

# **Untersuchungen zur rekombinanten Expression und Faltung pflanzlicher Tyrosinasen**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Julia Hörnemann**

geb. am 7. Januar 1976 in Wesel (Niederrhein)

Mainz (2005)

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Pflanzliche Tyrosinasen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Nomenklatur und Einordnung der Tyrosinasen	1
1.1.2	Struktur der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel ( <i>ibCO</i> )	2
1.1.3	Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen	4
1.1.3.1	Schematische Darstellung des Tyrosinase-Reaktionsmechanismus	4
1.1.3.2	Melanogenese	6
1.1.4	Latenz und Aktivität pflanzlicher Polyphenoloxidasen	8
1.1.4.1	Aktivierung	8
1.1.4.2	Inhibition	9
1.1.5	Genetische Organisation pflanzlicher Polyphenoloxidasen	10
1.1.6	Lokalisation der PPO in der Pflanze	11
1.1.7	Funktion der Tyrosinasen	12
1.1.7.1	Funktion pflanzlicher Polyphenoloxidasen	12
1.1.7.2	Bedeutung der Tyrosinasen für andere Organismen	13
<b>1.2</b>	<b>Proteinfaltung</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Geräte</b>	<b>18</b>
<b>2.3</b>	<b>Mikrobiologische Arbeiten</b>	<b>22</b>
2.3.1	Verwendete Bakterienstämme	22
2.3.2	Medien	23
2.3.3	Anzucht von Bakterien	25
2.3.4	Kompetente Zellen	26
2.3.4.1	Herstellung kompetenter Zellen	26
2.3.4.2	Kompetenzkontrolle	27
2.3.5	Transformation	27
2.3.5.1	Transformation von JM101-Zellen	27
2.3.5.2	Transformation von BL21(DE3)(pLysE)- und Rosetta(DE3)-Zellen	28
2.3.6	Screening der Bakterienkolonien	28
2.3.7	Dauerkulturen	28

---

<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>29</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Klone</b>	<b>29</b>
2.4.1.1	Vektoren	31
2.4.1.2	Herstellung der Klone	34
<b>2.4.2</b>	<b>Plasmid-DNA-Präparation</b>	<b>38</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung</b>	<b>39</b>
<b>2.4.4</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR)</b>	<b>39</b>
2.4.4.1	DNA-Polymerasen	39
2.4.4.2	Primer und Oligonukleotide	40
2.4.4.3	PCR-Ansatz und PCR-Programme	42
2.4.4.4	Ortsgerichtete Mutagenese	44
<b>2.4.5</b>	<b>Restriktion</b>	<b>45</b>
<b>2.4.6</b>	<b>Dephosphorylierung von Vektoren</b>	<b>46</b>
<b>2.4.7</b>	<b>Agarosegelelektrophorese</b>	<b>47</b>
2.4.7.1	Agarose-Mini-Gele	47
2.4.7.2	Visualisierung und Densitometrische DNA-Quantifizierung	47
<b>2.4.8</b>	<b>DNA-Aufreinigung</b>	<b>48</b>
<b>2.4.9</b>	<b>Hybridisierung von Oligonukleotiden</b>	<b>49</b>
<b>2.4.10</b>	<b>Phosphorylierung von Oligonukleotiden</b>	<b>49</b>
<b>2.4.11</b>	<b>Ligation</b>	<b>49</b>
<b>2.4.12</b>	<b>Sequenzierung</b>	<b>50</b>
<b>2.5</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeiten</b>	<b>52</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Inclusion Bodies (Einschlusskörper)</b>	<b>52</b>
2.5.1.1	Protein-Überexpression	52
2.5.1.2	Präparation von Inclusion Bodies ohne His/Strep-Tag	52
2.5.1.3	Präparation von Inclusion Bodies mit His/Strep-Tag	53
2.5.1.4	Solubilisierung von Inclusion Bodies	54
<b>2.5.2</b>	<b>Absorptionsspektroskopie / Konzentrationsbestimmung</b>	<b>55</b>
2.5.2.1	Photometrische Proteinbestimmung bei 280 nm	55
2.5.2.2	Bradford-Assay	56
2.5.2.3	BCA-Assay	57
2.5.2.4	Chlorophyllbestimmung	58
2.5.2.5	Aufnahme von Absorptionsspektren	58
<b>2.5.3</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</b>	<b>58</b>
2.5.3.1	Herstellung von Polyacrylamidgelen	59
2.5.3.2	Denaturierende SDS-PAGE	59
2.5.3.3	Schwach denaturierende PAGE	60
2.5.3.4	Färbung von Polyacrylamidgelen	61
2.5.3.5	Digitalisierung und Molekulargewichtsbestimmung	62
<b>2.5.4</b>	<b>Western Blot</b>	<b>62</b>
2.5.4.1	Elektrotransfer (Blotting)	63
2.5.4.2	Ponceau S-Färbung	63
2.5.4.3	Blockierung der Membran	64
2.5.4.4	Proteinmarkierung mit Antikörpern	64

2.5.4.5	Nachweisreaktion mit BCIP und NBT	65
<b>2.5.5</b>	<b>Affinitätschromatographie</b>	<b>66</b>
2.5.5.1	Strep-Tag/Strep-Tactin <sup>®</sup> -System	66
2.5.5.2	His-Tag/Ni <sup>2+</sup> -NTA-Sepharose	69
<b>2.5.6</b>	<b>Versuche zur Faltung von Proteinen in Lösung</b>	<b>71</b>
2.5.6.1	Verdünnungen	71
2.5.6.2	Dialysen	72
<b>2.5.7</b>	<b>Aufreinigung nativer Tyrosinasen aus Blattgeweben</b>	<b>73</b>
2.5.7.1	Pflanzenmaterial	74
2.5.7.2	Thylakoidpräparation	75
2.5.7.3	Solubilisierung der Thylakoidmembranen	76
2.5.7.4	Ammoniumsulfatfällung	77
2.5.7.5	Gelfiltration (Sephadex G-25)	78
2.5.7.6	Anionenaustausch-Chromatographie	79
<b>2.5.8</b>	<b>Aufreinigung nativer Tyrosinasen aus Früchten und Knollen</b>	<b>81</b>
2.5.8.1	Vorkondensation von Triton X-114	81
2.5.8.2	Enzym-Aufreinigung aus Äpfeln	81
2.5.8.3	Enzym-Aufreinigung aus Kartoffeln	82
<b>2.5.9</b>	<b>Enzymaktivitätstests</b>	<b>83</b>
2.5.9.1	MBTH-Enzymassay	83
2.5.9.2	Kinetiken	84
2.5.9.3	Tropfen-Test	85
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>86</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>Herstellung der Klone</b>	<b>86</b>
<b>3.2</b>	<b>Enzymassays</b>	<b>88</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Tropfen-Test</b>	<b>88</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Kinetiken</b>	<b>89</b>
3.2.2.1	Optimierung des MBTH-Enzymassays	89
3.2.2.2	Einfluss verschiedener Substanzen auf den MBTH-Enzymassay	90
<b>3.3</b>	<b>Rekombinante Tyrosinase (PPO A) aus Tomate</b>	<b>93</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Faltungsversuche mit dem nicht modifizierten Protein</b>	<b>93</b>
3.3.1.1	Präparation und Solubilisierung von Inclusion Bodies der PPO A	94
3.3.1.2	Faltungsversuche über Verdünnung und Dialyse	95
<b>3.3.2</b>	<b>PPO A aus Tomate inklusive Strep-Tag</b>	<b>96</b>
3.3.2.1	Insertion des Strep-Tags in die PPO A-Sequenz	97
3.3.2.2	Bindung des Strep-Tag-Proteins an Strep-Tactin <sup>®</sup> -Sepharose	97
3.3.2.3	Einfluss der Anzuchttemperatur auf die Bildung von löslichem Protein	100
3.3.2.4	Einfluss von Denaturierungsmittel auf die Bindung an Strep-Tactin <sup>®</sup>	102
3.3.2.5	Aktivierungsversuche mit dem löslichen Protein	102

<b>3.3.3</b>	<b>PPO A aus Tomate mit His-Tag</b>	<b>105</b>
3.3.3.1	Insertion des His-Tags in die NsiI-Schnittstelle	105
3.3.3.2	Charakterisierung des Klons pDS12-ppoA-His	106
<b>3.4</b>	<b>Rekombinante Tyrosinase (PPO A) aus Spinat</b>	<b>109</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Charakterisierung des PhxA-Gens aus Spinat</b>	<b>109</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Expressionsversuche in JM101-<i>E.coli</i>-Zellen</b>	<b>110</b>
3.4.2.1	Überführung des PhxA-Gens in einen Expressionsvektor (pDS12)	110
3.4.2.2	Insertion eines His-Tags und Austausch einer Aminosäure	112
3.4.2.3	Insertion eines Peptids aus der PPO A (Tomate) in das Spinat-Protein	114
3.4.2.4	Versuche zur Verbesserung der Überexpression	115
3.4.2.5	Versuch zur Bindung von Inclusion Bodies auf Ni <sup>2+</sup> -Säulen	120
<b>3.4.3</b>	<b>Expression in alternativen <i>E.coli</i>-Zellen</b>	<b>122</b>
3.4.3.1	Überführung des PhxA-Gens in den pT7-7-Vektor	122
3.4.3.2	Optimierung der Überexpression	123
3.4.3.3	Molekulargewicht und Löslichkeit des überexprimierten Proteins	125
<b>3.4.4</b>	<b>Versuche zur Faltung des PPO A-His-Proteins aus Spinat</b>	<b>126</b>
3.4.4.1	Art der Kupfer-Zugabe und Stabilität des Glutathion-Cu(I)-Komplexes	127
3.4.4.2	Dialysen zur Proteinfaltung	128
3.4.4.3	Versuche zur Proteinfaltung über Verdünnung	130
3.4.4.4	Versuche zur Proteinfaltung auf Ni <sup>2+</sup> -NTA-Sepharosesäulen	132
<b>3.4.5</b>	<b>Fazit zur Expression und Faltung der PPO A aus Spinat</b>	<b>135</b>
<b>3.5</b>	<b>Native Tyrosinasen</b>	<b>136</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Native Tyrosinasen aus verschiedenen Pflanzen</b>	<b>136</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Native Tyrosinase aus Spinat</b>	<b>137</b>
3.5.2.1	Charakterisierung der Proben aus den ersten Aufreinigungsschritten	137
3.5.2.2	Weiterführende Aufreinigung	140
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>141</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression rekombinanter Tyrosinasen in <i>E.coli</i></b>	<b>141</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Vergleich der Expression der PPO A aus Tomate und Spinat</b>	<b>141</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Optimierung der Expressionsbedingungen</b>	<b>143</b>
4.1.2.1	Auswahl geeigneter Bakterienzellen	144
4.1.2.2	Einfluss von Medium und Glucosekonzentration auf die Expression	144
4.1.2.3	Beeinflussung der Überexpression durch die Temperatur	144
4.1.2.4	Einfluss der Induktorkonzentration	145
4.1.2.5	Induktionskinetik	145
4.1.2.6	Fazit aus den Optimierungsversuchen zur Proteinexpression	146
<b>4.1.3</b>	<b>Bedeutung von Cofaktoren für die heterologe Expression</b>	<b>146</b>
4.1.3.1	Expression bakterieller Tyrosinasen	147

4.1.3.2	Expression der Tyrosinasen bei Säugern	147
4.1.3.3	Expression pflanzlicher Tyrosinasen	148
4.1.3.4	Chaperone und Fusionsproteine	148
4.1.3.5	Überexpression des PPO A-Proteins aus Spinat	149
4.1.3.6	Einfluss von Kupfer auf die rekombinante Expression der Tyrosinase	150
<b>4.2</b>	<b>Rückfaltung rekombinant exprimierter Tyrosinasen</b>	<b>151</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Solubilisierung von Inclusion Bodies</b>	<b>151</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Verschiedene Rückfaltungsansätze</b>	<b>152</b>
4.2.2.1	Verdünnung	152
4.2.2.2	Pufferaustausch	154
4.2.2.3	Adsorption an eine Matrix	155
<b>4.2.3</b>	<b>Die Rolle niedermolekularer Additiva bei der Rückfaltung</b>	<b>158</b>
4.2.3.1	Aggregation <i>versus</i> Proteinfaltung	160
4.2.3.2	Einfluss des Redoxpotentials auf die Ausbildung von Disulfidbrücken	161
<b>4.2.4</b>	<b>Einbau des Cofaktors (Kupfer)</b>	<b>162</b>
4.2.4.1	Kupferproteine <i>in vivo</i>	162
4.2.4.2	Einbau von Kupfer in Proteine <i>in vitro</i>	163
4.2.4.3	Bedeutung der Oxidationsstufe des Kupfers für den Einbau in Proteine	164
4.2.4.4	Einfluss der Thioetherbrücke am AZ auf die Koordination des Kupfers	165
<b>4.2.5</b>	<b>Indikatoren für den Erfolg der Faltung</b>	<b>166</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Fazit aus den Rückfaltungsexperimenten der Spinat-PPO A</b>	<b>167</b>
<b>4.3</b>	<b>Aufreinigung nativer Tyrosinasen</b>	<b>168</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Lokalisation der Tyrosinasen in der Pflanze</b>	<b>168</b>
4.3.1.1	Transport der Tyrosinasen in die Plastiden	168
4.3.1.2	Luminale Lokalisation oder Assoziation an die Thylakoidmembran	169
<b>4.3.2</b>	<b>Heterogenität der Polyphenoloxidasen in der Pflanze</b>	<b>171</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Latenz und Aktivierung der Polyphenoloxidasen</b>	<b>172</b>
4.3.3.1	Proteolytische Aktivierung	173
4.3.3.2	SDS und andere Aktivatoren	174
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>176</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>177</b>
<hr/>		
<b>Anhang</b>		
<hr/>		
	<b>Abkürzungen</b>	<b>203</b>
	<b>Chemikalien</b>	<b>207</b>
	<b>Hydrophathiewerte nach Kyte und Doolittle (1982)</b>	<b>211</b>
	<b>Sequenzierungen</b>	<b>212</b>
	<b>Sequenzen</b>	<b>227</b>

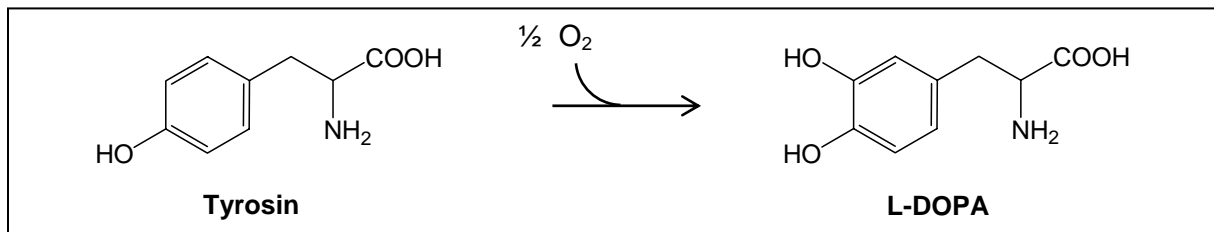
# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Tyrosinasen

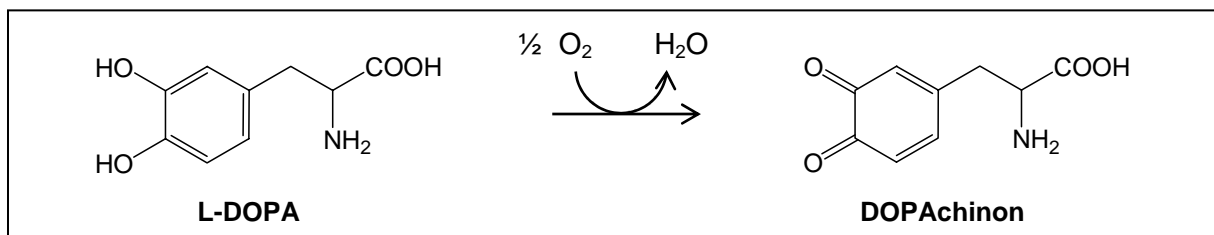
Quer durch alle Organismenreiche, von Bakterien bis hin zum Menschen, katalysieren Tyrosinasen die Synthese der Melanine, jener gelb bis schwarzen Pigmente, die sowohl aus der menschlichen Haut, als auch aus der Bräunung z.B. eines angeschnittenen Apfels bekannt sind. Diese Enzyme erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben, die von der Pigmentierung bis hin zu einer Beteiligung an der Immunantwort reichen.

### 1.1.1 Nomenklatur und Einordnung der Tyrosinasen

Unter den Metalloproteinen gehören Tyrosinasen zu den Typ-3-Kupferproteinen, die sich durch zwei Kupfer-Ionen im Aktiven Zentrum (AZ) auszeichnen und zu denen auch die Catecholoxidasen (CO) und Hämocyanine (HC), die respiratorischen Proteine der Arthropoden und Mollusken, zählen. Während letzteren in erster Linie eine Funktion im Sauerstofftransport zukommt, besitzen Tyrosinasen zwei enzymatische Aktivitäten, die die entscheidenden Schritte innerhalb der Melanogenese, der Bildung des Melanins, darstellen. Zum einen katalysieren sie die *ortho*-(*o*)-Hydroxylierung monophenolischer Substrate, wie des Tyrosins, dem sie ihre Benennung verdanken, zum entsprechenden *o*-Diphenol, das im Falle des Tyrosins L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) ist:



Sie werden als Monooxygenasen (EC 1.14.18.1) klassifiziert, finden sich jedoch oft auch, bezogen auf das Substrat, als Cresolasen oder verallgemeinernd als Monophenolasen oder Monphenolhydroxylasen bezeichnet. Zum anderen sind Tyrosinasen in der Lage, *o*-Diphenole zu *o*-Chinonen zu oxidieren und entsprechen demnach Diphenoloxidasen oder Diphenolasen (EC 1.10.3.1). So entsteht aus DOPA das DOPAchinin (4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon):



Bei der Hydroxylierung wird Sauerstoff aus molekularem O<sub>2</sub> verbraucht (Mason *et al.*, 1955) und das verbleibende Sauerstoffatom mit Hilfe von zwei Elektronen, die von den umgesetzten Substraten geliefert werden, zu Wasser reduziert. Diphenoloxidasen sind auch

als Catecholoxidasen zu benennen. Diesen Enzymen fehlt demnach im Unterschied zu den Tyrosinasen die Möglichkeit zum Umsatz von Monophenolen.

In der Literatur finden sich, je nach Organismus und Vorliebe der Autoren, wenig eindeutige und einheitliche Angaben zur Bezeichnung dieser Proteine. Phenolasen treten vornehmlich in frühen Veröffentlichungen auf, als Phenoloxidasen (PO) werden die Enzyme aus Invertebraten bezeichnet, während Polyphenoloxidasen (PPO) bei Pflanzen gebräuchlich sind, allerdings auch als eine Art Oberbegriff angesehen werden können (Rescigno *et al.*, 2002). Die Unterscheidung zwischen CO und Tyrosinasen ist mitunter schwierig und abhängig sowohl von der Aufreinigungsmethode, als auch den für den jeweiligen Aktivitätsassay verwendeten Substraten, da im Verlauf der Isolation Teilaktivitäten verloren gehen oder Substratspezifitäten vorliegen können. Gerade diese Differenzierung zwischen Tyrosinasen und Catecholoxidasen, zusammen mit der Ursache für die fehlende Monophenolhydroxylase-Aktivität der letzteren, steht derzeit im Mittelpunkt des Interesses vieler aktueller Studien (Decker *et al.*, 2000; Decker und Tuczec, 2000; Gerdemann *et al.*, 2002b; Tepper *et al.*, 2005), da im Gegensatz zur CO bislang keine Röntgenkristallstruktur einer Tyrosinase aufgeklärt werden konnte.

### 1.1.2 Struktur der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel (*ibCO*)

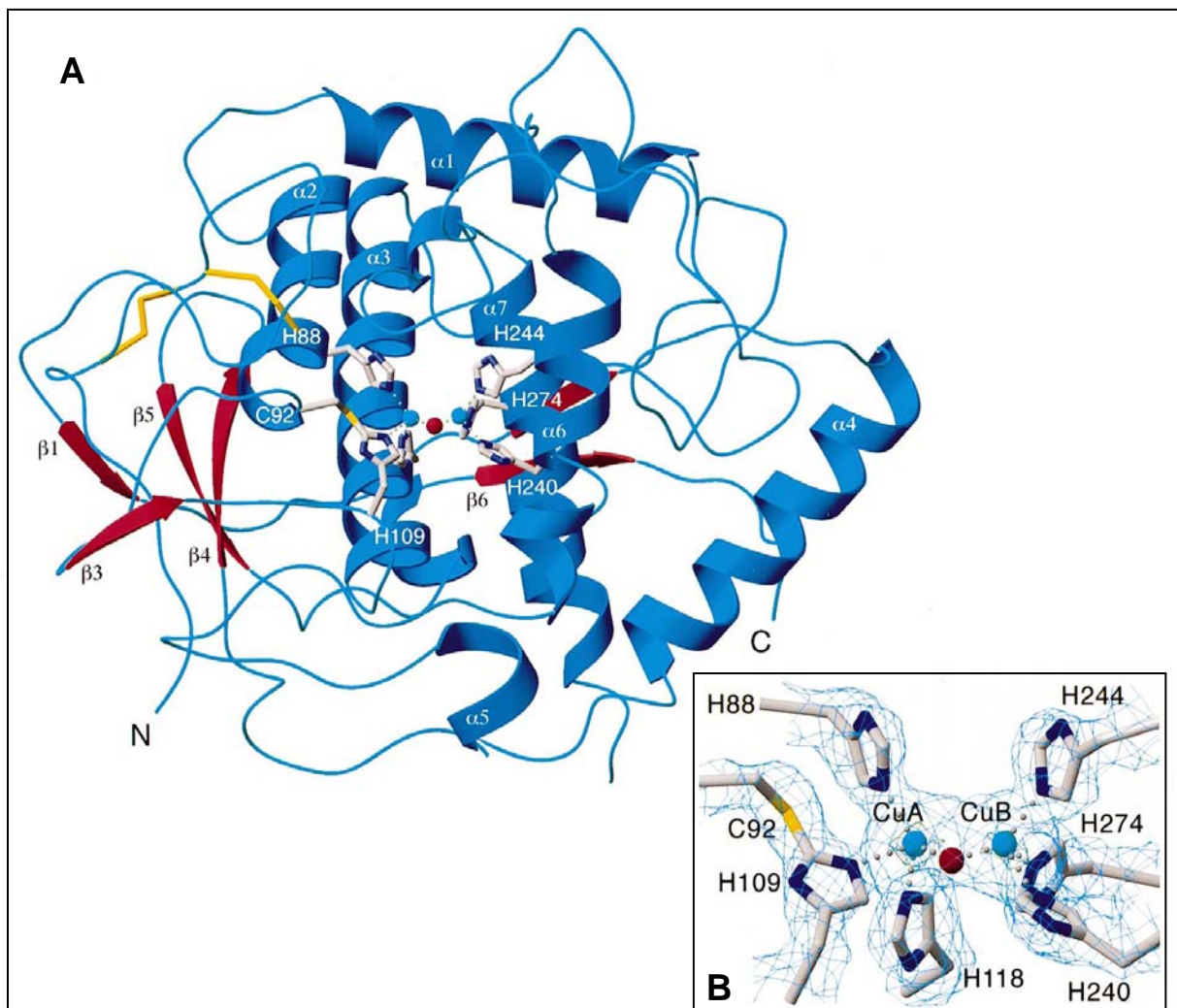
Die Kristallstruktur der nativen Catecholoxidase (*ibCO*) aus der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas*, wurde von Klambunde *et al.* (1998) aufgelöst (Abb. 1.1 A). Bei dem kristallisierten Protein handelt es sich um ein ellipsoides Monomer mit Abmessungen von 55 x 45 x 45 Å und einem Molekulargewicht von 39 kDa. Das Aktive Zentrum wird von einem 4  $\alpha$ -Helix-Motiv gebildet, in dem die beiden Kupfer-Atome jeweils von drei Histidin-Resten koordiniert werden, CuA von H88, H109 sowie H118 und CuB von H240, H244 und H274. Auch die übrige Sekundärstruktur erweist sich hauptsächlich als  $\alpha$ -helical und enthält nur wenige kurze  $\beta$ -Stränge, die vornehmlich in der Amino-(N)-terminalen Domäne der *ibCO* lokalisiert sind, welche über zwei Disulfidbrücken (C11-C28 und C27-C89) an das restliche Protein gebunden vorliegt.

Ein ungewöhnliches Strukturmerkmal stellt die Thioetherbrücke zwischen einem Cystein (C92) und einem an der Ausbildung des AZ beteiligten Histidin (H109) dar (Abb. 1.1 B). Eine analoge Cys-His-Bindung konnte anhand der Röntgenstruktur in der Untereinheit *g* des HC von *Octopus dolfeini* (*odgHC*, Cuff *et al.*, 1998) nachgewiesen werden. Neben der Kristallstruktur dieses Mollusken-HC wurden als einzige andere Typ-3-Kupferproteine die Hämocyanine aus *Panulirus interruptus* (Gaykema *et al.*, 1984; Volbeda und Hol, 1989), *Limulus polyphemus* (Hazes *et al.*, 1993; Magnus *et al.*, 1994) und *Rapana thomasiana* (Perbandt *et al.*, 2003) strukturell aufgeklärt. Die Arthropoden-Hämocyanine weisen keine vergleichbare Thioetherbrücke auf. Ihre Funktion ist nicht bekannt (Gerdemann *et al.* 2002a).

Abhängig vom Oxidationszustand der beiden zentralen Kupfer-Ionen, kann das Reaktionszentrum in vier verschiedenen Zuständen vorliegen, die sich durch den Abstand von CuA zu CuB, deren Koordinations-Geometrie und die gebundenen Liganden unterscheiden (Tepper *et al.*, 2005). Der *met*-Zustand (Abb. 1.1 B), in dem die beiden Kupfer-Ionen oxidiert vorliegen und vermutlich über ein Hydroxid-Ion verbunden sind



[Cu(II)-OH<sup>-</sup>-Cu(II)], ist abhängig vom Organismus dominant (85 - 95 %), sofern das Enzym in Abwesenheit eines Substrates vorliegt (Jolley *et al.*, 1974). *half-met*-Derivate [Cu(I) OH<sup>-</sup>-Cu(II)] kommen unter physiologischen Bedingungen nicht vor, lassen sich jedoch *in vitro* aus dem *deoxy*-Zustand herstellen (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Tepper, 2005). Dieses reduzierte AZ (*red* oder *deoxy*) [Cu(I) Cu(I)] ist in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden und damit die oxygenierte Form (*oxy*) [Cu(II)-O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Cu(II)] auszubilden. Der Sauerstoff wird hier als Peroxid, in  $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -Koordination, *side-on* verbrückend, gebunden (siehe *oxy*-Zentrum in Abb. 1.2; Kitajima *et al.*, 1989; Kitajima und Moro-oka, 1994; Solomon *et al.*, 1996) und ist damit verantwortlich für die charakteristische Absorption der Typ-3-Kupferproteine um 350 nm und 570 nm (Baldwin *et al.*, 1992).



**Abb. 1.1** Röntgenkristallstruktur der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas* (*ibCO*), entnommen aus Klambunde *et al.* (1998).

**A: Gesamtansicht der *ibCO*.**  $\alpha$ -Helices sind blau,  $\beta$ -Stränge rot und die Disulfidbrücken (C11-C28 und C27-C89) sowie die Thioetherbrücke zwischen C92 und H109 gelb dargestellt. Im Aktiven Zentrum sind die sechs Histidin-Reste zusammen mit den beiden Kupfer-Ionen (blaue Kugeln) und dem gebundenen Molekül, vermutlich einem Hydroxid-Ion (rote Kugel), gezeigt.

**B: Aktives Zentrum der *ibCO* mit den Kupfer-Ionen im oxidierten Zustand (*met*).**

Ausschnittsvergrößerung aus der Elektronendichtekarte zu **A**, Farben wie dort. Beide Kupfer-Ionen, CuA und CuB, sind durch jeweils drei Histidinreste, H88, H109 und H118 sowie H240, H244 und H274 trigonal-pyramidal koordiniert. Das Cystein C92 nimmt an dieser Ligation nicht teil, sondern steht über eine Thioetherbrücke mit dem H109 in Verbindung.

Ausschließlich im *met*- und *oxy*-Status kann das AZ neue Substrate aufnehmen (Makino und Mason, 1973; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Dass dies nur bei Catecholoxidasen und Tyrosinasen möglich ist, konnte anhand eines ebenfalls kristallisierten Inhibitor-Komplexes der *ibCO* mit Phenylthioharnstoff (PTU) gezeigt werden (Klabunde *et al.*, 1998). Das Schwefelatom des PTU ersetzt das an die *met*-Form gebundene OH<sup>-</sup>-Ion. Die mit der Bindung einhergehenden strukturellen Veränderungen lassen darauf schließen, dass der Zugang zum Kupfer-Zentrum in erster Linie von einem Phenylalanin-Rest (F261) kontrolliert wird. Die Seitenkette des F261 rotiert und gibt so den Weg zum AZ frei. Der aromatische Ring des gebundenen Inhibitors lässt sich mit F49 aus der Struktur des *lpHC* (Hazes *et al.*, 1993; Magnus *et al.*, 1994) bzw. F75 des *piHC* (Gaykema *et al.*, 1984; Volbeda und Hol, 1989) überlagern. Diese Reste sind damit bei den Hämocyaninen offenbar für die Abschirmung des Reaktionszentrums gegenüber phenolischen Substraten verantwortlich (Klabunde *et al.*, 1998).

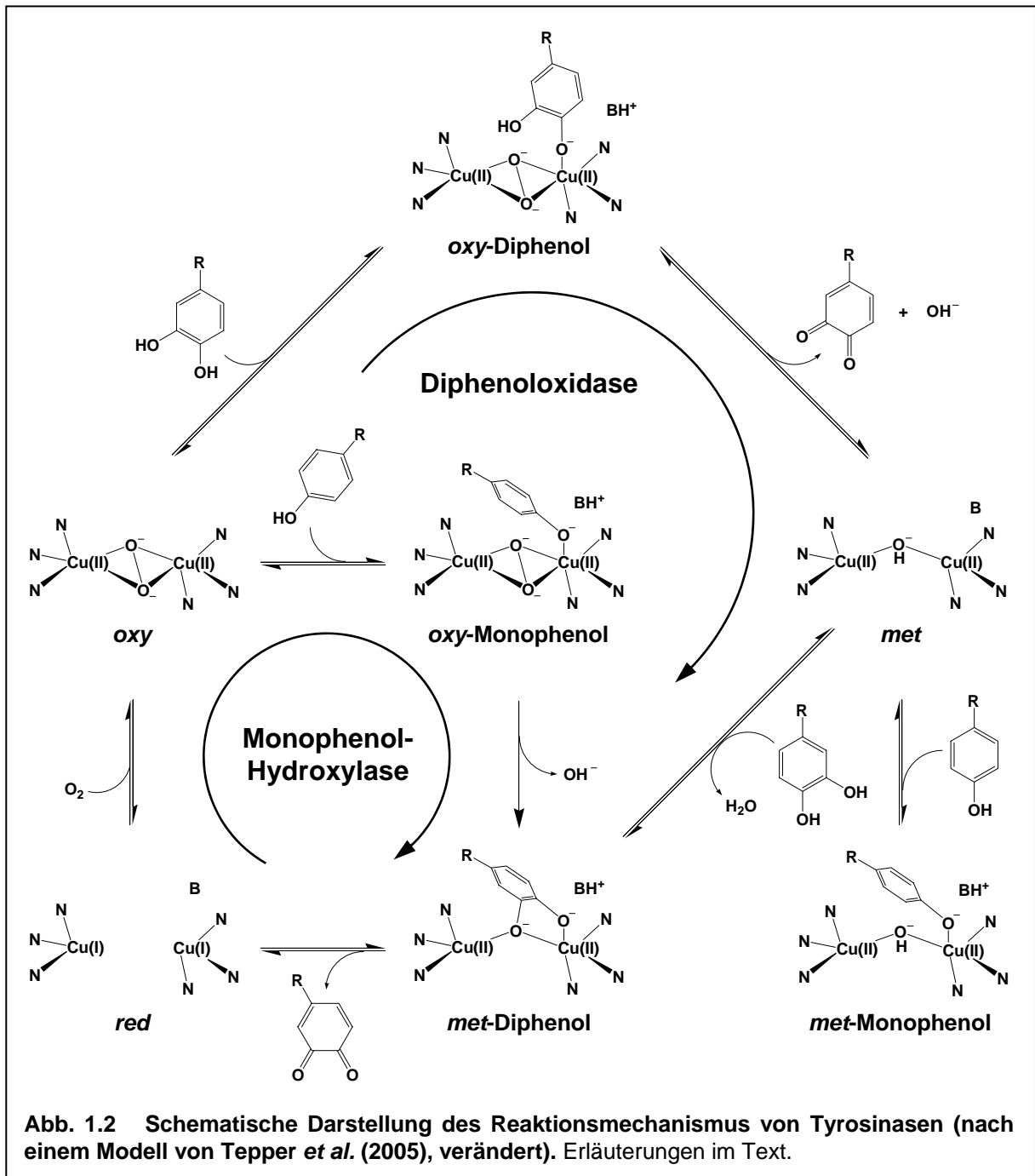
### 1.1.3 Reaktionsmechanismus der Tyrosinasen

Trotz der zahlreichen enzymatischen, spektroskopischen und strukturellen Studien, die zur Untersuchung von Tyrosinasen durchgeführt wurden, ist der Reaktionsmechanismus dieser Enzyme immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Aufbauend auf einigen vorangegangenen Modellen, die zum katalytischen Mechanismus der Tyrosinasen entwickelt worden sind (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Solomon *et al.*, 1996; Olivares *et al.*, 2002), wurde kürzlich von Tepper *et al.* (2005) ein neues Modell vorgeschlagen, das in Abb. 1.2 schematisch dargestellt ist. Es beinhaltet, gemäß dem bereits zuvor erlangten Konsens, sowohl einen Zyklus für die Diphenoloxidase-Aktivität, als auch einen darin integrierten Zyklus für die Monophenol-Hydroxylase-Aktivität. Die Modifikation des Schemas besteht in erster Linie in der Art der Interaktion monophenolischer Substrate mit dem Kupferzentrum.

#### 1.1.3.1 Schematische Darstellung des Tyrosinase-Reaktionsmechanismus

Die Monophenol-Hydroxylase-Reaktion beginnt mit der Bindung von molekularem Sauerstoff an das reduzierte Reaktionszentrum (*red*), das dadurch oxygeniert wird (*oxy*) und ein Monophenol an der CuB-Stelle binden kann (*oxy*-Monophenol). Der aromatische Ring des Substrates wird bei dieser Bindung so zu dem, zwischen den beiden Kupfer-Ionen gebundenen, Peroxid ausgerichtet, dass, nach Abgabe eines Protons an eine Base (B), ein Sauerstoff auf das Substrat übertragen werden kann. Die Existenz des intermediär entstehenden *met*-Diphenol-Komplexes, in dem die beiden Kupfer-Ionen über den *o*-Sauerstoff des Phenols verbunden werden, ist mehrfach belegt worden (van Gastel *et al.*, 2000; Tepper *et al.*, 2002; Bubacco *et al.*, 2003) und steht im Gegensatz zu der von Wilcox *et al.* (1985), Sánchez-Ferrer *et al.* (1995) und Solomon *et al.* (1996) beschriebenen Interaktion des *o*-Sauerstoffs mit CuA und der Verbrückung der beiden Kupfer-Ionen über ein, für die *met*-Form typisches, Hydroxid-Ion. Das entstandene Diphenol kann daraufhin entweder vom Komplex dissoziieren oder zuvor zum Chinon oxidiert werden, sodass das AZ anschließend wieder im reduzierten Zustand vorliegt (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Decker und Tuczec (2000) postulierten eine Interaktion des Monophenols mit der CuA-Site, deren Koordination anhand von synthetischen Kupfer-Komplexen bestätigt werden konnte (Battaini *et al.*, 2003). Das Modell von Tepper *et al.* (2005) ist damit insofern vereinbar, als die grundsätzliche Forderung der unmittelbaren Umsetzung auch monophenolischer Substrate zu Chinonen, über ein oxy-Monophenol-Intermediat, wie es in Abb. 1.2 dargestellt ist, identisch ist. Dabei entfällt die Unterteilung der Tyrosinase-Reaktion in zwei aufeinander folgende Schritte aus Monophenolhydroxylierung und anschließender Oxidation des entstandenen Diphenols.



Innerhalb des Diphenolasezyklus bindet ein *o*-Diphenol ebenfalls an das zuvor oxygenierte AZ (oxy-Diphenol), das nach Oxidation des Phenols und Freisetzung des gebildeten Chinons

sowie eines Hydroxid-Ions in der *met*-Form zurückbleibt. In diesem Zustand kann erneut ein diphenolisches Substratmolekül gebunden werden (*met*-Diphenol), das unter Abgabe von Wasser zum Chinon oxidiert wird, wobei sich der Kreis mit der Reduktion des Kupfer-Zentrums (*red*) schließt. In der Summe werden hierbei aus zwei *o*-Diphenolen zwei *o*-Chinone gebildet, wobei ein Molekül O<sub>2</sub> mit Hilfe von 4 Elektronen zu 2 H<sub>2</sub>O reduziert wird (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Die zu diesem Modell analoge Orientierung eines monophenolischen Substrates im oxy-Monophenol-Komplex wird im AZ der *ibCO* durch das Phenylalanin F261 verhindert, das das Reaktionszentrum versperrt (Klabunde *et al.*, 1998). Auf diese Weise ist die fehlende Monophenolhydroxylase-Aktivität der Catecholoxidasen zu erklären (Tepper *et al.*, 2005).

Bindet anstelle des Diphenols ein monophenolisches Substrat an das *met*-Zentrum, kommt es zur Ausbildung eines "dead end"-Komplexes (*met*-Monophenol), da der *met*-Zustand nicht in der Lage ist, Monophenole umzusetzen (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995). Dies erklärt die so genannte Lag-Phase, die bei kinetischen Messungen der Monophenolaseaktivität im Gegensatz zur Diphenolaseaktivität auffällt (Rodríguez-López *et al.*, 1992a; Cooksey *et al.*, 1997). Der *steady state*-Umsatz von Monophenolen stellt sich erst mit einer Verzögerung von meist mehreren Minuten ein, da im Ruhezustand ein Großteil des Enzyms in der *met*-Form vorliegt (Jolley *et al.*, 1974) und nur wenigen Monophenolmolekülen oxy-Zentren zur Verfügung stehen. Die hier gebildeten Diphenole müssen anschließend zunächst die *met*-Zentren regenerieren, weshalb die Reaktion nur schleppend anläuft. Die Dauer der Lag-Phase ist abhängig von der Enzym- und Monophenolkonzentration (García-Cánovas *et al.*, 1981) und wird verkürzt oder vollständig aufgehoben durch den Einsatz katalytischer Mengen an Diphenol oder Metall-Ionen, wie Fe<sup>2+</sup>, die *met*-Zentren in ausreichender Menge reduzieren, damit monophenolische Substrate unmittelbar umgesetzt werden können (Pomerantz und Warner, 1967; Palumbo *et al.*, 1985; Ros *et al.*, 1993a).

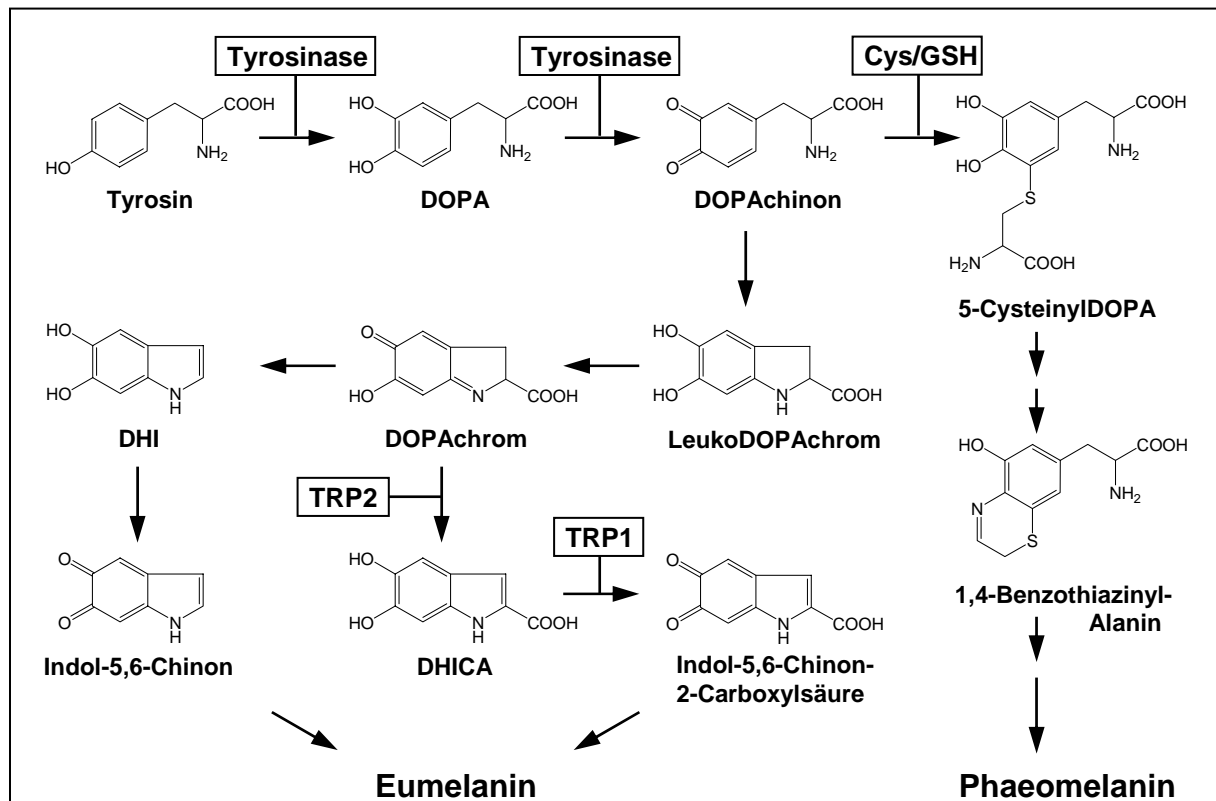
### 1.1.3.2 Melanogenese

Die Tyrosinase-Reaktion stellt den limitierenden Schritt der Melanogenese dar. Auf die enzymatische Bildung von DOPAchinon aus DOPA bzw. Tyrosin (1.1.1) folgen bis zur Entstehung des Melanins eine Reihe weiterer chemischer und enzymatisch katalysierter Reaktionen, die zuerst von Raper (1928) und Mason (1965) beschrieben wurden und in Abb. 1.3 in Anlehnung an Jiménez-Cervantes *et al.* (1994), Kobayashi *et al.* (1995) und Sánchez-Ferrer *et al.* (1995) schematisch zusammengefasst sind.

Der Syntheseweg des Melanins lässt sich in eine proximale und eine distale Phase unterteilen. In der proximalen Phase kann das von der Tyrosinase gebildete DOPAchinon spontan zum relativ instabilen LeukoDOPAchrom zyklisieren, das sehr schnell zu DOPAchrom, dem Endprodukt der proximalen Phase, oxidiert wird (Graham und Jeffs, 1977). Dieser Reaktionsweg wird durch ein alkalisches bis neutrales Milieu begünstigt. Ein niedriger pH-Wert fördert die Protonierung der Aminogruppe des DOPAchinons und erschwert den notwendigen Ringschluss sowie die zur Entstehung des DOPAchroms erforderliche Deprotonierung der Hydroxylgruppen (García-Cánovas *et al.*, 1982). In saurerer

Umgebung verläuft die Bildung von DOPAchrom daher auf einem Umweg über 2,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA) (Graham und Jeffs, 1977; Rodríguez-López *et al.*, 1992b).

Die distale Phase zeichnet sich durch eine langsame Decarboxylierung von DOPAchrom zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) und dessen anschließende, wiederum durch die Tyrosinase vermittelte, Oxidation zu Indol-5,6-Chinon aus. Alternativ kann DOPAchrom von einer DOPAchrom-Tautomerase, die aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit mit der Sequenz und Tertiärstruktur der Tyrosinase auch *Tyrosinase related protein 2* (TRP2) genannt wird, in DHI-2-Carboxylsäure (DHICA) umwandelt werden (Aroca *et al.*, 1990; Pawelek, 1991; Jackson *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1992). Dieses wird von TRP1, einer DHICA-Oxidase, zu Indol-5,6-Chinon-2-Carboxylsäure oxidiert (Jiménez-Cervantes *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994). Aus den Produkten all dieser Reaktionen entstehen durch Polymerisierung die braun bis schwarz gefärbten Eumelanine. Die daran beteiligten Enzyme, TRP1, TRP2 und die Tyrosinase, gehören zu einer gemeinsamen Genfamilie, die durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen ist (Sturm *et al.*, 2001).



**Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Melanin-Synthese am Beispiel von Tyrosin als Substrat (nach Kobayashi *et al.* (1995), verändert).**

**Cys:** Cystein. **DHI:** 5,6-Dihydroxyindol. **DHICA:** DHI-2-Carboxylsäure. **DOPA:** L-3,4-Dihydroxy-Phenylalanin. **DOPAchinon:** 4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon. **DOPAchrom:** 2-Carboxy-2,3-Dihydroxyindolen-5,6-Chinon. **GSH:** Glutathion. **LeukoDOPAchrom:** 2,3-Dihydro-5,6-Dihydroxyindolen-2-Carboxylat. **TRP1:** *Tyrosinase related protein 1*, DHICA-Oxidase. **TRP2:** *Tyrosinase related protein 2*, DOPAchrom-Tautomerase. Erläuterungen im Text.

Kommt es zu einem Einbau von Cystein oder Glutathion, so wird aus DOPAchinon bevorzugt 5-CysteinyldOPA gebildet (Jara *et al.*, 1988), das ebenfalls zyklisiert und über 1,4-Benzothiazinyl-Alanin zu den gelb bis rot-braunen Phaeomelaninen weiterreagiert (Ozeki *et al.*, 1997). Bezüglich der Entstehung der zahllosen Abstufungen an Haut- und Haarfarben existieren unterschiedliche Annahmen. Einerseits könnten gemischte Melanine aus Wechselwirkungen von Phaeo- und Eumelanin-Komponenten hervorgehen (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Ito, 2003), andererseits begründete Prota (2000) diese Diversität mit einer graduell unterschiedlichen strukturellen Integrität jeweils nur eines Melanintyps. Manchmal wird in Abhängigkeit vom Ausgangssubstrat eine weitere Pigment-Gruppe unterschieden. Während sich die bisher beschriebenen Pigmente vom Tyrosin ableiten, werden jene Polymere, die auf andere Substrate zurückgehen, in diesem Fall Allomelanine genannt (Rescigno *et al.*, 2002).

### 1.1.4 Latenz und Aktivität pflanzlicher Polyphenoloxidasen

Viele pflanzliche und pilzliche Polyphenoloxidasen liegen *in vivo* in einem stabilen, latenten Zustand vor, der vor dem Umsatz von Phenolen zunächst aktiviert werden muss (van Gelder *et al.*, 1997). Obwohl diese Enzyme mehrfach in latenter Form isoliert werden konnten (Moore und Flurkey, 1990; Robinson und Dry, 1992; Escribano *et al.*, 1997; Laveda *et al.*, 2000, 2001; Chazarra *et al.*, 2001a; Escribano *et al.*, 2002), wurde die Latenz in anderen Fällen bereits im Verlauf der Aufreinigung aufgehoben (Lieberei und Biehl, 1976).

#### 1.1.4.1 Aktivierung

Die Methoden zur Aktivierung der PPO *in vitro* sind äußerst vielfältig. Als Aktivatoren wurden z.B. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat; Moore und Flurkey, 1990; Robinson und Dry, 1992; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993a; Escribano *et al.*, 1997; Laveda *et al.*, 2000; Chazarra *et al.*, 2001b) und andere Detergenzien (Satô und Hasegawa, 1976), Säure (Lerner *et al.*, 1972; Fujita *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 2000) sowie Lipide und Fettsäuren (Golbeck und Cammarata, 1981; Mayer, 1987) identifiziert.

Der tatsächliche, *in vivo* existierende Regulationsmechanismus ist bislang unbekannt. Neben einer physiologisch zu berücksichtigenden Aktivierung mit Hilfe von Fettsäuren und Lipiden, gibt es einige Indizien, die auf eine proteolytische Aktivierung der PPO hindeuten, die *in vitro* mehrfach gezeigt wurde (Tolbert, 1973; Mayer und Harel, 1979; Espín *et al.*, 1999; Espín und Wichers, 1999; Laveda *et al.*, 2001). Etliche dieser pflanzlichen Enzyme werden als 60 - 70 kDa schwere Precursor synthetisiert, die zu 55 - 65 kDa prozessiert werden. Die maturen Proteine können proteolytisch gespalten werden, wonach sie Molekulargewichte von 40 - 45 kDa besitzen (van Gelder *et al.*, 1997). Bei derart ähnlichen Größenverhältnissen liegt die Vermutung einer konservierten Schnittstelle nahe. In *Vicia faba* (Robinson und Dry, 1992) und der PPO aus Weintrauben (Dry und Robinson, 1994) war das zur Aktivierung abgespaltene, selbst inaktive Peptid mit dem Carboxy-(C)-Terminus des Proteins identisch. Dies findet sich bei homologen Enzymen aus Pilzen und Säugern bestätigt (van Gelder *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wird im Verlauf einer Protease-Behandlung von

Tyrosinasen aus Arthropoden ein N-terminales Peptid entfernt, das Homologien mit dem N-Terminus der Arthropoden-Hämocyanine aufweist (Aspán *et al.*, 1995; Kawabata *et al.*, 1995; Chosa *et al.*, 1997; Söderhäll und Cerenius, 1998). So lassen sich auch diese respiratorischen Proteine durch die Entfernung der N-terminalen Domäne (Decker und Rimke, 1998) oder eine Behandlung mit Perchlorat, die die Zugänglichkeit des AZ begünstigt (Zlateva *et al.*, 1996; Salvato *et al.*, 1998), in Enzyme mit der katalytischen Aktivität von Tyrosinasen umwandeln.

Die latente CO aus der Süßkartoffel besitzt gegenüber dem von Klabunde *et al.* (1998) strukturell aufgeklärten, aktiven Protein eine zusätzliche C-terminale Domäne (Gerdemann *et al.*, 2002b), die sich mit dem C-Terminus des *odgHC* (Cuff *et al.*, 1998) überlagern lässt und die auch bei der Tyrosinase aus *Neurospora crassa* identifiziert wurde (Beltramini *et al.*, 1990). All diese Befunde deuten darauf hin, dass sowohl bei den latenten Tyrosinasen und Catecholoxidasen als auch den inaktiven Hämocyaninen eine endständige Domäne das AZ abschirmt und den Zugang zum Reaktionszentrum für Substrate versperrt (Gerdemann *et al.*, 2002b).

#### 1.1.4.2 Inhibition

Während die humane Tyrosinase relativ spezifisch den Umsatz von Tyrosin, innerhalb eines Proteins oder frei vorliegend (Ito *et al.*, 1984), und L-DOPA katalysiert, bietet sich den Polyphenoloxidasen aus Pflanzen und Pilzen ein breites Spektrum an phenolischen Substraten (Mayer und Harel, 1979). Hierzu zählen u.a. Flavonoide, Leukoanthocyanine, 4-Hydroxymitsäuren und Tannine. Während einige Vertreter dieser Klassen als Substrate dienen, wirken andere als Inhibitoren (Rescigno *et al.*, 2002). Solche Substrat-Analoga, wie Resorcinol, Benzoesäure, Resveratrol, Quercitin, Zimtsäure oder auch 4-nitro- und 4-cyano-Catechol-Derivate, besetzen das Reaktionszentrum, können aber nicht zu Chinonen reagieren. Die Wirkung mancher dieser Substanzen ist allerdings variabel. So wurde z.B. durch 3,4-Dihydroxymitsäure (Kaffeensäure) bei einigen Polyphenoloxidasen eine Hemmung beobachtet, bei anderen nicht (Rescigno *et al.*, 2002).

Neben den Substrat-ähnlichen Substanzen, die mit phenolischen Substraten in Konkurrenz treten, bilden Kupfer-Chelatoren eine zweite Gruppe von PPO-Inhibitoren, indem sie mit dem Sauerstoff am AZ konkurrieren. Hierzu zählen u.a. Troponin (Broothaerts *et al.*, 2000; Pérez-Gilabert und García-Carmona, 2000), Cyanid (Duckworth and Coleman, 1970; Yang *et al.*, 2000), Azid (Shi *et al.*, 2001) und Halogen-Ionen (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990; Tepper *et al.*, 2002). Als kompetitive Inhibitoren wurden auch Mimosin (Cabanès *et al.*, 1987; Bubacco *et al.*, 2003) und Koji-Säure (Chen *et al.*, 1991; Burdock *et al.*, 2001) identifiziert. PTU (Rompel *et al.*, 1999) und Barbarin (Seo *et al.*, 1999) stellen nicht-kompetitive Inhibitoren dar.

Es sind jedoch nicht nur Tyrosinase-Inhibitoren, die Einfluss auf die Melanogenese nehmen. Vielmehr kann die Melaninsynthese z.B. auch durch Entfernung der gebildeten Chinone behindert werden. Reduktionsmittel, wie Ascorbinsäure, reduzieren Chinone zu Phenolen, die wiederholt mit der Tyrosinase reagieren und somit die Reaktion verlangsamen (Ros *et al.*, 1993b; Yang *et al.*, 2000). Im Verlauf der Reduktion können ebenso kovalente

Modifikationen der Phenole auftreten, sodass diese nicht erneut als Substrate zur Verfügung stehen und die Melaninbildung irreversibel gestoppt wird (Rescigno *et al.*, 2002). Für Dithiothreitol (DTT) und  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) wurde dagegen eine direkte Interaktion mit dem Aktiven Zentrum der Tyrosinase postuliert (Park *et al.*, 2003).

Während Phenole unbestritten zum Nährstoffgehalt von Obst und Gemüse beitragen und eine geminderte PPO-Aktivität oft mit einem Qualitätsverlust oder auch einer verstärkten Anfälligkeit für Infektionen (1.1.7.1) korreliert ist, hat die Hemmung der Melaninentstehung dennoch für die Lebensmittelindustrie an Bedeutung gewonnen. Durch eine geminderte Bräunungstendenz lassen sich landwirtschaftliche Produkte länger lagern. Allein für die Konservierung von Pilzen sind die entwickelten Methoden vielfältig und nicht unumstritten. Sie reichen vom Autoklavieren und Blanchieren über die Verwendung von Mikrowellen (Devece *et al.*, 1999) bis hin zum Einsatz chemischer Substanzen, wie Sulfit (Seo *et al.*, 2003). Ein anderer Ansatz wurde bei der Expression von RNA einer Tomaten-PPO in *sense*- oder *antisense*-Orientierung verfolgt, durch die die PPO-Aktivität in transgenen Kartoffelpflanzen inhibiert werden konnte (Coetzer *et al.*, 2001). Koji-Säure, die in Kosmetika zur Hautaufhellung eingesetzt wird, wurde unlängst als ungefährlich eingestuft (Burdock *et al.*, 2001). Andere Substanzen, die in der Kosmetik-Industrie mit dem gleichen Hintergrund Verwendung finden, sind z.B. Aloesin aus *Aloe vera* und Arbutin (Funayama *et al.*, 1995; Maeda und Fukuda, 1996; Jin *et al.*, 1999).

### 1.1.5 Genetische Organisation pflanzlicher Polyphenoloxidasen

Pflanzliche Polyphenoloxidasen sind kerncodierte Enzyme (Vaughn und Duke, 1984; Mayer, 1987), die, mit Ausnahme der PPO aus Weintrauben, die durch eine singuläre Genkopie repräsentiert wird (Dry und Robinson, 1994), in vielen Fällen als Genfamilien auftreten (Hunt *et al.*, 1993; Boss *et al.*, 1995; Joy *et al.*, 1995; Thygesen *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 2004). Die PPO-Genfamilie aus *Lycopersicon esculentum*, Tomate, besteht aus sieben Mitgliedern (Newman *et al.*, 1993). Die Gene liegen in 12.4 kb Clustern innerhalb einer 165 kb Region auf dem Chromosom 8 und enthalten, ebenso wie die PPO-Gene bei *Malus domestica*, Apfel (Haruta *et al.*, 1998), keine Introns (Shahar *et al.*, 1992). Dagegen wurde sowohl in *Musa cavendishii*, Banane (Gooding *et al.*, 2001), als auch in *Ananas comosus* (Zhou *et al.*, 2003) jeweils ein einzelnes Intron nachgewiesen.

Die Sequenz-Identität der codierenden DNA-Abschnitte (ORF, Open Reading Frame) liegt innerhalb der PPO-Familie von Tomate zwischen 70 und 91 %, die nicht translatierten Bereiche sind hingegen deutlich heterogener. Den hier vorhandenen regulatorischen Elementen wurde daher eine mögliche Rolle bei der gewebspezifischen Expression der Isozyme zugesprochen (Newman *et al.*, 1993; Thipyapong und Steffens, 1997). Es wird angenommen, dass die Genfamilie durch Duplikation und ungleiches Crossing Over aus einem ursprünglichen Single Copy-Gen entstanden ist (Thipyapong *et al.*, 1997).



### 1.1.6 Lokalisation der PPO in der Pflanze

Die Primärsequenz der pflanzlichen Tyrosinasen, die im Cytoplasma synthetisiert werden, lässt sich im Wesentlichen in drei Domänen unterteilen (van Gelder *et al.*, 1997). Sie besteht aus einem aminoterminalen Transit-Peptid, von etwa 80 - 90 Aminosäuren (AS) Länge, einer zentralen Domäne, die die beiden Kupfer-Bindungsstellen, CuA und CuB, beinhaltet, sowie einem carboxyterminalen, vermutlich zur Aktivierung proteolytisch entfernbaren (1.1.4.1), Bereich. Dieser weist eine dritte Histidin-reiche Region auf, die als mögliche zusätzliche Kupfer-Koordinationsstelle, CuC, vorgeschlagen wurde (Joy *et al.*, 1995; Sommer *et al.*, 1995). Ein Sequenzvergleich von Tyrosinasen aus unterschiedlichen Organismengruppen zeigt, dass einige konservierte Sequenzbereiche innerhalb jeder Gruppe existieren, die einzigen in allen Organismen konservierten Regionen jedoch die CuA- und CuB-Bindungsstellen sind (van Gelder *et al.*, 1997).

So besitzen außer den pflanzlichen Polyphenoloxidasen lediglich Tyrosinasen von Säugern ebenfalls ein Signalpeptid (van Gelder *et al.*, 1997). Dieses ist mit nur 18 AS jedoch deutlich kürzer als bei Pflanzen und vermittelt den Import in die Melanosomen, membranösen Organellen innerhalb der Melanocyten, die sich vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ableiten und in denen die Melaninsynthese stattfindet (Sulaimon und Kitchell, 2003). In der menschlichen Haut steht eine Melanocyte mit etwa je 35 Keratinocyten in Kontakt, auf die sie die melaninhaltigen Organellen überträgt (Eisinger und Marko, 1982). Ihre Verteilung innerhalb eines Organismus ist genetisch kontrolliert und führt u.a. zur Ausprägung solch interessanter Muster, wie der Fellzeichnung des Zebras. Die Tyrosinase liegt in einem Proteinkomplex mit TRP1 und TRP2 (Kobayashi *et al.*, 1998) zum Großteil im Inneren der Melanosomen vor, während eine Transmembran-Helix die Membran durchspannt und die 30 C-terminalen AS in das Cytosol der Melanocyten hineinragen (Sulaimon und Kitchell, 2003).

Bei Bakterien, Pilzen und Insekten (Kawabata *et al.*, 1995) liegen die Proteine dagegen gelöst im Cytoplasma vor, weshalb ihnen entsprechende Transit-Sequenzen fehlen (Mayer und Harel, 1979; van Gelder *et al.*, 1997). Die extrazelluläre Tyrosinase bei *Streptomyces* wird mit Hilfe des MelC1-Proteins und dessen Signal-Sequenz sekretiert (Leu *et al.*, 1992).

In Pflanzen sind die Polyphenoloxidasen in den Plastiden lokalisiert (Arnon, 1949; Vaughn und Duke, 1984; Vaughn *et al.*, 1988). Mit Hilfe eines zweiteiligen Transit-Peptids, das aus einem N-terminalen hydrophilen Abschnitt und einem C-terminalen hydrophoben Bereich besteht, werden sie bis in das Lumen der Thylakoide transportiert (Keegstra und Olsen, 1989; Kieselbach *et al.*, 1998). Am Beispiel einer PPO aus *Lycopersicon esculentum* konnte der Transfer des 67 kDa schweren Precursors aus dem Cytoplasma über die Chloroplasten-Hüllmembran in das Stroma der Chloroplasten gezeigt werden, wo eine stromale Peptidase (SPP) die Prozessierung zu einem 62 kDa-Protein vornahm (Koussevitzky *et al.*, 1998a). Dieses wurde anschließend in das Thylakoid-Lumen geleitet und lag in diesem Kompartiment in löslicher Form, mit einem Molekulargewicht von 59 kDa vor (Sommer *et al.*, 1994).

Ob pflanzliche Tyrosinasen und Catecholoxidasen gelöst im Thylakoidlumen oder an die luminale Seite der Thylakoidmembran assoziiert vorliegen, ist nicht eindeutig erwiesen. Bei der Isolation der nativen Enzyme aus pflanzlichen Geweben wurden Polyphenoloxidasen

sowohl in löslichen als auch membranhaltigen Fraktionen nachgewiesen (Golbeck und Cammarata, 1981; Lax und Vaughn, 1991; Heimdal *et al.*, 1994; Sheptovitzky und Brudvig, 1996; Chazarra *et al.*, 2001b; Escribano *et al.*, 2002; Gandía-Herrero *et al.*, 2004;). Hydrophobe Bereiche, die bei einigen Vertretern der PPO-Genfamilie bei Tomate nahe dem C-Terminus identifiziert wurden, unterstützen jedoch die Annahme einer möglichen Membranassoziation (Newman *et al.*, 1993).

## 1.1.7 Funktion der Tyrosinasen

Die Lokalisierung der Polyphenoloxidasen in den Thylakoiden, dem Kompartiment, in dem innerhalb der Pflanzenzelle die Photosynthese stattfindet, wirft die Frage nach der Funktion der Enzyme auf. Ihre Substrate, vielfältigste phenolische Substanzen, befinden sich dagegen in erster Linie in der Vakuole. Anfängliche Versuche, die PPO mit der Synthese von Diphenolen in Verbindung zu bringen, lieferten keine stichhaltigen Indizien (Mayer und Harel, 1979; Vaughn und Duke, 1984).

### 1.1.7.1 Funktion pflanzlicher Polyphenoloxidasen

Durch die offensichtliche Bräunung pflanzlicher Gewebe bei einer Verwundung oder im Verlauf der Seneszenz liegt die Vermutung einer Beteiligung der Polyphenoloxidasen an diesen Prozessen nahe. Die Induktion der PPO kann dabei auf einer Solubilisierung oder Aktivierung des latenten Enzyms, als Folge der Aufhebung der Kompartimentgrenzen beruhen, sodass das Enzym in Kontakt mit seinen Substraten kommt, oder auf eine *de novo*-Synthese zurückzuführen sein (Mayer und Harel, 1979). Die Hinweise auf einen Beitrag der Tyrosinase zur Krankheitsresistenz, als einem von vielen Mechanismen, die den Pflanzen zu Verfügung stehen (Cohn *et al.*, 2001), sind vielfältig, jedoch nicht systematisch zu belegen. So wurde die PPO-Expression bei Tabak und Pappel, als Folge einer mechanischen Verwundung zur Simulation von Fraßfeinden systemisch induziert, bei Weide und Sojabohne jedoch nicht (Constabel und Ryan, 1998; Constabel *et al.*, 2000). Da Methyl-Jasmonat den gleichen Effekt hervorrief, wurde eine Vermittlung über Systemin und den Octadecanoid-Wundsignal-Weg postuliert (Constabel *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 2002). Andere Signalmoleküle, wie Ethylen oder Salicylsäure (Thipyapong und Steffens, 1997) sowie Gibberellin (Zhou *et al.*, 2003) erwiesen sich ebenfalls als wirksam.

Hinweise auf eine Regulation der Aktivität auf Ebene der Transkription ergaben sich aus der Akkumulation von PPO-mRNA in Äpfeln (Boss *et al.*, 1995) bzw. einer erhöhten Proteinkonzentration in Kartoffelpflanzen (Thipyapong *et al.*, 1995) im Anschluss an eine Verwundung. In Folge einer Überexpression und verstärkten Aktivität einer PPO erhöhte sich die Resistenz von Tomatenpflanzen gegenüber Pathogenen (Li und Steffens, 2002). Im Umkehrschluss zeigte eine resistente Weizenart verstärkte PPO-Aktivität sowohl im Vergleich mit einer nicht resistenten Art als auch bei Inokulation mit *Alternaria triticina* (Tyagi *et al.*, 2000). Abiotischer Stress, ausgelöst durch Trockenheit (Thipyapong *et al.*, 2004) oder extreme Temperaturen (Rivero *et al.*, 2001), scheint ebenso in Bezug zur PPO zu stehen.

Der Mechanismus dieser Abwehrreaktionen ist vielfach unbekannt. Eine direkte Toxizität reaktiver Chinon-Spezies für eindringende Pathogene (Mayer und Harel, 1979; Vaughn und Duke, 1984; Tyagi *et al.*, 2000) ist ebenso denkbar wie die Bildung einer mechanischen Barriere durch deren Polymerisierung (Vaughn *et al.*, 1988). Verschiedene Vertreter der Gattungen *Solanum* und *Lycopersicon* weisen innerhalb ihrer Drüsenhaare einen sehr hohen Gehalt an PPO-Protein auf (Yu *et al.*, 1992). Dieser ist verantwortlich für die schnelle Initiation der Polymerisation des austretenden Exsudats, wenn die Trichome bei Berührung aufbrechen, sodass Insekten in einem festen Polymer eingeschlossen und die Fraßfeinde so eliminiert werden (Kowalski *et al.*, 1992).

Die Synthese von Melanin ist jedoch nicht immer nur als Abwehrreaktion zu verstehen. Vielmehr erhalten z.B. Oliven auf diese Weise ihre schwarze Farbe (Sciancalepore und Longone, 1984), andere Früchte, wie Kakao und Rosinen, charakteristische organoleptische Eigenschaften (Seo *et al.*, 2003) und manche Samen ihre harte, impermeable Schale (Marbach und Mayer, 1975).

Polyphenoloxidasen stellen zudem Komponenten aus Synthesewegen anderer pflanzlicher Pigmente, wie der gelb bis rot-violetten Betalaine und der gold-gelben Aurone, dar (Steiner *et al.*, 1996; Strack und Schliemann, 2001). Die Aureusidin-Synthase, die an der Auron-Synthese in den Blüten von *Antirrhinum majus*, dem Löwenmäulchen, beteiligt ist, konnte als PPO-Homolog identifiziert werden (Nakayama *et al.*, 2000). In den Früchten der amerikanischen Kermesbeere, *Phytolacca americana*, die aufgrund eines hohen Betalain-Gehaltes rot gefärbt sind, wird die PPO während der Reifungsphase spezifisch induziert (Joy *et al.*, 1995). Eine solche differentielle Expression in vegetativen und reproduktiven Organen während des Wachstums und der Differenzierung wurde auch in anderen Spezies gezeigt (Shahar *et al.*, 1992; Thygesen *et al.*, 1995; Thipyapong *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 2004).

Versuche, die PPO in Verbindung mit der Photosynthese zu bringen, beruhen zumeist auf deren andernfalls ungewöhnlichen Lokalisation in den Thylakoiden (Meyer und Biehl, 1982; Trebst und Depka, 1995). Ihre regulatorische Beteiligung an der Mehler-Reaktion, die unter Stress-Bedingungen zur Übertragung überschüssiger Elektronen aus dem Photosystem I (PSI) auf Sauerstoff und einem pseudozyklischen Elektronentransport führt, ist bisher nicht bewiesen (Tolbert, 1973; Vaughn und Duke, 1984; Mayer, 1987; Vaughn *et al.*, 1988; Thipyapong *et al.*, 2004). Während die Aufgabe der PPO in Pflanzen noch nicht geklärt ist, kann ihre Funktion in andere Organismen z.T. exakt definiert werden.

### 1.1.7.2 Bedeutung der Tyrosinasen für andere Organismen

Bakteriellen Tyrosinasen konnte bisher ebenfalls, abgesehen von einem durch die Pigmentierung hervorgerufenen UV-Schutz (Ruan *et al.*, 2002) und einem Beitrag zur mikrobiellen Pathogenese (Nosanchuk und Casadevall, 2003), keine eindeutige Aufgabe zugewiesen werden. Ungeachtet dessen werden sie, wie auch die Tyrosinase aus dem Champignon, *Agaricus bisporus*, vielfältig industriell genutzt. Bei Pilzen generell steht die Melaninproduktion in Zusammenhang mit der Differenzierung reproduktiver Organe und der Sporen-Entwicklung, der Virulenz pathogener Pilze und dem Schutz verletzter Gewebe (Seo

*et al.*, 2003). In der Biotechnologie finden, oftmals auf Oberflächen immobilisierte, Tyrosinasen Verwendung bei der synthetischen Produktion von L-DOPA, das der Behandlung der Parkinson-Krankheit dient, als Katalysatoren für die Entgiftung phenolhaltiger Böden und Abwässer, sowie als Biosensoren für die Detektion von Phenolen (Seo *et al.*, 2003). Halaouli *et al.* (2005) beschrieben die mögliche Verwendung einer Tyrosinase aus *Pycnopus sanguineus* in der Lebensmittel-Industrie, da sie aufgrund ihrer effizienten Vernetzung von Casein in Verdickungsmitteln eingesetzt werden könnte. In der klinischen Anwendung wird die Tyrosinase z.B. als Autoantigen und damit Marker für Vitiligo, eine Autoimmunkrankheit, die sich durch lokale Hypopigmentierung der Haut (weiße Flecken) und Haare auszeichnet, eingesetzt. Ihre Bedeutung für die Therapie von Hautkrebs (Malignes Melanom) wird erforscht (Riley, 2003; Seo *et al.*, 2003).

Bei Invertebraten treten Melanine im Verlauf dreier wichtiger physiologischer Prozesse in Erscheinung. Hierzu zählen die Sklerotisierung des Exoskeletts (Andersen *et al.*, 1996; Sugumaran, 2002), der Wundverschluss mittels einer Melaninschicht (Lai-Fook, 1966; Ashida und Brey, 1995) sowie die Immunantwort. Eine Komponente der letzteren stellt eine Kaskade aus Serinproteasen dar, an deren Ende die Prophenoxidase aktiviert wird (Söderhäll und Cerenius, 1998). Deren Wirksamkeit ist zum einen durch einen direkten zytotoxischen Effekt der gebildeten Chinone, zum anderen durch den Einschluss großer Pathogene in eine Melaninkapsel, die als mechanische Barriere dient, charakterisiert (Sugumaran, 2002).

Als Schlüsselenzym der Melanogenese ist die Tyrosinase beim Menschen und anderen Säugern mit verantwortlich für die Pigmentierung von Haaren, Haut und Augen und sorgt damit für Tarnung, Thermoregulation und einen effizienten UV-Schutz. Eine Vielzahl von Mutationen des Tyrosinase-Gens führt zum Auftreten des Oculocutanen Albinismus vom Typ 1 (OCA1), einer Hypopigmentierung der Haut, Augen und Haare, die durch eine fehlerhafte Prozessierung des Enzyms im ER und eine anschließende Degradation desselben zustande kommt (Oetting, 2000; Sturm *et al.*, 2001; Toyofuku *et al.*, 2001; Kushimoto *et al.*, 2003). Andere Formen des Albinismus werden ausgelöst durch Mutationen des TRP1-Gens (OCA3) oder der Gene, die für zwei Membrantransporter codieren (OCA2 und OCA4). Hierbei handelt es sich um das P(*pink eyed*)-Protein (Rinchik *et al.*, 1993) und MATP (*Membrane-associated transporter protein*; Newton *et al.*, 2001), die den Transfer der Tyrosinase nach deren Freisetzung aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk in die Melanosomen vermitteln. Sie alle stehen in direktem Zusammenhang mit einem Defekt des Transportes der Tyrosinase in die Melanosomen (Kushimoto *et al.*, 2003).

Andere Pigmentstörungen, wie Melasma (unregelmäßige dunkle Flecken), Lentigines (Alters- oder Sonnenflecken) oder Sommersprossen stehen ebenfalls mit der Melanin-Produktion in Verbindung (Seo *et al.*, 2003). Die Parkinson-Krankheit beruht auf einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin im Gehirn und steht in Bezug zum Neuromelanin, dessen Gehalt in der Substantia nigra im Verlauf der Erkrankung durch das Absterben dopaminergener Neuronen abnimmt (Ikemoto *et al.*, 1998; Tief *et al.*, 1998; Zecca *et al.*, 2001).

## 1.2 Proteinfaltung

In der nativen Konformation eines Proteins lassen sich mehrere Strukturebenen differenzieren. Die Aminosäuresequenz wird als Primärstruktur bezeichnet,  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter stellen Sekundärstrukturelemente dar, während die komplexe Orientierung einer Polypeptidkette im Raum als Tertiärstruktur bezeichnet wird. Zusammenlagerungen mehrerer Polypeptide zu einem Oligomer und die Bindung von Cofaktoren, prosthetischen Gruppen oder Metallionen vervollständigen die Quartärstruktur vieler Proteine. Das Phänomen, dass die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins sehr viel schneller erfolgt, als sich für die zufällige Einnahme und Kombination aller möglichen Positionen der Aminosäuren statistisch berechnen ließe, ist als Levinthal'sches Paradoxon bekannt (Levinthal *et al.*, 1969; Zwanzig *et al.*, 1992).

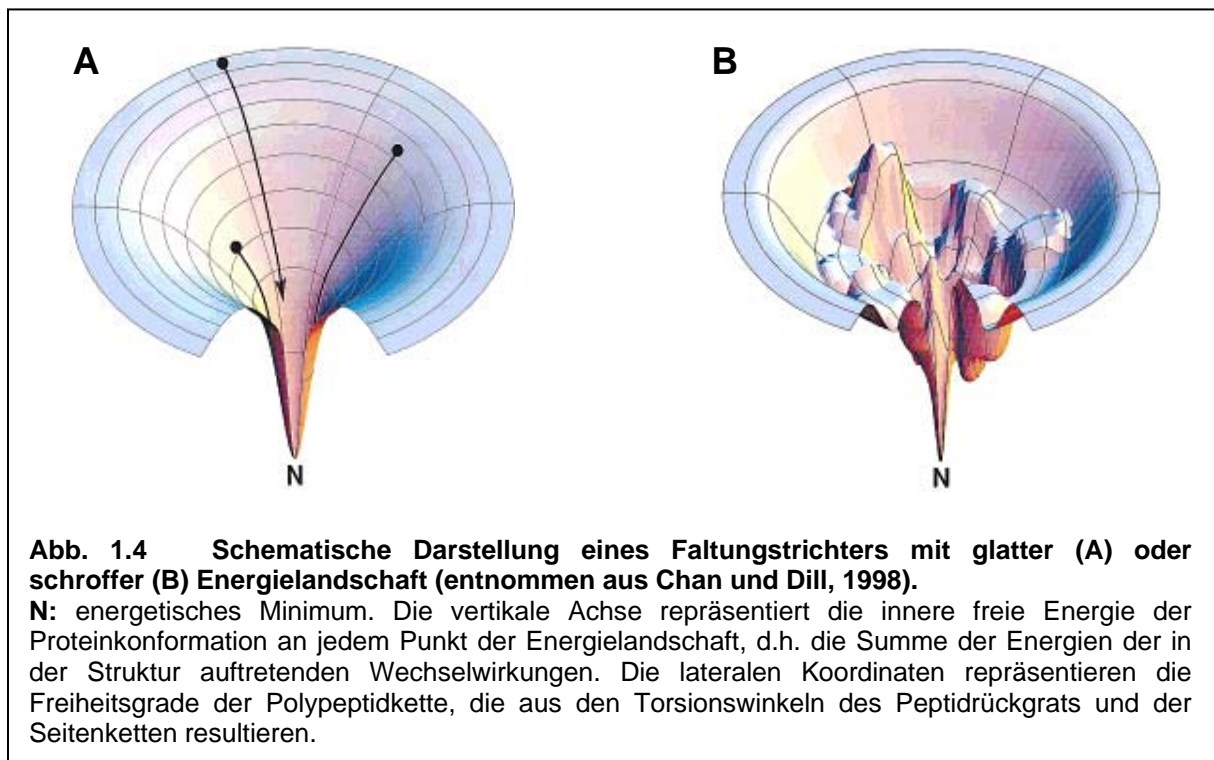
Die erste spontane Faltung eines löslichen Proteins unter oxidierenden Bedingungen wurde von Anfinsen *et al.* (1961) anhand der reduzierten und denaturierten RNaseA gezeigt (Anfinsen und Haber, 1961). Die räumliche Konformation des Proteins ist bereits in seiner Aminosäuresequenz festgelegt (White, 1961; Seckler und Jaenicke, 1992). Der spontanen Proteinfaltung liegt ein Entropie-getriebener Prozess zugrunde, der hauptsächlich auf dem so genannten hydrophoben Effekt beruht (Winter und Noll, 1998). Energetisch wird eine Konformation bevorzugt, bei der unpolare Aminosäurereste dem Inneren des Proteins zugewandt und polare Seitenketten an dessen Oberfläche exponiert vorliegen. Die Entropie des Wassers nimmt dabei durch dessen Ausschluss aus dem Protein um einen größeren Betrag zu als die der gefalteten Polypeptidkette durch die höhere Ordnung abnimmt. Die *in vitro* Rekonstitution von Membranproteinen gestaltet sich, aufgrund ihrer hydrophoben Domänen, die einer Membran-ähnlichen Umgebung zur Faltung bedürfen, als weitaus schwieriger und gelang daher erst zu Beginn der achtziger Jahre am Beispiel des Bakteriorhodopsins (Huang *et al.*, 1981; London und Khorana, 1982; Booth, 2000).

Die Renaturierung von Proteinen kann *in vitro* mehrerer Stunden oder Tage bedürfen, während die Faltung *in vivo* oft innerhalb weniger Sekunden bzw. Minuten abgeschlossen ist oder bereits cotranslational erfolgen kann. Diese Diskrepanz der Reaktionsgeschwindigkeit ist auf die Beteiligung von Protein-Disulfid-Isomerasen, die die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken katalysieren, Peptidylprolyl-Isomerasen, die die *cis/trans*-Isomerie des Prolins einstellen, und molekularer Chaperone *in vivo* zurückzuführen (Jaenicke, 1991; Chan und Dill, 1996; Hiniker und Bardwell, 2003).

Zum Mechanismus der Proteinfaltung wurden verschiedene Theorien entwickelt. Neben einem *Two-State*-Modell, das den unmittelbaren Übergang vom ungefalteten in den gefalteten Zustand beschreibt (Itzhaki *et al.*, 1995; Schindler *et al.*, 1995), führte die Entdeckung von Faltungs-Intermediaten, so genannten *Molten Globules*, relativ kompakten Zuständen, die bereits Sekundärstrukturelemente enthalten, zur Annahme eines hierarchischen Faltungsweges, der über die Ausbildung von Sekundärstrukturen bis hin zur Einnahme der Tertiärstruktur verläuft (Ptitsyn, 1995). Eine Hierarchie wird auch von Baldwin und Rose (1999a) postuliert, allerdings könnte sich die Faltung auch in umgekehrter Reihenfolge ereignen, wobei die Entstehung lokaler Strukturelemente durch eine zuvor

ausgebildete globale dreidimensionale Struktur erst induziert würde (Dill *et al.*, 1995; Baldwin und Rose, 1999b).

Der Begriff des Faltungsweges wurde Mitte der 90er Jahre durch den des so genannten Faltungstrichters (*foldng funnel*) ersetzt (Baldwin, 1995; Bryngelson *et al.*, 1995). Hiermit wird eine energetische Landschaft (*energy landscape*) beschrieben, in der verschiedene ungefaltete Zustände des Proteins auf unterschiedlichen Wegen den gleichen Endzustand erreichen, der identisch ist mit der nativen Konformation des Proteins und dessen globalem energetischen Minimum (Onuchic *et al.*, 1995; Chan und Dill, 1998). Die glatte oder eher schroffe Beschaffenheit der Energielandschaft, die in Abb. 1.4 exemplarisch dargestellt ist, bedingt die Kinetik der Faltung, da viele lokale Minima, in Form von ungeeigneten Intermediaten, kinetische Fallen bilden, die die Einnahme der nativen Struktur behindern können (Chan und Dill, 1998).



### 1.3 Ziele der Arbeit

Für die Ursache der abweichenden Reaktionsmechanismen von Tyrosinasen und Catecholoxidasen gibt es bislang zwar Indizien (Tepper *et al.*, 2005), eindeutig belegen ließe sich der Grund dieses Unterschiedes jedoch erst durch die Aufklärung der Struktur, besonders des Aktiven Zentrums, einer Tyrosinase und den Vergleich mit der bereits vorhandenen CO-Kristallstruktur (Klabunde *et al.*, 1998).

Die Kristallisation eines Proteins, die einer Röntgenstrukturanalyse vorausgeht, bedarf oftmals einer vielfältigen Variation der Parameter in vielen parallelen Versuchsansätzen und entsprechend großer Mengen des aufgereinigten Proteins. Für die Herstellung desselben gibt es im Wesentlichen zwei experimentelle Ansätze. Bei der Isolierung eines nativen Proteins stellt die meist sehr aufwendige Aufarbeitung einer großen Menge an Ausgangsmaterial einen entscheidenden Nachteil dar. Dagegen bieten die heterologe Expression und anschließende Rückfaltung des rekombinanten Polypeptids *in vitro* die besten Voraussetzungen zur Produktion des gewünschten Proteins in definiertem Ausmaß. In Kombination mit einem Fusionspeptid wird die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins mit Hilfe einer entsprechenden Affinitätschromatographie darüber hinaus zusätzlich erleichtert.

Ziel dieser Arbeit war, vor diesem Hintergrund, die Etablierung eines bakteriellen Expressionssystems zur heterologen Überexpression einer pflanzlichen Tyrosinase und die nachfolgende Rückfaltung derselben. Parallel dazu sollte ein geeigneter pflanzlicher Organismus, der die Isolation einer aktiven Tyrosinase erlaubt, identifiziert und die Erstellung eines Protokolls zur Aufreinigung des nativen Enzyms begonnen werden. Dieser Aspekt wurde anschließend von M. Gebhardt (2004) experimentell weiter verfolgt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Chemikalien in p.a.-Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), BIOMOL Feinchemikalien GmbH (Hamburg), Boehringer (Mannheim), GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg), Merck (Darmstadt), NEB New England Biolabs (Frankfurt), PeQLab Biotechnologie (Erlangen), Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH + Co. KG (Seelze), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim). Eine vollständige Liste aller verwendeten Chemikalien befindet sich im Anhang.

Für die Herstellung vieler Lösungen und Puffer werden Stammlösungen verwendet, die, sofern nicht anders angegeben, mit Aqua dest. angesetzt, autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur (RT) gelagert werden.

### 2.2 Geräte

#### **Autoklav**

Dampfsterilisator Varioklav Typ 500 E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)

#### **Digitalkamera**

Camedia C-3040 ZOOM (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)

#### **Eismaschine**

Ice Flaker gel-o-mat Typ GB 1555 A (ELGE Eismaschinen, Lippstadt)

#### **Filtrationsanlage**

Filtrationseinheit (Nalgene®/Nunc GmbH, Wiesbaden)

Membranfilter Polyamid, NL 16, 0.2 µm, Durchmesser: 47 mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Membranpumpe Typ Aquastop II (Van der Heijden, Dörentrup)

#### **FPLC**

BioLogic HR Workstation (Bio-Rad, München)

Auto-Injection Valve AV7-3 (Bio-Rad, München)

Select Valve Model SV5-4 (Bio-Rad, München)

Fraction Collector Model 2128 (Bio-Rad, München)

#### **Geldokumentation**

VersaDoc™ Imaging System Model 3000, Software: Quantity One (Bio-Rad, München)



### **Geltrocknungsanlage**

Slab Gel Dryer 2003 (LKB Produkter AB, Bromma, Schweden)

Vakuum-Pumpe Model RV5 (Edwards High Vacuum International, Crawley, England)

Kältefalle Typ KF-2-60 (Bachofer GmbH, Reutlingen)

### **Inkubationsschüttler**

Certomat R/H (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)

Typ KS 500 (IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen) zur Anzucht von Kulturen im Klimaraum (18°C)

### **Kühlzentrifugen**

J2-HS, Rotoren: JLA-10.500, JA-20 (Beckman Instruments GmbH, München)

Mikro 22R, Rotoren: 1015, 1195 (Hettich, Tuttlingen)

Universal 30 RF, Rotoren: 1412, 1414 (Hettich, Tuttlingen)

### **Magnetrührer**

Oberflächen Temperatur Heizplatte IKAMAG<sup>®</sup> RCT (IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen)

Kontaktthermometer MR 3001 K (Heidolph, Kelheim)

### **Mikrotiterplatten-Spectrophotometer**

SPECTRAMaxPLUS, Software : SOFTmaxPRO<sup>®</sup> (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)

UV-Mikrotiterplatten Flat Bottom (Greiner/VWR International GmbH, Darmstadt)

VIS-Mikrotiterplatten: Microtest Plate 96-Well Flat Bottom (Sarstedt, Nürnberg)

### **Mikrowelle**

Typ HF 1610 (Siemens Elektrogeräte GmbH, München)

### **Mischgeräte**

Vortex Genie 2<sup>™</sup> (Bachofer GmbH, Reutlingen)

MS2 Minishaker (IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen)

REAX 2000 (Heidolph, Kelheim)

### **Mixer**

Heavy Duty Blender Model 37BL28 (Waring Commercial, New Hartford, CT, USA)

### **PCR-Gerät**

Primus 25 (MWG-Biotech, Ebersberg)

### **Pflanzenanzucht**

Aquariumpumpen Elite 800 Aquarium-Durchlüfter (Hagen Deutschland, Holm)

Ausströmer-Stein für Aquarien (TRIXIE Heimtierbedarf, Librics GmbH, Hannover)

Leuchtstoffröhren:

Cool White L 36 W / 20 (Osram GmbH, München)

Cool White L 40 W / 20 S (Osram GmbH, München)

Normal White 40 W / 25 S (Osram GmbH, München)

### **pH-Meter**

Labor pH-Meter Serie 500 (Krick Elektronische Messgeräte, Berlin)  
inoLab pH Level 2 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim)

### **Photometer**

Spectrophotometer V-550 UV/VIS (Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt)  
UV-VIS Scanning Spectrophotometer UV-2101PC (Shimadzu, Kyoto, Japan)

### **Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Midget-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Laufkammern Model SE 250 (Hoefer, Pharmacia Biotec, Inc. San Francisco, CA, USA)

### **Quantenmessgerät**

Quantum/Radiometer/Photometer Model LI-250 Light Meter (LI-COR<sup>®</sup>, Lincoln, NE, USA)

### **Reinstwasseranlage**

OPTILAB-Standard, MemCab 1 (0.2 µm) (MembraPure, Bodenheim)

### **Rotationsvorrichtungen**

Kulturenrad Typ Rotator (Bachofer GmbH, Reutlingen)  
Typ RZR 50 (Heidolph, Kelheim)

### **Scanner (Gel-Digitalisierung)**

ScanJet 4c (Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen)

### **Schüttler**

IKA-VIBRAX-VXR (IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen)  
Phero-Shaker (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)

### **Spannungsgeräte**

Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)  
Electrophoresis Power Supply Typ E501 (Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen)  
Microcomputer Electrophoresis Power Supply E714 (Consort NV, Turnhout, Belgien)  
PowerPac 300 (Bio-Rad, München)

### **Sterilbank**

Laminar Flow Typ HLF H (SLEE Semiconductor Technik GmbH, Mainz)

### **Tischzentrifugen**

EBA 12, Rotor: 1124 (Hettich, Tuttlingen)  
Mikro 12-24, Rotor: 2029 (Hettich, Tuttlingen)  
Mikro 24-48, Rotor: 1124 (Hettich, Tuttlingen)  
Typ 2020 (Hettich, Tuttlingen)

### **Ultraschallbad**

Sonorex Super RK 102 H (Bandelin electronic, Berlin)

### **Ultrazentrifugen**

Ultracentrifuge Optima™ LE-80K und Optima™ XL-100K (Beckman, München)  
Rotoren: SW 28, SW 40 TI, SW 41 TI, Centrifuge Tubes Polyallomer (Beckman, München)  
Centrikon T-1065 und Centrikon T-2060 (Kontron Instruments, Neufahrn)  
Rotoren: TST 41.14, TFT 70.38 (Kontron Instruments, Neufahrn)

### **UV-Lampe**

Typ HL-6-KM, 254/312 nm (Bachofer GmbH, Reutlingen)

### **Vakuum-Trocknungsanlage**

Vacuum Concentrator (Bachofer GmbH, Reutlingen)  
Vakuum-Pumpe Model RV5 (Edwards High Vacuum International, Crawley, England)  
Kältefalle Typ KF-2-60 (Bachofer GmbH, Reutlingen)

### **Waagen**

Analytik A 200 S (Sartorius GmbH, Göttingen)  
BP 2100 S (Sartorius GmbH, Göttingen)  
Typ L 610 (Sartorius GmbH, Göttingen)  
Model GT 2100 (OHAUS® Corp., Florham Park, NJ, USA)

### **Wärmeschränke**

Typ B 50 (Mettler, Schwabach)  
Typ BE 400 (Mettler, Schwabach)  
Typ U 30 (Mettler, Schwabach)

### **Wasserbäder**

Thermomix® MM (B. Braun Biotech International, Melsungen)  
Haake GH und D1, Modell Fisons (Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe)  
Typ P/3 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach)

### **Wasserkocher**

HB 4basic (IKA®-Labortechnik, Staufen)

### **Western Blotting**

Tank Transphor Electrophoresis Unit Model TE 22 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA)

### **Zellpresse**

French Pressure Cell Press, SLM Aminco (SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA)

## 2.3 Mikrobiologische Arbeiten

### 2.3.1 Verwendete Bakterienstämme

#### **JM101** (NEB, Frankfurt)

Genotyp [F<sup>-</sup>traD36 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 / Δ(lac-proAB) glnV thi]

Typischer blau/weiß-Stamm, der in Gegenwart von Glutamin viele *amber*-Mutationen unterdrückt. Zur Klonierung und Überexpression verwendbar, hohe Expressionseffizienz, als *recA*<sup>+</sup> anfällig für Rekombinationsereignisse, keine Antibiotikaresistenz.

#### **BL21(DE3)** (Novagen/Merck, Darmstadt)

Genotyp [F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)]

Enthält ein IPTG-induzierbares T7-Phagen-RNA-Polymerase-Gen im Genom, das die Expression von pET-Vektoren, deren Expression über T7-Promotoren reguliert wird, ermöglicht. Dadurch wird die basale Expression erniedrigt und die Überexpressionseffizienz gesteigert. Zusätzlich wird die Überexpression durch *Lon*- und *OmpT*-Proteasen-Defizienz verstärkt. Keine Antibiotikaresistenz.

#### **BL21(DE3)pLysE** (Novagen/Merck, Darmstadt)

Genotyp [F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)pLysE (Cm<sup>R</sup>)]

BL21(DE3)-Stamm mit einem zusätzlichen Plasmid, das ein T7-Lysozym-Gen enthält. T7-Lysozym fungiert als Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, d.h. sowohl die basale Expression als auch die Überexpressionseffizienz werden vermindert. Aus diesem Grund eignet sich dieser Stamm zur Expression toxischer Proteine. Resistenz gegenüber Chloramphenicol.

#### **Rosetta<sup>™</sup>(DE3)** (Novagen/Merck, Darmstadt)

Genotyp [F<sup>-</sup>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1 (DE3) pRARE<sup>6</sup> (Cm<sup>R</sup>)]

BL21(DE3) lacY-(Galactosid-Permease)-Deletionsmutante. Besitzt ein zusätzliches Plasmid, auf dem sich Gene seltener tRNAs befinden. In solchen Zellen kann die Expression von Genen, die (viele) Codons enthalten, die von seltenen tRNAs erkannt werden, gesteigert werden. Resistenz gegenüber Chloramphenicol.

## 2.3.2 Medien

### LB-Medium (Luria und Bertani)

- 1.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.5 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)
- 1.0 % (w/v) NaCl

Das Medium wird mit 5 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt.

### M9-Minimal-Medium

- 1.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.5 % (w/v) NaCl
- 0.1 % (w/v) NH<sub>4</sub>Cl
- 0.3 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 2.13 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.4 % (w/v) Glucose

Diese Lösungen werden getrennt autoklaviert und anschließend zugegeben:

- 0.2 % MgSO<sub>4</sub> (1 M Stammlösung)
- 0.01 % CaCl<sub>2</sub> (1 M Stammlösung)

### NZCYM-Medium

- 22.45 g/L NZCYM Broth EZMix™ (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

### SOB-Medium

- 2.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.5 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.05 % (w/v) NaCl
- 2.5 mM KCl
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> (getrennt autoklaviert (1 M) und anschließend zugegeben)

Das Medium wird mit 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt.

### SOC-Medium

- 2.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.5 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.05 % (w/v) NaCl
- 2.5 mM KCl
- 20 mM Glucose
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> (getrennt autoklavieren (1 M) und anschließend zugeben)

Das Medium wird mit 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt.

### 2xTY-Medium

- 1.6 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
- 1.0 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)
- 0.5 % (w/v) NaCl

**TB-Medium (Terrific Broth)**

1.2 % (w/v)	Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)	12 g
2.4 % (w/v)	Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)	24 g
0.4 % (v/v)	Glycerin	4 ml, ad 900 ml Aqua dest.
0.231 %	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31 g
1.254 %	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.54 g, ad 100 ml Aqua dest.

Beide Lösungen werden getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen vereinigt.

Alle Medien werden zu je 50 ml in 300 ml Erlenmeyerkolben bzw. zu je 100 ml in 500 ml Kolben autoklaviert. Für 500 ml Kulturmedium werden 2 Liter Erlenmeyerkolben verwendet. Die Gefäße sollten in diesen Größen gewählt werden, um eine ausreichende Belüftung und Sauerstoffzufuhr der Bakterien während des Wachstums zu garantieren. Sterile Medien können bei RT gelagert werden. Vor dem Beimpfen werden den Medien die gewünschten Antibiotika zugesetzt.

**LB-Amp-Agar-Platten**

1 % (w/v)	Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)
0.5 % (w/v)	Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)
1 % (w/v)	NaCl

Das Medium wird vor Zugabe des Agars mit 5 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt.

1.5% (w/v)	Agar Agar
------------	-----------

Das Medium wird autoklaviert, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, in sterile Petrischalen ausgegossen und nach dem Erkalten bei 4°C gelagert.

**Antibiotika**

Die Stammlösungen der Antibiotika werden mit Hilfe von Spritzenfiltern (Membrex 25, 0.2 µm, MembraPure GmbH, Bodenheim) sterilisiert, in sterile Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

**Ampicillin (Na-Salz)**

Stammlösung:	100 mg/ml	gelöst in Aqua dest.
Endkonzentration im Medium:	100 µg/ml	

**Chloramphenicol**

Stammlösung:	34 mg/ml	gelöst in Ethanol p.a.
Endkonzentration im Medium:	34 µg/ml	

### 2.3.3 Anzucht von Bakterien

*Escherichia coli* (*E.coli*) ist ein aerobes gramnegatives Bakterium, das seine Zellzahl bei optimalen Wachstumsbedingungen innerhalb von etwa 20 Min. verdoppelt. Alle Arbeiten mit sterilen Bakterienkulturen werden an einer Sterilbank (Typ HLF H, SLEE, Mainz) durchgeführt. Vor der Verwendung werden alle Medien, Lösungen und Gefäße (Glaskolben, Reagenzgläser) und Geräte (Glaspipetten, Pipettenspitzen) autoklaviert (Dampfsterilisator Varioklav Typ 500E, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim). Da Bakterien in 100 % Ethanol Sporen bilden, die bei neuerlicher Bewässerung auskeimen, werden die Arbeitsplatte der Sterilbank sowie Pipetten und andere nicht sterile Geräte vor und nach Benutzen mit 70 % Ethanol gereinigt. Gefäße werden nur kurz geöffnet und vor dem erneuten Abdecken an der Öffnung abgeflammt.

#### Flüssigkulturen

Für Plasmid- (2.4.2) und Inclusion Bodies-Präparationen (2.5.1.1) werden 50 ml bzw. 100 oder 500 ml Kulturen verwendet. Die Medien werden dafür direkt in den passenden Erlenmeyerkolben autoklaviert (2.3.2). Zum Anlegen von Dauerkulturen (2.3.7), beim Kolonie-Screening (2.3.6) und für schnelle Überexpressionstests sind 5 ml Bakterienkulturen ausreichend. Hierfür werden je 5 ml steriles Medium mit sterilen Glaspipetten in 20 ml Reagenzglasröhrchen mit Deckel pipettiert. Unmittelbar vor dem Beimpfen werden den Medien die gewünschten Antibiotika (2.3.2) zugesetzt.

Bakterien können entweder mit Hilfe einer ausgeglühten, abgekühlten Impföse oder sterilen Pipettenspitze von einer Agarplatte gepickt oder aus einer frischen Flüssigkultur überimpft werden. Pipettenspitzen können mit den Bakterien zusammen direkt in das Medium abgeworfen werden.

5 ml-Flüssigkulturen in Reagenzgläsern werden über Nacht (ü/N) bei 37°C im Kulturenrad (Typ Rotator, Bachofer GmbH, Reutlingen) im Wärmeschrank (Typ B 50, Memmert, Schwabach) inkubiert. 50 und 100 ml-Kulturen in Erlenmeyerkolben wachsen bei 37 °C und 210 rpm auf dem Inkubationsschüttler (Certomat R/H, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen). Der Ausdruck „ü/N“ beschreibt einen Zeitraum zwischen 12 und 17 Stunden. In diesem Fall erreicht das Wachstum der Bakterienkulturen eine Sättigungsphase, sodass z.B. für eine Plasmidpräparation (2.4.2) ausreichend Material zur Verfügung steht. Dienen ü/N-Kulturen als Vorkulturen, etwa für die Herstellung von Inclusion Bodies (2.5.1), werden damit große Volumina angeimpft, in denen die Bakterien schnell in eine exponentielle Wachstumsphase übergehen, in der die Proteinexpression induziert werden kann. 5 ml Vorkultur reichen aus, um 100 ml Medium anzuimpfen. Wird nur ein Teil-Volumen aus einer Vorkultur entnommen, sollte diese zuvor gut homogenisiert werden, da Bakterien schnell sedimentieren.

#### Agarplatten

Zur Vereinzelung oder kurzfristigen Aufbewahrung von Klonen können Bakterien mit Hilfe einer Impföse auf LB-Amp-Agarplatten (2.3.2) ausgestrichen werden. Die Platten werden mit dem Boden nach oben ü/N bei 37°C im Wärmeschrank (Typ B 50, Memmert, Schwabach) inkubiert, um eine Vermischung der Klone durch eventuell vorhandenes Kondenswasser zu vermeiden. Die Petrischalen werden mit Parafilm rundum verschlossen und können bei 4°C einen Monat gelagert werden.

### 2.3.4 Kompetente Zellen

Die Membranen von Bakterienzellen werden porös, wenn diese in Anwesenheit von  $\text{MgCl}_2$  angezogen und später bei  $0^\circ\text{C}$  mit  $\text{CaCl}_2$  inkubiert werden. Diese Behandlung befähigt sie zur Aufnahme von Fremd-DNA während einer Transformation.

Bereits kompetente *E.coli*-Zellen der Stämme BL21(DE3)pLysE, BL21(DE3) und Rosetta(DE3) werden von Novagen/Merck (Darmstadt) bezogen und in 20  $\mu\text{l}$  Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 2.3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zellen des Stammes JM 101 (NEB, Frankfurt, 2.3.1) werden auf einer LB-Platte, die kein Antibiotikum, aber 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , enthält, ausgestrichen und ü/N bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Von dieser Platte wird eine Kolonie gepickt und 4 - 5 Std. in 100 ml TYM BROTH-Medium auf dem Inkubationsschüttler bei  $37^\circ\text{C}$  und 200 rpm angezogen, bis eine  $\text{OD}_{[550\text{ nm}]}$  von 0.8 – 0.9 erreicht ist (Halbmikro Einmalküvetten, Ratiolab, Dreieich-Buchsclag). Die Zellen werden bei 3000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 10 - 12 Min. zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 40 ml kalter TfbI-Lösung resuspendiert, 20 Min. auf Eis inkubiert und anschließend 8 Min. bei 3000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Aus diesem Pellet und 4 ml kalter TfbII-Lösung wird vorsichtig eine Suspension hergestellt, die zu je 50  $\mu\text{l}$  in Eppendorf-Reaktionsgefäße auf Eis überführt wird. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### LB- $\text{MgCl}_2$ -Platten

1.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)  
 0.5 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)  
 1.0 % (w/v) NaCl  
 10 mM  $\text{MgCl}_2$   
 pH 7.5  
 1.5 % (w/v) Agar Agar

#### TYM BROTH-Medium

2.0 % (w/v) Bacto™-Trypton (Otto Nordwald, Hamburg)  
 0.5 % (w/v) Bacto™-Hefeextrakt (Otto Nordwald, Hamburg)  
 0.1 M NaCl  
 10 mM  $\text{MgCl}_2$   
 pH 7.5

#### TfbI-Lösung

30 mM K-Acetat  
 100 mM KCl  
 10 mM  $\text{CaCl}_2$   
 15 % (w/v) Glycerin  
 50 mM  $\text{MnCl}_2$

#### TfbII-Lösung

75 mM  $\text{CaCl}_2$   
 10 mM MOPS, pH 7.0  
 10 mM KCl  
 15 % (w/v) Glycerin

(Eine 1 M Lösung  $\text{MnCl}_2$  wird getrennt autoklaviert und das entsprechende Volumen nach dem Abkühlen zur TfbI-Lösung zugegeben.)



Alle Medien und Lösungen werden autoklaviert. Die LB-MgCl<sub>2</sub>-Platten werden, wie in 2.3.2 beschrieben, gegossen und bei 4°C gelagert. Die TfbI- und TfbII-Lösungen werden vor der Verwendung auf Eis gekühlt.

### 2.3.4.2 Kompetenzkontrolle

Mit Hilfe einer Standard-DNA-Reihe (Lambda-DNA, NEB, Frankfurt) wird die Kompetenz der JM 101-Zellen überprüft. Es werden sieben DNA-Standard-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-3</sup> µg/µl (1 fg/µl – 1 ng/µl) verwendet. Die Selektion erfolgt über eine Ampicillin-Resistenz. Die Transformation erfolgt wie unter 2.3.5.1 beschrieben. Es werden je 2 µl DNA zu 50 µl kompetenten Zellen pipettiert und für die 60 minütige Inkubation jeweils 348 µl LB-Medium zugefügt. 100 µl dieser Ansätze, die 0.5 µl der Standard-DNA-Lösungen enthalten, werden ausplattiert. Die Kolonien auf den Platten werden ausgezählt und geben Aufschluss darüber, wieviele Zellen DNA aufgenommen haben. Erfahrungswerte für gute Kompetenz liegen bei einer Kolonie aus 5 fg/µl - 0.05 pg/µl transformierter DNA.

### 2.3.5 Transformation

Die porösen Membranen kompetenter Zellen ermöglichen diesen die Aufnahme von Fremd-DNA. Dies gelingt nur dann, wenn die Zellen zuvor nicht aufgetaut werden, da sich die Löcher in den Zellmembranen durch den Hitzeschock wieder schließen. Aus diesem Grund werden die Bakterien während der Durchführung konstant auf Eis gehalten.

Für die Transformation werden entweder fertige Plasmide oder Ligationsansätze verwendet. Im Anschluss an eine Transformation wird entweder eine Kontrolle der Transformanden (nach einer vorangegangenen Ligation) durchgeführt oder eine einzelne Kolonie auf eine neue LB-Amp-Platte überimpft.

#### 2.3.5.1 Transformation von JM101-Zellen

50 µl kompetente Zellen (2.3.4.1) werden aus -80°C 15 Min. auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen werden etwa 2.5 µl Plasmid-DNA (2.4.2) oder 5 µl Ligationsansatz (2.4.11) gegeben und das Eppendorf-Reaktionsgefäß gut angeschnippt. Als Negativkontrolle wird ein zusätzliches Zell-Aliquot mit sterilem Aqua dest. versetzt. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis werden die Ansätze 5 Min. bei RT inkubiert. Durch die Erwärmung schließen sich die Löcher in den Zellmembranen. Die Ansätze werden mit jeweils 225 µl LB-Medium (ohne Ampicillin, 2.3.2), das zuvor auf 37°C vorgewärmt wird, versetzt und 60 Min. bei 37°C im Drehrad (Typ Rotator, Bachofer GmbH, Reutlingen) inkubiert. 100 µl der Zellen werden auf warmen LB-Amp-Platten (2.3.2) mit Hilfe eines Triggalski-Spatels ausgestrichen und ü/N bei 37°C im Wärmeschrank (Typ B 50, Memmert, Schwabach) inkubiert. Die Inkubationszeit sollte nicht mehr als etwa 14 Std. betragen, um die Entstehung von Satellitenkolonien zu vermeiden. Hierbei handelt es sich um nicht transformierte Zellen, deren Wachstum zunächst durch das Ampicillin im Medium unterdrückt wird. Die Satellitenkolonien sind kleiner als die Kolonien transformierter Bakterien und entstehen kreisförmig um diese herum, sobald das Antibiotikum in deren Umgebung durch die β-Lactamase gespalten worden ist.

### 2.3.5.2 Transformation von BL21(DE3)(pLysE)- und Rosetta(DE3)-Zellen

20 µl kompetente Zellen (-80°C, 2.3.1) werden 2 - 5 Min. auf Eis aufgetaut. Zu diesen 20 µl wird 1 µl DNA-Lösung (2.4.2) gegeben und das Eppendorfreaktionsgefäß gut angeschnippt. Für eine Negativkontrolle kann steriles Aqua dest. verwendet werden. Die Ansätze werden 5 Min. auf Eis inkubiert und anschließend 30 sec., ohne Erschütterung, bei 42°C im Wasserbad (Thermomix® MM, B. Braun Biotech International, Melsungen) inkubiert. Einer 2minütigen Inkubation auf Eis folgt die Zugabe von 80 µl SOC-Medium (2.3.2) und die Inkubation im Drehrad bei 37°C über 60 Min. 5 - 50 µl der Zellen werden auf vorgewärmte LB-Amp-Platten (2.3.2) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

### 2.3.6 Screening der Bakterienkolonien

Im Anschluss an die Transformation nach einer Ligation werden einzelne Kolonien gepickt und auf das gewünschte Insert hin überprüft.

