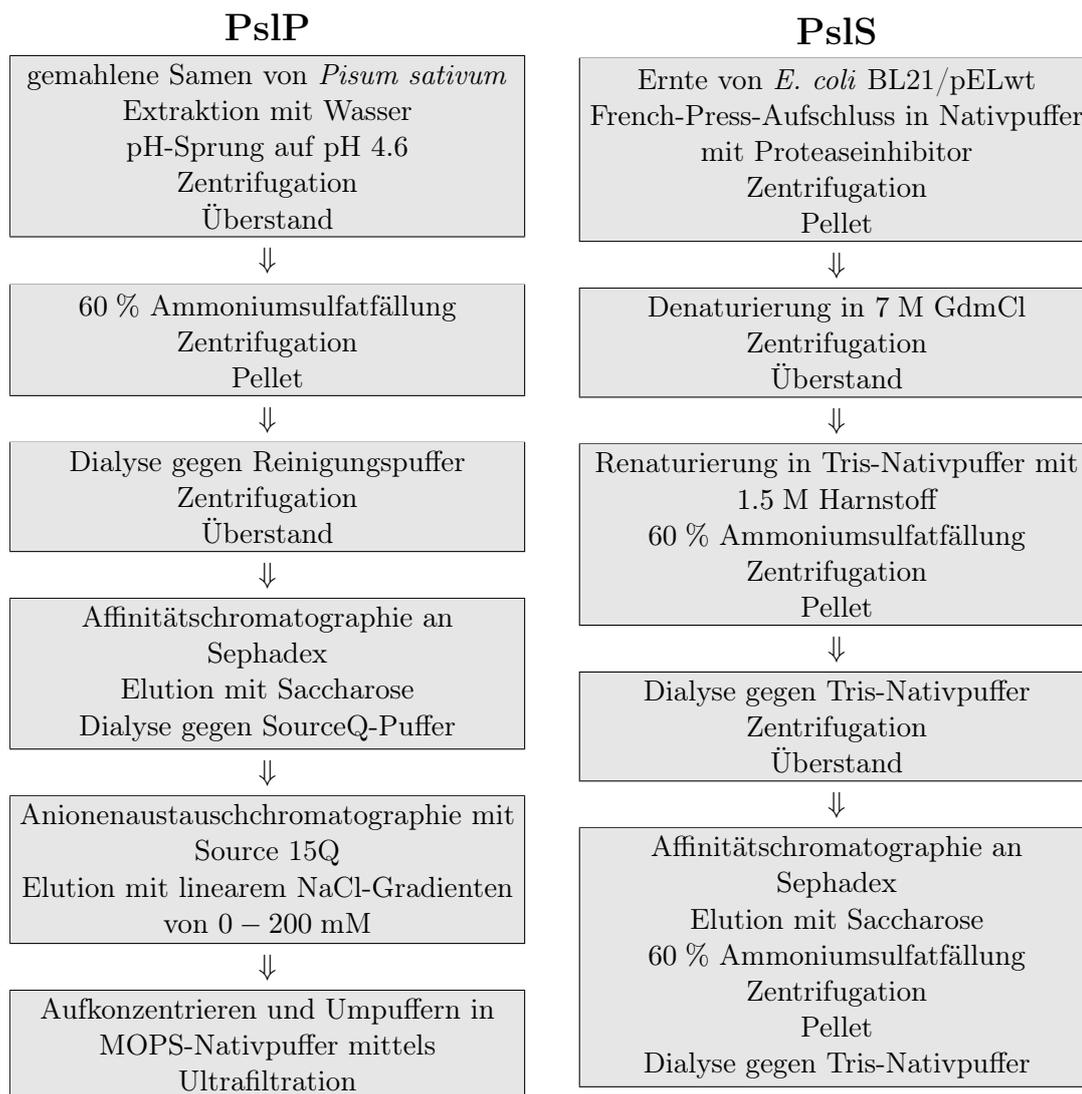
Die Vorschrift zur Reinigung von Psl aus der Erbse ist in der Literatur von unterschiedlichen Autoren im wesentlichen identisch beschrieben worden (Trowbridge, 1974; Entlicher *et al.*, 1970). Sie wurde in dieser Arbeit nach Dertinger (1996) durchgeführt. Zur Trennung der Isoformen wurde die Ionenaustauschchromatographie weiter optimiert.

Eine Übersicht über die Reinigung ist in Tabelle 3.1 auf der nächsten Seite dargestellt. Den ersten deutlichen Reinigungseffekt erzielt bereits der pH-Sprung. Dabei werden vor allem die Speicherproteine des Erbsensamens (Vicilin, Convicilin und Legumin) ausgefällt und entfernt (Wenzel *et al.*, 1993). Die anschließende Ammoniumsulfatfällung dient hier nur der Aufkonzentrierung. Zur Affinitätschromatographie kann Sephadex verwendet werden, eigentlich eine Gelfiltrationsmatrix. Da Sephadex aus quervernetztem Dextran besteht (Pingoud & Urbanke, 1997), also letztlich aus Glucoseeinheiten, die hauptsächlich 1,6-verknüpft sind (Beyer & Walter, 1984), hat es eine hohe Bindekapazität für Psl (siehe auch Abschnitt 3.4.4 auf Seite 98).

Anschließend ist noch ein weiterer Chromatographieschritt zur Entfernung letzter Verunreinigungen notwendig, der gleichzeitig der Trennung der Isoformen dienen kann. Dazu wurde in der Literatur (Trowbridge, 1974; Entlicher *et al.*, 1970) die Verwendung von DEAE-Cellulose als Anionenaustauscher beschrieben, die heute noch als DE52-Material erhältlich ist. In Dertinger (1996) konnten jedoch mit DE52-Chromatographie die Isoformen nicht getrennt werden, da das Protein als einzelner Peak eluierte. Daher wurde eine Optimierung mit anderen Anionenaustausch-Säulen versucht. Mit einer Resource-Q-Säule wurden schon in Dertinger (1996) zwar mehrere Peaks gefunden, diese waren aber nicht separiert, so dass keine saubere Trennung möglich war. In dieser Arbeit konnten nun die Isoformen durch Chromatographie an einer Source-15-Q-Säule getrennt werden. Um eine Präparation zu erhalten, die ausschließlich eine reine Isoform enthielt, musste dieser Chromatographieschritt einmal wiederholt werden. Dabei wurde zwischen den erwarteten Peaks der Isoformen jeweils ein weiterer Peak beobachtet. Wurden Fraktionen, die aus diesem Peak gesammelt wurden, für mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend nochmals chromatographiert, so ergab sich wieder das selbe Elutionsmuster wie beim ersten Auftrag.

Daraus ergibt sich, dass es sich bei diesem mittleren Peak um gemischte Dimere handelt, die je eine α -Kette jeder Isoform enthalten. Offensichtlich liegt bei Psl ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor, das erlaubt, dass sich die ursprünglichen Gleichgewichtsverteilungen zwischen den Isoform-Kombinationen AA, BB und AB wieder einstellt. Dieses Gleichgewicht wurde in Abschnitt 3.3.2 auf Seite 85 näher charakterisiert,

Tabelle 3.1: Reinigungsschema



dort wird auch auf bisher publizierte Daten eingegangen. Durch mehrfaches Rechromatographieren des AB-Peaks konnte nahezu das gesamte Protein in reine Isoformen AA und BB überführt werden.

3.1.2 Reinigung von rekombinant erzeugtem Lektin

Die in Stubbs *et al.* (1986); Prasthofer *et al.* (1989) und van Eijsden *et al.* (1992) veröffentlichten unterschiedlichen Reinigungsvorschriften wurden in Dertinger (1996) und Pankoke (1997) kombiniert und in dieser Arbeit wie in Pankoke (1997) durchgeführt¹. Das Reinigungsschema ist in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Da die Ausbeuten bereits zufriedenstellend waren (150 mg aus 5 Litern Kultur),

¹Allerdings wurde im Denaturierungspuffer auf die unnötigen Metallsalze verzichtet.

wurden die Renaturierungsbedingungen nicht weiter optimiert. Auch auf die Ionenaustauschchromatographie konnte verzichtet werden, da das Protein bereits nach der Affinitätschromatographie auf einem silbergefärbten SDS-Gel keine Verunreinigungen mehr aufwies (Daten nicht gezeigt). Wie man in Abbildung 5 in Pankoke (1997) erkennen kann, war dies auch dort der Fall, der angeschlossene Chromatographieschritt war unnötig. Die Bildung von *inclusion bodies* ist ein relativ spezifischer Vorgang, bei dem wenige Fremdproteine mitgefällt werden (Speed *et al.*, 1996; Betts *et al.*, 1997), und das Protein ist daher schon nach der Renaturierung recht sauber. So ist zu erklären, dass ein einzelner Affinitätschromatographieschritt ausreicht, um eine Proteinpräparation zu erhalten, die auf dem SDS-Gel homogen aussieht.

Die Präparation der inaktiven Mutante PslS N125D ist in Dertinger (1996) beschrieben, es wurde das in dieser Arbeit gereinigte Protein verwendet.

Aufgrund der unterschiedlichen zugrundeliegenden Vorschriften wurden für die Affinitätschromatographie von PslP und PslS unterschiedliche Puffer verwendet (Phosphat- bzw. Tris-Puffer, siehe dazu auch Abschnitt 3.2.1.1 auf Seite 47). Ein Unterschied im Elutionsmuster oder der Ausbeute konnte dabei nicht beobachtet werden. Auch zwischen Sephadex G-75 und G-100 in der Affinitätschromatographie konnte kein Unterschied im Reinigungseffekt beobachtet werden, allerdings ist G-75 mechanisch robuster.

3.1.3 Charakterisierung der Erbsenlektin-Varianten

PslS wurde in der Arbeitsgruppe zuerst von Christine Pankoke (Pankoke, 1997) hergestellt, PslP und die rekombinante Bindungsmutante PslS D125N von Dagmar Dertinger (Dertinger, 1996). In beiden Arbeiten wurden die gereinigten Proteine spektroskopisch charakterisiert. Dabei wurden bei der Mutante ein minimal anderes denaturiertes UV-Absorptionsspektrum festgestellt, was möglicherweise auf vorhandene Reststruktur im denaturierten Zustand hindeutet (Dertinger, 1996; Pankoke, 1997). Da mit der Mutante keinerlei Faltungsuntersuchungen durchgeführt wurden, wurde darauf nicht weiter eingegangen.

In den genannten Arbeiten war PslP immer ein Gemisch der Isoformen. In dieser Arbeit konnten diese nun getrennt werden. Die UV-Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Isoformen und von PslS sind identisch (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 3.1 auf der nächsten Seite sind CD-Spektren im nahen und fernen UV abgebildet. Man kann erkennen, dass die Spektren der Isoformen jeweils gleich sind, während sich das PslS-Spektrum im nahen UV in der Intensität leicht unterscheidet. Diese Abweichung von etwas über 10 % ist signifikant größer als der Fehler in der Bestimmung der Proteinkonzentration. Bei einem Konzentrationsfehler müssten sich außerdem die Kurven im Nulldurchgang bei etwa 260 nm schneiden. Wahrscheinlicher ist ein gewisser Einfluss des Linkers auf das CD-Signal. Allerdings ist kein Aminosäurerest zu erkennen, dem diese Änderung eindeutig zuzuordnen wäre, da in unmittelbarer Umgebung kein Tryptophan liegt und Tyrosine oberhalb 295 nm keine Absorption aufweisen.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass PslP und PslS bis auf die unmittelbare Umgebung des Linkers vermutlich identische Struktur haben. Fluoreszenzspektren von nativem und denaturiertem Psl sind in Abbildung 3.13 auf Seite 61 dargestellt.

3 Ergebnisse

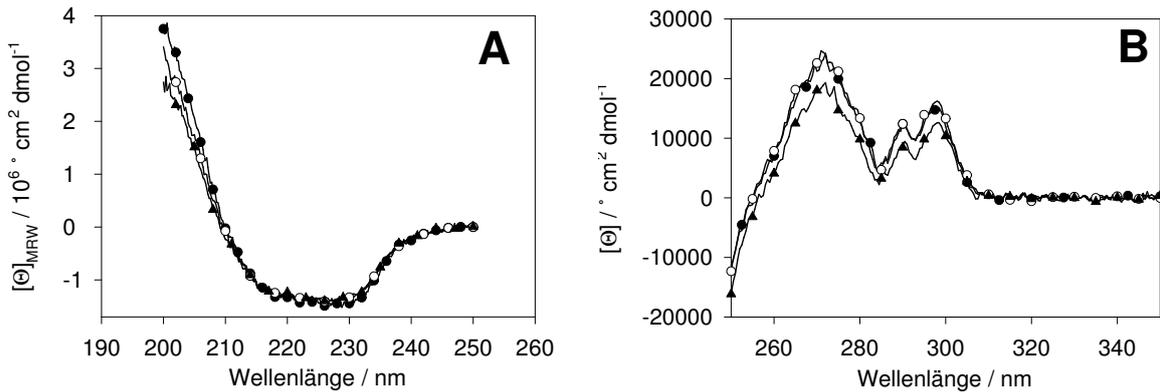


Abbildung 3.1: CD-Spektren von PslP-A (●—●), PslP-B (○—○) und PslS (▲—▲) in MOPS-Nativpuffer bei 20°C. Im fernen UV (A) betrug die Proteinkonzentration 0.09 mg/ml bei einer Schichtdicke von 0.1 cm, im nahen (B) 1.1 mg/ml (Schichtdicke 0.5 cm).

Extinktionskoeffizienten Die Extinktionskoeffizienten bei 280 nm wurden nach der Methode aus Pace *et al.* (1995) bestimmt. Sie betragen $(35900 \pm 700) \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PslP und $(36000 \pm 300) \text{ l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für PslS. Die Zahlen bedeuten dabei den Mittelwert und die Standardabweichung aus den Mehrfachbestimmungen. Die beiden Werte sind im Rahmen des Messfehlers identisch. Dies ist auch zu erwarten, da beide bis auf den Linker die selbe Sequenz und abgesehen von der direkten Umgebung des Linkers vermutlich auch die selbe Struktur haben. Es wurde daher einheitlich der Wert von PslS verwendet. Da in der Praxis in der Regel mit Massenkonzentrationen gerechnet wurde, wurde der massenbezogene Extinktionskoeffizient von $1.41 \text{ ml mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet. Zu seiner Berechnung wurde einheitlich die Summe der Molekularmassen der Polypeptidketten von PslP-B, 25600 g mol^{-1} , zugrundegelegt.

Für die spezifische Absorption von Psl wurde bisher in der Literatur ein Wert von $A_{280 \text{ nm}}^{1\% \text{ 1 cm}} = 15.0$ angegeben, der durch Einwiegen von lyophilisiertem Protein ermittelt wurde (Bhattacharyya *et al.*, 1985). Der in dieser Arbeit gefundene Wert (14.1) weicht davon ab. Da die dazu verwendete Methode genauer ist, kann man davon ausgehen, dass der Unterschied auf Wägefehlern oder Resten von Puffersalzen bei der Gefriertrocknung beruht.

3.2 Faltungsuntersuchungen

Am Beginn der Arbeit wurde gemäß der Aufgabenstellung intensiv nach einem Funktionstest gesucht, mit dem natives Erbsenlektin unter Re- und Denaturierungsbedingungen quantifiziert werden sollte. Diese Untersuchungen brachten zwar einige interessante Zwischenergebnisse, letztlich konnte jedoch keine geeignete Methode gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Versuche spielen daher für die Faltungsuntersuchungen keine Rolle und werden am Ende des Ergebnisteils in Abschnitt 3.4 auf Seite 87 dargestellt.

Somit wurden zur Untersuchung der Faltung hauptsächlich spektroskopische und chromatographische Methoden verwendet. So eignet sich z. B. die Fluoreszenzspektroskopie gut zur Quantifizierung nativen Proteins, wenn Doppelsprungexperimente durchgeführt

bzw. die Denaturierungsamplituden von renaturierten Lösungen gemessen werden (Kiefhaber, 1995): Liegen in einer Proteinlösung native und denaturierte Moleküle neben möglichen Faltungsintermediaten vor, so kann man davon ausgehen, dass diese Intermediate eine deutlich geringere Stabilität aufweisen als die nativen Moleküle. Verdünnt man die Lösung so, dass stark denaturierende Bedingungen erreicht werden, kann daher nur die Denaturierung der nativen Spezies spektroskopisch beobachtet werden, während die Intermediate schon in der Totzeit des Mischens vollständig denaturieren und denaturierte Proteine überhaupt keine Signaländerung² liefern.

Solche Experimente wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Bei sehr langsamen Renaturierungskinetiken oder zur Untersuchung von Faltungsausbeuten wurden die Proben auf 20 °C gebracht und in Harnstoffpuffer 1 (≈ 9 M, Glycin/HCl pH 2.5) denaturiert. Für schnellere Kinetiken, bei denen die renaturierenden Proben nicht erst auf 20 °C gebracht werden konnten, wurde Harnstoffpuffer 2 (≈ 9 M, HCl pH 1.8) bei 10 °C verwendet. Die Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1 : 4 in die Denaturierungspuffer verdünnt, so dass sich eine Harnstoffkonzentration von ungefähr 6.75 M ergab. Diese Bedingungen wurden aufgrund der in Abschnitt 3.2.5 auf Seite 78 dargestellten Ergebnisse gewählt. Die Proteinkonzentration bei den Renaturierungen war üblicherweise 10 $\mu\text{g/ml}$, so dass sie im Denaturierungsschritt noch 2.5 $\mu\text{g/ml}$ betrug. Die Konzentration nativen Proteins war zu verschiedenen Zeiten der Kinetik natürlich noch geringer, so dass die untere Grenze des Messbereichs bzw. eines ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis fast erreicht war.

Die Denaturierungskurven konnten monoexponentiell gefittet werden, und die erhaltene Denaturierungsamplitude wird als Maß für natives Protein verwendet. Dass dies gerechtfertigt ist, ergibt sich aus den Ergebnissen in Abschnitt 3.2.4.2 auf Seite 64 und Abschnitt 3.2.5.2 auf Seite 82.

3.2.1 Stabilität und Renaturierungsausbeuten

3.2.1.1 pH-Wert und Ionenstärke, Pufferwahl

Zur Wahl geeigneter Renaturierungsbedingungen wurden zunächst einige Experimente zur Stabilität und Renaturierungsausbeute von PslS durchgeführt. Dabei wurde natives Protein durch Denaturierung in Harnstoffpuffer 2 bei 20 °C quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite dargestellt. Renaturierung ist zwischen pH 5 und pH 8 möglich, mit guter Ausbeute allerdings nur oberhalb pH 6. Oberhalb pH 8 ist Mn^{2+} zunehmend unlöslich, wird als $\text{Mn}(\text{OH})_2$ gefällt und zu Braunstein umgewandelt. Daher konnten keine stabilen Renaturierungspuffer mit pH-Werten über 8 hergestellt werden, was verlässliche Messungen der Proteinfluoreszenz in ihnen unmöglich macht; in den braunsteinhaltigen Lösungen konnte jedoch keine Renaturierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wird deutlich, dass pH-Werte um 7 die besten Ausbeuten liefern. Um genauere Aussagen zu treffen, wurden GdmCl-induzierte Denaturierungsübergänge bei verschiedenen pH-Werten zwischen 6.25 und 7.5 gemessen (siehe Abschnitt 3.2.1.2).

²Sofern sich die Fluoreszenz denaturierter Proteine in Reaktion der solvensexponierten Chromo- oder Fluorophore auf die veränderten Solvensbedingungen ändert, ist diese Änderung genauso schnell wie das Mischen.

3 Ergebnisse

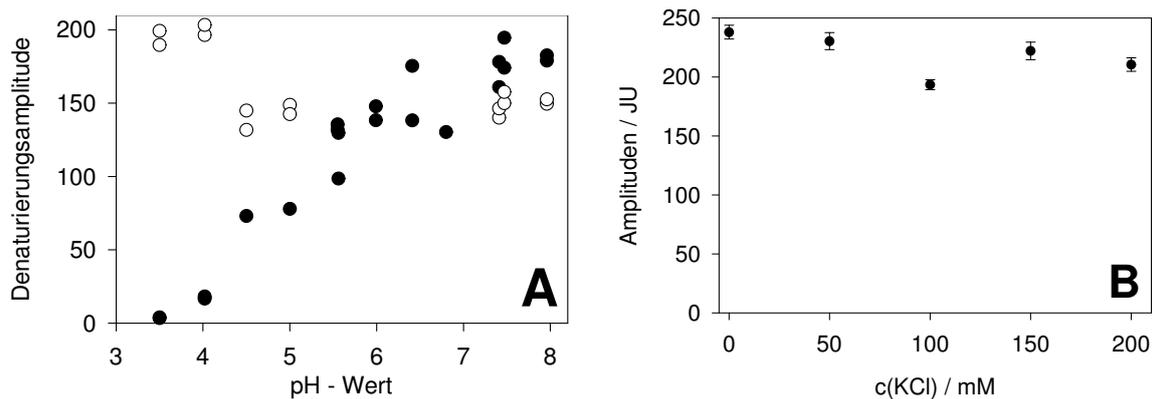


Abbildung 3.2: Renaturierungsausbeuten von PslS bei unterschiedlichem pH-Wert und Ionenstärke. **A:** Natives (○) oder in GdmCl denaturiertes (●) PslS wurde in Puffer mit 20 mM Kaliumacetat (pH 3.5 – 5.5), Kaliumphosphat (pH 5.5 – 7.5) oder Tris/HCl (pH 7.5 – 8), 150 mM KCl, je 1 mM CaCl_2 und MnCl_2 , in Eppendorf-Gefäße verdünnt (Restkonzentration an GdmCl 0.12 M in den Renaturierungsansätzen) und eine Woche bei 10 °C inkubiert. Dann wurde die Denaturierungsamplitude bei 20 °C in Harnstoffpuffer 1 gemessen. **B:** Denaturiertes PslS wurde in Phosphatpuffer (10 mM Kaliumphosphat, je 10 μM CaCl_2 und MnCl_2 , pH 6.8) mit der angegebenen Konzentration an KCl verdünnt und wie in A renaturiert und vermessen. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung aus Mehrfachmessungen der selben renaturierten Probe.

In der älteren Literatur waren Experimente mit Erbsenlektin häufig mit Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt worden, daneben auch mit Tris-Puffer (siehe z. B. van Eijsden *et al.*, 1992; Schwarz *et al.*, 1993; Rini *et al.*, 1993; Kornfeld *et al.*, 1981). Für Faltungsuntersuchungen ist Phosphatpuffer wegen der schlechten Löslichkeit von Calciumphosphat jedoch nicht geeignet. Die Renaturierung in Phosphatpuffer ist zwar möglich (siehe Abbildung 3.2), aber die dabei vorliegende Calciumkonzentration ist nicht bekannt. In Dertinger (1996) und Pankoke (1997) sowie für die Bindungsstudien am Beginn dieser Arbeit wurde daher Tris-Puffer verwendet. Wegen der schlechten Pufferkapazität von Tris ($\text{p}K_a = 8.3$, Chambers & Rickwood (1993)) bei pH-Werten um und unter 7 wurde MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure) mit einem $\text{p}K_a$ von 7.2 (Chambers & Rickwood, 1993) als Puffersubstanz gewählt und für alle folgenden Faltungsstudien verwendet.

Die Renaturierungsausbeuten sind nur in geringem Maße von der Ionenstärke abhängig (siehe Abbildung 3.2B). Die Ausbeuten scheinen mit höherer Ionenstärke etwas zu sinken. Allerdings zeigte sich, dass natives Lektin zur Aggregation neigt und an Gefäßwände adsorbiert wird, wenn es in Puffern mit geringer Ionenstärke einige Tage aufbewahrt wird. Daher wurde im folgenden weiter mit einer Konzentration von 150 mM an NaCl gearbeitet.

3.2.1.2 Übergänge in Guanidiniumchlorid

Übergänge mit PslS Zu einer ersten Charakterisierung der konformationellen Stabilität von Psl wurden denaturierungsmittelinduzierte Übergänge mit Fluoreszenzdetektion gemessen. In Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite sind De- und Renaturierungsübergänge von PslS nach verschiedenen Inkubationszeiten gezeigt. Bei niedrigen Restkonzentrationen an Denaturierungsmittel erreicht das renaturierte Protein 100 % des nativen

Signals. Im Laufe der Wochen wird hier zwar eine leichte Abnahme des Signals beobachtet (siehe die Messungen nach 3 Monaten, \diamond), was darauf hindeuten könnte, dass nicht alle Moleküle, die native Fluoreszenzintensität zeigen, auch wirklich nativ gefaltet sind. Allerdings ist eine entsprechende Abnahme auch im Denaturierungsübergang zu beobachten. Es handelt sich also nicht um ein Problem der Rückfaltung, sondern der Langzeitstabilität des nativen Proteins. Im Übergangsbereich zeigen die Kurven eine deutliche apparente Hysterese, das heißt die Punkte der Renaturierung und der Denaturierung fallen nicht zusammen. Das System befindet sich demnach nicht im Gleichgewicht, und eine thermodynamische Auswertung zur Berechnung der freien Enthalpie der Entfaltung ist nicht möglich. Da sich die Renaturierungsübergänge praktisch nicht verschieben, ist dies ausschließlich auf die sehr langsame Denaturierungskinetik zurückzuführen. Es ist nicht auszuschließen, dass sich nach sehr langer Wartezeit doch noch ein Gleichgewicht einstellen würde.

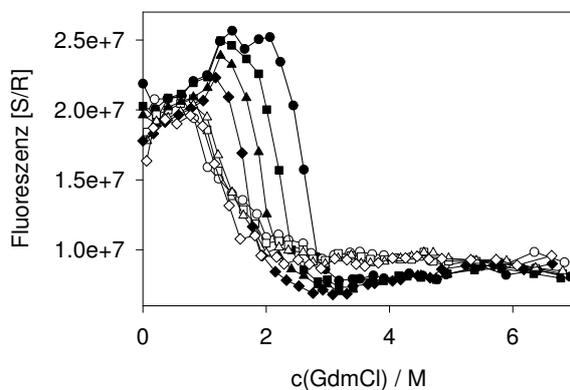


Abbildung 3.3: GdmCl-induzierte De- und Renaturierungsübergänge von PslS nach verschiedenen Zeiten. Natives (gefüllte Symbole) und denaturiertes (offene Symbole) PslS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde bei 10 $^{\circ}\text{C}$ in MOPS-Nativpuffer (pH 6.8) mit entsprechender GdmCl-Konzentration verdünnt und seine Fluoreszenz nach einem Tag ($\text{O}-\text{O}$), einer Woche ($\square-\square$), einem ($\triangle-\triangle$) und drei ($\diamond-\diamond$) Monaten gemessen.

Im Bereich um 2 M GdmCl, am Ende der Vorübergangs-Basislinie zum jeweiligen Zeitpunkt, ist bei den Denaturierungskurven ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Ein solcher Anstieg wurde schon häufiger bei Proteinen beobachtet, die eine apparente Hysterese im Faltungsübergang aufweisen (Dams & Jaenicke, 1999; Ostendorp *et al.*, 1996), seine Interpretation ist umstritten. Möglicherweise handelt es sich um Lichtstreuungseffekte aufgrund von Aggregation. Die Bildung dieser Aggregate ist offensichtlich reversibel, da nach 3 Monaten (gefüllte Rauten in Abbildung 3.3) die Fluoreszenz in diesem Bereich die Nachübergangs-Basislinie erreicht hat. Auch die hohe Steigung der Vorübergangs-Basislinie zwischen 0 und 1 M GdmCl könnte auf Aggregation zurückzuführen sein. Da hier aber auch die Renaturierungsproben diese Steigung zeigen (besser in Abbildung 3.4 zu sehen), dürfte es sich eher um die Abhängigkeit der Fluoreszenz nativer Moleküle von der GdmCl-Konzentration handeln. In der Struktur ist zu erkennen, dass die Seitenketten der Tryptophane 53 und 128 in der β -Kette deutlich solvens exponiert sind, was die GdmCl-Abhängigkeit ihrer Fluoreszenz erklären könnte.

Eine weitere Eigentümlichkeit ist zwischen 3 und 5 M GdmCl zu sehen: Die Fluoreszenzintensitäten der Renaturierungsübergänge liegen hier klar über denen der Denaturierungsübergänge. Dies ist weder durch ein Gleichgewichtsintermediat noch durch ein kinetisches Renaturierungsintermediat erklärbar, denn in beiden Fällen müssten die denaturierenden Proben es auch erreichen – bei einem kinetischen Intermediat mit dem Umweg über völlig entfaltete Konformationen. Mit einem stabilen kinetischen Denatu-

rierungsintermediat, dessen Fluoreszenz geringer ist als die des entfalteten Zustands, könnte der Befund zwar erklärt werden. Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass ein kinetisches Intermediat in einem derart breiten GdmCl-Konzentrationsbereich stabil ist, ohne auch vom denaturierten Ensemble aus zugänglich zu sein.

Wahrscheinlich handelt es sich hier vielmehr um ein Artefakt der Denaturierungsbedingungen. Zur Initiation der Rück- und Entfaltung wurde die entsprechende Protein-stammlösung bei diesen Experimenten in den Deckel von Reaktionsgefäßen pipettiert, die vortemperierten Puffer enthielten, und dann durch Invertieren und Vortexen gemischt. Diese Methode wurde gewählt, um eine möglichst schnelle Durchmischung zu gewährleisten. Möglicherweise können die nativen Moleküle jedoch an das Material des Deckels adsorbieren, von wo sie nach dem Aufstellen der Gefäße nicht mehr in die Lösung zurück gelangen. Bei denaturierten Proteinen in hochkonzentrierter GdmCl-Lösung ist dagegen keine Adsorption zu erwarten.

Zur Auswertung der Amplituden von Fluoreszenzkinetiken werden die theoretischen Start- und Endwerte benötigt, also die Fluoreszenz denaturierten bzw. nativen Proteins bei kleinen GdmCl-Konzentrationen. Um einen Wert für die Fluoreszenz von denaturiertem Protein zu erhalten, wurde die Nachübergangsbasislinie der Denaturierungskurven linear zu 0 M GdmCl extrapoliert. Damit konnten die gemessenen Startwerte von Fluoreszenz-Renaturierungskinetiken auf eine Totzeitamplitude überprüft werden. Die Fluoreszenz nativen Proteins wurde den Nativkontrollen entnommen, die bei jeder Kinetik durchgeführt wurden.

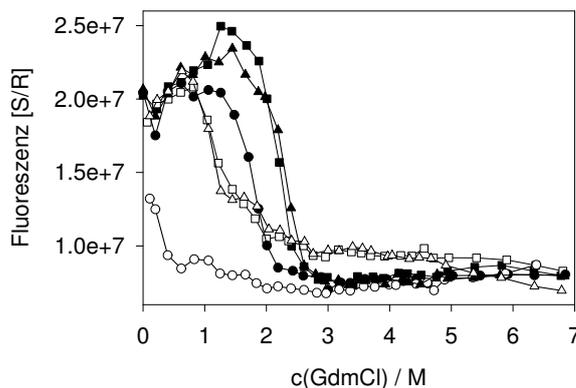


Abbildung 3.4: Denaturierungs- (gefüllte Symbole) und Renaturierungsübergänge (offene Symbole) von PslS nach einer Woche in MOPS-Nativpuffer, der auf verschiedene pH-Werte eingestellt wurde: 7.5 (○—○), 6.8 (□—□) und 6.25 (△—△), bei 10 µg/ml und 10 °C.

pH-abhängige Übergänge von PslS Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der De- und Renaturierung wurden Übergänge bei pH 7.5, 6.8 und 6.25 nach verschiedenen Zeiten vermessen. In Abbildung 3.4 sind die Kurven von PslS nach einer Woche dargestellt. Zwischen pH 6.8 und 6.25 sind kaum Unterschiede zu sehen. Dagegen weichen die Kurven bei pH 7.5 stark von den anderen beiden ab. Einerseits sind die Renaturierungsausbeuten geringer, und das Protein renaturiert überhaupt nur bei GdmCl-Konzentration unter 0.5 M in nennenswerter Menge. Andererseits ist auch die Denaturierung deutlich beschleunigt, und der Übergangsmittelpunkt ist um mehr als 0.5 M verschoben. Auch wenn man die Messungen nicht thermodynamisch auswerten kann, weil sich kein Gleichgewicht einstellt, so deuten sie doch darauf hin, dass Psl bei pH 7.5 weniger stabil ist als bei pH 6.8 und darunter. In jedem Fall verringern leicht alkalische

pH-Werte die Faltungseffizienz deutlich. In Abschnitt 3.2.2.2 wird auf Seite 57 auf diese Beobachtung und auf die zugrundeliegenden Mechanismen näher eingegangen.

Übergänge mit PslP In Abbildung 3.5 sind Übergänge von PslS und PslP zum Vergleich aufgetragen. Die Denaturierungskurven liegen praktisch übereinander, lediglich im Bereich des Fluoreszenzanstiegs durch Aggregation zwischen 1 und 2 M GdmCl weichen sie etwas voneinander ab, allerdings unsystematisch. Es handelt sich hier wohl um statistische Streuung. Da nicht nur Fluoreszenz, sondern bei Anwesenheit von Aggregaten auch Lichtstreuung gemessen wird, ist das nicht unerwartet. Von daher ist auch der in Abbildung 3.4 auf der vorigen Seite sichtbare Unterschied zwischen pH 6.8 und 6.25 für PslS möglicherweise nur statistisches Rauschen.

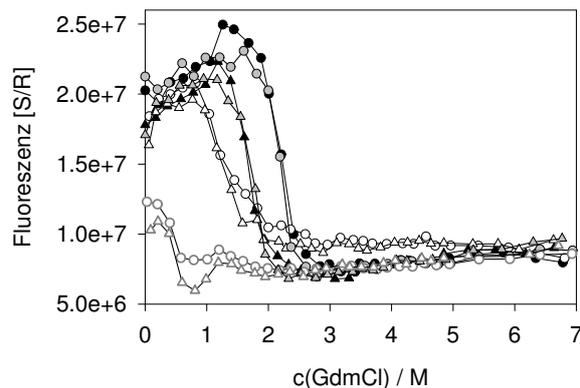


Abbildung 3.5: GdmCl-induzierte Übergänge von PslP und PslS. Vergleich von Denaturierungs- (gefüllte Symbole) und Renaturierungsübergängen (offene Symbole) von PslS (schwarz) und PslP (grau) nach einer Woche (○—○) und drei Monaten (△—△), bei 10°C und 10 µg/ml in MOPS-Nativpuffer.

Bei GdmCl-Konzentrationen unter 0.5 M erreicht der Renaturierungsübergang über 30 % des nativen Signals. Zwischen 0.5 und 1 M GdmCl ist ein Minimum zu sehen; hier geht das Signal auch nach drei Monaten am deutlichsten zurück. Wahrscheinlich liegen in diesem Bereich langlebige Intermediate vor, die im Verlauf der Wochen langsam aggregieren. Außerdem fällt auf, dass bei PslP die Nachübergangs-Basislinien von De- und Renaturierung aufeinanderliegen, obwohl auch hier die Stammlösung in den Deckel pipettiert wurde.

Die De- und Renaturierungsübergänge von PslP bei pH 6.25 bestätigen die mit PslS gemachten Beobachtungen, dass die Veränderung des pH-Werts in diesem Bereich keinen merklichen Einfluss hat (Daten nicht gezeigt). Bei pH 7.5 wurden keine Übergänge gemessen, weil hier schon die Renaturierungsausbeuten von PslS gering waren.

Proteinkonzentrationsabhängige Übergänge Wenn unimolekulare Faltungsreaktionen mit Aggregation kinetisch kompetieren, erhält man häufig bei geringeren Proteinkonzentrationen höhere Ausbeuten (Kiefhaber *et al.*, 1991). Bei oligomeren Proteinen allerdings enthält auch die Strukturbildung einen bimolekularen Schritt, bei PslP sogar mehrere. Deren Geschwindigkeit wird bei zu geringen Proteinkonzentrationen ebenfalls sinken. Um die Rolle dieses Effektes bei PslP und den Einfluss der Proteinkonzentration auf die Denaturierungskurve zu untersuchen, wurden Übergänge bei 2.5, 10 und 40 µg/ml gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6 auf der nächsten Seite dargestellt.

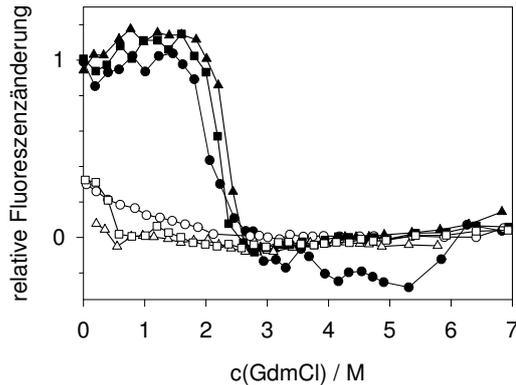


Abbildung 3.6: Denaturierungs- (gefüllte Symbole) und Renaturierungsübergänge (offene Symbole) von PslP bei einer blablu Protein-Konzentration von 2.5 µg/ml (○—○), 10 µg/ml (□—□) und 40 µg/ml (△—△). Die Messdaten wurden anhand der Anfangs- und Endwerte normiert (siehe Text). Die Inkubationszeit betrug eine Woche bei 10 °C in MOPS-Nativpuffer.

Die Ausbeute bei minimalen GdmCl-Konzentrationen ist bei 2.5 und 10 µg/ml praktisch gleich, bei 40 µg/ml ist sie deutlich reduziert. Im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen wird bei 2.5 µg/ml kein Minimum zwischen 0.5 und 1 M GdmCl beobachtet, die Messpunkte liegen auf einer Linie. Offensichtlich ist hier die Konzentration der aggregationsanfälligen Spezies klein genug, um nicht ins Gewicht zu fallen.

Die Übergangsmittelpunkte der Denaturierungskurven liegen wie erwartet mit höherer Proteinkonzentration bei höheren GdmCl-Konzentrationen. Im Vorübergangsbereich liegen die Kurven mit höherer Proteinkonzentration ebenfalls höher. Dies könnte daher kommen, dass jeweils eine konstante Menge Protein an die Gefäßwände adsorbiert, was bei niedrigerer Konzentration einen höheren Anteil ausmacht. Wie oben für PslS beschrieben, konnte die Normierung allerdings nicht mit einem Fit durch alle Punkte der Kurve oder der Basislinienbereiche durchgeführt werden, weil unklar ist, was für eine Funktion dafür verwendet werden müsste. Daher wurden die Mittelwerte einiger Punkte am Anfang der Vorübergangs-Basislinie sowie die Punkte Nachübergangs-Basislinien zwischen 3.5 und 5 M GdmCl willkürlich als Maximal- und Minimalsignal verwendet³, die Normierung ist also möglicherweise fehlerbehaftet.

Auffallend ist, dass die Nachübergangsbasislinie der Denaturierung bei 2.5 µg/ml stark streut und nach unten abweicht. Dies war nach einem Tag noch nicht der Fall (Daten nicht gezeigt). Vermutlich wird hier wieder der selbe Prozess beobachtet, der auch schon die Nachübergangs-Basislinien der Denaturierungskurven von PslS nach unten verschob. Wenn davon eine konstante Menge Protein aus der Lösung entfernt wird, ist zu erwarten, dass der Effekt bei kleineren Proteinkonzentrationen stärker ins Gewicht fällt.

3.2.2 Renaturierung von rekombinantem Lektin

Das rekombinante Erbsenlektin sollte als vereinfachtes Modell der Faltung des prozessierten Proteins untersucht werden. Da es weitgehend die selbe Struktur, aber Untereinheiten mit nur einer Polypeptidkette besitzt, könnten Faltungsschritte, die bei ihm gefunden würden, auch bei PslP eine Rolle spielen. Da außerdem bekannt war, dass PslS vergleichsweise schnell (Pankoke, 1997) und mit brauchbaren Ausbeuten (Prasthofer *et al.*, 1989; Stubbs *et al.*, 1986; Pankoke, 1997) faltet, sollte versucht werden, an

³Bei 2.5 µg/ml wurden die abgebildeten Daten der Renaturierung und die nicht gezeigten Daten der Denaturierung nach einem Tag verwendet, bei denen die Basislinien übereinstimmten.

