

Proteinexpression in *Streptomyces lividans*:
Untersuchungen zur Beeinflussung von Sekretion
und Faltung von Proteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften



vorgelegt beim Fachbereich 14
– Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften –
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Karen Geßner
aus Großburgwedel

Frankfurt 2003

*Ausnahmen sind nicht immer Bestätigung
der alten Regel; sie können auch Vorboten
einer neuen sein.*

Marie von Ebner-Eschenbach

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis März 2002 am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Joachim W. Engels angefertigt.

Prof. J. W. Engels danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und die gewährte akademische Freiheit, die eine sehr variantenreiche Forschung ermöglicht hat. Durch die vielen kritischen und anregenden wissenschaftlichen Diskussionen hat er stets Einfluss auf die Gestaltung dieser Arbeit genommen.

Prof. Bernd Ludwig danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts danken, die direkt oder indirekt auf diese Arbeit Einfluss genommen haben:

- Dr. Mireille Gastmans für den fruchtbaren interkulturellen Wissenschaftsaustausch und die immer tolle Stimmung in unserem „Aussichtslabor“,
- dem gesamten BioSpring-Team für fortwährende Diskussionen, gemeinsames Brainstorming und die konstruktive Arbeitsatmosphäre abends und an Wochenenden,
- Bingyuan Wu und Itamar Goren für die gute Zusammenarbeit im EU-Projekt und ihre stete Diskussionsbereitschaft bei „biologischen“ Fragestellungen,
- Holger Steinlechner für seine Geduld bei Computerproblemen,
- Kerstin Jahn-Hofmann und Beate Conrady für die Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden,
- Beate Conrady für ihre Unterstützung bei HPLC-Trennungen und der CE-Analytik,
- Hannelore Brill und Illona Prieß für ihre Geduld bei den zahlreichen MALDI- und ESI-Messungen,
- Susann Rosmus für die kritische Durchsicht von Teilen dieser Arbeit.

Allen hier genannten und auch den nicht namentlich erwähnten Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die freundliche Atmosphäre im Arbeitskreis.

aa	Aminosäuresequenz
abs.	absolut (Reinheitsgrad)
A. dem.	demineralisiertes Wasser
A. dest.	entmineralisiertes Wasser (Milli Q-entmineralisiert)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AT	anti-Thrombin
ATP	Adenosintriphosphat
Axe A	Acetylxylan Esterase A
β-ME	β-Mercaptoethanol
b	Base
BIS	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
Cel B	Cellulase B
Chi C	Chitinase C
cm	Zentimeter
CPG	controlled pore glass
Da	Dalton
dNTP	desoxy-Nukleinsäuretriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E°'	Standard-Redoxpotential
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Electron Spray Ionisation
g	Gramm
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
GTE	Glukose, Tris, EDTA
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssig-Chromatografie
k	kilo
KOAc	Kaliumacetat
L	Liter
m	milli
μ	mikro
M	mol/L
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MeOH	Methanol
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
N	normal
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamid-adenindinukleotid-phosphorsäure

NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
NIH	National Institute of Health
NMR	magnetische Kernresonanz
OD	optische Dichte
ox	oxidiert
p	piko
PBS	“phosphate buffered saline”, NaCl in Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfid Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
pK _a	Säurekonstante
RBS	ribosomale Bindestelle
red	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Snp A	Small nuclear protease A
SP	Signalpeptid
SRP	signal recognition particle
SS	Signalsequenz
Tab.	Tabelle
TBE	Tris, Borat, EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
Tricin	N-tris-(Hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
Tsr	Thiostrepton
U	Unit
ÜNRK	Über-Nacht-Rollerkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
w/v	weight per volume

I	Einführung	1
<hr/>		
II	Theorie	3
<hr/>		
1	Streptomyceten	3
1.1	Phäno- und genotypische Besonderheiten	3
1.2	Voraussetzungen für die heterologe Proteinexpression in Streptomyceten	6
1.2.1	Klonierungssysteme	6
1.2.2	Promotoren	7
1.2.3	Translationsstart	8
1.2.4	Terminatoren	10
1.2.5	Signalpeptide	10
1.2.6	Codonverteilung	13
1.3	Beispiele erfolgreicher heterologer Proteinexpressionen	17
1.4	Engpässe bei der heterologen Proteinexpression in Streptomyceten	18
2	Proteinexport in Bakterien	19
2.1	Die Wege zur Membran	20
2.1.1	In <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.2	In Gram-positiven Bakterien	24
2.1.3	Welcher Weg wird bevorzugt?	26
2.2	Die Wege durch die Membran	26
2.2.2	In <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.2	In Gram-positiven Bakterien	27
2.3	Postsekretorische Änderungen	28
3	Proteinfaltung	30
3.1	Chaperone	31
3.2	Oxidoreduktasen	32
3.3	Niedermolekulare Thiole	38
4	Proteine	41
4.1	Tendamistat	41
4.2	Hirudin	43
4.2.1	Pharmazeutische Eigenschaften	45
4.2.2	Faltung	49
4.3	Thioredoxin	53
III	Aufgabenstellung für die vorliegende Arbeit	55
<hr/>		
IV	In vitro-Rückfaltungen von Hirudin	56
<hr/>		
1	Rückfaltung bei verschiedenen pH-Werten	57
2	Rückfaltung mit Glutathion	62
3	Rückfaltung mit anderen Thiolen	64
4	Oligomerbildung	68

5	Trennung der nicht-nativen Hirudin-Konformere	69
6	Rückfaltung mit Thioredoxin	75
6.1	Analytik über Nativgele	75
6.2	CE-Analytik	81
7	Zusammenfassung	84
V Expression von Hirudin		86
<hr/>		
1	Expression von Hirudin unter Zusatz von Glutathion	86
2	Coexpression von Thioredoxin	92
2.1	Konstruktion der Vektoren	93
2.1.1	Thioredoxin-Konstrukt	93
2.1.2	Bicistronisches Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt	94
2.2	Expression von Thioredoxin	96
2.3	Coexpression Hirudin/Thioredoxin	98
3	Expression über integrative Vektoren	103
3.1	Konstruktion der Vektoren	103
3.2	Expression	105
3.2.1	Expression von Hirudin	106
3.2.2	Expression von Thioredoxin	107
4	Variation des CXXC-Motifs in Thioredoxin	108
4.1	Konstruktion der CXXC-Mutanten	109
4.2	Expression der CXXC-Mutanten	110
5	Zusammenfassung	112
VI Vergleichende Expressionen mit verschiedenen Signalpeptiden		114
<hr/>		
1	Auswahl der eingesetzten Signalpeptide	114
2	Konstruktion der Vektoren	119
2.1	Tendamistat-Konstrukte	120
2.2	Hirudin-Konstrukte	120
3	Expressionsvergleiche mit einem homologen Protein (Tendamistat)	123
3.1	Trockengewicht und Gesamtproteingehalt des Mediums	123
3.2	SDS-Gel und Aktivitätsbestimmung aus dem Medium	125
3.3	Untersuchungen der Zellextrakte	130
3.4	Massenanalytik des sekretierten Tendamisatats	134
4	Expressionsvergleiche mit einem heterologen Protein (Hirudin)	139
4.1	Trockengewicht	139
4.2	Nativgele und Aktivitätsbestimmung aus dem Medium	140
4.3	Massenanalytik des sekretierten Hirudins	145
5	Diskussion	148
5.1	Diskussion zur Expression	148
5.1.1	Ladung und Länge der n-Domäne	148
5.1.2	Unterschiede in der h-Domäne	151
5.1.3	Unterschiede in der c-Domäne	152

5.1.4 Codonverteilung	154
5.2 Diskussion zur Prozessierung	156
5.2.1 Schnittstellenberechnungen	156
5.2.2 Sekundärstrukturberechnungen	159
VII Zusammenfassung	164
<hr/>	
VIII Materialien und Methoden	168
<hr/>	
1 Geräte	168
2 Reinheit der eingesetzten Chemikalien und Enzyme	169
3 Bakterienstämme und Vektoren	171
4 Oligonukleotide	172
5 Flüssig- und Festmedien	174
6 Mikro- und Molekularbiologische Arbeiten	177
6.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	177
6.1.1 Anzucht	177
6.1.2 Stammhaltung	177
6.1.3 Über-Nacht-Rollerkultur	177
6.1.4 Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	177
6.1.5 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	178
6.1.6 DNA-Minipräparation (schnelle alkalische Lyse)	178
6.1.7 DNA-Minipräparation zur Gewinnung von Cosmid-DNA	179
6.1.8 DNA-Minipräparation	179
6.2 Arbeiten mit <i>Streptomyces lividans</i>	180
6.2.1 Stammhaltung	180
6.2.2 Herstellung einer Sporensuspension	180
6.2.3 Herstellung von Protoplasten	180
6.2.4 Transformation von <i>S. lividans</i>	181
6.2.5 Animpfen von Kulturen	182
6.2.6 Trockengewichtsbestimmung	183
6.2.7 Zellaufschluß	183
6.3 Arbeiten mit <i>S. lividans</i> und <i>E. coli</i>	184
6.3.1 Konjugativer Transfer von Plasmid-DNA von <i>E. coli</i> auf <i>S. lividans</i>	184
6.4 Arbeiten mit DNA allgemein	185
6.4.1 Konzentrationsbestimmung DNA	185
6.4.2 Restriktion von Plasmid-DNA	185
6.4.3 Kinasieren / Hybridisieren	186
6.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten	186

6.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	186
6.4.6	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen / Elektroelution	187
6.4.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit NucleoSpin Extrakt Kit	188
6.4.8	Polymerase-Kettenreaktion	188
6.4.9	Sequenzierungen	189
7	Proteinanalytische Arbeiten	189
7.1	Ent- und Rückfaltungsexperimente mit Hirudin	189
7.2	α -Amylase-Inhibitor-Plattentest	190
7.3	Tendamistat-Aktivitätstest mit α -Amylase und chrom. Substrat	190
7.4	Thrombinhemmtest zur Hirudin-Aktivitätsbestimmung	192
7.5	Gesamtprotein-Bestimmung nach Bradford	194
7.6	Fällen und Entsalzen von Proteinen aus Kulturüberstand	194
7.7	Nativgelelektrophorese	195
7.8	Nativgel nach der Methylenblau-Methode	196
7.9	SDS-Gele	197
7.10	Silberfärbung	198
7.11	Färbung mit Coomassie	199
7.12	HPLC-Methoden	199
7.13	CE-Methoden	199
7.14	Massenanalytik	199

Anhang 200

1	Literaturverzeichnis	200
2	Plasmidkarten	220
3	DNA-Sequenzen	226
4	Sequenzen der eingesetzten Signalpeptide	228
5	Signalsequenzen sekretorischer Proteine aus Streptomyceten	239
6	Strukturauswertungen	231
6.1	Signalpeptidase-Spaltstellen	231
6.2	Transmembran-Regionen der Signalpeptide	233
7	Verzeichnis aller Abbildungen und Tabellen	236

Lebenslauf 239

I Einleitung

Mit dem Voranschreiten der Biotechnologie werden heutzutage eine Vielzahl von therapeutisch bedeutsamen eukaryotischen Proteinen mit Hilfe der verschiedensten Organismen und Zelltypen gewonnen. Diese heterologe Produktion stellt eine bedeutende Alternative zur Isolierung der Proteine aus den natürlichen Quellen dar. Innerhalb der großen Variationsbreite der nutzbaren Organismen stellt *Escherichia coli* immer noch den am besten erforschten Zelltyp dar, der besonders leicht und mit wenig Aufwand manipuliert werden kann. Trotzdem führen Nachteile wie die Akkumulation der sekretierten Proteine als unlösliches Aggregat im Periplasma zu weiterführenden Problemen bei der Reinigung und Rückfaltung des Materials zu biologisch aktiven Substanzen. Genau diese Probleme können bei einem Einsatz von Grampositiven Bakterien umgangen werden, da sie die exprimierten Proteine direkt in das Wachstumsmedium sekretieren. Daraus resultiert in vielen Fällen eine native Faltung und somit eine erheblich leichtere Reinigung. Aufgrund dieses Vorteils wurde an dem Bodenbakterium *Streptomyces*, insbesondere *S. lividans*, innerhalb der letzten 15 Jahre intensiv geforscht. Neben der hohen Sekretionskapazität stellt die mittlerweile etablierte Fermentationstechnologie eine gute Grundlage für die Überexpression heterologer Proteine dar. Darüber hinaus sind Streptomyceten überwiegend nicht pathogen. Trotzdem sind Probleme bei der Überexpression in Streptomyceten oft nur durch vielfältige Untersuchungen zu beheben, da der Organismus, insbesondere der Sekretionsapparat, noch nicht ausreichend erforscht ist.

Im Theorieteil dieser Arbeit wird zunächst auf die Besonderheiten der Streptomyceten eingegangen. Besonders berücksichtigt werden dabei die Voraussetzungen der heterologen Expression und der Sekretionsapparat, dessen Komponenten noch nicht erschöpfend erforscht sind. Da die Thematik der Arbeit auch die Faltung eines der exprimierten Proteine umfaßt, wird kurz die Proteinfaltung allgemein angesprochen und nachfolgend die in dieser Arbeit behandelten Proteine vorgestellt.

Die Kapitel IV, V und VI beinhalten die drei behandelten, verschiedenen Arbeitsgebiete. Neben der Vorstellung der experimentellen Ergebnisse ist in jedem Kapitel die Diskussion der Ergebnisse integriert. In Kapitel VII erfolgt eine Zusammenfassung.

In Kapitel IV wird zunächst vorgestellt, in wie weit die *in vitro*-Bedingungen für eine Rückfaltung von Hirudin aus *Hirudo medicinalis* optimiert werden können. Dabei wird zwischen thiol-gestützter und enzymatisch beeinflusster Rückfaltung unterschieden.

Im folgenden Kapitel V werden die Ergebnisse der heterologen Expression von Hirudin vorgestellt. Bei der Expression wurde auf die Ergebnisse der Rückfaltungen zurückgegriffen und die Kultivierungen unter Zusatz von Glutathion und Coexpression einer Oxidoreduktase durchgeführt. Ebenso wurde der Einsatz eines integrativen Vektors für die Überexpression untersucht.

Der wichtigste Teil der Arbeit wird in Kapitel VI vorgestellt. Hier erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zur Expression des homologen Proteins Tendamistat (*S. tendae*) im Vergleich mit der des heterologen Hirudins. Beiden Proteinen wurden fünf verschiedene Signalpeptide vorangestellt, deren Auswirkungen auf Expression, Sekretion und Prozessierung vorgestellt und diskutiert werden.

II Theorie

1 Streptomyceten

1.1 Phäno- und genotypische Besonderheiten

Bei der Gattung *Streptomyces* handelt es sich um Gram-positive Bodenbakterien, die zu der Ordnung *Actinomycetales* gehören. Sie sind mit über 500 Arten weit verbreitet und verleihen dem Boden durch das Stoffwechselprodukt Geosmin (1,10-Dimethyl-9-decalol) den typischen Erdgeruch. Sie produzieren eine große Vielfalt von Sekundärmetaboliten, z.B. allein 60 % aller bekannten mikrobiell synthetisierten Antibiotika (Streptomycin, verschiedene Tetracycline und Anthracycline, Erythromycin und verschiedene Makrolide) [KIESER ET AL., 2000]. Viele Arten produzieren gleich mehrere Antibiotika, die über unterschiedliche Biosynthesewege aufgebaut werden; die Diversität der Antibiotika der einzelnen Stämme ist dabei immens. Der Grund für diese sehr hohe Produktivität ist noch nicht zufriedenstellend geklärt, es wird jedoch am häufigsten von einem Vorteil gegenüber konkurrierenden Organismen ausgegangen. Eine etwas differenziertere Idee ist die Ausschaltung von Konkurrenz im Stadium der Entwicklung des Luftmyzels [CHATER UND MERRICK, 1979]. Für diese Theorie sprechen die Versuche von WIENER (1996), in denen die Antibiotikaproduktion von Streptomyceten nur im Falle von bereits vorhandenen Kolonien gegen einen Zusatz von *Bacillus subtilis* erfolgreich war, jedoch nicht bei gleichzeitiger Entwicklung oder neben einer bereits bestehenden *Bacillus*-Population.

Zu den Sekundärmetaboliten zählen auch zahlreiche Pigmente. Der in unseren Studien eingesetzte Stamm *S. lividans* TK 24 entwickelt unter Lichteinfluss aromatische β -Carotinoide (KUBRASIK, 1999, pers. Mitteilung). Darüber hinaus sekretieren Streptomyceten eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, wie α -Amylasen, β -Galactosidasen, Agarasen, Cellulasen, Xylanasen, Esterasen, Proteasen, β -Lactamasen, Chitinasen, Lipasen sowie peptidische Inhibitoren für verschiedene Enzyme (Literatur hierzu findet sich in der Zusammenstellung der Streptomyceten-Signalsequenzen im Anhang).

Streptomyceten weisen einen für Bakterien sehr komplexen Lebenszyklus auf. Von Sporen ausgehend entwickelt sich ein Substratmycel, welches sich unter Nährstoff-

mangel zu einem Luftmycel differenziert. An den Enden der Lufthyphen entstehen artspezifisch verschiedenartig geformte Sporophoren, von denen die der Verbreitung dienenden Kondiosporen abgeschnürt werden. Auf Festmedien bilden Streptomyceten feste Kolonien mit einer gefalteten Oberflächenstruktur (Abb. II-1). In Flüssigmedien wachsen sie in Form von Mycelklumpen, die zwischen 0,5 mm und 0,5 cm groß werden.

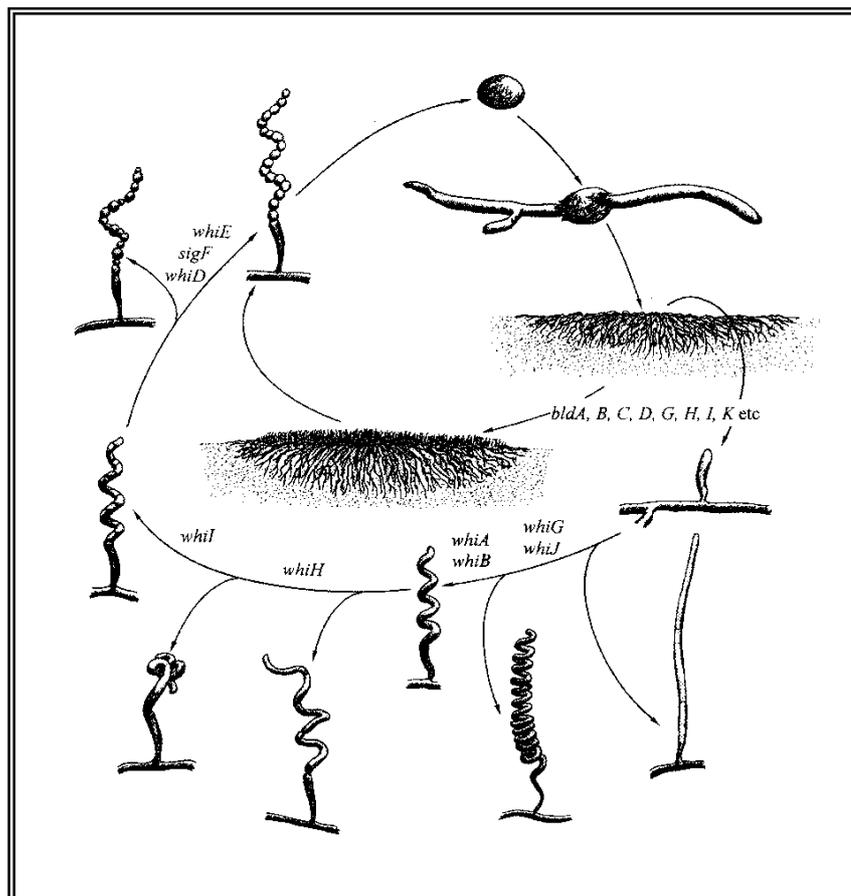


Abb. II-1 *Komplexität des Lebenszyklus von Streptomyceten am Beispiel von S. coelicolor A3(2) (übernommen von KIESER ET AL., 2000). Eine Spore bildet ein oder zwei Keime, die unter Verzweigung das Substratmyzel bilden. Nach einigen Tagen entstehen unter Einfluß der bld-Gene Lufthyphen, die etliche Kopien des Genoms enthalten. Die whi-Regulatorgene sorgen für Wandverdickung und Abschnürung zu Sporen mit je einer Genkopie. Die Seitenwege in der Abbildung zeigen Endstadien von verschiedenen knock-out-Mutanten.*

Streptomyceten sind überwiegend nicht pathogen. Einzige Ausnahme in dieser Hinsicht ist der Vertreter *S. somaliensis*. Einige andere Stämme wie z.B. *S. scabies*, *S. acidiscabies*, *S. ipomoeae*, *S. parvulus* und *S. sparsogenes* sind Pflanzenpatho-

gene [KENNEDY UND ALCORN, 1980; BLANCHETTE ET AL., 1981a,b; LORIA ET AL., 1997].

Die Wachstumsrate von Streptomycceten ist im Vergleich zum am besten untersuchten Gram-negativen Bakterium *Escherichia coli* erheblich niedriger, die vorgefundenen Nährstoffe werden jedoch wesentlich effektiver genutzt. Ökologisch gesehen beruht die Selektionsstrategie von *E. coli* auf einer Maximierung der Produktionsrate, die der Streptomycceten auf einer Maximierung der Nutzbarmachung des Nahrungsangebotes. Diese Tatsache könnte eine Grundlage für die Entwicklung des sehr großen Genoms sein. Die Größe des Gesamtgenoms von *S. coelicolor* A3(2) beträgt z. B. 8,7 Mb und ist damit fast doppelt so groß wie das Genom anderer gut untersuchter Bakterien [BENTLEY ET AL., 2002]. *E. coli* oder *Bacillus subtilis* (Gram-positiv) erreichen eine Gesamtgröße von 4-5 Mb. Damit zählen Streptomycceten zu den Bakterien mit den größten Genomen und es könnte möglich sein, dass bei dieser Größe die Grenze des DNA-Gehaltes in Organismen mit einem einzelnen Replikationsstart erreicht ist [DHARMALINGAM UND CULLUM, 1996].

Streptomycceten besitzen ein lineares Chromosom [CHEN, 1996; KOLSTØ, 1997]. Jede Spore enthält nur eine Kopie des Genoms, der GC-Gehalt ist mit ca. 72 % sehr hoch. Am 5'-Ende der linearen DNA befinden sich kovalent gebundene Proteine [PANDZA ET AL., 1997]. Die Replikation erfolgt in zwei Richtungen, da der Replikationsstart in der Mitte des Chromosoms lokalisiert ist [ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA UND SCHREMPF, 1992; MUSIALOWSKI ET AL., 1994]. Die DNA-Sequenz des einen Endes des Chromosoms ist invers am anderen Ende wiederholt. Diese in „terminal inverted repeats“ vorliegenden Sequenzen sind zwischen 24 und 550 kb groß [LEZHAVA ET AL., 1995; PANDZA ET AL., 1997]. In *S. lividans* befindet sich kein funktionell wichtiges Gen in der Region der endständigen 300, bzw. 800 Kilobasen. Diese genetisch ruhenden Regionen finden sich auch in anderen Streptomyccetenchromosomen. Allgemein ist das Chromosom von Streptomycceten sehr instabil. 0,1 % der Sporen weisen spontane Mutationen auf. Über Pulsfeld-Gelelektrophorese konnte an *S. ambofaciens* gezeigt werden, dass bis zu 2 Mb große Deletionen auftreten können [LEBLOND UND DECARIS, 1994]. Die meisten Mutationen betreffen dabei die Enden des Chromosoms. Treten Deletionen an beiden Telomeren auf, kann das Chromosom durch Rekombination zum Ring geschlossen werden. Eine Replikation des zirkulären Chromosoms ist dabei weiterhin möglich. In *S. ambofaciens* konnten auch große

interne Deletionen festgestellt werden [FISCHER ET AL., 1997]. Darüber hinaus finden eine Vielzahl von kleineren Mutationen statt. So konnten z.B. für 99 % der *S. rimosus* Mutanten, die eine veränderte Sporulation, Pigmentierung oder Oxytetracyclin-Produktion aufwiesen, keine gravierenden DNA-Neuanordnungen festgestellt werden [GRAVIUS ET AL., 1993].

Die meisten Bakterien besitzen ein ringförmiges Chromosom. Streptomyceten dagegen weisen ein lineares auf, das vielfach anfälliger in Bezug auf Mutationen ist. Wird das Chromosom zum Ring geschlossen, ist es durch fehlende Replikations-terminatoren noch instabiler. Trotzdem ist diese Strategie in der Evolution der Streptomyceten erhalten geblieben. VOLFF UND ALTENBUCHNER (1998) weisen darauf hin, dass bei Streptomyceten wahrscheinlich eine häufige Kombination der Chromosomen auftritt, in der ein lineares Chromosom homolog rekombinieren kann. Genetische Informationen (z.B. Antibiotika-Biosynthesewege) von linearen Chromosomen können so leichter in andere Spezies transferiert werden. Die durch die Instabilität auftretenden Deletionen und Amplifikationen können darüber hinaus die Genexpression und Reorganisation von Genabschnitten verändern. So hatte die genetische Instabilität ein enormes Potential, die große Diversität an Stämmen und Sekundärmetaboliten hervorzubringen, wie sie heute beobachtet werden kann. Sie ist wahrscheinlich eine gut funktionierende Strategie zur Anpassung an eine sich verändernde Umwelt.

1.2 Voraussetzungen für die heterologe Proteinexpression in Streptomyceten

1.2.1 Klonierungssysteme

S. coelicolor A3(2) ist zwar der auf genetischer Basis am besten untersuchte Streptomyceten-Stamm, für die heterologe Expression wird jedoch hauptsächlich *S. lividans* 66 eingesetzt. Die Zellen dieses Stammes lassen sich besonders gut protoplastieren, darüber hinaus fehlt eine Restriktionsbarriere [GUSEK UND KINSELLA, 1992]. Zusätzlich wird die Gewinnung von sekretierten Proteinen sehr erleichtert, weil *S. lividans* sehr wenig Proteasen sekretiert [HENDERSON ET AL., 1987; ARETZ ET AL., 1989]. Tatsächlich

werden kaum andere Stämme als *S. lividans* für eine heterologe Proteinexpression benutzt. Nur wenige Arbeiten beschäftigen sich mit einem Vergleich der Expressionshöhen ein und desselben Proteins in verschiedenen Streptomyceten-Stämmen [GILBERT ET AL., 1995].

Für die Klonierung von Expressionskassetten stehen grundsätzlich selbstreplizierende Plasmide und integrative Vektoren zur Verfügung. Die selbstreplizierenden Plasmide werden in low copy number Vektoren (z.B. die auf dem SLP1,2 Replikon basierenden) oder high copy number Vektoren (Plasmid pIJ101 und seine Derivate) eingeteilt. Eine aktuelle Liste der Plasmide und ihrer Charakteristika findet sich bei KIESER ET AL. (2000). Eines der bekanntesten Plasmide, pIJ702, ein Derivat von pIJ101, enthält ein Thiostrepton Resistenzgen und liegt in einer Höhe von 40 bis 300 Kopien pro Zelle vor. Dieses Plasmid ist in *S. lividans* stabil. Im Gegensatz dazu sind die aus pIJ101 entstandenen *E. coli/S. lividans* shuttle-Vektoren ohne Selektionsdruck nicht stabil. Eine Proteinexpression über in das Genom integrierte Gene kann auf einen Selektionsdruck verzichten. Integrative Plasmide enthalten das Integrasegen (*int*) und die attachment site (*attP*) von Streptomyceten-Phagen oder Plasmiden. Beispiele hierfür sind die integrativen Vektoren, die auf dem Phagen ϕ C31, dem *S. venezuelae* ETH 14630-Phagen VWB [VAN MELLAERT ET AL., 1998] oder dem Plasmid pSAM2 (*S. ambofaciens*) [KUHSTOSS ET AL., 1991] basieren.

1.2.2 Promotoren

Die Promotorsequenzen in Streptomyceten weisen eine sehr große Heterogenität auf. STROHL (1992) und BOURN UND BABB (1995) haben eine große Anzahl von Sequenzen identifiziert und zusammengetragen. Aus der großen Heterogenität wird auf eine Vielzahl von σ -Faktoren und somit auf RNA Polymerase Holoenzymen geschlossen, die speziell regulierte Promotoren erkennen. Ein Teil der Sequenzen ist ähnlich zu denen, die von σ -Faktoren von *E. coli* (σ^{70}) und *B. subtilis* (σ^A) gebunden werden. Sie werden in *S. coelicolor* wahrscheinlich von σ^{hrdB} erkannt und in anderen Streptomyceten von verwandten σ -Faktoren. Andere Promotoren in Streptomyceten weisen nicht die typisch konservierten -10 und -35 Regionen auf.

Um so viel Protein wie möglich zu produzieren, wird üblicherweise auf zwei verschiedene Strategien zurückgegriffen. Für eine Überexpression von homologen Genen wird meist der native Promotor am Gen belassen. Bei einer Expression von heterologen Genen werden vielfach starke Promotoren eingesetzt. Zu nennen sind hier die Promotoren *aph* (Aminoglycosid Phosphotransferasegen aus *S. fradiae*), *ermEup* (Erythromycin Resistenzgen, verändert, aus *Saccharopolyspora erythrea*), *still* (Subtilisin/Trypsin Inhibitor aus *S. longisporus*) und *β-gal* (β-Galactosidase aus *S. lividans*). Interessant sind darüber hinaus induzierbare Promotoren. Sie entstammen meist den Antibiotika-Synthesegenen, die spät in der Wachstumsphase aktiviert werden. Der *tipA* Promotor (induziert durch Thiostrepton) wurde erfolgreich eingesetzt für die Produktion von sowohl homologen als auch heterologen Genen.

Vergleiche von Promotoren in ihrer Wirkung auf die Expression von verschiedenen heterologen Genen sind bisher kaum veröffentlicht. Die Ausbeute des Tumor Nekrose Faktors α konnte durch den Wechsel des *aph* Promotors zum *ermEup* Promotor vervierfacht werden (CHANG UND CHANG, 1988). Die α -Amylase-Produktion (homolog) wurde durch den Austausch des eigenen durch den *saf* Promotor versechzehnfacht (VIGAL ET AL., 1991). Bei der homologen Expression des α -Amylase-Inhibitors Tendamistat in *S. lividans* konnte durch einen Austausch des eigenen gegen den *aph* Promotor keine höhere Expression erzielt werden. Durch Substitution mit dem *mel* Promotor wurde eine Steigerung um den Faktor 4 erreicht, bei Einsatz des *ermEup* Promotors sogar um den Faktor 10 [FAß, 1994; FAß UND ENGELS, 1996]. Mit dem *still* Promotor gelangen FORNWALD ET AL. (1993) eine fünfzigmal höhere Expression eines CD4-Derivates als mit dem *β-gal* Promotor.

1.2.3 Translationsstart

Für eine hohe Produktionsrate muß auch ein effizienter Translationsstart gegeben sein. Die Shine-Dalgarno(SD)-Sequenzen der Ribosomalen Bindestellen (RBS) liegen normalerweise 5-9 Nukleotide vor dem Startcodon und weisen eine Komplementarität zu den 3'-Enden der 16S rRNA auf. STROHL (1992) untersuchte viele RBS von Streptomyceten und stellte fest, dass der komplementäre Bereich 3 bis 7

Nukleotide umfassen kann. Die konservierteste Sequenz ist dabei (a/g)-G-G-A-G-G. Die Komplementarität der SD-Sequenz zur 16S rRNA muß aber für eine effiziente Expression nicht sehr hoch sein. Das zeigte sich in der Möglichkeit, *E. coli*-Gene mit gering übereinstimmender SD-Sequenz (z.B. *ampC*) in Streptomyceten zu exprimieren. Auch SD-Sequenzen mit nur drei komplementären Nukleotiden werden zum Starten der Translation akzeptiert. Der Abstand der Shine-Dalgarno-Sequenzen zum Startcodon beträgt 5 bis 12 Nukleotide, bei *E. coli* beträgt dieser Abstand 5 bis 9 und bei *B. subtilis* 7 bis 14 Nukleotide. Bei 11 von 44 untersuchten Sequenzen konnten keine SD-Sequenzen vor oder bis 20 Nukleotide nach dem Startcodon identifiziert werden. Trotzdem werden diese Gene (z.B. *aphI* aus *S. fradiae*, JANSSEN ET AL., 1989) stark exprimiert.

Als Startcodon fungiert, wie in anderen Bakterien auch, am häufigsten AUG (61%, *S. coelicolor*), darüber hinaus GUG (36%) und UUG (3%). Bei *E. coli* ist die Verteilung allerdings signifikanter: AUG ist zu 97% Startcodon, UUG zu 3% [KIESER ET AL., 2000]. Ist in Streptomyceten das UUG-Codon als Startsignal vorhanden, wird eine Reduktion der Expression beobachtet. Bei der Xylanase A-Produktion wurde eine Steigerung von 10 % durch den Austausch von UUG gegen AUG im eingesetzten Cellulase A-Signalpeptid erreicht [PAGÉ ET AL., 1996].

Viele Streptomycetengene besitzen in ihren Signalsequenzen ein zweites Startcodon, dem auch eine zusätzliche Ribosomale Bindestelle vorangestellt ist. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein einer zweiten RBS die Expressionshöhe steigern kann. Die Signalpeptide der Cellulase A und Mannase aus *S. lividans* enthalten zwei RBS und Startcodons. Werden die Sequenzen so verkürzt, dass nur noch eine RBS und ein zugehöriges Startcodon vorhanden ist, resultieren funktionsfähige Signalpeptide, die aber eine verringerte Expression bewirken [PAGÉ ET AL., 1996]. Eine Steigerung der Proteinproduktion kann allerdings nur erreicht werden, wenn der Abstand der beiden Startcodons groß genug ist. Im Signalpeptid des Subtilisin Inhibitors sind die beiden Startcodons nur 6 Nukleotide voneinander entfernt. Eine Mutation des inneren Startcodons zeigte keine Verschlechterung der Expression [TAGUCHI ET AL., 1991]. Da ein Ribosom 30 - 40 Nukleotide abdeckt, also auf jeder Seite 15 - 20 Nukleotide, ist hier der Abstand von 6 Nukleotiden zu gering, um gleichzeitig zwei Ribosomen an der mRNA anzulagern.

Eine erhöhte Expression durch eine Verdoppelung der Translation ist dann nicht möglich.

1.2.4 Terminatoren

Transkriptionsterminatoren von Streptomyceten sind mit denen anderer Bakterien vergleichbar. Sie enthalten lange „inverted repeats“, die Haarnadel-Strukturen ausbilden können. Sie ähneln den *rho*-unabhängigen Terminatoren von *E. coli*, besitzen allerdings nicht die für *E. coli* typischen langen Thymidin-reichen Sequenzen. Die Terminatorsequenz stabilisiert die RNA und führt theoretisch auch zu höheren Proteinausbeuten, wie PULIDO und JIMÉNEZ (1987) zeigen konnten. Die Insertion des *aph*-Terminators hinter das Gen des humanen Interferon $\alpha 2$ ergab in *S. lividans* eine viermal höhere Proteinexpression. In Bezug auf die Tendamistat-Produktion in *S. lividans* konnte dem *aph*-Terminator kein positiver Effekt bescheinigt werden [SCHMITT-JOHN UND ENGELS, 1992]. Ebenfalls in *S. lividans* wurde bei der Produktion von heterologen Peptiden als Fusionsproteine mit SSI (*Streptomyces* Subtilisin Inhibitor) eine der beiden Terminatorsequenzen entfernt. Die Ausbeuten der Fusionsproteine konnten hierdurch gesteigert werden [TAGUCHI ET AL, 1993; UEDA ET AL, 1993]. Der Einfluß der Terminatorsequenzen scheint ganz unterschiedlich zu sein und sollte in jedem Expressionssystem neu getestet werden.

1.2.5 Signalpeptide

Schon teilweise vor über zwei Jahrzehnten wurden biophysikalische Eigenschaften der Signalpeptide (zumeist in *E. coli*) bestimmt und in den Zusammenhang mit Translokation und Faltung der Proteine gebracht.

Signalpeptide sekretorischer Proteine weisen im Allgemeinen gleiche Strukturmerkmale auf. Sie werden in drei Bereiche geteilt, die durch unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen charakterisiert sind. Die N-terminale Region besitzt eine positive Nettoladung und verbleibt bei der Insertion des Signalpeptids in die Membran im Cytoplasma. Der stark hydrophobe Zentralbereich integriert in die

Membran. Der C-terminale Bereich trägt eine Erkennungs- und Schnittstelle für Signalpeptidasen. In der Länge und der Aminosäurezusammensetzung der Teilbereiche gibt es allerdings große spezies-spezifische Variationen. So weisen z.B. Signalpeptide Gram-positiver Bakterien eine mittlere Gesamtlänge von 29-31 Aminosäuren auf, die Signalpeptide aus *E. coli* (24,1 AS), aus Pflanzen (23,9 AS) oder die des Menschen (22,5 AS) sind erheblich kürzer. Signalpeptide aus Streptomyceten heben sich auch von den Gram-positiven Bakterien durch eine noch größere mittlere Länge von 35 AS ab [GILBERT ET AL., 1995].

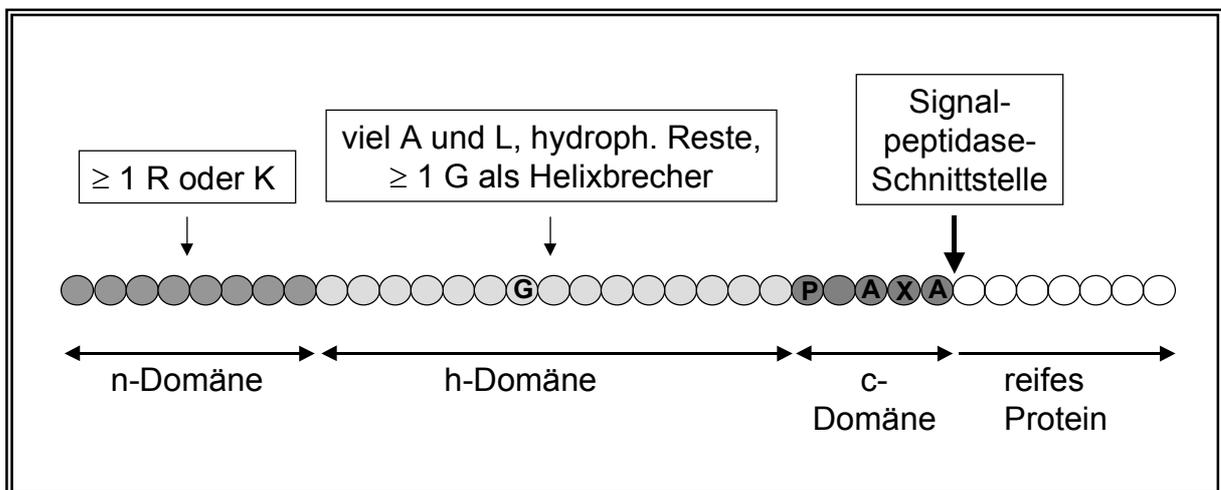


Abb. II-2 Schematischer Aufbau eines Signalpeptids sekr. Proteine (nach PUGSLEY, 1993)

Die n-Domäne (N-terminaler Bereich des Signalpeptids) beinhaltet eine hohe Konzentration an positiver Ladung, die für eine optimale Prozessierung und Translokation erforderlich ist. Im Exportweg über den Sec-Apparat unterstützen Signalpeptide die Translokation, indem sie eine vorzeitige Faltung des reifen Proteinanteils verzögern [LAMINET UND PLÜCKTHUHN, 1989]. Nur ein ungefaltetes Vorläuferprotein kann durch Chaperone weiter stabilisiert werden. Das sekretionsspezifische Chaperon SecB aus *E. coli* erkennt die stark positive Ladung am N-terminalen Bereich des Signalpeptids und kann mit ihm wechselwirken [RANDALL, 1992]. Die Funktion der positiven Ladung kann auch über die Orientierung bei der Membraninsertion erklärt werden, wobei die positive Ladung an der inneren Seite der Membran verbleibt („positiv-innen“-Regel) [NILSSON UND VON HEIJNE, 1990]. Die n-

Domänen menschlicher Signalpeptide und die aus Hefe und aus Pflanzen sind nur vier bis fünf AS kurz, die Ladung ist mit durchschnittlich +0,8 sehr gering. In *E. coli* besteht dieser Bereich aus gemittelt 5,5 AS mit einer Ladung von +2. Der N-terminale Bereich in Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus* und *Staphylococcus* ist deutlich länger (7 bis 8 AS) und weist eine höhere Ladung auf (+3, bzw. +2,8) [VON HEIJNE UND ABRAHMSÉN, 1989]. Hiervon heben sich die *Streptomyces*-Signalpeptide nochmals ab, denn die mittlere Länge mit 12 AS ist deutlich höher und die mittlere Ladung liegt bei +3,5. In Einzelfällen kann die Ladung des N-Terminus +7 betragen. Auch die Aminosäurezusammensetzung weist große Unterschiede zu anderen Organismen auf. In Streptomyceten liegt der Argininanteil bei 30%, Lysin dagegen trägt nur wenig zur positiven Ladung bei, da es mit nur 3% einen geringen Anteil hat. Die N-Region anderer Bakterien enthält dagegen zu 10% Arginin und 35% Lysin, bei eukaryotischen Signalpeptiden ebenfalls 10% Arginin, aber nur 10-20% Lysin. Dieser deutliche Unterschied liegt wahrscheinlich in dem hohen GC-Gehalt der Streptomyceten-DNA, wodurch die GC-reicheren Arginin- gegenüber den TA-reicheren Lysin-Codons bevorzugt wären.

Die h-Domäne ist der hydrophobe Kernbereich des Signalpeptids. Seine Struktureigenschaften sind ebenso wichtig für eine erfolgreiche Translokation wie die der n-Domäne. In *E. coli* wird die hydrophobe Region durch die methioninreiche Domäne der p54-Untereinheit des „signal recognition particles“ (SRP) erkannt und gebunden. In diesem Sinne fungieren Signalpeptide auch als Liganden des SRP-homologen Ffh/4.5S RNA-Ribonukleoproteins in *E. coli* [BERNSTEIN ET AL., 1993]. Der hydrophobe Kernbereich ist dafür verantwortlich, dass Signalpeptide in einer unpolaren Umgebung eine partiell alpha-helikale Struktur einnehmen [BATENBURG ET AL., 1988]. Desweiteren weist er eine hohe Affinität zu Lipiden auf und kann in Acylkettenregionen von Lipiddoppelschichten insertieren [MCKNIGHT ET AL., 1989, 1991]. Die Zentralregion muß eine gewisse Mindestlänge haben, unterhalb derer die Membran bei einer Insertion nicht mehr aufgespannt werden und die Signalpeptidase-Schnittstelle nicht mehr exponiert werden kann [KENDALL ET AL., 1986]. Änderungen in der Hydrophobizität und/oder der Sekundärstruktur können die Prozessierbarkeit des Vorläuferproteins beeinflussen. Für die Funktionsfähigkeit ist eher die Gesamt-Hydrophobizität als die AS-Zusammensetzung entscheidend [SCHATZ UND BECKWITH, 1990; DOUD ET AL., 1993]. Dennoch lassen sich deutliche Unterschiede in der AS-

Komposition einzelner Organismen erkennen. Der hydrophobe Bereich ist mit 12 AS beim Menschen und in *E. coli* wesentlich kürzer als die h-Domänen bei Gram-positiven Bakterien (15 und mehr AS). Die Bevorzugung von Alanin gegenüber Leucin ist bei Streptomyceten sehr ausgeprägt (Alanin: Eukaryoten (10%), Prokaryoten (10-30%); Leucin: Eukaryoten (40%), Prokaryoten (25-35%)), wodurch die Hydrophobizität etwas geringer ausfällt. Die Signalpeptide in Prokaryoten sind daher auch strukturell etwas flexibler, unterstützt durch das Auftreten von Glycinresten in der Mitte der h-Domäne. Glycin kann die helikale Struktur brechen und die Bildung einer Haarnadel-Struktur bewirken, die besonders gut in eine Membran insertieren kann.

Die c-Domäne ist der kurze C-terminale Bereich des Signalpeptids. Sie beginnt mit einer helix-brechenden Aminosäure (meist Prolin, oder auch Glycin) in Position -6 bis -4. Die β -Faltblattstruktur dieser Region unterstützt die Präsentation der Signalpeptidase-Spaltstelle zwischen Signalpeptid und reifem Proteinanteil. Dabei folgt die Aminosäurekomposition der (-1,-3)-Regel von VON HEIJNE (1984). Diese Positionen werden nur durch kleine Aminosäuren wie Alanin, Serin und Glycin besetzt, wohingegen in Position -2 ein breites Spektrum von AS toleriert wird. Die mittlere Länge der C-terminalen Region ist bei den Gram-positiven Bakterien im Vergleich zu allen anderen Organismen deutlich größer.

Obwohl die Struktur und eingeschränkt auch die Aminosäurekomposition bei fast allen Signalpeptiden vergleichbar ist, tritt so gut wie keine über einen größeren Bereich konservierte AS-Sequenz zwischen verschiedenen Signalpeptiden auf. Die große Varianz der Sequenzen erlaubt den Einsatz in verschiedenen Translokationswegen (siehe Kapitel II-2).

1.2.6 Codonverteilung

Die verschiedenen Aminosäuren werden durch 1 bis 6 verschiedene Codons in der RNA repräsentiert. Der Anteil der unterschiedlichen Codons ist dabei nicht gleich verteilt. Eine verschieden hohe Präferenz der einzelnen Codons konnte schon 1975 von FRIERS ET AL. durch eine Auswertung des Genoms von *E. coli* nachgewiesen

werden. Auch für andere Organismen wurden bald verschiedene Codonverteilungsmuster erkannt, z.B. für *Saccharomyces cerevisiae* [SHARP ET AL., 1986] und *Drosophila melanogaster* [SHIELDS ET AL., 1988]. Für viele Streptomyceten ist die Verteilung der Basen innerhalb der Codons heute ebenso bekannt. In *E. coli* sind die Zusammenhänge mit der Codonverteilung besonders gut untersucht. So konnte zunächst eine Korrelation zwischen der tRNA-Konzentration und den häufig vorkommenden Codons gezeigt werden [IKEMURA, 1981]. Des weiteren zeigte sich, dass hochexprimierte Gene ausschließlich Codons enthalten, die komplementär zu höher konzentriert vorliegender t-RNA sind [IKEMURA, 1985]. Bei niedrig exprimierten Genen sind dagegen andere Codon-Häufigkeiten festgestellt worden. An dieser Tatsache setzt die Evolutionstheorie an, wonach ein gering exprimiertes Gen unter einem geringen Selektionsdruck steht und daher wenig Mutationen aufweist. Stark exprimierte Gene und somit auch ihre Codons sind dagegen unter Selektionsdruck „optimiert“ [SHARP, 1986]. Im menschlichen Genom ist kein Zusammenhang zwischen Codonverteilung und Expressionshöhe verschiedener Gene festzustellen.

UUU	F	0,04	UCU	S	0,07	UAU	Y	0,10	UGU	C	0,09
UUC	F	2,85	UCC	S	2,22	UAC	Y	2,35	UGC	C	0,80
UUA	L	0,01	UCA	S	0,11	UAA	*	0,02	UGA	*	0,21
UUG	L	0,20	UCG	S	1,54	UAG	*	0,05	UGG	W	1,50
CUU	L	0,17	CCU	P	0,16	CAU	H	0,11	CGU	R	0,58
CUC	L	3,21	CCC	P	2,17	CAC	H	1,80	CGC	R	3,57
CUA	L	0,03	CCA	P	0,13	CAA	Q	0,14	CGA	R	0,25
CUG	L	5,44	CCG	P	3,03	CAG	Q	2,95	CGG	R	2,48
AUU	I	0,08	ACU	T	0,12	AAU	N	0,07	AGU	S	0,16
AUC	I	3,20	ACC	T	4,36	AAC	N	2,49	AGC	S	1,41
AUA	I	0,06	ACA	T	0,16	AAA	K	0,12	AGA	R	0,11
AUG	M	1,64	ACG	T	2,19	AAG	K	2,92	AGG	R	0,39
GUU	V	0,15	GCU	A	0,30	GAU	D	0,23	GGU	G	1,00
GUC	V	4,77	GCC	A	7,33	GAC	D	6,00	GGC	G	6,75
GUA	V	0,20	GCA	A	0,53	GAA	E	0,67	GGA	G	0,60
GUG	V	3,04	GCG	A	4,43	GAG	E	4,81	GGG	G	1,33

Tab. II-1 Codonverteilung in *Streptomyces lividans*. Zahlenangaben: prozentuales Vorkommen der jeweiligen Codons, bestimmt aus 63.114 Codons. * = Stop-Codon. Übernommen von: Kazusa DNA Research Institute, Japan; www.kazusa.or.jp

Es gibt auch noch weitere Gründe, die eine gleiche Verteilung der Codons ausschließen. WRIGHT UND BIBB (1992) verglichen das Codonverteilungsmuster von Streptomyceten-Genen. Die durch Sequenzierprojekte aktualisierten Ergebnisse finden sich in Tabelle II-2. *Streptomyces lividans* weist einen GC-Gehalt von 70,55% auf, wobei die Verteilung innerhalb des Codons sehr unterschiedlich ist (1. Base: 68,36%; 2. Base: 50,07%; 3. Base: 93,23% GC). Die fast ausschließliche Präsenz von G, bzw. C als dritte Base im Codon bewirkt eine sehr unterschiedliche Codonverteilung, in der die Codons mit A oder T an dritter Stelle eine sehr geringe Häufigkeit aufweisen.

Organismus	gesamt	1. Base	2. Base	3. Base
<i>Streptomyces lividans</i>	70,55	68,36	50,07	93,23
<i>Streptomyces coelicolor</i> A2(3)	72,38	72,73	51,36	93,06
<i>Streptomyces tendae</i>	71,39	71,02	49,08	94,05
<i>Streptomyces rochei</i>	72,44	72,61	51,72	92,97
<i>Streptomyces griseus</i>	71,77	72,10	51,76	91,46
<i>Streptomyces cacaoi</i>	73,12	71,77	54,28	93,29
<i>Escherichia coli</i>	51,11	58,33	40,96	54,31
<i>Bacillus subtilis</i>	44,35	52,39	36,02	44,65
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39,72	44,60	36,58	37,97
<i>Hirudo medicinalis</i>	50,13	53,25	41,81	55,34
<i>Homo sapiens</i>	52,51	56,04	42,35	59,13

Tab. II-2 GC-Gehalt in verschiedenen Organismen. Zahlenangaben: prozentualer Anteil von G und C innerhalb eines Codons, bzw. innerhalb einer Position im Codon. Aufgelistet nach: Kazusa DNA Research Institute, Japan; www.kazusa.or.jp

Da Streptomyceten einen extrem hohen GC-Gehalt in der DNA aufweisen, könnte das eine Expression von Genen anderer Organismen beeinflussen. Verschiedene Untersuchungen zur Verwendung von minder repräsentierten Codons in verschiedenen Streptomyceten Spezies zeigten gegensätzliche Ergebnisse [CHEN UND INOUE, 1990; ROSENBERG ET AL., 1993; LAMMERTYN ET AL., 1996]. So scheinen mehrere benachbarte Codons mit geringer Häufigkeit einen negativen Effekt auf die Genexpression zu haben, besonders wenn sie nahe des ATG-Startcodons liegen. LAMMERTYN (2000) fand aber, dass ein Austausch von 5 dieser Codons nahe der Startsequenz des mTNF-Gens eine starke Verminderung der Ausbeute ergab. UEDA

ET AL. (1993) fügten das sehr seltene Codon TTA^{Leu} im Gen des Subtilisin Inhibitors (SSI) aus *S. albogriseolus* ein und fanden eine Reduktion der SSI-Produktion. LAMMERTYN dagegen konnte bei einem Austausch von TTA^{Leu} gegen CTG^{Leu} im mTNF-Gen keine Änderung der Produktion feststellen.

Unter anderem zeigen diese Ergebnisse weitere Variablen im Zusammenhang von Codonverteilung und Expressionshöhe an. Nicht nur die Verfügbarkeit der tRNA-Moleküle spielt eine Rolle. Durch einen Austausch von Codons wird die mRNA verändert, was sich auf die Sekundärstruktur und somit die Stabilität auswirken kann. So führt auch LAMMERTYN eine geringere Stabilität der mRNA (identifiziert über die mRNA-Menge im Northern Blot) als Grund für geringere Expression an. Allgemein ist die Verknüpfung von mRNA-Gehalt und Expressionshöhe aber fraglich. So konnten ANDERSON UND SEILHAMMER (1997) zeigen, dass der Korrelationsfaktor zwischen mRNA-Menge und Proteinexpression nur bei 0,48 liegt. Eine Steigerung der Proteinexpression konnte nicht mit dem mRNA-Gehalt in Zusammenhang gebracht werden.

1.3 Beispiele erfolgreicher heterologer Proteinexpressionen

Protein	Organismus	Promo-ter	Signal-sequ. ^a	Aus-beute ^b	Sekr.	Referenz
HuTNF α	human	<i>ermE-up</i>	<i>melC1</i>	20	nb	CHANG & CHANG, 1988
HuIFN- α 1	human	<i>sak</i>	<i>sak</i>	1-2 x 10 ⁵ U/mL	>90%	NOACK ET AL., 1988
HuIL-1 β	human	<i>β-gal</i>	<i>β-gal</i>	3,8 x 10 ⁶ U/mL	98%	LICHENSTEIN ET AL., 1988
Thaumatococcoside	<i>Thaumatococcus daniella</i>	<i>β-gal</i>	<i>β-gal</i>	0,2	100%	ILLINGWORTH ET AL., 1989
Proinsulin	<i>Macaca fascicularis</i>	AI	AI	20-100	100%	KOLLER ET AL., 1989
Hirudin	<i>Hirudo medicinalis</i>	AI	AI	0,2-0,5	100%	BENDER ET AL., 1990a
HuIL-2	human	AI	AI	0,03	5%	BENDER ET AL., 1990b
Apidaecin	<i>Apis mellifera</i>	<i>ssi</i>	<i>ssi</i>	200	nb	TAGUCHI ET AL., 1992
HuGM-CSF	human	<i>aph</i>	<i>prtBz</i>	10-15	nb	GARVON & MALEK, 1993
sCD4(D1D2)	human	<i>still</i>	<i>still</i>	>300	nb	FORNWALD ET AL., 1993
sELAM1 deriv.	human	<i>still</i>	<i>still</i>	<1-100	nb	FORNWALD ET AL., 1993
Fv von HyHEL10	(mAb)	<i>ssi</i>	<i>ssi</i>	1 ^c	nb	UEDA ET AL., 1993
MuTNF α	Maus	<i>aml</i>	<i>aml</i>	1-10	100%	VAN MELLAERT ET AL., 1994
HuTGF α	human	<i>ssi</i>	<i>ssi</i>	10	nb	TAGUCHI ET AL., 1995
HuEPO-R	human	<i>aph</i>	<i>prtBz</i>	15	nb	BINNIE ET AL., 1997
Calcitonin	Lachs	<i>aph</i>		0,1	nb	HONG ET AL., 1998

Tab. II-3 Aufstellung von rekombinant durch sekretorische Expression in *Streptomyces lividans* produzierten eukaryotischen Proteinen (erweiterte Aufstellung zu VAN MELLAERT UND ANNÉ, 1999).

a: Herkunft von Promotor und Signalsequenz (AI: *S. tendae* α -Amylase Inhibitor; *aml*: *S. venezuelae* α -Amylase; *aph*: *S. fradiae* Aminoglykosid Phosphotransferase; *ermEup*: *Saccharopolyspora erythraea* Erythromycin-Resistenz; *β -gal*: *S. lividans* β -Galactosidase; *melC1*: *S. antibioticus* Melanin; *prtBz*: *S. griseus* Protease B; *sak*: *Staphylococcus aureus* Staphylokinase; *ssi*: *S. albogriseolus* Subtilisin Inhibitor; *still*: *S. longisporus* Subtilisin/Trypsin Inhibitor). b: Ausbeuten in mg/L, wenn nicht anders angegeben. c: Ausbeute nach Reinigung, nb: nicht bestimmt.

1.4 Engpässe bei der heterologen Proteinexpression in Streptomyceten

Bei der Expression von heterologen Proteinen in großen Mengen sind vielfach limitierende Faktoren zu berücksichtigen, bzw. auszuräumen. Viele genomische Komponenten wie ganze Vektorsysteme, aber auch einzelne Bereiche der Promotoren und Terminatoren sind optimiert worden. Proteasedefiziente Stämme sorgen für eine verminderte Degradation der exprimierten Proteine.

Ob ein Protein effizient exprimiert werden kann, hängt aber auch von ihm selbst ab. Die Codonverteilung kann speziell an die Streptomyceten angepaßt werden, darüber hinaus kann ein Protein sich aber als toxisch erweisen oder durch die Umgebung des Wachstumsmediums (im Gegensatz zur natürlichen Umgebung) eine Falschfaltung und/oder eine falsche Disulfidverbrückung aufweisen.

Neben der reinen Expression der Proteine können auch Faktoren der Sekretion und der posttranslationalen Prozessierung die Effizienz der Proteinproduktion beeinflussen. Im nachfolgenden Kapitel werden die Systeme vorgestellt, die bei der Translokation von Proteinen eine Rolle spielen.

2 Proteinexport in Bakterien

Ist ein Protein in Form einer Polypeptidkette synthetisiert worden, muß es zur Erlangung seiner Funktion zu einer nativen Struktur falten und an seinen Wirkort transportiert werden. Die Faltung wird von verschiedenen Enzymen unterstützt (siehe dazu auch Kapitel II-3) und auch der Transport zum Wirkort geschieht unter Beteiligung zahlreicher Proteine. Er beinhaltet oft die Translokation über eine Membran hinweg, wobei die grundsätzlichen Prinzipien des Transports sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen sehr ähnlich sind [SCHATZ UND DOBBERSTEIN, 1996; POHLSCHRÖDER ET AL., 1997]. In *E. coli* (als am besten untersuchten Gram-negativen Organismus) existieren vier verschiedene Sekretionsmechanismen, die nachfolgend beschrieben sind.

Die Sekretion des Typs I basiert auf dem ABC-Transportersystem, welches aus drei Proteinen besteht. Die ATPase ist an der inneren Membran lokalisiert und liefert die Energie für den Translokationsvorgang. Ein zweites Protein ist an der inneren Membran verankert und reicht über das Periplasma bis zur äußeren Membran. Zusammen mit einem dritten Protein, das an der äußeren Membran sitzt, bilden sie einen Transportkanal, durch den Proteine direkt vom Cytoplasma über das Periplasma und die äußere Membran hinweg aus der Zelle ausgeschleust werden. Proteine, die über diesen Weg transloziert werden, besitzen innerhalb der C-terminal letzten 60 Aminosäuren ein Sekretionssignal [YOUNG UND HOLLAND, 1999].

Bei der Sekretion von Typ II und IV liegen teilweise die gleichen Mechanismen vor. So wird die innere Membran entweder mit Hilfe des Sec-Apparates (ungefaltete Proteine) oder des Tat-Systems (gefaltete Proteine) durchlaufen [PUGSLEY, 1993; BERKS, 2000]. Für beiden Mechanismen ist ein N-terminales Signalpeptid am Protein erforderlich, das nach erfolgter Sekretion von Signalpeptidasen prozessiert wird. Die Sekretion über die äußere Membran hinweg geschieht entweder durch eine Pore, die von mehreren Proteinen gebildet wird (Typ II) oder durch ein C-terminales Sekretionssignal am zu transportierenden Protein (Typ IV). Nachdem das Protein auf dem Weg des Typs IV auch durch ein System von porenbildenden Proteinen ge-

schleust wurde, wird der C-Terminus autoproteolytisch abgespalten. In Bakterien ist Typ II der generelle Sekretionsweg von extrazellulären Proteinen.

Typ III der Sekretion ähnelt zunächst Typ I, denn die Sekretion ist nicht Sec-abhängig und die Proteine müssen nicht innerhalb oder nach der Sekretion prozessiert werden. Weiterführend zu Typ I werden die Proteine auf diesem Weg nicht nur vollständig über die innere und äußere Membran der Bakterien transportiert, sondern zusätzlich noch bis in das Cytosol von dicht benachbarten eukaryotischen Zellen befördert. Ungefähr zwanzig Proteine dieses Sekretionsweges sorgen so für eine Übertragung von virulenten Proteinen in eine Zielzelle [HUECK, 1988].

In Gram-positiven Bakterien sind bisher nur der Typ I und der Sec- und Tat-abhängige Sekretionsmechanismus beschrieben. In diesem Kapitel wird nur auf die Sekretionswege eingegangen, die von Proteinen mit Signalpeptiden eingeschlagen werden. In Gram-negativen Bakterien bedeutet das den Transport vom Cytosol ins Periplasma, in Gram-positiven Bakterien die Sekretion in den extrazellulären Raum. Die N-terminalen Signalpeptide tragen dabei zur Erkennung und dadurch Stabilisierung ihrer Polypeptidkette durch Chaperone bei und vorbestimmen durch die Interaktion mit verschiedenen Chaperonen einen bestimmten Sekretionsweg.

Anhand des Beispiels von *E. coli* werden nachfolgend die verschiedenen Wege der Sekretion vorgestellt; am Ende jedes Unterkapitels wird auf Gemeinsamkeiten der Translokationswege in Gram-positiven Bakterien und insbesondere in Streptomyceten hingewiesen.

2.1 Die Wege zur Membran

2.1.1 In *Escherichia coli*

Proteine, die in andere Kompartimente der Zelle oder aus ihr heraus transportiert werden sollen, werden als Vorläuferproteine synthetisiert. Sie enthalten ein zusätzliches N-terminales Peptid, das eine die Sekretion unterstützende Sequenz enthält. Über dieses Signalpeptid werden die Proteine zu den Membranen der

Bakterien, zu denen des eukaryotischen Endoplasmatischen Retikulums oder der Thylakoid-Membran von Chloroplasten geleitet. Wie in Kapitel II-1.2.5 ausgeführt, besitzen Signalpeptide drei definierte strukturelle Elemente, können die zu frühe Faltung von Proteinen verhindern und ermöglichen die Bindung an Chaperone (siehe unten). Obwohl die Struktur und eingeschränkt auch die Aminosäurekomposition bei fast allen Signalpeptiden vergleichbar ist, tritt so gut wie keine über einen größeren Bereich konservierte AS-Sequenz zwischen verschiedenen Signalpeptiden auf. Diese große Varianz der Sequenzen erlaubt den Einsatz in verschiedenen Translokationswegen.