Einen ersten Hinweis auf den Versuchserfolg liefert das Verhältnis der Kolonieanzahl in der Ligationsprobe zur Ligationskontrolle. Bei erfolgreicher Ligation sollten auf der Probenplatte deutlich mehr Kolonien zu zählen sein als in der Kontrolle. Im optimalen Fall wachsen auf der Kontrollplatte keine Kolonien.

Etwa 10 – 30 Kolonien werden gepickt, die Pipettenspitzen gründlich in je 10 µl sterilem Aqua dest. (in Eppendorfreaktionsgefäßen aliquotiert) geschwenkt und in je 5 ml steriles LB-Amp-Medium (2.3.2) abgeworfen. Die LB-Amp-Reagenzgläser werden bei 37°C im Drehrad im Wärmeschrank inkubiert. Von positiven Klonen werden anschließend aus diesen Flüssigkulturen Agarplatten angeimpft (2.3.3).

5 der 10 µl Bakterienwasser werden anstelle der Template-DNA in eine PCR (2.4.4) eingesetzt. Für die Überprüfung der korrekten Insertion und Orientierung des ligierten DNA-Fragments in den Vektor werden geeignete Primer für die PCR gewählt. Enthält der gewünschte Klon eine neue Schnittstelle, wird ein PCR-Fragment mit Hilfe eines flankierenden Primerpaares amplifiziert und anschließend restringiert (2.4.5). Die Ausrichtung eines Inserts wird mit einem Primer im Insert und einem *antisense*-Primer im Vektor kontrolliert. Hier kann nur dann eine Amplifikation stattfinden, wenn das DNA-Stück in richtiger Orientierung eingefügt worden ist. Restriktions- und PCR-Ansätze werden zur Visualisierung auf Agarosegele (2.4.7) aufgetragen und fotografiert.

### 2.3.7 Dauerkulturen

5 ml Vorkulturen werden wie in 2.3.3 beschrieben ü/N inkubiert. Zur Vereinfachung können die hier benötigten kleinen Volumina auch aus den 50 ml ü/N-Kulturen für eine Plasmidpräparation (2.4.2) entnommen werden. Je 400 µl Vorkultur werden mit 600 µl Glycerin (80 %) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.4.1 Klone

Die Bezeichnungen der Klone setzen sich aus den Kurzbezeichnungen von Vektor und Protein-Gen zusammen. Weitere Namenszusätze geben Auskunft über eingeführte neue Schnittstellen, Aminosäuren oder funktionelle Anhänge, wie z.B. His-Tags. Einige Klone haben bei der Herstellung Trivialnamen oder Nummerierungen erhalten, die in Klammern angegeben sind. Positionsangaben beziehen sich auf die Nukleotide des *sense*-Stranges in 5'→3'-Richtung ab dem Beginn des ORF des entsprechenden Gens. Die Klone pDS12-ppoA und pBSCKS(+)-PhxA sind von E. Harel (Hebrew University of Jerusalem, Department of Plant Sciences, Israel) bzw. A. Sokolenko und R. Herrmann (Allgemeine und Molekulare Botanik, LMU, München) zur Verfügung gestellt worden. Der pT7-7-Vektor wurde von S. Tabor (Boston, MA, USA) hergestellt. Die Lhcb1-Klone dienen als Quelle für den zur Klonierung verwendeten pDS12-RBSII-2-Vektor (D7f.3) und zur Herstellung von Kontrollproteinen (C3.2h, S3Ch (Hu4), S106C/V229C (ML1)) für verschiedene protein-biochemische Methoden. Alle Klonierungen werden in JM 101-Zellen (2.3.1) durchgeführt.

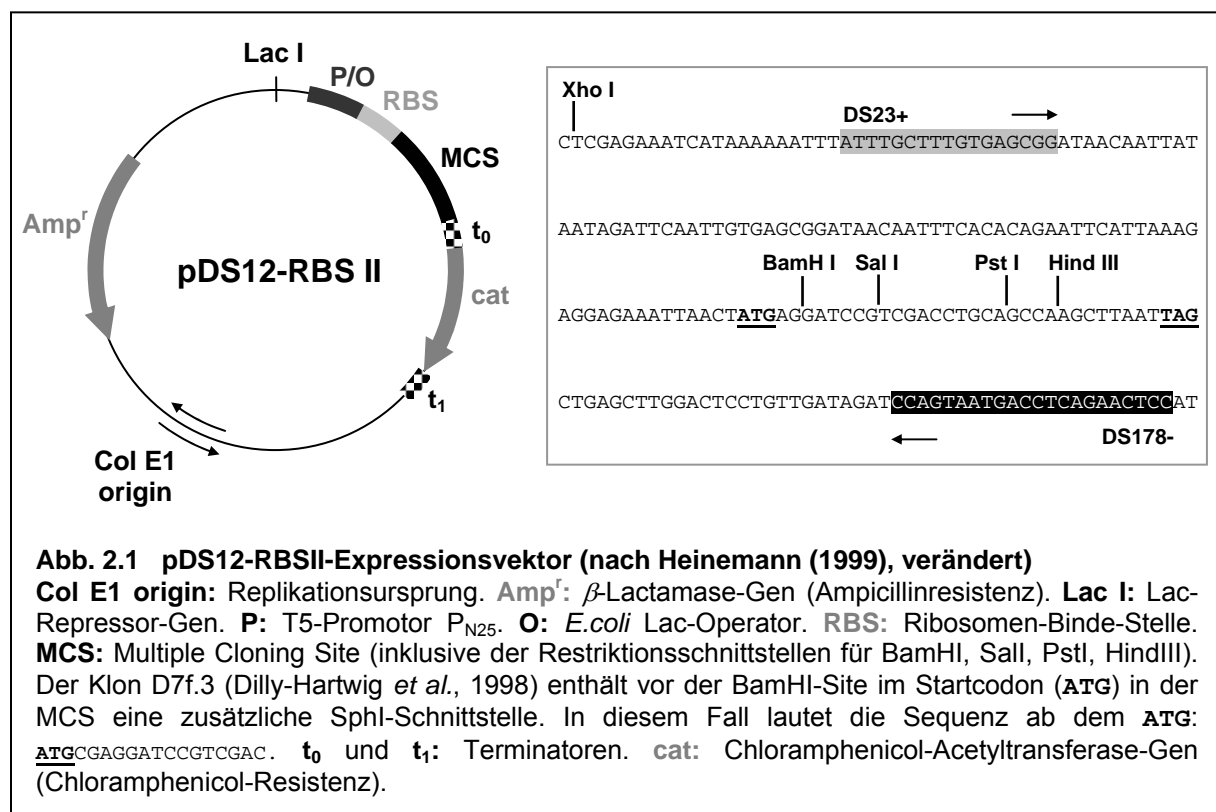
Bezeichnung	Charakterisierung	Herstellung/Hersteller
<b>ppoA-Gen aus Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)</b>		
pDS12-ppoA (Va)	ppoA in pDS12-RBSII-2	Harel E.
pDS12-ppoA-Nsil (2) (Nsi (2))	ppoA in pDS12-RBSII-2 mit Nsil-Schnittstelle an Position 1891	2.4.4.4 mit P <sub>M</sub> : ppoA-Nsi1+, P <sub>1</sub> : DS178-, P <sub>2</sub> : ppoA-EcoRV+. EcoRV-PstI-Restriktion, Ligation.
pDS12-ppoA-Strep (8)	pDS12-ppoA-Nsil mit Strep-Tag-Insert in der Nsil-Schnittstelle	Hybridisierte Primer Strep+/Strep- in pDS12-ppoA-Nsil, Nsil-restringiert
pDS12-ppoA-His (1) (Nsil-His (1))	pDS12-ppoA-Nsil mit His-Tag-Insert in der Nsil-Schnittstelle	Hybridisierte Primer Nsil-His+/Nsil-His- in pDS12-ppoA-Nsil, Nsil-restringiert
<b>PhxA-Gen aus Spinat (<i>Spinacia oleracea</i>)</b>		
pBSCKS(+)-PhxA	PhxA in T3→T7-Orientierung in der EcoRI-Stelle in pBSCKS(+)	Sokolenko <i>et al.</i> (1995)
pBSCKS(+)-PhxA-SphI (2) (PhxA-SphI (2))	pBSCKS(+)-PhxA mit SphI-Schnittstelle an Position 3	2.4.4.4 mit P <sub>M</sub> : PhxA-SphI+, P <sub>1</sub> : T3- und P <sub>2</sub> : PhxA-Bsu36I+. Bsu36I-HindIII-Restriktion, Lig.
pDS12-PhxA (J)	PhxA in pDS12	SphI-PstI-Fragment aus Klon pBSCKS(+)-PhxA-SphI in D7f.3 SphI-PstI-restringiert
pDS12-PhxA-ApaI (4)	pDS12-PhxA mit ApaI-Schnittstelle an Position 1913	2.4.4.4 mit P <sub>M</sub> : PhxA-ApaI-, P <sub>1</sub> : PhxA-EcoNI+, P <sub>2</sub> : DS178-. EcoNI-PstI-Restriktion, Ligation
pDS12-PhxA-His (30)	pDS12-PhxA-ApaI mit His-Tag-Insert in der ApaI-Schnittstelle	Hybridisiertes Primerpaar ApaI-His+/ApaI-His- in pDS12-PhxA-ApaI, ApaI-restringiert

Bezeichnung	Charakterisierung	Herstellung/Hersteller
<b>PhxA-Gen aus Spinat (<i>Spinacia oleracea</i>)</b>		
pDS12-PhxA-His-Arg2 (C)(G)	pDS12-PhxA-His mit Pro-Arg-Austausch an AS-Position 2	2.4.4.4 mit P <sub>M</sub> : PhxA-SphI-Arg-, P <sub>1</sub> : DS23+ und P <sub>2</sub> : PhxA-Bsu36I+. SphI-Bsu36I-Restriktion, Ligation
pDS12-PhxA-His-Arg2-ppoA	pDS12-PhxA-His-Arg2 mit Insert aus 7 AS zwischen dem MCS-ATG und dem ATG des ppoA-Gens aus pDS12-ppoA	Hybridisiertes Primerpaar PhxA-ppoA+/PhxA-ppoA- in pDS12-PhxA-His-Arg2, SphI-restringiert
pDS12-PhxA-His-NdeI (3) (pDSv.3)	pDS12-PhxA-His mit NdeI-Schnittstelle an Position -1	2.4.4.4 mit P <sub>M</sub> : PhxA-NdeI-, P <sub>1</sub> : PhxA-XhoI+, P <sub>2</sub> : PhxA-Bsu36I+. XhoI-Bsu36I-Restriktion, Ligation
pT7-7-PhxA-His (7)	PhxA-His in pT7-7	NdeI-HindIII-Fragment aus Klon pDS12-PhxA-His-NdeI, in pT7-7, NdeI-HindIII-restringiert
<b>Lhcb1-Gen aus Erbse (<i>Pisum sativum</i>)</b>		
C3.2h	Lhcb1 mit (C-terminalem) His <sub>6</sub> -Tag am 3'-Ende des Gens im pDS12-RBSII-Vektor	Kosemund (1999)
D7f.3	Lhcb1 ( <i>cab</i> -Gen AB80 aus <i>P. sativum</i> ) in pDS12-RBSII-2 (Wildtyp-Lhcb1)	Dilly-Hartwig <i>et al.</i> (1998)
S3Ch (Hu4)	Lhcb1 mit (C-terminalem) His <sub>6</sub> -Tag und singulärem Cys am N-Terminus, C79S, S3C	Huschenbett (2001)
S106C/V229C (ML1)	Lhcb1 ohne His <sub>6</sub> -Tag-Sequenz, S106C, V229C	Lion (2005)
<b>Vektoren ohne Proteingene</b>		
pDS12-leer	pDS12-Vektor ohne Proteingen	Mick (2004)
pT7-7 (a)	leerer pT7-7-Vektor	Tabor und Richardson (1985)
<p><b>Tab. 2.1 Verwendete Klone</b>  P<sub>M</sub>: Mutagenese-Primer. P<sub>1</sub>: gegenläufiger Primer für die 1.PCR. P<sub>2</sub>: gegenläufiger Primer für die 2.PCR (2.4.4.4, Abb. 2.10). Die Herstellung der einzelnen Konstrukte wird in Kapitel 2.4.1.2 beschrieben. Erläuterungen zur Herkunft und Benennung der Klone im Text.</p>		

### 2.4.1.1 Vektoren

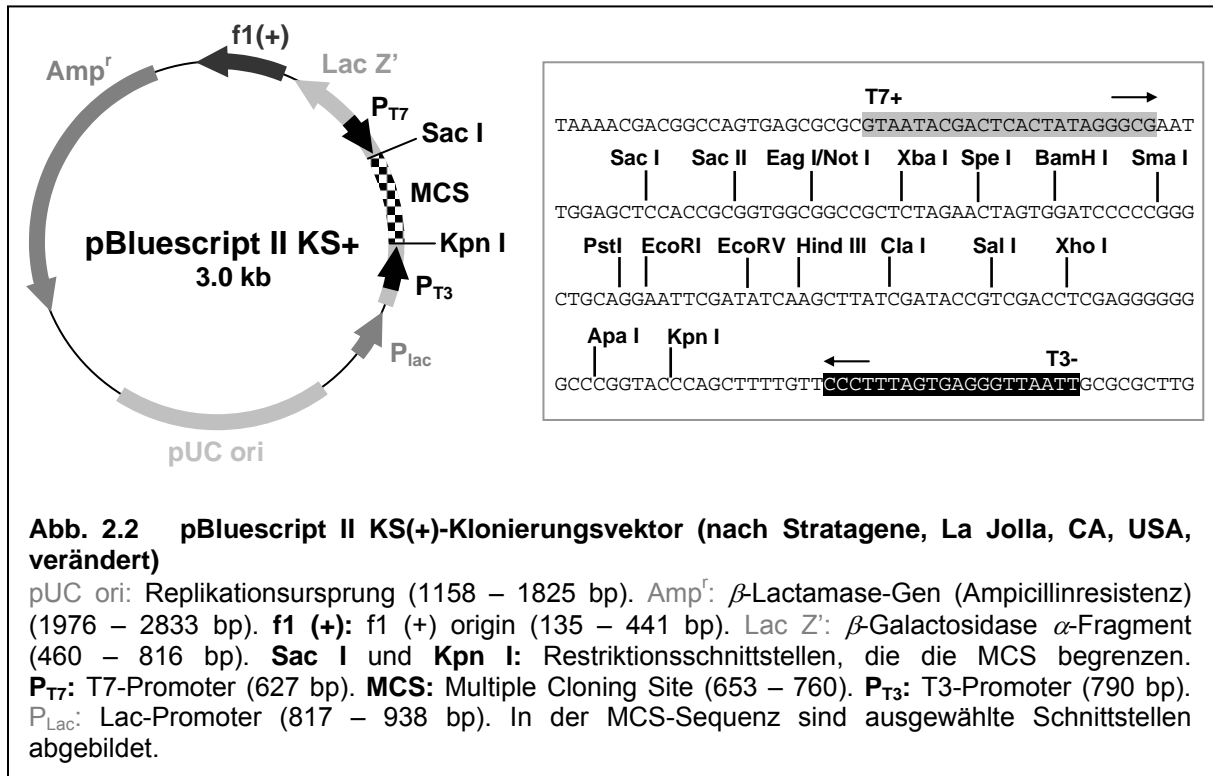
#### pDS12-RBS II

Im pDS12-RBS II-Vektor (Abb 2.1), einem Expressionsvektor aus der pDS12-Reihe (Bujard *et al.*, 1987), wird die Expression durch einen starken Promotor aus dem T5-Phagen ( $P_{N25}$ ) reguliert, der unter der Kontrolle des Lac-Operons steht. Nach Induktion mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid), einem Lactose-Analogen, erfolgt die Überexpression des in die MCS (Multiple Cloning Site) inserierten Protein-Gens mit Hilfe der *E.coli*-eigenen RNA-Polymerase. Zusätzlich enthält das Plasmid ein Gen für eine  $\beta$ -Lactamase ( $Amp^r$ ), die den  $\beta$ -Lactam-Ring des Ampicillin spaltet (Sikorski und Peters, 1998) und den transformierten Bakterien das Wachstum in Gegenwart dieses Antibiotikums erlaubt. Weitere Charakteristika des Vektors sind in Abb 2.1 erläutert. Mit dem pDS12-Plasmid werden JM101-Zellen transformiert (2.3.1), alle Versuche mit dem ppoA-Gen aus Tomate (siehe Kapitel 3.3) und einige Expressionsversuche mit dem Spinat-PhxA-Gen (3.4.2) durchgeführt.



#### pBSCKS(+) = pBluescript II KS (+)

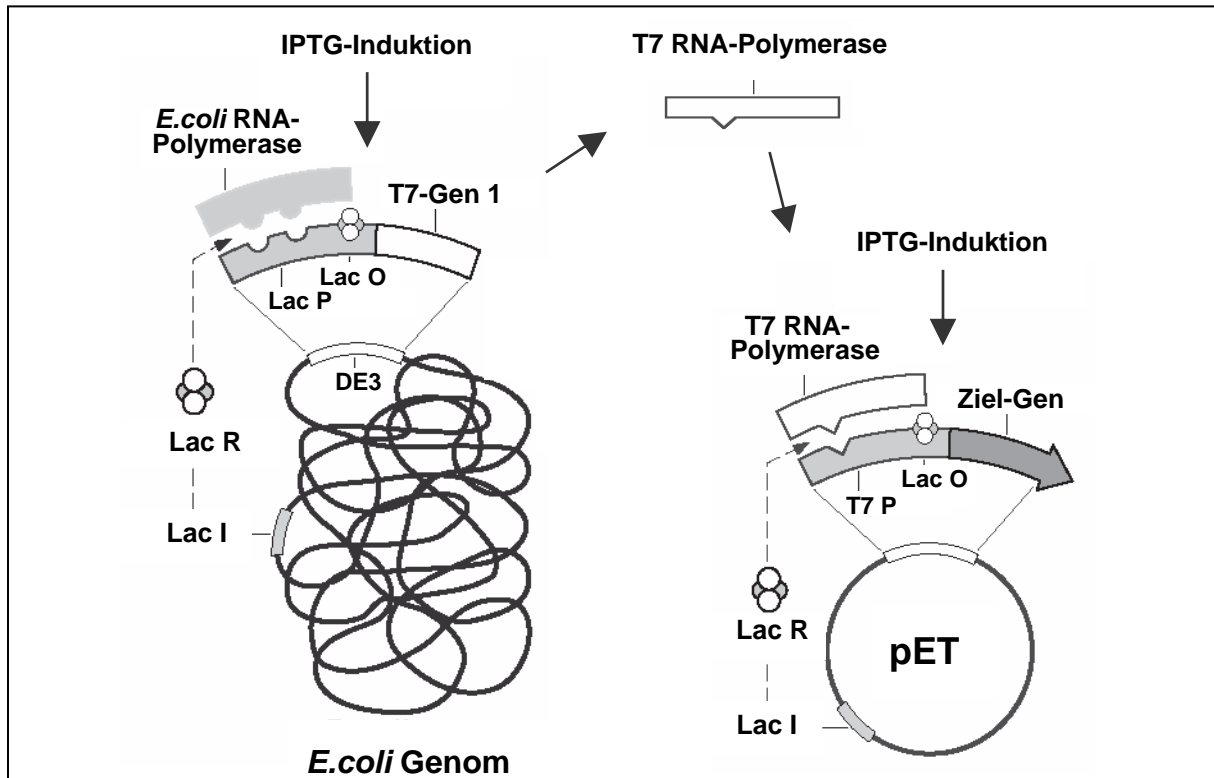
Bei dem pBluescript II KS (+)-Plasmid (Abb 2.2) handelt es sich um einen reinen Klonierungsvektor, dem die entscheidenden Bestandteile für die Protein-Expression fehlen. Die MCS beinhaltet eine Vielzahl an Restriktionsschnittstellen und, ebenso wie im pDS12-Vektor, ist ein Ampicillin-Resistenz-Gen ( $\beta$ -Lactamase) vorhanden. Das PhxA-Gen aus Spinat wird von A. Sokolenko und R. Herrmann (Allgemeine und Molekulare Botanik, LMU, München), einkloniert in die EcoRI-Schnittstelle, zur Verfügung gestellt und in dieser Form in *E.coli*-JM101-Zellen (2.3.1) eingebracht.



### pT7-7

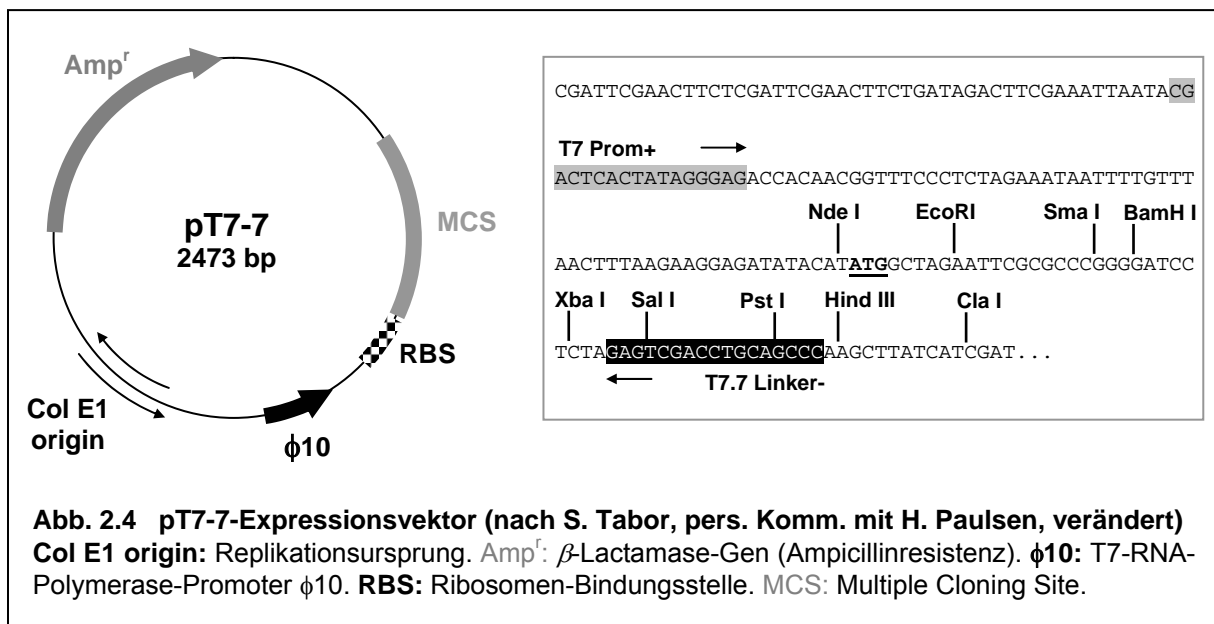
Der pT7-7-Vektor wurde von Tabor und Richardson (1985) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um einen Vorläufer des heute bekannten pET-Vektor-Systems (Abb 2.3). Dieses Expressionssystem macht sich die spezifische Interaktion der RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen mit dem starken T7-Promotor auf dem pET-Plasmid zunutze (Studier und Moffatt, 1986). Durch den Einsatz dieser zusätzlichen, bakterienfremden RNA-Polymerase kann die Expression des gewünschten Protein-Gens gezielt gesteuert werden. pET-Vektoren können nur in Verbindung mit Bakterienstämmen verwendet werden, deren Genom einen Abschnitt mit dem T7-Gen 1 (DE3) enthält, welches für die T7-RNA-Polymerase codiert und von der bakteriellen RNA-Polymerase transkribiert wird. Sowohl die *E.coli*-eigene als auch die Phagen-RNA-Polymerase werden über ein Lac-Operon reguliert und durch IPTG induziert.

Im pT7-7-Vektor (Abb. 2.4) wird die Expression über den  $\phi$ 10-T7-RNA-Polymerase-Promotor reguliert und die Ampicillin-Resistenz durch ein  $\beta$ -Lactamase-Gen gewährleistet. Dieses Plasmid dient als alternativer Expressionsvektor für das PhxA-Gen aus Spinat (3.4.3) und wird nach der Klonierung in JM101-Zellen (2.3.1) für die Überexpression in Verbindung mit den *E.coli*-Stämmen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysE und Rosetta(DE3) (2.3.1) der Firma Novagen/Merck (Darmstadt) verwendet.



**Abb. 2.3 pET-Vektor-Expressionssystem** (plasmid for expression by T7 RNA polymerase (nach pET System Manual (2002), Novagen/Merck, Darmstadt, verändert)

**Lac I:** Lac I-Repressor-Gen. **Lac O:** Lac-Operator. **Lac P:** Lac-Promotor. **Lac R:** Lac-Repressor. **DE3:** Abschnitt des Genoms aller DE3-Stämme, der das T7-Gen 1 unter Kontrolle des Lac-Operators enthält. **T7-Gen 1:** codiert für die T7-RNA-Polymerase. **T7 P:** T7-Promotor. Erläuterungen im Text.



**Abb. 2.4 pT7-7-Expressionsvektor** (nach S. Tabor, pers. Komm. mit H. Paulsen, verändert)

**Col E1 origin:** Replikationsursprung. **Amp<sup>r</sup>:**  $\beta$ -Lactamase-Gen (Ampicillinresistenz).  **$\phi$ 10:** T7-RNA-Polymerase-Promoter  $\phi$ 10. **RBS:** Ribosomen-Bindungsstelle. **MCS:** Multiple Cloning Site.

### 2.4.1.2 Herstellung der Klone

Im Verlauf einer Klonierung werden DNA-Fragmente zu intakten Plasmiden zusammengefügt, die in Bakterienzellen entweder für weitere Modifikationen vermehrt oder im Falle von Expressionsvektoren zur Überexpression eines Proteins verwendet werden können. Im einfachsten Fall werden zwei unterschiedliche Plasmide mit identischen Restriktionsenzymen verdaut (2.4.5) und anschließend die entstandenen DNA-Fragmente neu zusammengesetzt (2.4.11). Mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese nach Chen und Przybyla (1994) können über zwei PCR-Reaktionen (2.4.4) wenige Basen innerhalb eines DNA-Abschnitts verändert werden (2.4.4.4). Nach entsprechender Restriktion des Vektors und des PCR-Produktes, das die Mutation trägt, wird dieses Insert wieder in den ursprünglichen Vektor eingefügt. Tab. 2.2 zeigt den Ablauf einer solchen Klonierung.

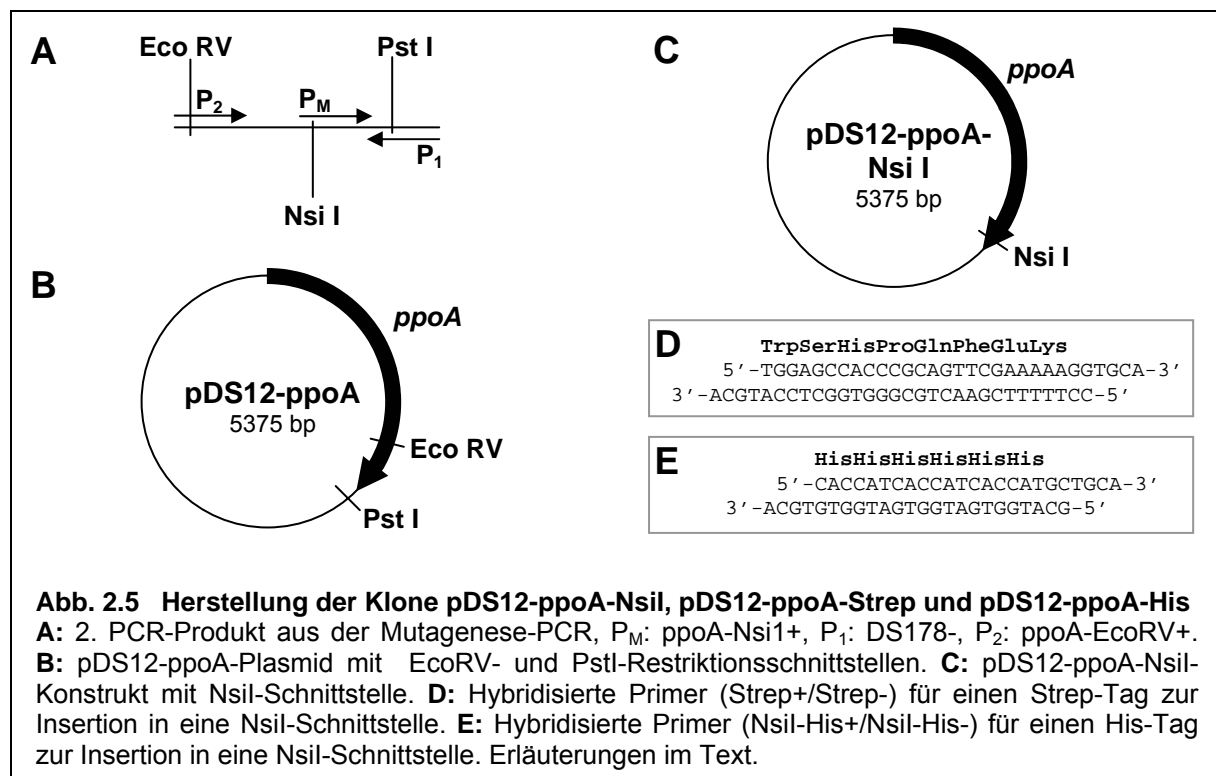
	Insert	Vektor	
Einführung der Mutation	1. PCR		
Aufreinigung	Analytisches/Präparatives Gel DNA-Extraktion Quantifizierung		
Vervollständigung des Inserts	2.PCR		
Aufreinigung	Analytisches/Präparatives Gel DNA-Extraktion Quantifizierung		
Identische Restriktionsenzyme	Restriktion		Restriktion
Verhinderung der Religation			Dephosphorylierung
Aufreinigung	Analytisches/Präparatives Gel DNA-Extraktion Quantifizierung	Analytisches/Präparatives Gel DNA-Extraktion Quantifizierung	
Verknüpfung der Fragmente	Ligation		
Selektion	Transformation		
Überprüfung des Konstruktes	Screening (PCR/Restriktion)		
Ausgangsmaterial	Präparation von Plasmid-DNA		
Endgültige Überprüfung	Sequenzierung		
Konservierung	Dauerkulturen		
Herstellung des Proteins	Expression		
<b>Tab. 2.2 Ablauf einer Klonierung</b> (Erläuterungen im Text)			

Als Ausgangsmaterial dient Plasmid-DNA (2.4.2), die in die PCR-Reaktionen (2.4.4) eingesetzt bzw. restringiert (2.4.5) und im Falle des Vektors dephosphoryliert wird (2.4.6). Die entstandenen Restriktionsfragmente werden im Verlauf einer Agarosegelelektrophorese (2.4.7) aufgetrennt, aus dem Gel eluiert, aufgereinigt (2.4.8) und in einem weiteren Gel quantifiziert (2.4.7.2). Jede Klonierung wird auf DNA-Ebene mit einer Ligation (2.4.11) der restringierten Vektor- und Insert-Fragmente abgeschlossen. Nach der Transformation (2.3.5) von *E.coli*-Zellen (JM101, 2.3.1) mit diesen Ligationsansätzen werden die entstandenen Bakterienkolonien auf das gewünschte Konstrukt hin überprüft. Dieses Screening erfolgt, wie in 2.3.6 beschrieben, mit Hilfe einer PCR und/oder Restriktion und anschließender Visualisierung im Agarosegel. Abschließend werden die vielversprechendsten Klone entweder mit einem PCR-Produkt, das den kritischen Bereich umfasst, oder mit Plasmid-DNA als Template sequenziert (2.4.12) und in Form von Dauerkulturen (2.3.7) aufbewahrt.



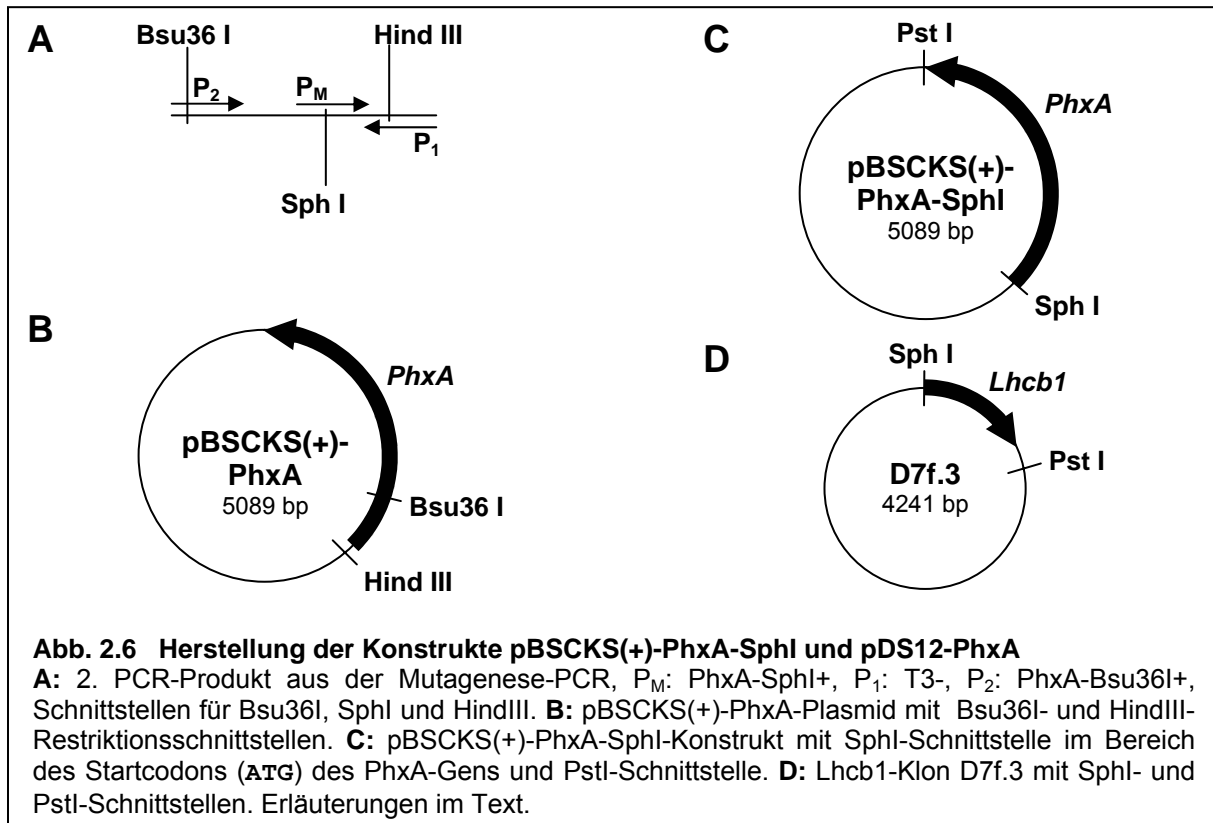
### pDS12-ppoA-NsiI, pDS12-ppoA-Strep und pDS12-ppoA-His

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR (2.4.4.4) zur Einführung einer NsiI-Schnittstelle mit ppoA-Nsi1+ als Mutagenese-Primer ( $P_M$ ), DS178- als Gegenprimer für die erste PCR ( $P_1$ ) und ppoA-EcoRV+ als Gegenprimer in der zweiten PCR ( $P_2$ ) werden sowohl das 2. PCR-Produkt als auch der pDS12-ppoA-Vektor EcoRV/PstI-restringiert und nach der Vektor-Dephosphorylierung ligiert. Das entstandene Konstrukt pDS12-ppoA-NsiI (Abb. 2.5) wird mit NsiI geschnitten, dephosphoryliert und mit dem hybridisierten Primerpaar für einen Strep-Tag (Strep+/Strep-) oder His-Tag (NsiI-His+/NsiI-His-) ligiert. Aus Bakterien, die mit diesen Konstrukten (pDS12-ppoA-Strep (5405 bp) und pDS12-ppoA-His, 5399 bp) transformiert worden sind, sollten PPO-Proteine mit C-terminalem Strep- bzw. His-Tag isoliert werden (3.3.2 und 3.3.3).



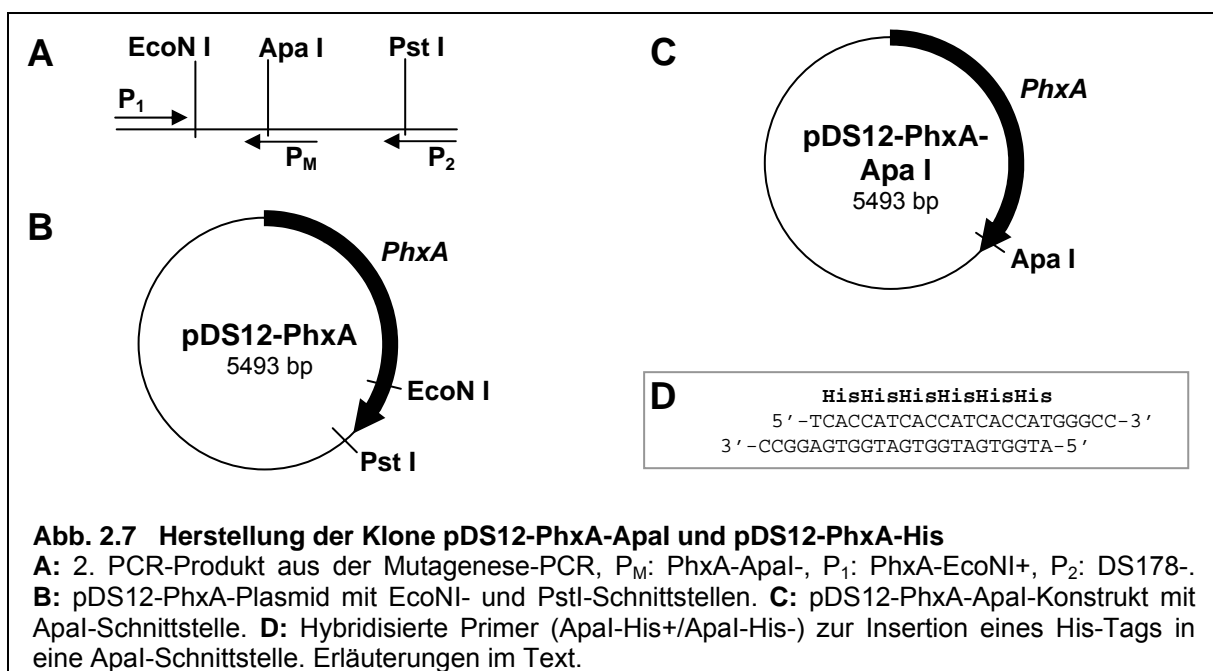
### pBSCKS(+)-PhxA-SphI und pDS12-PhxA

Durch Mutagenese-PCRs ( $P_M$ : PhxA-SphI+,  $P_1$ : T3-,  $P_2$ : PhxA-Bsu36I+) und anschließende Bsu36I/HindIII-Restriktion und Ligation des 2. PCR-Produktes sowie des pBSCKS(+)-PhxA-Plasmids wird eine SphI-Schnittstelle innerhalb des Stratcodons (ATG) des PhxA-Gens erzeugt (Abb. 2.6). Das SphI/PstI-Fragment aus dem Klon pBSCKS(+)-PhxA-SphI wird in das Vektor-Fragment von D7f.3 (Dilly-Hartwig *et al.*, 1998, SphI/PstI-restringiert, dephosphoryliert) inseriert und somit das PhxA-Gen in den pDS12-Expressionsvektor überführt (3.4.2.1). Das entstehende Konstrukt trägt die Bezeichnung pDS12-PhxA und hat eine Länge von 5493 bp.



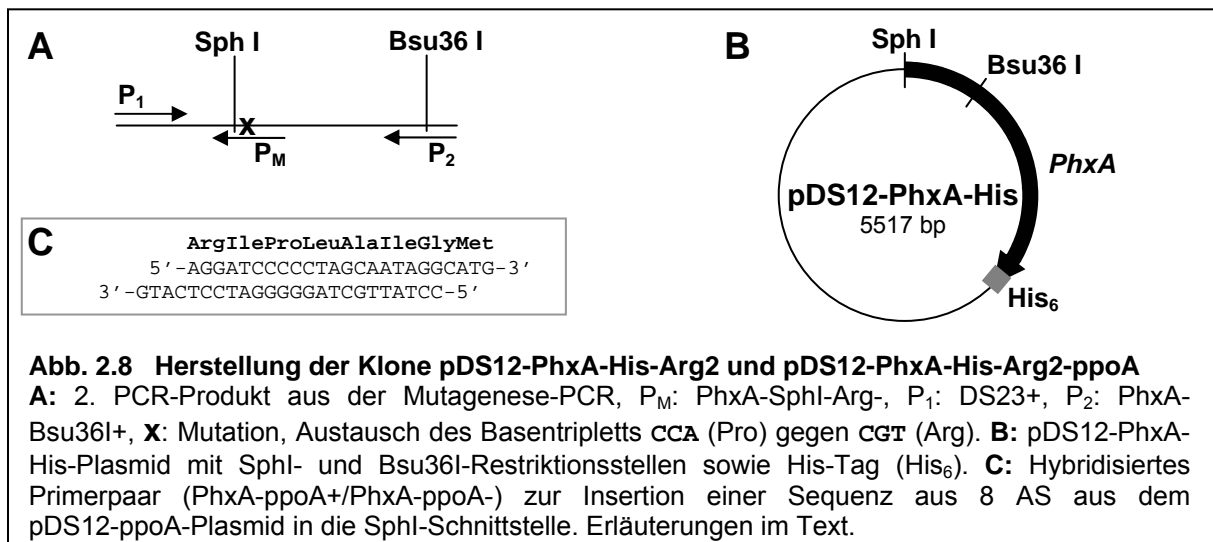
### pDS12-PhxA-ApaI und pDS12-PhxA-His

Kurz vor dem Stop-Codon des PhxA-Gens im pDS12-PhxA-Konstrukt wird durch eine ortserichtete Mutagenese (2.4.4.4, P<sub>M</sub>: PhxA-ApaI-, P<sub>1</sub>: PhxA-EcoNI+, P<sub>2</sub>: DS178, EcoNI/PstI-Restriktion und Ligation nach Dephosphorylierung des Vektors) eine ApaI-Schnittstelle eingefügt (Abb. 2.7), in die anschließend das hybridisierte Primerpaar ApaI-His+/ApaI-His- inseriert werden kann. Mit dem Klon pDS12-PhxA-His (5517 bp, Abb. 2.8 B) lässt sich ein PPO A-Protein mit C-terminalem His-Tag herstellen (3.4.2.2).



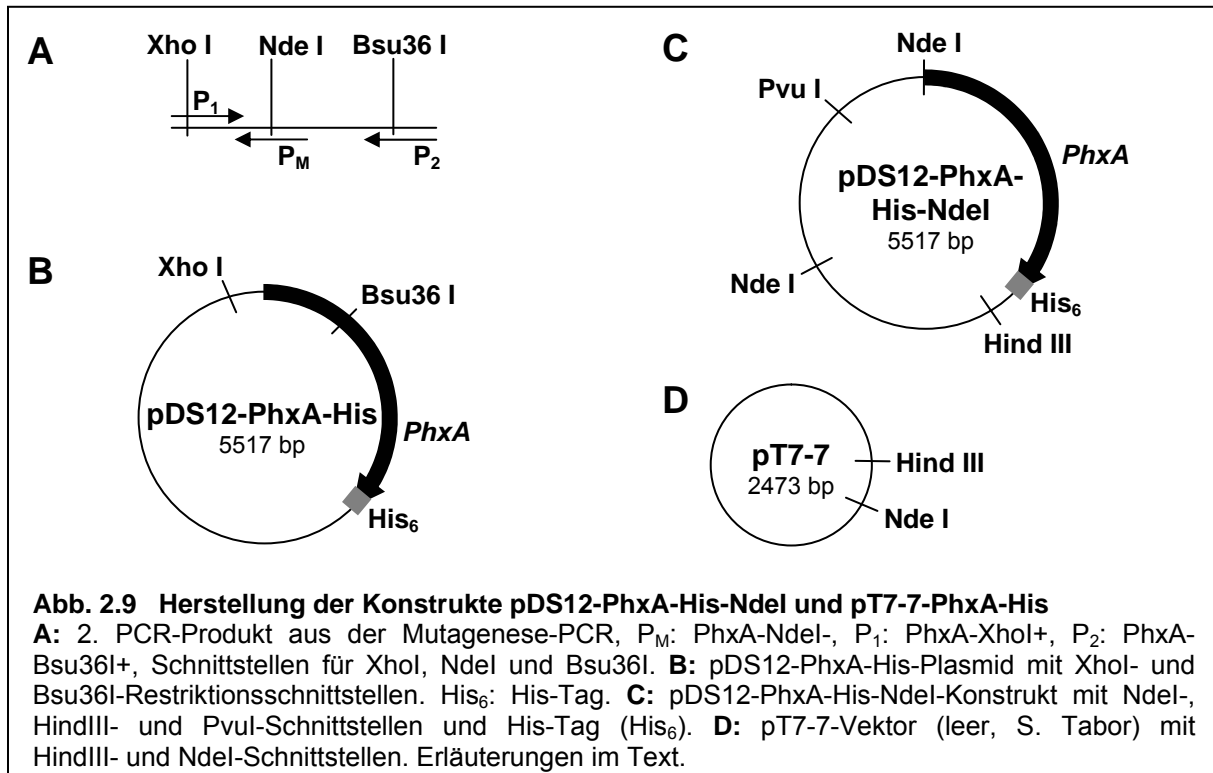
### pDS12-PhxA-His-Arg2 und pDS12-PhxA-His-Arg2-ppoA

Der DNA-Abschnitt rund um das Start-Codon (ATG) eines Gens ist für eine erfolgreiche Expression des entsprechenden Proteins von entscheidender Bedeutung. Für den Klon pDS12-PhxA-His-Arg2 (5517 bp) wird durch eine Mutagenese über zwei PCR-Runden ( $P_M$ : PhxA-SphI-Arg-,  $P_1$ : DS23+ und  $P_2$ : PhxA-Bsu36I+) und anschließende SphI/Bsu36I-Restriktion und Ligation das Prolin-Codon (CCA) aus pDS12-PhxA-His gegen ein Arginin-Triplett (CGT) ausgetauscht (Abb. 2.8). Das mit diesem Konstrukt hergestellte Protein enthält dann an Aminosäureposition 2 einen Arginin-Rest (3.4.2.2). Ergänzend zu dieser Modifikation ist im pDS12-PhxA-His-Arg2-ppoA-Plasmid (5541 bp) eine Sequenz aus acht zusätzlichen Aminosäure-Codons aus dem Bereich des ATG des pDS12-ppoA-Konstruktes (Abb. 2.5) enthalten. Auf diese Weise entspricht der Anfangsbereich des PhxA-Gens dem des im pDS12-Vektor gut exprimierten ppoA-Gens (3.4.2.3). Das für die AS-Sequenz Arg-Ile-Pro-Leu-Ala-Ile-Gly-Met codierende DNA-Fragment wird in Form eines hybridisierten Primerpaares (PhxA-ppoA+/PhxA-ppoA-) in die SphI-Schnittstelle des pDS12-PhxA-His-Arg2-Konstruktes einligiert.



### pDS12-PhxA-His-NdeI und pT7-7-PhxA-His

Um die *E.coli*-Zelllinien BL21(DE3), BL21(DE3)pLysE und Rosetta(DE3) (2.3.1) für die Überexpression verwenden zu können, muss das PhxA-Gen aus dem pDS12-PhxA-His-Plasmid zunächst in einen passenden Vektor (pT7-7) überführt werden (2.4.1.1). Die dafür benötigte NdeI-Schnittstelle wird durch Mutagenese-PCRs mit den Primern PhxA-NdeI- ( $P_M$ ), PhxA-XhoI+ ( $P_1$ ) und PhxA-Bsu36I+ ( $P_2$ ) und nachfolgende XhoI/Bsu36I-Restriktion sowie Ligation eingeführt (Abb. 2.9). Im Anschluss daran wird ein NdeI/HindIII/PvuI-Dreifachverdau dieses Konstruktes (pDS12-PhxA-His-NdeI) durchgeführt und das NdeI/HindIII-Fragment (2129 bp), das im Agarosegel von den anderen wesentlich kleineren Restriktions-Fragmenten (1213 bp, 1440 bp, 735 bp) abgetrennt wird, in den NdeI/HindIII-restringierten und dephosphorylierten pT7-7-Vektor (2423 bp) einligiert. Mit dem Ligationsansatz werden zunächst JM101-Zellen transformiert. Erst im Anschluss an die Überprüfung des Klonierungserfolges werden mit dem aus diesen Zellen aufgereinigten pT7-7-PhxA-His-Plasmid (4552 bp) die alternativen Zelllinien von Novagen/Merck (Darmstadt) transformiert und zur Überexpression verwendet (3.4.3).



## 2.4.2 Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wird mit Hilfe des Extraktionskits Nucleobond<sup>®</sup> AX 100 (Macherey-Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Bakterienzellen aus 50 ml ü/N-Kultur (2.3.3) werden 5 Min. bei 4°C und 5000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) sedimentiert, resuspendiert (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) und mit 1 % SDS und 200 mM NaOH lysiert. Durch Zugabe von 2.8 M KAc, pH 5.0 wird chromosomale DNA präzipitiert und durch 25 Min. Zentrifugation bei 4°C und 11000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) abgetrennt. Auf der Nucleobond<sup>®</sup>-Ionenaustauscher-Säule (äquibriert mit 100 mM TRIS/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, pH 6.3, 0.15 % Triton X-100) wird die DNA aus dem Überstand gebunden, gewaschen (100 mM TRIS/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15 % Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3) und eluiert (100 mM TRIS/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 15 % Ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5). Die gereinigte Plasmid-DNA wird mit einem 0.7fachen Volumen an Isopropanol (RT) gefällt und für 30 Min. bei 4°C und 12000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) pelletiert. Das DNA-Präzipitat wird mit 70 % Ethanol (-20°C) gewaschen, 10 Min. bei 4°C und 12000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert, getrocknet und in sterilem Aqua dest. aufgenommen. Eine gute Ausbeute liegt bei 50 µg Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkultur. Die DNA kann problemlos bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

### 2.4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von wässrigen Plasmid-DNA-Lösungen wird mit Hilfe eines Absorptionsphotometers (SPECTRAMaxPLUS, Software: SOFTmaxPRO<sup>®</sup>, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) in UV-Mikrotiterplatten (Greiner/VWR International GmbH, Darmstadt) bestimmt (PreRead-Modus und PathCheck, 2.5.2.1). Für die Dreifach-Bestimmungen sind Volumina von je 150 µl ausreichend. Nach den Angaben der SOFTmax<sup>®</sup>PRO-Software entspricht eine Absorption (A) oder Optische Dichte (OD) von  $OD_{[260\text{nm}]} = 1$  einer Konzentration von 38.1 µg/ml DNA in Wasser bzw. 50 µg/ml DNA in salzhaltigem Puffer. Eine akzeptable Reinheit einer DNA-Lösung ist gegeben, wenn der Quotient aus der DNA-Absorption bei 260 nm und der Proteinabsorption bei 280 nm  $OD_{[260\text{nm}]} / OD_{[280\text{nm}]} \geq 1.8$  beträgt.

### 2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Amplifikation von Nukleinsäuren, die von Mullis und Faloona (1987) entwickelt wurde. DNA-Polymerasen synthetisieren zu einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt einen komplementären, gegenläufigen Strang. Voraussetzung dafür ist ein freies 3'-OH-Ende eines kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnittes, das verlängert werden kann. Im ersten Schritt einer PCR-Reaktion wird doppelsträngige DNA bei 95°C in Einzelstränge denaturiert. Das Primer-*Annealing* erfolgt typischerweise bei der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) zwischen etwa 50 - 70°C, um eine optimale Hybridisierung der Oligonukleotide an den Template-Strang zu ermöglichen. Die Verlängerung der Primer (Elongation) wird bei 72°C, dem Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerasen, durchgeführt. Im Verlauf einer Reaktion entstehen so aus einem DNA-Doppelstrang zwei neue Doppelstränge, die jeweils einen Template-Strang und einen neu synthetisierten Strang enthalten. Durch die Verwendung thermostabiler Enzyme können meist 30 – 35 Zyklen dieser Reaktion hintereinander durchlaufen werden, was eine exponentielle Vervielfältigung des Templates zur Folge hat.

#### 2.4.4.1 DNA-Polymerasen

Als DNA-Polymerasen werden Enzyme eingesetzt, die sowohl in der Lage sind, bei 72°C lange DNA-Abschnitte in 5'→3'-Ausrichtung zu synthetisieren, als auch eine hohe Temperaturstabilität bei 95°C aufweisen. Für analytische Zwecke wird die *Taq*-DNA-Polymerase (PeQLab, Erlangen) verwendet, die ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, das in heißen Quellen lebt. Bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase entstehen während der Elongation  $2 \times 10^{-4}$  Fehler/Nukleotid (PeQLab, Erlangen). Das bedeutet, dass nach einer einmillionenfachen Amplifikation eines 200 bp langen Fragmentes in über 50 % der PCR-Produkte eine oder mehrere falsche Basen eingebaut sind. Dienen die Amplifikate nicht nur der Analyse, sondern sollen diese in Klonierungsexperimenten (2.4.4.4) weiter verwendet werden, wird die *Pwo*-DNA-Polymerase (PeQLab, Erlangen) eingesetzt. Dieses Enzym entstammt dem hyperthermophilen Tiefseebakterium *Pyrococcus woesei* und besitzt zusätzlich zu der 5'→3'-Polymeraseaktivität eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Diese so genannte *proof reading*-Funktion sorgt dafür, dass fehlerhaft eingebaute Nukleotide erkannt und durch erneute Polymerisation ausgetauscht

werden. Im Vergleich mit der *Taq*-DNA-Polymerase arbeitet die *Pwo*-DNA-Polymerase daher um einen Faktor 5 genauer, aber auch etwa 4mal langsamer, weshalb sich Elongationszeiten eventuell verlängern.

***Taq*-DNA-Polymerase** (PeQLab, Erlangen)

Konzentration: 5 U/μl  
Units/Reaktion: 1.25 U

**10 x *Taq*-Reaktionspuffer S**

100 mM TRIS/HCl, pH 8.8  
500 mM KCl  
15 mM MgCl<sub>2</sub>

***Taq*-Aufbewahrungspuffer**

20 mM TRIS/HCl, pH 8.0  
100 mM KCl  
0.2 mM EDTA  
55 % Glycerin  
0.5 % Tween 20  
0.5 % Nonidet P 40  
250 μ/ml Gelatine

***Pwo*-DNA-Polymerase** (PeQLab, Erlangen)

Konzentration: 1 U/μl  
Units/Reaktion: 2.5 U

**10 x *Pwo*-Reaktionspuffer**

100 mM TRIS/HCl, pH 8.8  
250 mM KCl  
20 mM MgSO<sub>4</sub>

***Pwo*-Aufbewahrungspuffer**

20 mM TRIS/HCl, pH 8.0  
100 mM KCl  
0.2 mM EDTA  
1 mM DTT  
0.5 % Nonidet P 40  
0.5 % Tween 20  
55 % Glycerin und Stabilisatoren

DNA-Polymerasen werden bei -20°C gelagert und sollten niemals aufgetaut werden.

#### 2.4.4.2 Primer und Oligonukleotide

Die Auswahl der Primer ist für das Gelingen einer PCR von entscheidender Bedeutung. Für die hier verwendeten sequenzspezifischen Primer, die komplementär zum DNA-Template sind, gelten die folgenden Syntheseregeln (Lottspeich, 1998). Die beiden Primer sollten aus etwa 17 - 28 Basen bestehen, über ein ausgeglichenes GC : AT-Verhältnis verfügen, eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur zwischen 55°C und 80°C besitzen und keine interne Komplementarität aufweisen, die zur Ausbildung von Hairpin-Strukturen oder Dimerbildung zwischen den beiden Oligonukleotiden führen könnte. Repetitive Abschnitte sind ebenfalls zu vermeiden. Bei Mutageneseprimern, mit deren Hilfe gezielte Basenaustausche in PCR-Fragmente eingeführt werden, sollten die Mismatches nach Möglichkeit etwa in der Mitte des Primers liegen.

Bei der Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wird im einfachsten Fall für jedes AT-Basenpaar ein Schmelzpunkt von 2°C und für jedes GC-Basenpaar ein Schmelzpunkt von 4°C zugrunde gelegt (Lottspeich, 1998). Die Formel zur Berechnung des  $T_m$  lautet demnach:

$$T_m = GC * \text{Primerlänge} * 4 + AT * \text{Primerlänge} * 2$$

wobei GC und AT die Gesamtzahlen der entsprechenden Basen in der Primersequenz sind. Diese Formel ist für Oligonukleotide mit bis zu 14 Basen gültig. Für Oligonukleotide mit mehr als 14 Basen gilt laut MWG Biotech (Ebersberg) ([www.mwg-biotech.com/html/all/index.php](http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.php)):

$$T_m = 69.3 + 0.41 * GC\% - 650/\text{Primerlänge}, \text{ mit } GC\% = \text{GC-Gehalt des Primers.}$$

Alle verwendeten Primer und Oligonukleotide werden in unmodifizierter, nicht phosphorylierter Form von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und in sterilem Aqua dest. in einer Konzentration von 100 pmol/µl aufgenommen.

Name	Sequenz	Beschreibung	T <sub>m</sub> [°C]
Apal-His-	5'-AT GGT GAT GGT GAT GGT GAG GCC-3'	Primer zur Einführung eines His <sub>6</sub> -Tags in eine Apal-Restriktionsschnittstelle	64.2
Apal-His+	5'-TCA CCA TCA CCA TCA CCA TGG GCC-3'		64.2
DS178-	5'-GGA GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-3'	Sequenzierprimer ca. 40 bp downstream der Pst-Schnittstelle in der MCS des pDS12-Vektors	60.3
DS23+	5'-ATT TGC TTT GTG AGC GG-3'	Sequenzierprimer upstream der MCS im pDS12-Vektor	50.4
DS340-	5'-CTT TAC GAT GCC ATT GGG-3'	Sequenzierprimer im pDS12-Vektor	53.7
Nsil-His+	5'-CAC CAT CAC CAT CAC CAT GCT GCA-3'	Primerpaar zur Einklonierung eines His <sub>6</sub> -Tags in eine Nsil-Schnittstelle	64.4
Nsil-His-	5'-GCA TGG TGA TGG TGA TGG TGT GCA-3'		64.4
PhxA-Apal-	5'-GAA ATA AAA TAC TTC ACT CGG GCC CGA TAC CAG-3'	Mutageneseprimer zur Einführung einer Apal-Schnittstelle 9 bp upstream des TGA im PhxA-Gen im pDS12-PhxA-Plasmid	68.2
PhxA-Bsu36I+	5'-CCC TCA CTC CCT AAG GCA GC-3'	überstreicht die Bsu36I-Schnittstelle im PhxA-Gen (PPO A aus Spinat), das in T3-T7-Richtung in die EcoRI-Schnittstelle in den pBSCKS(+)-Vektor einkloniert wurde	63.5
PhxA-EcoNI+	5'-GGG TAA GAA CAC TGT CCT CAA GTT GGC-3'	upstream der EcoNI-Schnittstelle im PhxA-Gen (PPO A aus Spinat), im pDS12-Vektor	66.5
PhxA-NdeI-	5'-GAG AGT TGG CAT ATG TAA TTT CTC C-3'	Mutageneseprimer zur Einführung einer NdeI-Schnittstelle im ATG des PhxA-Gens im pDS12-PhxA-His-Plasmid	59.7
PhxA-ppoA+	5'-AGG ATC CCC CTA GCA ATA GGC ATG-3'	Primerpaar zur Einklonierung von 8 AS (Arg-Ile-Pro-Leu-Ala-Ile-Gly-Met) vor dem Startcodon (ATG) des Gens aus dem pDS12-ppoA-Plasmid (PPO A aus Tomate) in die SphI-Schnittstelle des pDS12-PhxA-Plasmids (PhxA aus Spinat)	64.4
PhxA-ppoA-	5'-CCT ATT GCT AGG GGG ATC CTC ATG-3'		64.4
PhxA-Seq1+	5'-CCT CAT GTT CCA GCT TGT CTT CC-3'	Sequenzierprimer: Position 1219 bp im PhxA-pBSC KS(+)-Konstrukt	62.4
PhxA-Seq2-	5'-GGA TCT TAT CCG GTA CTC GG-3'	Sequenzierprimer: Position 2204 bp im PhxA-pBSC KS(+)-Konstrukt	59.4
PhxA-SphI+	5'-GAG AGT TGG CAT GCT GCA ACT AGC-3'	Mutageneseprimer zur Einführung einer SphI-Schnittstelle im ATG des PhxA-Gens (PPO A aus Spinat), das in T3-T7-Richtung in die EcoRI-Schnittstelle des pBSC KS(+)-Vektors einkloniert wurde	64.4

Name	Sequenz	Beschreibung	T <sub>m</sub> [°C]
PhxA-SphI-Arg-	5'-GAG AGT ACG CAT GCT TAA TTT C-3'	Mutageneseprimer zum Austausch des Prolins unmittelbar hinter dem Methionin (Start des PhxA-Proteins = PPO A aus Spinat) gegen ein Arginin	56.5
PhxA-XhoI+	5'-CCT TTC GTC TTC ACC TCG AG-3'	überstreicht die XhoI-Schnittstelle im pDS12-PhxA-His-Plasmid	59.4
ppoA-EcoRV+	5'-GGT ACC AAA GAA AGG TGA TAT CTC C-3'	Position: 1731 bp im ppoA-Gen, überstreicht die EcoRV-Schnittstelle	61.3
ppoA-Nsi1+	5'-AAT TTC CAT GCA TGA AAC TTG ATT TCC TTG-3'	Mutagenese-Primer zur Einführung einer Nsi I-Schnittstelle (ATGCAT) am 3'-Ende des ppoA-Gens (Tomate)	61.3
ppoA-Seq1+	5'-CCC TTC TGT GAC TAA GCT CCG-3'	Sequenzierprimer, Position: 368 bp im ppoA-Gen aus Tomate	61.8
ppoA-Seq2+	5'-CCC TGA TGT ACC GTC AGT TGG-3'	Sequenzierprimer, Position: 896 bp im ppoA-Gen aus Tomate	61.8
Strep-	5'-CCT TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAT GCA-3'	Primerpaar zur Einklonierung eines Strep-Tags (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) in eine NsiI-Schnittstelle	70.9
Strep+	5'-TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGT GCA-3'		70.9
T3-	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	Sequenzierprimer im pBSCKS(+)-Vektor	53.2
T7+	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'	Sequenzierprimer im pBSCKS(+)-Vektor	58.4
T7.7 Linker -	5'-GGG CTG CAG GTC GAC TC-3'	Sequenzprimer im T7-7-Vektor (nur im vorderen Teil des Polylinkers)	60.0
T7Prom+	5'-CGA CTC ACT ATA GGG AG-3'	Sequenzprimer für T7-7-Vektor, bindet im Promotor	52.8

**Tab. 2.3 Verwendete Primer und Oligonukleotide**

Die Namenszusätze „-“ und „+“ beziehen sich auf die Orientierung der Primer am Template als *antisense*- und *sense*-Primer zur Synthese des Leit- und Folgestranges. Im Fall von PhxA-Bsu36I+ handelt es sich um einen *sense*-Primer, der für den Klon pBSCKS(+)-PhxA hergestellt worden ist, in dem das PhxA-Gen in 3'→5'-Orientierung vorliegt. Nach Insertion in den pDS12-Vektor ist das PhxA-Gen 5'→3' ausgerichtet und PhxA-Bsu36I wird als *antisense*-Primer weiter verwendet.

#### 2.4.4.3 PCR-Ansatz und PCR-Programme

Da prinzipiell bereits ein einzelnes DNA-Molekül ausreicht, um in einer PCR als Template zu dienen, ist sauberes Arbeiten hier besonders wichtig (Handschuhe). Um die Kontaminationsgefahr zu minimieren, werden für PCR-Ansätze ausschließlich sterilisierte Filter-Pipettenspitzen und steriles Aqua dest. verwendet. Zur Überprüfung der Kontamination dienen Kontrollansätze, in denen die DNA durch Aqua dest. ersetzt ist. Alle Lösungen werden auf Eis aufgetaut und gründlich gemischt (Vortex), um mögliche Entmischungen während des Einfrierens auszugleichen. Dies gilt nicht für Polymerasen, die in 55 % Glycerin aufbewahrt werden und daher nicht einfrieren.



**PCR-Ansatz**

Alle PCR-Ansätze werden unmittelbar vor dem Start der Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl in autoklavierten 200 µl Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt.

2 - 200 ng	Template-DNA
0.5 µM	<i>sense</i> -Primer (aus 100 pmol/µl)
0.5 µM	<i>antisense</i> -Primer (aus 100 pmol/µl)
200 µM	dNTPs (je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP im dNTP-Stamm)
1 x	DNA-Polymerase-Reaktionspuffer (10 x Stammlösung)
2.5 U/1.25 U	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase / <i>Taq</i> -DNA-Polymerase
ad 50 µl	steriles Aqua dest.

Bei Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase werden alle Komponenten zusammenpipettiert, gemischt, kurz anzentrifugiert und das Programm gestartet (PCR-Gerät, Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg). Mit der *Pwo*-DNA-Polymerase wird ein so genannter Hot-Start durchgeführt, d.h. die Polymerase wird erst nach der Initialdenaturierung zugegeben (Tab. 2.4).

Werden die PCR-Produkte in einer Klonierung für eine weitere PCR oder Restriktion (2.4.5) und anschließende Ligation (2.4.11) benötigt, werden 5 – 10 parallele PCR-Ansätze (50 µl) gemeinsam aufgereinigt (2.4.8), um jeweils genügend Ausgangsmaterial für den nachfolgenden Schritt zur Verfügung zu haben.

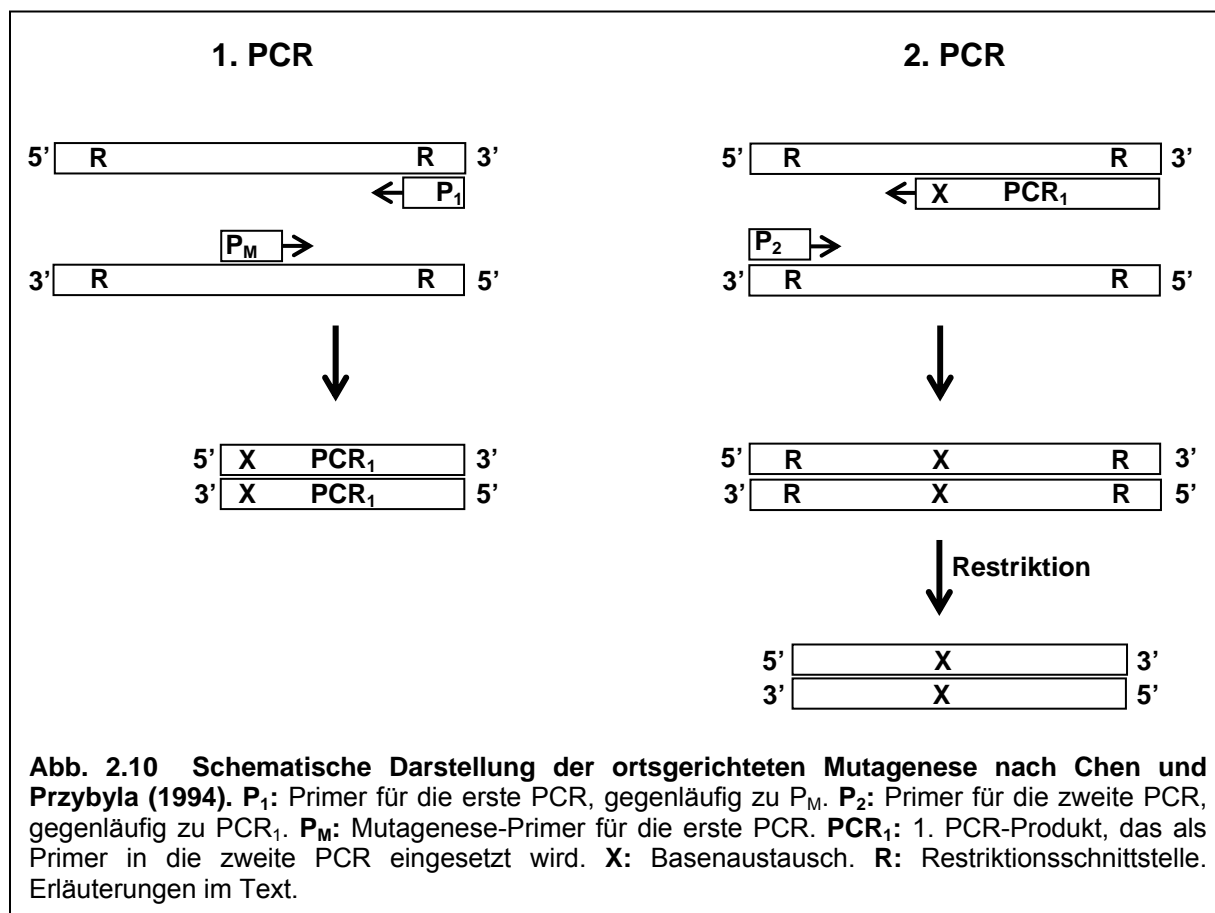
	Initialdenaturierung	Loops	Denaturierung Annealing Elongation	Polymerase	Verwendung
1	5'00" 95°C	35	1'00" 95°C 1'00" 55°C 1'00" 72°C	Taq	Kolonie-Screening (2.3.6) und andere Test-PCRs
2	5'00" 95°C Pause	35	1'00" 95°C 0'45" 55°C 1'00" 72°C	Pwo	PCR1 der ortsgerichteten Mutagenese (2.4.4.4)
3	5'00" 95°C Pause	35	1'30" 95°C 1'00" 58°C 2'00" 72°C	Pwo	PCR2 der ortsgerichteten Mutagenese (2.4.4.4)
4	1'00" 95°C	35	0'15" 96°C 0'15" 50°C 4'00" 60°C	Taq in BigDye(v2.0)	Sequenzierung (v2.0) (2.4.12)
5	-	35	0'10" 96°C 4'00" 55°C	Taq in BigDye(v3.1)	Sequenzierung (v3.1) (2.4.12)

**Tab. 2.4 Verwendete PCR-Programme**

Die *Initialdenaturierung* dient der Zerstörung zu Beginn noch komplexer DNA-Strukturen. Im Verlauf der *Pause* (Programme 2 und 3) bleibt die Temperatur konstant bei 95°C und die DNA-Polymerase wird zugegeben (Hot-Start). Die Ansätze für die Sequenzierungs-Reaktionen (Programme 4 und 5) sind in Kapitel 2.4.12 beschrieben.

#### 2.4.4.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Methode der ortsgerechten Mutagenese nach Chen und Przybyla (1994) basiert auf zwei aufeinander folgenden PCR-Schritten, die in Abb 2.10 schematisch dargestellt sind. Es werden zwei Primer ( $P_1$  und  $P_2$ ) benötigt, die den zu verändernden DNA-Abschnitt in 5'- und 3'-Richtung flankieren. Die Primer müssen gegenläufig sein (d.h. ein *sense*- und ein *antisense*-Primer) und so konstruiert werden, dass zwischen ihnen und der zu verändernden Sequenz jeweils eine singuläre Restriktions-Schnittstelle (R) liegt, d.h. eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym, die im gesamten Plasmid nur einmal vorhanden ist. Zusätzlich wird ein Mutagenese-Primer ( $P_M$ ) benötigt, der die gewünschten ausgetauschten Basen enthält.



Die erste PCR (1. PCR) wird mit dem Mutagenese-Primer ( $P_M$ ) und dem hierzu gegenläufigen Primer ( $P_1$ ) durchgeführt. Das dabei amplifizierte DNA-Stück von wenigen hundert, meist 100 - 200 Basenpaaren ( $PCR_1$ ) wird elektrophoretisch aufgetrennt (2.4.7), aus dem Gel eluiert (2.4.8) und zusammen mit dem gegenläufigen Primer ( $P_2$ ) direkt als Primer in die zweite Amplifikationsrunde (2. PCR) eingesetzt. Das doppelsträngige erste PCR-Produkt wird im Verlauf der Initialdenaturierung der zweiten Reaktion denaturiert. Das zweite PCR-Produkt wird aufgereinigt (2.4.7, 2.4.8) und mit den beiden Restriktionsenzymen, deren Erkennungssequenzen (R) links und rechts des veränderten DNA-Abschnitts liegen, verdaut (2.4.5). Das Ausgangs-Plasmid wird mit den gleichen Enzymen restringiert (2.4.5). Auf diese Weise kann das DNA-Stück mit den veränderten Basen in das Original-Plasmid einligiert werden (2.4.11). Mit dem Ligationsansatz werden Bakterienzellen transformiert (2.3.5) und damit das veränderte Plasmid beliebig vervielfältigt.

## 2.4.5 Restriktion

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Temperatur [°C]	Inaktivierung	Hersteller
Apa I	5'...G <sup>-</sup> GGCC↓C...3' 3'...C↑CCGG <sup>-</sup> G...5'	NEB 4	25	65°C, 20 Min.	NEB
BamH I	5'...G↓GATC <sup>-</sup> C...3' 3'...C <sup>-</sup> CTAG↑G...5'	NEB 1,2,4	37	-	NEB
Bsu36 I	5'...CC↓TNA <sup>-</sup> GG...3' 3'...GG <sup>-</sup> ANT↑CC...5'	NEB 3	37	80°C, 20 Min.	NEB
Cla I	5'...AT↓CG <sup>-</sup> AT...3' 3'...TA <sup>-</sup> GC↑TA...5'	NEB 4	37	65°C, 20 Min.	NEB
EcoN I	5'...CCTNN↓N <sup>-</sup> NNAGG.3' 3'...GGANN <sup>-</sup> N↑NNTCC.5'	NEB 1 - 4	37	65°C, 20 Min.	NEB
EcoR I	5'...G↓AATT <sup>-</sup> C...3' 3'...C <sup>-</sup> TTAA↑G...5'	NEB 1 - 4	37	65°C, 20 Min.	NEB
EcoR V	5'...GAT↓ATC...3' 3'...CTA↑TAG...5'	NEB 2, 3	37	80°C, 20 Min.	NEB
Hinc II	5'...GTPy↓PuAC...3' 3'...CAPu↑PyTG...5'	NEB 1 - 4	37	65°C, 20 Min.	Amersham
Hind III	5'...A↓AGCT <sup>-</sup> T...3' 3'...T <sup>-</sup> TCGA↑A...5'	NEB 2	37	65°C, 20 Min.	Promega
Nde I	5'...CA↓TA <sup>-</sup> TG...3' 3'...GT <sup>-</sup> AT↑AC...5'	NEB 1 - 4	37	65°C, 20 Min.	NEB
Nsi I	5'...A <sup>-</sup> TGCA↓T...3' 3'...T↑ACGT <sup>-</sup> A...5'	NEB 2, 3	37	65°C, 20 Min.	NEB
Pst I	5'...C <sup>-</sup> TGCA↓G...3' 3'...G↑ACGT <sup>-</sup> C...5'	NEB 1,2,3	37	80°C, 20 Min.	NEB
Pvu I	5'...CG <sup>-</sup> AT↓CG...3' 3'...GC↑TA <sup>-</sup> GC...5'	NEB 2, 3	37	80°C, 20 Min.	NEB
Sph I	5'...G <sup>-</sup> CATG↓C...3' 3'...C↑GTAC <sup>-</sup> G...5'	NEB 1,2,4	37	65°C, 20 Min.	NEB
Xho I	5'...C↓TCGA <sup>-</sup> G...3' 3'...G <sup>-</sup> AGCT↑C...5'	NEB 1 - 4	37	65°C, 20 Min.	NEB

**Tab. 2.5 Verwendete Restriktionsenzyme**

Die Restriktionsenzyme werden von NEB (New England Biolabs, Frankfurt), Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Promega (Madison, WI, USA) bezogen und bei -20°C gelagert. Da sie in glycerinhaltigem Puffer geliefert werden, müssen sie vor der Verwendung nicht aufgetaut werden. Die Zugabe von BSA erfolgt nach den Empfehlungen von NEB (Frankfurt).

Per Definition schneidet eine Unit einer Restriktionsendonuklease 1 µg DNA im angegebenen Puffer und bei optimaler Temperatur innerhalb einer Stunde. Für analytische Restriktionen sind diese Bedingungen ausreichend. Werden die Restriktions-Produkte anschließend in eine Ligation eingesetzt, ist ein vollständiger Verdau wünschenswert. In diesem Fall werden ≥ 5 Units/µg DNA eingesetzt und die Reaktionszeit auf mindestens 2 Std. verlängert. Vektor-Restriktionen werden meist ü/N durchgeführt, sofern sich die bei manchen Enzymen auftretende Star-Aktivität (unspezifischer Verdau bei langer Inkubation) nicht negativ bemerkbar macht. Ein Doppel- und Dreifach-Verdau mit zwei oder drei Restriktionsenzymen zur gleichen Zeit ist bei identischen Reaktionsbedingungen möglich.

### Restriktions-Ansatz

Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt in der Regel 10 – 25  $\mu\text{l}$ . Es richtet sich u.a. nach dem eingesetzten Enzymvolumen. Um eine Glycerinkonzentration von  $\leq 5\%$  zu gewährleisten, darf das Enzymvolumen maximal 1/10 des Gesamtansatzes entsprechen.

#### DNA

1 x            Reaktionspuffer (10 x Stammlösung)  
 100  $\mu\text{g/ml}$     BSA (optional, je nach Empfehlung des Herstellers, NEB, Frankfurt)  
 $\geq 5\text{ U}/\mu\text{g}$      Restriktionsenzym  
 ad 10 – 25  $\mu\text{l}$    Aqua dest.

Die Reaktion wird durch Hitzedenaturierung der Restriktionsendonuklease im Wärmeschrank (Typ U 30, Memmert, Schwabach) beendet. Zur Überprüfung der Restriktion werden 2 – 5  $\mu\text{l}$  des Ansatzes auf ein Agarosegel (2.4.7) aufgetragen. Für die Aufreinigung eines Restriktionsfragmentes wird der verbleibende Ansatz vollständig mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.4.7) und aus dem Gel eluiert (2.4.8). Soll aus dem Restriktionsansatz ein Vektorfragment für eine Ligation isoliert werden, wird dieses nach der Restriktion zunächst dephosphoryliert (2.4.6) und erst anschließend aufgereinigt (2.4.8).

### 2.4.6 Dephosphorylierung von Vektoren

Um die Gefahr der Religation (unvollständig) restringierter Vektoren zu minimieren, werden die 5'-Enden der Vektor-DNA mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (Calf intestine Alkaline Phosphatase, CiAP) dephosphoryliert. Den 3'OH-Enden des Vektors stehen dann in der anschließenden Ligation nur die 5'-Phosphatgruppen des Inserts zur Verfügung und die gewünschte Verknüpfung von Vektor und Insert erfolgt effektiver.

Für die Reaktion werden in 50  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen 2 U CiAP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) pro 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in 1 x OPA-Puffer für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Da das Enzym sehr hitzelabil ist, erfolgt eine erneute Zugabe von 2 U CiAP/ $\mu\text{g}$  DNA und eine weitere Inkubation für 30 Min. bei 37°C. Die CiAP wird im Anschluss durch eine 15minütige Inkubation bei 85 °C (Wärmeschrank, Typ U 30, Memmert, Schwabach) deaktiviert.

Restringierte Vektoren können unmittelbar nach dem Verdau dephosphoryliert werden, wenn die Restriktionsenzyme zuvor inaktiviert worden sind. Die dephosphorylierten Vektoren werden dann aufgereinigt und ligiert.

#### 10x OPA-Puffer (One Phor All)

100 mM    Tris-Acetat, pH 7.5  
 100 mM    Mg-Acetat  
 500 mM    K-Acetat

#### CiAP-Aufbewahrungspuffer

10 mM    Tris/HCl, pH 8.0  
 50 mM    KCl  
 1 mM    MgCl<sub>2</sub>  
 0.1 mM    ZnCl<sub>2</sub>  
 50 %    Glycerin

Die konzentrierte CiAP-Stammlösung (20 - 30 U/ $\mu\text{l}$ , Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wird für die Verwendung mit CiAP-Aufbewahrungspuffer auf 2 U/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

## 2.4.7 Agarosegelelektrophorese

Linearisierte DNA ist einheitlich negativ geladen, weist keine komplexen Strukturen auf und kann zur Analyse, Quantifizierung oder Aufreinigung in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Als Trägermaterial dient dabei Agarose, ein vernetzendes Galactose-Polymer.

### 2.4.7.1 Agarose-Mini-Gele

Die Agarose-Konzentration in der Gelmatrix ist abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Für Fragmente zwischen 0.1 – 2.0 kb wird 2 %, für 0.5 – 10 kb 1 % Agarose empfohlen. Die Agarose wird in 1 x TBE-Puffer in der Mikrowelle (Siemens, München) bei 360 W aufgekocht (1 – 2 Min.) und zu je 10 ml auf Glasplatten (7.5 x 5.5 cm, Trennstrecke ca. 6 cm) mit Kämmen aufgetragen. Nach dem Erkalten (30 – 60 Min.) können die Gele etwa 4 Wochen lang bei 4°C feucht gelagert werden.

Die Proben werden vor dem Auftrag mit 1 x Minigelauftragspuffer versetzt. Das Probenvolumen sollte mindestens 5 µl betragen und kann mit Aqua dest. ergänzt werden (eine Geltasche fasst maximal 15 µl). Die Elektrophorese erfolgt bei 0.14 kV (10 Min.) und anschließend 0.2 kV (Microcomputer Electrophoresis Power Supply E714, Consort NV, Turnhout, Belgien) in einer horizontalen Gelkammer in 1 x TBE-Puffer, der mit 0.3 mg/l Ethidiumbromid versetzt wird.

#### 5 x TBE-Puffer

0.45 M	TRIS/HCl
0.45 M	Borsäure
10 mM	EDTA

#### 10 x Minigelauftragspuffer

50 mM	TRIS/HCl, pH 8.0
10 mM	EDTA
0.025 %	Bromphenolblau
0.025 %	Xylencyanol
50 %	Glycerin

#### Laufpuffer für Agarosegele

1 x TBE-Puffer

0.3 mg/l Ethidiumbromid (50 µl aus einer 10 mg/ml Stammlösung für 1.5 Liter)

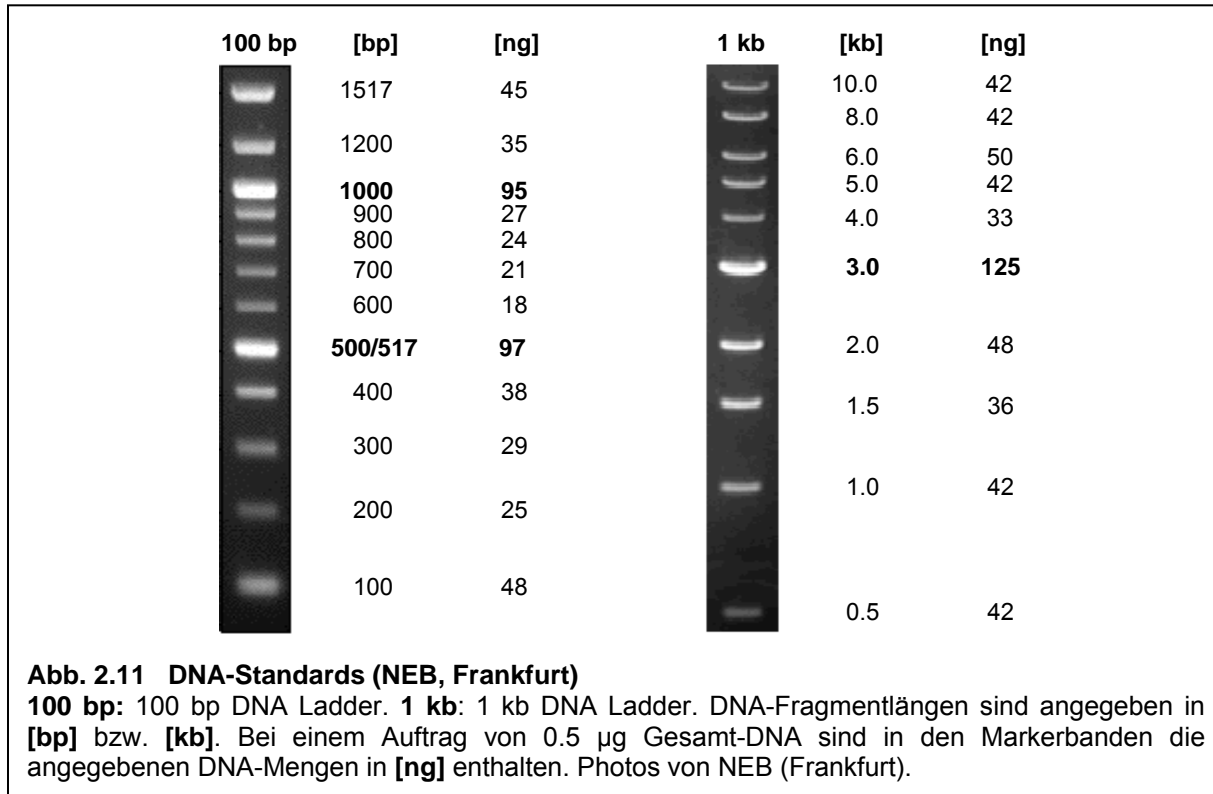
Die Farbstoffe, die im Minigelauftragspuffer enthalten sind, dienen der Abschätzung der Laufstrecke. Bromphenolblau läuft in einem 2 % Gel bei etwa 100 bp, im 1 % Gel bei etwa 300 bp. Xylencyanol ist im 1 % Gel bei etwa 5 kb zu finden.

### 2.4.7.2 Visualisierung und Densitometrische DNA-Quantifizierung

Ethidiumbromid (1,7-Diamino-10-Ethyl-9-Phenylphenanthridiniumbromid) ist ein organischer Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur in doppelsträngige DNA interkaliert. Seine aromatischen Ringstrukturen interagieren dabei mit den Heterozyklen der DNA-Basen. Bei Anregung mit UV-Licht zwischen 245 – 366 nm fluoresziert der Farbstoff bei 590 nm (Lottspeich, 1998).

Zur Dokumentation und Quantifizierung werden die Agarosegele mit dem VersaDoc™ Imaging System (Model 3000, Filter 520LP UV Trans, Bio-Rad, München) fotografiert und mit der QuantityOne Software (Bio-Rad, München) bearbeitet. Die für die Quantifizierung

verwendeten Standards sind in Abb. 2.11 dargestellt. Die Stammlösungen dieser Standards (500 µg/ml) werden mit sterilem Aqua dest. und 1/10 Minigelauftragspuffer auf 100 µg/ml verdünnt. Bei einem Auftragsvolumen von 5 µl (0.5 µg) sind in den Markerbanden die in Abb. 2.11 angegebenen DNA-Mengen [ng] enthalten.



## 2.4.8 DNA-Aufreinigung

Die, wie in 2.4.7.1 beschrieben, aufgetrennte DNA kann im Anschluss aus dem Gel eluiert und aufgereinigt werden. Diese präparativen Gele werden nicht fotografiert, um die DNA nicht durch die intensive UV-Bestrahlung zu schädigen. Stattdessen wird die gewünschte Bande unter einer UV-Lampe (Typ HL-6-KM, 254/312 nm, Bachofer GmbH, Reutlingen) bei 312 nm detektiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend mit Hilfe des NucleoTrap<sup>®</sup> Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren) oder des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (PeQLab, Erlangen) nach den Angaben der Hersteller aus dem Gelstück aufgereinigt und eluiert. Um eine maximale Konzentration der gereinigten DNA-Lösung zu erzielen, werden bei Verwendung des Kits von PeQLab (Erlangen) nur 30 µl anstelle von 50 µl Puffer zur Elution verwendet. Zur Quantifizierung werden je nach erwarteter DNA-Menge 2 - 5 µl des Eluats auf einem Agarosegel (2.4.7) aufgetrennt.

### 2.4.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Ligation z.B. von His-Tag-Sequenzen in eine Restriktionsschnittstelle werden zwei kurze Oligonukleotide benötigt, die den gewünschten Sequenzen des codierenden und des komplementären Stranges entsprechen. Diese einzelsträngigen Oligonukleotide werden von MWG Biotech (Ebersberg) chemisch synthetisiert (2.4.4.2) und hybridisieren bei geeigneten Reaktionsbedingungen spontan (*Annealing*). Sie müssen so konstruiert werden, dass die codierende Sequenz in das Leseraster des Gens und die Enden des gebildeten doppelsträngigen DNA-Stücks in die Restriktions-Schnittstelle passen. Das bedeutet, dass das hybridisierte DNA-Fragment z.B. die einzelsträngigen Überhänge besitzen muss, die durch einen Verdau mit dem entsprechenden Restriktionsenzym entstehen.

In einem Gesamtvolumen von 100 µl werden je 10 pmol/µl des *sense*- und *antisense*-Oligonukleotids in 1 x Annealing-Puffer für 10 Min. bei 100°C inkubiert und anschließend ü/N im geschlossenen Wärmeschrank (Typ U 30, Memmert, Schwabach) auf RT abgekühlt.

#### 10 x Annealing-Puffer

380 mM	TRIS/HCl, pH 7.5
200 mM	MgCl <sub>2</sub>
500 mM	NaCl

### 2.4.10 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden verläuft in 5'→3'-Richtung. Bei Abspaltung der Schutzgruppe geht auch die Phosphat-Gruppe des 5'-Endes verloren. Da die Oligonukleotide bei MWG Biotech (Ebersberg) unmodifiziert bezogen werden, fehlen ihnen und den hybridisierten doppelsträngigen DNA-Stücken (2.4.9) die 5'-Phosphate. Vor einer Ligation (2.4.11) werden diese daher mit Hilfe einer Polynukleotid-Kinase (PNK), die ein Monophosphat von ATP überträgt, ergänzt.

#### Phosphorylierungs-Ansatz (Gesamtvolumen: 10 µl)

1 µl	Annealingansatz (= 10 pmol DNA) (2.4.9)
1 x	T4-PNK-Puffer (NEB, Frankfurt)
1 mM	ATP (Boehringer, Mannheim)
2 U	T4-PNK (10 U/µl, NEB, Frankfurt)

Der Ansatz wird 60 Min. bei 37°C inkubiert (Wärmeschrank, Typ B 50, Memmert, Schwabach) und die PNK anschließend durch 20 Min. Inkubation bei 65°C inaktiviert (Wärmeschrank, Typ U 30, Memmert, Schwabach).

### 2.4.11 Ligation

Die T4-DNA-Ligase verknüpft unter Verwendung von ATP freie 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden doppelsträngiger DNA unter Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen. Zuvor identisch restringierte Vektoren und Inserts bilden so intakte Plasmide, mit denen kompetente *E.coli*-Zellen transformiert werden können.

**Ligations-Ansatz** (Gesamtvolumen: 10 µl)

- 100 ng DNA (molares Verhältnis von Vektor zu Insert = 1 : 2)
- 1 x T4-DNA-Ligasepuffer (10 x, enthält 10 mM ATP, NEB, Frankfurt)
- 1 mM ATP (im Puffer enthalten)
- 0.5 µl T4-DNA-Ligase (400 U/µl, NEB, Frankfurt)

Die Ansätze werden ü/N bei 4 – 10°C und anschließend für mindestens 4 Std. im Wasserbad (Typ P/3, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) bei 16°C inkubiert und können bis zur Transformation (2.3.5) einige Stunden auf Eis aufbewahrt werden. Als Kontrolle der Vektor-Religation dient ein identischer Ligationsansatz, der kein Insert enthält.

**2.4.12 Sequenzierung**

Die Methode der enzymatischen DNA-Sequenzierung ist in ihrer ursprünglichen Form von Sanger *et al.* (1977) entwickelt worden. Im seither weiter entwickelten Verfahren werden in einer einzigen PCR-Reaktion mit Hilfe einer *Taq*-DNA-Polymerase und nur einem Primer neue DNA-Moleküle gebildet. Der Einbau von zusätzlich zu den *deoxy*-Nukleotiden (*d*NTP) vorhandenen *dideoxy*-Nukleotiden (*dd*NTP), denen außer der 2'OH-Gruppe auch die 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt, verursacht jeweils einen Kettenabbruch der Synthese. Da dieses Ereignis statistisch verteilt eintritt, werden DNA-Moleküle jeder Länge gebildet, die sich in ihrer Länge um nur ein Basenpaar unterscheiden. Diese werden auf einem großen vertikalen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die unterschiedliche Fluoreszenz-Markierung der vier *dd*NTPs können die Fragmente in einem einzigen Gel detektiert werden. Die entstehenden Fluoreszenz-Spektren werden in die Sequenz der *Template*-DNA übersetzt.

**Sequenzierungsansatz (Version 2.0)**

- 200 - 500 ng DNA
- 4 µl Big-Dye (v2.0, *Taq*-Polymerase, *d*NTPs, *dd*NTPs) (GENterprise, Mainz)
- 10 pmol Primer
- ad 20 µl mit sterilem Aqua dest.

Die Reaktion wird in einem 200 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem PCR-Programm 4 (Tab. 2.4, 2.4.4.3) im Thermocycler (Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Im Anschluss muss die DNA gefällt werden.

**DNA-Fällung**

Der 20 µl Sequenzierungsansatz wird in ein steriles 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 3 µl NaAcetat (3 M) und 50 µl Ethanol (absolut, -20°C kalt) gründlich gemischt (Vortex). Dabei fällt die DNA aus und wird im Anschluss an eine 5minütige Inkubation in flüssigem Stickstoff durch 30 Min. Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm (Universal 30 RF, Rotor: 1412, Hettich, Tuttlingen) pelletiert. Das Präzipitat wird mit 300 µl 70% Ethanol (-20°C kalt) gewaschen und für 10 Min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig abgezogen und das Pellet 10 Min. im Vakuum (Vacuum Concentrator und Kältefalle Typ KF-2-60, Bachofer GmbH, Reutlingen; Vakuum-Pumpe Model RV5, Edwards High Vacuum International, Crawley, England) bei eingeschalteter Heizung getrocknet.



**Sequenzierungsansatz (Version 3.1)**

Die *Template*-DNA-Menge variiert nach den Angaben in Tab. 2.6.

2 µl	Sequencing Puffer (Version 3.1) (GENterprise, Mainz)
2 µl	BigDye-Premix (v3.1, enthält <i>Taq</i> , dNTPs, ddNTPs) (GENterprise, Mainz)
10 pmol	Primer
ad 10 µl	mit sterilem Aqua dest.

Die Reaktion wird in einem 200 µl Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem PCR-Programm 5 (Tab. 2.4, 2.4.4.3) durchgeführt (Thermocycler, Primus 25, MWG-Biotech, Ebersberg). Eine Fällung der DNA ist nicht notwendig.

Art der Template-DNA	Länge der Template-DNA [bp]	einzusetzende DNA-Menge [ng]
Plasmid-DNA	-	170 - 350
PCR-Produkt	1000	70
	500	35
	200	15

**Tab 2.6 Template-DNA für den Sequenzierungsansatz (Version 3.1)** (GENterprise, Mainz)

Die Sequenzierungsansätze werden von der Firma GENterprise (Mainz) aufgetrennt und analysiert und die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe der Chromas Software (Version 1.45, C. McCarthy, Griffith University, Southport, Queensland, Australia) editiert. In einem Sequenzier-Ansatz lässt sich eine Sequenz mit einer Länge von etwa 500 - 600 Basen analysieren. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt anschließend mit Hilfe von Programmen und Datenbanken aus dem Internet. Alignments, d.h. Vergleiche der ermittelten Basenabfolge mit der gewünschten Sequenz, werden mit dem Programm von Pearson *et al.* (1997) ([www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi](http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi)) durchgeführt. Bei Verwendung von *antisense*-Primern in der Sequenzier-PCR müssen die Sequenzier-Ergebnisse vor einem Alignment in die gegenläufige, komplementäre Basenfolge (*Reverse Complement*) überführt werden. Dies geschieht mit den DNA-Sequence-Manipulation-Tools der Molecular Cloning Laboratories (MCLab, San Francisco, CA, USA, [www.mclab.com/toolbox/seqmanipulator2.jsp](http://www.mclab.com/toolbox/seqmanipulator2.jsp)) oder mit Hilfe der pDRAW32 DNA analysis software (<http://medlem.spray.se/acacclone/>) von AcaClone Software. Zur Übersetzung von Nucleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen wird die DNA-Protein-Translation-Funktion von MCLab ([www.mclab.com](http://www.mclab.com)) oder ebenfalls die pDRAW32-Software verwendet.

## 2.5 Proteinbiochemische Arbeiten

### 2.5.1 Inclusion Bodies (Einschlusskörper)

Einige in Bakterien überexprimierte Proteine falten sich im prokaryotischen Zell-Milieu nicht in ihre natürliche Struktur und bleiben unlöslich. Sie neigen dazu, große Protein-Aggregate, so genannte Einschlusskörper oder Inclusion Bodies (IB), zu bilden. Bei deren Aufreinigung macht man sich ihre Stabilität gegenüber schwachen Detergenzien zunutze.

Nach einer IPTG-induzierten Überexpression des gewünschten Proteins werden die Bakterienzellen mit Hilfe einer Zellpresse (French Press) aufgebrochen. Dabei werden die Bakterien unter Druck stark verengt und platzen, bedingt durch den plötzlichen Druckabfall beim Austritt aus der Zellpresse, auf. Die Proteinaggregate werden präzipitiert und zur Entfernung verbliebener Membranteile und bakterieller Proteine mit milden Detergenzien wie Triton X-100 und Desoxycholat gewaschen. Auf diese Weise lässt sich eine Reinheit des überexprimierten Proteins von bis zu 90 % erzielen, die anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (2.5.3.2) überprüft werden kann.

#### 2.5.1.1 Protein-Überexpression

Für ein Kulturvolumen von 100 ml werden 5 ml Vorkultur und für 1 Liter (2 x 500 ml) 50 ml Vorkultur benötigt. Hierfür werden 5 ml LB-Medium (2.3.2) in einem Reagenzröhrchen oder 50 ml LB-Medium in einem 200 – 300 ml Erlenmeyer-Kolben mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, mit dem gewünschten Klon beimpft und ü/N bei 37°C im Drehrad bzw. bei 210 rpm auf dem Inkubationsschüttler, wie in 2.3.3 beschrieben, inkubiert.

Am Folgetag werden zu 100 ml oder 2 x 500 ml LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin und 5 ml bzw. 2 x 25 ml Vorkultur gegeben. Die Kulturen werden, sofern nicht anders angegeben, 60 Min. bei 37°C und 210 rpm auf dem Kulturen-Schüttler inkubiert, bis eine deutliche Trübung eintritt ( $OD_{600nm} \approx 0.5$ , Halbmikro Einmalküvetten, Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag). Nach Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid, Applichem, Darmstadt, Stammlösung: 1 M, sterilfiltriert, Endkonzentration: 1 mM, sofern nicht anders angegeben) zur Induktion der Überexpression folgt eine weitere Inkubation bei 37°C und 210 rpm von 4.5 Stunden.

Überexpressionsversuche ohne anschließende Proteinaufreinigung werden in einem Volumen von 5 ml in Reagenzgläsern durchgeführt. Dabei wird das Medium ebenfalls mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt, mit einer, wie oben beschrieben, hergestellten Vorkultur angeimpft und die Expression mit IPTG induziert. Nach einer mehrstündigen Inkubation werden Aliquots der Bakterienkulturen bei RT und 13000 rpm (EBA 12, Rotor: 1124, Hettich, Tuttlingen) für 3 Min. pelletiert und zur Überprüfung der Expressionseffizienz in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt (2.5.3.2). Die bei diesen Experimenten variierten Parameter sind in den entsprechenden Ergebnis-Kapiteln (3.4.2.4 und 3.4.3.2) angegeben.

#### 2.5.1.2 Präparation von Inclusion Bodies ohne His/Strep-Tag

Im folgenden Protokoll beziehen sich alle Volumenangaben auf 100 ml Kulturansatz. Die Bakterien werden 5 Min. bei 8500 rpm (JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) und 4°C sedimentiert. Die Zellen im Pellet werden in etwa 20 ml Lysispuffer resuspendiert (Vortex,

Ultraschallbad) und mit Hilfe einer Zellpresse (French Pressure Cell Press, SLM Aminco, SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA) aufgebrochen. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) wird das Präzipitat in 1 ml Lysispuffer resuspendiert (Vortex, Ultraschallbad), mit 11 µl eines Gemisches aus 1 M MgCl<sub>2</sub> und 1 M MnCl<sub>2</sub> (im Verhältnis 10 : 1) und 10 µl DNase I (Boehringer, Mannheim, Stammlösung: 1 mg/ml, Lagerung bei -20°C) versetzt und 15 Min. bei RT kräftig geschüttelt (IKA-VIBRAX-VXR, IKA®-Labortechnik, Staufen). Es folgt eine langsame Zugabe von 2 ml Detergenzienpuffer unter vorsichtigem und anschließend kräftigem Mischen (Vortex). Das Präzipitat aus 5 Min. Zentrifugation bei 4°C und 8500 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) wird in 2 ml Tritonpuffer aufgenommen (Vortex, Ultraschallbad) und über Nacht bei 4°C im Drehrad (Typ RZR 50, Heidolph, Kelheim) inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wird die Suspension erneut für 5 Min. bei 4°C und 8500 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert, das Präzipitat in 2 ml Tritonpuffer resuspendiert (Vortex, Ultraschallbad), zentrifugiert, in 2 ml TRIS-Puffer resuspendiert, zentrifugiert und zuletzt in 500 µl TRIS-Puffer aufgenommen. Die Inclusion Bodies werden bei -20°C gelagert und vor jeder Verwendung gut homogenisiert.

#### **DNase I-Verdünnungspuffer (- 20°C)**

20 mM	TRIS/HCl, pH 7.5
50 mM	NaCl
1 mM	DTT
0.1 mg/ml	BSA (NEB, Frankfurt)
50 %	Glycerin

#### **Detergenzienpuffer**

20 mM	TRIS/HCl, pH 7.5
200 mM	NaCl
1 %	Desoxycholat
1 %	Triton X-100
2 mM	EDTA
10 mM	β-Mercaptoethanol

#### **Lysispuffer**

50 mM	TRIS/HCl, pH 8.0
25 %	Saccharose
1 mM	EDTA

#### **Triton-Puffer**

20 mM	TRIS/HCl, pH 7.5
0.5 %	Triton X-100
1 mM	EDTA
10 mM	β-Mercaptoethanol

#### **TRIS-Puffer**

50 mM	TRIS/HCl, pH 8.0
1 mM	EDTA
10 mM	β-Mercaptoethanol

Abgesehen von dem Verdünnungspuffer für die DNase I werden alle Puffer bei 4°C gelagert und möglichst frisch und kalt verwendet.

### **2.5.1.3 Präparation von Inclusion Bodies mit His/Strep-Tag**

Diese Versuchsvorschrift ist an die Präparation der IBs ohne His/Strep-Tag angelehnt. Den wesentlichen Unterschied stellt der Verzicht auf β-Mercaptoethanol in den meisten Puffern dar, da Reduktionsmittel die Wechselwirkung von Metallatomen mit der Säulenmatrix behindern. Für genauere Erläuterungen zur Affinitätschromatographie sei auf Kapitel 2.5.5 verwiesen. Die beschriebenen Volumina sind ausreichend für 500 ml Kulturansatz.

Die Zellen werden, wie in 2.5.1.2 beschrieben, sedimentiert, in 25 ml frisch angesetztem <sup>His</sup>Lysispuffer für His-Tag-IBs resuspendiert (mindestens 3 Min. Ultraschallbad) und mit der Zellpresse (French Pressure Cell Press, SLM Aminco, SLM Instruments Inc., Rochester, NY, USA) aufgebrochen. Die Suspension wird 5 Min. bei 4°C und 9000 rpm (JA-20 Rotor,

Beckman, München) zentrifugiert, das Pellet in 8 ml <sup>His</sup>Detergenzienpuffer kräftig gemischt (Vortex), erneut zentrifugiert, in 8 ml <sup>His</sup>Tritonpuffer resuspendiert (Vortex, Ultraschallbad) und ü/N bei 4°C im Drehrad (Typ RZR 50, Heidolph, Kelheim) inkubiert.

Es folgen 5 Min. Zentrifugation bei 4°C und 9000 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München), eine zweimalige Resuspendierung in 8 ml <sup>His</sup>TRIS-Puffer mit anschließender Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C und 8500 rpm (JA-20 Rotor, Beckman, München) sowie die Aufnahme in 1 ml <sup>His</sup>TRIS-Puffer und Lagerung bei -20°C.

Bei dem in einigen Fällen auch verwendeten Überstand aus der French Press (FP-Ü) (3.3.2) handelt es sich um den Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt nach dem Aufbruch der Zellen mit Hilfe der Zellpresse. In diesem Fall werden dem Lysispuffer Proteaseinhibitoren in den unten angegebenen Konzentrationen zugefügt und DTT wird durch 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol ersetzt.

#### <sup>His</sup>Lysispuffer (frisch angesetzt)

0.8 mg/ml DTT

3.7  $\mu$ g/ml DNase I (Stammlösung: 1 mg/ml, in Verdünnungspuffer (2.5.1.2, -20°C))

#### Proteaseinhibitoren im Lysispuffer (optional)

1 mM PMSF (Stammlösung: 100 mM, gelöst in Ethanol, -20°C)

5 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure (Stammlösung: 1 M, gelöst in Aqua dest., -20°C)

1 mM Benzamidin (Stammlösung: 1 M, gelöst in Aqua dest., -20°C)

#### <sup>His</sup>Detergenzienpuffer = Detergenzienpuffer (2.5.1.2)

##### <sup>His</sup>Triton-Puffer

20 mM TRIS/HCl, pH 7.5

0.5 % Triton X-100

1 mM EDTA

##### <sup>His</sup>TRIS-Puffer

50 mM TRIS/HCl, pH 7.5

Alle Puffer werden möglichst frisch angesetzt, bei 4°C gelagert und kalt verwendet.