PslS allgemeine Aspekte der Faltung dieses Strukturtyps herauszuarbeiten, um dann die Unterschiede und die spezifischen Probleme bei der Faltung des prozessierten Proteins herauszuarbeiten.

3.2.2.1 Doppelsprungexperimente

Aus Pankoke (1997) war bekannt, dass die Renaturierung von PslS bei 30 mM GdmCl, 10 °C und 10 µg/ml bereits nach einer Renaturierungszeit von etwa einem Tag abgeschlossen ist. Damit ist der Hämagglutinationstest nicht zur Charakterisierung seiner Faltung geeignet, da wegen der Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 2.7.4 auf Seite 36) der erste Messpunkt nach mehr als zwölf Stunden erhalten wird. Daher wurde die Faltung mittels Doppelsprungexperimenten charakterisiert. Die Entfaltungskinetiken wurden bei 10 °C in Harnstoffpuffer 2 gemessen. Das Prinzip ist in Abschnitt 3.2 auf Seite 46 erläutert, die Ermittlung der Denaturierungsbedingungen wird in Abschnitt 3.2.5 auf Seite 78 beschrieben.

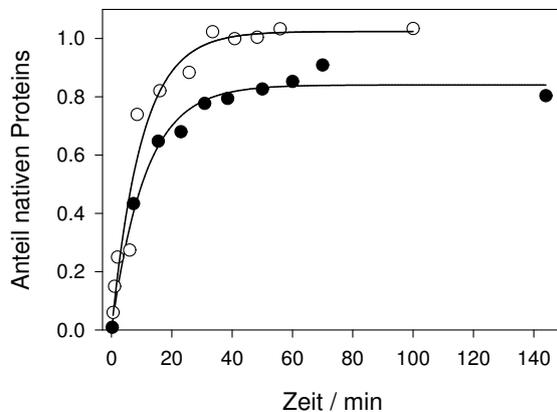


Abbildung 3.7: Doppelsprungexperimente zur Messung der Renaturierung von PslS bei 10°C und 10 µg/ml bei 300 mM (●) und 68 mM GdmCl (○). Gezeigt sind die Denaturierungsamplituden in Harnstoffpuffer 2, bezogen auf die Denaturierungsamplitude der Nativkontrollen. Die Linien sind das Ergebnis nichtlinearer Regression mit einer Exponentialfunktion durch den Nullpunkt.

Zwei so erhaltene Renaturierungskinetiken sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Daten können mit einer Exponentialfunktion durch den Nullpunkt beschrieben werden, sie zeigen weder eine Totzeitamplitude noch eine *lag*-Phase. Bei einer GdmCl-Restkonzentration von 68 mM wird eine Ausbeute von 100 % erreicht, bei 300 mM nur noch etwa 80 %. Im Fluoreszenzübergang wurde unter diesen Bedingungen noch das Signal erreicht, das das native Protein bei dieser GdmCl-Konzentration zeigt (vgl. Abbildung 3.3 auf Seite 49). Denkbar wäre, dass sich an die beobachtete Kinetik noch ein langsamer Prozess anschließt, der nach einem Tag zu 100 % nativem Protein führt, wie es im Übergang gemessen wurde. Wahrscheinlicher ist aber, dass die Ausbeute nur deswegen geringer ist, weil die exakten Renaturierungsbedingungen anders waren. Während für den Übergang die Renaturierung wie in Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 48 beschrieben gestartet wurde, wurde für die Doppelsprungexperimente in großvolumigen Kunststoffreaktionsgefäßen gearbeitet, deren Oberfläche sich möglicherweise von Eppendorf-Reaktionsgefäßen unterscheidet, und heftig mit dem Vortex gemischt. Wie in Abschnitt 3.2.4.1 auf Seite 62 gezeigt wird, lässt sich die Renaturierung von PslP schon durch die Rührgeschwindigkeit beeinflussen oder zugunsten von Aggregation gänzlich unterdrücken. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Ausbeuteverringerung von PslS im Doppelsprungexperiment zumindest zum Teil auf diese Unterschiede zurückzuführen ist.

Die aus der nichtlinearen Regression erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Abbildung 3.9A auf Seite 56 zusammen mit denen aus Fluoreszenzkinetiken dargestellt.

3.2.2.2 Fluoreszenz-Renaturierungskinetiken

Renaturierungskinetiken wurden bei 10 °C in MOPS-Nativpuffer und bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Die Messung erfolgte in fluoreszenzgeeigneten gerührten Kunststoffküvetten, also unter Bedingungen, bei denen auch mit PslP teilweise Renaturierung in der Fluoreszenz beobachtet werden kann (siehe Abschnitt 3.2.4.1 auf Seite 62). In Abbildung 3.8 sind repräsentative Renaturierungskinetiken bei verschiedenen GdmCl-Restkonzentrationen dargestellt.

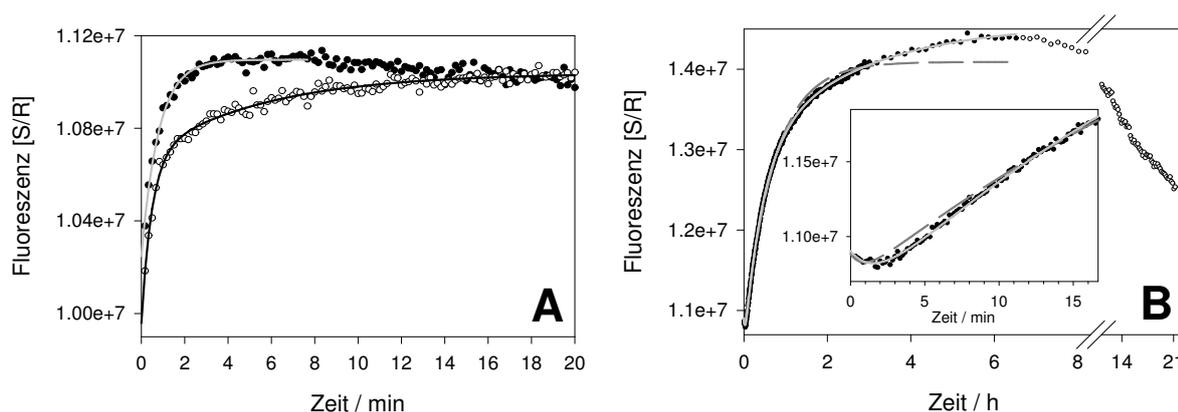


Abbildung 3.8: Renaturierungskinetiken von PslS. **A:** Renaturierung von PslS (10 µg/ml, 10°C) bei 90 mM GdmCl (●) mit monoexponentiellem Fit und bei 125 mM GdmCl (○) mit biexponentiellem Fit. **B:** Renaturierung von PslS bei 300 mM, die offenen Kreise wurden nicht in die Regression einbezogen. Die dunkelgraue gestrichelte Linie ist ein biexponentieller Fit, die hellgraue durchgezogene ein Fit an eine Summe dreier Exponentialfunktionen mit jeweils sinkender schnellster Phase. Im kleinen Bild sieht man einen Ausschnitt am Beginn der Renaturierung.

Man sieht bei allen Kinetiken den erwarteten Anstieg. Bei kleinen GdmCl-Konzentrationen wurden einphasige Kinetiken gefunden (siehe ● in Abbildung 3.8A), bei höheren mehrphasige. Diese zeigten zum Teil zwei unterschiedlich schnell ansteigende Prozesse (○ in Abbildung 3.8A), teilweise ging dem Anstieg aber auch eine *lag*-Phase oder sogar ein leichtes Sinken voraus (siehe das kleine Bild in Abbildung 3.8B). Dies war vor allem bei höheren Konzentrationen an GdmCl der Fall. Unter diesen Bedingungen setzte auch zunehmend Aggregation ein, die in der Regel nach dem Ende der Messung an einer Trübung in der Küvette erkennbar war. In den Messdaten zeigt sie sich darin, dass das Signal am Ende wieder sinkt, weil die Menge an löslichem Protein geringer wird. Eine solche Kinetik mit leichtem Sinken am Beginn, anschließendem Signalanstieg durch Renaturierung und schließlich Abfallen des Signals durch Aggregation ist in Abbildung 3.8B dargestellt.

Die Kinetiken bei niedriger GdmCl-Konzentration, bei denen über den ganzen Zeitverlauf nur ein Signalanstieg beobachtet wurde, konnten sehr gut durch mono- oder biexponentielle Funktionen beschrieben werden. Bei den Kinetiken bei höherer Konzentration an Denaturierungsmittel, bei denen am Ende Aggregation beobachtet wurde, wurden zur Auswertung nur die ansteigenden Punkte verwendet. Dadurch war es auch

hier in der Regel möglich, die Daten mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen zu beschreiben – bei einer sinkenden ersten Phase hatte einer der Exponentialfunktionen eine negative Amplitude. Allerdings beeinflusste die Aggregation gegen Ende auch die Krümmung der Kurve, so dass die Geschwindigkeitskonstanten, die für die langsame Phase erhalten sind, in gewissem Ausmaß von der Wahl des Bereichs abhängen, der in die Regression einbezogen wurde.

Bei einigen Datensätzen wurde eine gute Anpassung der Daten nur erreicht, wenn eine Summe dreier Exponentialfunktionen verwendet wurde (eine mit negativer Amplitude für die *lag*-Phase, zwei ansteigende). Ein solches Beispiel ist in Abbildung 3.8B auf der vorigen Seite gezeigt, wo je eine Kurve aus bi- und triexponentieller Regression eingezeichnet wurde. Bei dieser dritten Phase handelt es sich aber nicht um einen Renaturierungsprozess. Sie entsteht durch die Überlagerung der Renaturierung mit verschiedenen Seiteneffekten. Dabei handelt es sich zum einen um den Einfluss der Aggregation auf die Krümmung der Kurve. Außerdem kann man davon ausgehen, dass durch die Aggregation nicht nur Präzipitate entstehen, die nicht mehr zur Fluoreszenz beitragen, sondern vor allem im mittleren Zeitbereich auch lösliche bzw. suspendierte Partikel, deren Lichtstreuung das Signal erhöht. Die Geschwindigkeitskonstanten, die in der Regression für diese extrem langsamen Prozesse erhalten werden, liegen jeweils um etwa eine Größenordnung unter denen der langsamen Renaturierungsphase. Dies unterstreicht nochmals, dass es sich dabei nicht um einen Faltungsprozess handelt, denn die aus Doppelsprungexperimenten ermittelten Geschwindigkeitskonstanten stimmen mit denen der langsamen Renaturierungsphase überein, und die Doppelsprungexperimente messen direkt die Entstehung nativen Proteins (siehe Abschnitt 3.2.4.2 auf Seite 64 und Abschnitt 3.2.5.2 auf Seite 82).

Eine Zusammenfassung der bei pH 6.8 und verschiedenen GdmCl-Konzentrationen erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten ist in Abbildung 3.9A auf der nächsten Seite dargestellt.

Geschwindigkeitskonstanten Die Geschwindigkeitskonstanten der steigenden (●) und der sinkenden (▲) schnellen Phase zeigen eine gewisse Streuung, hängen davon abgesehen aber kaum von der GdmCl-Konzentration ab. Wenn man nur die Punkte unterhalb 0.6 M GdmCl betrachtet, ergibt sich für beide Prozesse die selbe Abhängigkeit. Die Halbwertszeiten reichen von 20 s unterhalb von 0.2 M GdmCl bis 140 s bei 0.6 M.

Möglicherweise handelt es sich bei den beiden unterschiedlichen schnellen Phasen um den selben Prozess, der nur bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen eine Signaländerung mit verschiedenem Vorzeichen hat. Dies könnte man mit einem in der schnellen Phase gebildeten Intermediat erklären, dessen Fluoreszenzeigenschaften stark von der Denaturierungsmittel-Konzentration abhängen, so dass es bei kleinen Konzentrationen stärker, bei größeren jedoch schwächer fluoresziert als das denaturierte Protein unter Rückfaltungsbedingungen. Verstärkt werden könnte so ein Effekt durch eine gegenläufige Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des denaturierten Proteins. Aus den Startwerten der Kinetiken, wie sie aus den Regressionen erhalten werden, lässt sich keine solche Tendenz ablesen, da diese Werte recht stark streuen (Daten nicht gezeigt). Die Steigung der Nachübergangs-Basislinie ist aber in der Tat positiv, die Fluoreszenz des denaturierten Proteins nimmt also mit steigender GdmCl-Konzentration etwas zu (vgl.

3 Ergebnisse

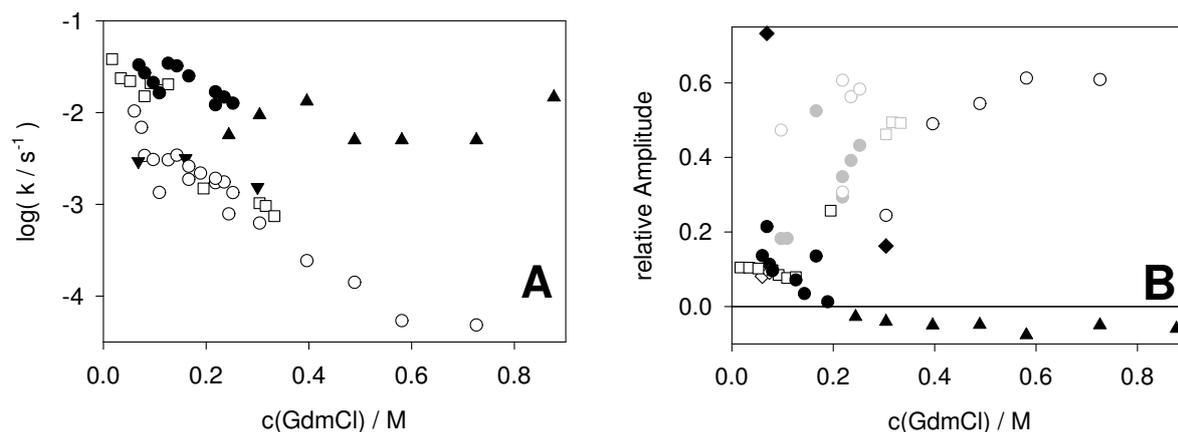


Abbildung 3.9: Geschwindigkeitskonstanten (A) und Fluoreszenzamplituden (B) der Renaturierung von PsIS bei 10 µg/ml und 10°C in MOPS-Nativpuffer. Die Symbole bedeuten in beiden Abbildungen: □ monoexponentielle Fits, ● die schnelle steigende, ▲ die schnelle sinkende, ○ die langsame Phase. In A sind außerdem die aus den Doppelsprungexperimenten in Abschnitt 3.2.2.1 auf Seite 53 erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen (▼). Die grauen Symbole in B stehen für die Amplituden aus einer Messreihe, deren Geschwindigkeitskonstanten trotz der abweichenden Amplituden keine Ausreißer darstellen. Die Amplituden unter Null bezeichnen die sinkende Phase.

Abbildung 3.3 auf Seite 49).

Die einheitliche Abhängigkeit der beiden schnellen Phasen von der GdmCl-Konzentration kann aber auch Zufall sein. Die unter- und oberhalb von 0.25 M GdmCl populierten, schnell gebildeten Intermediate könnten also völlig unterschiedlich sein und nur eine ähnliche GdmCl-Abhängigkeit ihrer Bildungsgeschwindigkeit besitzen.

Die monoexponentiell gefitteten Kinetiken (□) sind im Bereich unter 0.1 M genauso schnell wie die schnelle Phase der biexponentiellen Kinetiken. Das könnte bedeuten, dass der Prozess, der die langsame Phase bewirkt, bei den niedrigen GdmCl-Konzentrationen, bei denen monoexponentielle Kinetiken gemessen werden, nicht beobachtet wird. Allerdings nähern sich die Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Phase (○) bei niedrigen Denaturierungsmittel-Konzentrationen denen der schnellen Phase an. Möglicherweise können die beiden Prozesse deshalb hier nicht mehr voneinander unterschieden werden. Ungewöhnlich ist, dass auch bei höheren GdmCl-Konzentrationen gelegentlich monoexponentielle Kinetiken gemessen wurden (□ bei 0.2 und um 0.3 M M GdmCl).

Die langsame Phase stimmt fällt mit der Bildung nativen Proteins zusammen, wie sie in den Doppelsprungexperimenten bestimmt wurde (▼ in Abbildung 3.9A). Ihre Geschwindigkeit ist stark von der GdmCl-Konzentration abhängig. Während sie bei 0.06 M GdmCl nur um den Faktor 3.5 langsamer ist als die schnelle Phase (Halbwertszeit etwa 70 s), sind die Geschwindigkeitskonstanten bei 0.3 M eine Größenordnung kleiner als die der schnellen Phase (Halbwertszeit um 12 min). Bei 0.6 M GdmCl beträgt die Halbwertszeit schon um die 4 Stunden.

Amplituden Die Amplituden der fallenden Phase sind durchwegs klein relativ zur Gesamtsignaländerung bzw. zum Unterschied zwischen extrapolierte Nachübergangsbasislinie und Nativkontrolle (siehe Abbildung 3.9B). Für die ansteigende schnelle Phase wurden meist auch kleine Amplituden gefunden (schwarze Kreise), in einer einzelnen

Messreihe jedoch auch wesentlich größere (gefüllte graue Kreise, siehe unten).

Die Amplituden der monoexponentiellen und der langsamen biexponentiellen Phase zeigen einen uneinheitlichen und unerwarteten Verlauf. Sie sind für die meisten Messreihen bei kleinen GdmCl-Konzentrationen klein, obwohl dort höhere Renaturierungsausbeuten erwartet werden (vgl. Abschnitt 3.2.2.1 auf Seite 53), und nehmen mit zunehmender Denaturierungsmittelkonzentration zu (○ in Abbildung 3.9B). Selbst die monoexponentiellen Kinetiken haben sehr kleine Amplituden. Dabei liegen die Anfangswerte im Bereich der extrapolierten Nachübergangs-Basislinie ohne beobachtete Totzeitamplitude.

Die Kinetiken erreichen also im gesamten untersuchten Bereich bis 0.8 M nicht das native Signal, bei kleineren GdmCl-Konzentrationen sogar ein besonders niedriges Endsignal. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen mit Renaturierungsübergängen (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 49) und Doppelsprungexperimenten (siehe Abbildung 3.7 auf Seite 53), wo in diesem Bereich 100 % des nativen Signals erreicht werden.

Wie weiter oben beschrieben, folgt auf die Renaturierung eine Phase der Signalabnahme durch Aggregation, besonders bei höheren Konzentrationen. Diese macht die Auswertung der langsamen Phasen unsicher. Sie erhöht die Krümmung der Kurve und lässt sie früher abflachen, so dass man falsch zu hohe Geschwindigkeitskonstanten und zu niedrige Amplituden erwarten kann. Regressionsartefakte aufgrund der Signaländerung durch Aggregation sind somit keine Erklärung für den Verlauf der Amplituden.

Der Verlauf der Amplituden konnte in mehreren unabhängigen Messreihen reproduziert werden – allerdings auch die große Streuung. Bei einer einzelnen Messreihe wurden zwar die aufgrund der übrigen Daten zu erwartenden Geschwindigkeitskonstanten erhalten, die Amplituden waren jedoch z. T. viel größer (graue Symbole in Abbildung 3.9B auf der vorigen Seite). Aus den Aufzeichnungen gehen keine Unterschiede hervor, die diesen Effekt erklären könnten. Möglicherweise ist auch diese Beobachtung auf die starke Empfindlichkeit der Renaturierung gegenüber den Initiationsbedingungen zurückzuführen, so dass kleine Veränderungen – etwa minimale Temperaturabweichungen durch gleiche Equilibrierzeiten bei veränderter Raumtemperatur oder leicht unterschiedliche Rührgeschwindigkeit – unerwartet große Effekte haben. Da immer der um das Referenzsignal korrigierte Ausgabekanal (S/R) ausgewertet wurde und alle Renaturierungskinetiken am selben Spektrometer durchgeführt wurden, ist ein Geräteproblem auszuschließen.

Daher kann als Ursache für den Verlauf der Amplituden und die geringen Renaturierungsausbeuten die Empfindlichkeit von PslS gegenüber den Renaturierungsbedingungen, vor allem gegenüber der mechanischen Belastung durch das Rühren und die Wechselwirkung mit den Gefäßwänden, vermutet werden.

pH-Abhängigkeit Parallel zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Übergänge (vgl. Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 48) wurden auch Fluoreszenz-Renaturierungskinetiken bei pH 6.25, 6.80, 7.03 und 7.50 gemessen. Die Renaturierung erwies sich als stark pH-abhängig. Nicht nur bei pH 7.50, wie aus den Übergängen zu erwarten war, sondern auch schon bei pH 7 waren sie deutlich langsamer als bei pH 6.80. Außerdem war bei diesen pH-Werten die schnelle Phase schon bei niedrigeren GdmCl-Konzentrationen mit einer Verringerung der Fluoreszenz verbunden als bei pH 6.80 und 6.25. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10A auf der nächsten Seite zusammengefasst.

3 Ergebnisse

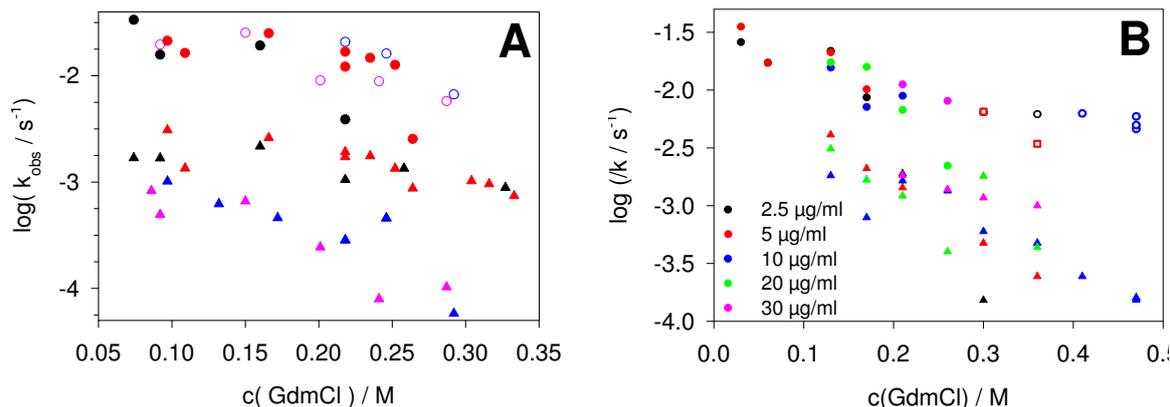


Abbildung 3.10: Abhängigkeit der Faltungsgeschwindigkeit vom pH-Wert und der Proteinkonzentration bei 10°C in MOPS-Nativpuffer. **A:** Faltungsgeschwindigkeiten von PslS bei pH 6.25 (●), 6.80 (●), 7.03 (●) und 7.50 (●). Die aufgetragenen Geschwindigkeitskonstanten stammen aus Fits mit einer, zwei oder drei Exponentialfunktionen, es sind jedoch nur die beiden schnellsten Geschwindigkeitskonstanten aufgetragen. Gefüllte Kreise bezeichnen die schnelle steigende, offene Kreise die schnelle sinkende und gefüllte Dreiecke die langsame Phase. **B:** Faltungsgeschwindigkeiten bei 2.5 (●), 5 (●), 10 (●), 20 (●) und 30 µg/ml (●). Gefüllte Kreise bezeichnen die schnelle steigende, offene Kreise die schnelle sinkende und gefüllte Dreiecke die langsame Phase.

Die Messungen wurden unterhalb von 0.3 M GdmCl durchgeführt, wo bei pH 6.80 (●) und pH 6.25 (●) eine steigende schnelle Phase gefunden wird. Bei pH 7.03 (●) und vor allem bei pH 7.50 (●) findet man jedoch ein sinkendes Signal in der ersten Phase bis hinunter zu 0.1 M GdmCl. Die Geschwindigkeit der schnellen Phase ist jedoch bei allen pH-Werten gleich groß, wenn man von zwei Werten bei pH 6.25 und 6.80 absieht, bei denen es sich wohl um Ausreißer handelt.

Die langsame Faltungsphase (▲) ist jedoch bei pH 7.03 und pH 7.50 langsamer als bei leicht saurem pH-Wert, oberhalb 0.15 M GdmCl ist sie deutlich langsamer. Auffallend ist dabei, dass der kleine Schritt von 6.80 nach 7.03 eine größere Veränderung bewirkt als der größere von 7.03 nach 7.50. Offenbar hat eine Aminosäureseitenkette in einem entscheidenden Intermediat einen pK_a -Wert in der Nähe von 6.9, so dass sich ihr Protonierungszustand zwischen pH 6.80 und 7.03 ändert und die Faltung beeinflusst. Die pK_a -Werte einzelner Aminosäuren liegen nicht in diesem Bereich, am nächsten kommt noch Histidin mit 6.04. Allerdings kann haben Aminosäurereste in gefalteten Proteinen unter dem Einfluss umgebender Gruppen teilweise stark verschobene pK_a -Werte. An dem Faltungsschritt, der in der langsamen Phase der Fluoreszenzänderung beobachtet wird, muss demzufolge ein Intermediat beteiligt sein, das zumindest lokal Tertiärstruktur ausgebildet hat.

Zwischen pH 6.25 und 6.80 konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Da bereits die Bindungsexperimente und einige Renaturierungsexperimente bei pH 6.80 durchgeführt wurden, wurde weiterhin standardmäßig bei pH 6.80 gearbeitet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Puffer frisch waren, um pH-Verschiebungen vorzubeugen. In einem Fall wurden jedoch auch bei pH 6.88 Daten gemessen, die sich ebenfalls nicht signifikant von denen bei pH 6.80 unterschieden. Der Bereich, in dem die Veränderung eintritt, ist also bemerkenswert scharf.

Konzentrationsabhängigkeit Da PslS ein dimeres Protein ist, ergibt sich die Frage, ob die Dimerassoziation einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Dazu wurden Fluoreszenzkinetiken bei Proteinkonzentrationen von 2.5 bis 30 $\mu\text{g/ml}$ untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.10B auf der vorigen Seite dargestellt. Die Messungen zeigen eine relativ hohe Streuung, aber keine systematische Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Bei diesem Experiment wurde das Protein aus verschiedenen denaturierten Stammlösungen im Verhältnis 1 : 200 bis 1 : 17 in Nativpuffer verdünnt, so dass sich auch bei gleicher Protein-Endkonzentration teilweise unterschiedliche Mischungsverhältnisse ergeben. Bei der bereits mehrmals gefundenen hohen Empfindlichkeit von PslS gegenüber den Mischbedingungen könnte dies eine Erklärung für die starke Streuung sein.

Die Daten zeigen aber keine systematische Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Proteinkonzentration. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt kann daher ein Faltungsschritt angenommen werden, nicht eine Assoziationsreaktion.

3.2.2.3 Gelfiltrationsexperimente

Zur Untersuchung der Dimerassoziation wurden Gelfiltrationsexperimente durchgeführt. Die Wahl fiel auf eine TSK-GEL-G2000SW-XL30-Säule. Zwar wäre auch Superdex 75 als Gelfiltrationsmaterial geeignet (van Eijsden *et al.*, 1992), allerdings sind davon keine HPLC-Säulen mit kleinen Volumina erhältlich. Nur mit solchen Säulen sind kurze Trennzeiten möglich, was zur Untersuchung von Kinetiken wichtig ist. Je länger ein Lauf dauert, desto mehr ändert sich die Population von Faltungsintermediaten während der Chromatographie und erschwert so die Interpretation.

Die Säule wurde mit Hilfe eines Molekularmassenstandards geeicht. Dabei ergab sich, dass natives Psl (sowohl PslS als auch PslP) nicht das für ein eher langgestrecktes Dimer erwartete Laufverhalten zeigt, also nicht mit einer größeren apparenten Molekularmasse als berechnet eluiert. Vielmehr wird eine apparente Molekularmasse von etwa 32 kDa statt 51.2 für das Dimer oder 25.6 für das Monomer gefunden. Ein solches Verhalten kann grundsätzlich durch ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht verursacht werden, das sich deutlich schneller einstellt als die Trennzeit der Säule beträgt. Die Molekularmasse, die sich dabei ergibt, ist jedoch ein stoffmengenbezogenes Mittel der Massen der beteiligten Moleküle. Demnach müsste im Gleichgewicht ein hoher Anteil an Monomer vorliegen. Dies widerspricht aber den Ergebnissen zum Monomer-Dimer-Gleichgewicht (siehe Abschnitt 3.3 auf Seite 84) und auch publizierten Daten (van Eijsden *et al.*, 1992). Daher ist davon auszugehen, dass Psl an das Säulenmaterial adsorbiert und dadurch zurückgehalten wird. Dies spiegelt sich auch in der asymmetrischen Peakform wider (siehe die Nativkontrolle in Abbildung 3.11 auf der nächsten Seite).

Trotzdem konnte die Technik eingesetzt werden, um die Renaturierung von PslP und das Verhalten isolierter α - oder β -Ketten unter Renaturierungsbedingungen zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.2.4.3 auf Seite 71). Für PslS liefert sie wenige Informationen, vor allem weil ihre Zeitauflösung zu gering ist.

Bereits in der sofort nach dem Start der Renaturierung aufgetragenen Probe eluiert das Protein mit etwa der selben Retentionszeit wie das native Dimer. Die Halbwertszeit der langsamen Renaturierungsphase der Fluoreszenzkinetiken liegt bei 0.16 M GdmCl bei 3 – 4 min, und die Probe kann auf der Gelfiltrationssäule in den etwa 12 min bis zur

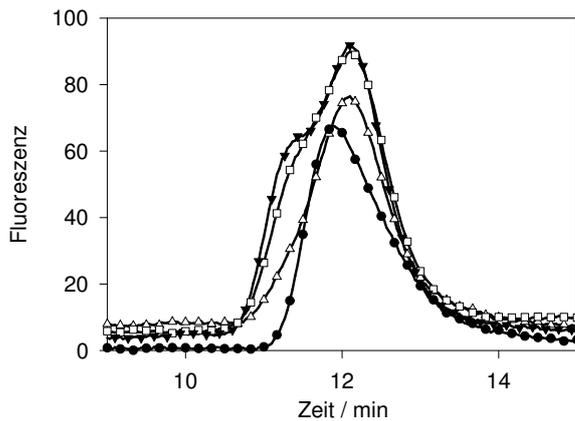


Abbildung 3.11: Gelfiltration mit renaturierendem PslS. Die Proben wurden für die angegebene Zeit bei 10 °C und 10 µg/ml in MOPS-Nativpuffer renaturiert und sofort (Δ), nach 10 Minuten (\square) und 54 Stunden (\blacktriangledown) aufgetragen und die Fluoreszenz des Eluats gemessen. Die GdmCl-Konzentration betrug 0.16 M. Eine Nativkontrolle ist mit \bullet markiert, sie wurde mit weniger sensitiven Detektoreinstellungen gemessen.

Elution weiter renaturieren.

Die Form der Peaks der renaturierenden Proben ist weniger asymmetrisch als bei der Nativkontrolle (siehe Abbildung 3.11), und sie eluieren etwas später. Dies ist jedoch vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Konzentration der Nativkontrolle höher ist als die der renaturierenden Proben, bei denen Aggregate und möglicherweise auch lösliche Intermediate auf der Vorsäule zurückgehalten werden. Die Nativkontrolle, die mit weniger sensitiven Detektoreinstellungen gemessen werden musste, sättigt offenbar die vorhandenen „Bindungsstellen“ für die Adsorption an die Gelmatrix schon teilweise ab und erhält so ein früher eluierendes Maximum und ein nachhängendes Ende des Peaks.

Ansonsten wird mit zunehmender Renaturierungszeit eine Zunahme der Peakfläche beobachtet. Die selbe Beobachtung wurde auch mit PslP gemacht und ist wohl darauf zurückzuführen, dass immer weniger Protein auf der Vorsäule zurückgehalten wird; auch eine Wechselwirkung früher Intermediate mit den Kunststoffflächen der Schläuche ist denkbar.

Bereits nach zehn Minuten ist zu erkennen, dass der Peak eine kleine Schulter ausbildet, die nach 54 Stunden deutlich ausgeprägter ist. Da aber aus den anderen Renaturierungsexperimenten bekannt ist, dass die Renaturierung unter diesen Bedingungen nach einigen Minuten abgeschlossen ist, kann es sich hierbei nur um langsam entstehende, *off-pathway* liegende Spezies, vermutlich Aggregate, handeln. Ob diese allerdings zunehmend gebildet werden oder nur ihre Eigenschaften so verändern, dass sie nicht mehr von der Vorsäule zurückgehalten werden, ist unklar. Jedenfalls ähneln sie dem nativen Protein insofern, als sie von der Säule adsorbiert und damit zurückgehalten werden: Ihre Retentionszeit ist immer noch geringer als für ein globuläres Dimer berechnet.

3.2.3 Gewinnung und Charakterisierung der isolierten α - und β -Ketten

Isolierung Um die Beiträge der einzelnen Ketten zur Faltung von PslP zu charakterisieren, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, diese isoliert zu gewinnen. Dies gelang durch Gelfiltration einer denaturierten PslP-Probe auf einer analytischen Superdex-75-Säule. Ein repräsentativer Lauf ist in Abbildung 3.12 auf der nächsten Seite gezeigt.

Es wurde von einer Proteinstammlösung mit über 10 mg/ml ausgegangen, mit der dreifachen Menge Denaturierungspuffer verdünnt und jeweils 100 bis 200 µl aufgetragen.

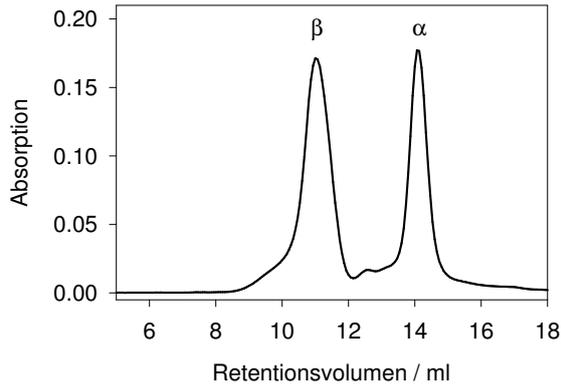


Abbildung 3.12: Gelfiltrationslauf zur Trennung der Polypeptidketten von PslP-B. Vollständig denaturiertes PslP-B in 6 M GdmCl wurde auf eine mit 3 M GdmCl in MOPS-Nativpuffer äquilibrierte Superdex-75-HR-10/30-Säule aufgetragen und mit dem selben Puffer eluiert.

Dadurch wurden die isolierten, denaturierten Ketten in Konzentrationen von bis zu 6 μM (PslP- β) bzw. 12 μM (PslP-B- α) in 3 M GdmCl erhalten. Die Einzelketten wurden von PslP-B ausgehend isoliert, die Isoform A der α -Kette wurde nicht untersucht.

Fluoreszenzspektren Um einen ersten Eindruck vom Verhalten der isolierten Ketten unter Renaturierungsbedingungen zu erhalten, wurden sie in Puffer mit unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen verdünnt und sofort ihre Fluoreszenzspektren gemessen. In Abbildung 3.13 sind in **A** einige Spektren gemeinsam mit Vergleichskurven von PslP-B abgebildet. In **B** sind die Wellenlängen der Maxima gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen.

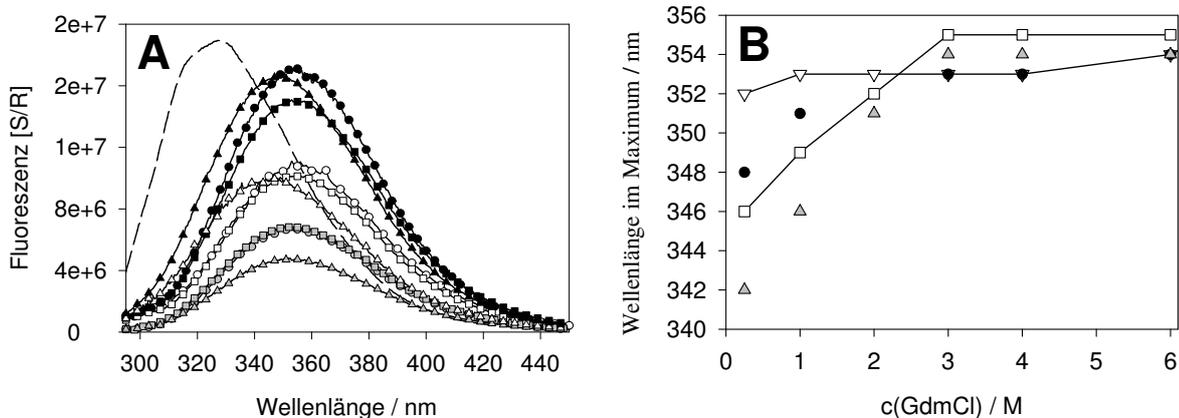


Abbildung 3.13: Fluoreszenzspektren und Maximalwellenlängen von PslP und den einzelnen Polypeptidketten bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen. Die denaturierten Proteine wurden von 3 M GdmCl in die entsprechenden Konzentrationen verdünnt (Endkonzentration 0.39 μM) und sofort vermessen. **A:** Die Symbole bedeuten: schwarze Symbole PslP-B, graue Symbole PslP-B- α und offene Symbole PslP- β , bei 6 M (○), 3 M (□) und 0.25 M (Δ) GdmCl. Zum Vergleich ist ein Spektrum von nativem PslP-B gezeigt (gestrichelte Linie). **B:** Wellenlängen der Maxima von renaturierendem PslP-B (●), PslS (Δ), PslP-B- α (▽) und PslP- β (□) bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen.

Man sieht, dass die α -Kette ihre Maximalwellenlänge kaum ändert. Isoliertes PslP- α liegt also auch unter Nativbedingungen denaturiert vor, d. h. ohne stabile Tertiärstruktur und ohne stabile hydrophobe Cluster auszubilden. In der nativen Struktur bildet

die α -Kette keine Kontakte mit sich selbst aus, wenn man von Kontakten zwischen Sequenznachbarn absieht. Daher ist es nicht überraschend, dass die isolierte Kette so unstrukturiert bleibt. Die β -Kette dagegen bildet offensichtlich deutlich Struktur aus, die Wellenlänge des Maximums verschiebt sich von 355 nm bis zu 346 nm. Es ist zu vermuten, dass sie teilweise nativähnliche Kontakte ausbilden kann, da sie ja den größten Teil der nativen Struktur ausmacht. Daher stellt sich die Frage nach dem Sekundärstrukturgehalt von PslP- β unter Nativbedingungen.

Leider war es nicht möglich, renaturierendes PslP- β in Konzentrationen in Lösung zu halten, die für CD-Spektren benötigt werden. Die Ausgangskonzentration von 6 μ M, was 36 μ g/ml entspricht, hätte vielleicht eine Messung ermöglicht. Bei der Dialyse der PslP- β -Stammlösung (3 M GdmCl) gegen Nativpuffer aggregierte das Protein jedoch nahezu quantitativ. Es wurde außerdem versucht, das Denaturierungsmittel GdmCl durch Gelfiltration an Entsalzungssäulen zu entfernen, aber auch dabei wurden nur minimale Konzentrationen an löslichem Protein erhalten. Daher konnten nur bei 6 und 3 M GdmCl CD-Spektren gemessen werden. Unter diesen Bedingungen haben sowohl die α - als auch die β -Kette ein denaturiertes Spektrum im nahen und fernen UV-Bereich.

Alle weiteren Experimente mit den isolierten Ketten und mit unterschiedlichen Mischungen sind bei den entsprechenden Untersuchungen zur Renaturierung von PslP beschrieben.

3.2.4 Renaturierung von prozessiertem Lektin

Das zentrale Ziel der Arbeit war es, Einblicke in den Faltungs- und Assoziationsmechanismus von prozessiertem Erbsenlektin zu gewinnen und herauszufinden, warum dieser Prozess so langsam ist. Dazu sollte die Faltungskinetik mit unterschiedlichen Methoden und bei verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Fluoreszenzkinetiken, die schon bei PslS problematisch in Durchführung und Interpretation waren, erwiesen sich dafür als untauglich. Mit einer Kombination aus Doppelsprungexperimenten, Hämagglutinationstest, Gelfiltration und Quervernetzung konnten jedoch einige der Fragen beantwortet werden.