Wird ein Protein am Ribosom gebildet, muß zunächst dafür gesorgt werden, dass das entstehende Polypeptid nicht aggregiert oder sich falsch faltet. Dafür stehen verschiedene Chaperone zur Wahl. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt kann sich entscheiden, welchen Translokationsweg das entstehende Protein einschlagen wird. Zu allererst kommt das naszierende Polypeptid mit dem ribosomal gebundenen Trigger-Faktor in Berührung [RASSOW UND PFANNER, 1996]. Diese Prolylpeptidyl-*cis/trans*-Isomerase unterscheidet nicht zwischen sekretorischen und cytosolischen Proteinen. Darüberhinaus stabilisieren Chaperone das naszente Protein [HARTL ET AL., 1994]. Ist es dem Protein noch nicht möglich, zu seiner nativen Struktur zu falten, wird es von den *E. coli* Hsp70-Proteinen DnaJ, DnaK und seinem Cofaktor GrpE in einem faltungs- und translokationskompetenten Zustand gehalten. Während der Translation, wenn noch nicht das vollständige Polypeptid zur Faltung zur Verfügung steht oder während des Transports zur Membran werden die hydrophoben Bereiche des Substratproteins abgeschirmt und so eine Aggregation verhindert. Das Hsp60-Chaperonin GroEL und sein Cofaktor GroES verhindern ebenfalls eine Aggregation der ungefalteten Proteine und erlauben weitergehend die spätere Faltung zur nativen Struktur. Während die Hsp60-Proteine nur an eine Polypeptidkette assoziieren, die sich bereits vom Ribosom gelöst hat, können Hsp70-Chaperone schon in einer frühen Phase der Translation an das ribosomal gebundene Polypeptid binden. Dabei konkurrieren sie direkt mit dem „Signal Recognition Particle“ (SRP).

Das SRP bindet spezifisch an besonders hydrophobe Bereiche, die innerhalb der Signalsequenzen sekretorischer Proteine vorliegen. Die Bindung erfolgt in einer zeitlich sehr frühen Phase, wenn am Ribosomen ein Peptid von 70 bis 150 Aminosäuren Länge entstanden ist. Assoziiert das SRP an das Polypeptid, wird im

eukaryotischen System die Translation verzögert, die Faltung der Polypeptidkette verhindert und der gesamte ribosomal gebundene Komplex zum SRP-Rezeptor an der Membran geleitet. Erst mit der Interaktion des SRP mit seinem Rezeptor dissoziiert es von dem Komplex und die Translation der mRNA wird fortgesetzt. In *E. coli* findet dagegen keine Unterbrechung der Translation statt, wenn die SRP-Untereinheit an das Signalpeptid bindet [BUKAU ET AL., 1996]. Die *E. coli*-Homologen des SRP-Komplexes (7S RNA, GTPase SRP54 und SRP-Rezeptor) sind 4.5S RNA, Ffh (Fifty four homologue) und der Rezeptor Fts Y, wobei Ffh für die Bindung der Signalsequenz verantwortlich ist [FEKKES UND DRIESSEN, 1999]. Die Hydrophobizität der Signalsequenz spielt bei der Bindung an die SRP-Untereinheit eine wichtige Rolle, denn je hydrophober die Sequenz, desto stärker ist die Bindung an Ffh und desto höher ist die Translokationseffizienz [DOUD ET AL., 1993; VALENT ET AL., 1995]. Nach der Bindung an Fts Y kann das Vorläuferprotein direkt in die Membran inserieren (z.B. membrangebundene Proteine) oder zum Translokase-Komplex weitergeleitet werden.

Ist der N-Terminus des naszierenden Proteins nicht hydrophob genug, entsteht keine oder nur eine sehr lockere Bindung zur SRP-Untereinheit. Bei einer weiteren Verlängerung des Vorläuferproteins und auch noch nach seiner Ablösung vom Ribosom kann SecB an das Protein assoziieren. SecB ist ein sehr saures Protein mit einer Masse von ca. 17 kDa, das als Tetramer vorliegt [KUMAMOTO UND NAULT, 1989; WATANABE UND BLOBEL, 1989]. Es ist im Gegensatz zu anderen Chaperonen keine ATPase. Für die Bindung an SecB ist nur der reife Proteinanteil verantwortlich, das Signalpeptid hat keinen Einfluß auf die Bindungsenergie oder -affinität [RANDALL ET AL., 1998]. Es verhindert jedoch eine sehr schnelle Faltung des Proteins, wodurch es die Interaktion von SecB mit dem ungefalteten Protein überhaupt erst ermöglicht. HARDY UND RANDALL (1991, 1995) gehen davon aus, dass die durch das Signalpeptid verlangsamte Faltung SecB die Unterscheidung zwischen Preproteinen und anderen ermöglicht und das ein Preprotein aufgrund der Faltungs- und Aggregationsgeschwindigkeit relativ zu seiner Chaperon-Bindung in die verschiedenen Sekretionswege geleitet wird. Im Komplex mit SecB behält das Preprotein eine wenig gefaltete, translokationskompetente Struktur [COLLIER ET AL., 1988] und gelangt so zum Rezeptor SecA an der Membran, wo die Translokation erfolgt. Für die Assoziation von SecB an SecA ist die Signalsequenz des zu sekretierenden Proteins

unerlässlich [FEKKES ET AL., 1998]. Ist das Vorläuferprotein auf SecA übertragen, verläßt SecB den Komplex.

Abbildung II-3 faßt die bisher beschriebenen Wege der Translokation zusammen.

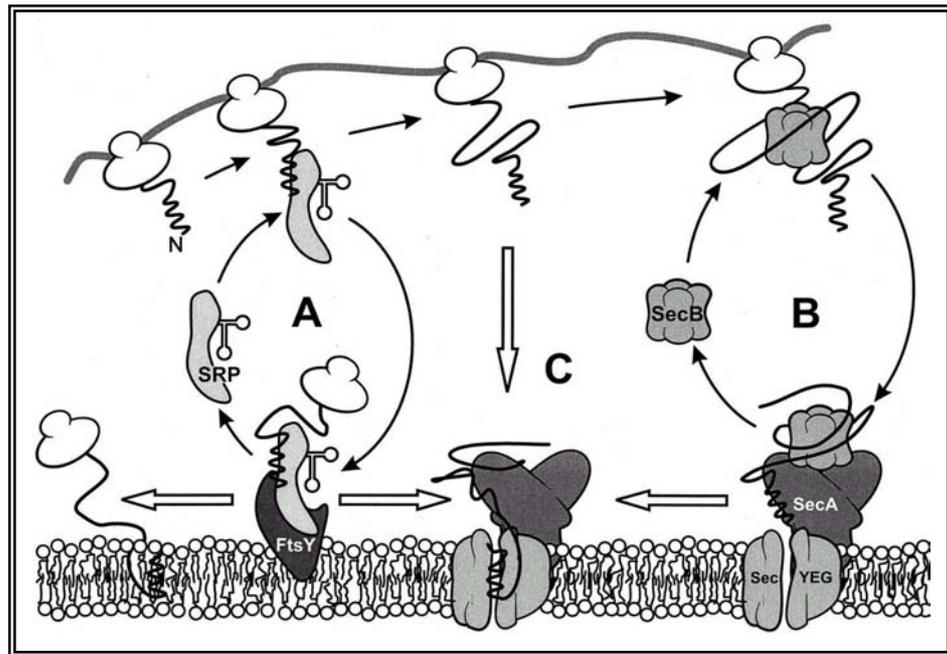


Abb. II-3 Modell der koexistierenden Sekretionswege (übernommen von FEKKES UND DRIESSEN, 1999) **A** SRP-abhängiger Weg mit nachfolgender direkter oder SecA-vermittelter Sekretion . **B** SecB-abhängiger Weg. **C** Direkte Sekretion über SecA.

Ein dritter Mechanismus für den Transport von Proteinen zur Membran und auch über sie hinweg wird durch den Tat- (twin-arginine translocation) Sekretionsweg ermöglicht. Er wurde zunächst als Δ pH-abhängige Translokation in Thylakoidmembranen entdeckt und später auch in Prokaryoten nachgewiesen [DALBEY UND ROBINSON, 1999; BERKS ET AL., 2000]. In *E. coli* werden über diesen Weg hauptsächlich periplasmatische Enzyme über die innere Membran transportiert, die schon im Cytoplasma falten, Redox-Cofaktoren binden und als Komplex durch die Membran transloziert werden [SANTINI ET AL, 1998]. Hier liegt der eine große Unterschied zum SRP- oder Sec-abhängigen Transport. Ein zweiter Unterschied liegt im Signalpeptid der transportierten Preproteine. Sie beinhalten die Konsensussequenz

(S/T)-R-R-X-F-L-K [BERKS, 1996], die sich über die n- und h-Domäne des Signalpeptids erstreckt. Während F und L durch andere hydrophobe Reste ersetzt werden können, müssen die beiden Arginine zwingend in der Sequenz enthalten sein und sind daher namensgebend für diese Gruppe der Signalpeptide. Weitere Besonderheiten der entsprechenden Signalpeptide sind die geringere Hydrophobizität und eine positive Ladung in der c-Domäne, die eine Verwendung in der Sec-abhängigen Translokation verhindert [BOGSCH ET AL., 1997]. Für die in Mais identifizierte Komponente des Δ pH-abhängigen Thylakoid-Importsystems Hcf106 [SETTLES ET AL., 1997] konnten in *E. coli* die Homologen TatA, TatB und TataE identifiziert werden, die wahrscheinlich membrangebundene Rezeptoren darstellen. Darüberhinaus wurde TatC eine Rolle als Translokase zugeschrieben. Diese vier Proteine sind in ihrer Funktion innerhalb einer Sec-unabhängigen Sekretion bestätigt, die genaue Rolle von TatD ist noch nicht bekannt. Als lösliches Protein besitzt es eventuell eine Transportfunktion.

2.1.2 In Gram-positiven Bakterien

Homologe zu den Hsp60-Chaperoninen und den Hsp70-Chaperonen sind in einer Vielzahl von Bakterien gefunden worden, darunter auch in *Streptomyces* Spezies [MARCO ET AL., 1992; DUCHÊNE ET AL., 1994; DE LEON ET AL., 1997; BUCCA ET AL., 1995; GRANDVALET ET AL., 1999]. Im Gegensatz zu den Operons Gram-negativer Bakterien sind den *Streptomyces*-Genen und -Operons der Hsp-Homologen Promotoren vorangestellt, die bei normaler Temperatur reguliert werden. In der Promotorregion von groES/EL1 und groEL2 von *S. albus* wurde das CIRCE-Motiv (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) entdeckt, an das der Repressor bindet. Der Promotor des DnaK-Operons aus *S. coelicolor* weist das HAIR-Motiv (HspR-associated inverted repeat) auf, der eine Bindung und somit Regulation durch das hspR-Genprodukt ermöglicht. Hier wird bei Temperaturerhöhung eine Bindung des Repressors verhindert.

In Gram-positiven Bakterien und hier auch in Streptomyceten konnten Homologe der SRP-Untereinheit und auch des SRP-Rezeptors gefunden werden. Dazu gehören Ffh und FtsY in *B. subtilis* [HONDA ET AL., 1993; OGURA ET AL., 1995], Ffh in *S. lividans*

(Genbank AAC24713) und Ffh (CAA19378) und FtsY (CAA22423) in *S. coelicolor*. Die Ffh-Homologen weisen die gleichen konservierten Domänen auf, wie sie für die Proteine aus Eukaryoten und *E. coli* bekannt sind. Dazu zählt die N-terminale GTP-Bindestelle und eine methioninreiche C-terminale Domäne, die an hydrophobe Signalpeptide bindet. Mit den prokaryotischen SRP54-Untereinheiten verglichen besitzen die beiden Ffh-Proteine aus Streptomyceten einen um 33 Aminosäuren längeren N-Terminus. In *B. subtilis* wurde darüberhinaus ein RNA-Molekül entdeckt, was mit der 7S-RNA der Eukaryoten vergleichbar ist [STRUCK ET AL., 1988] und durch diese oder die *E. coli* 4.5S RNA ersetzt werden kann.

SecB-Homologe konnten bisher nicht in Gram-positiven Bakterien gefunden werden. Es ist aber möglich, dass ähnliche Proteine existieren, sie jedoch auf Grund etwas anderer Funktionen eine andere Struktur aufweisen. In *E. coli* sind Proteine, die in die äußere Membran transloziert werden und hohe β -Faltblattanteile enthalten, das Hauptsubstrat von SecB. Solche Proteine kommen in Gram-positiven Bakterien nicht vor. SecB bildet vor der Translokation des Substratproteins zum C-Terminus von SecA eine Bindung aus. Diese Domäne ist innerhalb der bakteriellen SecA-Proteine hochkonserviert, die Sequenzen in *Streptomyces* und wenigen anderen Arten weichen davon ab. Daher ist es fraglich, ob die SecB-Homologe Gram-positiver Bakterien ebenfalls den SecA C-Terminus als Bindestelle nutzen. Ein erster Hinweis auf eine Homologie in *B. subtilis* ist CsaA, das eine SecB defiziente *E. coli*-Mutante komplementieren konnte [MÜLLER ET AL., 2000].

In *B. subtilis* konnten über Datenbankvergleiche bisher die Tat-Homologe von TatA/E/B (Ydil, YczB, YnzA), zwei Homologe von TatC (YdiJ, YcbT) und ein TatD-Homologes (YabD) identifiziert werden [LAMMERTYN, 2000]. In Streptomyceten wurden anhand von Vergleichen von Datenbank-Sequenzen Homologe von TatC identifiziert. Da einige sekretorische Proteine das charakteristische twin-arginine Motiv besitzen, liegt die Vermutung nahe, dass hier noch weitere Proteine dieses Sekretionsapparates gefunden werden.

2.1.3 Welcher Weg wird bevorzugt?

Trägt das naszierende Protein eine sehr hydrophobe Signalsequenz, konkurrieren in *E. coli* nach dem Triggerfaktor Chaperone mit dem Signal Recognition Particle um das Polypeptid. Das SRP besitzt dabei eine besonders hohe Affinität zu hydrophoben Sequenzen. Der SRP-Polypeptid-Komplex gelangt dann zur Membran, wo er an FtsY oder an SecA bindet und die Proteinkette aus dem Verbund entläßt. Die weitere Sekretion wird im nächsten Kapitel beschrieben. Ist die Signalsequenz nicht hydrophob genug, wird keine stabile Bindung zum SRP ausgebildet. Stattdessen kann SecB in einem späteren Stadium der Translation an die Aminosäurekette binden und als Komplex an SecA assoziieren, um die Translokation einzuleiten. Wird das Preprotein nicht von SecB erkannt, ist eine direkte Insertion in die Membran möglich. Sie wird vorangetrieben durch ionische Wechselwirkungen zwischen der Signalsequenz und der Lipiddoppelschicht der Membran. Proteine, die eine Tat-Signalsequenz tragen, falten direkt nach der Translation. SRP bindet nicht an diese Preproteine, weil sie nicht mehr ribosomal gebunden sind und auch eine Bindung an SecB ist nicht mehr möglich, da SecB nur an ungefaltete Sequenzen assoziieren kann. Demzufolge spielen SRP und SecB bei der Twin-Arginine-Translokation keine Rolle. Bei Signalsequenzen, die einen anderen Translokationsweg einschlagen, entscheidet die Hydrophobizität über eine Bindung an SRP oder eine spätere Assoziation an SecB.

Wie oben ausgeführt, konnte in Streptomyceten noch kein SecB-Homologes identifiziert werden, SRP-Untereinheiten und -Rezeptor-Homologe und Tat-Protein-Homologe wurden jedoch beschrieben. Daher ist davon auszugehen, dass auch in Streptomyceten verschiedene Sekretionsmechanismen vorliegen.

2.2 Die Wege durch die Membran

2.2.1 In *Escherichia coli*

Wie in Abb. II-3 zu erkennen (s. S. 23), stellt SecA den Rezeptor des Proteinkomplexes dar, der Proteine über die Zellmembran translozieren kann. Das Homodimer mit jeweils 102 kDa großen Untereinheiten bindet an den reifen Protein-

teil eines freien oder an SecB gebundenen Preproteins. Die Erkennung erfolgt dabei über den positiv geladenen N-Terminus des Signalpeptids [AKITA ET AL., 1990]. Nach der Assoziation an den membranintegrierten Translokase-Komplex (SecYEG) und Aktivierung durch Binden des Preproteins wird an einer ATP-Bindestelle ADP durch ATP ausgetauscht [LILL ET AL., 1989]. Dies bewirkt eine Konformationsänderung von SecA, wodurch es teilweise mit dem gebundenen Preprotein in die Membran insertiert. Nach der folgenden Deinsertion von SecA ist das Preprotein teilweise transloziert worden und wird über andere Mechanismen weitergeleitet [SCHIEBEL ET AL., 1991; DRIESSEN ET AL., 1998]. SecA inhibiert seine eigene Synthese durch Binden der SecA-mRNA, bei erhöhtem Translokationsbedarf wird die inhibierende Wirkung abgeschwächt.

2.2.2 In Gram-positiven Bakterien

SecA-Proteine von Gram-positiven Bakterien scheinen strukturell als auch funktionell dem *E. coli* SecA zu gleichen. In *Streptomyces griseus*, *S. lividans* und *S. coelicolor* konnten SecA-Homologe identifiziert werden [PÖHLING ET AL., 1997; BLANCO ET AL., 1996, 1998; GILBERT ET AL., 1996]. *Streptomyces* SecA-Proteine konnten einen Wachstumsdefekt in temperatur-sensitiven *E. coli* SecA-Mutanten nicht wiederherstellen, dagegen konnte ein SecA-Hybridprotein (N-Terminus aus *S. lividans* SecA, C-Terminus aus *E. coli*) einen defizienten *E. coli* SecA-Stamm komplementieren. Obwohl SecA eine hoch konservierte Komponente des bakteriellen Translokationsmechanismus zu sein scheint, können die Proteine nicht beliebig zwischen verschiedenen Bakterien ausgetauscht werden. Hier könnte eine Optimierung der jeweiligen Interaktionen zwischen SecA und SecYEG oder SecA und Preprotein-Chaperon-Komplex vorliegen [KLEIN ET AL., 1995]. In Mycobakterien sind zwei verschiedene SecA Proteine in den Zellen vorhanden, die eventuell unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen [ECONOMOU, 1999].

Homologe zu den Proteinen des Translokons (SecY, SecE und SecG) konnten in Gram-positiven Bakterien und auch in Streptomyceten identifiziert werden.

2.3 Postsekretorische Änderungen

Die Signalpeptide sekretorischer Proteine haben ihre Funktion nach der Translokation erfüllt und müssen vom reifen Protein abgespalten werden, um ein Ablösen des Proteins von der Membran und eine nachfolgende Faltung zu ermöglichen. Dies geschieht noch während oder nach der Sekretion durch Signalpeptidasen [DALBEY ET AL., 1997]. In *E. coli* besitzt die 37 kDa große Signalpeptidase I (SPase I, auch: LepB) zwei Domänen, die in die Membran insertiert sind. Sowohl der N- als auch der C-Terminus reichen in das Periplasma, wo sich auch das aktive Zentrum des Enzyms befindet. Prokaryotische Signalpeptidasen wurden von DALBEY ET AL. (1997) als neuartige Serinproteasen eingestuft, da sie nicht mit den bekannten Serin-, Cystein-, Asparaginsäure- oder Metallo-Protease-Inhibitoren interagieren. Sie besitzen aber Lysin- und Serinreste, die für die enzymatische Aktivität unerlässlich sind und ein Histidin der klassischen Serinproteasen ersetzen. Darüberhinaus enthält *E. coli* eine Signalpeptidase des Typs II (SPase II), die speziell die Signalpeptide von Lipoproteinen abspaltet. Vor der Spaltung muß zunächst die erste Aminosäure des reifen Proteins (immer ein Cystein) mit Diacylglycerol modifiziert werden.

Um eine Akkumulation der abgespaltenen Signalpeptide zu verhindern, werden sie schnellstmöglich durch membrangebundene Signalpeptid-Peptidasen (*E. coli*: SppA) abgebaut. Sie wirken zusammen mit cytoplasmatischen Oligopeptidasen (z.B. *E. coli* OpdA) [NOVAK UND DEV, 1988].

Sowohl in *B. subtilis* als auch in Streptomycceten konnten SPasen identifiziert werden, aber es gibt große Unterschiede in Struktur und in der Organisation der Gene. *E. coli* besitzt nur ein SPase I Gen, *B. subtilis* dagegen fünf verschiedene, die über das Chromosom verteilt liegen [VAN DIJL ET AL., 1992; BOLHUIS ET AL., 1996], zusätzlich zwei Plasmid-kodierte SPasen [MEIJER ET AL., 1995]. *S. lividans* besitzt mit mindestens vier verschiedenen SPasen (SipW, X, Y, Z) eine ähnlich hohe Anzahl [SCHACHT ET AL., 1998; PARRO UND MELLADO, 1998; PARRO ET AL., 1999]. Die Gene *sipW*, *X* und *Y* sind in einem Operon vereint, *sipZ* ist das erste Gen eines anderen Operons mit drei weiteren Genen. Die *Streptomyces*-SPasen besitzen wie andere SPasen Gram-positiver Bakterien nur eine membranständige Domäne. Da alle potentiell am aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste hochkonserviert sind und ein *E. coli* SPase I-defizienter Stamm durch SipY komplementiert werden konnte,

wird auf einen katalytischen Mechanismus identisch zu *E. coli* SPasen geschlossen [TSCHANTZ ET AL., 1993; VAN DIJL ET AL., 1995]. *B. subtilis* enthält nur eine SPase des Typs II [LAMMERTYN, 2000], in *S. coelicolor* wird ebenfalls eine SPase II vermutet. Zwei SppA-ähnliche Proteine konnten in *B. subtilis* identifiziert werden. In SppA-defizienten Zellen wurde eine langsamere Prozessierung von sekretorischen Proteinen beobachtet, ohne dass dabei die Translokation als solche beeinflusst wurde. Das cytosolische SppA-ähnliche TepA dagegen wird für eine effiziente Translokation des Preproteins benötigt, die genaue Funktion ist aber noch nicht geklärt.

Ebenfalls zu den postsekretorischen Ereignissen zählt die Faltung der translozierten Proteine. Auf die verschiedenen beteiligten Enzyme wird im folgenden Kapitel zur Proteinfaltung eingegangen.

3 Proteinfaltung

Um biologisch aktiv zu sein, muß ein Protein zu einer dreidimensionalen Struktur falten. Obwohl es eine fast unendlich große Anzahl von theoretisch möglichen Konfigurationen gibt, faltet ein Protein innerhalb von Millisekunden oder Sekunden in seine native Form. Seit C. Anfinsen in den 60er Jahren entdeckte, dass allein die Aminosäuresequenz die dreidimensionale Struktur von Proteinen bestimmt, ist die Faltung von Proteinen ein sehr großes und gefragtes Forschungsgebiet. Das erlangte Wissen über *in vivo*- und auch *in vitro*-Faltung wird sehr schnell in anderen Bereichen eingesetzt. Besonders interessant ist in den letzten Jahren die Modifikation von natürlichen Proteinen, um ihre Charakteristika und reaktiven Eigenschaften zu verbessern oder zu verändern. Das Proteindesign ist auch in pharmazeutischer Hinsicht sehr gefragt. Begleitend zu den reinen Faltungsstudien entstanden eine Vielzahl von Strukturvorhersageprogrammen und Computersimulationen der Dynamik und Interaktion von Proteinen.

Für eine Vielzahl von Proteinen sind die Faltungswege aufgeklärt oder postuliert. WOLYNES und ONUCHIC haben ein Energiemodell entwickelt, das verdeutlicht, wie variabel der Weg zur nativ gefalteten Struktur ist (siehe Abb. II-4).

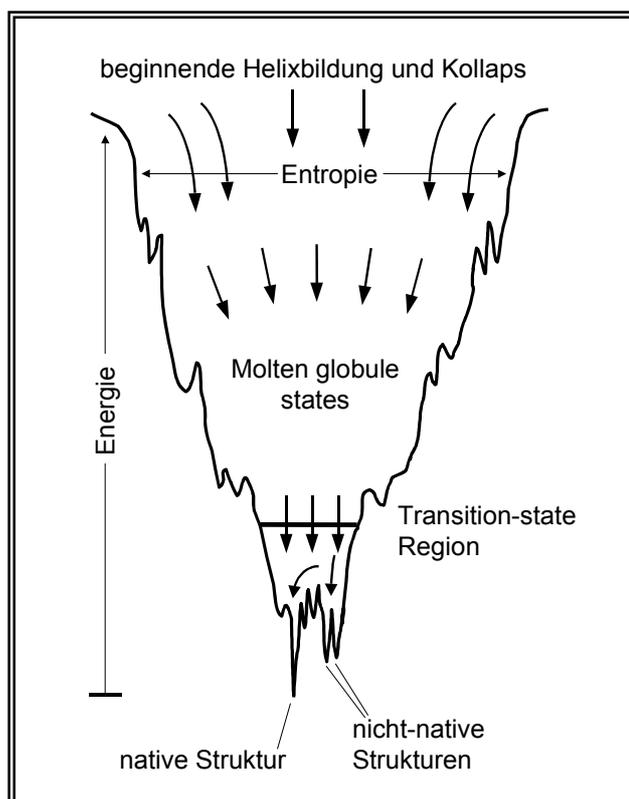


Abb. II-4
Energetisches Modell der Proteinfaltung, nach ONUCHIC ET AL. (1995). In dem nach unten enger werdenden Tunnelmodell nimmt die Anzahl der nativen Kontakte und die Anzahl der in nativer Konfiguration stehenden Winkel bis zum Erreichen der nativen Struktur zu.

Das Polypeptid beginnt seine Faltung am Rande eines Trichters, in dessen Mitte es einen globulären Zustand erreicht, in dem es partiell gefaltet ist. Danach muß es einen energetischen Flaschenhals passieren, repräsentiert durch verschiedene mögliche Übergangszustände, bevor es das Energie- und Entropieminimum und somit die native Struktur erreicht. Je nach Komplexizität des Faltungsweges verändert sich die Form des Trichters und die Anzahl und Ausprägtheit der lokalen Minima, die falsche Faltungszustände charakterisieren.

3.1 Chaperone

Bei der Proteinbiosynthese im Cytosol entsteht eine Konzentration von ca. 35 µM an ribosomal gebundenen Proteinen [HARTL, 1996]. Die Aggregationsgrenze für *in vitro* Bedingungen ist hier schon deutlich überschritten, d. h. es müssen *in vivo* Bedingungen herrschen, die eine Aggregation verhindern. Dass die Polypeptidketten zunächst in einem ungefalteten und translokationskompetenten Zustand verbleiben, wird durch die Anwesenheit von Chaperonen bewirkt. Einerseits binden Chaperone an die naszierenden Polypeptide und schirmen sie dadurch von äußeren Einflüssen ab, andererseits unterstützen sie aktiv die Faltung der Polypeptide.

Homologe zu den eukaryotischen Chaperonen wurden auch in Prokaryoten identifiziert. Das *E. coli* Hsp 70-Homologe wird als DnaK bezeichnet. Zusammen mit dem Cofaktor GrpE stabilisiert es naszente Proteine und hält Polypeptide in einem faltungskompetenten Zustand. SecB ist ein ebensolches Chaperon für sekretorische Proteine. Auch das Signal Recognition Particle SRP, das speziell an die hydrophoben Bereiche von Signalpeptiden bindet, hat eine Chaperonfunktion, da es die Faltung der Polypeptidkette verhindert. Der Trigger Faktor ist teilweise ribosomal gebunden und beinhaltet eine Prolylpeptidyl-Isomeraseaktivität [RASSOW UND PFANNER, 1996]. Das *E. coli*-Protein GroEL und sein Cofaktor GroES werden der Chaperonin-Gruppe Hsp 60 zugeordnet. Im Cytosol von *E. coli* falten rund 85 % der Proteine ohne die Hilfe eines Chaperons oder mit Unterstützung des Hsp 70-Systems. Nur ca. 15 % der Proteine benötigen für die Faltung die Hilfe sowohl der Chaperone als auch der Chaperonine [NETZER UND HARTL, 1998].

3.2 Oxidoreduktasen

Neben den Chaperonen sind Prolylpeptidylisomerasen und Oxidoreduktasen für die Faltung vieler Proteine essentiell. Für die Oxidation von Cysteinen zu Disulfidbrücken und die Isomerisierung falsch verknüpfter Brücken sind die Oxidoreduktasen verantwortlich. Sie werden auch als Thioredoxin-Familie bezeichnet. Alle Proteine teilen zwei Charakteristika. Sie ähneln sich stark in ihrer gefalteten Struktur am aktiven Zentrum. Die Struktur von Thioredoxin (Trx), einem ubiquitär vorkommendem cytoplasmatischen Enzym von 11 bis 12 kDa, wurde zuerst aufgeklärt und war namensgebend für die Enzymfamilie. Innerhalb der konservierten dreidimensionalen Struktur liegt die Konsensussequenz des aktiven Zentrums, das CXXC-Motiv. Ein Vergleich zwischen Thioredoxin und DsbA zeigt genauer die Gemeinsamkeiten. Obwohl die geringe Sequenzidentität zunächst nicht auf eine strukturelle Ähnlichkeit schießen läßt, existiert doch eine große Übereinstimmung. Das Thioredoxin-Faltungsmotiv, gegliedert durch die strukturelle Abfolge $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$, liegt sowohl der Struktur des Thioredoxin-Proteins als auch der des DsbA zugrunde [MARTIN, 1995].

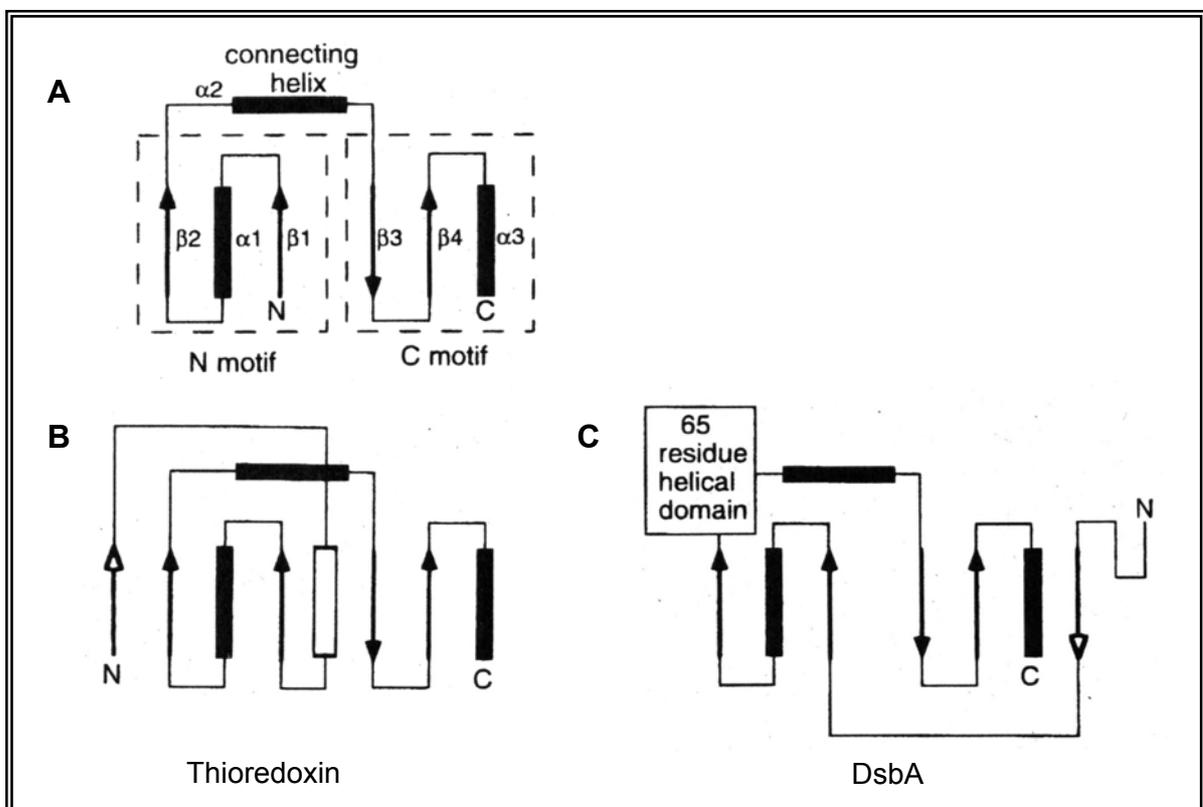


Abb. II-5 Struktur des Thioredoxin-Faltungsmotivs (MARTIN, 1995). Vergleich zwischen dem generellen Faltungsmotiv (A), Thioredoxin (B) und DsbA (C).

Das reduzierte Thioredoxin-Faltungsmotiv besteht aus 80 Aminosäuren, Thioredoxin mit 108 Resten besitzt am N-Terminus einen zusätzlichen β -Strang und einen weiteren Helixbereich. DsbA (189 AS) weist einen zusätzlichen N-terminalen β -Strang und eine 65 Reste umfassende helikale Domäne zwischen $\beta 2$ und $\alpha 3$ auf. Zusätzlich zum CXXC-Motiv besitzen sowohl Thioredoxin als auch DsbA den strukturell wichtigen sogenannten *cis*-Pro-Loop, der sich zwischen $\alpha 2$ und $\beta 3$ des reduzierten Faltungsmotivs befindet. Die Sequenz Arg-Gly-Ile/Val-Pro beteiligt sich räumlich am aktiven Zentrum und besitzt mit dem weniger häufigen *cis*-Prolin eventuell eine spezifische Möglichkeit zur Interaktion mit Substraten.

Trotz der dargestellten Gemeinsamkeiten können die verschiedenen Proteine der Thioredoxinfamilie gegensätzliche Reaktionen katalysieren, es werden entweder Cysteine zu Disulfiden oxidiert oder vorhandene Brücken reduziert. Die antagonistischen Reaktionen sind nur möglich, weil sich die Enzyme in verschiedenen Kompartimenten der Zelle befinden, wo sich unterschiedliche Redoxbedingungen manifestiert haben [GILBERT, 1990]. Cysteine in reduzierten, ungefalteten Proteine oxidieren oft auch schnell und unspezifisch zu Disulfiden. Diese nicht-nativen Verbrückungen müssen dann über Isomerisierung in die korrekten Cystine überführt werden. Diese ebenfalls von Oxidoreduktasen katalysierte Disulfid-Isomerisierung ist unabhängig von einem Redoxpuffer.

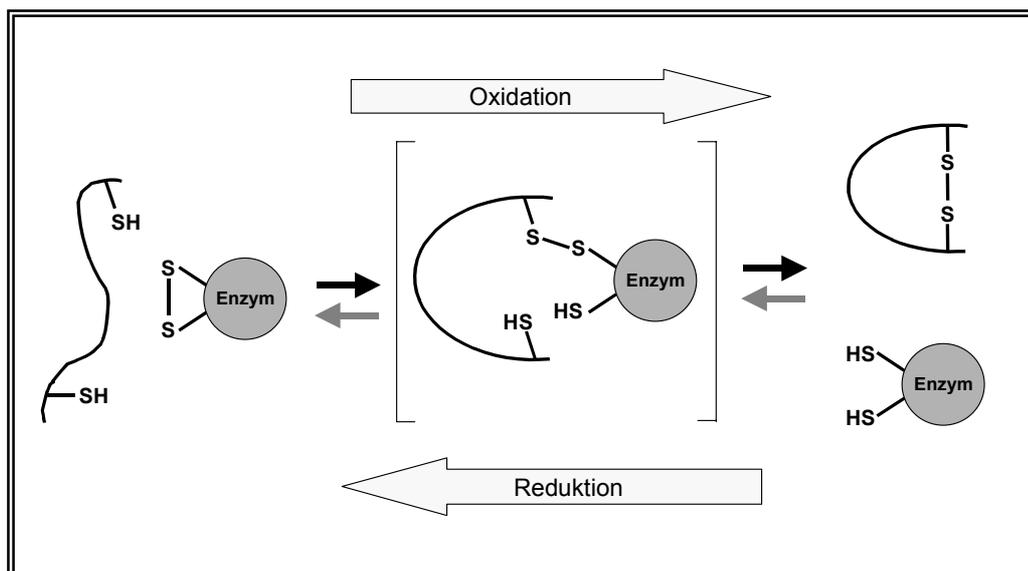


Abb. II-6 Disulfid-Redoxreaktionen von Oxidoreduktasen nach RIETSCH UND BECKWITH (1998). Die Oxidoreduktase ist als Scheibe dargestellt, das Substratprotein als Linie.

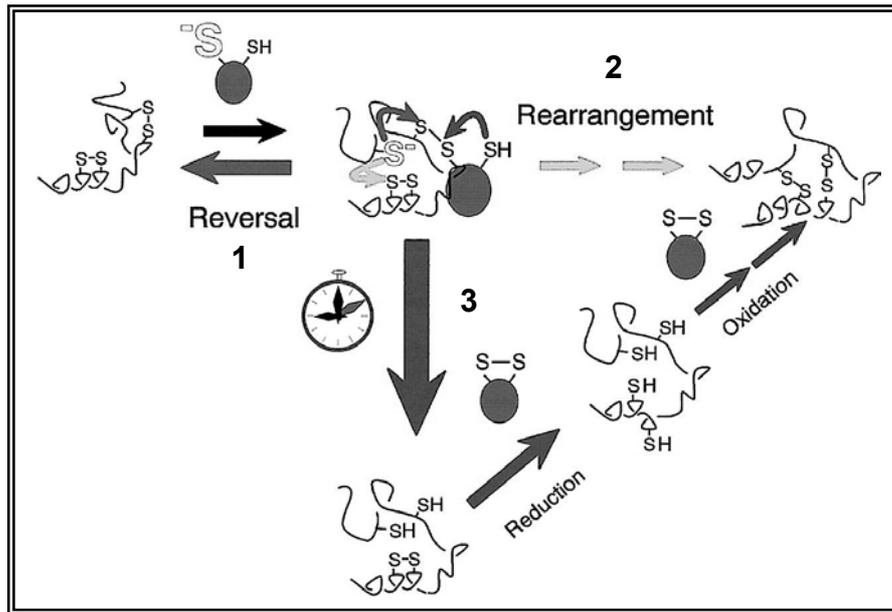


Abb. II-7 Isomerisierung von Disulfiden am Beispiel von PDI, übernommen von GILBERT (1997). Nukleophiler Angriff des reduzierten PDI resultiert im PDI-Substrat-Komplex. Drei mögliche Reaktionen folgen: 1 Rückreaktion; 2 Intramolekularer Austausch von Disulfiden, reaktivere Disulfide werden durch weniger reaktive (stabilere) ersetzt, dabei bleibt PDI gebunden; 3 Reduktion von ein oder mehr Disulfiden, Reoxidation mit neuer Orientierung, PDI wird dabei zwischenzeitlich voll oxidiert.

Thioredoxin wirkt hauptsächlich reduzierend. Das 11 – 12 kDa große Enzym hat die reduzierenden Bedingungen des Cytoplasmas um sich. Es bildet mit der Thioredoxin-Reduktase eine Redoxpaar. Die eukaryotische Proteindisulfidisomerase (PDI) katalysiert Redoxreaktionen in der oxidierenden Umgebung des Endoplasmatischen Reticulums (ER). PDI ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 57 kDa, bestehend aus 490 Aminosäuren, die in 6 Domänen unterteilt sind. Die Domänen a und a' sind strukturell und funktionell homolog zu Thioredoxin. PDI besitzt eine ausgeprägte Isomeraseaktivität, ihr werden auch chaperonähnliche Funktionen zugeschrieben. In der ebenfalls oxidierend wirkenden Umgebung des Periplasmas Gramnegativer Bakterien ist die Gruppe der Dsb-Proteine zu finden. In *E. coli* sind hauptsächlich zwei Proteine für die Bildung von Disulfidbrücken verantwortlich. DsbA hat ein hohes oxidatives Potential. Sie bildet mit dem membranständigen DsbB ein Redoxsystem. DsbB wird seinerseits durch Komponenten der Atmungskette reoxidiert. Für die Isomerisierung falsch verknüpfter Disulfide ist DsbC verantwortlich,

was mit dem membranständigen DsbD ein Redoxpaar bildet. DsbD selbst wird über einen Elektronentransfer von cytosolischen Thioredoxinen reoxidiert.

Wie ähnlich die Eigenschaften der Enzyme untereinander sind, zeigen folgende Studien: Wird PDI aus Ratten (rPDI) in das Periplasma von *E. coli* sekretiert, komplementiert es DsbA-Mutanten und katalysiert die oxidative Bildung von Disulfidbrücken. Darüber hinaus wird rPDI vom nativen DsbB reoxidiert [OSTERMEIER ET AL., 1996]. DsbA und *E. coli* Trx weisen eine identische dreidimensionale Struktur auf, es liegt jedoch nur am aktiven Zentrum eine große Sequenzhomologie vor [MARTIN ET AL., 1993]. Trotzdem kann Thioredoxin die oxidative Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen im oxidierenden Umfeld des Periplasmas katalysieren. Trx wurde in *E. coli* mit Hilfe eines fusionierten Signalpeptids in das Periplasma exportiert und konnte dort in einem *dsbA*⁻-Stamm den Defekt der Disulfidbrückenbildung teilweise aufheben [DEBARBIEUX UND BECKWITH, 1998]. Die Reoxidation erfolgt wie bei DsbA durch DsbB [JONDA ET AL., 1999]. Die Fähigkeit von Thioredoxin, Oxidationsreaktionen zu katalysieren, wurde auch durch eine Änderung der Redoxverhältnisse des Cytoplasmas bestätigt [DERMAN ET AL., 1993; PRINZ ET AL., 1997; STEWART ET AL., 1998]. Wird das CXXC-Motiv in Thioredoxin vom nativen Cys-Gly-Pro-Cys zur DsbA-Sequenz Cys-Pro-His-Cys geändert, können die Kinetiken der Disulfidbrückenbildung des Wildtyp- DsbA⁺-Stammes und des komplementierten DsbA⁻-Stammes nicht mehr unterschieden werden [DEBARBIEUX UND BECKWITH, 2000].

Thioredoxin ist zwar in der Lage, die Isomerisierung von Proteindisulfiden zu katalysieren, die Effektivität liegt aber nur bei 2% der des PDI. Mutationen des CXXC-Motivs vom nativen Cys-Gly-Pro-Cys zur PDI-Sequenz Cys-Gly-His-Cys erhöht die Disulfidbildung und Isomerisierungsaktivität von Thioredoxin um das 10fache. Obwohl die Homologie der das CXXC-Motiv umgebenden Sequenz innerhalb der Thioredoxinfamilie zwischen Thioredoxin und PDI am größten ist, konnte ein *E. coli* Thioredoxin PDI in *Saccharomyces cerevisiae* nicht komplementieren. Die Komplementierung war aber erfolgreich, als das CXXC-Motiv in Trx zu Cys-Gly-His-Cys (PDI-Sequenz) verändert wurde [CHIVERS ET AL., 1996]. Die Mutation von Prolin zu Histidin erhöht die Entropie der Polypeptidkette. Aufgrund dieser zusätzlichen Entropie liegt bevorzugt die reduzierte Form von Trx vor, da in einem flexibleren System die Disulfidbrücke der oxidierten Form unter einer höheren

Spannung stehen würde [GILBERT, 1990]. Dafür sprechen die höheren Redoxpotentiale von Trx-Mutanten gegenüber dem Wildtyp [KRAUSE ET AL., 1991; LIN UND KIM, 1991].

Tabelle II-4 zeigt die Zusammenhänge zwischen dem Redoxpotential des CXXC-Motivs und dem pK_a -Wert des nukleophileren, reaktiveren Cysteins innerhalb des Motivs. An dieser Stelle sei angemerkt, dass die in der Literatur angegebenen Redoxpotentiale stark differieren, beruhend auf unterschiedlichen Versuchsbedingungen und Berechnungen [ASLUND ET AL., 1997]. Bei Thioredoxin ergeben Veränderungen des Dipeptids ein höheres Redoxpotential und einen niedrigeren pK_a -Wert. Das Gleichgewicht zwischen reduziertem und oxidiertem Protein wird hier auf die Seite der im reduzierten Zustand vorliegenden Thiole verschoben. Thiole mit einem niedrigen pK_a -Wert werden leichter ionisiert, woraus eine höhere Reaktionsrate entsteht. Desweiteren bewirken die geringeren pK_a -Werte eine schnellere Spaltung der gebildeten Disulfide, was für einer Isomerasefunktion wichtig ist. Die Nukleophilie des Thiols sinkt allerdings mit fallenden pK_a -Werten, was die Reaktivität wiederum herabsetzt. Diese gegensätzlichen Effekte führen dazu, dass eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit vorliegt, wenn pK_a -Wert und pH-Wert der Umgebung gleich sind [CHIVERS ET AL., 1996]. Wird bei DsbA die Wildtypsequenz durch das Trx-Motiv ausgetauscht, verringert sich das Redoxpotential und der pK_a -Wert ist stark erhöht. Beide Größen scheinen nicht von der Sequenz des gesamten Proteins, sondern von der Sequenz des Dipeptids abhängig zu sein.

Oxidoreduktase	CXXC-Motiv	Redoxpotential E ⁰	pK _a des N-term. Cys
Trx (<i>E. coli</i> , WT)	CGPC	-0,270 V ^{a)}	7,13 ^{d)}
Trx (<i>E. coli</i> , PDI-Motiv)	CGHC	-0,221 V ^{d)} / -0,235 V ^{g)}	6,34 ^{d)}
Trx (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{d)}	CATC	-0,222 V	6,21
Trx (<i>E. coli</i> , DsbA-Motiv) ^{d)}	CPHC	-0,204 V	6,12
Trx (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{a)}	CWGC	-0,200 V	-
Trx (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{d)}	CPYC	-0,195 V	5,86
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CPPC	-0,220 V	6,73
DsbA (<i>E. coli</i> , Trx-Motiv)	CGPC	-0,214 V ^{e)} / -0,217 V ^{h)}	6,21 ^{e)}
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CTRC	-0,175 V	4,76
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CQLC	-0,174 V	4,59
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CPSC	-0,173 V	-
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{e)}	CPYC	-0,157 V	3,75
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CPLC	-0,156 V	4,42
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{e)}	CATC	-0,154 V	4,34
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CSFC	-0,152 V	4,34
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{c)}	CSVC	-0,148 V	4,23
DsbA (<i>E. coli</i> , PDI-Motiv) ^{e)}	CGHC	-0,146 V	3,71
DsbA (<i>E. coli</i> , geänd. Motiv) ^{e)}	CPGC	-0,143 V	4,85
DsbA (<i>E. coli</i> , WT)	CPHC	-0,122 V ^{b)}	3,28 ^{e)} / 3,5 ^{h)}
DsbC (<i>E. coli</i> , WT)	CGYC	-0,159 V ⁱ⁾	-
PDI	CGHC	-0,110 V ^{f)} / -0,190 V ⁱ⁾	6,7
Thiolat im Cystein		- 0,220 V	8,33

Tab. II-4 Vergleich der Redoxpotentiale von Oxidoreduktasen mit verschiedenen CXXC-Motiven und den pK_a-Werten des jeweils N-terminalen, nukleophilen Cysteins. a) CHIVERS ET AL. (1996); b) WUNDERLICH UND GLOCKSHUBER (1993); c) GRAUSCHOPF ET AL. (1995); d) MÖSSNER ET AL. (1998); e) HUBER-WUNDERLICH UND GLOCKSHUBER (1998); f) WUNDERLICH UND GLOCKSHUBER (1994); g) Lundström und Holmgren (1993); h) Aslund et al. (1997); i) ZAPUN ET AL. (1995)

Grundsätzlich kann also festgestellt werden, dass die Proteine der Thioredoxinfamilie weitgehend austauschbar sind. Wird ein Protein in das natürliche Kompartiment eines anderen gebracht, so kann es vielfach die dort benötigten Reaktionen katalysieren. Dies ist besonders dann der Fall, wenn das zwischen den Cysteinen liegende Dipeptid zur Sequenz des entsprechenden Proteins verändert wird.

3.3 Niedermolekulare Thiole

Das Verhältnis von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) bestimmt in großem Umfang die Redoxumgebung der einzelnen Kompartimente und ist für die Übertragung der Redoxäquivalente wichtig. Im Kapitel über die Oxidoreduktasen wurde gezeigt, dass Redoxpotential und pK_a -Wert der aktiven Cysteine der Enzyme die Redox- und Isomerisierungsreaktionen weit mehr beeinflussen als die Proteinstruktur. Organische Thiole, die ähnliche Werte in den beiden Parametern aufweisen, sollten also auch eine Knüpfung oder Isomerisierung von Disulfiden katalysieren können. Für eine native Rückfaltung von entfalteteten und reduzierten Proteinen durch Oxidation von Thiolen zu Disulfiden gibt es unzählige Beispiele. Verschiedene Thiol-Redoxpuffer werden für Ent- und Rückfaltungen von nicht-nativ gefalteten Proteinen (z.B. bei der Reaktivierung von in inclusion bodies ausgefallener Proteine) routinemäßig eingesetzt. Eine reine Isomerisierung ist ebenfalls mit den Thiolen zu erreichen, ist aber auf Grund der höheren Komplexität der Reaktion etwas schwieriger.

Nach CHANG (1994) kann bei einer Rückfaltung von Hirudin (in dieser Arbeit untersuchter Thrombin-Inhibitor) mit Cystin (0,5-4 mM) 90% aktives Protein erhalten werden, in Gegenwart von oxidiertem Glutathion (2 mM) 80 %. Im Gegensatz dazu fanden OTTO UND SECKLER (1991), dass bei Zusatz von oxidiertem Glutathion nur 20% der vorherigen Aktivität wiedergewonnen werden können. Wurde die Rückfaltung unter Zusatz von oxidiertem (1 mM) und reduziertem Glutathion (1-10 mM) durchgeführt, so wurde nach 24 h wieder die volle Aktivität des eingesetzten Hirudins erreicht. Wie die Beispiele zeigen, variieren bei jeder Anwendung Konzentration und Verhältnis des Redoxpuffers. Besonders die Verwendung von Monothiolen gestaltet sich oft komplizierter als erwartet, denn die Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten der Faltungsreaktionen sind nicht direkt abhängig vom Redoxpotential der Pufferlösung [WETLAUFER ET AL., 1987].

Die Isomerisierung falsch geknüpfter Disulfidbrücken ist jedoch etwas problematischer als die reine Oxidation durch Thiole. Wichtige Parameter für eine erfolgreiche Rückfaltung *in vitro* sind zum Einen das Redoxpotential der Disulfidbindung der aktiven Gruppe und die Säure-Dissoziationskonstante pK_a des nukleophilen Thiols. Da die niedermolekularen Thiole die Reaktion der Proteindisulfidisomerase kopieren,

wird auf diese noch einmal detailliert eingegangen. Die Katalyse von PDI beginnt mit einem nukleophilen Angriff des aktiveren (N-terminalen) Thiolats auf eine nicht-native Disulfidbrücke des Proteins. Es resultiert ein intermolekulares Disulfid und ein Thiolat am Substratprotein, welches weitere Disulfid-Umgruppierungen induziert. Bei Erreichen der nativen dreidimensionalen Struktur wird PDI beim Bilden des letzten Disulfids am Proteinsubstrat aus dem Molekülverbund entlassen. Für den gesamten Mechanismus ist also vorwiegend das Vorhandensein des N-terminalen Thiolats und nicht des Disulfids erforderlich. In der Redoxumgebung des ER liegt das aktive Zentrum der PDI zu 33 % in der Thiolatform vor. Trotzdem spielt das C-terminale Cystein des aktiven Zentrums eine Rolle bei der Dissoziation der PDI vom Substratmolekül. Kann das bei der Reduktion des nicht-nativen Disulfids gebildete Substratthiolat keine weiteren Umgruppierungen katalysieren, entsteht eine Sackgasse in der Reaktion. Das ist insbesondere dann der Fall, wenn sich negativ geladene Aminosäurereste neben dem gebildeten Thiolat befinden. Der pK_a des Thiols wird heraufgesetzt, die Aktivität des Thiolats nimmt ab, also auch der Thiol/Disulfid-Austausch. Besitzt das gebildete nicht-native Disulfid benachbarte Aminosäuren mit negativ geladenen Resten, dann sind die Schwefelatome weniger attraktiv für einen nukleophilen Angriff eines Thiolats. Auch dieser Fall würde einen Disulfidaustausch erschweren. PDI (oder ein niedermolekulares Thiol) wäre dann in einem intermolekularen Komplex gefangen. Bei den enzymatischen Reaktionen kann aber mit dem C-terminalen Cystein ein Disulfid gebildet und so PDI aus der Reaktion entzogen werden.

Niedermolekulare Monothiole sollten also generell eine Isomerisierung ermöglichen, es verbirgt sich aber die Gefahr einer sehr langsamen Reaktion durch die oben beschriebenen Sackgassen in der Reaktion. Dithiole dagegen sollten sich besonders gut eignen. Eine vergleichende Darstellung kann anhand von Daten der falsch gefalteten (scrambled) Ribonuclease A (sRNase A) gezeigt werden. HABER UND ANFINSEN (1962) belegten schon früh die Isomerasefähigkeit von β -ME, da sRNase A durch das Thiol wieder aktiviert werden konnte. Die Isomerisierung von sRNase A durch Dithiothreitol (DTT) und Glutathion untersuchten ROTHWARF UND SCHERAGA (1993a, 1993b). Dabei stellte sich heraus, dass DTT RNase A zwar hundertfach langsamer oxidiert als Glutathion, die Isomerisierung von Disulfidbrücken in den Faltungsinter-

mediaten aber wesentlich schneller katalysiert. In einem Vergleich von N-Methylmercaptoacetamid (NMA, Monothiol) und dem dithiolischen Analogon (\pm)-trans-1,2-bis(2-Mercaptoacetamido)cyclohexan (BMC) konnte gezeigt werden, dass BMC durch Isomerisierung von nicht-nativen Disulfiden der sRNase A eine zweifach höhere Ausbeute an aktivem Enzym erzielen kann [WOYCECHOWSKY ET AL., 1999].

	E°' (Thiolat)	pK _a (Thiolat)
PDI	- 180 mV	6,7*
Trx	- 270 mV	7,13*
DsbA	- 122 mV	3,5*
DsbC	- 159 mV	-
BMC ^{a)}	- 241 mV	8,3
NMA ^{a)}	-	8,3
Cystein	- 220 mV	8,33
GSH	- 205 mV	9,0
GSSG	- 252 mV ^{c)}	-
β -ME	- 260 mV ^{c)}	-
DTT	- 327 mV ^{c)}	9,2 ^{b)}

Tab. II-5 Vergleich von Standardredoxpotential und pK_a-Werten von verschiedenen Enzymen und niedermolekularen Thiolen.

* = pK_a des jeweils N-terminalen Cys; a) WOYCECHOWSKY ET AL., 1999; b) LAMOUREUX UND WHITESIDES, 1993; c) LEES UND WHITESIDES, 1993;

4 Proteine

4.1 Tendamistat

Tendamistat ist ein peptidischer α -Amylase-Inhibitor von 74 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 7,96 kDa. Es wird von *Streptomyces tendae* (ATCC 31210) sekretiert und ist in dieser Arbeit als homolog überexprimiertes Modellprotein von Interesse. Tendamistat inhibiert spezifisch α -Amylasen und hat damit eine physiologische Bedeutung in der Regulierung des Kohlenhydratmetabolismus. Es bindet stöchiometrisch und nahezu irreversibel an die α -Amylase, der K_i -Wert für die Hemmung von α -Amylase aus Schweinepankreas liegt zwischen 2×10^{-10} und 9×10^{-12} M und ist pH-unabhängig [VÉRTESY ET AL., 1984]. Bei oraler Applikation ist Tendamistat im Darmtrakt noch voll wirksam und kann durch Hemmung der α -Amylase den Abbau von Stärke dosieren. Eine Anwendung von Tendamistat z.B. bei der Therapie von Diabetis mellitus ist jedoch aufgrund des hohen allergenen Potentials nicht möglich. Tendamistat ist ein saures Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 4,35 und besitzt eine hohe thermische Stabilität ($T_m > 80^\circ\text{C}$).

Die Aminosäuresequenz und die Tertiärstruktur sind schon lange bekannt [ASCHAUER ET AL., 1981]. Durch Röntgenstrukturuntersuchungen und $^1\text{H-NMR}$ -Studien ist Tendamistat ein besonders gut charakterisiertes Protein [PFLUGRATH ET AL., 1986; KESSLER ET AL., 1989]. Rückfaltungsstudien an Tendamistat und vielen Mutationsvarianten konnten sehr viele intramolekulare Wechselwirkungen aufzeigen [SCHÖNBRUNNER, 1997; AYGÜN, 2001]. Die räumliche Struktur wird bestimmt durch zwei dreisträngige, antiparallele β -Faltblätter, die im Uhrzeigersinn gegeneinander verdreht sind. Zwischen den Cysteinen in Position 11 und 27 sowie 45 und 73 sind Disulfidbrücken ausgebildet. Innerhalb der Primärstruktur gliedern sie Tendamistat in eine kleinere und eine größere Schleife. Vier weitere peptidische α -Amylase-Inhibitoren aus Streptomyceten weisen eine ausgeprägte Sequenz- und Strukturhomologie zu Tendamistat auf. Z-2685 aus *Streptomyces parvulus* [HOFMANN ET AL., 1985], AI-3688 aus *Streptomyces aureofaciens* [VÉRTESY UND TRIPIER, 1985], Haim II aus *Streptomyces griseosporus* [MURAI ET AL., 1985] und Paim I aus *Streptomyces corchorushii* [HIRAYAMA ET AL., 1987] besitzen in der ersten,

kleineren Schleife die hochkonservierte Triade Trp-Arg-Tyr, die α -Amylase-Bindestelle.

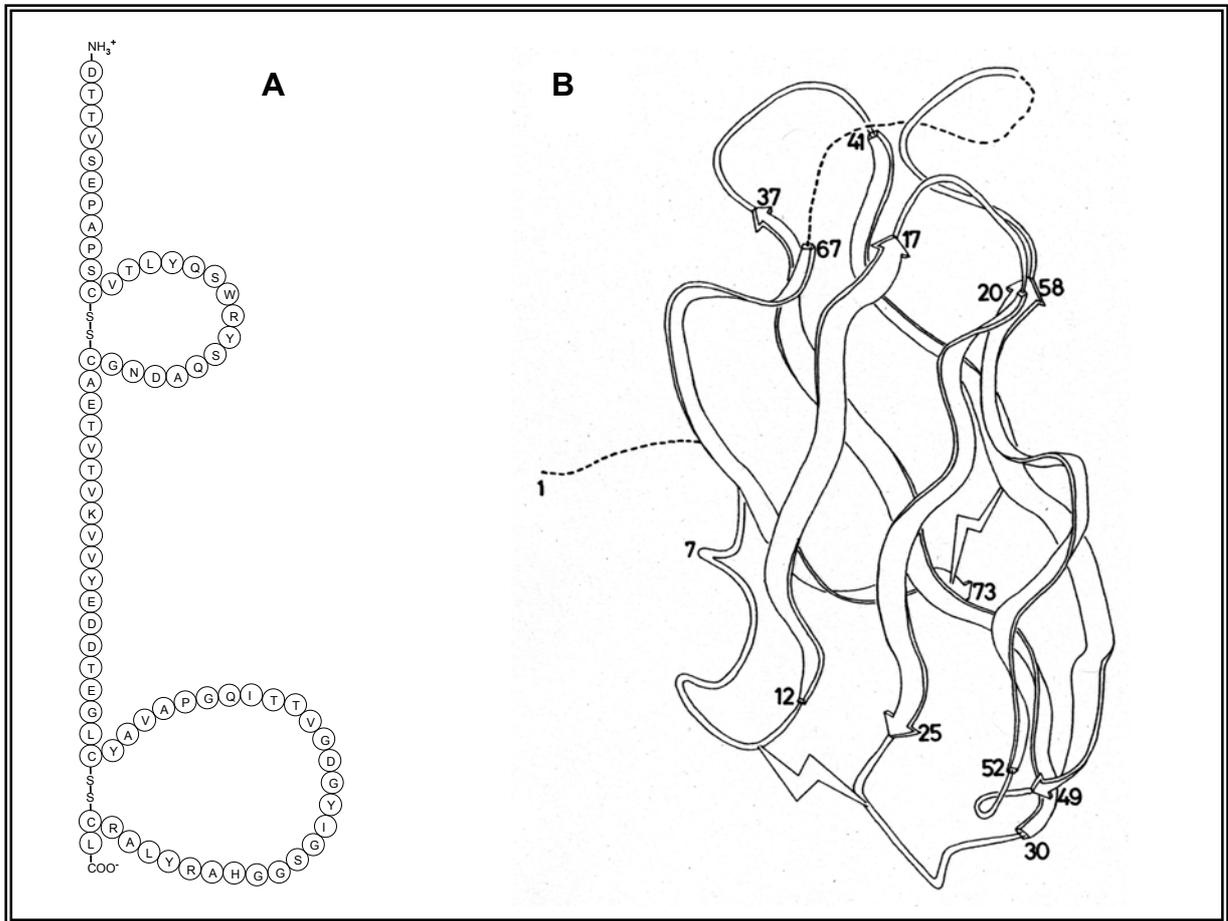


Abb. II-8 **A:** Primärstruktur von Tendamistat (nach ASCHAUER ET AL., 1981) Darstellung der Aminosäuresequenz mit den durch die Disulfidbrücken gebildeten Schleifen. **B:** Sekundärstruktur von Tendamistat (nach KLINE ET AL., 1986) Darstellung des β -barrels, die Disulfidbrücken werden durch Blitzsymbole hervorgehoben.

Tendamistat wird in dieser Arbeit als homologes Modellprotein in den Expressionsstudien eingesetzt. Eines der in den Studien verwendeten Signalpeptide ist das Tendamistat-Signalpeptid.