### 2.5.1.4 Solubilisierung von Inclusion Bodies

Die Löslichkeit der Inclusion Bodies ist u.a. abhängig vom verwendeten Klon. Wenn nicht anders angegeben, werden die Proteinaggregate in 8 M Harnstoff (frisch angesetzt bzw. nur wenige Tage alt) und 8 - 10 mM DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol durch etwa 10 - 15 Min. Inkubation bei 50°C oder bei 37°C im Drehrad (Wärmeschrank) gelöst. Alternativ können zur Solubilisierung der Proteinaggregate 6 M GdnHCl oder 10 % SDS in Verbindung mit Reduktionsmitteln eingesetzt werden. GdnHCl-Proben werden ebenfalls schonend auf 50°C erhitzt, SDS-Proben werden zur Denaturierung 3 Min. im Wasserbad (HB 4basic, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen) gekocht. Ungelöste Rest-Bestandteile werden anschließend durch 3minütige Zentrifugation bei RT und 13000 rpm präzipitiert und aus der Lösung entfernt.

## 2.5.2 Absorptionsspektroskopie / Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von reinen Proteinlösungen kann über die Absorption bei 280 nm bestimmt werden. Zur Konzentrationsbestimmung in Proteingemischen eignen sich Färbetests wie Bradford- und BCA-Assay. Chlorophyllkonzentrationen werden anhand der spezifischen Absorptionen von Chlorophyll *a* und *b* ermittelt. Mit Hilfe von Absorptionsspektren können abgesehen von der Konzentration weitere spezifische Charakteristika eines Moleküls beobachtet werden.

### 2.5.2.1 Photometrische Proteinbestimmung bei 280 nm

Zusätzlich zur Absorption des Proteinrückgrats, zwischen 190 und 220 nm, weisen Proteine durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Tryptophan (Trp) eine weitere Absorptionsbande im Bereich von etwa 250 – 290 nm auf. Da Trp aufgrund seiner charakteristischen Ringstruktur am stärksten absorbiert, wird dessen Absorptionsmaximum bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen herangezogen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis des Absorptionskoeffizienten des aufgereinigten Proteins bei 280 nm ( $\epsilon_{280\text{ nm}}$  [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]), sowie eine ausreichende Homogenität und Verdünnung der Lösung. Liegt die Absorption bei 280 nm ( $A_{280\text{ nm}}$ ) in einem Bereich von 0.1 – 1.0 kann die Konzentration ( $c$  [M]) mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden:

$$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} * c * d \quad (\text{mit } d = \text{Weglänge} = 1\text{ cm}).$$

Die Messungen werden entweder in Halbmikro-Präzisionsküvetten aus Quarzglas im Spectrophotometer V-550 UV/VIS (Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt) oder im Mikrotiterplatten-Absorptionsphotometer (SPECTRAMaxPLUS, SOFTmaxPRO®-Software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt. Bei der Verwendung von UV-Mikrotiterplatten (Greiner/VWR International GmbH, Darmstadt) ist die Weglänge kürzer als 10 mm. Mit Hilfe der PathCheck-Funktion (Water Constant) der Software SOFTmaxPRO® wird der Füllstand der Wells (maximales Füllvolumen  $\approx 300\ \mu\text{l}$ ) ermittelt und die gemessenen  $A_{280\text{ nm}}$ -Werte werden anhand eines geräteeigenen Wertes für Wasser auf eine Weglänge von 10 mm umgerechnet. Der PreRead-Modus ermöglicht das Einlesen der leeren Mikrotiterplatte vor der Messung. Eine Puffer-Referenz wird gleichzeitig parallel zur Probe als Blank gemessen und von der Protein-Absorption abgezogen. Bei der Verwendung von Quarz-Küvetten (SUPRASIL®, Hellma®/VWR International GmbH, Darmstadt,  $d = 10\text{ mm}$ ) erfolgt die Bestimmung von Blank und Probe nacheinander in derselben Küvette.

Die  $A_{280\text{ nm}}$ -Messung wird zur Konzentrationsbestimmung von IB-Lösungen (2.5.1) verwendet. Die Extinktionskoeffizienten werden mit Hilfe der ProtParam-Funktion des ExPASy Proteomics Servers ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) vom SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) in erster Näherung aus der Aminosäuresequenz ermittelt (ExPASy: Expert Protein Analysis System, Gasteiger *et al.*, 2003). Die  $\epsilon_{280\text{ nm}}$ -Werte werden hier für Proteinlösungen in 6 M Guanidin-Hydrochlorid (GdnHCl) und 0.02 M Phosphat-Puffer (pH 6.5) angegeben. Aufgrund des unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens der Inclusion Bodies (2.5.1.4), ist eine Messung in 6 M GdnHCl nicht immer möglich. Alternativ werden sie daher in 8 M Harnstoff  $\pm 8\text{ mM}$  DTT oder 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (10 Min. 50°C) oder 10 % SDS  $\pm 10\text{ mM}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (1 – 3 Min. 100°C) gelöst und eventuell verdünnt gegen eine entsprechende Referenz gemessen. In jedem Fall werden mindestens Dreifach-

Bestimmungen durchgeführt. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten sind in Tab 2.7 angegeben.

Protein, Klon, Sequenz	SP	AS	kDa	$\epsilon_{280\text{ nm}}$ [ $M^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ]	OD [1 mg/ml]
<b>PPO A aus Tomate</b>					
Q08303 (Newman <i>et al.</i> , 1993)	+	630	71	87180	1.24
Q08303 (Newman <i>et al.</i> , 1993)	-	543	62	85780	1.39
pDS12-ppoA-His	+	601	67	80090	1.20
<b>Phx A aus Spinat</b>					
P43310 (Hind <i>et al.</i> , 1995)	+	639	73	100070	1.37
P43310 (Hind <i>et al.</i> , 1995)	-	538	62	94950	1.53
X90869 (Sokolenko <i>et al.</i> , 1995)	+	638	73	100070	1.37
X90869 (Sokolenko <i>et al.</i> , 1995)	-	537	62	94950	1.53
pDS12-PhxA-His-Arg2	+	647	74	100070	1.35
pT7-7-PhxA-His	+	647	74	100070	1.35
pT7-7-PhxA-His	-	546	63	94950	1.51

**Tab. 2.7 Extinktionskoeffizienten.**

**SP:** Signalpeptid. **AS:** Anzahl der Aminosäuren. **kDa:** Molekulargewicht des Proteins in [kDa]. **OD [1 mg/ml]:** Optische Dichte (Absorption) einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Die  $\epsilon_{280\text{ nm}}$ -Werte in 6 M GdnHCl und 0.02 M Phosphat-Puffer (pH 6.5) werden mit Hilfe der ProtParam-Funktion ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) anhand der Aminosäuresequenz mit folgender Formel berechnet:  $\epsilon_{\text{Protein}} = \text{Anzahl}_{\text{Tyr}} * \epsilon_{\text{Tyr}} + \text{Anzahl}_{\text{Trp}} * \epsilon_{\text{Trp}} + \text{Anzahl}_{\text{Cys}} * \epsilon_{\text{Cystin}}$  (Gill und von Hippel, 1989). Bei Q08303 und P43310 handelt es sich um Indices von Proteinsequenzen des ExPASy-Proteomics Servers ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), Gasteiger *et al.*, 2003). X90869 ist zu finden in der EMBL Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute, EBI (Cambridge, UK, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), das zum European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) gehört, und ist identisch mit dem ExPASy-Eintrag Q41388. Die hier angegebenen Werte werden als Referenzen bzw. im Fall der PPO A aus Tomate in Ermangelung von eigenen Sequenzdaten als Näherungswerte verwendet. Für die hergestellten Klone sind jeweils die Extinktionskoeffizienten des ORF des Protein-Gens angegeben. Bei pDS12-ppoA-His handelt es sich um das durch ein verfrühtes Stop-Codon (AS-Austausche) verkürzte Protein (3.3.3.2).

### 2.5.2.2 Bradford-Assay

Der von Bradford (1976) veröffentlichte Protein-Assay beruht auf einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums des sauren Farbstoffes Coomassie® Brilliant Blue G-250 von 465 nm zu 595 nm bei der Bindung an Proteine. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten, wobei die Wechselwirkung mit Arginin am stärksten, die Interaktion mit Lys, His, Trp, Tyr und Phe schwächer ist (Lottspeich, 1998). Mit verschiedenen, bekannten Konzentrationen eines Standard-Proteins (z.B. BSA) wird eine Eichgerade erstellt und anhand dieser die Konzentration des Proteingemisches ermittelt. Auch hier werden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dennoch ist die Genauigkeit dieser Methode, aufgrund der hohen Unspezifität der Farbstoff-Protein-Wechselwirkung und der damit möglicherweise großen Differenz des Absorptionsverhaltens von Eich- und Proben-Proteinen, begrenzt. Ein Vorteil des Bradford-Assays liegt in seiner Toleranz gegenüber Reduktions- (1 M DTT) und Denaturierungsmitteln (6 M Harnstoff) (Bio-Rad Protein Assay (1994), Bio-Rad, München). Störende Substanzen sind hingegen z.B. Triton X-100 (> 0.5 %) und SDS (> 0.1 %) (Lottspeich, 1998).

Das ursprüngliche Protokoll sieht die Messung in 1.5 ml Halbmikro-Einmalküvetten (Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag) vor, wobei 1 ml Coomassielösung mit jeweils 20  $\mu$ l Probe für

1 – 10 Min. inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt wird. Bei Messungen im Mikrotiterplatten-Photometer (SPECTRAMaxPLUS, Software: SOFTmaxPRO<sup>®</sup>, Modus: PreRead und PathCheck: Water Constant, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) werden die Volumina entsprechend auf 4 µl Probe und 200 µl Coomassielösung angepasst. Von stark verdünnten Lösungen werden 50 µl mit 200 µl Färbelösung inkubiert. In diesem Fall müssen die 4 µl Eichlösung mit 46 µl Proben-Puffer ergänzt und beim Erstellen der Eichgerade die veränderten BSA-Konzentrationen berücksichtigt werden.

### **Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G-250**

Das 5 x Farbstoffkonzentrat (Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G-250, Proteinassay, Bio-Rad, München) wird 1 : 4 mit Aqua dest. verdünnt und kann über Monate bei RT gelagert werden.

### **BSA-Eichlösungen**

Es werden Lösungen mit Konzentrationen von 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mg/ml BSA (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH, USA) in Aqua dest. angesetzt und kurzfristig bei 4°C gelagert.

### **2.5.2.3 BCA-Assay**

Für die Entwicklung des BCA-Assays machten sich Smith *et al.* (1985) zunutze, dass Bicinchoninsäure (BCA) mit Cu<sup>+</sup>-Ionen einen violetten Komplex bildet, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm besitzt. Bei der Inkubation von Proteinen mit Cu<sup>2+</sup>, wird dieses von den Aminosäuren Cys, Tyr und Trp sowie durch das Peptidrückgrat zu Cu<sup>+</sup> reduziert und damit die Komplexbildung ermöglicht. Der Färbetest toleriert Detergenzien, wird jedoch von EDTA, Saccharose und Glucose (> 10 mM), Glycin (1M), Ammoniumsulfat (> 5 %), Natriumacetat (2 M) und Natriumphosphat (1 M) gestört (Lottspeich, 1998). Laut Hersteller (PIERCE, Bonn) ist die Verwendung von bis zu 3 M Harnstoff möglich, der Einsatz von Reduktionsmitteln ist dagegen problematisch (≤ 1 mM DTT).

In je 50 µl Gesamtvolumen werden eventuell verschiedene Verdünnungen der Probe, sowie mehrere BSA-Konzentrationen für die Eichgerade hergestellt. Alle Ansätze sollten 1% SDS enthalten und 1 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt werden. Nach Zugabe von je 1 ml BCA-Reaktionsmix werden die Ansätze 30 Min. bei 60°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm im Photometer (V-550 UV/VIS, Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt) bestimmt.

### **BSA-Eichreihe**

Es werden 50 µl Aliquots mit Konzentrationen von 0, 1, 2, 5, 10, 20 µg/ml BSA (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH, USA) in Aqua dest. aus einer 1 mg/ml BSA-Stammlösung angesetzt, die wie die Proben 1 % SDS enthalten.

#### **BCA-Reaktionsmix (pro Messpunkt)**

1 ml SRA-Lösung  
20 µl SRB-Lösung

#### **SRB-Lösung**

4 % CuSO<sub>4</sub>

#### **SRA-Lösung (PIERCE, Bonn)**

1 % BCA-Natriumsalz  
2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O  
0.16 % Na<sub>2</sub>-Tartrat  
0.4 % NaOH  
0.95 % NaHCO<sub>3</sub>, pH 11.25

Für die Messung in VIS-Mikrotiterplatten (Microtest Plate 96-Well Flat Bottom, Sarstedt, Nürnberg) werden die Volumina entsprechend angepasst.

#### 2.5.2.4 Chlorophyllbestimmung

Chlorophyll-Konzentrationsbestimmungen werden in dieser Arbeit im Verlauf der Aufreinigung nativer Proteine aus Blattmaterial (2.5.7) durchgeführt. Durch eine Bestimmung der Absorption (A) von Chlorophyll *a* (Chl *a*) bei 663.6 nm und Chlorophyll *b* (Chl *b*) bei 646.6 nm kann nach der Methode von Porra *et al.* (1989) der Chlorophyllgehalt einer Lösung mit Hilfe der folgenden Formeln bestimmt werden:

$$\begin{aligned} \text{Chl } a &= 12.3 * A_{663.6 \text{ nm}} - 2.55 * A_{646.6 \text{ nm}} \quad [\mu\text{g/ml}] \\ \text{Chl } b &= 20.3 * A_{646.6 \text{ nm}} - 4.90 * A_{663.6 \text{ nm}} \quad [\mu\text{g/ml}] \end{aligned}$$

Die Messung erfolgt bei RT im Spectrophotometer V-550 UV/VIS (Jasco, Groß-Umstadt, Response: medium, Band Width: 0.5 nm) oder UV-2101PC (Shimadzu, Kyoto, Japan, Recording Range: 0 – 2, Slit Width: 0.5 nm). Mit der Referenz (Blank, 80 % Aceton) wird ein Nullabgleich (Auto Zero) außerhalb des Chlorophyllspektrums bei 750 nm durchgeführt. Je 2 – 5 µl Probe werden in 998 bzw. 995 µl Aceton (80 %, RT) gelöst (Vortex, Ultraschall). Unmittelbar nach einer Präzipitation der eventuell in der Probe verbliebenen Stärke (1 Min., 13000 rpm, RT, Tischzentrifuge, Mikro 12-24, Rotor: 2029, Hettich, Tuttlingen) wird die Absorption bei 663.6 nm und 646.6 nm gemessen. Zu hoch konzentrierte Lösungen (A > 1.0) werden entsprechend verdünnt. Es werden Vierfachbestimmungen durchgeführt.

#### 2.5.2.5 Aufnahme von Absorptionsspektren

Absorptionsspektren werden in Halbmikro-Präzisionsküvetten aus Quarzglas (SUPRASIL<sup>®</sup>, Hellma<sup>®</sup>/VWR International GmbH, Darmstadt, d = 10 mm) im Spectrophotometer (V-550 UV/VIS, Jasco Labor- und Daten Technik GmbH, Groß-Umstadt) gemessen. Das benötigte Probenvolumen variiert je nach Küvetten-Typ zwischen etwa 500 µl und 1 ml. Nach Aufnahme einer Puffer-Baseline wird dieselbe Küvette für die Messung der Probe verwendet. Die Messungen werden bei RT in einem variablen Bereich zwischen 200 – 850 nm mit einer Scan-Geschwindigkeit von 400 – 1000 nm/Min. (Response: fast – quick, Band Width: 1 nm, Data Pitch: 1 nm) durchgeführt.

### 2.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine können in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Ladung und Größe aufgetrennt werden. Als Trägermatrix für eine solche Elektrophorese dienen Polyacrylamidgele, die durch Copolymerisation von Acrylamid mit quervernetzendem Bisacrylamid entstehen. Die verwendete Acrylamidkonzentration und dadurch bedingte Porengröße des Polyacrylamid-Netzes richtet sich nach der Größe der zu trennenden Proteine. Im diskontinuierlichen Verfahren (TRIS-Chlorid/TRIS-Glycin-Puffersystem) werden die Proteine zunächst in einem so genannten Sammelgel mit geringer Acrylamidkonzentration fokussiert. Die Auftrennung erfolgt anschließend im höher prozentigen Trenngel.



### 2.5.3.1 Herstellung von Polyacrylamidgelen

In dieser Arbeit werden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 10 % und einer Dicke von 0.75 mm verwendet. In der Gießapparatur des Midget-Systems (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) können gleichzeitig 10 – 11 Gele gegossen werden. Dafür werden Aluminiumoxidplatten, Spacer und Glasplatten mit Ethanol gesäubert, aufeinander geschichtet und durch Transparentpapier vom nächsten Gel getrennt. Die Trenn- und Sammelgel-Lösungen werden in Saugflaschen angesetzt (Tab 2.8) und jeweils vor der Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) mindestens 15 Min. entgast. APS bildet in wässriger Lösung Sulfatradikale, durch die die radikalische Polymerisation des Acrylamids initiiert wird. TEMED dient als Katalysator dieser Reaktion und erleichtert die Bildung der Sulfatradikale. Das Trenngel wird in die Gießapparatur eingefüllt und zur Begrädigung der Oberfläche mit 200 µl Aqua dest. pro Gel bedeckt. Nach 60 Min. ist das Acrylamid soweit polymerisiert, dass das Wasser entfernt und die Apparatur mit Sammelgel aufgefüllt werden kann. Nach Einsetzen der Kämme zur Ausbildung von Probestaschen folgt eine weitere Inkubation von 60 Min. Während der langsamen Nachpolymerisation ü/N werden die Gele bei 4°C aufbewahrt und erst anschließend aus der Gießapparatur entfernt. Sie werden sowohl für denaturierende (2.5.3.2) als auch schwach denaturierende (2.5.3.3) Elektrophoresen verwendet und können bei 4°C mindestens 14 Tage feucht aufbewahrt werden.

Stammlösungen	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
Aqua dest.	11.2	23.4
1 M TRIS/HCl, pH 8.8	22.6	-
1 M TRIS/HCl, pH 6.8	-	5.2
80 % Glycerin	3.4	5.0
Acrylamid/Bisacrylamid	18.0	6.0
APS	0.4	0.2
TEMED	0.026	0.02

**Tab. 2.8 Zusammensetzung der Lösungen für Polyacrylamidgele (10 %)**

Acrylamid/Bisacrylamid: 30% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung im Verhältnis 29 : 1 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg). Die Lösungen werden zunächst ohne APS (Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich, Steinheim) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Serva, Heidelberg) angesetzt und mindestens 15 Min. entgast. Der Ansatz ist ausreichend für 10 – 11 Gele. Bei dieser Zusammensetzung beträgt die Acrylamidkonzentration im Trenngel 10 % und im Sammelgel 4.5 %.

### 2.5.3.2 Denaturierende SDS-PAGE

Bei der denaturierenden PAGE nach Laemmli (1970) wird die Eigenladung der Proteine durch das anionische Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) komplett überdeckt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Protein-Micellen im elektrischen Feld ist allein abhängig von der Größe der Proteine. Kleine Proteine wandern schneller durch das Polyacrylamidnetz als größere. Die über einen bestimmten Bereich lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und der Wanderungsstrecke wird zur Molekulargewichts-Bestimmung mit Hilfe eines geeigneten Standards ausgenutzt.

### Probenvorbereitung und Durchführung der Elektrophorese

Ein Gel wird in eine Elektrophoresekammer eingespannt und sowohl das Kathoden- als auch das Anoden-Reservoir mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinlösungen werden in einem Verhältnis von 3 : 1 bis 2 : 1 mit Probenpuffer versetzt und 3 Min. im Wasserbad (HB 4basic, IKA®-Labortechnik, Staufen) gekocht. Das im Probenpuffer enthaltene Reduktionsmittel reduziert vorhandene Disulfidbrücken und sorgt zusammen mit dem SDS für eine vollständige Denaturierung der Proteine. Durch Anfärbung mit Bromphenolblau kann die Lauffront während der Elektrophorese verfolgt werden. Die so vorbereiteten Proben werden in die Taschen des Gels pipettiert und mit einer Spannung von 50 V im Sammelgel fokussiert (Electrophoresis Power Supply EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach Übertritt der Proben in das Trenngel kann die angelegte Spannung auf bis zu 200 V erhöht werden. Die Auftrennung erfolgt bei RT. Die verwendeten Protein-Standards (Tab 2.9) werden nach den Angaben des Herstellers angesetzt und sind bei -20°C bzw. für kürzere Zeit auch bei 4°C haltbar.

SDS - 7 - Marker		SDS - 6H - Marker	
Protein	MW [kDa]	Protein	MW [kDa]
Albumin, Rind	66	Myosin, Kaninchen, Muskel	205
Albumin, Ei	45	$\beta$ -Galactosidase, <i>E.coli</i>	116
Glyceraldehyd-3-PDH	36	Phosphorylase b, Kanin. Muskel	97.4
Carboanhydrase, Rind	29	Albumin, Rind	66
Trypsinogen, Rind, Pankreas	24	Albumin, Ei	45
Trypsin-Inhibitor, Sojabohne	20.1	Carboanhydrase, Erythrocyten	29
$\alpha$ -Lactalbumin, Rind, Milch	14.2		

**Tab. 2.9 Protein-Standards**  
 SDS-7-Marker: Dalton Marker VII-L für PAGE (Sigma-Aldrich, Steinheim). SDS-6H-Marker: High Molecular Weight Marker (Sigma-Aldrich, Steinheim). MW: Molekulargewicht in [kDa]. Glyceraldehyd-3-PDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Kaninchen, Muskel.

#### Probenpuffer (3 – 4 x konzentriert)

100 mM	TRIS, pH 6.8
24 % (w/v)	Glycerin
4 % (w/v)	SDS
1.4 M	$\beta$ -Mercaptoethanol
0.4 mM	Bromphenolblau

#### SDS-Laufpuffer

25 mM	TRIS (nicht titriert)
192 mM	Glycin (Applichem)
0.1 % (w/v)	SDS
0.5 mM	EDTA

#### 2.5.3.3 Schwach denaturierende PAGE

Eine schonende Auftrennung von Proteinen kann durch Ersetzen des SDS im Laufpuffer durch Deriphat, ein mildes Detergens, das die natürliche Proteinstruktur stabilisiert, erreicht werden. Die Proben werden dafür mit 80 % Glycerin im Verhältnis 4 : 1 bis 9 : 1 beschwert und weder mit Reduktionsmitteln versetzt noch gekocht. Die Elektrophoresekammer wird mit Hilfe eines Wasserbades (Haake GH und D1, Modell Fisons, Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe) während des Laufes auf 4°C gekühlt. Die angelegte Spannung beträgt zunächst

40 V, nach Übergang der Proben ins Trenngel 100 V (EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

Da im schwach denaturierenden Gelsystem SDS fehlt, ist eine exakte Größenbestimmung der Proteine nicht möglich. Soll das Molekulargewicht zumindest ungefähr abgeschätzt werden können, werden die Proben wie für die schwach denaturierende Elektrophorese vorbereitet, der Deriphatlaufrpuffer jedoch durch SDS-Laufpuffer (2.5.3.2) ersetzt. Die Proteine behalten dabei weitestgehend ihre native Struktur und Aktivität, ihre Ladung wird jedoch ausreichend abgeschirmt, um eine Größentrennung zu ermöglichen.

#### **Deriphat-Laufpuffer**

12 mM	TRIS (nicht titriert)
48 mM	Glycin (Applichem, Darmstadt)
0.15 %	Deriphat (Cognis Deutschland GmbH und Co. KG, Düsseldorf)

#### **2.5.3.4 Färbung von Polyacrylamidgelen**

In denaturierenden Gelen werden die Proteinbanden unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese in einer Coomassie-Färbelösung fixiert. Bei schwach denaturierenden Gelen kann zunächst eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden (optional). Im Anschluss daran werden die Proteinbanden ebenso wie in den denaturierenden SDS-Gelen mit Coomassie gefärbt.

#### **Coomassiefärbung**

Zur Fixierung der Proteinbanden werden die Gele unmittelbar im Anschluss an die Elektrophorese für mindestens 30 Min. in einer Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue-Färbelösung in Rotilabo<sup>®</sup>-Frischhalteboxen (Roth, Karlsruhe) vorsichtig bewegt (Phero-Shaker, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen). Durch 30 – 45 Min. Inkubation im ersten Entfärber und ü/N im zweiten Entfärber wird der Hintergrund der Gele anschließend vollständig entfärbt.

#### **Coomassie-Färbelösung**

0.175 %	Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G 250
50 % (v/v)	Ethanol
7 % (v/v)	Essigsäure

#### **Erster Entfärber**

10 % (v/v)	Ethanol
7 % (v/v)	Essigsäure

#### **Zweiter Entfärber**

10 % (v/v)	Essigsäure
------------	------------

#### **Aktivitätsfärbung**

Im Verlauf einer schwach denaturierenden Gelelektrophorese bleibt die natürliche Struktur und Funktion der Proteine weitestgehend erhalten. Bei Zugabe eines geeigneten Substrates kann die Aktivität eines Enzyms im Polyacrylamidgel überprüft werden. Tyrosinasen lassen sich mit Hilfe des in Kapitel 2.5.9.1 beschriebenen MBTH-Assays (Pifferi und Baldassari, 1973) nachweisen. Dieser Test ist von Nellaiappan und Vinayakam (1993) für Gelsysteme modifiziert worden und wird hier sowohl zur Ermittlung der Monophenolhydroxylase- als auch der Diphenoloxidase-Aktivität eingesetzt. Eine anschließende Coomassie-Färbung des aktivitätsgefärbten Gels ermöglicht die Zuordnung der enzymatischen Aktivität zu diskreten Proteinbanden. Bei sehr hoher Enzymaktivität kann eine intensive Färbung der Banden

einschließlich des Gelhintergrundes entstehen. Diese ist irreversibel und überdeckt daher möglicherweise die Coomassie-Färbung der Proteinbanden. In diesem Fall kann es von Vorteil sein, parallel zum aktivitätsgefärbten ein identisches Gel, ohne vorherige Inkubation in Substratlösung, direkt in Coomassie® zu fixieren.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele für etwa 10 Min. in kaltem Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7.0, 4°C) inkubiert. Auf diese Weise wird der basische Trenngelpuffer (pH 8.8) durch neutralen Puffer (pH 7.0) ausgetauscht und damit die Autooxidation des Substrates (Dopamin) herabgesetzt (2.5.9.1). Anschließend werden die Gele in die Aktivitäts-Färbelösung (4°C) überführt, eventuell abgedeckt und die Färbung dokumentiert, sobald deutliche Banden zu erkennen sind (2.5.3.5). Die Dauer der Inkubation ist dabei abhängig von Temperatur und Beleuchtungsstärke sowie von der Wahl des Substrates. Dopamin-Färbungen sind in der Regel nach 5 – 10 Min. abgeschlossen, Tyraminfärbungen treten nach 30 – 60 Min. auf.

<b>Aktivitäts-Färbelösung</b>	ausreichend für ein Gel	Stammlösung
65 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0	20 ml	100 mM
3.2 mM Substrat	10 ml	10 mM
450 µM MBTH	1 ml	13.9 mM

Als Substrate werden Dopamin zum Nachweis der Diphenoloxidaseaktivität und Tyramin für die Monophenolhydroxylaseaktivität verwendet. Zur Aktivierung können 0.3 % SDS eingesetzt werden. Die Lösungen werden, wie in Abschnitt 2.5.9.2 beschrieben, angesetzt und behandelt.

### 2.5.3.5 Digitalisierung und Molekulargewichtsbestimmung

Nach einer Aktivitäts- oder Coomassiefärbung werden die Gele eingescannt (ScanJet 4c (Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen) und zwischen zwei Lagen Einmachfolie (Alba Einmach-Haut, Gehring & Neiweser GmbH + Co. KG, Bielefeld) getrocknet (Slab Gel Dryer 2003, LKB Produkter AB, Bromma, Schweden; Vakuum-Pumpe Model RV5, Edwards High Vacuum International, Crawley, England; Kältefalle Typ KF-2-60, Bachofer GmbH, Reutlingen).

Molekulargewichte können in den digitalisierten SDS-Gelen anhand eines geeigneten Proteinstandards im gleichen Gel mit Hilfe der Quantity One-Software (Bio-Rad, München) bestimmt werden.

### 2.5.4 Western Blot

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine können mit Hilfe eines senkrecht zur Gelebene angelegten elektrischen Feldes auf eine Membran überführt werden. Bei diesem Blot-Vorgang bleibt das Bandenmuster der Auftrennung erhalten und wird fixiert. Eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran ist wesentlich einfacher zu handhaben als ein Gel und erleichtert den spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Der Transfer wird hier im Tankblot-Verfahren durchgeführt.

### 2.5.4.1 Elektrotransfer (Blotting)

Nach Beendigung der Gelelektrophorese (2.5.3.2) wird das Gel in Blot-Puffer äquilibriert. Zwei Schaumstofflagen, zwei Filterpapierstücke (GB002, Schleicher und Schuell, Dassel) sowie die Nitrocellulosemembran (Optitran BA-S 83, Porenweite: 0.2  $\mu\text{m}$ , Schleicher und Schuell, Dassel) in Gelgröße werden ebenfalls in Blot-Puffer eingeweicht. Die Transfereinheit wird mit Handschuhen und Blot-Pinzette luftblasenfrei in der folgenden Reihenfolge zusammengesetzt

Kathodenseite der Transfereinheit (schwarz)  
 Schaumstoff  
 Filterpapier  
 Gel  
 Nitrocellulosemembran  
 Filterpapier  
 Schaumstoff  
 Anodenseite der Transfereinheit (weiß),

in richtiger Orientierung in die Tankblotkammer (Tank Transphor Electrophoresis Unit, Model TE 22, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) eingestellt und mit 4°C kaltem Blot-Puffer bedeckt. Die Kammer wird mit Hilfe eines Wasserbades (Modell Fisons GH und D1, Haake Messtechnik GmbH, Karlsruhe) auf 4°C gekühlt und der Puffer leicht gerührt (IKAMAG<sup>®</sup> RCT, IKA<sup>®</sup>-Labortechnik, Staufen). Der Elektrotransfer findet für 90 Min. bei 146 mA statt (EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Im Anschluss wird die Nitrocellulosemembran für die nachfolgenden Schritte in eine Rotilabo<sup>®</sup>-Frischhaltebox (Roth, Karlsruhe) überführt und kurz in 1 x TBS-Puffer gewaschen. Die Membran sollte auch weiterhin ausschließlich mit einer Blot-Pinzette oder Handschuhen gehandhabt werden. Die Inkubationen erfolgen, wenn nicht anders angegeben, bei RT auf dem Schüttler (Phero-Shaker, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen).

#### Blot-Puffer

20 mM TRIS (nicht titriert)  
 150 mM Glycin (Applichem, Darmstadt)  
 0.05 % (w/v) SDS  
 20 % (v/v) Methanol

#### 1 x TBS-Puffer

10 mM TRIS/HCl, pH 7.5  
 150 mM NaCl  
 (Stammlösung: 5 x, RT)

Der Blot-Puffer (2 Liter sind ausreichend) wird bei 4°C gelagert und kann 5 mal wieder verwendet werden.

### 2.5.4.2 Ponceau S-Färbung

Die Effizienz des Elektrotransfers kann durch reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S überprüft werden (Salinovich und Montelaro, 1986). Dazu wird die Membran kurz (1 – 2 Min.) in die Färbelösung eingelegt. Nach Entfärben des Hintergrundes durch Waschen mit Aqua dest. werden die sichtbaren Banden des Protein-Standards mit einem Stift markiert. Die vollständige Entfärbung der Membran resultiert aus mehrfachem Wasserwechsel. Dies gelingt umso schneller, je kürzer die vorherige Inkubation mit der Ponceau S-Lösung erfolgt.

**Ponceau S-Färbelösung**

0.2 % (w/v) Ponceau S (Merck, Darmstadt)

3 % (w/v) Trichloressigsäure (Merck, Darmstadt)

Die Färbelösung wird bei 4°C gelagert und ist beliebig oft wieder verwendbar.

**2.5.4.3 Blockierung der Membran**

Da BSA von dem verwendeten Antikörper nicht erkannt wird, eignet es sich zur Absättigung der Nitrocellulose, um unspezifischen Markierungen durch den Antikörper vorzubeugen. Die Membran wird 2 x 5 Min. in 1 x TBS-Puffer gewaschen und anschließend für mindestens 60 Min. bei RT oder ü/N bei 4°C in etwa 40 ml Blocking-Lösung leicht bewegt (IKA-VIBRAX-VXR, IKA®-Labortechnik, Staufen).

**Blocking-Lösung** (50 ml für einen Blot)

3 % (w/v) BSA (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH, USA)

1 x TBS-Puffer (2.5.4.1)

Der pH-Wert des Puffers (pH 7.5) kann sich durch die Zugabe von BSA verändern und sollte daher überprüft und eventuell neu eingestellt werden (1 M NaOH).

**2.5.4.4 Proteinmarkierung mit Antikörpern**

Die auf der Membran fixierten Proteine werden mit Hilfe von zwei Antikörpern (AK) nachgewiesen. Der erste Antikörper (AK<sub>1</sub>) bindet spezifisch an das gesuchte Protein. Da dieser AK<sub>1</sub> durch Immunisierung von Mäusen hergestellt worden ist, können konstante Bereiche darin von mehreren Molekülen eines zweiten AK (AK<sub>2</sub>) erkannt werden. Auf diese Weise erfolgt eine Signalverstärkung. Der AK<sub>2</sub> ist mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert und kann über eine enzymatische Farbreaktion detektiert werden (2.5.4.5). Die verwendeten Antikörper sind in Tab 2.10 angegeben.

Antikörper	Verdünnung	Puffer
<b>Nachweis des Strep-Tags</b>		
AK <sub>1</sub> : Strep-Tag II spezifischer AK	2 µg/ml	0.5 x Blocking-Lösung (2.5.4.3) 0.5 x TBS-Puffer
AK <sub>2</sub> : Anti-Maus IgG <sub>1</sub>	1 : 5000	0.5 x Blocking-Lösung (2.5.4.3) 0.5 x TBS-Puffer
<b>Nachweis des His-Tags</b>		
AK <sub>1</sub> : Anti-His <sub>5</sub> -Antikörper (Maus)	1 : 1000	0.5 x Blocking-Lösung (2.5.4.3) 0.5 x TBS-Puffer
AK <sub>2</sub> : Anti-Maus IgG <sub>1</sub>	1 : 5000	1 x TBSTT-Puffer

**Tab. 2.10 Verwendete Antikörper und Inkubationsbedingungen**

Für einen Blot sind je 5 ml Antikörper-Lösung (frisch angesetzt, bis zur Verwendung auf Eis gehalten) ausreichend. Strep-Tag II spezifischer AK: monoklonaler AK, Stammlösung: 100 µg/ml in Aqua dest. (IBA, Göttingen). Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper (Maus): gerichtet gegen ein Epitop aus 5 Histidin-Resten (Qiagen, Hilden). Anti-Maus IgG: whole molecule, Alkalische Phosphatase-Konjugat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim).

Im Anschluss an die BSA-Blockierung wird nach dem folgendem Protokoll verfahren.

Die Waschschritte werden dabei in einer Rotilabo®-Frischhaltebox (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Die verschiedenen Antikörper-Lösungen werden zusammen mit der Membran möglichst luftblasenfrei in eine Plastikfolie in Blot-Größe eingeschweißt und zur Inkubation auf dem Schüttler (Phero-Shaker, Biotec-Fischer GmbH, Reiskirchen) mit Glasmurmeln beschwert, um eine gleichmäßige Verteilung der Lösung zu erzielen. Alle Inkubationen erfolgen bei RT.

- 2 x 10 Min. Waschen in 1 x TBSTT-Puffer
- 1 x 10 Min. Waschen in 1 x TBS-Puffer (2.5.4.1)
- 60 Min. Inkubation mit AK<sub>1</sub> (Pufferbedingungen sind in Tab 2.10 angegeben)
- 2 x 10 Min. Waschen in 1 x TBSTT-Puffer
- 1 x 10 Min. Waschen in 1 x TBS-Puffer (Schritt entfällt, wenn AK<sub>2</sub> in TBSTT-Puffer)
- 60 Min. Inkubation mit AK<sub>2</sub> (Pufferbedingungen sind in Tab 2.10 angegeben)
- 4 x 10 Min. Waschen in 1 x TBSTT-Puffer

#### 1 x TBSTT- Puffer

- 20 mM TRIS/HCl, pH 7.5
- 0.5 M NaCl
- 0.05 % (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 0.2 % (v/v) Triton X-100 (Boehringer, Mannheim)

Der Puffer wird als 5 x Stammlösung ohne Tween 20 und Triton X-100 bei RT gelagert. Die Detergenzien werden erst unmittelbar vor der Verwendung zugegeben.

#### 2.5.4.5 Nachweisreaktion mit BCIP und NBT

Der Nachweis der Antikörpermarkierung erfolgt über die mit dem AK<sub>2</sub> konjugierte Alkalische Phosphatase, die in basischem Milieu die Abspaltung einer Phosphatgruppe von BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) katalysiert. In einer dadurch begünstigten kombinierten Redoxreaktion (BCIP-Oxidation, NBT-Reduktion) entsteht ein dunkel violetter Niederschlag (Blake *et al.*, 1984 und Lottspeich, 1998).

Die Nitrocellulosemembran wird in einer frisch angesetzten, kalten Lösung aus 5 ml AP-Puffer, 33 µl NBT und 16.5 µl BCIP in Plastikfolie eingeschweißt und bis zur Entstehung deutlicher Farbsignale (etwa 5 – 15 Min.) inkubiert. Der entwickelte Blot wird getrocknet und eingescannt (ScanJet 4c, Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen), da die Signale mit der Zeit verblassen.

#### AP-Puffer

- 100 mM TRIS/HCl, pH 9.5
- 100 mM NaCl
- 5 mM MgCl<sub>2</sub>

**BCIP** (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Na-Salz, Serva, Heidelberg)

- 5 % (w/v) gelöst in Aqua dest. und bei -20°C gelagert

**NBT** (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim)

- 5 % (w/v) gelöst in DMF (N,N-Dimethylformamid, Sigma-Aldrich, Steinheim), -20°C

## 2.5.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine selektive und sehr effektive Methode zur Aufreinigung eines Moleküls, bei der dessen spezifische Interaktion mit einem Bindungspartner ausgenutzt wird. Der Ligand wird dafür an eine Säulenmatrix gekoppelt, das zu reinigende Molekül wird gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Bei Proteinen sind so genannte Tags weit verbreitet. Dies sind oftmals kurze Peptide, die durch Insertion eines entsprechenden DNA-Abschnitts in ein rekombinantes Protein eingefügt werden können. Für die Lokalisation des Tags wird meist der N- oder C-Terminus ausgewählt, da statistisch nur eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, dass diese Regionen bei der Faltung im Protein-Innenen verborgen werden, und sie somit die native Struktur wenig beeinflussen (Lottspeich, 1998). In dieser Arbeit werden Strep- und His-Tag nicht nur zur Aufreinigung der Proteine verwendet. Vielmehr bietet diese Methode die Möglichkeit zur Rückfaltung von Proteinen im immobilisierten Zustand auf einer Säulenmatrix. Als Indikator für den Erfolg solcher Faltungs-Versuche dient die Enzymaktivität, die mit Hilfe eines Tropfen-Tests (2.5.9.3) überprüft werden kann.

### 2.5.5.1 Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-System

Die Bindung zwischen Biotin (Vitamin H) und Avidin (oder Streptavidin aus *Streptomyces avidinii*) ist eine der stärksten biologischen Bindungen. Auf dieser Grundlage ist von der Firma IBA (Institut für Bioanalytik, Göttingen) das Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-System entwickelt worden. An das dabei verwendete Säulenmaterial, die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharose, ist Strep-Tactin<sup>®</sup>, ein Streptavidin-Derivat, gekoppelt. Rekombinante Proteine, die einen so genannten Strep-Tag (2.4.1), ein Peptid aus acht Aminosäuren (Abb 2.12) enthalten, binden an Strep-Tactin<sup>®</sup> und können auf diese Weise von anderen Proteinen getrennt werden.

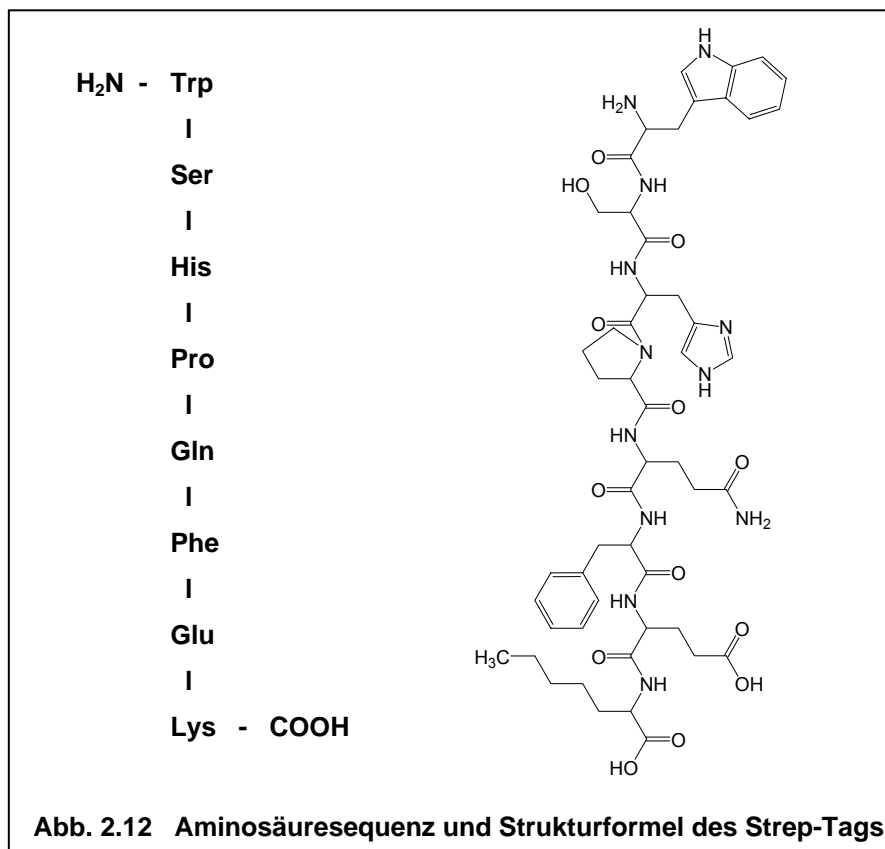
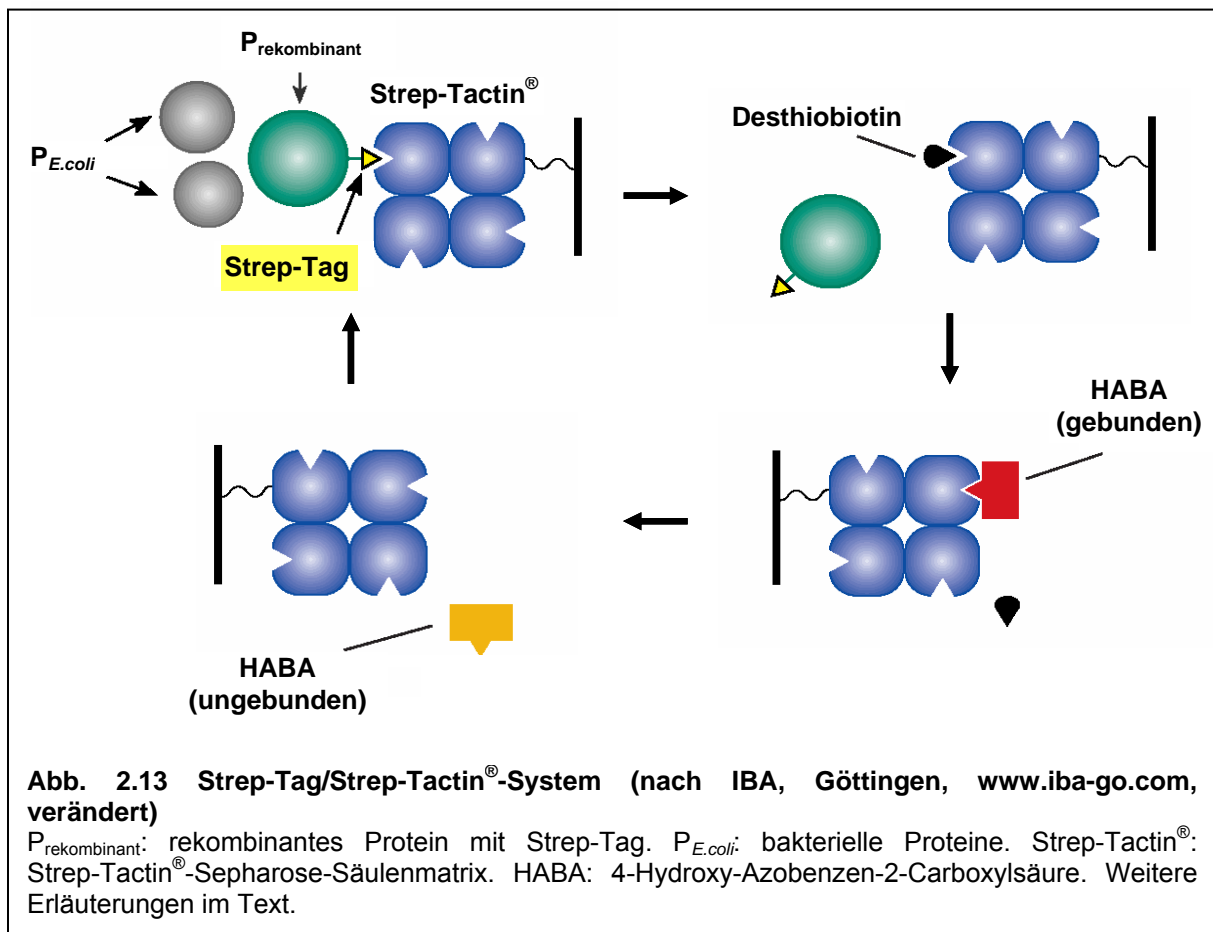




Abb. 2.13 zeigt den vorgesehenen Aufreinigungs-Zyklus. Nach Äquilibrierung der Säule wird das rekombinante Protein ( $P_{\text{rekombinant}}$ ) über den Strep-Tag an die Säulenmatrix gebunden und durch verschiedene Waschstschritte von noch vorhandenen bakteriellen Proteinen ( $P_{E.coli}$ ) getrennt. Die Elution des Proteins erfolgt mit Hilfe von Desthiobiotin, einem Biotin-Derivat, das im Gegensatz zu Biotin reversibel an Strep-Tactin<sup>®</sup> bindet. Zur Regeneration der Sepharose dient HABA (4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure), welches das Desthiobiotin verdrängt und das Säulen-Material bei vollständiger Besetzung aller Bindungsstellen rot färbt. HABA selbst hat eine gelbe Farbe und kann mit Waschpuffer von der Säule abgewaschen werden, bis diese wieder farblos ist. Auf diese Weise sind die Säulen mehrfach verwendbar und durch den Farbwechsel leicht zu handhaben.



Nach den Angaben des Herstellers (IBA, 2000) hat das Material eine Kapazität von 50 - 100 nmol Protein pro 1 ml Sepharose. Das pH-Optimum der Bindung liegt zwischen pH 4 und pH 9. Einen entscheidenden Nachteil der Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-Interaktion stellt ihre relativ geringe Stabilität gegenüber verschiedenen Detergenzien, Reduktions- und Denaturierungsmitteln dar. Die tolerierten Konzentrationen verschiedener ausgewählter Reagenzien sind in Tab. 2.11 angegeben.

Reagens	Konzentration [%]		Reagens	Konzentration [M]	
	(2003)	(2005)		(2003)	(2005)
Triton X-100	0.1 (v/v)	2	NaCl	1.0	5.0
Tween 20	0.1 (v/v)	2	GdnHCl	0.5	1.0
CHAPS	0.1 (v/v)	0.1	Harnstoff	0.5	1.0
SDS	0.01	0.1	$\beta$ -Mercaptoethanol	0.005	0.05
Glycerin	10	25	DTT	0.005	0.05

**Tab. 2.11 Mit dem Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-System kompatible Reagenzien (IBA, Göttingen)**  
Die Angaben sind im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit aktualisiert worden. Hier sind die Werte zum Zeitpunkt der Versuche (2003) den aktuellen Daten (2005) gegenübergestellt.

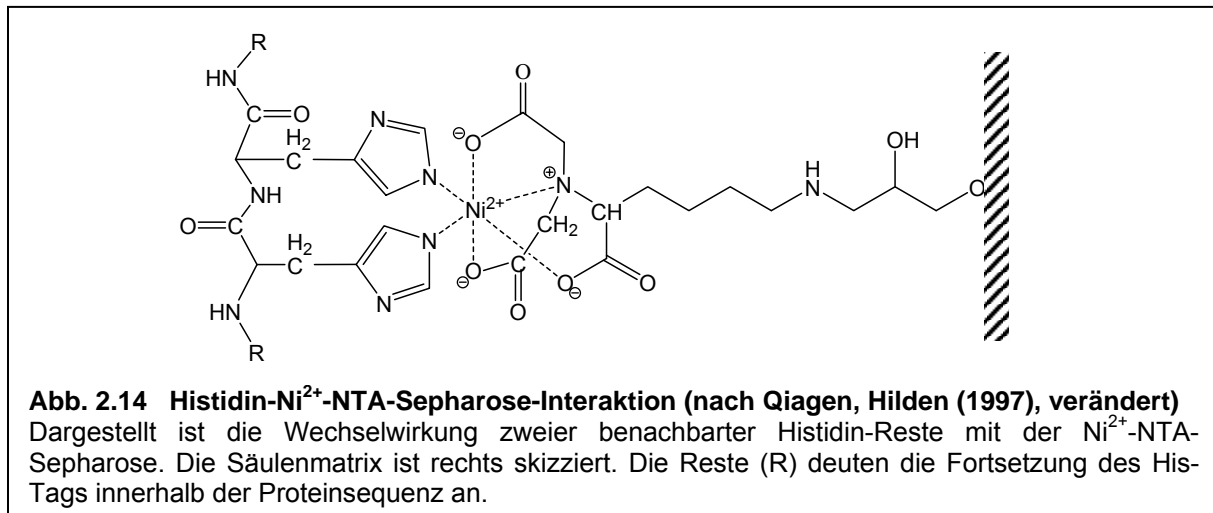
Ein Standardprotokoll für die Durchführung von Aufreinigungs- und Rückfaltungsversuchen von Strep-Tag-Proteinen mit Hilfe von Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sephrose-Säulen ist in Tab. 2.12 zusammengefasst. Es ist in Anlehnung an die Angaben des Herstellers (IBA, 2000) speziell für Proteine erstellt worden, die nach dem Aufbruch von Bakterienzellen mittels einer Zellpresse in der löslichen Fraktion enthalten sind (Überstand aus der French Press: FP-Ü, 2.5.1.3). Abweichungen von diesem Ablauf sind an entsprechender Stelle angegeben (3.3.2). Die Experimente werden mit einem Säulen-Volumen von 200  $\mu$ l in Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatography Columns (Bio-Rad, München) bei RT durchgeführt, wobei die aufgetragenen Lösungen die Säule ohne Druck durchwandern. Nach jeder Pufferzugabe wird vor dem nächsten Schritt der vollständige Durchlauf des Puffervolumens durch das Säulenbett abgewartet. Im Anschluss an die Regeneration können die Säulen bei 4°C gelagert und direkt erneut verwendet werden.

Fraktion	Schritt	Volumen	Puffer
	Äquilibrierung	3 x 1 ml	50 mM TRIS/HCl, pH 8.0
P	Probenauftrag	1 x 200 $\mu$ l	Probe
W1-W5	Waschen	5 x 200 $\mu$ l 3 x 1 ml	50 mM TRIS/HCl, pH 8.0 50 mM TRIS/HCl, pH 8.0
A1	Aktivierung	1 x 200 $\mu$ l	Aktivierungspuffer  Aktivierungspuffer
A2		Verschluss des Säulenauslaufs 1 x 200 $\mu$ l Inkubation (60 Min. – ü/N)	
A3		Öffnen des Säulenauslaufs 1 x 200 $\mu$ l	
	Waschen	4 x 200 $\mu$ l 3 x 1 ml	50 mM TRIS/HCl, pH 8.0 50 mM TRIS/HCl, pH 8.0
E1	Elution	1 x 100 $\mu$ l	50 mM TRIS/HCl, pH 8.0, 2.5 mM DB 50 mM TRIS/HCl, pH 8.0, 2.5 mM DB
E2		1 x 500 $\mu$ l	
R	Regeneration	3 x 1 ml 5 x 1 ml	1 x Regenerationspuffer (HABA) 50 mM TRIS/HCl, pH 8.0

**Tab. 2.12 Standard-Protokoll für Faltungsversuche auf Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sephrose-Säulen**  
Die Fraktionen sind jeweils nach dem Aufreinigungsschritt bezeichnet, in dem sie aufgefangen werden. DB: Desthiobiotin (IBA, Göttingen). Die Zusammensetzung der verschiedenen Aktivierungspuffer ist in Tab. 3.2 in Kapitel 3.3.2.5 angegeben. Die Inkubationen erfolgen bei RT oder 4°C. Das verwendete Säulenvolumen beträgt 200  $\mu$ l. Regenerationspuffer: Puffer R, HABA (4-Hydroxy-Azobenzon-2-Carboxylsäure; IBA, Göttingen).

### 2.5.5.2 His-Tag/Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose

Ein so genannter His-Tag besteht aus einer Sequenz von meist sechs Histidinen, ist damit klein und bei pH 8.0 ungeladen, sodass er die Proteinfaltung nicht wesentlich beeinflusst (Qiagen, 1997). Ein His-Tag-Protein kann über zwei der Histidinreste mit Metall-Ionen, wie z.B. Ni<sup>2+</sup>, interagieren. Die Nickel-Ionen werden zuvor über vier ihrer Koordinationsstellen mit Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert, die an eine Sepharosematrix gebunden vorliegt. Die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung des Proteins mit dieser Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulenmatrix steigt mit der Anzahl der Histidinreste, sechs Histidine sind jedoch statistisch ausreichend für die Bindung, die in Abb. 2.14 schematisch dargestellt ist (Conti *et al.*, 2000).



Die Stabilität des Histidin-Nickel-Komplexes wird von verschiedenen Reagenzien beeinflusst, von denen einige in Tab. 2.13 aufgelistet sind.

Reagens	Effekt	Konzentration
TRIS, HEPES, MOPS	sekundäre/tertiäre Amine reduzieren Ni <sup>2+</sup> -Ionen	100 mM
EDTA, EGTA	Verdrängung der Nickel-Ionen von der Matrix	1 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	Reduktion der Nickel-Ionen	20 mM
DTT	Reduktion der Nickel-Ionen	1 mM
Nicht ionische Detergenzien (Triton, Tween)	Entfernung von Hintergrund-Proteinen und Nucleinsäuren	2 %
Anionisches Detergens (SDS)		0.3 %
GdnHCl	Solubilisierung von Proteinen	6 M
Harnstoff	Solubilisierung von Proteinen	8 M
Glycin, Glutamin, Arginin	Interaktion mit Ni <sup>2+</sup> -Ionen	nicht empfohlen
Histidin	Bindung an Ni <sup>2+</sup> -NTA:	> 100 mM
	Verhinderung unspezifischer Bindung:	20 mM
NaCl	Verhinderung ionischer Wechselwirkungen	2 M
Glycerin	Verhinderung hydrophober Wechselwirkungen	50 %
Ethanol	Verhinderung hydrophober Wechselwirkungen	20 %

**Tab. 2.13 Kompatibilität verschiedener Reagenzien mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Materialien (Qiagen, 1997)**  
Angegeben sind maximal empfohlene bzw. bereits in anderen Studien erfolgreich eingesetzte Konzentrationen.

Tab. 2.14 zeigt ein Protokoll, das für die Protein-Rückfaltungsversuche (3.4.4.4) auf Ni<sup>2+</sup>-Säulen verwendet wird. Die genaue Versuchs-Durchführung und Zusammensetzung der Puffer aller anderen Experimente wird im Ergebnisteil (3.4.2.5 und 3.4.4.4) erläutert.

Fraktion	Schritt	Volumen	Puffer
	Ni <sup>2+</sup> -Beladung	1 x 1.25 ml	0.1 M NiCl <sub>2</sub>
	Äquilibrierung	2 - 3 x 500 µl	8 M Harnstoff, 10 mM β-Mercaptoethanol
P	Probenauftrag	1 x 500 µl	Probe
W1-W3	Waschen	3 x 500 µl	8 M Harnstoff, 10 mM β-Mercaptoethanol
RF1	Rückfaltung	1 x 500 µl	Rückfaltungspuffer
RF2		Säulenauslaufverschluss 1 x 500 µl	Rückfaltungspuffer
RF3		Inkubation (60 - 90 Min.) Öffnen des Säulenauslaufs 1 x 500 µl	Rückfaltungspuffer
E1	Elution	1 x 500 µl	Elutionspuffer
E2		1 x 1 ml	Elutionspuffer
R1 – R3	Regeneration	3 x 1 ml	Aqua dest.
		3 x 500 µl	2 % SDS, 0.3 M Imidazol
		3 x 1 ml	Aqua dest.
R4 – R6		3 x 500 µl	0.5 M EDTA
		3 x 1 ml	Aqua dest.
		1 x 500 µl	Ethanol (20 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (40 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (60 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (80 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (100 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (80 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (60 %)
		1 x 500 µl	Ethanol (40 %)
		2 x 500 µl	Ethanol (20 %)

**Tab. 2.14 Protokoll für Rückfaltungsversuche auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose-Säulen**

Die Fraktionen sind jeweils nach dem Durchführungsschritt bezeichnet, in dem sie aufgefangen werden. Die angegebenen Volumina werden nacheinander aufgegeben, wobei jeweils der vollständige Säulendurchlauf abgewartet wird. Für die Probe werden 500 µg pelletierte Inclusion Bodies in 8 M Harnstoff und 10 mM β-Mercaptoethanol gelöst (15 Min., 37°C, Drehrad, Wärmeschrank, 3 Min. bei RT und 13000 rpm zentrifugiert). Die Rückfaltungspuffer entsprechen (soweit nicht anders angegeben) den in Tab. 2.15 beschriebenen Puffern mit folgenden Änderungen: 50 mM MOPS/NaOH, pH 6.5 (1 M, RT, sterilfiltriert, nicht autoklaviert). 50 mM TRIS/HCl, pH 8.0 (1 M, RT). Die Reduktionsmittel DTT, GSH und GSSG werden in jedem Puffer durch 10 mM β-Mercaptoethanol ersetzt, welches aus einer 1 mM frischen Stammlösung vor der Verwendung zugegeben wird. Zusätzlich enthalten alle Puffer 50 µM CuSO<sub>4</sub>, das aus 100 mM (4°C) ebenfalls frisch zugesetzt wird, und 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid, Serva, Heidelberg, 100 mM in Ethanol, -20°C). Arginin entfällt. Für die Elutionspuffer werden alle Rückfaltungspuffer mit 0.5 M Imidazol ergänzt (Zugabe des abgewogenen Feststoffs). Die Elutionspuffer 2, 4, 6, 8, 11, 12 und 15 enthalten zusätzlich 0.2 % SDS. Die Inkubationen erfolgen bei RT. Das verwendete Säulenvolumen beträgt 500 µl.

Die mit NTA aktivierte Chelating Sepharose™ (Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wird in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert. Das homogenisierte Material wird zur Verwendung in Chromatographie-Säulen (Poly-Prep®, Bio-Rad, München) überführt. Für

1 µg Protein wird 1 µl abgesetztes Säulenvolumen benötigt. Nach der Komplexierung von Ni<sup>2+</sup> an NTA, durch Zugabe von 0.1 M NiCl<sub>2</sub>, werden die Säulen mit dem Puffer äquilibriert, in dem auch die Probe aufgetragen wird. Die Versuchsdurchführung erfolgt ohne Druck, d.h. vor jedem Schritt wird der vollständige Durchlauf des Puffervolumens durch das Säulenbett abgewartet. Das gebundene Protein wird gewaschen und anschließend mit 0.5 M Imidazol (Sigma-Aldrich, Steinheim) eluiert. Dieses konkurriert bereits ab einer Konzentration von 100 – 250 mM mit dem Imidazolring der Histidinreste und verdrängt die His-Tag-Proteine von der Säule. Eine andere Möglichkeit der Elution besteht in der Erniedrigung des pH-Wertes auf 4.5 – 5.0. In diesem Milieu werden Histidine (pK<sub>a</sub>-Wert ~ 6.0) protoniert und dissoziieren von den Metallatomen (Qiagen, 1997). Durch Zugabe von 10 – 20 mM Imidazol zum Waschpuffer können unspezifische Wechselwirkungen reduziert werden.

Die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose ist mehrfach verwendbar und wird nach Elution der Probe, wie in Tab 2.14 beschrieben, regeneriert. Anschließend wird das Material aus dem Säulengehäuse entfernt, in 20 % Ethanol bei 4°C gesammelt und vor der Wiederverwendung in einem größeren Gesamtvolumen erneut nach demselben Protokoll (Tab. 2.14) regeneriert.

## 2.5.6 Versuche zur Faltung von Proteinen in Lösung

Das Ergebnis der Rückfaltungs-Versuche wird mit Hilfe von Tropfen-Tests (2.5.9.3) anhand der Enzymaktivität kontrolliert.

### 2.5.6.1 Verdünnungen

Für die Faltungsversuche durch Verdünnung wird das solubilisierete IB-Protein (2.5.1.4) in einem Puffer verdünnt und inkubiert, der die Rückfaltung des Proteins begünstigen soll. Um Aggregationen zu vermeiden, werden hier in der Regel deutlich geringere Proteinkonzentrationen (50 – 100 µg/ml) gewählt als in der Affinitätschromatographie, wo intermolekulare Wechselwirkungen der Proteine durch die Bindung an die Säulenmatrix verhindert werden. Die Verdünnungs-Versuche werden in Gesamtvolumina zwischen 100 µl und 1 ml in Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Die Inkubationen erfolgen über einen Zeitraum zwischen 1 – 24 Std. bei RT oder 4°C. Genaue Versuchsbedingungen sind in den entsprechenden Abschnitten im Ergebnis-Teil angegeben (3.4.4.3).

In Tab. 2.15 sind die Komponenten der 15 Rückfaltungspuffer zusammengestellt, die für die Faltungsversuche mit dem PhxA-His-Protein aus Spinat (Klon: pT7-7-PhxA-His, 2.4.1) verwendet werden. Für diese Experimente (3.4.4.3) werden jeweils 50 µl Proteinlösung (1 mg/ml) mit 950 µl Puffer gemischt, sodass die Endkonzentration des Proteins 50 µg/ml beträgt.

	Puffer	pH	NaCl [mM]	KCl [mM]	Mg/Ca [mM]	Gdn [M]	TX [%]	PEG [%]	DTT [mM]	GSH [mM]	GSSG [mM]	EDTA [mM]	S [M]	Arg [M]
1	MES	6.0	9.6	0.4	2	0.75	0.5		1					
2	MES	6.0	9.6	0.4	2			0.05		1.0	0.1			0.5
3	MES	6.0	9.6	0.4		0.75	0.5	0.05	1			1.0	0.4	
4	MES	6.0	240.0	10.0	2		0.5			1.0	0.1			0.5
5	MES	6.0	240.0	10.0		0.75			1			1.0	0.4	
6	MES	6.0	240.0	10.0			0.5	0.05		1.0	0.1	1.0	0.4	0.5
7	MES	6.0	240.0	10.0	2	0.75		0.05	1					
8	TRIS	8.8	9.6	0.4	2		0.5	0.05		1.0	0.1		0.4	
9	TRIS	8.8	9.6	0.4		0.75		0.05	1			1.0		0.5
10	TRIS	8.8	9.6	0.4	2	0.75				1.0	0.1		0.4	0.5
11	TRIS	8.8	9.6	0.4			0.5		1			1.0		
12	TRIS	8.8	240.0	10.0				0.05		1.0	0.1	1.0		
13	TRIS	8.8	240.0	10.0		0.75	0.5		1			1.0		0.5
14	TRIS	8.8	240.0	10.0	2	0.75	0.5	0.05		1.0	0.1		0.4	0.5
15	TRIS	8.8	240.0	10.0	2				1				0.4	

**Tab. 2.15 Zusammensetzung der Rückfaltungs-Puffer nach AthenaES™ (Refolding Kit: Applications Manual (v1.0), 2003, verändert)**

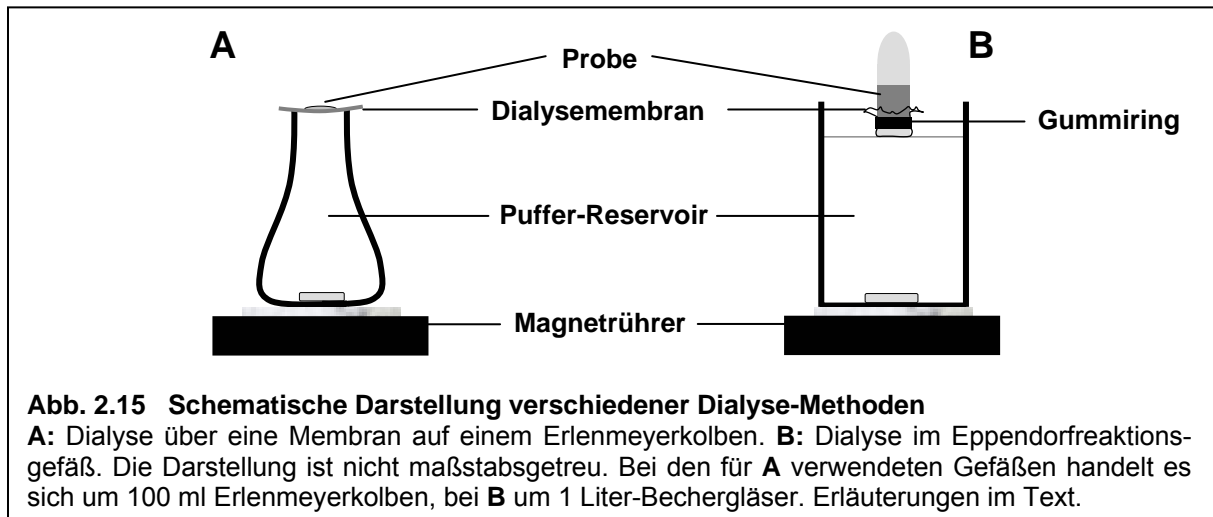
Die Konzentrationen und Aufbewahrungs-Temperaturen der für den Ansatz der Puffer verwendeten Stammlösungen sind in Klammern angegeben. Die Puffer werden ohne DTT, GSH und GSSG angesetzt und bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung werden 0.1 – 1.0 M Lösungen der Reduktionsmittel hergestellt und die Rückfaltungspuffer entsprechend ergänzt. MES/TRIS-Konzentration: 50 mM (1 M, RT, MES/NaOH wird nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert). NaCl (5 M, RT). KCl (2 M, RT). Mg/Ca: MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> (1 M, RT) werden beide zusammen jeweils in der angegebenen Konzentration eingesetzt. Gdn: GdnHCl (6 M, RT). TX: Triton X-100 (10 %, 4°C). PEG: Polyethylenglykol (Average MW: 4000 Da, 10 %, 4°C). DTT: 1,4-Dithio-D,L-threitol. GSH: Glutathion (reduzierte Form). GSSG: Glutathion (oxidierte Form). EDTA (0.5 M, RT). S: Saccharose (2 M, 4°C). Arg: Arginin (1 M, 4°C).

### 2.5.6.2 Dialysen

Die hier durchgeführten Dialysen dienen entweder der Proteinfaltung über einen langsamen Austausch des Denaturierungspuffers oder zur Entfernung von Substanzen aus dem Probenpuffer, die einen Aktivitätstest beeinflussen könnten. Die Dialysepuffer sind in den entsprechenden Ergebnis-Kapiteln (3.3.1.2 und 3.4.4.2) beschrieben. Die Verwendung der in Abb 2.15 dargestellten Dialyseaufbauten ist abhängig vom Probenvolumen.

#### Dialyse über eine Membran auf einem Erlenmeyerkolben

Diese Methode eignet sich zur Dialyse sehr kleiner Volumina zwischen 10 – 30 µl Probe. Es werden etwa 125 - 150 ml Dialysepuffer benötigt, um einen 100 ml Erlenmeyerkolben bis zum Rand zu füllen. Die nitrocellulosehaltige Dialysemembran (Filtertyp: weiß, 0.025µm, Durchmesser: 47 mm, Millipore, Eschborn) wird luftblasenfrei auf das Pufferreservoir aufgelegt. Anschließend wird die Probe in einem Tropfen in die Mitte der Membran abgesetzt (Abb. 2.15 A). Zum Schutz gegen Verdunstung wird der Glaskolben auf mehrere Lagen angefeuchtetes Haushalts-Papier gestellt und mit einem 500 – 1000 ml Becherglas abgedeckt (in Abb. 2.15 A nicht gezeigt). Die Dialyse erfolgt über mindestens 2 Std. unter leichtem Rühren bei 4°C oder RT.



### Dialyse im Eppendorfreaktionsgefäß

Größere Probenvolumina (200 – 500  $\mu$ l) werden in Eppendorfreaktionsgefäßen (Sarstedt, Nürnberg) dialysiert, von denen zuvor der Deckel entfernt und die scharfe obere Kante abgeschliffen worden ist. In den Poren des Dialyseschlauches (Visking Dialysis Tubing, Ausschluss: 12-14 kDa, Medicell International Ltd., London, GB) sind aus dem Herstellungsprozess noch Metallrückstände enthalten, die durch Erhitzen entfernt werden müssen. Zu diesem Zweck wird der Schlauch in 10 mM TRIS/HCl, pH 8.0 und 50 mM EDTA autoklaviert und anschließend in 70% Ethanol bei 4°C gelagert. Zur Verwendung wird der Dialyseschlauch in ca. 3 cm lange Stücke geschnitten, für mehrere Stunden unter mehrfachem Wasserwechsel in Aqua dest. äquilibriert und mit Hilfe eines Gummiringes faltenfrei über das Proben-Reaktionsgefäß gespannt. Die überstehenden Membranenden werden mit Parafilm umwickelt und die Reaktionsgefäße so in einem passenden Ständer fixiert. Ein 1 Liter Becherglas wird mit etwa 1 Liter Dialysepuffer befüllt und der Ständer (mit maximal 15 Proben à 500  $\mu$ l, mehr als 100facher Pufferüberschuss) so auf das Glas aufgesetzt, dass die Membran, wie in Abb 2.15 B gezeigt, auf der Flüssigkeitsoberfläche aufliegt bzw. minimal in den Puffer eintaucht. Die Dialyse erfolgt bei RT oder 4°C unter leichtem Rühren für mindestens 6 Std., meist jedoch ü/N.

### 2.5.7 Aufreinigung nativer Tyrosinasen aus Blattgeweben

In dieser Arbeit werden native Tyrosinasen aus Erbse (*Pisum sativum*, Fabaceae), Tomate (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae) und Spinat (*Spinacia oleracea*, Chenopodiaceae) untersucht. Während aus Erbsen- und Tomatenblättern für eine Enzymaktivitätsbestimmung (2.5.9) lediglich Thylakoide präpariert werden, wird die Tyrosinase aus Spinat weiter aufgereinigt.

### 2.5.7.1 Pflanzenmaterial

Die für die ersten Aufreinigungsschritte verwendeten Spinat- und Erbsenpflanzen stammen aus eigener Kultur in Klimaräumen oder frisch vom Feld (Hofbauer Bender, Mainz-Bretzenheim). Für die Enzym-Präparation im größeren Maßstab wird frisch geernteter Feld-Spinat von einem Händler (Ihr Guter Nachbar, Mainz-Gonsenheim) bezogen. Die Tomaten-Thylakoide werden von S. Storf (2005) zur Verfügung gestellt.

#### Hydroponische Spinatkultur

Zur Keimung werden die Spinatsamen (Matador, Beringmeier Saatgut, Bad Arolsen) relativ dicht auf autoklaviertes, gewaschenes Granulat (Lecaton<sup>®</sup>, Substrat für Hydrokultur, Leca Deutschland GmbH, Pinneberg) ausgesät, mit einer dünnen Granulatschicht bedeckt und mit Leitungswasser befeuchtet. Der Pflanztopf wird in einer mit Wasser gefüllten Schale im Halbdunkel, d.h. abgeschirmt, außerhalb des Leuchtfeldes aufgestellt. Jeden zweiten Tag werden die Samen gegossen und das stehende Wasser ausgetauscht. Nach der Keimung (nach ca. 1 Woche) wird der Topf ins Licht überführt und nach 12 - 15 Tagen können die Keimpflänzchen pikiert werden. Hierfür werden 10 - 12 gut entwickelte Keimlinge pro Pflanzschale mit einem Papierstück in einem Steckbrett fixiert und mit diesem auf die Schale aufgelegt, sodass die Wurzeln die Nährlösung erreichen. Die Pflanzschalen werden mit je 10 Litern Hoaglandlösung befüllt und mit Hilfe von Aquariumpumpen (Elite 800 Aquarium-Durchlüfter, Hagen Deutschland, Holm; Ausströmer-Stein für Aquarien, TRIXIE Heimtierbedarf/Librics GmbH, Hannover) belüftet. Die Pflanzen wachsen für weitere 6 – 8 Wochen, bei einer Tagestemperatur von 18°C und nächtlicher Temperaturabsenkung auf 14°C, in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 11 : 13 Stunden (Leuchtstoffröhren: Cool White L 36 W / 20 und L 40 W / 20 S sowie Normal White 40 W / 25 S, Osram GmbH, München). Die so zusammengesetzten Leuchtfelder haben eine Lichtintensität von etwa 80 pmol Lichtquanten pro m<sup>2</sup> (Quantum/Radiometer/Photometer Model LI-250 Light Meter, LI-COR<sup>®</sup>, Lincoln, NE, USA). Der Flüssigkeitsverlust in der Nährlösung wird mit Aqua dest. ausgeglichen. Die Ernte erfolgt vor Beginn der Internodienstreckung.

Das ursprüngliche Protokoll (M. Richter, persönliche Mitteilung) sieht eine Flüssigkeitsergänzung bei sukzessiv verringerter Konzentration der Hoaglandlösung (3. und 4. Woche: 1 x, 5. und 6. Woche: 0.5 x, ab der 7. Woche: 0.25 x konzentriert) vor. Bedingt durch die bei der Klimatisierung entstehende starke Luftumwälzung, kommt es jedoch zu einer erhöhten Transpiration der Pflanzen. Da diese zum Ausgleich des Wasserverlustes mit der Nährlösung auch viele Mineralien aufnehmen, entwickeln sie sehr bald Symptome von Salzstress. Dieser kann durch Nachgießen mit Aqua dest., anstelle der Hoaglandlösung, reduziert werden. Um die Luftfeuchtigkeit zusätzlich zu erhöhen, wird ein Sprudelstein in eine Wanne gesetzt, die mit einem Gemisch aus Leitungswasser und Aqua dest. in einem Verhältnis von etwa 1 : 4 gefüllt ist. Das fein zerstäubte Wasser wird mit Hilfe eines Ventilators im Raum verteilt (in der Lichtphase: 15 Min. pro Stunde).

#### Hoaglandlösung

Für 10 Liter der Nährlösung werden nach einem Protokoll von Robinson (1986) je 100 ml der sechs Stammlösungen (A – E2) mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert der fertigen Lösung sollte bei 6.0 liegen. Die Zusammensetzung der 100 x konzentrierten Stammlösungen ist in Tab. 2.16 angegeben.



<b>A</b>	4 mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	<b>D</b>	50 µM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
<b>B</b>	1 mM	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		10 µM	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
<b>C</b>	6 mM	KNO <sub>3</sub>		1 µM	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	2 mM	MgSO <sub>4</sub>		0.5 µM	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O
<b>E1</b>	90 µM	EDTA- <i>di</i> -Na-Salz		0.1 µM	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
	90 µM	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.1 µM	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	
<b>E2</b>	0.1 mM	NaOH			

**Tab 2.16 Stammlösungen für die Herstellung der Hoagland-Nährlösung (Robinson, 1986)**

Die Lösungen werden in einem Volumen von je 1 Liter angesetzt und bei RT gelagert. Für Lösung D werden Stammlösungen der einzelnen Spurenelemente hergestellt und bei 4°C gelagert. Das EDTA für Lösung E1 wird ohne pH-Einstellung gelöst. Um zu verhindern, dass Bakterien das Eisen bereits in der Stammlösung oxidieren, wird die Lösung E1 ohne FeSO<sub>4</sub> angesetzt und dieses jeweils vor der Verwendung ergänzt (248 mg FeSO<sub>4</sub>/100 ml E1).

### Anzucht von Erbsenpflanzen

Pro Pflanzschale werden zwei Handvoll Erbsensaatgut der Sorte "Golf" (Raiffeisen-genossenschaft, Hechtsheim, Mainz) bei guter Belüftung ü/N gequollen, am Folgetag auf feuchtem Pflanzensubstrat (Vermiculit, Dämmstoff-Fabrik Klein GmbH, Zellertal) verteilt, mit einer dünnen Schicht Vermiculit bedeckt und mit Leitungswasser gegossen. Die Erbsenpflanzen wachsen bis zur Ernte nach 10 – 12 Tagen bei 20 – 24°C im Dauerlicht (Leuchtstoffröhren: Cool White L 36 W / 20, Osram GmbH, München).

### 2.5.7.2 Thylakoidpräparation

Alle Aufreinigungen aus photosynthetisch aktivem Blattgewebe erfolgen zum Schutz vor oxidativen Schäden schnell, kalt (bei 4°C im Kühlraum oder auf Eis) und dunkel (abgedunkelte Räume bzw. Lichtquellen). Die verwendeten Geräte und Puffer werden auf 4°C vorgekühlt.

#### Thylakoide aus Spinatblättern

Die Präparation von Thylakoiden aus Spinat erfolgt nach Hauska (1986). Der kommerziell erworbene Feld-Spinat (2.5.7.1) wird vor der Aufreinigung in Eiswasser gewaschen und die Blätter werden von Mittelrippen und Stielen befreit. Die Blattspreiten des Kulturspinates können komplett und ungewaschen verwendet werden. Das Blattmaterial wird in kurzen Intervallen (10 sec.) mit ca. 500 ml kaltem <sup>Spinat</sup>STN-Puffer (ausreichend für etwa 1 kg Feldspinat bzw. 3 Schalen Kulturspinat) im Mixer (Stufe: Medium, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA) zerkleinert und durch 8 Lagen Baumwollgaze und eine Lage Nylongaze auf Eis filtriert. Das Filtrat wird für 10 - 20 Min. bei 9500 rpm (≈ 16200 g, JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) und 4°C pelletiert. Das Präzipitat, das weitestgehend intakte Grana-Thylakoide enthält, während die Stroma-Thylakoide vermutlich zerstört sind, wird mit einem Pinsel in wenigen Millilitern <sup>Spinat</sup>STN-Puffer, möglichst unter Vernachlässigung der meist separat abgesetzten Stärke, gelöst und im Potter (40 ml, Tight Fit, B. Braun, Melsungen) homogenisiert. Es wird eine Chlorophyllbestimmung (2.5.2.4) durchgeführt, um die homogenisierten Thylakoide für die weitere Aufarbeitung zu je 50 mg oder 250 mg Gesamtchlorophyll aliquotieren zu können. Die Aliquots werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## Thylakoide aus Erbsenpflanzen

Für die Präparation von Erbsen-Thylakoiden wird etwa das oberste Drittel der Pflanzen aus einer Schale (2.5.7.1) abgeschnitten und in ca. 300 ml kaltem <sup>Erbsen</sup>Puffer 1 im Mixer (Stufe: Medium, mehrere 10 sec. Intervalle, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA) zerkleinert. Das Blatthomogenat wird durch 4 Lagen Baumwollgaze filtriert, für 5 – 15 Min. bei 4°C und 7000 rpm ( $\approx$  6000 g, JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert und das Pellet anschließend mit Hilfe eines Pinsels in etwa 2 ml <sup>Erbsen</sup>Puffer 2 gelöst. Im Anschluss an eine Chlorophyllbestimmung (2.5.2.4) werden die Thylakoide aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Spinat <b>STN-Puffer</b>	<sup>Erbsen</sup> <b>Puffer 1</b> (pH 8.2)	<sup>Erbsen</sup> <b>Puffer 2</b> (pH 8.2)
10 mM TRIS/HCl, pH 8.0	10 mM Tricin/NaOH, pH 7.8	10 mM Tricin/NaOH, pH 7.8
10 mM NaCl	330 mM Sorbitol	330 mM Sorbitol
0.4 M Saccharose	3 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM KOH	10 mM KOH

## Probenvorbereitung für Aktivitätstests

Für eine Bestimmung der Enzymaktivität ohne weitere Proteinaufreinigung werden Thylakoidaliquots, die etwa 0.1 mg Chl *a/b* enthalten, 3 Min. bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert (EBA 12, Rotor: 1124, Hettich, Tuttlingen). Das Präzipitat wird in ca. 500  $\mu$ l 0.1 – 1.0 % SDS gelöst, eventuell auf eine geringere SDS-Konzentration verdünnt und so direkt in den Aktivitätsassay (2.5.9) eingesetzt. Alternativ können die pelletierten Thylakoide mit 10 mM TRIS/HCl, pH 8.0 und 150 mM NaCl gewaschen, erneut präzipitiert und der Überstand zur Bestimmung der Aktivität verwendet werden.

### 2.5.7.3 Solubilisierung der Thylakoidmembranen

Die weitere Aufreinigung der Spinat-Thylakoide erfolgt nach einem Protokoll von Zer *et al.* (1999) bzw. Gal *et al.* (1990) für die Präparation einer membrangebundenen Kinase, die vermutlich an der Phosphorylierung des Lichtsammelkomplexes II (LHCII) und dessen lateraler Beweglichkeit in der Membran beteiligt ist (Allen, 1992). Die Tyrosinase ist wahrscheinlich auf der luminalen Seite an die Thylakoidmembran assoziiert (Newman *et al.*, 1993; siehe auch 1.1.6), daher lässt sie sich auf dieselbe Weise isolieren (Sokolenko *et al.*, 1995).

Die Aufarbeitung (kalt und dunkel) besteht aus mehreren Inkubationen unter Rühren (4°C, mit einem schwarzen Tuch abgedeckt) und anschließenden Zentrifugationen (4°C). Die dabei entstehenden Pellets werden vor der Weiterverarbeitung jeweils im Potter (40 ml, Tight Fit, B. Braun, Melsungen) schonend homogenisiert und konstant auf Eis gehalten. Im ersten Schritt werden die aus -80°C aufgetauten Thylakoide (50 mg Chl *a/b*) in 200 ml TRIS/HCl (10 mM, pH 8) aufgenommen, mit 200 ml NaCl (150 mM) versetzt und 5 Min. unter Rühren inkubiert. Die dabei aufgebrochenen Grana-Thylakoid-Stapel werden für 20 Min. bei 9500 rpm ( $\approx$  16200 g, JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert und das Pellet (P1) mit einem Pinsel in NST-Puffer gelöst, homogenisiert, auf 200 ml mit NST-Puffer aufgefüllt und 30 Min. unter Rühren inkubiert, um mit Hilfe des Natriumbromids periphere Membranproteine abzutrennen. Anschließend wird das gleiche Volumen an 10 mM TRIS/HCl

(pH 8.0)/10 mM NaCl zugegeben. Durch kurzes Rühren und Zentrifugation (25 Min., 9500 rpm, JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) werden in diesem Waschschrift lösliche Proteine, Pigmente und Zelltrümmer entfernt (Ü2). Das Pellet (P2) wird mit einem Pinsel in 10 mM TRIS/HCl (pH 8.0)/10mM NaCl gelöst, homogenisiert, auf 400 ml aufgefüllt, kurz gerührt, erneut für 25 Min. bei 9500 rpm (JLA-10.500 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert, in einem minimalen Volumen an STKM-Puffer aufgenommen und im Potter homogenisiert (P3).

An dieser Stelle wird zur Berechnung der Komponenten für die Solubilisierung der gewaschenen Thylakoidmembranen eine Volumen- und Chlorophyllbestimmung (2.5.2.4) durchgeführt. Der Solubilisierungsansatz hat folgende Zusammensetzung:

2 mg/ml	Gesamtchlorophyll (Chl <i>a/b</i> )
28 mM	OG (n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid, Sigma-Aldrich, Steinheim)
0.5 %	Na-Cholat (Cholic Acid, Na-Salt, Serva, Heidelberg)
10 %	AMS (Ammoniumsulfat, 99 %, Sigma-Aldrich, Steinheim)

Das OG (8.19 mg/ml) wird als Feststoff eingesetzt und daher beim Gesamtvolumen nicht berücksichtigt. Na-Cholat (25  $\mu$ l/ml) wird aus einer 20 % Stammlösung (2 g/10 ml) zugesetzt, die unmittelbar zuvor frisch hergestellt wird. Diese beiden Komponenten (OG und Na-Cholat) werden vor der Zugabe zur Thylakoid-STKM-Suspension, die unter Rühren erfolgt, in STKM-Puffer gelöst. Das Ammoniumsulfat (100  $\mu$ l/ml) wird aus einer 4.1 M ( $\approx$ 100 %) gesättigten Stammlösung zugefügt, die bei RT aufbewahrt wird. Der Ansatz wird mit STKM-Puffer auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt und 30 Min. bei 4°C gerührt, wodurch eine vollständige Solubilisierung der Membranen erfolgt.

#### **NST-Puffer**

10 mM	TRIS/HCl, pH 8.0
0.4 M	Saccharose
2.0 M	NaBr

#### **STKM-Puffer**

20 mM	Tricin/NaOH, pH 8.0 (Applichem, Darmstadt)
0.2 M	Saccharose
3 mM	KCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>

Bei der Aufarbeitung eines Thylakoidaliquots mit einem Chl *a/b*-Gehalt von 500 mg werden die Puffervolumina erhöht. Anstelle von 200 ml wird 1 Liter Puffer verwendet, sodass z.B. der erste Waschschrift des Protokolls in einem Gesamtvolumen von 2 Litern durchgeführt wird. Die übrigen Volumina verändern sich entsprechend.

#### **2.5.7.4 Ammoniumsulfatfällung**

Die solubilisierten Membranen aus einem 50 mg Chl *a/b*-Thylakoidaliquot (2.5.7.3) werden für 30 – 45 Min. in Polyallomer-Tubes (Beckman, München) bei 4°C und 31000 rpm ( $\approx$  17260 g, TST-41.14 Kontron-Rotor oder SW 40 TI / SW 41 TI Beckman-Rotor) in einer Ultrazentrifuge (Centrikon T-1065 / Centrikon T-2060, Kontron Instruments, Neufahrn, oder Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München) pelletiert. Aufgrund des größeren Volumens wird bei der Aufarbeitung einer 500 mg Chl *a/b*-Thylakoid-Probe (2.5.7.3) der Kontron-Rotor TFT 70.38 (Centrikon T-1065 / Centrikon T-2060, Kontron Instruments, Neufahrn) bei 41000 rpm ( $\approx$  17260 g, 4°C, 30 – 45 Min.) verwendet. Das Pellet

(P4) wird verworfen und das Volumen des Überstandes (Ü4) bestimmt. Unter Rühren werden 150 mg/ml AMS (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Feststoff zugegeben und 15 Min. (4°C, abgedeckt) inkubiert. Die in diesem Schritt bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von etwa 25 % (Holtzhauer, 1988) ausgefallenen Proteine werden für 15 Min. bei 4°C und 15000 rpm ( $\approx$  26900 g, JA-20 Rotor, Beckman, München) präzipitiert (P5) und verworfen. Nach einer erneuten Volumenbestimmung des Überstandes (Ü5) folgen eine Zugabe von 129 mg/ml AMS (Feststoff, Sigma-Aldrich, Steinheim) und einer weiteren Inkubation für 15 Min. (4°C, abgedeckt) unter Rühren. In diesem Schritt fällt bei etwa 45 % (Holtzhauer, 1988) AMS-Sättigung ein Gemisch aus Proteinen aus, in dem sowohl die LHCII-Kinase als auch eine Tyrosinase enthalten sind. Dieses wird 15 Min. bei 4°C und 15000 rpm ( $\approx$  26900 g, JA-20 Rotor, Beckman, München) zentrifugiert und der Überstand (Ü6) verworfen. Das Präzipitat (P6) kann in dieser Form bei -20°C aufbewahrt werden. Alternativ wird es für eine langfristige Lagerung über mehrere Monate in maximal 0.5 – 1.0 ml Storage-Puffer oder in einem für die weitere Verarbeitung verwendeten Puffer (z.B. Verdünnungspuffer oder IEX-Puffer A, 2.5.7.6) aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

**Storage-Puffer**

25 mM TRIS/HCl, pH 7.5  
 25 mM OG  
 200  $\mu$ M PMSF  
 1 mM Benzamidin

**Verdünnungs-Puffer**

25 mM *bis*-TRIS-Methan  
 5 mM CHAPS (0.31 %)  
 0.1 % Triton X-100  
 200  $\mu$ M PMSF  
 1 mM Benzamidin

Die Puffer werden steril filtriert (Membrex 25, 0.2  $\mu$ m, MembraPure GmbH, Bodenheim) und bei 4°C gelagert. Zum Ansetzen der Puffer wird CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-*di*-Methylammonium)-1-Propan-Sulfonat, BIOMOL, Feinchemikalien GmbH, Hamburg) als Feststoff eingewogen, von den anderen Komponenten werden Stammlösungen hergestellt.

- 100 mM *bis*-TRIS-Methan (2,2-*bis*-(Hydroxyethyl)-(Iminotris)-(Hydroxymethyl)-Methan, Merck, Darmstadt), sterilfiltriert und bei 4°C gelagert
- 10 % (w/v) Triton X-100 (purified for membrane research, Boehringer, Mannheim), 4°C
- 100 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid, Serva, Heidelberg) in Ethanol, -20°C
- 1 M Benzamidin/HCl (Serva, Heidelberg), Lagerung bei -20°C

**2.5.7.5 Gelfiltration (Sephadex G-25)**

Die Gelfiltration ist eine chromatographische Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrer Größe. Dabei werden poröse Trägermaterialien mit definierten Porengrößen verwendet. Kleine Moleküle, die in die Poren eindringen können, werden retardiert, größere Moleküle eluieren entsprechend früher. Die Größe der zu trennenden Moleküle entscheidet über die Wahl der Porengröße des verwendeten Materials. Man unterscheidet die fraktionierte Trennung unterschiedlich großer Bestandteile eines Probengemisches von der so genannten Gruppentrennung. Hierbei werden niedermolekulare Substanzen mit einer Größe unterhalb der Ausschlussgröße des Trägermaterials auf der Säule verzögert, während alle größeren Probenbestandteile im Ausschlussvolumen eluieren, d.h. in dem Puffervolumen, das die

Säule von der Aufgabe bis zum Säulenausgang einmal durchläuft. Diese Methode wird zur Entsalzung oder für Pufferwechsel von Proben verwendet.

Aus dem mit Ammoniumsulfat gefällten Proteingemisch (2.5.7.4) müssen die Salze entfernt werden, die die weitere Aufreinigung (2.5.7.6) oder Aktivitätstests (2.5.9) beeinflussen können. Zu diesem Zweck wird als Säulenmaterial Sephadex<sup>®</sup> G-25 (Fine, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einer Ausschlussgröße von 5 kDa in Poly-Prep<sup>®</sup> Chromatography Columns (Bio-Rad, München) verwendet. Um die Trennung von Proteinen und Salzen zu gewährleisten, gleichzeitig jedoch eine starke Verdünnung der Probe zu vermeiden, werden das Volumen des Säulenbetts und das Probenvolumen aufeinander abgestimmt. Für 100 – 300 µl Probe ist 1 ml Sephadex<sup>®</sup> G-25 ausreichend, für 1 ml Probe werden 4 ml Material eingesetzt. Säulen, Puffer und Probe werden vor der Verwendung auf 4°C temperiert. Bei der Durchführung durchlaufen alle Lösungen die Säule vor dem nächsten Auftrag vollständig und ohne Druck. Die Säule wird mit dem Probenpuffer (IEX-Puffer A (2.5.7.6) oder Verdünnungspuffer (2.5.7.4)) äquilibriert, die Probe aufgetragen und mit demselben Puffer eluiert (Volumenzunahme der Probe etwa um einen Faktor 1.5 - 2). Die im Probengemisch enthaltenen Pigment-Protein-Komplexe erleichtern ein gezieltes Auffangen der grün gefärbten Probe.

Die Säule wird mit mehreren Säulenvolumina Puffer gewaschen und kann so kurzfristig bei 4°C gelagert werden. Verunreinigungen werden mit 1 – 2 % SDS oder einem Ethanolgradienten entfernt. Für die längerfristige Lagerung wird das Material aus dem Säulengehäuse entfernt und bei 4°C in 20 % Ethanol aufbewahrt.

### **2.5.7.6 Anionenaustausch-Chromatographie**

Die Ionenaustausch-Chromatographie (Ion Exchange Chromatography, IEX) wird zur Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Ladung verwendet. Die Matrix eines Anionenaustauschers enthält positiv geladene Gruppen, die mit den negativ geladenen Resten und Carboxylgruppen der Aminosäuren elektrostatische Wechselwirkungen eingehen können. Die Elution der Proteine erfolgt in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen Isoelektrischen Punkt (pI) mit Hilfe eines Salzgradienten.

#### **Probenvorbereitung**

Die mit AMS gefällte Probe (P6) aus 2.5.7.4 wird, wie in 2.5.7.5 beschrieben, in IEX-Puffer A (25 mM TRIS/HCl (pH 7.5), 200 µM PMSF, 1 mM Benzamidin) entsalzt, mit Hilfe eines Sterilfilters (Membrex 25, 0.2 µm, MembraPure GmbH, Bodenheim) gereinigt und über eine 200 µl Probenschleife aufgetragen (Gesamtproteingehalt z.B. 400 µg).

#### **Durchführung der Chromatographie**

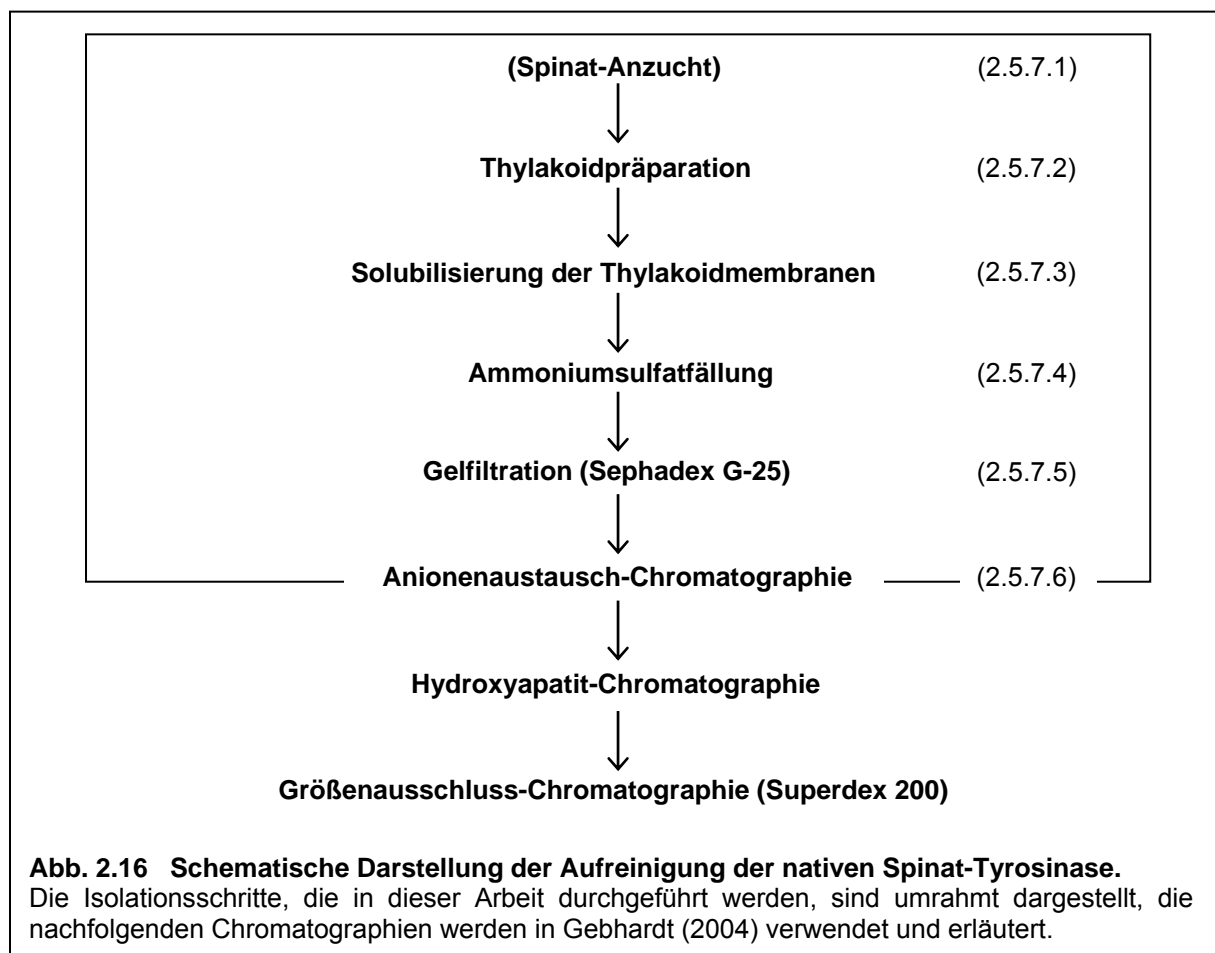
Die IEX wird mit einer 1 ml Resource Q-Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung einer FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)-Anlage der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Das verwendete Programm ist in Tab. 2.17 angegeben. Die Elution erfolgt mit Hilfe des IEX-Puffers B (25 mM TRIS/HCl (pH 7.5), 200 µM PMSF, 1 mM Benzamidin, 0.5 M NaCl). Puffer A und B werden vor der Verwendung filtriert (Filtrationseinheit: Nalgene<sup>®</sup>/Nunc GmbH, Wiesbaden; Membranfilter Polyamid, NL 16, 0.2 µm, Durchmesser: 47 mm, Schleicher & Schuell, Dassel).

	Volumen	Puffer	Einstellungen
Isokratischer Fluss	2 ml	A (100 %)	Flussrate: 2 ml/Min. Fraktionen: 1 ml.
Injektion der Probe	2 ml	A (100 %)	AV7-3 Valve (Static Loop), 200 µl Probenschleife
Linearer Gradient	20 ml	A (100 → 0 %)	Flussrate: 2 ml/Min. Fraktionen: 1 ml.
Isokratischer Fluss	5 ml	B (100 %)	Flussrate: 2 ml/Min. Fraktionen: 1 ml.
Linearer Gradient	10 ml	A (0 → 100 %)	Flussrate: 2 ml/Min.
Isokratischer Fluss	10 ml	A (100 %)	Flussrate: 2 ml/Min.

**Tab. 2.17 Programm für die IEX-Chromatographie.** Weitere Angaben im Text.

Die aktiven Fraktionen werden mit Hilfe eines Tropfen-Tests (2.5.9.3) ermittelt. Eine Bestimmung der Proteinmenge in diesen Fraktionen erfolgt über einen Bradford-Assay (2.5.2.2), die Aktivität wird unter Verwendung von Dopamin-Kinetiken (2.5.9.2) quantifiziert.

Die weiterführenden Aufreinigungsschritte über DEAE Sepharose™ Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Hydroxyapatit Bio-Gel® HTP Gel (Bio-Rad, München) und Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) werden in Gebhardt (2004) beschrieben. Abb. 2.16 fasst die einzelnen Schritte, die zur Präparation der Spinat-Tyrosinase durchgeführt werden, noch einmal schematisch zusammen.



## 2.5.8 Aufreinigung nativer Tyrosinasen aus Früchten und Knollen

Für die Bestimmung von Enzymaktivitäten in Früchten bzw. Knollen werden Proteine mit Hilfe von Triton X-114 aus Äpfeln (*Malus domestica*, *Rosaceae*) und Kartoffeln (*Solanum tuberosum*, *Solanaceae*) extrahiert. Hier verwendet werden heimische Äpfel der Sorte Idared (Benders Hofladen, Mainz-Bretzenheim) und Braeburn aus Neuseeland, sowie Kartoffeln der Sorte Inova (Ägypten), beide bezogen über PLUS (Mainz-Bretzenheim).

### 2.5.8.1 Vorkondensation von Triton X-114

Triton X-114 ist ein nicht ionisches Detergens, das zur Solubilisierung von Membranen und ganzen Zellen eingesetzt wird. Das weit verbreitete Triton X-100 bildet bei RT und Konzentrationen oberhalb der CMC (kritische micellare Konzentration) Micellen in klaren Lösungen. Ab 64°C kommt es zu einer Trübung dieser Lösung (*cloud point*) und bei weiterer Temperaturerhöhung ist eine deutliche Phasentrennung in eine detergensreiche und eine wässrige Phase zu beobachten. Der *cloud point* ist innerhalb der Triton X-Reihe abhängig von der Anzahl der hydrophilen Oxyethylen-Einheiten innerhalb des Moleküls. Steigt deren Zahl, verbessert sich die Löslichkeit in Wasser und die Temperatur, bei der eine Phasentrennung eintritt, ist deutlich geringer. Da Triton X-114 in verdünnten Lösungen bei 0°C homogen verteilt vorliegt und bereits ab 20°C in eine Phasentrennung übergeht, ermöglicht es eine schonende Trennung von Membrankomponenten und löslichen Proteinen im Verlauf einer Aufreinigung (Bordier, 1981).

Zur Herstellung der Isolationspuffer für die Enzymextraktion aus Äpfeln (2.5.8.2) oder Kartoffeln (2.5.8.3) wird vorkondensiertes TX-114 verwendet. Für diese Vorkondensation nach Bordier (1981) werden 3 Liter Puffer (entsprechend dem jeweiligen Isolationspuffer ohne TX-114 aus 2.5.8.2 bzw. 2.5.8.3) benötigt, die ebenso wie das Triton X-114 (Sigma-Aldrich, Steinheim) auf 4°C temperiert werden. 950 ml Puffer und 50 g TX-114 werden bei 4°C mehrere Minuten gerührt, bis die Lösung homogen ist, und anschließend ü/N in einem Scheidetrichter bei 30°C (Wärmeschrank Typ BE 400, Memmert, Schwabach) inkubiert. Die untere detergensreiche Phase wird in ein Becherglas überführt, mit Puffer (4°C) auf etwa 1 Liter aufgefüllt, erneut unter Rühren gemischt und zwei weitere Male ü/N bei 30°C im Scheidetrichter inkubiert. Die oberen wässrigen Phasen können verworfen werden.

Die Konzentration an TX-114 (w/v) in der Detergensphase wird photometrisch bestimmt. Nach Werck-Reichhart *et al.* (1991) entspricht einer Absorption  $A_{278 \text{ nm}} = 1.25$  bei 278 nm eine TX-114-Konzentration von 0.05 % (w/v).

### 2.5.8.2 Enzym-Aufreinigung aus Äpfeln

Die Aufarbeitung erfolgt nach Espín *et al.* (1995). 150 g gewaschene, geschälte und zerkleinerte Äpfel werden mit 75 ml Isolationspuffer im Mixer homogenisiert (Stufe: Low, wenige kurze Intervalle, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA) und zur Entfernung des entstandenen Schaumes und eventuell verbliebener Fruchtstücke durch 4 Lagen Baumwollgaze filtriert. Das Homogenat wird für 60 Min. bei 4°C inkubiert und anschließend in Polyallomer-Tubes (Beckman, München) für 45 Min. bei 4°C und 23500 rpm zentrifugiert ( $\approx 100000 \text{ g}$ , SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München). Tritt dabei eine Phasentrennung auf, wird nur der hellere obere Überstand weiter verwendet und die dunkler gefärbte untere Phase inklusive

des Pellets verworfen. Nach Bestimmung des Volumens wird der Überstand bei 4°C mit zusätzlich 8 % (w/v) vorkondensiertem TX-114 bis zur vollständigen Vermischung verrührt. Die hierfür benötigte Detergensmenge in [g] wird mit folgender Formel berechnet:

$$[g] = ((0.08 / X) * \text{Volumen}) / (1 - (0.08 / X)), \quad \text{mit } X = [\text{TX-114, vorkondensiert}].$$

Die Lösung wird auf mehrere 38.5 ml Schraubdeckel-Zentrifugenröhrchen verteilt und zur Phasentrennung mindestens 30 Min. bei 35°C (Wärmeschrank Typ BE 400, Memmert, Schwabach) inkubiert. Die anschließende 15minütige Zentrifugation erfolgt bei 25°C und 8.000 rpm (Universal 30 RF, Rotor: 1414, Hettich, Tuttlingen). Es folgt eine Volumenbestimmung der oberen wässrigen Phase, eine erneute Zugabe von 8 % (w/v) TX-114 (vorkondensiert) bei 4°C und eine Wiederholung der nachfolgenden Arbeitsschritte. Der Überstand aus der Zentrifugation wird mit verdünnter HCl-Lösung auf pH 5.0 eingestellt und bei 4°C für 60 Min. inkubiert. Im Anschluss an 30 Min. Zentrifugation bei 4°C und 23500 rpm ( $\approx 100000$  g, SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München) wird der Überstand bis zu 30 % Sättigung (w/v) mit festem Ammoniumsulfat versetzt. Nach Holtzhauer (1988) entspricht dies bei einer AMS-Ausgangskonzentration von 0 % einer Zugabe von 166 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zu 1 Liter Lösung. Der Ansatz wird 15 Min. bei 4°C unter Rühren inkubiert und 30 Min. bei 4°C und 21100 rpm ( $\approx 80000$  g, SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München) zentrifugiert. Zu diesem Überstand werden 328 g/l festes  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gegeben, um eine Sättigung von 80 % zu erzielen (Holtzhauer, 1988). Es folgen eine weitere Inkubation unter Rühren bei 4°C für 30 Min. und eine letzte 30 Min. Zentrifugation bei 4°C und 23500 rpm ( $\approx 100000$  g, SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München). Das Pellet wird in etwa 1 ml 10 mM Na-Phosphat, pH 7.0 oder Aqua dest. gelöst und mit demselben Puffer, nach dem in Kapitel 2.5.7.5 beschriebenen Prinzip, entsalzt. Für diese Gelfiltration werden fertig gepackte Säulen mit 8.3 ml Trägermaterial verwendet (Sephadex® G-25, PD 10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Nach Äquilibrierung der Säule mit 3 x 5 ml Puffer wird die Probe in einem Volumen von 2.5 ml (= Ausschlussvolumen) aufgetragen, und mit 3.5 ml Puffer fraktioniert eluiert. Die Säule wird mit 10 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und einem Ethanolgradienten regeneriert und bei 4°C gelagert. Die salzfreien Proben können zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden.