Im folgenden wird zunächst gezeigt, warum sich Fluoreszenzkinetiken nicht eignen, und dann auf die anderen Methoden eingegangen.

3.2.4.1 Fluoreszenzkinetiken

In Pankoke (1997) wurde bereits versucht, die Renaturierung von PslP mit Fluoreszenz zu verfolgen, dabei ergab sich aber nur ein Absinken des Signals. In dieser Arbeit wurde nun versucht, durch Optimierung der Bedingungen solche Messungen möglich zu machen. Es stellte sich heraus, dass renaturierendes Protein sowie die isolierte β -Kette unter Nativbedingungen sehr stark Photobleach-Prozessen unterliegen (Royer, 1995). Indem der Messpunkt Abstand vergrößert wurde und dazwischen der Anregungsspalt geschlossen wurde, konnte der Signalverlust verringert werden. Daneben erwies sich die Verwendung von Kunststoff-Fluoreszenzküvetten als förderlich, um Signalverlust durch Adsorption an die Küvettenwände zu minimieren. Der Zusatz von 0.12 % des sanften Detergens Tween 20, das in anderen Fällen ähnliche Probleme unterdrücken konnte (Zardeneta & Horowitz, 1994a,b; Goldberg *et al.*, 1995; Rozema & Gellman, 1996; Herbst

et al., 1997; Walter, 2002), hatte dagegen keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

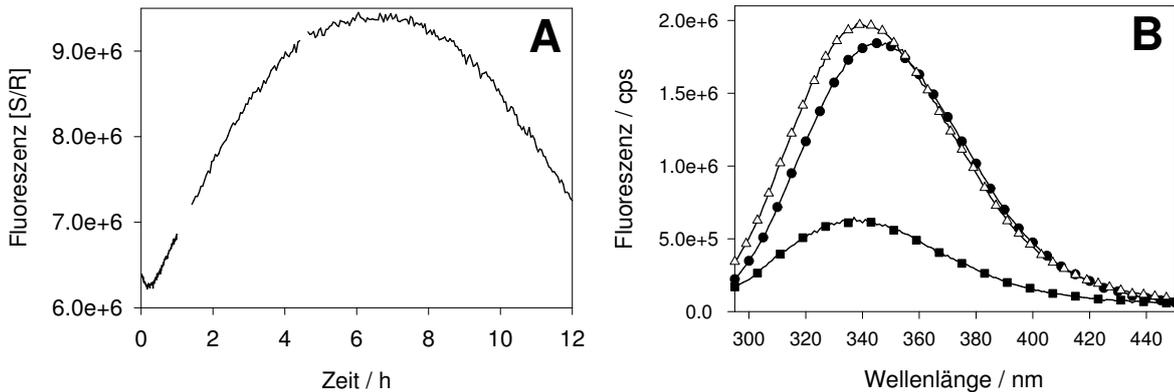


Abbildung 3.14: Fluoreszenz-Renaturierungskinetik von PslP-B. 100 μ l PslP-B wurden in der Küvette vorgelegt, 2400 μ l MOPS-Nativpuffer zupipettiert und der Rührer gestartet. Die Konzentrationen nach der Verdünnung waren 10 μ g/ml, 0.17 M GdmCl. In **A** ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{exc} = 282$ nm, $\lambda_{em} = 315$ nm) gezeigt, in **B** Spektren ($\lambda_{exc} = 282$ nm), die in den Lücken in **A** aufgezeichnet wurden. Dabei wurde das mit \bullet gekennzeichnete Spektrum nach 1 h, \triangle nach 3 h und \blacksquare nach 18 h aufgezeichnet.

Die besten Ergebnisse ergaben sich, wenn die vortemperierte denaturierte Proteinlösung in der Küvette vorgelegt und möglichst schnell Puffer mit der selben Temperatur darauf pipettiert wurde. Ein solches Experiment ist in Abbildung 3.14 gezeigt. Man sieht einen ähnlichen Verlauf wie bei PslS bei höheren Konzentrationen mit Sinken zu Beginn, dann einem Anstieg und schließlich wieder ein Sinken durch Aggregation. Dass der Anstieg einen Faltungsprozess widerspiegelt, zeigen die währenddessen gemessenen Spektren in Abbildung 3.14B. Nach einer Stunde ist die Wellenlänge des Maximums etwa 344 nm, kleiner als die in Abbildung 3.13 auf Seite 61 beobachtete, und nach drei Stunden hat sich das Maximum noch weiter in Richtung auf das native Spektrum ($\lambda_{max} = 327$ nm) verschoben und 339 nm erreicht. Am Ende der Kinetik ist durch Aggregation ein großer Teil des Signals verloren gegangen, und das noch in Lösung befindliche Protein hat seine Maximalwellenlänge nicht weiter verschoben. Die letzte Beobachtung ist wahrscheinlich ein Resultat der Überlagerung der Fluoreszenzspektren von nativem Protein, faltungskompetenten Intermediaten und kleinen, noch löslichen Aggregaten mit größerer Maximalwellenlänge.

Schon in diesem Fall zeigte sich also, dass das Fluoreszenzsignal von renaturierendem PslP noch stärker und auch bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen durch Aggregationsprozesse überlagert ist als bei PslS. Kinetiken, die bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen aufgenommen wurden, erwiesen sich als nicht auswertbar. Vor allem stellte sich heraus, dass das beobachtete Signal stark vom Rühren beeinflusst wird. In Abbildung 3.15 auf der nächsten Seite sind Renaturierungskinetiken gezeigt, bei denen bei 10 °C und 0.1 M GdmCl ausschließlich die Rührgeschwindigkeit und die Rührstabgröße variiert wurde. Sie zeigen völlig unterschiedliches Verhalten von leichtem Steigen über kontinuierliches Sinken bis hin zu mehrphasigem Verhalten. Um den Einfluss des Rührens zu minimieren wurde versucht, den Rührer ganz abzuschalten und nur in regelmäßigen Abständen kurz anzuschalten, damit durch die Durchmischung Photobleachefekte minimiert würden. Leider führte das zu unbrauchbaren Ergebnissen, denn durch

das kurzzeitige Rühren fiel die gemessene Lichtintensität sprunghaft ab. Eine derartige Kurve ist ebenfalls in der Abbildung gezeigt.

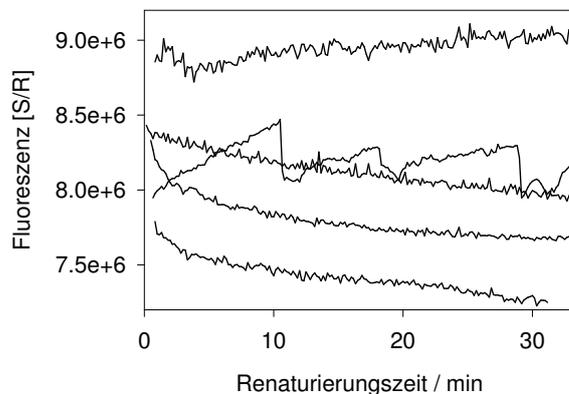


Abbildung 3.15: Einfluss des Rührens auf die Renaturierung von PslP. Gezeigt sind mehrere „Renaturierungskurven“, die mit unterschiedlichen Rührfischen und Rührgeschwindigkeiten unter ansonsten gleichen Messbedingungen (10 µg/ml, 0.1 M GdmCl, 10°C, Kunststoffküvetten) aufgezeichnet wurden. Bei der gezackten Kurve wurde der Rührer wenige Sekunden nach dem Mischen abgestellt, die Sprünge ergaben sich, wenn er für jeweils 10 s wieder auf mittlerer Stufe angestellt wurde.

Damit war die Verwendung von Fluoreszenzkinetiken zur Untersuchung der PslP-Renaturierung ausgeschlossen. Man könnte zwar versuchen, Rührbedingungen zu finden, bei denen die Aggregation gering und der Einfluss des Rührens klein scheint, und genau darauf achten, diese Bedingungen immer exakt einzuhalten. Dies führt aber nicht zu sinnvoll interpretierbaren Ergebnissen, denn ohne ein zweites Signal mit gleicher Zeitauflösung ist es nicht möglich zu beurteilen, ob man wirklich Renaturierung beobachtet, oder nicht doch zumindest teilweise ungewisse Artefakte. Dazu kommt noch, dass vermutlich der Einfluss des Rührens auf die Faltung selbst wieder von den interessierenden, im Experiment systematisch zu variierenden Bedingungen wie der GdmCl-Konzentration und vor allem der Proteinkonzentration abhängig sein wird.

Bereits die Auswertung der PslS-Kinetiken war durch die Aggregation teilweise sehr erschwert und ihre Amplituden wahrscheinlich durch ähnliche Artefakte beeinflusst. Das Fluoreszenzsignal von PslP jedoch ist offensichtlich von diesen Effekten dominiert und daher zur Untersuchung der Faltung nicht geeignet. Ein Verzicht auf das Rühren kam nicht in Frage, da dann keine ausreichende Durchmischung der Lösung während der Messung gewährleistet gewesen wäre und der Einfluss von Photobleach-Prozessen wieder zugenommen hätte. Fluoreszenzmessungen wurden mit PslP daher nur im Zusammenhang mit Doppelsprungexperimenten durchgeführt, ansonsten wurde der Hämagglutinationstest, Gelfiltration und Quervernetzung verwendet, um Informationen über die Strukturbildung von PslP zu gewinnen.

3.2.4.2 Hämagglutinationsassay und Doppelsprungexperimente

Auswertung des Hämagglutinationstests Der Hämagglutinationstest beruht auf der Quervernetzung von Erythrozyten durch Wechselwirkung von deren Oberflächenpolysacchariden mit dem bivalenten Lektin. Dazu wird in Mikrotiterplatten mit rundem Boden eine Verdünnungsreihe der Lektinlösung hergestellt, so dass sich in jeder Vertiefung die halbe Lektinkonzentration wie in der vorausgehenden ergibt. Nach der Zugabe der Erythrozytensuspension wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann visuell beurteilt, in welcher der Vertiefungen Hämagglutination zu sehen ist. In Vertiefungen ohne Hämagglutination sinken die Zellen zu Boden und sammeln sich in der

Mitte des halbkugelförmigen Bodens, in solchen mit ausreichender Lektinkonzentration bildet sich eine geschlossene Schicht aus mit Lektin quervernetzten Erythrozyten. Nimmt man nun, wie in der Literatur bisher geschehen, die Anzahl der Vertiefungen mit Hämagglutination als Maß für die Lektinkonzentration, so kann diese wegen der Zweifachverdünnung nur sehr grob bestimmt werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hämagglutinationstests fiel auf, dass zwischen Vertiefungen mit und ohne Agglutination Zwischenformen auftraten. Dabei reicht die Lektinkonzentration offenbar nur aus, um einen Teil der Zellen zu vernetzen, der Rest sinkt auf den Boden. Um diese Zwischenstufen zur Konzentrationsbestimmung nutzen zu können, wurden sie durch visuelle Inspektion in zwei Kategorien, „noch etwas Agglutination zu sehen“ und „schon etwas Sedimentation zu sehen“, eingeteilt. Wurde in Vertiefung N vollständige Agglutination und in Vertiefung $N + 1$ „noch etwas Agglutination“ gefunden, so wurde der Messreihe die Anzahl $N + 0.3$ an agglutinierten Vertiefungen zugeordnet. War die Agglutination in $N + 1$ noch deutlicher ausgeprägt, aber „schon etwas Sedimentation zu sehen“, so erhielt die Reihe den Wert $N + 0.7$. Aus jeder Probe wurden mindestens drei Verdünnungsreihen hergestellt, die nicht immer exakt den selben Wert lieferten, aber nie um mehr als 0.7 voneinander abwichen; es wurde jeweils der Mittelwert verwendet. Eine Formel, um diesen Wert in eine Konzentration umzurechnen, ergibt sich aus den folgenden Überlegungen.

Nimmt man an, dass eine willkürlich gewählte Konzentration von 1024 Einheiten genau ausreicht, um in 10 Vertiefungen Agglutination zu erzeugen, dann erhält man mit 512 Einheiten in 9 und mit 256 Einheiten in 8 Vertiefungen Agglutination. Mit dem Faktor $1/2^a$ für die Umrechnung der willkürlichen in molare Konzentration ergibt sich für den Zusammenhang zwischen Konzentration c und wie oben berechneter Anzahl N der Vertiefungen:

$$N = \log_2\left(\frac{c}{2^a}\right)$$

Durch Umformung erhält man die bereits im Methodenteil aufgeführte Gleichung (2.4):

$$\ln c = (N + a) \ln 2$$

Der Umrechnungsfaktor a muss dabei aus Nativkontrollen bestimmt werden. Diese wurden jeweils mit der selben Erythrozytenpräparation durchgeführt. Die so erhaltene Konzentration wurde auf die ursprünglich in die Renaturierung eingesetzte Konzentration bezogen und so eine relative Renaturierungsausbeute bestimmt. Auf diese Weise wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hämagglutinationstests ausgewertet. Von einigen Messreihen aus Pankoke (1997) lagen Bleistiftzeichnungen vor, aus denen ebenfalls das Ausmaß der teilweisen Agglutination hervorging. Auch diese Daten wurden mit Gleichung (2.4) ausgewertet und in die Analysen einbezogen.

Renaturierungskinetiken mit Hämagglutinationstest und Doppelsprungexperimenten Um die Kinetik der Entstehung von nativem PslP zu untersuchen, wurden Renaturierungen mit dem Hämagglutinationstest und Doppelsprungexperimenten gemessen. Der Hämagglutinationsassay als funktionaler Test sollte ein direktes Maß für natives Protein liefern, allerdings mit geringer Zeitauflösung. Auch Doppelsprungexperimente werden als Maß für native Struktur angesehen, da Intermediate in der Regel in der

3 Ergebnisse

Totzeit des Mischens denaturieren. Allerdings könnten späte Intermediate bereits eine beträchtliche Stabilität aufweisen, so dass ihre Denaturierung spektroskopisch verfolgbar wird. In parallel an den selben Proben durchgeführten Messungen ergaben sich aber keine Unterschiede zwischen den Methoden.

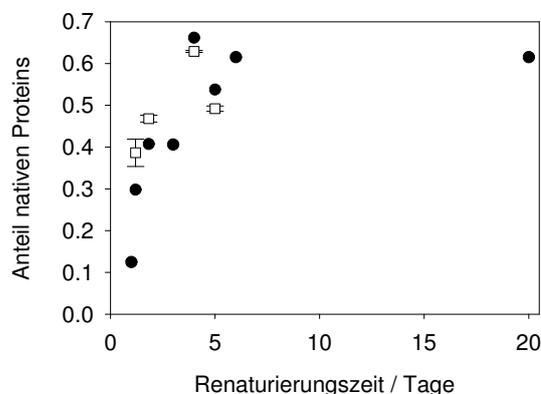


Abbildung 3.16: Renaturierungskinetik von PslP im Hämagglutinationstest (●) und mit Doppelsprungexperimenten (□, die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung aus Mehrfachbestimmungen). Die Renaturierungsbedingungen waren 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PslP, 10°C und 0.21 M GdmCl, für die Doppelsprungexperimente wurde Harnstoffpuffer 1 bei 20°C verwendet. Die Hämagglutinationsdaten wurden teilweise in Pankoke (1997) gemessen.

Die erhaltenen Renaturierungsausbeuten sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Man erkennt, dass die Kinetik erst nach mehr als 5 Tagen abgeschlossen ist. Außerdem ist zu sehen, dass der Hämagglutinationstest und die in den Doppelsprungexperimenten erhaltenen Denaturierungsamplituden gut übereinstimmen.

Um eine erste Einschätzung zu erhalten, wie lange PslP- α und PslP- β löslich bleiben bzw. zu welchem Zeitpunkt die Anwesenheit der zweiten Kette notwendig ist, um weiter zu falten, wurden die isolierten Ketten zunächst separat in Nativpuffer überführt und dann nach unterschiedlichen separaten Renaturierungszeiten die Lösungen vereinigt. Die Endkonzentrationen betragen je 0.39 μM für PslP- α und PslP- β bei 0.21 M GdmCl. Die Lösungen wurden zwei Wochen bei 10 °C inkubiert, um die Renaturierung abzuschließen, auf Raumtemperatur gebracht und danach parallel im Hämagglutinationstest und mit Doppelsprungexperimenten bei 20 °C mit Harnstoffpuffer 1 analysiert. Die erhaltenen Renaturierungsausbeuten sind in Abbildung 3.17 gegen die separate Renaturierungszeit aufgetragen.

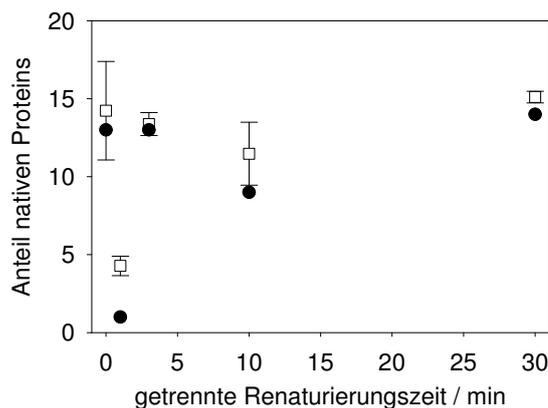


Abbildung 3.17: Renaturierungsausbeuten von PslP nach separater Renaturierung der Ketten. PslP- α und PslP- β wurden wie im Text beschrieben separat renaturiert und nach der angegebenen Zeit vereinigt. Nach Abschluss der Renaturierung wurde die Ausbeute mit Hämagglutination (●) und Doppelsprungexperimenten (□, die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung aus Mehrfachbestimmungen) bestimmt.

Von einem Ausreißer abgesehen ist die Renaturierungsausbeute unabhängig von der Zeit, in der die beiden Ketten getrennt waren. Das bedeutet, dass die beiden Polypep-

tidketten während des beobachteten Zeitraums löslich bleiben und auch danach noch miteinander assoziieren und weiterfalten können.

Die Werte aus Hämagglutinationstests und den Doppelsprungexperimenten stimmen gut überein. Zwar liegen die mit dem Hämagglutinationstest bestimmten Ausbeuten einheitlich etwas unter den aus Doppelsprungexperimenten, doch ist eine derartige Abweichung leicht erklärbar. Aufgrund der Fehlerfortpflanzung ergibt sich für den Umrechnungsfaktor a der gleiche Fehler wie für N . Für eine einzelne Ablesung beträgt dieser mindestens $+0.2/-0.15$, durch die Mehrfachbestimmung wird er sich etwas verringern. Der relative Fehler für die errechnete Konzentration allein aus dem Fehler von a ist damit 10 bis 14 % bzw. etwas weniger durch die Mehrfachbestimmungen⁴. Eine systematische Abweichung der Messwerte aus Hämagglutinationstest und Doppelsprungexperimenten in dem geringen Ausmaß, wie sie in Abbildung 3.17 zu sehen ist, ist also durch die Ungenauigkeit der Auswertung des Hämagglutinationstest nicht vermeidbar. Insgesamt erweisen sich die Doppelsprungexperimente also als besser geeignet, natives Protein zu quantifizieren, weil sie das selbe messen, dabei aber weniger fehlerbehaftet sind.

Die Ausbeuten in Abbildung 3.17 sind geringer als in Abbildung 3.16. Dies könnte einerseits auf verstärkte Nebenreaktionen zurückzuführen sein, weil das Protein durch den doppelten Mischschritt mit mehr Oberflächen in Berührung kam und stärker mechanisch belastet wurde bzw. an die Oberflächen adsorbierte. Vor allem aber laufen trotz der insgesamt sehr langsamen Kinetik auch in der ersten halben Stunde verschiedene Prozesse ab, die zur Stabilisierung der Moleküle führen. In Experimenten mit den isolierten Ketten dagegen nimmt die Konzentration löslicher Peptide teilweise bereits in dieser Zeit ab (s.u.). Da in dem in Abbildung 3.17 dargestellten Experiment vor dem zweiten Mischschritt keine Assoziation der Ketten möglich war, trug auch dies zur Verringerung der Ausbeute bei.

Schnelle Renaturierungskinetiken von PslP mit Doppelsprungexperimenten Nachdem feststand, dass Doppelsprungexperimente zur Quantifizierung nativen Proteins geeignet sind, konnte daran gegangen werden, ihre bessere Zeitauflösung zu nutzen, um den Beginn der Renaturierungskinetik zu untersuchen. Die Renaturierungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bisher beschrieben und auch weiterhin in großen Volumina (30 – 50 ml) gearbeitet, um ausreichend viele Proben nehmen zu kön-

⁴Der Fehler von a ergibt sich aus der umgeformten Gleichung (2.4)

$$c = e^{(N+a) \ln 2} \quad \text{bzw.} \quad a = \ln c / \ln 2 - N$$

mit der Näherung, dass die Konzentration der Nativkontrolle nicht fehlerbehaftet ist, zu

$$\Delta a = \left| \frac{\partial a}{\partial N} \right| \Delta N = |-1| \Delta N = \Delta N_{\text{Nativkontrolle}}$$

Der systematische relative Fehler, der sich daraus für die Konzentration der Proben ergibt, ist dann mindestens

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{1}{c} \left\{ \left| \left(\frac{\partial c}{\partial a} \right)_N \right| \Delta a + \left| \left(\frac{\partial c}{\partial N} \right)_a \right| \Delta N \right\} > \frac{1}{c} \left\{ e^{(N+a) \ln 2} \ln 2 \Delta a \right\} = \ln 2 \Delta N_{\text{Nativkontrolle}}$$

Die Abhängigkeit vom Fehler von N wird dabei nicht berücksichtigt, weil sie eine Streuung der einzelnen Punkte, nicht aber eine Verschiebung der ganzen Messreihe gegenüber anderen Methoden bewirkt.

3 Ergebnisse

nen. Aus den selben Renaturierungsansätzen wurden auch Proben auf die analytische Gelfiltrationssäule aufgetragen, die Ergebnisse werden in Abschnitt 3.2.4.3 auf Seite 71 dargestellt.

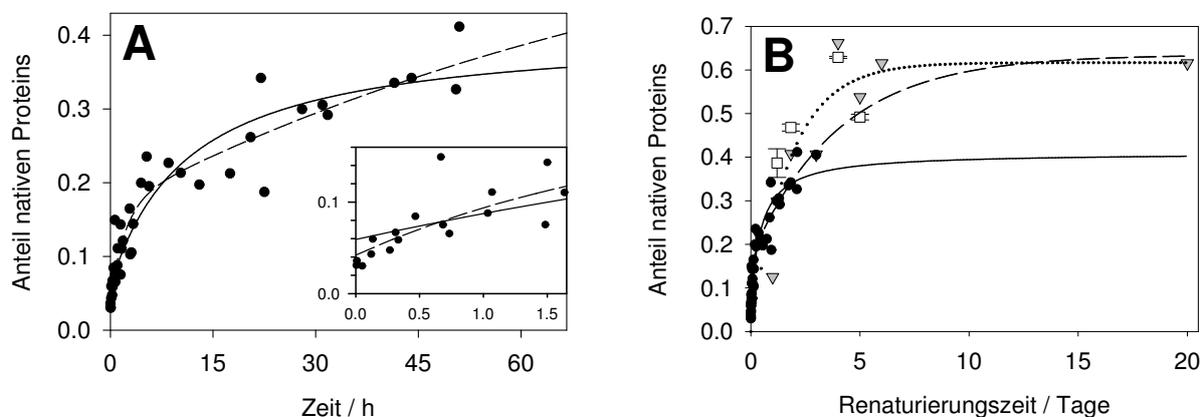


Abbildung 3.18: Renaturierungskinetiken von PsIP-B, gemessen mit Doppelsprungexperimenten. **A:** Anteil nativen Proteins nach unterschiedlichen Renaturierungszeiten von PsIP-B (10 $\mu\text{g/ml}$, 0.39 μM) in 0.16 M GdmCl bei 10°C. Die gestrichelte Linie wurde durch nichtlineare Regression der Daten mit einer biexponentiellen Funktion erhalten, die durchgezogene entspricht einer Hyperbelfunktion. Im kleinen Bild ist ein Ausschnitt am Anfang der Renaturierung vergrößert gezeigt. Zur Quantifizierung wurden Doppelsprungexperimente bei 10°C in Harnstoffpuffer 2 verwendet und auf eine Nativkontrolle bezogen. **B:** Vergleich mit den Hämagglutinationsdaten. □ sind die mit Doppelsprungexperimenten, ▽ die aus dem Hämagglutinationstest gewonnenen Daten aus Abbildung 3.16 auf Seite 66 bei jeweils 0.21 M GdmCl, ● wie in A die Renaturierung von PsIP bei 0.16 M GdmCl. Die durchgezogene und gestrichelte Linie sind jeweils die selbe Funktion wie in A, die gepunktete Linie beschreibt alle Daten bei 0.21 M mit einer monoexponentiellen Funktion.

Die Renaturierung bei 0.16 M GdmCl ergab eine biphasische Kinetik (siehe Abbildung 3.18), die mit einer Summe von zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden konnte (gestrichelte Linie in der Abbildung). Eine apparent zweiphasige Kinetik kann auch durch einem bimolekularen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt entstehen, eine solche Reaktion hat einen hyperbolischen Verlauf. Die Daten lassen sich etwa genauso gut mit einer Hyperbelfunktion $y = y_0 - a/(1 + kt)$ beschreiben (durchgezogene Linie). Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Geschwindigkeitskonstanten der PsIP-Faltung aus Doppelsprungexperimenten und Hämagglutinationstest

Funktion	c(GdmCl)/M	k_1/ d^{-1}	k_2/ d^{-1}
biexponentiell	0.16	11	0.25
hyperbolisch	0.16		2.1
monoexponentiell	0.16		0.61
monoexponentiell	0.21	–	0.57

In Abbildung 3.18B sind die Daten zusammen mit den bei 0.21 M GdmCl gewonnenen (aus Abbildung 3.16 auf Seite 66) aufgetragen. Dass der Endpunkt der Regressionskurve mit zwei Exponentialfunktionen genau mit dem Endpunkt der Kinetik bei 0.21 M GdmCl übereinstimmt, dürfte eher Zufall sein, denn da in den Daten in der

zweiten Phase kaum eine Krümmung zu sehen ist, ist ihre Geschwindigkeitskonstante schlecht definiert. Die Kinetik ist bei beiden GdmCl-Konzentrationen etwa gleich schnell, eher noch scheint die Reaktion bei 0.21 M etwas schneller zu verlaufen. Aufgrund der Zeitauflösung ist hier eine Regression nur mit einer Exponentialfunktion möglich, sie ergibt eine Geschwindigkeitskonstante von 0.57 d^{-1} , also eine Halbwertszeit von 1.2 Tagen. Beschreibt man auch die Daten bei 0.16 M mit einer monoexponentiellen Funktion, so erhält man eine Geschwindigkeitskonstante von 0.61 d^{-1} , die Geschwindigkeiten sind also gleich.

Interessant ist, dass auch bei den ersten Messungen in Abbildung 3.18A auf der vorigen Seite bereits natives Protein gefunden wird. Für diese Messpunkte wurde die Lösung mit dem denaturierten Protein in Nativpuffer pipettiert, das Gefäß verschlossen und auf dem „Vortex“ gemischt. Sofort danach wurde es wieder geöffnet und die erste Probe in Harnstoffpuffer 2 überführt. Den Punkten wurde daher eine Renaturierungszeit von 20 s zugeordnet, realistisch ist eher eine noch kürzere Dauer. Auf der Zeitskala in Abbildung 3.18A auf der vorigen Seite, auch im kleinen Bild, wo der Beginn vergrößert dargestellt ist, liegen diese Punkte praktisch bei Null. Trotzdem beträgt die Denaturierungsamplitude hier schon 3 bis 5 % der Nativkontrolle. Offenbar kann ein Teil der Moleküle sehr schnell renaturieren, während der Großteil in einer kinetischen Falle landet, einem Intermediat, von dem aus sie erst ganz oder teilweise entfalten müssen, bevor sie zum nativen Protein weiterreagieren können. Die Gelfiltrations- und Quervernetzungs-experimente in Abschnitt 3.2.4.3 auf Seite 71 lieferten einige nähere Informationen zu diesem Intermediat oder diesen Intermediaten.

Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit Um zu überprüfen, ob die Form der Kurven auf einen bimolekularen Schritt zurückzuführen ist, wurden Kinetiken mit unterschiedlichen Verhältnissen der Konzentrationen von α -Kette und β -Kette untersucht. Hätte man einfach die Konzentration beider Ketten erhöht, so wäre noch stärker mit Aggregationsproblemen zu rechnen gewesen (vgl. die konzentrationsabhängigen Übergänge in Abbildung 3.6 auf Seite 52). Bei einer Erniedrigung dagegen wäre das Signal/Rausch-Verhältnis in den Doppelsprungexperimenten schlechter geworden, in denen ja bereits bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ im Renaturierungsansatz die Gesamt-Proteinkonzentration bei nur $2.5 \mu\text{g/ml}$ liegt. Der Vorteil einer Variation des $\alpha : \beta$ -Verhältnisses ist außerdem, dass es dadurch möglich sein sollte, die Beiträge der Konzentrationen von α - und β -Kette zu unterscheiden.

Dabei trat jedoch das Problem auf, dass die Proteinkonzentration in den Präparationen von PslP- α und PslP- β relativ gering war und vor allem für PslP- α mit einer molaren Masse von nur 5.85 kDa ein Konzentrierungsschritt schwer durchzuführen war. Da die Lösungen der isolierten Ketten aber eine GdmCl-Konzentration von 3 M hatten, war es nicht möglich, diese Renaturierungen wie bisher bei etwa 0.2 M GdmCl durchzuführen. Bei einem Überschuss von PslP- α ergab sich eine minimale GdmCl-Konzentration von 0.4 M, mit der noch geringer konzentrierten β -Kette von 0.48 M. Daher wurden parallel einige Proben aus einer bei 0.48 M GdmCl mit PslP-B durchgeführten Renaturierung vermessen, um den Einfluss der GdmCl-Konzentration zu untersuchen.

Die Ergebnisse sind ebenfalls in Abbildung 3.19 auf der nächsten Seite zu sehen. Bei der Probe, die bei 0.48 M GdmCl mit einem α - β -Verhältnis von 1 : 1 renaturiert wurde

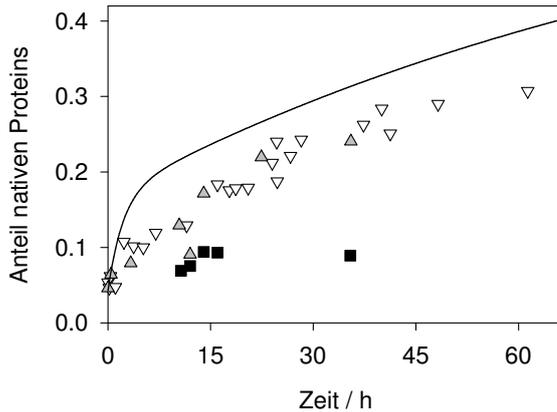


Abbildung 3.19: Renaturierungskinetiken von PslP bei (▽) 0.78 μM PslP- α , 0.39 μM PslP- β und 0.40 M GdmCl sowie (△) 0.39 μM PslP- α , 0.78 μM PslP- β bei 0.48 M GdmCl bei 10°C. Aufgetragen ist der Anteil nativen Proteins, bezogen auf eine Nativkontrolle mit 0.39 μM PslP-B. Zum Vergleich ist auch eine Renaturierungskinetik von PslP-B ($\alpha : \beta = 1 : 1$) in 0.48 M GdmCl (■) sowie die Regressionskurve der Renaturierung bei 0.16 M aus Abbildung 3.18A auf Seite 68 dargestellt.

(■) war die Renaturierungsausbeute sehr stark verringert. Da sich der Anteil nativen Proteins zwischen 15 und 35 Stunden kaum mehr verändert, scheint auch die Kinetik deutlich langsamer zu sein – möglicherweise ist aber auch bereits der Endpunkt erreicht. Bei den beiden mit einem α - β -Verhältnis von 2 : 1 bzw. 1 : 2 durchgeführten Renaturierungen war die Ausbeute deutlich besser, obwohl auch diese bei erhöhter GdmCl-Konzentration durchgeführt wurden. Die Geschwindigkeit beider Renaturierungen ist gleich, und die schnelle Phase ist, wenn überhaupt, nur in geringerem Maße zu sehen.

Die bessere Ausbeute und der unterschiedliche Kurvenverlauf deuten auf einen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Rückfaltung hin. Die Erhöhung der Ausbeute ist besonders bemerkenswert, weil bei einer Erhöhung der Gesamt-Proteinkonzentration die Rückfaltungseffizienz schlechter wird (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 52). Das Experiment zeigt klar, dass am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine Assoziationsreaktion beteiligt sein muss.

Eine exakte kinetische Interpretation der Daten ist jedoch nicht möglich. Zum einen war bei dieser GdmCl-Konzentration die Ausbeute der Renaturierung im Verhältnis 1 : 1 so gering, dass der Verlauf nicht mehr klar erkennbar ist. Zum anderen muss eine Erhöhung der Konzentration von PslP- α oder PslP- β nicht bedeuten, dass sich dabei auch die Konzentration kritischer Intermediate erhöht. Proben aus den selben Renaturierungsansätzen wurden auch auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Im Vergleich zur Renaturierung bei 0.16 M GdmCl mit PslP-B fanden sich in allen drei bei höherer GdmCl-Konzentration durchgeführten Renaturierungen größere Anteile an fehlgefalteten Spezies, bei Überschuss der α -Kette auch Aggregate (siehe Abbildung 3.24 auf Seite 76). Aus den Gelfiltrationsexperimenten sowie aus der langsamen Kinetik überhaupt lässt sich auch folgern, dass die hauptsächlich populierte Konformation nicht einfach entfaltete oder unspezifisch kompaktierte Moleküle sind. Man kann daher nicht davon ausgehen, dass die Konzentration der kritischen assoziationskompetenten Intermediate mit steigender Gesamtkonzentration an PslP oder einer der Ketten ansteigt. Denn die höhere Konzentration wird auch die Aggregation beschleunigen, die ebenfalls mindestens eine Reaktion zweiter Ordnung ist. Dadurch ist es letztlich möglich, dass die Konzentration einzelner Intermediate bei höherer Proteinkonzentration sinkt. Dies ist ganz analog zu der bei vielen Proteinen (Rudolph *et al.*, 1997) und auch mit PslP (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 52) gemachten Beobachtung, dass die Ausbeute an nativem Protein mit höherer Proteinkonzentration sinkt.

Im folgenden werden nun zunächst die Ergebnisse der Gelfiltrations- und Quervernetzungsexperimente mit PslP-B, PslP- α und PslP- β vorgestellt. Eine zusammenfassende Diskussion der Experimente zur Renaturierung von PslP folgt in Abschnitt 4.6 auf Seite 109.

3.2.4.3 Gelfiltration und Quervernetzung

Renaturierungsexperimente mit PslP- α und PslP- β Wie in Abschnitt 3.2.3 auf Seite 60 beschrieben, ist PslP- α auch unter Nativbedingungen weitgehend unstrukturiert, während das Fluoreszenzspektrum von PslP- β auf die Ausbildung von Struktur hindeutet. Um dies näher zu untersuchen, wurden mit den isolierten Ketten Gelfiltrationsexperimente auf der TSK-Säule durchgeführt. Sie sollten auch dazu dienen, in Chromatogrammen der Renaturierung von komplettem PslP solche Peaks identifizieren zu können, die von den Einzelketten herrühren.

Dazu wurden beide Polypeptide in Nativpuffer zu einer Endkonzentration von 0.39 μM Protein und 0.16 M GdmCl bei 10 °C verdünnt. Die Proteinkonzentration ist die gleiche wie in den meisten Renaturierungsexperimenten von PslS und PslP, bei denen 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt wurden. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Als x-Achse wird hier und in den folgenden Chromatogrammen die Zeit anstatt des Retentionsvolumens verwendet. Damit soll daran erinnert werden, dass zumindest für die Proben, die kurz nach der Überführung in Nativbedingungen aufgetragen wurden, auch die Chromatographiezeit als Renaturierungszeit teilweise einzubeziehen ist.

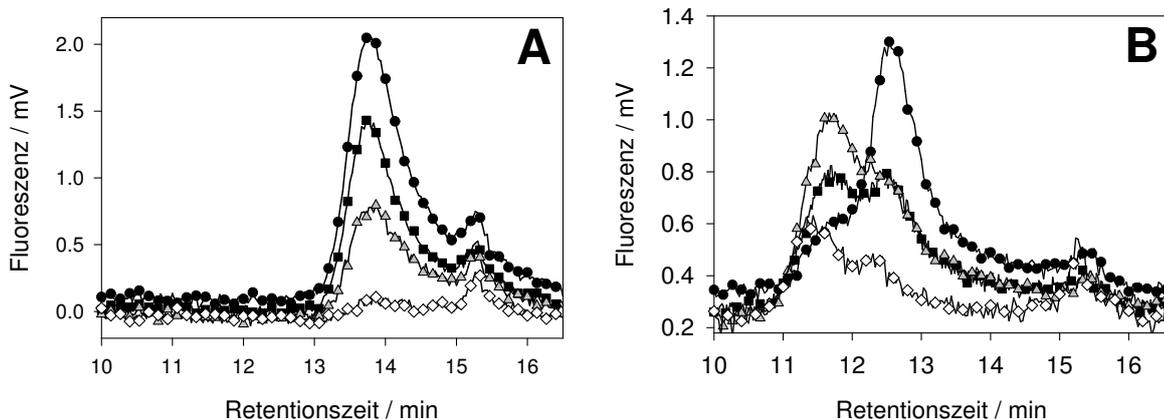


Abbildung 3.20: Gelfiltrationsprofile von α - und β -Kette. **A:** Läufe von PslP- α (0.39 μM) nach der Verdünnung in Nativpuffer zu einer Endkonzentration von 0.16 M GdmCl. Die Proben wurden sofort nach dem Start (\bullet), nach 30 (\blacksquare) und 60 Minuten (\triangle) sowie nach 2.5 Stunden (\diamond) aufgetragen. **B:** Läufe von PslP- β (0.39 μM), ebenfalls in 0.16 M GdmCl. Der Auftrag erfolgte sofort (\bullet), nach 60 Minuten (\blacksquare), 90 Minuten (\triangle) und 3 Stunden (\diamond).

Bei der α -Kette (Abbildung 3.20A) ist im wesentlichen ein Peak bei 13.8 min zu sehen, der mit der Zeit verschwindet, vermutlich durch Aggregation, so dass immer mehr Protein von der Vorsäule zurückgehalten wird. Daneben ist bei 15.3 min ein kleiner Peak zu sehen. Dieser Peak wurde auch in Experimenten mit PslP gefunden. Es handelt sich möglicherweise um leicht strukturiertes, an das Säulenmaterial bindendes PslP- α . Aus dem langsamen Verschwinden des 13.8 min-Peaks kann geschlossen werden, dass PslP- α

zwar zur Aggregation neigt, aber viele Minuten in Lösung bleibt, in kleinen Mengen sogar mehrere Stunden.

Bei PslP- β ist beim ersten, sofort nach dem Start der „Renaturierung“ aufgetragenen Lauf ein Peak bei 12.5 min mit einer früher eluierenden Schulter zu sehen (● in Abbildung 3.20B). Dieser Peak wird schnell kleiner, während die Schulter zunimmt und zu einem eigenen Peak bei 11.5 min wird. Dieser Peak ist nach 60 Minuten genauso hoch wie der erste (■), hat wegen seiner asymmetrischen Form aber wahrscheinlich eine deutlich größere Fläche⁵. Im Verlauf der ersten 90 min nimmt der Peak bei 11.5 min zu (▲ nach 90 min). Danach ist in den Chromatogrammen nur noch eine Verringerung der gesamten Peakfläche zu sehen. Auch nach drei Stunden, wenn die Fläche schon deutlich kleiner geworden ist, ist noch eine Schulter zu erkennen, die dem Peak bei 12.5 min entspricht und wegen der Asymmetrie des Hauptpeaks etwas verschoben scheint (◇).