4.2 Hirudin

Im Speicheldrüsensekret des Blutegels *Hirudo medicinalis* wurde 1884 erstmals von Haycraft eine gerinnungshemmende Wirkung nachgewiesen. Erst 1957 gelang es MARKWARDT, ein Protein mit inhibitorischer Wirkung gegen Thrombin aus dem Blutegel zu isolieren. Im Laufe der Jahre hat sich herausgestellt, dass der als Hirudin bezeichnete Inhibitor eine ganze Proteinfamilie bildet. Mittlerweile sind mehr als 20 verschiedene Hirudin-Homologe isoliert und charakterisiert worden. Sie bestehen alle aus ungefähr 65 Aminosäuren und unterscheiden sich teilweise nur in wenigen Resten. Die minimale Sequenzidentität liegt bei 65%. Auch aus der Egelart *Hirudinaria manillensis* [STEINER ET AL., 1992; SCACHERI ET AL., 1993] und aus *Haemadipsa sylvestris* [STRUBE ET AL., 1993] wurden Hirudinhomologe isoliert und charakterisiert. Im Falle des Haemadin ist die Sequenzidentität sehr gering, aufgrund der gemeinsamen Strukturmerkmale wird es aber dem selben Inhibitor typ zugerechnet.

```

1: VVYTD----CTES-GQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCVTGEGETPKPQSHNDGDFEEIPEE-yLQ
2: ITYTD----CTES-GQNLCLCEGSNVCGKGNKNCILGSQKDNQCVTGEGETPKPQSHNQDFEEIPEDAYde
3: LTYTD----CTES-GQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCVTGEGETPKPQSHNDGDFEEIPEE-YLQ
4: MRYTA----CTES-GQNQCICEGNDVCGQGRNCQFDSSG-K-KCVEGEGtRKPNQEGQHDFFEEIPEE-YLS
5: VSYTD----CTES-GQNYCLCVGGNLCGGGKHCEMDGSG--NKcVDGEGTPKPKSQTEGDFEEIPDEDILN
6: IRFGMGKVPcPDGEVGYTCDC-GEKICLYGQSCN-----DGQC-SGD--PKP-SSEFEFEFEIDEEK

```

Abb. II-9 Sequenzvergleich von Primärstrukturen der Thrombininhibitoren des Hirudintyps aus Blutegeln. (y: Tyrosinschwefelsäureester; t: O-Glykosylierung an Threonin) 1 und 2: natürlich vorkommende Isohirudine [DODT ET AL., 1986], 1 mit posttranslational unverändertem Tyr⁶³ entspricht dem in dieser Arbeit exprimierten Hirudin; 3: rekombinantes Hirudin aus *Saccharomyces cerevisiae*, in dieser Arbeit als Standard verwendet; 4 und 5: Isohirudine aus *Hirudinaria manillensis*; 6: Haemadin aus *Haemadipsa sylvestris*.

Basierend auf der Primärstruktur des aus *Hirudo medicinalis* isolierten Hirudins lassen sich die Peptidmoleküle in zwei Bereiche unterteilen [DODT ET AL., 1985]. Die N-terminale Domäne (Reste 1-48) ist durch drei nicht-konsequente, hochkonservierte Disulfidbrücken verknüpft (Cys⁶-Cys¹⁴, Cys¹⁶-Cys²⁸ und Cys²²-Cys³⁹). NMR-Studien

zeigen einen kompakten Bereich, der aber trotz definierter Tertiärstruktur kaum Sekundärstrukturmerkmale aufweist. Helicale Bereiche existieren nicht, β -Faltblattanteile konnten jedoch identifiziert werden [Folkers et al., 1989; Chatrenet, 1993]. Der C-terminale Bereich (Reste 49-65) besitzt einen hohen Gehalt an sauren Aminosäureresten und bildet keinerlei Sekundärstrukturen aus. Ein zusätzlicher saurer Rest wird durch die posttranslationale Bildung eines Tyrosinschwefelsäureesters an Position 63 erreicht. Aufgrund des hohen Anteils von sauren Aminosäuren liegt der isoelektrische Punkt der Isohirudine bei $pI=3.8-4,0$ [MARKWARDT, 1957]

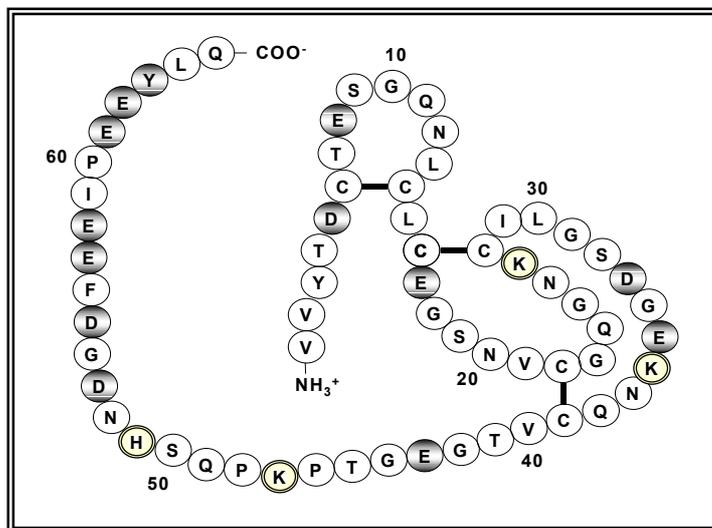


Abb. II-10 Kovalente Struktur des in dieser Arbeit exprimierten Isohirudins [nach DODT ET AL., 1985]

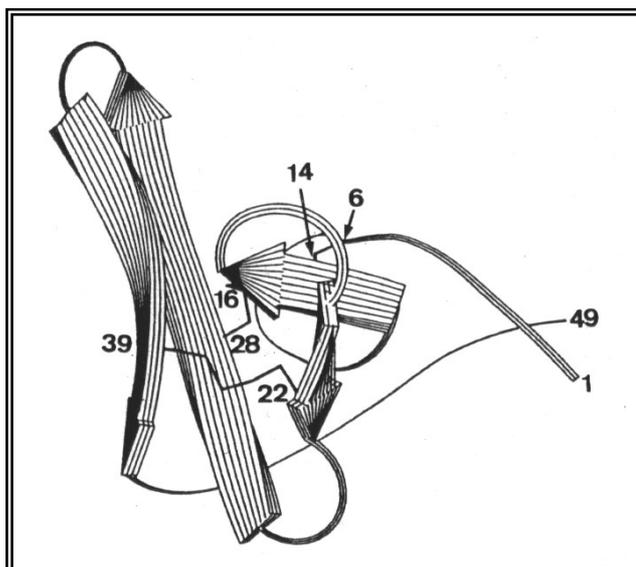


Abb. II-11 Sekundärstruktur des N-terminalen Bereichs von Hirudin (übernommen von CHATRENET UND CHANG, 1993)

4.2.1 Pharmazeutische Eigenschaften

Hirudin zählt zu den Antikoagulantien und inhibiert mit Thrombin das Schlüsselenzym der Blutgerinnung. Die Bildung von Thrombin in der Blutgerinnungskaskade ist Ursache jeder Gerinnselbildung. Dabei übt Thrombin sowohl enzymatische als auch hormonähnliche Funktionen aus, die die Blutgerinnung verstärken und abschwächen können [FENTON II UND BING, 1986; FENTON II, 1988].

Thrombin ist eine Trypsin-ähnliche Serinprotease mit einer ausgeprägten Spezifität gegenüber makromolekularen Substraten. Das aktive Zentrum geht in eine Furche über, die die Funktion einer Fibrinogen-Bindungsstelle (FBS) besitzt. Hier befinden sich viele positiv geladene Aminosäurereste, die mit dem Substrat Salzbrücken bilden. Ohne diese Wechselwirkung wäre die Bindung zu Makromolekülen zu schwach.

Natürliches Hirudin reagiert mit α -Thrombin sehr schnell zu äquimolaren Komplexen [STONE UND HOFSTEENGE, 1986]. Aus der Kristallstruktur eines Thrombin/r-Hirudin-Komplexes wurde ersichtlich, dass Hirudin ein bivalenter Inhibitor ist [RYDEL ET AL., 1990; GRÜTTER ET AL., 1990]. Im Komplex liegt die N-terminale, disulfidverbrückte Domäne (Reste 1-48) über dem aktiven Zentrum des Thrombins und verhindert so den Zugang von Substraten. Das N-terminale Tripeptid von Hirudin wird im Komplex durch eine Salzbrücke positioniert. Die freie α -Aminogruppe des N-Terminus von Hirudin bildet Wasserstoffbrücken zu zwei Serinen des Thrombins, der Phenylring von Tyr³ paßt sich in eine Aryl-Bindungsstelle ein [BETZ ET AL., 1992]. Die Peptidkette des Hirudin N-Terminus ist dabei parallel zu den Resten Ser²¹⁴-Gly²¹⁶ ausgerichtet, was einer unnatürlichen Orientierung entspricht [LOMBARDI ET AL., 1996]. Die natürliche Orientierung eines Substrates wäre eine antiparallele Ausrichtung. Der größte Teil der N-terminalen Domäne wechselwirkt jedoch nicht mit Thrombin. Die C-terminale Kette von Hirudin liegt in Lösung völlig ungeordnet vor, nimmt im Komplex aber eine gestreckte Konformation an und besetzt mit den Positionen Pro⁴⁸-Gln⁶⁵ die FBS. Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Enzymen beruhen dabei auf Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen.

Hirudin inhibiert Thrombin direkt und spezifisch, wobei die Inhibierung kompetitiv ist. Die Assoziationsgeschwindigkeit ist nur abhängig von der Ionenstärke, nicht von der Substratkonzentration. Der Reaktionsmechanismus wurde durch Stopped-Flow-Messungen untersucht [JACKMANN ET AL., 1992]. Die Reaktion beginnt mit dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Anlagerung des C-Terminus, nach einer Konformationsänderung wechselwirkt im dritten Schritt der N-Terminus mit dem aktiven Zentrum.

Hirudin hat sich bei medizinischen Behandlungen und in Toxizitätstests als besonders verträglich herausgestellt [zusammengefaßt von DODT, 1995]. Es findet keine nachweisbare Antikörperbildung statt, bei einfacher Pharmakokinetik ist die Bioverfügbarkeit hoch. Der größte Vorteil von Hirudin gegenüber dem zweiten wichtigen Antikoagulant Heparin ist die direkte Inhibierung des Thrombin. Heparin wirkt als Cofaktor des Plasmaproteinaseinhibitors Antithrombin III (AT III) und dieser Komplex kann zum Einen nicht das Thrombin innerhalb eines Gerinnsels inhibieren, zum Anderen wird die Konzentration des Komplexes durch andere Enzyme reguliert. Die Pharmakokinetik ist daher sehr komplex und die Einstellung der therapeutischen Dosis ist besonders bei Patienten mit genetisch bedingtem AT III-Mangel schwierig.

Obwohl Heparin trotz der oben dargestellten Nachteile wichtigstes Antithrombolytikum ist, kann während der Behandlung die sehr ernst zu nehmende Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) auftreten, die sich in zwei Formen zeigt. HIT I bewirkt nach 1 bis 2 Tagen der Heparin-gabe ein flüchtige, asymptomatische Absenkung der Blutplättchenzahl. Diese Auswirkung verschwindet jedoch wieder spontan. HIT II dagegen hat eine immunologische Ursache. Die Thrombozytopenie entsteht ca. fünf Tagen nach der Heparin-gabe und kann bei venöser und arterieller Thrombose kaum von den zu behandelnden Symptomen unterschieden werden. Der Beginn einer Thrombozytopenie ist unabhängig von der Dosierung, der Einnahmehäufigkeit und der Applikation. Sie kann nur behandelt werden durch eine Substitution von Heparin durch Heparinoide oder direkt wirkende Thrombininhibitoren wie Hirudin [FABRIS ET AL., 2000].

Erst in den siebziger Jahren wurden die durch Heparin induzierten Komplikationen entdeckt und werden seitdem dokumentiert. Heparin bewirkt aufgrund der HIT bei 3-5 % der Patienten eine ernsthafte Morbidität und führt sogar zu einer erhöhten

Mortalitätsrate [MESSMORE, 1999]. Nachdem verkürzte („low molecular weight“-) Heparine (LMWH) und Heparinoide in den Blickpunkt der Forschung gerieten, gewinnen seit Beginn der neunziger Jahre auch Studien mit Hirudin als Ersatz für Heparin an Bedeutung. Neuere Untersuchungen zeigen, dass rekombinantes Hirudin (r-Hirudin, z.B. Lepirudin) nicht nur bei der Behandlung von HIT wirksam ist, sondern eventuell auch bei anderen Indikationen [GREINACHER UND LUBENOW, 2001].

Nachdem die Struktur von Thrombin und seine Funktion innerhalb der Blutgerinnung immer differenzierter geklärt werden konnten, wurde dieses Wissen im Proteindesign von Hirudinanaloga umgesetzt. Da Hirudin ein bivalenter Inhibitor ist, wurden der N-Terminus (AS 1-48) und die 17 C-terminalen AS getrennt betrachtet. In den ersten Ansätzen wurden zunächst nur die Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen synthetischen C-Termini von Hirudin (Hirugene) und der Fibrinogen-Bindestelle (FBS) von Thrombin untersucht. Aus Kristallstrukturdaten wurde geschlossen, dass sich die Wechselwirkungen der C-terminalen Hirudinpeptide mit der FBS sehr gut mit denen des Gesamtproteins vergleichen lassen. Die Aktivität des Reaktionszentrums von Thrombin wird dabei nicht beeinflusst [SKRZYPCZAK-JANKUN ET AL., 1991]. Aus den Hirugenen wurden dann die bivalenten Inhibitoren (Hiruloge, Hirunorme) entwickelt, die ebenso an die FBS binden und zusätzlich mit dem aktiven Zentrum von Thrombin wechselwirken. Eine Aufstellung der Aminosäuresequenzen und der Inhibitorwirkung der verschiedenen Hirudinmimetika ist in Tabelle II-6 dargestellt.

In aktuellen klinischen Studien sollen die pharmakologischen Vorteile von Hirudin und seinen Mimetika gezeigt werden. Gelingt dies, so können r-Hirudin und seine Analoga als direkte Thrombininhibitoren bei einigen Indikationen das Medikament der Wahl werden [MARKWARDT, 2001].

Parallel zu den pharmakologischen Studien wurde auch die Analytik von Hirudin verfeinert. R-Hirudin mit FITC-Marker (Fluoresceinisothiocyanat) wird mit Hilfe von Antikörpern HPLC-gereinigt und mit Kapillarelektrophorese (CE) detektiert. Der CE-basierende Immunoessay ist eine sensitive und spezifische Methode, in der laserinduzierte Fluoreszenz und Immunoessay kombiniert werden und die eine quantitative Analyse von r-Hirudinen in biologischen Sekreten ermöglicht [BAN ET AL., 2001].

	Sequenz und Wechselwirkung mit Thrombin	K_i
Hirudin ^{a)}	Native Sequenzen und Struktur. Der N-Terminus des Hirudin bildet ein unnatürliches paralleles Faltblatt mit den Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Thrombins, der C-Terminus besetzt mit den Resten Pro ⁴⁸ -Gln ⁶⁵ die FBS.	$2,2 \times 10^{-14} \text{ M}$
r-Hirudin	Native Sequenzen und Struktur, ohne Sulfatgruppe an Tyr ⁶³ . Inhibitorwirkung identisch zu Hirudin	$2,3 \times 10^{-13} \text{ M}^{\text{d)}$
Hirutonin ^{b)}	N-acetyl-Asn-Gly ⁵⁴ -Leu ⁶⁴ , C-Terminus nach Hirudin, mit Sulfonsäureester an Tyr ⁶³ . Monovalenter Inhibitor, wechselwirkt mit der FBS.	
Hirulog ^{c)}	Sequenz: (D-Phe)-Pro-Arg-Pro-Glycinlinker-Asp ⁵⁵ -Gln ⁶⁵ , kein Sulfonsäureester an Tyr ⁶³ . Bivalenter Inhibitor: N-terminale AS sind antiparallel am aktiven Zentrum orientiert, die AS hinter dem Glycinspacer wechselwirken mit der FBS identisch zum nativen Hirudin.	1: $3,3 \times 10^{-10} \text{ M}^{\text{d)}$
Hirunorm ^{a),d)}	Sequenz: (IV) Chg-Arg-2Nal-Thr-Asp-(D-Ala)-Gly-βAla-Pro-Glu-Ser-His-hPhe-Gly-Gly-Asp-Tyr-Glu-Glu-Ile-Pro-Aib-Aib-Tyr-Cha-(D-Glu); (V) hat ein Val ² . Bivalenter Inhibitor: N-Terminus (1-5) mit paralleler Ausrichtung, die AS 9-26 imitieren die Wechselwirkung des C-Terminus mit der FBS, vergleichbar mit den AS 48-65 im natürlichen Hirudin.	IV: $1,3 \times 10^{-10} \text{ M}^{\text{d)}$ V: $2,5 \times 10^{-10} \text{ M}^{\text{d)}$

Tab. II-6 Zusammenfassung von Sequenzen und Strukturen von Hirudin und seinen Analogen und Mimetika. a) RYDEL ET AL., 1990; LOMBARDI ET AL., 1996a, b) SKRZYPCZAK-JANKUN ET AL., 1991, c) MARAGANORE ET AL., 1990, d) CAPIELLO ET AL., 1996. Aib (α -Aminoisobuttersäure), β -Ala (β -Alanin), Cha (Cyclohexylalanin), Chg (Cyclohexylglycin), 2Nal (β -2-Naphthylalanin), hPhe (Homophenylalanin).

Rekombinantes Hirudin wird von verschiedenen Firmen durch unterschiedliche Formen der Überexpressionen hergestellt. Das in dieser Arbeit als Standard verwendete Hirudin (HBW023, LTYT-Variante) wurde von Hoechst Marion Roussel mit Hilfe der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Den gleichen Hefe-Stamm nutzten die Firma Transgene für die Produktion einer Lys⁴⁷-Variante [RIEHL-BELLON ET AL., 1989; ACHSTETTER ET AL., 1992] und die Firmen Plantorgan, Novartis und Ciba-Geigy, um die Variante HV1 herzustellen [HEIM ET AL., 1994]. Rhein Biotech stellt ebenfalls die Variante HV1 her, nutzt dafür aber den Stamm *Hansenula polymorpha*, bei dem das Hirudingen in das Genom integriert wurde [WEYDEMANN ET AL., 1995]. Die

rekombinanten Hirudine HM1 und HM2 wurden auch aus dem Periplasma von *E. coli* isoliert [SCACHERI ET AL., 1993], ebenfalls die HVI-Variante [DODT, 1986]. Nicht-kommerziell wurde kürzlich die Überexpression von Hirudin in der Hefe *Pichia pastoris* erreicht [CAI UND FANG, 2001].

4.2.2 Faltung

Hirudin weist eine sehr hohe Temperaturstabilität auf. Nach starkem Erhitzen einer Hirudinlösung nahm die Aktivität der Thrombin-Inhibition nicht ab [HAYCRAFT, 1884; MARKWARDT, 1957;]. Differenziertere Angaben konnten OTTO UND SECKLER (1991) mit Hilfe der CD-Spektroskopie machen. Sie beobachteten einen reversiblen thermischen Übergang bei 65°C. Aus den Daten entnehmen sie, dass es sich bei Hirudin um ein Zwei-Zustands-Protein mit einer freien Standardenthalpie von etwa 20 kJ/mol (25°C) handelt. Damit ist die thermische Stabilität niedriger als bei anderen Disulfid-verbrückten Proteinen dieser Größe. Neben der thermischen Stabilität behält Hirudin auch bei hohen Salzkonzentrationen seine Struktur. So konnte Hirudin bei einer Konzentration von 6M Guanidiniumhydrochlorid nicht denaturiert werden. Das gelang erst nach Zugabe einer hohen Konzentration an Thiolreagenz, durch die die Reduktion der Disulfidbrücken und die vollständige Entfaltung des Proteins gelang. Bei Entfernen des Denaturierungs- und Thiolreagenzes und Zufügen eines Glutathionpuffers wurde aktives Hirudin mit nativer Struktur erhalten [CHANG, 1991 und 1994].

Die Faltung von Hirudin wurde eingehend untersucht, weil sich der Faltungsweg des Hirudin von den bis dahin vorwiegend untersuchten Proteinen Trypsin-Inhibitor BPTI und RNase A zu unterscheiden schien und alternative Modellsysteme hilfreich für das Verständnis der Proteinfaltung sein würden. Für Hirudin liegen mittlerweile zwei Theorien zur Faltung vor, abhängig von den Redoxbedingungen während der Rückfaltung.

CHATRENET UND CHANG (1992 und 1993) untersuchten die Faltung des N-terminalen Bereichs von reduziertem Hirudin (Hirudin¹⁻⁴⁹; Aminosäuren 1-49) unter der Annahme, dass der C-Terminus die Qualität der Faltung nicht beeinflusst. Bei Vergleichen der Rückfaltung von natürlichem Hirudin (65 AS) und dem verkürzten

Hirudin (Hirudin¹⁻⁴⁹) wurde zwar eine Behinderung der Faltung durch den C-Terminus nachgewiesen, sie äußerte sich aber nur in einer langsameren Bildung der vergleichbaren Menge an nativem Hirudin. Aus der Rückfaltung in Gegenwart und Abwesenheit von β -Mercaptoethanol (β -ME) wurde ein biphasischer Faltungsmechanismus postuliert, in dem die Bildung der Disulfidbrücken statistischen Gesetzmäßigkeiten unterliegt. Es wurde gezeigt, dass der Anteil der 6 Cysteine am Disulfidaustausch gleich hoch ist und somit ein „trial and error“-Mechanismus vorherrscht. Damit würde sich Hirudin deutlich vom Faltungsmechanismus des BPTI abheben. Sie postulierten, dass in der ersten Phase der Faltung hydrophobe Wechselwirkungen zu einer kollabierten Struktur führen, die dann die ersten einfach disulfidverbrückten Intermediate bildet, aus denen dann die zweifach verbrückten hervorgehen u.s.w. In der zweiten Phase wird aus der dreifach verbrückten Spezies durch spezifische Interaktionen die native Struktur gebildet. Die irreversible Abfolge von sequentiell verlaufenden Disulfidverbrückungen wurde aus der Heterogenität der einzelnen Disulfid-Spezies geschlossen wurde. Bei der Rückfaltung in Abwesenheit von β -ME gehen die Autoren davon aus, dass die freien Cysteine im Protein als Thiolreagenz fungieren. Je mehr Disulfidbrücken im Protein vorhanden sind, desto geringer ist der Anteil an freiem Cystein und desto eher findet eine Akkumulierung einer falsch verbrückten Spezies statt. Bei einer Rückfaltung in Gegenwart von β -ME konnte dagegen bis zu 100% aktives Hirudin¹⁻⁴⁹ erhalten werden.

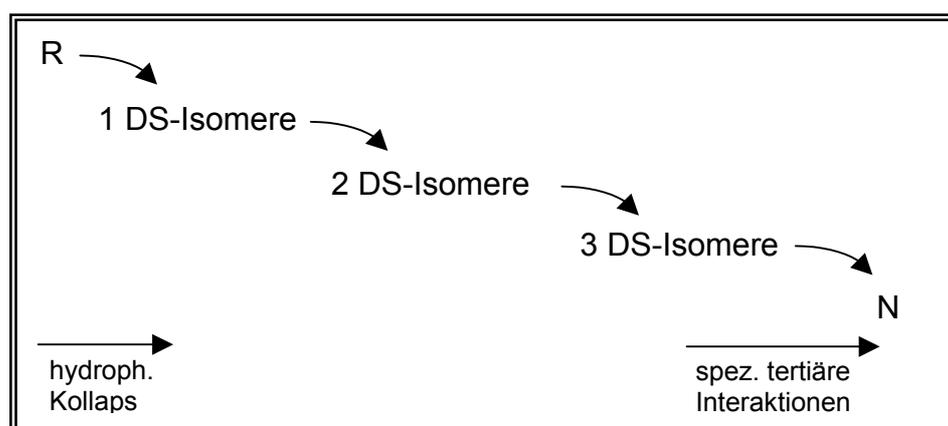


Abb. II-12 Rückfaltungsmodell von Hirudin nach CHATRENET UND CHANG (1993). Die auftretenden Isomere liegen jeweils im Gleichgewicht vor. R (reduziertes Protein), 1 DS (Isomere mit einer Disulfidbrücke), 2 DS (zwei Disulfidbrücken), 3 DS (drei Disulfidbrücken, falsch verbrückt), N (vollständig nativ gefaltetes Protein).

Einen etwas anderen Faltungsweg beschreiben THANNHAUSER ET AL. (1997). Sie untersuchten die Regeneration des reduzierten, entfalteten rHV1, einer rekombinanten Hirudinvariante. Als Rückfaltungsmedium wurden Lösungen mit oxidiertem und/oder reduziertem Dithiothreitol (DTT) bei pH 8,3 und 12°C unter anaeroben Bedingungen eingesetzt. Die Kinetik wurde unter der Annahme bestimmt, dass die reduzierte Spezies mit den verschiedenen intramolekular disulfidverbrückten Intermediaten im Gleichgewicht steht. Der Weg zum nativen Protein kann nur durch eine höhere Energiebarriere überwunden werden; dieser Weg stellt dann den entscheidenden Schritt in der Faltung dar. Nach Auswertung der kinetischen Daten wurde über 90% des regenerierten Proteins in verschiedenen Redoxpuffern über den in Abb. II-13 gezeigten Weg rückgefaltet. Die Autoren gehen davon aus, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur Bildung des nativen Proteins die Oxidation der 2S-Spezies mit zwei nativen Disulfidbrücken zur 3S*-Spezies mit drei nativen Disulfiden ist, da der intramolekulare Disulfidaustausch innerhalb der Intermediatgruppe 2S um den Faktor 10^2 - 10^4 schneller ist als die Oxidation oder Reduktion der Disulfidbrücken. Diese Theorie wird unterstützt durch die Beobachtungen von CHATRENET UND CHANG (1993), die in einem Glutathion-Redoxpuffer eine schnellere Bildung des nativen rHV1 erzielten. Die stärker oxidierenden Bedingungen eines Glutathion-Puffers beschleunigen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Oxidation zum dritten Disulfid.

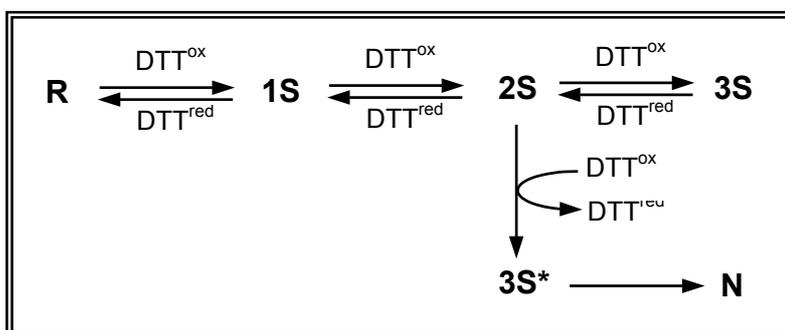


Abb. II-13 Rückfaltungsmodell von Hirudin nach Thannhauser [übernommen von THANNHAUSER ET AL., 1997]. Die Zustände R, 1S, 2S und 3S liegen im Gleichgewicht vor. R (reduziertes Protein), 1S (Protein mit einer Disulfidbrücke), 2S (zwei Disulfidbrücken), 3S (drei Disulfidbrücken, falsch verbrückt), 3S* (drei Disulfidbrücken, richtig verbrückt), N (vollständig nativ gefaltetes Protein).

Das 3S*-Intermediat kann kinetisch nicht von dem nativen Protein unterschieden werden, es bildet sehr schnell den nativen Zustand aus. Die Kinetik der Umwandlung $2S \rightarrow 3S^*$ wird bestimmt über die Konzentrationen von 2S und DTT^{ox}.

Auf die verschiedenen Ansätze zur Rückfaltung von Hirudin mit verschiedenen niedermolekularen Thiolen und Enzymen wird im Kapitel IV eingegangen.

4.3 Thioredoxin

Thioredoxine sind hitzestabile Oxidoreduktasen mit einer Größe von 11 bis 12 kDa. Sie sind ubiquitär in Tieren, Pflanzen und Bakterien verbreitet. Die Struktur von Thioredoxin (Trx) wurde innerhalb der Familie der Oxidoreduktasen zuerst aufgeklärt und war namensgebend für die ganze Enzymfamilie. Innerhalb der konservierten dreidimensionalen Struktur liegt die Konsensussequenz des aktiven Zentrums, das CXXC-Motiv.

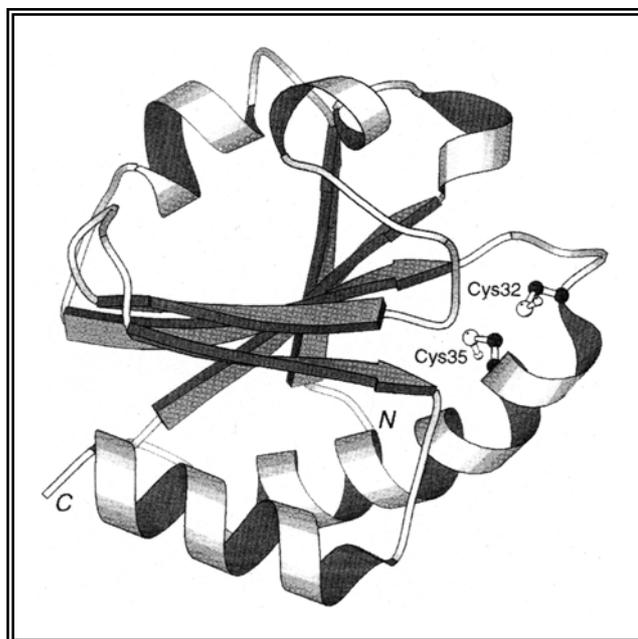


Abb. II-14 *Dreidimensionale Struktur von reduziertem E. coli Thioredoxin. Übernommen von CHIVERS ET AL., 1996.*

Die für diese Arbeit wichtigen strukturellen Eigenschaften und die katalytischen Fähigkeiten im Bereich der Proteinfaltung sind bereits ausführlich in Kapitel II-3.2 beschrieben worden.

Thioredoxin wird über die Thioredoxin-Reduktase regeneriert, die je nach Umgebung ihre Reduktionsäquivalente aus verschiedenen Quellen bezieht. In der Photosynthese übernimmt Thioredoxin generelle enzymatisch-regulative Funktionen und wird über das mit der Elektronentransport-Kette in Verbindung stehende Ferredoxin und

die Trx-Reduktase regeneriert. Ebenfalls in Pflanzen, aber auch in Mitochondrien, dem Endoplasmatischen Retikulum und im Cytoplasma ist das NADP/Thioredoxin-System beheimatet, in dem NADPH die Reduktionsäquivalente liefert [BUCHANAN ET AL., 1994a].

Thioredoxinen werden vielfältige zelluläre Aufgaben zugeschrieben, z.B. Desoxyribonukleotidsynthese, Proteinfaltung und -regulation, und die Beeinflussung des oxidativen Stresses [GRANT, 2001]. Die Variabilität in der Funktion von Thioredoxin liegt zum Teil an der Fähigkeit, Disulfidbrücken zu reduzieren, die gegenüber anderen Reduktanten der Zellkompartimente stabil sind. Auch die denkbaren technischen und medizinischen Einsatzgebiete sind sehr vielfältig. So bewirken Zusätze des NADP/ Thioredoxin-Systems zu Mehl eine verbesserte Qualität bei der Verarbeitung. Thioredoxin reduziert selektiv intramolekulare Disulfidbindungen in Weizenproteinen, die dann eine intermolekulare Verknüpfung eingehen. In Tierversuchen wurden bei einem ähnlichen Zusatz eine verringerte allergene Wirkung von Soja, Milch und Weizen festgestellt [BUCHANAN ET AL., 1994a]. Eine andere Studie von BUCHANAN ET AL. (1994b) belegt, dass reduziertes Thioredoxin Neurotoxine im Gift von Schlangen, Skorpionen und Bienen vermindern kann.

In dieser Arbeit wird Thioredoxin als Oxidoreduktase in den *in vitro*-Rückfaltungen mit Hirudin eingesetzt. Es handelt sich dabei um rekombinantes Thioredoxin aus *E. coli* mit einem Molekulargewicht von 11,7 kDa. Der Extinktionskoeffizient A_{280} ist 13.700. Für die Coexpressionen wurde das Gen aus *S. coelicolor* [REDENBACH ET AL., 1996] amplifiziert, in den entsprechenden Vektor inkloniert und überexprimiert.

III Aufgabenstellung

***In vitro*-Rückfaltungen von Hirudin**

Ein Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit ist die Expression von Hirudin. Da Hirudin fast ausschliesslich in einer inaktiven, nicht nativ gefalteten Form exprimiert wird, sollten zunächst einige die Hirufinfaltung beeinflussenden Faktoren genauer betrachtet werden. Dazu sollten in *in vitro*-Rückfaltungen Parameter wie pH-Wert, Temperatur und der Zusatz von verschiedenen Thiolen zum Rückfaltungsansatz untersucht werden. Als zusätzliche Thematik sollte der Effekt eines Zusatzes der Oxidoreduktase Thioredoxin auf die Hirudinfaltung betrachtet werden.

Expression von Hirudin

In verschiedenen Kultivierungen von *S. lividans* sollte der Einfluss von dem Medium zugefügten Thiolen auf die Expression von Hirudin untersucht werden. Da der Zusatz von Thioredoxin in den *in vitro*-Rückfaltungen sehr gute Ergebnisse erzielte, sollte der Schwerpunkt der Kultivierungen in einer gleichzeitigen Expression von Hirudin und Thioredoxin liegen. Daher sollten zunächst verschiedene Expressionssysteme generiert werden, die eine gleichzeitige Produktion beider Proteine ermöglichen und diese Konstrukte in anschließenden Kultivierungen getestet werden.

Vergleichende Expressionen mit verschiedenen Signalpeptiden

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit ist der Vergleich der Expression eines Proteins in *S. lividans* über ein Expressionssystem, in dem einzig das Signalpeptid differiert. Zum Einen sollte das bereits gut untersuchte, homologe Streptomyceten-Protein Tendamistat exprimiert werden, zum Anderen das heterologe Blutegel-Enzym Hirudin. Zunächst sollte für beide Proteine ein Vektor-Kassetten-System entwickelt werden, in dem die Signalsequenzen beliebig ausgetauscht werden können. In Kultivierungen sollten dann Expression, Sekretion und im Fall des Hirudins auch die Faltung des produzierten Proteins miteinander verglichen werden.

IV *In vitro*-Rückfaltungen von Hirudin

In einem oxidativen Faltungsweg sind neben den Eigenschaften der Aminosäureseitenketten die Bildung von nativen oder nicht-nativen Disulfidbrücken von entscheidender Bedeutung. Für Proteine, die spontan zurückfalten, ist die thermodynamische Stabilität der nativen Struktur die treibende Kraft. Der Faltungsweg verläuft selten so geradlinig, dass nacheinander native Disulfidbrücken gebildet werden, bis die richtige Konformation innerhalb der Faltung erreicht ist. Vielmehr entstehen auch Intermediate mit nicht-nativen Verknüpfungen, die dann aber auf alternativen Faltungswegen zum nativen Konformer führen. Ein Protein mit 6 Cysteinen, die drei Disulfidbrücken bilden, kann in 15 verschiedenen Variationen vorliegen, die im Faltungsweg mögliche Anzahl von Kombinationen mit unvollständig verknüpften Cysteinen liegt sogar bei 75. Dabei sind nicht alle Zustände thermodynamisch gleich begünstigt, da die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen, bedingt durch die in der Peptidkette vorhandenen Reste, Interaktionen von bestimmten Cysteinen begünstigt. Die Stabilität einer Disulfidbrücke in ungefalteten Proteinen oder kleinen Peptiden ohne signifikante Sekundärstruktur hängt stark von der Anzahl der dazwischen liegenden Aminosäuren ab. Bei einem Abstand von weniger als acht Aminosäuren zwischen den verknüpften Cysteinen wird eine gerade Anzahl von Resten gegenüber einer ungeraden Anzahl um das 2 bis 10fache bevorzugt [ZANG UND SNYDER, 1989]. Liegen geladenen Reste benachbart zu den Cysteinen, wird die Stabilität der Disulfidbrücke stark beeinflusst. Positive Ladungen wirken stabilisierend auf reduzierte Cysteine, durch die herabgesetzte Nukleophilie, bzw. einem herabgesetzten pK_a -Wert des Thiols sind entstehende Disulfidbrücken weniger stabil [CREIGHTON, 1997].

Die *in vitro*-Rückfaltung von cysteinhaltigen Proteinen wird in der Regel in thiolhaltigen Redoxpuffern durchgeführt. Dabei werden zunächst die gemischten Protein/Thiol-Disulfide gebildet. Über die gemischten Disulfide erfolgt schließlich die intramolekulare Brückenbildung des Proteins. Das Thiolreagenz wird dabei reduziert und kann die eben gebildeten Brücken wieder durch Reduktion spalten, bzw. Thiol/Disulfid-Umlagerungsreaktionen katalysieren. In Abbildung IV-1 ist der schematische

Ablauf der Disulfid-Brückenbildung über ein gemischtes Protein/Thiol-Disulfid dargestellt.

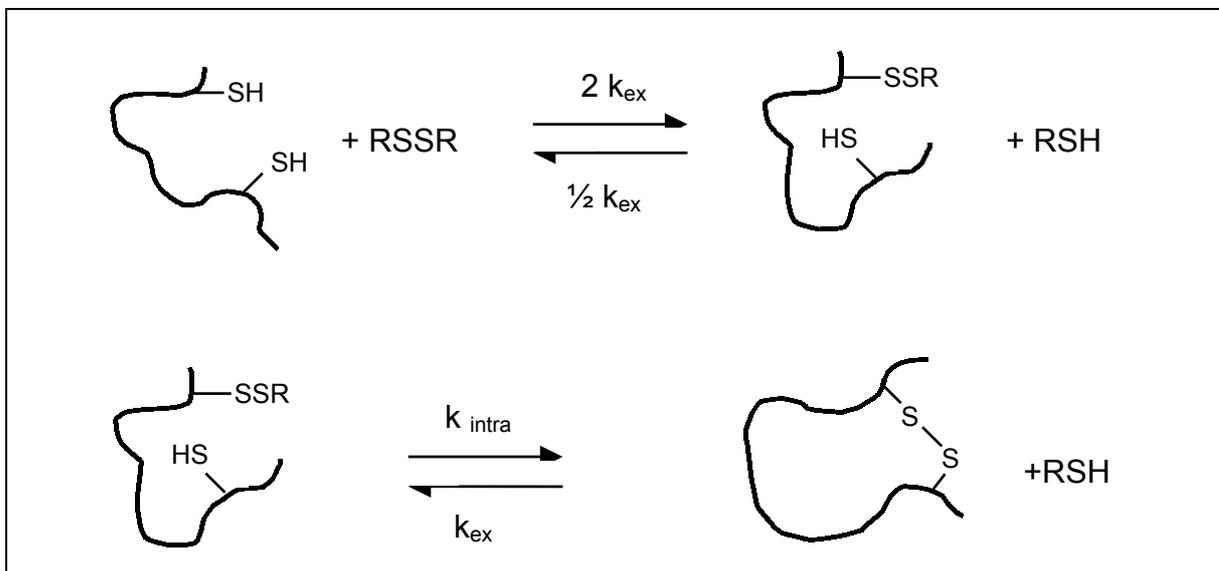


Abb. IV-1 Bildung von Protein-Disulfidbindungen durch Thiol/Disulfidaustausch mit Thiolreagenzien. Thiolform (RSH); Disulfidform (RSSR). Abb. übernommen von CREIGHTON, 1997.

Hirudin weist in seiner Aminosäuresequenz sechs Cysteine auf, die nicht-konsekutiv zu drei Disulfiden verknüpft sind. Bei der rekombinanten Überexpression in Streptomycceten und auch bei Rückfaltungsversuchen wurde die Beobachtung gemacht, dass Hirudin in einer inaktiven, nicht-nativen Form vorliegt [WOJCZEWSKI, 1999]. Auf Grund verschiedener Annahmen (siehe Diskussion) wird hier von einer Falschfaltung auf Grund falsch verbrückter Disulfide ausgegangen. Um diese nicht-native Faltung näher zu charakterisieren und den Einfluss von verschiedenen Reagenzien und Enzymen zu untersuchen, wurden die folgenden *in vitro*-Rückfaltungen von Hirudin vorgenommen.

1 Rückfaltung bei verschiedenen pH-Werten

Hirudin wird zunächst mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid und 100 mM Dithioerythritol (DTE) bei Raumtemperatur über Nacht entfaltet und die Disulfidbrücken reduziert. Nach dem Entsalzen über eine PD10-Säule werden Aliquots mit bekanntem

Hirudingehalt mit konzentrierten Puffern verschiedener pH-Werte versetzt, um den Einfluss der pH-Werte auf die Rückfaltungen zu betrachten.

Die Detektion der Konformere des rückgefalteten Hirudins erfolgt anhand einer Auftrennung in einem Nativgel. Bei dieser Art der Elektrophorese erfolgt die Wanderung der Proteine in Abhängigkeit von Nettoladung und Konformation. Bei gleicher Ladung bestimmt die Mobilität des Proteins die Wanderungsgeschwindigkeit. Im Falle des Hirudins kann so zwischen den verschiedenen Konformationen (Faltungen) des Proteins unterschieden werden.

Abbildung IV-2 zeigt die Auftrennung der verschiedenen Faltungskonformere, die bei einer Rückfaltung in verschiedenen pH-Werten entstehen. Auf der Spur 1 ist der Rückfaltungsansatz in Minimalmedium aufgetragen, der pH-Wert von 8,0 wird hier mittels eines Phosphatpuffers eingestellt. Diese Spur ist durch die Salzeffekte des Mediums etwas breiter als die benachbarten. Spur 2 zeigt ebenfalls einen Ansatz bei pH 8,0, der hier durch einen Tris/HCl-Puffer eingestellt wurde. Die Rückfaltung von Hirudin bei pH 6,0 (Spur 3) wurde in einem MES/NaOH-Puffer, bei pH 4,0 (Spur 4) in mit HCl eingestelltem A. dest durchgeführt. Deutlich sichtbar ist der Laufunterschied zwischen dem nativen Hirudin (unterste Bande) und den nicht-nativen Konformeren, die erheblich langsamer durch das Gel laufen. Das nicht-native rückgefaltete Hirudin

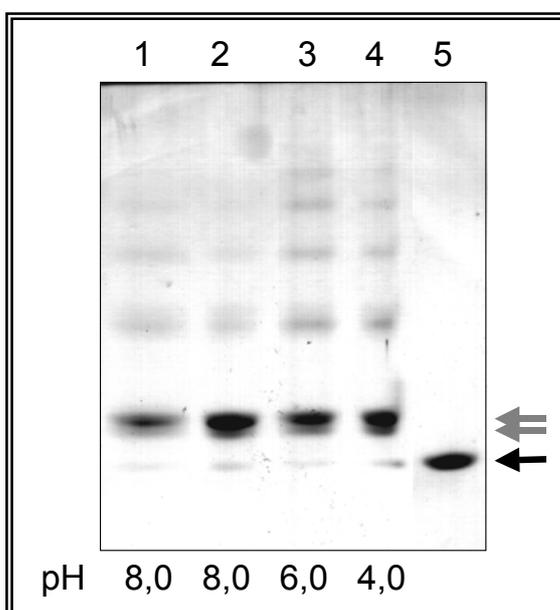


Abb. IV-2

Rückfaltung von Hirudin bei Raumtemperatur und verschiedenen pH-Werten, Komponenten aufgetrennt in einem Nativgel, Silberfärbung. Jede Spur enthält 10 µg Hirudin, 1-4: Rückfaltungsansätze; 5: Hirudin Standard.

→ : nativ gefaltetes Hirudin

→ : nicht-nativ gefaltetes Hirudin

bildet eine charakteristische Doppelbande aus. Diese Doppelbande wurde schon von WOJCZEWSKI (1999) beobachtet und findet sich auch in gelchromatographischen Auftrennungen von Kulturüberständen (diese Arbeit, Kapitel V). Zusätzlich zu den drei Hauptbanden treten weitere schwache Banden auf, die Oligomere von Hirudin enthalten (siehe Kapitel IV-2).

Grundsätzlich sind keine großen Unterschiede auf den verschiedenen Spuren des Gels zu erkennen. In allen Ansätzen ist der Anteil von nativem Hirudin sehr gering, bei den Rückfaltungen entsteht vorwiegend falsch gefaltetes Hirudin. Ebenfalls bei allen Ansätzen erkennbar ist die bevorzugte Bildung des höher laufenden nicht-nativen Hirudins. Einziger Unterschied in allen Ansätzen ist die vermehrt auftretende Oligomerbildung bei den beiden niedrigeren pH-Werten.

Der pH-Wert und auch die Art und Konzentration des Salzes im Puffer kann bei der Rückfaltung von Proteinen eine entscheidende Rolle spielen. So beobachteten CHATRENET und CHANG (1992, 1993), dass in einem NaHCO_3 -Puffer bei pH 8,7 in Rückfaltungen kein natives Hirudin gebildet wurde. In einem Tris/HCl-Puffer bei pH 8,3 wurde nach 11 h etwa 30 % natives Hirudin erhalten. Bei Rückfaltungen mit zusätzlich enthaltenen Thiolen ergab die Änderung der Pufferkonzentration von 20 auf 100 mM Tris eine Steigerung der Ausbeute an nativem Protein, ebenso verbesserte die Erhöhung von 0,2 auf 4 M NaCl die Rückfaltung. In den in dieser Arbeit beschriebenen Rückfaltungen wurde im pH-Bereich von 8 neben einem Tris-Puffer auch Minimalmedium eingesetzt, da dieses das Medium der Wahl bei den späteren Expressionen sein sollte. Das Minimalmedium ist ein Phosphatpuffer mit verschiedenen Salzen und Aminosäuren (s. Kapitel VIII), die eventuell die Faltung beeinflussen können. In Bezug auf die Menge des gebildeten nativen Hirudins kann aber kein erheblicher Unterschied zwischen der Rückfaltung in Tris-Puffer und den in Minimalmedium festgestellt werden.

Die reine Änderung des pH-Wertes beeinflusst die pK_a -Werte der Schwefelatome in Thiolen, bzw. Disulfiden entscheidend. Thiolgruppen von Cysteinen besitzen einen pK_a -Wert von ca. 8,7, der aber durch die Umgebung stark beeinflusst wird. So werden in einem unpolaren Umfeld oder bei benachbarten negativen Resten höhere pK_a -Werte erreicht. Negativ geladene Aminosäurereste neben dem Disulfid setzen also den pK_a -Wert des Thiols herauf, dadurch sinkt die Aktivität des Thiolats und die

Intensität des Thiol/Disulfid-Austausches nimmt ab. Zusätzlich sind Disulfide mit benachbarten negativ geladenen Resten weniger attraktiv für einen nukleophilen Angriff von Thiolaten. Auch das setzt die Aktivität beim Disulfidshuffling herab. Dagegen verringern positiv geladene Reste in unmittelbarer Nähe den pK_a -Wert des Thiols und bewirken gegensätzliche Effekte. Bei Ionenkonzentrationen oberhalb von 20 mM beziehen sich diese elektrostatischen Effekte nur auf die benachbarten Aminosäuren [SNYDER ET AL., 1981]

Bei einem relativ hohen pH der Lösung werden diese Einflüsse aber relativiert, liegt z. B. der pH-Wert bei 8,7, besitzen verschiedene Thiolgruppen in einem Protein sehr ähnliche pK_a -Werte. Bei noch höheren, aber besonders bei niedrigeren pH-Werten, vergrößern sich die Unterschiede der Reaktivitäten der verschiedenen Thiole. Ein Thiol mit einem pK_a -Wert, der um eine pH-Einheit niedriger liegt, reagiert bei einem pH von 7,4 fünfmal schneller als bei pH 8,7 [DARBY UND CREIGHTON, 1993].

Bei der Faltung von Hirudin entstehen offensichtlich sehr leicht zwei nicht-native Konformere, die äußerst stabil sind. Betrachtet man die benachbarten Aminosäurereste der im Hirudin enthaltenen Cysteine, so können sehr unterschiedliche Effekte postuliert werden. Im nativ verdrückten Hirudin sollte die Disulfidbindung zwischen Cys⁶ und Cys¹⁴ am stabilsten sein, da hier ein Aspartat den pK_a -Wert des einen Cysteins stark heraufsetzt (siehe Abb. IV-3). Die Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁶ und Cys²⁸ wird einerseits durch Glu¹⁷ stabilisiert, gleichzeitig aber durch Lys²⁷ destabilisiert. Die Bindung zwischen Cys²² und Cys³⁹ wird nicht durch benachbarte geladene Reste beeinflusst. Betrachtet man das reduzierte Hirudin zu Beginn der oxidativen Rückfaltung, so wäre die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys⁶ und Cys¹⁶ denkbar. Dieses Disulfid wäre auf Grund seiner zwei benachbarten negativ geladenen Reste sehr stabil und wäre bei einem niedrigen pH-Wert der Rückfaltungslösung einem Disulfidshuffling weit stärker entzogen als andere Disulfidbrücken.

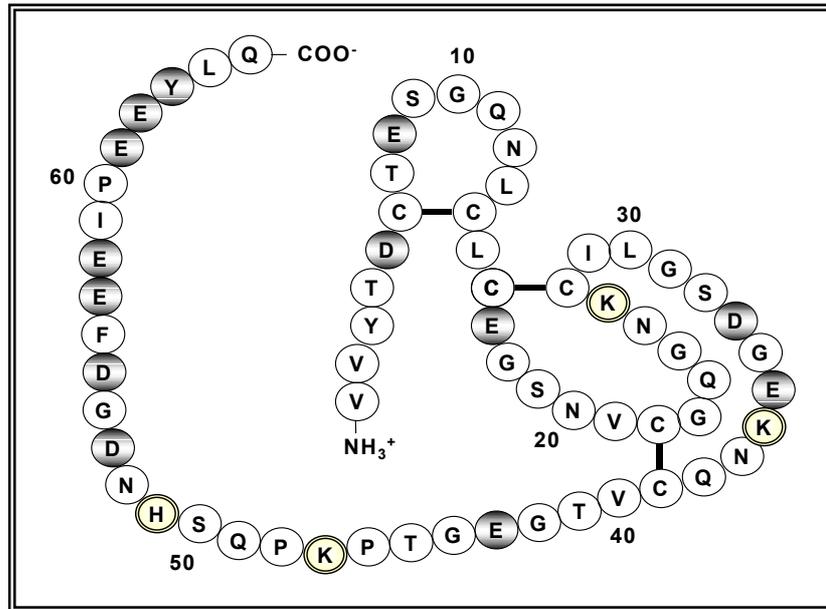


Abb. IV-3 Struktur des nativ disulfidverbrückten Hirudins [nach DODT ET AL., 1985]

Generell sollte das Disulfidshuffling bei pH-Werten von 8 und höher begünstigt sein, da dann alle Thiolgruppen im Protein sehr ähnliche pK_a -Werte aufweisen und eine Bevorzugung der Disulfidbrücken nur auf Grund der energetischen Verhältnisse gegeben sein sollte. Wäre dann die native Konformation die energetisch bei weitem günstigste, sollten nicht-native Zustände zurückgedrängt werden. Da dies anhand der durchgeführten Rückfaltungen nicht beobachtet werden konnte, lassen sich folgende Aussagen postulieren:

Das Auftreten von zwei bestimmten nicht-nativen Konformeren läßt den Schluß zu, dass in dem oxidativen Faltungsweg zunächst in großem Umfang nicht-native Disulfidbrücken ausgebildet werden.

Die resultierenden nicht-nativen Konformere des Hirudins sind sehr stabil, da es in geeigneter Umgebung nicht zu einem Disulfidshuffling in Richtung nativer Struktur kommt.

2 Rückfaltung mit Glutathion

In der vorhandenen Literatur zu thiolgestützten Rückfaltungen von Hirudin fanden sich zum Teil widersprüchliche Aussagen. Darüber hinaus sind die verschiedenen Ansätze oft nicht miteinander vergleichbar, da sie in der Rückfaltungstemperatur, dem pH-Wert des Puffers und seiner Ionenstärke und der Thiolkonzentration differieren. Daher sollte in eigenen Rückfaltungsansätzen Ergebnisse unter vergleichbaren Bedingungen produziert werden. Die hier dargestellten Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur und bei 4°C durchgeführt. Die Ansätze enthalten verschiedene Mengen an reduziertem und/ oder oxidiertem Glutathion.

Der Zusatz von 10 mM reduziertem Glutathion (GSH) und einem 2:1-Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH:GSSG, Redoxpuffer) bei 4°C führt zu fast 100 % nativ rückgefaltetem Hirudin (Abb. IV-4). Bei einem Zusatz von 10 mM GSSG zum Rückfaltungsansatz entsteht eine gleiche Verteilung zwischen nativ und nicht-nativ gefaltetem Hirudin. Werden die vergleichbare Ansätze bei Raumtemperatur gehalten, entsteht ein anderes Bild der Rückfaltungen. Die Bildung von nativ gefaltetem Hirudin ist zwar gegenüber der Rückfaltung ohne Thiolzusatz erhöht (vgl. Abb. IV-2), der Anteil an nicht-nativer Hirudinspezies ist aber sowohl bei GSH-

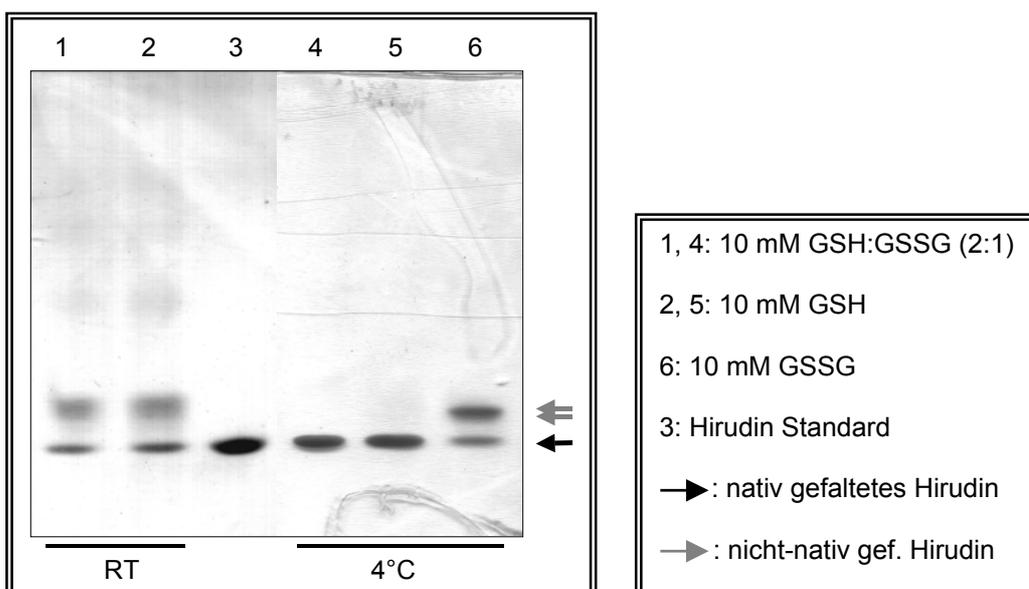


Abb. IV-4 Rückfaltung von Hirudin bei GSH- und GSSG-Zugabe bei 4°C und RT (pH-Wert 8,0; Tris/HCl, 15 mM).

Zugabe als auch bei der Zugabe des Redoxpuffers gegenüber der Rückfaltung bei 4°C deutlich erhöht.

Die angeführten Ergebnisse ließen auf eine Temperaturabhängigkeit der Faltung schließen, die für den Zusatz von reduziertem Glutathion genauer untersucht werden sollte. Ebenso sollte abgeschätzt werden, inwieweit verschiedene Konzentrationen des Thiols die Rückfaltung beeinflussen.

Bei der Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurden daher jeweils Ansätze mit 1 mM und 10 mM reduziertem Glutathion betrachtet. Im Gel der Abb. IV-5 wird deutlich, dass die Rückfaltung mit 1 mM GSH wesentlich bessere Ergebnisse erzielt als die Rückfaltung mit 10 mM. Beim Zusatz von 10 mM GSH wird natives Hirudin als Hauptprodukt gebildet, die beiden nicht-nativen Konformere sind aber ebenfalls entstanden. Die Präferenz zur nativen oder nicht-nativen Form wird, wie schon in Abb. IV-4 gefunden, durch die Temperatur beeinflusst. Je höher die Temperatur in den Rückfaltungsansätzen, desto größer ist der Anteil an nicht-nativ gefaltetem Hirudin. Beim Zusatz von 1 mM GSH dagegen wird fast ausschließlich natives Hirudin gebildet. Während bei den niedrigen Temperaturen noch geringe Banden der nicht-

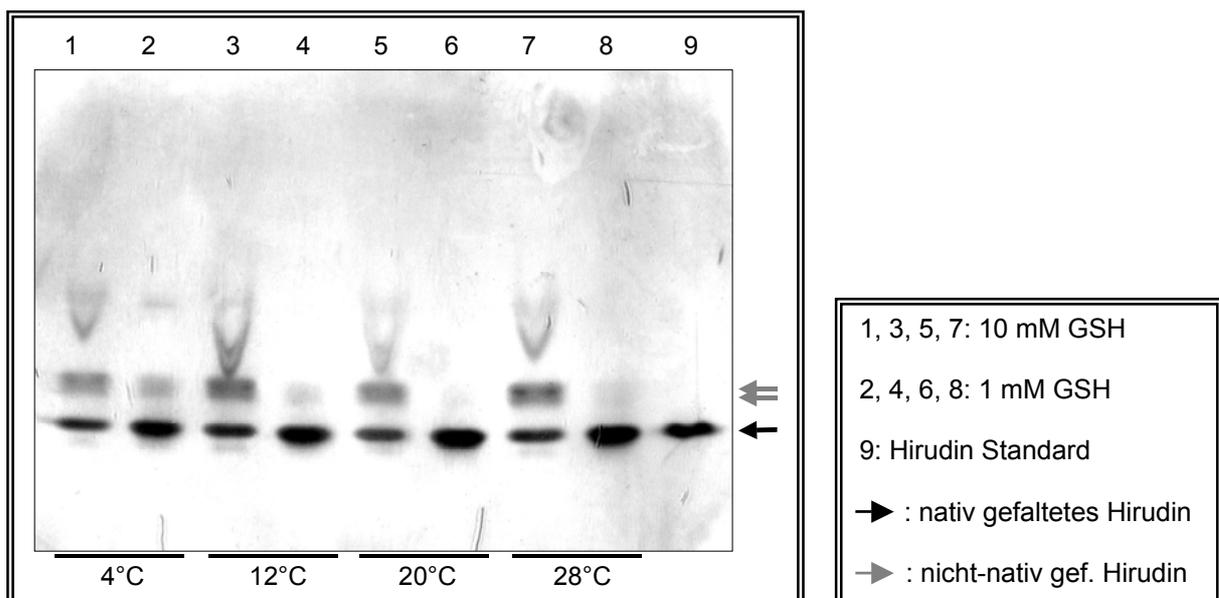


Abb. IV-5 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei GSH-Zugabe und einem pH von 8,0 (Tris/HCl, 15 mM).

nativen Spezies erkennbar sind, liegt bei höheren Temperaturen das native Konformer zu fast 100% vor. Alle Ansätzen zeigen darüber hinaus gleich stark gefärbte Banden. Das lässt auf gleiche Mengen von Hirudin in jeder Spur schließen.

Im Theorieteil wurde auf die zwei in der Literatur beschriebenen postulierten Faltungswege von Hirudin nach CHATRENET UND CHANG (1992 und 1993) und THANNHAUSER ET AL. (1997) eingegangen. Verschiedene Thiole führten dort zu verschiedenen Rückfaltungswegen. Um die Auswirkungen von verschiedenen Thiolen im Zusammenhang mit einer Temperaturabhängigkeit zu betrachten, wurden die folgenden Rückfaltungen durchgeführt.

3 Rückfaltungen mit anderen Thiolen

Wie bei den Ansätzen mit reduziertem Glutathion wurde den Rückfaltungsansätzen N-Acetylcystein (NAC) in den Konzentrationen von 1 und 10 mM zugesetzt. Bei beiden Konzentrationen und bei allen Temperaturen ist eine Oligomerbildung zu erkennen (Abb. IV-6), die in den 1 mM-Ansätzen besonders stark ausgeprägt ist. Bei 4°C existiert keine Bevorzugung eines bestimmten Konformers, das native, die beiden nicht-nativen und die Oligomierzustände liegen in gleichen Konzentrationen vor. Mit 1 mM NAC liegt bei höheren Temperaturen zunehmend eine nicht-native Spezies von Hirudin vor. Bei 10 mM NAC entsteht bei höheren Temperaturen keinerlei Präferenz zu einem bestimmten Konformer. Es fällt jedoch auf, dass die Spuren der 10 mM-Ansätze insgesamt weniger Hirudin enthalten, obwohl in jeder Spur die gleiche Menge aufgetragen wurde. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass eventuell noch reduziertes Hirudin im Ansatz vorlag, das auf Grund der nicht verknüpften Cysteine im Gel eine wesentlich höhere Ladung ausweist und so schneller durch das Gel transportiert wird. Bei dem pH-Wert von 8,9 im Trenngel weist Hirudin eine negative Nettoladung von 14 auf (berechnet über „Gateway to Isoelectric Point Service“, www.embl.heidelberg.de). Die Thiole des reduzierten oder teilweise reduzierten Hirudins würden eine mindestens um 2 erhöhte Ladung aufweisen und wären unter den gegebenen Bedingungen nicht detektierbar.

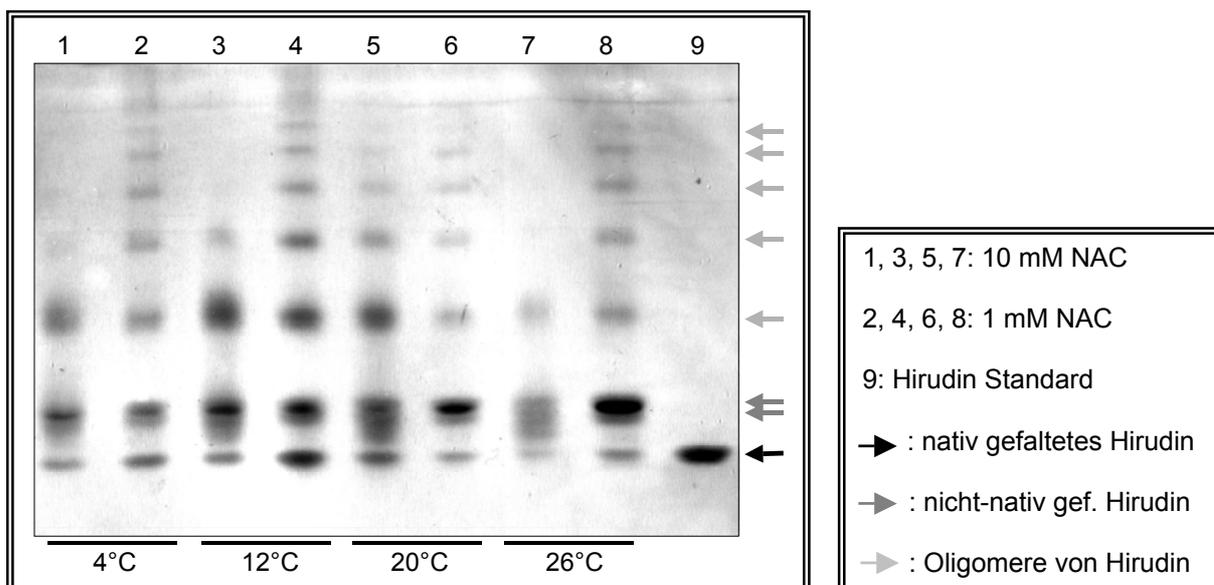


Abb. IV-6 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei NAC-Zugabe, pH 8,0 (Tris/HCl, 15 mM)

Während bei der Rückfaltung mit reduziertem Glutathion nur in sehr geringem Umfang eine Temperaturabhängigkeit der Faltung zu sehen war, ist bei den hier beschriebenen Rückfaltungen ein deutlicher Einfluss sichtbar. Bei niedrigen Temperaturen ist keine Bevorzugung eines bestimmten Faltungszustandes erkennbar. Eine statistische Bildung der Disulfidbrücken und somit ein gleich hoher Anteil der 6 Cysteine am Disulfidshuffling würde einem „trial and error“-Mechanismus folgen, wie er für Hirudin postuliert wurde. Da bei höheren Temperaturen aber eine deutliche Bevorzugung eines Konformers vorliegt, scheint hier das Überwinden bestimmter Energiebarrieren möglich zu sein.