### Isolationspuffer

100 mM	Na-Phosphat, pH 7.3
20 mM	EDTA
6 % (w/v)	TX-114, vorkondensiert (2.5.8.1)

### 2.5.8.3 Enzym-Aufreinigung aus Kartoffeln

Die Aufarbeitung erfolgt nach Angaben von Sánchez-Ferrer *et al.* (1993b) und Partington und Bolwell (1996). Die Kartoffeln werden gewaschen, geschält und zerkleinert. 100 g Kartoffelstücke werden mit 150 ml Isolationspuffer im Mixer homogenisiert (Stufe: Low, wenige kurze Intervalle, Heavy Duty Blender Model 37BL28, Waring Commercial, New Hartford, CT, USA), durch 4 Lagen Baumwollgaze filtriert, 90 Min. bei 4°C inkubiert und im Anschluss 30 Min. in Polyallomer-Tubes bei 4°C und 23500 rpm zentrifugiert ( $\approx 100000$  g,



SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München). Der Überstand wird mit zusätzlich 4 % (w/v) TX-114 (vorkondensiert, zur Berechnung siehe auch 2.5.8.2) bei 4°C unter Rühren homogen vermischt, auf Schraubdeckel-Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 35°C (Wärmeschrank Typ BE 400, Memmert, Schwabach) für 60 Min. inkubiert. Nach 15 Min. Zentrifugation bei 25°C und 10000 rpm (Universal 30 RF, Rotor: 1414, Hettich, Tuttlingen) liegen deutlich getrennte Phasen vor, von denen die obere abgezogen und mit 166 g/l Ammoniumsulfat (30 % Sättigung, Holtzhauer, 1988) versetzt wird. Dieser Ansatz wird 60 Min. bei 4°C unter Rühren inkubiert, 30 Min. bei 4°C und 18200 rpm ( $\approx$  60000 g, SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München) zentrifugiert und der Überstand für eine Sättigung von 60 % mit 184 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt (Holtzhauer, 1988). Nach einer weiteren 60minütigen Inkubation unter Rühren bei 4°C folgt eine erneute Zentrifugation für 30 Min. bei 4°C und 18200 rpm ( $\approx$  60000 g, SW 28 Rotor, Optima™ LE-80K / Optima™ XL-100K, Beckman, München). Das dabei entstehende Präzipitat wird in etwa 1 – 2 ml 10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7.0 (bzw. Aqua dest.) gelöst, wie in Kapitel 2.5.8.2 beschrieben, entsalzt und anschließend bei -20°C gelagert.

### Isolationspuffer

200 mM	Na-Acetat, pH 4.0
20 mM	EDTA
6 % (w/v)	TX-114, vorkondensiert (2.5.8.1)

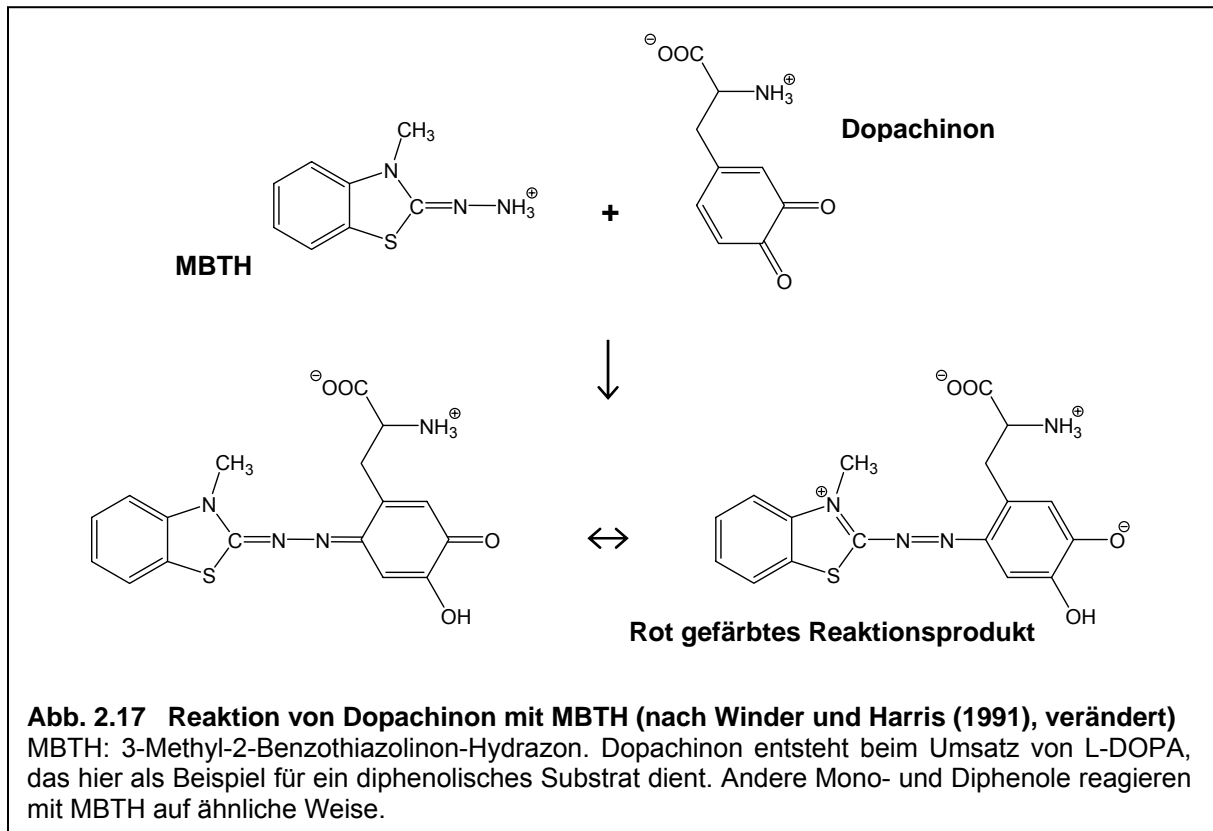
## 2.5.9 Enzymaktivitätstests

Zum Nachweis der Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität von Tyrosinasen in Präparationen nativer Enzyme sowie in Rückfaltungsversuchen mit rekombinantem Protein wird der MBTH-Assay verwendet. Zur Quantifizierung der Aktivität dienen kinetische Messungen, qualitative Bestimmungen werden mit Hilfe eines so genannten Tropfen-Tests durchgeführt. Zusätzlich lassen sich mit Hilfe dieses Tests, wie in Kapitel 2.5.3.4 beschrieben, Enzymaktivitäten in Polyacrylamidgelen nachweisen.

### 2.5.9.1 MBTH-Enzymassay

Tyrosinasen setzen Mono- und Diphenole zu Chinonen um. Der von Pifferi und Baldassari (1973) eingeführte und von Winder und Harris (1991) sowie Jaenicke (2002) weiter entwickelte Assay beruht auf einer Farbreaktion der entstehenden Chinone mit MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydraxon), die in Abb. 2.17 dargestellt ist.

MBTH, auch bekannt als Besthorns Hydraxon, reagiert in einer Michaelis-Addition mit einem Chinon zu einem stabilen rot gefärbten Reaktionsprodukt, dessen Absorptionsmaximum bei etwa 500 nm liegt. Auf diese Weise wird die autokatalytische Weiterreaktion der Chinone zu Melanin verhindert. Dies ist ein entscheidender Vorteil dieses Assays gegenüber dem häufig verwendeten Dopachrom-Assay, bei dem die Bildung von Dopachrom aus Dopachinon (siehe auch 1.1.3.2) bei 475 nm verfolgt wird, die anschließende Autokatalyse jedoch nicht unterbunden wird (Mason, 1948).



### 2.5.9.2 Kinetiken

Für eine quantitative Bestimmung der Enzymaktivität wird die Bildung des roten Reaktionsproduktes bei 505 nm verfolgt. Die Messungen werden im SPECTRAMaxPLUS-Mikrotiterplatten-Spectrophotometer (Software: SOFTmaxPRO<sup>®</sup>, PathCheck: Water Constant, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ohne vorherige Aufnahme eines Leerwertes (PreRead) durchgeführt. Auf diesen kann verzichtet werden, da zur Auswertung nicht der Absolutwert, sondern die Änderung der Absorption bei 505 nm ( $\Delta OD_{505\text{nm}}/\text{sec.}$ ) verwendet wird.

Wenn nicht anders angegeben, werden die Messungen in VIS-Mikrotiterplatten (Microtest Plate 96-Well Flat Bottom, Sarstedt, Nürnberg) in einem Gesamtvolumen von jeweils 250  $\mu\text{l}$  bei RT durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthalten die folgenden Komponenten:

- Na-Phosphatpuffer, pH 7.0
- 2.5 mM Substrat
- 2.5 mM MBTH
- Enzym
- 0.1 % SDS oder 1 mg/ml Trypsin (optional)

Der Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) wird in einer Konzentration von 100 mM angesetzt, bei 4°C gelagert und dient in dieser Form zur Volumenergänzung der Ansätze. Als Substrate werden Tyramin (als Monophenol, 4-Hydroxyphenethylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim) und Dopamin (als Diphenol, 3,4-Dihydroxyphenethylamin, Sigma-Aldrich, Steinheim) aus

10 mM Stammlösungen eingesetzt, die unmittelbar vor der Verwendung mit kaltem Na-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.0) hergestellt und bis zur Messung dunkel und auf Eis aufbewahrt werden. Unter diesen Bedingungen wird die Autooxidation des Dopamins verzögert, dennoch werden die Substratlösungen nicht länger als einen Tag verwendet. MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon, Sigma-Aldrich, Steinheim) ist in Aqua dest. gut löslich, wird in einer Konzentration von 13.9 mM (3 mg/ml) angesetzt und anschließend auf Eis temperiert. Die eingesetzte Enzymmenge ist bedingt durch die sehr unterschiedliche Herkunft der Proben (Rückfaltungsversuche (2.5.5 und 2.5.6), Proteingemische mit sehr unterschiedlichem Tyrosinase-Anteil (2.5.7 und 2.5.8)) extrem variabel. Sie muss im Einzelfall eventuell in Vorversuchen optimiert werden, da nur Messungen im *steady state* mit einer konstanten Umsatzrate ( $\Delta OD/Min.$ ) ausgewertet werden können. In Positivkontrollen zur Dopaminreaktion wird 1  $\mu g$  der Tyrosinase aus Champignon, die kommerziell erhältlich ist (Sigma-Aldrich, Steinheim), eingesetzt. Zur Aktivierung oder Signalverstärkung können 0.1 % (w/v) SDS aus einer 10 % (w/v) Stammlösung (RT) oder 1 mg/ml Trypsin zugefügt werden.

Puffer, MBTH, (Aktivator) und Enzym werden in einem Eppendorfreaktionsgefäß gemischt und vollständig in ein Well einer VIS-Mikrotiterplatte (Microtest Plate 96-Well Flat Bottom, Sarstedt, Nürnberg) überführt. Unmittelbar nach der Substrat-Zugabe mit Hilfe einer Multikanalpipette (Gilson/Abimed Analysentechnik GmbH, Langenfeld) wird die Messung gestartet, wobei maximal 8 Proben zeitgleich gemessen werden können. Der Umsatz von Dopamin wird für 5 Min. bei 505 nm verfolgt. Tyramin-Kinetiken werden für 30 Min. bei 505 nm aufgezeichnet.

### 2.5.9.3 Tropfen-Test

Der Tropfen-Test ist eine zeitsparende Variante des MBTH-Assays, die eine schnelle qualitative Überprüfung der Enzymaktivität erlaubt und sich besonders bei einer großen Probenanzahl anbietet. Hierfür werden je 2  $\mu l$  Probe und 2  $\mu l$  Färbelösung auf einem Parafilm zusammenpipettiert und die Färbung der Tropfen unmittelbar nach ihrer vollständigen Ausprägung photographisch dokumentiert. Um eine Fehlinterpretation des Ergebnisses auszuschließen, werden gleichzeitig immer Positiv- und Negativ-Kontrollen mit und ohne Champignon-Tyrosinase (Sigma-Aldrich, Steinheim) im jeweiligen Probenpuffer angesetzt. Als Referenz für die Autooxidation des Substrates dient die unverdünnte Färbelösung.

<b>Färbelösung</b>	<b>Ansatz</b>	<b>Stammlösung</b>
65 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0	1 ml	100 mM
3.2 mM Substrat	0.5 ml	10 mM
450 $\mu M$ MBTH	50 $\mu l$	13.9 mM
(0.3 % SDS	50 $\mu l$	10 %)

Die Stammlösungen werden, wie in Abschnitt 2.5.9.2 erläutert, angesetzt und behandelt. Aufgrund der unter diesen Bedingungen erhöhten Autooxidation von Dopamin sind Färbelösungen mit diesem Substrat sofort nach der Herstellung und nur einmalig zu verwenden.

### 3 Ergebnisse

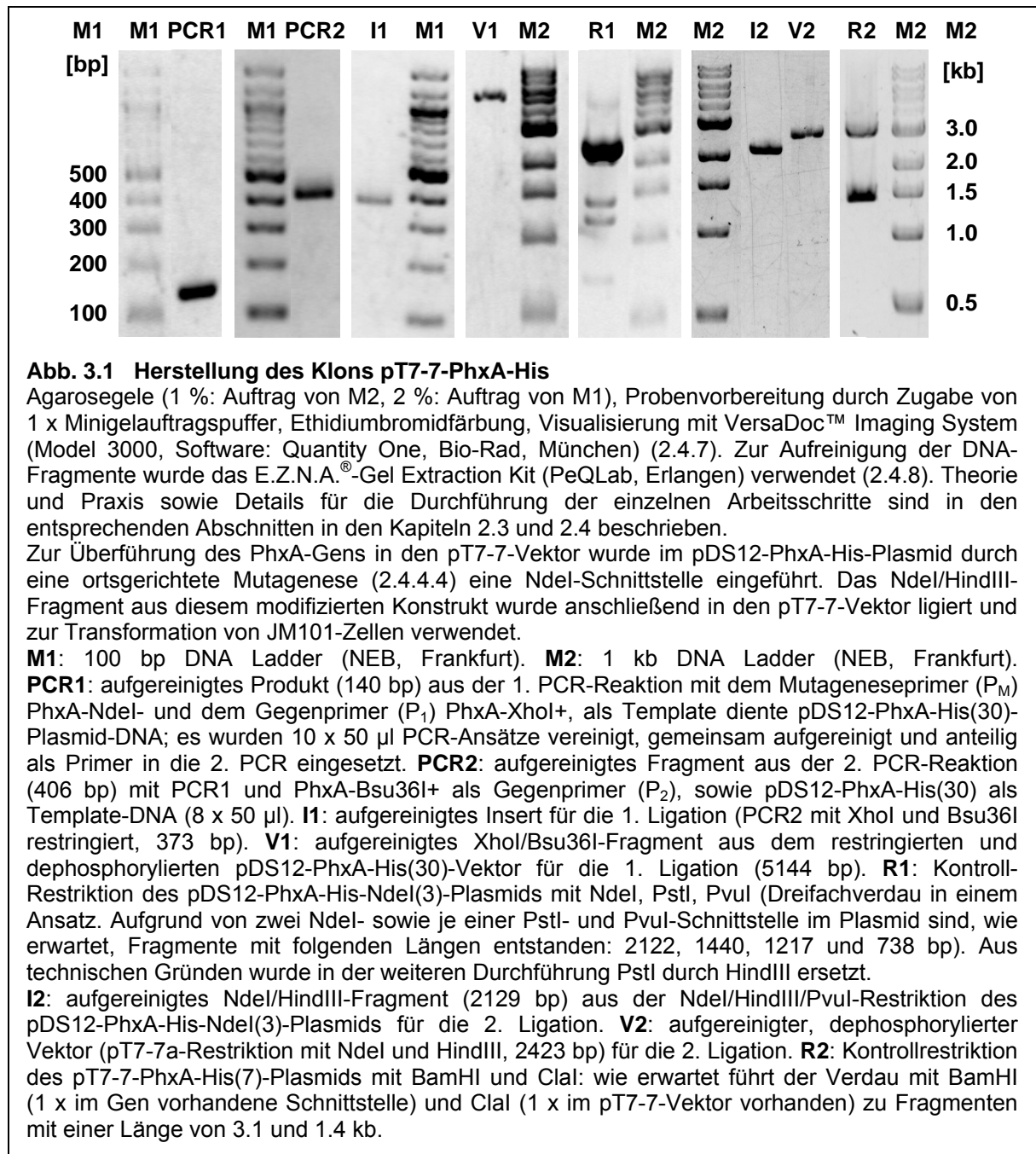
Zum Studium der Beziehung zwischen strukturellem Aufbau und Funktion eines Proteins ist die Kenntnis der Struktur unerlässlich. Der Reaktionsmechanismus der Tyrosinase, die im Gegensatz zur bereits strukturell aufgeklärten Catecholoxidase (Kalbunde *et al.*, 1998) zusätzlich zu diphenolischen Substraten auch Monophenole umsetzen kann, ist noch unverstanden. Anhand eines bekannten Aufbaus, besonders des aktiven Zentrums, könnte das von Tepper *et al.* (2005) postulierte Modell, das einen Reaktionszyklus zur Hydroxylierung von Monophenolen und Oxidierung von Diphenole zu Chinonen vorschlägt (1.1.3.1), bestätigt oder weiter entwickelt werden.

Für die röntgenkristallographische Strukturaufklärung wird ein Kristall des Enzyms und für dessen Kristallisierung eine große Menge des reinen Proteins benötigt. Grundsätzlich gibt es zwei Ansätze zur Aufreinigung eines Proteins. Die eine Möglichkeit ist die Isolation des nativen Proteins, die andere dessen rekombinante Expression. Der zweite Ansatz hat dabei den entscheidenden Vorteil, dass sich das Protein in großen Mengen in Bakterien vermehren lässt, wobei jedoch von Nachteil ist, dass dieses Expressionsprodukt oftmals in ungefalteter Form isoliert wird und zunächst in die korrekte Struktur überführt werden muss.

Es wurden parallele Versuche zur Aufreinigung einer nativen Tyrosinase und der Expression und Faltung rekombinanter Enzyme durchgeführt, wobei der Schwerpunkt auf den Rückfaltungsexperimenten lag. Diese wurden in einer ersten Versuchsreihe mit einer Tyrosinase aus Tomate durchgeführt, an die sich Experimente zur Expression und Faltung eines Enzyms aus Spinat anschlossen.

#### 3.1 Herstellung der Klone

Die zur Expression der rekombinanten Proteine in Bakterienzellen verwendeten Plasmide wurden im Verlauf der Arbeit vielfach modifiziert. Diese Veränderungen hatten in erster Linie die Einführung von His- bzw. Strep-Tags zur Immobilisierung der Proteine (2.5.5) oder eine Optimierung der Überexpression zum Ziel. In Tab. 2.1 (2.4.1) findet sich eine Zusammenstellung aller Klone und ihrer Charakteristika. Abb. 3.1 belegt anhand des Klons pT7-7-PhxA-His (siehe auch Abb. 2.9) exemplarisch die einzelnen Schritte der in Kapitel 2.4.1.2 beschriebenen Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.



Als Endergebnis dieser und aller übrigen Klonierungen wird in den folgenden Kapiteln auf die abschließenden Sequenzierungen und Alignments im Anhang verwiesen, durch die das gewünschte Konstrukt jeweils bestätigt wurde. Der Verlauf der einzelnen Arbeitsschritte bei der Herstellung der übrigen Klone wird nicht weiter dokumentiert.

## 3.2 Enzymassays

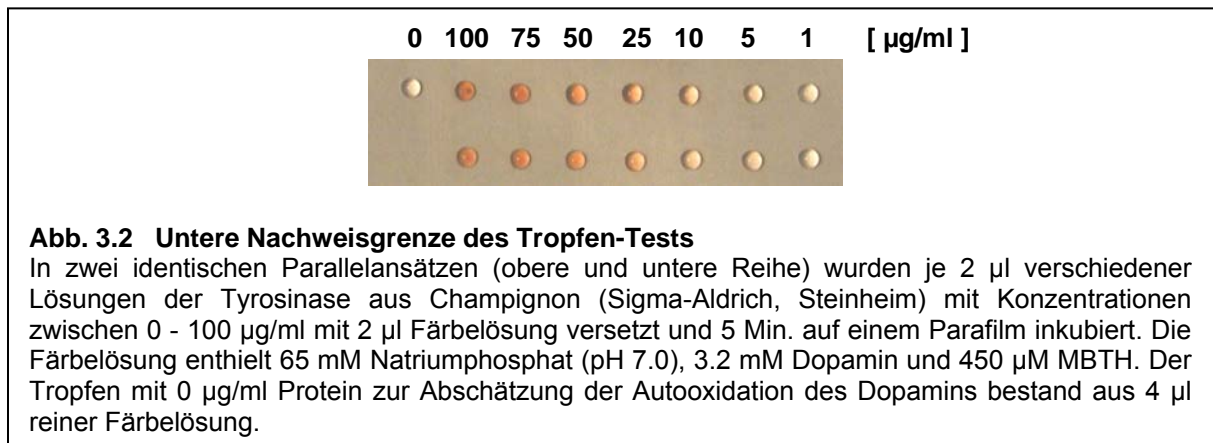
Mangels einer aufgereinigten nativen Tyrosinase ließ sich der Erfolg der Rückfaltungsversuche nicht anhand eines z.B. spektroskopischen Vergleiches mit dem nativen Enzym ableiten. Stattdessen wurde die Enzymaktivität als Indikator für eine korrekte Faltung herangezogen. Hierfür und zur Aktivitätsbestimmung in nativen Enzympräparaten wurde der MBTH-Assay nach Pifferi und Baldassari (1973) verwendet, bei dem die Reaktion von MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon) mit einem Chinon, dem Produkt der Tyrosinase-Reaktion, zu einem stabilen, rot gefärbten Reaktionsprodukt ausgenutzt wurde, das ein Absorptions-Maximum bei etwa 500 nm aufwies (2.5.9). Zur qualitativen Analyse wurden Tropfen-Tests (2.5.9.3) durchgeführt, eine Quantifizierung erfolgte in Form von kinetischen Messungen (2.5.9.2).

### 3.2.1 Tropfen-Test

Dieser Schnelltest machte die Überprüfung großer Probenanzahlen in kürzester Zeit möglich und wurde in erster Linie für Rückfaltungsversuche verwendet. Als Substrat diente in den meisten Fällen Dopamin, da der Diphenolumsatz generell sehr viel stärker und schneller abläuft, als der Umsatz eines monophenolischen Substrates wie Tyramin. Die Intensität der entstehenden Färbung wurde im Vergleich zu Negativ- und Positivkontrollen optisch abgeschätzt, die in jedem Tropfen-Test zusammen mit den Proben aufgetragen wurden. Die Inkubationszeit wurde durch die Autooxidation des Dopamins limitiert, die abhängig von Temperatur und Lichteinfall unterschiedlich schnell einsetzte. Der Test wurde daher nach Möglichkeit immer vor Beginn einer Anfärbung der reinen Färbelösung dokumentiert.

Zur Abschätzung der minimal ausreichenden Enzymkonzentrationen in den Rückfaltungsversuchen wurde die für ein positives Signal im Tropfen-Test notwendige Proteinmenge ermittelt. Hierfür wurde in erster Näherung die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. Es handelte sich bei diesem Präparat nicht um eine reine Enzymfraktion, sondern um einen Extrakt, der etliche Verunreinigungen enthielt (U. Salzbrunn, persönliche Mitteilung). Eine Auftrennung des Präparates in schwach denaturierenden Gelelektrophoresen bestätigte diesen Befund (Abb. 3.27 B - D, 3.5.2.1). Hier wurden immer mindestens zwei aktive Banden detektiert. Die Tyrosinase stellte jedoch die Hauptprotein-Fraktion dar und konnte somit in definierten Mengen eingesetzt werden. Abb. 3.2 zeigt einen Tropfen-Test, der mit einer Konzentrationsreihe des Enzyms durchgeführt wurde.

Ab einer Konzentration von 5 - 10 µg/ml ließ sich die Aktivität der Champignon-Tyrosinase im Tropfen-Test nachweisen. 0.01 - 0.02 µg der Tyrosinase aus Champignon waren demnach für ein positives Testergebnis ausreichend. Die meisten Rückfaltungsversuche wurden entweder parallel mit 10, 50 und 100 µg/ml Protein (3.4.4.2) oder mit Proteinkonzentrationen von 50 µg/ml (3.4.4.3) durchgeführt, die weit oberhalb der unteren Nachweisgrenze dieses Aktivitätstests lagen, sofern die verwendeten Enzyme eine äquivalente Aktivität aufzuweisen hatten wie das Kontrollenzym.



### 3.2.2 Kinetiken

Zur zeitsparenden Auswertung möglichst vieler Proben wurden die Messungen in einem Mikrotiterplatten-Spectrophotometer (SPECTRAMaxPLUS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt. Dies erlaubte eine gleichzeitige Messung von maximal acht Proben in einem geringen Probenvolumen (250 µl), wodurch sich der Proteinverbrauch erheblich einschränken ließ.

#### 3.2.2.1 Optimierung des MBTH-Enzymassays

Kinetiken können nur dann ausgewertet werden, wenn die Umsatzrate ( $\Delta OD/Min.$  oder  $\Delta OD/sec.$ ) über einen ausreichenden Zeitraum konstant bleibt (*steady state*). Um dies zu gewährleisten, wurden die Messparameter zunächst optimiert. Hierfür wurden die einzelnen Bestandteile des Assays, wie Enzym (Champignon-Tyrosinase, Sigma-Aldrich, Steinheim), Substrat (Dopamin) und MBTH, in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander kombiniert. Die Messungen erfolgten bei RT und in Na-Phosphatpuffer (pH 7.0). Eine optimale Auswertung war bei einem Dopamin : MBTH-Verhältnis von 1 : 1 (2.5 mM) und geringen Enzymkonzentrationen möglich. Die Zugabe von 1 µg der Tyrosinase aus Champignon war für die Positivkontrollen der späteren Versuche ausreichend. Die eingesetzten Proteinmengen der Proben waren variabel und mussten jeweils an die entsprechenden Bedingungen angepasst werden. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Herkunft und Zusammensetzung der Proben (rekombinante Enzyme, native Extrakte aus unterschiedlichen Aufreinigungsstadien), konnte der Gesamtproteingehalt der Probe nicht unmittelbar Aufschluss über den Tyrosinase-Anteil am Proteingemisch und deren Aktivität geben.

Die Molarität des Na-Phosphatpuffers variierte in den Ansätzen abhängig vom zugegebenen Probenvolumen, da der Puffer der Volumenergänzung der Messansätze diente. Um diese Variabilität zu begrenzen, wurden möglichst kleine Probenvolumina verwendet und das Substrat in demselben Puffer angesetzt. MBTH war in Na-Phosphat (pH 7.0) nicht, in Aqua dest. jedoch sehr viel besser löslich als in Ethanol. Daher wurde dieses ursprünglich

verwendete Lösungsmittel (Jaenicke, 2002) durch Aqua dest. ersetzt und auf diese Weise eine weitere möglicherweise störende Komponente aus den Messungen entfernt.

### 3.2.2.2 Einfluss verschiedener Substanzen auf den MBTH-Enzymassay

Der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Enzymaktivität wurde anhand von Dopamin-Kinetiken (2.5.9.2, 3.2.2.1) mit Hilfe der Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich, Steinheim) oder einem nativen Enzympräparat aus Spinat überprüft. Letzteres wurde dafür, wie in den Kapiteln 2.5.7.2 - 2.5.7.5 beschrieben, aufgereinigt und entsalzt und unter der Annahme verwendet, dass sich darin eventuell eher die Charakteristika einer pflanzlichen Tyrosinase widerspiegeln als in dem Enzym aus einem Pilz.

#### Aktivatoren

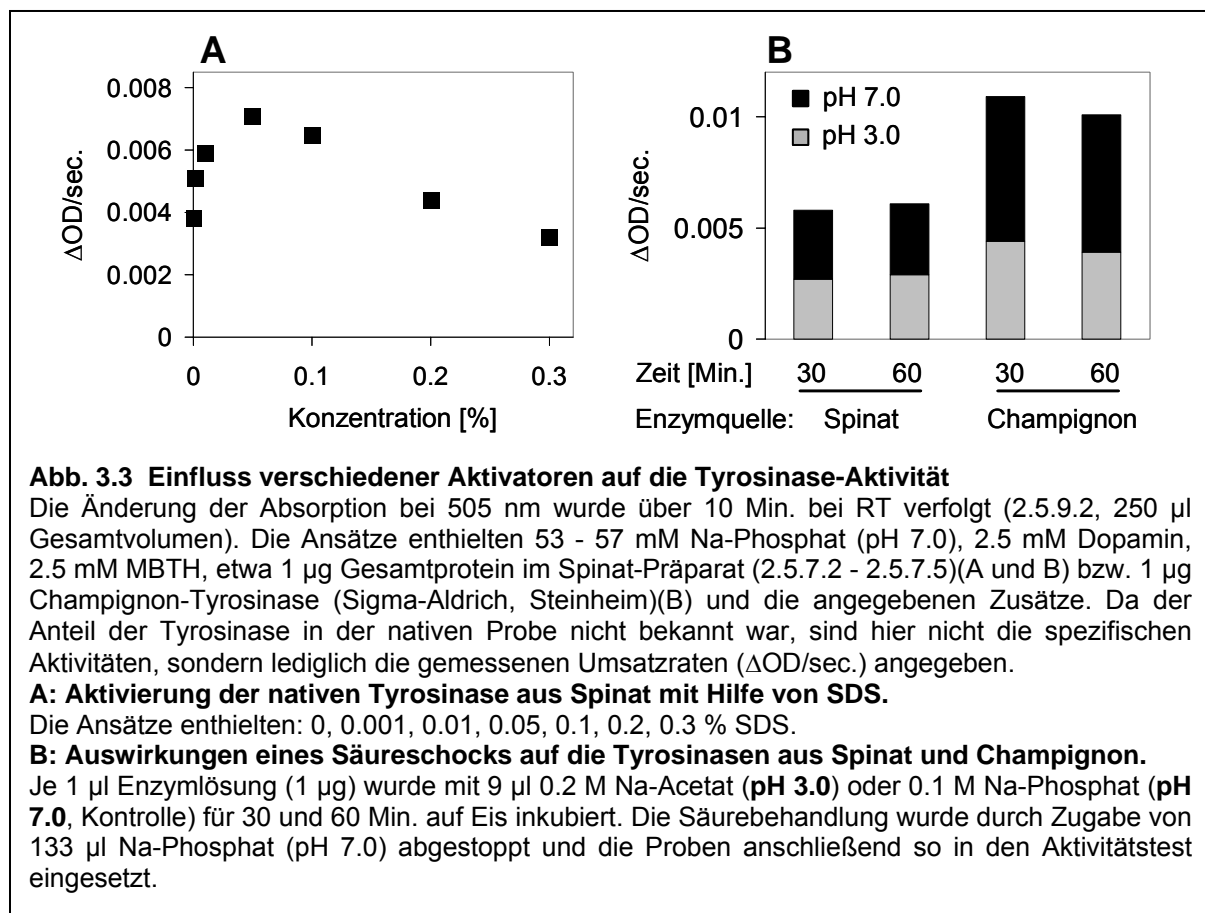
Weder die Champignon- noch die isolierte Spinat-Tyrosinase wiesen Latenz auf. Dennoch war es gut möglich, dass Enzyme aus anderen Pflanzen latent isoliert wurden oder gefaltete rekombinante Proteine zunächst aktiviert werden mussten. Die Aktivitätsmessung war das Erfolgskriterium bei allen Rückfaltungsversuchen. In diesen Messungen sollten daher standardmäßig auch Aktivatoren eingesetzt werden, um das Risiko einzuschränken, dass mangelnde Aktivität lediglich auf einen fehlenden Aktivierungsschritt zurückzuführen war. Da kein latentes Enzym vorlag, wurde versucht, den Effekt von SDS, Trypsin oder einem Säureschock (siehe 1.1.4.1) in Form einer möglichen Steigerung der Substrat-Umsatzrate der bereits aktiven Enzyme zu quantifizieren und ein ungefähres Maß für die zur Aktivierung einzusetzende Konzentration zu erhalten.

Abb. 3.3 A zeigt den Einfluss von SDS auf das Spinat-Enzym. Hier kam es bei Konzentrationen zwischen 0.001 und 0.2 % zu einer Steigerung der Umsatzrate. In Anwesenheit von 0.3 % SDS war die Aktivität minimal verringert. Als Aktivator wurde SDS im Folgenden in einer Konzentration von 0.1 % eingesetzt. Mit dem Enzym aus Champignon konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Der Effekt von 0.1 - 5.0 mg/ml Trypsin auf die bereits aktiven Enzyme war nicht signifikant. Da jedoch eine proteolytische Aktivierung latenter Enzyme durchaus notwendig sein konnte, wurde eine Konzentration von 1 mg/ml für diese Messungen ausgewählt. Eine nach Ichishima *et al.* (1984) durchgeführte Säurebehandlung, die von Nakamura *et al.* (2000) zur Aktivierung der Tyrosinase aus *Aspergillus oryzae* eingesetzt worden war, führte zu einer Abnahme der vorhandenen Aktivität um etwa 50 % (Abb. 3.3 B) und wurde nicht weiter verwendet.

Als Aktivitätstests wurden in den meisten Fällen daher drei Parallel-Messungen durchgeführt: ganz ohne Aktivatoren, unter Zugabe von 0.1 % SDS oder mit 1 mg/ml Trypsin im Ansatz.





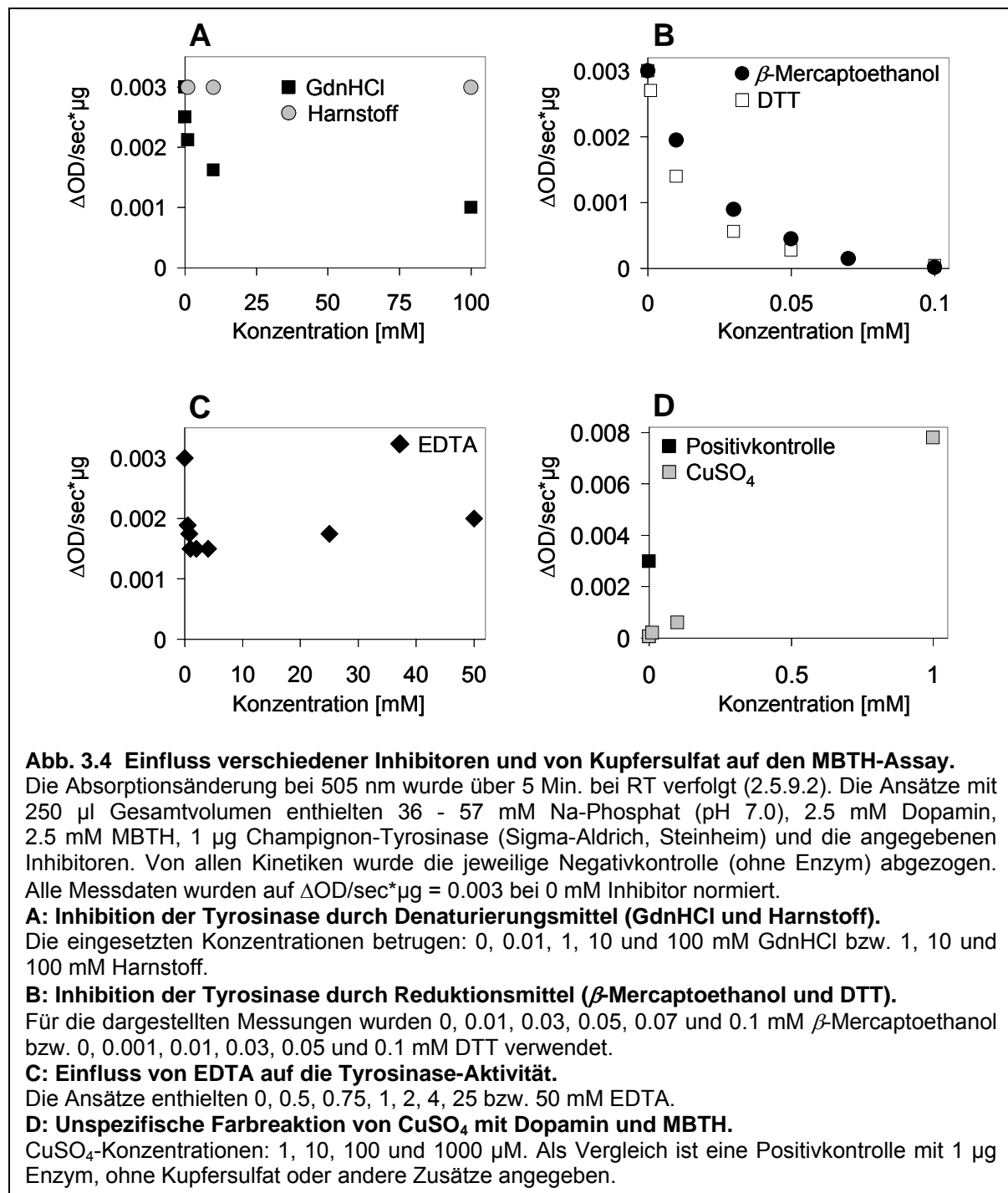
## Inhibitoren

Für die Solubilisierung von Inclusion Bodies, die in Rückfaltungsversuche eingesetzt werden sollten (3.3, 3.4), wurden verschiedene Denaturierungs- und Reduktionsmittel verwendet. Abb. 3.4 A zeigt den Einfluss von Harnstoff und GdnHCl auf die Champignon-Tyrosinase. Während letzteres das Enzym ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M deutlich hemmte, hatte Harnstoff anscheinend keinen sichtbaren Effekt. Bereits durch 0.01 mM DTT und  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde die Aktivität der Champignon-Tyrosinase um etwa 50 % reduziert, ab Konzentrationen von 0.1 mM war die Hemmung vollständig (Abb. 3.4 B). Daher war eine quantitative Entfernung der Reduktionsmittel und des GdnHCl aus den Faltungsansätzen vor einem Aktivitätstest essentiell. EDTA, das der Komplexbildung überschüssigen Kupfers diente (3.3.1.2), hatte ebenfalls einen negativen Effekt (Abb. 3.4 C). Da diese Hemmung jedoch offenbar bereits ab 1 mM eine Sättigung erreichte und auch bei 50 mM nicht vollständig war, konnte auf eine Entfernung des EDTA aus den Proben notfalls verzichtet werden.

## Unspezifische Farbreaktion

Cu(II) führte in Verbindung mit Dopamin und MBTH ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> auch in Abwesenheit eines Enzyms zu einem bei 505 nm deutlich detektierbaren Reaktionsprodukt (Abb. 3.4 D). Freies CuSO<sub>4</sub> wurde daher entweder mit EDTA komplexiert

oder über eine Dialyse aus der Probe entfernt. War es in geringen Mengen in den Proben enthalten, wurden die Negativkontrollen mit der gleichen  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration versetzt (10  $\mu\text{M}$  nur minimaler Effekt).



Weitere Kontrollversuche wurden immer dann durchgeführt, wenn ausgeschlossen werden sollte, dass Proben-Bestandteile entweder zu einer erhöhten Untergrundfärbung oder Hemmung der Enzymreaktion führen konnten, die den Aktivitätstest beeinträchtigt hätten. Im Zweifelsfall wurden Positiv- und Negativkontrollen mit und ohne Champignon-Tyrosinase in den Probenpuffern angesetzt. Auf diese Experimente wird in den entsprechenden Kapiteln eingegangen.

### 3.3 Rekombinante Tyrosinase (PPO A) aus Tomate

Rekombinante Tyrosinasen aus der bei Tomate (*Lycopersicon esculentum*) sieben Isozyme umfassenden Genfamilie wurden von der Arbeitsgruppe von E. Harel (Hebrew University of Jerusalem, Department of Plant Sciences, Israel) bereits für Importstudien in Thylakoide verwendet (Sommer *et al.*, 1994, 1995). In diesen konnte gezeigt werden, dass die Precursor-Proteine in zwei Schritten prozessiert und ins Thylakoidlumen transportiert werden (Sommer *et al.*, 1995). Ein Konstrukt aus einem Gen für eines der Isozyme und einem pDS12-Expressionsvektor wurde von E. Harel für die hier beschriebenen Rückfaltungsexperimente zur Verfügung gestellt. Auf der Grundlage eines Ausschnitts der nicht in digitaler Form mitgelieferten Sequenz-Information wurde die Nukleotidsequenz im Verlauf einer Datenbank-Recherche über die *Nucleotide Blast*-Funktion des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) als die der PPO A (Index: CAA78295, gi:22725, Z12833) identifiziert. Die PPO A aus Tomate ist mit dem Eintrag Q08303 von Newman *et al.* (1993) identisch, der über das ExPASy (Expert Protein Analysis System, [www.expasy.org](http://www.expasy.org), Gasteiger *et al.*, 2003) des SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) analysiert wurde. Daraus ergab sich, dass es sich bei dieser Tyrosinase um ein Precursor-Protein aus 630 Aminosäuren mit einer Molekularen Masse von etwa 71 kDa handelte, das nach Entfernung des Signalpeptids von 87 AS zu etwa 62 kDa prozessiert werden konnte.

Mit diesem Konstrukt und daraus abgeleiteten Klonen (Abb. 2.5) wurden mehrere Versuchsreihen zur Rückfaltung des Proteins in Lösung und nach Immobilisierung über einen C-terminalen Strep- oder His-Tag an eine Säulenmatrix durchgeführt, bevor das Gen vollständig sequenziert wurde. Diese Sequenzierung zeigte erhebliche Modifikationen des Gens und des daraus resultierenden Proteins, die in Kapitel 3.3.3.2 genauer beschrieben werden. Eine besonders gravierende Veränderung stellte die Verkürzung des Proteins durch ein verfrühtes Stop-Codon dar. Diese hatte zur Folge, dass die eingeführten Strep- bzw. His-Tag-Sequenzen nicht transkribiert wurden und in den exprimierten Proteinen nicht für die Bindung an eine Matrix zur Verfügung standen.

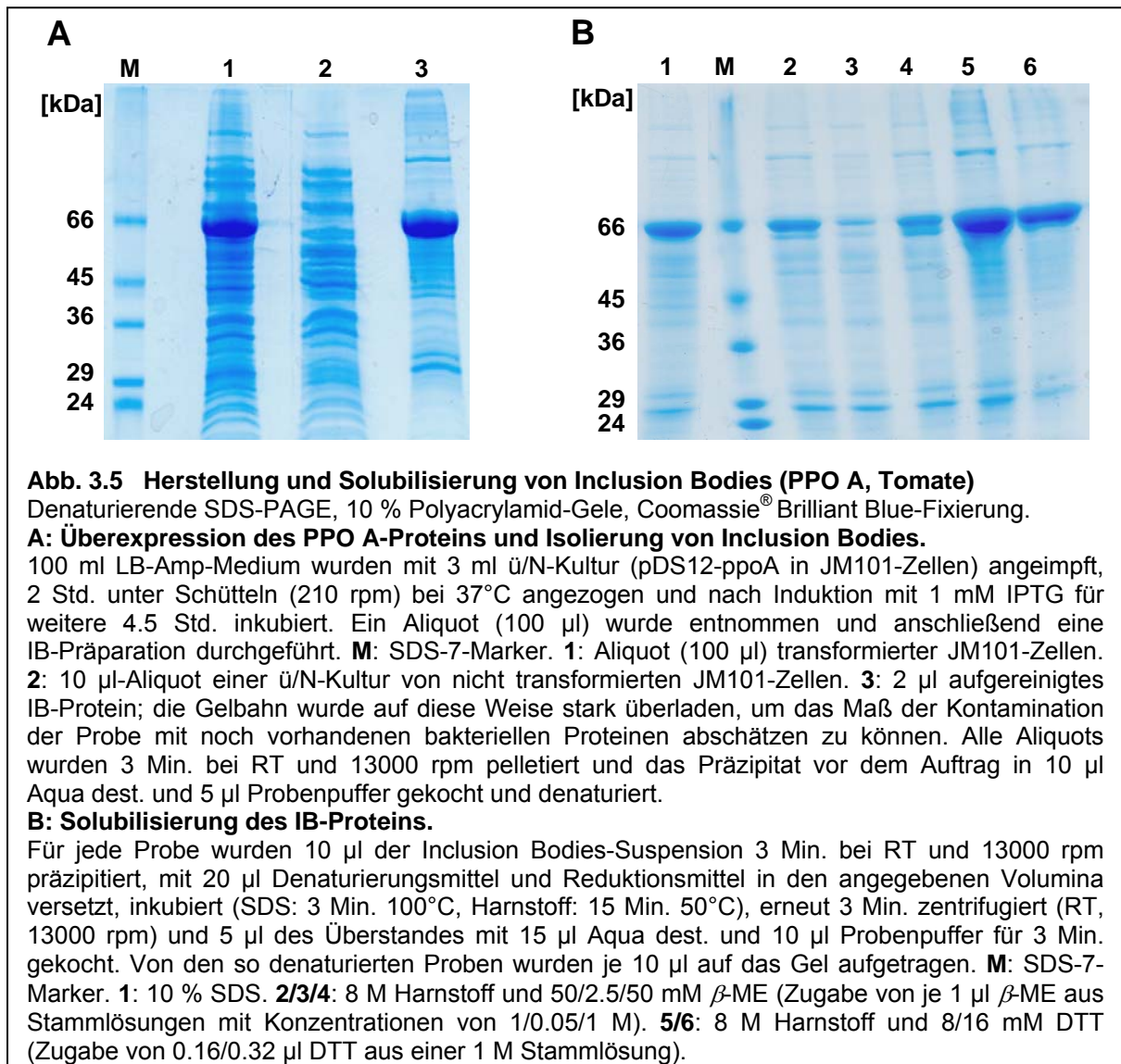
Die Ergebnisse der Experimente erschienen jedoch während der Durchführung durchweg schlüssig, weshalb erst nach einiger Zeit ernsthafte Zweifel auftraten, die dann zur vollständigen Sequenzierung des ppoA-His-Gens führten (3.3.3.2). Die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche müssen daher vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass sie unwissentlich mit einem fehlerhaften Protein durchgeführt wurden, das ein positives Ergebnis von vornherein ausschloss.

#### 3.3.1 Faltungsversuche mit dem nicht modifizierten Protein

Die lyophilisierte DNA des Konstruktes pDS12-ppoA von E. Harel wurde zur Transformation von *E.coli*-Zellen des Stammes JM101 verwendet. Nach ersten Expressionsversuchen (2.5.1.1) mit 10 der Transformanden wurde einer der Klone mit der besten Überexpression (pDS12-ppoA (V)) für die weiteren Versuche ausgewählt.

### 3.3.1.1 Präparation und Solubilisierung von Inclusion Bodies der PPO A

Mit dem Plasmid pDS12-ppoA ließ sich ein Protein in JM101-Zellen überexprimieren, das in Form von unlöslichen Proteinaggregaten (Inclusion Bodies) aus den Bakterien isoliert und aufgereinigt werden konnte (Abb. 3.5 A). Während der Aufarbeitung wurde sowohl die induzierte Bakteriensuspension (4.5 Std. nach IPTG-Zugabe), als auch die Lösung aus der French Press in einen Dopamin-Tropfen-Test eingesetzt. Weder im extrazellulären Medium noch im Zellinhalt der aufgebrochenen Bakterien konnte Tyrosinase-Aktivität nachgewiesen werden. Es gab demnach keine Anzeichen auf eine Bildung aktiven Proteins während der Überexpression in Bakterien.



Das IB-Protein wurde weitestgehend von bakteriellen Proteinen abgetrennt und hatte eine molekulare Masse von ca. 62 - 63 kDa. Dies entsprach erstaunlicherweise nicht dem erwarteten Vorläuferprotein (71 kDa), sondern dem reifen Protein (62 kDa), das in diesem Fall im Verlauf der Aufreinigung bereits das Signalpeptid hätte verloren haben müssen. Es konnte in 10 % SDS gelöst werden, war jedoch in 8 M Harnstoff oder 6 M GdnHCl ohne Zugabe von Reduktionsmitteln nicht löslich. Wie in Abb. 3.5 B dargestellt, waren 8 mM DTT

in Verbindung mit 8 M Harnstoff (Probe 5) und 15 Min. Inkubation bei 50°C ausreichend zur Reduktion von eventuell während der Aggregation geknüpften Disulfidbrücken und führten zur vollständigen Denaturierung des IB-Proteins. Im Folgenden wurden die Inclusion Bodies entweder in 10 % SDS und 8 mM DTT gekocht oder mit 6 M GdnHCl bzw. 8 M Harnstoff und 8 mM DTT solubilisiert.

### 3.3.1.2 Faltungsversuche über Verdünnung und Dialyse

Die Versuche zur Rückfaltung des unmodifizierten PPO A-Proteins in Lösung wurden anhand von Dialysen oder Verdünnungen vollständig denaturierter Inclusion Bodies durchgeführt. Dabei sollte die Faltung des Proteins in seine natürliche Struktur bei geeigneten Bedingungen ein spontaner Prozess sein. Um auch den Einbau des Kupfers als Cofaktor zu ermöglichen, der eventuell mehr Zeit in Anspruch nimmt, wurden die Proben in einigen Versuchen anschließend an den Faltungsschritt ü/N inkubiert.

In den Verdünnungsexperimenten wurden jeweils 10 - 20 µl solubilisiertes Protein in einem 8 - 15 fachen Puffervolumen (80 - 150 µl) verdünnt, wodurch die Konzentration des Reduktionsmittels (DTT) auf  $\leq 1$  mM reduziert wurde, und unter Zugabe von 10 µM CuSO<sub>4</sub> inkubiert. Im Gegensatz zu diesem einfachen Verdünnungsschritt wurde im Verlauf der Dialysen von je 100 µl Probe gegen ein mindestens 100faches Puffervolumen (125 ml) die Konzentration von Denaturierungs- und Reduktionsmitteln in der Probe kontinuierlich verdünnt, um an einem beliebigen Punkt innerhalb dieses Gradienten eine Rückfaltung des Proteins zu erlauben.

In Vorversuchen konnte mit Hilfe von Enzymkinetiken mit der Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich, Steinheim), die im Dialysat inkubiert wurde, gezeigt werden, dass bei den gewählten Volumina bereits eine zweistündige Dialyse zum Pufferaustausch ausreichte. Im Anschluss an den ersten Verdünnungs- oder Dialyseschritt wurden alle Proben zur Entfernung des noch vorhandenen Reduktions- und Denaturierungsmittels, sowie zur Komplexbildung des überschüssigen Kupfers gegen 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und 2 mM EDTA dialysiert. In keinem dieser Ansätze, die mit Hilfe kinetischer Aktivitätstests analysiert wurden, konnte ein Umsatz von Dopamin beobachtet werden.

Tab. 3.1 enthält eine Zusammenstellung der Parameter, wie Denaturierungsmittel, Inkubations- und Dialysedauer, sowie Temperatur und weiterer Pufferkomponenten, die bei den einzelnen Experimenten variiert wurden.

Es wurde außerdem versucht, die Bildung von löslichem Protein durch Zugabe von CuSO<sub>4</sub> zum Kulturmedium während der Überexpression zu unterstützen. Für die Ansätze im 5 ml-Maßstab ohne anschließende Proteinaufreinigung wurden LB-Amp-Medien mit 0, 10, 30, 100 und 500 µM CuSO<sub>4</sub> versetzt, angeimpft und nach der Induktion 4.5 Std. bei 37°C inkubiert. Parallele Inkubationen für 8 bzw. 24 Std. bei 18°C sollten im Verlauf des verzögerten Bakterienwachstums eine Proteinaggregation verhindern. Eine erfolgreiche Überexpression konnte auch unter diesen Anzuchtbedingungen über denaturierende SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Zellmembranen der Bakterien wurden durch drei aufeinander folgende Einfrier-Auftau-Zyklen in 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7.0),

2 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure und 1 mM Benzamidin aufgebrochen und die Proben anschließend ü/N gegen 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und 2 mM EDTA dialysiert. Kinetische Messungen ergaben jedoch auch hier keinerlei Aktivität, weshalb in den folgenden Experimenten versucht wurde, das Protein im immobilisierten Zustand zu falten.

	Solubilisierung	Inkubation		Pufferkomponenten	CuSO <sub>4</sub> [µM]
		Dauer [Min.]	Temperatur [°C]		
V1	8 M Harnstoff	240 bzw. ü/N	4	-	10
V2	6 M GdnHCl	180 bzw. ü/N	4	-	10
V3	10 % SDS	3 x 60 / 3 x 15	-20 / 25	-	10
V4	10 % SDS	ü/N	4	-	10
V5	10 % SDS	ü/N	4	-	100
V6	10 % SDS	ü/N	25	-	10
V7	10 % SDS	120	25	1.3 % OG	10
V8	10 % SDS	120	25	0.65 % TX-100	10
D1	8 M Harnstoff	120	4	1 mM DTT	10
D2	8 M Harnstoff	120 + ü/N	4	1 mM DTT	10
D3	6 M GdnHCl	240	4	1 mM DTT	10
D4	6 M GdnHCl	240 + ü/N	4	1 mM DTT	10

**Tab. 3.1 Parameter der Faltungsversuche mit unmodifizierten IB-Protein (PPO A, Tomate).**

**D:** Dialysen. **V:** Verdünnungen. Die Solubilisierungsansätze enthielten zusätzlich zum angegebenen Denaturierungsmittel jeweils 8 mM DTT. Als Inkubations- und Dialysepuffer wurden 45 – 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) mit den angegebenen Zusätzen verwendet. Die Dialysen wurden entweder über eine Membran auf einem Erlenmeyerkolben (Abb. 2.15 A, 2.5.6.2) oder in Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt (Abb. 2.15 B, 2.5.6.2). Bei V3 handelte es sich um 3 aufeinander folgende Einfrier(-20°C)-Auftau(25°C)-Zyklen. D2 und D4 sind Variationen der Versuche D1 und D3, die in einer Inkubation der dialysierten Proben ü/N bei 4°C bestanden, um anschließend an die Faltung der Proteinstruktur im Verlauf der Dialyse einen langsamen Einbau des Kupfers in das Aktive Zentrum zu ermöglichen. Vor dem abschließenden Aktivitätstest wurden die Proben gegen 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und 2 mM EDTA dialysiert.

### 3.3.2 PPO A aus Tomate inklusive Strep-Tag

Die Bindung eines ungefalteten Proteins an eine Säulenmatrix kann für dessen Rückfaltung von Vorteil sein, da höhere Proteinkonzentrationen und auch solche Pufferbedingungen eingestellt werden können, die eine Faltung begünstigen, bei einem Protein in Lösung jedoch zu dessen Präzipitation führen würden.

Für eine erste Versuchsreihe zur Proteinrückfaltung im immobilisierten Zustand wurde das Strep-Tag/Strep-Tactin®-System der Firma IBA (Institut für Bioanalytik, Göttingen) ausgewählt, das auf der Grundlage der Biotin-(Strept)Avidin-Bindung entwickelt worden ist. Dabei binden Proteine, die einen so genannten Strep-Tag, eine Sequenz aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) enthalten, spezifisch an eine Sepharose-Matrix, die mit Strep-Tactin®, einem Streptavidin-Derivat, aktiviert ist. Kreuzreaktionen sind mit Biotin zu erwarten, bei der Aufreinigung eines rekombinanten Proteins aus *E.coli*-Zellen gibt der

Hersteller jedoch lediglich das 22 kDa schwere Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP) als Kontaminationsgefahr an (IBA, 2000).

In diesem Kapitel werden die Versuche beschrieben, die zur Herstellung, Bindung und Aktivierung eines Strep-Tag-Derivates des PPO A-Proteins aus Tomate durchgeführt wurden.

### 3.3.2.1 Insertion des Strep-Tags in die PPO A-Sequenz

Der Strep-Tag durfte die Faltung des auf der Säule immobilisierten Proteins in seine natürliche Struktur nicht behindern. Da es statistisch unwahrscheinlich ist, dass der N- oder C-Terminus im Inneren eines räumlich gefalteten Proteins verborgen liegt (Lottspeich, 1998), standen diese Bereiche für die Lokalisation des Strep-Tags zur Auswahl. Gegen eine C-terminale Platzierung sprach die Annahme einer für die Aktivierung des Enzyms möglicherweise notwendigen proteolytischen Prozessierung (siehe Kapitel 1.1.4.1). Die hierfür verwendete Schnittstelle ist für Tyrosinasen höherer Pflanzen am C-Terminus des Enzyms beschrieben (van Gelder *et al.*, 1997). Bei einer Bindung des Proteins an die Säulenmatrix und vorzeitiger Proteolyse hätte dies den Verlust des Proteins zur Folge. Da jedoch die Masse des unmodifizierten PPO A-Proteins von etwa 62 kDa (3.3.1.1) eher darauf schließen ließ, dass bereits das N-terminale Signalpeptid während der IB-Präparation verloren gegangen war, erschien der N-Terminus noch weniger als geeignete Position.

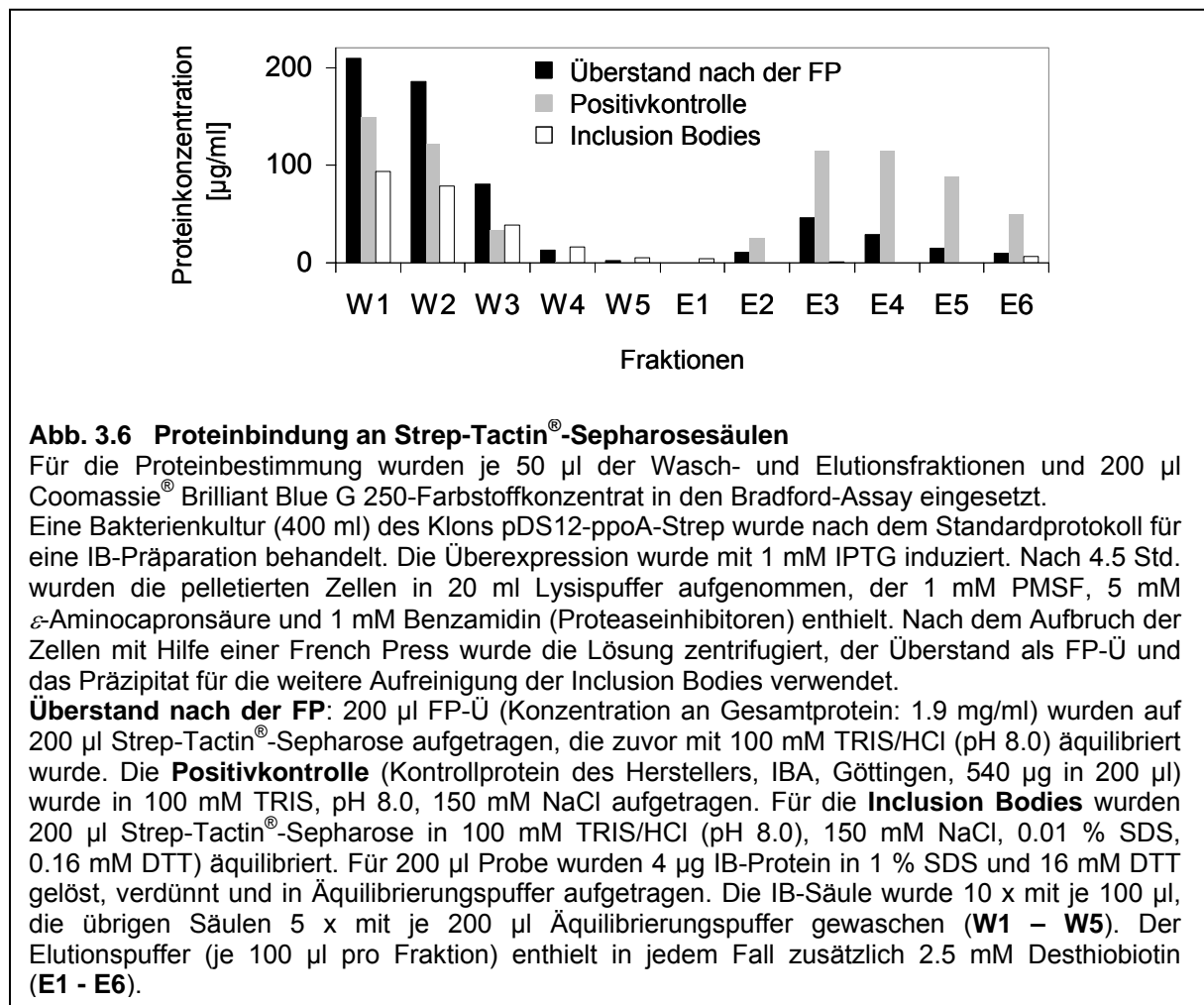
Zur C-terminalen Insertion des Strep-Tags in Form eines kurzen DNA-Abschnittes in das 3'-Ende des *ppoA*-Gens war eine Kenntnis der exakten DNA-Sequenz unerlässlich. Eine Sequenzierung des pDS12-*ppoA*-Plasmids im Bereich rund um das Stop-Codon des Gens ergab keine Abweichungen von der Sequenz, die erwartet werden konnte, wenn das *ppoA*-Gen, wie von E. Harel angegeben, in die BamHI-Schnittstelle des pDS12-Vektors inkloniert worden war (Anhang: Sequenzierungen: pau369).

Da in dieser Region keine singuläre Restriktionsschnittstelle, die im Gesamtplasmid nur einmal auftrat, vorhanden war, musste eine neue Schnittstelle geschaffen werden. Durch Austausch zweier Basenpaare im Verlauf einer ortsgerichteten Mutagenese (2.4.4.4) konnte ein Abschnitt unmittelbar vor dem Stop-Codon des *ppoA*-Gens in die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NsiI* umgestaltet werden. Die DNA wurde dann an dieser Position gezielt restringiert und mit dem kurzen für den Strep-Tag codierenden DNA-Fragment in Form zweier synthetisch hergestellter und hybridisierter Oligonukleotide ligiert (2.4.1.2). Die abschließende Sequenzierung (Anhang: pau398) zeigte eine einfache Insertion der Strep-Tag-Sequenz in korrekter Orientierung.

### 3.3.2.2 Bindung des Strep-Tag-Proteins an Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sephrose

Das mit Hilfe des pDS12-*ppoA*-Strep-Plasmids in JM101-*E.coli*-Zellen überexprimierte und in Form von Inclusion Bodies isolierte Protein zeigte bezüglich Reinheitsgrad, Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel und molekularer Masse keine sichtbaren Unterschiede zum nicht modifizierten PPO A-Protein (Abb. 3.5 A, 3.3.1.1 und Abb. 3.7). Es konnte in 8 M Harnstoff, 6 M GdnHCl oder 1 % SDS jeweils in Verbindung mit 8 - 16 mM DTT gelöst, unter diesen Bedingungen jedoch nicht auf die Säulen aufgetragen werden. Die Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-

Bindung war nach den Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen) zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung (siehe Tab. 2.11, 2.5.5.1) mit Konzentrationen von maximal 0.5 M Harnstoff oder GdnHCl, 0.01 % SDS, 1 M NaCl und 5 mM DTT kompatibel. Da das pH-Optimum zwischen pH 4 und pH 9 angegeben wurde, wurden die Proben mit 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) oder 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) und 150 mM NaCl verdünnt. Die Proben (etwa 5 µg Protein) wurden auf äquilibrierte Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharosesäulen (200 µl Säulenbett) aufgetragen, mit einem Äquilibrierungspuffer gewaschen, der die gleichen Denaturierungs- und Reduktionsmittel-Konzentrationen enthielt wie die jeweilige Probe, und mit 2.5 mM Desthiobiotin eluiert. Alle Fraktionen wurden mit Hilfe von Bradford-Protein-Assays und/oder SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Bei Konzentrationen von 0.4 - 0.8 M Harnstoff bzw. 0.3 - 0.6 M GdnHCl und 0.4 - 0.8 mM DTT in den Proben, wurde das Protein fast vollständig in den ersten beiden Waschfraktionen von der Säule gespült. Die Elutionsfraktionen enthielten kein Protein. Mit SDS-Konzentrationen von 0.001, 0.002, 0.005 und 0.01 % und 0.074 - 0.74 mM DTT konnte ebenfalls keine Bindung an die Matrix beobachtet werden (Abb. 3.6).



Zur Überprüfung des Systems wurde ein Kontroll-Protein des Herstellers verwendet. Dieses war in einem lyophilisierten bakteriellen Extrakt enthalten und wurde als GAPDH-Strep-Tag

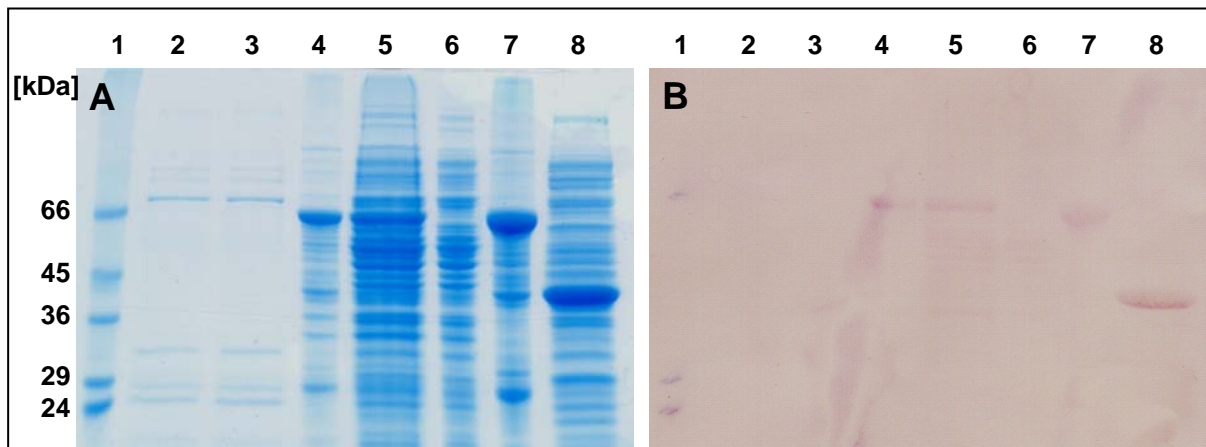


(37 kDa) angegeben. Da bei der Überexpression rekombinanter Proteine in Bakterien zusätzlich zu den Inclusion Bodies manchmal auch eine kleinere Menge an löslichem Protein gebildet werden kann, wurde gleichzeitig versucht, ein entsprechendes Protein über die Bindung an die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säule aus dem pDS12-ppoA-Strep-Bakterienextrakt zu isolieren. Dafür wurden die Bakterien wie für eine IB-Präparation angezogen und induziert. Nach dem Zellaufbruch mit Hilfe einer Zellpresse (French Press) wurde die Bakterienlösung zentrifugiert und 200 µl des Überstandes (FP-Ü) als Probe verwendet. In beiden Fällen wurden die Säulen (200 µl) mit 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) und 150 mM NaCl äquilibriert und gewaschen. Wie in Abb. 3.6 gezeigt, wurde in diesen Waschschritten (W1 - W5, 5 x 200 µl) bereits eine große Menge an Protein abgetrennt. Dabei handelte es sich vermutlich um bakterielle Proteine, da beide Proben aus einem Bakterienextrakt bestanden. Mit Desthiobiotin konnten jedoch nicht nur aus der Kontrolle, sondern auch aus dem FP-Ü ein oder mehrere Proteine eluiert werden (E1 - E6, 6 x 200 µl).

In einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot mit einem monoklonalen Strep-Tag-spezifischen Antikörper (IBA, Göttingen) wurden die Eluate genauer charakterisiert. Wie in Abb. 3.7 A zu sehen ist, trat im Eluat (Proben 2 und 3) keine mit den Inclusion Bodies vergleichbare Bande bei 62 - 63 kDa auf. Stattdessen konnte für die Hauptbande des Eluats mit Hilfe der Quantity One-Software (Bio-Rad, München) eine molekulare Masse von ca. 72 kDa ermittelt werden. Dies stimmte überraschend gut mit der Masse des Precursor-Proteins von 71 kDa überein. Aufgrund des sehr geringen Anteils, den das eluierte Protein am Gesamt-Überstand (FP-Ü) hatte, war in einem Vergleich transformierter (pDS12-ppoA-Strep) und nicht transformierter JM101-Zellen in einer weiteren SDS-PAGE nicht zu erkennen, ob im Verlauf der Überexpression mehr oder ein zusätzliches 72 kDa Protein gebildet worden war. Eine Kreuzreaktion mit einem bakteriellen Protein wurde aufgrund der Hinweise des Herstellers auf nur ein kontaminierendes bakterieneigenes Protein (BCCP, 22 kDa; IBA, 2000) ausgeschlossen. Daher wurde angenommen, dass das vollständige Vorläufer-Protein der PPO A in löslicher Form von den Bakterien produziert worden und im FP-Ü zu finden war und die Prozessierung zu 62 kDa erst im Verlauf der IB-Präparation stattfand.

Leider konnte diese Annahme nicht durch einen Western Blot bestätigt werden (Abb. 3.7 B), da es hierbei lediglich zu einer unspezifischen Markierung all der Banden kam, die sehr große Proteinmengen enthielten. Da auch das Kontrollprotein des Herstellers nicht angefärbt werden konnte, handelte es sich hierbei offenbar um ein Problem mit dem Strep-Tag-spezifischen Antikörper (IBA, Göttingen). Dennoch wurde entschieden, mit dem löslichen Protein weiterzuarbeiten.

In mehreren Parallelversuchen wurde mit Hilfe des Bradford-Assays die Protein-Gesamtkonzentration in allen Elutionsfraktionen nach dem Auftrag von 200 µl FP-Ü auf die Säule bestimmt. Eine Abschätzung der Proteinmenge, die auf diese Weise aus 100 ml Bakterienkultur isoliert werden könnte, belief sich auf etwa 600 µg. Daher wurde versucht, das Verhältnis von löslichen Proteinen zu Inclusion Bodies, die bei der Überexpression entstanden, zu verbessern.



**Abb. 3.7 SDS-PAGE und Western-Blot von Strep-Tag-IB und FP-Ü (PPO A, Tomate)**

**A:** Denaturierende SDS-PAGE, 10 % Polyacrylamid, Coomassie® Brilliant Blue-Fixierung.

**B:** Western-Blot, Proteintransfer aus einem zu A analogen Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Erster Antikörper: Strep-Tag spezifischer AK (IBA, Göttingen). Zweiter Antikörper: Anti-Maus IgG, Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (Sigma-Aldrich, Steinheim). Der enzymatische Nachweis erfolgte über die Alkalische Phosphatase mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat).

100 ml LB-Amp-Medium wurden mit 5 ml einer 8 Std. alten Bakterienkultur (pDS12-ppoA-Strep in JM101-Zellen) angeimpft, 1.5 Std. unter Schütteln (210 rpm) bei 37°C angezogen und nach Induktion mit 1 mM IPTG für 14.5 Std. bei 28°C inkubiert. Ein Aliquot (100 µl) wurde entnommen, die Zellen wurden pelletiert, in 10 ml Lysispuffer mit 1 mM PMSF, 5 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure und 1 mM Benzamidin resuspendiert und in der French Press aufgebrochen. Das Präzipitat aus der nachfolgenden Zentrifugation wurde in 1 ml Lysispuffer aufgenommen (FP-P) und ebenso wie der Überstand (FP-Ü) bei -20°C eingefroren. 200 µl des FP-Ü wurden auf 200 µl Strep-Tactin®-Säulen aufgetragen, mit 5 x 200 µl und 3 x 1 ml Puffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0) gewaschen und mit 6 x 100 µl Elutionspuffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0 und 2.5 mM Desthiobiotin) fraktioniert eluiert (E1-E6). Alle Proben wurden 3 Min. im Wasserbad (100°C) erhitzt. Der Probenauftrag war bei beiden Gelen (A und B) identisch.

**1:** SDS-7-Marker. Die Markierungen in B wurden während der Kontrolle des Proteintransfers auf die Nitrocellulosemembran mit Hilfe einer Ponceau S-Färbung mit Kugelschreiber angebracht.

**2/3:** Elutionsfraktionen (E4) von zwei parallelen Strep-Tactin®-Säulen-Chromatographien. Je 40 µl E4 wurden mit 20 µl Probenpuffer gekocht, davon wurden je 30 µl auf die Gele aufgetragen.

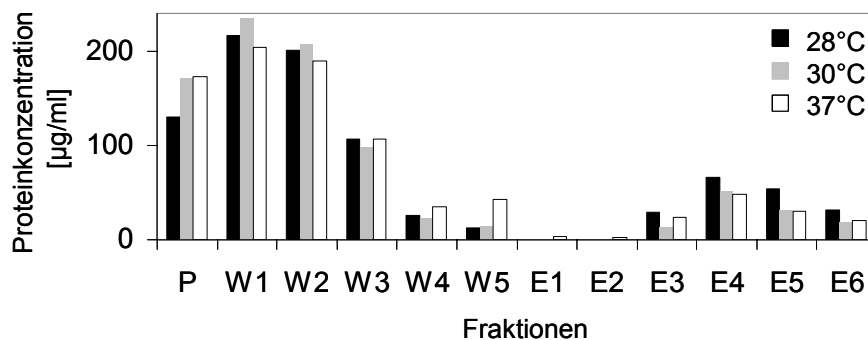
**4:** FP-P. 5 µl des in Lysispuffer aufgenommenen Präzipitats (FP-P) wurden in 50 µl Aqua dest. und 25 µl Probenpuffer denaturiert, 5 µl dieser Probe wurden aufgetragen. **5:** Aliquot (100 µl) der 14.5 Std. inkubierten Zellkultur. Die pelletierten Zellen wurden in 25 µl Aqua dest. und 15 µl Probenpuffer gekocht, aufgetragen wurden je 15 µl Probe. **6:** FP-Ü. 20 µl FP-Ü wurden mit 20 µl Aqua dest. und 20 µl Probenpuffer gekocht, aufgetragen wurden je 15 µl Probe. **7:** Inclusion Bodies aus einer separaten IB-Präparation (pDS12-ppoA-Strep) nach dem Standard-Protokoll. 2 µl pelletierte Inclusion Bodies wurden mit 20 µl Aqua dest. und 10 µl Probenpuffer gekocht und davon 2 µl aufgetragen. **8:** Positivkontrollprotein (IBA, Göttingen), 4 µl (11 µg Gesamtprotein) wurden mit 36 µl Aqua dest. und 20 µl Probenpuffer gekocht und je 15 µl von dieser Probe auf die Gele aufgetragen.

### 3.3.2.3 Einfluss der Anzuchttemperatur auf die Bildung von löslichem Protein

Unter optimalen Wachstumsbedingungen verdoppelt sich die Anzahl der Zellen in einer *E.coli*-Flüssigkultur alle 20 Min. Dazu gehört neben einem adäquaten Nährstoffangebot und ausreichender Sauerstoffzufuhr auch die Temperatur (optimal 37°C). Eine Absenkung der Temperatur führt zu einer Verminderung der Wachstumsrate bei gleichzeitiger Verlangsamung aller in der Zelle ablaufenden Prozesse. Eine eingeschränkte

Proteinsynthese und damit einhergehende reduzierte Konzentrationen in der Zelle können eine Aggregation von Proteinen eventuell verhindern.

Es wurde versucht, die Ausbeute an löslichem Protein durch eine Überexpression bei geringerer Temperatur zu verbessern. Dafür wurden je 100 ml LB-Amp-Medium mit Standard-ü/N-Kulturen (pDS12-ppoA-Strep) angeimpft, 1.5 Std. bei 37°C und 210 rpm inkubiert und nach der Induktion für 4.5, 7, 14 bzw. 23 Std. bei 30°C geschüttelt. Der jeweilige FP-Ü wurde auf Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säulen aufgetragen und wie oben beschrieben gewaschen und eluiert. Mit Hilfe eines Bradford-Assays wurde im Eluat der 14 Std. gewachsenen Kultur die höchste Proteinkonzentration ermittelt. Anschließend wurde der Versuch mit Induktionstemperaturen von 28°C und 37°C und einer Überexpressionsdauer von 14.5 Std. wiederholt, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen und auszuschließen, dass eine eventuell gesteigerte Produktion von löslichem Protein nicht allein auf die verlängerte Inkubation zurückgeführt werden konnte. Abb. 3.8 zeigt eine Gegenüberstellung der Proben aus den drei Expressionsversuchen. Aus der 28°C-Kultur wurde hier mehr Protein eluiert als aus den beiden anderen Ansätzen. Eine Abschätzung der Gesamtproteinmenge in allen Elutionsfraktionen ergab eine Menge von etwa 800 µg pro 100 ml Kulturvolumen bei 28°C im Vergleich zu 500 µg / 100 ml bei 37°C. Da ausgehend von einer 400 ml Kultur, die für 4.5 Std. bei 37°C induziert worden war, ein höherer Wert hatte berechnet werden können (3.3.2.2), lag die Vermutung nahe, dass eine verlängerte Inkubation bei 37°C die Degradation des Proteins beschleunigte. Aufgrund der großen Varianz des Bradford-Assays waren diese Ergebnisse jedoch nicht signifikant. Es konnte daher nur von einer möglichen Verbesserung der Ausbeute bei niedrigerer Temperatur ausgegangen werden.



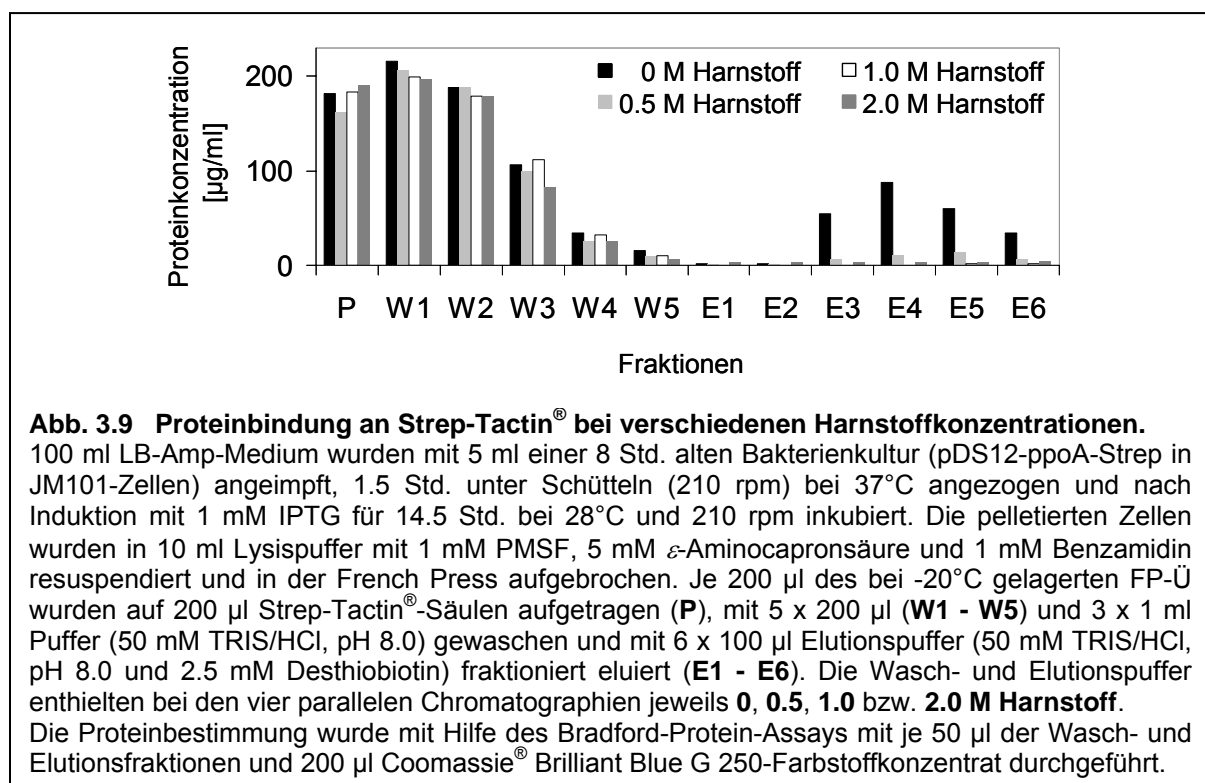
**Abb. 3.8 Einfluss der Anzuchttemperatur auf die Bindung von löslichem Protein an Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharosesäulen.**

Je 100 ml LB-Amp-Medium wurden mit 5 ml einer 8 Std. alten Bakterienkultur (pDS12-ppoA-Strep in JM101-Zellen) angeimpft, 1.5 Std. unter Schütteln (210 rpm) bei 37°C angezogen und nach Induktion mit 1 mM IPTG für 14 - 14.5 Std. bei 28°C, 30°C bzw. 37°C und 210 rpm inkubiert. Die pelletierten Zellen wurden in je 10 ml Lysispuffer mit 1 mM PMSF, 5 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure und 1 mM Benzamidin resuspendiert und in der French Press aufgebrochen. Die Überstände (FP-Ü) aus der nachfolgenden Zentrifugation wurden unmittelbar bei -20°C eingefroren. 200 µl der FP-Überstände wurden auf 200 µl Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säulen aufgetragen (P), mit 5 x 200 µl (W1 - W5) und 3 x 1 ml Puffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0) gewaschen und mit 6 x 100 µl Elutionspuffer (50 mM TRIS/HCl, pH 8.0 und 2.5 mM Desthiobiotin) fraktioniert eluiert (E1 - E6).

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Bradford-Protein-Assays mit je 50 µl der Wasch- und Elutionsfraktionen und 200 µl Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G 250-Farbstoffkonzentrat durchgeführt.

### 3.3.2.4 Einfluss von Denaturierungsmittel auf die Bindung an Strep-Tactin®

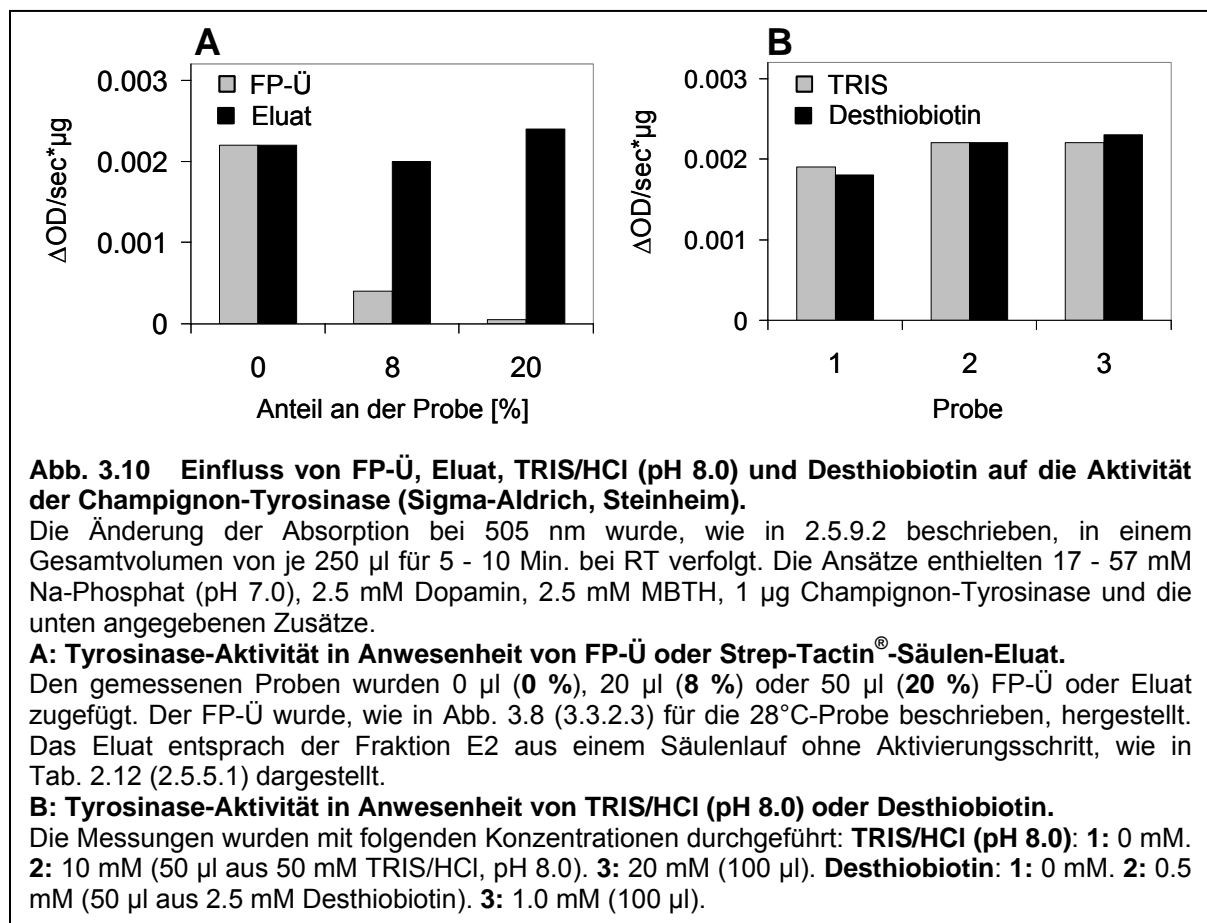
Die Bindung eines löslichen Proteins an Strep-Tactin® bot die Möglichkeit, die Stabilität dieser Bindung gegenüber Denaturierungsmitteln zu untersuchen, deren Verwendung für Experimente mit Inclusion Bodies unerlässlich war. Abb. 3.9 zeigt, dass bereits eine Konzentration von 0.5 M Harnstoff die Proteinbindung an die Säule fast vollständig verhindert. Die maximalen Konzentrationen von SDS (0.01 %) und GdnHCl (0.5 M), die laut Hersteller eingesetzt werden konnten, führten zu einem noch schlechteren Resultat. Die Verwendung des Strep-Tag/Strep-Tactin®-Systems erwies sich damit als unbrauchbar für Rückfaltungs-Versuche mit Inclusion Bodies, die in jedem Fall zunächst vollständig denaturiert werden mussten.



### 3.3.2.5 Aktivierungsversuche mit dem löslichen Protein

Das Protein, das nach der Zentrifugation im Anschluss an den Zellaufbruch über Strep-Tactin® aus dem Überstand (FP-Ü) isoliert werden konnte, war löslich und damit auch räumlich gefaltet. Ob es sich hierbei um die native oder eine falsch gefaltete und damit inaktive Struktur handelte, ließ sich außer über einen Aktivitätstest nicht feststellen. Im Folgenden wurden verschiedene Versuche zur Aktivierung des löslichen Proteins durchgeführt, die mit Hilfe von Standard-Dopamin-Kinetiken auf der Grundlage des MBTH-Assays (mit je 50 - 100 µl der Probe, 2.5.9.2) überprüft wurden.

In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Champignon-Tyrosinase (Sigma-Aldrich, Steinheim), die hier als Referenz eingesetzt wurde, bei Zugabe von 20 % FP-Ü (anteilig an der Probe) um ca. 98 % gemindert wurde (Abb. 3.10 A). Diese Lösung enthielt offenbar einen oder mehrere Inhibitoren der Tyrosinase, die jedoch über eine Strep-Tactin®-Sepharosesäule entfernt werden konnten. Das Eluat war nicht aktiv, führte aber auch zu keiner Hemmung der Champignon-Tyrosinase mehr (Abb. 3.10 A). Der Einfluss von TRIS/HCl (pH 8.0) und Desthiobiotin, den Bestandteilen des Elutionspuffers, in dem alle folgenden Kinetiken durchzuführen waren, war nicht signifikant (Abb. 3.10 B).



Für die Aktivierungsversuche des löslichen Proteins konnten daher die Eluate des mit Hilfe von Strep-Tactin®-Säulen aufgereinigten FP-Ü verwendet werden. Die Proteinkonzentration in den Eluatfraktionen wurde mit Hilfe des Bradford-Assays überprüft. Bei ausreichender Proteinausbeute wurden die Fraktionen E2 - E6 von insgesamt 6 x 100  $\mu l$  Eluat vereinigt und als Probe verwendet. Die Kinetiken wurden jeweils mit den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. In ersteren wurden die Proben durch 1  $\mu g$  Champignon-Tyrosinase ersetzt und das fehlende Volumen mit 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0) ergänzt, letztere enthielten kein Enzym. Wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben, konnte die Tyrosinase-Aktivität prinzipiell durch Zugabe von SDS oder Trypsin zu den Kinetikansätzen gesteigert werden. Die Messungen wurden daher jeweils ganz ohne Aktivatoren, mit 0.1 % SDS sowie mit 1 mg/ml Trypsin im Ansatz durchgeführt.

Da das lösliche Protein an sich nicht aktiv war und es keine Möglichkeit zur Überprüfung seiner Struktur gab, konnten nur Annahmen diesbezüglich gemacht werden. Im einfachsten Fall wäre es korrekt gefaltet gewesen, hätte jedoch ohne Kupfer als Cofaktor im Aktiven Zentrum als Apoprotein vorgelegen. Dafür hätte zum einen ein Mangelangebot während der Bakterienanzucht verantwortlich sein können. Versuche, dies mit Konzentrationen von 10, 100 und 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  bzw. 100  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  und 1 oder 10 mM Glucose im Anzuchtmedium auszugleichen, bestätigten diese Theorie jedoch nicht. Andererseits bestand die Chance eines nachträglichen Kupfereinbaus in das bereits gefaltete Apoprotein.

Die Art der Kupferzugabe als  $\text{Cu}^+$  oder  $\text{Cu}^{2+}$  ist in der Literatur umstritten (siehe hierzu auch Kapitel 4.2.4.3). Um beiden Ansichten gerecht zu werden, wurde in den Experimenten entweder Kupfersulfat ( $\text{Cu}^{2+}$ ) verwendet, oder versucht, dieses in Anwesenheit von Glucose oder Ascorbinsäure zumindest anteilig in  $\text{Cu}^+$  zu überführen. Versuche, das Kupfer durch Glutathion zu reduzieren (Ciriolo *et al.*, 1990), waren ebenfalls geplant, kamen jedoch nicht mehr zur Anwendung (siehe auch Kapitel 3.4.4). Aufgrund des bereits in Abschnitt 3.2.2.2 beschriebenen, durch Kupfersulfat hervorgerufenen Hintergrundsignals im MBTH-Assay, konnten die Proben nicht mit  $\text{CuSO}_4$  inkubiert und anschließend sofort in den Assay eingesetzt werden. Stattdessen wurde versucht, die Aktivierung des Proteins nach dem in 2.5.5.1 beschriebenen Protokoll auf Strep-Tactin<sup>®</sup>-Säulen durchzuführen. Dazu wurde der aufgetragene FP-Ü gewaschen, mit einem Puffer inkubiert, der zur Aktivierung dienen sollte (Aktivierungspuffer), erneut gewaschen, eluiert und das Eluat wie oben beschrieben in den Aktivitätstest eingesetzt. Die Durchführung erfolgte bei RT, die Inkubationen wurden mit einigen Ausnahmen jedoch entweder für 1 - 3 Std. oder ü/N bei 4°C durchgeführt, da längere Inkubationszeiten bei RT einen deutlichen Proteinverlust zur Folge hatten.

Die Zusammensetzung der verwendeten Aktivierungspuffer ist in Tab. 3.2 angegeben. Neben  $\text{CuSO}_4$ , Glucose und Ascorbinsäure wurde DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol zur Reduktion eventuell falsch geknüpfter Disulfidbrücken eingesetzt, die aufgrund der recht großen Anzahl von 15 Cysteinresten in der Aminosäuresequenz der PPO A aus Tomate nicht unwahrscheinlich waren. Um anschließend an diese Reduktion die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken zuzulassen, wurde in einigen Experimenten ein zweiter Inkubationsschritt angeschlossen, in dem mit Hilfe von DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoic Acid), Ellmann's Reagens) in unterschiedlichen Verhältnissen zum Reduktionsmittel versucht wurde, hierfür geeignete reduzierende Bedingungen einzustellen.

Die Aktivierungsversuche des löslichen Proteins blieben erfolglos. Da die Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharosesäulen für Faltungsversuche mit Inclusion Bodies nicht geeignet waren, wurde auf ein alternatives System der Affinitätschromatographie zurückgegriffen.

	<b>CuSO<sub>4</sub></b> [μM]	<b>G</b> [mM]	<b>A</b> [mM]	<b>Reduktionsmittel</b> [mM]	<b>DTNB</b> [mM]	<b>Zeit</b> [Min.]
<b>1</b>	10, 100, 1000					60, ü/N
<b>2</b>	100	1, 10				60, ü/N
<b>3</b>	10	10		0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0		100, 60
<b>4</b>	10	10		0.1, 1.0, 5.0		120
<b>5</b>	10		10	0.1, 1.0, 5.0		120
<b>6</b>	10	10		0.1, 1.0, 5.0		120, ü/N
<b>7</b>	10		10	0.1, 1.0, 5.0		120, ü/N
<b>8</b>	10			0.1, 1.0, 2.0, 3.0		200
<b>9</b>	10			1.0		180
	10			1.0	1.0, 9.0	120
<b>10</b>	10	10		1.0		180
	10	10		1.0	1.0, 9.0	120
<b>11</b>	10		10	1.0		180
	10		10	1.0	1.0, 9.0	120
<b>12</b>	10			1.0		120
	10			1.0	0.5, 1.0, 2.0	150
<b>13</b>	10	10		1.0		120
	10	10		1.0	0.5, 1.0, 2.0	150

**Tab. 3.2 Zusammensetzung der Puffer zur Aktivierung des löslichen Proteins.**

Die Aktivierungspuffer wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Chemikalien jeweils in 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0) angesetzt. **G**: Glucose. **A**: Ascorbinsäure. Als **Reduktionsmittel** wurden DTT (Experimente 3, 4, 5, 12 und 13) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (Experimente 6, 7, 8, 9, 10 und 11) verwendet. **DTNB**: 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoic Acid), Ellmann's Reagens. Die Inkubationen (**Zeit**) wurden bei 4°C durchgeführt mit Ausnahme der Versuche 1 (60 Min.), 2 (60 Min.) und 3 (100 Min.), die bei RT stattfanden. In den Experimenten 9 - 13 bestand die Aktivierung aus zwei aufeinander folgenden Schritten, die Pufferzusammensetzungen und Inkubationszeiten sind in diesen Fällen zweizeilig untereinander angegeben.

### 3.3.3 PPO A aus Tomate mit His-Tag

Über den Imidazolring von Histidinresten können Proteine an Ni<sup>2+</sup>-Ionen gebunden werden. Zur Immobilisierung von Proteinen auf einer mit Nickel beladenen NTA (Nitrilotriessigsäure)-Sephrosematrix ist eine kurze Sequenz aus sechs aufeinander folgenden Histidinen ausreichend (Conti *et al.*, 2000). Dieser so genannte His-Tag wird durch Imidazol oder einen erniedrigten pH-Wert von der Matrix verdrängt und das Protein auf diese Weise eluiert. Die große Toleranz des Nickel-Histidin-Komplexes gegenüber Denaturierungsmitteln (siehe auch Tab. 2.13 in Kapitel 2.5.5.2) konnte für Rückfaltungsexperimente mit solubilisierten Inclusion Bodies von Vorteil sein. Der His-Tag sollte genau wie der Strep-Tag am C-Terminus der rekombinanten PPO A aus Tomate eingefügt werden.

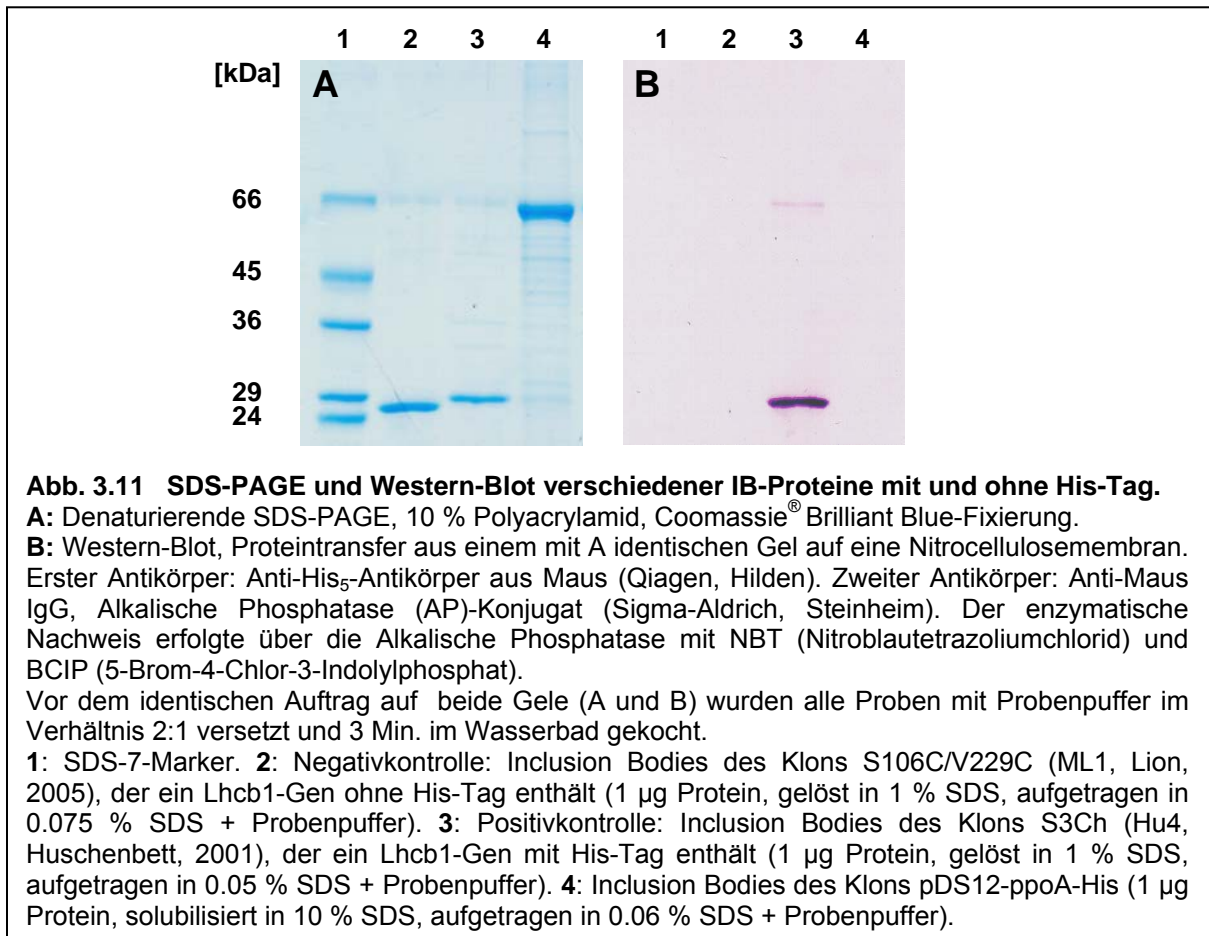
#### 3.3.3.1 Insertion des His-Tags in die Nsil-Schnittstelle

Für die Insertion der His-Tag-Sequenz in Form zweier hybridisierter Oligonukleotide in das ppoA-Gen konnte die Nsil-Schnittstelle verwendet werden, die zur Einführung des Strep-Tags erzeugt worden war (3.3.2.1). Im Anschluss an die in Kapitel 2.4.1.2 beschriebene

Herstellung des Klons pDS12-ppoA-His wurde eine Sequenzierung durchgeführt, die die einmalige Anwesenheit des His-Tag-Inserts in korrekter Orientierung am 3'-Ende des Gens bestätigte (Anhang: pau414).

### 3.3.3.2 Charakterisierung des Klons pDS12-ppoA-His

In einer SDS-PAGE (Abb. 3.11 A) zeigten Inclusion Bodies des Klons pDS12-ppoA-His (Probe 4) dasselbe Laufverhalten wie das unmodifizierte Protein (Abb. 3.5 A, 3.3.1.1).



Mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen ein Epitop aus 5 Histidin-Resten gerichtet war (Anti-His<sub>5</sub>-AK aus Maus, Qiagen, Hilden), konnte das Protein in einem anschließenden Western Blot überprüft werden (Abb. 3.11 B). Als positive Referenz dienten Inclusion Bodies eines Lhcb1-Proteins mit His-Tag (S3Ch (Hu4), Huschenbett, 2001), als Negativkontrolle wurde ein Lhcb1-Protein ohne His-Tag (S106C/V229C (ML1), Lion, 2005) eingesetzt (siehe auch Tab. 2.1, 2.4.1). Nur die Positivkontrolle lieferte ein eindeutiges Signal. Bei verlängerter Inkubation traten lediglich verstärkt schwache, unspezifisch markierte Banden auf. Da die Proben für die SDS-PAGE vollständig denaturiert worden waren, erschien es als unwahrscheinlich, dass der C-Terminus inklusive His-Tag für den Antikörper nicht zugänglich im Protein verborgen liegen und auf diese Weise nicht nachweisbar gewesen sein könnte. Im Protein aus dem Klon pDS12-ppoA-His war demnach kein His-Tag vorhanden.



Dafür gab es prinzipiell zwei mögliche Gründe. Einerseits hätte das Protein C-terminal verdaut worden sein können. Um dies zu verhindern, waren jedoch während der IB-Präparation Proteaseinhibitoren eingesetzt worden. Andererseits konnte im *ppoA*-Gen durch eine Mutation ein Stop-Codon entstanden sein, das in der Folge zu einer Verkürzung des Proteins führte. Um herauszufinden, wie der Verlust des His-Tags zustande gekommen war, wurde das *ppoA*-Gen vollständig sequenziert und mit der erwarteten Sequenz des *ppoA*-Gens aus Q08303 aus der ExPASy-Datenbank (Gasteiger *et al.*, 2003) vom SIB (Swiss Institute of Bioinformatics, [www.expasy.org](http://www.expasy.org): PPOA-LYCES, Newman *et al.*, 1993) verglichen.

Das Ergebnis dieses Alignments sowie ein Vergleich der aus den jeweiligen Open Reading Frames resultierenden Aminosäuresequenzen ist im Anhang (Sequenzierungen, pau428 - pau431) angegeben (siehe auch pDS12-*ppoA*-His im Anhang/Sequenzen). Zusätzlich zum Bereich unmittelbar vor dem Stop-Codon des Gens, der durch die Insertion des His-Tags modifiziert worden war, ergaben sich im vorliegenden Gen insgesamt 12 ausgetauschte Basen, zwei zusätzliche sowie eine fehlende Base. Die Insertion einer zusätzlichen Base (917 bp) hatte eine Leserasterverschiebung zur Folge, die jedoch durch den Verlust einer weiteren Base in einer Entfernung von nur 22 Nukleotiden wieder aufgehoben wurde. In diesem Sequenzabschnitt wurden acht andere Aminosäuren codiert als in der Originalsequenz, das Leseraster blieb jedoch erhalten. Die zweite zusätzliche, im Original fehlende Base (1774 bp) führte zu einer Verschiebung des Leserasters, durch die unmittelbar zwei Triplets weiter, 115 bp vor dem 3'-Ende des ursprünglichen ORF ein Stop-Codon entstand.

Wie diese Mutationen in das Gen gelangt waren, war nicht nachvollziehbar. Dass sie in diesem Ausmaß während der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen entstanden waren, kann als äußerst unwahrscheinlich angesehen werden. Prinzipiell hätten sie nur im Verlauf der PCR-Reaktionen auftreten können, für die jedoch aus genau diesem Grund die wenig fehleranfällige *Pwo*-DNA-Polymerase verwendet worden war (2.4.4.1). Besonders der Austausch von acht Aminosäuren im Bereich zwischen Insertion und Deletion je einer Base deutete eher auf eine gezielte Modifikation hin. Eine Kontrolle der kritischen Abschnitte der in Kopie vorliegenden Sequenzinformation zur DNA des Klons pDS12-*ppoA* ergab eine exakte Übereinstimmung mit der publizierten Sequenz Q08303, ohne Hinweis auf die gefundenen Mutationen. Einer erneuten Datenbankrecherche mit Hilfe von Nucleotide Blast (*blastn*) über das NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zur Folge, in diesem Fall auf der Grundlage des ORF aus der Sequenzierung (pau428 - pau431), handelte es sich trotzdem eindeutig um eine modifizierte Form der PPO A aus Tomate und nicht um eines der anderen bekannten Isozyme (Newman *et al.*, 1993).

Das resultierende Protein enthielt 17 ausgetauschte Aminosäuren und durch das verfrühte Stop-Codon fehlten 37 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins. Für das verkürzte Protein ließ sich mit Hilfe der ProtParam-Funktion ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) des ExPASy Proteomics Servers vom SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) eine molekulare Masse von etwa 67 kDa errechnen, die offensichtlich durch die Bande bei ca. 62 - 63 kDa in allen Gelen repräsentiert worden war (Abb. 3.5, Abb. 3.7). Die Modifikationen, die auf Ebene der DNA zur Insertion des Strep- und His-Tags vorgenommen worden waren, waren zwar im

Plasmid vorhanden, wurden jedoch nie exprimiert. Ohne die entsprechenden Peptidsequenzen war die Bindung an die verschiedenen Säulenmatrices daher nicht möglich. Bei dem 72 kDa schweren löslichen Protein, das bei der IB-Präparation des Strep-Tag-Klons mit Hilfe der Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sephrose aus dem FP-Ü isoliert worden war, handelte es sich offensichtlich, anders als angenommen, doch um ein bakterielles Protein (Abb. 3.7).

Es war anzunehmen, dass die erhebliche Veränderung der Primärsequenz des Proteins Einfluss auf die Faltung nehmen würde. Deshalb erschien es als nicht zweckmäßig, mit dem vorliegenden Gen weiterzuarbeiten. Da es zudem bei weitem zu zeitaufwendig gewesen wäre, alle Mutationen rückgängig zu machen, wurden die Arbeiten mit der PPO A aus Tomate an dieser Stelle beendet.