Auch PslP- β bleibt wie PslP- α also viele Minuten löslich und geht danach durch Aggregation oder Adsorption verloren. Dies steht in Übereinstimmung mit den Renaturierungsausbeuten nach verschieden langer separater Renaturierung (siehe Abbildung 3.17 auf Seite 66). Im Unterschied zu PslP- α verändert sich jedoch das Peakmuster während der Zeit, in der es löslich bleibt. Da in der Gelfiltration größere Moleküle schneller eluieren, bedeutet eine Verschiebung der Population vom Peak bei 12.5 min zu dem bei 11.5 min eine Größenzunahme. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Peak bei 11.5 min um ein Dimer handelt. In der Untereinheitenkontaktfläche von PslP befinden sich bis auf einen nur Aminosäurereste aus der β -Kette (siehe auch Abschnitt 4.6.2 auf Seite 110), so dass eine spezifische Dimerbildung denkbar wäre.

Zur Untermauerung dieser Vermutung wurden Quervernetzungsexperimente mit Glutaraldehyd durchgeführt. Glutaraldehyd bildet mit sich selbst Oligomere unterschiedlicher Länge und kann daher zur Quervernetzung über unterschiedliche Distanzen verwendet werden. Dabei reagieren Glutaraldehyd bzw. längerkettige Dialdehyde mit Lysinresten auf der Proteinoberfläche. Durch Reduktion mit NaBH₄ wird das gebildete Imin stabilisiert. Psl besitzt 12 Lysinreste pro Untereinheit, so dass es für diese Form der Quervernetzung geeignet schien. Zunächst wurde mit nativem PslS überprüft, dass nur spezifisch Dimere quervernetzt werden. Auf dem SDS-Gel wurden nur Banden mit der Molekularmasse des Dimers, jedoch keine Banden mit höherer Masse gefunden. Daneben war auch noch unvernetztes PslS zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde PslP- β bei 10 °C in Nativpuffer zu einer Konzentration von 0.39 μ M bei 0.16 M GdmCl verdünnt. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden Proben entnommen, wie in Abschnitt 2.7.6 auf Seite 37 beschrieben quervernetzt und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Ein solches Gel ist in Abbildung 3.21 auf der nächsten Seite gezeigt.

In den ersten beiden Spuren, die sofort nach der Verdünnung in Nativpuffer quervernetzt wurden, sind Banden mit 20 kDa und bei 36 kDa zu sehen. Dabei handelt es sich um monomeres PslP- β ($M = 20.0$ kDa) und um quervernetzte Dimere. Diese laufen etwas unterhalb der erwarteten Molekularmasse von 40 kDa. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Moleküle durch die Quervernetzung kompakter sind und nicht wie unbehandeltes Protein mit SDS wechselwirken können. Auf Gelen unbehan-

⁵Dies ergab auch eine Analyse von Chromatogrammen zu verschiedenen Zeiten mit dem Programm Peakfit. Die Auftragung der erhaltenen Peakflächen liefert aber keine neuen Informationen.

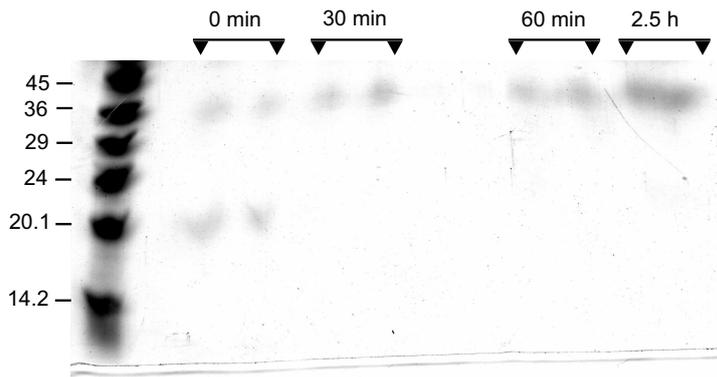


Abbildung 3.21: Quervernetzung von PslP- β unter Nativbedingungen. PslP- β (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde bei 10°C in Nativpuffer mit 0.16 M GdmCl gebracht und nach den angegebenen Zeiten quervernetzt. Das Gel ist mit Coomassie gefärbt.

delter Proben ist keine solche Bande zu sehen. Das Gel zeigt deutlich, dass in Lösung PslP- β -Dimere vorliegen müssen, die der Quervernetzung zugänglich sind. Auch hier werden keine höheren Oligomere beobachtet. Es handelt sich daher um eine spezifische Assoziation zu Dimeren, nicht um Vorstufen zur Aggregation.

In den Spuren, die nach längerer Zeit gezogene Proben enthalten, ist jeweils nur noch das quervernetzte Dimer zu sehen. Im Gegensatz dazu waren beim PslS auch in nativen Proben noch unvernetzte Monomere zu sehen. Dieses unterschiedliche Verhalten ist nicht verwunderlich, weil das PslP- β -Dimer eine andere Struktur als PslS besitzen muss, so dass die Abstände und relative Anordnung der Lysine unterschiedlich sein kann – die Quervernetzungseffizienz der dimeren β -Kette ist offensichtlich höher als die des kompletten Proteins.

Im ersten Gelfiltrationsprofil in Abbildung 3.20B auf Seite 71 ist der Peak bei 12.5 min der bei weitem dominierende, in der Quervernetzungs-Probe beträgt der Anteil monomerer β -Kette kaum über 50 %. Da die Proben zur Quervernetzung 2 Minuten mit Glutaraldehyd inkubiert wurden, bevor die Reaktion mit NaBH_4 gestoppt und fixiert wurde, spiegelt die erste Probe die Population in diesem Zeitraum wider. Für die Gelfiltrationssäule lässt sich ebenfalls kein exakter Zeitpunkt angeben, ab dem die Trennung eintritt, da ihre Größe verändernde Moleküle noch „aufholen“ oder „zurückfallen“ können, was eine Peakverbreiterung bewirkt. Darüber hinaus werden im Chromatogramm nur die Anteile erfasst, die löslich sind und die Vorsäule passieren können. Daher ist es trotz der unterschiedlichen Dimerenanteile plausibel, dass es sich beim 12.5 min-Peak um monomeres, beim 11.5 min-Peak um dimeres PslP- β handelt. Die geringen Mengen an Monomer, die der Fläche des 12.5 min-Peaks nach einer Stunde entsprechen, liegen möglicherweise unter der Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung. Eine andere Möglichkeit, die Unterschiede in der Kinetik der Abnahme der nicht-quervernetzten β -Ketten und der Ausbildung des Dimeren-Peaks in der Gelfiltration zu erklären wäre eine Konformationsänderung des β_2 -Dimers. Die schnell gebildeten quervernetzbaaren Dimere werden zum großen Teil durch Adsorption an die Vorsäule zurückgehalten, und die eluierenden Anteile stehen im Gleichgewicht mit den Monomeren, so dass sie nur als Schulter des Monomerenpeaks sichtbar sind. Erst nach einer langsamen Konformationsänderung entstehen in der Gelfiltration detektierbare Dimere, die nicht an die Matrix adsorbieren.

In jedem Fall wird aus den Gelfiltrationsläufen mit PslP- β deutlich, dass sich eine dimere Spezies, die im 11.5 min-Peak eluiert, erst langsam ausbildet, und dass es diese

Konformation ist, die am längsten in Lösung bleibt. Bei den Konformationen, die im Peak bei 12.5 min eluieren, handelt es sich entweder um monomere β -Kette oder um instabile Dimere.

Zur Untersuchung der Stabilität des β_2 -Dimers wurden Doppelsprungexperimente mit „renaturierendem“ PslP- β durchgeführt, das heisst, PslP- β wurde bei 10 °C auf eine Konzentration von 0.39 μ M mit Nativpuffer verdünnt und nach verschiedenen Zeiten die Denaturierungsamplitude in Harnstoffpuffer 2 gemessen. Dabei wurde jedoch keine Denaturierungsamplitude gefunden. Die von PslP- β gebildete Struktur denaturiert also in der Totzeit des Experiments.

Renaturierungsexperimente mit PslP Mit dem kompletten prozessierten Protein wurden Gelfiltrationsexperimente in analoger Weise durchgeführt. Einige Chromatogramme sind in Abbildung 3.22 dargestellt.

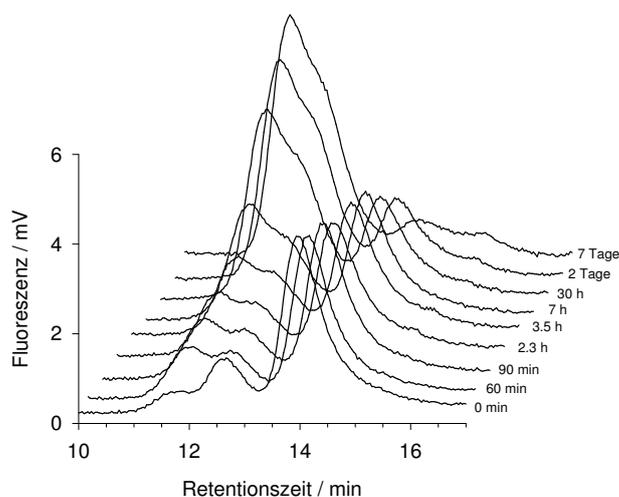


Abbildung 3.22: Gelfiltrationsprofile der Renaturierung von PslP. Das denaturierte Protein wurde bei 10°C, 10 μ g/ml und 0.16 M GdmCl-Restkonzentration in Nativpuffer verdünnt und nach den angegebenen Renaturierungszeiten auf die Säule aufgetragen.

In den Gelfiltrationsprofilen sind im wesentlichen drei Peaks zu erkennen, bei 11.5, 12.5 und bei 14 min. Diese Werte stimmen mit den beiden bei PslP- β und in etwa mit dem bei PslP- α gefundenen Peak überein. Die beiden Peaks bei 11.5 und 12.5 min verhalten sich zu Beginn auch ähnlich wie bei PslP- β beobachtet: Der Peak bei 12.5 min dominiert am Beginn und wird dann kleiner, der andere wächst erst mit der Zeit. Im Unterschied zur isolierten Kette wird die Gesamtfläche beider Peaks aber nicht nach 90 min Renaturierungszeit kleiner, sondern wächst weiter an. Außerdem verschiebt sich das Maximum des ersten Peaks langsam von 11.5 min zu höheren Retentionszeiten und damit in die Nähe des nativen Proteins, das bei 12 min eluiert.

Der dritte Peak bei 14 min ähnelt dem bei PslP- α beobachteten Peak bei 13.8 min. Allerdings bleibt seine Fläche viele Stunden relativ konstant bzw. nimmt nur wenig ab, während der α -Peak kaum eine Stunde erhalten bleibt. Außerdem ist seine Intensität im Maximum etwa doppelt so hoch wie bei PslP- α (siehe Abbildung 3.20A auf Seite 71).

Die mit dem Programm Peakfit integrierten Peakflächen sind in Abbildung 3.23 auf der nächsten Seite dargestellt. Die Fläche des Peaks bei 12.5 min verändert sich im Rahmen des Messfehlers nicht. Die anderen zeigen eine monoexponentielle Zu- bzw. Abnahme, wie die Regressionskurven zeigen.

Der Peak bei 12.5 min wurde bei den Chromatogrammen von PslP- β der monomeren β -Kette zugeordnet. In den PslP-Renaturierungen bleibt er jedoch tagelang erhalten. Die Renaturierung ist aber am Ende des Beobachtungszeitraums abgeschlossen, wie nicht nur der Verlauf der Fläche des Peaks bei 11.5 min zeigt, sondern auch die Doppelsprung- und Hämagglutinationsexperimente. Auch beim Vergleich der Gelfiltrationsprofile mit der Quervernetzungs-kinetik von PslP- β fiel auf, dass dort die Monomere viel schneller verschwinden als dieser Peak bei 12.5 min (Abbildung 3.20B auf Seite 71). Zwar ist nicht auszuschließen, dass dieser Peak auch faltungskompetente Monomere enthält. Es ist aber davon auszugehen, dass er nach wenigen Minuten nur noch solche monomere Moleküle enthält, die keine Dimerisierungskontaktfläche ausgebildet haben und dadurch in einer Sackgasse des Faltungswegs geraten. Das Fortbestehen des Peaks auch noch nach Tagen zeigt, dass sie diese Sackgasse zumindest zum größten Teil nicht mehr verlassen können.

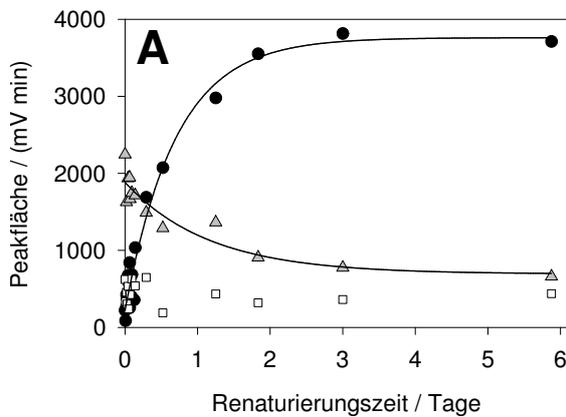


Abbildung 3.23: Renaturierungskinetik von PslP-B in der Gelfiltration bei 10°C und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gezeigt sind die numerisch integrierten Peakflächen der Chromatogramme der Renaturierung bei 0.16 M GdmCl aus Abbildung 3.22 auf der vorigen Seite). Die Symbole bedeuten: ● Peak bei 11.5 min (Dimerenpeak), □ Peak bei 12.5 min, ▲ Peak bei 14 min. Die Linien stellen nichtlineare Regressionen mit einer Exponentialfunktion dar.

Der Peak bei 11.5 min nimmt kontinuierlich zu und verschiebt langsam sein Maximum in Richtung 12 min. Das deutet darauf hin, dass darin eine heterogene Population von Molekülen enthalten ist, die langsam nativähnlicher wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um lediglich zwei Moleküle: Das native PslP und das PslP- β -Dimer. Es ist mit den vorliegenden Daten aber genauso vereinbar, dass noch weitere Faltungs- und Assoziationsintermediate in diesem Peak mitlaufen, etwa $(\alpha\beta)(\beta)$ -Trimere, nicht-native $(\alpha\beta)_2$ -Tetramere oder auch unterschiedlich strukturierte β_2 -Dimere. Klar ist jedoch, dass wenigstens ein sehr langlebiges Intermediat existieren muss, das zumindest die Zusammensetzung β_2 hat.

Die Punkte in Abbildung 3.23 konnten mit monoexponentiellen Funktionen beschrieben werden. Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 4.1 auf Seite 110 aufgenommen und werden dort mit den mit anderen Methoden gefundenen Geschwindigkeiten verglichen.

Konzentrationsabhängige Renaturierungsexperimente Die bisher gewonnenen Daten deuteten darauf hin, dass möglicherweise die Entfaltung des β_2 -Dimers der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung von nativem PslP ist. In diesem Fall erwartet man, dass die Faltungsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration unabhängig ist. Daneben sind bei einer so komplexen Reaktion eine Reihe weiterer geschwindigkeitsbestimmender Schritte denkbar: Es könnte sich auch ein Gleichgewicht zwischen β_2 -

3 Ergebnisse

Dimeren und monomeren β -Kette einstellen, so dass sich die Geschwindigkeit aus der Assoziationskinetik von PslP- α und der monomeren β -Kette ergibt, oder der Assoziationsschritt zwischen α - und β_2 begrenzt die Geschwindigkeit. In diesen Fällen müsste die Geschwindigkeit proteinkonzentrationsabhängig sein. Schließlich wurde bei oligomeren Proteinen auch gefunden, dass Faltungsprozesse nach der Assoziation geschwindigkeitsbestimmend sind (Fuchs *et al.*, 1991).

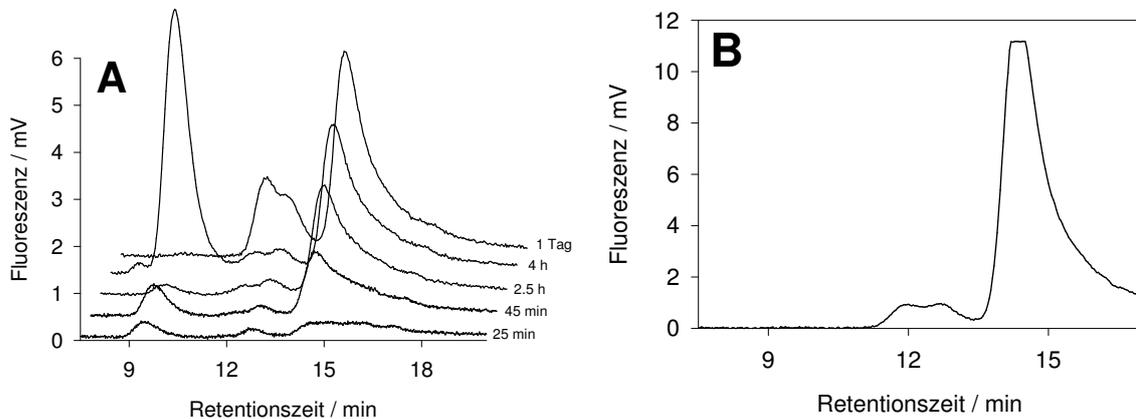


Abbildung 3.24: Renaturierung von PslP mit α - oder β -Überschuss. **A:** PslP- α und PslP- β wurden im Verhältnis 2 : 1 gemischt und renaturiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde eine Probe auf die Säule aufgetragen und die abgebildeten Chromatogramme aufgenommen. Die Endkonzentrationen waren 0.8 μ M PslP- α , 0.4 μ M PslP- β , 0.4 M GdmCl. **B:** Chromatogramm eines analogen Experiments mit umgekehrtem Verhältnis (0.4 μ M PslP- α , 0.8 μ M PslP- β , 0.4 M GdmCl). Der gezeigte Lauf wurde nach 12 Stunden gemessen, unterscheidet sich aber nicht von nach etwa einer Stunde aufgetragenen Läufen.

Die Doppelsprungexperimente ergaben, dass wahrscheinlich ein Assoziationsschritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Die selben Proben wurden auch mittels Gefiltration analysiert, um die Beiträge von PslP- α und PslP- β zu untersuchen.

In Abbildung 3.24A ist ein Experiment gezeigt, bei dem die Konzentration an PslP- α verdoppelt wurde. Wie erwartet ist der letzte Peak vergleichsweise groß. Sein Maximum hat sich von 13.8 min (PslP- α allein) bzw. 14 min (PslP-Renaturierung) nach 14.4 min verschoben. Außerdem nimmt der Peak im Verlaufe eines Tages stetig zu, während er bei der PslP-Renaturierung zunächst annähernd konstant blieb und später sank. Daneben ist der sich verschiebende Doppelpeak bei 11.5 und 12.5 min und ein Peak mit größeren Spezies um 9.5 min zu sehen, bei dem es sich um lösliche oligomere Aggregate handeln dürfte, Zwischenstufen der Bildung unlöslicher Aggregate. Seine Fläche nimmt von Kurve zu Kurve unregelmäßig zu und ab. Möglicherweise ist die Kinetik seiner Bildung ein komplexer Prozess, bei dem die Konzentration der Zwischenstufen schwankt. Eventuell wurden aber bei der Probennahme nach 4 Stunden größere Mengen bereits präzipitierter Aggregate erfasst, von denen der größte Teil auf der Vorsäule zurückgehalten wurde. Wenn ein kleiner Teil dieser Aggregate noch instabil genug ist, um nach der Verdünnung auf der Vorsäule wieder in seine oligomeren Bestandteile zu dissoziieren, so kann dies einen im Vergleich mit den löslichen Proteinen großen Peak hervorrufen.

In Abbildung 3.24B ist ein Chromatogramm aus einem Experiment mit umgekehrten Konzentrationsverhältnissen gezeigt. Die Chromatogramme aus diesem Experiment

verändern sich innerhalb der beobachteten 12 Stunden praktisch nicht. Der bekannte Doppelpack scheint hier etwas (nach 12 und 13 min) verschoben zu sein, höhere Oligomere sind nicht zu erkennen. Dagegen ist auch in diesem Chromatogramm der Peak, der bisher der α -Kette zugeordnet wurde, dominierend, er ist so groß, dass er über den Messbereich des Detektors hinausgeht. Sein Maximum liegt zwischen 14 und 15 min.

Diese beiden Experimente stellen die bisher dargestellte Interpretation der Gelfiltrationsprofile teilweise in Frage. Offenbar lässt sich der Peak bei 14 min nicht eindeutig der α -Kette zuordnen, sondern enthält auch β -Ketten. Da seine Elutionszeit einem globulären Protein mit einer molaren Masse von nur 17 kDa entspricht, während PslP- β eine Masse von 20 kDa besitzt, muss es sich hier um Moleküle handeln, die zeitweise an die Gelfiltrationsmatrix adsorbieren und dadurch zurückgehalten werden.

Bei dem Peak bei 11.5 min ist die Zuordnung weniger fraglich. Aufgrund seines langsamen Wachstums und der Verschiebung des Maximums zu nativen Werten ist es wahrscheinlich, dass es sich dabei um $\beta_2\alpha_n$ -Oligomere mit $n = 0, 1$ oder 2 α -Ketten handelt. Eine eindeutige Zuordnung wäre eventuell möglich, wenn die entsprechende Lösung aufgefangen und massenspektrometrisch untersucht würde. Allerdings sind quantitative Vergleiche sehr unterschiedlicher Peptide in der Massenspektrometrie problematisch (Jensen *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Analysen nicht mehr durchgeführt werden.

Zum anderen ist überraschend, dass sich die Peakmaxima bei unterschiedlichen Renaturierungsbedingungen so stark verschieben. Einflüsse der Schlauchlänge zwischen Säule und Detektor können beim Vergleich der beiden Experimente mit Überschuss an PslP- α und PslP- β ausgeschlossen werden, da die abgebildeten Chromatogramme am selben Messtag aufgenommen wurden. Zwei Erklärungen kommen für die Verschiebungen in Frage, die wahrscheinlich beide teilweise zutreffen. Einerseits sind die gemessenen Peaks wohl Überlagerungen von unabhängig eluierenden Konformationen, etwa bei 14 min bestimmte Konformationen der α -Kette, die auch in Isolation dort einen Peak erzeugt, und andere Moleküle, die aus PslP- β bestehen oder es enthalten. Andererseits liegen möglicherweise dynamische Gleichgewichte zwischen Spezies mit unterschiedlichen Gyrationradien vor, die nicht nur für eine Peakverbreiterung sorgen, sondern bei einer Verschiebung der relativen Populationen auch das Peakmaximum verschieben.

In den Doppelsprungexperimenten, die mit denselben Proben durchgeführt wurden (siehe Seite 69), wurde eine geringere Ausbeute erreicht. Auch in der Gelfiltration ist die Ausbeute geringer als bei der Renaturierung bei 0.16 M. Diese Verringerung ist durch die verstärkte Population von Intermediaten (Oligomerpeaks beim 1 : 1-Experiment bei 0.4 M GdmCl und bei α -Überschuss, adsorbierende Moleküle bei Überschuss an PslP- β) zu erklären. Ob die Intermediate im Falle des β -Überschusses lange genug löslich bleiben, um irgendwann doch noch nativ zu werden, bleibt unklar, jedenfalls verringert sich die Peakfläche innerhalb eines halben Tages nicht.

Durch diese Effekte ist der Einfluss der Konzentrationsänderung auf die Kinetik schlecht zu erkennen, die Frage nach dem Einfluss der Proteinkonzentration auf die Kinetik ist hiermit also nicht eindeutig zu beantworten. In den Doppelsprungexperimenten konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Ausbeute durch die Erhöhung der Proteinkonzentration steigt.

3.2.5 Denaturierungskinetiken von prozessiertem und rekombinantem Lektin

3.2.5.1 Denaturierungskinetiken in Guanidiniumchlorid bei pH 6.8

Bereits aus Dertinger (1996) war bekannt, dass die Denaturierung von PslP und PslS biphasisch verläuft und die Geschwindigkeit von der Proteinkonzentration abhängig ist. In dieser Arbeit wurde die Denaturierung systematisch untersucht und quantitativ ausgewertet.

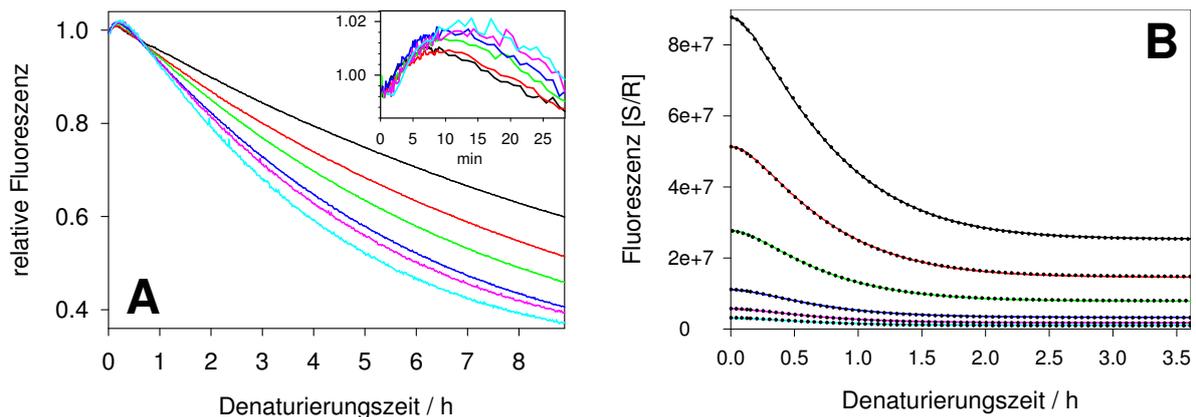


Abbildung 3.25: Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken von PslP-B. **A:** Normierte Denaturierungskinetiken bei 3.5 M GdmCl bei einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml (schwarze Kurve), 50 µg/ml (rot), 30 µg/ml (grün), 20 µg/ml (blau), 10 µg/ml (magenta) und 5 µg/ml (cyan). Das Inset zeigt eine Vergrößerung des Anstiegs zu Beginn. **B:** Denaturierungskinetiken bei 4 M GdmCl bei einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml (schwarze Kurve), 50 µg/ml (rot), 25 µg/ml (grün), 10 µg/ml (blau), 5 µg/ml (magenta) und 2.5 µg/ml (cyan). Die gepunkteten Linien sind die Ergebnisse der nichtlinearen globalen Regression (siehe Text).

Fluoreszenzkinetiken Abbildung 3.25A zeigt normierte Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken von PslP-B bei 3.5 M bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Man erkennt einen deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals in den ersten 10 bis 15 Minuten, das darauf folgende Sinken wird mit steigender Proteinkonzentration zunehmend langsamer. Die relative Amplitude des Anstiegs ist bei kleinen Proteinkonzentrationen größer, und das Maximum wird später erreicht als bei hohen Konzentrationen. Das selbe Verhalten konnte auch bei GdmCl-Konzentrationen bis hinunter zu 3 M und mit PslP-A und PslS beobachtet werden. Bei höheren Konzentrationen an GdmCl ist kein Anstieg mehr zu sehen, sondern nur noch eine *lag*-Phase (siehe Abbildung 3.25B).

Bereits in Dertinger (1996) wurde vermutet, dass der Anstieg der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem nativen Dimer und weitgehend gefalteten Monomeren entspricht. Dafür spricht zum einen die Konzentrationsabhängigkeit: Bei hoher Proteinkonzentration stellt sich das Gleichgewicht schneller ein; wenn sie niedriger ist, liegt es stärker auf der Seite des Monomers, was den stärkeren relativen Anstieg erklärt. Durch die Verschiebung des Gleichgewichts ergibt sich auch die Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der sinkenden Phase von der Proteinkonzentration. Außerdem liegt ein Tryptophan, Trp 19 in der α -Kette, in der Untereinheitenkontaktfläche.

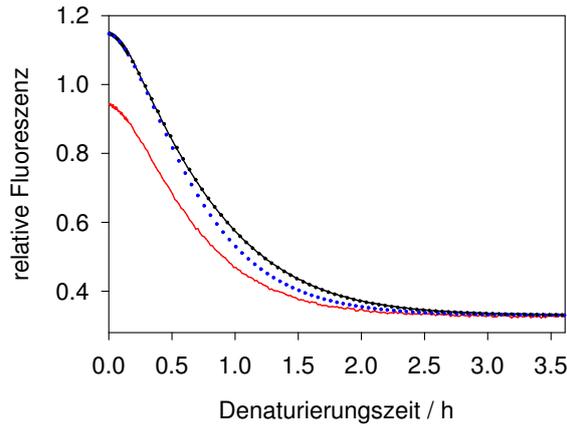
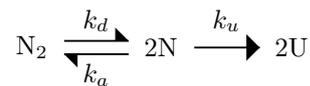


Abbildung 3.26: Vergleich von Daten und Regression für die Denaturierung von PsIP-B in 4 M GdmCl. Gezeigt sind die normierten Fluoreszenzdaten bei 100 µg/ml (schwarze Linie) und 2.5 µg/ml (rote Linie) und die Regressionskurve für 100 µg/ml (schwarze Punkte) und 2.5 µg/ml (blaue Punkte).

Die Seitenketten von Gln 15, Gln 16 und Asn 17 der β -Kette befinden sich nur 3.5 bis 4.7 Å von der Seitenkette von Trp 19 entfernt, und Glutamin und Asparagin sind Quencher der Tryptophanfluoreszenz (Harris & Hudson, 1990). Dass bei höheren GdmCl-Konzentrationen kein Anstieg mehr zu sehen ist, könnte an der geringeren Fluoreszenz von Trp 19 unter diesen Bedingungen liegen.

Das einfachste Modell für den Verlauf der Denaturierung, das mit diesen Beobachtungen im Einklang steht, ist



Die Reaktionsgeschwindigkeiten werden durch ein System von Differentialgleichungen beschrieben, für das keine analytische Lösung gefunden wurde und wahrscheinlich auch keine existiert. Die Auswertung erfolgte daher mit dem Programm Dynafit (Kuzmic, 1996), das die Gleichungen numerisch integriert und außerdem eine globale Analyse der bei verschiedenen Proteinkonzentrationen aufgenommenen Kurven ermöglicht. Für die Regression wurden Skripte verwendet, von denen eines in Abschnitt 2.8.4 auf Seite 40 wiedergegeben ist.

Um die Zahl der Parameter zu reduzieren wurde zunächst die Proteinkonzentration (bei festem *response*-Faktor von U) anhand der Endwerte manuell angepasst, da sie kleine Abweichungen vom errechneten Wert zeigten. Zur Reduktion der Zahl an variierten Parametern wurde außerdem versucht, die *response*-Faktoren festzulegen, indem die im freien Fit erhaltenen Werte gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen wurden. Zwar ergaben sich annähernd Geraden, aber die mit den so bestimmten Faktoren durchgeführten Regressionen ergaben schlechtere Anpassungen, wenn sie überhaupt konvergierten.

In Abbildung 3.25B auf der vorigen Seite ist ein Vergleich der Daten und Regressionskurven für die Denaturierung in 4 M GdmCl gezeigt. Man sieht, dass das Modell die Messdaten gut beschreibt. Nur bei kleinen Proteinkonzentrationen wichen die Signalintensitäten am Beginn der Kinetik bei allen GdmCl-Konzentrationen von den Regressionskurven ab. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 3.26 die Kurven aus Abbildung 3.25B mit der höchsten und der niedrigsten Proteinkonzentration normiert aufgetragen.

3 Ergebnisse

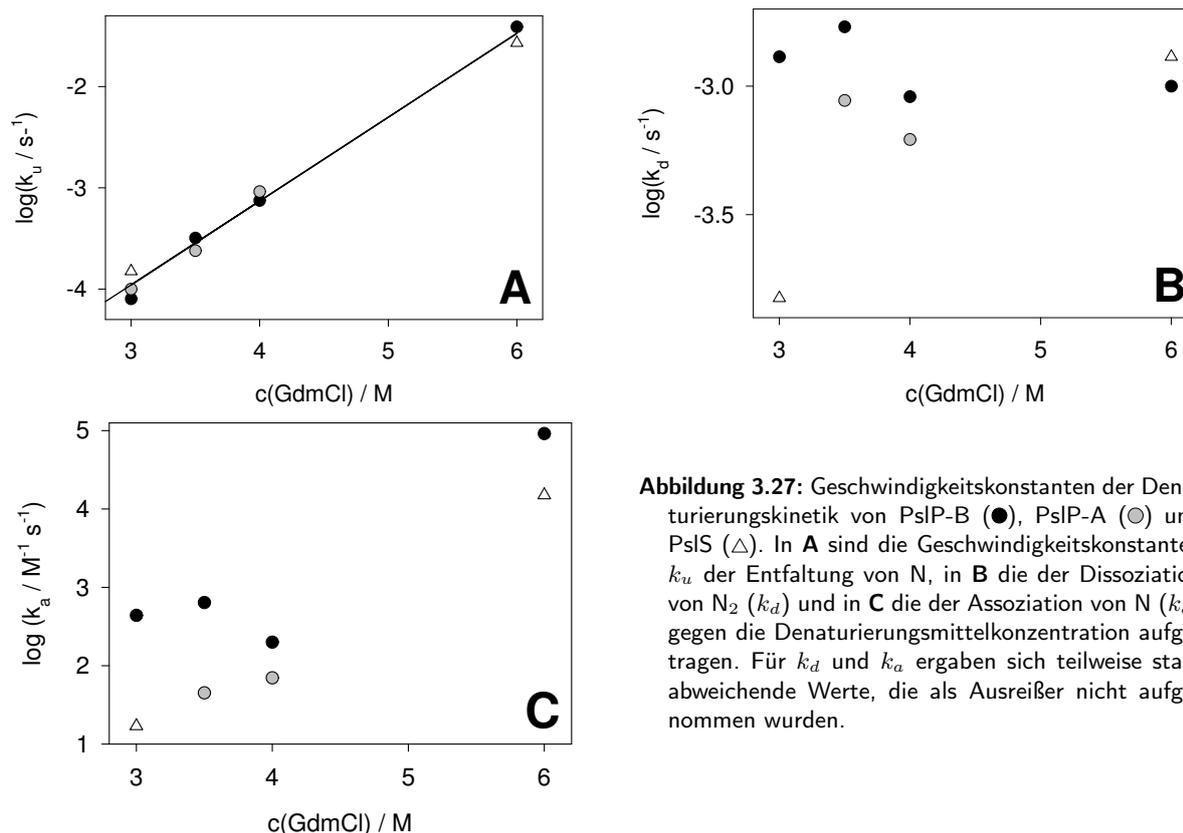
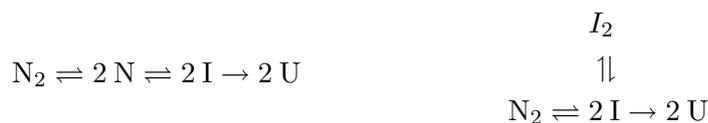


Abbildung 3.27: Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierungskinetik von PsIP-B (●), PsIP-A (○) und PsIS (△). In **A** sind die Geschwindigkeitskonstanten k_u der Entfaltung von N, in **B** die der Dissoziation von N_2 (k_d) und in **C** die der Assoziation von N (k_a) gegen die Denaturierungsmittelkonzentration aufgetragen. Für k_d und k_a ergaben sich teilweise stark abweichende Werte, die als Ausreißer nicht aufgenommen wurden.

Obwohl die Proteinkonzentration korrekt normiert wurde, wie die Übereinstimmung von Daten und Regressionskurven am Ende der Kinetik zeigt, liegen die Startwerte der Messdaten bei niedrigen Proteinkonzentrationen zunehmend unter denen der hohen Konzentrationen. Darüber hinaus finden sich auch bei höheren Konzentrationen systematische Abweichungen der Regression von den Messdaten, die nur bei Auftragung der Residuen sichtbar werden. Diese Abweichungen treten selbst dann auf, wenn man nur eine einzelne Kurve mit dem selben Modell zu beschreiben versucht (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich ist das Modell zu einfach und müsste um weitere Spezies erweitert werden, um die Daten korrekt zu beschreiben. Denkbar wäre ein weiteres Denaturierungsintermediat zwischen N und U. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Dissoziation mit einer teilweisen Denaturierung einhergeht, dass aber auch diese Denaturierungsintermediate dimerisieren können:



In jedem Fall enthalten diese Modelle jeweils so viele weitere variable Parameter, dass

keine sinnvolle Regression mehr möglich ist. Die Anpassung der Daten war mit dem ursprünglichen Modell insgesamt recht gut. Daher wurde ausschließlich das einfache Modell verwendet. Die Ergebnisse dieser Regression sind in Abbildung 3.27 auf der vorigen Seite dargestellt.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von N, k_u , zeigen eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Dabei ist kein Unterschied zwischen PslP-A, PslP-B und PslS zu erkennen. Offenbar spielt weder der in PslS enthaltene Linker noch die Ladungsdifferenz zwischen PslP-A und PslP-B eine Rolle für die Kinetik der Entfaltung. Die Größenordnung von k_u steht im Einklang mit der bei den Übergängen beobachteten langsamen Denaturierung. Ein quantitativer Vergleich ist hier leider nicht möglich, weil nur bei wenigen Proteinkonzentrationen Übergänge gemessen wurden. p

Die Werte für k_d und k_a streuen stark, dabei ist kein klarer Trend zu erkennen. Es scheint zwar, als sei die Assoziationsgeschwindigkeit (k_a) bei 6 M GdmCl größer als bei 3 bis 4 M. Dies wäre sehr ungewöhnlich, da man davon ausgehen muss, dass das native Protein unter diesen Bedingungen stark destabilisiert ist. Unter diesen Bedingungen wird nur noch eine schwach ausgeprägte *lag*-Phase beobachtet. Vermutlich stellt sich bei 6 M GdmCl überhaupt kein Gleichgewicht mehr ein, da $k_u \gg k_a$ ist. Damit sind k_a und die Gleichgewichtskonstante K_D nicht mehr bestimmbar, lediglich k_d kann aus der *lag*-Phase bestimmt werden.

Aber auch bei geringeren GdmCl-Konzentrationen sind die Geschwindigkeitskonstanten durch die Daten nicht gut definiert, was sich in der starken Streuung äußert. Da nach der Einstellung des Gleichgewichts die beobachtete Geschwindigkeitskonstante außer von k_u nur noch von der Konzentration von N abhängt, sollte die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation besser aus der globalen Regression bei verschiedenen Proteinkonzentrationen zu ermitteln sein als die Geschwindigkeitskonstanten. Eine nähere Diskussion folgt in Abschnitt 3.3.1 auf Seite 84.

CD-Kinetiken CD-Spektroskopie liefert im fernen UV-Bereich (180 – 250 nm) Informationen über den Anteil nativer Sekundärstruktur, während die Tryptophanfluoreszenz Aussagen über die Tertiärstruktur in der Umgebung der Fluorophore erlaubt. Zur Beobachtung der stark konzentrationsabhängigen Denaturierungskinetik von Psl eignet sich die CD-Spektroskopie allerdings weniger, da dabei relativ hohe Proteinkonzentrationen benötigt werden. Es wurden daher keine proteinkonzentrationsabhängigen Kinetiken gemessen und lediglich überprüft, ob sich im CD-Signal eine vergleichbare Kinetik ergibt (siehe Abbildung 3.28 auf der nächsten Seite).