Die Rückfaltungen mit 1 und 10 mM Dithioerythritol zeigen ein ähnliches Bild wie die Ansätze mit NAC. Die oben beschriebenen Beobachtungen treten jedoch noch deutlicher auf. Auch hier scheint die Konzentration von 10 mM DTE ein so stark reduzierendes Umfeld zu generieren, dass das Hirudin teilweise noch reduziert vorliegt und auf dem Gel nicht detektiert werden kann. Dies ist erkennbar an den wesentlich schwächer gefärbten Banden im Gel (Abb. IV-7); alle Spuren sollten die gleiche Menge an anfärbbarem Hirudin enthalten. Eine Temperaturabhängigkeit der Rückfaltungen bei 10 mM DTE kann nicht festgestellt werden, das Verhältnis von nativ zu nicht-nativ rückgefaltetem Hirudin ändert sich bei zunehmender Temperatur nicht.

Bei Zusatz von 1 mM DTE liegt bei zunehmender Temperatur wie bei den Ansätzen mit 1 mM NAC eine Präferenz zum höherlaufenden nicht-nativen Konformer des Hirudins vor. Wie bei den Ansätzen mit NAC tritt eine starke Oligomerbildung auf, die sich bei den DTE-Rückfaltungen jedoch nur auf die Ansätze mit einer Konzentration von 1 mM DTE beschränkt. Die Bildung von Oligomeren ist bei höherer Temperatur weniger ausgeprägt.

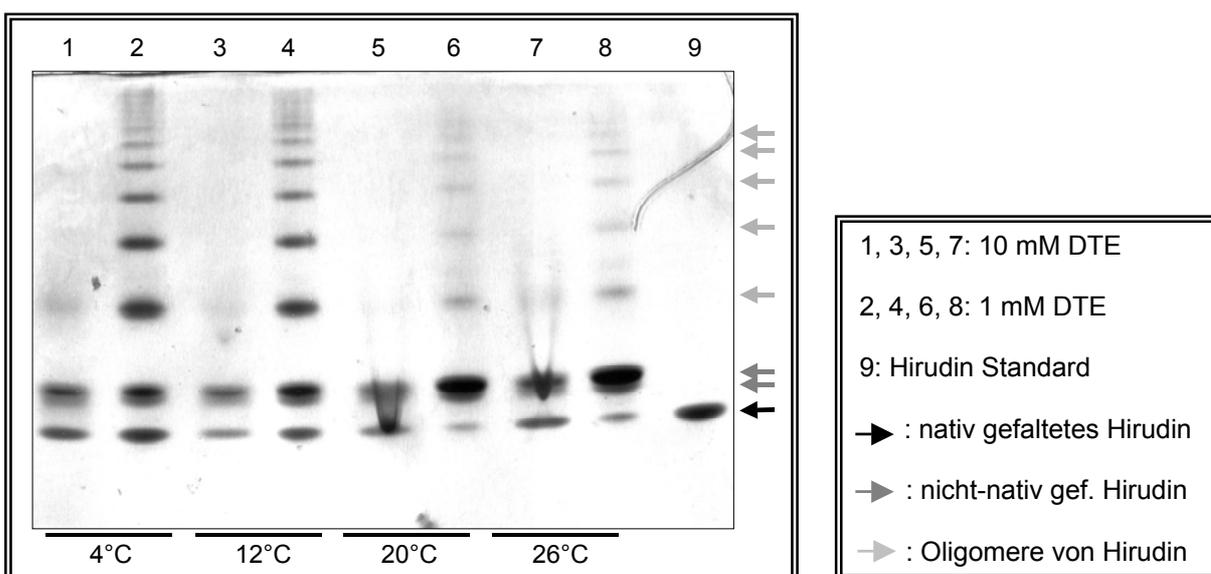


Abb. IV-7 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei DTE-Zugabe, pH 8,0 (Tris/HCl, 15 mM).

Der Anteil an nativ gefaltetem Hirudin-Konformer ist bei den verschiedenen Rückfaltungsansätzen sehr unterschiedlich. Ein einheitlicher Effekt kann weder der Temperatur noch der Art des Thiols zugeschrieben werden. Durch Vergleiche der verschiedenen Ansätze und auch durch Vergleiche mit der Literatur (s. nächste Seite) kann einzig der pH-Wert als fester Parameter ausgewiesen werden. Danach existiert ein pH-Optimum von ca. 8,0 bis 9,0. Rückfaltungsansätze mit abweichenden pH-Werten resultieren in geringerem Anteil an nativ rückgefaltetem Hirudin. Eine Zusammenfassung der experimentell ermittelten Daten, ergänzt durch die verfügbaren Literaturdaten, gibt die Tabelle IV-1 wieder.

Thiolzusatz	pH	Puffersystem	Rückf.-Temp.	nat. Hirudin (Zeit)	Ref.
-	6,0	MES/NaOH, 15 mM	20°C	~ 5% (20 h)	1
-	8,0	Tris/HCl, 15 mM	20°C	~ 5% (20 h)	1
-	8,3	Na-Bicarbonat, 50 mM	23°C	30% (11 h)	2
-	8,7	Tris/HCl, 0,1 M	k.A.	~ 20% (1,5 h)	3
β-ME, 100 μM	8,3	Na-Bicarbonat, 50 mM	23°C	85% (11 h)	2
DTT ^{ox} , 50 mM	8,0	k. A.	12°C	10% (8 h)	4
DTT ^{ox} , 150 mM	8,0	k. A.	12°C	20% (8 h)	4
DTE ^{red} , 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 20% (20 h)	1
DTE ^{red} , 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 5% (20 h)	1
DTE ^{red} , 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 20% (20 h)	1
DTE ^{red} , 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 20% (20 h)	1
NAC, 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 30% (20 h)	1
NAC, 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 20% (20 h)	1
NAC, 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 20% (20 h)	1
NAC, 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 10% (20 h)	1
GSH, 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 80% (20 h)	1
GSH, 1 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 100% (20 h)	1
GSH, 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 80% (20 h)	1
GSH, 10 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	26°C	~ 60% (20 h)	1
GSSG, 1mM	8,3	Na-Bicarbonat, 50 mM	23°C	80% (15 h)*	3
GSSG, 1mM	8,5	Tris/HCl	25°C	20% (24 h)	5
GSSG, 10mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 30% (20 h)	1
GSH, 1mM + GSSG, 1mM	4,0	HCOOH/NaOH, 0,1 M; KCl, 0,2 M	25°C	- (4 h)	6
	6,0	Na-Phosphat, 0,1 M	25°C	~ 25% (24 h)	5
	7,0	Na-Phosphat, 0,1 M	25°C	60% (24 h)	5
	8,0	Tris/HCl	25°C	100% (24 h)	5
	8,7	Tris/HCl, 0,1 M; KCl, 0,2 M	25°C	100 % (4 h)	6
	9,0	Tris/HCl	25°C	100% (24 h)	5
	9,4	Na-Corbonat	25°C	~ 90% (24 h)	5
	11,0	Na-Corbonat	25°C	~ 90% (24 h)	5
GSH, 6 mM +	8,0	Tris/HCl, 15 mM	4°C	~ 100% (20 h)	1
GSSG, 3 mM	8,0	Tris/HCl, 15 mM	20°C	~ 30% (20 h)	1

Tab. IV-1 *Aufstellung der Ausbeute von nativem Hirudin bei verschiedenen Rückfaltungsansätzen. Ref. 1 (diese Arbeit), 2 (CHATRENET UND CHANG, 1992), 3 (CHATRENET UND CHANG, 1993), 4 (THANNHAUSER ET AL., 1997), 5 (OTTO UND SECKLER, 1991), 6 (WUNDERLICH ET AL., 1993) k.A. (keine Angabe), ox (oxidiert), red (reduziert), * (Hirudin¹⁻⁴⁹)*

4 Oligomerbildung

Zusätzlich zu den in den Gelen der Rückfaltungsansätze detektierten Banden von nativem und nicht-nativem Hirudin konnten noch zahlreiche höherlaufende Hirudinbanden detektiert werden. Die Bestimmung der Laufstrecken aus dem Gel der Abbildung IV-7 und die logarithmische Auftragung der Laufstrecken gegen die potentielle Anzahl der Hirudinmoleküle im vermeintlichen Oligomer ergibt eine Gerade. Durch diese graphische Auswertung wird die Vermutung untermauert, dass die zusätzlich auftretenden Banden tatsächlich durch intermolekular verknüpfte Hirudinoligomere verursacht werden. Aus dem Diagramm (Abb. IV-8) ist ebenfalls zu entnehmen, dass die nicht-nativ gefalteten Hirudinmoleküle exakt auf der Regressionsgeraden der Oligomere liegen, das native Konformer aber etwas darüber. Daraus lässt sich zunächst ableiten, dass das native Hirudin im Gel eine höhere Laufgeschwindigkeit hat als die nicht nativ gefalteten Proteine. Da bei gleicher Nettoladung nur die Mobilität des Proteins die Wanderungsgeschwindigkeit bestimmt, liegt mit dem nativ gefalteten Hirudin also ein kompakteres Protein vor.

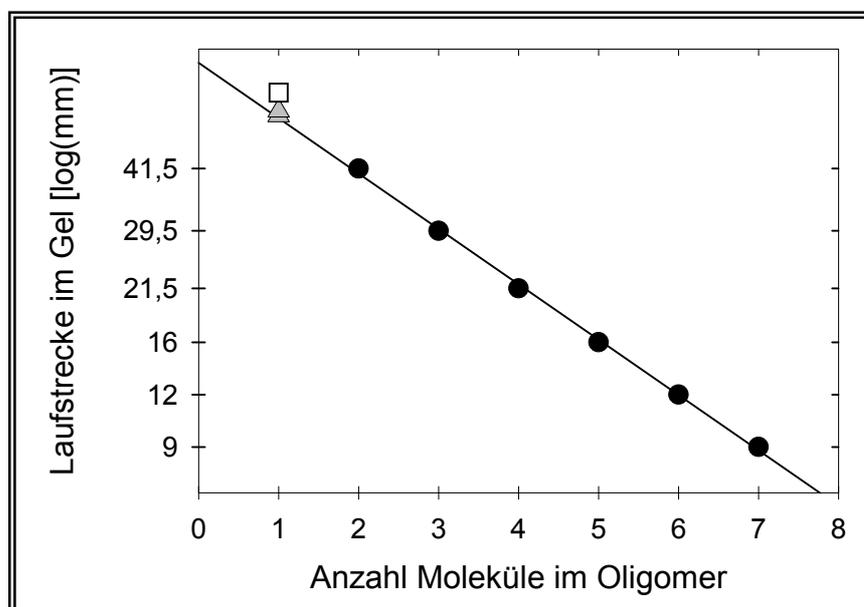


Abb. IV-8 Logarithmische Auftragung der Laufstrecken der verschiedenen Banden von Hirudin. Kreise: Oligomere; Quadrat: natives Konformer; Dreiecke: nicht-native Konformere

5 Trennung der nicht-nativen Hirudin-Konformere

Die nicht-nativen Konformere des Hirudins treten in den Nativgelen als Doppelbande in Erscheinung. Da die einzelnen Banden sich überlagern, sollte eine Trennung der beiden Konformere zeigen, dass es sich tatsächlich um zwei isolierte Zustände handelt.

Um die nicht-nativen Konformere des Hirudins zu erhalten, wurde zunächst Standard-Hirudin wie in Kapitel IV-1 beschrieben entfaltet und in Phosphatpuffer ohne weitere Zusätze bei pH 8,0 rückgefaltet. Unter diesen Bedingungen wird fast ausschließlich nicht-natives Hirudin erhalten. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot des Rückfaltungsansatzes auf einem Nativgel aufgetragen und analysiert (siehe Abb. IV-10 A). Im Gel erkennbar sind nur die nicht-nativen Konformere, alle weiteren Spezies wie Oligomere oder natives Hirudin sind zu einem so kleinen Anteil enthalten, dass sie nicht detektiert werden können.

Die Trennung der Konformere erfolgte via HPLC mit einer reversed phase-Säule. Um eine Überladung der Säule zu vermeiden, wurde der gesamte Ansatz in drei identischen Läufen (0, 1 und 2) aufgetrennt. Da das Auftrennungsmuster leicht differierte, werden hier alle drei Chromatogramme gezeigt.

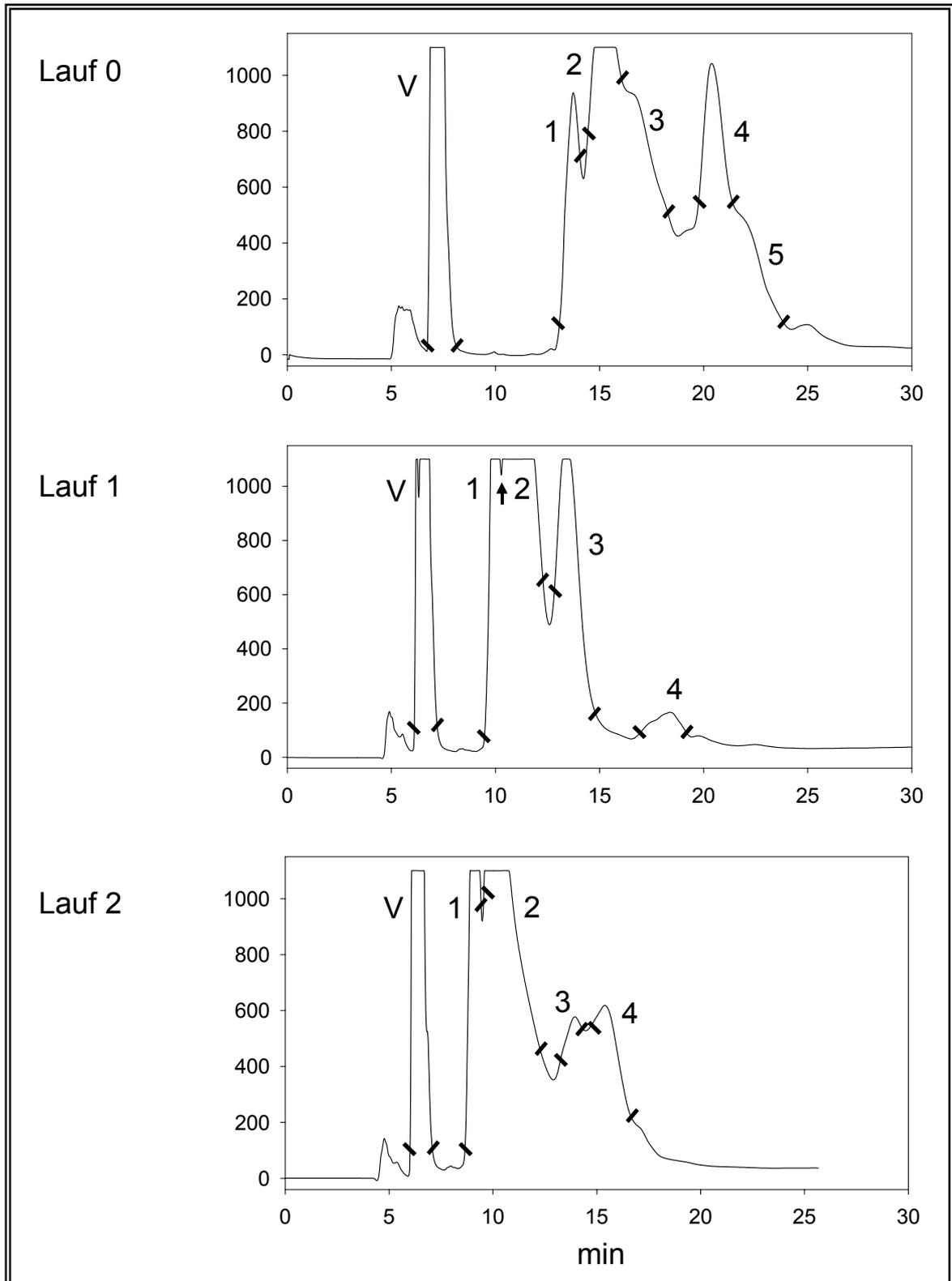


Abb. IV-9 HPLC-Chromatogramme des Rückfaltungsansatzes von Hirudin. Dargestellt sind die drei Läufe 0, 1 und 2 unter gleichen Bedingungen. Die einzeln aufgefangenen Fraktionen sind durch Zahlen gekennzeichnet.

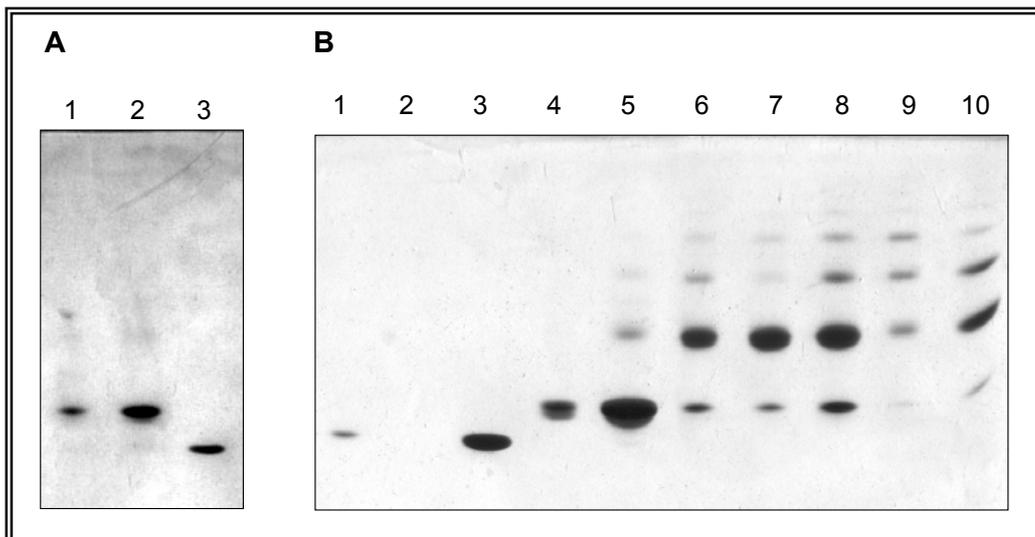


Abb. IV-10 Nativgele des Rückfaltungsansatzes von Standard-Hirudin. **A** Kontrolle des Ansatzes, aufgetragen sind 10 μL (Spur 1) und 20 μL (Spur 2) des Ansatzes und ein Hirudin-Standard (Spur 3). **B** Hirudin-Standard (Spur 1) und HPLC-Fractionen des Rückfaltungsansatzes (Spuren 2-10). Zur genaueren Spezifikation siehe Tabelle IV-2.

Spur im Gel	HPLC-Fraktion	nativ	nicht-nativ	Oligomere	
1	Standard	X			
2	Vorlauf 0/1/2				kein Hirudin
3	Fraktion 1 /0/1/2	X			
4	Fraktion 2 /0/1/2		X		vereinigt als A
5	Fraktion 3 /0		X		
6	Fraktion 3 /1		X	X	vereinigt als B
7	Fraktion 3 /2		X	X	
8	Fraktion 4 /0		X	X	
9	Fraktion 4 /1		X	X	
10	Fraktion 4 /2		X	X	

Tab. IV-2 Zuordnung der HPLC-Fractionen der Läufe 0, 1 und 2 zu den detektierten Banden des Nativgels in Abb. IV-10 B.

Der Vorlauf aller drei HPLC-Trennungen wird im Nativgel nicht detektiert und besteht vermutlich aus Maleat-Rückständen, die im Hirudin-Standard enthalten sind. Die in allen Chromatogrammen sichtbare Schulter des ersten großen Peaks wurde vor dem Gellauf vereinigt und auf Spur 3 aufgetragen. Diese Fraktion enthält natives Hirudin.

Der Hauptpeak (Fraktion 2 aller Läufe und Fraktion 3 des Laufes 0; Spur 4 und 5 im Gel) enthält nicht-nativ rückgefaltetes Hirudin. Im Gel ist eine Doppelbande zu sehen, d. h. es erfolgte keine Trennung der beiden Konformere. In der Fraktion 3/0 ist zusätzlich eine leichte Verunreinigung mit einem Dimer zu erkennen. Die restlichen Spuren des Gels (6 – 10) enthalten zu einem geringen Anteil eines der beiden nicht-nativen Konformere, darüber hinaus aber hauptsächlich Oligomere des Hirudins. Um die gewünschte Trennung der Konformere zu erreichen, wurden einzelne Fraktionen erneut mit einem flacheren Gradienten während des HPLC-Laufes getrennt. Dafür wurden die Fraktionen 2 aller Läufe und die Fraktion 3/0 zu der Charge A vereinigt. Sie beinhaltet nur die beiden nicht-nativen Konformere. Die Fraktionen 3/1, 3/2 und 4 wurden zu Charge B vereinigt, sie enthält das höher laufende nicht-native Konformer und die nicht erwünschten Oligomere. Beiden Chargen wurden getrennt chromatographiert.

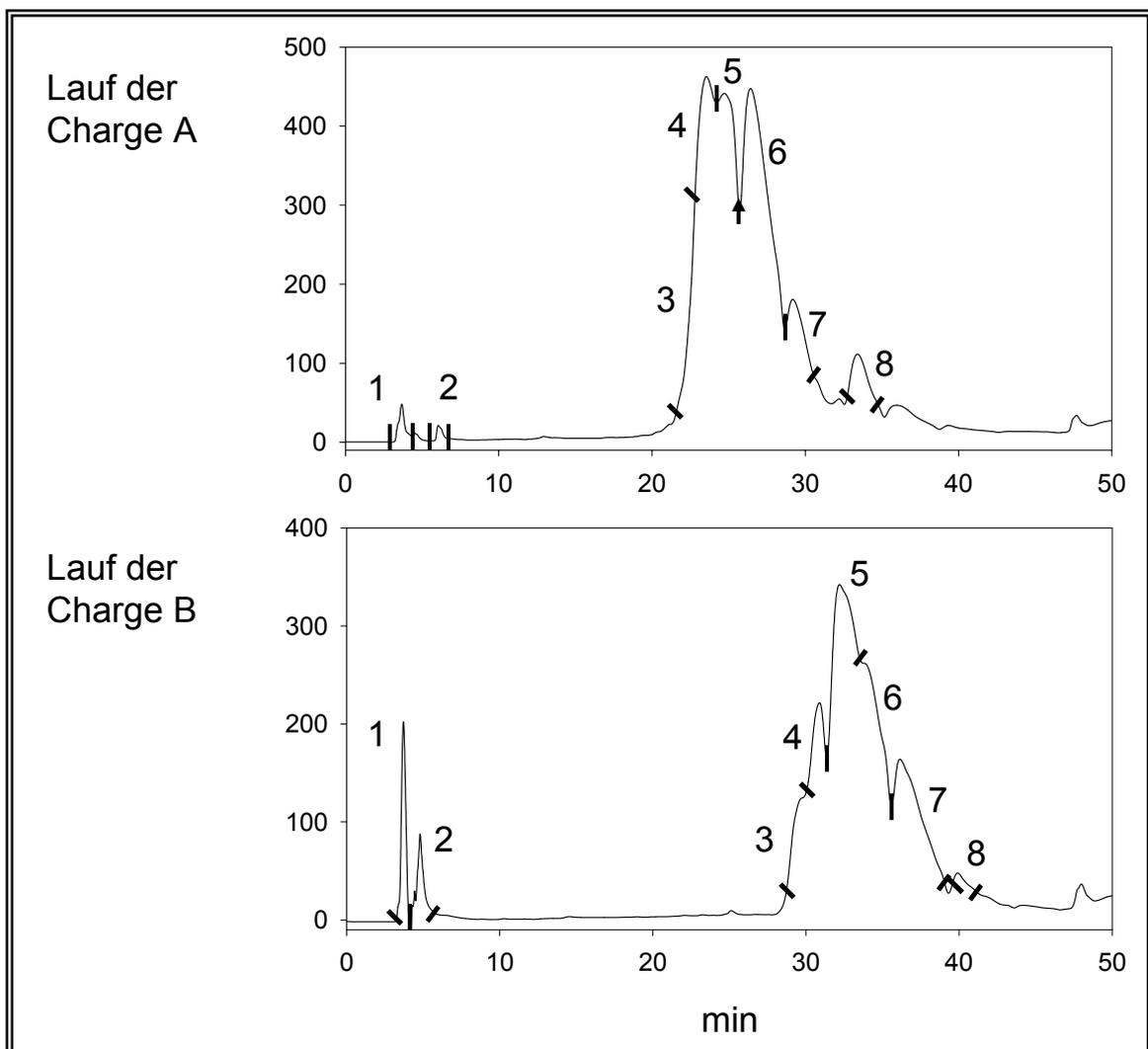


Abb. IV-11 HPLC-Chromatogramme der Chargen A und B.

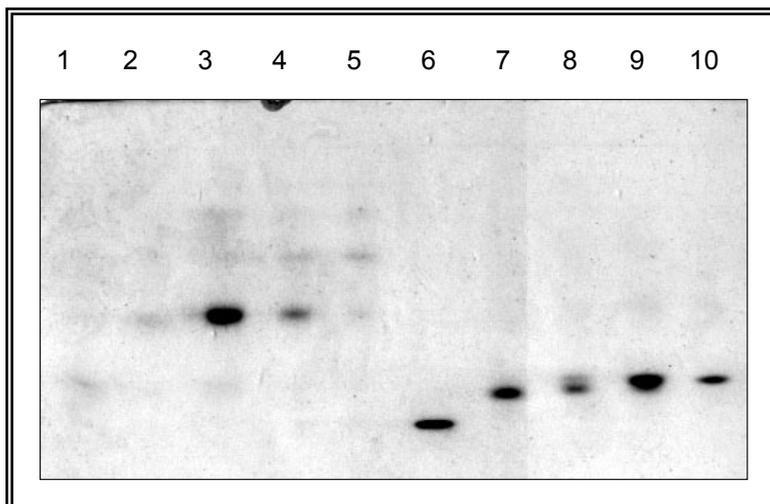


Abb. IV-12 Nativgel der einzelnen HPLC-Fractionen der Chargen A (Spuren 7–11) und B (Spuren 1-5). Spur 6: Hirudin-Standard. Zur genaueren Zuordnung siehe Tabelle IV-3.

Spur im Gel	HPLC-Fraktion	nativ	nicht-n. 1	nicht-n. 2	Oligomer
1	B 3				X
2	B 4			X	X
3	B 5				X
4	B 6				X
5	B 7				X
6	Standard	X			
7	A 3/4		X		
8	A 5		X	(X)	
9	A 6		(X)	X	
10	A 7			X	

Tab. IV-3 Zuordnung der HPLC-Fractionen der Chargen A und A zu den detektierten Banden des Nativgels in Abb. IV-12.

Die Spuren 1 bis 5 des Nativgels zeigen die einzelnen Fraktionen der Trennung von Charge B. Nur in 1 ist eine leichter Schatten in Höhe des nicht-nativen Hirudins zu erkennen. Wie schon aus Abb. IV-10 B zu entnehmen war, besteht die Charge B hauptsächlich aus den während der Rückfaltung gebildeten Oligomeren. Eine Abtrennung des nur in einem sehr kleinen Anteil enthaltenen nicht-nativen Hirudins konnte nicht erreicht werden. Aus der Charge A lassen sich aber die beiden nicht-

nativen Konformere isolieren. Wie aus dem Bandenmuster und Tabelle IV-3 ersichtlich ist, enthalten die Fraktionen A 3 und A 4 nur das tiefer laufende Konformer (nicht-nativ 1), die Fraktion A 10 besteht nur aus dem höher laufenden Konformer (nicht-nativ 2). Die Fraktionen A 5 und A 6 enthalten beide Konformere. Die Trennung der nicht-nativen Konformere ist grundsätzlich erreicht, läßt sich aber durch veränderte Bedingungen während der HPLC-chromatographischen Trennung sicherlich noch verbessern.

6 Rückfaltung mit Thioredoxin

Neben den Thiolen existieren im Cytosol, im Periplasma Gram-negativer Bakterien und im eukaryotischen Endoplasmatischem Reticulum Enzyme, die die Faltung von Proteinen ermöglichen und positiv beeinflussen. Dazu zählen neben den Chaperonen sowohl Prolylpeptidyl-Isomerasen (PPI) als auch Oxidoreduktasen. Zur letzteren Gruppe von Enzymen zählen Proteindisulfidisomerasen wie Thioredoxin, Dsb-Proteine und PDI. Auf die Gemeinsamkeiten und Unterschiede wurde bereits in der theoretischen Einleitung eingegangen. In Streptomyceten wurden bislang nur Thioredoxine nachgewiesen, sie kommen ubiquitär in allen Organismen, auch in Pflanzen, vor. Ihnen wird eine Vielzahl von katalysierenden Mechanismen zugeschrieben, unter anderem auch eine Disulfid-Isomerase-Funktion. Es sollte untersucht werden, in wie weit Disulfidisomerasen die Rückfaltung von Hirudin zur nativen Form begünstigen können. Für DsbA ist dieser Effekt am Beispiel von Hirudin schon belegt worden [WUNDERLICH ET AL., 1993; WUNDERLICH UND GLOCKSHUBER, 1994]. Über Thioredoxin standen noch keine Daten zur Verfügung, darüber hinaus war Thioredoxin noch in weiteren Aspekten interessant. Zum Einen waren in zwei *Streptomyces*-Arten Thioredoxine identifiziert worden (*S. clavuligerus*, COHEN ET AL., 1993; *S. aureofaciens*, LABUDOVA ET AL., 1994; HORECKA ET AL., 1996). PDI- oder Dsb-ähnliche Enzyme konnten dagegen in Streptomyceten noch nicht charakterisiert werden. Zum Anderen sind Thioredoxine mit einem Molekulargewicht von 11–12 kDa recht klein, was eine eventuelle spätere Überexpression oder auch eine Co-expression besonders günstig erscheinen ließ. Daher wurde in dieser Arbeit näher untersucht, ob Thioredoxin einen positiven Einfluss bei der *in vitro*-Rückfaltung von Hirudin aufweisen kann.

6.1 Analytik über Nativgele

Wie in den bisher beschriebenen Rückfaltungen wurde Hirudin zunächst unter dem Einfluss von Guanidiniumhydrochlorid und Dithioerythritol entfaltet und die Disulfidbrücken reduziert. Nach dem Entsalzen über eine PD10-Säule wurden Aliquots mit einem Hirudingehalt von 75 μM bei Raumtemperatur für 20 Stunden mit konzentriertem Phosphatpuffer pH 8,0 versetzt, der verschiedene Mengen an einem oxi-

dierten Thioredoxin-Standard enthält. Hierfür wurde rekombinantes Thioredoxin aus *E. coli* mit einem Molekulargewicht von 11,7 kDa verwendet. Die Rückfaltungsansätze enthielten 0,01 bis 1 Moläquivalente Thioredoxin. (Auf die Anzahl der Disulfidbrücken bezogen liegt das molare Verhältnis bei 0,003 bis 0,3.) Auch hier wurde das Ergebnis der Hirudinfaltung über die bewährte Methode der Nativgelelektrophorese detektiert.

In Abbildung IV-13 A ist ein Nativgel gezeigt, in dem die Rückfaltungsansätze auf den Spuren 1 bis 8 aufgetragen sind. Deutlich erkennbar ist zunächst der Unterschied von Hirudin im nativen und nicht-nativen Zustand. Wird Thioredoxin im Molverhältnis 1:1 bei den Rückfaltungen eingesetzt (Spur 1), bildet sich nur das native Konformer von Hirudin. Auch bei geringeren Zusätzen von Thioredoxin wird eine Falschfaltung von Hirudin unterbunden. Bei einem Molverhältnis von 1:10 (5) erscheint auf dem Gel nur die Bande für natives Hirudin. Sinkt der Gehalt der Oxidoreduktase auf ein Zwanzigstel des Hirudingehaltes (6), kann eine sehr schwache Bande eines nicht-nativen Hirudinkonformers detektiert werden. Bei einem Verhältnis von 1:100 (7) ist hauptsächlich nicht-natives Hirudin gebildet worden, die Bande für das native Konformer ist nur noch schwach erkennbar. Im Kontrollansatz der Rückfaltungen im Puffer ohne Thioredoxin-Zusatz wird schließlich nur noch falsch gefaltetes Hirudin nachgewiesen. Eine positive Beeinflussung von Thioredoxin bei einer *in vitro*-Rückfaltung von Hirudin ist dadurch eindeutig nachgewiesen. Bei einem nicht äquivalenten Gehalt der Oxidoreduktase wird die Faltung eindeutig zum nativen Konformer begünstigt und auch bei einem katalytischen Gehalt von einem Zwanzigstel Äquivalent Thioredoxin ist noch eine Beeinflussung feststellbar.

Mittlerweile sind Hinweise auf Reaktionen von Thioredoxin mit Hirudin auch in der Literatur zu finden. Die Arbeitsgruppe um Rudi Glockshuber, die sich schon intensiv mit den Eigenschaften der Oxidoreduktase DsbA beschäftigt hat, veröffentlichte Ende 1999 Studien von Hirudin-Rückfaltungen mit Thioredoxin [JONDA ET AL., 1999]. Reduziertes und entfaltetes Hirudin wurde bei pH 7,0 und 25°C mit jeweils drei Äquivalenten DsbA oder Thioredoxin versetzt. Das molare Verhältnis der Proteine beinhaltet ein äquimolares Verhältnis der Thiole, bzw. Disulfide zwischen den Oxidoreduktasen und Hirudin. Nach einem Quenchen der Reaktion wurden die verschiedenen Faltungszustände von Hirudin per HPLC getrennt. Mit DsbA wurde eine Halb

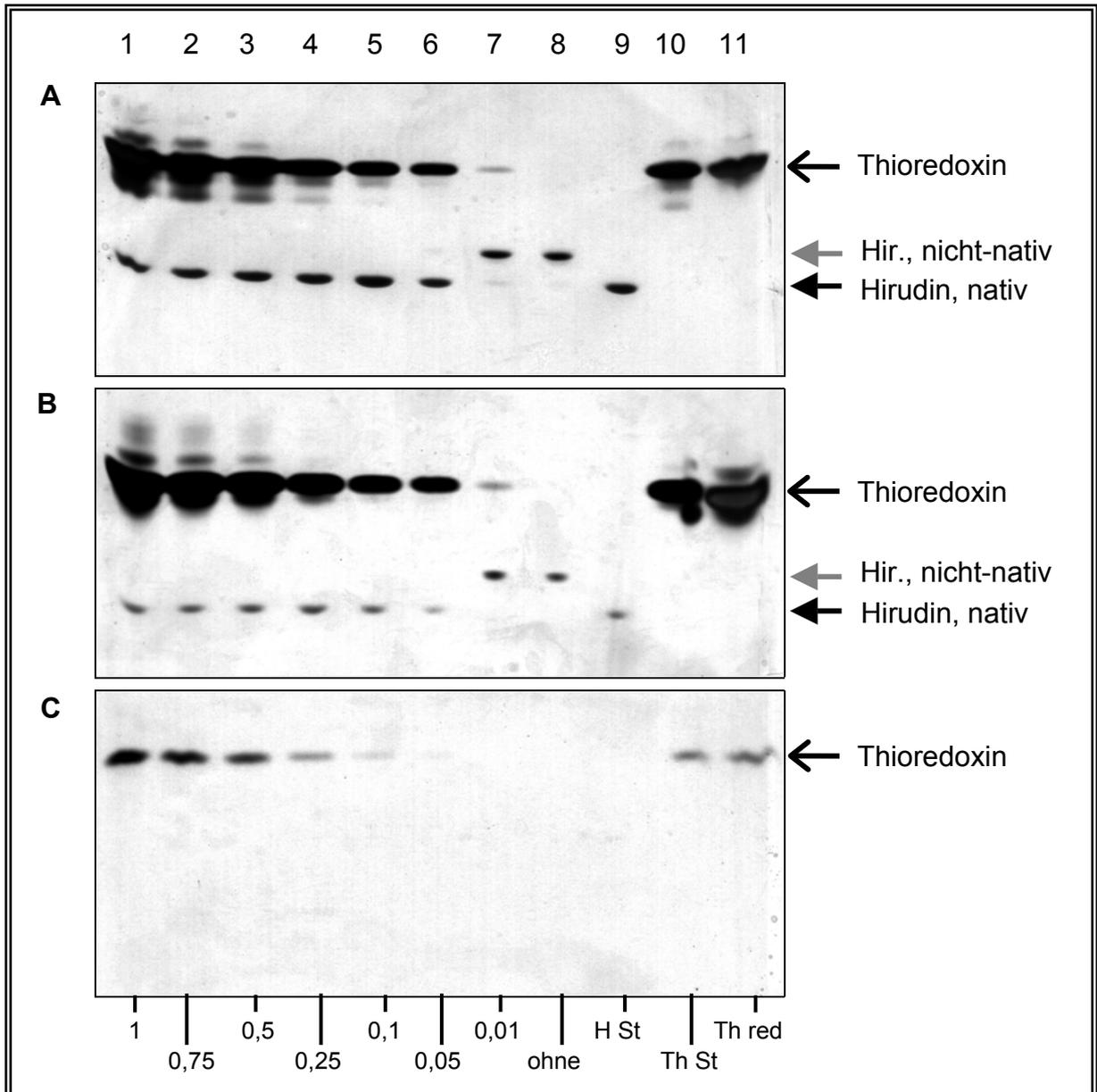


Abb. VI-13 Rückfaltung von Hirudin mit verschiedenen Äquivalenten an Thioredoxin, dokumentiert anhand von verschiedenen Gelen/Färbungen. 1-8: rückgefaltetes Hirudin, die Zahlen unterhalb der Bilder geben die Äquivalente an Thioredoxin an; 9: Hirudin Standard (10 µg); 10: Thioredoxin Standard (12 µg); 11: reduziertes Thioredoxin (12 µg). **A** Nativgel, silbergefärbt; **B** Methylenblau-Nativgel, silbergefärbt; **C** Nativgel, Coomassie-Färbung.

wertszeit für die Rückfaltung zur nativen Spezies von 3 min bestimmt, mit Thioredoxin waren nach einer Stunde erst weniger als 10 % der Peptidmoleküle in den nativen Zustand gefaltet. Für die Rückfaltungen mit Thioredoxin wurden in den HPLC-Analysen Intermediate mit anderen Retentionszeiten gefunden als mit DsbA,

sie werden als Ein- oder Zwei-Disulfidspezies charakterisiert. Aus dieser Beobachtung schlossen die Autoren auf einen veränderten Faltungsweg von Hirudin in der Anwesenheit von Thioredoxin. Bedingt durch die geringe Oxidationskraft von Thioredoxin postulieren die Autoren eine konsekutive Bildung und Isomerisierung der Disulfide während der Faltung, in der nicht-native Drei-Disulfid-Spezies in nur geringem Umfang auftreten. Postuliert wurde weiterhin, dass Hirudin den nativen Zustand mit drei oxidierten Disulfiden in Anwesenheit von Thioredoxin nicht quantitativ erreichen kann. Eine Reduktion von nativem Hirudin mit reduziertem Thioredoxin unter gleichen Bedingungen verringerte den Anteil an nativem Hirudin auf weniger als 10 %.

In dieser Arbeit ist aber gezeigt worden, dass Hirudin mit Thioredoxin in den nativen Zustand rückgefaltet werden kann, sowohl in fast äquivalenten Mengen als auch bei katalytischem Zusatz. Die in den verschiedenen Hirudinbanden detektierten Proteinmengen unterscheiden sich untereinander nicht und sind identisch zum mit aufgetragenen Standard. Es ist also keine Minimierung der Hirudinmenge zu sehen, was der Fall sein müsste, wenn bis zu 90% des Proteins nicht einer voll oxidierten Form vorliegen würden. Bei einem pH des Trenngels von 8,9 wären die noch freien Thiole des Hirudin deprotoniert und das Protein würde auf Grund der höheren Ladung wesentlich schneller durch das Gel wandern.

Wie aus den Rückfaltungen von Hirudin ohne den Zusatz von Thiolen oder Enzymen (s. Kap. IV-1) ersichtlich ist, erfolgt die Bildung der Disulfidbrücken auch durch Oxidation mit dem Luftsauerstoff. JONDA zeigte in ihrer Arbeit, dass reduziertes Thioredoxin unter dem Einfluss von Luftsauerstoff nicht oxidiert wird. In den Rückfaltungsansätzen wird zunächst Hirudin durch Thioredoxin oxidiert. Sind bei katalytischen Zusatz von Thioredoxin nicht ausreichend Enzymmoleküle für eine stöchiometrische Oxidation von Hirudin vorhanden, erfolgt die Oxidation über Luftsauerstoff. Die Oxidoreduktase liegt nach dieser ersten Reaktion in der reduzierten Form vor, die nur noch eine Isomerasefunktion übernehmen kann. Der pK_a -Wert des aktiven Thiols in Thioredoxin liegt bei 7,13. Wie GILBERT (1997) zeigte, ist bei einer Isomerisierung die aktive Gruppe ein Thiolat, Thiole sind nicht reaktiv genug. Daher ist das Verhältnis von Thiol zu Thiolat besonders wichtig. Bei einem pH von 7,0 (JONDA) liegen nur wenige der Thioredoxin-Thiole als aktive Thiolatspezies vor, bei pH 8,0 (hier vorliegender pH-Wert) ist das Gleichgewicht auf die Seite des

deprotonierten Thioredoxin-Thiolats verschoben. Die Reaktivität des Thiols ist bei pH 8 also weitaus höher. Generell sollte auch das Disulfidshuffling bei pH-Werten von 8 und höher begünstigt sein, da dann alle Thiolgruppen im Protein sehr ähnliche pK_a -Werte aufweisen. Die Isomerisierung kann bei pH 8 also in viel stärkerem Ausmaß erfolgen.

Die Banden oberhalb und besonders unterhalb der stärksten Thioredoxinbande im Gelbild A der Abbildung IV-13 warfen noch einige Fragen auf. Zum Einen sollte geklärt werden, ob Thioredoxin tatsächlich katalytisch wirkt, oder ob es nach der Reaktion in einem reduzierten Zustand vorliegt, der eventuell ein anderes Laufverhalten im Gel zeigt, als der in einer oxidierten Form vorliegende Standard. Zum Anderen war es denkbar, dass Thioredoxin mit Hirudin intermolekulare Disulfidbrücken bildet und so als Zwittermolekül eine zusätzliche Bande auf dem Gel bewirkt. Daher wurde das Gel auf den Spuren 10 und 11 mit dem Thioredoxin-Standard und reduziertem Thioredoxin (behandelt mit 0,1 M DTE) beladen und alle Ansätze zusätzlich in anderen Gelen oder mit einer anderen Färbemethode analysiert.

Ein Vergleich beider Thioredoxine im Nativgel (A) zeigt ein vergleichbares Laufverhalten. Polyacrylamidgelen werden in den meisten Fällen über Ammoniumperoxosulfat (APS) polymerisiert, als Reaktionsstarter fungiert hierbei TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin). Ist das Gel polymerisiert, sind meist noch Anteile an Radikalen enthalten, die auf die zu untersuchenden Substanzen oxidierend wirken. Um sicher zu sein, dass das reduzierte Thioredoxin auch tatsächlich als reduzierte Spezies durch das Gel wandert, wurde auf eine andere Art der Polymerisation zurückgegriffen. In einem Nativgel nach der Methyleneblau-Methode werden statt TEMED und APS andere Starter für die Polymerisation des Acrylamids eingesetzt. Die Katalysatoren sind Diphenyljodoniumchlorid und Na-Toluolsulfonat, als Starter der Reaktion fungiert Methyleneblau. Die Polymerisation wird über UV-Licht initiiert, normales Tageslicht reicht hierfür aus. Dieses Gel wirkt erheblich weniger oxidierend, als die über APS und TEMED polymerisierten Gele [GOLDENBERG, 1997]. In dem ebenfalls silbergefärbten Methyleneblau-Nativgel (B) in Abb. IV-13 ist kein signifikanter Unterschied zu den Thioredoxinbanden des Nativgels (A) zu erkennen.

Das leicht verschiedene Laufverhalten von Thioredoxin im Methylenblau-Gel (rundere und etwas verwischtere Banden) ist auf die geänderte Art der Polymerisation zurückzuführen. Die zusätzlichen Banden oberhalb und unterhalb des Thioredoxins sind auf beiden Gelen identisch. Zusätzliche Banden, die durch reduzierte Oxidoreduktase entstehen, können also ausgeschlossen werden.

Die Frage nach einem intermolekular verknüpften Protein kann schon aus den verschiedenen starken Banden interpretiert werden. In allen Ansätzen gleich ist der Gehalt an Hirudin. Würde ein großer Teil an Hirudin mit Thioredoxin verknüpft sein und eine zusätzliche Bande bilden, so würde dieser Anteil in der Bande des nativen Hirudins fehlen. In den Ansätzen 1 bis 5 ist aber eine gleichmäßig starke Hirudinbande zu erkennen, wohingegen die zusätzlichen Thioredoxinbanden mit der Abnahme des Gehaltes an der Oxidoreduktase ebenfalls abnehmen.

Eine mögliche Erklärung der zusätzlichen Banden liegt in der geringen Reinheit des Thioredoxins (98 %) und der erheblichen Unterschiede in der Anfärbung von Proteinen in der Silberfärbung. Hirudin ist ein Protein, das sich über die gängigen Methoden nur sehr schlecht anfärben läßt. Die übliche Methode der Blaufärbung über den Coomassie-Farbstoff gelingt nur mit sehr stark konzentrierten Lösungen. Auch in der Silberfärbung lagert sich nicht sehr viel Silber an dem Protein an. Zu erkennen ist das in den silbergefärbten Gelen A und B. In Spur 1 kann ein direkter Vergleich zwischen Hirudin und Thioredoxin erfolgen. Hier sind äquimolare Mengen der beiden Proteine aufgetragen (1,5 nmol), der Unterschied in der Stärke der Banden ist eklatant. In Spur 6 liegt nur noch ein Zwanzigstel der Thioredoxinmenge vor, bei konstantem Hirudingehalt ist die Bande von Thioredoxin trotzdem wesentlich stärker. Da der Massenunterschied von 7 (Hirudin) und 11,7 kDa (Thioredoxin) die unterschiedlich starke Anfärbung nicht erklären kann, muss es sich um eine verschieden starke Anfärbung der Proteine handeln. Die Begründung der zusätzlichen Thioredoxinbanden liegt daher eher an der Zusammensetzung, bzw. nicht sehr hohen Reinheit des Thioredoxins. Anhand des Coomassie-gefärbten Nativgels (C) wird deutlich, wie ungenau und unempfindlich diese Art der Färbung in Bezug auf die Reinheit der Oxidoreduktase und der schlechten Anfärbbarkeit des Hirudins ist.

Um diese Annahmen zu untermauern, wurden die Rückfaltungsansätze zusätzlich über eine Kapillarelektrophorese (CE) untersucht.

6.2 CE-Analytik

Bei der Kapillarelektrophorese erfolgt die Trennung der Proteine in einer Kapillare, an der Spannung angelegt wird. Für die hier dargestellte Analytik wurde eine offene, mit Tricinpuffer (pH 8,0) gefüllten Kapillare eingesetzt. Die Trennung aller im Rückfaltungsansatz enthaltenen Moleküle erfolgt sowohl in Abhängigkeit von der elektrophoretischen Wanderung als auch vom elektroosmotischen Fluß. Die Elektrophoretische Wanderung, also die Bewegung geladener Moleküle ist durch die Beschichtung der Kapillare durch Silanolgruppen bedingt. Sie ionisieren bei Kontakt mit dem eingesetzten Puffer und erzeugen an der Kapillarwand eine elektrische Doppelschicht. Bei Anlegen einer Spannung wandern hauptsächlich die Kationen nahe der Kapillarwand in Richtung der Kathode. Durch die Ionenbewegung entsteht der elektroosmotische Fluß des Gesamtelektrolyten.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine kann durch die Länge der Kapillare, den verwendeten Puffer, die angelegte Spannung und ähnliche Faktoren beeinflusst werden. Bei Konstanthalten dieser Parameter bestimmt die elektrophoretische Beweglichkeit der Probenmoleküle deren Auftrennung. Dabei verändern Größe, Oberfläche und Ladung die Beweglichkeit.

Zunächst wurde anhand der CE-Messungen die Retentionszeit des Thioredoxin-Standards bestimmt. Der scharfe Peak für einheitliches Thioredoxin mit einer Retentionszeit von 7,33 min ist in Abbildung IV-14 A deutlich zu erkennen. Reduziertes Thioredoxin (Spektrum B) läuft als Totpeak der Retention, abhängig von der Methode. Der verwendete Tricinpuffer mit einem pH von 8,0 bewirkt, dass zumindest das reduzierte Thiol des N-terminalen Cysteins (pK_a 7,13) deprotoniert vorliegt. Die veränderte Ladung spiegelt sich in dem stark unterschiedlichen Laufverhalten im Vergleich zum oxidierten Standard wieder. Mit der Retentionszeit von 7,30 min ist bei B ein sehr kleiner Anteil an nicht reduziertem Thioredoxin erkennbar.

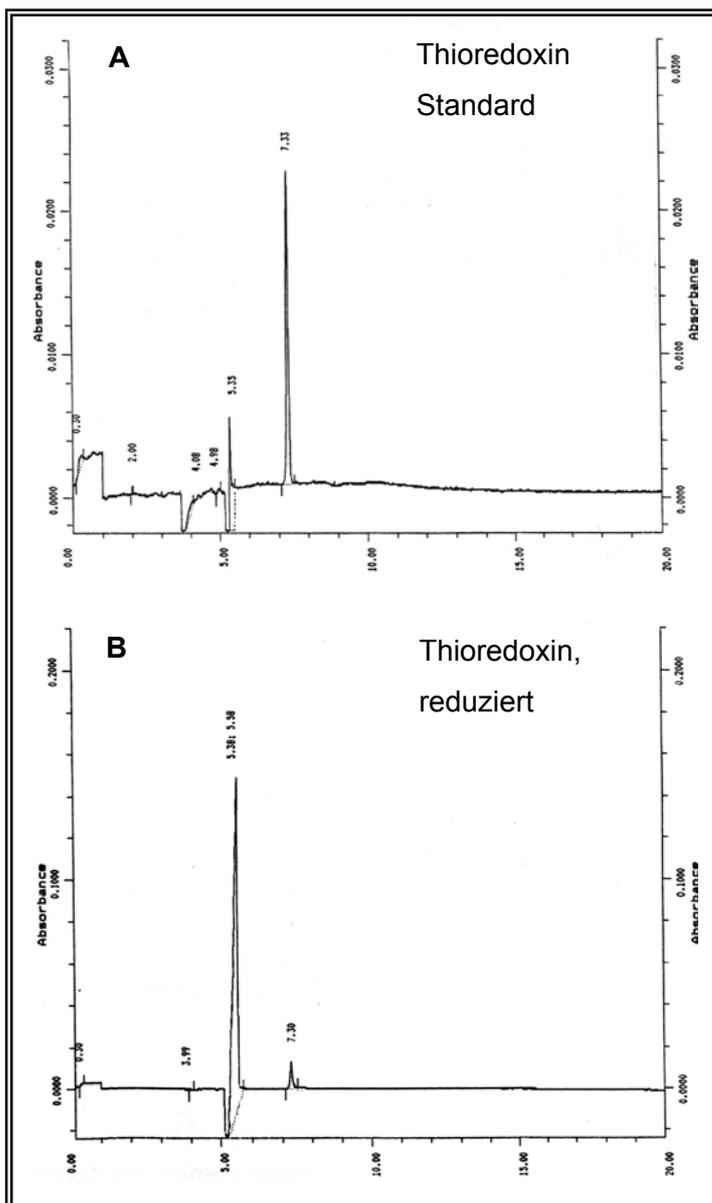


Abb. IV-14
 Kapillarelektrophorese von Standard-Thioresoxin und reduziertem Thioresoxin. In Spektrum A ist der Peak für einheitliches Thioresoxin bei einer Retentionszeit von 7,33 min deutlich zu erkennen.
 Reduziertes Thioresoxin (Spektrum B) läuft als Totpeak der Retention, abhängig von der Methode. Mit der Retentionszeit von 7,30 min ist hier ein sehr kleiner Anteil an oxidiertem Thioresoxin erkennbar.

Abbildung IV-15 zeigt die elektrophoretische Trennung der Rückfaltungsansätze mit 0,75 und 0,01 Äquivalenten Thioresoxin. Bei der Rückfaltung mit 0,75 Äquivalenten (Spektrum A) wurde das entfaltete Hirudin vollständig zur nativen Spezies zurückgefaltet (vgl. Abb. IV-13). Der Peak mit der Retentionszeit von 9,71 min repräsentiert das nativ gefaltete Hirudin. Der zweite Peak bei 7,54 min enthält das oxidierte Thioresoxin. Im Nativgel der Abb. IV-13 waren zusätzliche Banden nahe der Thioresoxinbande detektiert worden, im entsprechenden CE-Spektrum kann nun nachgewiesen werden, dass nur Hirudin und oxidiertes Thioresoxin im Faltungsansatz vorhanden sind. Eventuell vorliegendes reduziertes Thioresoxin oder Verunreinigungen des Standards liegen unterhalb der Nachweisgrenze.

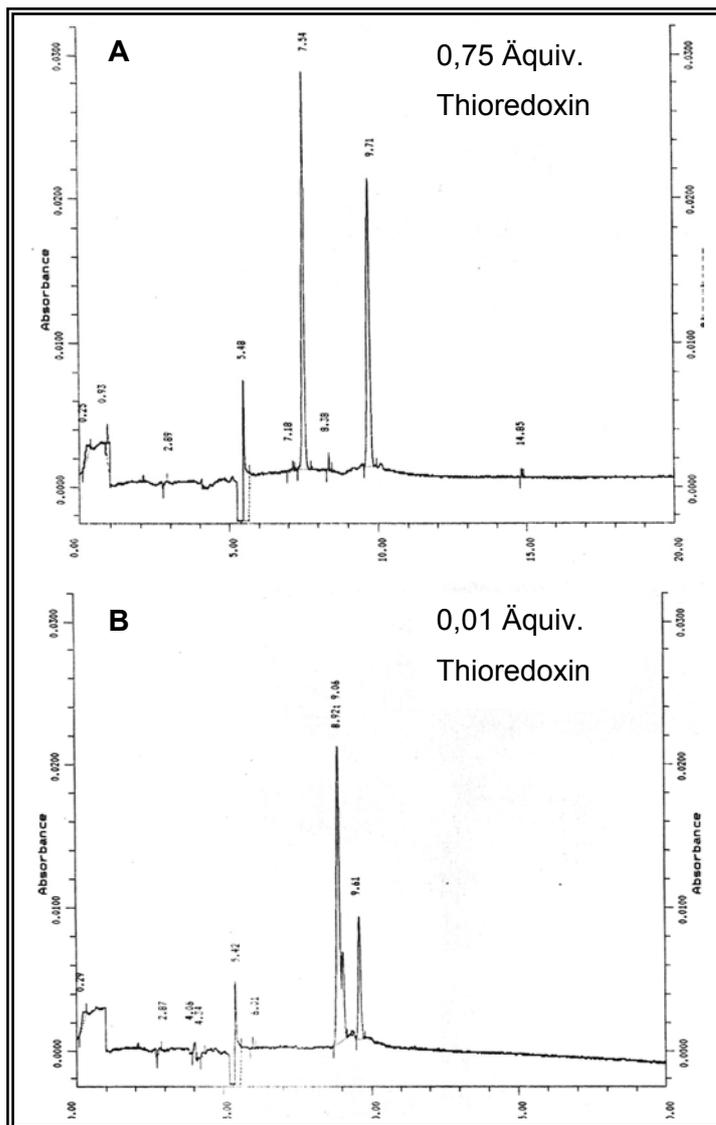


Abb. IV-15

Kapillarelektrophorese von verschiedenen Rückfaltungsansätzen von Hirudin. Spektrum **A** zeigt vollständig zum nativen Konformer rückgefaltetes Hirudin (Retentionszeit 9,71 min), zusätzlich ist der Peak für Thioredoxin bei 7,54 min zu erkennen.

In Spektrum **B** ist eine Auftrennung des Hirudins in natives und nicht-natives Protein sichtbar. Der Peak der Retentionszeit von 9,61 min entspricht dem nativen Konformer, der Doppelpeak bei 8,92 und 9,06 min entspricht dem nicht-nativen Konformer. Die Menge an Thioredoxin (0,01 Äquivalente, auf Hirudin bezogen) ist hier zu gering, als das ein Protein bei 7,3 bis 7,5 min detektiert werden könnte.

Im Rückfaltungsansatz mit 0,01 Äquivalenten Thioredoxin (Abb. IV-15 B) ist der Gehalt an Thioredoxin so gering, dass er nicht mehr detektiert werden kann. Deutlich erkennbar sind jedoch die beiden getrennten Peaks für Hirudin. Das im Nativgel nur noch in einer schwachen Bande nachweisbare native Hirudin wird hier in dem kleineren Peak sichtbar. Die Retentionszeit von 9,61 min stimmt gut mit dem Wert von 9,71 min aus A überein. Der größere Doppelpeak bei 8,92 und 9,06 min entspricht den nicht-nativ gefalteten Konformeren von Hirudin, die in den Nativgelen in einer Doppelbande gefunden werden.

Anhand der CE-Analytik kann gezeigt werden, dass in den Rückfaltungsansätzen nur die verschiedenen Konformere von Hirudin und Thioredoxin in reduzierter und oxi-

dierter Form enthalten sind. Verunreinigungen des Thioredoxin oder intermolekular verknüpfte Komplexe von Thioredoxin und Hirudin konnten nicht nachgewiesen werden.

7 Zusammenfassung

Bei der *in vitro* Rückfaltung von entfaltetem, reduziertem Hirudin entstehen neben dem nativen Protein hauptsächlich zwei nicht-nativ gefaltete Konformere. Das Verhältnis von nativem und nicht-nativem Konformer lässt sich während der Rückfaltung durch verschiedene Parameter beeinflussen.

Der pH-Wert im Bereich von 4,0 bis 8,0 verändert das Rückfaltungsmuster von Hirudin in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht. Das ist eher erstaunlich, da ein hoher pH-Wert das Disulfidshuffling erleichtert und weniger nicht-native (energetisch ungünstige) Konformere auftreten sollten. Literaturdaten bestätigen ein pH-Optimum für erfolgreiche Rückfaltungen bei 8-9.

Thiole wie reduziertes Glutathion (GSH), N-Acetylcystein (NAC) und Dithioerythritol (DTE) beeinflussen die Rückfaltung auf verschiedene Weise. Während beim Zusatz von GSH sehr verstärkt die Bildung des nativen Konformers auftritt, können für NAC und DTE einerseits ebenfalls positive Auswirkungen festgestellt werden (leicht verbessertes Verhältnis von nativem zu nicht-nativem Konformer), andererseits wird aber eine stark vermehrte Oligomerbildung beobachtet. Werden GSH und GSSG (oxid. Glutathion) als Redoxpuffer im Molekülverhältnis 2:1 (10 mM) zugesetzt, so kann bei 4°C eine vollständige Rückfaltung zum nativen Hirudin erreicht werden. Der Zusatz von 1 mM GSH bewirkt bei höheren Temperaturen ebenfalls eine 100 %ige Rückfaltung zum nativ gefalteten Hirudin-Konformer.

Das Ergebnis der Rückfaltungen ist auch von der Temperatur abhängig. Während bei einem Zusatz von 1 mM GSH die Rückfaltung zum nativen Hirudin-Konformer bei 28°C (höchste gewählte Temperatur) am erfolgreichsten ist, ergeben die Rückfaltungen unter Zusatz von 1 mM DTE, NAC und 10 mM GSH, bzw. GSH/GSSG bei 4°C eine wesentlich höhere Ausbeute an nativ gefaltetem Hirudin.

Eine graphische Auswertung der zusätzlich auftretenden, im Nativgel höher laufenden Banden legt die Vermutung nahe, dass die Banden Hirudin-Oligomere enthalten.

Nativ und nicht-nativ gefaltetes Hirudin und die ebenfalls während der Rückfaltung entstehenden Oligomere lassen sich HPLC-chromatographisch trennen. Die in den Nativgelen auftretende Doppelbande erscheint bei der HPLC-Trennung in zwei verschiedenen Konformeren in unterschiedlichen Fraktionen.

Eine positive Beeinflussung von Thioredoxin bei einer *in vitro*-Rückfaltung von Hirudin kann eindeutig nachgewiesen werden. Bei katalytischen Gehalt (1:10, Thioredoxin:Hirudin und kleiner) erfolgt die Rückfaltung ausschließlich zu nativem Hirudin. Sinkt der Gehalt der Oxidoreduktase auf ein Zwanzigstel des Hirudingehaltes, kann eine sehr schwache Bande des nicht-nativen Hirudinkonformers detektiert werden. Bei einem äquivalenten Gehalt der Oxidoreduktase wird die Faltung eindeutig zum nativen Protein begünstigt und auch bei einem von einem Zwanzigstel Äquivalent Thioredoxin ist noch eine positive Beeinflussung feststellbar.

V Expression von Hirudin

In diesem Kapitel wird zunächst gezeigt, in wie weit ein Zusatz von Glutathion bei der Hirudinexpression einen positiven Einfluss auf die Faltung des Proteins bewirken kann. Nachfolgend werden die Resultate vorgestellt, die bei einer Coexpression von Thioredoxin und Hirudin erreicht wurden. Es schließen sich Expressionsergebnisse von integrierbaren Vektoren an, abschließend folgt eine Diskussion über die Isomeraseaktivität verschiedener Thioredoxin-Mutanten und die Darstellung von drei Thioredoxin-Mutanten.