### 3.4 Rekombinante Tyrosinase (PPO A) aus Spinat

Der Ansatz, eine rekombinante Tyrosinase in Bakterien zu exprimieren und anschließend in ihre native Struktur zurückzufalten, um Material für eine Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse zu gewinnen, erschien weiterhin als sinnvoll. Dank der Arbeitsgruppe von R. Herrmann (Allgemeine und Molekulare Botanik, LMU, München) bot sich eine Alternative zu dem bisher verwendeten Enzym aus Tomate. Das von A. Sokolenko zur Verfügung gestellte PhxA-Gen codierte die PPO A aus Spinat und ist von Sokolenko *et al.* (1995) beschrieben worden. Die entsprechende Sequenz fand sich unter dem Eintrag X90869 in der EMBL Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute EBI (Cambridge, UK, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), das zum European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) gehört, und war identisch mit dem Index Q41388 des ExPASy Proteomics Servers ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), Gasteiger *et al.*, 2003). Bei diesem Protein handelte es sich um ein Precursor-Protein mit einer Masse von 73.1 kDa (638 AS), das mit Hilfe eines zweigeteilten Transitpeptids von 101 AS (11 kDa) analog der PPO A aus Tomate in das Thylakoidlumen transportiert wird. Aus der Primärsequenz des reifen Proteins wurde mit Hilfe der ProtParam-Funktion ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) ein Molekulargewicht von 62 kDa ermittelt. In der Originalveröffentlichung wurden 64 kDa angegeben (Sokolenko *et al.*, 1995). Ähnlich wie für die Polyphenoloxidasen aus Tomate beschrieben, wird auch bei *Spinacia oleracea* eine Genfamilie vermutet, die jedoch bisher nicht genauer charakterisiert worden ist. Parallel ist von Hind *et al.* (1995) das Gen für dieselbe PPO A aus Spinat unter dem Index P43310 veröffentlicht worden ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

#### 3.4.1 Charakterisierung des PhxA-Gens aus Spinat

Das PhxA-Gen war von der Arbeitsgruppe von R. Herrmann (Allgemeine und Molekulare Botanik, LMU, München) in die EcoRI-Schnittstelle eines pBSCKS(+)-Vektors inkloniert worden. In dieser Form wurde es zunächst in *E.coli* JM101-Zellen transformiert und vollständig sequenziert, um die exakte Sequenz und Orientierung des Gens innerhalb des Vektors ermitteln zu können. Die erhaltene Sequenz (Anhang: Sequenzen: pBSCKS(+)-PhxA) wurde mit dem bereits erwähnten Datenbank-Eintrag X90869 (EMBL Nucleotide Sequence Database, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), von Sokolenko *et al.* (1995) verglichen. Das Ergebnis dieses Alignments ist im Anhang (Sequenzierungen: pau432 - pau435) angegeben. Ein zusätzlicher Vergleich fand mit der von Hind *et al.* (1995) publizierten Sequenz P43310 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) statt. Das Ergebnis dieser Gegenüberstellung ist in Tab 3.3 zusammengefasst.

Abgesehen von vier aus insgesamt 638 bzw. 639 Aminosäuren stimmten die drei Sequenzen überein. X90869 und P43310 unterschieden sich an drei Positionen. Die Aminosäuren Asp 55, Thr 410 und Ser 539 aus dem hier vorhandenen PhxA-Gen waren jeweils in einer der beiden veröffentlichten Sequenzen vorhanden. Lediglich das Glycin 362 konnte in keiner der bekannten Sequenzen identifiziert werden.

Aminosäure-Position	Vorhandene DNA pau432 - pau435	X90869 Sokolenko <i>et al.</i> (1995)	P43310 Hind <i>et al.</i> (1995)
55	Asp	Asp	Glu
362	Gly	Arg	Arg
410	Thr	-	Thr
539	Ser	Pro	Ser

**Tab. 3.3 Vergleich der vorhandenen PhxA-Sequenz mit publizierten Sequenzen**

Angegeben sind lediglich die Aminosäuren, in denen sich die drei Sequenzen unterscheiden. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die hier vorhandene DNA, die im Anhang vollständig angegeben ist (Sequenzen: pBSCKS(+)-PhxA, Sequenzierungen: pau432 - pau435). X90869 ist in der EMBL Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute EBI (Cambridge, UK, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), das zum European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) gehört, eingetragen und ist identisch mit dem ExPASy-Eintrag Q41388. Bei P43310 handelt es sich ebenfalls um einen Index des ExPASy-Proteomics Servers ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

Eine weitere Datenbank-Recherche mit Hilfe von Protein Blast (blastp, Altschul *et al.*, 1997) über das NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ergab, dass dieser Rest, der sich innerhalb der CuB-Site des Proteins befindet, in anderen pflanzlichen Polyphenoloxidasen konserviert ist, z.B. in P43309 aus *Malus domestica* (gi:1172584, Boss *et al.*, 1995), Q06215 aus *Vicia faba* (CAA77764, gi:22029, Z11702, Cary *et al.*, 1992) oder P43311 aus *Vitis vinifera* (CAA81798, gi:510234, Z27411, Dry und Robinson, 1994). Das Arginin 362 ist offensichtlich spezifisch für Spinat. Eine Auswirkung dieses Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität war daher nicht zu erwarten. Für die überraschenden Unterschiede zwischen X90869 und dem vorhandenen Gen hatte A. Sokolenko (München) auf Anfrage keine Erklärung.

Das vorliegende Konstrukt pBSCKS(+)-PhxA hatte eine Gesamtlänge von 5089 bp (Anhang: Sequenzen: pBSCKS(+)-PhxA). Das PhxA-Gen lag in *antisense*-Orientierung (T3 → T7) in der EcoRI-Schnittstelle des pBSCKS(+)-Vektors vor (siehe auch Abb. 2.6, 2.4.1.2). Der ORF umfasste 1920 bp. Auf diese Weise umfassend kontrolliert, konnte das Plasmid für die nachfolgenden Klonierungen verwendet werden.

### 3.4.2 Expressionsversuche in JM101-*E.coli*-Zellen

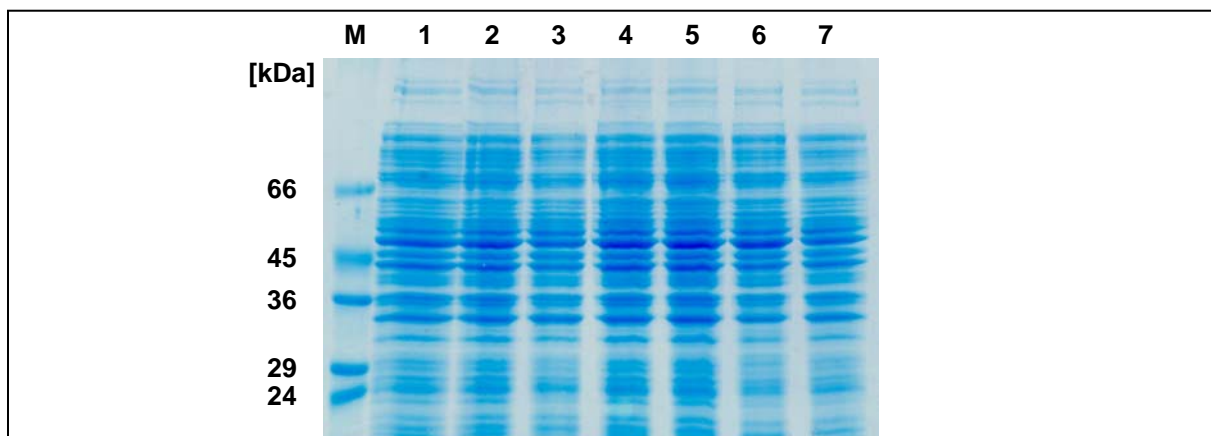
Der pBSCKS(+)-Vektor kann ausschließlich zur Klonierung verwendet werden, da ihm die entscheidenden Bestandteile für eine Proteinexpression, wie Promotoren oder Ribosomen-Bindungsstelle, fehlen. Für die Überexpression der PPO A musste das PhxA-Gen daher in einen geeigneten Expressionsvektor überführt werden.

#### 3.4.2.1 Überführung des PhxA-Gens in einen Expressionsvektor (pDS12)

Da die Überexpression des fehlerhaften PPO A-Proteins aus Tomate im pDS12-Vektor problemlos funktioniert hatte, wurde dieser Vektor auch für die Expression der Spinat-Tyrosinase ausgewählt. Zur Klonierung eignete sich ein pDS12-Derivat mit einer SphI-Schnittstelle in der Multiple Cloning Site. In der palindromischen Erkennungssequenz dieses

Restriktionsenzym ist ein Start-Methionin-Codon (ATG) enthalten. Nach Einführung einer SphI-Restriktionsschnittstelle durch Austausch einiger Basen im Bereich des Start-Codons des PhxA-Gens konnte dieses, wie in 2.4.1.2 (Abb. 2.6) beschrieben, in den pDS12-Vektor aus dem Lhcb1-Klon D7f.3 (Dilly-Hartwig *et al.*, 1998) ligiert werden und lag damit automatisch im richtigen Leseraster vor.

Nach erfolgreicher Überführung des PhxA-Gens in den pDS12-Expressionsvektor (Anhang: Sequenzierungen: pau447) wurde eine erste Überexpression in transformierten JM101-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten JM101-Zellen, die mit einem leeren pDS12-Vektor transformiert worden waren. Dieser Klon pDS12-leer, der kein Proteingen enthielt, hatte gegenüber nicht transformierten JM101-Zellen ohne Antibiotikaresistenz den Vorteil, auf Medium mit Ampicillin selektioniert und somit zu dem getesteten Klon identisch behandelt werden zu können. Zum Vergleich wurden Zellen beider Klone vor und nach der Induktion in einer SDS-PAGE analysiert. In dem mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbten Gel, das in Abb. 3.12 dargestellt ist, waren in den Zellextrakten, die nach der Induktion entnommen worden waren, keine deutlichen zusätzlichen Proteinbanden zu erkennen, d.h. es hatte keine sichtbare Überexpression stattgefunden. Um festzustellen, ob das Protein gar nicht überexprimiert worden war oder eventuell nur in so geringen Mengen, die in einem Coomassie-Gel nicht detektiert werden konnten, wurde das pDS12-PhxA-Konstrukt weiter modifiziert.



**Abb. 3.12 Erster Überexpressionsversuch mit pDS12-PhxA (PPO A aus Spinat).**

Denaturierende SDS-PAGE, 10 % Polyacrylamidgel, Coomassie® Brilliant Blue-Fixierung.

Je 5 ml LB-Amp-Medium wurden mit 500 µl einer ü/N-Kultur der Klone pDS12-PhxA (J) und pDS12-leer (pDS12-Vektor ohne Proteingen) angeimpft, 75 Min. bei 37°C im Kulturread inkubiert, mit 1 mM IPTG induziert und weitere 4 Std. inkubiert. Je 100 µl der ü/N-Kulturen und 2 x 100 µl der induzierten Bakterienkulturen wurden 3 Min. bei RT und 13000 rpm pelletiert. Die Zellen aus den ü/N-Kulturen wurden in 50 µl Aqua dest. und 25 µl Probenpuffer aufgenommen, die induzierten Zellen wurden in 20 µl Aqua dest. und 10 µl Probenpuffer resuspendiert. Die so vorbereiteten Proben wurden 3 Min. im Wasserbad (100°C) gekocht und je 15 µl auf das Gel aufgetragen.

**M:** SDS-7-Marker. **1/2:** Negativkontrolle: leerer pDS12-Vektor, induziert. **3:** pDS12-PhxA (J), ü/N-Kultur. **4/5:** pDS12-PhxA (J), induziert. **6:** Überstand nach der French Press (FP-Ü) aus einer Präparation nach dem Standard-IB-Protokoll mit dem Klon pDS12-PhxA (J). 5 µl FP-Ü wurden mit Aqua dest. und Probenpuffer im Verhältnis 1:1:1 versetzt. **7:** leerer pDS12-Vektor, ü/N-Kultur.

### 3.4.2.2 Insertion eines His-Tags und Austausch einer Aminosäure

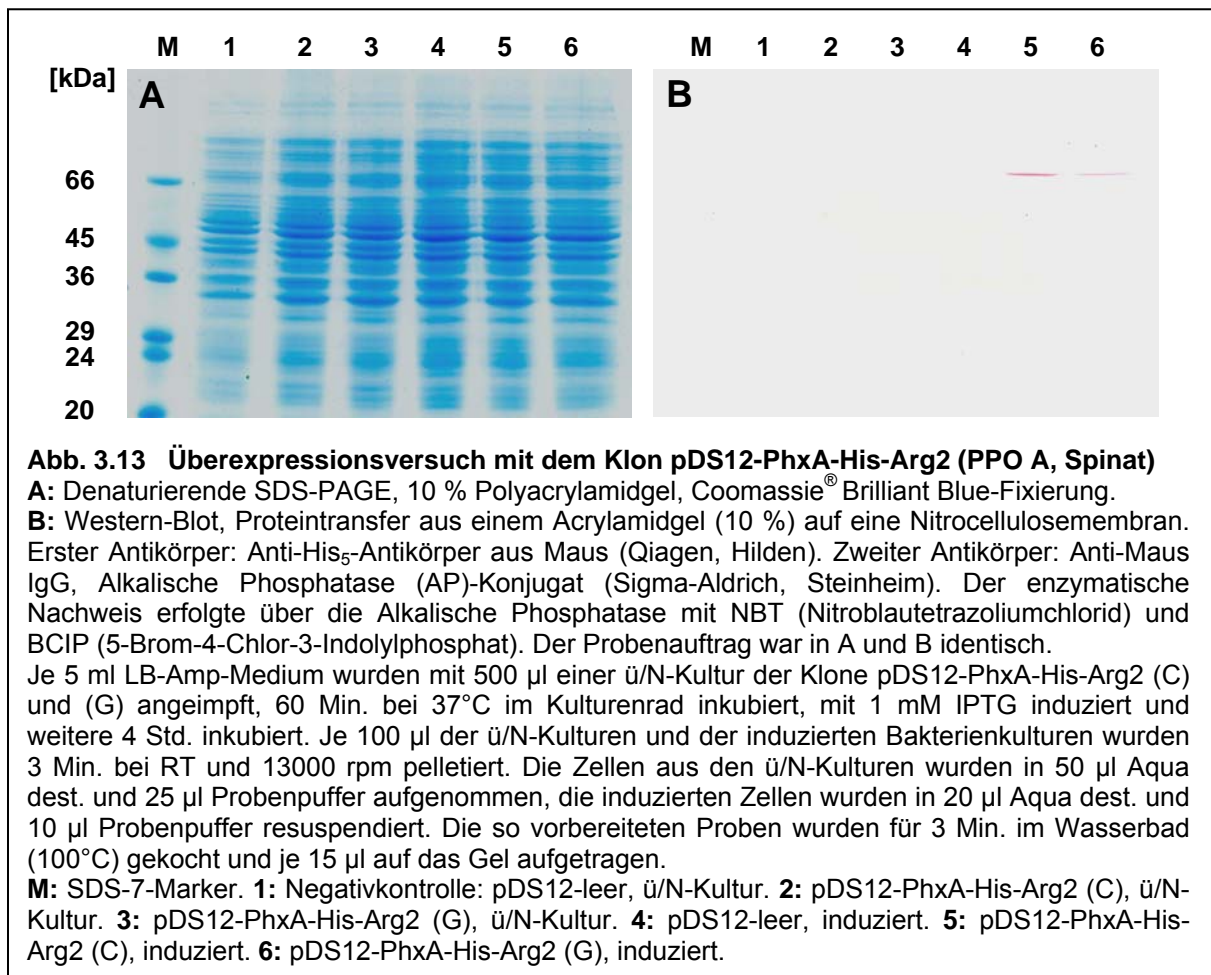
Zur Aufreinigung und Rückfaltung der rekombinanten PPO A aus Spinat über Affinitätschromatographie mit Hilfe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose-Säulen sollte dem Protein ein His<sub>6</sub>-Tag angehängt werden. Dies bot zudem die Möglichkeit, das Protein im Anschluss an einen Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe eines Antikörpers zu markieren, der gegen ein Peptid aus fünf Histidin-Resten gerichtet war. Mit Hilfe dieser äußerst sensitiven Markierungsmethode konnten sehr viel geringere Proteinmengen detektiert werden als mit der Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels. Zur Detektion und Abtrennung der rekombinanten Spinat-Tyrosinase aus der Menge bakterieller Proteine wurde daher an dieser Stelle ein His-Tag in das Protein eingeführt, der zugleich für eine spätere Immobilisierung auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosematrix verwendet werden konnte. Für die Platzierung des His-Tags wurde, wie in Kapitel 3.3.2.1 erläutert, der C-Terminus des Proteins ausgewählt. Zur Insertion der hybridisierten Oligonukleotide, die die sechs Histidin-Codons enthielten, wurde dort durch eine ortsgerichtete Mutagenese eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Apal geschaffen (siehe auch 2.4.1.2, Abb. 2.7). Das gewünschte Konstrukt pDS12-PhxA-His wurde in einer Sequenzierung (pau457, Anhang) bestätigt. Da diese Modifikation zwar die Detektion erleichterte, jedoch keinen Einfluss auf die Expressionseffizienz des rekombinanten Proteins hatte, wurde vor einem erneuten Überexpressionsversuch gleichzeitig eine weitere Veränderung an dem Gen vorgenommen.

Für die Überexpression von Proteinen können die unmittelbar auf das Start-Methionin folgenden Aminosäuren von entscheidender Bedeutung sein. Jeder Organismus zeichnet sich durch eine spezifische Häufigkeitsverteilung in der Verwendung der 61 Aminosäure-Codons aus. Diese so genannte Codon Usage kann bei eu- und prokaryotischen Organismen sehr unterschiedlich sein. Bei dem Versuch, ein pflanzliches Protein in Bakterien zu exprimieren, kann es daher passieren, dass die Proteinsynthese an solchen Codons scheitert, für die in den Prokaryoten nur sehr wenige passende tRNA-Moleküle vorhanden sind, da sie in diesem Organismus selbst nur selten verwendet werden. Dabei sind besonders die ersten Basentriplets kritisch, die unmittelbar nach der Initiation für die Translation benötigt werden.

In vielen Lhcb1-Derivaten, die in pDS12-Vektoren erfolgreich überexprimiert werden konnten (Paulsen *et al.*, 1990), folgt auf das Start-Methionin der Multiple Cloning Site (MCS) ein Argininrest. Dieses vektoreigene Start-Codon ist unmittelbar am Beginn der MCS lokalisiert. Je nachdem, in welche der darauf folgenden Restriktionsschnittstellen das Proteingen einkloniert wird, sind daher einige Aminosäurereste mehr oder weniger zusätzlich am N-Terminus des späteren Genproduktes vorhanden, da die Transkription nicht erst mit dem Startsignal des Gens, sondern bereits mit dem des Vektors beginnt. Im pDS12-PhxA-Konstrukt war das nicht der Fall, da das PhxA-Gen über die SphI-Schnittstelle unmittelbar in das **ATG** der MCS inseriert worden war. An dieses schloss sich hier ein Codon (cca) für Prolin an, für das von Hénaut und Danchin (1996) ([www.biology.ualberta.ca/old-site/pilgrim.hp//links/codontable.html](http://www.biology.ualberta.ca/old-site/pilgrim.hp//links/codontable.html)) eine Codon Usage in *E.coli* von 15 % angegeben wird. Es wurde daher im Verlauf einer weiteren Mutagenese gegen ein Arginin-Codon (cgt) mit einer Verwendungshäufigkeit von 64 % (Hénaut und Danchin, 1996) ausgetauscht. Nachdem in dem Plasmid pDS12-PhxA-His-Arg2 der gewünschte Basenaustausch nachgewiesen werden konnte (Anhang: Sequenzierungen: pau469), wurde das PhxA-His-

Arg2-Gen zudem vollständig sequenziert, um ungewollte Mutationsereignisse während der bis dahin vorgenommenen Klonierungen auszuschließen (Anhang: Sequenzierungen: pau471 - pau474 und Sequenzen: pDS12-PhxA-His-Arg2).

Mit dem Konstrukt pDS12-PhxA-His-Arg2 wurde die Überexpression in JM101-*E.coli*-Zellen erneut unter Standardbedingungen induziert. Abb. 3.13 zeigt das Ergebnis dieses Experiments.



Nach Auftrennung der Proteine aus den Bakterienzellen in einer SDS-PAGE zeigte die Coomassiefärbung des Acrylamidgels (Abb. 3.13 A) keine zusätzlichen Banden eines überexprimierten Proteins in den induzierten Proben. Der Austausch des Prolins an Aminosäureposition 2 gegen einen Argininrest hatte demnach keine Auswirkung auf die Überexpression. Im Anschluss an einen Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran konnten jedoch in den induzierten Zellproben schwache Proteinbanden mit dem Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper markiert werden (Abb. 3.13 B). In der Effizienz nicht ausreichend, hatte eine dennoch eindeutig detektierbare Überexpression des Proteins stattgefunden. Im folgenden Abschnitt wird der Versuch beschrieben, dieses Ergebnis durch eine weitere Veränderung des DNA-Abschnitts unmittelbar nach dem Start-Codon zu verbessern.

### 3.4.2.3 Insertion eines Peptids aus der PPO A (Tomate) in das Spinat-Protein

Das fehlerhafte ppoA-Gen aus Tomate hatte im pDS12-Vektor in JM101-Zellen problemlos überexprimiert werden können (3.3.1.1 und 3.3.2.2). Die Insertion des Gens in die BamHI-Schnittstelle der MCS führte aufgrund des vektoreigenen Start-Codons in diesem Konstrukt zu einer N-terminalen Verlängerung des rekombinanten Proteins um sieben Aminosäuren. Es war durchaus denkbar, dass der entsprechende DNA-Abschnitt die Überexpression begünstigte. Dass der Grund dafür jedoch nicht in der statistischen Verwendungshäufigkeit der beteiligten Basentriplets in *E.coli*-Bakterien zu finden war, zeigt Tab. 3.4. Hier sind die ersten acht Aminosäuren ab dem Startpunkt der Transkription aus dem Spinat-PPO A-Konstrukt (pDS12-PhxA-His-Arg2) denen aus dem Tomaten-PPO A-Klon (pDS12-ppoA) gegenüber gestellt.

Aminosäure-Position	pDS12-PhxA-His-Arg2 (Spinat)		Codon Usage [%]	pDS12-ppoA (Tomate)		Codon Usage [%]
1	<b>ATG</b>	<b>Met</b>	100	ATG	Met	100
2	CGT	Arg	64	AGG	Arg	<b>0.29</b>
3	ACT	Thr	29	ATC	Ile	66
4	CTC	Leu	8	CCC	Pro	<b>1.6</b>
5	TCT	Ser	32	CTA	Leu	<b>0.8</b>
6	TCT	Ser	32	GCA	Ala	24
7	CCG	Pro	72	ATA	Ile	<b>0.6</b>
8	ACC	Thr	54	<b>ATG</b>	<b>Met</b>	100

**Tab. 3.4 Vergleich der *E.coli* Codon Usage für die ersten 8 Aminosäuren der Expressions-Produkte aus den PPO A-Klonen pDS12-PhxA-His-Arg2 (Spinat) und pDS12-ppoA (Tomate)**  
Die Werte für die Codon Usage in *E.coli* wurden einer Tabelle von Hénaut und Danchin (1996) ([www.biology.ualberta.ca/old-site/pilgrim.hp//links/codontable.html](http://www.biology.ualberta.ca/old-site/pilgrim.hp//links/codontable.html)) entnommen. Das Start-Codon des PPO A-Gens ist jeweils hervorgehoben.

Für vier dieser Basentriplets des Tomaten-Konstruktes wurden sehr geringe Werte angegeben. Drei davon lagen unter Eins und konnten als kritisch angesehen werden. Es war äußerst erstaunlich, dass die Expression des ohnehin fehlerreichen ppoA-Gens unter diesen Bedingungen so gut funktioniert hatte (Abb. 3.5, 3.3.1.1). Dagegen erschien die DNA-Struktur des Spinat-PPO A-Gens im entsprechenden Bereich als absolut unkritisch.

Für den Fall, dass dieser DNA-Abschnitt die Überexpression auf andere Weise beeinflussen könnte, wurde dennoch die Auswirkung der Insertion einer Sequenz, die den ersten sieben Aminosäuren aus dem Tomaten-Konstrukt entsprach, untersucht. Diese wurde in Form zweier hybridisierter Oligonukleotide in die SphI-Schnittstelle im PhxA-Gen eingefügt (siehe auch 2.4.1.2, Abb. 2.8). Die Transformanten aus dieser Klonierung wurden mittels PCR mit einem der inserierten Oligonukleotide (PhxA-ppoA+) als Primer und einem passenden Gegenprimer (PhxA-Bsu36I+) überprüft. Die Überexpression der positiven Klone (pDS12-PhxA-His-Arg2-ppoA) erfolgte unter Standardbedingungen (siehe Tab. 3.5, 3.4.2.4) und wurde, wie in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben, anhand von SDS-PAGE und Western Blot kontrolliert. Bei drei von fünf pDS12-PhxA-His-Arg2-ppoA-Klonen konnten mit dem Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper keine spezifischen Proteinbanden markiert werden. Dieses Ergebnis war nach dem in Tab. 3.4 gezeigten Vergleich nicht unerwartet.



Das PhxA-His-Arg2-Gen war nach den ersten Klonierungen komplett sequenziert worden (Anhang: Sequenzierungen: pau471 - pau474, 3.4.2.2), nicht jedoch der pDS12-Vektor. Da bei PCR-Reaktionen prinzipiell immer die Gefahr von Mutationen besteht, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Bereiche des Plasmids Schaden genommen hatten, die für die Replikation oder Proteinexpression essentiell waren. Um auch diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde das PhxA-Gen aus dem pDS12-PhxA-His-Arg2-Konstrukt ausgeschnitten (SphI/PstI) und erneut in den pDS12-Vektor aus dem LHCP-Klon D7f.3 einligiert (siehe auch Abb. 2.6, 2.4.1.2). Hieraus ergab sich der Klon pDS12(NEU)-PhxA-His-Arg2, jedoch keine Verbesserung der Überexpressionseffizienz.

Es konnte daher angenommen werden, dass das Plasmid nicht beschädigt und die Ursache für den geringen Expressionserfolg nicht zwingend in der Genstruktur zu finden war. Aus diesem Grund wurde im Folgenden versucht, durch Variation der Bedingungen, die zur Expression gewählt worden waren, deren Effizienz zu verbessern.

#### **3.4.2.4 Versuche zur Verbesserung der Überexpression**

Die Expressionsbedingungen sind für den Erfolg einer Überexpression von entscheidender Bedeutung und müssen für jedes rekombinante Protein neu angepasst werden. Sie können sich von den optimalen Wachstumsbedingungen der Bakterien stark unterscheiden, sofern das rekombinante Protein z.B. toxisch für den prokaryotischen Organismus ist. In einem solchen Fall wachsen die Bakterien entweder sehr schlecht oder es kommt zu einem schnellen Abbau des schädlichen Proteins. Eine bewusste Verlangsamung der Zellvermehrung durch gezielte Einstellung nicht optimaler Wachstumsbedingungen kann dann trotzdem zu einer geringfügigen Akkumulation des toxischen Proteins führen, da auf diese Weise dessen Menge reguliert und die negative Auswirkung auf den bakteriellen Organismus eingeschränkt wird.

In allen bis dahin durchgeführten Überexpressionsversuchen gab es keinen Hinweis auf eine Toxizität der rekombinanten Tyrosinase. Das Bakterienwachstum war im Vergleich zu den Kulturen, in denen z.B. die PPO A aus Tomate erfolgreich überexprimiert worden war (3.3.1.1 und 3.3.2.2), unverändert gut. Es wurde daher versucht, die Überexpression der Spinat-PPO A bei gleich bleibendem Wachstum zu verbessern. Zu den optimierbaren Parametern zählen das Anzuchtmedium, die Glucosekonzentration darin, sowie das Animpfverhältnis, d.h. das Volumenverhältnis des Mediums zur Vorkultur und die damit korrelierende Dauer der Inkubation der frisch überimpften Kultur bis zur Induktion. Standardmäßig wird die Überexpression induziert, sobald die Bakterien in die exponentielle Wachstumsphase übergehen, um in kurzer Zeit möglichst viel Protein zu erhalten. Ebenso kritisch sind die Konzentration des Induktors (IPTG = Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid) und die Induktionsdauer. Bei verlangsamtem Wachstum muss diese natürlich verlängert werden, andererseits kann es passieren, dass für den Wirtsorganismus nachteilige Proteine frühzeitig abgebaut werden und bei zu langer Induktion bereits nicht mehr isolierbar sind. Die Temperatur und Belüftung, d.h. die essentielle Sauerstoffzufuhr, sind zusätzliche Variablen. Da es sich weitgehend um sterile Kulturen handelte, wurde letztere durch die Größe des Gefäßes, also das Verhältnis des Luftvolumens zum Kulturvolumen, das im optimalen Fall mindestens bei 3 : 1 lag, und die Rotationsgeschwindigkeit des Inkubationsschüttlers eingestellt.

Zur Verbesserung der Überexpression der Spinat-Tyrosinase aus dem Klon pDS12-PhxA-His-Arg2 in JM101-*E.coli*-Zellen wurden verschiedene Medien, Glucose- und IPTG-Konzentrationen, Induktionszeiten und Temperaturen ausprobiert. In Tab. 3.5 sind die durchgeführten Variationen den bisher verwendeten Standardbedingungen gegenüber gestellt. In jeder Versuchsreihe wurde jeweils nur ein Faktor verändert, während alle übrigen Bedingungen, sofern nicht anders angegeben, dem Standard entsprachen.

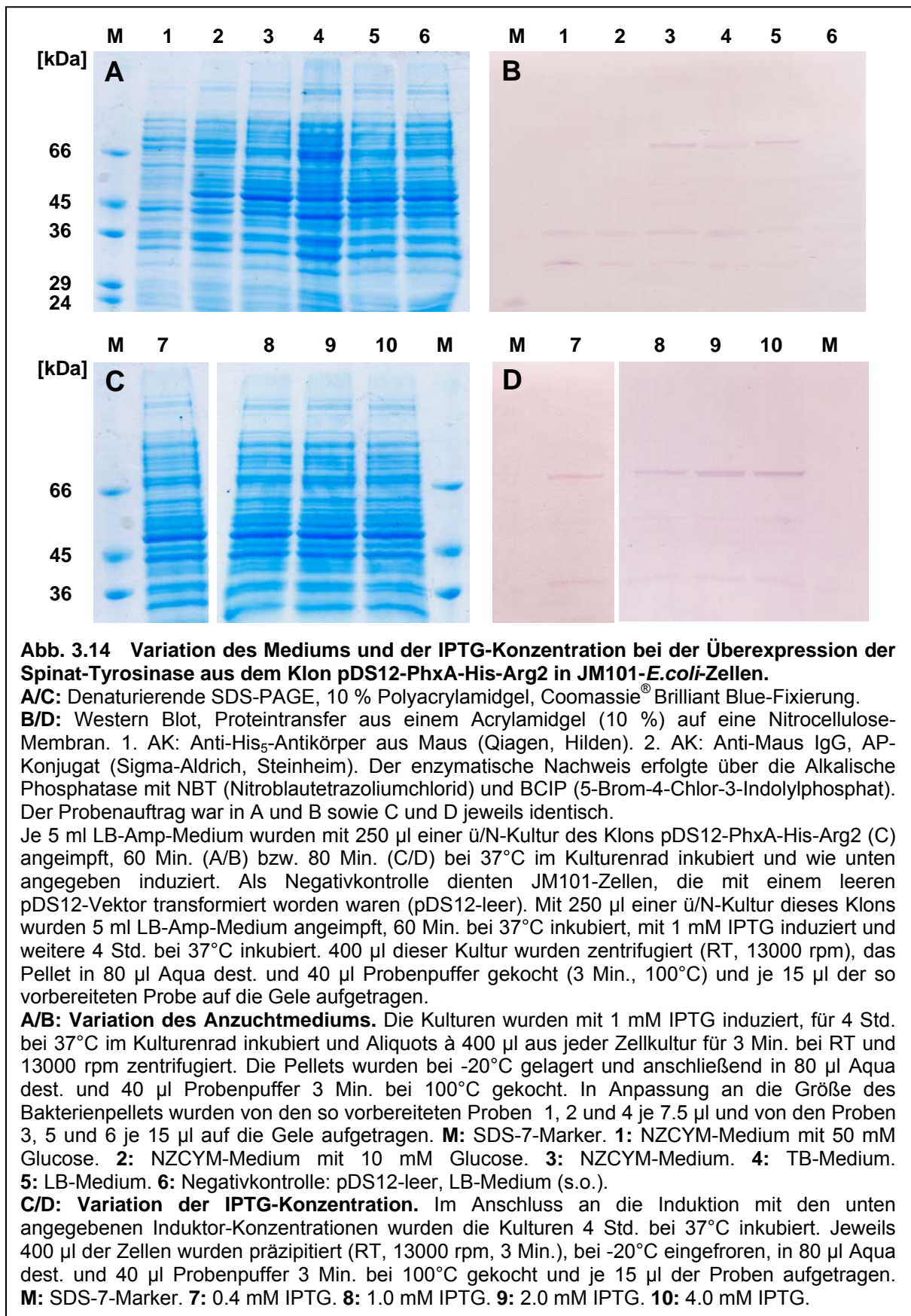
	Standardbedingungen	Variationen
<b>Medium</b>	LB	LB, TB, NZCYM
<b>Glucosekonzentration [mM]</b>	-	0, 10, 50
Animpfverhältnis (Vorkultur : Medium)	1 : 20	1 : 20
Zeit bis zur Induktion [Min.]	60 - 90	60 - 80
<b>IPTG-Konzentration [mM]</b>	1.0	0.4, 1.0, 2.0, 4.0
<b>Induktionsdauer [Std.]</b>	4 – 4.5	1, 2, 4, 6, 8
<b>Temperatur [°C]</b>	37	28, 37, 42
Belüftung (Volumenverhältnis Luft : Medium)	3 : 1	3 : 1

**Tab. 3.5 Parameter zur Variation der Überexpressionsbedingungen**

Die während der Versuche veränderten Parameter sind hervorgehoben. Für die Überexpressions-Tests wurden je 5 ml Medium in 20 ml Reagenzgläsern mit 100 µg/ml Ampicillin und 250 µl einer LB-Amp-ü/N-Kultur (2.3.3) des Klons pDS12-PhxA-His-Arg2 (C) versetzt und vor der Induktion für 60 - 80 Min. bis zu einer  $OD_{600nm} \approx 0.5 - 0.9$  im Kulturreaktor bei 37°C inkubiert. Diese Zeit war aus technischen Gründen weder im Standardansatz noch in der Variation konstant. Für die Variation der Temperatur wurden die Kulturen aufgrund des Ergebnisses aus dem Experiment zur IPTG-Konzentration mit 2 mM IPTG induziert und die Temperatur erst ab dem Zeitpunkt der Induktion verändert. Die Zellen aus 100 - 400 µl Kulturvolumen wurden bei RT und 13000 rpm pelletiert und das Präzipitat bis zur Analyse über SDS-PAGE (Coomassiefärbung) und Western Blot (Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper aus Maus / Anti-Maus IgG und Nachweis des AP-Konjugats über die Reaktion mit NBT und BCIP) bei -20°C eingefroren.

Die Überexpressionsversuche wurden mit Hilfe denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen und anschließender Western Blots (Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper) ausgewertet. Hierzu wurden den induzierten Bakterienkulturen unmittelbar nach Beendigung der Inkubation homogene Aliquots entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation präzipitiert und nach Entfernung des Mediums bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Größe der Zellpräzipitate aus den einzelnen Ansätzen unterschied sich z.T. deutlich. Sehr reichhaltige Medien, wie z.B. das TB-Medium (2.3.2), oder die Zugabe von Glucose zum NZCYM-Medium boten den Bakterien besonders gute Wachstumsbedingungen, die eine stärkere Zellvermehrung zur Folge hatten. Wie nicht anders zu erwarten, nahm die Zellmasse auch im Verlauf einer verlängerten Induktionszeit zu. Ein verbessertes Wachstum korreliert nicht zwangsläufig mit einer effektiveren Überexpression. Um die Menge des rekombinanten Proteins gegenüber den bakteriellen Proteinen abschätzen zu können, wurde versucht, ungefähr vergleichbare Gesamtproteinmengen auf die Gele aufzutragen. Dazu wurde die Zellmasse in den Bakterienpellets abgeschätzt und das Volumen der für die Gele vorbereiteten Proben jeweils angepasst. Als Negativkontrollen dienten in allen Versuchen Kulturen des Klons pDS12-leer (pDS12-Vektor ohne Proteingen in JM101-Zellen), die unter möglichst vergleichbaren Bedingungen induziert und weiter behandelt worden waren.

In Abb. 3.14 A/B sind die Ergebnisse der Überexpressionsversuche mit unterschiedlichen Medien gezeigt.



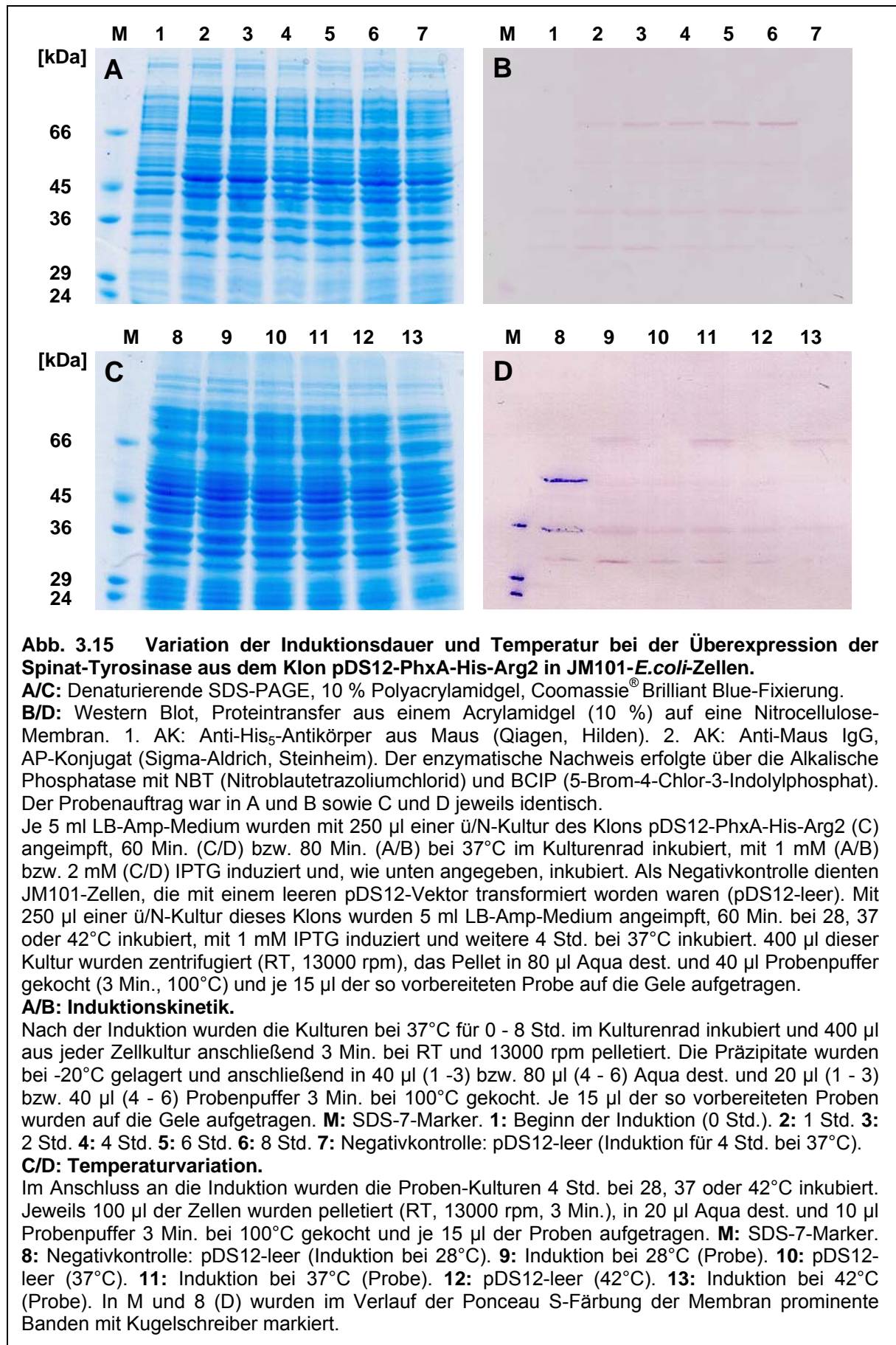
Die Proben 1, 2 und 4 enthielten im Vergleich zu den übrigen Proben (3, 5 und 6) nur das halbe Zellkulturvolumen, da die Bakterien hier sehr viel besser gewachsen waren. Bei etwa vergleichbaren Gesamtproteinmengen ließen sich in der Coomassiefärbung (A) keine prominenten Proteinbanden mit einer Masse um 66 kDa erkennen. Im Western Blot (B) konnten mit Hilfe des Anti-His<sub>5</sub>-AK in den Proben 3 - 5 schwache Proteinbanden > 66 kDa markiert werden. Eine exakte Bestimmung des Molekulargewichtes war mangels eines geeigneten Markers nicht möglich. Mit Ponceau S wurden bei der Kontrolle des Proteintransfers auf die Membran nur einige niedermolekulare Banden des SDS-7-Markers angefärbt, sodass die hier angebrachten Markierungen (siehe z.B. Abb. 3.15 D) nicht für eine Auswertung der höhermolekularen Banden ausreichten. Die gleichermaßen schwach markierten Banden > 66 kDa (3 - 5) wurden jedoch als eindeutige Signale im Bereich des erwarteten Molekulargewichts identifiziert, da sie deutlich früher auftraten als die übrigen Signale, die auch in allen anderen Blots (Abb. 3.15 und Abb. 3.16) immer als unspezifische Markierungen zu erkennen waren. Durch die Verwendung von TB- (4) oder NZCYM-Medium (3) konnte die Expression im Vergleich zum LB-Medium (5) also nicht verbessert werden. Die Zugabe von Glucose zum NZCYM-Medium verhinderte eine Überexpression sogar vollständig (1 und 2).

Eine Veränderung der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration zwischen 0.4 mM und 4.0 mM hatte ebenfalls keinen deutlichen Effekt auf die Überexpression der Spinat-Tyrosinase (Abb. 3.14 C/D). Mit 2 mM Induktor (9) wurde das beste Ergebnis erzielt, das sich jedoch nur minimal von den übrigen Ansätzen (7, 8 und 10) unterschied.

In Abb. 3.15 A/B sind die Proben aus der Induktionskinetik gezeigt. Von den 0 - 2 Std. induzierten Zellkulturen (Proben 1 - 3) wurde im Vergleich zu den länger (4 - 8 Std.) inkubierten Kulturen (Proben 4 - 6) das doppelte Volumen auf die Gele aufgetragen, um eine äquivalente Gesamtproteinmenge zu erzielen, die sich in der Coomassiefärbung (A) bestätigt fand. Der Western Blot (B) zeigt eine leichte, kontinuierliche Zunahme der Menge an überexprimiertem Protein mit der Inkubationszeit (1 → 6). Dennoch ist auch nach achtstündiger Inkubation (6) noch keine Menge der rekombinanten Tyrosinase gebildet worden, die auch nur annähernd für eine Isolation des Proteins im präparativen Maßstab [mg] ausreichend gewesen wäre.

Für Abb. 3.15 C/D wurden die bei unterschiedlichen Temperaturen inkubierten Zellkulturen zusammen mit den korrespondierenden Negativkontrollen (pDS12-leer bei entsprechender Temperatur) aufgetragen. Sowohl eine Temperaturerniedrigung auf 28°C (9) als auch eine Erhöhung der Temperatur auf 42°C (13) hatten gegenüber 37°C (11) eine weitere Verschlechterung der Überexpression zur Folge.

In keinem der Optimierungsversuche konnte eine deutliche Verbesserung der Proteinexpression festgestellt werden. Da von der rekombinanten Expression die Herstellung großer Proteinmengen erwartet wurde, waren die erzielten minimalen Erfolge nicht ausreichend. Eine letzte Möglichkeit zur Anreicherung des Proteins nach dessen Überexpression in JM101-Zellen bot die Konzentrierung der Probe über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose-Säulen, an die das rekombinante Protein über den inserierten His-Tag binden sollte.



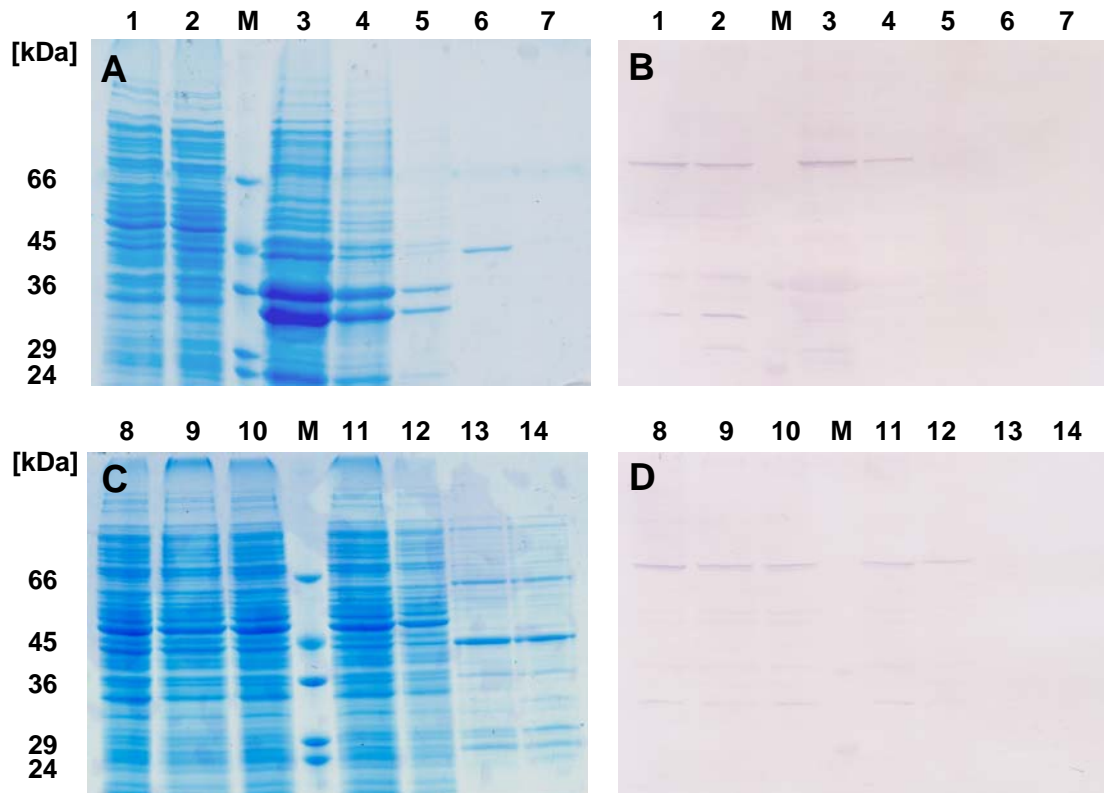
### 3.4.2.5 Versuch zur Bindung von Inclusion Bodies auf Ni<sup>2+</sup>-Säulen

Für dieses Experiment wurde mit den Klonen pDS12-PhxA-His-Arg2 und pDS12-leer als Negativkontrolle eine Überexpression unter Standardbedingungen durchgeführt. Im Anschluss an Lyse (DNaseI und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2.5.1.3) und Aufbruch der Zellen, in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren mit Hilfe einer Zellpresse, wurde die Suspension zentrifugiert und damit die lösliche Proteinfraction (FP-Ü) von Zelltrümmern und Inclusion Bodies im Präzipitat (FP-P) getrennt. Der FP-Ü wurde direkt auf die mit 10 mM TRIS/HCl (pH 7.5) und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol äquilibrierte Säule aufgetragen. Das Pellet wurde in 8 M Harnstoff und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gelöst und die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose vor dem Auftrag mit derselben Denaturierungslösung vorbereitet. Nach mehreren Wasch- und Elutionsschritten wurden Aliquots der Proben und der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

In Abb. 3.16 lassen sich in den Blots schwache Banden sowohl im Pellet (B, 1 - 4) als auch im Überstand (D, 8 - 12) nach der French Press erkennen. Diese Markierungen waren in den Kontrollen mit pDS12-leer nicht zu sehen (nicht gezeigt). Es wurden demnach in beiden Proben spezifisch His-Tag-Proteine nachgewiesen. Die Bandenmuster in der Coomassiefärbung der Kontroll- und Proben-Gele waren dagegen identisch. Hier zeigten sich in den Elutionsfraktionen des FP-Ü-Experimentes (C, 13/14) zwei deutlich angereicherte Proteinbanden zwischen 45 und 66 kDa, bei denen es sich, dem korrespondierenden Blot zufolge, jedoch nicht um Proteine mit His-Tag, sondern um bakterielle Proteine handelte, wie die Negativkontrolle bestätigte, in der die gleichen Banden auftraten. Es ließen sich also keine Proteine mit His-Tag in detektierbaren Mengen von den Säulen eluieren. Da die Fraktionen, in denen die Ni<sup>2+</sup>-Ionen zur Regeneration der Sepharose von der Säule gewaschen wurden, nicht auf das Gel aufgetragen worden waren, konnte hier nicht geklärt werden, ob das Protein gar nicht erst gebunden hatte oder nur nicht durch 0.3 M Imidazol im Elutionspuffer verdrängt worden war.

Aufgrund von Parallelversuchen zur Bindung von Lhcb1-Inclusion Bodies (Klon C3.2h, Lhcb1-Protein mit C-terminalem His-Tag; Kosemund, 1999) auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen konnte ausgeschlossen werden, dass die gewählten Versuchsbedingungen die Adsorption von His-Tag-Proteinen generell verhinderten. Die Lhcb1-Proteine konnten sowohl in 8 M Harnstoff ( $\pm$  10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) als auch in 1.6 M Harnstoff, 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 80 % FP-Ü (aus der Tyrosinase-IB-Präparation) an die Sepharosematrix gebunden werden. Dabei kam es zwar ebenfalls zu einem Proteinverlust in den Waschfraktionen, jedoch ebenso zu einer deutlich nachweisbaren Proteinmenge im Eluat. Weder eine hohe Konzentration an Denaturierungsmittel noch die Anwesenheit der übrigen im FP-Ü enthaltenen Substanzen wirkte sich demnach störend aus.

Weitere Bemühungen zur Bindung und Konzentrierung der Spinat-Tyrosinase auf Affinitätschromatographiesäulen erschienen in Anbetracht der ohnehin äußerst geringen Proteinmengen, die im Verlauf der rekombinanten Expression bis dahin gewonnen worden waren, nicht als sinnvoll. Daher wurde als nächstes ein alternatives Expressionssystem eingesetzt, um zunächst deutlich gesteigerte Proteinausbeuten zu erzielen.



**Abb. 3.16 Proteinbindung auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose (pDS12-PhxA-His-Arg2).**

**A/C:** Denaturierende SDS-PAGE, 10 % Polyacrylamidgel, Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue-Fixierung.

**B/D:** Western Blot, Proteintransfer aus einem Acrylamidgel (10 %) auf eine Nitrocellulosemembran. 1. AK: Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper aus Maus (Qiagen, Hilden). 2. AK: Anti-Maus IgG, AP-Konjugat (Sigma-Aldrich, Steinheim). Der Nachweis erfolgte über die AP mit NBT und BCIP. Der Probenauftrag war in A und B sowie C und D jeweils identisch.

Je 100 ml LB-Amp-Medium wurden mit 5 ml einer 14 Std. alten Bakterienkultur (pDS12-PhxA-His-Arg2 bzw. pDS12-leer (Negativkontrolle) in JM101-Zellen) angeimpft, 70 Min. bei 37°C und 210 rpm angezogen und nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4.5 Std. bei 37°C inkubiert. Aliquots à 100 µl wurden entnommen, zentrifugiert (3 Min., 13000 rpm, RT), das Präzipitat in 20 µl Aqua dest. und 10 µl Probenpuffer aufgenommen und davon je 15 µl als Probe 1 und 8 auf die Gele aufgetragen. Die Zellen aus der übrigen Zellkultur wurden pelletiert, in 25 ml Lysispuffer (3.7 µg/ml DNaseI, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 5 mM ε-Aminocaproinsäure, 1 mM Benzamidin) resuspendiert und mit Hilfe einer Zellpresse aufgebrochen. Das Präzipitat aus der nachfolgenden Zentrifugation (FP-P) wurde in 500 µl 8 M Harnstoff und 10 mM β-Mercaptoethanol gelöst (50°C). 400 µl davon wurden auf eine 400 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule aufgetragen, die zuvor mit 8 M Harnstoff und 10 mM β-Mercaptoethanol äquilibriert worden war. 20 ml des Überstandes (FP-Ü) wurden ohne Vorbehandlung auf eine mit 10 mM TRIS/HCl (pH 7.5) und 10 mM β-Mercaptoethanol äquilibrierte Säule (1 ml Volumen) aufgetragen. In beiden Fällen folgte nach dem Probenauftrag ein 30minütige Inkubation, 5 Waschschrte (W1 - W5) à 1 ml (10 mM TRIS/HCl, pH 7.5) und zwei Elutionsschritte (E1 und E2) mit je 1 ml Elutionspuffer (10 mM TRIS/HCl, pH 7.5 und 0.3 M Imidazol), die voneinander durch eine weitere Inkubation für 30 Min. getrennt waren. Je 50 µl der Fraktionen wurden mit 25 µl Probenpuffer 3 Min. bei 100°C gekocht (Ausnahme: für Probe 2 wurden die doppelten Volumina eingesetzt) und je 25 dieser Ansätze auf die Gele aufgetragen.

**A/B: Auftrag des Pellets (FP-P) auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule.**

**M:** SDS-7-Marker. 1: Zell-Aliquot nach der Induktion. 2: Suspension aus der Zellpresse. 3: FP-P in 8 M Harnstoff und 10 mM β-Mercaptoethanol (Auftragslösung). 4: Eluat nach der ersten Inkubation der aufgetragenen Probe. 5: W1. 6: E1. 7: E2.

**C/D: Auftrag des Überstandes (FP-Ü) auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule.**

**M:** SDS-7-Marker. 8: Zell-Aliquot nach der Induktion. 9: FP-Ü (Auftragslösung). 10: Eluat nach Durchlauf der ersten 10 von 20 ml Probenauftrag. 11: Eluat nach der ersten Inkubation der aufgetragenen Probe. 12: W1. 13: E1. 14: E2.

### 3.4.3 Expression in alternativen *E.coli*-Zellen

Das pET-Vektor-Expressionssystem (Abb. 2.3) nutzt die spezifische Interaktion der RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen mit dem starken T7-Promotor auf dem pET-Plasmid zur gezielten Expression rekombinanter Proteine aus. Diese pET-Vektoren müssen dafür in Bakterienstämme eingebracht werden, in deren Genom das T7-RNA-Polymerase-Gen enthalten ist. Dies wird von der bakterieneigenen RNA-Polymerase transkribiert, sodass die T7-RNA-Polymerase zur Transkription des Proteingens zur Verfügung steht. Beide RNA-Polymerasen werden über ein Lac-Operon reguliert und sind durch IPTG induzierbar (siehe hierzu auch 2.4.1.1). In diesem Kapitel wird die Überführung des PhxA-Gens in einen geeigneten Vektor und die dadurch ermöglichte erfolgreiche Überexpression der Spinat-PPO A in alternativen Bakterienstämmen beschrieben.

#### 3.4.3.1 Überführung des PhxA-Gens in den pT7-7-Vektor

Verschiedenste Derivate von pET-Vektoren sind in jeglicher Ausführung, inklusive diverser Leader- oder Tag-Sequenzen kommerziell erhältlich (Novagen/Merck, Darmstadt; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Stratagene, La Jolla, CA, USA). Eine Leader-Sequenz für die Ausschleusung des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen oder extrazellulären Raum kann die anschließende Aufreinigung erheblich vereinfachen. Voraussetzung zur Verwendung dieser Vektoren sind passende Restriktionsschnittstellen im vorhandenen Genkonstrukt. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme NcoI, NdeI, SphI u.a. beinhalten jeweils ein Methionin-Codon (ATG). Die Klonierung über eine dieser Schnittstellen im Bereich des Start-Methionins zu Beginn des ORF hat den Vorteil, dass das Gen automatisch im korrekten Leseraster zu liegen kommt. Häufig vertreten sind NcoI-Sequenzen, die jedoch im PhxA-Gen selbst ebenfalls vorhanden waren und damit nicht benutzt werden konnten. Stattdessen wurde auf die NdeI-Schnittstelle im pT7-7-Vektor zurückgegriffen, der von Tabor und Richardson (1985) entwickelt worden war und einen Vorläufer des pET-Systems darstellte (siehe 2.4.1.1).

Die Klonierung des pT7-7-PhxA-His-Konstruktes wurde von Nadine Göhring und Sabine Schönecker im Rahmen eines Praktikums unter der Anleitung der Autorin durchgeführt. Ausgehend von dem Konstrukt, das für die PPO A aus Spinat mit C-terminalem His-Tag codierte (pDS12-PhxA-His), jedoch keine weiteren Modifikationen beinhaltete, wurde die SphI-Erkennungssequenz umgewandelt in die des Enzyms NdeI. Das Gen konnte anschließend, wie in Abschnitt 2.4.1.2 (Abb. 2.9) beschrieben, in den pT7-7-Vektor überführt und sequenziert werden (Anhang: Sequenzierungen: pau483 - pau488 sowie Anhang: Sequenzen: pT7-7-PhxA-His).

Im pT7-7-Vektor steht die Expression des Proteingens unter der Kontrolle des  $\phi$ 10-T7-RNA-Polymerase-Promotors, der von der bakteriellen RNA-Polymerase der JM101-Zellen nicht erkannt wird. Hierfür ist ausschließlich die T7-RNA-Polymerase geeignet, deren Gen durch den DNA-Abschnitt DE3 im Genom von *E.coli*-BL21(DE3)-Stämmen repräsentiert wird. Für die Überexpression des PhxA-His-Gens wurden drei Zelllinien der Firma Novagen/Merck (Darmstadt) verwendet. BL21(DE3)pLysE und Rosetta(DE3) sind Derivate des Stammes BL21(DE3), deren Eigenschaften, die im Abschnitt 2.3.1 erläutert sind, die Exprimierbarkeit



des rekombinanten Proteins erleichtern sollten. Im ersten Fall wird dies durch T7-Lysozym, einen Inhibitor der T7-RNA-Polymerase, bewerkstelligt, während die Rosetta(DE3)-Zellen ein Defizit seltener tRNA-Moleküle ausgleichen können.

### 3.4.3.2 Optimierung der Überexpression

In einem ersten Versuch nach der Transformation von Zellen der drei alternativen BL21(DE3)-Stämme konnte keine sichtbare Überexpression der Spinat-PPO A beobachtet werden. Eine Permutation der in Abschnitt 3.4.2.4 dargelegten Expressionsbedingungen führte jedoch sehr schnell zum Erfolg. Zur Analyse der Experimente waren mit Coomassie gefärbte SDS-Gele ausreichend, da sich das überexprimierte Protein bereits mit dieser wenig sensitiven Methode eindeutig nachweisen ließ.

Die variierten Parameter und die ermittelten optimalen Überexpressionsbedingungen für die rekombinante Spinat-Tyrosinase sind in Tab. 3.6 zusammengefasst.

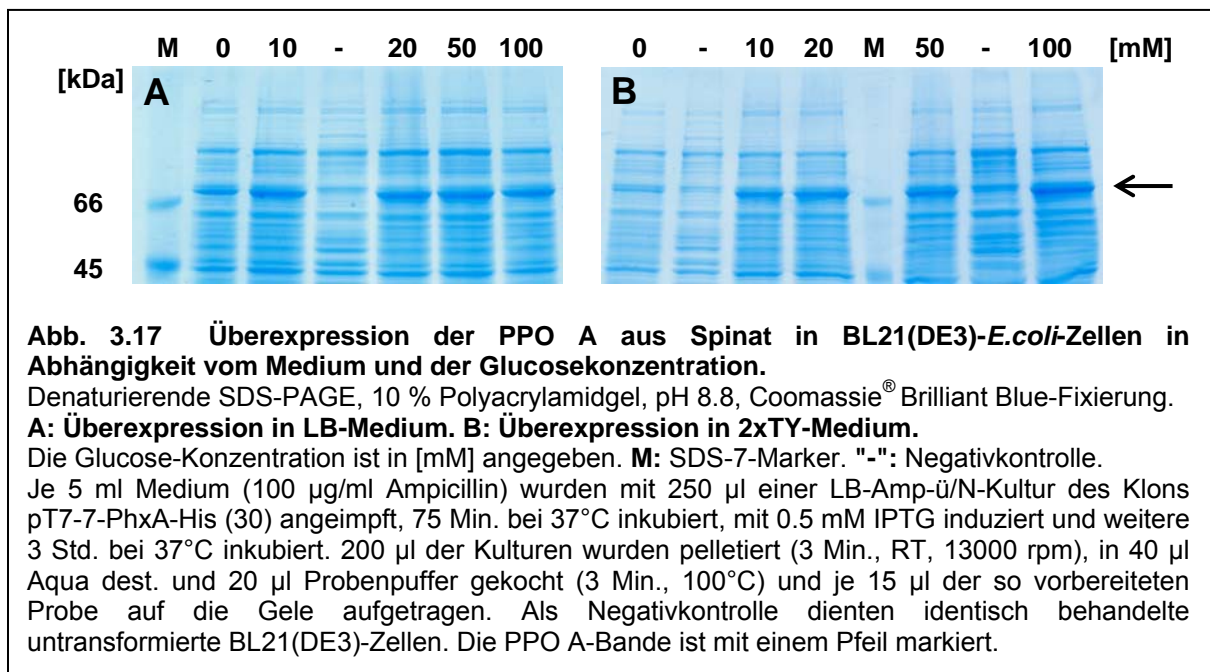
Parameter	Variationen	Optimum
Bakterienstamm	BL21(DE3) BL21(DE3)pLysE Rosetta(DE3)	BL21(DE3)
Medium	LB, TB, NZCYM, 2xTY, SOB, M9	LB
Glucosekonzentration [mM]	0, 10, 20, 50, 100	50
Animpfverhältnis	1 : 20	1 : 20
OD <sub>[700nm]</sub> bei Induktion	0.5	0.5
IPTG-Konzentration [mM]	0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0	0.5
Induktionsdauer [Std.]	0, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 6.5	5
Temperatur [°C]	25, 32, 37	37
Belüftung (Luft : Medium)	1 : 3	1 : 3

**Tab. 3.6 Permutation der Überexpressionsbedingungen für die PPO A aus Spinat in alternativen *E.coli*-Zellen.**

Die Überexpressionsversuche wurden in je 5 ml Medium (2.3.2) mit 100 µg/ml Ampicillin durchgeführt. Dieses wurde mit je 250 µl LB-Amp-ü/N-Kultur (2.3.3) des Klons pT7-7-PhxA-His (30) in BL21(DE3)-Zellen angeimpft und vor der Induktion für 75 - 110 Min. bis zu einer OD<sub>[700nm]</sub> = 0.5 im Kulturreaktor bei 37°C inkubiert. Nachdem in einem ersten Experiment unter Verwendung von LB-, TB-, NZCYM- und SOC-Medium die drei alternativen Zelllinien (Novagen/Merck, Darmstadt, 2.3.1) 60 Min. bis zur Induktion inkubiert, mit 1 mM IPTG induziert und weitere 3 Std. bei 37°C inkubiert worden waren, konnten keine Unterschiede zwischen ihnen festgestellt werden. Um die Anzahl der Variablen zu reduzieren, wurden für alle übrigen Ansätze BL21(DE3)-Zellen ausgewählt. Die verschiedenen Medien, Glucosekonzentrationen und Temperaturen wurden in einer ersten Permutation alle miteinander kombiniert (Ausnahme: M9 enthält bereits Glucose)(78 Ansätze). Die in dieser Versuchsreihe ermittelten optimalen Parameter wurden, sofern nicht anders angegeben, bei der Variation der übrigen Parameter berücksichtigt. Bis zur Bestimmung der effizientesten Induktor-Konzentration und Induktionszeit, wurden die Experimente mit 0.5 mM IPTG und 3 Std. Induktionszeit durchgeführt. Im Anschluss an die Induktion wurden die Zellen aus je 200 µl Kulturvolumen bei RT und 13000 rpm pelletiert und das Präzipitat bis zur Analyse über SDS-PAGE bei -20°C eingefroren.

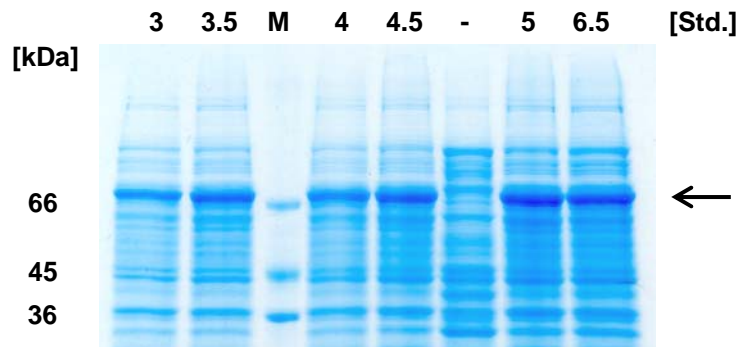
Nachdem in einem ersten Experiment keine Unterschiede zwischen den drei Bakterienstämmen festgestellt werden konnten, wurden im Folgenden ausschließlich BL21(DE3)-Zellen eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten identisch behandelte, nicht

transformierte BL21(DE3)-Zellen. Diese mussten in Medium ohne Antibiotika angezogen werden, da ihnen in Ermangelung eines Plasmids auch die zugehörige Ampicillin-Resistenz fehlte. In einer ersten Versuchsreihe wurden alle verwendeten Medien, Glucose-Konzentrationen und Temperaturen miteinander kombiniert. Eine deutliche Überexpression zeigte sich in allen Ansätzen, die Glucose enthielten. Die optimale Konzentration an Glucose erwies sich dabei als abhängig vom Medium. Während bei TB- und SOB-Medium niedrige Konzentrationen (10 - 20 mM) vorteilhaft waren, zeigte sich bei NZCYM-Medium keine Tendenz. In Abb. 3.17 sind die Ergebnisse der LB- und 2xTY-Reihen gezeigt. Neben einer Kombination aus LB-Medium und 50 mM Glucose wurden 100 mM Glucose kombiniert mit 2xTY-Medium zur weiteren Verwendung ausgewählt und in den nachfolgenden Permutationen berücksichtigt. Die besten Ergebnisse wurden zudem mit einer Inkubation bei 37°C erzielt. Eine Verringerung der Temperatur auf 32°C oder 25°C verminderte trotz Verlängerung der Induktionszeit auf 4 bzw. 5 Std. den Expressionserfolg erheblich.



Anstelle der für JM101-Zellen verwendeten Standard-Induktor-Konzentration von 1 mM (3.4.2.4, Tab. 3.5) war die Konzentration in dieser Reihe von Experimenten aufgrund von Erfahrungswerten (Boronowski, 1999) auf 0.5 mM verringert worden. Eine anschließende Variation der IPTG-Konzentration hatte keinen merklichen Effekt auf die Überexpressions-Effizienz. Konzentrationen zwischen 0.4 und 1.0 mM IPTG führten zu identischen Proteinmengen, daher wurden 0.5 mM als IPTG-Optimum beibehalten.

Eine letzte Anpassung der Expressionsparameter wurde durch Ausdehnung der Induktionszeit erreicht. In Abb. 3.18 ist eine Induktionskinetik dargestellt, aus der deutlich hervorgeht, dass die Menge an rekombinantem Protein mit der Inkubationsdauer zunimmt. Da die Differenz zwischen 5 und 6.5 Stunden minimal ausfiel, wurden 5 Std. als optimal festgelegt.



**Abb. 3.18 Induktionskinetik der Überexpression der PPO A aus Spinat in BL21(DE3)-Zellen.** Denaturierende SDS-PAGE, 10 % Polyacrylamidgel, pH 8.8, Coomassie® Brilliant Blue-Fixierung. Die Inkubationszeit im Anschluss an die Induktion ist in [Std.] angegeben. **M**: SDS-7-Marker. "-": Negativkontrolle.

Für diesen Versuch wurden 5 ml LB-Amp-Medium mit 50 mM Glucose und 250 µl einer LB-Amp-ü/N-Kultur (BL21(DE3)-Zellen transformiert mit dem pT7-7-PhxA-His(30)-Plasmid) versetzt, 110 Min. bis zu einer  $OD_{700nm} = 0.5$  bei 37°C inkubiert und mit 0.5 mM IPTG induziert. Im Zeitraum zwischen 3 und 6.5 Std. wurden alle 30 Min. 200 µl Zellkultur entnommen, pelletiert (3 Min., RT, 13000 rpm), in 40 µl Aqua dest. und 20 µl Probenpuffer gekocht (3 Min., 100°C) und je 15 µl der so vorbereiteten Probe auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten nicht transformierte BL21(DE3)-Zellen, die unter identischen Bedingungen für 3 Std. induziert worden waren. Der Pfeil markiert die Bande der überexprimierten Spinat-PPO A.

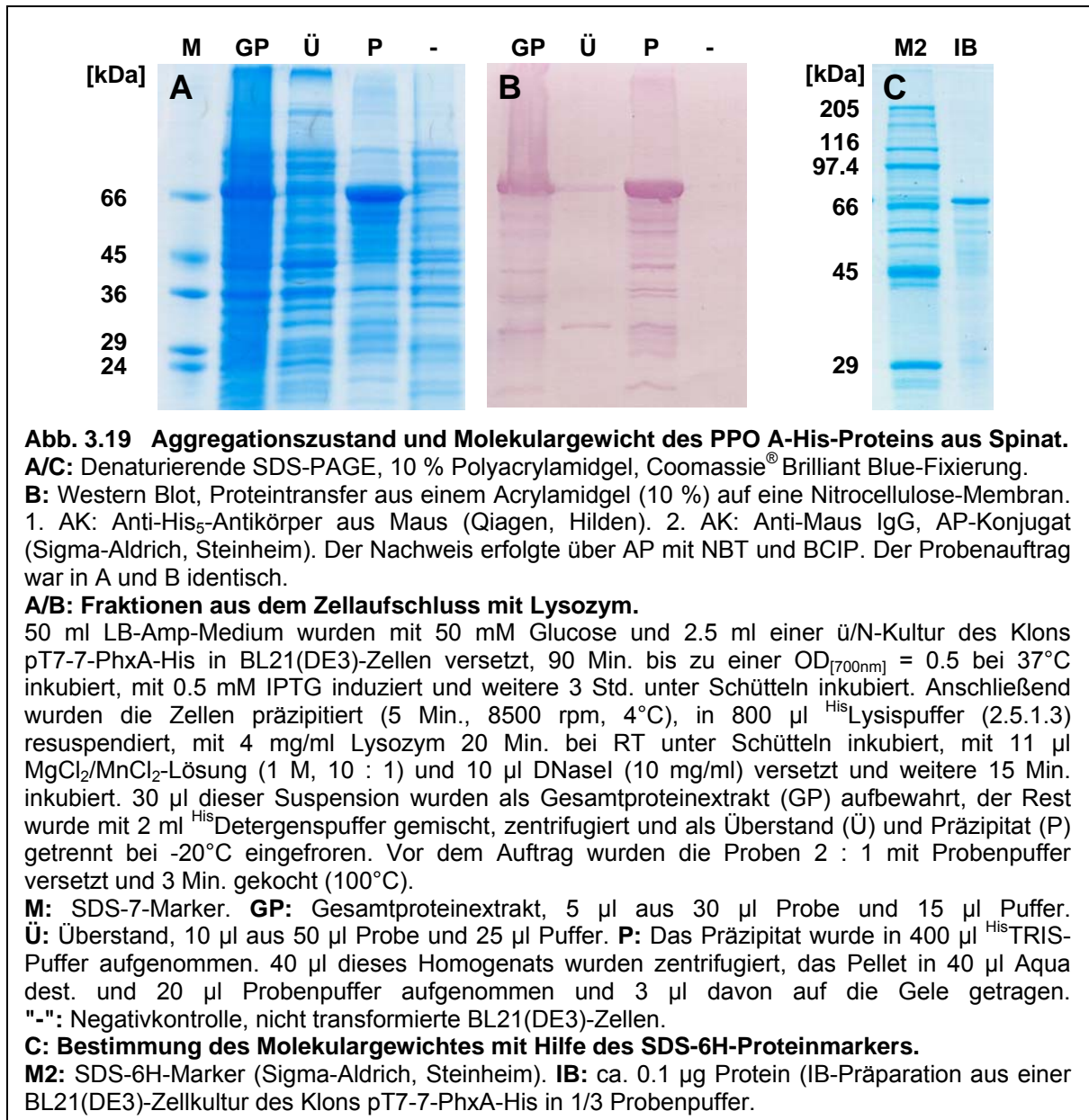
### 3.4.3.3 Molekulargewicht und Löslichkeit des überexprimierten Proteins

Zur Bestimmung des Aggregationszustandes des überexprimierten Proteins wurden induzierte Bakterienzellen mit Lysozym aufgeschlossen. Aus diesem Gesamtproteinextrakt (GP) wurden alle unlöslichen Zellbestandteile und Proteinaggregate, respektive Inclusion Bodies, durch Präzipitation (P) von den löslichen Proteinen im Überstand (Ü) abgetrennt. Abb. 3.19 zeigt das Ergebnis von SDS-PAGE (A) und Western Blot (B) der einzelnen Fraktionen.

Der Hauptanteil des überexprimierten Proteins befand sich im Pellet und ließ sich mit dem Anti-His<sub>5</sub>-Antikörper spezifisch markieren. Im Western Blot fielen jedoch viele niedermolekulare Banden in der unlöslichen Fraktion (P) auf. Da diese in den untransformierten Zellen nicht auftraten, handelte es sich hierbei vermutlich nicht um unspezifische Markierungen sondern vielmehr um C-terminale Abbauprodukte des Proteins.

Das rekombinante His-Tag-Protein konnte demnach auch in BL21(DE3)-Zellen in Form von Inclusion Bodies akkumuliert werden. Bei deren Isolation aus einem Liter Bakterienkultur wurde eine Ausbeute von etwa 30 mg Protein erzielt. Dies war bei einer Erwartung von 10 – 100 mg/L ein normaler Ertrag.

Für die Bande der überexprimierten Proteine aus Abb. 3.18 konnte mit Hilfe der Quantity One-Software auf Basis des SDS-7-Markers (Sigma-Aldrich, Steinheim) ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa berechnet werden. Eine Analyse der Proteinbande aus Abb. 3.19 C ergab bei Festlegung des SDS-6H-Markers (Sigma-Aldrich, Steinheim) als Standard eine vergleichbare molekulare Masse von 69 kDa.



Mit Hilfe der ProtParam-Software ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) wurde anhand der Spinat-PPO A-His-Sequenz (pT7-7-PhxA-His, Anhang) für das Vorläuferprotein (647 Aminosäuren, inklusive Signalpeptid), ein Molekulargewicht von 74 kDa und für das gereifte Protein (546 AS) eine Masse von 63 kDa errechnet. Diese Diskrepanz konnte eventuell durch abweichendes Laufverhalten im Gel erklärt werden, sie ließ jedoch keine Bestimmung der Form des Proteins zu.

### 3.4.4 Versuche zur Faltung des PPO A-His-Proteins aus Spinat

Bei den Experimenten zur Faltung der rekombinanten Spinat-Tyrosinase wurde den verschiedenen Ansätzen nachgegangen, die in Kapitel 4.2.2 näher erläutert sind. Dazu gehörten sowohl Versuche zur Faltung in Lösung über Dialyse und Verdünnung als auch die

Immobilisierung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose über den C-terminalen His-Tag. Das Protein wurde für alle Versuche in Form von Inclusion Bodies aus dem Klon pT7-7-PhxA-His hergestellt und vor dem Faltungsschritt vollständig denaturiert. Alle Versuche wurden bei RT durchgeführt. Im Anschluss an den jeweiligen Faltungsschritt wurden die Proben in Ermangelung eines geeigneten alternativen Faltungskriteriums anhand der Enzymaktivität überprüft. Dies erfolgte mit Hilfe von Tropfen-Tests (2.5.9.3) in Anlehnung an den MBTH-Assay von Pifferi und Baldassari (1973; 2.5.9). Als Positivkontrolle diente die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich, Steinheim).

#### 3.4.4.1 Art der Kupfer-Zugabe und Stabilität des Glutathion-Cu(I)-Komplexes

Da zum Kupfereinbau in Typ 3-Kupfer-Proteine in der Literatur mitunter widersprüchliche Angaben gemacht werden, wurden hier zwei unterschiedliche Hypothesen berücksichtigt. In Anlehnung an Nakamura *et al.* (2000) und Mari *et al.* (1998) wurde CuSO<sub>4</sub> als Quelle für Cu<sup>2+</sup>-Ionen verwendet. Der Ansatz von Brouwer und Brouwer-Hoexum (1992) u.a. wurde bezüglich des Einbaus von Cu<sup>+</sup> bedacht (zur Erläuterung der Methoden siehe auch 4.2.4).

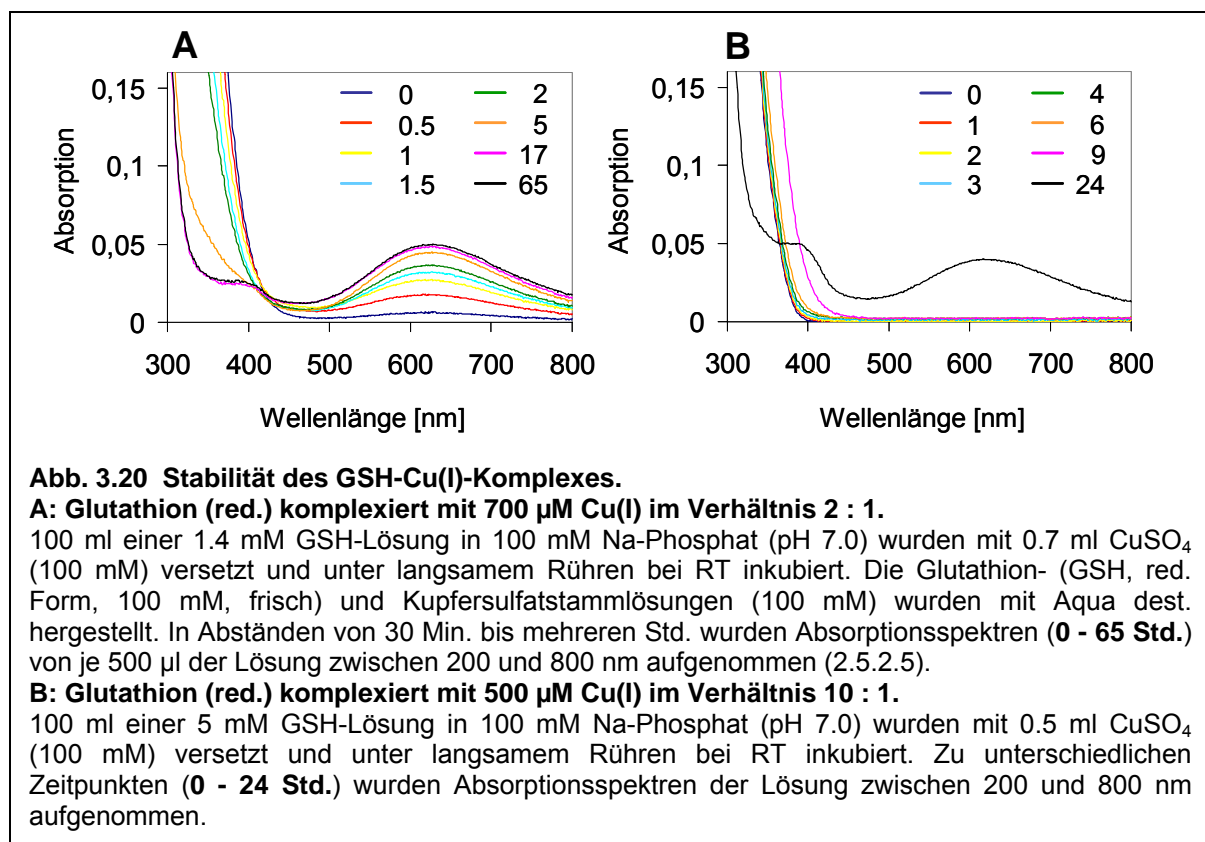
Kupfersulfat konnte unmittelbar als Cu(II)-Donor eingesetzt werden. Cu(I) wurde durch Komplexierung mit Glutathion (GSH, reduzierte Form) hergestellt und war auf diese Weise ebenfalls einfach zu handhaben. Durch Zugabe von CuSO<sub>4</sub> wird GSH stöchiometrisch zu GSSG (Glutathion, oxidierte Form) oxidiert und das dabei entstehende Cu(I) mit dem verbleibenden GSH komplexiert (Ciriolo *et al.*, 1990).

Die Stabilität des GSH-Cu(I)-Komplexes wurde photometrisch ermittelt. Anhand einer Zunahme der OD bei 625 nm, die charakteristisch für den Cu(II)-GSSG-Komplex ist (Postal *et al.*, 1985), konnte die Oxidation des Kupfers verfolgt werden. Laut Ciriolo *et al.* (1990) nimmt die Stabilität zwar bei Erhöhung des GSH : Cu(I)-Verhältnisses zu, bereits ab einem Verhältnis von 2 : 1 bleibt der Komplex jedoch, bei Inkubation im Schüttel-Wasserbad bei 37°C, über mindestens 5 Std. stabil.

Zur Untersuchung der Komplexstabilität wurde eine CuSO<sub>4</sub>-Lösung in unterschiedlichen Verhältnissen zu GSH in 0.1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) gegeben, bei RT unter Rühren inkubiert und in Abständen von jeweils 30 - 60 Min. je ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Abb. 3.20 zeigt zwei dieser Versuchsreihen, die mit GSH : Cu(I)-Verhältnissen von 2 : 1 (A) und 10 : 1 (B) in 0.1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7.0) durchgeführt wurden.

Während bei einem GSH : Cu(I)-Verhältnis von 2 : 1 (A) bereits nach 30 Min. eine deutliche Oxidation zu GSSG-Cu(II) in Form einer Zunahme der OD<sub>625nm</sub> zu erkennen war, blieb die Absorption des 10 : 1-Komplexes (B) über mindestens 9 Std. konstant. Dies war auch bei einer weiteren Erhöhung des GSH-Anteils (20 : 1, 30 : 1) zu beobachten. Voraussetzung dafür war eine unmittelbar vor Verwendung frisch angesetzte Glutathion-Lösung. TRIS/HCl-Puffer und basischere pH-Werte (TRIS/HCl oder Na-Phosphat, pH 8.0) wirkten sich negativ auf die Stabilität aus. Eine Erniedrigung des pH-Wertes auf pH 6.0 oder eine Zugabe von 500 mM NaCl blieben ohne Effekt. Bei ausreichendem Glutathion-Überschuss (≥ 10 : 1)

konnte daher davon ausgegangen werden, dass zumindest über den größten Abschnitt der ü/N durchgeführten Faltungsversuche Cu(I) in quantitativer Menge zur Verfügung stand.



### 3.4.4.2 Dialysen zur Proteinfaltung

Um dem Protein die Möglichkeit zu geben, sich in einem Konzentrationsgefälle von Denaturierungs- und Reduktionsmittel im Verlauf einer Dialyse zu falten, wurden die PhxA-His-Inclusion Bodies in 6M GdnHCl oder 8 M Harnstoff unter Zugabe von 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol solubilisiert. Diese Lösung, die 10 - 100 µg/ml Protein enthielt, wurde, wie in 2.5.6.2 (Abb. 2.15 B) beschrieben, in Eppendorfreaktionsgefäßen gegen einen Puffer dialysiert, der sich aus den in Tab. 3.7 aufgeführten Komponenten zusammensetzte. Dabei wurden in erster Linie Protein- und Kupferkonzentrationen, die Art der Kupferzugabe, sowie pH-Wert und Ionenstärke variiert.

In einigen Ansätzen wurde, meist durch erhöhte Proteinkonzentrationen (50 oder 100 µg/ml) begünstigt, eine Präzipitation des Proteins beobachtet. Spektren, die von den Puffern vor und nach der Dialyse aufgenommen wurden, zeigten eine deutlich Oxidation des GSSG-Cu(II)-Komplexes nach Beendigung der Versuche. Aufgrund der Vorversuche (3.4.4.1) wurde jedoch von einer ausreichenden Stabilität des GSH-Cu(I)-Komplexes über einen weiten Anfangsbereich der Dialyse-Experimente hinweg ausgegangen.

In keinem der Tropfen-Tests konnte in den dialysierten Proben Aktivität nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle dieser Tests wurde sowohl in 0.1 M Na-Phosphat (pH 7.0) als

auch im Dialysepuffer nach Versuchsende durchgeführt. Dabei fiel keine Inhibition der Champignon-Tyrosinase durch Pufferkomponenten auf, die den Nachweis in den Proben gestört haben könnten. Zur Dialysedauer siehe auch Kapitel 3.4.4.3.

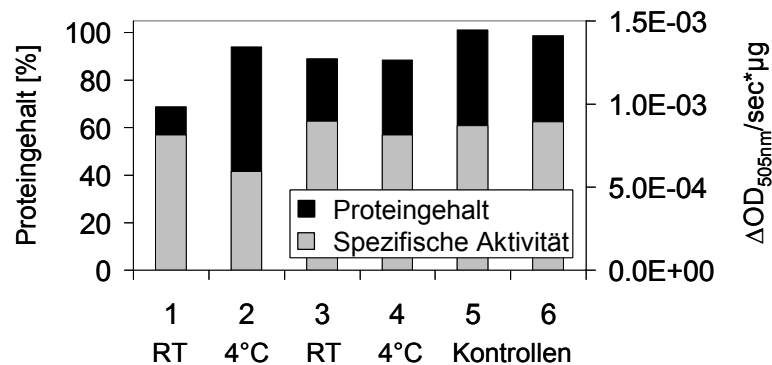
Parameter	Ausgangsbedingungen	Variationen
<b>Solubilisierung der Inclusion Bodies</b>		
Proteinkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	10	50, 100
Denaturierungsmittel [M]	Harnstoff, 8 M	GdnHCl, 6 M
$\beta$ -Mercaptoethanol [mM]	10	-
<b>Dialysepuffer und Durchführung</b>		
Probenvolumen [ml]	1.0	0.2
pH	7	6, 8
NaCl [M]	0	0.1, 0.5, 1.0
AMS [M]	0	0.01, 0.1, 0.5, 1.0
Cu-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	40	50, 100, 250
GSH : Cu(I)-Verhältnis	10 : 1	20 : 1, 30 : 1, 0 : 1
Dialysedauer [Std.]	14 - 18	14 - 18

**Tab. 3.7 Zusammensetzung der Proben und Dialysepuffer zur Faltung der Spinat-PPO A.**

Es wurden nicht alle Parameter miteinander kombiniert. Bei Variation einzelner Parameter, wurden die übrigen weitestgehend den Ausgangsbedingungen entsprechend, z.T. jedoch auch in Kombination miteinander, verwendet. Jeder Ansatz wurde immer parallel mit den drei angegebenen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Das GSH : Cu(I)-Verhältnis 0 : 1 repräsentiert die Verwendung von Kupfersulfat als Cu(II)-Donor.

Ob im Verlauf der Dialyse bereits allein durch die mechanische Beanspruchung die Gefahr eines Verlust oder einer Schädigung des Proteins bestand, wurde ebenfalls mit Hilfe der Tyrosinase aus Champignon untersucht. Diese wurde in einem den Faltungsexperimenten äquivalenten Versuchsaufbau ü/N bei RT bzw. 4°C gegen 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) dialysiert. Im Anschluss wurde der Proteinanteil in der Probe spektroskopisch über die Absorption bei 280 nm ermittelt (2.5.2.5) und die Enzymaktivität kinetisch bestimmt (2.5.9.2). Die Quantifizierung erfolgte jeweils über einen Vergleich mit ü/N im gleichen Puffer inkubierten bzw. frisch angesetzten, nicht dialysierten Proben.

Wie in Abbildung 3.21 gezeigt, führte die Dialyse bei RT zu einem Proteinverlust von etwa 30 %. Dies war vermutlich durch Adhäsion an die Dialysemembran oder Entfernung ausgefallenen Proteins aus der Probe durch die anschließende Zentrifugation zu erklären. Bei Inkubation der Probe ü/N oder Dialyse bei 4°C verminderte sich der Verlust auf 10 %. Die spezifische Aktivität wurde durch diese Behandlung jedoch nicht merklich beeinträchtigt. Dass das bei 4°C dialysierte Enzym eine deutlich geringere Aktivität aufwies, hing möglicherweise mit einer Überbewertung der Proteinkonzentration zusammen. Es handelte sich hierbei um ein einmaliges, nicht reproduziertes Experiment, dem daher nicht mehr als eine Tendenz zu entnehmen war. Aufgrund des nicht eindeutigen Ergebnisses für die 4°C-Dialyse, wurden die Versuche weiterhin bei RT durchgeführt. Es war tendenziell davon auszugehen, dass auch unter diesen Bedingungen ausreichend Protein für einen Aktivitäts-Nachweis zur Verfügung stand.



**Abb. 3.21 Protein- und Aktivitätsverlust bei der Dialyse der Champignon-Tyrosinase.**

Je 500  $\mu l$  einer 50  $\mu g/ml$  Lösung der Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) wurden bei RT (1 und 3) bzw. 4°C (2 und 4), wie in 2.5.6.2 beschrieben, in Eppendorfreaktionsgefäßen gegen 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) dialysiert (1 und 2) oder ü/N inkubiert (3 und 4).

Nach 15 Std. wurden von den zentrifugierten Proben Spektren zwischen 200 - 700 nm aufgenommen (2.5.2.5). Als Referenz dienten zwei unmittelbar vor der Messung angesetzte Proben gleicher Konzentration (5 und 6). Der Mittelwert der  $OD_{280nm}$  aus 5 und 6 wurde mit einer Konzentration von 50  $\mu g/ml$  gleichgesetzt und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben über dieses Verhältnis abgeschätzt. Angegeben ist der prozentuale Anteil des in der Probe vorhandenen Proteins (50  $\mu g/ml$  = 100 %).

Für die Enzymkinetiken (2.5.9.2) wurde die Änderung der Absorption bei 505 nm ( $\Delta OD_{505nm}$ ) über 5 Min. verfolgt. Die Messungen wurden in 1.5 ml Halbmikro-Einmalküvetten (Ratiolab, Dreieich-Buchsschlag) in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Die Ansätze enthielten je 2.5 mM Dopamin, 2.5 mM MBTH, 55 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und 25  $\mu l$  Probe. Angegeben ist die spezifische Aktivität ( $\Delta OD_{505nm}/sec \cdot \mu g$ ).

### 3.4.4.3 Versuche zur Proteinfaltung über Verdünnung

Um die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Versuche um einige Parameter zu erweitern, wurde im Folgenden versucht, zur Faltung eine Kombination aus Verdünnung des denaturierten Proteins in so genannten Rückfaltungspuffern und anschließender Dialyse zu verwenden. Kommerziell erhältlich sind so genannte „Protein Refolding Kits“ (z.B. Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Hampton Research Corp. (Laguna Niguel, CA, USA), Novagen/Merck, Darmstadt), die aus bis zu 50 Puffern bestehen, in denen verschiedenste Faltungshelfer in günstigen Kombinationen enthalten sind, da es zu zeitaufwendig wäre, alle Parameter miteinander zu verknüpfen. Hierzu gehören polare Aminosäuren wie Arginin, Detergenzien (Laurylmaltosid = LM, Triton X-100 = TX), Chaotrope (GdnHCl), divalente Kationen ( $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ), Polyethylenglykol, Saccharose, Salze (NaCl, KCl) für eine definierte Ionenstärke, Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiertes (GSSG) Form oder Dithiothreitol (DTT) zur Einstellung des Redoxpotentials sowie Puffer zur Festlegung des pH-Wertes. Die Funktion dieser Additiva wird in Kapitel 4.2.3 im Einzelnen erläutert. Die Schnittmenge dieser Produkte und anderer Referenzen (Rudolph und Lilie, 1996; He *et al.*, 2002) wurde ziemlich gut durch das Refolding Kit der Firma Athena Enzyme Systems Group™ (AthenaES™, Athena Environmental Sciences, Baltimore, Maryland, USA) repräsentiert. Aus diesem Grund wurden die hier verwendeten 15 Rückfaltungspuffer, deren



Zusammensetzung in Tab. 2.15 (2.5.6.1) angegeben ist, nach diesem Vorbild hergestellt (AthenaES™ Refolding Kit: Applications Manual (v1.0), 2003).

Alle Versuche wurden bei RT, mit einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml durchgeführt. Dafür wurden in jeder Versuchsreihe je 50 µl einer Proteinstammlösung (1 mg/ml) mit den 15 verschiedenen Puffern zu je 1 ml Gesamtvolumen verdünnt. Die Inclusion Bodies (PPO A-His aus Spinat) waren nach 10 - 15minütiger Inkubation bei 50°C in 8 M Harnstoff ohne Zugabe von Reduktionsmittel löslich. Bei der Durchführung der Versuche wurden bezüglich der Zugabe des Cofaktors (Cu) verschiedene Strategien verfolgt. Tab. 3.8 gibt darüber einen Überblick.

	Rückfaltungspuffer	Dialysepuffer	Anschließende Kupferzugabe
1	Zugabe von GSH-Cu(I)	Ohne Kupfer	-
2	Zugabe von CuSO <sub>4</sub>	Ohne Kupfer	-
3	Ohne Kupfer	GSH-Cu(I)	-
4		CuSO <sub>4</sub>	-
5		Ohne Kupfer	GSH-Cu(I)
6			CuSO <sub>4</sub>

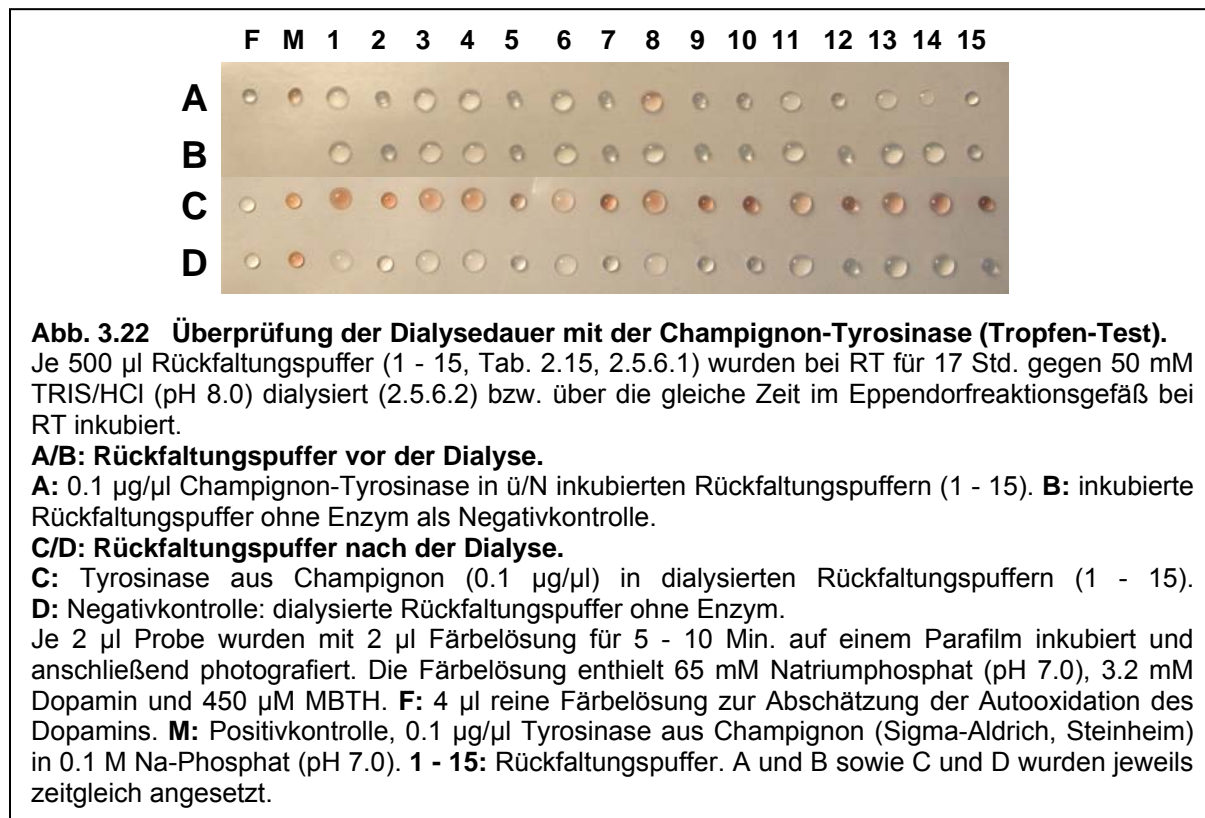
**Tab. 3.8 Variation der Versuchsdurchführung (Kombination aus Verdünnung und Dialyse).**

Die in 8 M Harnstoff (50°C, 10 - 15 Min.) solubilisierten Inclusion Bodies (pT7-7-PhxA-His) wurden in 15 Rückfaltungspuffern (2.5.6.1, Tab. 2.15) verdünnt (1 : 19) und für jeweils sowohl 1 - 4.5 Std. als auch 14 - 19 Std. inkubiert. Die anschließende Dialyse (6 - 21 Std., 2.5.6.2) diente der Entfernung störender Pufferkomponenten. Die Dialysepuffer enthielten entweder 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0) und 50 µM Cu(I) in einem GSH-Cu(I)-Komplex (10 : 1) oder 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0) und 50 µM CuSO<sub>4</sub>. Erfolgte die Kupferzugabe erst im Anschluss an die Dialyse, wurden die Proben danach weitere 6 - 7 Std. und 14 - 25 Std. inkubiert. Die Versuchsansätze wurden mit Hilfe eines Tropfen-Tests (2.5.9.3) in Anlehnung an den MBTH-Assay auf Aktivität überprüft. Als Positivkontrolle diente die Tyrosinase aus Champignon (Sigma-Aldrich, Steinheim).

Kupfer war in Form von Cu(I) im Komplex mit Glutathion (GSH-Cu(I)) oder Cu(II) aus CuSO<sub>4</sub> entweder direkt im Faltungsansatz enthalten (1 und 2) oder erst während der anschließenden Dialyse zur Entfernung der Faltungshelfer zugegeben worden (3 und 4). Im ersten Fall wurde die Möglichkeit einer Faltung unter gleichzeitigem Einbau des Kupfers in Betracht gezogen. Der zweite Ansatz berücksichtigte die Diffusion des Cofaktors durch die bereits gefaltete Proteinstruktur zum Aktiven Zentrum, wie sie z.B. von Brouwer und Brouwer-Hoexum (1992) postuliert worden ist (4.2.4.3). Eine Dialyse der Proben war in jedem Fall notwendig, da einige Bestandteile der Faltungspuffer, wie z.B. Reduktionsmittel, als Inhibitoren der Tyrosinase den Aktivitätstest beeinträchtigt hätten (3.2.2.2). In einer dritten Variante wurde das Kupfer erst im Anschluss an die Dialyse eingesetzt (5 und 6), d.h. erst nach Entfernung der Substanzen, die die Faltung begünstigen sollten, die Aktivierung des Enzyms durch Cu aber eventuell behindert hätten. Zudem wurden jeweils unterschiedliche Inkubationszeiten eingehalten.

Das Ergebnis der Faltungsversuche wurde, im Anschluss an eine Zentrifugation der Proben zur Entfernung z.T. entstandener Präzipitate, mit Hilfe von Tropfen-Tests (2.5.9.3) überprüft, wobei jedoch wiederum keinerlei Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die verwendete Proteinkonzentration von 50 µg/ml lag deutlich über der Nachweisgrenze des Tropfen-Tests (3.2.1). Es hätte genügt, wenn etwa ein Zehntel der eingesetzten Proteinmenge in den Rückfaltungsansätzen korrekt gefaltet und aktiv vorgelegen hätte.

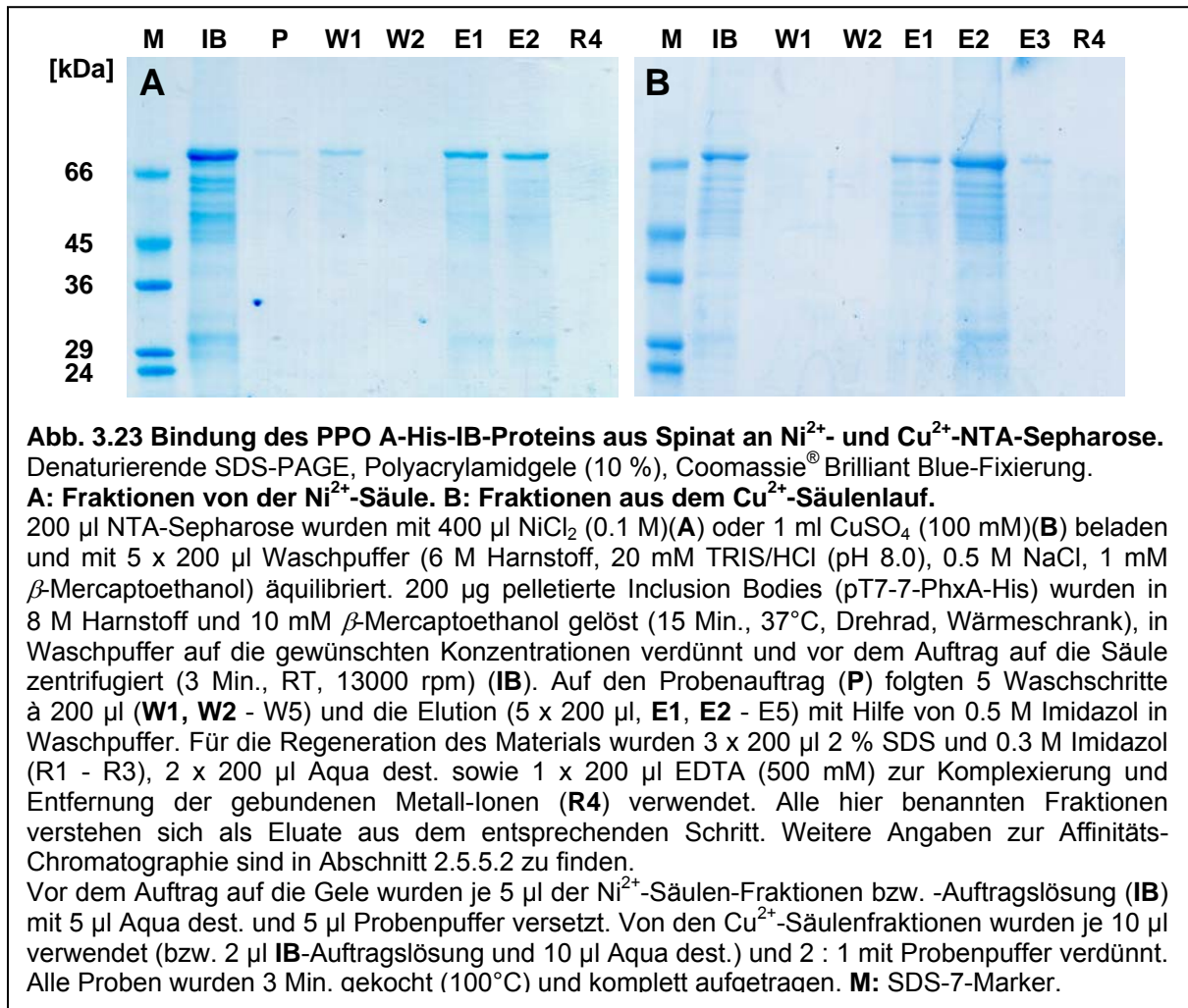
Die notwendige Dialysedauer wurde mit Hilfe der Champignon-Tyrosinase ermittelt. Hierzu wurden reine Lösungen der 15 Rückfaltungspuffer ohne Protein dialysiert und vor und nach dem Dialyseschritt mit und ohne Kontrollenzym in einen Aktivitätstest eingesetzt, der in Abb. 3.22 dargestellt ist. Als Negativkontrollen wurden die Puffer ohne Enzym verwendet (B und D).



In den nicht dialysierten Puffern war eine vollständige Hemmung der Diphenoloxidaseaktivität zu verzeichnen (A). Die im Puffer 8 aufgetretene Färbung war so nicht reproduzierbar und daher entweder auf einen Pipettierfehler oder Artefakt zurückzuführen. Im Anschluss an eine 17stündige Dialyse (C) entsprach die Enzymaktivität in allen Puffern der Positivkontrolle (M) in 100 mM Na-Phosphat (pH 7.0). In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass bereits eine Dialysedauer von 6 Std. zum gleichen Resultat führte, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Dialyse in allen Versuchen über eine ausreichende Zeitspanne erfolgt war.

#### 3.4.4.4 Versuche zur Proteinfaltung auf Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosesäulen

Durch den C-terminalen His-Tag der rekombinanten PPO A aus Spinat bot sich die Möglichkeit zur Immobilisierung und Faltung des Proteins auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix. Zunächst wurde die Bindung und Eluierbarkeit des Proteins überprüft. Die hierfür verwendeten Parameter wurden nach Empfehlungen der Firma Amersham (The Recombinant Protein Handbook, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ausgewählt. Abb. 3.23 zeigt das Ergebnis dieses und eines parallelen Versuches, bei dem die NTA-Sepharose mit Kupfer komplexiert wurde.