Das CD-Signal zeigt kaum noch eine *lag*-Phase zu Beginn (kleines Bild). Diese Phase ist jedoch in der Fluoreszenz nur deshalb so deutlich zu sehen, weil die Fluoreszenz der strukturierten Monomere größer ist als die des nativen Proteins, während sie bei der Denaturierung stark abnimmt. Der Fluoreszenzanstieg bei der Dissoziation der nativen Dimere wird, wie oben ausgeführt, wahrscheinlich durch den Beitrag des Trp 206 in der Untereinheitenkontaktfläche verursacht, während die Umgebung der anderen Fluorophore sich bei diesem Schritt kaum ändert. Ein wesentlicher Aspekt des Untereinheitenkontaktes ist andererseits die Ausbildung eines durchgängigen *back sheet* mit den faltblatt-typischen Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten. Wenn die Untereinheiten dissoziieren, geht daher zwangsläufig auch Sekundärstruktur verloren. Somit

3 Ergebnisse

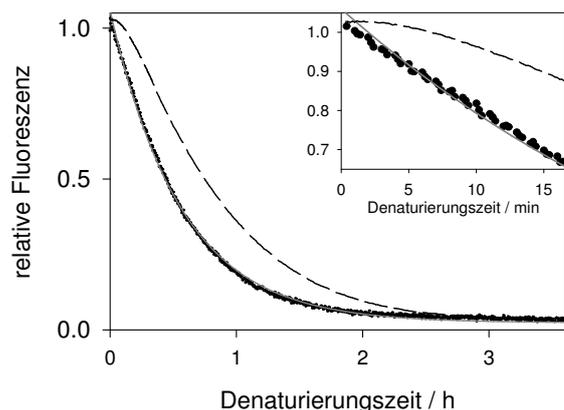


Abbildung 3.28: Denaturierungskinetik von PslP bei 4 M GdmCl in Fluoreszenz (gestrichelte Linie) und Circular dichroismus (Punkte). Die graue Linie ist eine Regressionskurve der CD-Daten mit einer Exponentialfunktion. Im kleinen Bild ist der Ausschnitt am Beginn der Kinetik vergrößert dargestellt.

ändert sich das CD-Signal gleichsinnig zur folgenden Denaturierung der Monomere, aber nur zu einem geringen Anteil, und die Dissoziationsphase kann kaum unterschieden werden.

Daher kann die CD-Denaturierungskurve bis auf einige kleine Abweichungen durch die schwach ausgeprägte *lag*-Phase mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Die erhaltene Geschwindigkeitskonstante ist $5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (23 min) und unterscheidet sich damit nur geringfügig von der, die eine Regression der Fluoreszenzdaten nach der *lag*-Phase mit einer monoexponentiellen Funktion ergibt ($3.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

3.2.5.2 Denaturierungskinetiken mit anderen Denaturierungsmitteln

Neben den Denaturierungskinetiken in GdmCl bei pH 6.8 wurde die Denaturierung auch in anderen Puffern untersucht. Ziel der Arbeiten war es, Bedingungen zu finden, bei denen die Denaturierung schnell genug abläuft, um für Doppelsprungexperimente zur Quantifizierung nativen Lektins eingesetzt werden zu können. Daneben konnte auch die Rolle von Ladungswechselwirkungen bei der Denaturierung näher analysiert werden.

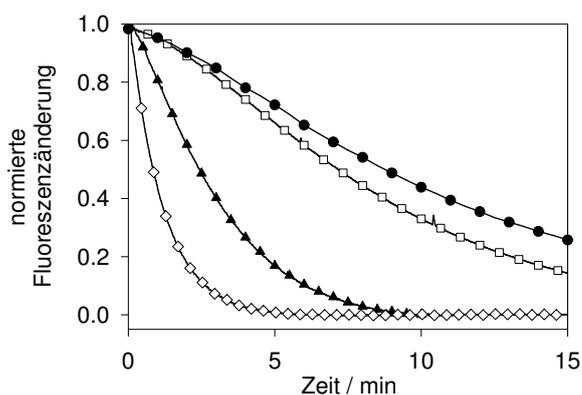


Abbildung 3.29: Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken von PslP (10 µg/ml, 20°C) in 6 M GdmCl, pH 6.8 (●), 6 M GdmCl, 50 mM Glycin pH 2.5 (□), 3.5 M GdmSCN, 50 mM Glycin pH 2.5 (▲) und 6 M Harnstoff, 50 mM Glycin pH 2.5 (◇). Die Messungen wurden an verschiedenen Geräten durchgeführt und daher zum Vergleich normiert.

In Abbildung 3.29 sind Denaturierungskinetiken von PslP in unterschiedlichen Puffern gezeigt. Sie wurden bei 20 °C durchgeführt, da zunächst befürchtet wurde, dass bei 10 °C die Denaturierung nicht ausreichend beschleunigt werden könnte, um Doppelsprungexperimente mit geeigneter Zeitauflösung durchführen zu können. Die verwendete

ten Konzentrationen der Denaturierungsmittel sind so gewählt, wie sie auch in einem Doppelsprungexperiment erreicht werden können, wenn ein Teil Renaturierungsansatz mit drei Teilen der Denaturierungsmittel-Stammlösung gemischt werden. Bei GdmCl sind 8 M gut löslich, bei dem stärkeren Denaturierungsmittel Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) lediglich etwa 4 M. Mit Harnstoff wären bei 20 °C auch noch Konzentrationen bis zu 10 M und daher 7.5 M in der Denaturierungskinetik zu erreichen.

Die Erniedrigung des pH-Werts von 6.8 (●) auf 2.5 (□) in GdmCl brachte nur eine geringe Beschleunigung der Denaturierung. Durch die hohe Ionenstärke in der GdmCl-Lösung werden die Ladungen, die durch den erniedrigten pH-Wert am Protein erzeugt werden, sehr effektiv voneinander abgeschirmt, so dass die Protonierung das native Protein und das monomere Denaturierungsintermediat bzw. die entsprechenden Übergangszustände nur wenig destabilisiert. Daher wurde versucht, die Denaturierung durch die Verwendung von Guanidiniumthiocyanat zu beschleunigen, das ein stärkeres Denaturierungsmittel als Guanidiniumchlorid ist (Nozaki & Tanford, 1970; Gordon, 1972). Bei pH 2.5 war die Denaturierung mit GdmSCN (▲) deutlich schneller als mit GdmCl. Um unter diesen Bedingungen die Denaturierung in Doppelsprungexperimenten durchzuführen, hätte man jedoch trotzdem noch etwa 15 min messen müssen.

Als noch schneller erwies sich die Denaturierung mit Harnstoff bei pH 2.5 (Harnstoffpuffer 1, ◇), sie ist bei 20 °C in weniger als 10 min abgeschlossen. Harnstoff ist ein nichtionisches Denaturierungsmittel, und auch wenn er für sich genommen schwächer denaturierende Eigenschaften hat als Guanidiniumchlorid, wird das Protein durch die Kombination mit der Wirkung der Protonierung stark destabilisiert. Verwendet man statt Harnstoff in Glycinpuffer bei pH 2.5 eine konzentrierte Harnstofflösung in etwa 1 M HCl, die mit konzentrierter HCl auf pH 1.8 eingestellt wurde (Harnstoffpuffer 2), so ist die Denaturierung auch bei 10 °C innerhalb von weniger als 10 min abgeschlossen. Bei 10 °C ist die maximale Löslichkeit des Harnstoffs 9 M.

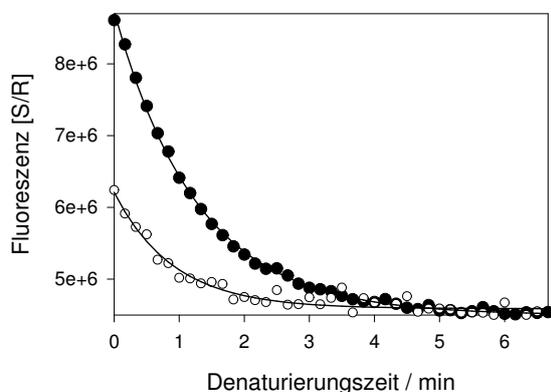


Abbildung 3.30: Denaturierung von PsIP in 6.75 M Harnstoff, pH 1.8 bei 10°C. Gezeigt sind eine Nativkontrolle (●) und ein Doppelsprungexperiment nach 72 Stunden Renaturierung bei 0.16 M GdmCl (○). Die Linien sind monoexponentielle Regressionskurven durch die Daten.

Zwei solche Experimente sind in Abbildung 3.30 abgebildet, bei einem handelt es sich um die Messung einer Renaturierungsprobe. Die Kinetiken wurden sofort nach dem Schließen des Deckels der Probenkammer gestartet. Die zwischen dem Start der Denaturierung und der Messung verstrichene Zeit beträgt ziemlich konstant 5 Sekunden. Die Entfaltungskinetiken konnten mit einer einfachen Exponentialfunktion mit einer Geschwindigkeitskonstante von 0.84 min^{-1} beschrieben werden. Dadurch ergibt sich, dass während den 5 Sekunden Verzögerung ein konstanter Anteil der Signaländerung nicht

erfasst wird, und die gemessene Amplitude kann ohne Korrektur des Zeitpunkts Null als Maß für natives Protein verwendet werden.

Für die Denaturierung in Doppelsprungexperimenten wurde hauptsächlich unter diesen Bedingungen gearbeitet, daneben wurde auch Harnstoffpuffer 1 verwendet, wenn die Renaturierungskinetiken so langsam waren, dass die Proben vor der Denaturierung auf 20 °C gebracht werden konnten, bzw. zur Bestimmung von Renaturierungsausbeuten. Die in den Doppelsprungexperimenten gemessenen Denaturierungskinetiken in beiden Harnstoffpuffern waren ebenfalls monoexponentiell, und die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten stimmten im Rahmen des Messfehlers mit den Nativkontrollen überein (0.70 – 1.20 min⁻¹ für die am stärksten streuenden Denaturierungskurven). Wurde die Regression der Denaturierungskinetiken von Doppelsprungexperimenten mit festgehaltener Geschwindigkeitskonstante ($k = 1.4 \text{ min}^{-1}$) durchgeführt, so änderten sich die erhaltenen Denaturierungsamplituden nicht signifikant.

3.3 Untersuchungen zur Stabilität und Dynamik des Lektin-Dimers

3.3.1 Folgerungen aus den Denaturierungskinetiken

In den Denaturierungskinetiken wurde beobachtet, dass zunächst die nativen Dimere dissoziieren und erst anschließend die strukturierten Monomere entfalten (siehe Abschnitt 3.2.5 auf Seite 78). Die aus den Denaturierungskinetiken gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation und Dissoziation streuten stark. Wie bereits bei der Diskussion der Kinetiken ausgeführt, sollte die Gleichgewichtskonstante zwischen etwa 3 und 4 M GdmCl mit größerer Genauigkeit zu ermitteln sein. Die nach $K_D = k_d/k_a$ berechneten Gleichgewichtskonstanten liegen für alle drei Proteine zwischen $3 \cdot 10^{-6}$ und $2 \cdot 10^{-5}$ M, sie zeigen immer noch deutliche Streuung, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen PslP-A, PslP-B und PslS oder bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Um die monomere, strukturierte Spezies näher charakterisieren zu können, wurde versucht, diese bei mild denaturierenden Bedingungen zu populieren. Doch weder in neutraler Harnstofflösung noch durch pH-Variationen gelang dies. Die Denaturierung mit Harnstoff wurde bei pH 6.8 mit 3 bis 8 M Harnstoff gemessen und war noch wesentlich langsamer als mit GdmCl (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die Amplitude der steigenden Phase der Denaturierungskinetik mit sinkender Harnstoffkonzentration kleiner⁶. Diese Phase entspricht der Einstellung des Gleichgewichts $N_2 \rightleftharpoons 2 N$. Die extrem langsame Denaturierung ist daher darauf zurückzuführen, dass unter diesen Bedingungen das Monomer-Dimer-Gleichgewicht auf der Seite des Dimers liegt und kaum Monomer gebildet wird, so dass $k_{obs} = [N] k_u$ sehr klein wird.

Die Bildung von monomerem Psl bei pH-Werten zwischen 5 und 3.5 wurde untersucht, indem PslP in entsprechenden Puffern über Nacht inkubiert und anschließend in 3 M GdmCl bei pH 6.8 denaturiert wurde. Wenn das Protein unter diesen Bedin-

⁶Dies widerspricht nicht der Tatsache, dass bei den Denaturierungskinetiken in GdmCl die lag-Phase bei Denaturierungsmittel-Konzentrationen von 3 bis 4 M ausgeprägter ist als bei 6 M, denn bei 6 M stellt sich überhaupt kein Gleichgewicht mehr ein.

gungen bereits als Monomer vorliegt, sollte die ansteigende Phase wegfallen und sofort die Denaturierung einsetzen. Dies war aber nicht der Fall, es wurde immer zuerst die Einstellung des Monomer-Dimer-Gleichgewichts beobachtet.

3.3.2 Untersuchungen zum Untereinheitenaustausch

Bei der Reinigung von PslP wurden neben den reinen Isoformen (Dimere AA und BB) auch gemischte Dimere AB gefunden, und in dieser Fraktion stellte sich wieder das ursprüngliche Gleichgewicht zwischen den drei Formen ein (siehe Abschnitt 3.1.1 auf Seite 43). Dazu müssen die Dimere zunächst dissoziieren, um dann teilweise andere Oligomerisierungspartner zu finden. Die ablaufenden Reaktionen sind



Kinetik des Untereinheitenaustauschs Um die Geschwindigkeit dieses Prozesses zu untersuchen, wurden zunächst gleiche Mengen der reinen Untereinheiten miteinander gemischt und nach verschiedenen Zeiten auf der Anionenaustauschersäule analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.31A abgebildet.

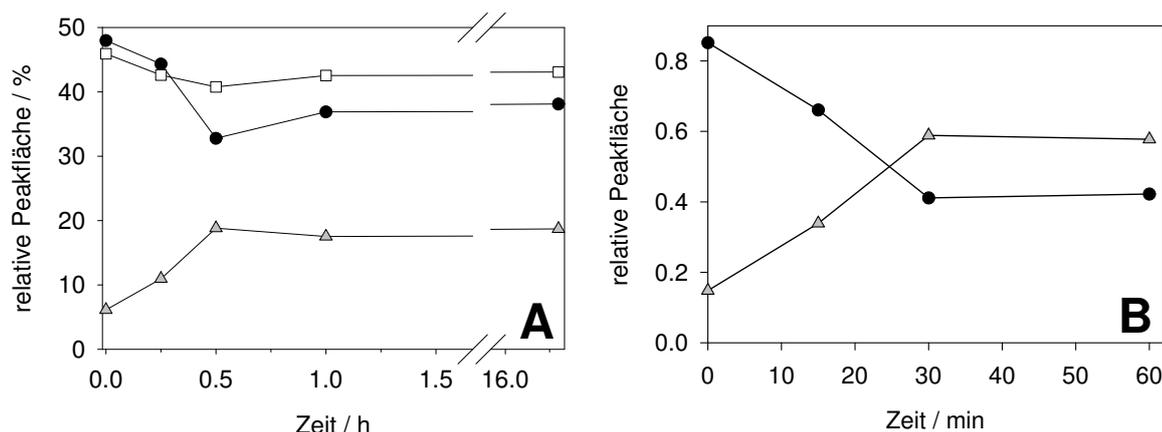


Abbildung 3.31: Kinetik des Untereinheitenaustauschs bei Raumtemperatur. **A:** PslP-A und PslP-B wurden in SourceQ-Puffer gemischt (Endkonzentration je 0.44 mg/ml) und nach der angegebenen Inkubationszeit auf die SourceQ-Säule aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Dargestellt sind die relativen Peakflächen von reinen BB-Dimeren (●), AA-Dimeren (□) und gemischten AB-Dimeren (△). Die Integration der Peakflächen erfolgte numerisch mit dem Programm Unicorn. **B:** PslP-A und PslP-B wurden im Verhältnis 20:1 gemischt (Endkonzentration 2.5 mg/ml PslP-A, 0.125 mg/ml PslP-B) und nach der angegebenen Zeit auf der SourceQ-Säule analysiert. Die Peakfläche des im Überschuss aufgetragenen AA-Dimers ist konstant, gezeigt ist die relative Fläche der BB-Dimere (●) und der AB-Dimere (△). Die Integration der Peakflächen erfolgte ebenfalls mit Unicorn.

Man erkennt, dass sich das Gleichgewicht nach einer halben Stunde wieder eingestellt hat. Außerdem wird deutlich, dass sich nicht das Verhältnis 1 : 2 : 1 für AA : AB : BB einstellt, das man erwarten würde, wenn alle drei Dimere gleich stabil wären. Vielmehr wird ein geringerer Anteil an AB gebildet. Der Unterschied zwischen AA und BB rührt möglicherweise von unterschiedlichen Wiedergewinnungsraten der Isoformen auf

der Säule her (Rini *et al.*, 1987), denn AA und BB wurden ja in gleicher Konzentration eingesetzt und werden in 1 : 1-Stöchiometrie verbraucht.

Die Abweichung vom statistisch erwarteten Verhältnis ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass eines der beiden reinen Dimere stabiler ist als das andere und auch als das gemischte Dimer. Allerdings könnte sie auch dadurch entstehen, dass das Gleichgewicht sich im gleichen Zeitfenster einstellt wie die Laufzeit der Säule (ca. 35 min). Wenn die Trennung einsetzt, ist in der Umgebung der AB-Dimere die lokale Konzentration an BB-Dimeren und vor allem an den früher eluierenden AA-Dimeren verringert. Es stellt sich ein neues Gleichgewicht mit geringerer AB-Konzentration ein, wobei die reinen Dimere kontinuierlich entfernt werden.

Um ein genaueres Maß für die Geschwindigkeit des Untereinheitenaustauschs zu erhalten, wurde das Experiment mit einem zwanzigfachen Überschuss an PslP-A wiederholt. Wenn die Stabilität der AA- und BB-Dimere in etwa gleich groß ist, sollte unter diesen Bedingungen die Konzentration von PslP-A-Monomeren viel größer sein als die der PslP-B-Monomere. Dadurch würde bis zur Einstellung des Gleichgewichts keine Assoziation von PslP-B zu BB-Dimeren beobachtet, sondern bevorzugt mit PslP-A zu AB-Dimeren. Die Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung sollte also die Dissoziationskonstante des BB-Dimers widerspiegeln. Ein entsprechendes Experiment ist in Abbildung 3.31B auf der vorigen Seite dargestellt. Auch hier ist die Gleichgewichtseinstellung nach einer halben Stunde abgeschlossen.

Aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung der Methode und wegen der Möglichkeit von Umwandlungseffekte auf der Säule ist es nicht möglich, auf diese Weise einen exakten Wert für k_d zu erhalten. Man kann aber abschätzen, dass die Halbwertszeit in der Größenordnung von 10 min ($k_d = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) liegen wird.

Stabilität der Dimere Zur Untersuchung der Stabilitäten der unterschiedlichen Dimere wurde in einer Messreihe eine konstante Menge PslP-A mit unterschiedlichen Mengen PslP-B über Nacht inkubiert und anschließend auf der SourceQ-Säule analysiert. Analog wurde auch die Menge an PslP-A variiert, die Verhältnisse betragen zwischen 1 : 20 und 12.5 : 1.

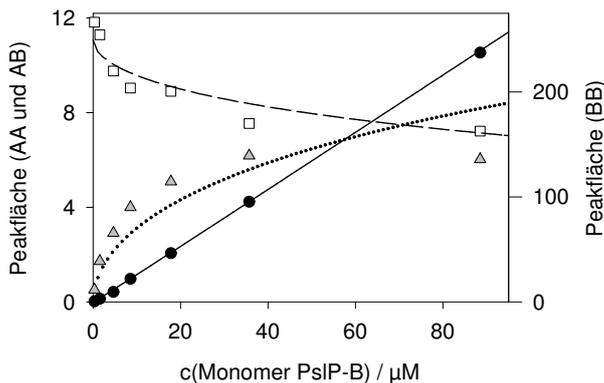


Abbildung 3.32: Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Dimeren. AA-Dimere ($4.31 \mu\text{M}$ PslP-A-Monomere) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen PslP-B inkubiert und über Nacht äquilibriert. Aufgetragen sind die nach der Trennung numerisch ermittelten Peakflächen für AB (Δ), AA (\square) und BB (\bullet , rechte Achse) sowie das Ergebnis der globalen Regression (siehe Text) für AA (gestrichelte Linie), AB (gepunktete Linie) und BB (durchgezogene Linie).

Abbildung 3.32 zeigt beispielhaft eine Messreihe mit $4.31 \mu\text{M}$ PslP-A. Oberhalb $40 \mu\text{M}$ PslP-B verändern sich die Peakflächen der AA- und AB-Dimere nicht mehr, es wird also eine Art Sättigung erreicht. Nach dem Modell ist dies aber gar nicht zu erwarten, die

AA-Konzentration sollte kontinuierlich abnehmen und asymptotisch auf Null zugehen. Die Daten wurden mit dem Programm Dynafit (Kuzmic, 1996) ausgewertet, die verwendeten Skripte sind in Abschnitt 2.8.4 auf Seite 40 dokumentiert. Auch die Regression ergibt, dass die Daten keine „Sättigung“ erreichen dürften. Die Kurven sind ebenfalls in Abbildung 3.32 auf der vorigen Seite abgebildet. In Messreihen, bei denen die Konzentration von PslP-B festgehalten wurde, ergibt sich ein qualitativ gleiches Verhalten im selben Konzentrationsbereich.

Die Ursache für dieses Verhalten dürfte die oben bereits diskutierte Umwandlung von AB-Dimeren in AA- und BB-Dimere sein, wenn im Verlaufe der Trennung die lokale Konzentration der reinen Dimere sinkt. Dieser Effekt führt offensichtlich nicht dazu, dass bei jeder AB-Konzentration ein konstanter Anteil umgewandelt wird, sondern umso mehr, je größer die AB-Konzentration vor dem Auftrag ist. Wenn zu einem gegebenen Zeitpunkt der Trennung die Konzentration von AA und BB im entsprechenden Bereich der Säule in etwa konstant ist, dann ist das Verhältnis AA : AB : BB bei größerer AB-Konzentration weiter vom Gleichgewicht entfernt als bei kleiner, die Assoziation $A + B \rightarrow AB$ spielt eine geringere Rolle, und es wird in der Trennungszeit ein größerer Anteil an AB in AA und BB überführt.

Eine quantitative Auswertung der Daten ist daher schwierig. Da der beschriebene Effekt bei hohen Konzentrationen der variierten Isoform größer ist, wurden Regressionen durchgeführt, bei denen die letzten ein oder zwei Punkte aller Kurven nicht einbezogen wurden. Dabei wurden Werte für K_{AA} , K_{BB} und K_{AB} erhalten, die im Bereich von 10^{-6} M bis 10^{-8} M lagen. Die Kurven zeigten aber immer noch starke systematische Abweichungen von den Daten, die wie bei der Regression aller Datensätze auf Umwandlungsprozesse auf der Säule zurückgeführt werden können. Daher wurde versucht, durch Festhalten jeweils einer Gleichgewichtskonstante zu ermitteln, bis zu welchen Werten eine Anpassung der übrigen Konstanten möglich ist. Bei Werten über 10^{-5} M für eine beliebige der Konstanten wichen bei allen Datensätzen die Regressionskurven extrem von den Daten ab, und zwar auch für die in der Konzentration variierte Spezies, für die die Messdaten auf einer Geraden liegen. Das Festhalten einer Konstante auf sehr niedrigem Wert ergab keine solche Grenze, die Regression konvergierte immer und lieferte entsprechend angepasste Werte für die anderen Gleichgewichtskonstanten.

Aus den kinetischen Messungen ist bekannt, dass die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation in der Größenordnung von 10^{-3} s^{-1} liegt. Da Assoziationsreaktionen von Proteinen in der Regel Geschwindigkeitskonstanten von 10^3 bis $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ haben, in Extremfällen bis $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Seckler, 2000), ergibt sich daraus eine Untergrenze für K_D von 10^{-11} M, eher 10^{-9} M. Auch wenn man nur die Regressionen betrachtet, die für alle Gleichgewichtskonstanten oberhalb dieser Grenzen liegen, ergibt sich kein klares Bild. Es ist auch nicht eindeutig abzulesen, ob AA oder BB stabiler ist.

3.4 Versuche zur Entwicklung eines Funktionstests

Wie in Abschnitt 1.3 auf Seite 18 beschrieben, sollte ein Assay sensitiver, quantitativer Assay zur Quantifizierung nativen, funktionalen Lektins in Renaturierungsexperimenten entwickelt werden. Dazu wurden verschiedene Strategien verfolgt. Grundsätzlich wurde bevorzugt nach Methoden gesucht, die in Lösung und in kleinen Konzentrations-

bereichen mit Fluoreszenzdetektion arbeiten. Unter diesen Bedingungen sollten auch die Faltungsexperimente durchgeführt werden.

Bei diesen Untersuchungen wurden zwar interessante Erkenntnisse über die Eigenschaften von Erbsenlektin und über die angewandten Methoden gewonnen, ein für Faltungsuntersuchungen geeigneter Assay konnte aber letztlich nicht entwickelt werden. Die Untersuchungen lassen sich in vier Gruppen einteilen: Nicht fluoreszierende Saccharide, fluoreszenzmarkierte Saccharide, Affinitätschromatographie und Variationen des etablierten Hämagglutinationstests. Die Präparation und Reinigung der fluoreszenzmarkierten Saccharide wird in einem eigenen Abschnitt geschildert.

3.4.1 Bindung an nichtfluoreszierende lösliche Saccharidliganden

Zwar ist der natürliche Ligand für Psl unbekannt, jedoch sind in der Literatur Bindungskonstanten nicht nur für unterschiedliche Monosaccharide, sondern auch für verschieden substituierte Zucker und für Oligosaccharide zu finden. Teilweise stammen diese Daten aus Inhibitionsstudien (Stubbs *et al.*, 1986; Van Wauwe *et al.*, 1975) und Untersuchungen mit Lektinsäulen (Kornfeld *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1982), teilweise wurden sie durch isotherme Titrationskalorimetrie gewonnen (Schwarz *et al.*, 1996, 1993; Stubbs *et al.*, 1986). Darüber hinaus sind weitere Faktoren für die Affinität und Spezifität von Leguminosenlektinen bekannt. Zum einen ergibt sich eine hochaffine Bindung meist nur mit komplexen Oligosacchariden, deren Struktur und Zusammensetzung recht unterschiedlich sein kann. Auf Seite des Proteins spielen neben der Bindungsstelle für Monosaccharide („*primary site*“), die wie bei Psl in Komplex-Kristallstrukturen immer sichtbar ist, weitere Interaktionsflächen eine Rolle: „*extended sites*“ (Bindestellen für Teile der Oligosaccharidstruktur in der Nähe der *primary site*) und „*secondary sites*“ (räumlich unabhängige Bindestellen). Die Interaktionen in diesen Bindestellen sind in Komplexstrukturen nicht immer sichtbar (siehe z.B. den Review Weis & Drickamer, 1996). Strukturelle Charakteristika eines hochaffinen an Psl bindenden Oligosaccharids wurden von Yamamoto *et al.* (1982) beschrieben. Aber auch hier handelt es sich nicht um das oder die physiologischen Zielmoleküle.

Da zu Beginn der Arbeit noch keine Ergebnisse der parallelen kombinatorisch-systematischen Suche nach hochaffinen Liganden (siehe Abschnitt 1.3 auf Seite 18) vorlagen, sollte versucht werden, vorerst aufgrund rationaler Kombination verschiedener Modifikationen an Monosacchariden die Affinität zu verbessern. Modifikationen mit zusätzlichen Substituenten am Zucker bieten die Chance, über die Einbindung von *secondary sites* die Bindung zu verbessern. Der Vorteil eines solchen Ansatzes liegt in einer größeren Nähe der Liganden zum vermuteten physiologischen Partner, während bei Verwendung gelabelter oder immobilisierter Liganden die Gefahr von Seiteneffekten und Artefakten noch größer ist. Vor allem aber kann ein spektroskopisch nicht detektierbarer Ligand in einer hohen Konzentration eingesetzt werden, solange er nicht den zu beobachtenden Faltungsprozess beeinflusst, aber eine ausreichende Änderung der Proteinfluoreszenz bewirkt. Ein fluoreszenzgelabeltes Saccharid dagegen kann in der Regel nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden, wenn seine Fluoreszenz detektiert werden soll. Dadurch muss aber umgekehrt die Affinität solcher Liganden höher sein, sollen sie das zu testende Protein annähernd quantitativ binden.

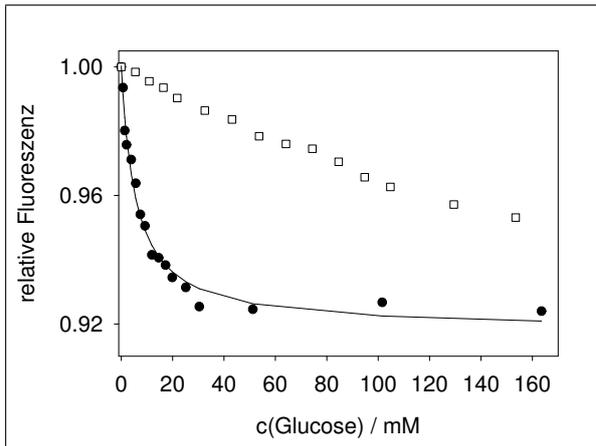


Abbildung 3.33: Titration der Bindung von Glucose an natives PslP (●) und denaturiertes PslP in 7.5 M GdmCl (□) bei 20 °C. Die Messung erfolgte mit $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ bei Spaltbreiten von 3 bzw. 4 nm, die Proteinkonzentration betrug 20 $\mu\text{g/ml}$. Die gemessene Fluoreszenz der Glucoselösung wurde abgezogen und die Werte volumenkoriert. Die Linie entspricht dem besten nichtlinearen Fit mit Gleichung (2.11).

3.4.1.1 Glucose

Zunächst wurde untersucht, ob die Bindungskonstanten aus der Literatur mit der hier verwendeten Methode, der Fluoreszenztitration, reproduziert werden konnten, und wie weit die beobachtete Bindung spezifisch war.

Für Glucose sind die Ergebnisse in Abbildung 3.33 dargestellt. Bei einer Proteinkonzentration von 0.78 μM (20 $\mu\text{g/ml}$) liegen schon bei der ersten Ligandenzugabe Überschussbedingungen ($c(\text{Glucose}) = 0.69 \text{ mM}$) vor. Die Daten konnten daher mit Gleichung (2.11) auf Seite 39 ausgewertet werden. Die erhaltene Bindungskonstante von 5.6 mM bei 20 °C weicht nur geringfügig vom Literaturwert von 2.5 mM (Schwarz *et al.*, 1993) ab, die Abweichung dürfte noch im Rahmen des Fehlers der Titration und der nichtlinearen Regression liegen. Jedoch ändert sich auch die Fluoreszenz von denaturiertem PslP bei der Zugabe von Glucose. Diese vermutlich unspezifische Wechselwirkung stellt ein Problem dar, mit dem in jedem Assay mit Detektion der Proteinfluoreszenz zu rechnen ist und das möglicherweise zusätzliche Korrekturen oder Kontrollen erfordern kann.

3.4.1.2 Andere und substituierte Saccharidliganden

Mit Mannose (Schwarz *et al.*, 1993) und 3-O-Methylglucose (Schwarz *et al.*, 1996), die nach der Literatur geringfügig fester binden, wurden ebenfalls Bindungstitrationen durchgeführt. Die Bindungskonstante von Mannose war im Rahmen der Fehlertoleranz nicht von der von Glucose zu unterscheiden. Die Daten von 3-O-Methylglucose waren nicht sinnvoll auszuwerten, da die Signaländerung von der Fluoreszenz der Saccharidlösung dominiert war. Von der Beschaffung hochreiner 3-O-Methylglucose wurde abgesehen, da ein Substituent allein keinen geeigneten Funktionstest versprach.

Aus den thermodynamischen Daten für unterschiedlich substituierte Monosaccharide (Schwarz *et al.*, 1996, 1993) lässt sich errechnen, dass für Phenyl-3-O-methyl- α -D-mannopyranosid (siehe Abbildung 3.34A auf der nächsten Seite) eine Dissoziationskonstante von 65 μM zu erwarten ist. Wenn dieser Ligand ausreichend sauber herzustellen ist und auch noch eine gute Signaländerung liefert, wäre er möglicherweise bereits für eine Quantifizierung von Erbsenlektin geeignet. Bei einer Konzentration an bindendem Protein von 2.5 $\mu\text{g/ml}$ und 10 mM an Ligand wären 99 % des Proteins gebunden. Die

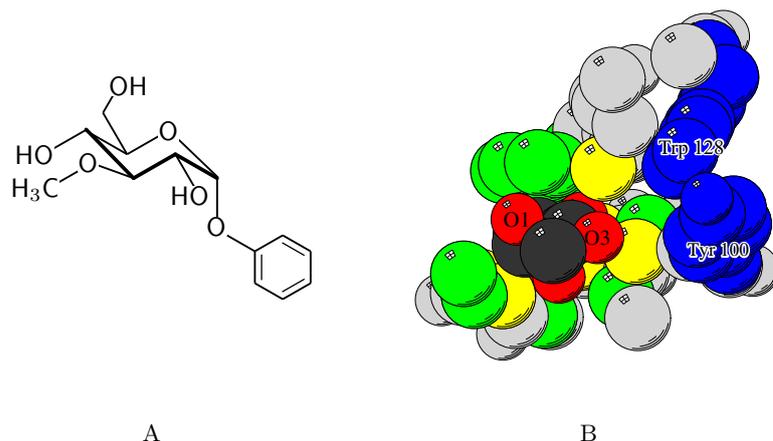


Abbildung 3.34: **A:** Struktur von Phenyl-3-O-methyl- α -D-mannopyranosid. **B:** Umgebung der Zuckerbindungsstelle von Psl (1rin, (Rini *et al.*, 1993)). Die gebundene Mannose ist mit schwarzen und roten Kugeln (Kohlenstoff- bzw. Sauerstoffatome) dargestellt. Grüne Kugeln sind Atome des Proteins, die im van-der-Waals-Kontakt mit dem Zucker stehen, gelbe bilden Wasserstoffbrücken aus, und graue Atome haben keine Kontakte zum Liganden. Blau dargestellt sind hydrophobe Atome von Tyr 100 und Trp 128 (siehe Beschriftung), die als Interaktionspartner für Substituenten an O3 des Zuckers in Frage kommen. O1 und O3 der Mannose sind ebenfalls gekennzeichnet.

Berechnung von K_D setzt dabei die Additivität der Beiträge der einzelnen Substituenten voraus. Um einen Anhaltspunkt zur Beurteilung dieser Frage zu erhalten, wurden entsprechend substituierte Zucker in die publizierte Struktur von PslP mit Triman (Methyl-3,6-di-*O*-(α -D-mannopyranosyl)- α -D-mannopyranosid, 1rin.pdb) gelegt und mit dem 3-D-Grafik-Bildschirm durch manuelles Drehen um rotierbare Bindungen versucht, die Substituenten in Kontakt mit dem Protein zu bringen. Dies ist für die 3-O-Methylgruppe leicht möglich. Sie interagiert mit Tyr 100 und Trp 128 (siehe Abbildung 3.34B). Diese Reste sind unter den Lektinen, die höhere Affinitäten für 3-*O*-substituierte Zucker haben, konserviert und vermutlich für die höhere Affinität verantwortlich (Rini *et al.*, 1993; Bourne *et al.*, 1990). Die Phenylgruppe dagegen deutet in allen Konformeren ins Lösungsmittel. Es ist also nicht auszuschließen, dass α -phenylsubstituierte Zucker gedreht in der Bindungstasche liegen. In diesem Fall ist keine Additivität der Substituenteneffekte mehr zu erwarten.

Die organisch-synthetische Herstellung der Substanz wurde erwogen, wegen der aufwändigen Schutzgruppenchemie wurde jedoch darauf verzichtet.

3.4.2 Präparation und Reinigung fluoreszenzmarkierter Liganden

3.4.2.1 Modifikationsstrategie und Reaktionstyp

Ein weiterer Ansatz zur Entwicklung eines Funktionstests bestand darin, Saccharide so zu modifizieren, dass ihre Bindungsaffinität im Vergleich zu einfachen Monosacchariden erhöht und eine einfache spektroskopische Detektion der Bindung ermöglicht wird.

Zur Erhöhung der Affinität kam die in Gao *et al.* (1995) beschriebene Strategie zur Anwendung, bei der die spezifische Bindung des natürlichen bzw. bekannten Liganden durch die eher unspezifische Bindung eines „greasy tail“ erhöht wird, die hauptsäch-

3.4 Versuche zur Entwicklung eines Funktionstests

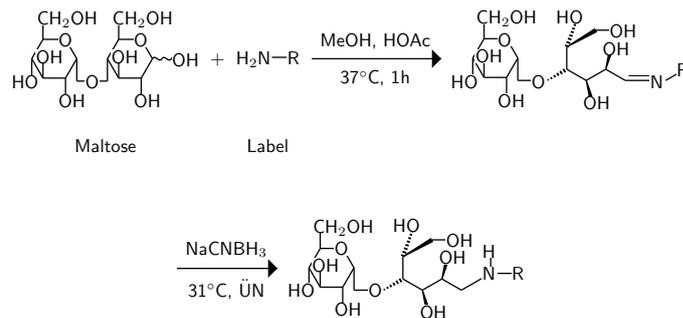


Abbildung 3.35: Reaktionsschema der reduktiven Aminierung.

lich von hydrophoben Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche getrieben wird. Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe schon erfolgreich verwendet, um die Bindungsaffinität von Oligosacchariden an das Tailspike-Protein des Bakteriophagen P22 zu erhöhen, das eine lektinähnliche, flache Bindungsstelle besitzt (Baxa *et al.*, 1996). Auch auf der Oberfläche von Psl finden sich hydrophobe Aminosäureseitenketten in der Nähe der Bindungsstelle.

Um eine einfache spektroskopische Detektion der Ligandenbindung zu ermöglichen, sollten die Zucker mit fluoreszierenden Labeln versehen werden. Die Detektion der Bindung könnte dann entweder durch Messung des Fluoreszenz-Quenchs oder der Fluoreszenzpolarisation erfolgen. Die Methode der reduktiven Aminierung von Sacchariden wird für unterschiedliche Modifikationen von Zuckern empfohlen (Hase, 1995) und war in der Gruppe erfolgreich für solche Zwecke angewandt worden (Baxa, 1998). Um gelabelte Glucose zu erhalten, wurde von Maltose ausgegangen. Dabei reagiert das Monosaccharid am reduzierenden Ende der Maltose und fungiert nach der Reduktion als Spacer zwischen der Glucose und dem Fluoreszenzlabel (siehe Abbildung 3.35).

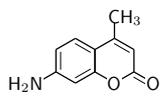
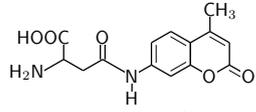
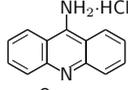
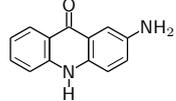
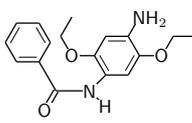
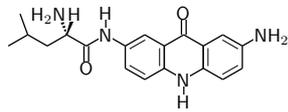
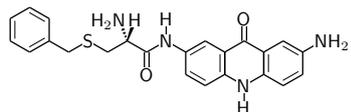
3.4.2.2 Markierung und Reinigung

Die verwendeten Fluoreszenzlabel sind in Tabelle 3.3 auf der nächsten Seite zusammengefasst. Für Verbindung (5) konnten leider keine Wellenlängenangaben erhalten werden. Erst später stellte sich heraus, dass die Substanz unter den verwendeten Bedingungen (wässrige oder methanolische Lösung mit und ohne Protein) überhaupt nicht fluoresziert. Für die Aminoacridon-Derivate wurde der Extinktionskoeffizient von Aminoacridon verwendet, ebenso für die Maltosekonjugate dieser Substanzen. Der dabei auftretende Fehler spielt hier keine Rolle, da letztlich keine der Verbindungen für eine quantitative Bestimmung geeignet war. Der Extinktionskoeffizient von Aminoacridin wurde nicht bestimmt, da von dieser Substanz keine Maltosekonjugate erhalten wurden (s.u.).

Die Markierung ergab bei den meisten Labeln Ausbeuten zwischen 50 und 70 %. Bei AspAMC war die Ausbeute bei der ersten Kupplungsreaktion unter 10 %, durch Optimierung der Reaktion konnte sie jedoch auf 86 % (Hauptpeak) erhöht werden. Dazu wurde die Maltose im Verhältnis 15:1 zum AspAMC eingesetzt und die Verluste bei der Aufarbeitung vermindert. Eine ähnliche Optimierungsmöglichkeit wäre daher wohl auch bei den übrigen Labeln zu erwarten. Nur bei Aminoacridin entstand entwe-

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3: Verwendete Fluoreszenzlabel.