1 Expression von Hirudin unter Zusatz von Glutathion

Für die nachfolgend beschriebenen Kultivierungen wurden *S. lividans* TK24-Zellen eingesetzt, die jeweils frisch mit dem Vektor pSWHIV2 [WOJCZEWSKI, 1999] transformiert wurden. Dieser Vektor enthält das Hirudingen mit der codon usage von *S. lividans* und die Signalsequenz von Tendamistat (aus *S. tendae*). Er basiert auf dem *S. lividans*/*E. coli*-Shuttle-Vektor pAX5a. Dieser setzt sich zusammen aus dem *E. coli* Vektor pUC19 [NORRANDER ET AL., 1983; YANISCH-PERRON ET AL., 1985] und dem *Streptomyces* Vektor pIJ702 [POCTA, 1991; HOFFMANN, 1992]. Der Shuttle-Vektor entstammt einer Reihe von Vektoren, in denen einzelne genetische Elemente wie Promotor, Ribosomale Bindestelle, Strukturgen mit Signalpeptid und Terminator ausgetauscht werden können. Genauere Angaben hierzu finden sich in Kapitel VI.

Wie in Kapitel VIII (Materialien und Methoden) beschrieben, wurden Vorkulturen mit Agarstücken frischer Transformationsplatten inokuliert und die späteren Vergleichskulturen nach 9 Tagen mit gleichen Volumina der Vorkultur beimpft. Im Wachstumsmedium war Glutathion in Konzentrationen von 1 und 10 mM enthalten. Diese Thiolgehalte wurden auch in den *in vitro*-Rückfaltungen eingesetzt. Beide Thiolkonzentrationen setzten sich aus verschiedenen Verhältnissen an reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion zusammen (nur GSH, GSH:GSSG (20:1), GSH:GSSG (2:1)). Während des Wachstums der Kulturen waren optisch deutliche

Unterschiede erkennbar. Die Ansätze mit 1 mM Glutathion verhielten sich vergleichbar zu einer Kultur ohne Thiolzusatz. Die Gelbfärbung des Mediums veränderte sich durch die Produktion von β -Carotinoiden innerhalb von drei Tagen zu blaßrot, nach vier Kulturtagen war bereits eine leichte Zellyse erkennbar. In den Kulturen mit einem Zusatz von 10 mM Glutathion änderte sich die Farbe des Mediums nicht und die Zellyse der weniger dicht bewachsenen Kulturen schritt etwas schneller voran.

Im Folgenden werden als Analytiken für die Hirudinexpression Nativgele und Massenspektren herangezogen. Da Hirudin hauptsächlich in der nicht-nativen und somit inaktiven Form aus den Kultivierungen gewonnen wird, erfasst eine Quantifizierung über enzymatische Bestimmungen ausschließlich den sehr geringen Anteil an nativem Hirudin. Eine genaue Analytik der Hirudinexpression über einen Aktivitätstest erfolgt bei der Expression von Hirudin-Signalsequenz-Mutanten (s. Kapitel IV), bei den hier gezeigten Untersuchungen wurde darauf verzichtet. Hirudin selbst läßt sich sowohl in der nativen als auch in der nicht-nativen Form aufgrund der geringen Größe sehr deutlich von allen anderen sekretierten Proteinen abtrennen und charakterisieren. Eine zusätzliche Methode für eine eindeutige Charakterisierung ist mit der Massenspektroskopie gegeben. ESI- und MALDI-Messungen belegen das korrekte Molekulargewicht des sekretierten Hirudins.

In den Abbildungen V-1 und V-3 sind Nativgele gezeigt, in denen natives von nicht-nativ gefaltetem Hirudin unterschieden werden kann. Aus jeweils 250 μ L Kulturüberstand wurden die sekretierten Proteine mit einer Methanol/Chloroform-Fällung aufkonzentriert und auf dem Gel analysiert. Abb. V-1 zeigt die Überstandsproben der Kulturen mit 1 mM Glutathion des dritten (Spur 2-4) und vierten (Spur 4-7) Kulturtages. Das Zellwachstum wurde für diese Kulturen nicht quantifiziert, daher kann hier nur ein optischer Vergleich der Menge des sekretierten Hirudins und des Gesamtproteinanteils im Überstand erfolgen. Schon am dritten Tag der Hauptkultur ist eine starke Überexpression von Hirudin erkennbar, es liegt fast ausschließlich in einer nicht-nativen Struktur vor. Auf der Höhe des Hirudinstandards ist nur bei der Kultur A1 (1 mM GSH) ein leichter Schatten zu sehen. Am vierten Kulturtag liegt die Menge des sekretierten Inhibitors noch höher, die Bande für natives Hirudin ist hier deutlich zu erkennen. Durch Vergleich mit dem Standard (10 μ g/Spur) lässt sich die

sekretierte Menge an Hirudin zu ungefähr 200 mg/L (AI4) und 20-32 mg/L (AII4, AIII4) bestimmen. Der Anteil des nativ gefalteten Hirudins an der Gesamtmenge des sekretierten Inhibitors ist sehr klein (ca. 2 mg/L bei AI4). Die Kulturen, die auch oxidiertes Glutathion enthielten (AI: GSH:GSSG (20:1); AIII: GSH:GSSG (2:1)) exprimierten bis zum vierten Kulturtag deutlich weniger Hirudin. Aufgrund der geringeren Menge kann hier nicht unterschieden werden, ob aufgrund der geänderten Thiolkonzentrationen kein natives Hirudin sekretiert oder nur eine nicht mehr zu detektierende Menge wegen der geringen Gesamtkonzentration an Hirudin transloziert wird. Allgemein läßt sich feststellen, daß eine Zugabe von Glutathion in der Konzentration von 1 mM keinen oder nur sehr geringen Einfluß auf die Faltung von Hirudin besitzt.

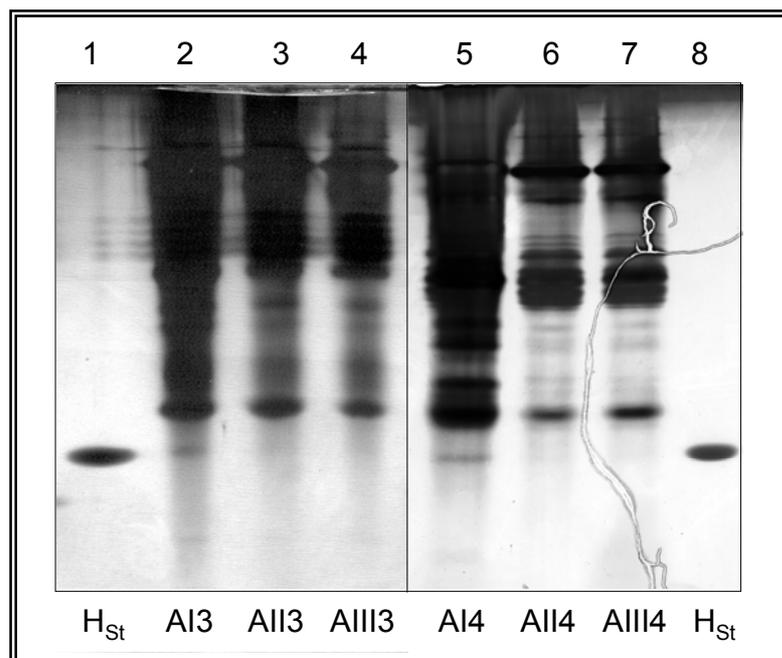


Abb. V-1 Überstandsproben der Hauptkulturen mit Zusatz von 1 mM Glutathion (Reihe A). 250 μ L, MeOH/ CHCl_3 -gefällt, Nativgel, silbergefärbt. 1,8 (Hirudin Standard); 2-4 (Tag 3); 5-7 (Tag 4); I (1 mM GSH); II (GSH:GSSG (20:1)); III (GSH:GSSG (2:1)).

Das MALDI-Massenspektrum in Abb. V-2 zeigt die Messung an der Methanol/ Chloroform-gefällten Überstandsprobe der Kultur AI2. Schon an Tag 2 der Kultur mit 1 mM reduziertem Glutathion kann Hirudin eindeutig nachgewiesen werden. Die

berechnete Masse von 6969,26 Da stimmt mit der gefundenen von 6971,68 Da sehr gut überein. Erkennbar ist auch, dass sich im Überstand kein anderes Protein mit einem Molekulargewicht von bis zu 14 kDa befindet.

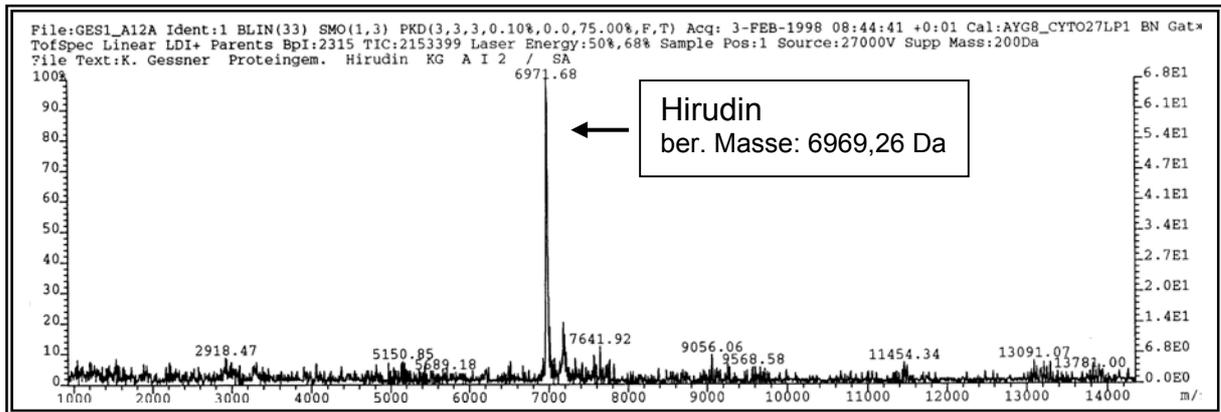


Abb. V-2 MALDI-Massenspektrum einer Überstandsprobe der Hirudinkultur AI2 (1 mM GSH, Tag 2 der Hauptkultur).

Übereinstimmend mit den Beobachtungen des geringeren Zellwachstums der Kulturen mit 10 mM Glutathion ist auf dem Nativgel der Überstandsproben des dritten Kulturtages (Abb. V-3, Spur 1-3) nur relativ wenig sekretiertes Protein erkennbar. Hirudinbanden liegen nicht vor, es ist lediglich ein leichter Schatten auf der Höhe des nicht-nativen Inhibitors zu sehen. In den Überständen des vierten Kulturtages (Spur 5-7) finden sich sehr deutliche Hirudinbanden. Alle Kulturen weisen die Produktion von nativem und nicht-nativem Hirudin auf. Die Gesamtexpression ist deutlich geringer als in den Kulturen mit 1 mM Glutathion, dagegen ist der Anteil an nativem Hirudin wesentlich höher. Die Konzentration an nativ sekretiertem Hirudin liegt ungefähr bei 2 mg/L für alle B-Kulturen, die Mengen an sekretiertem nicht-nativem Hirudin lassen sich nur sehr ungenau zu etwa 15 mg/L Überstand bestimmen.

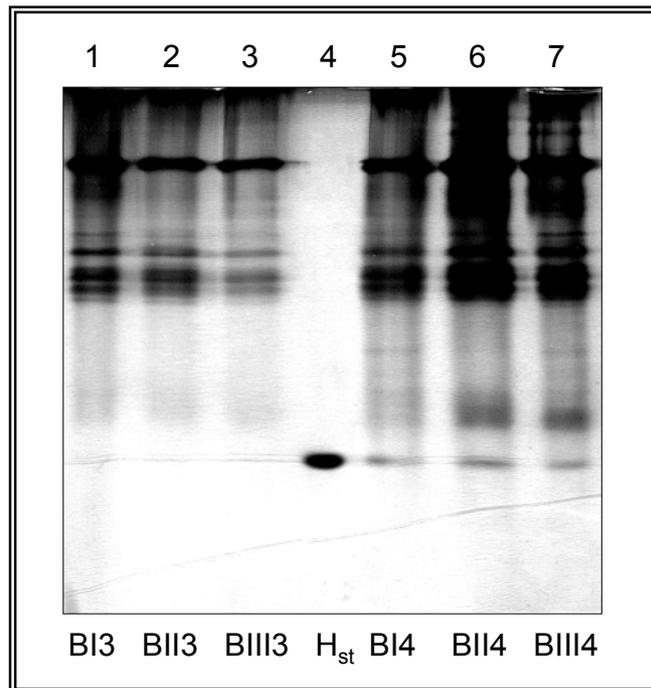


Abb. V-3 Überstandsproben der Hauptkulturen mit Zusatz von 10 mM Glutathion (Reihe B). 250 μ L, MeOH/ CHCl_3 -gefällt, Nativgel, silbergefärbt. 1-3 (Tag 3); 4 (Hirudin Standard); 5-7 (Tag 4); I (10 mM GSH); II (GSH:GSSG (20:1)); III (GSH:GSSG (2:1)).

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen: Die 1 mM-Glutathion-Kulturen erzielten eine wesentlich höhere Hirudinproduktion als die 10 mM-Kulturen. Innerhalb der 1 mM-Reihe zeichnete sich besonders der Zusatz von reduziertem Glutathion (GSH) durch einen hohen Anteil an sekretiertem Hirudin aus. Mit den 10 mM-Kulturen war die Inhibitor-Produktion zwar erheblich geringer, der Anteil an nativem Protein an der Gesamtmenge war dagegen wesentlich größer, besonders beim ausschließlichen Zusatz von reduziertem Glutathion. Die Beeinflussung der Hirudinfaltung durch Thiolzusätze im Medium spricht für die Vermutung, dass Hirudin erst nach der Sekretion außerhalb der Zelle zu falten beginnt. Die Gegenwart von GSH in höheren Konzentrationen scheint dabei die Faltung positiv beeinflussen zu können. Dagegen wird das Wachstum und die Proteinproduktion an sich negativ beeinflusst, da die Kulturen mit höherem Glutathiongehalt eine wesentlich geringere Zelldichte aufweisen und somit auch weniger gewünschtes Protein produzieren.

Die Beobachtungen der Kultivierungen zeigen jedoch einen Widerspruch zu den *in vitro*-Rückfaltungen von Hirudin. Während *in vivo* eine höhere Konzentration an Glutathion den Anteil an nativem Inhibitor verstärkt, verhindert die Konzentration von 10 mM GSH eine vollständige Rückfaltung zur nativen Struktur, die bei Zusatz von 1 mM GSH erreicht wird. Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen lassen nur bedingt Aussagen auf *in vivo*-Bedingungen zu, daher wird im nächsten Kapitel auch die Auswirkung einer Thioredoxin-Zugabe während der Hirudinexpression untersucht.

2 Coexpression von Thioredoxin

Die *in vitro*-Rückfaltungen von Hirudin mit Thioredoxin haben gezeigt, dass die Oxidoreduktase schon in katalytischen Mengen die quantitative Rückfaltung zu nativ gefaltetem Hirudin bewirken kann. Daher sollte untersucht werden, in wie weit dieser Einfluß auch während der Faltung von Hirudin unter *in vivo*-Bedingungen erreicht werden kann. Auf einen Zusatz der Oxidoreduktase zu dem Wachstumsmedium wurde verzichtet, es sollte vielmehr geklärt werden, ob eine Coexpression von Thioredoxin eine Produktion von nativem Inhibitor bewirken kann. Das natürlicherweise im Cytoplasma vorliegende Thioredoxin sollte daher mit einem Signalpeptid versehen und ebenfalls aus der Zelle ausgeschleust werden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Hirudin als ungefaltetes Polypeptid über die Zellmembran transloziert wird und erst außerhalb der Zelle faltet. Für diese Versuche wurde Thioredoxin sowohl als einzelnes Gen als auch innerhalb eines bicistronischen Konstruktes mit Hirudin exprimiert. Abbildung V-4 zeigt eine Übersicht der beiden Thioredoxin-Konstrukte.

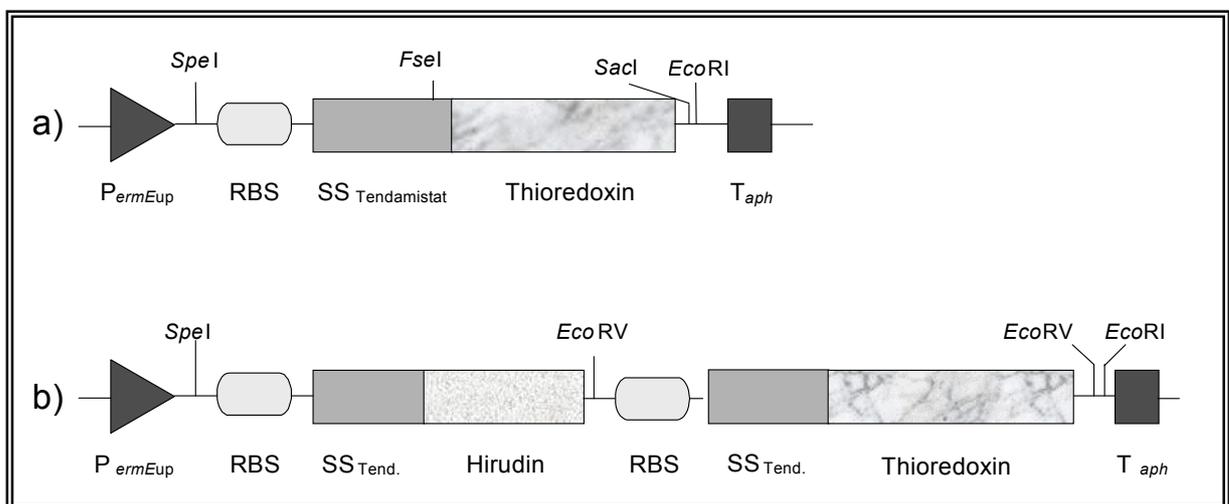


Abb. V-4 Übersicht über die Thioredoxin-Konstrukte im Expressionsvektor. a) Genbereich aus pThKG100, b) Genbereich aus pHTh100.

2.1 Konstruktion der Vektoren

Als Grundlagen für die zu generierenden Vektoren dienen einerseits der Vektor pT136 (enthält das Tendamistatgen mit Signalsequenz; SCHMITT-JOHN, 1991), der Vektor pSWHIV1 (enthält das Hirudingen mit Tendamistat-Signalsequenz; WOJCZEWSKI, 1999) und das *S. coelicolor* Cosmid H24, das ein Thioredoxingen beinhaltet [REDENBACH et al., 1996], andererseits den schon beschriebenen Shuttlevektor pAX5a. Die Vektoren sind mit genauen Angaben zur Positionierung der Fragmente und Schnittstellen im Anhang charakterisiert.

2.1.1 Thioredoxin-Konstrukt

Das Thioredoxingen (*trxA*) konnte aus dem *S. coelicolor* Cosmid H24 entnommen werden, das von M. Redenbach (Universität Kaiserslautern) in Form eines *E. coli*-Vereinzelausstrichs zur Verfügung gestellt wurde. Eine Gewinnung der Cosmid-DNA nach zwei verschiedenen Methoden zur Gewinnung von Plasmid-DNA scheiterte, daher wurde das 41 kb große Cosmid aus Rollerkulturen als Gesamt-DNA isoliert. Das isolierte Material wurde direkt als Templat für die PCR eingesetzt, in der *trxA* unter Anfügen von zusätzlichen 5'- und 3'-Sequenzen amplifiziert wurde. Am 5'-Ende des Thioredoxingens wurde ein Bereich mit einer *FseI*-Schnittstelle angehängt, am 3'-Ende entstand durch die PCR ein Bereich mit einer *SacI*-Schnittstelle. Im Vektors pT136 ist am Ende der Tendamistat-Signalsequenz eine *FseI*-Schnittstelle enthalten, *SacI* liegt in diesem Plasmid weit hinter dem Tendamistatgen und direkt vor der noch zu benutzenden *EcoRI*-Schnittstelle. Durch Öffnen von pT136 an der *FseI*- und *SacI*-Position und Einklonieren des verdauten PCR-Fragmentes entstand der Vektor pThKG1. Das Fragment zwischen den Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *EcoRI* enthielt nun den gesamten Bereich des Thioredoxingens inklusive der RBS und Signalsequenz von Tendamistat und wurde in den Expressionsvektor pAX5a eingefügt. Hierdurch resultierte der Thioredoxin-Expressionsvektor pThKG100 (s. Abb. V-5).

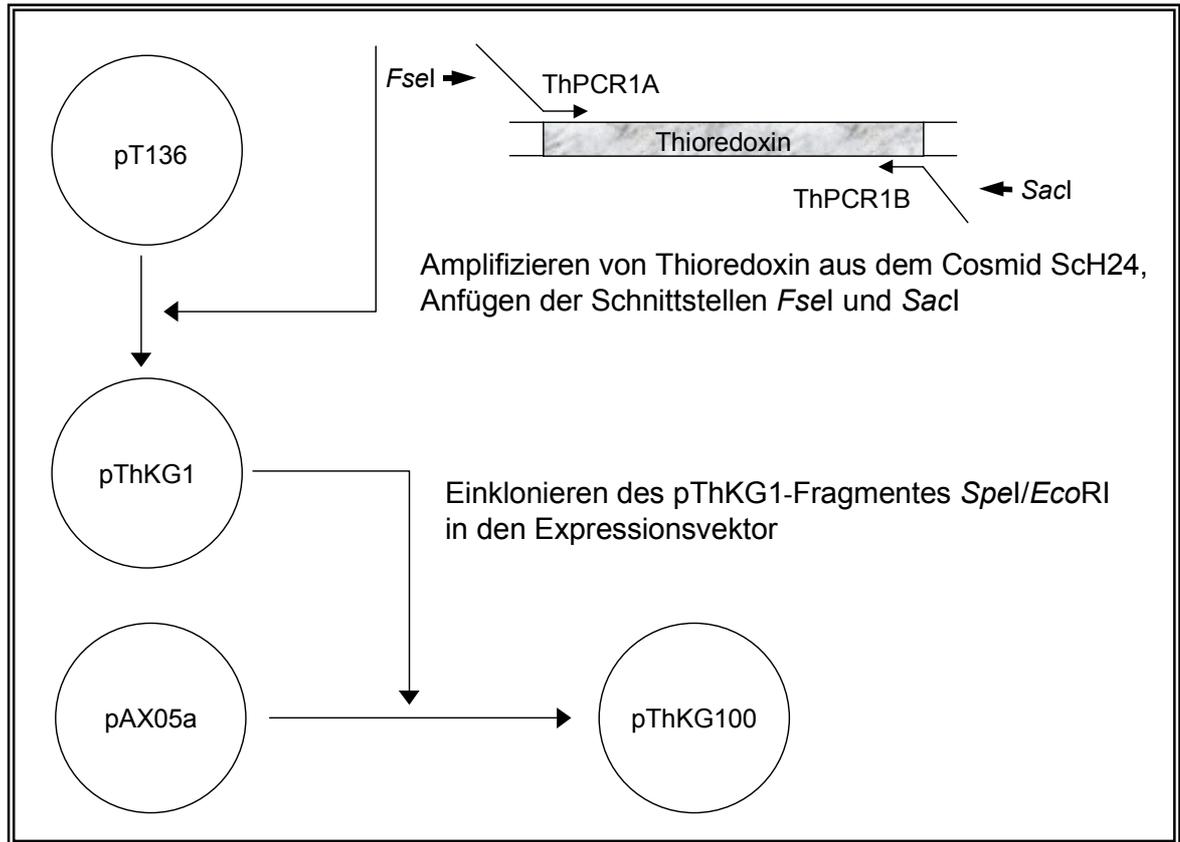


Abb. V-5 Klonierungsschema für den Aufbau der Thioredoxin-Konstruktes in pThKG100.

2.1.2 Bicistronisches Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt

Für eine Coexpression von Hirudin und Thioredoxin stellte sich die Frage, wie beiden Gene auf einem Plasmid miteinander verknüpft werden können. Da beide Enzyme als unabhängige Proteine exprimiert werden sollten, müssen sie durch ein Stop-codon getrennt und das hintere Gen mit einer zwischengeschalteten RBS vervollständigt werden. KHOKHLATCHEV ET AL. (1997) gelang dies für zwei verschiedene Kinasen der MAP-Kinase-Kaskade. Eine zweite RBS wurde 9 bp hinter dem Stop-codon der ersten Kinase eingefügt. Eine erfolgreiche Expression gelang ohne einen zusätzlichen Promotor. POLLOCK ET AL. (1998) coexprimierten zwei Cytochrome C in einem System, das für das vorgeschaltete Cyc1 einen *trc* Promotor besaß und das nachfolgende Cyc3 ohne eigenen oder mit einem zusätzlichen *lac* Promotor ausgestattet war. Das Konstrukt mit dem zusätzlichen Promotor erbrachte keine Steigerung der Cyc3-Expression. Da ein zweiter Promotor nicht zwingend erforderlich

schien, wurde das bicistronische Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt mit nur einem Promotor geplant.

Grundlage für das bicistronische Konstrukt war der Vektor pSWHIV1 (pT136-Derivat), der das Hirudingen mit vorgeschalteter Tendamistat-Signalsequenz enthält. Hier sollte hinter dem Hirudin über die Restriktionsschnittstelle *EcoRV* die Sequenz des Thioredoxins inklusive der Signalsequenz inkloniert werden. Innerhalb des Konstruktes sollte außerdem hinter dem Hirudingen eine zweite RBS liegen. Daher wurde aus dem Vektor pThKG1 der Bereich mit RBS, Signalsequenz und Thioredoxingen amplifiziert. Über die gewählten Primer wurde während der PCR am 5'- und am 3'-Ende des Fragmentes jeweils eine *EcoRV*-Schnittstelle angehängt. Aus der Ligation des PCR-Fragments mit dem geöffneten Vektor entstand das Plasmid pHTh1, der zunächst über einen Kontrollverdau auf die richtige Orientierung des Inserts überprüft wurde. Durch Transferieren des gesamten Bereiches zwischen *SpeI* und *EcoRI* in pAX5a entstand der Expressionsvektor pHTh100 (s. Abb. V-6).

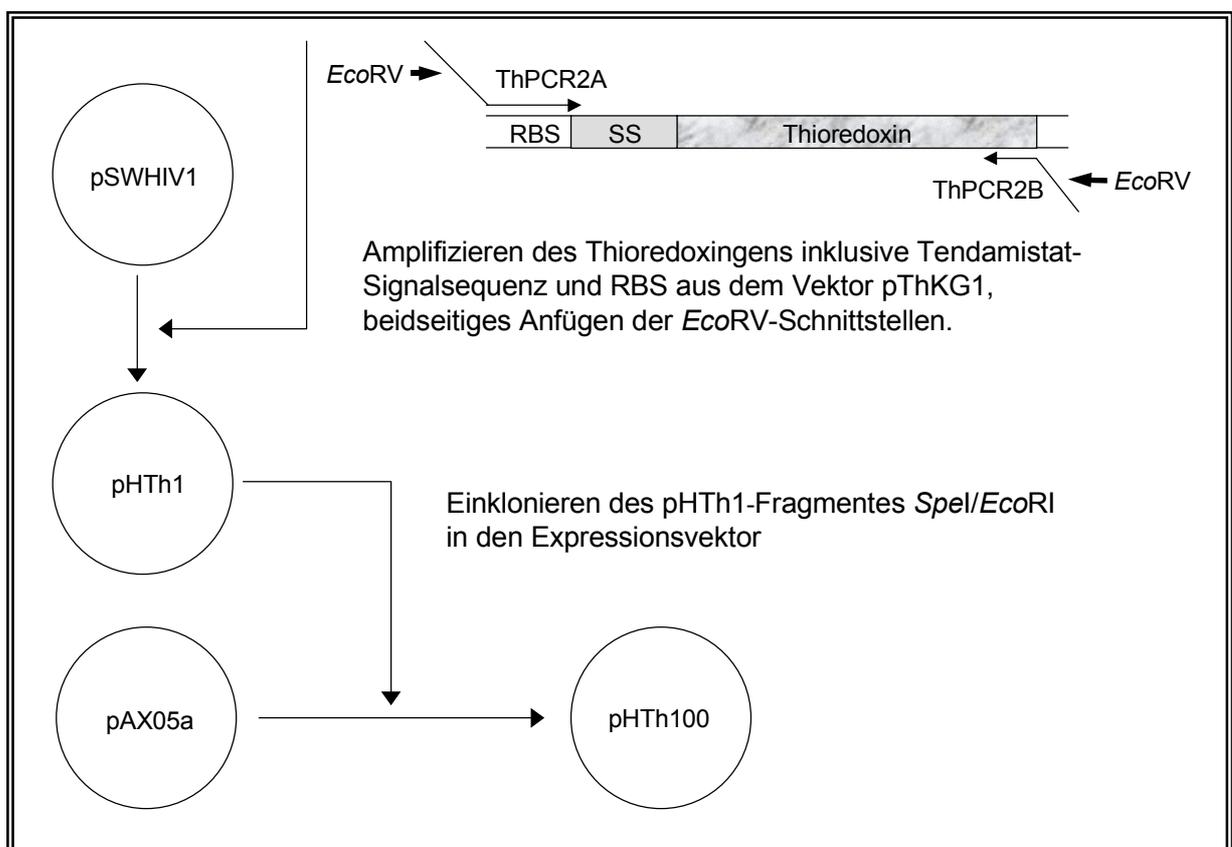


Abb. V-6 Klonierungsschema für den Aufbau der bicistronischen Hirudin/Thioredoxin-Konstruktes in pHTh100.

2.2 Expression von Thioredoxin

Die Kulturen wurden nach der Standardmethode mit *S. lividans* Zellen inokuliert, die zuvor mit dem Vektor pThKG100 transformiert wurden. Da hier keine quantitative Kontrolle der Proteinproduktion zwischen Vergleichskulturen erfolgen sollte, war ein Überimpfen von Vor- auf Hauptkulturen nicht nötig. Die im Gel der Abb. V-7 aufgetragenen Überstandsproben zeigen daher die mit Agarstücken der Transformationsplatte angeimpften Kulturen. Das Wachstum der z. T. als Sporen vorliegenden Zellen entwickelte sich sehr schnell, die exponentielle Wachstumsphase begann schon am dritten Tag der Kultivierung. Bereits am 7. Tag lag in den stark bewachsenen Kulturen eine deutliche Zellyse vor.

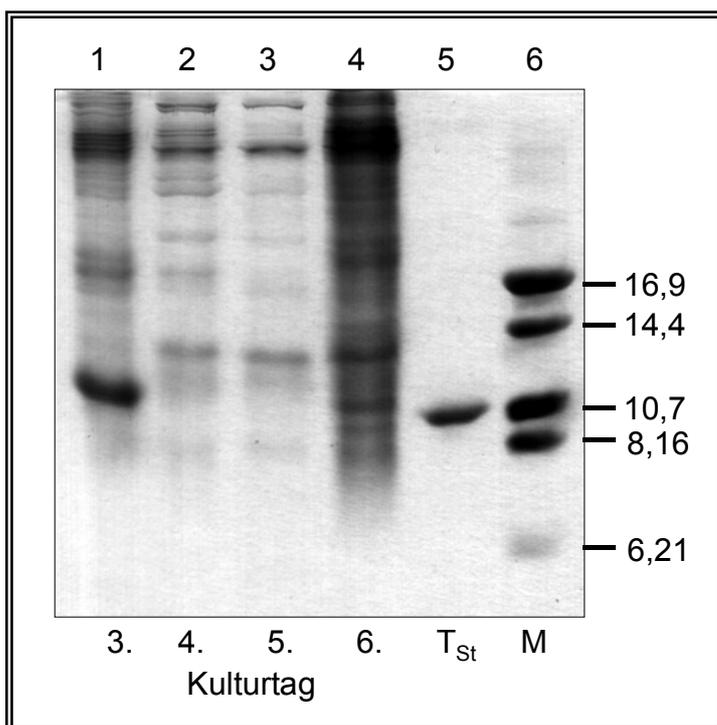


Abb. V-7

SDS-Gel der Überstände einer Thioredoxinkultur ThKG100. 1-4: Proben versch. Kulturtage (je 60 μ L, lyophilisiert); 5: Thioredoxin Standard (2 μ g); 6: Molekulargewichtsmarker, Angaben an der Seite in kDa.

Im SDS-Gel (Abb. V-7) als Standard mit aufgetragen ist rekombinantes *E. coli*-Thioredoxin mit einem Molekulargewicht von 11,7 kDa. Diese Masse stimmt mit den Größenangaben des Markers nicht ganz überein. Das exprimierte *S. coelicolor* Thioredoxin hat eine molekulare Masse von 11,8 kDa. Die starke Bande in Spur 1 stimmt in etwa mit dieser Größe überein. Durch die genaue Bestimmung der Masse über ESI-Massenspektroskopie (s. Abb. V-8) konnte die die richtige Masse des se-

kretierten Thioredoxins belegt werden. Eine Thioredoxinproduktion ist daher eindeutig nachgewiesen.

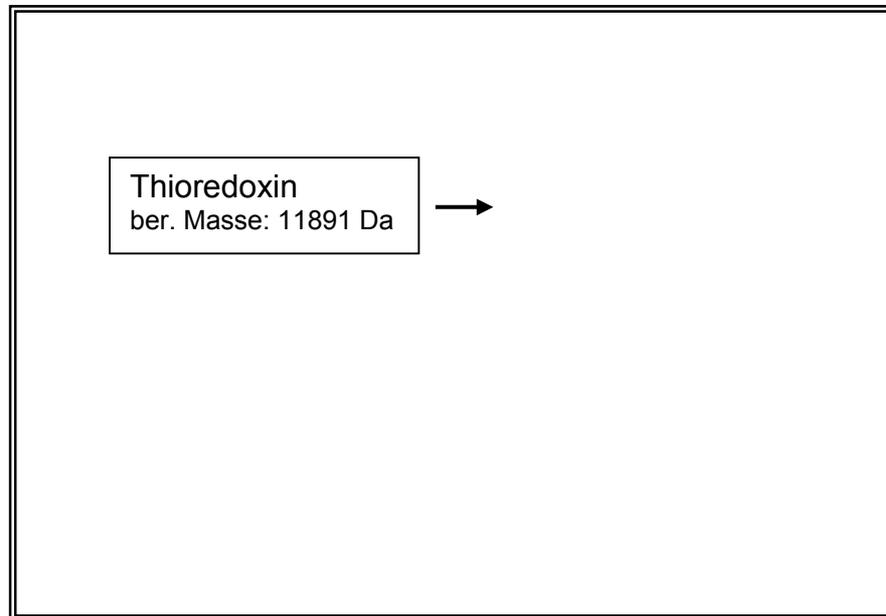


Abb. V-8 ESI-Massenspektrum einer Überstandsprobe der Kultur ThKG100.

Durch Vergleich mit dem mit aufgetragenen Standard kann eine Thioredoxinkonzentration von 65 mg/L im Überstand des dritten Kulturtages ermittelt werden. Eine Auswertung des gesamten Kulturverlaufes stellt jedoch eine Überraschung dar. Ab dem 4. Kulturtag ist die Oxidoreduktase im Überstand der Kulturen nicht mehr nachweisbar. Einerseits bedeutet das, daß Thioredoxin nicht mehr exprimiert wird, andererseits, daß ein sehr schneller Abbau des Proteins im Medium erfolgt. Da für die Kultivierungen ein Protease-armer Stamm eingesetzt wurde, ist ein enzymatischer Abbau eher unwahrscheinlich. Thioredoxin selbst sollte unter den gegebenen Bedingungen im Medium stabil sein. Ein plötzlicher Expressionsstopp ist ebenfalls nicht wahrscheinlich, da die Kultivierungsbedingungen sich nicht abrupt ändern. In verschiedenen Ansätzen wurde zwar festgestellt, daß der pH-Wert während der *S. lividans*-Kultivierungen in einen leicht sauren Bereich driften kann. Eine Änderung der Expression wurde dabei jedoch noch nicht beobachtet.

2.3 Coexpression Hirudin/Thioredoxin

Das Kulturwachstum während der Coexpression von Hirudin und Thioredoxin zeigte sich vergleichbar zu den Thioredoxinkulturen. Am dritten Tag nach der Inokulation mit Agarstücken der Transformationsplatte befanden sich die Kulturen bereits in der exponentiellen Wachstumsphase, am siebten Tag war die Zellyse schon sehr weit fortgeschritten.

Abb. V-9 zeigt zwei verschiedene Gele der Überstandsproben. Die Spuren 1-6 repräsentieren ein Nativgel, in dem sowohl Hirudin als auch *E. coli*-Thioredoxin als Standard mit aufgetragen sind. Beim Thioredoxin-Standard ist eine kleine zusätzliche Bande oberhalb der Hauptbande zu sehen, die auf Verunreinigungen zurückzuführen ist (s. Kap. IV-6). Die sehr starke Bande in Spur 1 auf ungefährer Höhe des Standards zeigt für den dritten Kulturtag exprimiertes und sekretiertes Thioredoxin. Dies konnte auch durch massenspektroskopische Messungen belegt werden (s. Abb. V-11 A). Wie bei der Einzelexpression der Oxidoreduktase ist die Thioredoxinbande in den Überständen der folgenden Kulturstage nicht mehr erkennbar. Nativ gefaltetes Hirudin ist während des gesamten Kulturverlaufs nicht nachweisbar, aber die verschwommene Doppelbande jeweils oberhalb des Hirudin-Standards weist auf sekretiertes, nicht-natives Hirudin hin. Um dies zu überprüfen, wurde eine Überstandsprobe des 6. Kulturtages der Ent- und Rückfaltungsprozedur unterzogen. Zu dem Rückfaltungsansatz wurden 0,25 Moläquivalente rekombinantes Thioredoxin zugesetzt. Diese Konzentration resultierte bei den *in vitro*-Rückfaltungen in einer vollständigen Rückfaltung zum nativen Protein. Abb. V-10 zeigt das Ergebnis. Das Protein in der unteren Bande in Spur 1 des Nativgels läuft exakt auf der Höhe des Hirudin-Standards. Dieses Ergebnis, zusammen mit den massenspektroskopischen Untersuchungen (Abb. V-11 B) belegt eindeutig die Expression von Hirudin. Ungeöhnlich an dieser Expression war die einheitliche Hirudinkonzentration des Überstandes über den gesamten Kulturverlauf hinweg. Eine Akkumulierung des sekretierten Inhibitors trat nicht auf.

Die Spuren 7-13 in Abb. V-9 zeigen zusätzlich ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel, in dem die Hirudinbanden aufgrund der Färbemethode nicht nachweisbar sind. Auch Thioredoxin liegt nur in geringer Konzentration vor, die Proteinbande in Spur 7 (3. Kulturtag) ist nicht sehr stark ausgeprägt.

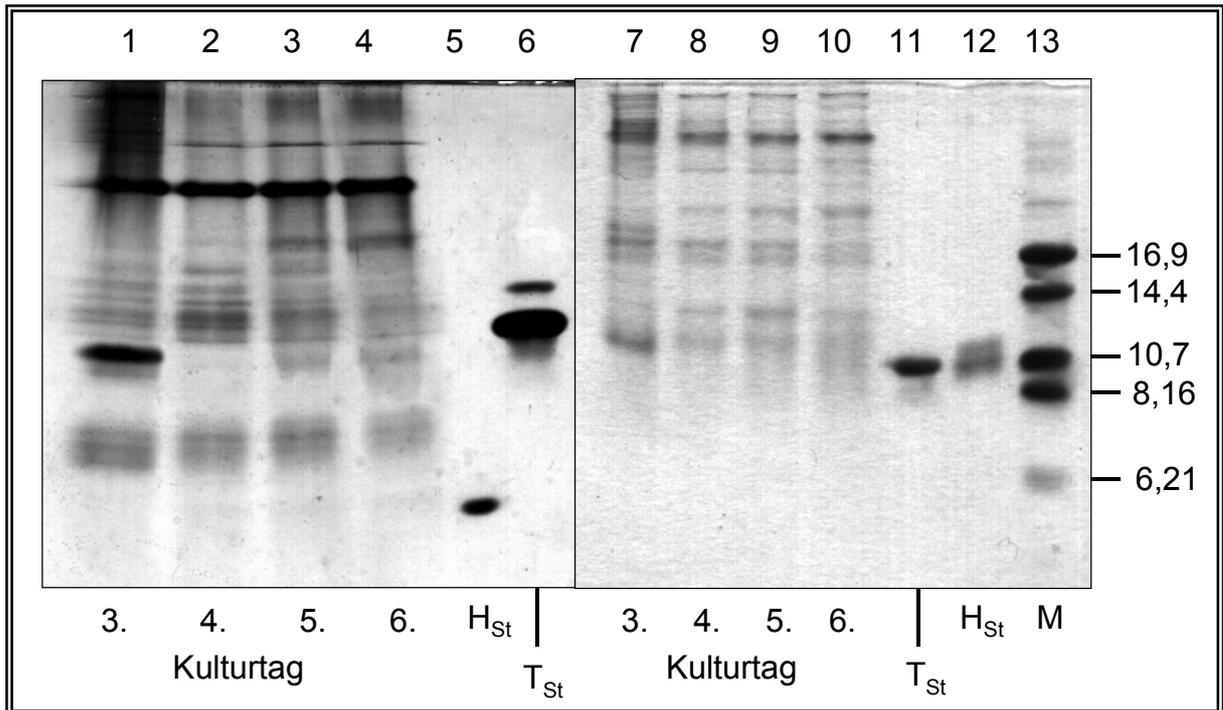


Abb. V-9 Nativ- und SDS-Gel von Überständen der HTh100-Kulturen. 1-6: Nativgel, 7-13: SDS-Gel. 1-4 (je 200 µL) und 7-10 (je 60 µL) (Überstandsproben der einzelnen Kulturtage), 5,12 (Hirudin Standard, 10 µg, 5 µg), 6,11 (Thioredoxin Standard, 4 µg, 2 µg), 13 (Molekulargewichtsmarker, Größenangabe an der Seite).

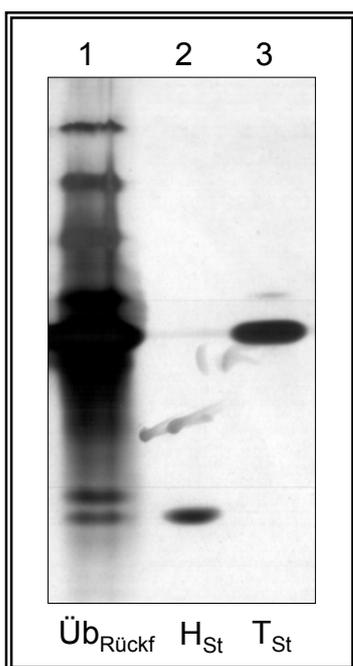


Abb. V-10 Nativgel mit ent- und rückgefalteten Aliquots des Überstands vom 6. Kulturtag (HTh100, Abb. V-9, Spur 4 und 10). Rückfaltung mit 0,25 Äquivalenten Thioredoxin.

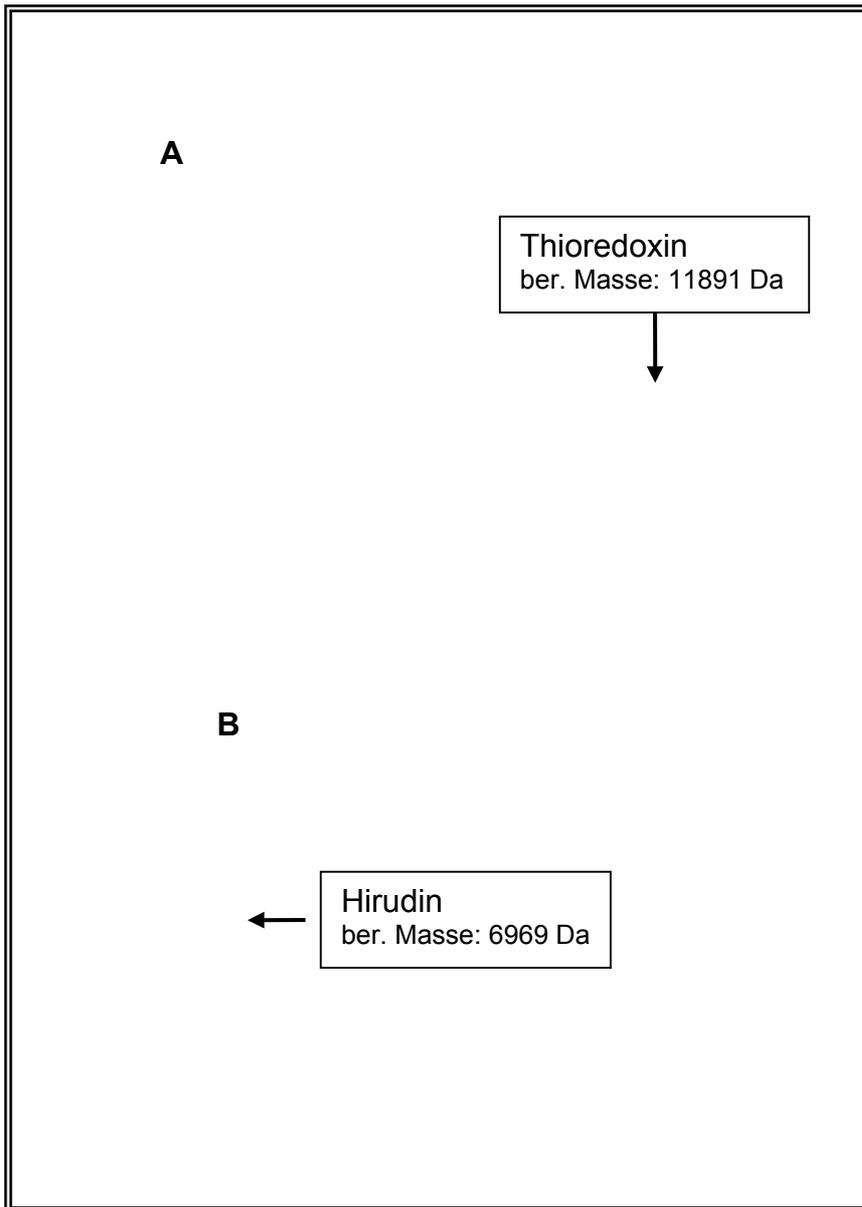


Abb. V-11

ESI-Massenspektren von Überstandsproben der Hirudinkultur HTh100.

A: Tag 3 der Kultur, im Spektrum ist Thioredoxin zu sehen; B: Tag 6 der Kultur, im Spektrum ist Hirudin zu sehen.

Im Nativgel der Abb. V-9 sieht es so aus, als ob Thioredoxin in wesentlich höheren Konzentrationen als Hirudin sekretiert wird. Dieser Eindruck täuscht aber, da Thioredoxin bei der Silberfärbung ca. 50fach stärker anfärbt als Hirudin (vgl. Kap. IV-6). Die Quantifizierung der Proteinmengen über die Standards ergab ca. 20 mg/L für Hirudin und 4 mg/L (Nativgel) bzw. 3,5 mg/L (SDS-Gel) für Thioredoxin. Betrachtet man die sekretierten Proteinmengen, dann wird Hirudin in ca. fünffach höheren Konzentrationen als Thioredoxin sekretiert. Hier stellt sich die Frage, in wie weit Expression und Translokation der Proteine ein Rolle für dieses Mengenverhältnis spielen. Wahrscheinlich liegt eine größere Verantwortung in der Expression, da die

Sekretion beider Proteine durch vergleichbare Parameter bestimmt wird. Hauptfaktor ist zunächst das Signalpeptid, welches den Sekretionsweg und wahrscheinlich auch die Effektivität der Translokation vorgibt. Da beiden Proteinen das Tendamistat-Signalpeptid vorangestellt ist, liegt hier kein Unterschied vor. Darüberhinaus sind beide Proteine mit 7 (Hirudin) bzw. 11,9 kDa (Thioredoxin) recht klein und besitzen zudem einen niedrigen pI (3,8 bzw. 4,4). Ein niedriger pI wird in letzter Zeit als Parameter für eine erfolgreiche Sekretion diskutiert. Anhand der Expressionsstudien mit dem Konstrukt pThKG100 konnte außerdem gezeigt werden, daß Thioredoxin in sehr viel höheren Ausbeuten gewonnen werden kann. Die Kapazitäten des Sekretionsweges können also während der Coexpression noch nicht erschöpft sein. Daher ist es wahrscheinlicher, daß sich die Mengendifferenz der im Überstand befindlichen Proteine aus der Expression ergibt. Beide Gene werden innerhalb eines mRNA-Stranges transkribiert, während der Translation kann das Ribosom jedoch an zwei verschiedenen Stellen an der mRNA ansetzen. Zunächst erfolgt die Translation des vorderen Hirudingens. Theoretisch könnte das Ribosom die mRNA nach dem Stopcodon des Hirudins verlassen und so eine nicht erfolgte Translation des dahinter liegenden Gens eine Thioredoxinexpression minimieren. Da die zweite RBS aber nur neun Nukleotide vom ersten Stopcodon entfernt liegt, ist ein Ablösen des Ribosomen von der mRNA unwahrscheinlich, da jeweils 15-20 Nukleotide beidseitig des aktiven Zentrums vom Ribosomen abgedeckt werden. Ein Kontaktverlust und somit eine Reduktion des Thioredoxinvorläufers ist daher unwahrscheinlich. Anhand der vorhandenen Daten kann nicht geklärt werden, warum die Thioredoxinkonzentration im Medium deutlich geringer ist als die Hirudinkonzentration.

Werden die sekretierten Proteinmengen mit denen anderer Kultivierungen verglichen, so läßt sich feststellen, dass die hier vorliegende Hirudinproduktion zu einigen Kulturen mit Glutathion-Zusatz äquivalent ist. Ein erfolgreicher Zusatz von GSH resultierte jedoch in einer zehnfach höheren Hirudinmenge. Auch Thioredoxin wird in einer Einzelexpression deutlich effektiver produziert. Die dort bestimmte Konzentration im Medium von ungefähr 65 mg/L liegt 15-20fach höher als der in der Coexpression erreichte Thioredoxingehalt. Kann die Coexpression nicht optimiert werden, scheint sie aufgrund der geringen Ausbeuten produktionstechnisch nicht interessant zu sein.

Darüber hinaus liegt der gewünschte Effekt einer Produktion von nativ gefaltetem Hirudin nicht vor. Es mag sein, dass sich innerhalb der geringen Hirudinausbeute auch ein geringer Anteil an nativem Inhibitor verbirgt, aber diese potentielle Menge ist zu gering, um im Sinne einer Optimierung interessant zu sein. Das Verhältnis des sekretierten Proteins von 4:1 (Hirudin:Thioredoxin) reicht unter *in vitro*-Bedingungen für eine quantitative Rückfaltung zum nativen Inhibitor aus, hier ist aber am dritten Kulturtag (Spur 1, Abb. V-9) kein positiver Einfluß des Thioredoxins auf die Struktur von Hirudin erkennbar.

In parallelen Arbeiten von I. Goren in unserem Arbeitskreis wurde festgestellt, daß coexprimiertes *E. coli* DsbA eine sehr geringe Erhöhung des Anteils an nativ gefalteten, sekretierten Hirudin bedingte. Ein ebenfalls coexprimiertes Fragment der humanen Proteindisulfidisomerase (hPDIab) führte zu einer moderaten Produktionssteigerung des nativ gefalteten Hirudins, die Ausbeute lag aber noch deutlich unter den Werten, die in einer Expression unter Zusatz von 10 mM GSH erzielt werden. Eine Coexpression mit *E. coli* DsbC scheiterte. Die Coexpression von verschiedenen Oxidoreduktasen zeigt also ganz unterschiedliche Ergebnisse. Neben einer eventuell vorhandenen Toxizität (DsbC) liegt in der stark variierenden Isomeraseaktivität der Enzyme eine mögliche Erklärung für einen mehr oder weniger starken Einfluß auf die Hirudinfaltung. Bei Thioredoxin läßt sich die Isomeraseaktivität durch Mutation im aktiven Zentrum verändern. Untersuchungen zu diesem Phänomen werden in Kapitel V-4 behandelt.

Das größte Problem an der Thioredoxin-, bzw. an der Coexpression bleibt aber die nicht mehr vorhandene Oxidoreduktase im weiteren Kulturverlauf. Daher sollten zunächst weitere Möglichkeiten zur Expression von Hirudin und/oder Thioredoxin untersucht werden. Im folgenden Kapitel werden Expressionsergebnisse vorgestellt, die über integrative Vektoren erzielt werden konnten.

3 Expression über integrative Vektoren

Nachdem die erzielten Proteinausbeuten in der Coexpression relativ gering waren und die Expression von Thioredoxin früher als die Hirudinexpression startete und auch nur einen Tag anhielt, wurde nach anderen Kombinationsmöglichkeiten für eine gleichzeitige Expression gesucht. Die Integration eines der beiden Gene in das *S. lividans*-Genom und die Transformation dieses Stammes mit einem Vektor, der die Information des zweiten Proteins trägt, war hierfür denkbar. In dem gewählten System mit einem integrativen Vektor wäre über einen induzierbaren Promotor so eventuell auch eine zeitversetzte Expression der beiden Proteine möglich. Ebenso sollte eine Integration des kompletten bicistronischen Konstruktes und die daraus resultierende Expression der Proteine untersucht werden.

3.1 Konstruktion der Vektoren

Als Ausgangsplasmide für die einzelnen Konstrukte wurden die schon vorliegenden Vektoren pSWHIV1 (Hirudin), pThKG1 (Thioredoxin) und pHTh1 (Hirudin/Thioredoxin) eingesetzt. Eingefügt wurden die entsprechenden Genabschnitte in die "multi cloning site" des integrativen Vektors pJ8600. Er enthält das "origin of transfer" für den Transfer des Plasmids von *E. coli* auf *Streptomyces*, das Integrasegen und die "attachment site" des Phagen ϕ C31, den Thiostrepton-induzierbaren *tipA*-Promotor mit zugehörigem Thiostrepton-Resistenzgen, darüber hinaus eine Apramycin-Resistenz. Der Transkriptionsterminator *tfd* stammt aus dem Phagen fd (Abb. siehe Anhang).

Ein Einfügen der Genbereiche über die Schnittstellen *NdeI* und *XbaI* schien am sinnvollsten, da die Schnittstelle von *NdeI* ein ATG-Codon beinhaltet und so direkt die Gensequenz beginnend mit dem Startcodon in den Vektor eingebracht werden kann. *XbaI* ist ebenfalls prädestiniert, da diese Schnittstelle ein Stopcodon beinhaltet und die gewünschte Sequenz so ohne zusätzlich anhängende Sequenzen inkloniert werden kann.

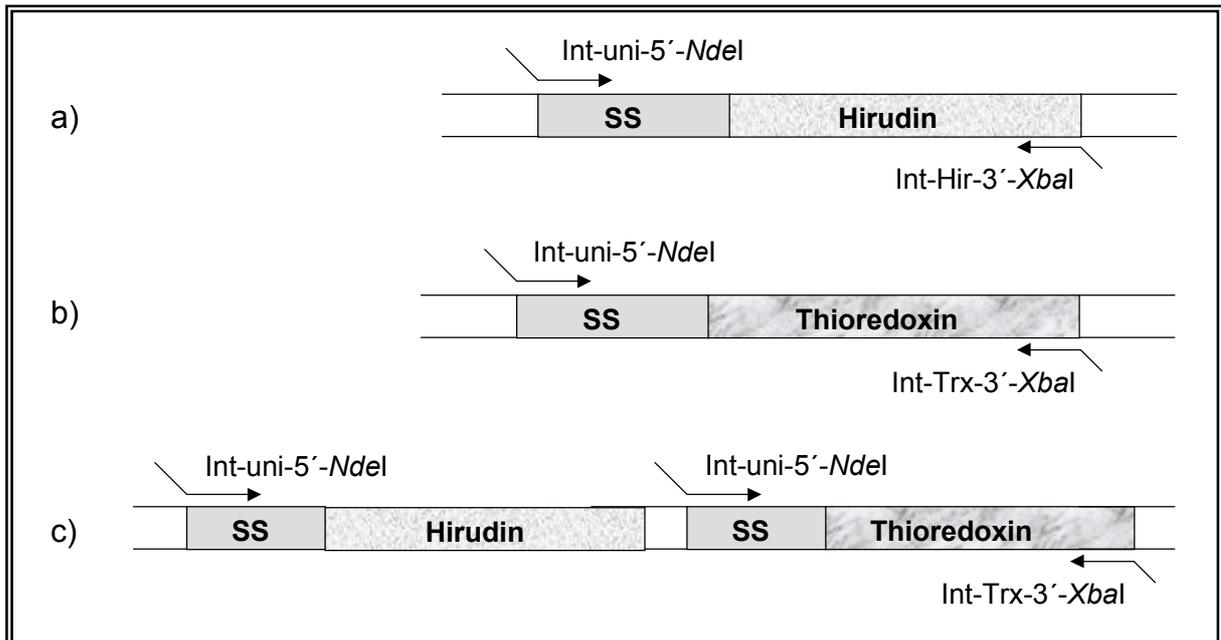


Abb. V-12 Schema der PCR zur Darstellung der Genfragmente, die in den integrierbaren Vektor einkloniert werden sollen. a) Generieren des Hirudin-Fragmentes unter Anfügen der *NdeI*- und *XbaI*-Schnittstellen. b) Generieren des Thioredoxin-Fragmentes unter Anfügen der *NdeI*- und *XbaI*-Schnittstellen. c) Generieren des bicistronischen Konstruktes unter mit *NdeI*- und *XbaI*-Schnittstelle.

Es wurden Primer konstruiert, die für alle drei Zielsequenzen in der PCR einsetzbar waren. Der 5'-Primer beinhaltet einen zum Anfang der Tendamistat-Signalsequenz komplementären Bereich und einen 5'-Überhang, der die *NdeI*-Schnittstelle enthält. Die 3'-Primer enthalten die Endsequenz von Hirudin bzw. Thioredoxin und in einem Überhang die einzuführende *XbaI*-Schnittstelle. Die PCR für die Einzelkonstrukte mit Hirudin oder Thioredoxin verlief problemlos und erzielte in hoher Konzentration die gewünschten Fragmente. Bei der PCR des bicistronischen Konstruktes als Templat lagerte sich der 5'-Primer an die beiden möglichen Positionen an, eine Isolierung des gewünschten größeren Fragmentes war aber in ausreichender Menge möglich. Die Ligation des geöffneten Vektors mit den Fragmenten bereitete jedoch große Probleme. Für die Einzelkonstrukte konnten schließlich Klone mit den entsprechenden Plasmiden isoliert werden, ein Klon mit dem bicistronischen Vektorkonstrukt konnte trotz vielfacher Versuche mit verschiedenen Methoden und Ansätzen nicht isoliert werden.

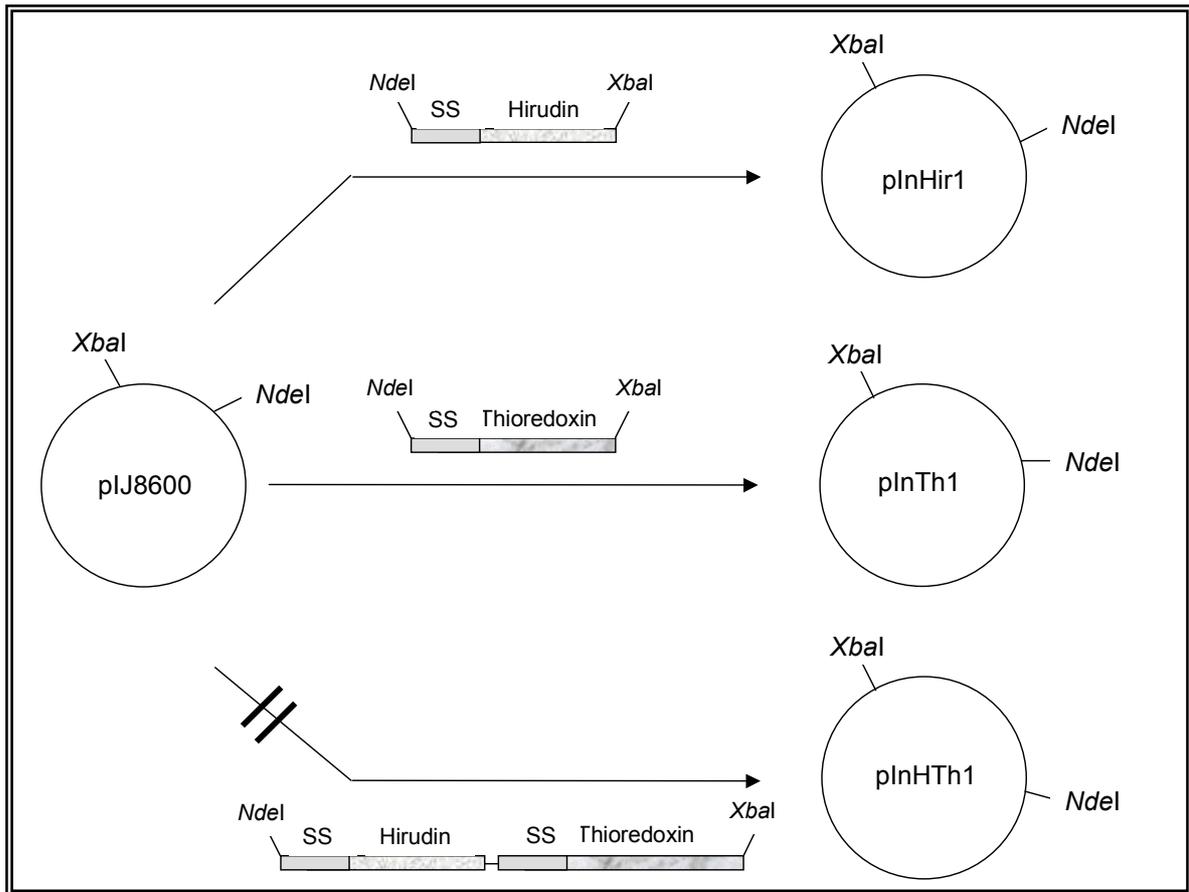


Abb. V-13 Klonierungsschema für den Aufbau der integrativen Vektoren.

3.2 Expression

Die Transformation von *S. lividans* mit den integrativen Vektoren erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Zum Einen wurden *S. lividans*-Protoplasten direkt mit den Plasmiden nach der Standardmethode transformiert. Die zweite Methode beinhaltete einen konjugativen Transfer der Vektoren von *E. coli* in *S. lividans* nach FLETT ET AL. (1997). Hierbei wurden zunächst *E. coli*-Zellen nach dem Standardverfahren transformiert und in Medium angezogen. Die geernteten Zellen wurden mit durch Hitzeschock zur Keimung induzierten *S. lividans*-Sporen versetzt und auf einer Agarplatte inkubiert. Nach einem Tag wurden die *E. coli*-Zellen mit A. dest von der Platte gespült, weiterhin anhaftende Zellen durch Zugabe von Nalidixinsäure am Wachstum gehindert. Die Transformationsplatten wurden daraufhin noch weitere 5 - 6 Tage inkubiert. Zum Animpfen der Kulturen sollten die nach beiden Methoden sporulierten

Zellen eingesetzt werden, was aber nur im Falle der durch konjugativen Transfer transformierten Zellen gelang (siehe unten). Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase nach drei Tagen wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Thiostrepton induziert.