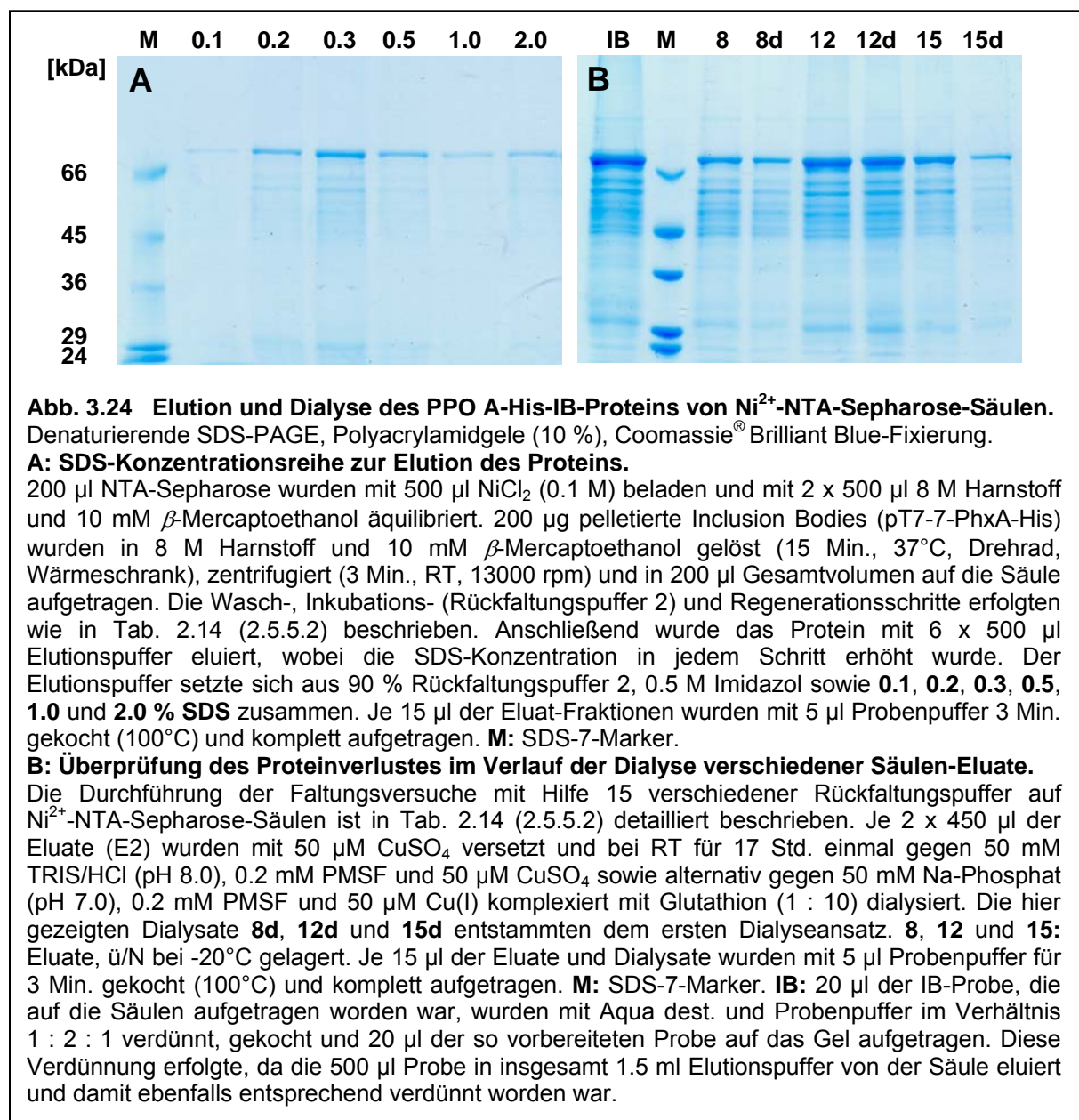


Nach Auftrag der IB-Probe auf die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose (A) ging ein geringer Anteil des Proteins im Durchlauf aus dem Probenauftrag (P) und in der ersten Waschfraktion (W1) verloren. Bei Verwendung der Cu<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosematrix konnte bereits im ersten Waschschritt so gut wie kein Protein mehr nachgewiesen werden. In beiden Fällen erfolgte eine mehr oder weniger quantitative Elution des Proteins (abzüglich der Verluste aus Auftrag und Waschen) in den ersten beiden Elutionsfraktionen (E1, E2). Dass bei der Regeneration der Säulenmatrix mit Hilfe von EDTA kein Protein mehr an den abgewaschenen Metall-Ionen gebunden war (R4), bestätigte die vorherige vollständige Elution des Proteins. Das PPO A-His-Protein konnte demnach für die Affinitätschromatographie verwendet werden.

Die Kupfer-Komplexierung der Säulen bot eine Alternative, die jedoch zugunsten von Nickel nicht weiter berücksichtigt wurde, da die Verwendung von Reduktionsmitteln sich als kritisch herausstellte. Die Reduktion des Cu<sup>2+</sup> führte schnell zur vollständigen Entfernung der Cu<sup>+</sup>-Ionen von der Matrix.

In den Faltungsversuchen wurde das PPO A-His-Protein an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose gebunden, gewaschen, mit je einem der 15 Rückfaltungspuffer 60 - 90 Min. inkubiert und anschließend mit 0.5 M Imidazol eluiert. Details zur genauen Durchführung der Versuche und Zusammensetzung der einzelnen Puffer sind in Tab. 2.14 in Kapitel 2.5.5.2 angegeben.

Bei Verwendung der Rückfaltungspuffer (Tab 2.15, 2.5.6.1), die auch in die Versuche zur Faltung in Lösung eingesetzt wurden (3.4.4.3), wurde das Protein entweder direkt von der Säule abgewaschen oder irreversibel gebunden. Etliche Handversuche ergaben eine Störung des Metall-Chelat-Komplexes durch DTT, GSH und GSSG sowie Arginin. Der Gebrauch dieser Substanzen wird auch vom Hersteller nicht empfohlen (Tab. 2.13, 2.5.5.2, Qiagen, 1997). Daraufhin wurden die Rückfaltungspuffer ohne Arginin hergestellt und die Reduktionsmittel durch  $\beta$ -Mercaptoethanol ersetzt. Zusätzlich wurden die Puffer um 50  $\mu$ M  $\text{CuSO}_4$  (Cofaktor) und 1 mM PMSF (Protease-Inhibitor) ergänzt. Bei Einsatz dieser Puffer blieb das Protein konstant gebunden, konnte jedoch erst bei der Regeneration des Säulenmaterials mit 2 % SDS und 0.3 M Imidazol wieder von diesem entfernt werden. In einem Experiment zur schonenderen Elution wurde versucht, das Protein mit niedrigeren SDS-Konzentrationen von den Nickel-Ionen zu trennen. Abb. 3.24 A zeigt eine Konzentrationsreihe des Detergens und die resultierende Proteinmenge im Eluat.



In den Elutionsschritten mit einem SDS-Anteil von 0.2 und 0.3 % wurde die größte Proteinmenge von der Säule gelöst. Eine anschließende weitere Erhöhung der Detergen-Konzentration führte lediglich zur Ablösung des verbliebenen Restproteins. Es zeigte sich nur in der ersten Waschfraktion ein geringer Proteinverlust (Gel nicht gezeigt), d.h. das Protein wurde mehr oder weniger quantitativ eluiert. Da 0.2 % SDS deutlich aktivierend auf die native Tyrosinase aus Spinat wirkten (3.2.2.2), wurde in den Faltungs-Experimenten diese Konzentration in allen GdnHCl freien Elutionspuffern verwendet. In Anwesenheit von GdnHCl fällt SDS aus und konnte daher nicht zusammen mit diesem Chaotrop eingesetzt werden.

Störende Pufferkomponenten wurden mittels Dialyse gegen 50 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 0.2 mM PMSF und 50  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> oder alternativ 50 mM Na-Phosphat (pH 7.0), 0.2 mM PMSF und 50  $\mu$ M Cu(I) komplexiert mit Glutathion (1 : 10) aus den Eluaten entfernt. Wie in Abb. 3.24 B zu sehen ist, war im Verlauf dieser Dialyse lediglich ein eingeschränkter Proteinverlust zu verzeichnen. Dies galt auch für die Ansätze mit den hier nicht gezeigten Dialyse- und Rückfaltungspuffern. Die Eluate zeigten jedoch in einem anschließenden Tropfen-Test keine Aktivität. Weitere Rückfaltungsversuche konnten aus Zeitgründen nicht unternommen werden.

### 3.4.5 Fazit zur Expression und Faltung der PPO A aus Spinat

Die Überexpression der Spinat-Tyrosinase wurde mit Hilfe des pT7-7-Vektors in *E.coli*-BL21(DE3)-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Bakterien in LB-Medium mit 50 mM Glucose bei 37°C und 210 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte bei OD<sub>700nm</sub> = 0.5 mit 0.5 mM IPTG für 5 Stunden. Das rekombinante Protein wurde in Form von Inclusion Bodies isoliert und mit 8 M Harnstoff  $\pm$  10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol solubilisiert. Eine Aufreinigung des IB-Proteins war, aufgrund der Fusion eines His<sub>6</sub>-Tags, anhand einer Affinitätschromatographie über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosematrix unter denaturierenden Bedingungen möglich. Die Versuche zur Rückfaltung des solubilisierten Proteins, in seine native, katalytisch aktive Konformation blieben jedoch erfolglos. Die unterschiedlichen Faltungs-Additiva und Durchführungsmethoden zum Pufferaustausch über Verdünnungen bzw. Dialysen hatten, ebenso wie die Immobilisierung des Proteins auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose-Säule, keinen positiven Effekt auf die Renaturierung des Enzyms.

## 3.5 Native Tyrosinasen

Alternativ zur Faltung einer rekombinanten Tyrosinase wurde die Aufreinigung eines nativen Enzyms angestrebt.

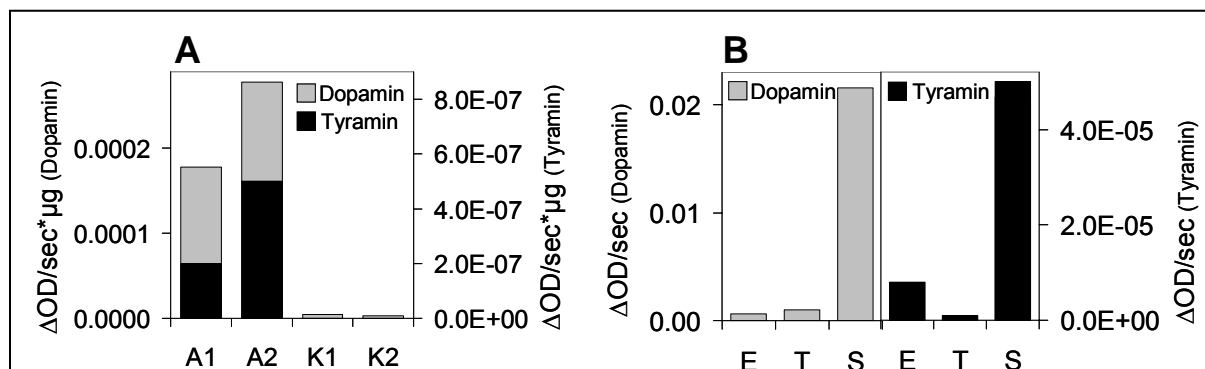
### 3.5.1 Native Tyrosinasen aus verschiedenen Pflanzen

Um ein geeignetes Objekt zu finden, wurden Enzympräparate aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien hergestellt und auf ihre Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidase-Aktivität hin überprüft. Als Auswahlkriterium wurde dabei neben der enzymatischen Aktivität auch das Aufreinigungsprotokoll berücksichtigt.

Für diese vergleichenden Experimente wurden Extrakte aus Früchten bzw. Knollen (Apfel und Kartoffel, 2.5.8) sowie Thylakoidpräparationen aus Blättern (Erbse, Tomate, Spinat, 2.5.7.1 und 2.5.7.2) verwendet.

Die Aufreinigungsprotokolle für Polyphenoloxidasen aus Äpfeln (2.5.8.2) und Kartoffeln (2.5.8.3) ähnelten sich sehr stark, weshalb eine gewisse Vergleichbarkeit gegeben war. Die mittels BCA-Assay (2.5.2.3) ermittelte, insgesamt isolierte Proteinmenge aus 100 g Frischmaterial war beim Apfel etwa um einen Faktor 10 geringer als bei der Kartoffel. Abb. 3.25 A zeigt einen Vergleich der Aktivitäten, die in den Extrakten gemessen und jeweils auf 1 µg Gesamtprotein normiert wurden, da es sich bei den Proben um Proteingemische handelte. Hier werden daher keine spezifischen Aktivitäten verglichen, sondern lediglich die Umsatzraten, die mit der gleichen Menge an Gesamtprotein erzielt wurden. Selbst unter Berücksichtigung des möglicherweise größeren Anteils an anderen Proteinen (≠ Tyrosinase) im Kartoffel-Extrakt, wurde in den Apfelproben eine deutlich höhere Diphenoloxidase-Aktivität gemessen und auch nur hier wurde Tyramin in signifikanten Mengen umgesetzt. Aus einer alternativen Apfelsorte (Braeburn, Großhändler) wurde noch weniger Protein isoliert, das jedoch vergleichbare Aktivitäten aufwies wie die Proben aus der direkt vom Bauern bezogenen Apfel-Sorte (Idared). Nach diesen ersten Versuchen und den zugrunde gelegten Kriterien erwiesen sich Äpfel daher gegenüber Kartoffeln als die Quelle der Wahl.

Eine Thylakoidpräparation lässt sich schwerlich als Aufreinigung eines Proteins bezeichnen. Da jedoch ein weiterführendes Protokoll lediglich für die Spinat-Tyrosinase existierte (2.5.7.3 und 2.5.7.4), wurden die Enzymaktivitäten in diesen nicht weiter aufgearbeiteten Proben verglichen. Auch hier konnten lediglich Umsatzraten, keine spezifischen Aktivitäten, verglichen werden. Die Ausgangsproben (Thylakoidaliquots) waren auf 0.2 mg/ml Chl *a/b* normiert und danach identisch weiter behandelt worden. Wie in Abb. 3.25 B gezeigt, war die Dopaminumsatzrate in den Spinat-Thylakoiden deutlich höher als in den Proben aus Erbse und Tomate. Ein ähnliches Verhältnis konnte beim Tyraminumsatz nach einer anfänglichen Lag-Phase von etwa 5 Min. beobachtet werden, weshalb Spinat eindeutig zu bevorzugen war.



**Abb. 3.25 Vergleich der Tyrosinase-Aktivität in verschiedenen nativen Enzympräparaten.**

Die Änderung der Absorption bei 505 nm wurde über 10 Min. (Dopamin) bzw. 20 - 60 Min. (Tyramin) bei RT verfolgt (2.5.9.2, 200 µl Gesamtvolumen). Da diese Messungen zeitlich vor der Optimierung des MBTH-Assays stattfanden, ergeben sich hier Abweichungen von den in Kapitel 3.2.2.1 beschriebenen Parametern.

**A: Monophenolhydroxylase- und Diphenoloxidaseaktivität in Apfel- und Kartoffelextrakten.**

Gemessen wurden je zwei alternative Proben (1 und 2). Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden mit Hilfe des BCA-Assays (2.5.2.3) ermittelt. Die Ansätze enthielten 41 - 86 mM Na-Phosphat (pH 7.0), 0.5 mM MBTH, 2 mM Dopamin bzw. 1 mM Tyramin und folgende Gesamtproteinmengen: **A1, A2:** 9 µg (Dopaminkinetik), 100 µg (Tyraminkinetik). **K1, K2:** 90 µg (Dopaminmessung), 1 mg (Tyraminmessung). Die Daten wurden auf 1 µg Gesamtprotein normiert.

**B: Aktivitätsvergleich in Erbsen-, Tomaten- und Spinat-Thylakoiden.**

Die Thylakoide wurden, wie in 2.5.7.1 und 2.5.7.2 beschrieben, hergestellt und wie folgt für die Aktivitätsmessung vorbereitet. Aliquots à 0.2 mg/ml Chl *a/b* wurden 3 Min. bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, das Präzipitat in je 90 µl 10 mM TRIS/HCl (pH 8.0) und 150 mM NaCl resuspendiert (Ultraschall), erneut zentrifugiert und je 20 µl des Überstandes in die Kinetiken eingesetzt. Zusätzlich enthielten die Ansätze 77 mM Na-Phosphat (pH 7.0), 0.5 mM MBTH und 1 mM Dopamin bzw. Tyramin als Substrat. Vergleichbare Resultate konnten nach Solubilisierung der Thylakoide in SDS erzielt werden. **E:** Erbse. **T:** Tomate. **S:** Spinat.

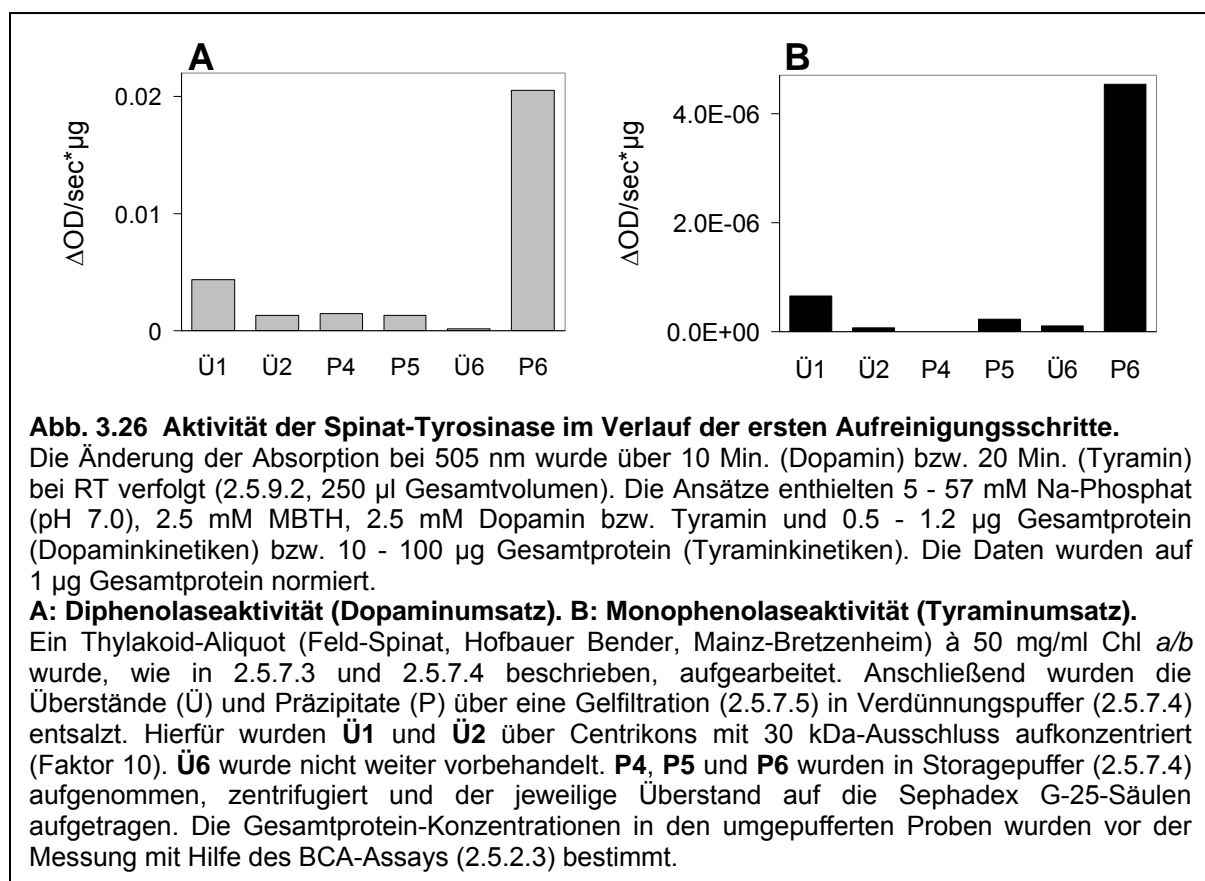
## 3.5.2 Native Tyrosinase aus Spinat

Es folgte eine weitere Aufarbeitung der Thylakoide aus Spinatblättern. Die ersten Aufreinigungsschritte wurden dabei nach Zer *et al.* (1999) durchgeführt und zunächst auf eine Anreicherung der Tyrosinaseaktivität hin überprüft, da das Protokoll ursprünglich für die LHCII-Kinase aus Spinat entwickelt worden war. Es war jedoch bereits bekannt, dass sich eine PPO zusammen mit der LHCII-Kinase aufreinigen ließ (Sokolenko *et al.*, 1995), daher wurde auf diese Reinigungsmethode zurückgegriffen.

### 3.5.2.1 Charakterisierung der Proben aus den ersten Aufreinigungsschritten

Im Verlauf der drei ersten Arbeitsschritte wurden die Thylakoidmembranen gewaschen, die Überstände (Ü1 - Ü3) verworfen und die jeweiligen Präzipitate (P) weiter verwendet (2.5.7.3). Nach der Solubilisierung der Membranen blieben die integralen und eventuell an die Membran assoziierten Proteine in Lösung und konnten im Anschluss an eine Ultrazentrifugation aus dem Ü4 mit Hilfe von Ammoniumsulfat (AMS) fraktioniert ausgefällt werden (2.5.7.4). Die im ersten Fällungsschritt präzipitierten Proteine wurden verworfen (P5). Ü5 wurde weiter mit AMS gesättigt, sodass nach der abschließenden Zentrifugation die

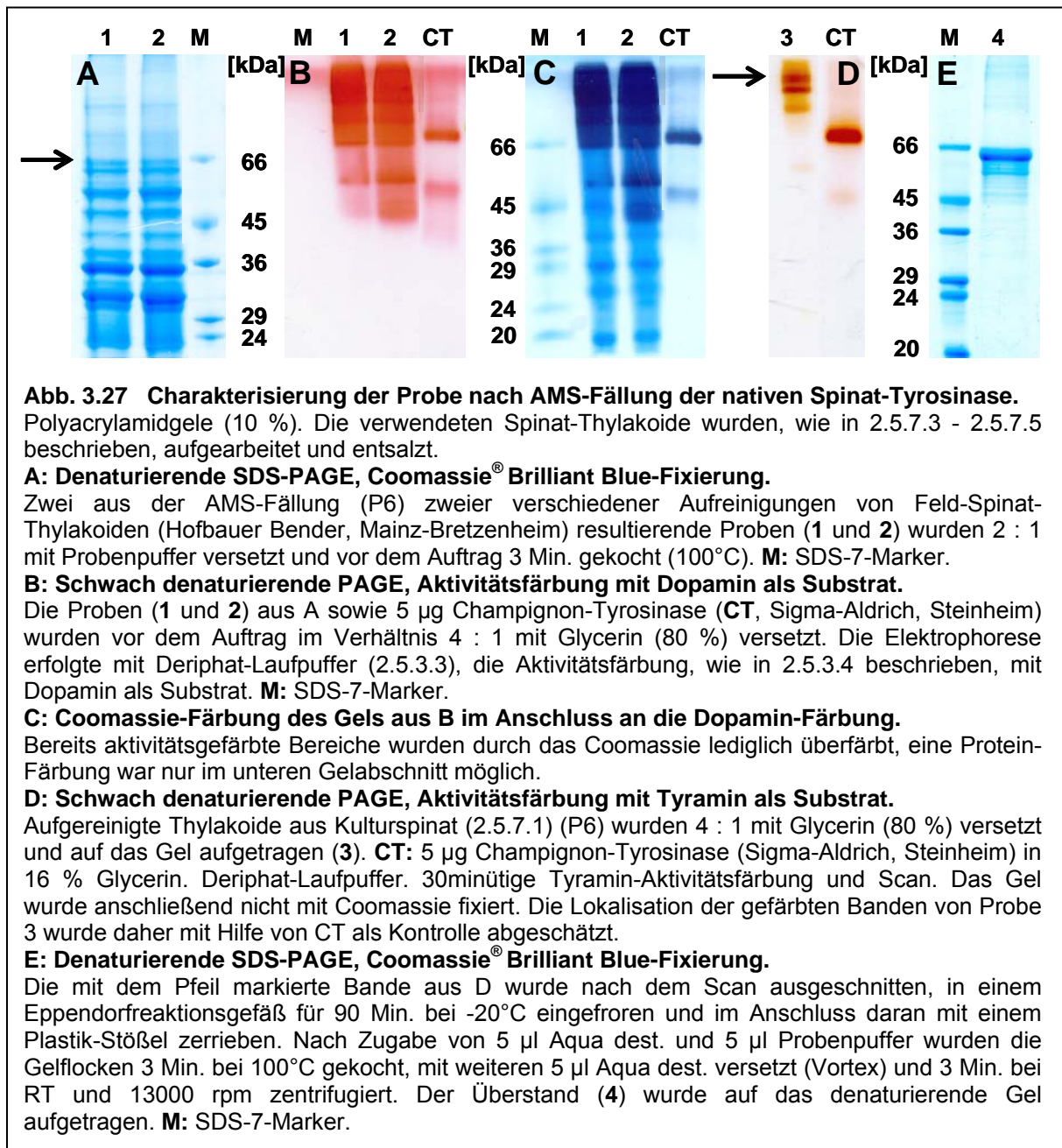
gewünschten Proteine im P6 enthalten waren. Die bei den einzelnen Aufreinigungsschritten verworfenen Proben-Anteile (Ü1, Ü2, P4, P5 und Ü6) wurden jeweils sowohl auf Monophenolase- als auch Diphenolase-Aktivität hin überprüft und mit dem vorläufigen Endprodukt aus der Ammoniumsulfatfällung (P6) verglichen. Ü3 wurde nicht untersucht, da der 3. Waschschrift lediglich eine Wiederholung des vorangegangenen darstellte. Abb. 3.26 zeigt eine deutliche Anreicherung der Aktivität in P6, der Probe, mit der später weitergearbeitet werden sollte. Das verwendete Protokoll erwies sich also für die Aufreinigung der Spinat-Tyrosinase als geeignet.



Zur weiteren Charakterisierung der Probe (P6) wurde diese elektrophoretisch aufgetrennt. Abb. 3.27 A zeigt die Auftrennung von denaturierten Proben (1 und 2) aus zwei unterschiedlichen Feld-Spinat-Aufreinigungen in mehr als zehn Banden. Die Bandenverteilung war in beiden Proben identisch und auch das Intensitätsverhältnis der einzelnen Banden zueinander sehr ähnlich. Bei anderen Aufreinigungen fiel die hier mit einem Pfeil markierte Bande, für die eine molekulare Masse von etwa 63 kDa berechnet werden konnte, z.T. prominenter aus. Von Sokolenko *et al.* (1995) und Hind *et al.* (1995) wurde ein 64 kDa schweres Protein als PPO identifiziert, was dafür sprach, dass es sich hier eventuell um dieses Enzym handelte.

In Abb. 3.27 B sind dieselben Proben nach einer schwach denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.5.3.3) und anschließender Aktivitätsfärbung mit Dopamin als Substrat (2.5.3.4) gezeigt. Diese Methode bietet durch den Erhalt der nativen Proteinstruktur die Möglichkeit zur Identifizierung enzymhaltiger Banden.





Als Kontrolle für die Farbreaktion, aber auch zur Abschätzung der Lokalisation der Banden diente die Tyrosinase aus Champignon (CT). Zudem wurde das Gel anschließend mit Coomassie® Brilliant Blue fixiert (Abb. 3.27 C), um durch den Protein-Standard einen weiteren Anhaltspunkt für die Lage der Banden zu erhalten. Hier ließen sich einige, enzymatisch aktive hochmolekulare Banden erkennen, deren Masse durch die Abwesenheit von SDS während der Elektrophorese nicht bestimmt werden konnte, die jedoch deutlich  $\geq$  der 66 kDa Marker-Bande in das Gel eingewandert waren. Auch hier variierte die Ausprägung der einzelnen Banden in Abhängigkeit von der Aufreinigung, ein Muster aus hochmolekularen Banden war jedoch immer gegeben. Da sich aufgrund der Intensität der Dopaminfärbung kaum einzelne Banden differenzieren ließen, wurde eine alternative Probe (3) einer Tyraminfärbung unterzogen (Abb. 3.27 D). Hier konnten drei klare Banden abgegrenzt werden, die im Anschluss separat ausgeschnitten und in eine denaturierende

SDS-PAGE eingesetzt wurden. Abb. 3.27 E zeigt eine, unter diesen Bedingungen entstehende, prominente Bande bei etwa 63 - 64 kDa, die aus der in D mit einem Pfeil markierten Bande extrahiert worden war. Die Proteinausbeute aus den übrigen Banden und weiteren Proben war sehr gering, jedoch traten auch hier schwache, meist einzelne Banden zwischen 63 und 65 kDa auf. Dies führte zu der Annahme, dass es sich bei den hochmolekularen aktiven Banden eventuell um Aggregate oder Oligomere eines 64 kDa schweren monomeren Proteins handelte.

### 3.5.2.2 Weiterführende Aufreinigung

Die Aufreinigung der Probe aus der Ammoniumsulfatfällung (2.5.7.4) wurde mit einer Anionenaustausch-Chromatographie (IEX) fortgesetzt (2.5.7.6). Bei Verwendung einer 1 ml Resource Q Säulenmatrix (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde die spezifische Aktivität in den aktiven Fraktionen um einen Faktor 6 angereichert, gleichzeitig jedoch ein großer Protein- und Aktivitätsverlust beobachtet. Die Proteinausbeute in den aktiven Fraktionen lag bei nur 3 %, die Aktivitätsausbeute bei 20 %, bezogen auf die auf die Säule aufgetragene Probe.

Das weiterführende Aufreinigungsprotokoll wurde von M. Gebhardt (2004) entwickelt. Hierbei konnte durch den Einsatz von *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid (LM), unter Verwendung eines größeren Säulevolumens (15 ml, DEAE Sepharose™ Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), bei einem Proteinanteil in den aktiven Fraktionen von etwa 10 %, der Aktivitätsverlust auf weniger als 30 % reduziert werden. Die spezifische Aktivität ließ sich im Verlauf von Anionenaustausch-(DEAE)-, Hydroxyapatit- und Größenausschluss-(Superdex 200)-Chromatographie weiter anreichern. Das Phänomen der vielen hochmolekularen Banden in aktivitätsgefärbten Gelen blieb jedoch auch nach der abschließenden Gelfiltration (Superdex 200) weiterhin bestehen. Erstaunlicher Weise konnten in den aktiven Gelbanden nur minimale Proteinmengen nachgewiesen werden (Gebhardt, 2004). Das im Verlauf der Aufreinigung angereicherte Protein war demnach hochaktiv, jedoch nur in Spuren vorhanden, weshalb sich das erstellte Protokoll nicht zur Reinigung einer größeren Proteinmenge eignete.

## 4 Diskussion

In diesem Kapitel werden sowohl die Expression und Faltungsversuche der beiden rekombinanten pflanzlichen Tyrosinasen aus Spinat und Tomate als auch die ersten Aufreinigungsschritte zur Isolation des nativen Enzyms aus Spinatblättern diskutiert.

### 4.1 Expression rekombinanter Tyrosinasen in *E.coli*

Die Identifizierung geeigneter Expressionsbedingungen für rekombinante Proteine kann sich, auch bei Verwendung eines so gut untersuchten Organismus wie *Escherichia coli*, als äußerst schwierig und zeitaufwendig erweisen, so auch in dieser Arbeit. Dass die Verwandtschaft oder strukturelle Ähnlichkeit von Proteinen keinen unmittelbaren Rückschluss auf deren heterologe Expressierbarkeit zulässt, zeigte sich deutlich bei der Expression zweier Tyrosinasen aus unterschiedlichen Pflanzen.

#### 4.1.1 Vergleich der Expression der PPO A aus Tomate und Spinat

Die PPO A aus Tomate (*Lycopersicon esculentum*) ließ sich mit Hilfe des pDS12-Vektors problemlos in JM101-*E.coli*-Zellen überexprimieren (3.3.1.1, 3.3.2.2). Die in Anlehnung an Paulsen *et al.* (1990) ausgewählten Standardbedingungen (LB-Medium, 1 mM IPTG, 4 Std. Induktion bei 37°C) wurden nicht nur für viele Derivate der Apoprotein-Komponenten von integralen Membranproteinen der pflanzlichen Lichtsammelkomplexe (LHC) erfolgreich verwendet (Hobe *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003a; Mick *et al.*, 2004). Auch die Expression eines wasserlöslichen Chlorophyll-bindenden Proteins (WSCP) war auf diese Weise, in Verbindung mit pDS12-Vektor und JM101-Zellen, möglich (Schmidt *et al.*, 2003). Dagegen konnte die rekombinante Tyrosinase (PPO A) aus Spinat (*Spinacia oleracea*) unter diesen Bedingungen nur in sehr geringem Maße in Bakterien (*E.coli*, JM101) akkumuliert werden (3.4.2.1).

Tab. 4.1 zeigt eine Gegenüberstellung verschiedener Charakteristika der beiden hier verwendeten Proteine und einer jeweiligen Referenz. Verglichen werden dabei die Precursor, deren Bildung bei einer Expression zu erwarten war, nicht die maturen Proteine. Molekulargewicht (MW), Isoelektrischer Punkt (pI) und Hydropathiewerte (GRAVY) lassen sich auf der Grundlage der Aminosäuresequenz eines Proteins berechnen ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)), sind jedoch vorsichtig zu bewerten, da experimentell ermittelte Daten, aufgrund nicht vorhergesagter Faltungsmotive oder posttranslatinaler Modifikationen, oftmals stark von den theoretischen Vorgaben abweichen (Colangeli *et al.*, 1998; U. Salzbrunn, persönliche Mitteilung). Hier dienen sie als Anhaltspunkt für die Ähnlichkeit der Proteine.

Bei der mit Hilfe des Konstruktes pDS12-ppoA-His exprimierten PPO A aus Tomate handelt es sich um das stark modifizierte Protein, das in Kapitel 3.3.3.2 detailliert beschrieben wird. Es weist aufgrund seiner Verkürzung ein geringeres Molekulargewicht (67 kDa) auf als die

Referenz (70.6 kDa, Q08303), abgesehen davon werden jedoch vergleichbare Eigenschaften, wie ein  $pI > 7$  und ein insgesamt eher hydrophiler Charakter (GRAVY = -0.4) vorhergesagt. Zwischen diesem Protein und der PPO A aus Spinat (pDS12-PhxA-His-Arg2) beträgt die Sequenzidentität auf AS-Ebene 36 % (Anhang: Sequenzierungen: Tomate - Spinat). Eine solche Heterogenität fällt bei einem Vergleich der Primärstruktur von Tyrosinasen allgemein auf. Die Identität der Primärsequenz der Spinat-PPO und anderer pflanzlicher Polyphenoloxidasen beträgt 30 und 40 % (Sokolenko *et al.*, 1995). Lediglich die zentralen Kupfer-Domänen sind in allen Organismen konserviert. Ein Gegenbeispiel für eine sehr hohe Sequenzidentität von 92 % liefern Kartoffel- und Tomaten-PPO (van Gelder *et al.*, 1997).

	PPO A aus Tomate		PPO A aus Spinat		Lhcb1 aus Erbse
	ppoA	Q08303	PhxA-His-Arg2	P43310	P07371
<b>ΣAS</b>	601	630	647	639	269
<b>MW [kDa]</b>	67.0	70.6	74.1	73.2	28.7
<b>pI</b>	7.55	7.21	6.11	5.89	5.47
<b>GRAVY</b>	-0.427	-0.324	-0.691	-0.658	-0.072

**Tab. 4.1 Vergleich der PPO A aus Tomate und Spinat und Lhcb1 aus Erbse.**

Die Parameter wurden mit Hilfe der ProtParam-Funktion ([www.expasy.org/tools/protparam.html](http://www.expasy.org/tools/protparam.html)) auf der Grundlage der jeweiligen Aminosäuresequenz ermittelt. In allen Fällen handelt es sich um die Precursor-Proteine, inklusive Transit-Peptid. **ΣAS**: Aminosäureanzahl. **MW**: aus der Sequenz berechnetes, theoretisches Molekulargewicht. **pI**: theoretischer, aus der Sequenz ermittelter Isoelektrischer Punkt. **GRAVY**: Grand average of hydropathicity, Summe aller Hydropathiewerte der einzelnen AS dividiert durch ΣAS, bestimmt nach Kyte und Doolittle (1982). Der Berechnung liegen die Hydropathiewerte zugrunde, die, wie im Anhang angegeben, den 20 Aminosäuren zugeordnet sind. Unpolare AS erhalten dabei positive, polare Aminosäuren negative Werte.

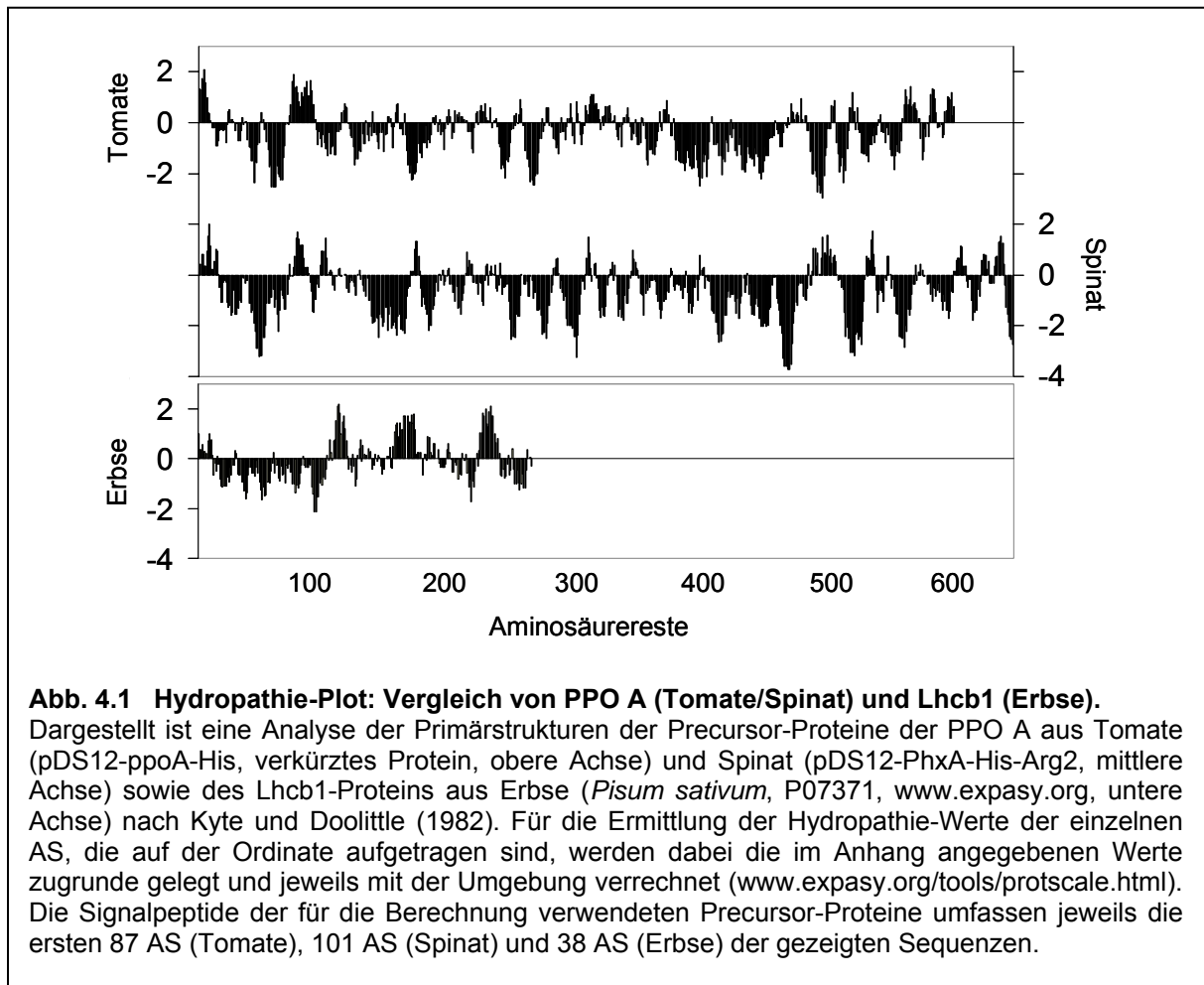
**ppoA**: aus dem pDS12-ppoA-His-Konstrukt resultierendes verkürztes Protein. **Q08303**: im ExPASy-Proteomics Servers ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), Gasteiger *et al.*, 2003) indizierte Proteinsequenz der PPO A aus Tomate (Newman *et al.*, 1993). **PhxA-His-Arg2**: resultierendes Protein aus dem Klon pDS12-PhxA-His-Arg2. **P43310**: PPO A aus Spinat (Hind *et al.*, 1995, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). **P07371**: AB80 (LHCII Typ I CAB-AB80) aus Erbse, *Pisum sativum* (Cashmore, 1984, [www.expasy.org](http://www.expasy.org)), entspricht, abgesehen vom dort fehlenden Transit-Peptid, dem Lhcb1-Wildtyp, d.h. dem Klon D7f.3 (Dilly-Hartwig *et al.*, 1998).

Dennoch hat das Spinat-Protein, trotz der geringen Übereinstimmung auf Sequenzebene, bei einem höheren MW (74.1 kDa) und niedrigeren  $pI$  ( $\sim 6$ ), einen ebenfalls hydrophilen Gesamtcharakter (GRAVY = -0.7), der sich in einem Hydropathie-Plot (Abb. 4.1) verdeutlichen lässt.

Zum qualitativen Vergleich ist in Tab 4.1 und Abb. 4.1 das Lhcb1-Protein aus Erbse (*Pisum sativum*) angegeben. Im Hydropathie-Plot sind deutlich die drei Transmembranhelices dieses integralen Proteins aus der Thylakoidmembran zu erkennen. Auch der mittlere Hydropathiewert (GRAVY = -0.07) unterscheidet sich eindeutig von dem der Tyrosinasen und zeigt den hydrophoben Charakter des Proteins an.

Diese Daten sprechen prinzipiell für eine äquivalente Löslichkeit beider PPO A-Proteine und geben keinen Aufschluss darüber, weshalb die Expression der PPO A aus Spinat im Gegensatz zu der des Tomaten-Proteins so problematisch war. Versuche zur Verbesserung der rekombinanten Proteinherstellung, anhand von Modifikationen der für die Expression möglicherweise kritischen Bereiche des Vektor-Gen-Konstruktes (3.4.2.2, 3.4.2.3), führten

ebenso wie eine Variation der Parameter (Medium, Glucose- und IPTG-Konzentration, Temperatur und Induktionsdauer, 3.4.2.4) zu keinem Fortschritt.



Der Erfolg bei der Überexpression des Spinat-Enzyms war dem Wechsel des Expressionssystems (3.4.3) und einer anschließenden Anpassung der Expressionsbedingungen zu verdanken (3.4.3.2).

#### 4.1.2 Optimierung der Expressionsbedingungen

Die Vorteile des pET-Vektor-Expressionssystems (Abb. 2.3) werden in Abschnitt 2.4.1.1 und 3.4.3 erläutert. Tatsächlich findet die Kombination aus pET-Vektoren und Derivaten der BL21(DE3)-Zellen vielfach Verwendung bei der Expression der unterschiedlichsten Proteine (Baneyx und Mujacic, 2004). In Vergleichsstudien setzten sich BL21(DE3)-Zellen z.T. deutlich gegen andere Bakterienstämme durch (Shiloach *et al.*, 1996; Choi und Lee, 1997; Corisdeo und Wang, 2004). Zusätzlich zur spezifischen Induzierbarkeit der T7-RNA-Polymerase (Tabor und Richardson, 1985) trägt vermutlich in erster Linie die Abwesenheit von *Lon*- und *OmpT*-Proteasen, die u.a. eine Degradation der T7-RNA-Polymerase verhindert (Tabor und Richardson, 1985; Grodberg und Dunn, 1988), in diesen Zellen zur Effizienz des Systems bei. *Lon*, eine ATP-abhängige Serinprotease, ist im bakteriellen

Cytoplasma hauptverantwortlich für den Abbau instabiler Proteine (Tomoyasu *et al.*, 2001). *OmpT* (outer membrane protease) ist eine in der äußeren Bakterienmembran lokalisierte Protease, die die Fähigkeit besitzt, Proteine aus Inclusion Bodies auch unter stark denaturierenden Bedingungen zu degradieren (White *et al.*, 1995).

#### 4.1.2.1 Auswahl geeigneter Bakterienzellen

Bei der Expression der Spinat-Tyrosinase führte bereits der Einsatz der BL21(DE3)-Standard-Zellen zum gewünschten Erfolg, daher konnte auf eine mögliche weitere Verbesserung der Überexpression in den ebenfalls transformierten, abgeleiteten Stämmen, BL21(DE3)pLysE und Rosetta(DE3), verzichtet werden (3.4.3.1, 3.4.3.2). Die Beispiele für Proteine, die gezielt in spezifisch abgewandelten Zelllinien exprimiert wurden, sind vielfältig (Jensen *et al.*, 1999; Kohashi *et al.*, 2004). So gelangen die Expressionsversuche der Catechol-Oxidase (*ibCO*) aus *Ipomoea batatas* (Süßkartoffel) in BL21(DE3)-Zellen nicht, sondern waren erst in Origami(DE3)pLysS erfolgreich (Greving, 2003). Ebenso gibt es ausreichend Belege rekombinanter Expression in JM101-Zellen (Li und Taylor, 1994) und den verschiedensten anderen Bakterienstämmen (JM109, Broedel *et al.*, 2001; DH5 $\alpha$ , Yoon *et al.*, 2002; JM109/M15, Wichers *et al.*, 2003). Für den Ausgleich seltener tRNA-Moleküle, der mit dem Stamm Rosetta(DE3) möglich gewesen wäre, reichte z.B. in DH5 $\alpha$ -Zellen die Einschleusung eines einzelnen tRNA-Gens aus (Hieber *et al.*, 2002).

#### 4.1.2.2 Einfluss von Medium und Glucosekonzentration auf die Expression

Auch für die Wahl der Expressionsbedingungen existiert kein Erfolgsrezept. Der nicht vorherzusehende Einfluss, den ein einzelner Parameter auf die Überexpression haben kann, kann irrelevant und variabel wählbar oder aber sehr kritisch sein.

In den hier für die Herstellung der Spinat-PPO A untersuchten Medien wurden zwar unterschiedliche Proteinausbeuten erzielt, diese waren jedoch in erster Linie abhängig von der eingesetzten Glucosekonzentration (3.4.3.2). Eine Glucosezugabe erwies sich als essentiell. Die Kombinationen aus LB-Medium und 50 mM Glucose sowie 2xTY-Medium und 100 mM Glucose waren optimal, wohingegen in M9-Minimalmedium kaum rekombinantes Protein gebildet wurde. Während diese Parameter hier relativ variabel waren, wurde die Verwendung von NZCYM-Medium für die Überexpression des One Helix Proteins (OHP) aus *Arabidopsis thaliana* als essentiell identifiziert. Die Konzentration an Glucose zeigte sich dabei als kritisch, sodass 20 - 50 mM ein gutes Ergebnis lieferten, 100 mM die Expression jedoch vollständig verhinderten (Raunser, 2000). Die Wahl der geeigneten Nährstoffkombination ist insofern schwierig, als ein sehr gutes bakterielles Wachstum nicht immer mit einer hohen Produktionsrate des Fremdproteins korreliert ist (Broedel *et al.*, 2001).

#### 4.1.2.3 Beeinflussung der Überexpression durch die Temperatur

Unter dem gleichen Aspekt ist die Auswahl der Anzucht-Temperatur zu betrachten. Eine Absenkung von 37°C, der optimalen Wachstumstemperatur von *E.coli*-Bakterien, auf Temperaturen zwischen 18°C und 30°C zum Zeitpunkt der Induktion kann die Bildung löslichen Proteins gegenüber einer Aggregation zu Inclusion Bodies begünstigen (Kong *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Skerra und Schmidt, 2000; Yoon *et al.*, 2002; Yang *et al.*,

2003b). Dies wurde hier mit dem Strep-Tag-Derivat der PPO A aus Tomate bei 28°C (3.3.2.3) bzw. dem unmodifizierten Tomaten-Protein bei 18°C (3.3.1.2) angestrebt. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant, was im Nachhinein nicht verwunderlich war, nachdem sich die vermeintlich detektierte rekombinante Strep-Tag-PPO A als bakterielles Protein herausgestellt hatte (3.3.3.2). Andererseits vermag eine Variation der Temperatur auch dann die Menge der gebildeten Inclusion Bodies zu beeinflussen, wenn gar kein lösliches Protein erzeugt wird. Eine Temperatur-Erniedrigung kann dabei ebenso erfolgreich sein (30°C-Optimum, 37°C keine Expression; Boronowski, 1999) wie eine Erhöhung (40°C besser als 37°C; Choi und Lee, 1997). Bei der Spinat-Tyrosinase, wie dem OHP (Raunser, 2000), erwiesen sich 37°C als vorteilhaft gegenüber 25°C, 30°C oder 42°C (3.4.2.4, 3.4.3.2).

#### 4.1.2.4 Einfluss der Induktorkonzentration

Über den Induktionszeitpunkt innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien ( $OD_{700nm} \sim 0.5$ ) scheint ein allgemeiner Konsens zu herrschen. Abweichend davon wurde die Expression in Versuchen von Galloway *et al.* (2003) durch eine spätere, bei Choi und Lee (1997) durch eine frühere Induktion begünstigt. Die Konzentration des Induktors (IPTG) kann ebenfalls Auswirkungen auf die Menge des heterolog exprimierten Proteins haben. Hohe IPTG-Konzentrationen vermögen die Expressionsrate z.T. zu steigern, durch die Akkumulation der Proteine jedoch auch deren Faltung zu verhindern. Hat die Expression daher ein lösliches Protein zum Ziel, kann sich die Senkung der Rate, durch Verzicht auf hohe Induktor-Konzentrationen, bei einer Einschränkung der Gesamtproduktion rekombinanten Proteins, positiv auf die Faltung und Löslichkeit auswirken (Broedel *et al.*, 2001). Dieser Aspekt hatte hier jedoch, ähnlich wie bei Corisdeo und Wang (2004), keinen merklichen Einfluss auf die Expressionseffizienz (3.4.2.4, 3.4.3.2). Von Boronowski (1999) wurde dagegen eine Optimumskurve mit einem Maximum bei 0.4 mM IPTG beobachtet. In anderen Arbeiten sind ebenfalls IPTG-Effekte beschrieben worden (Reyda *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001).

#### 4.1.2.5 Induktionskinetik

Während die Zeitspanne der Inkubation einer Bakterienkultur bis zur Induktion mit dem Animpfverhältnis (Vorkulturvolumen : Gesamtkulturvolumen) korreliert ist und über die Streuung der Zellsuspension photometrisch ( $OD_{700nm}$ ) kontrolliert und entsprechend angepasst werden kann, ist die Inkubationszeit der induzierten Kultur weitaus kritischer. Instabile Proteine oder Intermediate werden bei zu langem Verbleib im bakteriellen Zellmilieu von den dort vorhandenen Proteasen abgebaut, während die Produktion stabiler Proteine und besonders solcher, die in unlöslichen Aggregaten (IB) geschützt vorliegen, durch eine Ausdehnung der Induktion gesteigert werden kann. So wurde von Sanchez-Amat *et al.* (2001) und Greving (2003) ein Abbau des rekombinanten Proteins bereits ab einer Inkubation von mehr als 30 Min. beobachtet, während dieser Effekt in anderen Fällen deutlich später einsetzte (> 3 Std., Raunser, 2000; > 23 h, Choi und Lee, 1997) und innerhalb des bei der Expression der Spinat-PPO A untersuchten Zeitraumes von bis zu 6.5 Std. (3.4.3.2) bzw. 8 Std. (3.4.2.4) gar nicht auftrat.

#### 4.1.2.6 Fazit aus den Optimierungsversuchen zur Proteinexpression

Trotz der Notwendigkeit einer speziellen Optimierung der Expressionsbedingungen für jedes rekombinante Protein, lässt sich aus der Fülle der Parameter ein gewisser Standard formulieren, der eventuell als Anhaltspunkt für die Etablierung eines neuen Expressionssystems dienen kann. Eine Kombination aus pET-Vektoren und BL21(DE3)-Zellen mit einer Induktion durch 1 mM IPTG in LB-Medium bei 37°C für 3 - 4 Std. (Charbonnier *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003) ist vermutlich nicht immer optimal, in vielen Fällen lässt sich jedoch durch eine geringfügige Abwandlung der Faktoren, wie hier für die Spinat-Tyrosinase gezeigt werden konnte, bereits ein Erfolg herbeiführen.

Aufgrund der bereits nach einigen ersten Optimierungsschritten erzielten guten Überexpression des PPO A-Proteins (3.4.3.2), wurden keine weiteren Versuche zur Verbesserung der Ausbeute des IB-Proteins durchgeführt. Als Möglichkeiten hierfür standen eine Erhöhung der Temperatur auf > 37°C, z.B. 40 - 42°C, eine Modifikation der Belüftung oder Inkubationszeit der Bakterienkultur bis zur Induktion oder eine Zugabe des Cofaktors (Kupfer, in Form von Cu<sup>+</sup> oder Cu<sup>2+</sup>) zu den induzierten Zellen zur Wahl.

Die Forschung der letzten Jahre hat zu einem besseren Verständnis der Mechanismen geführt, die von Bakterien zur Proteinfaltung verwendet werden (Baneyx und Mujacic, 2004). Wie sich diese auch für die Faltung und damit die Herstellung funktioneller rekombinanter Proteine und Vermeidung der Bildung unlöslicher Aggregate in *E.coli* ausnutzen bzw. sinnvoll ergänzen lassen, wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

#### 4.1.3 Bedeutung von Cofaktoren für die heterologe Expression

Dass rekombinant exprimierte Proteine in Bakterien in Form unlöslicher Aggregate (IB) angereichert werden, ist keine Seltenheit und wird durch die Verwendung starker Promotoren und hoher Induktor-Konzentrationen (IPTG), mit denen sich eine hohe Expressionseffizienz von bis zu 50 % des Bakterien-Totalproteins erzielen lässt, noch verstärkt (Lottspeich, 1998; Baneyx und Mujacic, 2004). Bei ihrer Entstehung wirken vermutlich eine zu hohe Proteinkonzentration und das für die Faltung und Ausbildung von Disulfidbrücken mitunter ungünstige Milieu der bakteriellen Zelle zusammen. Während vor einigen Jahren noch kein Zusammenhang zwischen dem Expressionssystem oder spezifischer Charakteristika der exprimierten Proteine und ihrer Anreicherung in Form von Aggregaten hergestellt werden konnte (Rudolph und Lilie, 1996), scheint es jetzt Hinweise auf eine Korrelation der Primärstruktur bzw. bestimmter Eigenschaften (Thermostabilität, Gehalt bestimmter AS (Asn, Thr, Tyr)) und der Löslichkeit der entstehenden rekombinanten Proteine in *E.coli* zu geben. So begünstigt z.B. ein hoher  $\alpha$ -helicaler Strukturanteil offenbar die Löslichkeit, wohingegen gehäufte  $\beta$ -Faltblatt-Motive dem entgegenwirken (Idicula-Thomas und Balaji, 2005). Die Ursachen hierfür sind jedoch ungeklärt.



#### 4.1.3.1 Expression bakterieller Tyrosinasen

Bei der Wahl eines prokaryotischen Wirtsorganismus zur Expression eukaryotischer Proteine entfällt die Möglichkeit, die in den eukaryotischen Zellen vorhandene Maschinerie zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen auch für die Reifung des rekombinanten Proteins ausnutzen zu können. In manchen Fällen sind solche Modifikationen oder auch Faltungshelfer (Chaperone) jedoch unersetzlich bei der Herstellung des funktionellen Proteins. Dies kann auch für heterolog in *E.coli* exprimierte Proteine aus anderen Mikroorganismen gelten. So wird z.B. die Tyrosinase (MelC2) aus den gram-positiven Bakterien *Streptomyces antibioticus* oder *Streptomyces castaneoglobisporus*, die *in vivo* in einem Operon zusammen mit einem zusätzlichen ORF (MelC1) organisiert ist (Katz *et al.*, 1983), in *E.coli* nur bei gleichzeitiger Coexpression dieses zweiten Proteins funktionell exprimiert (Katz *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1988; Betancourt *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1992). Es konnten Heterodimere, bestehend aus diesen beiden Proteinen, isoliert werden, die auf eine Assoziation schließen lassen (Chen *et al.*, 1993; Kohashi *et al.*, 2004), die zumindest für den Einbau des Kupfers und die damit einhergehende Aktivierung der Tyrosinase notwendig ist (Tsai und Lee, 1998).

Kürzlich wurde zum ersten Mal auch in einem gram-negativen Bakterium ein ähnliches Tyrosinase-Operon identifiziert. Das *ppoB*-Operon des marinen, melanogenen Bakteriums, *Marinomonas mediterranea*, das erstmals von Solano *et al.* (1997) beschrieben worden ist, besteht ebenfalls aus zwei ORFs (López-Serrano *et al.*, 2004). *ppoB1* codiert für die Tyrosinase (López-Serrano *et al.*, 2002), während *ppoB2* für ein 250 AS-Protein codiert, das am Kupfer-Transport zur Apo-Tyrosinase beteiligt ist. Dessen Sequenz ist jedoch nicht homolog zu dem Metallochaperon aus dem *Streptomyces*-Operon, sondern vielmehr zu kleinen Proteinen in etlichen gram-negativen Bakterien, die eventuell eine neue Art von Metallochaperonen darstellen (López-Serrano *et al.*, 2004).

#### 4.1.3.2 Expression der Tyrosinasen bei Säugern

Weitaus komplexer gestaltet sich das bisher bekannte Szenario zur Entstehung der aktiven humanen oder Maus-Tyrosinase. Drei der daran beteiligten Proteine sind die Tyrosinase (TYR) selbst, die vom *Tyr/albino*-Locus codiert wird (Tamate *et al.*, 1985; Kwon *et al.*, 1987; Müller *et al.*, 1988; Hearing und Tsukamoto, 1991), sowie die Tyrosinase-related proteins 1 und 2 (TRP1 und TRP2, *Tyrp1/brown*- bzw. *Tyrp2/slaty*-Locus; Shibahara *et al.*, 1986; Jackson, 1988; Jackson *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1992; Manga *et al.*, 2000). Diese integralen Membranproteine sind vermutlich in einem funktionellen Komplex in den Melanosomen lokalisiert und besitzen spezifische Funktionen bei der Entstehung des Melanins (Kobayashi *et al.*, 1998). Neben der bekannten Tyrosin-Hydroxylase- und DOPA-(3,4-Dihydroxyphenyl-alanin)- sowie DHI-(5,6-Dihydroxyindol-)-Oxidase-Aktivität der Tyrosinase (Körner und Pawelek, 1982; Hearing, 1987; Tripathi *et al.*, 1992), fungiert TRP2 als DOPACHrom-Tautomerase, die DOPACHrom in DHI-2-Carboxylsäure (DHICA) umwandelt (Jackson *et al.*, 1992; Tsukamoto *et al.*, 1992) und TRP1 als DHICA-Oxidase (Jiménez-Cervantes *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994). Über diese katalytischen Funktionen hinaus spielen die TRPs eine Rolle bei der Stabilisierung und Regulation der Tyrosinase. Kobayashi *et al.* (1998) konnten bei Coexpression beider Proteine eine TRP1-vermittelte Verminderung

des Abbaus der TYR nachweisen, während Manga *et al.* (2000) eine zusätzlich stabilisierende Wirkung des TRP2 zeigen konnten.

Posttranslationale Modifikationen nehmen ebenfalls Einfluss auf die Faltung und Aktivität der humanen Tyrosinase. So wurden für die Prozessierung essentielle Glykosylierungen (Branza-Nichita *et al.*, 2000; Petrescu *et al.*, 2000; Olivares *et al.*, 2003) und die diesbezügliche Interaktion des Enzyms mit Calnexin und  $\alpha$ -Glucosidase II (Branza-Nichita *et al.*, 1999) nachgewiesen. Dabei wird die korrekte Faltung der Tyrosinase im Endoplasmatischen Retikulum (ER) offenbar über deren Substrate, Tyrosin und DOPA, reguliert (Halaban *et al.*, 2001). Die Aktivierung des Enzyms durch Phosphorylierung zweier Serin-Reste wurde von Park *et al.* (1999) gezeigt, wobei letztere eine Komplexbildung von TRP1 und TYR zu initiieren scheint (Wu und Park, 2003).

#### 4.1.3.3 Expression pflanzlicher Tyrosinasen

Bisher fehlt jeder Hinweis auf eine ähnliche genetische Organisation pflanzlicher Tyrosinasen, sie ist jedoch nicht auszuschließen. Eine Phosphorylierung ist, begründet durch die benachbarte Lokalisation z.B. zur LHCII-Kinase (Sokolenko *et al.*, 1995) durchaus denkbar. Dagegen erscheint eine Glykosylierung der pflanzlichen Enzyme eher unwahrscheinlich (García-Borrón und Solano, 2002), da bisher kaum glykosylierte Proteine in Chloroplasten, dem Bestimmungsort der PPO (siehe hierzu 4.3.1), nachgewiesen wurden (Gaikwad *et al.*, 1999).

#### 4.1.3.4 Chaperone und Fusionsproteine

Abgesehen von den spezifischen Faltungshelfern, die, wie hier dargestellt, für die humane Tyrosinase und das entsprechende Enzym aus *Streptomyces* essentiell sind, kann auch die Coexpression bakterieller Chaperone, wie GroEL/GroES oder DnaK/DnaJ/GrpE, und die damit einhergehende Erhöhung deren intrazellulärer Konzentration zur Entstehung funktioneller, rekombinanter Proteine in *E.coli* beitragen (Thomas *et al.*, 1997; Nishihara *et al.*, 1998, 2000; Schlieker *et al.*, 2002; Baneyx und Palumbo, 2003). Neben dieser sind in den vergangenen Jahrzehnten zudem weitere Methoden etabliert worden, die zur Faltung heterolog exprimierter Proteine auf der Ebene der Überexpression beitragen (Baneyx und Mujacic, 2004). Hierzu gehört auch die Fusion des rekombinanten Proteins an ein lösliches Protein, um so dessen Degradation oder Aggregation im bakteriellen Cytoplasma zu verhindern. Im Anschluss an die Zellpräparation kann das Fusionsprotein abgeschnitten und das rekombinante Protein aufgereinigt werden. Auf diese Weise gelang z.B. Pan *et al.* (1999) die Isolation der cytosolischen Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD) aus Reis und Yoon *et al.* (2002) die Expression einer Untereinheit eines humanen Interferon-Rezeptors vom Typ I (IFNAR-2c) in Form von GST(Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen. Yang *et al.* (2003b) erreichten die funktionelle Expression einer Phospholipase aus dem Gift der Seeschlange *Lapemis hardwickii* in *E.coli* durch Fusion an Thioredoxin.

Darüber hinaus kann es sich als vorteilhaft erweisen, das rekombinante Protein durch Fusion an ein Leader-Peptid aus dem Cytoplasma auszuschleusen und damit aus dessen reduzierender Umgebung zu entfernen. Die Zielsteuerungs-Sequenzen werden an den

N-Terminus des Proteins angefügt und können nach dem Export, der wahlweise über den bakteriellen Sec-, SRP (signal recognition particle)- oder Tat (twin arginine)-abhängigen Sekretionsweg vermittelt wird, proteolytisch entfernt werden (Baneyx und Mujacic, 2004). Die Art der Translokation wird bedingt durch die Struktur des Transit-Peptids. Ein prominentes Beispiel einer für den Sec-Exportweg eingesetzten Sequenz, stellt der PelB-Leader dar, der in vielen pET-Vektoren Verwendung findet (Novagen, 2002).

Die oxidierende Umgebung des Periplasmas begünstigt die Ausbildung von Disulfidbrücken, die zusätzlich durch periplasmatische oder membranständige Chaperone (DsbA, DsbB, DsbD, Skp) und zwei Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen (DsbC und DsbG) unterstützt wird (Schäfer *et al.*, 1999; Hiniker und Bardwell, 2003). Daher enthalten *E.coli*-eigene sekretorische Proteine zumeist Disulfidbrücken, während die Cysteine der cytosolischen Proteine der Bakterien keine Wechselwirkungen miteinander eingehen (Hiniker und Bardwell, 2003). Da in bakteriellen Proteinen zudem deutlich weniger derartige Verbindungen vorhanden sind als in eukaryotischen Proteinen, ist die bakterielle Maschinerie zur Ausbildung von Disulfidbrücken für deren Faltung eventuell nicht ausreichend (Rudolph und Lilie, 1996). In einem solchen Fall kann eine Coexpression der beteiligten Bakterien-Proteine einen positiven Effekt auf die Stabilität und Löslichkeit heterolog exprimierter Proteine in *E.coli* haben, wie bereits mehrfach gezeigt wurde (Hayhurst und Harris, 1999; Bothmann und Pluckthun, 2000; Kurokawa *et al.*, 2001).

Die verschiedenen Ansätze zur Begünstigung der Faltung rekombinant exprimierter Proteine lassen sich außerdem vielfältig kombinieren.

#### 4.1.3.5 Überexpression des PPO A-Proteins aus Spinat

Diese Strategien wurden bei der Expression der Spinat-PPO A nicht verfolgt, da hier stattdessen der Versuch gemacht wurde, das Enzym ausgehend von Inclusion Bodies, die in großer Menge in den Bakterienzellen akkumuliert werden konnten (3.4.3.3), zurückzufalten. Diese Proteinaggregate sind sehr stabil, sowie wenig anfällig für Proteasen und enthalten einen großen Anteil an relativ reinem Protein (Rudolph und Lilie, 1996; Li *et al.*, 2004). Nach der erfolgreichen Überexpression des Proteins, war es leichter, die anschließenden Faltungsversuche, die im nachfolgenden Kapitel (4.2) diskutiert werden, zu variieren, als das PhxA-Gen wiederum in ein neues Expressionssystem zu integrieren oder gar auf einen eukaryotischen Wirtsorganismus, Hefe-, Insekten- oder Säugerzellen, auszuweichen. Bei der Auswahl des pET-Vektors wurde die Verwendung einer Leader-Sequenz zur Ausschleusung des Proteins in den periplasmatischen Raum oder das extrazelluläre Medium in Erwägung gezogen, jedoch aufgrund unpassender Restriktionsschnittstellen nicht realisiert (3.4.3.1). Wollte man diesen Ansatz dennoch verfolgen, stünde ebenso wie für eine eventuelle Coexpression mit bakteriellen Chaperonen zunächst eine Mutagenese (2.4.4.4) des PhxA-Gens zur Anpassung der vorhandenen Schnittstellen an das entsprechende Plasmid an. Eine erfolgreiche Klonierung und Transformation bietet allerdings auch hierbei keine Garantie für eine Unterstützung der Faltung und Löslichkeit des rekombinanten Proteins. So kann z.B. ein ineffizienter Export, bedingt durch eine mangelhafte Erkennung des Leader-Peptids von der Transportmaschinerie, den Abbau oder die Aggregation des Proteins herbeiführen, was im besten Fall wiederum lediglich eine Akkumulation von Inclusion Bodies

im Cytoplasma zur Folge hätte (Greving, 2003; Baneyx und Mujacic, 2004; Hippmann, 2005). Auch eine Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von Chaperonen kann sich in manchen Fällen, etwa durch Begünstigung einer posttranslationalen gegenüber einer cotranslationalen Prozessierung, negativ auf die Faltung des rekombinanten Proteins auswirken (Agashe *et al.*, 2004).

Bei einem Versuch, den Anteil an löslichem und möglicherweise korrekt gefaltetem PPO A-Protein zu erhöhen, würden sich daher zunächst eher die schon in Abschnitt 4.1.2 dargestellten Variationen der Expressionsbedingungen, wie Senkung der Temperatur ab dem Zeitpunkt der Induktion und Reduktion der IPTG-Konzentration anbieten, da die Expressionsrate generell negativ mit der Proteinfaltung in *E.coli* korreliert ist (Rudolph und Lilie, 1996). Aus Experimenten von Hind *et al.* (1995), das PhxA-Gen in BL26(DE3)- oder RT11-Zellen zu exprimieren, resultierten jedoch auch bei erniedrigter Anzuchttemperatur oder Induktor-Konzentration lediglich Inclusion Bodies.

#### 4.1.3.6 Einfluss von Kupfer auf die rekombinante Expression der Tyrosinase

Die Zugabe des für die enzymatische Aktivität benötigten Cofaktors (im Falle der Tyrosinase: Kupfer) zur Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Induktion stellt eine weitere Variable dar. Dem wurde hier, ohne Erfolg, nur mit dem unmodifizierten Protein aus Tomate nachgegangen (3.3.1.2). Es gibt jedoch, wenn auch wenige, Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung dieser Methode. Durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  zu einer, abgesehen davon unter Standardbedingungen (LB, 37°C, 1 mM IPTG, 2 - 3 Std. Induktion) inkubierten, *E.coli*-BL21(DE3)RIL-Zellkultur gelang Sullivan *et al.* (2004) neben der IB-Produktion die Isolation einer geringen Menge einer aktiven, rekombinanten PPO aus *Trifolium pratense* (Wiesenklee). Gouka *et al.* (2001) erzielten die Faltung einer PPO aus *Acremonium murorum* durch Überexpression des Proteins in *Aspergillus awamori* unter Zusatz von 500  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  in der induzierten Kultur. Ein Vergleich mit der bakteriellen Expression einer pflanzlichen PPO fällt hierbei, aufgrund des abweichenden Expressionssystems, der Überexpression eines Enzyms aus einem Schimmelpilz in einem anderen pilzlichen Organismus, jedoch schwer. Dagegen hatte der Einsatz von  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen während der Induktionsphase auf die Bildung von Inclusion Bodies der humanen extrazellulären Superoxid-Dismutase (EC-SOD) in *E.coli* keinen Einfluss, es konnte kein lösliches Protein isoliert werden (He *et al.*, 2002).

Es existiert keine einheitliche Methode zur Expression rekombinanter Proteine, oder speziell der (pflanzlichen) Tyrosinasen in *E.coli*. Einige Organismen sind gut studiert, sodass z.B. etliche der Faktoren, die an der komplexen Entstehung der humanen Tyrosinase beteiligt sind, bereits identifiziert werden konnten. Beispiele für die erfolgreiche heterologe Expression funktioneller Proteine unter nahezu Standardbedingungen, ohne Einsatz verschiedenster Cofaktoren, sind zwar ebenfalls ausreichend vorhanden, für pflanzliche Tyrosinasen jedoch nur selten gezeigt worden. Daher stellte die erfolgreiche Überexpression der Spinat-PPO A in *E.coli* auch dann einen Erfolg dar, wenn das Protein, wie hier gezeigt, nur in Form von unlöslichen Aggregaten akkumuliert werden konnte. Allerdings gibt es auch für die Faltung von Proteinen keine Garantie. Dies wird im folgenden Kapitel diskutiert.

## 4.2 Rückfaltung rekombinant exprimierter Tyrosinasen

Der Begriff der Rückfaltung bezeichnet die Faltung von Proteinen im Anschluss an eine vorherige vollständige Denaturierung der Polypeptidkette. Diese ist immer dann notwendig, wenn das rekombinante Protein zuvor in Form von Inclusion Bodies isoliert worden ist. Die Rückfaltung erfolgt standardmäßig unter Verwendung einer von drei Methoden - Verdünnung, Austausch des Puffers oder Adsorption an eine Matrix (Li *et al.*, 2004) - denen die Überführung des denaturierten Proteins in eine Umgebung, die dessen native Struktur stabilisiert, gemeinsam ist. Bei den Experimenten zur Rückfaltung der Spinat-PPO A kamen diese unterschiedlichen Strategien alle zur Anwendung (3.4.4.2 - 3.4.4.4). Die Faltungsversuche mit dem fehlerhaften Tomaten-Protein, die prinzipiell ähnlich verliefen (3.3.1.2 und 3.3.2.5), werden im Folgenden nur am Rande berücksichtigt.

### 4.2.1 Solubilisierung von Inclusion Bodies

Zur Auflösung der Proteinaggregate können chaotrope Denaturierungsmittel, wie Harnstoff oder GdnHCl, sowie ionische Detergenzien, z.B. SDS oder N-Laurylsarcosin, verwendet werden (Tsumoto *et al.*, 2003). Während Chaotrope konzentrationsabhängig an Peptidketten binden und flexible ungeordnete Strukturen begünstigen, liegen Proteine in Detergen-Micellen, bei einer Detergenkonzentration oberhalb der CMC, stärker geordnet vor (Tsumoto *et al.*, 2003). Zur Denaturierung werden meist annähernd gesättigte Lösungen von GdnHCl (6 M) oder Harnstoff (6 - 8 M) eingesetzt, wobei ersteres nicht nur aufgrund seiner besseren Solubilisierungs-Fähigkeit bevorzugt wird (Nozaki und Tanford, 1970). In Harnstofflösungen entstehen, bei zu langer Lagerung, vielmehr Cyanat-Ionen, die freie Aminogruppen durch Carbamoylierung blockieren können (Gerding *et al.*, 1971; Hagel *et al.*, 1971; Rudolph und Lilie, 1996; Lottspeich, 1998). Frische Harnstofflösungen sind jedoch problemlos zu verwenden (Colangeli *et al.*, 1998; Rogl *et al.*, 1998; Reyda *et al.*, 1999; López-Vara *et al.*, 2000; Remmert *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2005). Die Spaltung inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken erfordert den Einsatz von Reduktionsmitteln, wie DTT, Glutathion, Cystein, Cystamin oder  $\beta$ -ME (Rudolph und Lilie, 1996).

Die Solubilisierung der Inclusion Bodies des Spinat-PPO A-Proteins erfolgte mit Hilfe einer in der Regel frisch angesetzten, bzw. in Ausnahmefällen nie mehr als wenige Tage alten, 8 M Harnstoff-Lösung, was deren Verwendung ungefährlich machte. Durch den Zusatz von nur 10 mM Reduktionsmittel, DTT oder  $\beta$ -ME, wurde eine fast vollständige Löslichkeit erzielt. Diese Zugabe zeigte sich als essentiell, wenn die Proteinaggregate sich ohne eine Reduktion nicht auflösen ließen. Durch die Verwendung dieser geringen Konzentrationen konnte auf eine Entfernung des Reduktionsmittels vor der Rückfaltung verzichtet werden. Die Auflösung der Aggregate wurde im Vergleich zu Angaben von Rudolph und Lilie (1996) (2 Std., 20°C, siehe auch Tab. 4.2) durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37°C oder 50°C deutlich beschleunigt, sodass sich eine Inkubationszeit von 10 - 15 Min. als ausreichend erwies (2.5.1.4). Während in vielen Veröffentlichungen keine Angaben zur Inkubationszeit gemacht werden, weisen einige Arbeiten auf deutlich längere Inkubationen von bis zu 12 - 24 Std. hin (Xie *et al.*, 1998; Ono *et al.*, 2005). Ob auf diese Weise eine

vollständigere Denaturierung, über die Auflösung der Aggregate hinaus, erzielt werden kann, ist ungewiss.

His- und Strep-Tags werden vielfach nicht in erster Linie zur Faltung sondern zur Aufreinigung von Proteinen, in gefaltetem oder ungefaltetem Zustand, genutzt (Skerra und Schmidt, 2000; Charbonnier *et al.*, 2001; Hwang und Chung, 2002; Jung *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003c). Eine solche Reinigung wird von Tsumoto *et al.* (2003) zur Entfernung von Komponenten, die die Faltung möglicherweise stören, empfohlen. Rudolph und Lilie (1996) beurteilten sie jedoch als nicht erforderlich, sofern der Erfolg der Faltung nicht spektroskopisch detektiert wird, wobei Kontaminationen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften der Proteinlösung nehmen würden. Hier wurde auf eine Aufreinigung der solubilisierten Inclusion Bodies (PPO A) verzichtet, da bereits im Anschluss an deren Isolation aus den Bakterien ein umfassendes Reinigungsprotokoll durchgeführt wurde (2.5.1.2, 2.5.1.3), mit dem eine zufrieden stellende Reinheit der Proteinlösung und Abtrennung kontaminierender, bakterieller Proteine erreicht wurde (3.3.1.1, 3.4.3.3, Reyda *et al.*, 1999).

Für alle Rückfaltungsversuche mit der PPO A aus Spinat wurde derselbe Klon, pT7-7-PhxA-His, zur Herstellung des Proteins verwendet. Der C-terminale His-Tag des rekombinanten Proteins konnte einerseits zur Bindung und Faltung auf einer Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose-Säule eingesetzt werden, war jedoch für die Experimente in Abwesenheit einer Matrix (Verdünnungen und Dialysen) überflüssig. Obwohl auch Vektoren existieren, die die Fusion eines Affinitäts-Tags ermöglichen und gleichzeitig eine Schnittstelle zur späteren Entfernung desselben einführen (Qiagen, Hilden; Novagen/Merck, Darmstadt), wurde mehrfach gezeigt, dass ein solches His<sub>6</sub>-Peptid oder ein äquivalent eingesetzter Strep-Tag die Faltung nicht behindern (Nakamura *et al.*, 2000; Skerra und Schmidt, 2000).

## 4.2.2 Verschiedene Rückfaltungsansätze

Die unterschiedlichen Ansätze zur Rückfaltung einer denaturierten Polypeptidkette in ihre native Struktur unterliegen alle dem gleichen Prinzip. Im Verlauf der Überführung der vollständig entfalteten Aminosäurekette aus der denaturierenden in eine renaturierende Umgebung, soll im Idealfall ein intermediärer Zustand durchlaufen werden, der die Faltung des Proteins in eine geordnete, funktionelle Struktur begünstigt. Dabei müssen die Bedingungen so gewählt sein, dass eine Aggregation der Proteine weiterhin verhindert, die Ausbildung intramolekularer Wechselwirkungen jedoch zugelassen wird, da die korrekte Faltung in ständiger Konkurrenz zu Fehlfaltungen oder Aggregation steht (Rudolph und Lilie, 1996; Tsumoto *et al.*, 2003). Die Methoden, die zur Rückfaltung verwendet werden, unterscheiden sich in erster Linie durch die Geschwindigkeit des Übergangs.

### 4.2.2.1 Verdünnung

Der einfachste Ansatz ist in Form einer Verdünnung des solubilisierten Proteins in einem Renaturierungspuffer gegeben. Aufgrund des geringen Zeitaufwandes und der simplen Durchführbarkeit bietet sich dieses Vorgehen zu Beginn von Rückfaltungsexperimenten an,

wenn noch keine Hinweise auf geeignete Faltungsbedingungen vorliegen (Middelberg, 2002). Um die essentiellen Bestandteile des Puffers zu determinieren, werden sie in variabler Zusammensetzung in möglichst vielen parallelen Ansätzen verwendet. Einer der ersten Screens wurde von Hofmann *et al.* (1995) mit Hilfe von Puffern durchgeführt, die ursprünglich für Kristallisationsversuche entwickelt worden waren. Auch in dem, in Anlehnung an Armstrong *et al.* (1999), von Hintze (2005) zusammengestellten Puffersystem, zur Bestimmung der günstigsten Faltungsumgebung für Domänen der Prokollagen C-Proteinase-2, dienen Präzipitation und Aggregation der Proteine als Indiz für ungeeignete Bedingungen. Mittlerweile sind verschiedenste „Protein Refolding Kits“ kommerziell erhältlich (z.B. von AthenaES™, Athena Environmental Sciences Inc., Baltimore, MD, USA; Fluka/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Hampton Research Corp., Laguna Niguel, CA, USA; Novagen/Merck, Darmstadt), die aus bis zu 50 Rückfaltungspuffern bestehen und spezifische Kombinationen bestimmter niedermolekularer Substanzen enthalten, auf deren Funktion in Abschnitt 4.2.3 im Einzelnen eingegangen wird.

Die für Verdünnungsexperimente mit den Inclusion Bodies der Spinat-PPO A verwendeten Puffer (3.4.4.3) wurden nach Angaben der Firma Athena Enzyme Systems Group™ (AthenaES™, Athena Environmental Sciences, Baltimore, MD, USA) hergestellt (2.5.6.1). Einige der darin enthaltenen Agenzien, wie GdnHCl oder Reduktionsmittel, wirken gleichzeitig als Inhibitoren der Tyrosinase (3.2.2.2), weshalb sie vor dem Aktivitätstest aus den Ansätzen entfernt werden mussten. Alle Verdünnungsversuche wurden daher, wie auch in mehreren anderen Arbeiten beschrieben (Reyda *et al.*, 1999; Remmert *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002; Hwang und Chung, 2002), mit anschließenden Dialysen zum Austausch des Rückfaltungspuffers kombiniert.

Durch unterschiedliche Inkubationszeiten der verdünnten Proben von entweder 1 - 4.5 Std. (A) oder 14 - 19 Std. (B) wurde versucht, dem unbekanntem Zeitbedarf des Faltungsprozesses Rechnung zu tragen. Durch die rapide Mischung von solubilisiertem Protein und Puffer werden bei der Verdünnung intermediäre Zustände sehr schnell durchlaufen und die Faltung innerhalb kurzer Zeit (A) abgeschlossen, sofern von einem zweistufigen Prozess ausgegangen werden kann. In einem solchen Fall sollte die Stabilität und Löslichkeit der bereits renaturierten Struktur im Verlauf der nachfolgenden Dialyse nach Möglichkeit erhalten bleiben. Eine Abfolge aus mehreren Schritten wurde durch eine verlängerte Inkubation (B) oder zusätzliche Dialyse von 6 - 21 Std. und dabei geförderte Weiterentwicklung eines, eventuell bei der Verdünnung entstandenen, Intermediates berücksichtigt. Zudem wurde nach dem in Tab. 3.8 (3.4.4.3) dargestellten Schema ein variabler Kupfereinbau, während oder nach Abschluss der Faltung der Proteinmatrix, ermöglicht. Dieser Aspekt wird in Kapitel 4.2.4 näher erläutert.

Während von den Herstellern der „Refolding Kits“ Inkubationszeiten von 1 Std. (AthenaES™), 1 oder 24 Std. (Fluka/Sigma-Aldrich) oder 4 - 12 Std. (Hampton Research) bei wahlweise 4°C oder stabiler RT empfohlen werden, führten in anderen Arbeiten tendenziell längere Inkubationen von 12 - 48 Std. bei 4°C - 15°C zum Erfolg (Reyda *et al.*, 1999; Remmert *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002; Hwang und Chung, 2002). Alle mit der Spinat-Tyrosinase durchgeführten Versuche blieben jedoch unabhängig von der Inkubationszeit zwischen 1 und 19 Std. und zusätzlicher Verlängerung durch anschließenden Pufferaustausch erfolglos.

Ein entscheidender Nachteil dieser Rückfaltungsstrategie ist die notwendige starke Verdünnung der Probe auf bis zu 10 µg/ml (Reyda *et al.*, 1999; Remmert *et al.*, 2000). Diese ist zur Verhinderung von Aggregationen unverzichtbar, da diese Gefahr u.U. mit der Geschwindigkeit des Übergangs steigt, macht die Anwendung in einem präparativen Maßstab, aufgrund der großen Puffervolumina, jedoch sehr kostspielig. Hinzu kommt der Zeitaufwand, der durch die Aufkonzentrierung der renaturierten Probe entsteht. In solchen Fällen empfehlen sich analytische Screenings zur Bestimmung der günstigsten Bedingungen und eine anschließende Übertragung derselben auf einen Dialyseansatz oder eine andere Art des Pufferaustausches (AthenaES™, 2003; Hintze, 2005). Allgemein werden meist Endkonzentrationen von 10 - 50 µg Protein/ml in den Faltungsansätzen eingestellt (Rudolph und Lilie, 1996). Dementsprechend wurden in dieser Arbeit Verdünnungen um einen Faktor 20 aus denaturierten IB-Lösungen von 1 mg/ml auf 50 µg/ml in den Proben vorgenommen, damit diese über eine ausreichende Proteinmenge für den Aktivitätstest verfügten (3.2.1, 3.4.4.3). Eine Erhöhung der Endkonzentration, die von Xie *et al.* (1998) für eine zweistufige Faltung beschrieben wurde (250 µg/ml), lässt sich durch eine schrittweise oder kontinuierliche Zugabe solubilisierter Proteinaliquots zum Renaturierungs-Ansatz erreichen (Rudolph, 1990). Dieses von Rudolph und Fischer (1990) patentierte Verfahren eignet sich besonders zur Optimierung der Ausbeute eines bereits etablierten Rückfaltungsmodus.

#### 4.2.2.2 Pufferaustausch

Die mangelnde Vorhersagbarkeit des Ablaufs eines Faltungsprozesses, erschwert die Wahl des Systems zur Durchführung eines solchen Experimentes. Während in einigen Rückfaltungsversuchen instabile Intermediate bereits in Anwesenheit noch recht hoher Denaturierungsmittel-Konzentrationen entstehen können, deren Aggregation durch einen langsamen Pufferaustausch begünstigt würde, gibt es andere Proteine, die instabile und schwer lösliche Strukturen erst in einer annähernd nativen Umgebung ausbilden. Im ersten Fall würde sich eine schnelle Verdünnung als vorteilhaft erweisen, während für den letzteren Fall eventuell ein verzögerter Übergang, z.B. in Form einer Dialyse, vorzuziehen wäre (Rudolph und Lilie, 1996). Unter der Annahme, dass auch allein der Faltungsmodus über den Erfolg entscheiden kann, wurden die ersten Dialyseversuche mit dem PPO A-Protein aus Spinat ohne vorheriges Screening der Pufferbedingungen durchgeführt (3.4.4.2). Nachdem etliche Dialyseansätze jedoch ohne positives Ergebnis blieben, und die Möglichkeiten zur weiteren Durchführung vielfältig waren, wurde auf eine solche gezielte Permutation der Parameter zurückgegriffen und an diese jeweils eine Dialyse angeschlossen (3.4.4.3, 4.2.2.1). Neben einer derartigen Kombination aus Verdünnung und Dialyse (Reyda *et al.*, 1999; López-Vara *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002; Hwang und Chung, 2002) sind auch Dialysemethoden allein vielfältig einsetzbar. Während in manchen Experimenten ein einzelner Pufferaustausch bereits eine erfolgreiche Faltung herbeiführt (Hieber *et al.*, 2002), können anderswo mehrere Dialyseschritte und damit jeweils Gleichgewichtseinstellungen bei unterschiedlichen intermediären Pufferbedingungen notwendig sein (Mari *et al.*, 1998; Jung *et al.*, 2003). Zur weiteren Verlangsamung des Übergangs vom denaturierten zum renaturierten Zustand entwickelten Sørensen *et al.* (2003) ein System, das im Verlauf der Dialyse den graduellen Austausch des Denaturierungspuffers gegen einen Faltungspuffer im Pufferreservoir erlaubt.



Neben der Dialyse sind Ultrafiltration und Größenausschluss-Chromatographie (SEC, Gelfiltration) gängige Methoden zum Austausch des Puffers. Bei der Verwendung von Dialysemembranen und Ultrafiltrationseinheiten besteht die Gefahr einer Adsorption oder Aggregation der Proteine an den Membranen und Verstopfung derselben (Li *et al.*, 2004). So wurde auch hier in einem Kontrollexperiment, bei der Dialyse der Tyrosinase aus Champignon, ein gewisser Proteinverlust festgestellt (3.4.4.2). Da dieser jedoch nur einen Teil des Proteins betraf, war nicht davon auszugehen, dass die Faltung in Anwesenheit der Dialysemembran vollständig verhindert werden würde. Die Zusammensetzung der in den eigentlichen Rückfaltungsversuchen verwendeten Denaturierungs- bzw. Rückfaltungspuffer und deren Einfluss auf eine mögliche Membranadsorption konnte bei der Dialyse der Champignon-Tyrosinase allerdings nicht berücksichtigt werden.

Obwohl auch bei der Gelfiltration die Gefahr einer unerwünschten Interaktion von Proteinen mit der Säulenmatrix besteht, wird das Aggregationsrisiko durch Verwendung dieser chromatographischen Methode insgesamt reduziert. Die Moleküle der Säulenmatrix separieren die Proteine voneinander und verhindern so intermolekulare Wechselwirkungen, die eine Präzipitation zur Folge hätten. Auf diese Weise gelang Werner *et al.* (1994) und Lanckriet und Middelberg (2004) die Faltung denaturierter Proteine durch Elution mit einem geeigneten Renaturierungspuffer bei gleichzeitiger Trennung gefalteter und ungefalteter Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufcharakteristika. Andere, experimentell etwas kompliziertere Methoden, die Faltungsprozesse durch eine räumliche Isolation von Proteinmolekülen unterstützen, sind die Verwendung von invertierten Micellen (Garza-Ramos *et al.*, 1992; Ono *et al.*, 2005) oder eines zweiphasigen Systems (Forciniti, 1994). Den nächsten, weiterführenden Schritt in diese Richtung stellt die Bindung von Proteinen an ein Säulenmaterial dar.

#### 4.2.2.3 Adsorption an eine Matrix

Chromatographische Methoden bieten den Vorteil, neben einer Faltung zeitgleich auch die Aufreinigung des gewünschten Proteins zu ermöglichen (Li *et al.*, 2004). Zudem sind sie bei Verwendung von FPLC-Apparaturen mühelos und wenig aufwendig anzuwenden. Abgesehen von der bereits erwähnten SEC (4.2.2.2), werden zu diesem Zweck in erster Linie Ionenaustausch-Chromatographien (IEX) und Affinitäts-Chromatographien mit Hilfe immobilisierter Metallionen (IMAC) eingesetzt, da die hierfür notwendigen Interaktionen zwischen Proteinen und Säulenmatrix auch gegenüber hohen Konzentrationen an Denaturierungsmitteln eine große Toleranz aufweisen (Qiagen, 1997, siehe auch Tab. 2.13, 2.5.5.2; Li *et al.*, 2004).

Durch die Adsorption der Proteine an das Säulenmaterial werden intermolekulare Wechselwirkungen verhindert und damit das Risiko einer Aggregation während des Faltungsprozesses reduziert. Erste Untersuchungen zur Rückfaltung adsorbierter Proteine wurden bereits in den 60er und 70er Jahren mit Trypsin durchgeführt (Epstein und Anfinsen, 1962; Sinha und Light, 1975). Im Zuge der Entwicklung vielfältiger Chromatographie-Medien in den vergangenen Jahrzehnten, wurden entsprechend auch die Rückfaltungsmethoden, die auf diese zurückgreifen, verfeinert (Li *et al.*, 2004). Während bei einer IEX die Ladung des Proteins und damit der pI, sowie pH-Wert und Temperatur bei der Wahl der Bindungs-, Elutions- und Rückfaltungs-Bedingungen vordergründig berücksichtigt werden müssen,

bedient sich die IMAC zur Proteinbindung zumeist eines kurzen Peptids (His<sub>6</sub>), das gemeinsam mit dem rekombinanten Protein als Fusionsprodukt exprimiert und auf der Matrix z.B. über Ni<sup>2+</sup>-Ionen komplexiert wird (2.5.5.2). Dies gestattet eine stabile, spezifische Immobilisierung des His-Tag-Proteins, die auch in dieser Arbeit für einige der Experimente zur Faltung der PPO A aus Spinat verwendet wurde (3.4.4.4). Hier zeigte sich allerdings in allen Eluatens zusätzlich zum gewünschten Produkt die Anwesenheit kleinerer Proteinbestandteile (Abb. 3.23 und 3.24, 3.4.4.4). Ob es sich dabei um proteolytische Abbauprodukte der Tyrosinase handelte, ließe sich eventuell mit Hilfe eines Western-Blots (Anti-His<sub>5</sub>-AK) feststellen. Unspezifische Interaktionen anderer Proteine hätten durch geringe Konzentrationen an Imidazol in den Waschpuffern reduziert werden können. Diese Kontrollen wurden jedoch nicht durchgeführt, da das Ziel an dieser Stelle nicht in einer 100%igen Reinigung oder Erhaltung des Proteins sondern dessen Faltung bestand, für die geringe Verluste zunächst in Kauf genommen werden konnten. Bei einem Hinweis auf möglicherweise effiziente Rückfaltungsbedingungen, hätten derartige Optimierungen im Nachhinein vorgenommen werden können. Bis dahin war aufgrund der räumlichen Trennung der Proteine auf der Säule keine Behinderung des Faltungsprozesses durch Verunreinigungen zu erwarten.

Die Möglichkeiten zur Durchführung von chromatographischen Rückfaltungsexperimenten sind ebenso vielfältig wie bei den Ansätzen in Lösung (4.2.2.1, 4.2.2.2). Gemeinsam ist aber auch ihnen die Überführung des denaturierten Proteins in eine stabilisierende, renaturierende Umgebung. Automatisierte Verfahren, in Form einer FPLC, gewähren durch die Einstellung der Laufgeschwindigkeit und stufenlose Mischung verschiedener Puffer, eine gezielte Modulierung des Überganges. Ein solcher Ansatz lässt sich insofern auf ganz verschiedene Proteine anwenden, als in jedem Fall der Gradient des Denaturierungsmittels vollständig durchlaufen und damit auch die für jedes Protein möglicherweise spezifische Konzentration passiert wird, ohne dass diese zuvor bekannt sein muss. Dieser Aspekt der Chromatographie blieb in dieser Arbeit ungenutzt, da hier ein Screening der Rückfaltungsbedingungen auf der Säule angestrebt wurde. Bedingt durch ihre große Anzahl, wurden die parallelen Experimente in minimalen Säulenvolumina in Poly-Prep<sup>®</sup>-Chromatographiesäulen ohne Druck und nicht mit Hilfe einer FPLC-Anlage durchgeführt (2.5.5.2). Diese Versuche konnten, ähnlich wie die Dialysen (4.2.2.2), nicht anders konzipiert werden, da sich aus den Verdünnungs-Experimenten (4.2.2.1) keinerlei Hinweise auf essentielle Pufferbestandteile oder sonstige Parameter ergeben hatten und die Faltungsmethode durchaus nicht als kritisches Element auszuschließen war. So wurde z.B. von Colangeli *et al.* (1998) bei der Faltung verschiedener IB-Proteine auf einer Säulenmatrix im Verlauf eines 8 → 0 M Harnstoff-Gradienten keine Präzipitation des Proteins beobachtet, im Gegensatz zu einem äquivalenten Austausch innerhalb eines Dialyse- oder Verdünnungs-Prozesses.

Für die IEX ist neben Systemen aus drei Puffern (Creighton, 1986), z.B. ein Zwei-Puffer-System entwickelt worden, das bei zeitgleicher Verminderung der Denaturierungsmittel-Konzentration und Erhöhung der Ionenstärke eine graduelle Rückfaltung des Proteins, in Form einer "on/off"-Kaskade, im Verlauf der Elution erlaubt (Li *et al.*, 2002). Eine derartige Kombination wäre theoretisch auch bei einer IMAC denkbar, tatsächlich wird jedoch in den meisten Fällen das denaturierte Protein zunächst gebunden, gewaschen, gefaltet und anschließend mit Imidazol von den Metallionen verdrängt (Zahn *et al.*, 1997; Colangeli *et al.*,

1998; Rogl *et al.*, 1998; Smith und Walker, 2003; Chen *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2004). Der eigentliche Rückfaltungsschritt besteht dabei oft in einer Reduktion des Denaturierungsmittels in Anwesenheit definierter niedermolekularer Substanzen, deren Einsatz jeweils abhängig vom einzelnen Protein oder dem gewählten System ist. So mussten, z.B. zur Gewährleistung der Komplexstabilität zwischen dem funktionellen His<sub>6</sub>-Tag der Spinat-PPO A und den Ni<sup>2+</sup>-Ionen, bzw. diesen und der NTA-Sepharose, die ursprünglich vorgesehenen Reduktionsmittel (DTT, GSH/GSSG) durch  $\beta$ -Mercaptoethanol ersetzt werden. Auf L-Arginin wurde ganz verzichtet (siehe Tab. 2.13, 2.5.5.2). Während die Faltung hier durch Zugabe des Rückfaltungspuffers sowie anschließende Inkubation versucht wurde und leider ohne Erfolg blieb, gelang Rogl *et al.* (1998), bei ähnlicher Vorgehensweise und adäquatem Detergens- und Pigmentangebot, die Rekonstitution zweier Membranproteine (Toc75 und LHCII) in einem einzigen Inkubationsschritt. Eventuell muss hierbei bedacht werden, dass sich der Faltungsmechanismus von Membran- und löslichen Proteinen u.U. grundsätzlich unterscheiden kann. Während für die Faltung integraler Membranproteine Detergenzien und deren CMC eine entscheidende Bedeutung haben, sind für lösliche Proteine vermutlich andere Parameter kritischer. Da die Lokalisation der Tyrosinase, im Lumen oder der Membran, innerhalb den Spinatchloroplasten nicht eindeutig geklärt ist (4.3.1), besteht zumindest die Möglichkeit, dass die PPO eine hydrophobe Region aufweist und ihre Faltung in Anwesenheit von Detergens unterstützt wird. Für den LHCII wurde, abgesehen davon, bereits zuvor eine alternative Methode der Rekonstitution, über mehrere Einfrier-/Auftau-Zyklen, entwickelt (Paulsen *et al.*, 1990), wodurch die Variabilität des Faltungsprozesses zusätzlich unterstrichen wird.

Vielfach wird die Renaturierung rekombinanter Proteine, unabhängig von ihrem zellulären Herkunftsort, innerhalb eines Denaturierungs- oder Reduktionsmittel-Gradienten (100 %  $\rightarrow$  0 %) erreicht (Zahn *et al.*, 1997; Colangeli *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2004). Chen *et al.* (2004) und Smith und Walker (2003) bedienten sich dagegen einer mehrstufigen Erniedrigung der Harnstoff-Konzentration. Generell spricht viel dafür, bei einer IMAC zur Proteinfaltung ein kontinuierliches System zum Pufferwechsel zu verwenden, was aus den genannten Gründen nicht zu verwirklichen war.

An dieser Stelle seien noch einige weitere chromatographische Methoden erwähnt, die sich zur Proteinfaltung einsetzen lassen. Hierzu zählen die Hydrophobe Interaktions- (HIC) oder Reversed Phase Chromatographie (RPC) ebenso wie die Verwendung kovalent auf einer Matrix immobilisierter Chaperone, wie z.B. GroEL, oder anderer Faltungshelfer (Li *et al.*, 2004). Im Rahmen der Experimente mit dem PPO A-Protein aus Tomate wurde die Verwendung des Strep-Tag/Strep-Tactin<sup>®</sup>-Systems für eine Immobilisierung und Faltung des Proteins, analog zur IMAC, geplant. Im Verlauf der hierzu durchgeführten Versuche waren, aufgrund des unbekannterweise fehlenden Strep-Tags der rekombinanten Tyrosinase (3.3.3.2), irrtümlich ausschließlich unspezifische Wechselwirkungen bakterieller Proteine mit der Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharose beobachtet worden (3.3.2). So kann aus den dabei gewonnenen Resultaten lediglich geschlossen werden, dass z.B. Harnstoff-Konzentrationen von  $\geq 0.5$  M unspezifische Bindungen verhindern (3.3.2.4). Das könnte für die Faltung eines korrekt immobilisierten Proteins durchaus von Vorteil sein, da auf diese Weise Kontaminationen eliminiert würden. Allerdings ist die Anwendbarkeit von Denaturierungsmitteln auch nach neueren Erkenntnissen limitiert auf Konzentrationen  $\leq 1$  M (Tab. 2.11,

2.5.5.1). Interessanter sind daher die Angaben des Herstellers (IBA, Göttingen) bezüglich einer beobachteten Toleranz gegenüber Konzentrationen von bis zu 50 mM DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (2.5.5.1). Dies könnte sich gegenüber der His-Tag/Ni<sup>2+</sup>-NTA-Interaktion, die sehr anfällig für Reduktionsmittel ist (Tab. 2.13, 2.5.5.2), u.U. als vorteilhaft erweisen, sofern sich die Denaturierungsmittelkonzentration vor dem Auftrag der Probe auf die Säule reduzieren ließe. Es gibt hierzu jedoch kaum gesicherte Erkenntnisse, da generell die IMAC als Standardmethode für die Proteinfaltung beschrieben wird und Strep-Tactin<sup>®</sup>-Sepharose in erster Linie in der Proteinaufreinigung Verwendung findet (Skerra und Schmidt, 2000).

Die hier dargestellten Rückfaltungsmethoden sind vielfältig kombinierbar und in ihrer Durchführung sehr variabel zu gestalten (Tsumoto *et al.*, 2003). Welche Strategie zu einer effizienten Faltung führt, muss im Einzelfall für jedes Protein spezifisch getestet werden (Rudolph und Lilie, 1996; Li *et al.*, 2004). Verwandte, bereits erfolgreich renaturierte Proteine liefern eventuell einen Hinweis auf die zu wählenden Bedingungen, es können jedoch auch stark abweichende Bedingungen für die Renaturierung ähnlicher Proteine notwendig sein (Tobbell *et al.*, 2002). Dabei sind oftmals niedermolekulare Substanzen von entscheidender Bedeutung.

#### 4.2.3 Die Rolle niedermolekularer Additiva bei der Rückfaltung

Bezüglich der für die Rückfaltung rekombinant exprimierter Proteine generell in Frage kommenden Substanzen und ihrer Verwendung werden allgemein übereinstimmende Angaben gemacht (Rudolph und Lilie, 1996; Armstrong *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 1999; Middelberg, 2002; Tsumoto *et al.*, 2003). Tab. 4.2 zeigt eine Gegenüberstellung der von Rudolph und Lilie (1996) vorgeschlagenen Versuchsbedingungen zur Rückfaltung rekombinanter IB-Proteine und der in dieser Arbeit, in Anlehnung an vergleichbare Angaben verschiedenster "Protein Refolding Kit"-Hersteller (bes. AthenaES<sup>™</sup>), ausgewählten Parameter.

Der Aspekt der Solubilisierung der Proteinaggregate wird in Kapitel 4.2.1 erörtert und unterscheidet sich in dieser Arbeit nicht wesentlich von Rudolph und Lilie (1996). Bezüglich der Durchführung von Verdünnungs-Versuchen, die in Abschnitt 4.2.2.1 diskutiert werden, und der Zugabe der verschiedenen niedermolekularen Pufferbestandteile besteht ebenfalls eine weitgehende Kongruenz. Physikalische Parameter wie Temperatur, Ionenstärke und pH-Wert können einen entscheidenden Einfluss auf den Faltungsprozess haben (Rudolph und Lilie, 1996), der allerdings im Einzelfall abhängig von der nativen Struktur, Ladung und Stabilität des jeweiligen Proteins und damit z.T. schwer vorherzusagen ist. Oftmals werden Faltungs-Experimente in leicht basischer Umgebung (pH 8 - 9) durchgeführt, da die Ausbildung von Disulfidbrücken so begünstigt wird (Rudolph und Lilie, 1996; Middelberg *et al.*, 2002). In einigen Fällen wurde ein positiver Effekt solcher Pufferkomponenten selbst (z.B. TRIS) auf die IB-Faltung beobachtet (Ambrosius und Rudolph, 1992).

Bei der Renaturierung muss sowohl eine ausreichende Löslichkeit der Polypeptidkette und Unterbindung intermolekularer Interaktionen gewährleistet, als auch die Möglichkeit zu intramolekularen Wechselwirkungen gegeben werden. Niedermolekulare Substanzen

beeinflussen daher die Rückfaltung von Proteinen, indem sie entweder deren native Struktur stabilisieren oder die Aggregation von Intermediaten, die im Verlauf der Faltung auftreten, verhindern (Bondos und Bicknell, 2003). Welchen Effekt eine Substanz auf die Faltung eines speziellen Proteins tatsächlich hat, ist schwer festzustellen, da sie sowohl zur Löslichkeit des denaturierten, als auch des intermediären oder korrekt gefalteten Polypeptids beitragen kann und die Übergänge fließend sind (Rudolph und Lilie, 1996). Im Folgenden wird der Wirkungsmechanismus der einzelnen Additiva, soweit er bekannt ist, näher erläutert.

	<b>Rudolph und Lilie (1996)</b>	<b>vorliegende Arbeit*</b>
<b>Solubilisierung der Inclusion Bodies</b>		
Proteinkonzentration [mg/ml]	5	1
Denaturierungsmittel [mM]	GdnHCl [6 M]	GdnHCl [6 M], Harnstoff [8 M]
Reduktionsmittel	DTT [100 mM]	- /DTT/ $\beta$ -ME [10 mM]
Puffer	0.1 M TRIS/HCl, pH 8.0	-
Inkubation	120 Min., 20°C	10 - 15 Min., 37°C oder 50°C
<b>Entfernung des Reduktionsmittels</b>		
Dialyse	6 M Gdn/HCl, pH 4.5	-
<b>Rückfaltung</b>		
Modus	Verdünnung (1 : 200)	Verdünnung (1 : 19)
Proteinkonzentration [ $\mu$ g/ml]	10 - 50	50
Temperatur	15°C	RT ~ 25°C
Inkubationsdauer	60 Min. oder 24 Std.	60 Min. bis 19 Std.
Rückfaltungspuffer	TRIS/HCl, pH 7.5/8.5	TRIS/HCl, pH 8.0/8.8 MES oder MOPS, pH 6.0/6.5
<b>Additiva</b>		
EDTA	5 mM	1 mM
Reduzierte/oxidierte Thiole	5 mM GSH/ 1 mM GSSG	1 mM GSH/ 0.1 mM GSSG
L-Arginin	0.5 M	0.5 M
TRIS	1 M	-
GdnHCl	0.5 M	0.75 M
Detergenzien	0.06 mg/ml LM 33 mM CHAPS mixed micelles (TX-100/ Phospholipide)	0.5 % TX-100
Polyethylenglycol	-	0.05 % PEG 4000
Glycerin, Saccharose	20 % Glycerin	0.4 M Saccharose
Metallionen, Liganden etc.	nach Bedarf	50 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub>
Assay	Enzymaktivität, Bioassay RP-HPLC, Spektroskopie Ligandenbindung, ELISA	Enzymaktivität

**Tab. 4.2 Vergleich möglicher Bestandteile von Rückfaltungspuffern nach Empfehlungen von Rudolph und Lilie (1996) mit den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen.**

\*Zusammensetzung der jeweiligen Puffer in Anlehnung an das "Protein Refolding Kit" der Firma AthenaES™ (verändert)(siehe auch 2.5.5.2, 2.5.6.1). In dieser Zusammenstellung fehlen Angaben zur Ionenstärke bzw. Saccharose-Konzentration, da auf diese in Rudolph und Lilie (1996) nicht eingegangen wird. Ein positiver Effekt von PEG findet auch dort Erwähnung, jedoch ohne genauere Quantifizierung. Erläuterung der verwendeten Abkürzungen in Tab. 2.15 (2.5.6.1).

#### 4.2.3.1 Aggregation versus Proteinfaltung

Die Hofmeister-Serie (siehe Anhang) ordnet Salze nach ihrer Fähigkeit Proteine auszufällen (Hofmeister, 1888; Lottspeich, 1998; Curtis *et al.*, 2002). Stark kosmotrope Salze, wie Ammoniumsulfat, eignen sich zur besonders schonenden Proteinfällung, da sie die native Proteinkonformation stabilisieren, indem sie die Oberflächenspannung des Wassers erhöhen (Neagu *et al.*, 2001; Bondos und Bicknell, 2003). Sie werden von der Proteinoberfläche ausgeschlossen und erschweren die Anlagerung der Wassermoleküle an das Protein. Die Einnahme des kompakten, gefalteten Zustandes ist daher zusätzlich entropisch gegenüber ungefalteten Intermediaten mit größeren, dem Wasser gegenüber exponierten, Oberflächen begünstigt (Bondos und Bicknell, 2003). Auf die gleiche Weise wirken Zucker, wie Glucose, Lactose (Arakawa und Timasheff, 1982) oder Saccharose (Lee und Timasheff, 1981) und einige Alkohole, wie Glycerin (Gekko und Timasheff, 1981), Sorbitol (Xie und Timasheff, 1997) oder Ethylenglykol (Gekko und Morikawa, 1981). Mono- ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) und divalente ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) Kationen können ebenfalls einen entscheidenden stabilisierenden oder Strukturbrechenden Einfluss auf die Ausbildung der nativen Konformation von Proteinen haben.