	Verbindung	Struktur	$\varepsilon / \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
1	7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)		16 000 (342 nm)
2	L-Asparaginsäure-4-(4-methyl-7-cumarinylamid) (AspAMC)		16 000 (325 nm)
3	9-Aminoacridin-hydrochlorid		$\lambda_{max} = 382 \text{ nm}$
4	2-Amino-10H-acridin-9-on		6100 ^a (425 nm)
5	N-(4-Amino-2,5-diethoxyphenyl)-benzoesäureamid (BA)		8200 ^a (317 nm)
6	N-(L-Leucyl)-2-aminoacridon (LAA)		
7	N-(S-Benzyl-L-cysteinyl)-2-aminoacridon (BCAA)		

^aIn dieser Arbeit ermittelt

der kaum Produkt, oder es konnte nicht vom Eduktpeak abgetrennt werden, der recht breit und mit einem nachhängenden „Schwanz“ eluierte. Die übrigen Reaktionsansätze wurden über reversed-phase-HPLC gereinigt. Bei AMC, Aminoacridon und BA wurde, wie erwartet, nur je ein Produkt gefunden. Ein repräsentativer Lauf des Aminoacridon-Reaktionsansatzes ist in Abbildung 3.36A auf der nächsten Seite dargestellt. Das freie Aminoacridon eluiert erst mit 100 % Laufmittel B (70 % Acetonitril) von der Säule, dort sieht man in der Abbildung etwas unreaktiertes Edukt (E). Die Reaktionsprodukte werden im folgenden abgekürzt mit Malt-AMC, Malt-AA bzw. Malt-BA bezeichnet.

Auch bei LAA eluiert unreaktiertes Label (E) erst nach dem Gradienten. Ein Reinigungslauf ist in Abbildung 3.36B zu sehen. Bei diesem Fluoreszenzlabel sind offensichtlich verschiedene Produkte entstanden (siehe unten). Neben den beiden Hauptpeaks 1 und 2 ist noch ein weiterer größerer Peak (4) und dazwischen ein sehr kleiner, aufgespaltenener Peak (3) zu sehen. Alle Peaks wurden getrennt charakterisiert und für Bindungsexperimente eingesetzt. Sie wurden in der Reihenfolge ihrer Elution durchnummeriert und werden im folgenden mit Malt-LAA1, Malt-LAA2 usw. bezeichnet.

Auch bei BCAA und AspAMC wurden mehrere Produktpeaks gefunden. Bei BCAA (Abbildung 3.36C) kommen drei kleine Peaks (1-3) vor dem Hauptpeak (4). Auch diese Fraktionen wurden getrennt analysiert und mit Malt-BCAA1, Malt-BCAA2 usw. bezeichnet. Bei AspAMC eluiert das unreaktierte Edukt noch im Gradienten und ist in

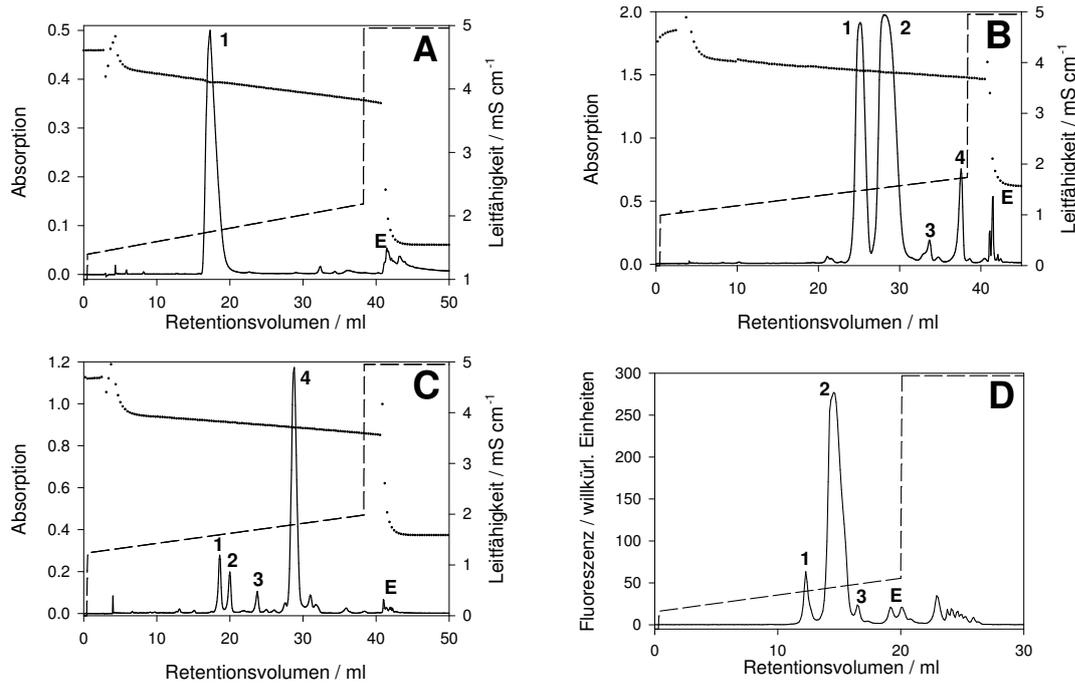


Abbildung 3.36: Reinigung der gelabelten Maltose. Repräsentative HPLC-Läufe der Produktgemische von Aminoacridon (A), LAA (B), BCAA (C) und AspAMC (D). Die gestrichelten Linien bezeichnen den verwendeten Gradienten (mit 100 % Laufmittel B am Ende), die gepunktete Linie die gemessene Leitfähigkeit. Die Peaks sind mit den im Text verwendeten Nummern markiert, E bezeichnet unreaktiertes Edukt.

Abbildung 3.36D als Doppelpeak (E) bei 20 ml zu sehen. Davor sind ein kleiner (1) und ein großer Peak (2) mit einem kleinen folgenden Nebenpeak (3) zu erkennen. Hier wurde nur der Hauptpeak für Bindungsmessungen verwendet.

Die Fluoreszenzlabel, bei denen mehr als ein Produktpeak beobachtet wurde, enthalten jeweils zwei Aminfunktionen. Grundsätzlich ist die Reaktion an beiden möglich, und über eine geladene Iminium-Zwischenstufe anstatt des Imins kann ein Stickstoff auch zweimal an Maltose gekuppelt werden. Dies wäre eine denkbare Erklärung für das Auftreten mehrerer Produkte; daneben ist auch mit Verunreinigungen und Heterogenitäten des Labels zu rechnen (man beachte den Doppelpeak des unreaktierten AspAMC), und wegen der Instabilität der Säureamidbindung ist eine teilweise Hydrolyse oder sogar Neubildung von Peptidbindungen denkbar.

Wenn eines der erhaltenen Produkte für den Funktionstest verwendet worden wäre, so hätte demnach die Struktur der Produkte ermittelt werden müssen. Da dies nicht der Fall war, wurde auf die Strukturaufklärung verzichtet.

3.4.3 Bindungsuntersuchungen mit modifizierten Liganden

3.4.3.1 Screening

Mit den so erhaltenen Maltose-Fluoreszenzlabel-Konjugaten wurde zunächst ein Bindungsscreen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.2.2 auf Seite 29). Die verwendeten Wellenlängen und die erhaltenen Proteinkonzentrationen in der Lösung sind in Tabelle 3.4

Tabelle 3.4: Bedingungen für den Bindungsscreen mit gelabelter Maltose

Substanz	λ_{exc}/nm	$\lambda_{em,1}/\text{nm}$	$\lambda_{em,2}/\text{nm}$	$c(\text{PsIP})/\mu\text{M}$	$c(\text{Ligand})/\mu\text{M}$
Malt-AMC	360	448	–	134/40 ^a	0.050
Malt-AA	415	523	–	43	0.20
Malt-BCAA1	395	440	–	77	0.24
Malt-BCAA2	395	438	457	77	0.24
Malt-BCAA3	395	440	456	77	0.24
Malt-BCAA4	395	440	–	77	0.22
Malt-LAA1	400	435	456	77	0.24
Malt-LAA2	400	439	458	77	0.24
Malt-LAA3	400	440	457	77	0.24
Malt-LAA4	396	440	–	77	0.28
Malt-AspAMC	325	390	–	111	0.67

^a Die höchste Konzentration für die Messung der Anisotropie wurde hier erhalten, indem Malt-AMC in die Protein-Stammlösung pipettiert wurde. Damit ist mit einem deutlichen Fehler in der Malt-AMC-Konzentration im Vergleich zur Titration zu rechnen. Eine Auswertung der Fluoreszenzintensität dieses Messpunkts ist daher nicht möglich, die Anisotropie dagegen ist konzentrationsunabhängig, solange die Ligandenmoleküle nicht miteinander interagieren.

zusammengefasst.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.37 auf der nächsten Seite dargestellt. Für eine nähere Untersuchung wurden die vielversprechendsten Substanzen ausgewählt, und zwar

Malt-AMC weil es die höchste Anisotropie und die höchste relative Anisotropieänderung zeigt,

Malt-BCAA3 das die größte Intensitätsänderung und die zweitgrößte absolute Anisotropie in der proteinhaltigen Lösung hat,

Malt-BCAA4 mit der drittgrößten relativen Anisotropieänderung (berechnet man statt der Anisotropie die Polarisation, so zeigt es die zweitgrößte Änderung),

Malt-LAA1 mit der zweitgrößten Anisotropieänderung sowie

Malt-AspAMC mit einem deutlichen Fluoreszenzquench und beträchtlicher Anisotropieänderung.

3.4.3.2 Bindungstitrationen

Mit den so ausgewählten Liganden wurden Bindungstitrationen durchgeführt. Die Ergebnisse der Anisotropiemessungen sind in Abbildung 3.38A auf Seite 96 dargestellt. Die Auftragung der Intensitäten (Daten nicht gezeigt) liefert ähnliche Ergebnisse.

Zwar findet man für Malt-AMC, Malt-BCAA3 und Malt-LAA1 deutliche Änderungen der Anisotropie. Auch sind die erreichten Werte teilweise in der Nähe der Hälfte der maximal möglichen Anisotropie von 0.4 (siehe Abschnitt 2.8.1 auf Seite 38). Da häufig Anregungs- und Emissions-Übergangsdipolmoment nicht genau parallel sind und auch das proteingebundene Label noch Mobilität besitzt, ist sogar eine kleinere Anisotropie

3.4 Versuche zur Entwicklung eines Funktionstests

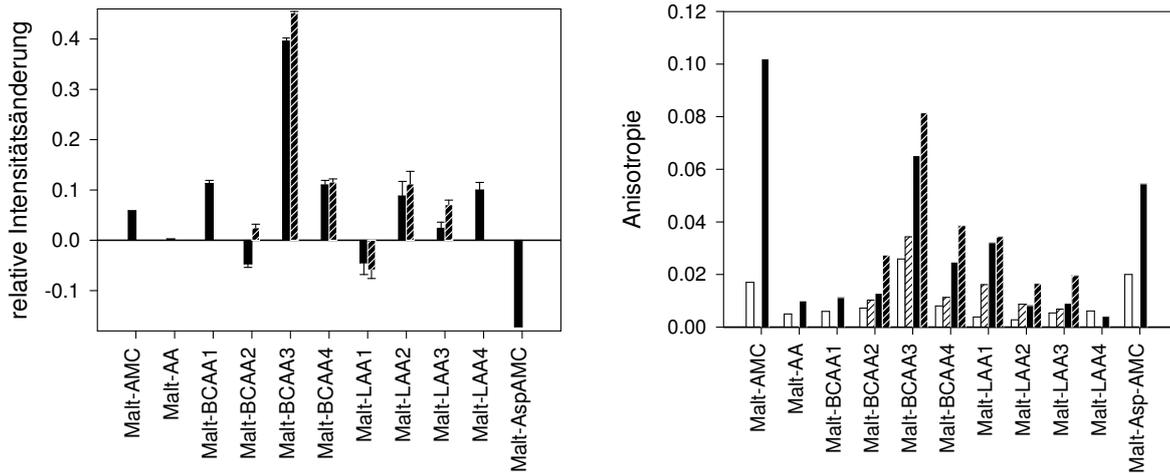


Abbildung 3.37: Ergebnisse des Bindungsscreens mit gelabelter Maltose. Dargestellt sind im linken Diagramm die relative Fluoreszenzänderung und im rechten die Anisotropie der Maltosekonjugate vor (leere Balken) und nach (gefüllte Balken) Proteinzugabe. Die Konzentrationen von Protein und Ligand sind in Tabelle 3.4 auf der vorigen Seite zusammengefasst. Gestreifte Balken beziehen sich auf $\lambda_{em,2}$.

bei 100 % gebundenem Label zu erwarten. Trotzdem ist bei den verwendeten Konzentrationen an Malt-AMC, Malt-BCAA3, Malt-BCAA4 und Malt-LAA1 noch keine Sättigung zu sehen, nicht einmal die erwartete deutliche Krümmung. Die Bindungskonstanten für Malt-AMC, Malt-BCAA3, Malt-BCAA4 und Malt-LAA1 liegen daher nicht in einem Bereich, der mit diesem Experiment bestimmbar wäre. Vielmehr müsste entweder die Protein- oder die Ligandenkonzentration deutlich erhöht werden. Damit sind diese Maltosederivate aber für einen Funktionstest, der in Faltungsexperimenten eingesetzt werden kann, nicht geeignet. Denn dabei wären noch geringere Proteinkonzentrationen von unter $10 \mu\text{g/ml}$, also $0.39 \mu\text{M}$, nötig. Um funktionales Protein quantifizieren zu können, müsste ein hoher Anteil des Fluoreszenzliganden gebunden sein, was wesentlich höhere Affinitäten erfordert als die hier gefundenen.

Das einzige Maltosederivat, bei dem die Anisotropiemessungen auf eine deutlich erhöhte Affinität hindeuten, ist Malt-AspAMC. Zwar ist die Anisotropie und ihre Änderung insgesamt sehr klein, aber man beobachtet bei kleinen Proteinkonzentrationen ein Verhalten wie bei einer Bindungskurve, die schon bei etwa $1 \mu\text{M}$ die Sättigung erreicht (siehe das Inset in Abbildung 3.38A auf der nächsten Seite). Allerdings ist die Signaländerung so klein, dass die Anisotropie als Messmethode ausscheidet. Daher wurde versucht, die Bindung von Malt-AspAMC an PslP mit anderen Methoden zu detektieren. Dazu wurde zunächst eine weitere Fluoreszenztitration durchgeführt, bei der nicht nur die reine Labelfluoreszenz detektiert wurde, sondern auch ein möglicher Fluoreszenzresonanzenergietransfer (Förster-Transfer, Anregung beim Absorptionsmaximum des Proteins, $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, und Detektion der Labelfluoreszenz). In der Tat sieht man in beiden Messreihen in Abbildung 3.38B eine Bindungskurve im Bereich $0 - 0.5 \mu\text{M}$. Allerdings ist die Signaländerung sehr klein, und die Fluoreszenz ändert sich auch nach Erreichen der „Sättigung“ weiter. Beim Transferexperiment nimmt sie zu, was wohl von der Proteinfluoreszenz bei 440 nm kommt; mit einer höheren Emissionswellenlänge ließe sich das minimieren. Bei der Detektion der Labelfluoreszenz allein wird jedoch ein Sin-

3 Ergebnisse

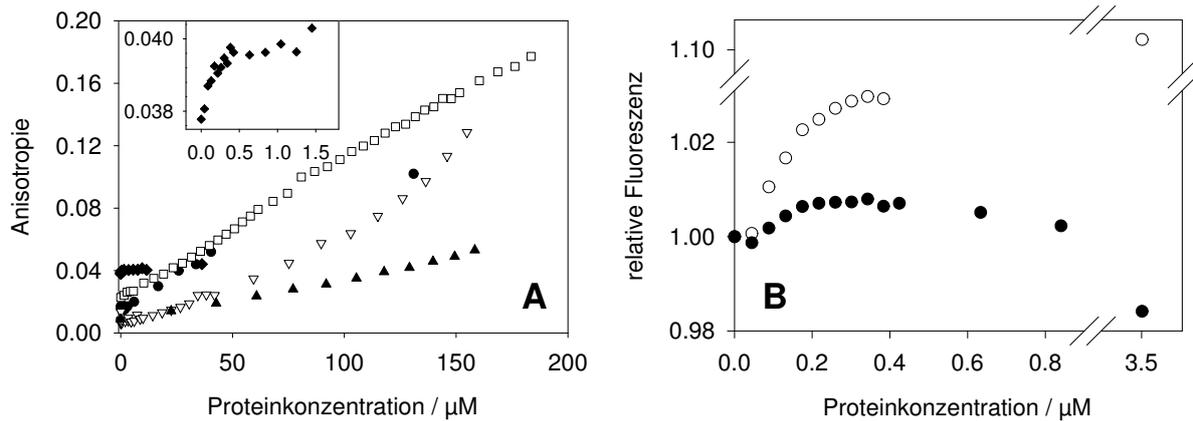


Abbildung 3.38: Bindungstitration mit ausgewählten Liganden. **A:** Anisotropie von Malt-AMC (●), Malt-BCAA3 (□), Malt-BCAA4 (▲), Malt-LAA1 (△) und Malt-AspAMC (◆) in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Das kleine Bild zeigt eine Vergrößerung der Messdaten von Malt-AspAMC. Die Ausgangskonzentrationen der Label waren die selben wie in Tabelle 3.4 auf Seite 94 angegeben. **B:** Fluoreszenzintensität von Malt-AspAMC (0.67 µM) bei 440 nm mit einer Anregungswellenlänge von 325 nm (●) und 280 nm (○).

ken beobachtet, für das es keine einfache Erklärung gibt, wenn man die Signaländerung am Beginn als Bindung auffasst.

Sowohl die Anisotropie als auch der Förster-Transfer deuten also auf eine feste Bindung von Malt-AspAMC im submikromolaren Bereich hin. Allerdings sind die Signaländerungen sehr klein und bei den Intensitätsmessungen von anderen Effekten überlagert. Mit einem Ultrafiltrationsexperiment konnte jedoch gezeigt werden, dass Malt-AspAMC in der Tat vergleichsweise fest an Psl bindet.

3.4.3.3 Bindungsmessung durch Ultrafiltration

Da bei einer Proteinkonzentration, die gleich der Dissoziationskonstante K_D ist, die Hälfte des Liganden gebunden vorliegt, sollte man eine Retention des Liganden an der Centrifree-Membran in diesem Proteinkonzentrationsbereich problemlos nachweisen können. Da K_D aus den vorausgegangenen Experimenten als kleiner als 1 µM geschätzt wurde, wurden als Proteinkonzentrationen 0.5 µM und 2 µM gewählt. Damit wurde der Ultrafiltrationsassay durchgeführt. Dabei werden Membranen verwendet, durch die der niedermolekulare Ligand problemlos hindurch kann, während das Protein und damit auch proteingebundener Ligand zurückgehalten wird. Dazu wurden für beide Konzentrationen die selben Centrifree-Röhrchen verwendet, der Test wurde zuerst mit der verdünnteren, dann mit der konzentrierteren Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.39 auf der nächsten Seite dargestellt.

Man erkennt, dass bei der kleinen Proteinkonzentration im Rahmen der Detektierbarkeit kein Malt-AspAMC vom Protein daran gehindert wird, durch die Membran zu gehen. Erst bei 2 µM Psl ist eine Retention zu sehen. Der Anteil zurückgehaltenen Fluoreszenzlabels nimmt mit steigender Labelkonzentration zu, die Bindung ist also nicht im Bereich der Sättigung, wo 100 % des Proteins Label gebunden haben müsste und man eine parallele Gerade erwarten würde.

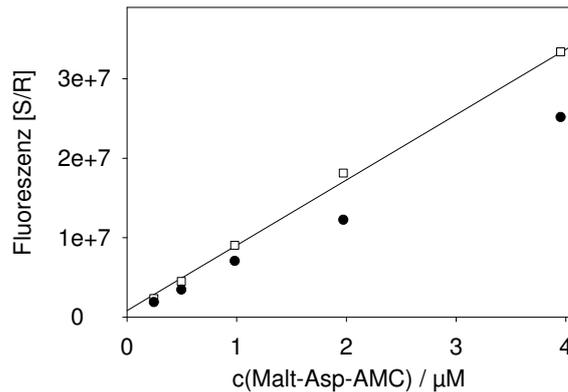


Abbildung 3.39: Centrifree-Bindungsexperiment mit Malt-AspAMC. Gemessene Fluoreszenz der Filtrate mit einer Proteinkonzentration von 2 μM (●) und 0.5 μM (□) für die verschiedenen Konzentrationen an Malt-AspAMC. Die durchgezogene Linie ist die Kalibrierungsgerade.

Man kann aus diesen Daten nicht auf eine submikromolare Dissoziationskonstante schließen, wie es die spektroskopischen Methoden nahelegten. Allerdings ist zu bedenken, dass es sich nicht um ein echtes Gleichgewichtsexperiment handelt. Wenn die Dissoziation schnell genug ist, kann auch ein fast vollständig gebundener Ligand nennenswert durch die Membran gelangen. Mit der Centrifree-Technik kann man also lediglich eine obere Grenze für die Dissoziationskonstante angeben. Eine rechnerische Auswertung ist problematisch, aber K_D lässt sich aus dem Graphen auf einige μM abschätzen.

Malt-AspAMC blieb also auch mit diesen Daten ein möglicherweise vielversprechender Ligand, ohne dass Klarheit geschaffen worden wäre. Um einen belastbaren Wert für K_D zu erhalten, sollte daher die Bindung mittels isothermer Titrationskalorimetrie gemessen werden.

3.4.3.4 Titrationskalorimetrie

Isotherme Titrationskalorimetrie erlaubt es, Interaktionen auch bei Bindungspartnern zu beobachten, bei denen keine Änderung von spektroskopischen oder anderen Signalen auftritt. Man kann damit nicht nur Bindungskonstanten, sondern auch die thermodynamischen Parameter der Bindung bestimmen, und die Messung greift sehr wenig in das System ein – im Gegensatz z.B. zur Fluoreszenz, bei der mit Photobleach-Effekten gerechnet werden muss⁷. Allerdings ist man darauf angewiesen, dass der zu beobachtende Prozess eine enthalpische Komponente hat. Dies ist für die meisten nichtkovalenten Interaktionen von Makromolekülen der Fall, zumindest bei geeigneter Wahl der Temperatur. Da man aber nicht nur die Reaktionsenthalpie misst, sondern gleichzeitig auch die Verdünnungsenthalpie des zutitrierten Liganden, muss man diese in einem separaten Experiment bestimmen und zur Auswertung abziehen.

Die Proteinkonzentration im Experiment betrug 45 μM , die Konzentration der Malt-AspAMC-Lösung 0.36 mM. Davon wurden pro Messpunkt 10 μl (3.6 nmol) zugegeben. Bei einer erwarteten Dissoziationskonstante von 1 μM wären nach Gleichung (2.12) auf Seite 39 daher bei der ersten Zugabe 98 % gebunden.

⁷Lediglich das notwendige Rühren kann bei sensiblen Makromolekülen ein Problem darstellen.

3 Ergebnisse

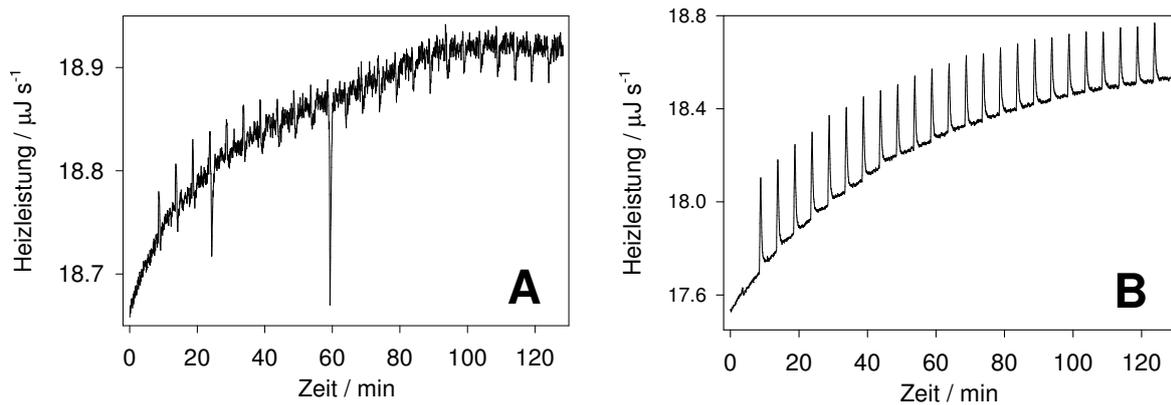


Abbildung 3.40: Bindung von Malt-AspAMC an Psl mittels Titrationskalorimetrie. Wärmeentwicklung bei der Titration von Malt-AspAMC in **A:** Psl-Lösung, **B:** reinen Dialysepuffer zur Bestimmung der Verdünnungsenthalpie der Malt-AspAMC-Lösung.

Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 3.40 gezeigt. Im rechten Bild ist zu sehen, dass Malt-AspAMC eine positive Verdünnungsenthalpie hat, die Lösung also bei jeder Zugabe etwas aufgeheizt werden muss, um die Temperatur in Messzelle und Referenzzelle konstant zu halten. Auch bei der Zugabe von Malt-AspAMC zur Proteinlösung (siehe linkes Bild) beobachtet man zunächst eine Abkühlung, die zunehmend weniger und schließlich zur Erwärmung wird. Dabei ist aber die Amplitude, unter $0,015 \mu\text{cal}$ pro Zugabe, klein im Vergleich zum Kontrollexperiment (etwa $0,08 \mu\text{cal}$). Daher ist die Messung auch sehr verrauscht.

Die Reaktionsenthalpie der Assoziationsreaktion ist also negativ, aber die Wärmeentwicklung ist bei den ersten Zugaben geringer als die Verdünnungswärme und nimmt erst mit der Zeit zu. Da nach der dreizehnten Zugabe nach etwa einer Stunde ein Stoffmengenverhältnis von 1:1 erreicht ist, kann es sich bei dieser Zunahme nicht um einen Bindungseffekt handeln. Bei einer Bindungskonstante im mikromolaren Bereich hätte man jedenfalls eine deutliche Signalverminderung erwarten müssen.

Damit muss aber die Bindungskonstante wiederum geringer sein als aufgrund der spektroskopischen Messungen erwartet. Um sie genauer zu bestimmen, müsste bei höheren Proteinkonzentrationen gearbeitet und möglichst die Temperatur so verändert werden, dass sich Verdünnungs- und Reaktionswärme nicht mehr nahezu kompensieren. Da die Information, dass sie deutlich über $1 \mu\text{M}$ liegt, schon ausreicht, um Malt-AspAMC als Reagenz für einen Funktionstest auszuschließen, wurde davon abgesehen.

3.4.4 Affinitätschromatographie

Als weitere Möglichkeit für einen Funktionsassay wurde Affinitätschromatographie in Erwägung gezogen. Bei der Reinigung von Erbsenlektin wird Sephadex als Affinitätsmatrix verwendet. Allerdings muss für eine Verwendung für Faltungsuntersuchungen eine Möglichkeit gefunden werden, natives neben denaturiertem und aggregiertem Psl und neben Faltungsintermediaten zu detektieren, und die verwendete Säule muss gut regenerierbar sein. Außerdem ist die Methode nur dann praktikabel, wenn sie schnell durchführbar ist, die Säule muss also klein sein und trotzdem natives Psl im Konzen-

trationsbereich von 10 µg/ml quantitativ binden.

Zur Abschätzung der Kapazität von Sephadex G-100 zur Bindung von Psl wurde das Material im Batchverfahren mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen des Proteins inkubiert, abgetrennt und der Überstand auf einem silbergefärbten Gel analysiert. Die verwendeten Lösungen (Volumen 1 ml) hatten Konzentrationen von 100, 30, 10, 3 und 1 µg/ml und darunter, jeder Ansatz enthielt 5 mg Sephadex. Auf dem Gel war nur in den Spuren mit einer Ausgangskonzentration von 10 – 100 µg/ml deutlich und in der Spur mit 3 µg/ml ganz schwach Protein zu erkennen. Da die Nachweisgrenze der Silberfärbung bei 0.05 – 0.1 ng/mm² liegt, wurden bei einer geschätzten Bandenfläche von unter 5 mm² die 3 µg in der verdünntesten Lösung noch fast vollständig gebunden. Eine kleine, schnell laufende Säule für einen Funktionstest schien also möglich

Daher wurde nun versucht, eine entsprechende Säule aus Sephadex G-100 herzustellen. Geplant war, zunächst nicht-bindendes Protein mit Nativpuffer und dann bindendes Protein mit Glucose zu eluieren. Daran sollte sich ein Waschschriff mit 0.5 M NaOH anschließen. Leider erwies sich das Material als mechanisch zu labil. Es entstanden sehr leicht deformierte Partikel, die das Gelbett verstopften. Die erhaltenen Flussraten, auch mit dem etwas robusteren Sephadex G-75, waren daher zu klein, um einen kurzen Testablauf zu ermöglichen.

Daher wurden die weiteren Versuche mit Superdex 200 prep grade unternommen. Dieses Material besteht aus quervernetzter Agarose und Dextran und ist wesentlich stabiler gegenüber Druck und hohen Flussraten. Die Wahl fiel auf Superdex 200 mit einem Trennbereich von 10 000 bis 600 000 g·mol⁻¹ für globuläre Proteine, da Psl mit 25.6 g·mol⁻¹ in die meisten Poren eindringen kann und damit mehr Bindestellen zur Verfügung hat als im kleinerporigen Superdex 75. Mit diesem Material wurde in einer Pharmacia-HR-10/10-Säule mit 6.5 ml Säulenvolumen eine Flussrate von 0.65 ml/min für Nativpuffer und 0.5 ml/min für die Elution mit Glucose und den Waschschriff erzielt.

In einer Pharmacia-HR-5/5-Säule ergaben sich durch den kleineren Durchmesser etwas geringere Flußraten, wegen des viel kleineren Säulenvolumens von 0.5 ml aber insgesamt kürzere Läufe. Allerdings stellte sich heraus, dass die Kapazität der Säule zu gering war. Schon bei einer Auftragsmenge von 0.7 µg Psl eluierte mehr als die Hälfte des Proteins, gemessen an der Peakfläche des Fluoreszenzsignals, mit Nativpuffer (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich ist die Kapazität von Superdex 200 trotz der großen Poren geringer als die von Sephadex G-75 und G-100. Dies steht im Einklang damit, dass van Eijsden *et al.* (1992) eine Superdex-75-Säule zur Gelfiltration von PslP, PslS und der inaktiven Mutante PslS N125D verwenden konnten und für alle Proteine im wesentlichen einen Peak bei der erwarteten Retentionszeit für das Dimer erhielten. Der Grund ist vermutlich, dass Superdex aus Dextran und Agarose besteht, während Sephadex ausschließlich quervernetztes Dextran enthält (Pingoud & Urbanke, 1997, S. 72ff).

Bei der HR-10/10-Säule band natives Psl an die Säule und konnte mit 0.2 M Glucose eluiert werden. Allerdings gab der Fluoreszenzdetektor auch im Waschschriff ein kleines Signal. Es ist aber nicht sicher, ob es sich dabei um Protein handelt oder um ein Artefakt, denn beim selben Elutionsvolumen wurde auch ohne Auftrag von Protein ein, wenn auch kleines Signal beobachtet. Dessen Ursache bleibt unklar, da es bei mehreren unabhängigen Detektoren (UV, Leitfähigkeit und Fluoreszenz) gleichzeitig auftritt.

In Abbildung 3.41 auf der nächsten Seite sind repräsentative Läufe auf der so erhal-

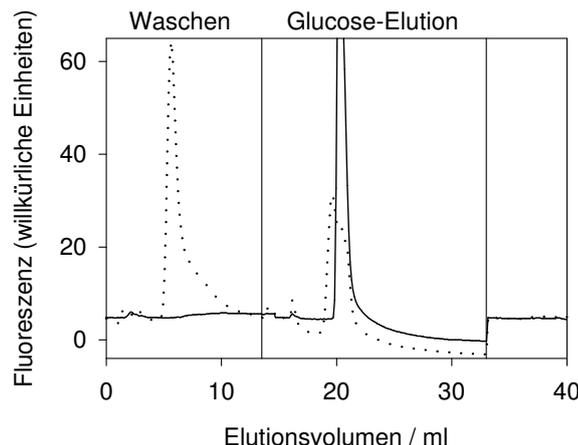


Abbildung 3.41: Affinitätschromatographie mit Superdex 200. Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 340 \text{ nm}$) von PslP (durchgezogene Linie) und PslS N125D (gepunktete Linie). Aufgetragen wurden jeweils $3.7 \mu\text{g}$. Die senkrechten Linien bezeichnen den Wechsel von Nativpuffer zur Glucoselösung und zurück.

tenen Affinitätssäule gezeigt. Dabei wurde zur Kontrolle auch PslS N125D aufgetragen. Diese Mutante ist nach den bisher verwendeten Messmethoden inaktiv bezüglich der Saccharidbindung (van Eijsden *et al.*, 1992; Pankoke, 1997). Das native PslP wird erst mit Glucose eluiert, während die Mutante zum großen Teil nicht an die Säule bindet und schon bei der Elution mit Nativpuffer (vor der ersten senkrechten Linie) von der Säule kommt. Aber auch bei N125D wird bei der Glucose-Elution noch einmal Protein eluiert.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das Protein trotz der Mutation noch eine Affinität für Glucose besitzt, die zwar zu klein ist, um mit den üblichen Methoden detektiert zu werden, aber ausreicht, um an die Dextran-Agarose-Matrix zu binden, die ja viele Glucoseeinheiten enthält. Dies wäre für den Funktionstest problematisch, denn dort soll ja natives, bindendes Lektin quantifiziert werden. Wenn auch die Mutante an die Säule bindet, so könnte das auch für Faltungsintermediate gelten, die lediglich eine teilweise vorgeformte Bindungsstelle besitzen. Gegen diese Erklärung spricht, dass die Mutante nicht an Sephadex bindet (van Eijsden *et al.*, 1992). Da der bindende Anteil von PslS N125D mit Glucose eluiert werden kann und für unspezifische Bindungen wichtige Solvensparameter wie Ionenstärke oder Temperatur nicht verändert werden, ist eine unspezifische Bindung an die Säule unwahrscheinlich.

Auch ohne die Erklärung für den beobachteten Effekt zu kennen, kann aus den Daten gefolgert werden, dass Affinitätschromatographie an Superdex-Materialien nicht als Funktionstest geeignet ist; Sephadex scheidet zumindest wegen seiner problematischen mechanischen Eigenschaften aus.

3.4.5 Wechselwirkung von Erbsenlektin mit Erythrozyten

3.4.5.1 Agglutination

Der Hämagglutinationsassay wird in der Regel als halbquantitativer Test, wie in van Eijsden *et al.* (1992) und Prasthofer *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt. Hier wur-

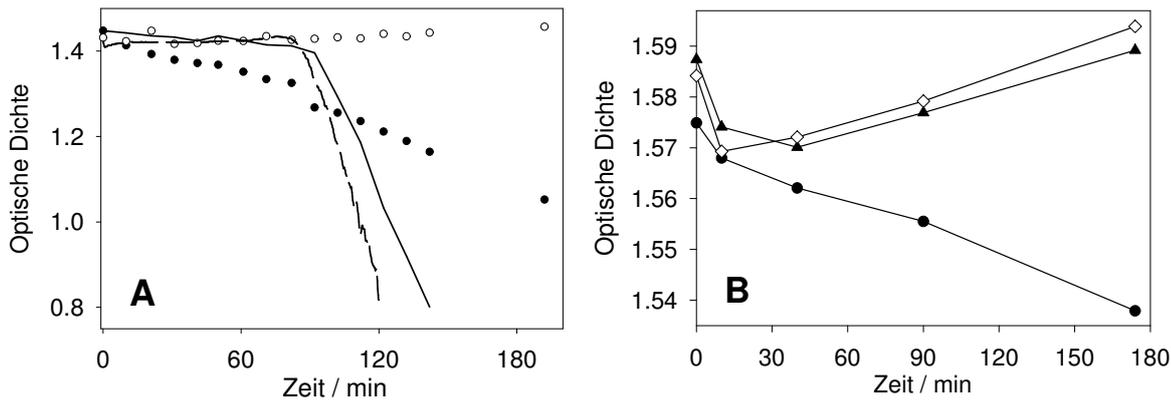


Abbildung 3.42: Photometrische Quantifizierung der Hämagglutination. **A:** Sedimentation von 0.2 % Erythrozyten, gemessen als optische Dichte bei 620 nm, in ruhig stehenden (Linien) und geschüttelten (Punkte) Küvetten, bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml (durchgezogene Linie, ●) oder ohne Proteinzugabe (gestrichelte Linie, ○). **B:** Sedimentation von 0.2 % Erythrozyten in geschüttelten Küvetten bei 50 (●) und 25 µg/ml (▲) sowie ohne Protein (◇).

de darüber hinaus eine etwas exaktere Quantifizierung versucht, indem Vertiefungen mit teilweiser Agglutination berücksichtigt wurden. Diese Auswertung wurde in Abschnitt 3.2.4.2 auf Seite 64 ausführlich dargestellt. In jedem Fall hat der Hämagglutinationstest jedoch den Nachteil, dass er hohe Proteinkonzentrationen benötigt und es daher nötig ist, vor der Durchführung die Proteinlösung mittels Ultrafiltration (Centriplus) aufzukonzentrieren, was mehrere Stunden dauert und die zeitliche Auflösung für Renaturierungskinetiken sehr begrenzt.

In der Literatur sind für andere hämagglutinierende Proteine photometrische Varianten des Assays beschrieben (Dybkjaer, 1967; Liener, 1955). Ihnen liegt letztlich die Messung der durch die Hämagglutination veränderte Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen zugrunde. Es sollte daher versucht werden, diese Methode auch auf Erbsenlektin anzuwenden.

Wie man an den Linien in Abbildung 3.42A sieht, wird die Sedimentation von Erythrozyten in ruhenden Gefäßen durch die Hämagglutination etwas verlangsamt. Die Zellkonzentration ist geringer als im Mikrotiterplatten-Assay (0.2 % vs. 0.9 %), so dass sich kein Netzwerk über den ganzen Querschnitt ausbildet. Es werden aber offenbar kleinere Zellverbände gebildet, die langsamer sedimentieren als einzelne Zellen. Der Effekt ist unter den gewählten Bedingungen wesentlich kleiner als in Liener (1955) für Sojin beschrieben und nicht zur Quantifizierung von Psl im Faltungsexperiment geeignet. Die Ursache dürfte in der geringeren Erythrozyten-Affinität von Psl im Vergleich zu Sojin oder an unterschiedlichen Quervernetzungseigenschaften liegen. Das Lektin der Soyabohne ist tetramer (Olsen *et al.*, 1997), so dass sich andere Affinitäten und Vernetzungsstrukturen ergeben. Eine Erhöhung der Zellkonzentration als naheliegende Optimierungsmöglichkeit scheidet leider aus, weil dann die optische Dichte zu sehr ansteigen würde.

Werden die Zellsuspensionen, wie in Dybkjaer (1967) beschrieben, während der Inkubation geschüttelt, so sieht man einen deutlicheren Einfluss des Psl (siehe Kreise in Abbildung 3.42A). Hier ist die Verringerung der optischen Dichte in der protein-

haltigen Suspension schneller als in der ohne Protein. Vermutlich spielen hier neben Sedimentation andere Prozesse eine Rolle. Zur Untersuchung, ob sich dieser Effekt zur Quantifizierung nutzen lässt, wurde das Experiment mit verschiedenen Proteinkonzentrationen wiederholt. Eine Auswahl der Daten ist in Abbildung 3.42B dargestellt. Man erkennt, dass unter einem Schwellenwert, der zwischen 50 und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ liegt, keine Beschleunigung der Signaländerung mehr beobachtet wird. Bei kleineren Erythrozytenkonzentrationen von 0.1 und 0.05 $\%(v/v)$ (Daten nicht gezeigt) wird auch ohne Protein eine deutliche Abnahme beobachtet, die genauso schnell ist wie mit den untersuchten Proteinkonzentrationen.