3.2.1 Expression von Hirudin

Die Transformation mit dem Vektor pInHir1 nach der Standardmethode ergab auf der Transformationsplatte ein anormales Wachstum der *S. lividans*-Zellen. Es entwickelten sich ungewöhnliche viele Kolonien, die jedoch nicht sporulierten. Ein Animpfen des Mediums mit diesen Zellen führte nicht zu einem Wachstum in Flüssigkulturen.

Die durch konjugativen Transfer erzielten *S. lividans*-Mutanten sporulierten auf den Transformationsplatten sehr gut und ergaben in den angeimpften Kulturen bei Induktion des Promotors am dritten Tag eine starke Hirudinproduktion. Bei gleichzeitiger Zugabe von sowohl Apramycin als Resistenzgift als auch Thiostrepton als Induktor zu Beginn der Kultivierung wurde kein Wachstum in den Kulturen beob-

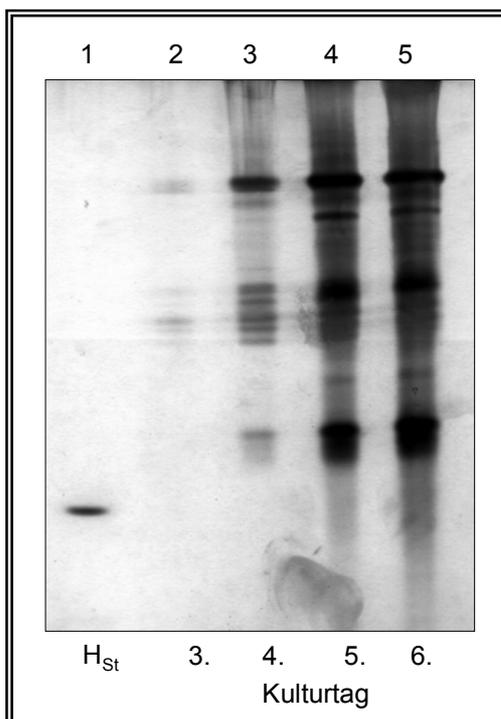


Abb. V-14

Nativegel von Überständen der InHir1-Kultur. 1 (Hirudin Standard, 10 µg), 2-5 (Überstandsproben der verschiedenen Kulturtage, je 400 µL).

achtet. In Abbildung V-14 sind Überstandsproben des 3. bis 6. Kulturtages in einem Nativgel aufgetrennt. Spur 2 zeigt die Hirudinkultur direkt vor der Induktion mit Thio-strepton. Die Kultur befindet sich hier im Stadium zu Beginn des exponentiellen Wachstums, in dem erst sehr wenig Proteine ins Medium sekretiert worden sind. Bereits einen Tag später (Spur 3) ist die Hirudinexpression erkennbar, das Maximum der sekretierten Menge an Inhibitor ist schon zwei Tage nach der Induktion erreicht (Spur 4). Durch Vergleich mit dem Standard läßt sich die Hirudinproduktion auf ca. 600-700 mg/L Überstand quantifizieren. Das ist ca. dreimal so hoch wie in einer optimierten Kultivierung mit GSH-Zusatz und 20-30fach höher als in den sonstigen bisher hier beschriebenen Hirudinkultivierungen.

3.2.2 Expression von Thioredoxin

Eine Transformation mit dem Vektor pInTh1 nach der Standardmethode ergab ebenfalls wie in 3.2.1 beschrieben ein anormales Wachstum der *S. lividans*-Zellen auf der Transformationsplatte. Die nicht sporulierten Zellen führten nach Inokulation eines Mediums zu keinem Kulturwachstum.

Die durch konjugativen Transfer erzielten *S. lividans*-Mutanten sporulierten auf den Transformationsplatten sehr gut und resultierten nach Inokulation der Kulturen in normalem Wachstum. Eine Thioredoxinproduktion konnte jedoch nicht erzielt werden. In unterschiedlichen Ansätzen wurden verschiedene Konzentrationen an Apramycin getestet, verschiedene Zeiten für die Induktion durch Thiostrepton untersucht, ebenso wiederholte Induktion. In keinem der Ansätze wurde die Expression von Thioredoxin beobachtet. Da ein normales Kulturwachstum vorlag, kann davon ausgegangen werden, daß der Vektor entweder in das *S. lividans*-Genom integriert wurde oder zumindest als Plasmid in den Zellen vorlag, da sonst die nicht vorhandene Apramycin-Resistenz ein Wachstum verhindert hätte.

Da für eine zeitversetzte Expression der Proteine nur die Kombination aus integriertem und induzierbarem Thioredoxin und das auf einem Plasmid vorliegende Hirudin interessant gewesen wäre, wurde hier auf weitere Versuche oder genauere Analytiken verzichtet.

4 Variation des CXXC-Motifs in Thioredoxin

In den Expressionsversuchen von Thioredoxin und Hirudin hat sich gezeigt, dass Thioredoxin in einer Coexpression keinen positiven Effekt auf die Faltung des sekretierten Hirudins besitzt. Zum Einen mag das an den zu geringen Konzentrationen des sekretierten Thioredoxins liegen. Ebenfalls denkbar ist aber, dass Hirudin nach der Translokation so schnell oxidativ faltet, dass die ebenfalls sekretierte Oxidoreduktase nur über eine Isomerisierung der Disulfidbrücken eine native Struktur des Hirudins erzielen könnte.

Wie im Theorieteil beschrieben, besitzt Thioredoxin nur eine geringe Isomeraseaktivität. Im Vergleich zur Proteindisulfidisomerase (PDI) erreicht Thioredoxin nur etwa 2 % der Isomerase-Effektivität. Eine Mutation des Redoxzentrums (CGPC) zum PDI-Motiv CGHC erhöht die Disulfidbindung und Isomeraseaktivität von Thioredoxin um das zehnfache. Die Veränderung der AS-Sequenz innerhalb der konservierten CXXC-Region hat Auswirkungen auf das Redoxpotential und den pK_a -Wert des N-terminalen, reaktiveren Cysteins. Bei allen Enzymen der Thioredoxinfamilie verändern sich Redoxpotential und pK_a -Wert bei einem Austausch der beiden Aminosäuren innerhalb des CXXC-Motivs. Beinhaltet die ausgetauschte Sequenz das Motiv einer anderen Oxidoreduktase, so nähern sich die physikalischen Werte an die des Herkunftszyms an (s. Tab. II-4, S. 37).

Diese Effekte sollten an dem *S. coelicolor* Thioredoxin genauer untersucht und ein eventueller Einfluß auf die Faltung von Hirudin überprüft werden. Dazu wurden Thioredoxin-Mutanten mit den CXXC-Motiven aus humaner PDI und *E. coli* DsbA sowie DsbC generiert. Während PDI und DsbC starke Disulfid-Isomeraseaktivität besitzen, katalysiert DsbA hauptsächlich die Oxidation von Cysteinen zu Disulfiden. Tabelle V-1 zeigt eine Übersicht der CXXC-Motive, Redoxpotentiale und pK_a -Werte der einzelnen Enzyme.

Oxidoreduktase	CXXC-Motiv	Redoxpotential $E^{0'}$	pK_a des N-term. Cys
Thioredoxin (<i>S. coelicolor</i> , <i>E. coli</i>)	CGPC	-0,270 V	7,13
DsbA (<i>E. coli</i>)	CPHC	-0,122 V	3,28 / 3,5
DsbC (ebenfalls DsbG, <i>E. coli</i>)	CGYC	-0,159 V	-
PDI (N- und C-terminal)	CGHC	-0,110 V / -0,190 V	6,7

Tab. V-1 Übersicht über die CXXC-Motive, Redoxpotentiale und pK_a -Werte der verschiedenen Oxidoreduktasen. Ref.: s. Tab. II-4, S. 37.

4.1 Konstruktion der CXXC-Mutanten

Für die Darstellung der CXXC-Mutanten des Thioredoxins wurde der Klonierungsvektor pThKG1 als PCR-Templat eingesetzt. Der Aufbau der Mutationsfragmente erfolgte über eine PCR in zwei Schritten (s. Schema in Abb. V-15). Im ersten Schritt (PCR 1) wurden über mismatch-Primer Fragmente erzeugt, die den Bereich der veränderten CXXC-Region bis zur *EcoRI*-Schnittstelle abdecken (Fragmente A), bzw. den Bereich von der *SpeI*-Schnittstelle bis zur CXXC-Region (Fragmente B). In jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen wurden dabei die drei verschiedenen Sequenzen der Mutanten aufgebaut. Im zweiten Schritt (PCR 2) wurden die Fragmente A und B mit den äußeren Primern kombiniert und so die Gesamtfragmente zwischen den Schnittstellen *SpeI* und *EcoRI* generiert, die jeweils die veränderte CXXC-Region enthielten.

In der PCR 1 waren nach 30 Zyklen die erwünschten Fragmente das Hauptprodukt der Reaktion, in der PCR 2 wurden die erwarteten Fragmente nach ebenfalls 30 Zyklen als fast alleiniges Produkt isoliert. Eine Ligation mit dem über *SpeI/EcoRI* geöffneten pAX5a ergab eine Vielzahl von Klonen, aus denen nach Kontrollverdau und Sequenzierung die erwünschten Plasmide pThGH (enthält das Thioredoxingen mit PDI-CXXC-Sequenz), pThGY (Thioredoxingen mit DsbC-Sequenz) und pThPH (Thioredoxingen mit DsbA-Sequenz) gewonnen werden konnten.

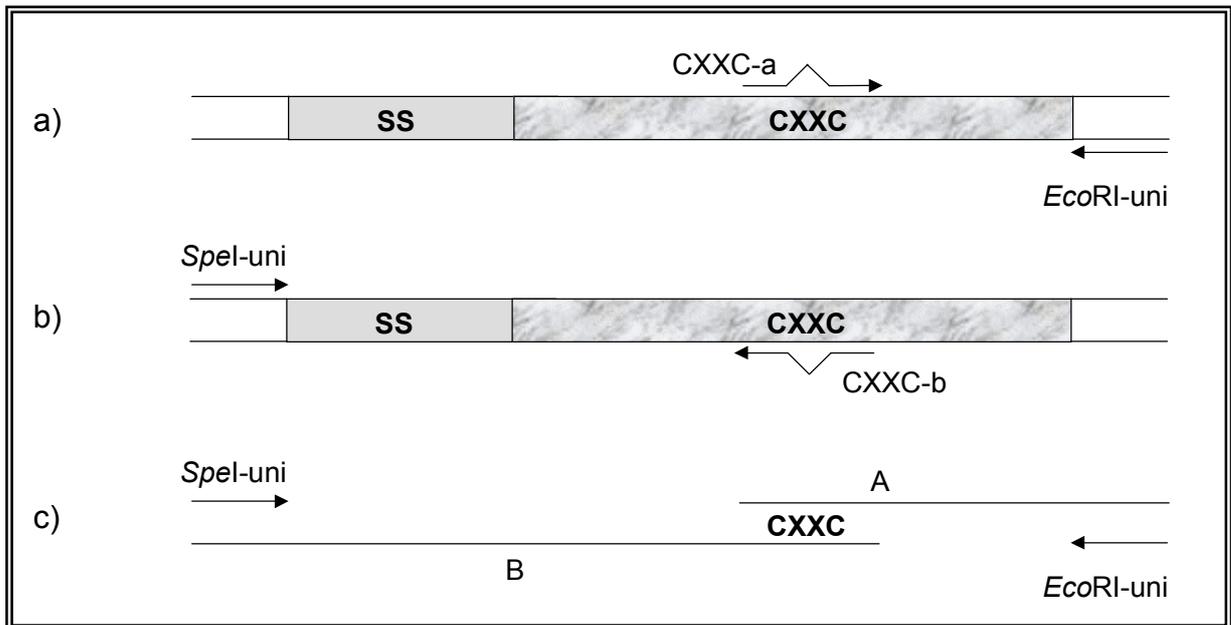


Abb. V-15 Schema der PCR zur Darstellung der drei Thioredoxin-CXXC-Mutanten. a) PCR 1A: Generieren der drei verschiedenen Fragmente A mit den AS-Sequenzen CGHC, CGYC, CPHC. b) PCR 1B: Generieren der drei verschiedenen Fragmente B. c) PCR 2: Aufbau des kompletten Fragments zwischen SpeI und EcoRI mit den äußeren Primern und den Fragmenten A und B als Template.

4.2 Expression der CXXC-Mutanten

Eine Kultivierung der mit den verschiedenen Plasmiden transformierten *S. lividans*-Zellen sollte zeigen, dass die Thioredoxin-Mutanten exprimiert werden und im Rahmen einer Überexpression sich als nicht toxisch für die Zellen erweisen. In parallelen Arbeiten im Arbeitskreis (I. Goren) wurde festgestellt, dass z. B. eine Überexpression von *E. coli* DsbC nicht möglich ist. Ebenso wurde dort die Beobachtung gemacht, dass eine Expression von *E. coli* DsbA und humanem PDI-Fragment (hPDIab) in einem glucosefreien Medium eine erheblich größere Ausbeute an Oxidoreduktase erzielt werden kann, eine hohe Produktion von Hirudin dagegen nur in einem glucosehaltigem Medium erreicht wird. Daher erfolgte bei der Thioredoxinexpression ein Produktionsvergleich in glukosefreiem TS- und glukosehaltigem MM-Medium.

Auf dem SDS-Gel in Abb. V-16 sind Überstandsproben der *S. lividans*-Kulturen der verschiedenen Medien aufgetrennt. Die Banden bei etwa 11 kDa beinhalten Thioredoxin. Die über das SDS-Gel bestimmte Masse stimmt nicht ganz mit der berechneten von etwa 11,9 kDa überein, dieses Phänomen wurde auch schon in der Expression des Wildtyps beobachtet (s. Kapitel V-2.2). Die dort durchgeführte Kontrolle über eine Massenspektroskopie erbrachte den Beweis, dass es sich eindeutig um Thioredoxin handelt. Die Expression der Thioredoxin-Mutanten ist in beiden Medien vergleichbar, jedoch allgemein nicht sehr stark ausgeprägt.

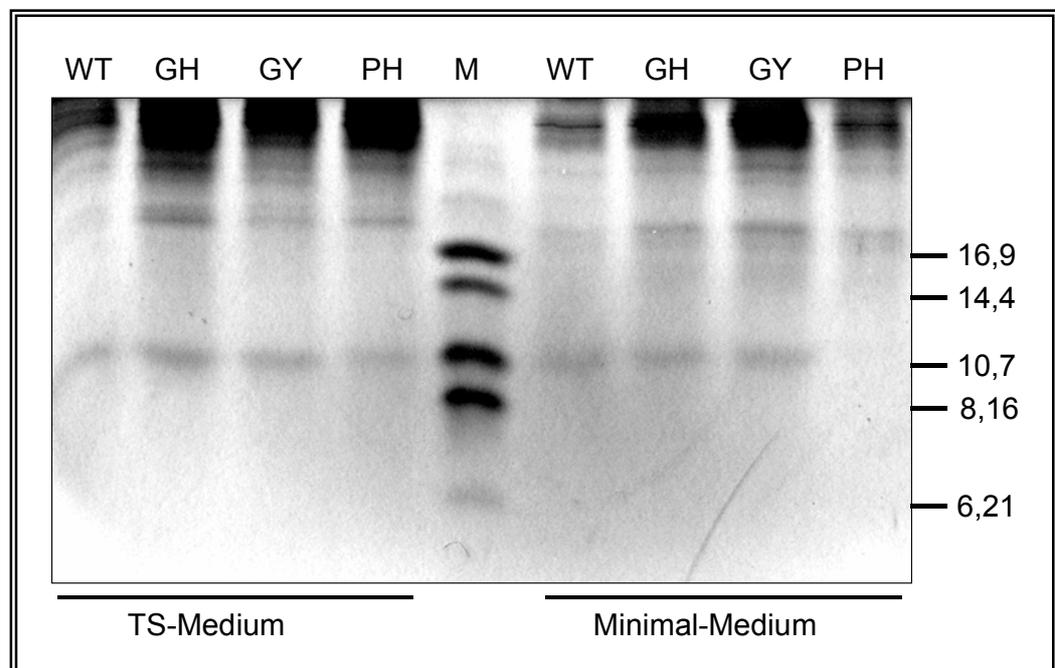


Abb. V-16 SDS-Gel von Kulturüberständen der Thioredoxin-CXXC-Mutanten.

WT (Variante CGPC, Wildtyp, *pThKG100*), GH (Variante CGHC, *pThGH*), GY (Variante CGYC, *pThGY*), PH (Variante CPHC, *pThPH*), M (Marker, Angabe an der Seite in Da).

Die ursprünglich angedachte Überexpression der Thioredoxin-CXXC-Mutanten in größeren Mengen, die Aufreinigung, Charakterisierung und die Untersuchung der Mutanten im Zusammenhang der Isomeraseaktivität und Hirudin-faltung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Die Plasmidkonstrukte stehen jedoch für weiterführende Arbeiten zur Verfügung.

5 Zusammenfassung

Bei einer *S. lividans*-Expression von Hirudin über ein pAX5a-Derivat wurde fast ausschließlich nicht-nativ gefaltetes Hirudin produziert. Die nicht-native Faltung war in einem Nativgel deutlich von der nativen, aktiven Form des Inhibitors zu unterscheiden. Durch Zusätze von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) zum Wachstumsmedium konnte der Anteil an nativem Hirudin erhöht werden. Die Zusätze beeinflussten stark die Gesamtausbeute des sekretierten Proteins. So wurden unter Zugabe von 1 mM GSH Ausbeuten von 200 mg/L Hirudin erreicht, davon 2 mg/L natives Protein. Die Gegenwart von verschiedenen Verhältnissen von GSH und GSSG reduzierte die Hirudinproduktion auf 20 – 32 mg/L, darunter war kein erkennbarer Anteil an nativem Hirudin. Ein Zusatz von gleichen Verhältnissen von GSH und GSSG in höherer Konzentration (10 mM) resultiert in einer Steigerung des Anteils an nativem Inhibitor auf 14 %, die Gesamtausbeute an Hirudin sank aber deutlich (15 mg/L insgesamt, 2 mg/L natives Protein).

Die Oxidoreduktase Thioredoxin konnte über ein pAX5a-Derivat in *S. lividans*-Kultivierungen in einer Konzentration von 65 mg/L produziert werden. Eine Coexpression von Thioredoxin und Hirudin über ein bicistronisches Gen in einem pAX5a-Derivat resultierte in einer Proteinproduktion von 4 mg/L Thioredoxin und 20 mg/L Hirudin. Obwohl ein Verhältnis von 0,2:1 Moläquivalenten (Thioredoxin:Hirudin) in den *in vitro*-Rückfaltungen zu 100 % nativ gefaltetem Inhibitor führte, war in den Kultivierungen kein positiver Einfluss des Thioredoxin auf die Hirudinfaltung erkennbar. Eine zusätzliche Problematik war hier die sehr frühe Expression von Thioredoxin, die zeitlich nicht mit der Hirudinexpression korrelierte.

Eine Coexpression von Hirudin und Thioredoxin über einen integrativen Vektor scheiterte. Eine Kultivierung der Thioredoxin-Mutanten erzielte kein Protein. Die Produktion von Hirudin jedoch konnte über den integrativen Vektor auf 600 - 700 mg/L gesteigert werden. Wie in anderen Hirudinkultivierungen ohne Thiolzusatz wurde Hirudin ausschließlich in der inaktiven, nicht-nativen Struktur produziert.

Um die Isomeraseaktivität des Thioredoxins zu erhöhen und somit eine größere Beeinflussung der Hirudinfaltung zu erzielen, wurden Thioredoxinmutanten hergestellt.

Die redoxaktiven CXXC-Zentren der generierten Thiothoxine enthalten die Aminosäuresequenzen der CXXC-Motive von *E. coli* DsbA und DsbC und humanem PDI. Die Expression aller Mutanten gelang in zwei verschiedenen Medien. Die Konstrukte stehen für weitere Arbeiten zur Verfügung.

VI Vergleichende Expressionen mit verschiedenen Signalpeptiden

1 Auswahl der eingesetzten Signalpeptide

Ein Vergleich der in der Literatur beschriebenen Signalpeptide gestaltet sich als sehr schwierig. Im Anhang findet sich eine tabellarische Aufstellung der Signalpeptide, die in die folgenden Überlegungen einbezogen wurden. Die in Überexpressionen charakterisierten Proteine und deren Signalpeptide wurden auf verschiedene Aspekte hin untersucht. Die Aminosäurekomposition und verschiedene andere Merkmale wie Ladung oder Länge des Peptids oder einzelner Domänen wurden verglichen mit Parametern wie Enzymklasse und N-Terminus des natürlich anhängenden Proteins, Cysteingehalt innerhalb des Signalpeptids und Zugehörigkeit zu verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen. Bei keinem dieser Vergleiche konnte eine Korrelation der verschiedenen Daten erzielt werden.

Die Signalpeptide für die Untersuchungen dieser Arbeit sollten eine typische Sequenz aufweisen. Geachtet wurde auf eine mittlere bis geringe Ladung in der n-Domäne und eine mittlere bis kurze Länge des Signalpeptids (sowohl Gesamtlänge als auch Länge der einzelnen Domänen). Die Aminosäuresequenz der c-Domäne aller ausgewählter Signalpeptide entspricht der häufigsten Verteilung nach einer Aufstellung von VON HEIJNE (siehe Tabelle VI-1). Der C-Terminus Alanin-X-Alanin mit Glutamin oder Serin als X und einem Prolin in Position -4 entspricht dem einer sehr häufig vorkommenden Signalpeptidase-Schnittstelle. Auch der N-Terminus der natürlich anhängenden Proteine wurde berücksichtigt. Bei jedem der ausgewählten Peptide entspricht die erste Aminosäure im N-Terminus (Aspartat, Alanin und Threonin) ebenfalls den am häufigsten vorkommenden Aminosäuren.

Bei der endgültigen Auswahl der Signalsequenzen wurde zunächst auf das Vorhandensein einer NgoMIV-Restriktionsschnittstelle geachtet. Da die nativen Sequenzen weder in der DNA- noch in der Aminosäuresequenz verändert werden sollten, mußte die Schnittstelle von vorn herein für Klonierungen vorhanden sein. Berücksichtigt wurden ferner nur solche Sequenzen, die keine zweite ribosomale Bindestelle inner

		-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2	+3
I	F	1	-	-	-	-	-	-	-	1
	H	-	1	-	-	5	-	3	1	1
	W	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	Y	-	-	-	-	2	-	-	-	3
		1	3	0	0	7	0	3	1	5
II	E / D	1	-	1	1	2	-	14	14	3
	R / K	-	-	4	-	2	3	-	-	3
		1	0	5	1	4	3	14	14	6
III	N / Q	3	3	2	0	16	0	0	0	2
IV	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L	2	1	-	-	3	-	-	1	6
	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	3	2	2	1	3	-	2	1	5
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		5	3	2	1	6	0	2	1	11
V	A	29	12	14	55	13	61	34	6	9
	S	6	6	9	5	11	-	3	2	7
	T	6	9	15	1	2	1	5	15	6
	C	-	1	-	-	-	-	-	-	2
		41	28	38	61	26	62	42	23	24
	G	2	15	4	2	3	1	2	6	3
	P	14	15	16	1	3	1	0	19	11

Tab. VI-1 Positionen der verschiedenen Aminosäuren an der Signalpeptidase-Schnittstelle in *Streptomyces*. Berücksichtigt wurden alle eindeutig belegten Sequenzen der tabellarischen Aufstellung im Anhang. Einteilung der Gruppen nach VON HEIJNE (1983): I aromatische Seitenkette; II geladene Seitenkette; III große, polare Seitenkette; IV hydrophobe Seitenkette; V kleine, neutrale Seitenkette.

halb der Signalsequenz aufwiesen und deren Signalpeptidaseschnittstellen experimentell belegt waren. Desweiteren war zunächst angedacht, nur *S. lividans*-Sequenzen zu berücksichtigen. Aufgrund der sehr eingeschränkten Diversität in Bezug auf den N-Terminus der natürlichen Proteine wurde dieser Ansatz verworfen. Tabelle VI-2 zeigt die Aufstellung der jeweils in Frage kommenden Anzahl von Signalpeptiden.

1. AS des Proteins	Sequenzen gesamt	einsetzbare Sequenzen	Sequenzen <i>S. lividans</i>
A	14	6	3
D	8	4	1
V	2	1	-
S	2	1	-
T	1	1	-

Tab. VI-2 Überblick über die Anzahl der Signalsequenzen mit NgoMIV-Schnittstelle. Berücksichtigt wurden alle eindeutig belegten Sequenzen der tabellarischen Aufstellung im Anhang.

Aufgrund von Kriterien wie Ladung und Länge des Signalpeptids, eindeutiger Signalpeptidase-Schnittstelle und Eigenschaften des natürlichen Proteins wurden folgende Signalpeptide ausgewählt:

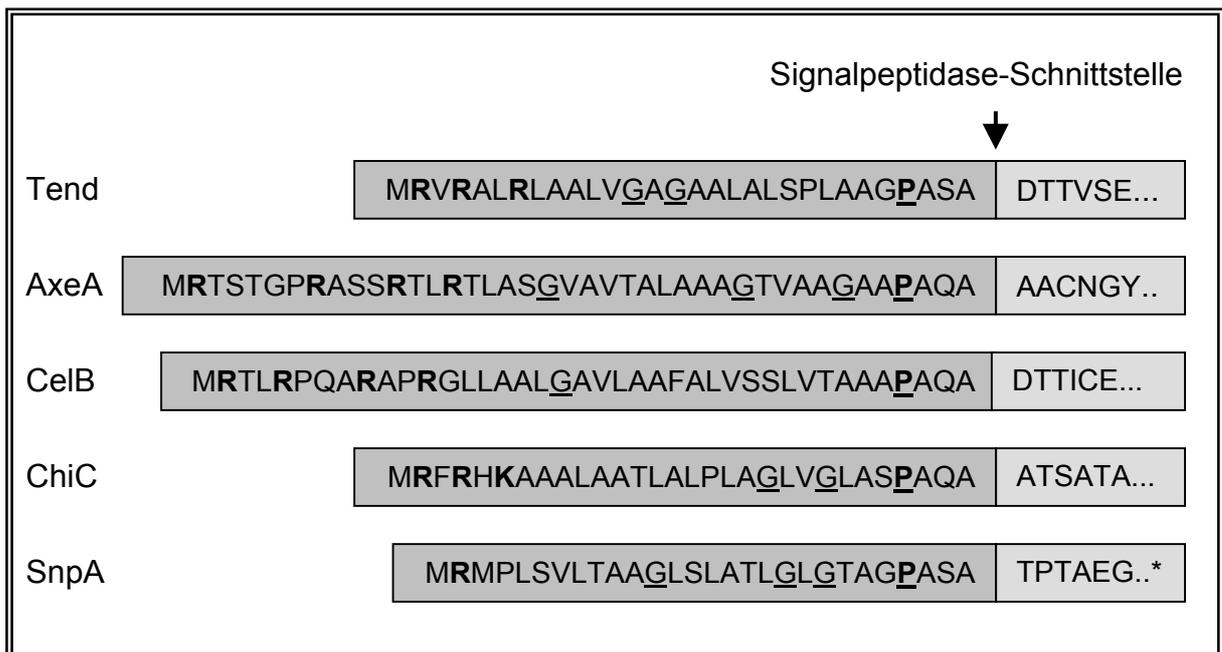


Abb. VI-1 Aminosäuresequenz der ausgewählten Signalpeptide und der nativen Proteine.
 ■ Signalpeptid; □ N-Terminus der Proteine. * N-Terminus des Propeptids.
 Fett: Positiv geladene AS der n-Domäne. Unterstrichen: Glycin als charakteristisches Merkmal der h-Domäne. Fett/unterstrichen: helixbrechende Proline der c-Domäne.

Alle Signalpeptide enthalten n-Domänen mit geladenen Resten, die Höhe der Ladung variiert von +1 bis +4. Auch die Länge des geladenen N-Terminus ist variiert mit 2 bis 15 AS stark. Die h-Domänen enthalten ein bis drei Glycinreste an verschie-

denen Positionen, die die strukturelle Flexibilität eventuell unterschiedlich fördern können. Die c-Domänen sind sehr ähnlich, sie unterscheiden sich im Bereich der Signalpeptidase-Schnittstelle nur in der Position -2, in der entweder Serin oder Glutamin vorkommt. Bedingt durch die *NgoMIV*-Restriktionsschnittstelle ist in jedem Signalpeptid an Position -4 der helixbrechende Rest Prolin zu finden. Die folgende Aufstellung zeigt genauere Unterschiede der Signalsequenzen und gibt nähere Informationen zu den Proteinen, die sich natürlicherweise den Signalpeptiden anschließen.

Tendamistat: Signalpeptid des Tendamistats aus *Streptomyces tendae*. Das Signalpeptid besteht aus 30 Aminosäuren mit einer Ladung von +3 in einer 7 Aminosäuren langen n-Domäne. Es sind keine TTA^{Leu}-Codons enthalten. Tendamistat ist ein Polypeptid von 74 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 7,96 kDa. Es enthält vier konsekutiv verbrückte Cysteine. Der isoelektrische Punkt von Tendamistat liegt bei 4,35.

AxeA: Signalpeptid der Acetylxylan Esterase A aus *S. lividans*. Mit 41 Aminosäuren ist es ein relativ langes Signalpeptid mit einer Nettoladung von +4, die geladene n-Domäne ist mit 15 Aminosäuren relativ lang. Im Peptid sind keine TTA^{Leu}-Codons enthalten. Die Acetylxylan Esterase A ist ein modular aufgebautes Enzym. Sie besteht aus 293 Aminosäuren, in jedem der durch einen glycinreichen Linker getrennten Module befinden sich zwei Cysteine. [SHARECK ET AL., 1995]

CelB: Signalpeptid der β -1,4-Endoglucanase B aus *S. lividans* 66. Mit 40 AS gehört auch dieses Peptid zu den längeren Signalpeptiden. Die n-Domäne umfasst 12 Aminosäuren mit einer Nettoladung von +4. Die DNA-Sequenz enthält zwei seltene TTA^{Leu}-Codons an den Positionen -19 und -37. Die Endoglucanase B mit einem Molekulargewicht von 36 kDa besteht aus 341 AS, enthält 6 Cysteine und gehört zur Cellulase-Familie H. Sie besitzt einen isoelektrischen Punkt von $pI=4,2$. [WITTMANN ET AL., 1994]

ChiC: Signalpeptid der Chitinase C aus *S. lividans*. Das Signalpeptid besteht aus 30 Aminosäuren mit einer Ladung von +3 in einer 6 Aminosäuren langen n-Domäne. Es

enthält kein TTA^{Leu}-Codon. Das anhängende, 589 Aminosäuren große Protein besteht aus drei Modulen, von denen das erste Modul (Cellulose-Bindungs-Domäne) 2 und das dritte Modul (chitinolytische Aktivität) 6 Cysteine enthält. Über eine Verknüpfung der Cysteine ist nichts bekannt.

SnpA: Signalpeptid einer neutralen Milchproteine hydrolysierenden Proteinase aus *Streptomyces* sp. C5. Mit 28 Aminosäuren ist das Signalpeptid eher kurz, die Ladung von +1 befindet sich in einer extrem kurzen n-Domäne. Es enthält kein TTA^{Leu}-Codon. Die Proteinase besitzt an ihrem N-Terminus ein 43 Aminosäuren langes Propeptid, das reife Protein hat eine Masse von 15,5 kDa mit einer Polypeptidkette von 148 Aminosäuren. Es enthält zwei Cysteine, über deren Verbrückung zu einem Disulfid nichts bekannt ist. Obwohl eine Zink-Bindestelle vorhanden ist, konnten keine Homologien zu anderen Metalloproteasen festgestellt werden [LAMPEL ET AL., 1992].

2 Konstruktion der Vektoren

Die Vektoren sollten so konstruiert werden, dass ein Kassettensystem entsteht. Innerhalb dieses Systems sollten sowohl die komplette Signalsequenz, als auch das Protein und der Grenzbereich zwischen Signalsequenz und Protein beliebig ausgetauscht werden können. Als Grundlage hierfür dienten einerseits die Vektoren pT136 (enthält das Tendamistatgen) [SCHMITT-JOHN, 1991] und pSWHIV2 (enthält das Hirudingen) [WOJCZEWSKI, 1999]. Die so erstellten Konstrukte wurden in einen Expressionsvektor überführt. Hierfür wurde der *S. lividans/E. coli*-Shuttle-Vektor pAX5a genutzt. Er basiert auf dem *E. coli* Vektor pUC19 [NORRANDER ET AL., 1983; YANISCH-PERRON ET AL., 1985] und dem *Streptomyces* Vektor pIJ702 [POCTA, 1991; HOFFMANN, 1992]. Der Shuttle-Vektor entstammt einer Reihe von Vektoren, in denen einzelne genetische Elemente wie Promotor, Ribosomale Bindestelle (RBS), Strukturgen mit Signalpeptid sowie Terminator ausgetauscht werden können. In dieser Reihe stehen verschiedene Streptomycetenpromotoren (Tendamistat-, mel-, ermEup-, tipA-Promotor) [SCHMITT-JOHN, 1991; LÖTZBEYER, 1991; SCHMITT-JOHN UND ENGELS, 1992; HOFFMANN, 1992] ebenso zur Verfügung wie der Tendamistat- und der aph-Terminator [BENDER, 1989]. In pAX5a liegen der konstitutive *ermEup*-Promotor und der starke *aph*-Terminator vor. In die dazwischenliegende „multi cloning site“ wurden die Strukturgene inklusive Signalsequenz und RBS inkloniert.

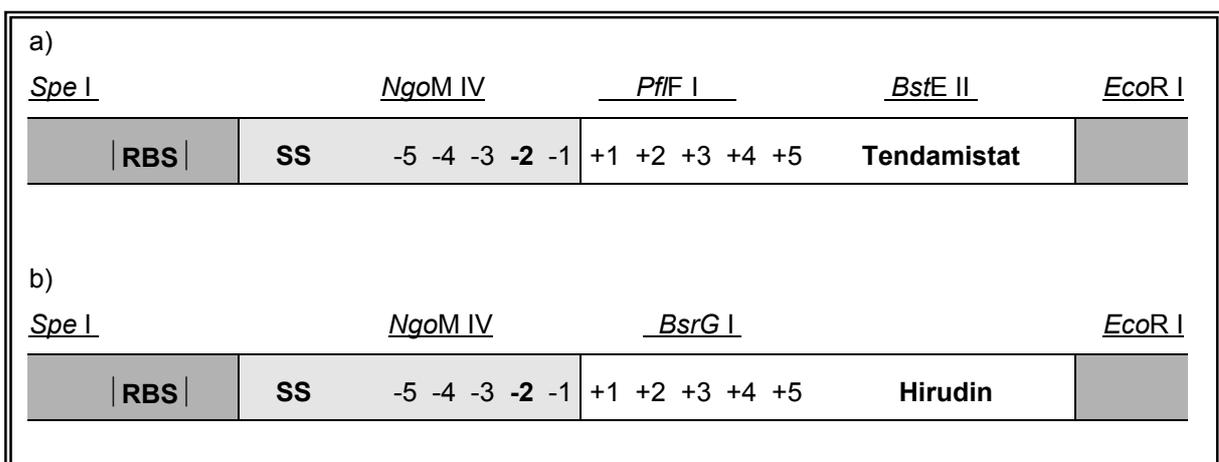


Abb. VI-2 Aufbau des Kassettensystems mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen.
a) Tendamistat, b) Hirudin. RBS (Ribosomale Bindestelle /Shine-Dalgarno-Sequenz), SS (Signalsequenz).

2.1 Tendamistat-Konstrukte

Grundlage für die verschiedenen Tendamistat-Konstrukte war der Vektor pT136. Er enthält das komplette Tendamistatgen inklusive Signalsequenz und Shine-Delgarno-Sequenz. Die Regionen, die verändert wurden, liegen alle zwischen den singulären Restriktionsschnittstellen von *Spe* I und *Eco*R I, über die das komplette Tendamistatgen später in den Expressionsvektor kloniert wurde.

Um die Tendamistat-Signalsequenz durch andere ersetzen zu können, wurde zu Beginn im N-terminalen Bereich des Tendamistats die zusätzliche Restriktionsschnittstelle *Pf*I I generiert. Dies erfolgte durch Einklonieren eines synthetisch hergestellten Linkers zwischen *Ngo*M IV und *Bst*E II. Der so entstandene Bereich zwischen *Ngo*M IV und *Pf*I I innerhalb von pTKG1 (siehe Abb. VI-2) beinhaltet den C-Terminus der Signalsequenz und den N-terminalen Bereich des Tendamistatgens. Hier kommt das Prinzip des Kassettensystems zum Ausdruck, in dem weitere Veränderungen, zum Beispiel eine Änderung der N-terminalen Sequenz, leicht durchgeführt werden können. In weiteren Schritten wurden die vier neuen Signalsequenzen jeweils über zwei synthetisch hergestellte Linkerpaare zwischen *Spe* I und *Ngo*M IV in den Vektor pTKG1 einkloniert. Durch Linkeraustausch zwischen *Ngo*M IV und *Pf*I I wurde die C-terminale Sequenz im Bereich der AS -2 innerhalb der *Axe*A-, *Cel*B- und *Chi*C-Signalsequenz angeglichen. Als letzter Schritt wurde der gesamte Bereich des Gens inklusive der jeweiligen Signalsequenz und der Shine-Delgarno-Sequenz (*Spe* I → *Eco*R I) in den Vektor pAX05a übertragen. Es resultierten die Tendamistat-Expressionsvektoren pTKG102 mit (*Axe*A-Signalsequenz), pTKG103 (*Cel*B-SS), pTKG104 (*Chi*C-SS) und pTKG105 (*Sn*pA-SS).

2.2 Hirudin-Konstrukte

Das Hirudingeng lag innerhalb des Expressionsvektors pSWHIV2 mit der Signalsequenz des Tendamistats vor. Die Region upstream bis zur *Spe* I Schnittstelle entspricht der Sequenz des pAX05a. Beim Sequenzieren wurde festgestellt, dass durch eine Deletion von drei Basen im N-terminalen Bereich die Aminosäuresequenz zu VVYT verändert war, ursprünglich sollte der Vektor die Sequenz VVTYT enthalten.

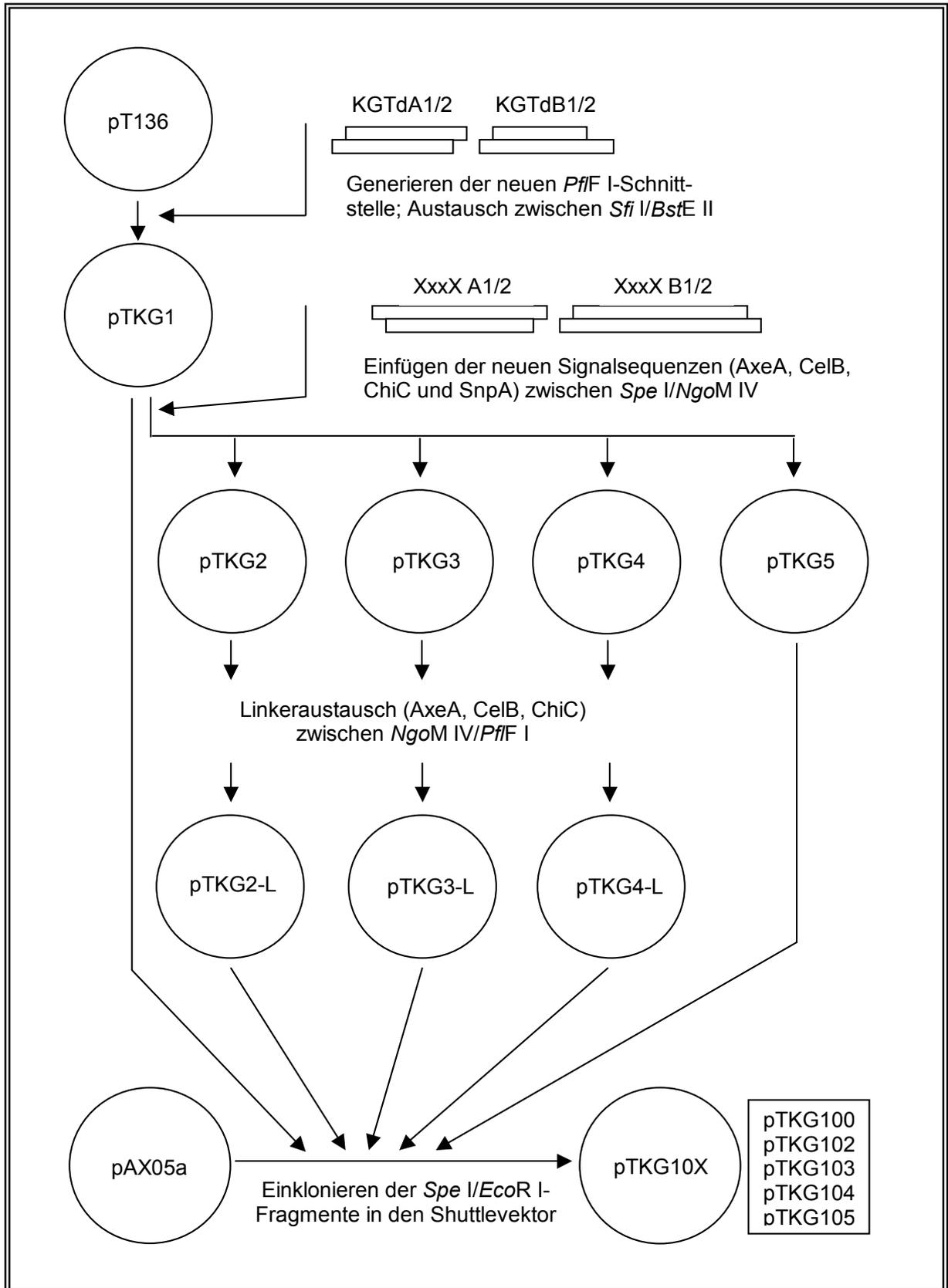


Abb. VI-3 Klonierungsschema für den Aufbau der Tendamistat-Konstrukte mit verschiedenen Signalsequenzen.

Die verkürzte Sequenz entspricht einem natürlich vorkommenden Isohirudin (DODT ET AL., 1986), sie enthält aber nicht die N-terminale *Sna*BI-Schnittstelle, die für den Aufbau des Kassettensystems genutzt werden sollte. Durch die Deletion ergab sich jedoch eine *Bsr*GI-Schnittstelle, die in pSWHIV2 ebenfalls singulär auftritt und für die Klonierungen genutzt werden konnte. Für das Generieren der neuen Hirudin-Konstrukte wurden die Signalsequenzen über eine PCR aus den Tendamistatvektoren (pAX05a-Derivate, geöffnete und gekürzte Vektoren, ~800 bp lange Fragmente zwischen *Hind* III und *Eco*R I) amplifiziert. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass zum Einen die *Spe* I-Schnittstelle upstream der Signalsequenz entstand, zum Anderen durch überhängende Primer der Hirudin-N-Terminus bis zur *Bsr*G I-Schnittstelle generiert wurde. Ein Einklonieren dieses Fragmentes in pSWHIV2 ergab die Hirudin-Vektoren pHXxxX (mit XxxX-Signalsequenz), pHXxxX (mit XxxX-Signalsequenz), pHXxxX (mit XxxX-Signalsequenz) und pHXxxX (mit XxxX-Signalsequenz).

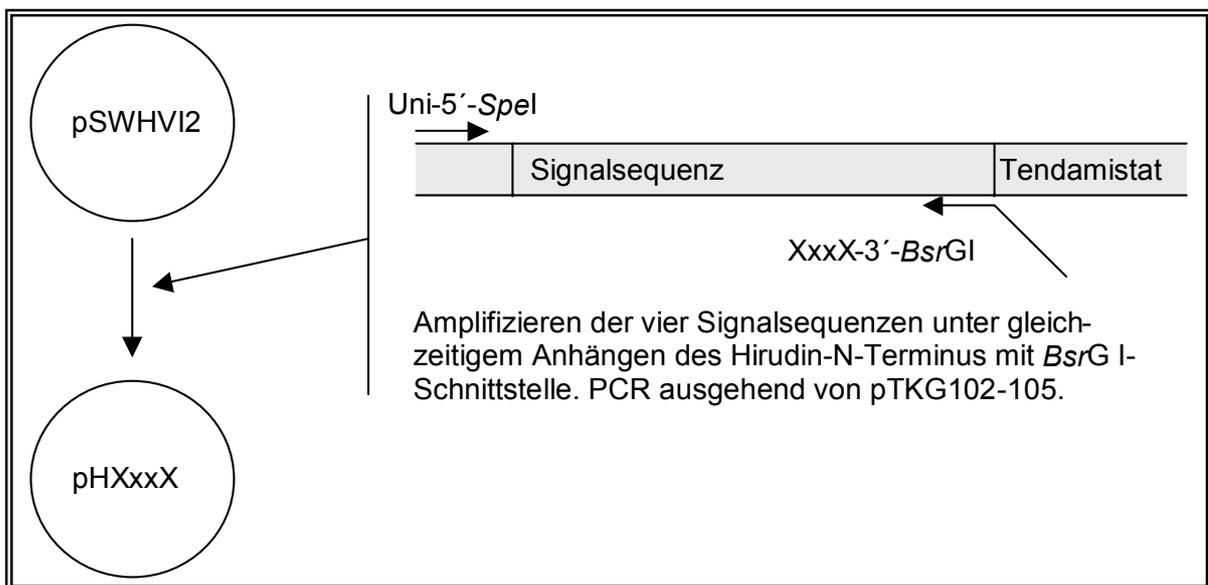


Abb. VI-4 Klonierungsschema für den Aufbau der Hirudin-Konstrukte mit verschiedenen Signalsequenzen. XxxX (AxeA, CelB, ChiC, SnpA)

3 Expressionsvergleiche mit einem homologen Protein (Tendamistat)

Nach dem Transformieren von *S. lividans* mit den jeweiligen Expressionsplasmiden wurden zunächst von den Transformationsplatten einzelne Klone auf frische Agarplatten übertragen und mit ihnen ein α -Amylase-Inhibitortest durchgeführt. Diese Untersuchung diente dazu, schon in einem frühen Stadium die Expression von Tendamistat nachweisen zu können. Während des Tests entstehen gefärbte Hemmhöfe, deren Größe qualitative Vergleiche der Menge des sekretierten Tendamistats erlauben. Für jedes der Signalsequenzkonstrukte konnte eine Tendamistat-expression anhand einer Hemmung von α -Amylase nachgewiesen werden. Die Hemmhöfe für die Tendamistat-, AxeA-, ChiC- und SnpA-Signalpeptide waren vergleichbar groß, die Tendamistatexpression über das CelB-Signalpeptid fiel etwas geringer aus.

Für eine quantitative Einschätzung der verschiedenen hohen Expressionen von Tendamistat und um weitere Analytiken an dem exprimierten Protein durchführen zu können, wurden Flüssigkulturen angesetzt. Wie sich herausgestellt hat [FAB, 1994], eignet sich das Minimalmedium besonders gut für vergleichende Untersuchungen, da eine gute Reproduzierbarkeit der Proteinexpression erreicht wird. Die maximale Ausbeute ist dagegen nur halb so groß wie in einem Produktionsmedium. Für jedes Signalsequenzkonstrukt wurden drei Vergleichskulturen in Minimalmedium angelegt; die Inokulation erfolgte über Sporensuspensionen. Ab dem zweiten Kulturtag wurden Proben für die einzelnen analytischen Untersuchungen entnommen.

3.1 Trockengewicht und Gesamtproteingehalt des Mediums

Um das Wachstum der Vergleichskulturen einschätzen zu können, wurde zunächst das Trockengewicht der Kulturen und die Gesamtkonzentration der exprimierten Proteine bestimmt (s. Abb. VI-5 und VI-6). Betrachtet man die Daten des Trockengewichts, so scheint das Zellwachstum erst am vierten Tag zu beginnen. Das kann auch direkt in den Schüttelkolben beobachtet werden, da die Kulturen mit einer Sporensuspension angeimpft werden, in der noch sichtbar große Mycelklumpen

vorhanden sind. Dieser Zellverband verteilt sich erst nach ca. zwei Tagen sehr fein im Medium, wenn die Sporen sich regeneriert haben und beginnen, auszukeimen. Erst dann erfolgt die Zellteilung und das eigentliche Wachstum der Kulturen. Nach einer deutlichen logarithmischen Wachstumsphase befinden sich die Kulturen am Ende des Beobachtungszeitraumes in der stationären Phase. Die Probenahme wurde am achten Tag abgebrochen, da eine deutliche Zellyse sichtbar war. Die in der Abbildung dargestellten Messdaten geben Mittelwerte aus drei Vergleichskulturen an. Das Wachstum der verschiedenen Kulturen ist fast identisch, woraus eine sehr gute Vergleichbarkeit der folgenden Daten resultiert.

Das hier erzielte Trockengewicht von 6-7,5 mg/mL entspricht den Ergebnissen von FAß (1994), die bei Tendamistatexpressionen Trockengewichte von 6 mg/mL erhielt.

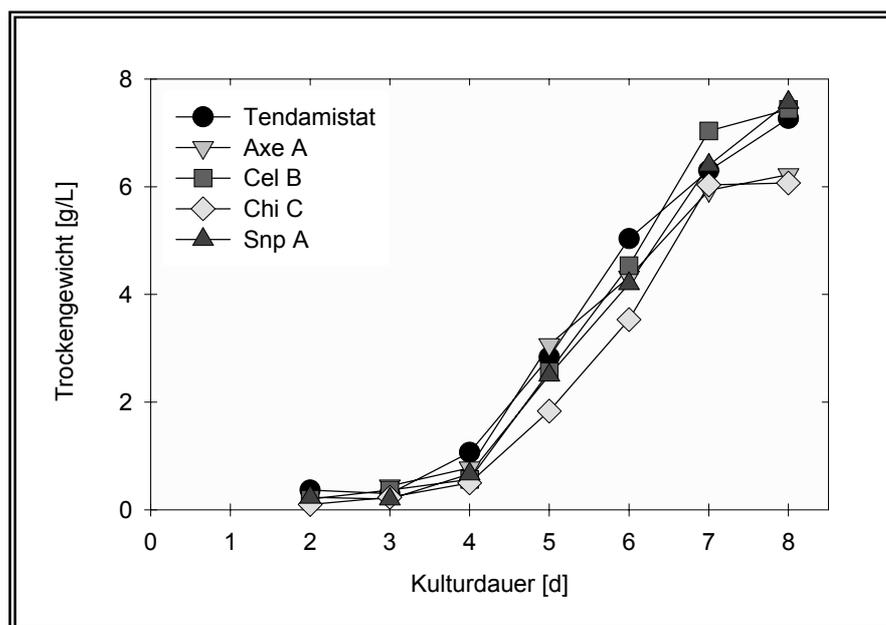


Abb. VI-5 Trockengewicht der Kulturen mit den verschiedenen Signalsequenzkonstrukten.

Eine weitere Methode, um die Vergleichbarkeit des Wachstums von verschiedenen Kulturen zu beurteilen, ist die Bestimmung des Gesamtgehalts an sekretiertem Protein. Auch in Auswertung dieser Daten (Abb. VI-6) sind Mittelwerte aus drei Vergleichskulturen gezeigt. Es ist ebenfalls ein sehr einheitliches Wachstum festzustellen. Zwar liegen die Kurven der einzelnen Kulturen nicht so dicht beieinander wie

bei der Trockengewichtsbestimmung, der zeitlich übereinstimmende Verlauf von logarithmischer und stationärer Phase ist aber bei allen vergleichbar. Schon am dritten Tag werden Proteine in das Medium sekretiert. In dieser sehr frühen Phase des Kulturwachstums handelt es sich vor allem um hydrolytisch wirksame Proteine wie Cellulasen und Amylasen. Tendamistat wird hauptsächlich in der späten logarithmischen Wachstumsphase exprimiert.

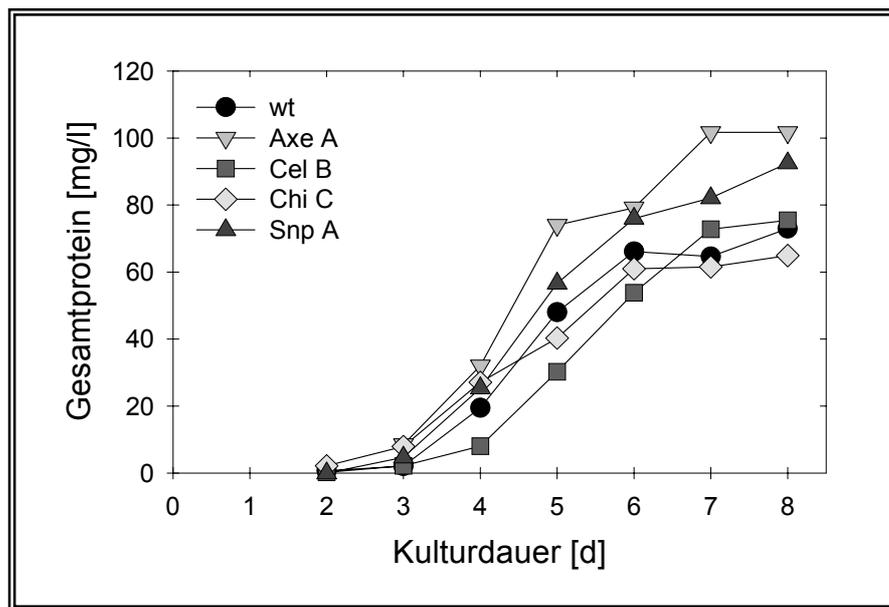


Abb. VI-6 Gesamt-Proteingehalt des Mediums der Kulturen der verschiedenen Signalsequenzkonstrukte (Bestimmung nach BRADFORD, 1976).

Sowohl aus der Trockengewichtsbestimmung als auch aus dem Gesamt-Proteingehalt geht hervor, dass das Wachstum der verschiedenen Kulturen sehr einheitlich ist. Die folgenden Bestimmungen zur Expressionshöhe des Tendamistat sind daher sehr gut miteinander vergleichbar.

3.2 SDS-Gel und Aktivitätsbestimmung aus dem Medium

Erste Hinweise auf die Expression von Tendamistat gab ein SDS-Gel der Kulturüberstände. In dem in Abb. VI-7 gezeigten Gelbild sind Aliquots des Wachstumsmediums des siebten Kulturtages aufgetragen. Auf dem Bild sind also Proteine zu

sehen, die von den Zellen in das Wachstumsmedium sekretiert worden sind. Die Proteine werden in einem denaturierenden und reduzierenden SDS-Gel über das Masse-/Ladungsverhältnis aufgetrennt, so dass direkte Größenvergleiche möglich sind.

Auf der Höhe eines mit aufgetragenen Standards von Tendamistat sind für jede Kultur starke Banden zu erkennen. Die Konstrukte mit der AxeA- und ChiC-Signalsequenz scheinen eine besonders hohe Expression zu bewirken. Bei allen Kulturen ist das typische Bandenmuster für andere von *S. lividans* sekretierte Proteine zu erkennen. Bei der Kultur mit der über die ChiC-Signalsequenz sekretierten Tendamistats ist der Anteil dieser Proteine erstaunlich gering.

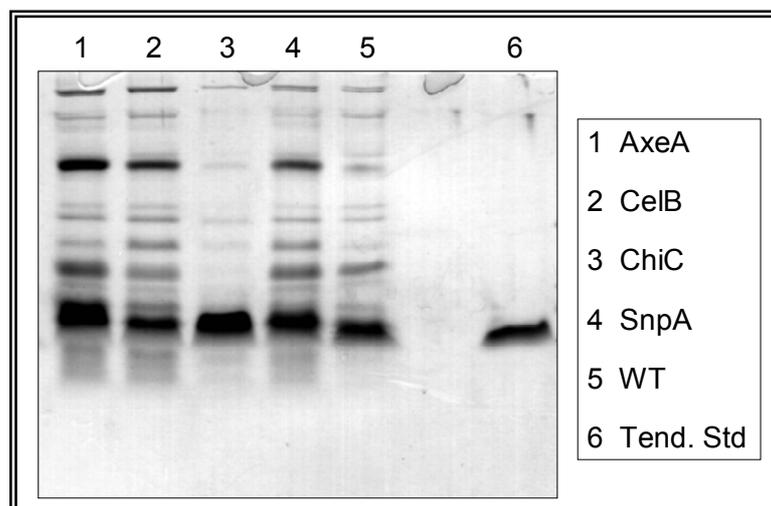


Abb. VI-7 SDS-Gel der Tendamistat-Kulturüberstände. Aufgetragen sind 40µL des Kulturüberstandes des siebten Kulturtages.

Um genauere Aussagen über die Expressionshöhe des Tendamistats in den verschiedenen Kulturen machen zu können, wurde über einen Aktivitätstest der absolute Gehalt an Tendamistat bestimmt. Hierfür wurden die Proben eines jeden Tages der jeweils drei Vergleichskulturen einzeln untersucht. Aus den Vergleichskulturen wurde der Mittelwert bestimmt. Für die Auswertung des Aktivitätstests werden im folgenden die Daten des siebten Kulturtages betrachtet. Am achten Tag der Kultivierungen war die Zellyse schon so weit fortgeschritten, dass nicht mehr zwischen intra- und extrazellulärem Protein unterschieden werden konnte.

Die Daten des Aktivitätstests bestätigen die rein optische Auswertung des SDS-Gels. Bezogen auf die Tendamistatproduktion über das Wildtyp-Signalpeptid (SP) von 25,8 mg/mL wird mit dem AxeA-SP eine Tendamistatproduktion von 171% erreicht. Das entspricht einem Tendamistatgehalt von 44,2 mg/L im Medium. Mit dem ChiC-SP wird eine Tendamistatausbeute von 154% (39,8 mg/L) erzielt. Das SnpA-SP bewirkt sowohl auf die Gesamtmenge als auch auf den zeitlichen Verlauf der Kultivierung bezogen eine zum Wildtyp-SP vergleichbare Tendamistatproduktion. Am 7. Kulturtag sind über das SnpA-SP 27,2 mg/L Tendamistat exprimiert worden, mit dem Wildtyp-Signalpeptid wurden 25,8 mg/L Protein produziert. Einzig das CelB-SP schneidet im Vergleich der erzielten Tendamistatmenge schlechter ab als das Wildtyp-Signalpeptid. Mit 63% der Wildtypproduktion (16,2 mg/L) scheint das CelB-SP einen eher negativen Einfluß auf die Tendamistatexpression zu haben. Die produzierte Proteinmenge steigt im Verlauf der Kultivierung nur langsam an. Vom 6. Bis 7. Kulturtag ist eine exponentielle Steigung auf das Maximum am siebten Tag zu erkennen. Mit allen anderen Signalpeptiden wird schon zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt der exponentielle Anstieg der Expression beobachtet. Besonders mit dem AxeA-Signalpeptid wird eine schnellere Expression deutlich. Dieses Signalpeptid

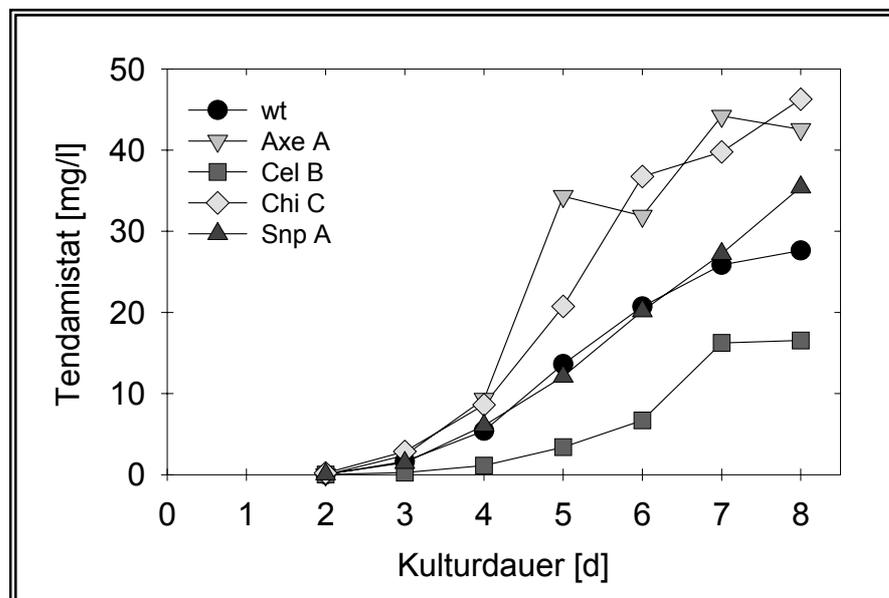


Abb. VI-8 Expression von Tendamistat über die verschiedenen Signalsequenzkonstrukte. Der Tendamistatgehalt wurde bestimmt über einen Aktivitätstest. Eine Angabe der Standardfehler ist in diesem Diagramm zu unübersichtlich, daher sind die Einzelmessungen in Abb. VI-9 aufgeführt.