Chaotrope Reagenzien, wie GdnHCl und Harnstoff, bewirken in hohen Konzentrationen die Denaturierung von Proteinen, in niedrigeren, nicht denaturierenden Konzentrationen können sie jedoch durch eine Interaktion mit dem Protein intermolekulare Wechselwirkungen verhindern und damit, ebenso wie chaotrope Salze ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ , NaBr), Aggregationen vorbeugen (Nozaki und Tanford, 1963; Nozaki und Tanford, 1970; Bondos und Bicknell, 2003). Auch mit Hilfe von Detergenzien, die sich an bestimmte Abschnitte der Peptidketten anlagern, lassen sich intermolekulare Wechselwirkungen reduzieren. Zu diesem Zweck sind je nach Bedarf sowohl ionische, z.B. N-Laurylsarcosin (Jung *et al.*, 2003) oder das zwitterionische CHAPS (Cerletti *et al.*, 1990; Hwang und Chung, 2002), als auch nicht-ionische Detergenzien, wie Laurylmaltosid (Tandon und Horowitz, 1987; Zardeneta und Horowitz, 1994), OG (n-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid; Hieber *et al.*, 2002) oder Triton X-100 (Smith und Walker, 2003), einsetzbar.

Der positive Effekt von PEG (Polyethylenglykol) wurde von Cleland und Randolph (1992) durch dessen Komplexbildung mit einem Molten Globule Faltungsintermediat erklärt. Darüber hinaus ließ sich eine Abhängigkeit der Wirksamkeit vom Molekulargewicht des PEG (MW = 1000 - 8000) feststellen (Cleland *et al.*, 1992). Cyclodextrin wirkt auf ähnliche Weise durch Verhinderung einer Aggregation der Proteine (Karuppiyah und Sharma, 1995), ist aber auch zur Entfernung von Detergenzien im Verlauf eines zweistufigen Faltungsprozesses verwendbar (Rozema und Gellman, 1995).

Polare Aminosäuren, wie das vielfach verwendete L-Arginin, erhöhen aufgrund ihrer Ladung die Löslichkeit von Proteinen in neutralen Lösungen. Dabei wirkt die Guanidinium-Gruppe des Arginins offenbar nicht in dem Maße destabilisierend wie beim GdnHCl (Rudolph und Lilie, 1996). Vielmehr postulierten Tsumoto *et al.* (2004), aufgrund struktureller Befunde zur Orientierung von Arginin-Resten und Aromaten in Proteinen (Flocco und Mowbray, 1994; Mitchell *et al.*, 1994; Pellequer *et al.*, 2000), eine mögliche Verbesserung der Löslichkeit aromatischer Reste durch eine parallele Ausrichtung der Guanidinium-Gruppe und des aromatischen Ringes. Insgesamt ist L-Arginin jedoch ein gutes Beispiel für eine Substanz, deren positiver Effekt auf die Proteinfaltung zwar vielfach belegt (Brinkmann *et al.*, 1992; Lin

und Traugh, 1993; Suenaga *et al.*, 1998; Reyda *et al.*, 1999; He *et al.*, 2002; Hwang und Chung, 2002; Umetsu *et al.*, 2003), deren zugrunde liegender Wirkungsmechanismus aber noch weitgehend unverstanden ist, auch wenn eher von einer die Aggregation verhindernden denn einer strukturell stabilisierenden Wirkung ausgegangen werden kann (Tsumoto *et al.*, 2004). Als weiterer niedermolekularer Faltungshelfer findet Prolin Verwendung, das ebenfalls das Risiko der Aggregation reduziert (Samuel *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2001; Ou *et al.*, 2002).

EDTA verhindert die Interaktion freier Thiolgruppen des ungefalteten Proteins mit Schwermetallen und schützt es zudem vor Metalloproteasen (Reyda *et al.*, 1999). Inwieweit es für die Faltung von Proteinen, die Metallionen enthalten, eingesetzt werden sollte, ist u.a. abhängig von der Art des Einbaus des jeweiligen Metalls. Inhibitoren von Serinproteasen, wie PMSF, Benzamidin oder  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure, sind ebenfalls verwendbar.

#### 4.2.3.2 Einfluss des Redoxpotentials auf die Ausbildung von Disulfidbrücken

Zuletzt sind die unterschiedlichen Redox-Systeme zu nennen, die für die Ausbildung von Disulfidbrücken unverzichtbar sind. Zur Einstellung eines Redoxpotentials, das einen schnellen Austausch und damit eine Reversibilität dieser Bindungen erlaubt, wird hierfür oft eine Kombinationen aus der reduzierten (GSH) und oxidierten (GSSG) Form von Glutathion eingesetzt (Xie *et al.*, 1998; Reyda *et al.*, 1999; López-Vara *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002). Gleichermäßen sind jedoch, je nach Protein, auch andere "oxido-shuffling"-Paare verwendbar, wie z.B. Cystein/Cystin (Lanckriet und Middelberg, 2004), Cysteamin/Cystamin oder di- $\beta$ -Hydroxyethylendisulfid/2-Mercaptoethanol (Rudolph und Lilie, 1996). Das reduzierte Agens wird dabei zumeist in einem 5 - 10fachen Überschuss angeboten (Wetlaufer *et al.*, 1987). In einer Arbeit von Ono *et al.* (2005) hat sich allerdings genau der umgekehrt Fall, bzw. die alleinige Verwendung von GSSG, als günstig gezeigt. Sind reduzierte, entfaltete Proteine schwer löslich, so kann die Disulfidbrückenbildung bei Zugabe von GSH/GSSG in zwei Schritten, durch eine der Faltung vorausgehende Ausbildung gemischter Disulfide mit Glutathion (Faulstich und Heintz, 1995) und die anschließende Induktion intramolekularer Bindungen, ermöglicht werden (Ruoppolo *et al.*, 1996). Gacche *et al.* (2004) konnten in Apfelsaft GSH als nicht kompetitiven Inhibitor der PPO identifizieren. Da hier in Kontrollexperimenten (z.B. 3.4.4.3) kein Effekt auf die Aktivität der Champignon-Tyrosinase festgestellt werden konnte, war von einem negativen Einfluss nicht unbedingt auszugehen. Das im Dialysepuffer enthaltene Glutathion lag allerdings zum Zeitpunkt der Aktivitätsassays bereits mehrheitlich oxidiert vor (3.4.4.1), was den fehlenden Hemmungseffekt erklären könnte.

Die Verwendung einzelner Additiva wurde nicht separat sondern ausschließlich im Ensemble untersucht. Die Präzipitation des Proteins konnte bei den durchgeführten Faltungsexperimenten nicht immer verhindert werden, erwies sich jedoch nicht als systematisch und ließ somit keine eindeutigen Rückschlüsse für die Verwendung der einzelnen Additiva zu (3.4.4.3). Hierzu wäre ein breiter angelegtes Screening der in Frage kommenden Pufferbestandteile und ihres Einflusses auf die Löslichkeit der rekombinanten Spinat-PPO A, unabhängig von den daran anschließenden eigentlichen Rückfaltungsexperimenten, notwendig.

#### 4.2.4 Einbau des Cofaktors (Kupfer)

Kupfer kommt als essentieller Cofaktor in vielen Proteine vor, da es, gleich anderen Metallionen, wie Eisen, Kobalt oder Molybdän, *in vivo* in zwei Oxidationsstufen ( $\text{Cu}^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$ ) existiert (Harrison *et al.*, 2000; Brouwer *et al.*, 2002). Es liegt innerhalb des Cytoplasmas jedoch so gut wie nicht frei vor, da es aufgrund seiner Redox-Eigenschaften die Entstehung von Radikalen katalysiert und somit toxisch für die Zelle ist (Brouwer und Brouwer-Hoexum, 1992; Harrison *et al.*, 1999; O'Halloran und Culotta, 2000). Im Überschuss vorkommendes Kupfer ist in der Lage, mit physiologisch entstehenden Sauerstoffspezies, wie Superoxidanionen, zu reagieren [1]:



Die reduzierten Metallionen können dann mit Wasserstoffperoxid, in einer Fenton-Reaktion [2] weiter reagieren und hochreaktive Hydroxylradikale bilden (Samuni *et al.*, 1981). Diese wiederum inaktivieren Enzyme oder zerstören andere Proteine, DNA und Membranen bzw. Organellen (Freedman *et al.*, 1989; Floyd, 1990; Aruoma *et al.*, 1991). Die Aufnahme des Kupfers in die Zelle muss daher einer strengen Regulation unterliegen (Wittung-Stafshede, 2004). Einen Hinweis darauf, dass eine solche Kontrolle existiert, gaben auch Versuche, in denen das Bakterienwachstum durch die Zugabe von bis zu 1 mM  $\text{CuSO}_4$  zum Kulturmedium nicht beeinträchtigt wurde (He *et al.*, 2002; 3.3.1.2, 3.3.2.5).

##### 4.2.4.1 Kupferproteine *in vivo*

Die Konzentration an frei vorliegendem Kupfer wurde in Hefezellen, mit einem Gesamtgehalt an Kupfer von 70  $\mu\text{M}$ , als  $< 10^{-18}$  M bestimmt. Dies entspricht mehreren Größenordnungen weniger als einem freien Cu-Atom pro Zelle (Lippard, 1999; Rae *et al.*, 1999). Freedman *et al.* (1989) konnten zeigen, dass mehr als 60 % des aus Leberzellen isolierten cytoplasmatischen Kupfers komplexiert an Glutathion vorliegt. Kinetische Import-Studien ergaben eine schnellere Bindung von radioaktivem  $^{67}\text{Cu}$  an GSH als an Metallothionein (MT). Daraus wurde ein Modell des Cu-Metabolismus entwickelt, das eine Komplexierung des Kupfers an GSH, unmittelbar nach dessen Aufnahme in die Zelle, und eine anschließende Weiterleitung an MT einschließt (Freedman *et al.*, 1989).

Metallothioneine sind niedermolekulare, Cystein reiche Metalloproteine, die eine zentrale Rolle im Cu-Metabolismus der Leber einnehmen, indem sie einen temporären Speicher für das Metall im Cytoplasma darstellen und zum Abbau dieses Zellgiftes beitragen (Freedman *et al.*, 1989). Hinweise auf eine entgiftende Funktion des MT, durch Bindung überflüssigen Kupfers, ergaben sich auch aus Studien an *Saccharomyces cerevisiae* (Hamer *et al.*, 1985) und Mäusen (Kelly und Palmiter, 1996). Die mögliche Bedeutung von MT für den Cu-Haushalt im Zusammenhang mit Synthese und Abbau des  $\text{O}_2$ -Carriers (HC) wurde bei der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* (Berger *et al.*, 1997), und Blaukrabbe, *Callinectes sapidus* (Brouwer *et al.*, 2002), diskutiert. Eine Weiterleitung des Kupfers von MT an andere Cu-Proteine, wie die Tyrosinase aus *Neurospora crassa*, wurde von Huber und Lerch (1987) postuliert. Harrison *et al.* (1999) schlossen dagegen eine Funktion von MT als Cu-Chaperon aus. In den 90er Jahren konnten einige der in eukaryotischen Zellen am Kupfer-Transport beteiligten Systeme in *Saccharomyces cerevisiae* genauer identifiziert werden (O'Halloran



und Culotta, 2000). Den Metallochaperonen kommt dabei, durch die Bindung und damit einhergehende Entfernung freien Kupfers aus dem Zellmilieu, eine duale Rolle bei Entgiftung und Cu-Transfer zu (Harrison *et al.*, 1999).

Die Aufnahme von Kupfer in Hefezellen erfolgt über eine Familie von Transport-Proteinen (Ctr1, Ctr2 und Ctr3) in der Plasmamembran (Dancis *et al.*, 1994; Kampfenkel *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1996). Von dort wird das Metall an verschiedene cytoplasmatische Cu-Chaperone abgegeben, die den Transport zu unterschiedlichen Zell-Kompartimenten bewerkstelligen (Valentine und Gralla, 1997). Cox17 vermittelt den Transfer zu den Mitochondrien, wo Kupfer für die Cytochrom-Oxidase benötigt wird (Glerum *et al.*, 1996). CCS (= Copper Chaperone for SOD, Lys7 bei Hefe) beliefert die SOD im Cytoplasma (Culotta *et al.*, 1997; Lamb *et al.*, 1999, 2001; Banci *et al.*, 2003) und Atx1 tritt in Interaktion mit Ccc2 aus dem Post-Golgi-Netzwerk, das den Cofaktor an die Oxidase Fet3p abgibt (Lin *et al.*, 1997). Homologien zu humanen Proteinen deuten auf ähnliche Mechanismen auch beim Menschen hin (Amaravadi *et al.*, 1997; Valentine und Gralla, 1997; Harrison *et al.*, 1999).

#### 4.2.4.2 Einbau von Kupfer in Proteine *in vitro*

Aus der Kenntnis der Komplexität des Cu-Transportes *in vivo* heraus stellt sich die Frage, ob der Cu-Einbau in rekombinante Proteine, und speziell Tyrosinasen, *in vitro* ebenso kompliziert erfolgen muss. Beispiele, die eine solche Annahme unterstützen, sind die humane Tyrosinase, sowie die homologen Enzyme aus verschiedenen *Streptomyces*-Spezies und *Marinomonas mediterranea*, die in Kapitel 4.1.3 vorgestellt worden sind. Die funktionelle, heterologe Expression dieser Proteine gelingt ausschließlich in Systemen, die eine Co-Expression von Proteinen gestatten, die am Transfer des Kupfers in das AZ beteiligt, respektive Cu-Chaperone, sind. Dem gegenüber steht die Herstellung einer aktiven, löslichen PPO aus *Trifolium pratense* (Wiesenklee), die Sullivan *et al.* (2004) durch alleinige Überexpression dieses Proteins in *E.coli*-Zellen in Anwesenheit von 20  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  im Kulturmedium gelang. Nakamura *et al.* (2000) zeigten darüber hinaus die Renaturierung einer Tyrosinase aus *Aspergillus oryzae*, die in *E.coli* exprimiert, als lösliches Protein isoliert, über eine  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Sepharose gereinigt und durch 14stündige Inkubation in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  sowie einen abschließenden Säureschock aktiviert wurde. Dass in diesen Fällen auf den Einsatz von Cu-Chaperonen verzichtet werden konnte, gibt keinerlei Aufschluss über den natürlichen Cu-Transfer in diesen Organismen *in vivo*. Es zeigt jedoch, dass Cu-Chaperone nicht zwingend essentiell für die Renaturierung von Cu-Proteinen *in vitro* sein müssen. So mag z.B. auch bereits eine im Vergleich zum zellulären Milieu stark erhöhte Konzentration der Metallionen ausreichen, um die *in vivo* benötigten Chaperone zu ersetzen (O'Halloran und Culotta, 2000).

Auf dieser Grundlage basierte die Konzeption der Rückfaltungsversuche der pflanzlichen Tyrosinasen in dieser Arbeit. Hier wurden die IB-Proteine entweder während des Rückfaltungsschrittes oder anschließend an diesen zusammen mit dem Cofaktor inkubiert (3.3.1.2, 3.3.2.5, 3.4.4.2 - 3.4.4.4). Dies entsprach im Ansatz dem von Nakamura *et al.* (2000) beschriebenen Experiment. Im Unterscheid dazu war hierbei nicht nur die Komplexbildung des AZ mit den Kupfer-Ionen, sondern auch die Faltung des übrigen

Proteingerüstes in seine native Struktur zu bewältigen. Woran dieses Vorhaben letztlich scheiterte, ob die Faltung, der Kupfer-Einbau, die Aktivierung des Enzyms oder all dies zusammen den kritischen Faktor darstellte, lässt sich schwer beurteilen.

#### 4.2.4.3 Bedeutung der Oxidationsstufe des Kupfers für den Einbau in Proteine

In den Experimenten zur Rückfaltung der pflanzlichen Tyrosinasen wurde versucht, durch ein Angebot sowohl von  $\text{Cu}^+$ , aus einem Cu(I)-GSH-Komplex, als auch  $\text{Cu}^{2+}$ , aus  $\text{CuSO}_4$ , diesen beiden Möglichkeiten gerecht zu werden und so die Oxidationsstufe des Kupfers als kritisches Element der Versuche auszuschließen, da es diesbezüglich in der Literatur widersprüchliche Angaben gibt. Während Versuche von Beltramini und Lerch (1982) zur Renaturierung von Apo-Hämocyanin (Apo-HC) aus der Strandkrabbe, *Carcinus maenas*, bzw. Apo-TYR aus dem Ascomyceten, *Neurospora crassa*, mit Hilfe von Cu(I)-MT gelangen, konnte das Apo-HC aus dem amerikanischen Hummer, *Homarus americanus*, durch Inkubation mit Cu(I)-GSH unter Stickstoff-Atmosphäre reaktiviert werden (Brouwer und Brouwer-Hoexum, 1992). Das Kupfer wurde dafür zuvor mit Hilfe von KCN aus dem AZ des nativen Hämocyanins entfernt, eine Methode, die auch bei Tyrosinasen und anderen Metalloproteinen Anwendung findet (Ciriolo *et al.*, 1990; Wigfield und Goltz, 1990a). Anhand dieser Experimente postulierten Brouwer und Brouwer-Hoexum (1992) einen zweistufigen Einbau des Kupfers, der in einem ersten Schritt eine schnelle reversible Anlagerung des Cu(I) an die Proteinoberfläche und dessen nachfolgende langsame Wanderung durch einen "Kupferkanal" bis hin zum AZ umfasst. Die Renaturierung der Apo-Tyrosinase aus Champignon, *Agaricus bisporus*, gelang mit Cu(I) besser als mit Cu(II) (Beltramini und Lerch, 1983). Dagegen wurde von Wigfield und Goltz (1990a, 1990b, 1993) explizit  $\text{CuSO}_4$ , aufgrund seiner Löslichkeit in Wasser, als Donor befürwortet. Dieses Argument verliert einerseits durch die angesprochene Toxizität freien Kupfers für die Zelle sowie durch die bekannten Daten bezüglich des Vorkommens und Transfers des komplexierten Metalls an Stichhaltigkeit. Andererseits konnte die rekombinante Tyrosinase aus dem Schimmelpilz, *Aspergillus oryzae*, wie erwähnt, ebenfalls mittels  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen regeneriert werden (Nakamura *et al.*, 2000).

Ähnlich uneinheitliche Ergebnisse wurden mit anderen Kupfer-Proteinen erzielt. So zeigten Ciriolo *et al.* (1990) die Reaktivierung der mit KCN behandelten nativen Apo-SOD aus Rinder-Erythrocyten sowohl mit Hilfe von Cu(I)-GSH, als auch  $\text{CuSO}_4$  oder Cu(II)-Methionin, während He *et al.* (2002) die humane SOD rekombinant, in Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ , in *E.coli* exprimierten und zur Rückfaltung ebenfalls die zweiwertigen Ionen verwendeten. Die heterologe Expression in *E.coli* und anschließende Renaturierung desselben Enzyms in alleiniger Anwesenheit von  $\text{CuSO}_4$  waren ebenfalls erfolgreich (Getzoff *et al.*, 1992; Banci *et al.*, 1998), obwohl die SOD *in vivo* mit dem bereits genannten Chaperon CCS interagiert (Banci *et al.*, 2003). Durch Einsatz von Cu(I)-GSH ließ sich Cu(I) sowohl in Metallothionein (Ferreira *et al.*, 1993), als auch Ceruloplasmin (Musci *et al.*, 1996) einbauen. Mit Ascorbinsäure zu Cu(I) reduziertes  $\text{CuCl}_2$  diente als beste Cu-Quelle für Menkes-Protein, eine ATPase des P-Typs (Jensen *et al.*, 1999). An Azurin, ein blaues Cu-Protein aus *Pseudomonas aeruginosa*, konnten sowohl Cu(I) als auch Cu(II) binden, wobei diese Bindung vor der Faltung der Polypeptidkette sehr viel schneller verlief als im Anschluss daran (Wittung-Stafshede, 2004).

Die Möglichkeiten des Kupfer-Einbaus in Proteine *in vitro* sind also vielfältig und die effektivste Methode ist ebenso wenig vorhersagbar wie der Faltungsmodus selbst. Da jedoch bei Kupfer-Typ 3-Proteinen und anderen (Azurin, SOD) jeweils mehrere Arten des Cu-Imports erfolgreich waren, handelt es sich vermutlich nicht um einen kritischen Faktor. Vielmehr lassen die vielen Befunde erfolgreichen Kupfer-Einbaus *in vitro* die Hypothese zu, dass die Notwendigkeit von Kupfer-Chaperonen *in vivo* eventuell in erster Linie auf ihre Rolle bei der Zellentgiftung, durch Komplexbildung des freien Metalls, zurückzuführen ist. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass bei korrekter Faltung des Proteingerüsts *in vitro* auch der Einbau des Metalls in das AZ gelingen sollte, wenn die Kupfer-Ionen in ausreichender Konzentration eingesetzt werden. Zudem wurde in den Versuchen mit der Spinat-Tyrosinase parallel sowohl Cu(I) als auch Cu(II) angeboten (3.4.4.2, 3.4.4.3).

Variabel sind auch die Kupfer-Quellen, bzw. die Behandlung des Kupfers vor dessen Einbau und der Versuchsaufbau währenddessen. Die Experimente von Jensen *et al.* (1999) fanden in Argon-Atmosphäre unter Ausschluss von Licht und Luft statt. In dieser Arbeit erfolgte die Durchführung aller Experimente unter aeroben Bedingungen, da gemäß Ciriolo *et al.* (1990) die aerobe Cu(I)-Präparation und Versuchsdurchführung keinen Nachteil gegenüber einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre darstellte und der Cu(I)-GSH-Komplex auch in Luft über mehrere Stunden stabil blieb. Dagegen zeigten Ferreira *et al.* (1993) die Notwendigkeit eines GSH-Überschusses in aerober gegenüber anaerober Umgebung. Dieser Befund wurde hier anhand der Untersuchungen zur Stabilität des Cu(I)-GSH-Komplexes, die nur bei mindestens 9 x GSH-Überschuss gegeben, dann jedoch über wenigstens 9 Std. konstant war, bestätigt (3.4.4.1).

#### 4.2.4.4 Einfluss der Thioetherbrücke am AZ auf die Koordination des Kupfers

In der Röntgenstruktur der nativen *ibCO* (Klabunde *et al.*, 1998) sowie des Hämocyanins aus dem Riesenkraken, *Octopus dolfeini* (Cuff *et al.*, 1998), konnte im Bereich des AZ eine Thioetherbrücke zwischen einem Cystein und einem der Histidine, die an der Cu-Bindung beteiligt sind, aufgelöst werden. Anzeichen für dieses ungewöhnliche Strukturmerkmal gab es auch bei einem weiteren Mollusken-HC aus der Weinbergschnecke, *Helix pomatia*, (Gielens *et al.*, 1997) sowie den Tyrosinasen aus den Schimmelpilzen, *Neurospora crassa* (Lerch, 1982) und *Aspergillus oryzae* (Fujita *et al.*, 1995). Ein Sequenz-Alignment ergab, aufgrund konservierter Cys- und His-Reste, zudem Hinweise auf eine solche Bindung auch bei verschiedenen anderen Tyrosinasen aus Bakterien, *Rhizobium meliloti* und *Marinomonas mediterranea*, Pilzen, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina* und *Aspergillus oryzae*, sowie im Pflanzenreich bei Tomate, Apfel, Kartoffel, Bohne und Spinat (López-Serrano *et al.*, 2002). Erkenntnisse bezüglich einer möglichen Bedeutung dieser kovalenten Bindung für die katalytische Aktivität wurden anhand von Modellkomplexen der CO gewonnen (Merkel *et al.*, 2005). Die Galaktoseoxidase aus dem Pilz *Dactylium dendroides* weist ein ähnliches Merkmal (Cys-Tyr-Thioether) auf. Hier wurde ein stabilisierender Effekt im Verlauf der Katalyse postuliert (Ito *et al.*, 1991). Bei der nicht geglückten Rückfaltung der *ibCO* gab die Lokalisation dieser Thioetherbrücke im Bereich der Cu-Bindungsstelle Anlass zur Spekulation über einen möglichen Einfluss dieser ungewöhnlichen Bindung auf die Faltung des Enzyms (Greving, 2003). Im Verlauf der Rückfaltung der Polypeptidkette hätten Fehlpaarungen des beteiligten Cystein-Restes mit benachbarten Cysteinen die korrekte

Ausbildung der nativen Struktur eventuell verhindern können. Dieses Risiko bestand prinzipiell auch bei der Spinat-PPO A, jedoch gleichermaßen für alle in der Sequenz vorhandenen Cysteine, die unter geeigneten Redox-Bedingungen dennoch Disulfidbrücken hätten ausbilden können sollen (4.2.3). Zudem ist die autokatalytische Ausbildung vergleichbarer Thioether mehrfach gezeigt worden (Rogers *et al.*, 2000; Firbank *et al.*, 2001; Daltrop *et al.*, 2002).

#### 4.2.5 Indikatoren für den Erfolg der Faltung

Den einzig eindeutigen Hinweis auf die korrekte und vollständige Faltung eines Enzyms liefert dessen katalytische Aktivität. Dieser Ansatz lag auch im Fall der Spinat-Tyrosinase nahe, da weder deren Struktur bekannt ist, noch das gereinigte native PPO A-Protein zur Verfügung stand, das als Vergleich für z.B. absorptions- oder fluoreszenzspektroskopische Messungen, die gewisse strukturelle Merkmale abbilden, hätte dienen können. Aufgrund der Unkenntnis der notwendigen Rückfaltungsbedingungen für die Inclusion Bodies und den daher bei den Experimenten anfallenden großen Proben-Anzahlen, war zudem ein möglichst einfach durchzuführender und zeitsparender Test erforderlich. Diese Anforderungen wurden von dem verwendeten Tropfen-Test (2.5.9.3) optimal erfüllt.

Rückblickend beurteilt, war die Enzymaktivität als Kriterium zu streng gewählt, da es dem eigentlichen Faltungsprozess voraus griff und nur das Endziel, nicht aber mögliche Zwischenergebnisse, damit zu erkennen waren. Die Risiken und Fehlerquellen, die diese Methode barg, wurden zwar weitestgehend, ob der Fülle der Faktoren aber unmöglich vollständig, ausgeschlossen. So wurden Inhibitoren und Substanzen, die das Signal überdeckten, einerseits in separaten Kontrollexperimenten (3.2.2.2), andererseits in jeweils parallel zum eigentlichen Versuch durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen (3.3.2.5, 3.4.4), identifiziert. Eine eventuell notwendige Aktivierung des Enzyms wurde durch eine Zugabe von Aktivatoren, wie SDS oder Trypsin, zu den Assay-Ansätzen berücksichtigt. Jeden Parameter, der im Verlauf der verschiedenen Versuchsreihen auftrat, gesondert systematisch zu untersuchen, hätte eine zeitlich nicht zu bewältigende Aufgabe dargestellt. Es kann daher nicht mit absoluter Sicherheit behauptet werden, dass eine potentiell vorhandene Aktivität auch detektiert worden wäre. Es wurden jedoch alle zur Verfügung stehenden Maßnahmen ergriffen, um dies zu gewährleisten.

Die Konsequenz aus den bisherigen Experimenten kann nur eine methodische Veränderung sein. Intermediäre oder vollständig gefaltete Zustände des Proteins, die zumindest einige Sekundärstrukturelemente enthalten, ließen sich z.B. mit Hilfe der CD-(Circular Dichroismus)-Spektroskopie detektieren. Mit einigen Proben wurden CD-Spektren aufgenommen, die jedoch nicht signifikant waren und einer umfassenden Modifikation der Versuchsdurchführung bedurft hätten. AUZ (Analytische Ultrazentrifugation) oder ESR-(Elektronen Spin Resonanz)-Spektroskopie stellen weitere Möglichkeiten zur Unterscheidung gefalteter und ungefalteter Polypeptide dar. Da den durchgeführten Versuchen jedoch keine Anhaltspunkte für geeignete Rückfaltungsbedingungen zu entnehmen waren, wären die Variablen zu vielfältig gewesen, als dass eine dieser, in der Realisierung weit aufwendigeren, Methoden sinnvoll hätte genutzt werden können.

Stattdessen böte sich an dieser Stelle ein erneuter Test der Additiva und Umgebungsbedingungen in mehr als 15 Kombinationen und unter Beobachtung der Löslichkeit, nicht der Aktivität, des Enzyms an. Diese wird durch eine ausbleibende Aggregation und Präzipitation des IB-Proteins bedingt und kann über das Ausmaß der Trübung der Proteinlösung photometrisch ermittelt werden (Hintze, 2005). Auf diese Weise werden Substanzen, die die Löslichkeit und damit den Rückfaltungsprozess beeinträchtigen, identifiziert und ausgeschlossen. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse können dann als Basis für die weitere Entwicklung des geeigneten Faltungsmodus dienen.

Der Ansatz, die Enzymaktivität als Indikator für die korrekte Faltung der Spinat-Tyrosinase zu verwenden, bleibt grundsätzlich richtig und in jedem Fall unverzichtbar. Es ist jedoch ratsam, den Blick vor Erreichen dieses Endziels auf intermediäre Faltungszustände zu lenken und die Methodik entsprechend auszurichten.

#### 4.2.6 Fazit aus den Rückfaltungsexperimenten der Spinat-PPO A

Bei dem Versuch, aus den unterschiedlichen, insgesamt erfolglosen Rückfaltungs-Experimenten, die mit der rekombinanten Spinat-Tyrosinase durchgeführt und deren Teilaspekte in diesem Kapitel im Detail diskutiert worden sind, ein Fazit zu ziehen, muss berücksichtigt werden, dass sich unter allen angeführten Referenzen keine Arbeit findet, in der die erfolgreiche Rückfaltung einer heterolog als IB-Protein exprimierten Tyrosinase gezeigt werden konnte. Die Versuche, die ausgehend von Inclusion Bodies der *ibCO* (Catecholoxidase aus der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas*) von Greiving (2003) durchgeführt wurden, blieben ebenfalls ohne positives Ergebnis. Mari *et al.* (1998) konnten zwar die Renaturierung einer Apfel-PPO in zwei Dialyseschritten zeigen, diese folgte jedoch auf eine vorangegangene Denaturierung des nativen Enzyms mit Hilfe von 6 M GdnHCl. Die Ausgangssituation unterschied sich daher deutlich von der IB-Rückfaltung, zumal auf eine Zugabe von Reduktionsmittel verzichtet worden war, sodass die Struktur bei der Entfaltung vermutlich partiell erhalten blieb.

Dies muss allerdings nicht heißen, dass die Rückfaltung von Inclusion Bodies für die rekombinante Herstellung von Tyrosinasen grundsätzlich der falsche Weg ist. Wie in Kapitel 4.1.3 dargestellt, existieren für die funktionelle Expression eines solchen Enzyms ebenso wenige Positivbeispiele. Beides sind viel versprechende Ansätze, wobei die Entwicklung in den letzten Jahren, ausgelöst durch die wachsende Kenntnis der beteiligten Mechanismen, vermutlich in die Richtung einer an die Expression gekoppelten Faltung des rekombinanten Proteins geht. Vor noch nicht einmal einem Jahrzehnt konnte dagegen die IB-Faltung als Mittel der Wahl angesehen werden (Rudolph und Lilie, 1996; Clark, 1998, 2001). Dies ist auch heute noch immer dann legitim, wenn ein adäquates Expressionssystem nicht bereits zur Verfügung steht oder über den Faltungs-Prozess *in vivo* so wenig bekannt ist, wie bei den pflanzlichen Tyrosinasen. In einem solchen Fall sind sowohl die Erfolgchancen als auch der Zeitaufwand zur Etablierung eines Systems zur Expression und Isolierung des löslichen, korrekt gefalteten Proteins oder Rückfaltung unlöslicher Aggregate vermutlich relativ ähnlich einzuschätzen. Wenn sich, wie hier beobachtet, die Überexpression generell als schwierig darstellt, bieten die erhaltenen Inclusion Bodies zumindest einen guten Ausgangspunkt. Daher wäre diese Methode auch weiterhin zu befürworten.

Für einen, bedauerlicherweise über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehenden, weiteren Versuch zur Renaturierung einer rekombinanten Tyrosinase wäre jedoch ein breiter angelegtes Screening der geeigneten Pufferbedingungen in Kombination mit einem anders gewählten Faltungsindikator, der sich nicht auf die Enzymaktivität stützt, ratsam. Hier könnte ein System hilfreich sein, das ähnlich wie das von Hintze (2005) entwickelte, die Protein-Löslichkeit als erstes Indiz für einen positiven Effekt bestimmter Additiva und anderer Parameter verwendet und die Methode mit Hilfe der daraus gewonnenen Kenntnisse in anschließenden Dialysen oder Chromatographien optimiert.

### 4.3 Aufreinigung nativer Tyrosinasen

Die Aufreinigung einer nativen pflanzlichen Tyrosinase umfasste im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie die Identifikation eines geeigneten Objektes, das in den Blättern von *Spinacia oleracea* gefunden wurde, und die Etablierung der ersten Aufreinigungsschritte. Die auf die Ammoniumsulfatfällung folgenden Versuche zur chromatographischen Auftrennung der Proteinprobe wurden hier lediglich begonnen und später von M. Gebhardt weiter entwickelt. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur einige Charakteristika der Spinat-Tyrosinase diskutiert, die bereits zu Beginn der Experimente auffielen. Einige andere Aspekte werden gemeinsam mit einer detaillierten Darstellung der Chromatographie-Methoden in der Arbeit von M. Gebhardt (2004) erläutert.

#### 4.3.1 Lokalisation der Tyrosinasen in der Pflanze

Abgesehen von einigen Ausnahmen bei Pilzen, wie einer Tyrosinase aus *Streptomyces*, die u.a. ins Medium sekretiert wird (Crameri *et al.*, 1982; Bernan *et al.*, 1985; Leu *et al.*, 1992), sind Tyrosinasen intrazelluläre Enzyme (Mayer und Harel, 1979). In Bakterien, Pilzen und Insekten liegen sie als lösliche Proteine im Cytoplasma vor und weisen demnach keine Signalpeptide oder Transmembran-Bereiche auf (Mayer und Harel, 1979; van Gelder *et al.*, 1997). Die Tyrosinasen aus Mensch und Maus sind dagegen mit einem 18 AS langen N-terminalen Signalpeptid ausgestattet, das ihren Transport in die Melanosomen bewirkt (García-Borrón und Solano, 2002). Dort liegen sie als integrale Membranproteine vor, deren Hauptteil sich im Inneren der Melanosomen befindet, während eine einzelne Transmembran-(TM)-Helix die Membran durchspannt und ein kleiner C-terminaler Anteil des Proteins dem Cytosol der Melanocyten, in denen sich die Melanosomen befinden, zugewandt ist (Sulaimon und Kitchell, 2003).

##### 4.3.1.1 Transport der Tyrosinasen in die Plastiden

In höheren Pflanzen sind Catecholoxidasen und Tyrosinasen ubiquitär in Plastiden lokalisiert (Arnon, 1949; Vaughn und Duke, 1984; Vaughn *et al.*, 1988). Nahezu alle Plastidentypen enthalten Polyphenoloxidasen, lediglich in Bündelscheidenzellen der Mohrenhirse (*Sorghum*) ließ sich im Gegensatz zum Mesophyll keine Enzymaktivität nachweisen (Vaughn *et al.*,

1988). Innerhalb der Plastiden liegt die PPO in Vesikeln, die in tubulärer Ausprägung z.B. in den Leukoplasten der Karotten-Wurzel vorkommen (Vaughn *et al.*, 1988), oder im Falle der Chloroplasten in den Thylakoiden vor. Polyphenoloxidasen werden bei höheren Pflanzen im Kern codiert (Mayer, 1987), im Cytoplasma als Precursor synthetisiert und posttranslational mit Hilfe eines N-terminalen Transit-Peptids, das aus etwa 80 - 100 AS besteht, in die Thylakoide transportiert (van Gelder *et al.*, 1997). Die zweigeteilte Struktur dieses Transit-Peptids, das u.a. bei Polyphenoloxidasen aus Tomate (Newman *et al.*, 1993; Shahar *et al.*, 1992), Spinat (Hind *et al.*, 1995), Birne (Nishimura *et al.*, 2003) und der amerikanischen Kermesbeere, *Phytolacca americana*, (Joy *et al.*, 1995) gefunden wurde, ist typisch für plastidäre Proteine, die bis ins Thylakoid-Lumen befördert werden (Kieselbach *et al.*, 1998). Sie zeichnet sich durch einen N-terminalen Serin-/Threonin-reichen, hydrophilen Abschnitt, der charakteristisch für stromale Proteine ist, sowie eine hydrophobe Domäne von etwa 25 AS unmittelbar vor der Spaltstelle des Signalpeptids, die den Transfer über die Thylakoidmembran gewährleistet, aus (Keegstra und Olsen, 1989). An isolierten Chloroplasten konnte der Import des 67 kDa Precursors der PPO B aus Tomate in einem ersten Schritt ins Stroma (62 kDa Intermediat) und in einem zweiten Schritt in das Thylakoid-Lumen (59 kDa matures Protein) *in vitro* gezeigt werden (Sommer *et al.*, 1994). Eine daran beteiligte SPP (stromal processing peptidase) wurde von Koussevitzky *et al.* (1998a) isoliert. Interessanter Weise wird der Import durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in einer Konzentration von 0.1 - 1.0  $\mu\text{M}$  aktiviert, bei Zugabe von  $> 1 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  jedoch gehemmt (Sommer *et al.*, 1995; Koussevitzky *et al.*, 1998b). Eine äquivalente zweigeteilte Prozessierung wurde auch für die PPO A aus Spinat nachgewiesen (Clausmeyer *et al.*, 1993; Sokolenko *et al.*, 1995).

#### 4.3.1.2 Luminale Lokalisation oder Assoziation an die Thylakoidmembran

Ob die Polyphenoloxidasen höherer Pflanzen in der Membran oder im Lumen der Thylakoide lokalisiert sind, ist der Literatur nicht eindeutig zu entnehmen. Viel spricht dafür, dass sie sich in intakten Zellen in der Thylakoidmembran befinden, da sie vielfach aus der Membranfraktion isoliert wurden (Golbeck und Cammarata, 1981; Lax und Vaughn, 1991; Sheptovitzky und Brudvig, 1996). Es handelt sich jedoch vermutlich nicht um intrinsische Membranproteine, da sie durch eine Behandlung mit Ultraschall, milden Detergenzien oder Proteasen aus der Membran heraus gelöst werden können (Parish, 1972; Robinson und Dry, 1992; Sommer *et al.*, 1994). Zudem wurden bei Aufreinigungen aus Eisberg-Salat (*Lactuca sativa*, Heimdal *et al.*, 1994; Chazarra *et al.*, 2001b) und Rüben (*Beta vulgaris*, Escribano *et al.*, 2002; Gandía-Herrero *et al.*, 2004) sowohl in löslichen als auch in Membranfraktionen Polyphenoloxidasen gefunden.

Dies deckt sich mit den Befunden aus der Aufreinigung der Spinat-Tyrosinase in dieser Arbeit, wobei bereits in den ersten Waschschrinen ein Teil der Enzymaktivität in den Überständen nachzuweisen war (3.5.2.1). Ob die dafür verantwortlichen Proteine ursprünglich löslich im Thylakoidlumen vorlagen oder aus der Membran herausgetrennt worden sind, ließ sich aufgrund der recht groben Aufreinigungsmethode nicht ermitteln. Dies stellt auch bei der Interpretation der Ergebnisse vieler Enzymextraktionen aus frühen Veröffentlichungen ein Problem dar, da hier oftmals nicht spezifiziert werden kann, ob es sich bei der experimentell gefundenen Lokalisation um einen Artefakt in Folge der Präparation oder den natürlichen Aufenthaltsort handelte (Mayer und Harel, 1979). Die

starke mechanische Beanspruchung bei der Zerstörung des Blattgewebes mit einem Mixer zur Herstellung der Thylakoide (2.5.7.2) und die anschließenden Waschschriffe (2.5.7.3), müssen jedoch in jedem Fall eine zumindest teilweise Zerstörung der Thylakoidstruktur herbeigeführt haben, damit die luminalen Proteine in den Überstand gelangen konnten. Denn auch bei einer Bindung an die Membran, würde diese auf der luminalen Seite erfolgen (Sheptovitzky und Brudvig, 1996) und das Enzym nach einer Lösung in diesem Kompartiment vorliegen.

Dies geht z.B. aus Sequenz-Untersuchungen von Newman *et al.* (1993) an den sieben Mitgliedern der Tyrosinase-Genfamilie aus Tomate hervor. Bei dreien dieser Proteine, PPO A, A' und C, konnten im Rahmen einer Analyse nach Kyte und Doolittle (1982) innerhalb der 60 C-terminalen AS-Reste zwei  $\alpha$ -helicale Bereiche ermittelt werden, die auf eine mögliche Membran-Assoziation hindeuten. Dies könnte auf eine ähnliche Orientierung hinweisen, wie sie die humane Tyrosinase in den Melanosomen einnimmt (Sulaimon und Kitchell, 2003). Die übrigen vier Tomaten-Proteine, PPO B, D, E und F, weisen dieses Sekundärstruktur-Merkmal nicht auf und wären damit vermutlich löslich. Diese Annahme wird unterstützt durch die Importstudien von Sommer *et al.* (1994), bei denen die PPO B bis in das Thylakoidlumen geleitet wurde. Die Sequenz der Spinat-Tyrosinase, PPO A, zeigt in der C-terminalen Domäne deutliche Homologien zu PPO B und F aus Tomate (Hind *et al.*, 1995). Hier werden sieben  $\beta$ -Stränge vorhergesagt, die im Falle des Hämocyanins aus *Panulirus interruptus* (Gaykema *et al.*, 1984) sowie der SOD aus Rindererythrocyten (Tainer *et al.*, 1982), ein  $\beta$ -Barrel ausbilden, wie anhand der entsprechenden Röntgenstrukturen festgestellt werden konnte. Zusätzlich wird eine amphiphatische  $\alpha$ -Helix angezeigt, die beim Arthropoden-HC aus dem  $\beta$ -Barrel herausragt und mit einer Helix aus der N-terminalen Domäne interagiert (Volbeda und Hol, 1989). Ähnliche Wechselwirkungen sind auch bei der Spinat-PPO A denkbar (Hind *et al.*, 1995).

Diese Befunde deuten zunächst auf die Löslichkeit der PPO A aus *Spinacia oleracea* hin. Unter dieser Annahme ist nicht auszuschließen, dass auch in dieser Pflanze eine Genfamilie vorliegt, deren Existenz außer bei *Lycopersicon* (Tomate) auch bei anderen Spezies, u.a. *Malus domestica* (Apfel; Boss *et al.*, 1995), *Solanum tuberosum* (Kartoffel; Hunt *et al.*, 1993) und *Trifolium pratense* (Wiesenklée; Sullivan *et al.*, 2004), gezeigt worden ist, und die eine unterschiedliche Lokalisation der Isozyme ermöglichen würde. Die PPO aus Weintrauben, ist bisher die einzige, die mit Hilfe einer Southern-Analyse als alleinige Kopie bestätigt wurde (Dry und Robinson, 1994).

Die ersten Schritte der zur Extraktion der Spinat-Tyrosinase verwendeten Methode (2.5.7.2, 2.5.7.3), sind jedoch ursprünglich zur Isolation der LHCII-Kinase, eines integralen Membranproteins, konzipiert worden (Zer *et al.*, 1999). Die Enzym-Aufreinigungen, die zur Klonierung der PPO A führten, obwohl das eigentliche Ziel in der Isolation der LHCII-Kinase bestand, erfolgten aus den gleichen Gründen nach ähnlichen Protokollen (Hind *et al.*, 1995; Sokolenko *et al.*, 1995). In diesen Fällen befand sich die Tyrosinase eindeutig in der Membranfraktion, ein Resultat, das sich in der hohen Aktivität bestätigt fand, die in der mit Ammoniumsulfat (AMS) gefällten Fraktion von Membranproteinen gefunden wurde (3.5.2.1). Periphere Membranproteine, die keine TM-Helix besitzen, sollten durch die Behandlung mit 2 M NaBr im Verlauf der Aufarbeitung (2.5.7.3) entfernt worden sein, da dieses chaotrope



Salz die Löslichkeit von Proteinen stark unterstützt, sofern sie ihm zugänglich sind (Karnauchov *et al.*, 1997). Dies weist auf eine sehr feste Membran-Assoziation der PPO hin. Die einzig andere bleibende Erklärung wäre ein Erhalt der Integrität eines Großteils der Thylakoide und damit Schutz der luminalen Proteine bis zur Solubilisierung der Membranen, wenn die löslichen Lumen-Proteine dann gemeinsam mit den solubilisierten Membranproteinen in die lösliche Fraktion der Probe übergangen. Dieser Aspekt bleibt spekulativ, ebenso wie die Versuche, die unternommen wurden, die PPO einem definierten Membranbereich und damit einer Colokalisation mit einem der beiden Photosysteme (PS) zuzuordnen. Während Lieberei und Biehl (1976) die PPO aus Spinat-Blättern weder eindeutig mit den Membranen der Stroma-(PSI)- noch der Grana-(PSII)-Thylakoide assoziieren konnten, wiesen Experimente von Lax und Vaughn (1991) an *Vicia faba* und Sheptovitzky und Brudvig (1996) an *Spinacia* auf eine Verbindung mit den PSII-Membranen der Grana-Thylakoide hin.

Die Hypothese einer generell stabilen Interaktion des Spinat-Proteins mit Komponenten der Thylakoidmembran wurde unterstützt von den Ergebnissen aus der weiterführenden Aufreinigung im Anschluss an die AMS-Fällung. Im Verlauf der IEX kam es bei der Verwendung von detergensfreien Puffersystemen zu großen Proteinverlusten (3.5.2.2; Gebhardt, 2004). Erst der Einsatz von LM führte zu einer ausreichenden Löslichkeit der Tyrosinase, die demnach entweder noch mit Membranteilen assoziiert war, die nur auf diese Weise solubilisiert werden konnten, oder selbst in der hydrophilen Umgebung schlecht löslich war (Gebhardt, 2004). Beides würde auf eine Wechselwirkung dieses Proteins mit der Membran *in vivo* hindeuten, das aber, wie erwähnt, nicht zwingend das einzige, in Spinat auftretende PPO-Protein sein muss. Vielmehr ist es gut möglich, dass ein Pool verschiedener Vertreter dieser Enzymspezies vorliegt, der eine Verteilung auf verschiedene Kompartimente zulässt.

### 4.3.2 Heterogenität der Polyphenoloxidasen in der Pflanze

Multiple Formen der PPO lassen sich nicht immer unterschiedlichen Kompartimenten zuordnen. In vielen Fällen wurden im Verlauf von Extraktionen verschiedene Formen von Polyphenoloxidasen gefunden. So gelang Eicken *et al.* (1998) die Isolation zweier Catecholoxidasen aus der Süßkartoffel, *Ipomoea batatas*. Bei Tee (Halder *et al.*, 1998) aber auch bei Pilzen, wie dem Champignon (Gerritsen *et al.*, 1994) oder *Aspergillus oryzae* (Ichishima *et al.*, 1984), wurden ebenfalls jeweils mehrere Isoformen beschrieben. Ob es sich bei allen isolierten multiplen Formen um echte Isozyme, Aufreinigungs-Artefakte oder eventuell Precursor und die daraus abgeleiteten maturen Proteine handelt, lässt sich nicht immer eindeutig feststellen (Mayer und Harel, 1979). Das Vorkommen von Isozymen wird jedoch durch die nachgewiesene Existenz von Genfamilien zusätzlich belegt (Hunt *et al.*, 1993; Newman *et al.*, 1993; Boss *et al.*, 1995; Wichers *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2004).

In der Präparation der Spinat-Tyrosinase wurden in einer schwach denaturierenden PAGE viele aktive Banden angefärbt (3.5.2.1). Da die Auftrennung in Abwesenheit von SDS erfolgte, konnte die Masse der zugehörigen Polypeptide nicht analysiert werden. Auffällig war jedoch ein eindeutiges Bandenmuster, das nicht auf die verschmierte Farbreaktion einer Proteinspezies in einer einzigen Bande zurückzuführen war. Aufgrund ihrer Verteilung über

einen weiten Bereich des Gels ließen sich die vielen Banden weder allein durch unterschiedliche Isoformen noch durch proteolytische Spaltprodukte erklären, auch wenn Molekulargewichtsbestimmungen von Polyphenoloxidasen generell sehr uneinheitlich sind.

Verallgemeinernd ist bei pflanzlichen Polyphenoloxidasen von etwa 60 - 70 kDa schweren Vorläufer-Proteinen auszugehen, die zu maturaen Formen mit Molekulargewichten von 55 - 65 kDa prozessiert werden, proteolytisch aktivierbar sind und dann Massen zwischen 40 und 45 kDa aufweisen (van Gelder *et al.*, 1997). Es sind jedoch auch mehrfach größere aktive Formen nachgewiesen worden (Sommer *et al.*, 1994). Das von Hind *et al.* (1995) und Sokolenko *et al.* (1995) unabhängig voneinander identifizierte 64 kDa-Protein aus Spinat korrelierte aufgrund einer N-terminalen Sequenzierung mit der aktiven PPO, die eine molekulare Masse von 48 kDa aufwies und von Sheptovitzky und Brudvig (1996) zusätzlich zu einem 72 kDa-Precursor nachgewiesen werden konnte. Dies wäre in dieser Arbeit eventuell mit der aktivitätsgefärbten Bande bei etwa 50 kDa in Einklang zu bringen (3.5.2.1), beantwortet jedoch nicht die Frage nach den multiplen höhermolekularen Banden. Ein Erklärungsansatz hierfür wären Artefakte, die während der Präparation oder im Verlauf der Elektrophorese auftraten und sich in einer Aggregation der Proteine äußerten. Da die höhermolekularen Banden aus dem schwach denaturierenden Gel in einer anschließenden SDS-PAGE jedoch bei 64 kDa zu finden waren (3.5.2.1), bieten sich native Oligomere, die in der Literatur mehrmals erwähnt worden sind, als weitere Erklärungsmöglichkeit an. Heimdal *et al.* (1994) gelang die Isolation zweier Isoformen eines PPO-Tetramers von 150 und 136 kDa aus photosynthetischem bzw. gefäßreichem Gewebe von Eisberg-Salat, *Lactuca sativa*, wobei nur die letztere Variante leicht in 40 bzw. 46 kDa-Monomere dissoziierte. Aus der Thylakoidmembran von *Lactuca* konnten später zwei Proteine (49 kDa und 188 kDa) aufgereinigt werden, die als Mono- und Tetramer charakterisiert wurden (Chazarra *et al.*, 1996; Chazarra *et al.*, 2001b). Golbeck und Cammarata (1981) isolierten ebenfalls zwei PPO-Spezies aus Spinat-Chloroplasten, ein 158 kDa schweres Protein, das als Tetramer bezeichnet wurde, sowie ein 42.5 kDa schweres Monomer. Dieser Befund wurde von Nguyen *et al.* (1996) durch die Aufreinigung eines 64 kDa-Proteins aus Spinat bestätigt, das proteolytisch in ein 43 kDa-Fragment überführbar war, selbst jedoch so gut wie inaktiv vorlag, wogegen die Hauptaktivität der Probe mittels Gelfiltration in Fraktionen nachgewiesen wurde, die Proteine mit einem MW zwischen 180 und 200 kDa enthalten sollten. Die Existenz eines nativen Tyrosinase-Oligomers in Spinat ist daher nicht auszuschließen. Ob es sich hierbei, wie in den dargestellten Studien lediglich aus dem ermittelten MW geschlossen wurde, um ein Tetramer handeln könnte, bleibt ungeklärt.

### 4.3.3 Latenz und Aktivierung der Polyphenoloxidasen

Abgesehen von ihrer elektrophoretischen Auftrennung in viele Banden, fiel bei der Aufreinigung der Spinat-Tyrosinase die fehlende Latenz des Enzyms auf, die für viele andere Polyphenoloxidasen (Moore und Flurkey, 1990; Robinson und Dry, 1992; Escribano *et al.*, 1997, 2002; Laveda *et al.*, 2000, 2001; Chazarra *et al.*, 2001a) und u.a. auch für die Spinat-PPO (Tolbert, 1973; Golbeck und Cammarata, 1981; Trebst und Depka, 1995) beschrieben wurde. Dies ist vermutlich auf eine Aktivierung im Verlauf des Aufarbeitungsprozesses zurückzuführen, die auch von Lieberei und Biehl (1976) beobachtet wurde. In intakten

Chloroplasten aus Spinat-Blättern konnte ausschließlich eine latente PPO nachgewiesen werden, die im Verlauf der Seneszenz oder Lagerung der Präparate spontan irreversibel aktiviert wurde (Meyer und Biehl, 1980, 1982). Als Erklärung für die Aktivitätszunahme während der Seneszenz wurde, anstelle einer *de novo* Synthese, die Herauslösung des Enzyms aus der Thylakoidmembran und eine damit einhergehende Aktivierung postuliert (Meyer und Biehl, 1981). Der Mechanismus der Aktivierung *in vivo* ist jedoch unbekannt.

#### 4.3.3.1 Proteolytische Aktivierung

Mayer (1966) zeigte, dass die CO aus Zuckerrüben innerhalb der Chloroplasten membrangebunden vorlag, mit Hilfe von Proteasen jedoch sowohl solubilisiert als auch aktiviert werden konnte (Escribano *et al.*, 1997). Dies deutet zum einen auf eine Aktivierung mit Verlassen der Thylakoidmembran, zum anderen auf eine proteolytische Prozessierung hin. Bei *Beta vulgaris* wurde sowohl eine lösliche als auch membranständige PPO in latenter Form isoliert (Escribano *et al.*, 1997). Daraus folgt jedoch nicht zwingend, dass die Hypothese von der proteolytischen Solubilisierung des Proteins aus der Membran, die zum Auftreten einer löslichen und gleichzeitig aktiven Form führt, falsch sein muss. Vielmehr ließe sich dieses Resultat auch als Existenz verschiedener Isozyme interpretieren. Die von Newman *et al.* (1993) entdeckte mögliche Membranassoziation, bei dreien der sieben PPO-Proteine aus Tomate, lässt vor diesem Hintergrund eine proteolytische Abspaltung des C-Terminus und Freisetzung des aktiven Enzyms durchaus plausibel erscheinen.

Dies würde mit dem Aktivierungsmechanismus der humanen Tyrosinase übereinstimmen, der von Valverde *et al.* (1992) vorgeschlagen wurde. Da sich das humane Enzym durch einen Trypsin-Verdau aus der Membran lösen lässt (Quevedo *et al.*, 1975; Nishioka, 1977; Wittbjer *et al.*, 1989), wurde vermutet, dass dabei der Hauptteil des Proteins, der in das Innere des Melanosoms ragt, solubilisiert wird und der C-Terminus zusammen mit der TM-Helix in der Membran verbleibt. Die postulierte Schnittstelle liegt bei pflanzlichen und pilzlichen Tyrosinasen an einer ähnlichen Position zwischen der zentralen und der C-terminalen Domäne wie bei dem humanen Äquivalent. Arthropoden-Phenoloxidasen weisen dagegen eine N-terminale Schnittstelle für Proteasen auf (van Gelder *et al.*, 1997).

Bei Pflanzen und Pilzen ist die proteolytische Aktivierbarkeit der PPO *in vitro* vielfach gezeigt worden (Tolbert, 1973; Mayer und Harel, 1979; Espín *et al.*, 1999; Espín und Wichers, 1999; Laveda *et al.*, 2001). Anhand einer Analyse der cDNA der PPO aus Weintrauben konnte das nativ aufgereinigte 40 kDa-Protein als der mittlere 40.5 kDa-Teil des 67 kDa schweren Precursors, abzüglich des Transit-Peptids von 10.6 kDa und der C-terminalen Domäne von 16.2 kDa, identifiziert werden (Dry und Robinson, 1994). Bei den Experimenten mit dem 64 kDa-Protein aus Spinat wurde ein N-terminales Abbauprodukt von 39 kDa und ein C-terminales Fragment von 21 kDa erwähnt (Sokolenko *et al.*, 1995). Da während der ersten Schritte der Aufreinigung der Spinat-Tyrosinase in dieser Arbeit keine Proteaseinhibitoren verwendet wurden (2.5.7.2, 2.5.7.3), ist eine Aktivierung durch eventuell in der Probe enthaltenen proteolytische Enzyme nicht auszuschließen.

#### 4.3.3.2 SDS und andere Aktivatoren

Robinson und Dry (1992) setzten zwei unterschiedliche Methoden zur Aktivierung der latenten PPO (60 kDa) aus *Vicia faba* ein. Eine Proteolyse ergab ein aktives Enzym von 42 kDa und ein inaktives C-terminales Spaltprodukt von 15 - 18 kDa. Interessanter Weise ließ sich das Protein jedoch bei unverändertem MW (60 kDa) auch mit Hilfe von 6 mM SDS (entspricht etwa 0.17 %, Bhairi, 1997) aktivieren. Daraus sind die Vielfalt der Aktivierungsmethoden und die Variabilität der zugrunde liegenden Prozesse abzuleiten, die auch *in vitro* belegt sind. Die Verwendung von SDS ist zwar unphysiologisch, erfreut sich jedoch großer Beliebtheit, nicht nur zur Aktivierung latenter Tyrosinasen (Moore und Flurkey, 1990; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993a; Escribano *et al.*, 1997; Laveda *et al.*, 2000; Chazarra *et al.*, 2001b), sondern auch zur Umwandlung von Hämocyaninen, Sauerstofftransportproteinen, von Cheliceraten in aktive Phenoloxidasen (Decker *et al.*, 2001). SDS, das in höheren Konzentrationen destabilisierend auf Proteinstrukturen wirkt und eine Inaktivierung zur Folge hat (López-Serrano *et al.*, 2002), wird in diesen Fällen in Konzentrationen unterhalb der CMC (0.2 - 0.3 % oder 7 - 10 mM; Bhairi, 1997) eingesetzt. Die Grenzen des Aktivierungseffektes liegen z.B. bei der Tyrosinase aus *Marinomonas mediterranea* (López-Serrano *et al.*, 2002) und *Agaricus bisporus* (3.2.2.2) recht nahe beieinander, bei 0.1 - 0.2 %. Eine Förderung der PPO-Aktivität, wurde zudem durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vaughan und McIntyre, 1975), Licht (Tolbert, 1973), extreme pH-Werte (pH 3 - 3.5 oder pH 11.5; Mayer und Harel, 1979; Laveda *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000), Cyclodextrine, die phenolische Inhibitoren komplexieren (Sojo *et al.*, 1999), und andere Substanzen beschrieben.

Die proteolytischen Aktivierung ließe sich relativ einfach durch die Entfernung einer Domäne erklären ließe, die den Zugang zum AZ versperrt. Wie bereits bei der Tyrosinase aus *Neurospora crassa* vermutet wurde (Beltramini *et al.*, 1990), konnte anhand der *ibCO* gezeigt werden, dass eine C-terminale Domäne verantwortlich ist für die Latenz des Enzyms, die bei deren Entfernung aufgehoben wird (Gerdemann *et al.*, 2002b; 1.1.4.1). Im Gegensatz dazu ist der Reaktionsmechanismus des SDS nicht so leicht zu verstehen. Diesbezüglich wurden Veränderungen eher der Tertiär- als Sekundärstruktur (Karbassi *et al.*, 2004) bzw. gewisse Konformationsänderungen postuliert (Espín und Wichers, 1999), die auch eine geringfügige Varianz des elektrophoretisch bestimmten Molekulargewichtes (48 kDa/47 kDa) zur Folge hatten (Moore und Flurkey, 1990).

Ein denkbares physiologisches Äquivalent zum SDS stellen Lipide oder Fettsäuren dar. Diese könnten einerseits eine Aktivierung der Tyrosinasen durch deren Solubilisierung und Freisetzung aus einer Membran oder ebenfalls eine Konformationsänderung bewirken. So wäre die spontane Aktivitätszunahme während der Seneszenz oder Alterung von Präparaten eventuell von Fettsäuren zu vermitteln (Golbeck und Cammarata, 1981; Mayer, 1987). Eine andere Funktion wurde verschiedenen Fettsäuren von Ando *et al.* (2004) zugesprochen, die diesbezüglich eine Regulation des proteosomalen Abbaus der humanen Tyrosinase annahmen. Dagegen führten Jiménez-Cervantes *et al.* (1995) den Effekt mehrerer *in vitro* getesteter nicht ionischer Detergenzien auf ihre Beeinflussung der C-terminalen Konformation und die damit einhergehende Destabilisierung der humanen Tyrosinase als Membrankomponente zurück.

Das Protokoll zur Aufarbeitung der Spinat-Tyrosinase beinhaltete auch die Solubilisierung der Thylakoidmembranen mit Hilfe von OG (2.5.7.3), für die Extraktion der Tyrosinasen aus Äpfeln und Kartoffeln (2.5.8) wurde TX-114 eingesetzt. Hier bietet sich damit ein weiterer Ansatz zur Interpretation der fehlenden Latenz der isolierten Enzyme. Während letzteres die humane Tyrosinase aktiviert (Jiménez-Cervantes *et al.*, 1995) und eine PPO aus Kartoffeln, *Solanum tuberosum*, in dessen Anwesenheit in aktiver Form isoliert wurde (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993b), blieb bei der Isolation der PPO aus Blättern von *Solanum tuberosum* (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1993a), Trauben, *Vitis vinifera* (Sánchez-Ferrer *et al.*, 1989), und Bananen, *Musa acuminata* (Sojo *et al.*, 1998), die Latenz erhalten. TX-100, Tween 80 und andere Detergenzien konnten bei der Spinat-PPO eine Aktivitätssteigerung bewirken (Satô und Hasegawa, 1976). Vermutlich wirken sich derartige Effekte nicht bei allen Organismen gleichermaßen aus.

Auf den physiologischen Aktivierungsmechanismus gibt es damit viele Hinweise, jedoch keinen Beleg für den tatsächlichen Prozess *in vivo*. Die spontan auftretende Bräunung von pflanzlichem Gewebe, die bei dessen Alterung oder mechanischer Verletzung allgemein zu beobachten ist, reicht allein nicht als Argument für einen notwendigen Mechanismus zur PPO-Aktivierung aus. Egal ob für die Überführung in den aktiven Zustand eine Freisetzung oder anderweitige Konformationsänderung des Enzyms verantwortlich ist, geht sie vermutlich in jedem Fall mit einer Aufhebung der Kompartimentgrenzen einher. Diese macht den Kontakt des Enzyms aus den Plastiden mit seinen phenolischen Substraten aus der Vakuole und deren Umsatz möglich. Denkbar ist zudem nicht nur die Speicherung der Substrate, sondern eventuell auch bestimmter aktivierender Substanzen, in der Vakuole, die erst bei einer Überwindung der Organellmembranen die Aktivität der PPO induzieren. Hier zeigt sich die unumgängliche Bedeutung von Membranen und Zellkompartimentierung für die Regulation der Melaninsynthese bei Pflanzen.

## 5 Zusammenfassung

In ihrer dualen Funktion als Monophenolhydroxylase (EC 1.14.18.1) und  $\alpha$ -Diphenoloxidase (EC 1.10.3.1) ist die Tyrosinase das Schlüsselenzym der Melanogenese, der Synthese des Melanins, und übernimmt damit quer durch alle Organismenreiche Aufgaben von der Pigmentierung bis hin zu einer Beteiligung an der Immunantwort. Sie zählt, zusammen mit den Catecholoxidasen und Hämocyaninen, zu den Typ-3-Kupfer-Proteinen, die sich durch ein Aktives Zentrum auszeichnen, das in der Lage ist, Sauerstoff und phenolische Substrate reversibel zwischen zwei Kupfer-Ionen in  $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -Koordination, *side-on* verbrückend, zu binden. In Pflanzen ist die Tyrosinase ubiquitär in den Plastiden lokalisiert, wo sie vermutlich an die luminale Seite der Thylakoidmembran assoziiert vorliegt.

Bisher konnte weder die Funktion der pflanzlichen Tyrosinase genau identifiziert, noch die Struktur eines solchen Enzyms aufgeklärt werden. Mit dem späteren Ziel, durch eine röntgenkristallographische Analyse die zugrunde liegende strukturelle Ursache der zusätzlichen Monophenolhydroxylase-Aktivität von Tyrosinasen gegenüber reinen Catecholoxidasen ermitteln zu können, wurde in dieser Arbeit ein bakterielles Expressionssystem entwickelt, das zur Herstellung einer rekombinanten Tyrosinase oder Polyphenoloxidase (PPO) aus *Spinacia oleracea* (Spinat) für die Kristallisation verwendet werden kann.

Zur Überexpression der PPO A aus Spinat erwies sich eine Kombination aus pT7-7-Vektor und *Escherichia coli*-BL21(DE3)-Zellen als optimal. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 50 mM Glucose bei 37°C und 210 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte nach Erreichen einer Optischen Dichte von 0.5 bei 700 nm mit Hilfe von 0.5 mM Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid für 5 Stunden. Das rekombinante Protein konnte in Form von Inclusion Bodies isoliert, mit 8 M Harnstoff  $\pm$  10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol solubilisiert und durch die Fusion mit einem His<sub>6</sub>-Peptid anhand einer Affinitätschromatographie über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosematrix aufgereinigt werden. Zahlreiche Versuche zur Rückfaltung des denaturierten Proteins in seine native, katalytisch aktive Konformation blieben hingegen, sowohl bei einer Immobilisierung des Proteins als auch bei Ansätzen in Lösung, erfolglos. Die hierfür eingesetzten unterschiedlichen Faltungs-Additiva und Durchführungsmethoden zum Pufferaustausch über Verdünnungen bzw. Dialysen hatten ebenso wenig einen positiven Effekt auf die Renaturierung des Enzyms, wie dessen Bindung an ein Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharosematerial.

In einer parallelen Versuchsreihe konnte Spinat, aufgrund seiner hohen Tyrosinaseaktivität, als geeignetes Objekt für die Isolation des nativen Enzyms identifiziert werden. Im Anschluss an eine Thylakoidpräparation, Solubilisierung der Thylakoidmembranen und Fällung des Proteins mit Ammoniumsulfat, wurden Experimente zur weiteren Anreicherung der Tyrosinase-Aktivität über eine Anionenaustausch-Chromatographie und zur Etablierung einiger nachfolgender Aufreinigungsschritte durchgeführt.

## 6 Literatur

**Agashe V.R., Guha S., Chang H.C., Genevoux P., Hayer-Hartl M., Stemp M., Georgopoulos C., Hartl F.U., Barral J.M. (2004)** Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell* 117 (2): 199-209

**Allen J.F. (1992)** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1098: 275-335

**Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402

**Amaravadi R., Glerum D.M., Tzagoloff A. (1997)** Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum. Genet.* 99 (3): 329-33

**Ambrosius D., Rudolph R. (1992)** Process for the reactivation of denatured protein. *European Patent Application.* (867679). WO 92/09622, 5618927

**Andersen S.O., Peter M.G., Roepstorff P. (1996)** Cuticular Sclerotization in Insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B (4): 689-705

**Ando H., Watabe H., Valencia J.C., Yasumoto K., Furumura M., Funasaka Y., Oka M., Ichihashi M., Hearing V.J. (2004)** Fatty acids regulate pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase: a new aspect of ubiquitin-proteasome function. *J. Biol. Chem.* 279 (15): 15427-33

**Anfinsen C.B., Haber E. (1961)** Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 236: 1361-3

**Anfinsen C.B., Haber E., Sela M., White F.H.J. (1961)** The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease during Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1309-1314

**Arakawa T., Timasheff S.N. (1982)** Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry* 21 (25): 6536-44

**Armstrong N., de Lencastre A., Gouaux E. (1999)** A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 8 (7): 1475-83

**Arnon D.I. (1949)** Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 (1): 1-15

**Aroca P., García-Borrón J.C., Solano F., Lozano J.A. (1990)** Regulation of mammalian melanogenesis. I: Partial purification and characterization of a dopachrome converting factor: dopachrome tautomerase. *Biochim. Biophys. Acta* 1035 (3): 266-75

**Aruoma O.I., Halliwell B., Gajewski E., Dizdaroglu M. (1991)** Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273 (Pt 3): 601-4

**Ashida M., Brey P.T. (1995)** Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (23): 10698-702

**Aspán A., Huang T.S., Cerenius L., Söderhäll K. (1995)** cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (4): 939-43

- AthenaES™ (2003)** Protein Refolding Kit: Applications Manual. 1. Ed. (v1.0) Athena Enzyme Systems Group, Athena Environmental Sciences, Inc., Baltimore, MD, USA
- Baldwin M.J., Root D.E., Pate J.E., Fujisawa K., Kitajima N., Solomon E.I. (1992)** Spectroscopic Studies of Side-On Peroxide-Bridged Binuclear Copper(II) Model Complexes of Relevance to Oxyhemocyanin and Oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10421-10431
- Baldwin R.L. (1995)** The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J. Biomol. NMR* 5 (2): 103-9
- Baldwin R.L., Rose G.D. (1999a)** Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci.* 24 (1): 26-33
- Baldwin R.L., Rose G.D. (1999b)** Is protein folding hierarchic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci.* 24 (2): 77-83
- Banci L., Benedetto M., Bertini I., Del Conte R., Piccioli M., Viezzoli M.S. (1998)** Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme? *Biochemistry* 37 (34): 11780-91
- Banci L., Bertini I., Cramaro F., Del Conte R., Viezzoli M.S. (2003)** Solution structure of Apo Cu,Zn superoxide dismutase: role of metal ions in protein folding. *Biochemistry* 42 (32): 9543-53
- Baneyx F., Palumbo J.L. (2003)** Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol. Biol.* 205: 171-197
- Baneyx F., Mujacic M. (2004)** Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* 22 (11): 1399-408
- Battaini G., Monzani E., Perotti A., Para C., Casella L., Santagostini L., Gullotti M., Dillinger R., Näther C., Tucek F. (2003)** A Double Arene Hydroxylation Mediated by Dicopper(II)-Hydroperoxide Species. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 4185-4198
- Beltramini M., Lerch K. (1982)** Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins. *FEBS Lett.* 142 (2): 219-22
- Beltramini M., Lerch K. (1983)** The reconstitution reaction of *Neurospora* apotyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110 (1): 313-9
- Beltramini M., Salvato B., Santamaria M., Lerch K. (1990)** The reaction of CN<sup>-</sup> with the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: its relevance for a comparison between tyrosinase and hemocyanin active sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1040 (3): 365-72
- Berger B., Dallinger R., Gehrig P., Hunziker P.E. (1997)** Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochem. J.* 328 (Pt 1): 219-24
- Bernan V., Filpula D., Herber W., Bibb M., Katz E. (1985)** The nucleotide sequence of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product. *Gene* 37 (1-3): 101-10
- Betancourt A.M., Bernan V., Herber W., Katz E. (1992)** Analysis of tyrosinase synthesis in *Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 787-794
- Bhairi S.M. (1997)** Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem/Novabiochem Corp.
- Blake M.S., Johnston K.H., Russell-Jones G.J., Gotschlich E.C. (1984)** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179



- Bondos S.E., Bicknell A. (2003)** Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal. Biochem.* 316 (2): 223-31
- Booth P.J. (2000)** Unravelling the folding of bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1460 (1): 4-14
- Bordier C. (1981)** Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 256 (4): 1604-7
- Boronowski U. (1999)** Die Überexpression von Membranproteinen: Rekombinante im Vergleich zu nativen Untereinheiten des Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplexes. *Dissertation*. Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen. Ruhr-Universität, Bochum
- Boss P.K., Gardner R.C., Janssen B.J., Ross G.S. (1995)** An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.* 27 (2): 429-33
- Bothmann H., Pluckthun A. (2000)** The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl cis,trans-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragments with and without cis-prolines. *J. Biol. Chem.* 275 (22): 17100-5
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Branza-Nichita N., Petrescu A.J., Dwek R.A., Wormald M.R., Platt F.M., Petrescu S.M. (1999)** Tyrosinase folding and copper loading *in vivo*: a crucial role for calnexin and alpha-glucosidase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 (3): 720-5
- Branza-Nichita N., Negroiu G., Petrescu A.J., Garman E.F., Platt F.M., Wormald M.R., Dwek R.A., Petrescu S.M. (2000)** Mutations at critical *N*-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* 275 (11): 8169-75
- Brinkmann U., Buchner J., Pastan I. (1992)** Independent domain folding of *Pseudomonas* exotoxin and single-chain immunotoxins: influence of interdomain connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (7): 3075-9
- Broedel S.E., Jr., Papciak S.M., Jones W.R. (2001)** The Selection of Optimum Media Formulations for Improved Expression of Recombinant Proteins in *E.coli*. *Technical Bulletin - Athena Enzyme Systems Group 2*: 1-8
- Broothaerts W., McPherson J., Li B., Randall E., Lane W.D., Wiersma P.A. (2000)** Fast apple (*Malus x domestica*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. *J. Agric. Food Chem.* 48 (12): 5924-8
- Brouwer M., Brouwer-Hoexum T. (1992)** Glutathione-mediated transfer of copper(I) into American lobster apohemocyanin. *Biochemistry* 31 (16): 4096-102
- Brouwer M., Syring R., Brouwer-Hoexum T. (2002)** Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* 88 (2): 228-39
- Bryngelson J.D., Onuchic J.N., Socci N.D., Wolynes P.G. (1995)** Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21 (3): 167-95
- Bubacco L., van Gastel M., Groenen E.J., Vijgenboom E., Canters G.W. (2003)** Spectroscopic characterization of the electronic changes in the active site of *Streptomyces antibioticus* tyrosinase upon binding of transition state analogue inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278 (9): 7381-9
- Bujard H., Gentz R., Lanzer M., Stueber D., Mueller M., Ibrahimi I., Haeuptle M.T., Dobberstein B. (1987)** A T5 Promoter-Based Transcription-Translation System for the Analysis of Proteins *in Vitro* and *in Vivo*. *Methods Enzymol.* 155: 416-33

- Burdock G.A., Soni M.G., Carabin I.G. (2001)** Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 33 (1): 80-101
- Cabanes J., García-Cánovas F., Tudela J., Lozano J.A., García-Carmona (1987)** L-mimosine, a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* 26 (4): 917-919
- Cary J.W., Lax A.R., Flurkey W.H. (1992)** Cloning and characterisation of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 20 (2): 245-253
- Cashmore A.R. (1984)** Structure and expression of a pea nuclear gene encoding a light-harvesting chlorophyll *a/b* binding polypeptide. *PNAS* 81: 2960-2964
- Cerletti N., McMaster G.K., Cox D., Schmitz A., Meyhack B. (1990)** Process for the production of biologically active protein (e.g. TGF). *European Patent Application.* (90810922.6). EP 0 433 225 A1
- Chan H.S., Dill K.A. (1996)** A simple model of chaperonin-mediated protein folding. *Proteins* 24 (3): 345-51
- Chan H.S., Dill K.A. (1998)** Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins* 30 (1): 2-33
- Charbonnier F., Köhler T., Pechère J.C., Ducruix A. (2001)** Overexpression, Refolding, and Purification of the Histidine-Tagged Outer Membrane Efflux Protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr. Purif.* 23 (1): 121-7
- Chazarra S., Cabanes J., Escribano J., García-Carmona F. (1996)** Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in Iceberg Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44 (4): 984-988
- Chazarra S., García-Carmona F., Cabanes J. (2001a)** Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (3): 769-75
- Chazarra S., García-Carmona F., Cabanes J. (2001b)** Evidence for a tetrameric form of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 49 (10): 4870-5
- Chen J.S., Wei C., Marshall M.R. (1991)** Inhibition Mechanism of Kojic Acid on Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 39 (11): 1897-1901
- Chen L.Y., Leu W.M., Wang K.T., Lee Y.H. (1992)** Copper transfer and activation of the *Streptomyces* apotyrosinase are mediated through a complex formation between apotyrosinase and its trans-activator MelC1. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 20100-7
- Chen L.Y., Chen M.Y., Leu W.M., Tsai T.Y., Lee Y.H. (1993)** Mutational study of *Streptomyces* tyrosinase trans-activator MelC1. MelC1 is likely a chaperone for apotyrosinase. *J. Biol. Chem.* 268 (25): 18710-6
- Chen B., Przybyla A.E. (1994)** An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques* 17 (4): 657-9
- Chen H.M., Chen K.T., Luo S.L. (2004)** Immobilization and solid-state refolding of 6 x His-tagged glutathione-S-transferase using metal affinity matrices. *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 35 (6): 643-650
- Choi J.W., Lee S.Y. (1997)** Enhanced expression of bovine growth hormone gene by different culture conditions in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 19 (8): 735-739
- Chosa N., Fukumitsu T., Fujimoto K., Ohnishi E. (1997)** Activation of prophenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (1): 61-8
- Ciriolo M.R., Desideri A., Paci M., Rotilio G. (1990)** Reconstitution of Cu,Zn-superoxide dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J. Biol. Chem.* 265 (19): 11030-4

- Clark E.D.B. (1998)** Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (2): 157-63
- Clark E.D., Schwarz E., Rudolph R. (1999)** Inhibition of Aggregation Side Reactions during *in Vitro* Protein Folding. *Methods Enzymol.* 309: 217-236
- Clark E.D. (2001)** Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2): 202-7
- Clausmeyer S., Klosgen R.B., Herrmann R.G. (1993)** Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *J. Biol. Chem.* 268 (19): 13869-76
- Cleland J.L., Hedgepeth C., Wang D.I. (1992)** Polyethylene glycol enhanced refolding of bovine carbonic anhydrase B. Reaction stoichiometry and refolding model. *J. Biol. Chem.* 267 (19): 13327-34
- Cleland J.L., Randolph T.W. (1992)** Mechanism of polyethylene glycol interaction with the molten globule folding intermediate of bovine carbonic anhydrase B. *J. Biol. Chem.* 267 (5): 3147-53
- Coetzer C., Corsini D., Love S., Pavek J., Tumer N. (2001)** Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2): 652-7
- Cohn J., Sessa G., Martin G.B. (2001)** Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 13 (1): 55-62
- Colangeli R., Heijbel A., Williams A.M., Manca C., Chan J., Lyashchenko K., Gennaro M.L. (1998)** Three-step purification of lipopolysaccharide-free, polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 714 (2): 223-35
- Constabel C.P., Bergey D.R., Ryan C.A. (1995)** Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (2): 407-11
- Constabel C.P., Ryan C.A. (1998)** A Survey Of Wound- And Methyl Jasmonate-Induced Leaf Polyphenol Oxidase In Crop Plants. *Phytochemistry* 47 (4): 507-511
- Constabel C.P., Yip L., Patton J.J., Christopher M.E. (2000)** Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 124 (1): 285-95
- Conti M., Falini G., Samori B. (2000)** How strong is the coordination bond between a histidine tag and Ni-nitrilotriacetate? An experiment of mechanochemistry on single molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39: 215-218
- Cooksey C.J., Garratt P.J., Land E.J., Pavel S., Ramsden C.A., Riley P.A., Smit N.P. (1997)** Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 272 (42): 26226-35
- Corisdeo S., Wang B. (2004)** Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein. Expr. Purif.* 34 (2): 270-9
- Cramer R., Ettliger L., Hütter R., Lerch K., Suter M.A., Vetterli J.A. (1982)** Secretion of tyrosinase in *Streptomyces glaucescens*. *J. Gen. Microbiol.* 128 (2): 371-9
- Creighton T.E. (1986)** Process for the production of a protein. WO86/05809
- Cuff M.E., Miller K.I., van Holde K.E., Hendrickson W.A. (1998)** Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278 (4): 855-70
- Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B., Gitlin J.D. (1997)** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272 (38): 23469-72
- Curtis R.A., Ulrich J., Montaser A., Prausnitz J.M., Blanch H.W. (2002)** Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 79 (4): 367-80

- Daltrop O., Allen J.W., Willis A.C., Ferguson S.J. (2002)** *In vitro* formation of a c-type cytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (12): 7872-6
- Dancis A., Haile D., Yuan D.S., Klausner R.D. (1994)** The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* 269 (41): 25660-7
- Decker H., Rimke T. (1998)** Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273 (40): 25889-92
- Decker H., Dillinger R., Tuczek F. (2000)** How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (9): 1591-1595
- Decker H., Tuczek F. (2000)** Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 25 (8): 392-7
- Decker H., Ryan M., Jaenicke E., Terwilliger N. (2001)** SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.* 276 (21): 17796-9
- Devece C., Rodríguez-López J.N., Fenoll L.G., Tudela J., Catalá J.M., de Los Reyes E., García-Cánovas F. (1999)** Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 47 (11): 4506-11
- Dill K.A., Bromberg S., Yue K., Fiebig K.M., Yee D.P., Thomas P.D., Chan H.S. (1995)** Principles of protein folding - a perspective from simple exact models. *Protein Sci.* 4 (4): 561-602
- Dilly-Hartwig H., Allen J.F., Paulsen H., Race H.L. (1998)** Truncated recombinant light harvesting complex II proteins are substrates for a protein kinase associated with photosystem II core complexes. *FEBS Lett.* 435: 101-104
- Dry I.B., Robinson S.P. (1994)** Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 26 (1): 495-502
- Duckworth H.W., Coleman J.E. (1970)** Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 245 (7): 1613-25
- Eicken C., Zippel F., Büldt-Karentzopoulos K., Krebs B. (1998)** Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Lett.* 436 (2): 293-9
- Eisinger M., Marko O. (1982)** Selective proliferation of normal human melanocytes in vitro in the presence of phorbol ester and cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (6): 2018-22
- Epstein C.J., Anfinsen C.B. (1962)** The reversible reduction of disulfide bonds in trypsin and ribonuclease coupled to carboxymethyl cellulose. *J. Biol. Chem.* 237: 2175-9
- Escribano J., Cabanes J., García-Carmona F. (1997)** Characterization of Latent Polyphenol Oxidase in Table Beet: Effect of Sodium Dodecyl Sulphate. *J. Sci. Food Agric.* 73: 34-38
- Escribano J., Gandía-Herrero F., Caballero N., Pedreño M.A. (2002)** Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50 (21): 6123-9
- Espín J.C., Morales M., Varón R., Tudela J., García-Cánovas F. (1995)** A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* 231 (1): 237-46
- Espín J.C., van Leeuwen J., Wichers H.J. (1999)** Kinetic study of the activation process of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by serine proteases. *J. Agric. Food Chem.* 47 (9): 3509-17

- Espín J.C., Wichers H.J. (1999)** Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47 (9): 3518-25
- Faulstich H., Heintz D. (1995)** Reversible Introduction of Thiol Compounds into Proteins by Use of Activated Mixed Disulfides. *Methods Enzymol.* 251: 357-366
- Ferreira A.M., Ciriolo M.R., Marcocci L., Rotilio G. (1993)** Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem. J.* 292 (Pt 3): 673-6
- Firbank S.J., Rogers M.S., Wilmot C.M., Dooley D.M., Halcrow M.A., Knowles P.F., McPherson M.J., Phillips S.E. (2001)** Crystal structure of the precursor of galactose oxidase: an unusual self-processing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (23): 12932-7
- Flocco M.M., Mowbray S.L. (1994)** Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.* 235 (2): 709-17
- Floyd R.A. (1990)** Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4 (9): 2587-97
- Forciniti D. (1994)** Protein refolding using aqueous two-phase systems. *J. Chromatography A* 668: 95-100
- Freedman J.H., Ciriolo M.R., Peisach J. (1989)** The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.* 264 (10): 5598-605
- Fujita Y., Uruga Y., Ichisima E. (1995)** Molecular cloning and nucleotide sequence of the protyrosinase gene, melO, from *Aspergillus oryzae* and expression of the gene in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1261 (1): 151-4
- Funayama M., Arakawa H., Yamamoto R., Nishino T., Shin T., Murao S. (1995)** Effects of *alpha*- and *beta*-arbutin on activity of tyrosinases from mushroom and mouse melanoma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1): 143-4
- Gacche R.N., Warangkar S.C., Ghole V.S. (2004)** Glutathione and cinnamic acid: natural dietary components used in preventing the process of browning by inhibition of Polyphenol Oxidase in apple juice. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19 (2): 175-179
- Gaikwad A., Tewari K.K., Kumar D., Chen W., Mukherjee S.K. (1999)** Isolation and characterisation of the cDNA encoding a glycosylated accessory protein of pea chloroplast DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 27 (15): 3120-9
- Gal A., Hauska G., Herrmann R.G., Ohad I. (1990)** Interaction between Light Harvesting Chlorophyll-*a/b* Protein (LHCII) Kinase and Cytochrome *b<sub>6</sub>/f* Complex. *J. Biol. Chem.* 265 (32): 19742-19749
- Galloway C.A., Sowden M.P., Smith H.C. (2003)** Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *Biotechniques* 34 (3): 524-6, 528, 530
- Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Escribano J. (2004)** Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* 52 (3): 609-15
- García-Borrón J.C., Solano F. (2002)** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15 (3): 162-73
- García-Cánovas F., García-Carmona F., Lozano J.A. (1981)** Hysteresis of mushroom tyrosinase: lag period of cresolase activity. *Phytochemistry* 20 (6): 1215-1217
- García-Cánovas F., García-Carmona F., Sánchez J.V., Iborra J.L., Lozano J.A. (1982)** The Role of pH in the Melanin Biosynthesis Pathway. *J. Biol. Chem.* 257 (15): 8738-8744

- Garza-Ramos G., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou A., Gracy R.W. (1992)** Dimerization and reactivation of triosephosphate isomerase in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 208 (2): 389-95
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003)** ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acid Res.* 31: 3784-3788
- Gaykema W.P.J., Hol W.G.J., Vereijken J.M., Soeter N.M., Bak H.J., Beintema J.J. (1984)** 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature* 309: 23-29
- Gebhardt M. (2004)** Isolierung und Charakterisierung von Tyrosinasen aus Spinat. *Diplomarbeit*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Gekko K., Morikawa T. (1981)** Preferential hydration of bovine serum albumin in polyhydric alcohol-water mixtures. *J. Biochem.* 90 (1): 39-50
- Gekko K., Timasheff S.N. (1981)** Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* 20 (16): 4667-76
- Gerdemann C., Eicken C., Krebs B. (2002a)** The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* 35 (3): 183-91
- Gerdemann C., Eicken C., Galla H.J., Krebs B. (2002b)** Comparative modeling of the latent form of a plant catechol oxidase using a molluscan hemocyanin structure. *J. Inorg. Biochem.* 89 (1-2): 155-8
- Gerding J.J., Koppers A., Hagel P., Bloemendal H. (1971)** Cyanate formation in solutions of urea. II. Effect of urea on the eye lens protein-crystallin. *Biochim. Biophys. Acta* 243 (3): 375-9
- Gerritsen Y., Chapelon C.G.J., Wichers H.J. (1994)** The low isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry* 35 (3): 573-577
- Getzoff E.D., Cabelli D.E., Fisher C.L., Parge H.E., Viezzoli M.S., Banci L., Hallewell R.A. (1992)** Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* 358 (6384): 347-51
- Gielens C., De Geest N., Xin X.Q., Devreese B., Van Beeumen J., Préaux G. (1997)** Evidence for a cysteine-histidine thioether bridge in functional units of molluscan haemocyanins and location of the disulfide bridges in functional units d and g of the betaC-haemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* 248 (3): 879-88
- Gill S.C., von Hippel P.H. (1989)** Calculations of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326
- Glerum D.M., Shtanko A., Tzagoloff A. (1996)** Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271 (24): 14504-9
- Golbeck J.H., Cammarata K.V. (1981)** Spinach Thylakoid Polyphenol Oxidase. Isolation, Activation, and Properties of the Native Chloroplast Enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984
- Gooding P.S., Bird C., Robinson S.P. (2001)** Molecular cloning and characterisation of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta* 213 (5): 748-57
- Gouka R.J., van der Heiden M., Swarthoff T., Verrips C.T. (2001)** Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (6): 2610-6
- Graham D.G., Jeffs P.W. (1977)** The role of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine in melanin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 252 (16): 5729-34

- Greving J. (2003)** Strukturelle und Funktionelle Untersuchungen zur Substratspezifität der Catecholoxidase aus der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*). *Dissertation*. Fachbereich Chemie und Pharmazie. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- Grodberg J., Dunn J.J. (1988)** OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170 (3): 1245-53
- Hagel P., Gerding J.J., Fieggen W., Bloemendal H. (1971)** Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta* 243 (3): 366-73
- Halaban R., Cheng E., Svedine S., Aron R., Hebert D.N. (2001)** Proper folding and endoplasmic reticulum to golgi transport of tyrosinase are induced by its substrates, DOPA and tyrosine. *J. Biol. Chem.* 276 (15): 11933-8
- Halaoui S., Asther M., Kruus K., Guo L., Hamdi M., Sigoillot J.C., Lomascolo A. (2005)** Characterization of a new tyrosinase from *Pycnoporus* species with high potential for food technological applications. *J. Appl. Microbiol.* 98 (2): 332-43
- Halder J., Tamuli P., Bhaduri A.N. (1998)** Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*). *Nutrit. Biochem.* 9: 75-80
- Hamer D.H., Thiele D.J., Lemontt J.E. (1985)** Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science* 228 (4700): 685-90
- Harrison M.D., Jones C.E., Dameron C.T. (1999)** Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (2): 145-53
- Harrison M.D., Jones C.E., Solioz M., Dameron C.T. (2000)** Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 25 (1): 29-32
- Haruta M., Murata M., Hiraide A., Kadokura H., Yamasaki M., Sakuta M., Shimizu S., Homma S. (1998)** Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (2): 358-62
- Hauska G. (1986)** Preparations of eletrogenic, proton translocating complexes of the *b<sub>6</sub>f*-type (chloroplasts and cyanobacteria) and the *bc<sub>1</sub>*-type (*Rhodospseudomonas sphaeroides*). *Methods Enzymol.* 126: 271-285
- Hayhurst A., Harris W.J. (1999)** *Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr. Purif.* 15 (3): 336-43
- Hazes B., Magnus K.A., Bonaventura C., Bonaventura J., Dauter Z., Kalk K.H., Hol W.G. (1993)** Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Sci.* 2 (4): 597-619
- He H.J., Yuan Q.S., Yang G.Z., Wu X.F. (2002)** High-level expression of human extracellular superoxide dismutase in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expr. Purif.* 24 (1): 13-7
- Hearing V.J., Jr. (1987)** Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.* 142: 154-65
- Hearing V.J., Tsukamoto K. (1991)** Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5 (14): 2902-9
- Heimdal H., Larsen L.M., Poll L. (1994)** Characterisation of Polyphenol Oxidase from Photosynthetic and Vascular Tissues (*Lactuca sativa*). *J. Agric. Food Chem.* 42: 1428-1433
- Heinemann B. (1999)** Random mutations directed to trans-membrane and loop domains of light-harvesting chlorophyll *a/b* protein: Impact on complex formation and pigment binding. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

- Hénaut A., Danchin A. (1996)** Analysis and Predictions from *Escherichia coli* sequences. *Escherichia coli and Salmonella*. Ed. 114. 2: 2047-2066. (Ed. Neidhardt F.C.) ASM press, Washington, D.C.
- Hieber A.D., Bugos R.C., Verhoeven A.S., Yamamoto H.Y. (2002)** Overexpression of violaxanthin de-epoxidase: properties of C-terminal deletions on activity and pH-dependent lipid binding. *Planta* 214 (3): 476-83
- Hind G., Marshak D.R., Coughlan S.J. (1995)** Spinach thylakoid polyphenol oxidase: cloning, characterization and relation to a putative protein kinase. *Biochemistry* 34 (25): 8157-64
- Hiniker A., Bardwell J.C. (2003)** Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochemistry* 42 (5): 1179-85
- Hintze V. (2005)** Strukturelle und funktionelle Charakterisierung C-terminaler Domänen der Prokollagen C-Proteinase-2 (mTId). *Dissertation*. Institut für Zoophysiologie. Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
- Hippmann A.-A. (2005)** Overexpression of Different Silaffin Fragments with Hexahistidyl-Tag. *Diplomarbeit*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Hobe S., Fey H., Rogl H., Paulsen H. (2003)** Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *J. Biol. Chem.* 278 (8): 5912-9
- Hofmann A., Tai M., Wong W., Glabe C.G. (1995)** A sparse matrix screen to establish initial conditions for protein renaturation. *Anal. Biochem.* 230 (1): 8-15
- Hofmeister F. (1888)** Zur Lehre von der Wirkung der Saltze. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 24:247-60
- Holtzhauer M. (1988)** Biochemische Labormethoden - Arbeitsvorschriften und Tabellen. *Heidelberger Taschenbücher*. Springer Verlag, Heidelberg
- Huang K.S., Bayley H., Liao M.J., London E., Khorana H.G. (1981)** Refolding of an integral membrane protein. Denaturation, renaturation, and reconstitution of intact bacteriorhodopsin and two proteolytic fragments. *J. Biol. Chem.* 256 (8): 3802-9
- Huber M., Lerch K. (1987)** The influence of copper on the induction of tyrosinase and laccase in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 219 (2): 335-8
- Hunt M.D., Eannetta N.T., Yu H., Newman S.M., Steffens J.C. (1993)** cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21 (1): 59-68
- Huschenbett C. (2001)** Zugänglichkeit einzelner Domänen des Lichtsammelkomplexes LHCII: ein Vergleich zwischen Monomeren und Trimeren. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Hwang H.S., Chung H.S. (2002)** Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. *Protein Expr. Purif.* 25 (3): 541-6
- IBA (2000)** Strep-Tag Manual: Protein expression, purification and detection system. IBA, Institut für Bioanalytik, Göttingen
- Ichishima E., Maeba H., Amikura T., Sakata H. (1984)** Multiple forms of protyrosinase from *Aspergillus oryzae* and their mode of activation at pH 3.0. *Biochim. Biophys. Acta* 786 (1-2): 25-31
- Idicula-Thomas S., Balaji P.V. (2005)** Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 14 (3): 582-92
- Ikemoto K., Nagatsu I., Ito S., King R.A., Nishimura A., Nagatsu T. (1998)** Does tyrosinase exist in neuromelanin-pigmented neurons in the human substantia nigra? *Neurosci. Lett.* 253 (3): 198-200



- Ito S., Kato T., Shinpo K., Fujita K. (1984)** Oxidation of tyrosine residues in proteins by tyrosinase. Formation of protein-bonded 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine. *Biochem. J.* 222 (2): 407-11
- Ito N., Phillips S.E., Stevens C., Ogel Z.B., McPherson M.J., Keen J.N., Yadav K.D., Knowles P.F. (1991)** Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* 350 (6313): 87-90
- Ito S. (2003)** The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 16 (3): 230-6
- Itzhaki L.S., Otzen D.E., Fersht A.R. (1995)** The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding. *J. Mol. Biol.* 254 (2): 260-88
- Jackson I.J. (1988)** A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (12): 4392-6
- Jackson I.J., Chambers D.M., Tsukamoto K., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Hearing V. (1992)** A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* 11 (2): 527-35
- Jaenicke R. (1991)** Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. *Biochemistry* 30 (13): 3147-61
- Jaenicke E. (2002)** Zum funktionellen und strukturellen Vergleich von Phenoloxidasen und Hämocyaninen. *Dissertation*. Institut für Molekulare Biophysik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Janovitz-Klapp A.H., Richard F.C., Goupy P.M., Nicolas J.J. (1990)** Inhibition Studies on Apple Polyphenol Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926-931
- Jara J.R., Aroca P., Solano F., Martinez J.H., Lozano J.A. (1988)** The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine and glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. *Biochim. Biophys. Acta* 967 (2): 296-303
- Jensen P.Y., Bonander N., Horn N., Tumer Z., Farver O. (1999)** Expression, purification and copper-binding studies of the first metal-binding domain of Menkes protein. *Eur. J. Biochem.* 264 (3): 890-6
- Jiménez-Cervantes C., Solano F., Kobayashi T., Urabe K., Hearing V.J., Lozano J.A., García-Borrón J.C. (1994)** A new enzymatic function in the melanogenic pathway. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase activity of tyrosinase-related protein-1 (TRP1). *J. Biol. Chem.* 269 (27): 17993-8000
- Jiménez-Cervantes C., García-Borrón J.C., Lozano J.A., Solano F. (1995)** Effect of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1243 (3): 421-30
- Jin Y.H., Lee S.J., Chung M.H., Park J.H., Park Y.I., Cho T.H., Lee S.K. (1999)** Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Arch. Pharm. Res.* 22 (3): 232-6
- Jolley R.L.J., Evans L.H., Makino N., Mason H.S. (1974)** Oxytyrosinase. *J. Biol. Chem.* 249 (2): 335-45
- Joy R.W.t., Sugiyama M., Fukuda H., Komamine A. (1995)** Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107 (4): 1083-9
- Jung S.T., Kim M.S., Seo J.Y., Kim H.C., Kim Y. (2003)** Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 31 (2): 240-6

- Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., Inze D., van Montagu M. (1995)** Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270 (47): 28479-86
- Karbassi F., Haghbeen K., Saboury A.A., Rezaei-Tavirani N., Ranjbar B. (2004)** Calorimetric, spectrophotometric and circular dichroism studies on the impact of sodium dodecyl sulfate on the mushroom tyrosinase structure. *Biologia* 59 (3): 319-326
- Karnauchov I., Herrmann R.G., Klosgen R.B. (1997)** Transmembrane topology of the Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 408 (2): 206-10
- Karuppiyah N., Sharma A. (1995)** Cyclodextrins as protein folding aids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 (1): 60-6
- Katz E., Thompson C.J., Hopwood D.A. (1983)** Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2703-2714
- Kawabata T., Yasuhara Y., Ochiai M., Matsuura S., Ashida M. (1995)** Molecular cloning of insect pro-phenol oxidase: a copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (17): 7774-8
- Keegstra K., Olsen L.J. (1989)** Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 471-501
- Kelly E.J., Palmiter R.D. (1996)** A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat. Genet.* 13 (2): 219-22
- Kieselbach T., Hagman, Andersson B., Schröder W.P. (1998)** The Thylakoid Lumen of Chloroplasts. Isolation and Characterization. *J. Biol. Chem.* 273 (12): 6710-6
- Kitajima N., Fujisawa K., Moro-oka Y. (1989)**  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-Peroxo}$  Binuclear Copper Complex  $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)_2(\text{O}_2)]$ . *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8975-8976
- Kitajima N., Moro-oka Y. (1994)** Copper-Dioxygen Complexes. Inorganic and Bioinorganic Perspectives. *Chem. Rev.* 94: 737-757
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., Krebs B. (1998)** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5 (12): 1084-90
- Knight S.A., Labbe S., Kwon L.F., Kosman D.J., Thiele D.J. (1996)** A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev.* 10 (15): 1917-29
- Kobayashi T., Urabe K., Winder A., Jiménez-Cervantes C., Imokawa G., Brewington T., Solano F., García-Borrón J.C., Hearing V.J. (1994)** Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 13 (24): 5818-25
- Kobayashi T., Vieira W.D., Potterf B., Sakai C., Imokawa G., Hearing V.J. (1995)** Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 6): 2301-9
- Kobayashi T., Imokawa G., Bennett D.C., Hearing V.J. (1998)** Tyrosinase Stabilization by Tyrp1 (the *brown* Locus Protein). *J. Biol. Chem.* 273 (48): 31801-5
- Kohashi P.Y., Kumagai T., Matoba Y., Yamamoto A., Maruyama M., Sugiyama M. (2004)** An efficient method for the overexpression and purification of active tyrosinase from *Streptomyces castaneoglobisporus*. *Protein Expr. Purif.* 34 (2): 202-7
- Kong K.H., Park S.Y., Hong M.P., Cho S.H. (2000)** Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 125 (4): 563-9

- Körner A., Pawelek J. (1982)** Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217 (4565): 1163-5
- Kosemund K. (1999)** Die Biogenese von Chlorophyll-a/b-bindenden Lichtsammelkomplexen: Topographie des Apoproteins bei der Thylakoidinsertion. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Koussevitzky S., Ne'eman E., Sommer A., Steffens J.C., Harel E. (1998a)** Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase. Processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J. Biol. Chem.* 273 (42): 27064-9
- Koussevitzky S., Ne'eman E., Sommer A., Steffens J.C., Harel E. (1998b)** A dual effect of Cu<sup>2+</sup> on the import and processing of a polyphenol oxidase precursor by chloroplasts. *Proceedings of the XIth international Congress on Photosynthesis*. (Ed. Garab G., Puszta, J.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Kowalski S.P., Eannetta N.T., Hirzel A.T., Steffens J.C. (1992)** Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Glandular Trichomes of *Solanum berthaultii*. *Plant Physiol.* 100: 677-684
- Kurokawa Y., Yanagi H., Yura T. (2001)** Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276 (17): 14393-9
- Kushimoto T., Valencia J.C., Costin G.E., Toyofuku K., Watabe H., Yasumoto K., Rouzaud F., Vieira W.D., Hearing V.J. (2003)** The melanosome: an ideal model to study cellular differentiation. *Pigment Cell Res.* 16 (3): 237-44
- Kwon B.S., Haq A.K., Pomerantz S.H., Halaban R. (1987)** Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (21): 7473-7
- Kyte J., Doolittle R.F. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157 (1): 105-32
- Laemmli U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lai-Fook J. (1966)** The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect. Physiol.* 12: 195-226
- Lamb A.L., Wernimont A.K., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (1999)** Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat. Struct. Biol.* 6 (8): 724-9
- Lamb A.L., Torres A.S., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (2001)** Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat. Struct. Biol.* 8 (9): 751-5
- Lanckriet H., Middelberg A.P. (2004)** Continuous chromatographic protein refolding. *J. Chromatogr. A* 1022 (1-2): 103-13
- Laveda F., Nunez-Delicado E., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. (2000)** Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* 379 (1): 1-6
- Laveda F., Nunez-Delicado E., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. (2001)** Proteolytic activation of latent Paraguaya peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2): 1003-8
- Lax A.R., Vaughn K.C. (1991)** Colocalization of Polyphenol Oxidase and Photosystem II Proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31

- Lee J.C., Timasheff S.N. (1981)** The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.* 256 (14): 7193-201
- Lee Y.H., Chen B.F., Wu S.Y., Leu W.M., Lin J.J., Chen C.W., Lo S.C. (1988)** A trans-acting gene is required for the phenotypic expression of a tyrosinase gene in *Streptomyces*. *Gene* 65 (1): 71-81
- Lerch K. (1982)** Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257 (11): 6414-9
- Lerner H.R., Mayer A.M., Harel E. (1972)** Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry* 11: 2415-2421
- Leu W.M., Chen L.Y., Liaw L.L., Lee Y.H. (1992)** Secretion of the *Streptomyces* tyrosinase is mediated through its trans-activator protein, MelC1. *J. Biol. Chem.* 267 (28): 20108-13
- Levinthal C., Debrunner P., Tsibris J.C., Münch E. (1969)** Proceedings of a Meeting held at Allerton House. Urbana, University of Illinois.
- Li X., Taylor K.B. (1994)** Effect of glucose on the expression parameters of recombinant protein in *Escherichia coli* during batch growth in complex medium. *Biotechnol. Prog.* 10 (2): 160-4
- Li L., Steffens J.C. (2002)** Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247
- Li M., Zhang G., Su Z. (2002)** Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield of lysozyme. *J. Chromatogr. A* 959 (1-2): 113-20
- Li M., Su Z.G., Janson J.C. (2004)** *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.* 33 (1): 1-10
- Lieberei R., Biehl B. (1976)** Release and Activation of Polyphenoloxidase from Thylakoid Membranes of Spinach Chloroplasts. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 89: 663-676
- Lin W.J., Traugh J.A. (1993)** Renaturation of casein kinase II from recombinant subunits produced in *Escherichia coli*: purification and characterization of the reconstituted holoenzyme. *Protein Expr. Purif.* 4 (3): 256-64
- Lin S.J., Pufahl R.A., Dancis A., O'Halloran T.V., Culotta V.C. (1997)** A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272 (14): 9215-20
- Lion M. (2005)** Einzelmolekülspektroskopische Studien an Farbstoff-markierten Chlorophyll-a/b-Lichtsammlerkomplexen und Untersuchungen zur Integration der Komplexe in elektrochemische Solarzellen. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Lippard S.J. (1999)** Free copper ions in the cell? *Science* 284 (5415): 748-9
- Liu W., He R.Q., Xue Z.G. (2001)** Expression of the N-terminal segment of QBRN-2 in *E.coli* and tips on preparation of a recombinant protein. *Protein Peptide Lett.* 8 (1): 27-32
- London E., Khorana H.G. (1982)** Denaturation and renaturation of bacteriorhodopsin in detergents and lipid-detergent mixtures. *J. Biol. Chem.* 257 (12): 7003-7011
- López-Serrano D., Sanchez-Amat A., Solano F. (2002)** Cloning and molecular characterization of a SDS-activated tyrosinase from *Marinomonas mediterranea*. *Pigment Cell Res.* 15 (2): 104-11
- López-Serrano D., Solano F., Sanchez-Amat A. (2004)** Identification of an operon involved in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Gene* 342 (1): 179-87

- López-Vara M.C., Gasset M., Pajares M.A. (2000)** Refolding and characterization of rat liver methionine adenosyltransferase from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 19 (2): 219-26
- Lottspeich F., Ed. (1998)** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Maeda K., Fukuda M. (1996)** Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276 (2): 765-9
- Magnus K.A., Hazes B., Ton-That H., Bonaventura C., Bonaventura J., Hol W.G. (1994)** Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins* 19 (4): 302-9
- Makino N., Mason H.S. (1973)** Reactivity of oxytyrosinase toward substrates. *J. Biol. Chem.* 248 (16): 5731-5
- Manga P., Sato K., Ye L., Beermann F., Lamoreux M.L., Orlow S.J. (2000)** Mutational analysis of the modulation of tyrosinase by tyrosinase-related proteins 1 and 2 *in vitro*. *Pigment Cell Res.* 13 (5): 364-74
- Marbach I., Mayer A.M. (1975)** Changes in Catechol Oxidase and Permeability to Water in Seed Coats of *Pisum elatius* during Seed Development and Maturation. *Plant Physiol.* 56: 93-96
- Mari S., Marques L., Breton F., Karamanos Y., Macheix J.J. (1998)** Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 49 (5): 1213-7
- Mason H.S. (1948)** The chemistry of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 172: 83-99
- Mason H.S., Fowlks W.L., Peterson E. (1955)** Oxygen Transfer and Electron Transport by the Phenolase Complex. *J. Am. Chem. Soc.* 77: 2914-2915
- Mason H.S. (1965)** Oxidases. *Annu. Rev. Biochem.* 34: 595-634
- Mayer A.M. (1966)** Catechol oxidase: Enzymic liberation from sugar beet chloroplasts. *Phytochemistry* 5: 1297-1301
- Mayer A.M., Harel E. (1979)** Review: Polyphenol Oxidases in Plants. *Phytochemistry* 18: 193-215
- Mayer A.M. (1987)** Polyphenol Oxidases in Plants - Recent Progress. *Phytochemistry* 26: 11-20
- Meng F., Park Y., Zhou H. (2001)** Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (7): 701-9
- Merkel M., Möller N., Piacenza M., Grimme S., Rompel A., Krebs B. (2005)** Less symmetrical dicopper(II) complexes as catechol oxidase models - an adjacent thioether group increases catecholase activity. *Chemistry* 11 (4): 1201-9
- Meyer H.-U., Biehl B. (1980)** Activities and Multiplicity of Phenolase from Spinach Chloroplasts during Leaf Ageing. *Phytochemistry* 19: 2267-2272
- Meyer H.-U., Biehl B. (1981)** Activation of latent spinach phenolase during spinach leaf senescence. *Phytochemistry* 20 (5): 955-959
- Meyer H.-U., Biehl B. (1982)** Relation between photosynthetic and phenolase activities in spinach chloroplasts. *Phytochemistry* 21 (1): 9-12
- Mick V. (2004)** Stabilisierung des pflanzlichen Lichtsammlers LHCIIB: Beitrag der luminalen Schleifendomäne und Entwicklung eines evolutiven Verfahrens zur Stabilitätsverbesserung des rekombinanten Pigment-Protein-Komplexes. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