Möglicherweise ist das beobachtete Verhalten eine Überlagerung von Sedimentation, Agglutination und weiteren Prozessen. Um einen anderen Versuchsaufbau zu erhalten, wurden die selben Experimente auch in Mikrotiterplatten mit Messung der optischen Dichte von oben nach unten durchgeführt. Aber auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Daten nicht gezeigt).

3.4.5.2 Hämolyse

Bei den traditionellen Hämagglutinationsassays wurde beobachtet, dass sich in den Vertiefungen ohne sichtbare Agglutination die Lösung über den sedimentierten Zellen rot färbte. Dies ist offensichtlich auf die Freisetzung von Hämoglobin aus lysierten Zellen zurückzuführen. Mit bloßem Auge war zu erkennen, dass die Färbung mit zunehmender Proteinverdünnung geringer wurde. Daher wurden die Überstände im Photometer vermessen. Unter einer Schwelle von 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte keine Hämabsorption gemessen werden, über 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ war ein Plateau erreicht und die Absorption erhöhte sich mit steigender Proteinkonzentration nur noch sehr wenig (Daten nicht gezeigt). Obwohl ein solches Verhalten nicht gut zur Quantifizierung im interessierenden Bereich geeignet ist, wurde das Experiment mit Inkubation in Eppendorf-Gefäßen und mit verschiedenen Erythrozytenkonzentrationen wiederholt. Doch auch hier ergab sich kein brauchbarer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Hämabsorption im gewünschten Messbereich. Außerdem zeigten auch Guanidiniumchlorid-haltige Proben etwas Hämolyse (Daten nicht gezeigt), was den Einsatz in Renaturierungsexperimenten ausschließt.

4 Diskussion

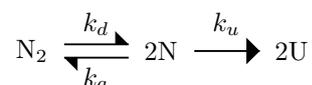
4.1 Charakterisierung der Isoformen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Reinigungsprotokoll entwickelt, das die Trennung der beiden Isoformen PslP-A und PslP-B im präparativen Maßstab ermöglicht. Im Unterschied zu früheren Ansätzen (Rini *et al.*, 1987; Trowbridge, 1974) können dabei beide Isoformen in hoher Ausbeute gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Isoformen nicht in ihren spektroskopischen Eigenschaften (Abschnitt 3.1.3) und der Entfaltung ihrer Monomere unterscheiden (Abschnitt 3.2.5). Auch hinsichtlich der Stabilität der gebildeten Dimere und der Geschwindigkeitskonstanten ihrer Assoziation und Dissoziation unter denaturierenden und nativen Bedingungen konnten im Rahmen der Messgenauigkeit keine Unterschiede festgestellt werden (Abschnitt 3.3).

In der Literatur wurde für strukturelle Studien in der Regel eine Mischung beider Isolektine verwendet (Ahmad *et al.*, 1998; Rini *et al.*, 1993; Schwarz *et al.*, 1993; Einspahr *et al.*, 1986; Bhattacharyya *et al.*, 1985; Meehan *et al.*, 1982). Aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit kann dies als gerechtfertigt gelten. Für die Untersuchungen zur Faltungskinetik wurden jedoch einheitliche Präparationen von PslP-B verwendet. Ein systematischer Vergleich von PslP-A und PslP-B hinsichtlich ihrer Faltungseigenschaften wurde nicht durchgeführt. Allerdings wurde für Vorversuche meistens PslP-A verwendet, und die dabei gewonnenen Erkenntnisse stimmten immer mit den später mit PslP-B gemessenen Daten überein.

4.2 Quartärstruktur und Stabilität

Kinetik der Denaturierung Die Denaturierungskinetiken von PslP-A, PslP-B und PslS sind biphasisch. Durch Messungen bei verschiedenen Proteinkonzentrationen und globale Analyse der Daten konnte gezeigt werden, dass die Denaturierung nach dem Modell



verläuft. Extrapoliert man die daraus erhaltenen Werte für k_u , der Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung der strukturierten Monomere N, nach 0 M GdmCl, so ergibt sich ein Wert von $10^{-6.5} \text{ s}^{-1}$. Dieser Wert ist im Vergleich zu anderen, monomeren Proteinen nicht außergewöhnlich langsam. Bei Psl ist die Denaturierung aber bei GdmCl-Konzentrationen über 3 M erst nach vielen Stunden abgeschlossen, bei 2.5 M nach Wochen und bei 2 M und darunter nach Monaten. Die ungewöhnlich langsame Denaturierung ergibt sich dadurch, dass auch unter denaturierenden Bedingungen noch ein Gleichgewicht zwischen Dimeren N_2 und gefalteten Monomeren N besteht und daher die Konzentration der entfaltenden Spezies sehr gering ist.

Zweiphasige Denaturierungen sind relativ selten. Da Untereinheiten von oligomeren Proteinen häufig nur minimale Stabilität aufweisen, stellen monomere Entfaltungsintermediate die Ausnahme dar (Seckler, 2000). Eine ähnliche Denaturierungskinetik zeigt zum Beispiel Invertase (Kern *et al.*, 1992). Diese liegt mindestens als Dimer vor und bildet bei höheren Salzkonzentrationen Tetramere und Oktamere. Der Denaturierung geht dann die Dissoziation in Dimere voraus, so dass sie bei höherer Ionenstärke langsamer ist. Bei der Denaturierung mit Harnstoff, oder mit GdmCl nach Vorinkubation in nicht-denaturierenden Konzentrationen von Harnstoff, zeigt Invertase monophasische Denaturierungskinetiken. Im Gegensatz dazu wurden bei Psl auch bei der Denaturierung in Harnstoff biphasische Denaturierungskinetiken beobachtet (Abschnitt 3.3.1 auf Seite 84). Es gibt in der Literatur einige weitere Beispiele für biphasische Denaturierungskinetiken, die dadurch entstehen, dass der Denaturierung ein Dissoziationsprozess vorausgeht (Rendon & Mendoza-Hernandez, 2001; Hung & Chang, 1998). Eine so starke Verlangsamung wie bei Psl ist jedoch bisher nicht beschrieben worden.

Die Denaturierung von Psl wurde bereits mit DSC untersucht (Schwarz *et al.*, 1993). Dabei wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass während des Aufheizens monomere Intermediate populiert werden. Die Daten wurden als reversibel ausgewertet, obwohl die Übergänge heizratenabhängig waren und bei einem zweiten Temperaturscan nach dem Abkühlen kein thermisches Signal mehr beobachtet wurde. Wahrscheinlich spiegeln sie also eher die Kinetik der thermischen Denaturierung wider (Marcos *et al.*, 1999). Im Gegensatz zur Denaturierungsmittel-induzierten Entfaltung werden demnach bei der thermischen Denaturierung keine Intermediate populiert. Bei anderen Leguminosenlektinen wurden aber auch in der thermischen Denaturierung monomere, strukturierte Intermediate beobachtet, wobei wie bei Psl unklar ist, ob es sich um thermodynamische oder kinetische Intermediate handelt (Reddy *et al.*, 1999a; Srinivas *et al.*, 1998).

Bei einem dieser Proteine, dem Lektin aus der Erdnuss, wurden auch in Denaturierungsmittel-induzierten Übergängen strukturierte monomere Intermediate gefunden, die sogar noch Affinität gegenüber dem Liganden Lactose zeigten (Reddy *et al.*, 1999b). Auch diese Daten wurden als Gleichgewichtsübergang ausgewertet, ohne dass jedoch die Renaturierung untersucht worden wäre. Eine nähere Betrachtung der publizierten Daten stützt die Vermutung, dass es sich auch in diesem Fall um ein kinetisches Intermediat handeln könnte. Denn die mit verschiedenen Signalen beobachteten Übergänge vom und zum Intermediat stimmen weder miteinander noch mit den gezeigten Spektren und Gelfiltrationsprofilen überein, was am einfachsten dadurch erklärt werden kann, dass das System nicht im Gleichgewicht war und unterschiedliche Signale (Nah- und Fern-UV-CD sowie Fluoreszenz) verschiedene Zeitpunkte der Denaturierungskinetik maßen. Vermutlich handelt es sich auch hier um ein monomeres kinetisches Denaturierungsintermediat.

Demnach könnte das Auftreten von strukturierten Monomeren während der Denaturierung ein typisches Kennzeichen vieler Leguminosenlektine sein. Offenbar besitzt das Monomer eine hohe intrinsische Stabilität, die ihm nicht nur die große Variabilität in der Ausbildung von Oligomeren ermöglicht, sondern auch in Denaturierungskinetiken zum Tragen kommt.

Dimerstabilität unter Nativbedingungen Neben der Denaturierungskinetik wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Existenz zweier Isoformen genutzt, um die Stabilität und Dynamik der Psl-Dimere zu charakterisieren. Die Geschwindigkeit der Dissoziation liegt in der Größenordnung von 10^{-3} s^{-1} (Halbwertszeit um 10 min, Abschnitt 3.3.2 auf Seite 85).

In Gleichgewichtsuntersuchungen wurde versucht, die Stabilität der reinen Dimere der beiden Isoformen und des gemischten Dimers relativ zueinander und zum Monomer zu charakterisieren (Abschnitt 3.3.2 auf Seite 85). Da die Zeitauflösung der verwendeten Trennmethode aber in der selben Größenordnung liegt wie die Gleichgewichtseinstellung, ist keine eindeutige Interpretation der Daten möglich. Als sicher kann gelten, dass die Dissoziationskonstanten der Dimere nicht größer als einige mikromolar sind. Eine Obergrenze der Stabilität ergibt sich lediglich aus der Kombination der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation mit Literaturdaten über die Geschwindigkeit von Assoziationsreaktionen. Diese Grenze liegt in der Größenordnung von 10^{-9} M , höchstens 10^{-11} M . Daraus errechnen sich freie Enthalpien der Assoziation bei Raumtemperatur von etwa 51 kJ mol^{-1} bzw. 60 kJ mol^{-1} , eine Dissoziationskonstante an der unteren Grenze der Stabilität entspräche etwa 30 kJ mol^{-1} .

Bisher ist es nur in seltenen Fällen gelungen, die Dissoziationskonstanten von oligomeren Proteinen unter Nativbedingungen zu messen, etwa durch Verdünnungsexperimente. Bei den meisten Proteinen wird im messbaren Konzentrationsbereich keine Dissoziation beobachtet. Daher gibt es relativ wenig Daten zur Stabilität von Dimeren (Seckler, 2000). In den untersuchten Fällen stellte sich heraus, dass ein Großteil der freien Stabilisierungsenthalpie der nativen Oligomere aus der Interaktion zwischen den Untereinheiten stammt (Neet & Timm, 1994).

Mit den oben abgeschätzten Dissoziationskonstanten kann man errechnen, dass unter nativen Bedingungen bei einer Proteinkonzentration von $0.4 \mu\text{M}$, wie sie in den Übergängen in Abschnitt 3.2.1.2 verwendet wurde, einige Promille bis einige Prozent der Moleküle als Monomer vorliegen. Die Vorübergangs-Basislinien der Denaturierungsübergänge von PslS und PslP waren aber über Wochen stabil und verschoben sich im Laufe von drei Monaten nur gering nach unten (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 51). Dies ist ein weiteres starkes Indiz dafür, dass die monomeren Spezies nativ strukturiert sind und eine hohe kinetische Stabilität gegen Denaturierung haben, denn entfaltete PslP-Moleküle konnten unter den selben Bedingungen nur in geringer Ausbeute die native Struktur erreichen.

Während die Oligomerenbildung von Leguminosenlektinen auf der Basis von Kristallstrukturen und Sequenzanalysen gut untersucht ist (siehe Abschnitt 1.1.1.2 auf Seite 3 in der Einleitung), gibt es bisher kaum Daten über die thermodynamische Stabilität der Oligomere und die Kinetik ihrer Assoziation und Dissoziation. Generell sind Assoziationsreaktionen oligomerer Proteine bisher meist als ein Schritt auf dem Faltungsweg untersucht worden, und die publizierten Geschwindigkeitskonstanten stammen aus solchen Experimenten (Jaenicke, 1987; Seckler, 2000). Daher stellt Erbsenlektin mit seiner unter Nativbedingungen relativ leicht messbaren Untereinheiten-Austauschreaktion ein interessantes Modellsystem dar. Die bisher verwendete Trennmethode für die Isoformen arbeitet allerdings zu langsam. Für zukünftige Versuche könnten sich *micro-bore*-HPLC oder Kapillarelektrophorese als geeignet erweisen, wobei letztere den Vorteil hat, dass dort auch die Salzkonzentration in der Probe variiert werden kann.

4.3 Stabilitätsuntersuchungen an Psl

Die Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge von PslS und PslP, die in dieser Arbeit gemessen wurden, sind nicht reversibel (Abschnitt 3.2.1.2 auf Seite 48). Daher ist es nicht möglich, die Daten thermodynamisch auszuwerten und die freie Stabilisierungsenthalpie zu berechnen. In der hier untersuchten kinetischen Stabilität unterscheiden sich PslS und PslP nicht. Die strukturierten Monomere denaturieren mit einer Geschwindigkeit, die mit der Entfaltung monomerer Proteine vergleichbar ist (s.o.). Sie sind also durch eine relativ große Aktivierungsbarriere vom entfalteten Zustand getrennt. In Pankoke (1997) wurde die Denaturierungskinetik von PslS und PslP bei 6 M bei verschiedenen Temperaturen gemessen und mit einer monoexponentiellen Funktion annähernd ausgewertet. Dabei wurde eine Aktivierungsenergie von etwa 40 kJ mol^{-1} für beide Proteine gefunden. Man kann daher davon ausgehen, dass dieser Aktivierungsbarriere auch eine gewisse thermodynamische Stabilisierung entspricht. Dazu kommt die Stabilität Dimers gegenüber dem strukturierten Monomer, für die die weiter oben diskutierten Experimente einen Anhaltspunkt liefern. Es ist folglich zu erwarten, dass die thermodynamische Stabilität deutlich über 30 kJ mol^{-1} bei Raumtemperatur liegt.

In der einzigen bisher publizierten Studie, in der die Stabilität von Psl untersucht wurde, wird ein Wert von 77 kJ mol^{-1} bei 25 °C angegeben (Ahmad *et al.*, 1998). Allerdings muss man davon ausgehen, dass auch diese Werte mit möglicherweise großen Fehlern behaftet sind. Dort wurden nämlich nur die Denaturierungsübergänge in Harnstoff in die Auswertung einbezogen, ohne die Reversibilität zu überprüfen. Die Renaturierung wurde nur bei einer Konzentration an Denaturierungsmittel untersucht, dabei erreichen in 0.5 M Harnstoff die spektroskopischen Signale 85 – 90 % der Werte nativen Proteins. Die Fähigkeit des renaturierten Proteins zur Hämagglutination wurde nicht untersucht. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die Renaturierungsausbeute bei höheren Harnstoffkonzentrationen noch niedriger liegt und der Renaturierungsübergang wie in den GdmCl-induzierten Übergängen in dieser Arbeit nicht mit dem Denaturierungsübergang übereinstimmt.

Die „Übergänge“ in Ahmad *et al.* (1998) messen also eher die Denaturierungskinetik, die durchgeführte thermodynamische Auswertung ist nicht gerechtfertigt. Damit sind die Werte weniger verlässlich als die Schätzwerte, die in dieser Arbeit aufgrund der Dimerstabilität gewonnen wurden.

4.4 Methoden zur Untersuchung der Faltung von Psl

Ein Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Funktionstests, der sich zur Quantifizierung nativen Proteins in Faltungsexperimenten eignet. Dazu wurde eine Vielzahl von Versuchen unternommen, die verschiedene Aspekte der Interaktion von Psl mit löslichen und unlöslichen Liganden und unterschiedliche Quantifizierungsstrategien zum Gegenstand hatten. Dabei konnte jedoch letztlich kein Test entwickelt werden, der für die vorgesehenen Zwecke brauchbar gewesen wäre.

Der etablierte Funktionstest für Lektine, der Hämagglutinationstest, weist eine Reihe von Nachteilen auf, die seinen Einsatz in Faltungsexperimenten erschweren und teilweise unmöglich machen. Zum einen wird eine relativ hohe Proteinkonzentration benötigt, und

der deswegen notwendige Konzentrationsschritt ist problematisch. Denn dabei kommt das Protein mit unterschiedlichen Oberflächen in Kontakt, was sich in Faltungsexperimenten als problematisch erwies (siehe Abschnitt 3.2.4.1 auf Seite 62). Außerdem wird durch das Aufkonzentrieren die zeitliche Auflösung stark reduziert. Mittlerweile sind Mikrokonzentratoren zum Zentrifugenbetrieb auf dem Markt, die wesentlich schneller arbeiten als die verwendeten Centriplus-Apparaturen. Damit wäre es möglich, eine ähnliche Zeitauflösung wie in den Gelfiltrationsexperimenten zu erhalten. Als Funktionstest für die schnelleren Faltungsprozesse von PslP, vor allem aber für PslS wäre der Test aber immer noch nicht geeignet.

Ein weiterer Nachteil des Hämagglutinationstests konnte in dieser Arbeit teilweise umgangen werden. Mit der bisher beschriebenen Auswertung liefert er nur halbquantitative Daten. Durch die Berücksichtigung teilweiser Agglutination und die Umrechnung in Proteinkonzentrationen konnte in gewissen Grenzen eine quantitative Aussage aus den Daten gewonnen werden.

Als wesentlich besser geeignet erwies sich die Doppelsprungmethode bzw. die Bestimmung von nativem Protein über dessen Fluoreszenz-Denaturierungsamplitude. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Wert ein Maß für nativ gefaltetes Protein darstellt. Die mit manuellem Mischen erhaltene Zeitauflösung von unter einer Minute bei einer Totzeit von wenigen Sekunden ist für die Untersuchung der Faltung von langsam faltenden Proteinen wie Psl ausreichend. Über *stopped-flow*-Doppelsprungexperimente könnte man versuchen, die Bildung der 3 – 5 % nativen Moleküle in den ersten 20 Sekunden zu untersuchen.

Da die Messung von Fluoreszenzkinetiken bei PslP nicht möglich war, wurde die Doppelsprungmethode ergänzt durch Quervernetzungsexperimente und Gelfiltration. Die verwendete Säule ist nicht ideal, weil auch das native Protein dort teilweise adsorbiert wird und mit einer apparenten Molekularmasse eluiert, die kleiner als das Dimer ist. Da sich mit ihr aber schnellere Trennzeiten erreichen lassen als mit FPLC-Gelfiltrationssäulen, stellt sie einen brauchbaren Kompromiss dar und lieferte wertvolle Informationen über die Faltungskinetik von PslP.

4.5 Faltungskinetik von PslS

Die Faltung von PslS ist über einen pH-Bereich von 5.5 bis 8 möglich, zwischen pH 6 und 7 wurde eine Rückfaltungsausbeute von 100 % erreicht (Abschnitt 3.2.1.1 auf Seite 47). Durch Fluoreszenzmessungen wurde gezeigt, dass die Rückfaltung aus mindestens zwei Phasen besteht, die bei GdmCl-Konzentrationen unter 0.2 M vergleichbare Amplituden haben (Abschnitt 3.2.2.2 auf Seite 54). Doppelsprungexperimente zeigten, dass nur in der langsamen Phase natives Protein gebildet wird (Abschnitt 3.2.2.1 auf Seite 53). Daraus ergibt sich, dass es sich nicht um parallele Faltungswege handelt, sondern um die Bildung eines langlebigen Intermediates. Die langsame Faltungsphase und damit die Bildung nativen Proteins wird mit zunehmender GdmCl-Konzentration langsamer. Oberhalb von 0.8 M ist sie so sehr von Aggregation überlagert, dass sie sich im Fluoreszenzspektrometer nicht mehr beobachten lässt.

Auch bei einer Erhöhung des pH-Werts von 6.8 auf 7.0 wird sie deutlich langsamer, noch stärker bei pH 7.5. Dies ist bemerkenswert, da in einem Puffer mit 150 mM

NaCl gearbeitet wurde, in dem elektrostatische Wechselwirkungen schon weitgehend abgeschirmt und daher von kurzer Reichweite sind. Außerdem sind die pK_a -Werte der freien Aminosäuren weit von pH 7 entfernt. Offenbar sind hier also ein Intermediat oder ein Übergangszustand entscheidend, die bereits so viel Tertiärstruktur aufweisen, dass sich der pK_a -Wert eines Aminosäurerestes unter dem Einfluss seiner Umgebung stark verschiebt. Dieser Rest muss außerdem in eine stabilisierende oder destabilisierende Interaktion mit benachbarten, relativ stark vom Lösungsmittel abgeschirmten Ladungen eingebunden sein.

Die Messung von Renaturierungskinetiken bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ergaben keine Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der Konzentration an PslS. Daraus ergibt sich, dass nicht die Assoziation von strukturierten monomeren Intermediaten den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Dies steht im Einklang mit den weiter oben diskutierten Ergebnissen zur Dynamik der Dimerassoziation. Ob allerdings der geschwindigkeitsbestimmende Faltungsschritt auf Monomerebene abläuft und erst die assoziationskompetenten Untereinheiten erzeugt, oder ob es sich um eine Konformationsänderung bereits dimerisierter Moleküle handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Ob das in der schnellen Phase gebildete Intermediat *on-* oder *off-pathway* ist, kann anhand der Daten nicht eindeutig beurteilt werden. Bei einem *on-pathway*-Intermediat ergibt sich eine *lag*-Phase in der Kinetik der Entstehung des nativen Proteins. In den Doppelsprungexperimenten, die diese Kinetik messen, wurde keine solche Verzögerung gefunden. Allerdings ist die schnelle Phase in den Fluoreszenzkinetiken mit Halbwertszeiten zwischen 10 und 60 Sekunden um mindestens eine Größenordnung schneller als die langsame Phase bzw. die Bildung von nativem PslS. Die Zeitauflösung des Doppelsprungexperiments, bei dem die erste Messung frühestens etwa 15 s nach dem Start der Renaturierung erfolgen kann, ist daher zu klein, um die Existenz einer *lag*-Phase ausschließen zu können, die der schnellen Phase der Fluoreszenzkinetiken entspricht.

Die schnelle Phase ändert ab etwa 0.2 M GdmCl ihre Amplitude und wird zunächst zu einer *lag*-Phase, oberhalb 0.25 M GdmCl sinkt das Signal. Dabei ist unklar, ob diese Signaländerungen den gleichen Prozess, also die Bildung desselben Intermediats anzeigen, das bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen unterschiedliche Fluoreszenz zeigt, oder ob es sich um mehrere Intermediate handelt.

Die Verzögerung der langsamen kinetischen Phase durch den vorgelagerten schnellen Prozess könnte als Hinweis auf eine konsekutive Reaktion mit einem *on-pathway*-Intermediat interpretiert werden. Man kann aber aus einer apparenten *lag*-Phase in einem spektroskopischen Signal nicht in jedem Fall auf eine konsekutive Reaktion schließen. Denn eine konsekutive Reaktion $U \rightarrow I \rightarrow N$ bzw. $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ führt zur selben Funktion wie ein *off-pathway*-Intermediat oder wie parallele Faltungswege (Bieri & Kiefhaber, 2000), nämlich einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen. Bei geeigneter Kombination der Amplituden beider Summanden erhält man das beobachtete Verhalten.

Ob das gebildete Intermediat *on-* oder *off-pathway* ist, könnte nur durch Messung der Population von nativem PslS und der Intermediate zu Beginn der Renaturierung erfolgen. Falls sich Bedingungen finden ließen, unter denen die Denaturierung des Intermediats kinetisch verfolgt werden kann, das native Protein jedoch nativ bleibt, könnten Doppelsprungexperimente in einer *stopped-flow*-Einrichtung diese Frage klären. In dieser Arbeit sollte die Faltung von PslS allerdings nur charakterisiert werden, um ein

Modellprotein mit einer Polypeptidkette zum Vergleich mit PslP zur Verfügung zu haben. Da bei PslP keine vergleichbare schnelle Phase gefunden wurde – es konnten ja keine Fluoreszenzkinetiken gemessen werden –, unterblieb die Charakterisierung dieses möglicherweise nur für PslS relevanten Intermediats.

Die Renaturierung von PslS wurde auch mit Gelfiltration untersucht. Allerdings konnte dort kein Unterschied festgestellt werden zwischen Proben, die sofort nach Beginn der Renaturierung aufgetragen wurden, und nach 10 min oder später aufgetragenen Proben, das Protein eluierte immer als Dimer mit nativer Elutionszeit. Dies ist im Einklang mit den Fluoreszenzmessungen; die Halbwertszeit der Bildung nativer Moleküle unter den Inkubationsbedingungen vor der Gelfiltration (Renaturierung bei 0.16 M GdmCl) beträgt 3 – 4 min, und die Renaturierung kann während der Elution auf der Säule (ca. 12 min) bei noch niedrigerer GdmCl-Konzentration weiter ablaufen. Die Gelfiltration ist also nicht geeignet, um die Faltung und Assoziation von PslS unter den gewählten Bedingungen zu charakterisieren.

Die Faltungskinetik von PslS wurde nur unterhalb von 0.8 M GdmCl untersucht. Darüber ist es nicht mehr möglich, Fluoreszenzkinetiken zu messen (s.o.), allerdings könnte man Doppelsprungexperimente einsetzen, und bei weiterer Verlangsamung auch wieder Gelfiltration. Da bei PslP unter diesen Bedingungen jedoch überhaupt keine produktive Faltung beobachtet wird, wurde darauf verzichtet.

4.6 Die Faltung von PslP

4.6.1 Kinetik der Bildung von nativem PslP

Durch eine verbesserte Auswertung des Hämagglutinationstests und durch Doppelsprungexperimente konnte in dieser Arbeit erstmals die Renaturierungsausbeute von PslP zu nativem, funktionalem Protein eindeutig quantifiziert werden. Dabei wurden Ausbeuten von bis zu 60 % bei 0.2 M erhalten, und die Renaturierung war bei GdmCl-Restkonzentrationen bis zu 0.5 M möglich. In der Literatur sind bei der Rückfaltung in 0.5 M Harnstoff Rückfaltungsausbeuten von 85 – 90 % beschrieben worden (Ahmad *et al.*, 1998). Allerdings wurden dort nur spektrale Intensitäten bestimmt und nicht untersucht, ob es sich dabei auch um zuckerbindende Moleküle mit nativer Stabilität handelt. Da mittlere Konzentrationen an Denaturierungsmittel solubilisierend wirken (Jaenicke & Seckler, 1997), wurden hier möglicherweise lösliche Intermediate mit einberechnet, zumal keine Renaturierungszeit angegeben ist. In der vorliegenden Arbeit konnte aber auch gezeigt werden, dass die Rückfaltungseffizienz von PslP sensitiv gegenüber einer Vielzahl von Einflüssen wie der Beschaffenheit von Oberflächen und mechanischer Belastung ist. Es ist daher plausibel, dass unter bestimmten Bedingungen bei der Renaturierung in Harnstoff wirklich etwas höhere Ausbeuten erreicht werden können.

Die Renaturierungskinetik wurde mit unterschiedlichen Methoden verfolgt. Die daraus erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite zusammengefasst. Die Renaturierung ist extrem langsam. Mit Doppelsprungexperimenten und dem Hämagglutinationstest wurde bei etwa 0.2 M GdmCl eine Halbwertszeit von 1.2 Tagen gemessen, das heisst die Renaturierung ist erst nach mehr als einer Woche abgeschlossen. Daneben sind in der Tabelle auch die Geschwindigkeitskonstanten der

Veränderung der Peakflächen bei der Gelfiltration aufgenommen. Diese Daten konnten nur mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden, obwohl klar ist, dass in den Peaks mehrere Spezies eluieren. Die Geschwindigkeitskonstanten sind etwas größer als die aus den Doppelsprungexperimenten erhaltenen. Dies erklärt sich dadurch, dass in der Gelfiltration nicht nur das Entstehen nativen Proteins beobachtet wird, sondern auch das Akkumulieren bzw. bei 14 min der Abbau von Intermediaten.

Tabelle 4.1: Geschwindigkeitskonstanten der PslP-Faltung

Methoden	c(GdmCl)/M	k/ d ⁻¹	k/ d ⁻¹
Doppelsprungexperimente, biexponentiell	0.16	11	0.25
Doppelsprungexperimente, hyperbolisch	0.16		2.1
Hämagglutinationstest und Doppelsprungexperimente, monoexponentiell	0.21	–	0.57
Wachstum des Dimerenpeaks	0.16	–	0.86
Rückgang des Peaks bei 14 min	0.16	–	1.5

Genauere Untersuchungen mit Doppelsprungexperimenten zeigten, dass natives PslP in mehreren Phasen entsteht: 3 bis 5 % sind bereits nach weniger als 20 Sekunden nativ. Die darauf folgende, beobachtbare Kinetik kann näherungsweise durch eine hyperbolische Funktion beschrieben werden, die einer bimolekularen Assoziation mit einer Geschwindigkeitskonstante von 2.1 d⁻¹ entspricht. Eine gute Anpassung der Daten ergibt sich auch mit einer Summe aus zwei Exponentialfunktionen. In der ersten Phase mit einer Halbwertszeit von 1.5 Stunden wird etwa ein Drittel der Endausbeute erreicht. Der Rest entsteht in einem langsamen Prozess mit einer Halbwertszeit von 2.8 Tagen.

Die Rückfaltung von PslP umfasst mehrere Assoziationsschritte, so dass möglicherweise eine noch komplexere Kinetik resultiert. Um diese zu analysieren müssen Messungen bei mehreren Proteinkonzentrationen durchgeführt werden. Bei PslP ist das wegen der hohen Aggregationsanfälligkeit problematisch. Daher wurden Renaturierungen durchgeführt, bei denen die Konzentration je einer der beiden Ketten erhöht war. In beiden Fällen ergab sich eine deutliche Erhöhung der Ausbeute gegenüber der Renaturierung im Verhältnis 1 : 1 unter ansonsten gleichen Bedingungen. Da diese Experimente nur bei 0.4 – 0.5 M GdmCl möglich waren, wo die Ausbeute bereits stark zurückgeht, konnte der Einfluss auf die Kinetik nicht exakt bestimmt werden. Die Erhöhung der Ausbeute zeigt aber, dass die Assoziation von *alpha*- und *beta*-Kette eine Rolle für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt spielt.

4.6.2 Intermediate vor der ($\alpha\beta$)-Assoziation

Voraussetzung für diese Experimente war die Isolierung der α - und β -Ketten des prozessierten Proteins. Diese gelang vollständig im präparativen Maßstab durch Gelfiltration unter denaturierenden Bedingungen. Überführt man die isolierten Ketten in Nativpuffer, so bildet nur die β -Kette Struktur aus, während die kürzere α -Kette keine Anzeichen von Strukturbildung zeigt. Beide bleiben aber viele Minuten in Lösung, die Menge an

löslicher β -Kette beginnt erst nach 1.5 Stunden abzunehmen. Diese lange Löslichkeit ermöglicht somit die Rückfaltung von PslP in nennenswerten Ausbeuten.

Durch Gelfiltrationsexperimente und Quervernetzung konnte gezeigt werden, dass auch die isolierte β -Kette Dimere ausbildet, und zwar innerhalb weniger Minuten nach dem Start der Renaturierung. Informationen über die Struktur des β_2 -Dimers können nur indirekt erschlossen werden.

In den Quervernetzungsexperimenten wurden keine höheren Oligomere quervernetzt. Daraus ergibt sich, dass die Oligomerisierung eine spezifische Assoziationsreaktion ist, und man kann davon ausgehen, dass die Untereinheitenkontaktfläche nativähnlich strukturiert ist. Diese wird im nativen Protein hauptsächlich vom N -Terminus der β -Kette gebildet. Der erste Strang des *back sheet* und der folgende Loop bilden viele Kontakte zur anderen Untereinheit aus, darauf folgen dann je zwei Faltblattstränge des *top-* und des *front sheet* und darauf ein Stück irregulärer Struktur (vgl. Abschnitt 1.1.2 auf Seite 6). Der irregulär strukturierte Abschnitt hat ebenfalls Kontakt zur anderen Untereinheit.

Die Untereinheitenkontaktfläche besteht also im wesentlichen aus einem in der Sequenz zusammenhängenden Bereich der β -Kette, lediglich Trp 19 der α -Kette bildet ebenfalls Kontakte mit der anderen Untereinheit (siehe Abschnitt 3.2.5 auf Seite 78). Dieser Sequenzbereich bildet auch in der Struktur viele lokale Wechselwirkungen aus. Er enthält zwei Faltblattbruchstücke mit je zwei Strängen und einen weiteren Faltblattstrang, der die Dimerisierung vermittelt. Kontakte zum Rest der β -Kette gibt es in der nativen Struktur kaum, nur mit Val 90 bis Pro 94 sind in der Kristallstruktur Kontakte sichtbar. Da PslP- β spezifische Homodimere bildet kann man davon ausgehen, dass darin die Untereinheitenkontaktfläche ebenfalls aus diesen Strukturen gebildet wird und eine nativähnliche Anordnung ihrer Sekundärstrukturelemente vorliegt.

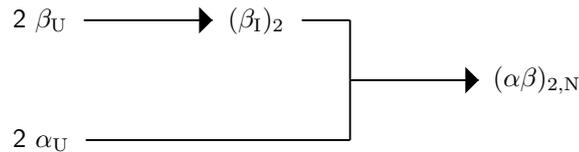
Verfolgt man die Struktur weiter von der Kontaktfläche weg, so fehlen in allen Faltblättern Stränge, die von der α -Kette beigetragen werden. Der Rest der β -Kette bildet eine in sich recht abgeschlossene Struktur, und die α -Kette läuft an deren Rand zwischen den beiden Faltblättern entlang und bildet den äußeren Abschluss des hydrophoben Cores, der zwischen den Faltblättern liegt. Schließlich lagert sie sich als letzter Strang wieder an das *back sheet* an. Man kann vermuten, dass in Faltungsintermediaten der C -terminale, kompakte Teil der β -Kette nativähnliche Topologie und Teile der nativen Sekundärstruktur besitzt.

Wenn im β_2 -Dimer zugleich der N -Terminus in der Untereinheitenkontaktfläche nativähnlich ist, so werden die beiden Teile in irgendeiner Form Kontakte ausbilden. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass die Faltblattstränge, die in der nativen Struktur mit der α -Kette wasserstoffverbrückt sind, gegenseitig ihre Wasserstoffbrücken absättigen und so zwei durchgehende Faltblätter erzeugen, wenn auch um je einen Strang kürzer. Dieses Modell ist natürlich höchst spekulativ. Es ist jedoch von der nativen Struktur her betrachtet nicht abwegig, und es steht im Einklang mit der Langlebigkeit dieses Intermediats.

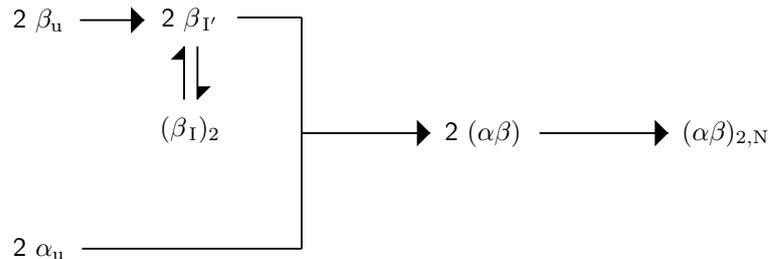
4.6.3 Minimalmodelle für die Faltung von PslP

Aufgrund der bisher diskutierten Ergebnisse ergibt sich folgendes Minimalmodell der Faltung von PslP:

4 Diskussion



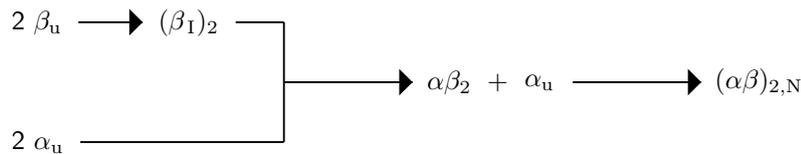
Damit ist jedoch noch nichts über die Prozesse gesagt, die zur Assoziation von α - und β -Kette führen. Eine Möglichkeit wäre, dass die β_2 -Dimere zuerst dissoziieren und teilweise entfalten müssen, bevor sie mit der α -Kette assoziieren können. Daraus ergäbe sich folgendes Modell:



Dabei könnte nun die Dissoziation der $(\beta_I)_2$ -Dimere oder die Assoziation der im Gleichgewicht vorliegenden β_I -Monomere mit der α -Kette geschwindigkeitsbestimmend sein.

Die Gelfiltrationsexperimente zeigen, dass im Laufe der Renaturierung eine nicht-native $\beta_2\alpha_n$ -Spezies ($n = 0, 1, 2$), vermutlich hauptsächlich β_2 -Dimere, akkumuliert. Dafür gibt es im obigen Modell zwei Möglichkeiten. β_2 und β_I werden (in ihrem Gleichgewichtsverhältnis) stark populiert, wenn ihre Weiterreaktion, die Assoziation mit PslP- α , entsprechend langsam ist. Aber auch wenn β_I und $(\beta_I)_2$ sehr schnell gebildet werden und das Gleichgewicht weit auf der Seite der Dimere liegt, könnte anschließend die Dissoziation von $(\beta_I)_2$ geschwindigkeitsbestimmend sein, und $(\beta_I)_2$ würde akkumulieren. Die Gelfiltrationsexperimente mit PslP- β zeigten jedoch, dass die langlebige β_2 -Spezies erst in einem langsamen Prozess im Verlauf von über einer Stunde gebildet wird. In der Zeit davor sind entweder Monomere populiert oder möglicherweise Dimere, die im schnellen Gleichgewicht mit Monomeren stehen (siehe Seite 74). Darüber hinaus werden schon in den ersten Sekunden nach dem Beginn der Renaturierung native Moleküle gebildet und auch danach setzt sich die Renaturierung ohne *lag*-Phase in einem „schnellen“ Prozess fort (siehe Abbildung 3.18A auf Seite 68). Es stellt sich also nicht zuerst das Gleichgewicht zwischen den PslP- β -Intermediaten ein, sondern die Renaturierung kann sofort beginnen. Demnach ist die Assoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Diese These wird auch durch die Experimente unterstützt, bei denen die Proteinkonzentration variiert wurde. Zwar war keine quantitative Auswertung dieser Kinetiken möglich, die Erhöhung der Konzentration einer Spezies erhöhte jedoch eindeutig die Renaturierungsausbeute (siehe Seite 69).

Wenn die α -Kette mit monomerem β_I assoziieren muss, um natives PslP zu bilden, dann würde man allerdings erwarten, dass eine Erhöhung der Konzentration an PslP- β nicht oder nicht im selben Maße zu einer höheren Ausbeute führt wie eine Erhöhung von PslP- α . Denn damit verschiebt sich auch das Gleichgewicht zu den Dimeren, und die Konzentration an β_I steigt nicht oder nicht im selben Maße wie die Konzentration von PslP- β . Daher beschreibt ein anderes Modell die Reaktion besser:



Zwar wurden hier Pfeile nur in einer Richtung eingezeichnet, aber es kann sich bei einigen der Reaktionen durchaus um Gleichgewichtsreaktionen handeln. Außerdem existieren mit Sicherheit weitere Konformationen von PslP- β , darunter monomere; aber sie liegen nicht auf dem produktiven Weg zum nativen Protein.

Für die Faltungskinetik können sie insofern trotzdem eine Rolle spielen, weil die Startpunkte der beobachteten Aggregationsprozesse sein können. Aggregation beginnt in der Regel mit bereits teilgefalteten Strukturen, nicht mit völlig entfalteten Polypeptidketten, und häufig handelt es sich dabei um fehlgefaltete *off-pathway*-Intermediate. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der produktiven Faltungsreaktion ist jedoch bei PslP die Assoziation der durch die Prozessierung erzeugten Ketten.