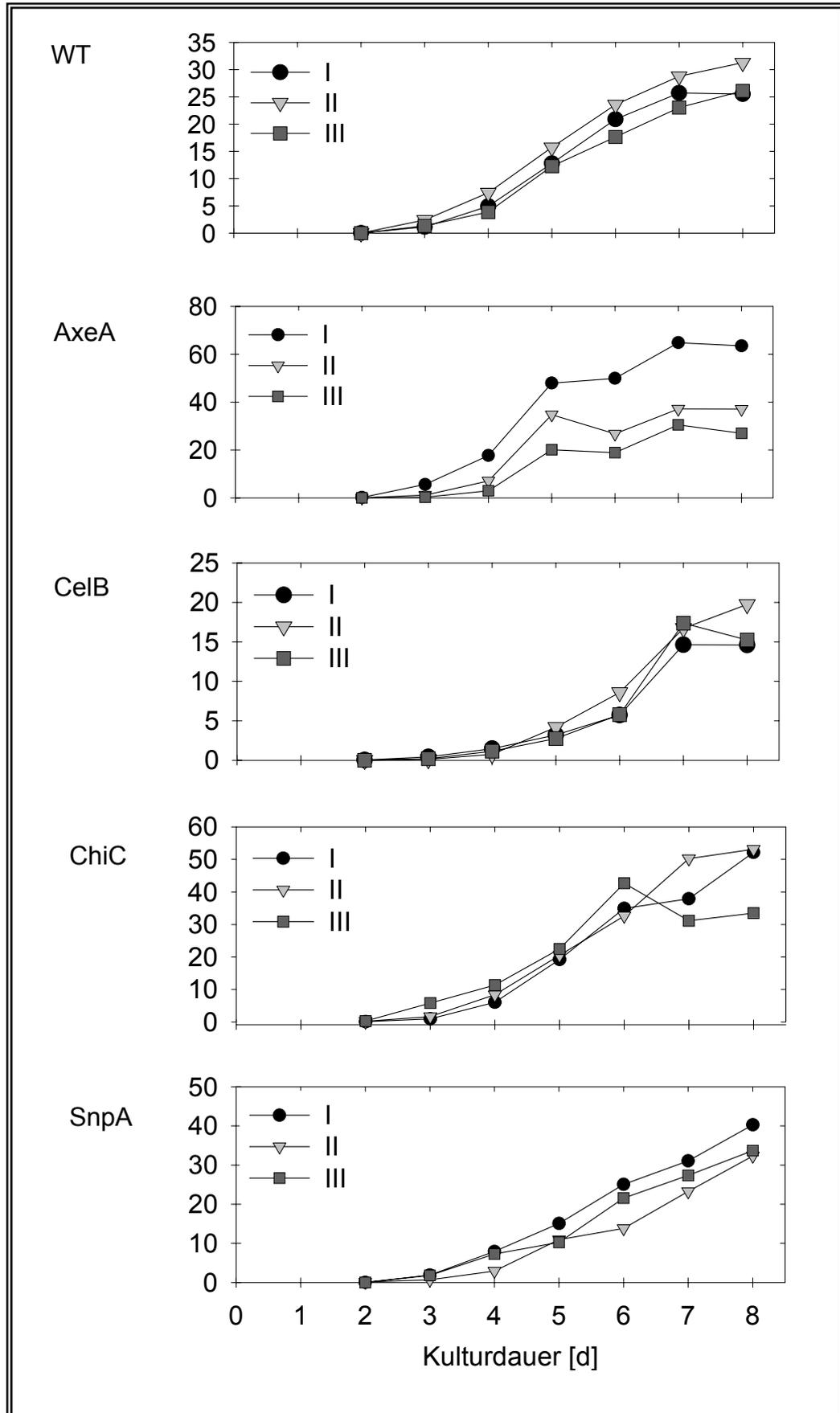


Abb. VI-9 Tendamistatgehalt in mg/L in den einzelnen Kulturen der Signalsequenzkonstrukte.

erzielt schon am fünften Kulturtag eine Ausbeute von 34 mg/L Tendamistat und erreicht damit schon zwei Tage früher einen höheren Wert als für die Maximalausbeuten beim Wildtyp-, beim SnpA- und CelB-Signalpeptid.

Die Expression von 25,8 mg/mL Tendamistat mit dem Wildtyp-SP liegt unter den Werten von vergleichbaren Arbeiten. So konnte in Expressionsversuchen mit Signalpeptid-Ladungsmutanten von Tendamistat [FAB, 1994] mit dem Wildtyp-SP eine Expressionshöhe von 334 mg/mL erzielt werden. Diese hohe Expression wurde durch Selektion von hochexprimierende Klonen erreicht. Auf Vereinzlungsplatten von Transformationen wurden α -Amylase-Inhibitortests durchgeführt und nur aus den am höchsten exprimierenden Klonen Schüttelkulturen angezogen. Auch WOJCZEWSKI (1999) ermittelte auf diesem Wege die Tendamistatproduktion von N-terminalen Tendamistatmutanten. Für das WT-Tendamistat wurde ein Gehalt von 170 mg/mL bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit lag jedoch das Hauptaugenmerk auf der Vergleichbarkeit der Daten. Statt einzelne maximale Expressionshöhen zu erzielen, wurden die Schüttelkulturen mit Sporensuspensionen angeimpft, die die Gesamtheit der transformierten Klone repräsentieren. Auf eine Einzelselektion hochexprimierender Klone wurde verzichtet.

In der Tabelle VI-3 werden die Ausbeuten von Tendamistat mit dem Gesamtprotein-gehalt der Kulturüberstände verglichen. Es ist deutlich zu sehen, dass einerseits mit dem AxeA-Signalpeptid die höchste Tendamistatproduktion erreicht wird, andererseits aber bei der Expression über ChiC der Anteil von Tendamistat an der Gesamtheit der exprimierten Proteine am höchsten ist. Das ist auch deutlich erkennbar im SDS-Gel der Kulturüberstände (Abb. VI-7), wo in der Spur von ChiC alle anderen typischerweise von *S. lividans* sekretierten Proteine deutlich geringer auftreten als bei allen anderen Kulturen. Im Hinblick auf eine Isolierung des produzierten Tendamistats könnte also eine Expression über das ChiC-Signalpeptid einen Vorteil bedeuten. Allgemein läßt sich feststellen, dass der Anteil des Tendamistats an der Gesamtmenge der sekretierten Proteine sehr hoch ist. Bedingt durch die Überexpression stellt Tendamistat 22,3% (CelB) bis 64,6% (ChiC) der gesamt sekretierten Proteinmenge.

	Tendamistatgehalt im Medium [mg/L]	Ausbeute im Vergleich zum Wildtyp	Gesamtproteingehalt im Medium [mg/L]	Anteil Tendamistat am Gesamtprotein
Wildtyp	25,8	100%	64,62	40,0%
AxeA	44,2	171%	101,68	43,5%
CelB	16,2	63%	72,78	22,3%
ChiC	39,8	154%	61,54	64,6%
SnpA	27,2	105%	82,10	33,2%

Tab. VI-3 *Aufstellung der Tendamistat- und Gesamtproteinausbeuten der Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte des siebten Kulturtags.*

Bevor auf mögliche Zusammenhänge zwischen den Expressionshöhen von Tendamistat und der strukturellen Charakteristika der Signalpeptide eingegangen wird, werden zunächst noch die Ergebnisse der Untersuchungen der Zellextrakte und der Massenanalytik des sekretierten Tendamistats vorgestellt.

3.3 Untersuchungen der Zellextrakte

Für die Bestimmung des Gesamt-Proteingehaltes der Zellextrakte wurde wie auch bei der Untersuchung der Kulturüberstände auf die Methode nach BRADFORD (1976) zurückgegriffen. Nach dem Zellaufschluß liegen die Zellextrakte in gleichen Volumina vor, mit Aliquots dieser Lysate wird die Proteinbestimmung durchgeführt. Der in Abb. VI-10 dargestellte Proteingehalt ist daher auf ein Volumen bezogen und nicht auf das Trockengewicht des Zellpellets. Die gezeigten Kurven des intrazellulären Proteingehaltes geben somit Wachstumskurven an, die mit der des Trockengewichts oder der in das Medium sekretierten Proteine vergleichbar sein sollte. Wie in den anderen Wachstumskurven auch ist hier nach einer lag-Phase ein exponentielles Wachstum mit einer anschließenden stationären Phase zu erkennen. Das Wachstumsplateau ab dem 6. bzw. 7. Kulturtag stimmt zeitlich mit der Kurve des extrazellulären Gesamt-Proteingehaltes (vgl. Abb. VI-6) überein.

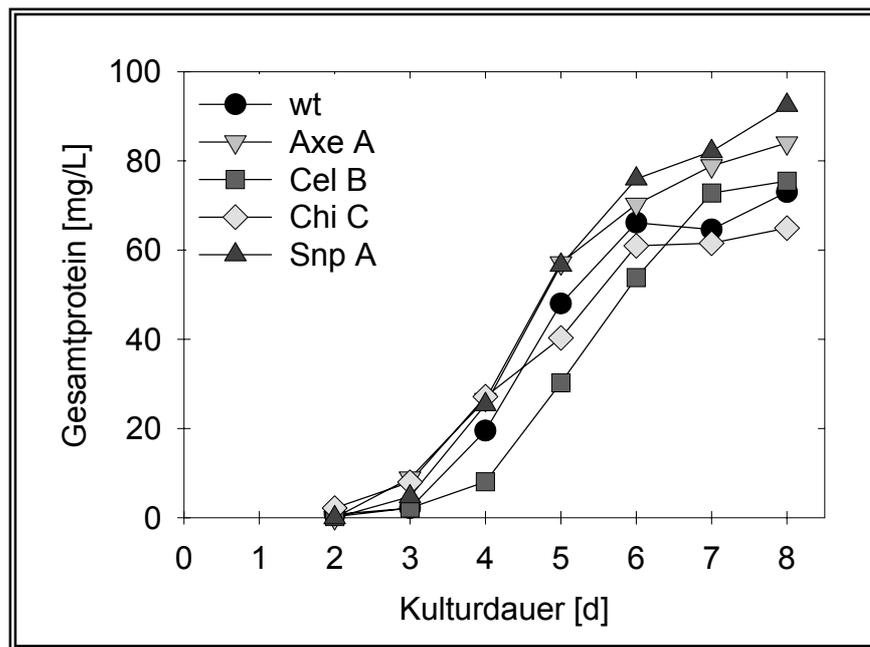


Abb. VI-10 Gesamt-Proteingehalt der Zellextrakte der Kulturen der verschiedenen Signalsequenzkonstrukte (Bestimmung nach BRADFORD, 1976).

Die Proteine der Zellextrakte sind in einem denaturierenden SDS-Gel der Größe nach aufgetrennt (Abb. VI-11). Die aufgetragenen Aliquots sind den Zelllysaten des siebten Kulturtages entnommen. Die durch den Pfeil gekennzeichneten Banden enthalten die jeweiligen Vorläuferproteine von Tendamistat, d. h. Tendamistat mit den noch nicht abgespaltenen Signalpeptiden. Diese Banden befinden sich auf Grund der größeren Masse etwas oberhalb von der Bande des mit aufgetragenen Tendamistat-Standards. Gut zu erkennen sind die größeren Massen der AxeA- und CelB-Preproteine, deren Signalpeptide 10-13 Aminosäuren länger sind als die der ChiC-, SnpA- und Wildtyp-Vorläuferproteine.

Über die Bestimmung des Tendamistatgehaltes im Zelllysate sollte festgestellt werden, ob sich die Vorläuferproteine von Tendamistat im Cytoplasma anreichern. Das wäre ein Hinweis darauf, ob das Protein über das jeweilige Signalpeptid nicht in ausreichender Menge über die Zellmembran translozieren kann. Die Proben jeden Kulturtages der jeweils drei Vergleichskulturen wurden wie bei der Bestimmung des Tendamistatgehaltes im Medium einzeln untersucht. Der Aktivitätstest kann trotz der am N-Terminus von Tendamistat anhängenden Signalpeptide durchgeführt werden,

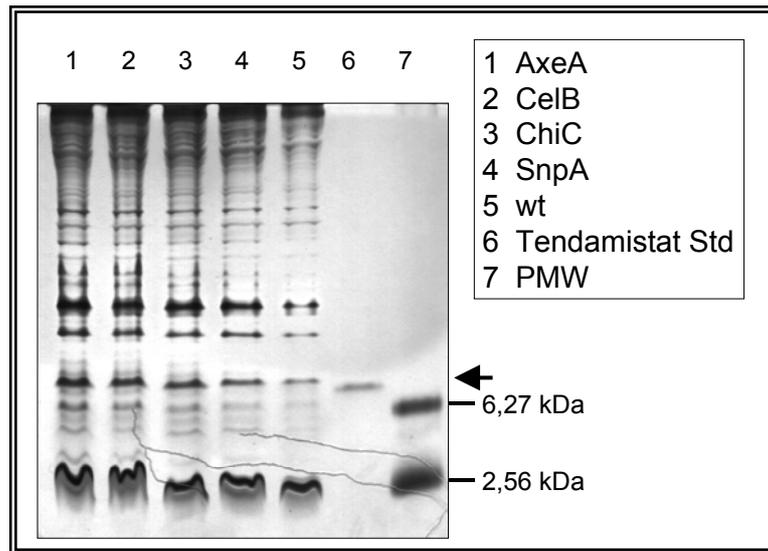


Abb. VI-11 SDS-Gel der Tendamistat-Vorläuferproteine. Aufgetragen sind 40 μ L des Zelllysates des siebten Kulturtages.

da die zusätzliche Peptidkette die Struktur von Tendamistat nicht beeinflusst und die Aktivität nicht verändert wird. Die Mittelwerte der Messungen der Zellextrakte sind in Abbildung VI-12 wiedergegeben.

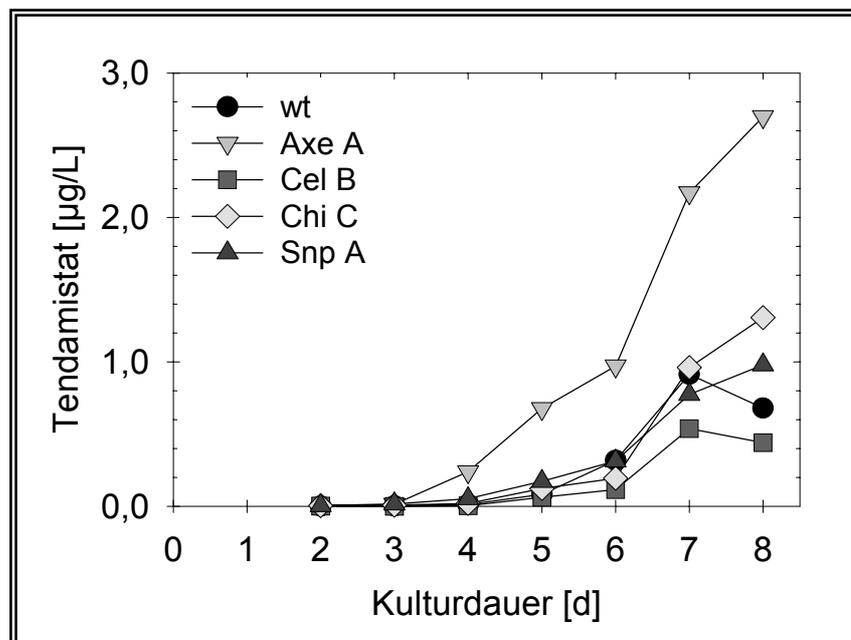


Abb. VI-12 Tendamistatgehalt in μ g/L, bestimmt aus den Zellextrakten der einzelnen Kulturen der Signalsequenzkonstrukte.

Anhand der Kurven des Tendamistatgehaltes im Kulturüberstand (Abb. VI-9) und des Trockengewichts (Abb. VI-5) kann eindeutig belegt werden, dass die Tendamistatexpression schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase beginnt. Eine Anreicherung von Vorläuferproteinen kann zu diesem frühen Zeitpunkt der Expression nicht festgestellt werden. Auch zu Beginn der stationären Phase an Tag 6 steigt der Gehalt der intrazellulären Preproteine kaum an. Der Gehalt des exportierten und prozessierten Tendamistats im Medium reicht zu diesem Zeitpunkt schon fast an die späteren Maximalwerte heran. Erst am siebten Kulturtag, kurz vor Beendigung der Kultivierungen aufgrund fortschreitender Zellyse, steigen die Werte für den intrazellulären Tendamistatgehalt an.

Es ist anzunehmen, dass bei der erhöhten Produktionsrate des Tendamistats an den Kulturtagen 6 und 7 die Translokationsfähigkeit der Zellen an ihre Grenzen stößt. Erst bei sehr hoher Tendamistatexpression findet eine leicht erhöhte Akkumulierung der Vorläuferproteine im Cytoplasma statt. Für diese Theorie sprechen auch die Einzelwerte der Expression über das AxeA-Signalpeptid. Bereits am fünften Kulturtag ist der Gehalt an exportiertem Tendamistat im Medium sehr hoch. Nur mit dem ChiC-Signalpeptid wird ein ähnlich hoher Wert einen Tag später erreicht. Äquivalent zu der großen translozierten Tendamistatmenge an Tag 5 hat auch die Anreicherung des Vorläuferproteins von AxeA zwei Tage früher als mit den anderen Signalpeptiden den Maximalwert erreicht. Bis zum Ende der Kultivierungen steigt der intrazelluläre Gehalt des AxeA-Tendamistatvorläufers fast linear an, was ebenfalls einen Hinweis auf eine nicht ausreichende Kapazität der Sekretionswege gibt.

Die Ergebnisse von FAß (1994) lassen ebenfalls diesen Schluß zu. Die Expressionshöhe von Tendamistat lag dort deutlich höher (334 mg/mL), der Anteil von Tendamistat am löslichen Gesamtprotein wurde zu 2,5 µg/mg bestimmt. Bei der geringeren Tendamistatproduktion in den hier vorgestellten Versuchen liegt der Anteil am Gesamtprotein des Lysates bei <0,1 µg/mg (siehe Tabelle VI-4).

Neben der Akkumulierung des AxeA-Vorläufers aufgrund der sehr frühen, starken Expression kann kein Zusammenhang zwischen der Menge des exportierten und akkumulierten Tendamistats festgestellt werden. Die Kurven der beiden Bestimmungen lassen sich nicht zur Deckung bringen, da die extrazellulären Proteine deutlich

verschiedene Kurvenverläufe aufweisen, die der intrazellulären Vorläuferproteine aber innerhalb ihrer Fehlergrenzen fast identisch verlaufen.

	Tendamistatgehalt im Lysat [$\mu\text{g/L}$]	Gehalt im Vergleich zum Wildtyp	Gesamtproteingehalt im Lysat [mg/L]	Anteil Tendamistat am Ges.-protein ($\times 10^{-3}$)
WT	0,914	100%	64,6	1,41%
AxeA	2,171	238%	78,9	2,75%
CelB	0,538	59%	72,8	0,74%
ChiC	0,961	105%	61,5	1,56%
SnpA	0,775	85%	82,1	0,94%

Tab. VI-4 *Aufstellung des Tendamistat- und Gesamtproteingehalts der Zellysate in den Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte.*

Bei einem Vergleich der akkumulierten Mengen des Tendamistats sollten die absoluten Werte nicht außer acht gelassen werden. Auch wenn mit dem AxeA-Signalpeptid eine Anreicherung im Cytoplasma von 238% (bezogen auf 100% beim Wildtyp) erreicht wird, so sind die absoluten Mengen so klein, dass eine Interpretation dieser Werte fast unmöglich erscheint. Obwohl aufgrund der oben ausgeführten Beobachtungen geschlossen werden könnte, dass die Kapazität des Sekretionsweges zumindest im Falle des AxeA-Konstruktes erschöpft ist, zeigen andere Daten die hohe Effizienz der Überexpressionen. Einerseits wurde bereits weiter oben ausgeführt, dass der Tendamistatanteil an den ins Medium sekretierten Proteinen mit 22,3% (CelB-SP) bis zu 64,6% (ChiC-SP) sehr hoch ist. Andererseits ist der Anteil der Tendamistatvorläufer am Gesamtproteingehalt der Zellextrakte sehr gering. Wie aus Tabelle VI-4 ersichtlich wird, liegt er bei allen Konstrukten weit unterhalb von 0,01%.

3.4 Massenanalytik des sekretierten Tendamistats

Nach oder während der Sekretion der Tendamistat-Vorläuferproteine werden die Signalpeptide durch Signalpeptidasen vom reifen Proteinteil getrennt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Signalpeptide werden ausnahmslos korrekt durch die Signal-

peptidasen von ihren natürlich anhängenden Proteinen prozessiert. Die Schnittstellen der Signalpeptide besitzen die typischen Eigenschaften, um von Signalpeptidasen erkannt zu werden. So befindet sich in Position -4 ein Prolin, welches als Helixbrecher fungiert, um die Schnittstelle für die Signalpeptidasen räumlich optimal zu präsentieren. Auch die c-terminalen Sequenzen Alanin-Serin-Alanin sowie Alanin-Glutamin-Alanin entspricht einer typischen Erkennungssequenz. Eine korrekte Prozessierung des Tendamistats sollte also unter den gegebenen Voraussetzungen ohne weiteres möglich sein.

Um die Prozessierung zu überprüfen, wurden aus den vorgereinigten Überständen des fünften und siebten Kulturtages Massenanalytiken erstellt. Um möglichst genaue Daten zu bekommen, wurden sowohl MALDI- (matrix assisted laser detected ionization) als auch ESI- (electron spray ionization) Messungen ausgewertet. Abbildung VI-13 zeigt beispielhaft Ausschnitte aus MALDI-Massenspektren der Überstände des fünften Kulturtages. In den meisten Fällen ergaben die MALDI-Messungen sehr gute Spektren mit scharfen Peaks für Tendamistat bei nur sehr geringem Hintergrundrauschen. Neben den isolierten Tendamistatpeaks waren teilweise noch zusätzliche Peaks von höherer und/oder geringerer Masse zu erkennen, deren Molekulargewicht durch ESI-Messungen teilweise noch genauer bestimmt werden konnten.

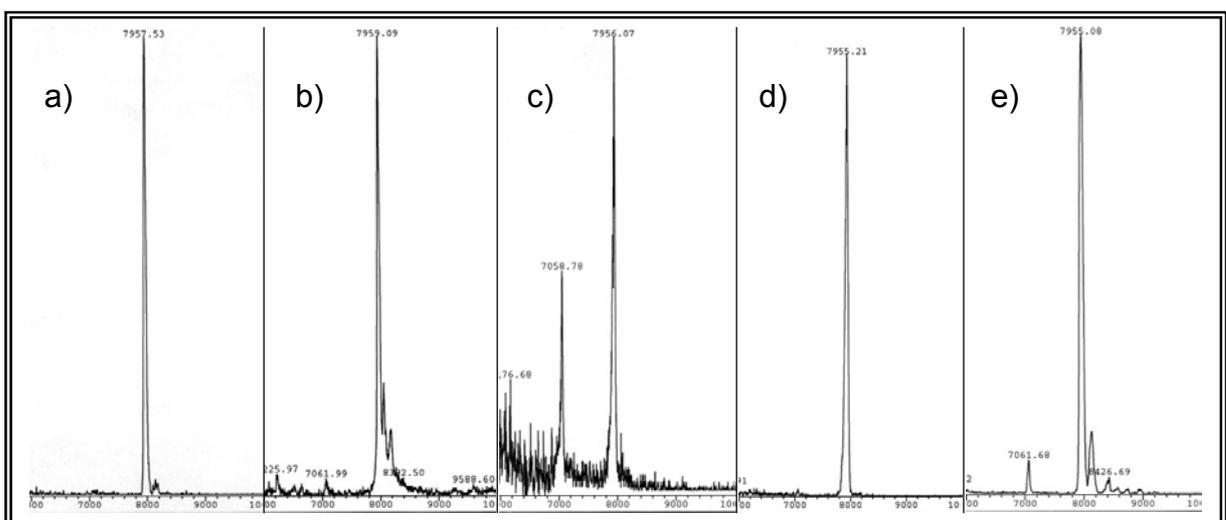


Abb. VI-13 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Überstände des fünften Kulturtages. a) mit Tendamistat-SP, b) mit AxeA-SP, c) mit CelB-SP, d) mit ChiC-SP, e) mit SnpA-SP.

Die gesammelten Daten sind in Tabelle VI-5 zusammengestellt. Anhand der Daten kann gezeigt werden, dass die zusätzlichen Peaks höherer Masse auf falsch prozessiertes Tendamistat schließen lassen. Die Werte stimmen relativ gut mit den berechneten Massen für Tendamistat plus 2 bzw. 6 Aminosäuren der jeweiligen Signalpeptide überein. Für die niedrigeren Massen, die im Überstand der CelB-Konstrukte schon am fünften Tag, bei allen anderen Konstrukten am siebten Tag gefunden wurden, stimmen die Daten der Massenanalytik gut mit dem berechneten Wert eines teilweise hydrolysierten Tendamistats überein. Hier kann von einem durch Proteolyse um neun Aminosäuren verkürzten Tendamistat ausgegangen werden.

		WT	AxeA	CelB	ChiC	SnpA
Signalsequenz-Tendamistat	ber.	gef.	gef.	gef.	gef.	gef.
Tag 5						
SC...	~ 7059	-	-	7058,78°	-	-
DTTVSEPAESC...	~ 7958	7957,9*	7960,68°	7958,5*	7955,46°	7956,24*
SA-DTTVSEPAESC...	~ 8116	-	/	/	/	8117,18°
QA-DTTVSEPAESC...	~ 8157	/	8177,51°	-	-	/
AGPASA-DTTVSEPAESC...	~ 8412	-	/	/	/	8410,8*
Tag 7						
SC...	~ 7059	7043,51°	7059,47°	7052,49°	7059,08	7055,07°
DTTVSEPAESC...	~ 7958	7956,9*	7960,79°	70957,8°	7956,96°	7957,03°
SA-DTTVSEPAESC...	~ 8116	-	/	/	/	8106,39°
QA-DTTVSEPAESC...	~ 8157	/	8176,68°	-	-	/
AGPASA-DTTVSEPAESC...	~ 8412	-	/	/	/	8407,81°

Tab. VI-5 *Aufstellung der im Kulturüberstand gefundenen Massenpeaks von Tendamistat für die Kulturtage 5 und 7. Messungen mit ESI(*) und MALDI(°). Zahlenangaben in Da. - (keine entsprechenden Werte im Spektrum vorhanden); /(keine Angabe möglich, da die Zuordnung nicht dem Signalpeptid entspricht).*

Da die natürlich anhängenden Proteine richtig von ihren Signalpeptiden abgespalten werden, können die Probleme der Tendamistatprozessierung an dem veränderten N-Terminus des reifen Proteinteils liegen. In der Position +1 befindet sich im Tendamistat ein Aspartat. Auch die Endoglucanase B (CelB) besitzt an ihrem N-Terminus ein Aspartat. Mit dem CelB-Signalpeptid wird Tendamistat korrekt prozessiert. Der N-Terminus der Acetylxylan Esterase (AxeA) und auch der Chitinase (ChiC) besteht

aus einem Alanin. Im Falle von AxeA wird Tendamistat nicht korrekt prozessiert, mit dem ChiC-Signalpeptid jedoch wird die Signalpeptidase-Schnittstelle fehlerfrei erkannt. Die Aminosäuresequenz der Metalloproteinase (SnpA) beginnt mit Threonin, ihr Signalpeptid führt in der Kombination mit Tendamistat zu einer zweifachen Falschprozessierung. Um definitive Aussagen treffen zu können, ob für eine vollständig richtige Prozessierung die Kombination aus Signalpeptid und N-Terminus des Proteins eine Rolle spielt, sind die vorhandenen Daten der fünf Konstrukte zu gering. Einerseits könnte vermutet werden, dass eine richtige Prozessierung erfolgt, wenn das an ein Signalpeptid fusionierte Protein den gleichen N-Terminus besitzt wie das natürlich anhängende Protein. Das könnte belegt werden durch die richtige Abspaltung von Tendamistat sowohl über das eigene als auch über das CelB-Signalpeptid und eine falsche Prozessierung über Signalpeptide, deren Proteine mit anderen Aminosäuren beginnen (AxeA, SnpA). Andererseits stellt sich dann die Frage, warum mit ChiC eine korrekte Prozessierung erreicht wird.

Eine falsche Prozessierung kann auch durch eine Veränderung im C-Terminus des Signalpeptids begründet sein. Im Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt sich, dass das Tendamistat- und das SnpA-Signalpeptid in den letzten sechs Aminosäuren übereinstimmen. Trotzdem wird Tendamistat vom SnpA-Signalpeptid nicht korrekt abgespalten. Die drei anderen Signalpeptide weisen in den letzten vier, bzw. sechs Positionen eine identische Aminosäureabfolge auf, die Prozessierung ist aber verschieden. Aus den beschriebenen Daten ergibt sich folgendes Bild (siehe Abb. VI-14) für die Spaltstellen der Signalpeptide:

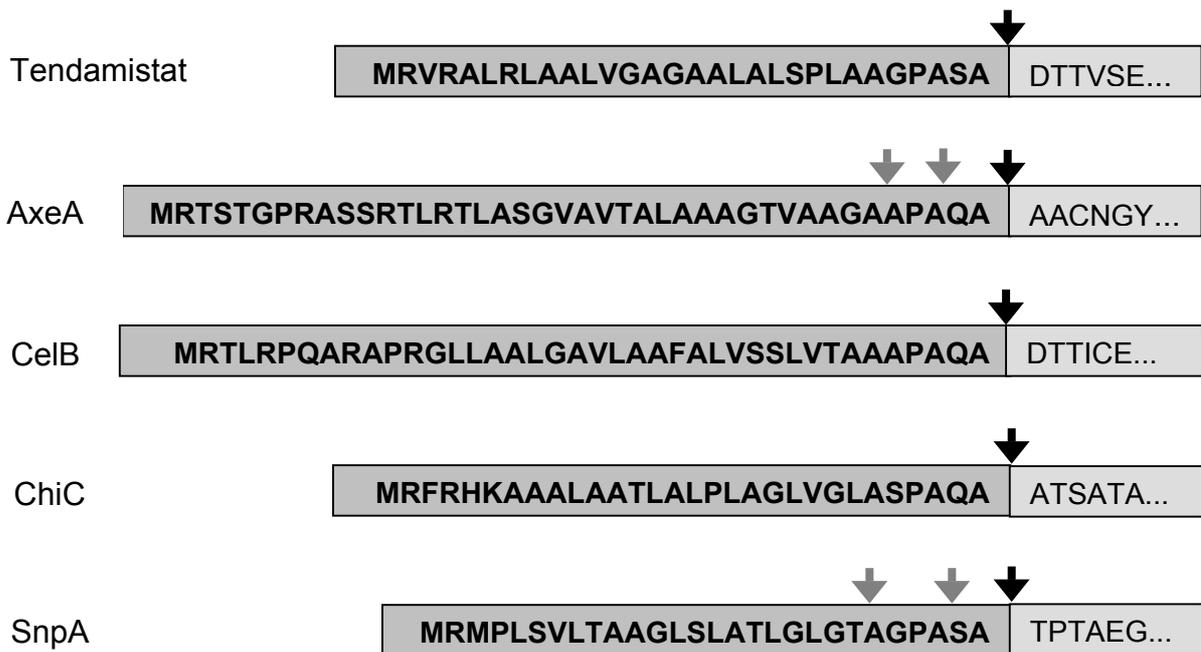


Abb. VI-14 Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide. ■ Signalpeptid; □ natürlich anhängendes Protein. ▼ natürliche Spaltstelle; ▼ zusätzliche Spaltstelle bei der Prozessierung des Tendamistats, berechnet anhand der massenspektroskopischen Daten.

Da eine Betrachtung der Aminosäuresequenz rund um die Signalpeptidase-Schnittstelle zu keinem eindeutigen Ergebnis führt, wurden für eine Erklärung der Meßergebnisse verschiedene Programme zur Strukturberechnung von Signalpeptiden herangezogen (siehe Diskussion, Kapitel VI-5).

4 Expressionsvergleiche mit einem heterologen Protein (Hirudin)

Für den Vergleich der Hirudinexpression über die verschiedenen Signalpeptide wurden *S. lividans*-Protoplasten zunächst mit den Expressionsplasmiden transformiert. Aus den gut sporulierten Transformationsplatten wurden kleine Agarstücke entnommen und Vorkulturen angeimpft. Nach drei Tagen wurden daraus jeweils drei Vergleichskulturen inokuliert. Aus diesen Kulturen wurden ab dem ersten Tag Proben für die nachfolgenden analytischen Untersuchungen entnommen.

4.1 Trockengewicht

Um das Wachstum der Vergleichskulturen einschätzen zu können, wurde zunächst das Trockengewicht der Kulturen bestimmt (s. Abb. VI-15). Betrachtet man die Daten, so scheint ein exponentielles Wachstum erst am zweiten Tag nach der Inokulation über die Vorkulturen zu beginnen, was auch direkt in den Schüttelkolben beobachtet werden konnte. Bereits am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (fünfter Tag) war die Zellyse in allen Kulturen so weit fortgeschritten, dass eine weitere Probenahme nicht sinnvoll war.

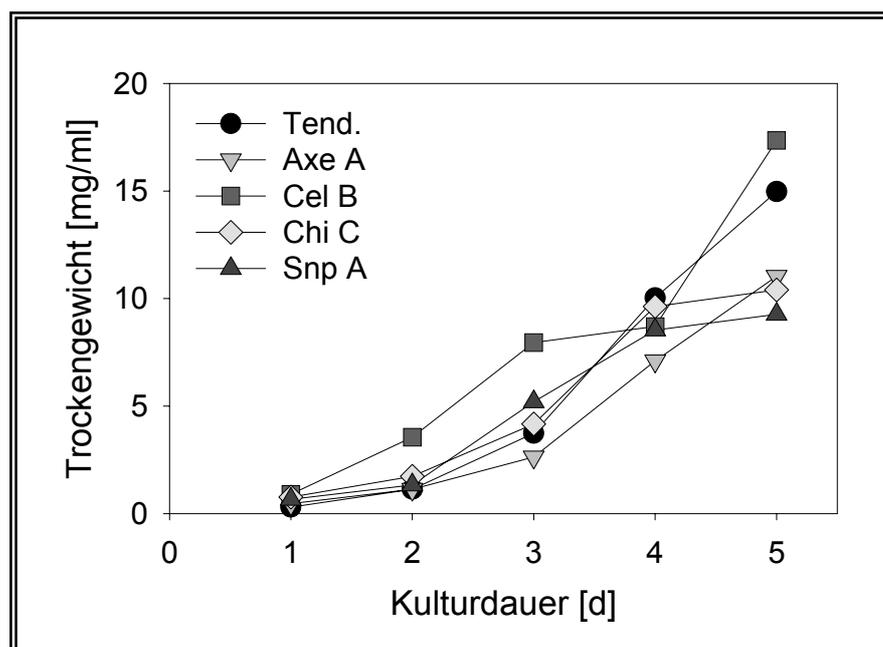


Abb. VI-15 Trockengewicht der Hirudinkulturen mit verschiedenen Signalsequenzkonstrukten.

Die in der Abbildung VI-15 dargestellten Messdaten geben Mittelwerte aus drei Vergleichskulturen an. Das Wachstum der verschiedenen Kulturen ist mit 10 bis 17 mg/mL ungefähr doppelt so stark wie bei der Tendamistatexpression (6 bis 7,5 mg/mL). Die Kurven der Zellmassenentwicklung der Hirudinkulturen weichen teilweise stark voneinander ab. So setzt das Wachstum der Kulturen des CelB-Signalpeptidkonstrukts sehr viel schneller ein als bei allen anderen. Die ChiC- und SnpA-Kulturen befinden sich am fünften Tag der Expression schon in der stationären Phase, die anderen Kulturen noch in der logarithmischen Wachstumsphase. Die folgenden Meßwerte der Hirudinkonzentration und -aktivität im Medium beziehen sich auf die Probenahme am vierten und fünften Tag der Kultivierungen.

4.2 Nativgele und Aktivitätsbestimmung aus dem Medium

Hirudin wird zum größten Teil in einer nicht aktiven Form sekretiert. Diese Spezies von Hirudin kann nicht über den Aktivitätstest quantifiziert werden. Für eine Quantifizierung der Gesamtmenge an Hirudin kann nur eine optische Auswertung von Acrylamidgelen herangezogen werden. Hier bietet sich eine Gelfiltration an, bei der zusätzlich zwischen der aktiven und inaktiven Form von Hirudin unterschieden werden kann. Im Gegensatz zu SDS-Gelen erfolgt die Auftrennung von Proteinen in einem Nativgel hauptsächlich über Größe und natürliche Ladung. Im Fall von Hirudin kann in einem Nativgel leicht zwischen der aktiven, nativ gefalteten Spezies und dem inaktiven Enzym mit anderer Konformation unterschieden werden. Der Hintergrund hierzu wurde bereits in Kapitel IV beschrieben. In den in Abbildung VI-16 gezeigten Nativgelen kann deutlich zwischen der höher laufenden Doppelbande des inaktiven Hirudins und der Bande des aktiven Enzyms unterschieden werden. Auf diesen Gelen sind Aceton-gefällte Proben des Überstandes des vierten und fünften Kulturtages zu sehen. Über eine Acetonfällung werden die Proben kaum entsalzt, was ein Auseinanderlaufen der Banden verursacht. Diese Art der Fällung hat sich jedoch als quantitativ zuverlässiger als eine Chloroform/Methanol-Fällung herausgestellt. Die Gele wurden mit einer großen Menge an Protein beladen, da nur so Banden für aktives Hirudin erkennbar sind.

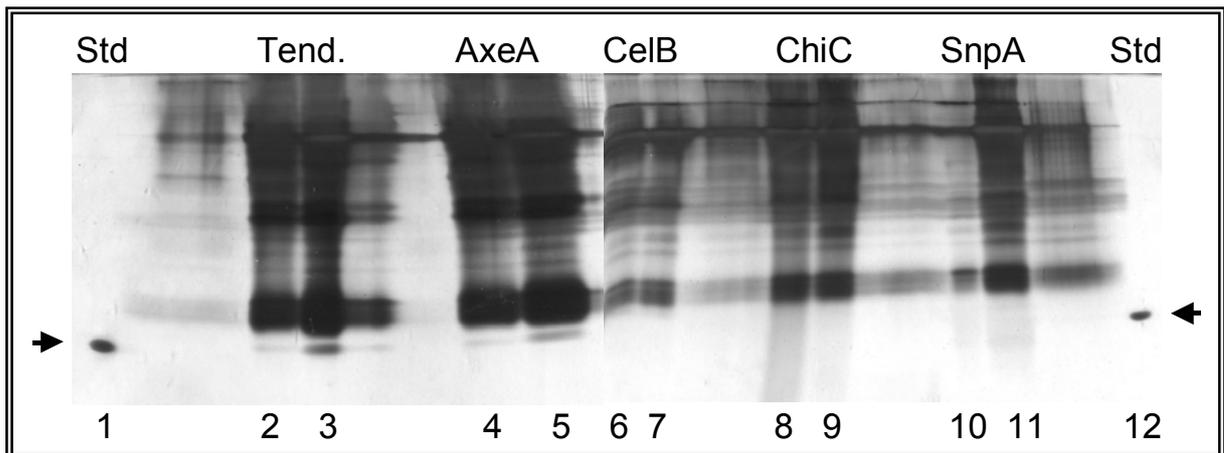


Abb. VI-16 Nativgel der Hirudin-Kulturüberstände. 1,12 (Hirudin Standard); 2,4,6,8,10 (4. Kulturtag); 3,5,7,9,11 (5. Kulturtag); ► natives Hirudin.

Mit den Tendamistat- und AxeA-Signalpeptiden wird eine sehr starke Hirudinexpression erzielt; ein geringer Anteil des sekretierten Enzyms liegt in der aktiven Form vor. Die Menge des sekretierten Hirudins ist am fünften Tag deutlich höher als am vierten. Die Zellmasse der Tendamistat-SP-Kulturen ist im Vergleich zur AxeA-SP-Kultur am fünften Tag noch einmal deutlich angestiegen. Anhand der Bandenstärke läßt die höhere Zellmassenentwicklung nicht auf eine höhere Hirudinexpression schließen, was aber auch anhand der sehr starken Bande kaum noch möglich ist. Betrachtet man die schwache Bande des nativen Hirudins, so ist vom vierten zum fünften Tag in den Tendamistat-SP-Kulturen ein größerer Anstieg zu erkennen als beim AxeA-Signalpeptid. Im Vergleich dazu wird bei den CelB-, ChiC- und SnpA-Kulturen kein aktives Hirudin sekretiert. Das kann aber auch an der Gesamtmenge des sekretierten Hirudins liegen. Die Hirudinbanden der ChiC- und SnpA-Kulturen sind sehr viel schwächer als die der Tendamistat- und AxeA-Konstrukte.

Abb. VI-17 zeigt die Konzentration an nativem Hirudin in den Kulturüberständen, bestimmt über die Anti-Thrombin-Aktivität des Mediums. Im Vergleich zu den Nativgelen, in denen gefällte Proteine im größeren Vergleich analysiert werden, entstehen hier weniger Ungenauigkeiten. Die Aktivitäten wurden in jeweils drei verschiedenen Kulturen bestimmt. Da eine Fehlerangabe in dem Gesamtvergleich der Abb. VI-17 zu unübersichtlich wäre, sind die Messungen für die verschiedenen Kulturen in Abb. VI-18 einzeln dargestellt.

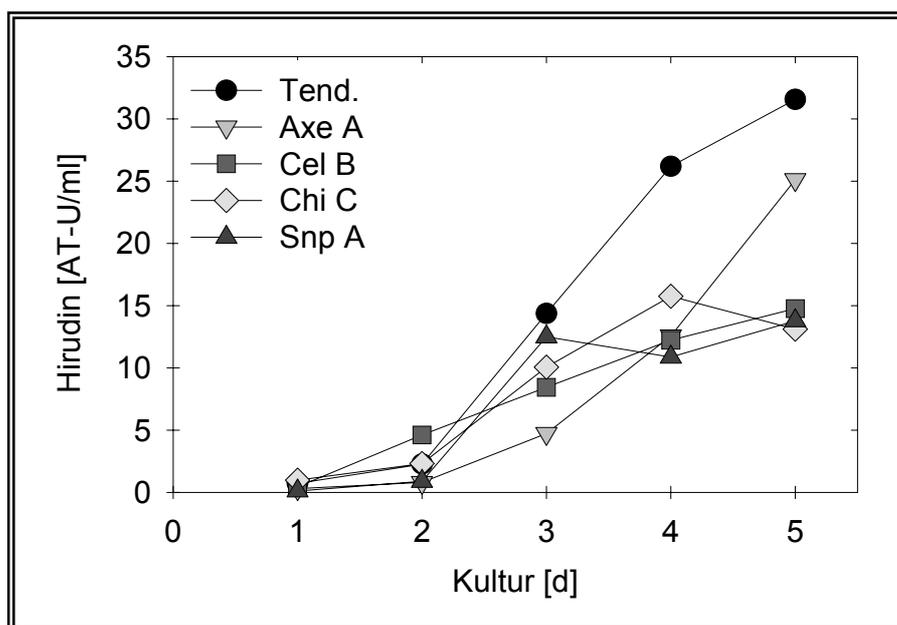


Abb. VI-17 Expression von nativem Hirudin über die verschiedenen Signalsequenzkonstrukte. Der Hirudingeht wurde bestimmt über einen Aktivitätstest.

Die Produktion von nativem Hirudin ist mit dem Tendamistat-Signalpeptid am höchsten (31,6 AT-U/mL). Wie die Parallelbestimmung der Einzelkulturen zeigt, ist die Hirudinproduktion sehr gut verifizierbar. Auch mit dem AxeA-SP wird ein hoher Aktivitätswert von 25,1 AT-U/mL erreicht. Dies spiegelt sich ebenso in jeder Einzelbestimmung wider. Mit den Signalpeptiden von CelB, ChiC und SnpA werden sehr viel geringere Hirudinkonzentrationen im Medium erzielt (14,8, 13,1 und 13,8 AT-U/mL). Die Messungen der Einzelkulturen variieren teilweise sehr stark. Obwohl alle Kulturen am fünften Kulturtag eine starke Zellyse aufwiesen, war, gemessen am Verlauf der Kurven des Trockengewichtes, noch keine stationäre Wachstumsphase in den Kulturen erreicht. In den Kurven der Hirudinaktivität ist bei den CelB-, ChiC- und SnpA-Signalpeptid-Kulturen ab dem dritten bzw. vierten Wachstumstag eine deutliche Stagnation zu erkennen. Auch die Kurve der messbaren Hirudinaktivität des Tendamistat-SP-Konstruktes flacht vom vierten bis fünften Kulturtag ab. Mit AxeA als Signalpeptid dagegen ist keine Stagnation der Hirudinproduktion in den Messdaten erkennbar.

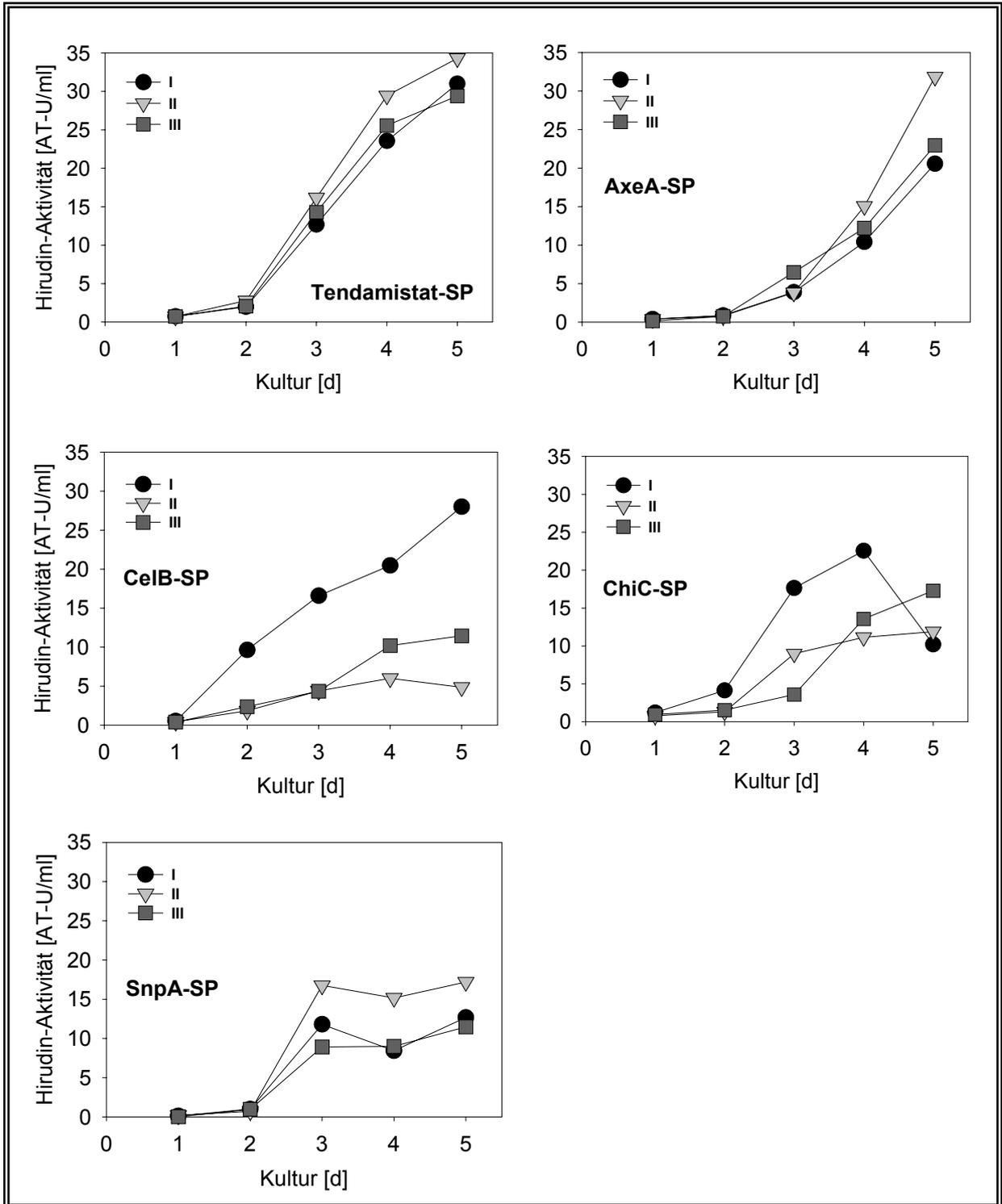


Abb. VI-18 Anti-Thrombin-Aktivität in mg/L in den einzelnen Kulturen der Hirudin-Signalpeptid-konstrukte.

In Tab. VI-6 sind die Daten der Hirudinaktivität und des Trockengewichts des jeweils fünften Kulturtages zusammengefasst. Den Bezug zwischen gemessener Aktivität und dem Trockengewicht zeigt deutlich, dass in den AxeA-Signalpeptid-Kulturen die Produktion an nativem Hirudin, bezogen auf die Zelldichte, am größten ist (2,3 AT-U/mg). Die Tendamistat-SP-Kultur erzielt einen ähnlichen Wert (2,1 AT-U/mg). Die SnpA- und ChiC-SP-Kulturen weisen eine deutlich geringere Hirudinaktivität auf. (1,5; 1,3 AT-U/mg). Die CelB-SP-Kulturen weisen zwar die höchste Zelldichte auf, die Hirudinaktivität bezogen auf die Zellmasse ist aber mit Abstand am geringsten (0,85 AT-U/mL).

	aktives Hirudin im Medium [AT-U/mL]	Trockengewicht [mg/mL]	aktives Hirudin bez. auf das Trockengewicht [AT-U/mg]
Tendamistat	31,6	15,0	2,1
AxeA	25,1	11,0	2,3
CelB	14,8	17,4	0,85
ChiC	13,1	10,4	1,3
SnpA	13,8	9,27	1,5

Tab. VI-6 *Aufstellung der Anti-Thrombin-Aktivität und des Trockengewichts der Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte des fünften Kulturtags.*

Bevor auf mögliche Zusammenhänge zwischen den Expressionshöhen von Hirudin und den strukturellen Charakteristika der Signalpeptide eingegangen wird, werden in Kapitel 4.3 zunächst noch die Ergebnisse der Untersuchungen der Massanalytik des sekretierten Hirudins vorgestellt.

Eine sinnvolle Auftrennung der Proteine im Zellextrakt in einem Nativgel war nicht möglich. Eine Detektion der Hirudin-Vorläuferproteine im Zellextrakt anhand des Aktivitätstests ist ebensowenig möglich, da im Preprotein der N-Terminus des Hirudin blockiert ist und somit keine Aktivität vorliegt.

4.3 Massenanalytik des sekretierten Hirudins

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, werden alle hier eingesetzten Signalpeptide korrekt von ihren natürlich anhängenden Proteinen durch Signalpeptidasen abgespalten. Um die Prozessierung des heterologen Hirudins zu überprüfen, wurden die vorgereinigten Kulturüberstände des vierten Kulturtages massenspektroskopisch (MALDI) untersucht. Die Messungen ergaben bei Verwendung eines Zusatzes von Ammoniumcitrat gut auswertbare Spektren. Der Zusatz bedingt jedoch eine um 18 Da höhere Masse der gemessenen Proteine (durch NH_4^+). Abb. VI-19 zeigt Ausschnitte der Spektren.

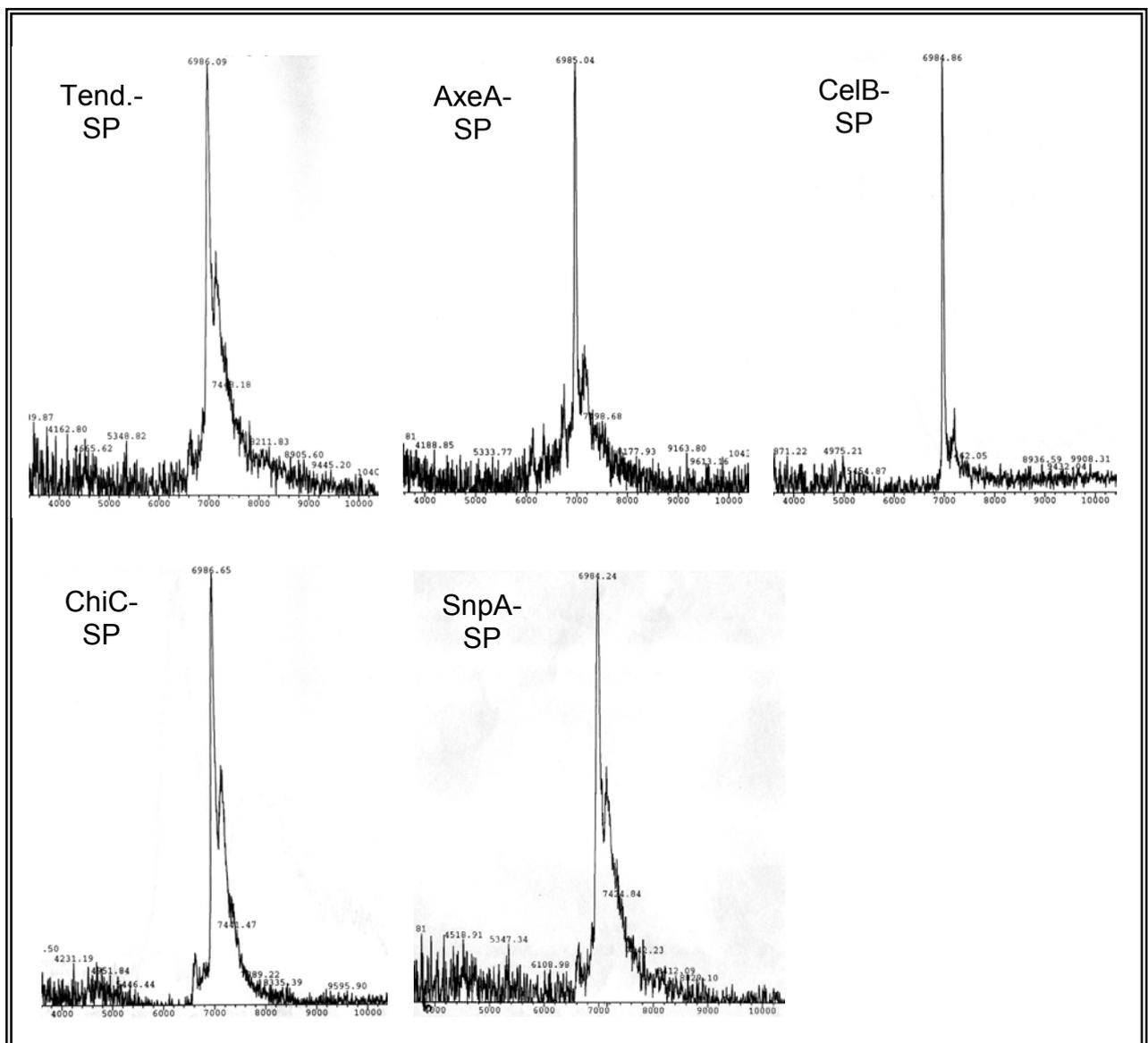


Abb. VI-19 Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Überstände der Hirudin-Signalpeptid-Konstrukte des fünften Kulturtages.

In den Überständen jedes der Signalsequenz-Konstrukte wurden Hirudine mit verschiedenen Massen gefunden. Die Tabelle VI-7 vergleicht die gefundenen Massendaten der aus den Signalpeptid-Varianten prozessierten Hirudine mit den berechneten Werten. Wie auch in den Spektren von Tendamistat lassen sich zusätzliche Peaks mit höherer Masse als von Hirudin identifizieren. Diese Peaks können zum großen Teil einen um jeweils zwei Aminosäuren verlängerten N-Terminus von Hirudin zugeordnet werden. Es liegen auch Nebenpeaks mit deutlich geringerer Masse als die für Hirudin berechnete vor. Sie lassen sich teilweise einem um drei Aminosäuren verkürzten Protein zuordnen. Diese Nebenpeaks stechen unterschiedlich deutlich hervor und sind damit auch unterschiedlich leicht vom Grundrauschen zu isolieren, so dass nicht für alle Peaks Zuordnungen gelingen.

Sequenz		Tend.	AxeA	CelB	ChiC	SnpA
Signals.-Hirudin	ber.	gef.	gef.	gef.	gef.	gef.
<i>T...</i>	6607,86	6637,8° (6619,8+18)	n.b.	-	6620,4° (6602,4+18)	n.b.
<i>VVYT...</i>	6969,26	6986,1° (6968,1+18)	6985,0° (6967,0+18)	6984,9° (6966,9+18)	6986,7° (6968,7+18)	6984,2* (6966,2+18)
SA-VVYT...	7127,40	7144,2° (7126,2+18)	/	/	/	7148,3* /7130,3+18)
QA-VVYT...	7168,46	/	n.b.	7205° (7187+18)	7189,4° (7171,4+18)	/

Tab. VI-7 *Aufstellung der im Kulturüberstand gefundenen Massenpeaks von Hirudin am vierten Kulturtag. Messungen mit ESI(*) und MALDI(°). n.b.: nicht bestimmbar.*

Aus den Massenspektren, bzw. den in Tabelle VI-7 enthaltenen Daten lässt sich folgendes Bild der möglichen Spatstellen innerhalb der Signalpeptid-Konstrukte ableiten:

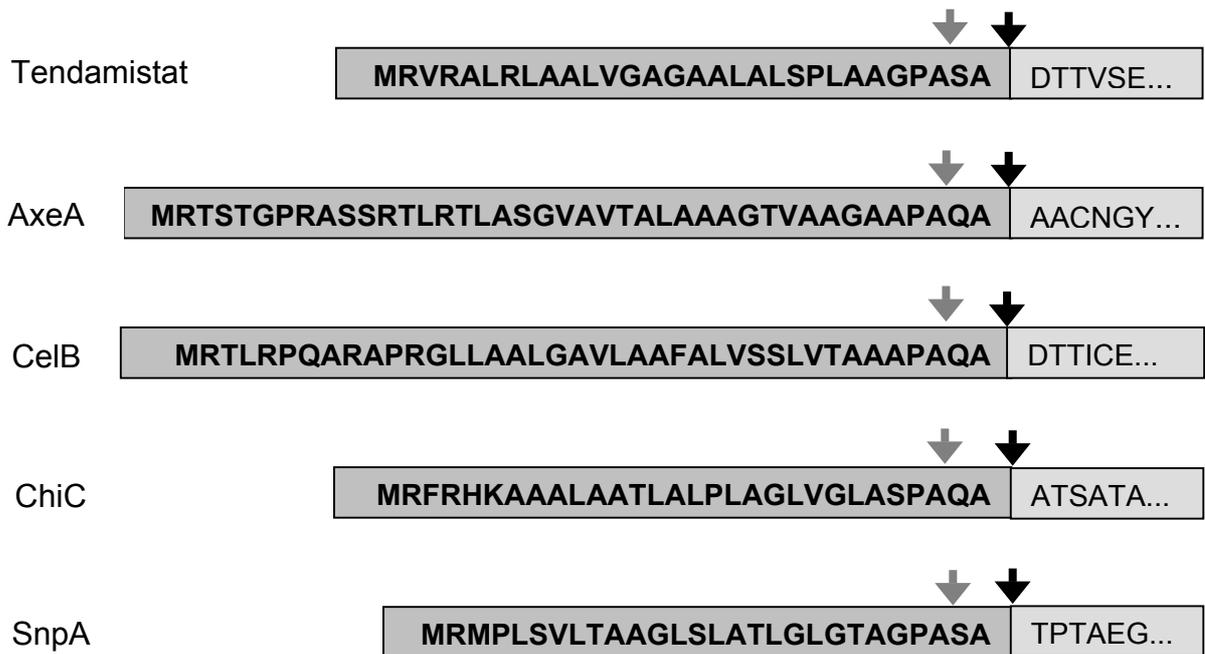


Abb. VI-20 Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide. Signalpeptid; natürlich anhängendes Protein. ▼ natürliche Spaltstelle; ▼ zusätzliche Spaltstelle, berechnet anhand der massenspektroskopischen Daten.

Auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Aminosäurezusammensetzung und der Struktur der Signalpeptide sowie der Prozessierung der Preproteine wird im nächsten Kapitel eingegangen.

5 Diskussion

5.1 Diskussion zur Expression

In der theoretischen Einführung sind einige mögliche Faktoren zur Beeinflussung der Expressionshöhe von Proteinen aufgeführt worden. Einige dieser Faktoren müssen in der nachfolgenden Diskussion nicht berücksichtigt werden, da sie von vornherein ausgeschlossen werden können. So liegt bei allen in dieser Arbeit eingesetzten Signalsequenzen ein ATG-Startcodon vor, d. h. die verschiedenen Expressionshöhen werden nicht durch das Startcodon beeinflusst. Ebenso sind die Sequenzen so ausgewählt, dass nur jeweils eine Ribosomale Bindestelle vorliegt. Auf die einzelnen Bereiche der Signalpeptide bezogen können ebenfalls einige Faktoren, die die Expression beeinflussen, ausgeschlossen werden. Im Bereich der c-Domäne ist das Vorhandensein eines Prolins in der Position -4 bis -6 essentiell, um eine beta-turn-Struktur auszubilden und die Signalpeptidase-Spaltstelle zu exponieren. Ist kein Prolin vorhanden, wird das Signalpeptid fast funktionsunfähig, wie ein Austausch von Prolin (-5) gegen Leucin im Signalpeptid der Metalloprotease Npr aus *S. cacaoi* zeigte [CHANG ET AL., 1997]. In den hier untersuchten Signalpeptiden befindet sich jeweils an der Position -4 ein Prolin.

5.1.1 Ladung und Länge der n-Domäne

Die Ladung der n-Domäne scheint einer der wichtigsten Kriterien für eine erfolgreiche Sekretion von Proteinen zu sein. Die meisten Untersuchungen, die sich mit Mutationen innerhalb von Signalsequenzen beschäftigen, ziehen dieses Kriterium heran. Bei der Expression des alpha-Amylase Inhibitors Tendamistat aus *S. tendae* konnte durch eine Reduktion der positiven Ladung von +3 (WT) auf +2 eine Steigerung der Expression auf das Doppelte erreicht werden. Andere Ladungsmutanten, die sowohl höhere als auch niedrigere Ladungen aufwiesen, ergaben eine Reduktion der Expression [FAB UND ENGELS, 1996]. Verschiedene Veränderungen im Esterase-Signalpeptid zu einer Nettoladung von 0 und +2, ausgehend vom +4 Wildtyp, reduzierten die Esteraseproduktion erheblich [HALE UND SCHOTTEL, 1996]. Der Austausch eines Alanins zu Beginn der h-Domäne gegen ein Arginin und damit eine

Erhöhung der Ladung auf +3 im alpha-Amylase-Signalpeptid resultierte in einer Ausbeutesteigerung auf 230 % im Vergleich zum Wildtyp [VIGAL ET AL., 1991]. Die Verringerung der Nettoladung von +3 auf +1 durch den Austausch eines Arginins gegen ein Glutamin in der Signalsequenz der Metalloprotease Npr verringerte die Ausbeute um die Hälfte [CHANG ET AL., 1997]. Die n-Domäne eines Cellulase-Signalpeptids aus *Streptomyces* KSM-9 ist mit 26 Aminosäuren sehr lang und trägt eine ungewöhnlich hohe Ladung von +9. Diese hohe Ladung ist bedingt durch neun Arginine, die über die gesamte n-Domäne verteilt und teilweise geclustert vorliegen. Eine Deletion von acht ungeladenen Aminosäuren und somit eine Konzentration von neun positiven Ladungen auf achtzehn Aminosäuren ergab eine Ausbeutesteigerung auf 112% des Wildtypwertes. Eine Verringerung der Ladung durch Substitution oder Deletion einzelner Arginine um 2 bzw. 4, erzielte eine Reduktion der Cellulaseproduktion um 10 - 25% [PARK ET AL., 1991]. Ähnliche Substitutionen im Signalpeptid MelC1 aus *Streptomyces antibioticus* bewirkten eine Verringerung der Tyrosinase-expression auf 10% [LEU ET AL., 1992]. PAGÉ ET AL. (1996) verglichen die Expression von Xylanase A (XlnA) unter dem Einfluß von verschiedenen Signalpeptiden. Das Signalpeptid der Acetylxylan Esterase ergab im Vergleich zur Wildtyp-Signalsequenz eine Ausbeutesteigerung um 20%, obwohl die Ladung der n-Domänen beider Peptide identisch ist. Der N-terminale Bereich von AxeA ist um zwei Aminosäuren länger als bei XlnA und die vier Ladungen sind homogener verteilt. Die Expressionen unter dem Einfluß der Xylanase B- und Mannase-Signalpeptide fielen vergleichbar hoch aus, obwohl die Ladungen sich stark unterscheiden (XlnB: +5; Man: +2). Aus anderen Vergleichen schließen die Autoren, dass eine Mindestladung von +2 im Signalpeptid vorhanden sein muß, um die Funktionalität zu gewährleisten [MOROSOLI ET AL., 1997].