- Mick V., Eggert K., Heinemann B., Geister S., Paulsen H. (2004)** Single amino acids in the lumenal loop domain influence the stability of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* complex. *Biochemistry* 43 (18): 5467-73
- Middelberg A.P.J. (2002)** Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 20 (10): 437-43
- Mitchell J.B., Nandi C.L., McDonald I.K., Thornton J.M., Price S.L. (1994)** Amino/aromatic interactions in proteins: is the evidence stacked against hydrogen bonding? *J. Mol. Biol.* 239 (2): 315-31
- Moore B.M., Flurkey W.H. (1990)** Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265 (9): 4982-8
- Müller G., Ruppert S., Schmid E., Schutz G. (1988)** Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* 7 (9): 2723-30
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987)** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- Musci G., Di Marco S., Bellenchi G.C., Calabrese L. (1996)** Reconstitution of ceruloplasmin by the Cu(I)-glutathione complex. Evidence for a role of Mg<sup>2+</sup> and ATP. *J. Biol. Chem.* 271 (4): 1972-8
- Nakamura M., Nakajima T., Ohba Y., Yamauchi S., Lee B.R., Ichishima E. (2000)** Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 350 (Pt 2): 537-45
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Sato T., Kikuchi S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Ueda T., Nakao M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T. (2000)** Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* 290 (5494): 1163-6
- Neagu A., Neagu M., Der A. (2001)** Fluctuations and the Hofmeister effect. *Biophys. J.* 81 (3): 1285-1294
- Nellaiappan K., Vinayakam A. (1993)** A method for demonstrating prophenoloxidase after electrophoresis. *Biotech. Histochem.* 68 (4): 193-5
- Newman S.M., Eannetta N.T., Yu H., Prince J.P., de Vicente M.C., Tanksley S.D., Steffens J.C. (1993)** Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21 (6): 1035-51
- Newton J.M., Cohen-Barak O., Hagiwara N., Gardner J.M., Davisson M.T., King R.A., Brilliant M.H. (2001)** Mutations in the human orthologue of the mouse *underwhite* gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am. J. Hum. Genet.* 69 (5): 981-8
- Nguyen H., Chung S., Davenport J.W. (1996)** Active Spinach Polyphenol Oxidase is Oligomeric. *Plant Biology '96, Annual meeting of the Plant Physiologists.* San Antonio, Texas, USA. *Plant Physiology*, 111(2) Supplement
- Nishihara K., Kanemori M., Kitagawa M., Yanagi H., Yura T. (1998)** Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (5): 1694-9
- Nishihara K., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. (2000)** Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3): 884-9
- Nishimura A., Fukuda C., Murata M., Homma S. (2003)** Cloning and some properties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase, and changes in browning potential during fruit maturation. *J. Sci. Food Agric.* 83: 1156-1162

- Nishioka K. (1977)** Conversion of particulate tyrosinase to soluble form and to desialylated tyrosinase in human malignant melanoma. *FEBS Lett.* 80 (1): 225-8
- Nosanchuk J.D., Casadevall A. (2003)** The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5 (4): 203-223
- Novagen (2002)** pET System Manual. 10th Ed. Novagen/Merck, Darmstadt
- Nozaki Y., Tanford C. (1963)** The Solubility of Amino Acids and Related Compounds in Aqueous Urea Solutions. *J. Biol. Chem.* 238: 4074-81
- 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
- Oetting W.S. (2000)** The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): A model for understanding the molecular biology of melanin formation. *Pigment Cell Res.* 13 (5): 320-5
- O'Halloran T.V., Culotta V.C. (2000)** Metallochaperones, an Intracellular Shuttle Service for Metal Ions. *J. Biol. Chem.* 275 (33): 25057-60
- Olivares C., García-Borrón J.C., Solano F. (2002)** Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 41 (2): 679-86
- Olivares C., Solano F., García-Borrón J.C. (2003)** Conformation-dependent post-translational glycosylation of tyrosinase. Requirement of a specific interaction involving the CuB metal binding site. *J. Biol. Chem.* 278 (18): 15735-43
- Ono T., Nagatomo M., Nagao T., Ijima H., Kawakami K. (2005)** Nonaggregating refolding of ribonuclease A using reverse micellar dialysis. *Biotechnol. Bioeng.* 89 (3): 290-5
- Onuchic J.N., Wolynes P.G., Luthey-Schulten Z., Socci N.D. (1995)** Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (8): 3626-30
- Ou W.B., Park Y.D., Zhou H.M. (2002)** Effect of osmolytes as folding aids on creatine kinase refolding pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34 (2): 136-47
- Ozeki H., Ito S., Wakamatsu K., Ishiguro I. (1997)** Chemical characterization of pheomelanogenesis starting from dihydroxyphenylalanine or tyrosine and cysteine. Effects of tyrosinase and cysteine concentrations and reaction time. *Biochim. Biophys. Acta* 1336 (3): 539-48
- Palumbo A., Misuraca G., D'Ischia M., Protà G. (1985)** Effect of metal ions on the kinetics of tyrosine oxidation catalysed by tyrosinase. *Biochem. J.* 228 (3): 647-51
- Pan S.M., Hwang G.B., Liu H.C. (1999)** Over-expression and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from rice in *Escherichia coli*. *Bot. Bulletin Acad. Sinica* 40 (4): 275-281
- Parish R.W. (1972)** The intracellular location of phenol oxidases, peroxidase and phosphatases in the leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L. subspecies *vulgaris*). *Eur. J. Biochem.* 31 (3): 446-55
- Park H.Y., Perez J.M., Laursen R., Hara M., Gilchrist B.A. (1999)** Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 274: 16470-16478
- Park Y.D., Lee S.J., Park K.H., Kim S.Y., Hahn M.J., Yang J.M. (2003)** Effect of thiohydroxyl compounds on tyrosinase: inactivation and reactivation study. *J. Protein Chem.* 22 (7-8): 613-23
- Partington J.C., Bolwell G.P. (1996)** Purification of polyphenol oxidase free of the storage protein patatin from potato tuber. *Phytochemistry* 42 (6): 1499-502

- Paulsen H., Rümmler U., Rüdiger W. (1990)** Reconstitution of pigment-containing complexes from light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein overexpressed in *Escherichia coli*. *Planta* 181: 204-211
- Pawelek J.M. (1991)** After dopachrome? *Pigment Cell Res.* 4 (2): 53-62
- Pearson W.R., Wood T., Zhang Z., Miller W. (1997)** Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46: 24-36
- Pellequer J.L., Zhao B., Kao H.I., Bell C.W., Li K., Li Q.X., Karu A.E., Roberts V.A. (2000)** Stabilization of bound polycyclic aromatic hydrocarbons by a pi-cation interaction. *J. Mol. Biol.* 302 (3): 691-9
- Perbandt M., Guthöhrlein E.W., Rypniewski W., Idakieva K., Stoeva S., Voelter W., Genov N., Betzel C. (2003)** The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 42 (21): 6341-6
- Pérez-Gilabert M., García-Carmona F. (2000)** Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 48 (3): 695-700
- Petrescu S.M., Branza-Nichita N., Negroiu G., Petrescu A.J., Dwek R.A. (2000)** Tyrosinase and glycoprotein folding: roles of chaperones that recognize glycans. *Biochemistry* 39 (18): 5229-37
- Pifferi P.G., Baldassari L. (1973)** A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone. *Anal. Biochem.* 52 (2): 325-35
- Pomerantz S.H., Warner M.C. (1967)** 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. Occurrence in melanoma and binding constant. *J. Biol. Chem.* 242 (22): 5308-14
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. (1989)** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394
- Postal W.S., Vogel E.J., Young C.M., Greenaway F.T. (1985)** The binding of copper(II) and zinc(II) to oxidized glutathione. *J. Inorg. Biochem.* 25 (1): 25-33
- Prota G. (2000)** Melanins, melanogenesis and melanocytes: looking at their functional significance from the chemist's viewpoint. *Pigment Cell Res.* 13 (4): 283-93
- Ptitsyn O.B. (1995)** How the molten globule became. *Trends Biochem. Sci.* 20 (9): 376-9
- Qiagen (1997)** The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Qiagen, Hilden
- Quevedo W.C., Jr., Holstein T.J., Bienieki T.C. (1975)** Action of trypsin and detergents on tyrosinase of normal and malignant melanocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150 (3): 735-40
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. (1999)** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284 (5415): 805-8
- Raper H.S. (1928)** The Aerobic Oxidases. *Physiol. Rev.* 8: 245-282
- Raunser S. (2000)** Überexpression und Rekonstitution von OHP ("one helix protein") aus *Arabidopsis thaliana* und Trimerisierung des rekombinanten Lichtsammelkomplexes II bei Variation des Xanthophyllangebots. *Diplomarbeit*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Remmert K., Vullhorst D., Hinssen H. (2000)** *In vitro* refolding of heterodimeric CapZ expressed in *E. coli* as inclusion body protein. *Protein Expr. Purif.* 18 (1): 11-9



- Rescigno A., Sollai F., Pisu B., Rinaldi A., Sanjust E. (2002)** Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17 (4): 207-18
- Reyda S., Jacob E., Zwilling R., Stöcker W. (1999)** cDNA cloning, bacterial expression, *in vitro* renaturation and affinity purification of the zinc endopeptidase astacin. *Biochem. J.* 344: 851-857
- Riley P.A. (2003)** Melanogenesis and melanoma. *Pigment Cell Res.* 16 (5): 548-52
- Rinchik E.M., Bultman S.J., Horsthemke B., Lee S.T., Strunk K.M., Spritz R.A., Avidano K.M., Jong M.T., Nicholls R.D. (1993)** A gene for the mouse pink-eyed dilution locus and for human type II oculocutaneous albinism. *Nature* 361 (6407): 72-6
- Rivero R.M., Ruiz J.M., García P.C., López-Lefebvre L.R., Sánchez E., Romero L. (2001)** Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Sci.* 160 (2): 315-321
- Robinson S.P. (1986)** Improved rates of CO<sub>2</sub>-fixation by intact chloroplasts isolated in media with KCl as the osmoticum. *Photosyn. Res.* 10: 93-100
- Robinson S.P., Dry I.B. (1992)** Broad Bean Leaf Polyphenol Oxidase Is a 60-Kilodalton Protein Susceptible to Proteolytic Cleavage. *Plant Physiol.* 99: 317-323
- Rodríguez-López J.N., Tudela J., Varón R., García-Carmona F., García-Cánovas F. (1992a)** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267 (6): 3801-10
- Rodríguez-López J.N., Banón-Arno M., Martínez-Ortiz F., Tudela J., Acosta M., Varón R., García-Cánovas F. (1992b)** Catalytic oxidation of 2,4,5-trihydroxyphenylalanine by tyrosinase: identification and evolution of intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* 1160 (2): 221-8
- Rogers M.S., Baron A.J., McPherson M.J., Knowles P.F., Dooley D.M. (2000)** Galactose Oxidase Pro-Sequence Cleavage and Cofactor Assembly Are Self-Processing Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 122: 990-991
- Rogl H., Kosemund K., Kühlbrandt W., Collinson I. (1998)** Refolding of *Escherichia coli* produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. *FEBS Lett.* 432 (1-2): 21-6
- Rompel A., Fischer H., Meiwes D., Büldt-Karentzopoulos K., Dillinger R., Tucek F., Witzel H., Krebs B. (1999)** Purification and spectroscopic studies on catechol oxidases from *Lycopus europaeus* and *Populus nigra*: evidence for a dinuclear copper center of type 3 and spectroscopic similarities to tyrosinase and hemocyanin. *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1): 56-63
- Ros J.R., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F. (1993a)** Effect of ferrous ions on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1163 (3): 303-8
- Ros J.R., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F. (1993b)** Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295 (Pt 1): 309-12
- Rozema D., Gellman S.H. (1995)** Artificial Chaperones: Protein Refolding via Sequential Use of Detergent and Cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 2373-2374
- Ruan L., Huang Y., Zhang G., Yu D., Ping S. (2002)** Expression of the *mel* gene from *Pseudomonas maltophilia* in *Bacillus thuringiensis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 244-248
- Rudolph R. (1990)** Renaturation of recombinant, disulfide-bonded proteins from inclusion bodies. *Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research*: 149-172. (Ed. Tschesche H.) Walter de Gruyter, New York
- Rudolph R., Fischer S. (1990)** Process for obtaining renatured proteins. *US Patent.* 4 933 434
- Rudolph R., Lilie H. (1996)** *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10 (1): 49-56

- Ruoppolo M., Freedman R.B., Pucci P., Marino G. (1996)** Glutathione-dependent pathways of refolding of RNase T1 by oxidation and disulfide isomerization: catalysis by protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 35 (42): 13636-46
- Salinovich O., Montelaro R.C. (1986)** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156 (2): 341-347
- Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G., Casella L. (1998)** The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin:  $\alpha$ -diphenol oxidase activity. *Biochemistry* 37 (40): 14065-77
- Samuel D., Kumar T.K., Ganesh G., Jayaraman G., Yang P.W., Chang M.M., Trivedi V.D., Wang S.L., Hwang K.C., Chang D.K., Yu C. (2000)** Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci.* 9 (2): 344-52
- Samuni A., Chevion M., Czapski G. (1981)** Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* 256 (24): 12632-5
- Sanchez-Amat A., Lucas-Elío P., Fernández E., García-Borrón J.C., Solano F. (2001)** Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1547 (1): 104-16
- Sánchez-Ferrer Á., Bru R., García-Carmona F. (1989)** Novel Procedure for Extraction of a Latent Grape Polyphenoloxidase Using Temperature-Induced Phase Separation in Triton X-114. *Plant Physiol.* 91: 1481-1487
- Sánchez-Ferrer Á., Laveda F., García-Carmona F. (1993a)** Substrate-Dependent Activation of Latent Potato Leaf Polyphenol Oxidase by Anionic Surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1583-1586
- Sánchez-Ferrer Á., Laveda F., García-Carmona F. (1993b)** Partial Purification of Soluble Potato Polyphenol Oxidase by Partitioning in an Aqueous Two-Phase System. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1219-1224
- Sánchez-Ferrer Á., Rodríguez-López J.N., García-Cánovas F., García-Carmona F. (1995)** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247 (1): 1-11
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467
- Satô M., Hasegawa M. (1976)** The Latency of Spinach Chloroplast Phenolase. *Phytochemistry* 15: 61-65
- Schäfer U., Beck K., Müller M. (1999)** Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 274 (35): 24567-74
- Schindler T., Herrler M., Marahiel M.A., Schmid F.X. (1995)** Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.* 2 (8): 663-73
- Schlieker C., Bukau B., Mogk A. (2002)** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J. Biotechnol.* 96 (1): 13-21
- Schmidt K., Fufezan C., Krieger-Liszkay A., Satoh H., Paulsen H. (2003)** Recombinant water-soluble chlorophyll protein from *Brassica oleracea* var. *Botrys* binds various chlorophyll derivatives. *Biochemistry* 42 (24): 7427-33
- Sciancalepore V., Longone V. (1984)** Polyphenol Oxidase Activity and Browning in Green Olives. *J. Agric. Food Chem.* 32: 320-321
- Seckler R., Jaenicke R. (1992)** Protein folding and protein refolding. *FASEB J.* 6 (8): 2545-52

- Seo B., Yun J., Lee S., Kim M., Hwang K., Kim J., Min K.R., Kim Y., Moon D. (1999)** Barbarin as a new tyrosinase inhibitor from *Barbarea orthocerus*. *Planta Med.* 65 (8): 683-686
- Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N. (2003)** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51 (10): 2837-53
- Shahar T., Hennig N., Gutfinger T., Hareven D., Lifschitz E. (1992)** The tomato 66.3-kD polyphenoloxidase gene: molecular identification and developmental expression. *Plant Cell* 4 (2): 135-47
- Sheptovitsky Y.G., Brudvig G.W. (1996)** Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* 35 (50): 16255-63
- Shi C., Dai Y., Xu X., Xie Y., Han H., Liu Q. (2001)** The Interaction of Azide with Polyphenol Oxidase II from Tobacco. *J. Protein Chem.* 20 (6): 463-468
- Shibahara S., Tomita Y., Sakakura T., Nager C., Chaudhuri B., Müller R. (1986)** Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. *Nucleic Acids Res.* 14 (6): 2413-27
- Shiloach J., Kaufman J., Guillard A.S., Fass R. (1996)** Effect of Glucose Supply Strategy on Acetate Accumulation, Growth and Recombinant Protein Production by *Escherichia coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 421-428
- Sikorski R., Peters R. (1998)** Lactamase Live! *Science* 279 (5349): 412
- Sinha N.K., Light A. (1975)** Refolding of reduced, denatured trypsinogen and trypsin immobilized on Agarose beads. *J. Biol. Chem.* 250 (22): 8624-9
- Skerra A., Schmidt T.G. (2000)** Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods. Enzymol.* 326: 271-304
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985)** Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* 79: 76-85
- Smith V.R., Walker J.E. (2003)** Purification and folding of recombinant bovine oxoglutarate/malate carrier by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 29 (2): 209-16
- Söderhäll K., Cerenius L. (1998)** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1): 23-8
- Sojo M.M., Nuñez-Delicado E., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. (1998)** Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase Using Triton X-114 and PEG 8000 for Removal of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930
- Sojo M.M., Nuñez-Delicado E., García-Carmona F., Sánchez-Ferrer Á. (1999)** Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 47 (2): 518-23
- Sokolenko A., Fulgosi H., Gal A., Altschmied L., Ohad I., Herrmann R.G. (1995)** The 64 kDa polypeptide of spinach may not be the LHCII kinase, but a lumen-located polyphenol oxidase. *FEBS Lett.* 371 (2): 176-80
- Solano F., García E., Pérez de Egea E., Sanchez-Amat A. (1997)** Isolation and Characterisation of Strain MMB-1 (CECT 4803), a Novel Melanogenic Marine Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (9): 3499-3506
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996)** Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* 96 (7): 2563-2606
- Sommer A., Ne'eman E., Steffens J.C., Mayer A.M., Harel E. (1994)** Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 105 (4): 1301-11

- Sommer A., Ne'eman E., Koussevitzky S., Hunt M.D., Steffens J.C., Mayer A.M., Harel E. (1995)** The inhibition by  $\text{Cu}^{2+}$  of the import of polyphenol oxidase into chloroplasts. *Photosynthesis: from Light to Biosphere*. 3: 827-830. (Ed. Mathis P.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Sørensen H.P., Sperling-Petersen H.U., Mortensen K.K. (2003)** Dialysis strategies for protein refolding: preparative streptavidin production. *Protein Expr. Purif.* 31 (1): 149-54
- Steiner U., Schliemann W., Strack D. (1996)** Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. *Anal. Biochem.* 238 (1): 72-5
- Storf S. (2005)** Untersuchungen der Pigment- und Proteinzusammensetzung der peripheren Lichtsammelantenne des Photosystem I. *Dissertation*. Institut für Allgemeine Botanik. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
- Strack D., Schliemann W. (2001)** Bifunktionelle Polyphenoloxidasen: neuartige Funktionen in der Biosynthese pflanzlicher Farbstoffe. *Angew. Chem.* 113 (20): 3907-3911
- Studier F.W., Moffatt B.A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 (1): 113-30
- Sturm R.A., Teasdale R.D., Box N.F. (2001)** Human pigmentation genes: identification, structure and consequences of polymorphic variation. *Gene* 277 (1-2): 49-62
- Suenaga M., Ohmae H., Tsuji S., Itoh T., Nishimura O. (1998)** Renaturation of recombinant human neurotrophin-3 from inclusion bodies using a suppressor agent of aggregation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28 (Pt 2): 119-24
- Sugumaran M. (2002)** Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 15 (1): 2-9
- Sulaimon S.S., Kitchell B.E. (2003)** The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol.* 14 (2): 57-65
- Sullivan M.L., Hatfield R.D., Thoma S.L., Samac D.A. (2004)** Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 136 (2): 3234-44
- Tabor S., Richardson C.C. (1985)** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (4): 1074-8
- Tainer J.A., Getzoff E.D., Beem K.M., Richardson J.S., Richardson D.C. (1982)** Determination and analysis of the 2 Å-structure of copper, zinc superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 160 (2): 181-217
- Tamate H.B., Kuzumaki T., Suzuki J., Ishikawa K. (1985)** Immunological quantitation of tyrosinase from wild-type and albino mutant mice. *FEBS Lett.* 183 (2): 279-82
- Tandon S., Horowitz P.M. (1987)** Detergent-assisted refolding of guanidinium chloride-denatured rhodanese. The effects of the concentration and type of detergent. *J. Biol. Chem.* 262 (10): 4486-91
- Tepper A.W., Bubacco L., Canters G.W. (2002)** Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by halide ions. *J. Biol. Chem.* 277 (34): 30436-44
- Tepper A.W. (2005)** Structure and Mechanism of the Type-3 Copper Protein Tyrosinase. *Dissertation*. Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen en die der Geneeskunde. Universiteit Leiden, Nederland
- Tepper A.W., Bubacco L., Canters G.W. (2005)** Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue p-nitrophenol studied by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2): 567-75

- Thipyapong P., Hunt M.D., Steffens J.C. (1995)** Systemic Wound Induction Of Potato (*Solanum tuberosum*) Polyphenol Oxidase. *Phytochemistry* 40 (3): 673-676
- Thipyapong P., Joel D.M., Steffens J.C. (1997)** Differential Expression and Turnover of the Tomato Polyphenol Oxidase Gene Family during Vegetative and Reproductive Development. *Plant Physiol.* 113: 707-718
- Thipyapong P., Steffens J.C. (1997)** Tomato Polyphenol Oxidase. Differential Response of the Polyphenol Oxidase F Promoter to Injuries and Wound Signals. *Plant Physiol.* 115: 409-418
- Thipyapong P., Melkonian J., Wolfe D.W., Steffens J.C. (2004)** Suppression of polyphenol oxidase increases stress tolerance in tomato. *Plant Sci.* 167: 693-703
- Thomas J.G., Ayling A., Baneyx F. (1997)** Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66 (3): 197-238
- Thygesen P.W., Dry I.B., Robinson S.P. (1995)** Polyphenol oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109 (2): 525-31
- Tief K., Schmidt A., Beermann F. (1998)** New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 53 (1-2): 307-10
- Tobbell D.A., Middleton B.J., Raines S., Needham M.R., Taylor I.W., Beveridge J.Y., Abbott W.M. (2002)** Identification of *in vitro* folding conditions for procathepsin S and cathepsin S using fractional factorial screens. *Protein Expr. Purif.* 24 (2): 242-54
- Tolbert N.E. (1973)** Activation of Polyphenol Oxidase of Chloroplasts. *Plant Physiol.* 51: 234-244
- Tomoyasu T., Mogk A., Langen H., Goloubinoff P., Bukau B. (2001)** Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol. Microbiol.* 40 (2): 397-413
- Toyofuku K., Wada I., Spritz R.A., Hearing V.J. (2001)** The molecular basis of oculocutaneous albinism type 1 (OCA1): sorting failure and degradation of mutant tyrosinases results in a lack of pigmentation. *Biochem. J.* 355 (Pt 2): 259-69
- Trebst A., Depka B. (1995)** Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosyn. Res.* 46: 41-44
- Tripathi R.K., Hearing V.J., Urabe K., Aroca P., Spritz R.A. (1992)** Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 267 (33): 23707-12
- Tsai T.Y., Lee Y.H. (1998)** Roles of copper ligands in the activation and secretion of *Streptomyces* tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 273 (30): 19243-50
- Tsukamoto K., Jackson I.J., Urabe K., Montague P.M., Hearing V.J. (1992)** A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* 11 (2): 519-26
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Arakawa T. (2003)** Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 28 (1): 1-8
- Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J.S., Arakawa T. (2004)** Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization and Purification. *Biotechnol. Prog.* 20: 1301-1308
- Turner J.G., Ellis C., Devoto A. (2002)** The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14 Suppl: S153-64
- Tyagi M., Kayastha A.M., Sinha B. (2000)** The role of peroxidase and polyphenol oxidase isoenzymes in wheat resistance to *Alternaria tritricina*. *Biologia Plantarum* 43 (4): 559-562

- Umetsu M., Tsumoto K., Hara M., Ashish K., Goda S., Adschiri T., Kumagai I. (2003)** How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. Spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain Fv fragment. *J. Biol. Chem.* 278 (11): 8979-87
- Valentine J.S., Gralla E.B. (1997)** Delivering copper inside yeast and human cells. *Science* 278 (5339): 817-8
- Valverde P., García-Borrón J.C., Solano F., Lozano J.A. (1992)** Proteolysis with trypsin of mammalian tyrosinase isoforms from B16 mouse melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* 297 (2): 221-7
- van Gastel M., Bubacco L., Groenen E.J., Vijgenboom E., Canters G.W. (2000)** EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Lett.* 474 (2-3): 228-32
- van Gelder C.W., Flurkey W.H., Wichers H.J. (1997)** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45 (7): 1309-23
- Vaughan P.F., McIntyre R.J. (1975)** The action of hydrogen peroxide on the hydroxylation of p-coumaric acid by spinach-beet phenolase. *Biochem. J.* 151 (3): 759-62
- Vaughn K.C., Duke S.O. (1984)** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum* 60: 106-112
- Vaughn K.C., Lax A.R., Duke S.O. (1988)** Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum* 72: 659-665
- Vincent P., Dieryck W., Maneta-Peyret L., Moreau P., Cassagne C., Santarelli X. (2004)** Chromatographic purification of an insoluble histidine tag recombinant Ykt6p SNARE from *Arabidopsis thaliana* over-expressed in *E. coli*. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 808 (1): 83-9
- Volbeda A., Hol W.G. (1989)** Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209 (2): 249-79
- Werck-Reichhart D., Benveniste I., Teutsch H., Durst F., Gabriae B. (1991)** Glycerol allows low-temperature phase separation of membrane proteins solubilized in Triton X-114: Application to the purification of plant cytochromes P-450 and b<sub>5</sub>. *Anal. Biochem.* 197: 125-131
- Werner M.H., Clore G.M., Gronenborn A.M., Kondoh A., Fisher R.J. (1994)** Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett.* 345 (2-3): 125-30
- Wetlaufer D.B., Branca P.A., Chen G.X. (1987)** The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential. *Protein Eng.* 1 (2): 141-6
- White F.H., Jr. (1961)** Regeneration of native secondary and tertiary structures by air oxidation of reduced ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 236: 1353-60
- White C.B., Chen Q., Kenyon G.L., Babbitt P.C. (1995)** A novel activity of OmpT. Proteolysis under extreme denaturing conditions. *J. Biol. Chem.* 270 (22): 12990-4
- Wichers H.J., Recourt K., Hendriks M., Ebbelaar C.E., Biancone G., Hoerberichts F.A., Mooibroek H., Soler-Rivas C. (2003)** Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (4): 336-41
- Wigfield D.C., Goltz D.M. (1990a)** The pH dependence of the reconstitution reaction of apotyrosinase: the question of Cu(I) versus Cu(II). *Biochem. Cell Biol.* 68 (3): 648-50
- Wigfield D.C., Goltz D.M. (1990b)** Kinetics of reconstitution of apotyrosinase by copper. *Biochem. Cell Biol.* 68: 476-479

- Wigfield D.C., Goltz D.M. (1993)** Activation parameters for the reconstitution of apotyrosinase by copper. *Biochem. Cell Biol.* 71 (1-2): 96-8
- Wilcox D.E., Porras A.G., Hwang Y.T., Lerch K., Winkler M.E., Solomon E.I. (1985)** Substrate Analogue Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 4015-4027
- Winder A.J., Harris H. (1991)** New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 198 (2): 317-26
- Winter R., Noll F. (1998)** Methoden der Biophysikalischen Chemie. *Teubner-Studienbücher: Chemie.* Teubner, Stuttgart
- Wittbjer A., Dahlback B., Odh G., Rosengren A.M., Rosengren E., Rorsman H. (1989)** Isolation of human tyrosinase from cultured melanoma cells. *Acta Derm. Venereol.* 69 (2): 125-31
- Wittung-Stafshede P. (2004)** Role of cofactors in folding of the blue-copper protein azurin. *Inorg. Chem.* 43 (25): 7926-33
- Wu H., Park H.Y. (2003)** Protein kinase C-beta-mediated complex formation between tyrosinase and TRP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311 (4): 948-53
- Xie G., Timasheff S.N. (1997)** Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: Preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Sci.* 6: 211-221
- Xie Y., Lashuel H.A., Miroy G.J., Dikler S., Kelly J.W. (1998)** Recombinant human retinol-binding protein refolding, native disulfide formation, and characterization. *Protein Expr. Purif.* 14 (1): 31-7
- Yang C.P., Fujita S., Ashrafuzzaman M., Nakamura N., Hayashi N. (2000)** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48 (7): 2732-5
- Yang C., Horn R., Paulsen H. (2003a)** The light-harvesting chlorophyll *a/b* complex can be reconstituted *in vitro* from its completely unfolded apoprotein. *Biochemistry* 42 (15): 4527-33
- Yang W.L., Peng L.S., Zhong X.F., Wei J.W., Jiang X.Y., Ye L.T., Zou L., Tu H.B., Wu W.Y., Xu A.L. (2003b)** Functional expression and characterization of a recombinant phospholipase A2 from sea snake *Lapemis hardwickii* as a soluble protein in *E. coli*. *Toxicon* 41 (6): 713-21
- Yang L.C., Zhu Z., Yang X.G. (2003c)** Purification and immunity analysis of recombinant 6His-HPT protein expressed in *E. coli*. *Biomed. Environ. Sci.* 16 (2): 149-56
- Yoon S.-O., Hirata R.D.C., da Silva A.C.R., Nguyen N.Y., Hirata M.H. (2002)** Cloning and expression of soluble recombinant protein comprising the extracellular domain of the human type I interferon receptor 2c subunit (IFNAR-2c) in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* 24: 1443-1448
- Yu H., Kowalski S.P., Steffens J.C. (1992)** Comparison of Polyphenol Oxidase Expression in Glandular Trichomes of *Solanum* and *Lycopersicon* Species. *Plant Physiol.* 100: 1885-1890
- Zahn R., von Schroetter C., Wüthrich K. (1997)** Human prion protein expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett.* 417: 400-404
- Zardeneta G., Horowitz P.M. (1994)** Protein refolding at high concentrations using detergent/phospholipid mixtures. *Anal. Biochem.* 218 (2): 392-8
- Zecca L., Tampellini D., Gerlach M., Riederer P., Fariello R.G., Sulzer D. (2001)** Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour. *Mol. Pathol.* 54 (6): 414-8

**Zer H., Vink M., Keren N., Dilly-Hartwig H.G., Paulsen H., Herrmann R.G., Andersson B., Ohad I. (1999)** Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (14): 8277-82

**Zhou Y., O'Hare T.J., Jobin-Decor M., Underhill S.J.R., Wills R.B.H., Graham M.W. (2003)** Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart. *Plant Biotechnol. J.* 1: 463-478

**Zlateva T., Di Muro P., Salvato B., Beltramini M. (1996)** The  $\alpha$ -diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin. *FEBS Lett.* 384 (3): 251-4

**Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B. (1992)** Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1): 20-2



## Abkürzungen

A	Adenin
$A_{280\text{nm}}$	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMS	Ammoniumsulfat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
AT	Adenin-Thymin-Basenpaar
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Aktives Zentrum
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Cytosin
Chl	Chlorophyll
Chl <i>a/b</i>	Gesamtchlorophyll (Chl <i>a</i> und Chl <i>b</i> )
CiAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
CMC	Kritische micellare Konzentration
CO	Catecholoxidase
CuA, CuB	Kupferzentren der Tyrosinasen, Catecholoxidasen und Hämocyane
<i>dd</i> NTP	<i>ddesoxy</i> -Nucleosidtriphosphat
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DHICA	DHI-2-Carboxylsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>d</i> NTP	<i>desoxy</i> -Nucleosidtriphosphat
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DOPACHINON	4-(2-Carboxy-2-Aminoethyl)-1,2-Benzochinon
DOPACHROM	2-Carboxy-2,3-Dihydroxyindolen-5,6-Chinon
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoic Acid), Ellmann's Reagens
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FP	French Press (Zellpresse)
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FP-P	Pellet aus der Zentrifugation im Anschluss an eine FP-Behandlung
FP-Ü	Überstand aus der Zentrifugation im Anschluss an eine FP-Behandlung
G	Guanin
GC	Guanin-Cytosin-Basenpaar
GdnHCl	Guanidin-Hydrochlorid
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
HABA	4-Hydroxy-Azobenzon-2-Carboxylsäure
HC	Hämocyanin
His-Tag	Histidin-Tag (His <sub>6</sub> -Peptid)
IB	Inclusion Bodies
IC	5,6-Indolchinon
IEX	Ion Exchange Chromatographie
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KCN	Kaliumcyanid
LB	Luria Bertani
LeukoDOPAchrom	2,3-Dihydro-5,6-Dihydroxyindolen-2-Carboxylat
LHCII	Light-harvesting complex II, Lichtsammlerkomplex II
Lhcb1	Bezeichnung des Gens für das rekombinante Apoprotein des LHC II
LM	Laurylmaltosid, n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
MATP	Membrane-associated transporter protein
MBTH	3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrazon
Min.	Minuten
MT	Metallothionein
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NTA	Nitrilotriessigsäure
OCA1-4	Oculocutaner Albinismus Typ 1 - 4

OD	Optische Dichte = Absorption bei 1 cm Weglänge
OG	(n)-Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosid
OPA	One Phor All
ORF	Open Reading Frame
P	Pellet
P-Protein	<i>pink eyed</i> -Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pET	<u>P</u> lasmid for <u>E</u> xpression by <u>I</u> 7 RNA polymerase
pH	pH-Wert
PhxA	Polyphenoloxidase A-Gen aus Spinat
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PPO	Polyphenoloxidase
ppoA	Polyphenoloxidase A-Gen aus Tomate
PSI / PSII	Photosystem I / II
PTU	Phenylthiourea = Phenylthioharnstoff
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec.	Sekunden
SEC	Size Exclusion Chromatography = Größenausschluss-Chromatographie
SOD	Superoxid-Dismutase
SPP	Stromal Processing Peptidase
Std.	Stunden
Strep-Tag	Streptavidin-Tag
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TB	Terrific Broth
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS buffered saline
TBSTT	TBS-Tween 20-Triton X-100

---

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Mittlere Schmelztemperatur [°C] von Primern/DNA
TOPA	2,4,5-Trihydroxyphenylalanin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRP1	Tyrosinase-related protein 1, auch DHICA-Oxidase
TRP2	Tyrosinase-related protein 2, auch DOPAchrom-Tautomerase
Toc75	The outer envelope component (Chloroplasten-Import-Maschinerie)
TX	Triton X
TYR	Tyrosinase
U	Unit
Ü	Überstand
ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
(v/v)	volume per volume
WSCP	water soluble chlorophyll-binding protein
(w/v)	weight per volume

## Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid 30% (29 : 1)	Serva
Agar Agar, high gel strength	Serva
Agarose	GERBU
Ampicillin, Na-Salz	Serva
AMS, Ammoniumsulfat, 99 %	Sigma
AMS, Ammoniumsulfat, p.a.	Merck
APS, Ammoniumpersulfat	Sigma
Arginin, L-Arginin	Merck
Ascorbinsäure, L(+)-Ascorbinsäure, Vitamin C	Merck
ATP, Adenosintriphosphat	Boehringer
Bacto™-Hefeextrakt, Extrakt autolyzierter Hefezellen	Otto Nordwald
Bacto™-Trypton	Otto Nordwald
BCIP, 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Na-Salz	Serva
Benzamidin/HCl	Serva
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
<i>bis</i> -TRIS-Methan, 2,2- <i>bis</i> -(Hydroxyethyl)-(Iminotris)-(Hydroxymethyl)-Methan	Merck
Bromphenolblau	Sigma
BSA, Bovine Serum Albumin	ICN
CaCl <sub>2</sub>	Merck
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	Merck
CHAPS, 3-((3-Cholamidopropyl)- <i>di</i> -Methylammonium)-1-Propan-Sulfonat	BIOMOL
Chelating Sepharose™ Fast Flow	Amersham
Chloramphenicol	Serva
CiAP, Calf intestine Alkaline Phosphatase, 20 – 30 U/ $\mu$ l	Amersham
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Serva
Coomassie® Brilliant Blue G-250, Proteinassay, Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	Merck
DEAE Sepharose™ Fast Flow	Amersham
Deriphat, Natrium-N-Lauryl- $\beta$ -Iminodipropionat	Cognis
Desoxycholat, Na-Salz	Sigma
Desthiobiotin	IBA
DMF, N,N-Dimethylformamid	Sigma

---

DNase I	Boehringer
Dopamin, 3,4-Dihydroxyphenethylamin	Sigma
DTNB, 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoic Acid), Ellmann's Reagens	Sigma
DTT, 1,4-Dithio-D,L-threitol	GERBU
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure, Titriplex III	Merck
$\varepsilon$ -Aminocapronsäure	Sigma
Essigsäure, 100 %	Riedel-de Haën
Ethanol p.a.	Merck
Ethanol tech.	Mundo
Ethidiumbromid, 1,7-Diamino-10-Ethyl-9-Phenylphenanthridiniumbromid	Serva
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	PeQLab
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Merck
GdnHCl, Guanidin-Hydrochlorid	Fluka/Sigma
Glucose, D(+)-Glucose	Riedel-de Haën
Glycin	Applichem
Glycerin $\geq$ 98 %, wasserfrei	Roth
GSH, Glutathion, reduzierte Form	Merck
GSSG, Glutathion, oxidierte Form	Serva
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Roth
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën
HABA, 4-Hydroxy-Azobenzen-2-Carboxylsäure, Puffer R (10 x)	IBA
Harnstoff, Urea, ultra pure	BIOMOL
HCl	Merck
Hydroxyapatit Bio-Gel <sup>®</sup> HTP Gel	Bio-Rad
Imidazol	Sigma
IPTG, Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid	Applichem
Isopropanol	Merck
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3 H <sub>2</sub> O	Merck
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
KNO <sub>3</sub>	Merck
KOH	Merck
Lambda-DNA, Standard-DNA, N6-Methyladenin-frei	NEB
LM, n-Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid, ULTROL <sup>®</sup> Grade, Calbiochem <sup>®</sup>	Merck
Lysozym, from chicken egg white	Serva
MBTH, 3-Methyl-2-Benzothiazolinon-Hydrason	Sigma
MES, 2-(N-Morpholino)Ethan sulfonic acid	BIOMOL

Methanol	Merck
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Merck
MnCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	Merck
MOPS, 3-(N-Morpholino)Propan sulfonic acid	GERBU
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	Merck
Na-Acetat	Merck
NaBr	Merck
Na-Cholat, Cholic Acid, Na-Salz	Serva
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	Merck
NaOH	Merck
NBT, Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 2,2'-Di-p-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-[3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylen]ditetrazolium Chlorid	Sigma
NH <sub>4</sub> Cl	Merck
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NiCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	Merck
Nucleobond® AX 100	Macherey-Nagel
NucleoTrap® Extraction Kit	Macherey-Nagel
NZCYM Broth EZMix™	Sigma
OG, n-Octyl-β-D-Glucopyranosid	Sigma
OG, Octyl-β-D-Glucopyranosid	BIOMOL
OPA-Puffer, One Phor All (10 x)	Amersham
PEG, Polyethylenglycol, Average MW = 4000 Da	Serva
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Serva
Ponceau S	Merck
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeQLab
Saccharose, D(+)-Saccharose	Roth
SDS, Natriumdodecylsulfat	Boehringer
SDS-7-Marker, Dalton Marker VII-L für PAGE	Sigma
SDS-6H-Marker, High Molecular Weight Marker	Sigma
Sephadex® G-25, Fine	Amersham
Sephadex® G-25, PD 10, Säulen, prepacked	Amersham
Sorbitol, D-Sorbitol	Sigma
SRA-Lösung, BCA Protein Assay, Reagent A	PIERCE
Strep-Tactin®-Sephrose	IBA
Superdex 200	Amersham
T4-DNA-Ligase, 400 U/μl	NEB


---

T4-DNA-Ligasepuffer, inkl. 10 mM ATP (10 x)	NEB
T4-PNK, T4-Polynukleotidkinase, 10 U/μl	NEB
T4-PNK-Puffer (10 x)	NEB
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, 5 U/μl	PeQLab
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Tricin	Applichem
TRIS, Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan	BIOMOL
Triton X-100, purified for membrane research	Boehringer
Triton X-114, Octylphenoxyethoxyethanol	Sigma
Trypsin	Merck
Tween 20, Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat	Sigma
Tyramin, 4-Hydroxyphenethylamin	Sigma
Tyrosinase, from Mushroom	Sigma
Xylencyanol	Serva
ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	Merck

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)  
Applichem (Darmstadt)  
BIOMOL Feinchemikalien GmbH (Hamburg)  
Bio-Rad Laboratories GmbH (München)  
Boehringer (Mannheim)  
Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)  
Cognis Deutschland GmbH und Co. KG (Düsseldorf)  
GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg)  
IBA Institut für Bioanalytik (Göttingen)  
ICN Biomedicals, Inc. (Aurora, OH, USA)  
Macherey-Nagel (Düren)  
Merck (Darmstadt)  
Mundo (Kostheim)  
NEB New England Biolabs (Frankfurt)  
Otto Nordwald (Hamburg)  
PeQLab Biotechnologie (Erlangen)  
PIERCE Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn)  
Riedel-de Haën Laborchemikalien GmbH + Co. KG (Seelze)  
Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg)  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)



## Hofmeister-Serie (entnommen aus Lottspeich, 1998)

	<b>kosmotrop</b>									<b>chaotrop</b>
<b>Kationen:</b>	$\text{NH}_4^+$	$\text{K}^+$	$\text{Na}^+$	$\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$	(Guanidin)					
<b>Anionen:</b>	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{CH}_3\text{COO}^-$	$\text{Cl}^-$	$\text{Br}^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{ClO}_3^-$	$\text{I}^-$	$\text{SCN}^-$	

## Hydropathiewerte nach Kyte und Doolittle (1982)

### Hydropathiewerte der Aminosäuren:

Ile:	4.500
Val:	4.200
Leu:	3.800
Phe:	2.800
Cys:	2.500
Met:	1.900
Ala:	1.800
Gly:	-0.400
Thr:	-0.700
Ser:	-0.800
Trp:	-0.900
Tyr:	-1.300
Pro:	-1.600
His:	-3.200
Glu:	-3.500
Gln:	-3.500
Asp:	-3.500
Asn:	-3.500
Lys:	-3.900
Arg:	-4.500

## Sequenzierungen

### pau369

Sequenzierung des Klons pDS12-ppoA (V) mit dem *antisense*-Primer DS178- (3.3.2.1). Alignment des Reverse Complement der Original-Sequenz von GENterprise (Mainz) mit der erwarteten Sequenz des ppoA-Gens von Q08303 aus der ExPASy-Datenbank (Gasteiger *et al.*, 2003) vom SIB (Swiss Institute of Bioinformatics, [www.expasy.org](http://www.expasy.org): PPOA-LYCES, Newman *et al.*, 1993), einligiert in die BamHI-Schnittstelle des pDS12-Vektors (E. Harel persönliche Mitteilung). Das Stopcodon (TGA) des ppoA-Gens ist markiert.

```
pau369          TGTAGTGAATCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-ppoA      TGTAGTGAATCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTT

pau369          TGTTTGTTGGTTTGTCTGTTTGTTTTTTAATTTCCATGTTTGA AACTTGATTTCCTTGTA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-ppoA      TGTTTGTTGGTTTGTCTGTTTGTTTTTTAATTTCCATGTTTGA AACTTGATTTCCTTGTA

pau369          CTTGTTAAAGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGTCGACCTGCA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-ppoA      CTTGTTAAAGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGTCGACCTGCA

pau369          GCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGAT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-ppoA      GCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGAT
```

### pau398

Sequenzierung des Klons pDS12-ppoA-Strep (8) mit dem *antisense*-Primer DS178- (3.3.2.1). Reverse Complement der Original-Sequenz von GENterprise. Markierung des korrekt orientierten Strep-Tags und des Stop-Codons (TGA) des ppoA-Gens.

```
TGGTACCAAAGAAAGGTGATATCTCCATTGGAGGTGTGGAGATCAAGCTTGCGGATTGTTAAATTAGTGTGTGTA
GTGAATCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTTTGTTTGTTGGTTTGTCTGT
TTGTTTTTTTAATTTCCATGCA TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA GGTGCATGA AACTTGATTTCCTTGTACTTG
TTAAAGCCGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGA
```

**pau414**

Sequenzierung des Klons pDS12-ppoA-His (1) mit dem *antisense*-Primer DS178- (3.3.3.1). Reverse Complement der Original-Sequenz von GENterprise (Mainz). Markierung des richtig inserierten His-Tags und des Stop-Codons (**TGA**) des ppoA-Gens.

```
CCAAAGAAAGGTGATATCTCCATTGGAGGTGTGGAGATCAAGCTTGCGGATTGTTAAATTAGTGTGTGTAGTGAA
TCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTTTGTGGTTTGTCTGTTTGT
TTTTAATTTCCATGCACACCATCACCATCACCATGCTGCATTGAAACTTGATTTCCTTGTACTTGTAAAGCCGAA
TTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGATCAC
```

**pau428 - pau431**

Sequenzierungen des Klons pDS12-ppoA-His (1) mit den *sense*-Primern DS23+ (pau428), ppoA-Seq1+ (pau429) und ppoA-Seq2+ (pau430) sowie dem *antisense*-Primer DS178- (pau431) (3.3.3.2). Alle vier Sequenzier-Ergebnisse (pau431 als Reverse Complement) ließen sich aufgrund von Überschneidungen zusammenfügen und mit dem ORF der erwarteten Sequenz des ppoA-Gens aus Q08303 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org): PPOA-LYCES, Newman *et al.*, 1993) vergleichen. Markierung des Start- (**ATG**) und Stop-Codons (**TGA**) des ppoA-Gens, des durch die Mutation entstandenen verfrühten Stop-Codons (**TAA**) sowie der Mismatches. Im Anschluss an das DNA-Alignment folgt eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der resultierenden Proteine.

	10	20	30	40	50	60
pau428-pau431	<b>ATG</b> GCAAGTTTGTGTAGTAATAGTAGTAGTACATCTCTCAAAACTCCTTTTACTTCTTCC					
	::					
Q08303	<b>ATG</b> GCAAGTTTGTGTAGTAATAGTAGTAGTACATCTCTCAAAACTCCTTTTACTTCTTCC					
	70	80	90	100	110	120
pau428-pau431	ACCACTTGTTTATCTTCCACTCC <b>TAA</b> AGGCTTCTCAACTTTTTCCTACATGGAAAACGTAAC					
	::					
Q08303	ACCACTTGTTTATCTTCCACTCC <b>TAA</b> AGGCTTCTCAACTTTTTCCTACATGGAAAACGTAAC					
	130	140	150	160	170	180
pau428-pau431	AAAACATTCAAAGTTTCATGCAAGGTTACCAATACTAACGGTAACCAAGATGAAACGAAT					
	::					
Q08303	AAAACATTCAAAGTTTCATGCAAGGTTACCAATACTAACGGTAACCAAGATGAAACGAAT					
	190	200	210	220	230	240
pau428-pau431	TCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTTCTTGGCTTAGGTGGTCTTTATGGTGTGCTAATGCT					
	::					
Q08303	TCTGTTGATCGAAGAAATGTTCTTCTTGGCTTAGGTGGTCTTTATGGTGTGCTAATGCT					
	250	260	270	280	290	300
pau428-pau431	ATACCATTAGCTGCATCCGCTGCTCCTACACCACCTCCTGATCTCTCATCTTGTAATAAAA					
	::					
Q08303	ATACCATTAGCTGCATCCGCTGCTCCTACACCACCTCCTGATCTCTCATCTTGTAATAAAA					



	910	920	930	940	950	
pau428-pau431	CCATGTCCTCTTATGTTCTTTGGTGGACCTTACACTCTTGGGAGTACGGTCAAGCAGC					
Q08303	CCATGTCCTCTTATGTTCTTTGGTGGACCTTACACTCTTGGGAGTACGGTCAAGCAGC					
	960	970	980	990	1000	1010
pau428-pau431	GGGAACTGTTGAAAACATCCCTCACAGCCCTGTTTACATTTGGGTTGGTACGAGACGAGG					
Q08303	GGGAACTGTTGAAAACATCCCTCACAGCCCTGTTTACATTTGGGTTGGTACGAGACGAGG					
	1020	1030	1040	1050	1060	1070
pau428-pau431	TTCAGTTTTACCTGATGGTAAAAATATCAAATGGTGAGGATATGGGTAATTTCTATTTCAGC					
Q08303	TTCAGTTTTACCTGATGGTAAAAATATCAAATGGTGAGGATATGGGTAATTTCTATTTCAGC					
	1080	1090	1100	1110	1120	1130
pau428-pau431	TGGTTTAGACCCGCTTTTCTATTGCCATCACAGCAATGTGGACAGGATGTGGAACGAATG					
Q08303	TGGTTTAGACCCGCTTTTCTATTGCCATCACAGCAATGTGGACAGGATGTGGAACGAATG					
	1140	1150	1160	1170	1180	1190
pau428-pau431	GAAGGCAACTGGAGGTAAACGAACAGATATACAAAACAAAGATTGGTTGAACTCGGAGTT					
Q08303	GAAGGCAACTGGAGGTAAACGAACAGATATACAAAACAAAGATTGGTTGAACTCGGAGTT					
	1200	1210	1220	1230	1240	1250
pau428-pau431	CTTTTTCTATGATGAGAATGGAAATCCGTTCAAAGTGAGAGTCAGAGACTGTTTGGATAC					
Q08303	CTTTTTCTATGATGAGAATGGAAATCCGTTCAAAGTGAGAGTCAGAGACTGTTTGGATAC					
	1260	1270	1280	1290	1300	1310
pau428-pau431	GAAGAAGATGGGGTATGATTACCAAGCAACGGCGACCCCATGGCGTAACTTCAAGCCAAA					
Q08303	GAAGAAGATGGGGTATGATTACCAAGCAACGGCGACCCCATGGCGTAACTTCAAGCCAAA					
	1320	1330	1340	1350	1360	1370
pau428-pau431	AACAAAGGCTTCAGCTGGGAAAGTGAATACGGGTTCAATTCCTCCCAGAAAGCCAGGTATT					
Q08303	AACAAAGGCTTCAGCTGGGAAAGTGAATACGGGTTCAATTCCTCCCAGAAAGCCAGGTATT					
	1380	1390	1400	1410	1420	1430
pau428-pau431	CCCATTGGCTAAACTCGACAAAGCAATTTTCATTTTCCATCAACAGGCCTGCTTCCTCGAG					
Q08303	CCCATTGGCTAAACTCGACAAAGCAATTTTCATTTTCCATCAACAGGCCTGCTTCCTCGAG					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
pau428-pau431	GACTCAACAAGAGAAAAATGCACAAGAGGAGGTCCTAACATTCATGCAATAAAAATATGA					
Q08303	GACTCAACAAGAGAAAAATGCACAAGAGGAGGTCCTAACATTCATGCAATAAAAATATGA					

	1500	1510	1520	1530	1540	1550
pau428-pau431	TAACAGAGATTACATAAGATTCGATGTGTTCCCTCAACGTGGATAACAATGTGAACGCGAA					
	::					
Q08303	TAACAGAGATTACATAAGATTCGATGTGTTCCCTCAACGTGGATAACAATGTGAACGCGAA					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
pau428-pau431	TGAGCTTGACAAGGCAGAGTTTGCGGGGAGTTATACTAGCTTGCCACATGTACACAGAGT					
	::					
Q08303	TGAGCTTGACAAGGCAGAGTTTGCGGGGAGTTATACTAGCTTGCCACATGTACACAGAGT					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
pau428-pau431	TGGAGATCCTAAACATACTGCAACTGCTACTCTCCGGCTGGCGATAACAGAACTGTTGGA					
	::					
Q08303	TGGAGATCCTAAACATACTGCAACTGCTACTCTCCGGCTGGCGATAACAGAACTGTTGGA					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
pau428-pau431	GGACATTGGTTTGGAAGATGAAGATACTATCGCGGTGACTCTGGTACCAAAGAAAGGTGA					
	::					
Q08303	GGACATTGGTTTGGAAGATGAAGATACTATCGCGGTGACTCTGGTACCAAAGAAAGGTGA					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
pau428-pau431	TATCTCCATTGGAGGTGTGGAGATCAAGCTTGCGGATTGTTAAATTAGTGTGTGTAGTGA					
	::					
Q08303	TATCTCCATTGGAGGTGTGGAGATCAAGCTTGCGGATTGTTAAATTAGTGTGTGTAGTGA					
	1800	1810	1820	1830	1840	1850
pau428-pau431	ATCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTTTGTGTTGTT					
	::					
Q08303	ATCTGCTGACACTACAGTTGAACAAGGATAGGTTCTGTTATGATTCTGTTTTTGTGTTGTT					
	1860	1870	1880	1890	1900	1910
pau428-pau431	GGTTTGTCTGTTTGTGTTTTTAAATTTCCATG <b>CACACCATCACCATCACCATGCTGCATGAA</b>					
	::					
Q08303	GGTTTGTCTGTTTGTGTTTTTAAATTTCCATG <b>T-----</b>					
	1920					
pau428-pau431	<b>ACTTGA</b>					
	:::::					
Q08303	<b>--TTGA</b>					

Vergleich der Aminosäuresequenzen (single letter code) der Proteine, die aus dem vorliegenden Konstrukt pDS12-ppoA-His (Sequenzierung: pau428 - pau431) bzw. aus der Gen-Sequenz Q08303 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org): PPOA-LYCES, Newman *et al.*, 1993) gebildet werden. Markierung der ausgetauschten Aminosäuren und des C-Terminus (stop).

	10	20	30	40	50	60
pau428-pau431	MASLCSNSSSTSLKTPFTSSTTCLSSTP <b>K</b> ASQLFLHGKRNKTFKVSCKVTNTNGNQDET					
	::					
Q08303	MASLCSNSSSTSLKTPFTSSTTCLSSTP <b>K</b> ASQLFLHGKRNKTFKVSCKVTNTNGNQDET					

	70	80	90	100	110	120
pau428-pau431	SVDRRNVLLGLGGLYGVANAIPLAASAAPTPPPDLSSCNKPKINATTEVPYFCCAPKPDD					
Q08303	SVDRRNVLLGLGGLYGVANAIPLAASAAPTPPPDLSSCNKPKINATTEVPYFCCAPKPDD					
	130	140	150	160	170	180
pau428-pau431	MSKVPYYKFPSTVKLRIRPPAHALDEAYIAKYNLAISRMKDLDKTQPDNPIGFKQQANIH					
Q08303	MSKVPYYKFPSTVKLRIRPPAHALDEAYIAKYNLAISRMKDLDKTQPDNPIGFKQQANIH					
	190	200	210	220	230	240
pau428-pau431	CAYCNGGYSIDGKVLQVHNSWLFFPFHRWYLYFYERILGSLIDDPTFGLPFWNWDHPKGM					
Q08303	CAYCNGGYSIDGKVLQVHNSWLFFPFHRWYLYFYERILGSLIDDPTFGLPFWNWDHPKGM					
	250	260	270	280	290	300
pau428-pau431	RFPPMFDVPGTALYDERRGDQIHNGN <b>FI</b> DLG <b>S</b> FGDQVETTQLQLMTNNLTLMYRQLVTNS					
Q08303	RFPPMFDVPGTALYDERRGDQIHNGN <b>G</b> IDL <b>G</b> YFGDQVETTQLQLMTNNLTLMYRQLVTNS					
	310	320	330	340	350	360
pau428-pau431	PCPLM <b>FFCGPYTL</b> GSTVE <b>AA</b> AGTVENIPHSVHIWVGTRRGSVLP <b>D</b> GKISNGEDMGNFYSA					
Q08303	PCPLM <b>SLVDLTLF</b> GSTVE <b>D</b> AGTVENIPHSVHIWVGTRRGSVLP <b>V</b> GKISNGEDMGNFYSA					
	370	380	390	400	410	420
pau428-pau431	GLDPLFYCHHSNVDRMWNEWKATGGKRTDIQNKDWLNSEFFFYDENGPNPKVVRDCLDT					
Q08303	GLDPLFYCHHSNVDRMWNEWKATGGKRTDIQNKDWLNSEFFFYDENGPNPKVVRDCLDT					
	430	440	450	460	470	480
pau428-pau431	KKMGYDY <b>QP</b> TATPWRNFKPKTKASAGKVN <b>T</b> GSIPPESQVFPLAKLDKAISFSINRPASSR					
Q08303	KKMGYDY <b>HA</b> TATPWRNFKPKTKASAGKVN <b>T</b> GSIPPESQVFPLAKLDKAISFSINRPASSR					
	490	500	510	520	530	540
pau428-pau431	TQQEKNAQEEVLTFNAIKYDNRDYIRFDVFLNVDNNVNANELDKAEFAGSYTSLPHVHRV					
Q08303	TQQEKNAQEEVLTFNAIKYDNRDYIRFDVFLNVDNNVNANELDKAEFAGSYTSLPHVHRV					
	550	560	570	580	590	
pau428-pau431	GDPKHTATATLRLAITE <b>L</b> LEDIGLEDEDTIAVTLVPKKGDISIGGVEIKL <b>A</b> <b>DC</b> STOP					
Q08303	GDPKHTATATLRLAITE <b>L</b> LEDIGLEDEDTIAVTLVPKKGDISIGGVEIKL <b>A</b> <b>IV</b> KLVCVVN					
pau428-pau431						
Q08303	LLTLQLNKDRFCYDSVFCWFVCLFFNFH <b>V</b> STOP					

**pau432 - pau435**

Sequenzierungen des Klons pBSCKS(+)-PhxA mit den *sense*-Primern T7+ (pau433) und PhxA-Seq1+ (pau434) sowie den *antisense*-Primern T3- (pau432) und PhxA-Seq2- (pau435) (3.4.1). Die Sequenzier-Ergebnisse sind anhand von Überschneidungen zusammengesetzt (pau433 und pau434 als Reverse Complement) und mit dem ORF des PhxA-Gen von X90869 aus der EMBL-Nucleotide Sequence Database des European Bioinformatics Institute (EBI, Cambridge, UK, [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), Sokolenko *et al.*, 1995, EMBL, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) verglichen worden. Für das Alignment wurde das Reverse Complement des PhxA-Gens aus der Sequenzierung (pau432 – pau435) verwendet, da das PhxA-Gen im pBSCKS(+)-Vektor in P<sub>T3</sub>/P<sub>T7</sub>-Orientierung, d.h. in 3'→5'-Richtung, nicht translaterbar, vorliegt (Abb. 2.6). X90869 ist identisch mit Q41388 ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), Sokolenko *et al.*, 1995). Die Mismatches sowie Start- (ATG) und Stop-Codon (TGA) des PhxA-Gens sind markiert.

	10	20	30	40	50	60
pau432-pau435	<b>ATG</b> GCAACTCTCTCTTCTCCGACCATTATCACCACACTTCCATCCTCCTCAACAACCCT					
	::					
X90869	<b>ATG</b> GCAACTCTCTCTTCTCCGACCATTATCACCACACTTCCATCCTCCTCAACAACCCT					
	70	80	90	100	110	120
pau432-pau435	TTTCTCCCCAAAAACCCCCAACTTTCCGCTCATCACCACCGTGGTGTTCGATCTGTAAAC					
	::					
X90869	TTTCTCCCCAAAAACCCCCAACTTTCCGCTCATCACCACCGTGGTGTTCGATCTGTAAAC					
	130	140	150	160	170	180
pau432-pau435	GGAAAAGTCTCGTGCCAAAACAAAAACAACAATGGTAACGATGACAATAACCAATTTCAA					
	::					
X90869	GGAAAAGTCTCGTGCCAAAACAAAAACAACAATGGTAACGATGACAATAACCAATTTCAA					
	190	200	210	220	230	240
pau432-pau435	CTCATTCAAAAACCCTAACACAAAACACACCGTATTTATTAGATAGGAGAAATATACTCCTT					
	::					
X90869	CTCATTCAAAAACCCTAACACAAAACACACCGTATTTATTAGATAGGAGAAATATACTCCTT					
	250	260	270	280	290	300
pau432-pau435	GGTTTAGGTGGCATGTATGCTGCCTTAGGGAGTGAGGGAGCTAATTACTATAATACCCTA					
	::					
X90869	GGTTTAGGTGGCATGTATGCTGCCTTAGGGAGTGAGGGAGCTAATTACTATAATACCCTA					
	310	320	330	340	350	360
pau432-pau435	GCTGCCCCATTCTCCCTGACGTGGAAAAATGTACCCTGAGTGACGCCCTATGGGACGGG					
	::					
X90869	GCTGCCCCATTCTCCCTGACGTGGAAAAATGTACCCTGAGTGACGCCCTATGGGACGGG					
	370	380	390	400	410	420
pau432-pau435	TCAGTTGGTGATCATTTGCTGCCCTCCACCCTTCGATCTCAACATAACGAAAGATTTTCGAG					
	::					
X90869	TCAGTTGGTGATCATTTGCTGCCCTCCACCCTTCGATCTCAACATAACGAAAGATTTTCGAG					



	430	440	450	460	470	480
pau432-pau435	TTTAAGAACTATCATAACCACGTGAAGAAGGTTTCGGCGTCCAGCACACAAAGCCTACGAG					
	::					
X90869	TTTAAGAACTATCATAACCACGTGAAGAAGGTTTCGGCGTCCAGCACACAAAGCCTACGAG					
	490	500	510	520	530	540
pau432-pau435	GACCAAGAATGGCTAAATGATTATAAAAGAGCAATTGCCATAATGAAGTCACTCCCAATG					
	::					
X90869	GACCAAGAATGGCTAAATGATTATAAAAGAGCAATTGCCATAATGAAGTCACTCCCAATG					
	550	560	570	580	590	600
pau432-pau435	AGCGACCCTCGCAGCCACATGCAACAAGCTAGGGTACATTGTGCTTATTGTGATGGATCT					
	::					
X90869	AGCGACCCTCGCAGCCACATGCAACAAGCTAGGGTACATTGTGCTTATTGTGATGGATCT					
	610	620	630	640	650	660
pau432-pau435	TATCCGGTACTCGGTCACAATGATACTCGACTTGAGGTCCACGCTAGTTGGTTATTCCCT					
	::					
X90869	TATCCGGTACTCGGTCACAATGATACTCGACTTGAGGTCCACGCTAGTTGGTTATTCCCT					
	670	680	690	700	710	720
pau432-pau435	TCTTTCCATAGATGGTATCTCTATTTCTACGAGAGGATCCTTGGGAAGTTGATCAACAAA					
	::					
X90869	TCTTTCCATAGATGGTATCTCTATTTCTACGAGAGGATCCTTGGGAAGTTGATCAACAAA					
	730	740	750	760	770	780
pau432-pau435	CCTGATTTTCGCCTTGCCTTACTGGAATTGGGATCATCGTGATGGGATGCGTATCCCTGAG					
	::					
X90869	CCTGATTTTCGCCTTGCCTTACTGGAATTGGGATCATCGTGATGGGATGCGTATCCCTGAG					
	790	800	810	820	830	840
pau432-pau435	ATATTCAAAGAAAATGGATTCTCCCTCTTTGATCCTAACCGGAATACAAACCACCTTGAC					
	::					
X90869	ATATTCAAAGAAAATGGATTCTCCCTCTTTGATCCTAACCGGAATACAAACCACCTTGAC					
	850	860	870	880	890	900
pau432-pau435	AAGATGATGAATTTGTCGTTTGTATCCGACGAGGAAGGTTCCGATGTCAATGAAGATGAT					
	::					
X90869	AAGATGATGAATTTGTCGTTTGTATCCGACGAGGAAGGTTCCGATGTCAATGAAGATGAT					
	910	920	930	940	950	960
pau432-pau435	CAATACGAAGAAAAACATATTGCTTATGCGTAAGGCGATGGTGTACCCGAGTGTTCGAC					
	::					
X90869	CAATACGAAGAAAAACATATTGCTTATGCGTAAGGCGATGGTGTACCCGAGTGTTCGAC					
	970	980	990	1000	1010	1020
pau432-pau435	GATCCAAACAAGGCTGAGCTCTTCTTAGGGAGTCCGTACCGTGCAGGAGACAAAATGGAG					
	::					
X90869	GATCCAAACAAGGCTGAGCTCTTCTTAGGGAGTCCGTACCGTGCAGGAGACAAAATGGAG					



	1630	1640	1650	1660	1670	1680
pau432-pau435	GATTTTATCAAGTTTGATGTTTATATCAATGATGGAAGTATTATAAACCCGAGGATAAG					
	::					
X90869	GATTTTATCAAGTTTGATGTTTATATCAATGATGGAAGTATTATAAACCCGAGGATAAG					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
pau432-pau435	ACTAAAATCAATCTTGAGTATGCTGGAAGTTTCACCAGCTTAACCCATGGTGGAGGTGGA					
	::					
X90869	ACTAAAATCAATCTTGAGTATGCTGGAAGTTTCACCAGCTTAACCCATGGTGGAGGTGGA					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
pau432-pau435	GGTGGAGGTGACATGAGCCACATGGCAGAGGAGGATATGGGTAAGAACACTGTCCTCAAG					
	::					
X90869	GGTGGAGGTGACATGAGCCACATGGCAGAGGAGGATATGGGTAAGAACACTGTCCTCAAG					
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
pau432-pau435	TTGGCATTGAACCAGCTCCTTGAAGACCTTGATGCCACCGACGACGACTCTATTCAGGTC					
	::					
X90869	TTGGCATTGAACCAGCTCCTTGAAGACCTTGATGCCACCGACGACGACTCTATTCAGGTC					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
pau432-pau435	ACTATTGTCCCTAAATCAGGAACGGACTCCATAGTTATCACTGGTATCGACATCGAG <b>TGA</b>					
	::					
X90869	ACTATTGTCCCTAAATCAGGAACGGACTCCATAGTTATCACTGGTATCGACATCGAG <b>TGA</b>					

Alignment der Aminosäuresequenzen (single letter code) der Proteine, die von den Genen im Konstrukt pBSCKS(+)-PhxA und X90869 ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), Sokolenko *et al.*, 1995) codiert werden. Für den Vergleich wurde das Reverse Complement der PhxA-DNA-Sequenz (pau432 – pau435) mittels eines Transform-Programms der Molecular Cloning Laboratories (MCLab, San Francisco, CA, USA, [www.mclab.com/toolbox/seqmanipulator2.jsp](http://www.mclab.com/toolbox/seqmanipulator2.jsp)) in die entsprechende AS-Sequenz übersetzt und mit der Protein-Sequenz aus X90869 verglichen. Die ausgetauschten Aminosäuren sind markiert.

	10	20	30	40	50	60
pau432-pau435	MATLSSPTIITTTTSILLNPFLLPKTPQLSAHHHRGVRSVNGKVSCQTKNNNGNDDNNQFQ					
	::					
X90869	MATLSSPTIITTTTSILLNPFLLPKTPQLSAHHHRGVRSVNGKVSCQTKNNNGNDDNNQFQ					
	70	80	90	100	110	120
pau432-pau435	LIQNPNTNTPYLLDRRNILLGLGMYAALGSEGANYNTLAAPILPDVEKCTLSDALWDG					
	::					
X90869	LIQNPNTNTPYLLDRRNILLGLGMYAALGSEGANYNTLAAPILPDVEKCTLSDALWDG					
	130	140	150	160	170	180
pau432-pau435	SVGDHCCPPPFDLNITKDFEFKNYHNHVKKVRRPAHKAYEDQEWLNDYKRAIAIMKSLPM					
	::					
X90869	SVGDHCCPPPFDLNITKDFEFKNYHNHVKKVRRPAHKAYEDQEWLNDYKRAIAIMKSLPM					

	190	200	210	220	230	240
pau432-pau435	SDPRSHMQQARVHCAYCDGSYPVLGHNDTRLEVHASWLFPSFHRWYLYFYERILGKLINK					
X90869	SDPRSHMQQARVHCAYCDGSYPVLGHNDTRLEVHASWLFPSFHRWYLYFYERILGKLINK					
	250	260	270	280	290	300
pau432-pau435	PDFALPYWNWDHRDGMRIPEIFKEMDSPLFDPNRNTNHLDKMMNLSFVSDEEGSDVNEDD					
X90869	PDFALPYWNWDHRDGMRIPEIFKEMDSPLFDPNRNTNHLDKMMNLSFVSDEEGSDVNEDD					
	310	320	330	340	350	360
pau432-pau435	QYEENILLMRKAMVYPSVSDDPNKAELFLGSPYRAGDKMEGDVSGAGILERMPHNSVHVW					
X90869	QYEENILLMRKAMVYPSVSDDPNKAELFLGSPYRAGDKMEGDVSGAGILERMPHNSVHVW					
	370	380	390	400	410	420
pau432-pau435	TGSNTIKGNQDMGAFWSAGRDPLFYCHHSNVDRMWSLWTDVLHGGNFPKITPEYDDYRNAY					
X90869	TRSNNTIKGNQDMGAFWSAGRDPLFYCHHSNVDRMWSLWTDVLHGGNFPKITPEYDDYRNAY					
	430	440	450	460	470	480
pau432-pau435	FYFYDENANPVRVYVRDSFDTERLGYKYEDQELPWMSITQQQQQQQRQQQRQPLLGGRLK					
X90869	FYFYDENANPVRVYVRDSFDTERLGYKYEDQELPWMSITQQQQQQQRQQQRQPLLGGRLK					
	490	500	510	520	530	540
pau432-pau435	TRTFSLVKKVLTELKVMLPLPLKYSVIKTKVDRPKKSRTKEDKLEHEEVLVINFKLGKSK					
X90869	TRTFSLVKKVLTELKVMLPLPLKYSVIKTKVDRPKKSRTKEDKLEHEEVLVINFKLGKPK					
	550	560	570	580	590	600
pau432-pau435	DFIKFDVYINDGTDYKPEDKTKINLEYAGSF TSLTHGGGGGGDMSHMAEEDMGKNTVLK					
X90869	DFIKFDVYINDGTDYKPEDKTKINLEYAGSF TSLTHGGGGGGDMSHMAEEDMGKNTVLK					
	610	620	630			
pau432-pau435	LALNQLLEDLDATDDDSIQVTIVPKSGTDSIVITGIDIE STOP					
X90869	LALNQLLEDLDATDDDSIQVTIVPKSGTDSIVITGIDIE STOP					

**pau447**

Sequenzierung des Klons pDS12-PhxA (J) mit dem *sense*-Primer DS23+ (3.4.2.1). Alignment des Sequenzierungs-Ergebnisses mit der erwarteten Sequenz des PhxA-Gens anstelle des Lhcb1-Gens im pDS12-Vektor aus dem Klon D7f.3. Gezeigt ist lediglich der Sequenz-Ausschnitt, in dem der Übergang vom pDS12-Vektor zum PhxA-Gen zu sehen ist, dessen Start-Codon (ATG) markiert ist. Der Rest der Sequenz (pau447) ist mit dem PhxA-Gen identisch.

```
pau447          CAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG CCAACTCTC
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-PhxA     CAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATG CCAACTCTC

pau447          TCTTCTCCGACCATTATCACCACTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-PhxA     TCTTCTCCGACCATTATCACCACTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAA
```

**pau457**

Sequenzierung des Klons pDS12-PhxA-His (30) mit dem *antisense*-Primer DS178- (3.4.2.2). Reverse Complement der Original-Sequenz von GENterprise. Markierung des His-Tags in korrekter Orientierung und des Stop-Codons (TGA) des PhxA-Gens.

```
ACTGGTATCGGGCCTCACCATCACCATCACCATGGGCCCGAGTGAAGTATTTTATTTCTTAATTGGGTCAACGTA
TTAATAATACTACTTCCGTAATACGGATCGAGTATTAGCAAGTAATGTGCTTCATTTTATGTGTATGGTTTCTT
GCATTATTTTATG
```

**pau469**

Sequenzierung des Klons pDS12-PhxA-His-Arg2 (C) mit dem *antisense*-Primer PhxA-Bsu36I+ (3.4.2.2). Alignment des Reverse Complement des Sequenzier-Ergebnisses mit der Sequenz des Klons pDS12-PhxA-His (bekannt aus pau432 - pau435 und pau457). Im hier dargestellten Ausschnitt des Sequenz-Vergleichs sind das Startcodon des PhxA-Gens (ATG) und die wie gewünscht ausgetauschten Basen hervorgehoben.

```
pau469          TTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-PhxA-His TTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATT

pau469          TCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATGCTACTCTCTCTTCTCCGACCAT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-PhxA-His TCACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGCATGCTACTCTCTCTTCTCCGACCAT

pau469          TATCACCACTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAAACACCCCAACTTTC
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pDS12-PhxA-His TATCACCACTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAAACACCCCAACTTTC
```

**pau471 - pau474**

Sequenzierungen des Klons pDS12-PhxA-His-Arg2 (C) mit den *sense*-Primern DS23+ (pau471) und PhxA-Seq2- (pau472) sowie den *antisense*-Primern PhxA-Seq1+ (pau473) und DS178- (pau474) (3.4.2.2). Zusammengesetzt (pau473 und pau474 als Reverse Complement) entsprechen die Sequenzier-Ergebnisse, wie erwartet, der Sequenz pDS12-PhxA-His-Arg2, die im Anhang (Sequenzen) angegeben ist.

**pau483 - pau488**

Sequenzierungen des Klons pT7-7-PhxA-His (7) mit den *sense*-Primern T7 Prom+ (pau483), PhxA-Seq2- (pau485) und PhxA-EcoNI+ (pau487) sowie den *antisense*-Primern PhxA-Bsu36I+ (pau484), PhxA-Seq1+ (pau486) und ApaI-His- (pau488) (3.4.3.1). Zusammengesetzt (pau484, pau486 und pau488 als Reverse Complement) entsprechen die Sequenzier-Ergebnisse, wie gewünscht, der Sequenz des Klons pT7-7-PhxA-His. Der PhxA-ORF aus diesem Plasmid ist im Anhang (Sequenzen) dargestellt. Hier sind lediglich die Übergänge vom pT7-7-Vektor zum PhxA-Gen gezeigt. Außerhalb des PhxA-ORF ergab sich ein Mismatch, der hier im Sequenzausschnitt ebenso wie **ATG** und **TGA** markiert ist.

```
pau483          ATAGACTTCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAA
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pT7-7-PhxA-His ATAGACTTCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAA

pau483          TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAACCTCTCTCTTCTCCGACCAT
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pT7-7-PhxA-His TAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAACCTCTCTCTTCTCCGACCAT

pau483          TATCACCCTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAAACACCCCAACTTTC
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pT7-7-PhxA-His TATCACCCTACTTCCATCCTCCTCAACAACCCTTTTCTCCCCAAAACACCCCAACTTTC

pau483          CGCTCATCACCACCGTGGTGTTCGATCTGTAAACGGAAAAGTCTCG...
                ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
pT7-7-PhxA-His CGCTCATCACCACCGTGGTGTTCGATCTGTAAACGGAAAAGTCTCG...
```

...

...







## Sequenzen

Die DNA-Sequenzen sind einzelsträngig mit dem ORF des jeweiligen Gens dargestellt. Ausgewählte Restriktionsschnittstellen sind schwarz, verwendete Primer grau unterlegt angegeben. Start- (ATG) und Stop-Codons (TGA, TAA) sind ebenfalls markiert.

**pDS12-ppoA-His**

DS23+ →  
 ATTTGCTTTG TGAGCGG... AAAGAGGAGA AATTAACTAT GAGGATCCCC  
 M R I P

51 CTAGCAATAA TGGCAAGTTT GTGTAGTAAT AGTAGTAGTA CATCTCTCAA  
 L A I M A S L C S N S S S T S L K

101 AACTCCTTTT ACTTCTTCCA CCACTTGTTT ATCTTCCACT CCTAAGCCTT  
 T P F T S S T T C L S S T P K A S

151 CTCAACTTTT CCTACATGGA AAACGTAACA AAACATTCAA AGTTTCATGC  
 Q L F L H G K R N K T F K V S C

201 AAGGTTACCA ATACTAACGG TAACCAAGAT GAAACGAATT CTGTTGATCG  
 K V T N T N G N Q D E T N S V D R

251 AAGAAATGTT CTTCTTGGCT TAGGTGGTCT TTATGGTGTT GCTAATGCTA  
 R N V L L G L G G L Y G V A N A I

301 TACCATTAGC TGCATCCGCT GCTCCTACAC CACCTCCTGA TCTCTCATCT  
 P L A A S A A P T P P P D L S S

351 TGTAATAAAC CAAAGATTAA TGCAACTACG GAGGTGCCAT ACTTTTGTG  
 C N K P K I N A T T E V P Y F C C

401 CGCGCCTAAG CCTGATGATA TGTCCAAAGT TCCTTATTAC AAGTTCCCTT  
 A P K P D D M S K V P Y Y K F P S

ppoA-Seq1+ →  
 CTGTGACTAA GCTCCGTATT CGTCCCCTG CTCATGCTCT TGATGAGGCG  
 V T K L R I R P P A H A L D E A

501 TATATGCCA AGTACAATCT GGCGATTAGC CGAATGAAAG ATCTTGATAA  
 Y I A K Y N L A I S R M K D L D K

551 GACACAACCT GATAACCCTA TTGGTTTAA GCAACAAGCT AATATACATT  
 T Q P D N P I G F K Q Q A N I H C

601 GTGCTTATTG TAATGGTGGT TATTCTATTG ATGGCAAAGT GTTGCAAGTT  
 A Y C N G G Y S I D G K V L Q V

651 CATAACTCGT GGCTTTTCTT CCCGTTCCAT AGATGGTACT TGTACTTCTA  
 H N S W L F F P F H R W Y L Y F Y

701 CGAAAGAATC TTGGGATCAC TCATCGATGA TCCAACATTC GGTTTGCCAT  
 E R I L G S L I D D P T F G L P F

751 TTTGGAATTG GGATCATCCA AAGGGCATGC GTTCCCTCC CATGTTTGAT  
 W N W D H P K G M R F P P M F D

801 GTTCCAGGGA CCGCCCTTTA TGACGAAAGG CGTGGTGATC AAATCCATAA  
 V P G T A L Y D E R R G D Q I H N

851 TGGGAACCTT ATAGATCTTG GTTCTTTTGG GGATCAAGTT GAGACAACCTC  
 G N F I D L G S F G D Q V E T T Q

```

                                ppoA-Seq2+  →
901 AGTTGCAGTT GATGACTAAT AACTTAACCC TGATGTACCG TCAGTTGGTA
    L Q L M T N N L T L M Y R Q L V
951 ACTAATTCCTC CATGTCCTCT TATGTTCTTT GGTGGACCTT ACACTCTTGG
    T N S P C P L M F F G G P Y T L G
1001 GAGTACGGTC GAAGCAGCGG GAACTGTTGA AAACATCCCT CACAGCCCTG
    S T V E A A G T V E N I P H S P V
1051 TTCACATTTG GGTGGGTACG AGACGAGGTT CAGTTTACC TGATGGTAAA
    H I W V G T R R G S V L P D G K
1101 ATATCAAATG GTGAGGATAT GGGTAATTTT TATTCAGCTG GTTTAGACCC
    I S N G E D M G N F Y S A G L D P
1151 GCTTTTCTAT TGCCATCACA GCAATGTGGA CAGGATGTGG AACGAATGGA
    L F Y C H H S N V D R M W N E W K
1201 AGGCAACTGG AGGTAAACGA ACAGATATAC AAAACAAAGA TTGGTTGAAC
    A T G G K R T D I Q N K D W L N
1251 TCGGAGTTCT TTTTCTATGA TGAGAATGGA AATCCGTTCA AAGTGAGAGT
    S E F F F Y D E N G N P F K V R V
1301 CAGAGACTGT TTGGATACGA AGAAGATGGG GTATGATTAC CAGCCAACGG
    R D C L D T K K M G Y D Y Q P T A
1351 CGACCCCATG GCGTAACTTC AAGCCAAAAA CAAAGGCTTC AGCTGGGAAA
    T P W R N F K P K T K A S A G K
1401 GTGAATACGG GTTCAATTCC TCCCGAAAGC CAGGTATTCC CATTGGCTAA
    V N T G S I P P E S Q V F P L A K
1451 ACTCGACAAA GCAATTTCAT TTTCCATCAA CAGGCCTGCT TCCTCGAGGA
    L D K A I S F S I N R P A S S R T
1501 CTCAACAAGA GAAAAATGCA CAAGAGGAGG TCCTAACATT CAATGCAATA
    Q Q E K N A Q E E V L T F N A I
1551 AAATATGATA ACAGAGATTA CATAAGATTC GATGTGTTCC TCAACGTGGA
    K Y D N R D Y I R F D V F L N V D
1601 TAACAATGTG AACGCGAATG AGCTTGACAA GGCAGAGTTT GCGGGGAGTT
    N N V N A N E L D K A E F A G S Y
1651 ATACTAGCTT GCCACATGTA CACAGAGTTG GAGATCCTAA ACATACTGCA
    T S L P H V H R V G D P K H T A
1701 ACTGCTACTC TCCGGCTGGC GATAACAGAA CTGTTGGAGG ACATTGGTTT
    T A T L R L A I T E L L E D I G L
1751 GGAAGATGAA GATACTATCG CGGTGACTCT GGTACCAAAG AAAGGTGATA
    E D E D T I A V T L V P K K G D I
                                ppoA-EcoRV+  → EcoRV
1801 tctcCATTGG AGGTGTGGAG ATCAAGCTTG CGGATTGTTA AATTAGTGTG
    S I G G V E I K L A D C STOP
1851 TGTAGTGAAT CTGCTGACAC TACAGTTGAA CAAGGATAGG TTCTGTTATG
                                ppoA-NsiI+  →
1901 ATTCTGTTTT TGTTTGTGG TTTGTCTGTT TGTTTTTTAA TTTCCATGCA
    NsiI-His+  → STOP
1951 CACCATCACC ATCACCATGC TGCATGAAAC TTGATTTCCT TGTACTTGTT
                                BamHI
2001 AAAGCCGAAT TCCAGCACAC TGGCGGCCGT TACTAGTGGA TCCGTCGACC
    PstI HindIII
2051 TGCAGCAAG CTTAATTAG ... CCAGT AATGACCTCA GAACTCC
                                ← DS178-

```

**pBSCKS(+)-PhxA-SphI (pau432 – pau435 + SphI-Schnittstelle)**

1 TAAACGACG GCCAGTGAGC GCGC<sup>T7+ →</sup>GTAATA C<sup>→</sup>GACTCACTA TAGGGC<sup>→</sup>GAAT

51 TGGAGCTCCA CCGCGGTGGC GGCCGCTCTA GAACTAGTGG ATCCCCCGGG

**PstI EcoRI**

101 **CTGCAGGAAT TC**GCGGCCGC TAAATCAATC AGTAATATAA AAGGGAAATT

151 TGTAACATGT TGATCATAAA TAATGCAAGA AAACCATACA CATAAAATGA

201 AGCACATTAC TTGCTAATAC TCGATCCGTA TTACGGAAGT AGTATTATTA

251 ATACGTTGAC CCAATTAAGA AATAAAATAC **TCA**CTCGAT GTCGATACCA  
**STOP** E I D I G

301 GTGATAACTA TGGAGTCCGT TCCTGATTTA GGGACAATAG TGACCTGAAT  
T I V I S D T G S K P V I T V Q I

351 AGAGTCGTCG TCGGTGGCAT CAAGTCTTC AAGGAGCTGG TTCAATGCCA  
S D D D T A D L D E L L Q N L A

401 ACTTGAGGAC AGTGTCTTA CCCATATCCT CCTCTGCCAT GTGGCTCATG  
L K L V T N K G M D E E A M H S M

451 TCACCTCCAC CTCCACCTCC ACCATGGGTT AAGCTGGTGA AACTTCCAGC  
D G G G G G G G H T L S T F S G A

501 ATACTCAAGA TTGATTTTAG TCTTATCCTC GGGTTTATAA TCAGTTCAT  
Y E L N I K T K D E P K Y D T G

551 CATTGATATA AACATCAAAC TTGATAAAAT CCTTTGACTT TCCTAATTTG  
D N I Y V D F K I F D K S K G L K

**PhxA-Seq1+ →**

601 AAATTTATAA CAAGAACCT**C CTCATGTTCC AGCTTGCTT CC**TTTGTCT  
F N I V L V E E H E L K D E K T R

651 AGACTTTTTA GGCCTATCGA CCTTCGTTTT TATGACCGAG TACTTTAAGG  
S K K P R D V K T K I V S Y K L

701 GCAAAGGGAG CATCACCTTT AATTCGGTTA AAACCTTTTT AACTAGAGAA  
P L P L M V K L E T L V K K V L S

751 AACGTTCTCG TCTTGAGTCG TCCCCCAGC AGCGTTGTC GTTGTGTTG  
F T R T K L R G G L L P Q R Q Q Q

801 TCGTTGTTGT TGTGTTGTT GTTGAGTAAT TGACATCCAT GGCAGTTCCT  
R Q Q Q Q Q Q Q T I S M W P L E

851 GATCTTCGTA CTTGTACCG AGTCTCTCCG TGTCGAAACT ATCCCTGACA  
Q D E Y K Y G L R E T D F S D R V

901 TAAACCCTTA CAGGGTTAGC GTTTTCATCG TAGAAGTAGA AATACGCATT  
Y V R V P N A N E D Y F Y F Y A N

951 TCGATAATCA TCGTATTCAG GCGTCTTAGG GAAGTTACCC CCATGGAGAA  
R Y D D Y E P T K P F N G G H L

1001 CGTCAGTCCA AAGACTCCAC ATTCTATCTA CATTAGAGTG ATGACAATAA  
V D T W L S W M R D V N S H H C Y

1051 AACAAAGGGT CACGTCCAGC AGACCAGAAG GCACCCATGT CTTGATTACC  
F L P D R G A S W F A G M D Q N G

1101 CTTAATAGTA TTACTTCCGG TCCATACATG GACCGAGTTG TGAGGCATAC

```

1151 GCTCAAGAAT CCCAGCACCA CTTACATCCC CCTCCATTTT GTCTCCTGCA
      R E L I G A G S V D G E M K D G A

1201 CGGTACGGAC TCCCTAAGAA GAGCTCAGCC TTGTTTGGAT CGTCGGA AAC
      R Y P S G L F L E A K N P D D S V

1251 ACTCGGTAC ACCATCGCCT TACGCATAAG CAATATGTTT TCTTCGTATT
      S P Y V M A K R M L L I N E E Y

1301 GATCATCTTC ATTGACATCG GAACCTTCCT CGTCGATAAC AAACGACAAA
      Q D D E N V D S G E E D S V F S L

1351 TTCATCATCT TGTCAAGGTG GTTTGTATTG CCGTTAGGAT CAAAGAGGGG
      N M M K D L H N T N R N P D F L P

1401 AGAATCCATT TCTTTGAATA TCTCAGGGAT ACGCATCCCA TCACGATGAT
      S D M E K F I E P I R M G D R H

1451 CCCAATTCCA GTAAGGCAAG GCGAAATCAG GTTTGTGAT CAACTTCCCA
      D W N W Y P L A F D P K N I L K G

1501 AGGATCCTCT CGTAGAAATA GAGATACCAT CTATGGAAG AAGGGAATAA
      L I R E Y F Y L Y W R H F S P F L
                                     ← PhxA-Seq2-
1551 CCAACTAGCG TGGACCTCAA GTCGAGTATC ATTGTGACCG AGTACCGGAT
      W S A H V E L R T D N H G L V P

1601 AAGATCCATC ACAATAAGCA CAATGTACCC TAGCTTGTG CATGTGGCTG
      Y S G D C Y A C H V R A Q Q M H S

1651 CGAGGGTCGC TCATTGGGAG TGACTTCATT ATGGCAATTG CTCTTTTATA
      R P D S M P L S K M I A I A R K Y

1701 ATCATTTAGC CATTCTTGGT CCTCGTAGGC TTTGTGTGCT GGACGCCGAA
      D N L W E Q D E Y A K H A P R R

1751 CCTTCTTAC GTGGTTATGA TAGTTCTTAA ACTCGAAATC TTTCGTTATG
      V K K V H N H Y N K F E F D K T I

1801 TTGAGATCGA AGGGTGGAGG GCAGCAATGA TCACCAACTG ACCCGTCCCA
      N L D F P P P C C H D G V S G D W

1851 TAGGGCGTCA CTCAGGTAC ATTTTCCAC GTCAGGGAGA ATGGGGCAG
      L A D S L T C K E V D P L I P A
                                     PhxA-Bsu36I+ Bsu36I →
1901 CTAGGTATT ATAGTAATTA GCTCCCTCAC TCCCTAAGGC AGCATAATG
      A L T N Y Y N A G E S G L A A Y M

1951 CCACCTAAAC CAAGGAGTAT ATTTCTCCTA TCTAATAAAT ACGGTGTGTT
      G G L G L L I N R R D L L Y P T N

2001 TGTGTTAGGG TTTTGAATGA GTTGA AATTG GTTATTGTCA TCGTTACCAT
      T N P N Q I L Q F Q N N D D N G

2051 TGTGTTT TTTTGGCAC GAGACTTTTC CGTTTACAGA TCGAACACCA
      N N N K T Q C S V K G N V S R V G

2101 CGGTGGTGAT GAGCGGAAAG TTGGGGTGTT TTGGGGAGAA AAGGGTTGTT
      R H H H A S L Q P T K P L F P N N
                                     PhxA-SphI+
2151 GAGGAGGATG GAAGTAGTGG TGATAATGGT CGGAGAAGAG AGAGTTGCCA
      L L I S T T T I I T P S S L T A
SphI → EcoRI EcoRV HindIII
2201 TCGTGCAACT AGCTACTAGC TAGAGAGCGG CCGCGAATTC GATATCAAGC
      M
2251 TTATCGATAC CGTCGACCTC GAGGGGGGGC CCGGTACCCA GCTTTTGTTC
      ← T3-
2301 CCTTTAGTGA GGGTTAATTG CGCGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT

```

**pDS12-PhxA-His-Arg2- (pau471 - pau474)**

PhxA-XhoI+ → XhoI  
CCTTTTCGTCT TCACC**CTCGAG**

DS23+ →

1 AAATCATAAA AAATTT**ATTT GCTTTGTGAG CGG**ATAACAA TTATAATAGA

51 TTCAATTGTG AGCGGATAAC AATTT**CACAC** AGAATTCATT AAAGA**CGAGA**

← SphI PhxA-SphI-Arg- / PhxA-NdeI-

101 **AATTAAGCAT GCGTACTCTC** TCTTCTCCGA CCATTATCAC CACTACTTCC

M R T L S S P T I I T T T S

151 ATCCTCCTCA ACAACCCTTT TCTCC**CAAA** ACACCC**CAAC** TTTCCGCTCA

I L L N N P F L P K T P Q L S A H

201 TCACCACCGT GGTGTT**CGAT** CTGTAA**ACGG** AAAAGTCTCG TGCCAAACAA

H H R G V R S V N G K V S C Q T K

251 AAAACAACAA TGGTAACGAT GACAATA**ACC** AATTT**CAACT** CATTCAA**AAC**

N N N G N D D N N Q F Q L I Q N

301 CCTAACACAA ACACACCGTA TTTATTAGAT AGGAGAAATA TACTCCTTGG

P N T N T P Y L L D R R N I L L G

← Bsu36I PhxA-Bsu36I+

351 TTTAGGTGGC ATGTAT**GCTG CCTTAGGGAG TGAGGC**AGCT AATTACTATA

L G G M Y A A L G S E G A N Y Y N

401 ATACCCTAGC TGCCCCCATT CTCCCTGACG TGGAAAAATG TACCCTGAGT

T L A A P I L P D V E K C T L S

451 GACGCCCTAT GGGACGGGTC AGTTGGTGAT CATTGCTGCC CTCCACCCTT

D A L W D G S V G D H C C P P P F

501 CGATCTCAAC ATAACGAAAG ATTT**CGAGTT** TAAGAACTAT CATAACCAG

D L N I T K D F E F K N Y H N H V

551 TGAAGAAGGT TCGGCGTCCA GCACACAAAG CCTACGAGGA CCAAGAATGG

K K V R R P A H K A Y E D Q E W

601 CTAAATGATT ATAAAAGAGC AATTGCCATA ATGAAGTCAC TCCCAATGAG

L N D Y K R A I A I M K S L P M S

651 CGACCCTCGC AGCCACATGC AACAAGCTAG GGTACATTGT GCTTATTGTG

D P R S H M Q Q A R V H C A Y C D

PhxA-Seq2- →

701 AT**GGATCTTA TCCGGTACTC** GGTCACAATG ATACTCGACT TGAGGTCCAC

G S Y P V L G H N D T R L E V H

751 GCTAGTTGGT TATTCCTTC TTTCCATAGA TGGTATCTCT ATTTCTACGA

A S W L F P S F H R W Y L Y F Y E

801 GAGGATCCTT GGGAAGTTGA TCAACAAACC TGATTTCGCC TTGCCTTACT

R I L G K L I N K P D F A L P Y W

851 GGAATTGGGA TCATCGTGAT GGGATGCGTA TCCCTGAGAT ATTCAAAGAA

N W D H R D G M R I P E I F K E

901 ATGGATTCTC CCCTCTTGA TCCTAACCGG AATACAAACC ACCTTGACAA

M D S P L F D P N R N T N H L D K

951 GATGATGAAT TTGTCGTTG TATCCGACGA GGAAGTTCC GATGTCAATG

M M N L S F V S D E E G S D V N E

1001 AAGATGATCA ATACGAAGAA AACATATTGC TTATGCGTAA GGCGATGGTG

D D Q Y E E N I L L M R K A M V

1051 TACCCGAGTG TTTCCGACGA TCCAAACAAG GCTGAGCTCT TCTTAGGGAG

Y P S V S D D P N K A E L F L G S

```

1101 TCCGTACCGT GCAGGAGACA AAATGGAGGG GGATGTAAGT GGTGCTGGGA
    P Y R A G D K M E G D V S G A G I

1151 TTCTTGAGCG TATGCCTCAC AACTCGGTCC ATGTATGGAC CGGAAGTAAT
    L E R M P H N S V H V W T G S N

1201 ACTATTAAGG GTAATCAAGA CATGGGTGCC TTCTGGTCTG CTGGACGTGA
    T I K G N Q D M G A F W S A G R D

1251 CCCTTTGTTT TATTGTCATC ACTCTAATGT AGATAGAATG TGGAGTCTTT
    P L F Y C H H S N V D R M W S L W

1301 GGACTGACGT TCTCCATGGG GGTAACTTCC CTAAGACGCC TGAATACGAT
    T D V L H G G N F P K T P E Y D

1351 GATTATCGAA ATGCGTATTT CTACTTCTAC GATGAAAACG CTAACCCTGT
    D Y R N A Y F Y F Y D E N A N P V

1401 AAGGGTTTAT GTCAGGGATA GTTTCGACAC GGAGAGACTC GGGTACAAGT
    R V Y V R D S F D T E R L G Y K Y

1451 ACGAAGATCA GGAAGTCCA TGGATGTCAA TTAACAACA ACAACAACAA
    E D Q E L P W M S I T Q Q Q Q Q

1501 CAACAACGAC AACAACAACG ACAACCGCTG CTGGGGGGAC GACTCAAGAC
    Q Q R Q Q Q R Q P L L G G R L K T

1551 GAGAACGTTT TCTCTAGTTA AAAAGGTTTT AACGGAATTA AAGTGATGC
    R T F S L V K K V L T E L K V M L

1601 TCCCTTTGCC CTTAAAGTAC TCGGTCATAA AAACGAAGGT CGATAGGCCT
    P L P L K Y S V I K T K V D R P
                                ← PhxA-Seq1+
1651 AAAAAGTCTA GAACAAAGGA AGACAAGCTG GAACATGAGG AGGTTCTTGT
    K K S R T K E D K L E H E E V L V

1701 TATAAATTTT AAATTAGGAA AGTCAAAGGA TTTTATCAAG TTTGATGTTT
    I N F K L G K S K D F I K F D V Y

1751 ATATCAATGA TGGAAGTATG TATAAACCCG AGGATAAGAC TAAAATCAAT
    I N D G T D Y K P E D K T K I N

1801 CTTGAGTATG CTGGAAGTTT CACCAGCTTA ACCCATGGTG GAGGTGGAGG
    L E Y A G S F T S L T H G G G G G
                                PhxA-EcoNI+ →
1851 TGGAGGTGAC ATGAGCCACA TGGCAGAGGA GGATATGGGT AAGAACACTG
    G G D M S H M A E E D M G K N T V

1901 TCCTCAAGTT GGCATTGAAC CAGCTCCTTG AAGACCTTGA TGCCACCGAC
    L K L A L N Q L L E D L D A T D
                                EcoNI
1951 GACGACTCTA TTCAGGTCAC TATTGTCCCT AAATCAGGAA CGGACTCCAT
    D D S I Q V T I V P K S G T D S I
                                ApaI-His+ → ApaI
2001 AGTTATCACT GGTATCGGGC CTCACCATCA CCATCACCAT GGGCCGGAGT
    V I T G I G P H H H H H H G P E STOP
2051 GAAGTATTTT ATTTCTTAAT TGGGTCAACG TATTAATAAT ACTACTTCCG
2101 TAATACGGAT CGAGTATTAG CAAGTAATGT GCTTCATTTT ATGTGTATGG
2151 TTTTCTTGCA TTATTATGA TCAACATGTT ACAAATTTCC CTTTATATT
                                PstI HindIII
2201 ACTGATTGAT TTAGCGGCCG CGAATTCCTG CAGCCAAGCT TAATTAGCTG
2251 AGCTTGGACT CCTGTTGATA GATCCAGTAA TGACCTCAGA ACTCCATCTG
                                ← DS178-

```

**pT7-7-PhxA-His (pau483 - pau488)**

```

1  GTGTCAGAGG  TTTTCACCGT  CATCACCGAA  ACGCGCGAGC  CCAGGCGATT

51  CGAACTTCTC  GATTTCGAACT  TCTGATAGAC  TTCGAAATTA  ATACGACTCA
    T7-Prom+  →
101 CTATAGGGAG  ACCACAACGG  TTTCCCTCTA  GAAATAATTT  TGTTTAACTT
      NdeI
151 TAAGAAGGAG  ATATACATAT  GCCAACTCTC  TCTTCTCCGA  CCATTATCAC
      M P T L S S P T I I T

201 CACTACTTCC  ATCCTCTCTA  ACAACCCTTT  TCTCCCCAAA  ACACCCCAAC
      T T S I L L N N P F L P K T P Q L

251 TTTCCGCTCA  TCACCACCGT  GGTGTTTCGAT  CTGTAAACGG  AAAAGTCTCG
      S A H H H R G V R S V N G K V S

301 TGCCAAACAA  AAAACAACAA  TGGTAACGAT  GACAATAACC  AATTTCAACT
      C Q T K N N N G N D D N N Q F Q L

351 CATTCAAAC  CCTAACACAA  ACACACCGTA  TTTATTAGAT  AGGAGAAATA
      I Q N P N T N T P Y L L D R R N I
      ← Bsu36I PhxA-Bsu36I+
401 TACTCCTTGG  TTTAGGTGGC  ATGTATGCTG  CCTTAGGAG  TGAGGGAGCT
      L L G L G G M Y A A L G S E G A

451 AATTACTATA  ATACCCTAGC  TGCCCCCATT  CTCCCTGACG  TGGAAAAATG
      N Y Y N T L A A P I L P D V E K C

501 TACCCTGAGT  GACGCCCTAT  GGGACGGGTC  AGTTGGTGAT  CATTGCTGCC
      T L S D A L W D G S V G D H C C P

551 CTCCACCCTT  CGATCTCAAC  ATAACGAAAG  ATTTTCGAGTT  TAAGAACTAT
      P P F D L N I T K D F E F K N Y

601 CATAACCACG  TGAAGAAGGT  TCGGCGTCCA  GCACACAAAG  CCTACGAGGA
      H N H V K K V R R P A H K A Y E D

651 CCAAGAATGG  CTAATGATT  ATAAAAGAGC  AATTGCCATA  ATGAAGTCAC
      Q E W L N D Y K R A I A I M K S L

701 TCCCAATGAG  CGACCCTCGC  AGCCACATGC  AACAAGCTAG  GGTACATTGT
      P M S D P R S H M Q Q A R V H C
      PhxA-Seq2- →
751 GCTTATTGTG  ATGGATCTTA  TCCGGTACTC  GGTCACAATG  ATACTCGACT
      A Y C D G S Y P V L G H N D T R L

801 TGAGGTCCAC  GCTAGTTGGT  TATTCCCTTC  TTTCCATAGA  TGGTATCTCT
      E V H A S W L F P S F H R W Y L Y

851 ATTTCTACGA  GAGGATCCTT  GGGAAGTTGA  TCAACAAACC  TGATTTCGCC
      F Y E R I L G K L I N K P D F A

901 TTGCCTTACT  GGAATTGGGA  TCATCGTGAT  GGGATGCGTA  TCCCTGAGAT
      L P Y W N W D H R D G M R I P E I

951 ATTCAAAGAA  ATGGATTCTC  CCCTCTTGA  TCCTAACCGG  AATACAAACC
      F K E M D S P L F D P N R N T N H

1001 ACCTTGACAA  GATGATGAAT  TTGTCGTTG  TATCCGACGA  GGAAGGTCC
      L D K M M N L S F V S D E E G S

1051 GATGTCAATG  AAGATGATCA  ATACGAAGAA  AACATATTGC  TTATGCGTAA
      D V N E D D Q Y E E N I L L M R K

1101 GGCGATGGTG  TACCCGAGTG  TTTCCGACGA  TCCAAACAAG  GCTGAGCTCT
      A M V Y P S V S D D P N K A E L F

```

```

1151 TCTTAGGGAG TCCGTACCGT GCAGGAGACA AAATGGAGGG GGATGTAAGT
      L G S P Y R A G D K M E G D V S

1201 GGTGCTGGGA TTCTTGAGCG TATGCCTCAC AACTCGGTCC ATGTATGGAC
      G A G I L E R M P H N S V H V W T

1251 CGGAAGTAAT ACTATTAAGG GTAATCAAGA CATGGGTGCC TTCTGGTCTG
      G S N T I K G N Q D M G A F W S A

1301 CTGGACGTGA CCCTTTGTTT TATTGTCATC ACTCTAATGT AGATAGAATG
      G R D P L F Y C H H S N V D R M

1351 TGGAGTCTTT GGACTGACGT TCTCCATGGG GGTAACCTCC CTAAGACGCC
      W S L W T D V L H G G N F P K T P

1401 TGAATACGAT GATTATCGAA ATGCGTATTT CTACTTCTAC GATGAAAACG
      E Y D D Y R N A Y F Y F Y D E N A

1451 CTAACCCTGT AAGGGTTTAT GTCAGGGATA GTTTCGACAC GGAGAGACTC
      N P V R V Y V R D S F D T E R L

1501 GGGTACAAGT ACGAAGATCA GGAAC TGCCA TGGATGTCAA T TACTCAACA
      G Y K Y E D Q E L P W M S I T Q Q

1551 ACAACAACAA CAACAACGAC AACAACAACG ACAACCGCTG CTGGGGGGAC
      Q Q Q Q Q R Q Q Q R Q P L L G G R

1601 GACTCAAGAC GAGAACGTTT TCTCTAGTTA AAAAGGTTTT AACGGAATTA
      L K T R T F S L V K K V L T E L

1651 AAGGTGATGC TCCCTTTGCC CT TAAAGTAC TCGGTCATAA AAACGAAGGT
      K V M L P L P L K Y S V I K T K V
                                     ← PhxA-Seq1+

1701 CGATAGGCCT AAAAAAGTCTA GAACAAAGGA AGACAAGCTG GAACATGAGG
      D R P K K S R T K E D K L E H E E

1751 AGGTTCTTGT TATAAATTTT AAATTAGGAA AGTCAAAGGA TTTTATCAAG
      V L V I N F K L G K S K D F I K

1801 TTTGATGTTT ATATCAATGA TGGAAGTATG TATAAACCCG AGGATAAGAC
      F D V Y I N D G T D Y K P E D K T

1851 TAAATCAAT CTTGAGTATG CTGGAAGTTT CACCAGCTTA ACCCATGGTG
      K I N L E Y A G S F T S L T H G G

1901 GAGGTGGAGG TGGAGGTGAC ATGAGCCACA TGGCAGAGGA GGATATGGGT
      G G G G G D M S H M A E E D M G
PhxA-EcoNI+ →

1951 AAGAACACTG TCCTCAAGTT GGCATTGAAC CAGCTCCTTG AAGACCTTGA
      K N T V L K L A L N Q L L E D L D
                                     EcoNI

2001 TGCCACCGAC GACGACTCTA TTCAGGTCAC TATTGTCCTT AAATCAGGAA
      A T D D D S I Q V T I V P K S G T
                                     ApaI-His+ →

2051 CGGACTCCAT AGTTATCACT GGTATCGGGC CTCACCATCA CCATCACCAT
      D S I V I T G I G P H H H H H H
ApaI

2101 GGGCCCGAGT GAAGTATTTT ATTTCTTAAT TGGGTCAACG TATTAATAAT
      G P E STOP

2151 ACTACTCCG TAATACGGAT CGAGTATTAG CAAGTAATGT GCTTCATTTT

2201 ATGTGTATGG TTTTCTTGCA TTATTTATGA TCAACATGTT ACAAATTTCC
                                     PstI HindIII

2251 CTTTTATATT ACTGATTGAT TTAGCGACCG CGAATTCCTG CAGCCG AAGCT

```