Nach diesem Modell sind die Partner der Assoziationsreaktion die hauptsächlich populierte Spezies, α_u und β_I . Die Assoziation ist daher nicht lediglich ein diffusiver Prozess, sondern umfasst auch eine Konformationsänderung von β_I und die Strukturbildung von PslP- α .

4.6.4 Mechanismus der α - β -Assoziation

Die beiden Polypeptidketten jeder PslP-Untereinheit sind in der nativen Struktur eng miteinander verschränkt. Die Assoziation von PslP- α mit strukturierten β -Ketten erfordert daher eine umfassende Konformationsänderung von PslP- β bzw. β_2 . In Abschnitt 4.6.2 auf Seite 110 wurde bereits diskutiert, dass die Untereinheitenkontaktfläche im *N*-Terminus der β -Kette im wesentlichen native Struktur haben muss, und dass auch der größere, *C*-terminale Teil vermutlich native Topologie und teilweise native Sekundär- und Tertiärstruktur besitzt. Die Kontaktfläche dieser beiden Subdomänen, wo in der nativen Struktur die α -Kette liegt, wird dagegen mobiler sein, und die Interaktion zwischen den Teilen kann nur durch nicht-native Kontakte vermittelt werden. Möglicherweise sind sie gar nicht stabil assoziiert; da sie aber hydrophobe Oberflächen exponieren, ist davon auszugehen, dass sie zumindest transient miteinander in Kontakt stehen.

Damit PslP- α seinen Platz in der nativen Struktur einnehmen kann, müssen diese Kontakte konzertiert oder schrittweise aufgebrochen werden und durch Wechselwirkungen mit der α -Kette ersetzt werden. Eine konzertierte Reaktion bestünde aus einer Auseinanderbewegung der beiden Subdomänen, während oder nach der die α -Kette ihren Platz einnehmen kann. Denkbar wäre aber auch eine schrittweise Insertion der entsprechenden Teile der α -Kette in die vorgeformten β -Faltblätter der PslP- β -Struktur.

Die Insertion eines Faltblattstrang in ein bestehendes Faltblatt ist in der Literatur für die Serpine beschrieben worden. Es handelt sich um Inhibitoren von Serin-Proteasen, die von der Protease geschnitten werden, anschließend kovalent mit dem aktiven Zentrum verknüpft bleiben und dieses dadurch deformieren. Die Schnittstelle für die Protease liegt in einem flexiblen Loop, der nach dem Proteolyseschnitt in das zentrale β -Faltblatt

des Inhibitors inseriert. Dieses Faltblatt besteht in der aktiven Form vor dem Proteolyse-schritt aus fünf Strängen mit gemischt parallel-antiparalleler Anordnung. Drei davon liegen in der Sequenz relativ nahe am *N*-Terminus, daran schließen sich zwei Stränge vom *C*-Terminus an, der erste am Rand des Faltblatts, der zweite zu den *N*-terminalen Strängen hin. Der Loop schließt direkt an den letzten Faltblattstrang an und inseriert nach der Proteolyse als sechster Strang zwischen die drei *N*- und die beiden *C*-terminalen Faltblattstränge, so dass sich bis auf einen kurzen Strang am Rand eine rein antiparallele Anordnung ergibt (Huntington *et al.*, 2000).

Ein ähnlicher Prozess könnte auch bei der Assoziation der α -Kette von PslP mit dem β_2 -Dimer stattfinden. Allerdings müssen hier drei β -Stränge anstatt eines einzelnen in ein bestehendes Faltblatt inserieren bzw. anlagern. Möglicherweise kann dieser Prozess nicht in einem Schritt, sondern nur sequentiell erfolgen. Der erste Schritt wird plausiblerweise die Anlagerung des *C*-Terminus der α -Kette an das *back sheet* in der Nähe der Schnittstelle sein, denn dort bildet es das Ende des Stranges. Dann könnten die verbleibenden Sequenzbereich schrittweise in *front sheet* und *back sheet* inserieren.

Der größeren Anzahl von einzubauenden Sekundärstrukturelementen steht wahrscheinlich eine größere Mobilität des β_2 -Dimers im Vergleich zu Serpinen gegenüber. Serpine falten zunächst in die aktive Form ohne inserierten Loop, so dass auch diese evolutionärem Druck ausgesetzt ist und daher eine metastabile Struktur annimmt (Carrell & Owen, 1985). Psl dagegen faltet als *precursor* und wird erst danach in zwei Polypeptidketten prozessiert. Das β_2 -Dimer ist daher eine unphysiologische Form oder tritt nur dann auf, wenn einzelne Moleküle in der Zelle entfalten. Seine Struktur dürfte daher sehr mobil sein, was der α -Kette die Möglichkeit zur Anlagerung gibt.

4.7 Ausblick

Die Frage nach der Funktion der Prozessierung kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht abschließend beantwortet werden. Es wurde zwar gezeigt, dass auch PslP *in vitro* mit Ausbeuten über 50 % zurückfalten kann. Gleichzeitig wurde jedoch deutlich, wie stark dieser Prozess von Aggregation und anderen Nebenreaktionen begleitet ist. Ob PslP auch *in vivo*, genauer gesagt in den *protein bodies* falten kann, müsste noch näher untersucht werden. Dazu könnten grundsätzlich Faltungsexperimente in Zellextrakten oder unter Zusatz von Chaperonen und anderen zellulären Faltungshelfern durchgeführt werden.

Stattdessen könnte man, um die Funktion der unterschiedlichen Prozessierung von Leguminosenlektinen aufzuklären, ein vergleichender Ansatz wählen. Dazu müsste ein nichtprozessierter Vertreter der Familie gefunden werden, der mit höherer Ausbeute und eventuell sogar reversibel faltet. Davon ausgehend könnten dann rekombinant Varianten erzeugt werden, die das Prozessierungsmuster von Psl oder anderen Leguminosenlektinen und die circuläre Permutation von Concanavalin A aufweisen.

Solange kein solches Modell-Leguminosenlektin identifiziert ist, stellt Psl jedoch ein interessantes Untersuchungsobjekt dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Methoden etabliert, mit denen seine Faltung charakterisiert werden kann. Diese könnten in zukünftigen Studien verwendet werden, um die Faltungs- und Assoziationsprozesse von PslP näher zu untersuchen. Interessante Informationen sind von Experimenten bei weiteren

GdmCl-Konzentrationen zwischen 0 und 0.5 M GdmCl und von temperaturabhängigen Faltungsexperimenten zu erwarten. Vom trimeren *tailspike*-Protein des Phagen P22 ist bekannt, dass die Renaturierungsausbeute von einem temperaturabhängigen Gleichgewicht zwischen einem produktiven und einem aggregationsanfälligen monomeren Faltungsintermediat abhängt (Danner & Seckler, 1993). Zur Renaturierung wurde teilweise ein Temperatursprungverfahren angewandt, bei dem zuerst auf Eis die Faltung löslicher Monomere ermöglicht wird, bevor durch einen Sprung auf Raumtemperatur die Assoziation und weitere Konformationsänderungen eingeleitet werden (siehe z. B. Benton *et al.*, 2002). Ein ähnlicher Ansatz könnte auch bei PsIP versucht werden, um den Einfluss der Aggregation zu vermindern.

Durch die Möglichkeit, die Untereinheiten austauschreaktion zwischen Dimeren mit verschiedenen Isoformen zu beobachten, stellt Erbsenlektin ein interessantes Objekt zur Charakterisierung von Stabilität und Dynamik oligomerer Proteine dar. Durch Verwendung von Trennmethode mit höherer Zeitauflösung und durch Variation der Salzkonzentration, Zusatz von spezifischen Liganden oder von Cosolventien kann in Zukunft die Dimerbildung kinetisch und thermodynamisch charakterisiert werden. Damit würden zu den bisher aus Kristallstrukturen gewonnenen reichhaltigen Daten zur Quartärstruktur von Leguminosenlektinen wichtige biophysikalische Informationen über die Oligomerbildung verfügbar.

Literaturverzeichnis

- Ahmad, N., Srinivas, V. R., Reddy, G. B. & Surolia, A.** (1998), Thermodynamic characterization of the conformational stability of the homodimeric protein, pea lectin, *Biochemistry* 37(47), 16765–72.
- Alm, E. & Baker, D.** (1999), Matching theory and experiment in protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 9(2), 189–96. B2-03.
- Anfinsen, C. B.** (1973), Principles that govern the folding of protein chains, *Science* 181(96), 223–30.
- Anfinsen, C. B. & Haber, E.** (1961), Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds, *J Biol Chem* 236, 1361–63.
- Anson, M. L.** (1945), Protein denaturation and the properties of protein groups, *Adv Protein Chem* 2, 361–86.
- Anson, M. L. & Mirsky, A. E.** (1931), The reversibility of protein coagulation, *J Phys Chem* 35, 185–193.
- Bachmann, A. & Kiefhaber, T.** (2001), Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route, *J Mol Biol* 306(2), 375–86. B4-87.
- Baldwin, R. L. & Rose, G. D.** (1999a), Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding, *Trends Biochem Sci* 24(1), 26–33. B2-134.
- Baldwin, R. L. & Rose, G. D.** (1999b), Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states [published erratum appears in Trends Biochem Sci 1999 May;24(5):185], *Trends Biochem Sci* 24(2), 77–83. B2-134.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A.** (2000), The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science* 289(5481), 905–20.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R. & Seckler, R.** (1996), Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, Salmonella O-antigen polysaccharide, *Biophys J* 71(4), 2040–8.
- Baxa, Ulrich** (1998), Lipopolysaccharid-Erkennung durch das P22 Tailspikeprotein: Biophysikalisch-chemische Analyse einer Virus-Rezeptor-Interaktion, Dissertation, Universität Regensburg.

- Benton, C. B., King, J. & Clark, P. L.** (2002), Characterization of the protrimer intermediate in the folding pathway of the interdigitated beta-helix tailspike protein, *Biochemistry* 41(16), 5093–103.
- Betts, S., Haase-Pettingell, C. & King, J.** (1997), Mutational effects on inclusion body formation, *Adv Protein Chem* 50, 243–64. Using Smart Source Parsing.
- Beyer, Hans & Walter, Wolfgang** (1984), Lehrbuch der Organischen Chemie, S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Bhattacharyya, L., Brewer, C. F., Brown, 3rd, R. D. & Koenig, S. H.** (1985), Preparation and properties of metal ion derivatives of the lentil and pea lectins, *Biochemistry* 24(19), 4974–80. B3-65.
- Bieri, Oliver & Kiefhaber, Thomas** (2000), Kinetic models in protein folding, in: Pain (2000), (Seiten 34–64).
- Bouckaert, J., Dewallef, Y., Poortmans, F., Wyns, L. & Loris, R.** (2000), The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization, *J Biol Chem* 275(26), 19778–87. B4-103.
- Boulter, D., Edwards, G. A., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. & Hilder, V. A.** (1990), Additive Protective Effects of Different Plant-Derived Insect Resistance Genes in Transgenic Tobacco Plants, *Crop Protection* 9(5), 351–354. OCT CROP PROT.
- Bourne, Y., Roussel, A., Frey, M., Rouge, P., Fontecilla-Camps, J. C. & Cambillau, C.** (1990), Three-dimensional structures of complexes of Lathyrus ochrus isolectin I with glucose and mannose: fine specificity of the monosaccharide-binding site, *Proteins* 8(4), 365–76. Using Smart Source Parsing.
- Bowles, D. J., Marcus, S. E., Pappin, D. J., Findlay, J. B., Eliopoulos, E., Maycox, P. R. & Burgess, J.** (1986), Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons, *J Cell Biol* 102(4), 1284–97.
- Brewer, C. F., Brown, 3rd, R. D. & Koenig, S. H.** (1983), Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin A: a structure-function study, *J Biomol Struct Dyn* 1(4), 961–97.
- Broekaert, W. F., Vanparijs, J., Leyns, F., Joos, H. & Peumans, W. J.** (1989), A Chitin-Binding Lectin From Stinging Nettle Rhizomes With Antifungal Properties, *Science* 245(4922), 1100–1102. SEP 8 SCIENCE.
- Buffard, D., Kaminski, P. A. & Strosberg, A. D.** (1988), Lectin-Gene Expression in Pea (*Pisum-Sativum-L*) Roots, *Planta* 173(3), 367–372. MAR PLANTA.
- Burda, M. R. & Miller, S.** (1999), Folding of coliphage T4 short tail fiber in vitro. Analysing the role of a bacteriophage-encoded chaperone, *Eur J Biochem* 265(2), 771–8.

- Cantor, Charles R. & Schimmel, Paul R.** (1980), *Biophysical Chemistry*, Band 2, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Capaldi, A. P., Kleanthous, C. & Radford, S. E.** (2002), Im7 folding mechanism: misfolding on a path to the native state, *Nat Struct Biol* 9(3), 209–16.
- Carrell, R. W. & Owen, M. C.** (1985), Plakalbumin, alpha 1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis, *Nature* 317(6039), 730–2.
- Carrington, D. M., Auffret, A. & Hanke, D. E.** (1985), Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A, *Nature* 313(5997), 64–7.
- Chambers, J. A. A. & Rickwood, D.** (Hg.) (1993), *Biochemistry Labfax*, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford.
- Chandra, N. R., Prabu, M. M., Suguna, K. & Vijayan, M.** (2001), Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold, *Protein Eng* 14(11), 857–66. B4-118.
- Chen, Raymond F., Edelhoch, Harold & Steiner, Robert F.** (1969), Fluorescence of Proteins, in: *Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry*, **Leach, Sydney J.**, Hg., Academic Press, New York, London.
- Chikenji, G. & Kikuchi, M.** (2000), What is the role of non-native intermediates of beta-lactoglobulin in protein folding?, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26), 14273–7. B3-140.
- Chiti, F., Bucciantini, M., Capanni, C., Taddei, N., Dobson, C. M. & Stefani, M.** (2001), Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain, *Protein Sci* 10(12), 2541–7.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C. M.** (1999), Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7), 3590–4.
- Chrispeels, M. J. & Raikhel, N. V.** (1991), Lectins, lectin genes, and their role in plant defense, *Plant Cell* 3(1), 1–9.
- Cooper, T. G.** (1981), *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.
- Creighton, Thomas E.** (Hg.) (1997), *Protein Function. A Practical Approach*, The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 2nd Auflage.
- Dams, T. & Jaenicke, R.** (1999), Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, *Biochemistry* 38(28), 9169–78.

- Danner, M. & Seckler, R.** (1993), Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations, *Protein Sci* 2(11), 1869–81.
- Dertinger, Dagmar** (1996), Das Lektin der Erbse *Pisum sativum*: Faltung, Stabilität und Funktion der posttranslationalen Prozessierung, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Brewer, C. F. & Sacchettini, J. C.** (1995), X-ray crystal structure of the soybean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of the blood group I carbohydrate antigen, *Biochemistry* 34(15), 4933–42.
- Diaz, C. L., Melchers, L. S., Hooykaas, P. J. J., Lugtenberg, B. J. J. & Kijne, J. W.** (1989), Root Lectin As a Determinant of Host-Plant Specificity in the Rhizobium-Legume Symbiosis, *Nature* 338(6216), 579–581. APR 13 NATURE.
- Diaz, C. L., Spaink, H. P. & Kijne, J. W.** (2000), Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene, *Mol Plant Microbe Interact* 13(3), 268–76. B4-124.
- Dill, K. A.** (1999), Polymer principles and protein folding, *Protein Sci* 8(6), 1166–80. B2-127.
- Dill, K. A. & Chan, H. S.** (1997), From Levinthal to pathways to funnels, *Nat Struct Biol* 4(1), 10–9.
- Dobson, Christopher M.** (2000), The nature and significance of protein folding, in: Pain (2000), (Seiten 1–33).
- Dubendorff, J. W. & Studier, F. W.** (1991a), Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with the lac repressor, *J. Mol. Biol.* 219, 45–59.
- Dubendorff, J. W. & Studier, F. W.** (1991b), Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter, *J. Mol. Biol.* 219, 61–68.
- Dybkjaer, E.** (1967), Photometric quantitation of haemagglutination, *Scand J Haematol* 4(6), 465–72. B3-83.
- van Eijsden, R., Diaz, C. L., de Pater, B. S. & Kijne, J. W.** (1995), Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Plant Mol Biol* 29(3), 431–9.
- van Eijsden, R. R., Hoedemaeker, F. J., Diaz, C. L., Lugtenberg, B. J., de Pater, B. S. & Kijne, J. W.** (1992), Mutational analysis of pea lectin. Substitution of Asn125 for Asp in the monosaccharide-binding site eliminates mannose/glucose-binding activity, *Plant Mol Biol* 20(6), 1049–58. B3-67.

- Einspahr, H., Parks, E. H., Suguna, K., Subramanian, E. & Suddath, F. L.** (1986), The crystal structure of pea lectin at 3.0-Å resolution, *J Biol Chem* 261(35), 16518–27. B3-61.
- Elgavish, S. & Shaanan, B.** (1997), Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles, *Trends Biochem Sci* 22(12), 462–7. B3-132.
- Elgavish, S. & Shaanan, B.** (2001), Chemical characteristics of dimer interfaces in the legume lectin family, *Protein Sci* 10(4), 753–61. B4-39.
- Entlicher, G., Kostir, J. V. & Kocourek, J.** (1970), Studies on phytohemagglutinins. 3. Isolation and characterization of hemagglutinins from the pea (*Pisum sativum* L.), *Biochim Biophys Acta* 221(2), 272–81.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F.** (1971), Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane, *Biochemistry* 10(13), 2606–17.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S.** (1986), Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea, *Anal Biochem* 155(1), 83–8.
- Forge, V., Hoshino, M., Kuwata, K., Arai, M., Kuwajima, K., Batt, C. A. & Goto, Y.** (2000), Is folding of beta-lactoglobulin non-hierarchical? Intermediate with native-like beta-sheet and non-native alpha-helix, *J Mol Biol* 296(4), 1039–51. B3-170.
- Fuchs, A., Seiderer, C. & Seckler, R.** (1991), In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein, *Biochemistry* 30(26), 6598–604.
- Gao, J., Qiao, S. & Whitesides, G. M.** (1995), Increasing binding constants of ligands to carbonic anhydrase by using "greasy tails", *J Med Chem* 38(13), 2292–301. B2.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989), Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data, *Anal Biochem* 182(2), 319–26.
- Goldberg, J. M. & Baldwin, R. L.** (1998), Kinetic mechanism of a partial folding reaction. 1. Properties of the reaction and effects of denaturants, *Biochemistry* 37(8), 2546–55.
- Goldberg, M. E., Expert-Bezancon, N., Vuillard, L. & Rabilloud, T.** (1995), Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate in vitro protein renaturation, *Fold Des* 1(1), 21–7. Using Smart Source Parsing.
- Goldstein, I. J., Hughes, R. C., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N.** (1980), What Should Be Called a Lectin, *Nature* 285(5760), 66–66. NATURE.
- Gordon, J. A.** (1972), Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins, *Biochemistry* 11(10), 1862–70.

- Gupta, D., Bhattacharyya, L., Fant, J., Macaluso, F., Sabesan, S. & Brewer, C. F.** (1994), Observation of unique cross-linked lattices between multiantennary carbohydrates and soybean lectin. Presence of pseudo-2-fold axes of symmetry in complex type carbohydrates, *Biochemistry* 33(24), 7495–504.
- Hanahan, D.** (1983), Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166(4), 557–80.
- Hardman, K. D. & Ainsworth, C. F.** (1972), Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution, *Biochemistry* 11(26), 4910–9.
- Harris, D. L. & Hudson, B. S.** (1990), Photophysics of tryptophan in bacteriophage T4 lysozymes, *Biochemistry* 29(22), 5276–85.
- Hase, S.** (1995), pre- and post-column detection-oriented derivatization techniques in HPLC of carbohydrates, in: carbohydrate analysis, **Rassi, Z. E.**, Hg., Elsevier, Amsterdam.
- Herbst, R., Gast, K. & Seckler, R.** (1998), Folding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase: aggregation and reactivation of unfolding intermediates, *Biochemistry* 37(18), 6586–97.
- Herbst, R., Schafer, U. & Seckler, R.** (1997), Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase, *J Biol Chem* 272(11), 7099–105.
- Heukeshoven, J. & Dernik, R.** (1985), Untersuchungen zum Mechanismus und Einfluß einiger Parameter auf die Effektivität der Silberfärbung, in: Elektrophoreseforum, **Radola, B. J.**, Hg., (Seiten 108–118), TU München, München.
- Higgins, T. J., Chandler, P. M., Zurawski, G., Button, S. C. & Spencer, D.** (1983a), The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin, *J Biol Chem* 258(15), 9544–9. B2-72.
- Higgins, T. J., Chrispeels, M. J., Chandler, P. M. & Spencer, D.** (1983b), Intracellular sites of synthesis and processing of lectin in developing pea cotyledons, *J Biol Chem* 258(15), 9550–2. B3-69.
- Hirsch, A. M.** (1999), Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation, *Curr Opin Plant Biol* 2(4), 320–6. B3-88.
- Hoedemaeker, F. J., van Eijdsden, R. R., Diaz, C. L., de Pater, B. S. & Kijne, J. W.** (1993), Destabilization of pea lectin by substitution of a single amino acid in a surface loop, *Plant Mol Biol* 22(6), 1039–46. B2-44.
- Hoedemaeker, F. J., Richardson, M., Diaz, C. L., de Pater, B. S. & Kijne, J. W.** (1994), Pea (*Pisum sativum* L.) seed isolectins 1 and 2 and pea root lectin result from carboxypeptidase-like processing of a single gene product, *Plant Mol Biol* 24(1), 75–81.

- Hung, H. C. & Chang, G. G.** (1998), Biphasic denaturation of human placental alkaline phosphatase in guanidinium chloride, *Proteins* 33(1), 49–61.
- Huntington, J. A., Read, R. J. & Carrell, R. W.** (2000), Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation, *Nature* 407(6806), 923–6.
- Jaenicke, R.** (1987), Folding and association of proteins, *Prog Biophys Mol Biol* 49(2-3), 117–237. Using Smart Source Parsing.
- Jaenicke, R.** (1991), Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies, *Biochemistry* 30(13), 3147–61.
- Jaenicke, R.** (1999), Stability and folding of domain proteins, *Prog Biophys Mol Biol* 71(2), 155–241. Using Smart Source Parsing.
- Jaenicke, R. & Seckler, R.** (1997), Protein misassembly in vitro, *Adv Protein Chem* 50, 1–59. Using Smart Source Parsing.
- Jameson, D. M. & Sawyer, W. H.** (1995), Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions, *Methods Enzymol* 246, 283–300. B2 -26.
- Jensen, Ole Norregaard, Shevchenko, Andrej & Mann, Matthias** (1997), Protein analysis by mass spectrometry, in: Creighton (1997), (Seiten 29–58).
- John R. Warren, Julius A. Gordon** (1966), On the Refractive Indices of Aqueous Solutions of Urea, *J. Phys. Chem.* 70(1), 297–300.
- Juers, D. H., Jacobson, R. H., Wigley, D., Zhang, X. J., Huber, R. E., Tronrud, D. E. & Matthews, B. W.** (2000), High resolution refinement of beta-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation, *Protein Sci* 9(9), 1685–99.
- Kardailsky, I. V., Sherrier, D. J. & Brewin, N. J.** (1996), Identification of a new pea gene, PsNlec1, encoding a lectin-like glycoprotein isolated from the symbiosomes of root nodules, *Plant Physiol* 111(1), 49–60.
- Kataoka, M. & Goto, Y.** (1996), X-ray solution scattering studies of protein folding, *Fold Des* 1(5), R107–14. Using Smart Source Parsing R107-14.
- Kelley, A. M., Michalet, X. & Weiss, S.** (2001), Chemical physics. Single-molecule spectroscopy comes of age, *Science* 292(5522), 1671–2.
- Kern, G., Schulke, N., Schmid, F. X. & Jaenicke, R.** (1992), Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast, *Protein Sci* 1(1), 120–31.
- Kiaoren, T., Yasuhiko, N., Hai-Ou, L., Mingdi, Z., Hui, G., Akiko, F., Osamu, S. & Tomohiko, O.** (1994), The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli, *Nucleic Acid Research* 22, 2857–2858.

- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. & Buchner, J.** (1991), Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation, *Biotechnology (N Y)* 9(9), 825–9.
- Kiefhaber, Thomas** (1995), Protein Folding Kinetics, in: Shirley (1995), (Seiten 313–341).
- Kim, E. E., Varadarajan, R., Wyckoff, H. W. & Richards, F. M.** (1992), Refinement of the crystal structure of ribonuclease S. Comparison with and between the various ribonuclease A structures, *Biochemistry* 31(49), 12304–14.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L.** (1982), Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding, *Annu Rev Biochem* 51, 459–89. Using Smart Source Parsing.
- King, J. & Laemmli, U. K.** (1971), Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4, *J Mol Biol* 62(3), 465–77.
- Kocourek, J. & Horejsi, V.** (1981), Defining a Lectin, *Nature* 290(5803), 188–188. NATURE.
- Kornfeld, K., Reitman, M. L. & Kornfeld, R.** (1981), The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant, *J Biol Chem* 256(13), 6633–40. B2-8.
- Kraulis, P. J.** (1991), Molscript - a Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures, *Journal of Applied Crystallography* 24, 946–950. OCT 15 J APPL CRYST.
- Kummer, H. & Rudiger, H.** (1988), Characterization of a lectin-binding storage protein from pea (*Pisum sativum*), *Biol Chem Hoppe Seyler* 369(8), 639–46.
- Kurganov, Boris I., Lyubarev, Akrady E. & Sanchez-Ruiz, Jose M** (1997), Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation, *Biophys Chem* 69, 125–135.
- Kuzmic, P.** (1996), Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase, *Anal Biochem* 237(2), 260–73.
- Lawrence, M. C. & Colman, P. M.** (1993), Shape complementarity at protein/protein interfaces, *J Mol Biol* 234(4), 946–50. B2-97.
- Lide, David R.** (Hg.) (1998), CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Press, Boca Raton, Boston, London, New York, Washington, D.C, 79th Auflage.
- Liener, I. E., Sharon, N. & Goldstein, I.J.** (Hg.) (1986), Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, Academic Press, Orlando, Fla., USA.
- Liener, I.E.** (1955), The Photometric Determination of the Hemagglutinating Activity of Soyin and Crude Soybean Extracts, *Arch Biochem Biophys* 54, 223–231. B3-80.

- Lis, H. & Sharon, N.** (1986), Lectins as molecules and as tools, *Annu Rev Biochem* 55, 35–67. Using Smart Source Parsing.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L.** (1998), Legume lectin structure, *Biochim Biophys Acta* 1383(1), 9–36. B 2-14.
- Mandal, D. K. & Brewer, C. F.** (1992), Interactions of concanavalin A with glycoproteins: formation of homogeneous glycoprotein-lectin cross-linked complexes in mixed precipitation systems, *Biochemistry* 31(50), 12602–9.
- Manly, S. P., Matthews, K. S. & Sturtevant, J. M.** (1985), Thermal denaturation of the core protein of lac repressor, *Biochemistry* 24(15), 3842–6.
- Manoj, N. & Suguna, K.** (2001), Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins, *Protein Eng* 14(10), 735–45.
- Marcos, M. J., Chehin, R., Arrondo, J. L., Zhadan, G. G., Villar, E. & Shnyrov, V. L.** (1999), pH-dependent thermal transitions of lentil lectin, *FEBS Lett* 443(2), 192–6. B-2-66.
- McCubbin, W. D. & Kay, C. M.** (1971), Molecular weight studies on concanavalin A, *Biochem Biophys Res Commun* 44(1), 101–9.
- Meehan, Jr., E. J., McDuffie, J., Einspahr, H., Bugg, C. E. & Suddath, F. L.** (1982), The crystal structure of pea lectin at 6-Å resolution, *J Biol Chem* 257(22), 13278–82.
- Mitra, N., Srinivas, V. R., Ramya, T. N., Ahmad, N., Reddy, G. B. & Surolia, A.** (2002), Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on concanavalin A and winged bean acidic agglutinin, *Biochemistry* 41(29), 9256–63.
- Mitraki, A., Miller, S. & van Raaij, M. J.** (2002), Review: conformation and folding of novel Beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple Beta-spiral and triple Beta-helix, *J Struct Biol* 137(1-2), 236–47.
- Murphy, Kenneth P.** (1995), Noncovalent Forces Important for the Conformational Stability of Protein Structures, in: Shirley (1995), (Seiten 1–34).
- Nath, U. & Udgaonkar, J. B.** (1997), How do proteins fold?, *Current Science* 72(3), 180–191. FEB 10 CURR SCI.
- Neet, K. E. & Timm, D. E.** (1994), Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation, *Protein Sci* 3(12), 2167–74.
- Nozaki, Y.** (1972), The preparation of guanidine hydrochloride, *Methods Enzymol* 26(PtC), 43–50.
- Nozaki, Y. & Tanford, C.** (1970), The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions, *J Biol Chem* 245(7), 1648–52.

- Ogino, T., Kaji, T., Kawabata, M., Satoh, K., Tomoo, K., Ishida, T., Yamazaki, H., Ishidoh, K. & Kominami, E. (1999), Function of the propeptide region in recombinant expression of active procathepsin L in *Escherichia coli*, *J Biochem (Tokyo)* 126(1), 78–83.
- Olsen, L. R., Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Sacchettini, J. C. & Brewer, C. F. (1997), X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin, *Biochemistry* 36(49), 15073–80.
- Ostendorp, R., Auerbach, G. & Jaenicke, R. (1996), Extremely thermostable L(+)-lactate dehydrogenase from *Thermotoga maritima*: cloning, characterization, and crystallization of the recombinant enzyme in its tetrameric and octameric state, *Protein Sci* 5(5), 862–73.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995), How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci* 4(11), 2411–23.
- Pace, C. Nick & Schmidt, Franz Xaver (1997), How to determine the molecular absorbance coefficient of a protein, in: Protein Structure. A practical approach, Creighton, Thomas E., Hg., (Seiten 253–260), IRL, Oxford, 2nd Auflage.
- Pace, C. Nick & Scholtz, J. Martin (1995), Measuring the conformational stability of a protein, in: Shirley (1995), (Seiten 299–321).
- Pain, Roger H. (Hg.) (2000), Mechanisms of Protein Folding, *Frontiers in Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford, New York.
- Pak, J. H., Hendrickson, T. & Dobres, M. S. (1992), Predicted sequence and structure of a vegetative lectin in *Pisum sativum*, *Plant Mol Biol* 18(5), 857–63. B3-104.
- Pankoke, Christine (1997), Faltung, Stabilität und Aktivität von prozessierten und unprozessierten Formen des Erbsenlektins, Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Pingoud, Alfred & Urbanke, Claus (1997), Arbeitsmethoden der Biochemie, Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Pletnev, V. Z., Ruzheinikov, S. N., Tsygannik, I. N., Mikhailova Yu, I., Duax, W., Ghosh, D. & Pangborn, W. (1997), The Structure of Pea Lectin-D-Glucopyranose Complex at a 1.9 Å Resolution, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 23, 469.
- Prabu, M. M., Suguna, K. & Vijayan, M. (1999), Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins, *Proteins* 35(1), 58–69. B2-76.
- Prakash, C. & Vijay, I. K. (1983), A new fluorescent tag for labeling of saccharides, *Anal Biochem* 128(1), 41–6.

- Prasthofer, T., Phillips, S. R., Suddath, F. L. & Engler, J. A.** (1989), Design, expression, and crystallization of recombinant lectin from the garden pea (*Pisum sativum*), *J Biol Chem* 264(12), 6793–6. B3-99.
- Ptitsyn, O. B.** (1991), How does protein synthesis give rise to the 3D-structure?, *FEBS Lett* 285(2), 176–81.
- Raso, Stephen W. & King, Jonathan** (2000), Protein folding and human disease, in: Pain (2000), (Seiten 406–428).
- Reddy, G. B., Bharadwaj, S. & Surolia, A.** (1999a), Thermal stability and mode of oligomerization of the tetrameric peanut agglutinin: a differential scanning calorimetry study, *Biochemistry* 38(14), 4464–70. B3-117.
- Reddy, G. B., Srinivas, V. R., Ahmad, N. & Surolia, A.** (1999b), Molten globule-like state of peanut lectin monomer retains its carbohydrate specificity. Implications in protein folding and legume lectin oligomerization, *J Biol Chem* 274(8), 4500–3. B2-70.
- Rendon, J. L. & Mendoza-Hernandez, G.** (2001), Unfolding kinetics of glutathione reductase from cyanobacterium *Spirulina maxima*, *Arch Biochem Biophys* 387(2), 265–72.
- van Rhijn, P., Fujishige, N. A., Lim, P. O. & Hirsch, A. M.** (2001), Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, *Plant Physiol* 126(1), 133–44. B4-72.
- Rini, J. M.** (1995), Lectin structure, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24, 551–77. B2.
- Rini, J. M., Hardman, K. D., Einspahr, H., Suddath, F. L. & Carver, J. P.** (1993), X-ray crystal structure of a pea lectin-trimannoside complex at 2.6 Å resolution, *J Biol Chem* 268(14), 10126–32. B2.
- Rini, J. M., Hofmann, T. & Carver, J. P.** (1987), Amino acid sequence differences in the alpha chains of pea seed isolectins: C-terminal processing, *Biochem Cell Biol* 65(4), 338–44. B3-107.
- Roy, R., Page, D., Perez, S. F. & Bencomo, V. V.** (1998), Effect of shape, size, and valency of multivalent mannosides on their binding properties to phytohemagglutinins, *Glycoconj J* 15(3), 251–63. B2-29.
- Royer, Catherine A.** (1995), Fluorescence Spectroscopy, in: Shirley (1995), (Seiten 65–89).
- Rozema, D. & Gellman, S. H.** (1996), Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B, *J Biol Chem* 271(7), 3478–87.
- Rudolph, R. & Lilie, H.** (1996), In vitro folding of inclusion body proteins, *Faseb J* 10(1), 49–56.

- Rudolph, Rainer, Böhm, Gerald, Lilie, Hauke & Jaenicke, Rainer** (1997), Folding Proteins, in: Creighton (1997), (Seiten 57–100).
- Rumbley, J., Hoang, L., Mayne, L. & Englander, S. W.** (2001), An amino acid code for protein folding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1), 105–12. B3-143.
- Schilling, K., Pietschmann, S., Fehn, M., Wenz, I. & Wiederanders, B.** (2001), Folding incompetence of cathepsin L-like cysteine proteases may be compensated by the highly conserved, domain-building N-terminal extension of the proregion, *Biol Chem* 382(5), 859–65.
- Schwarz, F. P., Misquith, S. & Surolia, A.** (1996), Effect of substituent on the thermodynamics of D-glucopyranoside binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin, *Biochem J* 316(Pt 1), 123–9. B2-68.
- Schwarz, F. P., Puri, K. & Surolia, A.** (1991), Thermodynamics of the binding of galactopyranoside derivatives to the basic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*), *J Biol Chem* 266(36), 24344–50.
- Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat, R. G. & Surolia, A.** (1993), Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin, *J Biol Chem* 268(11), 7668–77. B2-74.
- Seckler, R.** (1998), Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein, *J Struct Biol* 122(1-2), 216–22. Using Smart Source Parsing.
- Seckler, Robert** (2000), Assembly of multi-subunit structures, in: Pain (2000), (Seiten 279–308).
- Sharma, V. & Surolia, A.** (1997), Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity, *J Mol Biol* 267(2), 433–45. B3-133.
- Sharon, N. & Lis, H.** (1990), Legume lectins—a large family of homologous proteins, *Faseb J* 4(14), 3198–208. B2.
- Sharon, Nathan & Lis, Halina** (1989), Lectins, Chapman and Hall, London.
- Shirley, Bret A.** (Hg.) (1995), Protein stability and folding. Theory and Practice, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Shortle, D.** (1996), The denatured state (the other half of the folding equation) and its role in protein stability, *Faseb J* 10(1), 27–34.
- Smith, L. J., Fiebig, K. M., Schwalbe, H. & Dobson, C. M.** (1996), The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins, *Fold Des* 1(5), R95–106. Using Smart Source Parsing R95-106.
- Speed, M. A., Wang, D. I. & King, J.** (1996), Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition, *Nat Biotechnol* 14(10), 1283–7.

- Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N., Swaminathan, C. P., Mitra, N. & Surolia, A.** (2001), Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization, *Biochim Biophys Acta* 1527(3), 102–11. B4-76.
- Srinivas, V. R., Singha, N. C., Schwarz, F. P. & Surolia, A.** (1998), Differential scanning calorimetric studies of the glycoprotein, winged bean acidic lectin, isolated from the seeds of *Psophocarpus tetragonolobus*, *FEBS Lett* 425(1), 57–60.
- Stubbs, M. E., Carver, J. P. & Dunn, R. J.** (1986), Production of pea lectin in *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 261(14), 6141–4. B3-97.
- Surolia, A., Sharon, N. & Schwarz, F. P.** (1996), Thermodynamics of monosaccharide and disaccharide binding to *Erythrina corallodendron* lectin, *J Biol Chem* 271(30), 17697–703.
- Takase, K., Nitta, K. & Sugai, S.** (1974), Thermodynamics of the unfolding of alpha-lactalbumin by guanidine thiocyanate, *Biochim Biophys Acta* 371(2), 352–9.
- Trowbridge, I. S.** (1973), Mitogenic properties of lectin and its chemical derivatives, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(12), 3650–4. B3-105.
- Trowbridge, I. S.** (1974), Isolation and chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*, *J Biol Chem* 249(18), 6004–12. B3-70.
- Tsai, C. J., Polverino de Laureto, P., Fontana, A. & Nussinov, R.** (2002), Comparison of protein fragments identified by limited proteolysis and by computational cutting of proteins, *Protein Sci* 11(7), 1753–70.
- Ullmann, A., Perrin, D., Jacob, F. & Monod, J.** (1965), [Identification, by in vitro complementation and purification, of a peptide fraction of *Escherichia coli* beta-galactosidase], *J Mol Biol* 12(3), 918–23.
- Van Wauwe, J. P., Loontjens, F. G. & De Bruyne, C. K.** (1975), Carbohydrate binding specificity of the lectin from the pea (*Pisum sativum*), *Biochim Biophys Acta* 379(2), 456–61. B2-35.
- Venclovas, C., Zemla, A., Fidelis, K. & Moulton, J.** (2001), Comparison of performance in successive CASP experiments, *Proteins Suppl*(5), 163–70.
- Vijayan, M. & Chandra, N.** (1999), Lectins, *Curr Opin Struct Biol* 9(6), 707–14.
- Walter, Monika** (2002), Die parallele β -Helix der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*: Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten, Dissertation, Universität Potsdam.
- Wang, C. C. & Tsou, C. L.** (1991), The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule, *Trends Biochem Sci* 16(8), 279–81.
- Weis, W. I. & Drickamer, K.** (1996), Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, *Annu Rev Biochem* 65, 441–73. B2.

- Wenzel, M., Gers-Barlag, H., Schimpl, A. & Rudiger, H.** (1993), Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds, *Biol Chem Hoppe Seyler* 374(9), 887–94. B3-106.
- Yamamoto, K., Tsuji, T. & Osawa, T.** (1982), Requirement of the core structure of a complex-type glycopeptide for the binding to immobilized lentil- and pea-lectins, *Carbohydr Res* 110(2), 283–9. B2-123.
- Young, N. M., Watson, D. C. & Thibault, P.** (1996), Post-translational proteolytic processing and the isolectins of lentil and other *Viciae* seed lectins, *Glycoconj J* 13(4), 575–83.
- Zardeneta, G. & Horowitz, P. M.** (1994a), Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding, *Anal Biochem* 223(1), 1–6.
- Zardeneta, G. & Horowitz, P. M.** (1994b), Protein refolding at high concentrations using detergent/phospholipid mixtures, *Anal Biochem* 218(2), 392–8.
- Zurdo, J., Guijarro, J. I., Jimenez, J. L., Saibil, H. R. & Dobson, C. M.** (2001), Dependence on solution conditions of aggregation and amyloid formation by an SH3 domain, *J Mol Biol* 311(2), 325–40.