Die in dieser Arbeit untersuchten Signalpeptide weisen untereinander sehr ähnliche n-Domänen auf. Das Tendamistat- und das ChiC-Signalpeptid tragen jeweils drei positive Ladungen, die in dem 7, bzw. 6 AS langen N-terminalen Bereich durch jeweils eine oder zwei Aminosäuren separiert sind. Ebenfalls ähnlich sind die Signalpeptide von AxeA und CelB aufgebaut. Die 15, bzw. 12 AS langen N-Termini tragen jeweils vier positive Ladungen, die homogen über den gesamten Bereich verteilt sind. Das SnpA-Signalpeptid ist dagegen außergewöhnlich kurz. Es besteht nur aus dem Start-Methionin und einem Arginin, resultierend in der geringen Ladung von +1.

Ein Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Tendamistat und der Struktur oder Ladung der n-Domänen der Signalpeptide kann nicht festgestellt werden. Die höchsten Ausbeuten in der Tendamistat-Produktion wurden mit den Signalpeptiden von AxeA und ChiC erzielt. Sie tragen zwar die höheren Ladungen (+4/+3), aber die Expression mit dem Tendamistat-Signalpeptid mit (Ladung: +3) hatte im Vergleich zu den beiden erstgenannten eine geringere Protein-Produktion zur Folge. Noch geringer fiel die Ausbeute für das CelB-Signalpeptid mit einer Ladung von +4 aus. Das SnpA-Signalpeptid mit nur einer Ladung konnte eine zum Tendamistat-Signalpeptid vergleichbare Expression erzielen. Dies spricht gegen die These von MOROSOLI ET AL. (1997), dass in einem funktionsfähigen Signalpeptid mindestens zwei positive Ladungen enthalten sein müssen. Auch die Länge des N-terminalen Bereichs scheint keine besonderen Auswirkungen auf die Expressionshöhe des Tendamistats zu haben. Die besten Produzenten (AxeA, ChiC) unterscheiden sich in ihren Längen erheblich (15 und 6 AS). Die zu ChiC vergleichbar lange n-Domäne im Tendamistat-Signalpeptid bewirkte eine geringere Expression von Tendamistat, die aber wiederum mit der des SnpA-Signalpeptids vergleichbar war, die eine nur zwei AS kurze n-Domäne besitzt. CelB mit einer eher längeren n-Domäne (12 AS) zeigte die niedrigste Protein-Produktion.

Auch bei der Hirudinexpression ist kein direkter Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Hirudin und der Struktur oder der Ladung der n-Domänen der Signalpeptide feststellbar. Die höchsten Aktivitätswerte, gleichbedeutend mit der Expression von nativem Hirudin wurden mit den Signalpeptiden von Tendamistat und AxeA erzielt, die innerhalb der n-Domäne Ladungen von +3 und +4 in den 7 bzw. 15 Aminosäuren langen n-Regionen enthalten. Über die CelB-, ChiC- und SnpA-Signalpeptide wird jeweils eine vergleichbare Expressionsrate erzielt. Diese drei Signalpeptide variieren sehr stark in Bezug sowohl auf die Ladung als auch auf die Länge der n-Domäne (CelB: +4, 12 AS; ChiC: +3, 6 AS; SnpA: +1, 2 AS).

5.1.2 Unterschiede in der h-Domäne

Der Theorie nach begünstigen ein oder mehrere Glycine im Kernbereich die Beweglichkeit des Signalpeptids. Bei erhöhter Flexibilität kann sich eine hairpin-Struktur ausbilden, die eine Insertion des Signalpeptids in die Membran erleichtert. Das Einfügen eines Glycins in das alpha-Amylase-Signalpeptid zeigte allerdings keinen Effekt in Bezug auf die Expressionshöhe der alpha-Amylase [VIGAL ET AL., 1991]. Die fünf hier vorgestellten Signalpeptide enthalten im Kernbereich ein bis drei Glycine.

Der hydrophobe Kernbereich des Signalpeptids ist in Gram-positiven Bakterien mit mindestens 15 Aminosäuren recht lang. Das Einhalten einer Mindestlänge scheint essentiell für ein funktionstüchtiges Signalpeptid zu sein. Eine Deletion von vier, bzw. acht Aminosäuren der h-Domäne resultierte in einer 200fachen Reduktion der Esterase-Produktion [HALE UND SCHOTTEL, 1996]. Die Deletion von drei benachbarten Alaninen im α -Amylase-Signalpeptid reduzierte die alpha-Amylase-Ausbeute. Eine Verlängerung um drei unpolare Aminosäuren resultierte aber ebenso in einem Ausbeuteverlust. Dagegen bewirkte eine Verkürzung des hydrophoben Bereichs durch den Austausch eines Alanins am Beginn der h-Domäne gegen ein Arginin eine Expressionssteigerung auf 230% im Vergleich zum Wildtyp. Hier scheint der Einfluß der Ladung entscheidend für die veränderte Expressionshöhe zu sein [VIGAL ET AL., 1991]. An dem mit 61 Aminosäuren recht langen und von der Zusammensetzung her eher ungewöhnlichen Cellulase-Signalpeptid sind 2 verschiedenen Deletionen im hinteren Bereich der h-Domäne untersucht worden. Eine Deletion von 12 benachbarten Aminosäuren reduzierte die Cellulase-Produktion auf 5% der Ausbeute des Wildtyps, bei einer Deletion der letzten fünf Aminosäuren konnten noch 62% der WT-Produktion erreicht werden [PARK ET AL., 1991]. Hier sieht es so aus, als ob die fortschreitende Verkürzung der h-Domäne einen immer größeren Ausbeuteverlust bewirkt. MOROSOLI ET AL. (1997) gehen ebenfalls davon aus, dass ein längerer Kernbereich eine erhöhte Expression bewirkt. Sie beziehen sich dabei auf die Expression von Xylanase A mit 7 verschiedenen Signalpeptiden. Allgemein bewirken die Signalpeptide mit längerem Kernbereich eine höhere Ausbeute als die mit kürzerer h-Domäne, aber es gibt auch Ausnahmen. Das deutet darauf hin, dass entweder keine generellen Aussagen bezüglich der h-Domäne getroffen werden können

oder dass andere strukturelle Elemente einen größeren Einfluß auf die Expression haben.

Vergleicht man die hier vorgestellten Signalpeptide, so variiert die Länge des hydrophoben Bereichs von 19 AS (Tendamistat-Signalpeptid), über 20 AS (ChiC-SP) und 22 AS (AxeA- und SnpA-SP) bis zu 24 AS (CelB-SS).

Die Signalpeptide von Tendamistat und SnpA bewirken eine vergleichbare Expression von Tendamistat, ebenso die von ChiC und AxeA. Die höchsten Expressionen werden bei den Signalpeptiden beobachtet, deren hydrophober Kern 20 und 22 AS enthält. Das Signalpeptid mit der längsten h-Domäne (CelB, 24 AS) zeigt die geringste Expression von Tendamistat, was aber eher auf andere Ursachen zurückzuführen ist (siehe Codonusage). Ein eindeutige Verknüpfung zwischen der Länge der h-Domäne und der Expressionshöhe kann hier nicht erstellt werden.

Die Daten der Expression von Hirudin weisen im Vergleich mit der Tendamistat-expression zwar teilweise andere Signalpeptide als diejenigen mit der höchsten Proteinexpression aus. Ein eindeutige Verknüpfung zwischen der Länge der h-Domäne und der Expressionshöhe kann aber auch für die Hirudinkonstrukte nicht erstellt werden. So bewirkt das Tendamistat-Signalpeptid mit 20 Aminosäuren die höchste Proteinexpression. Mit dem Axe A-Signalpeptid mit einer 22 Aminosäuren langen h-Domäne wird eine geringfügig niedrigere Expression erzielt. Die vorangestellten Signalpeptide von CelB, ChiC und SnpA (24, 20, 22 AS) resultieren in einer vergleichbar niedrigeren Proteinexpression.

5.1.3 Unterschiede in der c-Domäne

Die c-Domäne ist im Allgemeinen sehr kurz und weist konservierte Bereiche auf, ohne die die Signalpeptidase-Spaltstelle nicht exponiert und von den Peptidasen erkannt werden kann. Veränderungen in diesem Bereich sollten also massive negative Auswirkungen auf die Proteinsekretion haben und sind demzufolge auch weniger eingehend untersucht worden. Eine Veränderung des c-terminalen Bereichs des MelC1-Signalpeptids beeinflusste die Tyrosinase-Produktion kaum. Hier wurde ein an

der Position -2 unübliches Arginin gegen ein Serin ausgetauscht, welches viel eher der Sequenz einer typischen Spaltstelle entspricht. Obwohl MelC1 nicht die typischen strukturellen Merkmale eines Tat-Signalpeptids aufweist, wird angenommen, dass es in einer Tat-abhängigen Sekretion eine Rolle spielt. Da dieser Export noch wenig untersucht ist, können Einflüsse durch Mutationen nur schwer abgeschätzt werden [LEU ET AL., 1992]. Dagegen war es zu erwarten, dass eine Deletion der Spaltstelle des Xylanase A Signalpeptids die Sekretion des Proteins unterbindet [PAGÉ ET AL., 1996]. Eine Verkürzung der mit 11 Aminosäuren sehr langen c-Domäne des Cellulase-Signalpeptids um die ersten fünf Aminosäuren resultierte in einem Ausbeuteverlust von 45% [PARK ET AL., 1991]. Ein Austausch von Tyr und Ala an Position -2 und -1 gegen Ser und Met im Signalpeptid einer Metalloprotease resultierte in einem Ausbeuteverlust von 45%, obwohl Tyrosin (-2) nur in Ausnahmefällen in dieser Position zu finden ist und die Substitution eher eine Ausbeutesteigerung erwarten ließ. Der gleichzeitige Austausch von einem sehr üblichen Alanin gegen ein in dieser Position natürlicherweise nicht vorkommenden Methionin könnte daher eher für die Reduktion der Ausbeute eine Rolle spielen. Die Substitution des helixbrechenden Prolins durch ein Leucin im Signalpeptid der Metalloprotease hatte eine Reduktion der Ausbeute auf ein Fünftel zur Folge [VIGAL ET AL., 1991].

Der C-terminale Bereich der in dieser Arbeit untersuchten Signalpeptide ist in Aminosäuresequenz und Struktur sehr ähnlich. Von den jeweils fünf Aminosäuren ist nur die Position -2 variabel, dort befindet sich entweder ein Serin oder ein Glutamin.

Die beiden Signalpeptide mit Ser⁻² (Tendamistat, SnpA) bewirken eine mittlere Expression von Tendamiostat. Die das Gln⁻² enthaltenden Signalpeptide resultieren bei der Kultivierung einerseits in einer erhöhten Tendamiostatproduktion (AxeA, ChiC), andererseits aber auch in einer deutlich reduzierten Ausbeute (CelB), wobei die geringe Expression über das CelB-Signalpeptid eher auf die Codonverteilung zurückzuführen ist. Der Unterschied von Ser⁻² zu Gln⁻² scheint eventuell eine Begünstigung der Tendamiostat-Expression bei vorhandenem Glutamin in der Position -2 zu bewirken.

Bei der Hirudin-Expression zeigt sich dieser Trend nicht. Die höchsten Ausbeuten an nativ und auch an nicht-nativ gefaltetem Hirudin werden bei den Tendamistat- und AxeA-Signalpeptid-Konstrukten gefunden. Auch bei den Signalpeptiden, die in einer geringen Proteinexpression resultieren, ist sowohl ein Glutamin (CelB, ChiC) als auch ein Serin (SnpA) in der c-Domäne enthalten. Die Proteinausbeuten lassen sich daher für die Hirudin-Konstrukte nicht mit dem strukturellen Unterschied der c-Domäne erklären.

5.1.4 Codonverteilung

In Bezug auf die allgemeine Codonverteilung können keine definitiven Aussagen getroffen werden. Einzige Ausnahme stellt die Verwendung des seltenen TTA^{Leu}-Codons dar. Die entsprechende tRNA wird erst in der späten stationären Phase durch Einfluß des *bldA*-Gens gebildet und sollte eine Expression in einer früheren Phase verhindern. Zur Theorie teilweise widersprüchliche Ergebnisse zeigt der Literaturüberblick. Das Einfügen des TTA-Codons im Signalpeptid SSI des Subtilisin Inhibitors aus *S. albogriseolus* ergab eine Reduktion der SSI-Produktion [UEDA ET AL., 1993]. Dagegen führte der Austausch von TTA gegen CTG im VSI-Signalpeptid (Subtilisin Inhibitor aus *S. venezuelae*) zu keiner Änderung der mTNF-Produktion in *S. lividans* [LAMMERTYN, 2000]. Bei der Verwendung des Cellulase B-Signalpeptids für die Xylanase A-Expression konnte auch in einer späten Phase der Kultivierung keine Proteinproduktion festgestellt werden. Dies wurde auf das enthaltene TTA-Codon zurückgeführt [PAGÉ ET AL., 1996].

Von den in dieser Arbeit untersuchten Signalpeptiden enthält nur CelB ein TTA-Codon.

Das CelB-Signalpeptid bewirkt eine geringere Tendamistatproduktion als mit allen anderen Signalpeptiden. Die Expression von Tendamistat setzt auch etwas später ein. Zwischen dem sechsten und siebten Tag der Kultivierung ist ein sprunghafter Anstieg des Tendamistatgehaltes auf das Endniveau vom achten Tag zu beobachten. Mit den anderen Signalpeptiden wird teilweise schon am sechsten Tag die maximale Ausbeute erreicht. Im Vergleich der Tendamistat-Signalpeptid-Konstrukte

scheint sich daher zu bestätigen, dass ein in der Signalsequenz enthaltenes TTA^{Leu}-Codon sowohl für ein späteres Einsetzen der Expression als auch für eine geringere Expressionshöhe verantwortlich ist.

Ein Vergleich der Hirudin-Expression über die verschiedenen Signalpeptid-Konstrukte kann die für Tendamistat gefundene Aussage nicht bestätigen. Zwar zeigen die CelB-Kulturen II und III (vgl. Abb. VI-18) einen relativ späten Anstieg der Hirudin-Aktivität im Medium, im Mittel der Parallelkulturen ist die Entwicklung der Hirudin-Produktion aber mit der der anderen Signalpeptid-Konstrukte vergleichbar. Auch eine eindeutige Abgrenzung bezüglich der maximal erzielten Aktivität im Medium zu den anderen Signalpeptid-Konstrukten ist nicht gegeben.

5.2 Diskussion zur Prozessierung

5.2.1 Schnittstellenberechnungen

Das Programm **SignalP** wurde von H. Nielsen entwickelt, um das Vorhandensein und den exakten Ort einer Signalpeptidase-Spaltstelle vorherzusagen [NIELSEN ET AL. 1997; 1999]. Die Methode beruht auf der Kombination verschiedener künstlicher neuronaler Netze und beinhaltet sowohl eine Vorhersage der Spaltstellen als auch die Aussage, ob es sich bei der betrachteten Sequenz überhaupt um ein Signalpeptid handelt. Darüber hinaus basieren die neuronalen Netze auf getrennten Datensätzen für Eukaryonten, Gram-negative und Gram-positive Bakterien, was die Genauigkeit erheblich erhöht. Für die Bestimmung der Signalpeptid-Spaltstelle sowohl in den Tendamistat- als auch den Hirudin-Signalpeptid-Konstrukten wurden die Aminosäuresequenzen der Signalpeptide plus den ersten sechs AS von Tendamistat, bzw. Hirudin berücksichtigt.

Als Ergebnis der Berechnungen der Tendamistat-Konstrukte zeigte sich zunächst erwartungsgemäß, dass alle Sequenzen als Signalpeptide erkannt werden. Die berechneten Spaltstellen sind in Graphiken dargestellt, die im Anhang bei den Strukturauswertungen zu finden sind. Die ersten fünf Graphiken im Anhang basieren auf dem Programm SignalP V1.1. Maximalwerte des rot dargestellten Y-Scores zeigen die wahrscheinlichen Spaltstellen an. Für fast alle Signalpeptide stimmen die berechneten Daten mit den Literaturangaben der Prozessierung überein. Die zusätzlichen Massenpeaks von Tendamistat mit nicht korrekt prozessierten Signalpeptiden können nicht mit den theoretischen Betrachtungen korreliert werden. Nur für das AxeA-Signalpeptid wird von SignalP eine Spaltstelle zwischen den Positionen -6 und -5 berechnet (siehe Abb. VI-21). Dieses verkürzte Signalpeptid findet sich in den massenspektroskopischen Daten in dem um fünf Aminosäuren längeren Tendamistat wieder.

Werden die Berechnungen mit dem zur Zeit noch im Aufbau befindlichen Rechenmodell von SignalP V2.0 wiederholt, so wird die komplette Sequenz von AxeA als Signalpeptid erkannt und die der Literatur entsprechende Signalpeptid-Spaltstelle berechnet. In das erweiterte Modell sind neuere SWISS-PROT-Daten einbezogen

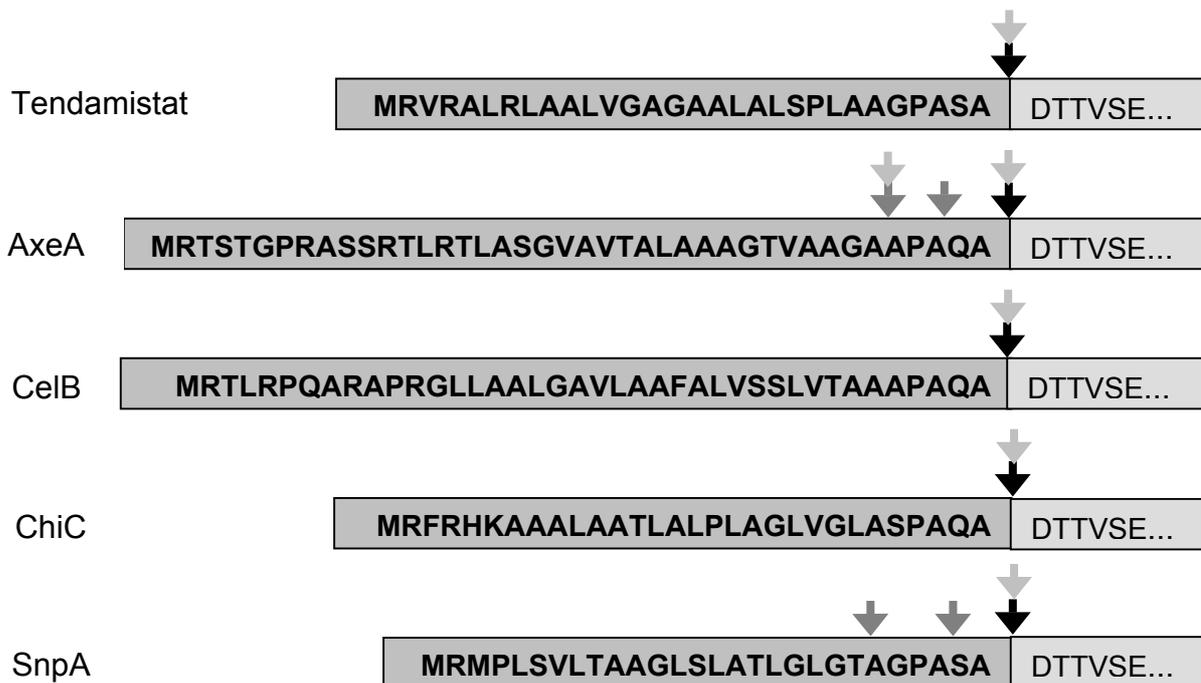


Abb. VI-21 Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide. ■ Signalpeptid; □ anhängendes **Tendamistat**. ▼ natürliche Spaltstelle; ▼ zusätzliche Spaltstelle, berechnet anhand der massenspektroskopischen Daten; ▼ über SignalP vorausgesagte Spaltstelle.

worden. Zusätzlich werden in diesem Modell die Auswertungen über neuronale Netze mit dem Hidden Markov Model (HMM) kombiniert [NIELSEN UND KROGH, 1998]. Die neu berechneten Daten zeigen zwar nur leicht geänderte Bilder für den Y-Score (Daten nicht aufgeführt), im HMM-Plot ist die größte Wahrscheinlichkeit für die Signalpeptidspaltstelle aber eindeutig den Positionen zwischen den Aminosäuren -1 und +1 zugeordnet. Wie die HMM-Plots aller Signalpeptide zeigen, befindet sich die weitaus größte Wahrscheinlichkeit für eine Spaltstelle an den literaturbekannten Positionen. Bei AxeA stimmen die zusätzlich angegebenen Spaltstellen geringerer Wahrscheinlichkeit (zusätzliche rote Markierung der „cleavage probability“) mit den Daten der Massenspektroskopie überein. Für CelB und SnpA ergeben sich gegensätzliche Aussagen. CelB führt zu einer nach den Massendaten vollständig korrekten Prozessierung, die über die Hidden Markov Modell berechnete Wahrscheinlichkeit für die Spaltstelle liegt aber nur bei 0,950. Bei SnpA dagegen liegt der berechnete Wert bei 0,998, gefunden wird aber trotzdem falsch prozessiertes Tendamat. Die Berechnungen über SignalP können daher die massenspektroskopischen Daten nicht erklären.

Die Berechnungen der Hirudin-Signalpeptid-Konstrukte über das Programm SignalP V1.1 zeigen ein ganz ähnliches Bild wie für die Tendamistat-Konstrukte. Im Anhang sind die graphischen Auswertungen mit der Kennzeichnung der wahrscheinlichsten Spaltstellen (höchster Y-Score) gezeigt. Bis auf AxeA werden für alle Signalpeptide eindeutige Spaltstellen direkt vor dem N-Terminus von Hirudin angegeben, was auf eine wahrscheinlich korrekte Prozessierung hindeutet. Nur für das AxeA-Signalpeptid ist die größte Wahrscheinlichkeit der Spaltstelle zwischen Position -5 und -6 im Signalpeptid angegeben, ausgewiesen durch den höchsten Y-Score und auch den höchsten C-Score. Beide Werte sind an der Position der eigentlich korrekten Spaltstelle etwas kleiner, daher weist das Programm die Position -5 als N-Terminus des reifen Proteins aus. Wird aber der S-Score betrachtet, also der Wert, der die wahrscheinliche Zugehörigkeit der jeweiligen Aminosäure zum Signalpeptid angibt, so findet sich hier ein Argument, dass die tatsächliche Spaltstelle doch an der natürlich vorhandenen Position vorliegt. Ein Absinken der blauen Linie des S-Scores für AxeA erfolgt noch nicht bei der Position der berechneten Schnittstelle sondern erst an der Position +1 im N-Terminus von Hirudin.

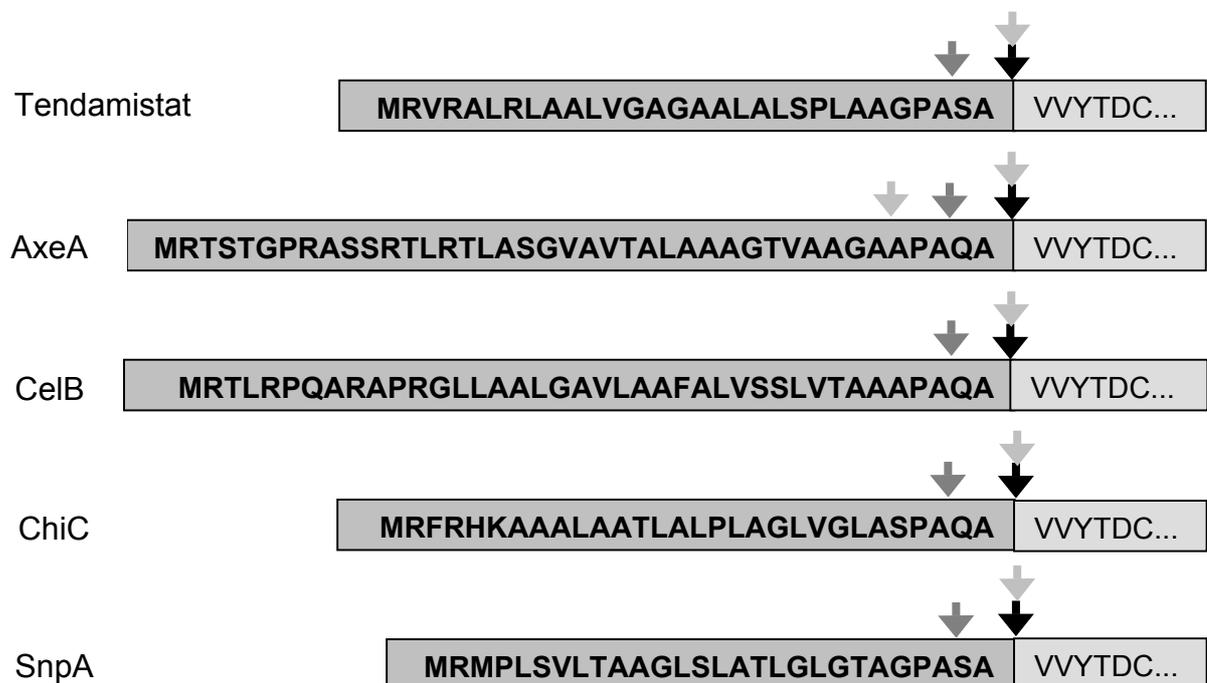


Abb. VI-22 Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide. ■ Signalpeptid; □ anhängendes **Hirudin**.
 ↓ natürliche Spaltstelle; ↓ zusätzliche Spaltstelle, berechnet anhand der massenspektroskopischen Daten; ↓ über SignalP vorausgesagte Spaltstelle.

In den Massenspektren aller Signalpeptid-Konstrukte können neben den Hauptpeaks des korrekt prozessierten Hirudins auch weitere Peaks mit höherer Masse identifiziert werden. Sie enthalten ein um jeweils 2 Aminosäuren verlängertes Hirudin. Diese Beobachtungen stimmen nicht mit den Berechnungen anhand des Programms SignalP überein.

5.2.2 Sekundärstrukturberechnungen

Die h-Domäne kann wichtig für die Prozessierung sein, da sie für die Insertion in die Membran und die Präsentation der Schnittstelle zwischen Signalpeptid und reifem Protein verantwortlich ist. Eine strukturelle Untersuchung der h-Domänen erfolgte durch das von E. Sonnhammer und A. Krogh entwickelte Programm **TMHMM**. Es charakterisiert Transmembran-Helices in Proteinen [SONNHAMMER ET AL., 1998; KROGH ET AL., 2001]. In einem unabhängigen Vergleich verschiedener Programme für die Vorhersage von Transmembran (TM)- Helices wurde TMHMM als bestes hervorgehoben [Moller et al., 2001]. Wie das zuvor beschriebene Programm SignalP basiert auch TMHMM auf einem Hidden Markov Model. TM-Helices sind wesentlich leichter vorherzusagen als Helices in globulären Domänen, da sie über einen ungewöhnlich langen Bereich mit hydrophoben Resten verfügen. Zusätzlich dazu besitzen die Loops in cytoplasmatischen Proteinanteilen vielfach positiv geladene Aminosäuren, folgend der „positiv-innen-Regel“ nach VON HEIJNE (1986). Auch für Signalpeptide gelten die Voraussetzungen eines im Cytoplasma vorliegenden, positiv geladenen N-Terminus und einer hydrophoben Kernregion, die in die Membran insertiert. Folglich unterscheidet das Programm in der Vorhersage nicht zwischen N-terminalen Helices in Membranproteinen und Signalpeptiden; mögliche Signalsequenzen am N-Terminus von Proteinen werden hierbei extra ausgewiesen.

Eine Analyse der Aminosäuresequenzen der fünf Signalpeptide inklusive des N-Terminus von Tendamistat ergibt folgendes Bild (grafische Auswertung siehe Anhang, Strukturauswertungen):

Tendamistat	MRVR <u>ALRLAALVGAGAALALSPLAAGPASA</u>	DTTVSE...
AxeA	MRTSTGPRASSRTLRT <u>LASGVAVTALAAAGTVAAGAAPAQA</u>	DTTVSE...
CelB	MRTLRPQARAPR <u>GLLAALGAVLAAFALVSSLVTAAAPAQA</u>	DTTVSE...
ChiC	MRFRHK <u>AAALAATLALPLAGLVGLASPAQA</u>	DTTVSE...
SnpA	MRMP <u>LSVLTAAGLSLATLGLGTAGPASA</u>	DTTVSE...

Abb. VI-23 Vergleich der hydrophoben Bereiche der Signalpeptide bei anhängendem *Tendamistat*. In weiß: transmembranaler Bereich, berechnet über TMHMM; = h-Domäne.

Alle Sequenzen werden als Signalpeptide ausgewiesen, wobei die Orientierung richtig mit einem cytoplasmatischen N-Terminus angegeben wird. Unabhängig von der Sequenz der Signalpeptide wird für das Tendami-stat-, AxeA-, CelB- und ChiC-SP eine TM-Region von 23 Aminosäuren berechnet, für das SnpA-SP wird ein Transmembran-Bereich von 22 Aminosäuren angegeben. Trotz der sehr variablen Länge von *Streptomyces*-Signalpeptiden ist es denkbar, dass nicht immer der gesamte hydrophobe Bereich vollständig in die Membran insertiert. Um den N-Terminus des reifen Proteins den Signalpeptidasen an der äußeren Seite der Membran zu präsentieren, muß mit der insertierenden Sequenz des Signalpeptids mindestens die Distanz der Zellmembran überbrückt werden. Da die Membran von einer ca. 23 Aminosäuren langen Sequenz durchspannt wird, ist das Ergebnis der TMHMM-Berechnungen schlüssig. Unklar ist dabei, warum die angegebene AS-Sequenz nicht mit dem Teilbereich der h-Domäne deckungsgleich ist. Im Falle des Tendami-stat-Signalpeptids ist der hydrophobe Kernbereich mit 19 AS zu kurz, um die Distanz der Membran zu überbrücken. In den TM-Bereich werden zusätzlich das Prolin der Position -4 und drei AS der n-Domäne, darunter auch ein geladener Argininrest, mit einbezogen. Beim ChiC-Signalpeptid mit einer h-Domäne von 20 AS wird dagegen der positive Lysinrest der n-Domäne nicht mit in den TM-Bereich einbezogen, dagegen aber drei AS der c-Domäne. Die Lage des TM-Bereichs in den Signalpeptiden

scheint variabel zu sein. Wenn möglich (d.h. wenn der hydrophobe Kernbereich lang genug ist), wird der TM-Bereich des Signalpeptids zu den positiv geladenen Resten der n-Domäne hin klar abgegrenzt. Ein Einbeziehen von Teilen der c-Domäne scheint dagegen eher möglich zu sein. Eine Korrelation zwischen korrekter Prozessierung und Positionierung des TM-Bereichs innerhalb der Signalpeptide liegt nicht vor. Die Signalpeptide, die auf der äußeren Seite der Membran eine längere Sequenz bis zur Schnittstelle präsentieren (Tendamistat-SP: 3 AS; CelB-SP: 5 AS) resultieren zwar in einer korrekten Prozessierung, aber auch das ChiC-SP mit nur einer Aminosäure außerhalb der Membran führt zu vollständig richtig prozessiertem, reifem Protein. Die theoretischen Betrachtungen des TM-Bereichs der Signalpeptide innerhalb der Tendamisitat-Konstrukte führen daher zu keiner Theorie über die Einflüsse des hydrophoben Bereichs auf die Prozessierung.

Eine entsprechende Auswertung der Hirudin-Signalpeptid-Konstrukte über TMHMM führt zu einem überraschenden Ergebnis. Zwar werden die TM-Bereiche der einzelnen Konstrukte auch einheitlich mit einer Länge von 23 Aminosäuren angegeben (24 Aminosäuren bei AxeA), die Positionierung dieser Bereiche ist aber im Vergleich mit den Tendamisitat-Konstrukten nur innerhalb des CelB- und ChiC-Signalpeptids identisch. In den Tendamisitat-, AxeA- und SnpA-Signalpeptid-Konstrukten ist der TM-Bereich verschoben und reicht bis in den Hirudin-N-Terminus hinein.

Tendamistat	MRVRALRLAALVGAGAALALSPLAAGPASA	VVYTDC...
AxeA	MRTSTGPRASSRTLRTLASGVAVTALAAAGTVAAGAAPAQA	VVYTDC...
CelB	MRTLRPQARAPRGLLAALGAVLAALFVSSLVTAAPAQA	VVYTDC...
ChiC	MRFRHKAAALAATLALPLAGLVGLASPAQA	VVYTDC...
SnpA	MRMPLSVLTAAGLSLATLGLGTAGPASA	VVYTDC...

Abb. VI-24 Vergleich der hydrophoben Bereiche der Signalpeptide bei anhängendem **Hirudin**. In weiß: transmembranaler Bereich, berechnet über TMHMM; = h-Domäne.

Offensichtlich ist dafür der ungeladene N-Terminus verantwortlich. Im Tendamistat steht mit Aspartat eine positiv geladene Aminosäure am Beginn des N-Terminus, der dadurch klar von der ungeladenen c-Domäne des Signalpeptids und ebenso vom hydrophoben Transmembranbereich getrennt wird. Die meisten der Streptomyceten-eigenen Proteine beinhalten in den ersten beiden Positionen ihres N-Terminus ebenfalls geladene Aminosäuren oder Aminosäuren mit kleinen, neutralen Seitenketten (s. Tab. VI-1). Hydrophobe Seitenketten in den Positionen 1 und 2 sind sehr selten. Hirudin dagegen enthält in den ersten drei Positionen des N-Terminus Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten. Die hier berechneten TM-Bereiche reichen vom Signalpeptid über die Grenze zum anhängenden Protein hinaus. Im Fall des Tendamistat-SP-Konstrukt wird so eine positive Ladung im Transmembranbereich vermieden. Aus den hier aufgeführten Betrachtungen kann geschlossen werden, dass der generell höhere Anteil an falsch prozessiertem Hirudin auf den im Sinne der Prozessierung ungünstigen N-Terminus zurückzuführen ist.

Eine weitere Möglichkeit, Sekundärstrukturen der Signalpeptide in die Diskussion zur Prozessierung einzubeziehen, stellt das von F. Eisenhaber entwickelte Programm **SSCP** (Secondary Structural Content Prediction) dar. Es sagt den prozentualen Gehalt von α -Helix-, β -Faltblatt- und Coil-Strukturen einer gegebenen Aminosäure-Sequenz voraus [EISENHABER ET AL., 1996a, b]. Dabei wird die Aminosäure-zusammensetzung eines Peptids auf zwei verschiedene Arten berücksichtigt. Im ersten Ansatz wird die Aminosäuresequenz eines gegebenen Peptids mit den AS-Zusammensetzungen der drei Sekundärstrukturen innerhalb von Tertiärstrukturen verglichen. Die so berechneten Gewichtskoeffizienten der einzelnen Aminosäuren ergeben die Vorhersage der Sekundärstruktur-Anteile. Der zweite Ansatz ist etwas allgemeiner als der erste, berücksichtigt aber zusätzlich die Häufigkeit einzelner Aminosäuren innerhalb der voraussichtlichen Sekundärstrukturen. In jeder der beiden Berechnungen wird zwischen zwei Methoden unterschieden. Die erste Methode bezieht sich nur auf die durchschnittliche AS-Zusammensetzung innerhalb von Sekundärstrukturen, die zweite Methode bezieht auch Schwankungen in der AS-Komposition mit ein. Die Autoren betonen, dass trotz des relativ einfachen Ansatzes die Genauigkeit der Vorhersage vergleichbar zu anderen Programmen ist.

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tabelle VI-8 zusammengefaßt:

	Sequence						Composition					
	Method 1			Method 2			Method 1			Method 2		
	α -H	β -Fb	Coil									
wt	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
AxeA	85,6	-	14,4	70	-	30	84,9	-	15,1	70	-	32,9
CelB	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
ChiC	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-
SnpA	63,9	-	36,1	17,4	49,8	32,8	63,9	-	36,1	17,4	49,8	32,8

Tab. VI-8 Aufstellung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden des SSCP für die Signalpeptide. Angegeben sind die prozentualen Anteile von α -Helix- (α -H), β -Faltblatt- (β -Fb) und Coil-Strukturen an der Sekundärstruktur.

Sowohl für das Wildtyp-Signalpeptid, als auch für die Strukturen der CelB- und ChiC-Signalpeptide wird ein α -Helix-Gehalt von 100% berechnet. Für das AxeA- und SnpA-Signalpeptid wird neben einem hohen α -helikalen auch der Gehalt einer Coil-Region angegeben. Diese Daten stimmen nicht ganz mit dem Bild von Signalpeptiden überein, welches für den C-Terminus nach einem helixbrechenden Element wie Glycin oder Prolin eine β -Faltblattstruktur ausweist. Die Angabe eines α -Helix-Anteils von 100% ist daher etwas fragwürdig.

Jedoch ist eine eindeutige Übereinstimmung zwischen den berechneten Daten des Programms SSCP und den gefundenen Massendaten der verschieden prozessierten Tendamistate vorhanden. Die Signalpeptide, die zu einem nicht vollständig korrekt prozessierten Protein führten (AxeA, SnpA), weisen in der hier gezeigten Auswertung der Sekundärstrukturen einen Coil-Anteil auf. Daher läßt die Strukturauswertung den Schluss zu, dass die Sekundärstruktur der Signalpeptide die Prozessierung des reifen Proteins beeinflusst.

Für die Prozessierung von Hirudin wird eine ähnliche Übereinstimmung nicht gefunden.

VII Zusammenfassung

Bei der *in vitro* Rückfaltung von entfaltetem, reduziertem Hirudin entstehen neben dem nativen Protein hauptsächlich zwei nicht-nativ gefaltete Konformere. Das Verhältnis von nativem und nicht-nativem Konformer lässt sich während der Rückfaltung durch verschiedene Parameter beeinflussen.

Thiole wie reduziertes Glutathion (GSH), N-Acetylcystein (NAC) und Dithioerythritol (DTE) beeinflussten die in dieser Arbeit untersuchten Rückfaltungen auf verschiedene Weise. Während beim Zusatz von GSH sehr verstärkt die Bildung des nativen Konformers auftrat, wurde bei einem Zusatz von NAC und DTE einerseits ein leicht verbessertes Verhältnis von nativem zu nicht-nativem Konformer festgestellt, andererseits wurde aber eine stark vermehrte Oligomerbildung beobachtet. Die aufgestellte Theorie der Oligomerbildung konnte anhand graphischer Auswertung der zusätzlich auftretenden, im Nativgel höher laufenden Banden bestätigt werden. Bei Zusatz von GSH und GSSG (oxid. Glutathion) als Redoxpuffer im Molekülverhältnis 2:1 (10 mM) wurde bei 4°C eine vollständige Rückfaltung zum nativen Hirudin erreicht. Der Zusatz von 1 mM GSH bewirkte dagegen bei 28°C (höchste gewählte Temperatur) ebenfalls eine vollständige Rückfaltung zum nativen Hirudin-Konformer. Die Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung zeigte sich auch in weiteren Untersuchungen. So ergaben die Rückfaltungen unter Zusatz von 1 mM DTE, NAC und 10 mM GSH bei 4°C eine wesentlich höhere Ausbeute an nativ gefaltetem Hirudin als bei höheren Temperaturen.

Der pH-Wert im Bereich von 4,0 bis 8,0 veränderte das Rückfaltungsmuster von Hirudin in den durchgeführten Untersuchungen nicht, obwohl Literaturdaten auf ein pH-Optimum von 8-9 für erfolgreiche Rückfaltungen hindeuten.

Nativ und nicht-nativ gefaltetes Hirudin sowie die ebenfalls während der Rückfaltung entstandenen Oligomere ließen sich HPLC-chromatographisch trennen. Die in den Nativgelen auftretende, sehr übereinanderliegende Doppelbande des nicht-nativen Hirudins konnte per HPLC in zwei verschiedenen Konformere getrennt werden.

Eine positive Beeinflussung der *in vitro*-Rückfaltung von Hirudin durch einen Zusatz der Oxidoreduktase Thioredoxin konnte eindeutig nachgewiesen werden. Bei einem äquivalenten Gehalt an Thioredoxin wurde die Rückfaltung zum nativen Konformer eindeutig begünstigt. Ein katalytischer Gehalt an Thioredoxin (Thioredoxin:Hirudin im Verhältnis 1:10) bewirkte die Rückfaltung ausschließlich zu nativem Hirudin. Auch bei einem Zwanzigstel Äquivalent Thioredoxin war noch eine positive Beeinflussung feststellbar.

Bei einer *S. lividans*-Expression von Hirudin über ein pAX5a-Derivat wurde fast ausschließlich nicht-nativ gefaltetes Hirudin produziert. Die nicht-native Faltung war in einem Nativgel deutlich von der nativen, aktiven Form des Inhibitors zu unterscheiden. Durch Zusätze von reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) zum Wachstumsmedium konnte der Anteil an nativem Hirudin erhöht werden. Die Zusätze beeinflussten aber stark die Gesamtausbeute des sekretierten Proteins. So wurden unter Zugabe von 1 mM GSH Ausbeuten von 200 mg/L Hirudin erreicht, davon 2 mg/L natives Protein. Die Gegenwart von verschiedenen Verhältnissen von GSH und GSSG (Gesamtkonzentration 1mM Thiol) reduzierte die Hirudinproduktion auf 20 – 32 mg/L, darunter war kein erkennbarer Anteil an nativem Hirudin. Ein Zusatz von gleichen Verhältnissen von GSH und GSSG in höherer Konzentration (10 mM) resultierte in einer Steigerung des Anteils an nativem Inhibitor auf 14 %, die Gesamtausbeute an Hirudin sinkt aber deutlich (15 mg/L insgesamt, 2 mg/L natives Protein).

Die Oxidoreduktase Thioredoxin wurde ebenfalls über ein pAX5a-Derivat in *S. lividans*-Kultivierungen mit einer Ausbeute von 65 mg/L gewonnen. Eine Co-expression von Thioredoxin und Hirudin über ein bicistronisches Gen in einem pAX5a-Derivat resultierte in einer Proteinproduktion von 4 mg/L Thioredoxin und 20 mg/L Hirudin. Obwohl ein Verhältnis von 0,2:1 Moläquivalenten (Thioredoxin:Hirudin) in den *in vitro*-Rückfaltungen zu 100 % nativ gefaltetem Inhibitor führte, war in den Kultivierungen kein positiver Einfluß des Thioredoxins auf die Hirudinfaltung erkennbar. Die Expression von Thioredoxin setzte zeitlich sehr viel früher als die Hirudin-Expression.

Die Produktion von Hirudin über einen integrativen Vektor erzielte 600 - 700 mg/L Protein. Wie in anderen Hirudinkultivierungen ohne Thiolzusatz wurde Hirudin ausschließlich in der inaktiven, nicht-nativen Struktur produziert. Kultivierungen der mit dem integrativen Thioredoxin-Vektor infizierten *S. lividans*-Zellen erzielten dagegen kein Protein. Die Coexpression von Hirudin und Thioredoxin scheiterte an dem nicht zu generierenden, bicistronischen integrativen Vektor.

Um die Isomeraseaktivität des Thioredoxins zu erhöhen und somit eine größere Beeinflussung der Hirudinfaltung zu erzielen, wurden Thioredoxinmutanten hergestellt. Die redoxaktiven CXXC-Zentren der generierten Thioredoxine enthalten die Aminosäuresequenzen der CXXC-Motive von *E. coli* DsbA und DsbC und humanem PDI. Die Expression aller Mutanten gelang in zwei verschiedenen Medien. Eine Isolierung und Anwendung der gereinigten Mutanten in der Hirudinfaltung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt. Die Konstrukte stehen für weitere Arbeiten zur Verfügung.

In vergleichenden Expressionen mit fünf verschiedenen Signalsequenzen wurden sowohl das homologe *Streptomyces*-Protein Tendamistat als auch das heterologe Hirudin über jeweils alle Signalpeptide exprimiert.

Tendamistat wurde schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. Innerhalb der verschiedenen Kultivierungen wurden unterschiedlich hohe Expressionswerte erreicht. Eine ausgeprägte Anreicherung von Vorläufer-Proteinen in der Zelle fand nicht statt. Neben dem vorwiegend nativ prozessierten Tendamiastat zeigte eine Analyse der Massendaten eine teilweise falsche Prozessierung der AxeA-, CelB- und SnpA-Signalpeptide.

Hirudin konnte ebenfalls über alle fünf Signalpeptide exprimiert werden. Dabei wurde fast quantitativ nicht-nativ gefaltetes Hirudin sekretiert. Die Höhe der Expression über die verschiedenen Signalpeptiden war unterschiedlich hoch, wobei die Unterschiede geringer als bei der Tendamistat-Expression waren. Die Massanalytik belegte, dass die Prozessierung des heterologen Hirudins wesentlich uneinheitlicher erfolgte als die Prozessierung des homologen Tendamistats.

Ein Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe beider Proteine und verschiedenen Strukturmerkmale der Signalpeptide konnte nicht festgestellt werden. So wurde die in der Literatur aufgestellte These, dass in der n-Domäne mindestens zwei Ladungen enthalten sein müssen, in dieser Arbeit nicht bestätigt. Weder die Struktur noch die unterschiedliche Ladung der n-Domäne der Signalpeptide zeigten einen eindeutigen Zusammenhang mit der Expressionshöhe der Proteine. Auch eine Verknüpfung zwischen der Länge der h-Domäne und der Expressionshöhe konnte weder für die Tendamistat- noch für die Hirudinexpression erstellt werden. Die Positionierung von Glutamin an Position -2 innerhalb der c-Domäne schien in der Tendamistatexpression bezüglich der Proteinausbeute von Vorteil zu sein. Bei der Expression von Hirudin wurde ein ähnlicher Trend nicht gefunden. Die Proteinproduktion über ein Signalpeptid mit enthaltenem TTA^{Leu}-Codon war entgegen Literaturaussagen möglich und verminderte - wie in der Hirudinexpression gezeigt - nicht automatisch die Expressionshöhe. Bei den Tendamistatkultivierungen wurde dieser Einfluss jedoch deutlich. Theoretische Betrachtungen zur Prozessierung anhand von Rechenmodellen waren hilfreich, um Beobachtungen zu erklären oder zu deuten. So wurde eine Erklärung der zusätzlichen falschen Prozessierung der Signalpeptide vom homologen und auch vom heterologen Protein über theoretische Modelle wie z. B. eine Schnittstellenberechnung teilweise möglich. Die Überlegungen zum Transmembran-Bereich der Signalpeptide zeigen im Vergleich der Berechnungen für Tendamisitat und Hirudin, dass die Ladung des N-Terminus des anhängenden Proteins eine Rolle bei der Positionierung des Signalpeptids innerhalb der Membran spielt und somit auch für die Präsentation der Schnittstelle und eine erfolgreiche Prozessierung verantwortlich ist.

Die bisher verfügbaren Literaturdaten lassen darauf schließen, dass es allgemeine Richtlinien in Bezug auf Aminosäurezusammensetzung, sowie Ladung und Länge der Signalpeptide gibt, deren Mißachtung eine Verringerung der Expressionshöhe von Proteinen bewirken. Diese Richtlinien scheinen aber hauptsächlich bei einzeln eingefügten Mutationen zu bestehen. Werden, wie in dieser Arbeit vorgestellt, ganze Signalpeptide ausgetauscht und die resultierende Expression beobachtet, können viele dieser Vorgaben nicht verifiziert werden oder stimmen nur in Einzelfällen überein. Trotzdem zeigt diese Arbeit, dass theoretische Betrachtungen für Vorhersagen zur Proteinexpression unabdingbar sind.

VIII Material und Methoden

1 Geräte

Aufgeführt werden nur die Geräte, die einen Einfluß auf die durchgeführten Experimente oder Methoden haben können.

Analysenwaage	Mettler, H20T Sartorius, BP 221 S
Autoklaven	Fedegari H + P Labortechnik, Varioklav, Steam Sterilizer
Brutschränke	Heraeus Christ, B 5090 E und B 1500
CE	Beckmann, P/ACE System 2100
DNA-Synthesizer	PerSeptive Biosystems, Expedite [™]
ELISA-Reader	Flow. Titertek Multiskan Plus MKII
Fluoreszenzspektrometer	Hitachi, F-4500
Gelelektrophorese, horiz.	BRL-Nachbau, Elektrodenabstand 34 cm, Gelkammern 15 cm breit und bis zu 30 cm lang
Gelelektrophorese, vertikal	BRL-Nachbau, passend für Gießkassetten von 20 x 20 cm Mini-Gelapparatur: Hoefer, Mighty Small II, SE260B
Geltrockner	Biotec-Fischer, PH-t60
HPLC	Merck Hitachi, L 4250, L 6220, D 6000
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Incubator/Shaker G25 New Brunswick Scientific, innova 4000
pH-Meter	Knick, Calimatic 761 Schott, CG 840
PCR	Hybaid, PCR Sprint Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler
Photometer	Hitachi, U-1100
Pipetten	Gilson, einstellbare, automatische Pipetten Abimed, Multipette mit variablen Volumina Eppendorf, einstellbare, automatische Pipetten Eppendorf, Multipette mit eingeschr. var. Volumina
Roller	New Brunswick Scientific, Typ TC7
Speed Vac Concentrator	Bachofer Laboratoriumsgeräte; Savant, Typ SC 110
Sterilbank	Heraeus, HA 2472 GS
Ultraschallbad	Merck Eurolab, USR 30 H
Ultraschall-Finger	Bandelin, Sonoplus GM70, UW70
UV-Durchleuchtungstisch	Spectroline Transilluminator TR-302 Herolab, UVP
Wasseraufreinigung	Millipore, Milli-Q

2 Reinheit und Bezugsquellen der eingesetzten Chemikalien und Enzyme

Die Reinheit der Chemikalien ist p. a., sofern nicht anders angegeben.

Aceton	Riedel de Haën
Acetonitril	Roth
N-Acetylcystein	Sigma
Acrylamid	Roth
Agar (Bacto-)	Difco
Agarose NA	Pharmacia
Ammoniumacetat	Acros
Ammoniumsulfat	Fluka
Ampicillin Trihydrat	Fluka
Apramycinsulfat	Sigma
APS	Roth
Beef Extract	Difco
BIS	Roth
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau, Na-Salz	Merck
BSA, Fraktion V, pH 7,0, stand. grade	Serva
Calciumchlorid-hexahydrat	Merck
Casaminoacids	Difco
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Sigma
CNP-G3 (chromogenes Substrat)	WAK-Chemie
Chromozym TH	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-25	Serva
Dextrin	Merck
Diphenyljodoniumchlorid	Fluka
DMSO	Merck
DTE	Sigma
EDTA (di-Na-Salz)	Serva
EDTA (tetra-Na-Salz)	Serva
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Merck
Eisensulfat-heptahydrat	Merck
Eisessig	Riedel de Haën
Ethanol, absolut	Roth
Ethidiumbromid, für biochem. Zwecke	Merck
Formalin	Merck
Glukose-monohydrat, für biochem. Zwecke	Roth
Glutathion, reduziert	Sigma
Glutathion, oxidiert	Fluka
Glycerin, >98 %	Merck
Glycin	Degussa
Guanidinium-Hydrochlorid, purum	Fluka
Harnstoff	Fluka
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol, 99,5 %	Roth
Jod	Fluka

Kaliumacetat	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka
Kaliumjodid	Merck
Kaliumpermanganat	Riedel de Haën
Kaliumsulfat	Merck
Kupfer(II)-chlorid-dihydrat	Fluka
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Fluka
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Fluka
Maleinsäure	Merck
Malt Extract Broth	Difco
Mangan(II)-chlorid	Merck
Mannitol	Roth
β -Mercaptoethanol	Merck
MES	Sigma
Methanol	Roth
Methylenblau	Fluka
Mineralöl	Sigma
Nalidixinsäure	Sigma
Natriumacetat	Fluka
di-Natriumtetraborat-decahydrat	Fluka
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel de Haën
Pankreatin	Merck
PEG 1000, pract.	Serva
PEG 6000, pract.	Serva
Pepton (Bacto-)	Difco
PMSF, >99,0 %	Fluka
Diphenyljodoniumchlorid, purum	Fluka
L-Prolin, 99 %	Sigma
D(+)-Saccharose, >99,5 %	Roth
Salzsäure, konz.	Riedel de Haën
SDS, 99 %	Fluka
Silbernitrat, rein	Degussa
Soytone (Bacto-)	Difco
Stärke, löslich	Roth
TCA	Fluka
TEMED	Sigma
TES	Sigma
TFA	Riedel de Haën
Thiostrepton	Fluka
Na-Toluolsulfinat	Merck
Tris	Serva
Tricine	Serva
Triton X-100	Roth
Tryptic Soy broth	Difco
Trypton (Bacto-)	Difco

Tween80	Merck-Schuchardt
Xylencyanol FF	Merck
Yeast Extract	Gibco
Zink(II)-chlorid	Fluka
Ampli-Taq-Polymerase	Perkin Elmer
α -Amylase	Fluka
DNAse	Boehringer Mannheim
Hirudin (Standard für Gele, Faltungen)	HMR
Hirudin (Standard für Inhibitortest)	Pentapharm (Vertrieb: Loxo GmbH)
Kinase	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Lysozym	Serva
Pancreatin	Merck
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNAse A	Boehringer Mannheim
Thioredoxin	Promega
Thrombin	Merck
Vent-Polymerase	New England Biolabs
Spezialpuffer für Enzyme	siehe Enzymlieferant
BSA-Lösung für Restriktionsansätze	New England Biolabs
<i>DNA-Marker</i>	
100bp-Marker und 1kb-Marker,	New England Biolabs
λ -DNA mit <i>Bst</i> EII verdaut	New England Biolabs
<i>Peptidmarker</i>	
Molecular Weight Marker (2,5 – 16,9 kDa)	Pharmacia Biotech

3 Bakterienstämme und Vektoren

<i>E. coli</i>	DH5 α	F ⁻ , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lacU</i>)169, (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15); HANAHAN (1983)
<i>E. coli</i>	ET12567	eingesetzt bei konjugativem Transfer <i>E. coli</i> \rightarrow <i>S. lividans</i> ; <i>dam-13::Tn9</i> ; <i>dcm-6</i> , <i>hsdM</i> ; FLETT ET AL. (1997)
<i>S. lividans</i>	TK24	

<i>E. coli</i>	pT136	Basis für alle Klonierungsvektoren, siehe Anhang
<i>E. coli</i> / <i>S. lividans</i>	pAX5a	Shuttlevektor, Basis für alle Expressionsvektoren, siehe Anhang;
<i>E. coli</i> / <i>S. lividans</i>	pIJ8600	integrativer Vektor, siehe Anhang; SUN ET AL. (1999)

4 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte am DNA-Synthesizer. Nach der Synthese wird die DNA durch dreistündiges Behandeln mit 30 µL konz. Ammoniak bei 65°C vom CPG-Träger abgespalten. Da bei der Synthese im letzten Zyklus die Tritylschutzgruppe nicht abgespalten wird, kann das Oligonukleotid über eine RP-Säule in der HPLC leicht von den Abbruchsequenzen isoliert werden. Die Tritylschutzgruppe wird durch Zugabe von 250 µL 80 %iger Essigsäure abgespalten und die DNA durch Zugabe von 1 mL n-Butanol gefällt.

Nachfolgend aufgeführt sind die Sequenzen der Linker, die zu den synthetisch hergestellten Signalsequenzen führten, ebenso die PCR-Primer zum reinen Amplifizieren und für site directed Mutagenese, ebenso spezielle Sequenzierprimer.

Name Oligo	bp	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
KGTdA1	53	CGGCCTCCGCCGACACGACCGTGTCCGAGCCCGCACCTCCTGC GTGACGCTC	Linker zum Einfügen der <i>PflF</i> 1- Schnittstelle im Tendamistat
KGTdA2	50	CACGCAGGAGGGTGCGGGCTCGGACACGGTCGTGTCGGCGGAG GCCGGCC	
KGTdB1	48	TACCAGAGCTGGCGGTACTCACAGGCCGACAACGGCTGTGCCGA GACG	
KGTdB2	59	GTCACCGTCTCGGCACAGCCGTTGTCCGGCCTGTGAGTACCGCCA GCTCTGGTAGAGCGT	
AxeA A1	69	CTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCCATGCGTACCAGT ACCGGACCACGCGCTCCTCGCGC	Signalpeptid der
AxeA A2	73	CGCAGGGTGC GCGAGGACGCGCGTGGTCCGTTACTGGTACGCAT GGCGGTTACCTTCTGAGAGACAGTCAA	Acetylxylylan
AxeA B1	75	ACCCTGCGCACCTGGCTTCCGGCGTCGCCGTCACCGCGCTCGC CGCCGCGGGCACGGTGGCGGCCGGCGCCGCG	Esterase aus
AxeA B2	71	CCGGCGCGGCCCGGCCACCGTGC CGCGCGGGCGGCGAGCG CGGTGACGGCGACGCCGAAGCCAGGGT	<i>S. lividans</i>
celB A1	73	CTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCCATGCGAACGTTA CGGCCCCAGGCCCGCGCCCCGCGGGCC	Signalpeptid
celB A2	77	CGCCAAGAGGCCGCGCGGGGCGCGGGCCTGGGGCCGTAACGTT CGCATGGCGGTTACCTTCTGAGAGACAGTCAA	der β-1,4-Endo- glucanase
celB B1	68	TCTTGGCGGCCCTGGGCGCGGTCTTAGCGGCCTTCGCCCTCGTG TCGTCCCTGGTGACAGCCGCCGCG	
celB B2	64	CCGGCGCGGGCGGCTGTACCAGGGACGACAGAGGGCGAAGGC CGCTAAGACCGCGCCAGGGC	
chiC A1	54	CTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCCATGCGCTTGAGA CACAAAGCC	Signalpeptid
chiC A2	58	AGTGCCGCGGCTTTGTGTCTGAAGCGCATGGCGGTTACCTTCT GAGAGACAGTCAA	der Chitinase C aus
chiC B1	57	GCGGCACTCGCAGCGACCCTGGCGCTTCCCCTCGCCGGTCTGGT CGGCCTCGCGTCC	
chiC B2	53	CCGGCGACGCGAGGCCGACCAGACCGGCGAGGGGAAGCGCCAG GGTCGCTGCG	

Name Oligo	bp	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
C5 Prot A1	48	CTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCCATGCG CATGCCCTG	Signalpeptid der
C5 Prot A2	52	AGAACGGACAGGGGCATGCGCATGGCGTTACACCTCC TGAGAGACAGTCAA	SnpA-
C5 Prot B1	57	TCCGTTCTCACCGCCGCGGACTGAGCCTGGCGACCCT CGGTCTCGGCACCGCCGGG	Proteinase aus
C5 Prot B2	53	CCGGACCGGCGGTGCCGAGACCGAGGGTCGCCAGGCT CAGTCCGGCGGCGGTG	<i>S. sp.</i> C5
Linker T1	21	CCGGCCAGGCGGACACGACC	AS-Austausch in Pos.
Linker T2	18	CGGTCGTGTCCGCTGGG	-2 bei CelB/ChiC
L-AxeA-1	32	CCGGCGCCGCGCCGCGCCAGGCCGACACGACC	AS-Austausch in Pos.
L-AxeA-2	29	CGGTCGTGTGCGCCTGGGCCGCGCGGCG	-2 bei AxeA
ThPCR1A	31	GCCGGGCCGGCCTCCGCCGTGGCCGGCACC	PCR-Primer Trx aus
ThPCR1B	36	ATTCGAGCTCGGTCATCAGTCGGCGATGAAGTCCTC	Cosmid Sch24
ThPCR2A	28	GAATCGATATCTCTCAGGAAGGTGAACC	PCR-Primer Trx plus
ThPCR2B	26	TGTTGATATCGGTCATCAGTAGGAG	SS aus pThKG1
Int-uni-5'- <i>NdeI</i>	24	GAAGGTGAACCCATATGCGCGTAC	PCR-Primer Trx,
Int-uni-5'- <i>NdeI</i> -neu	37	GGGAATTCCATATGCGCGTACGGGCACTTCGACTTGC	Trx/Hirudin,
Int-Hir-3'- <i>XbaI</i>	33	ATTCTCTAGATCATCACTGCAGGTATTCCTCGG	Hirudin in
Int-Trx-3'- <i>XbaI</i>	32	TCGATCTAGATCATCAGTCGGGCATGAAGTCC	pIJ8600
uni-5'- <i>SpeI</i>	21	GACTTCAACTAGTTGACTGTC	PCR-Primer
SnpA-3'- <i>BsrGI</i>	32	CAGTCGGTGTACACGACCGCCGAGGCCGGCCC	Signalsequenzen
ChiC-3'- <i>BsrGI</i>	33	CAGTCGGTGTACACGACCGCCTGGGCCGCGAC	vor Hirudin in
AxeA-3'- <i>BsrGI</i>	32	CAGTCGGTGTACACGACCGCCTGGGCCGCGC	pSWHIV1
CelB-3'- <i>BsrGI</i>	32	CAGTCGGTGTACACGACCGCCTGGGCCGCGC	
CGHC-a	25	TGCGGCCACTGCCGCCAGATCGCGC	PCR-Primer
CGHC-b	26	GGCGGCAGTGCCCGCACCAGGCGGCC	Trx-CGHC-Mutante
CGYC-a	25	TGCGGCTACTGCCGCCAGATCGCGC	PCR-Primer
CGYC-b	26	GGCGGCAGTAGCCCGCACCAGGCGGCC	Trx-CGYC-Mutante
CPHC-a	25	TGCCCGCACTGCCGCCAGATCGCGC	PCR-Primer
CPHC-b	29	GGCGGCAGTGCGGGCACCAGGCGGCCAG	Trx-CPHC-Mutante
<i>SpeI</i> -uni	18	ACTTCAACTCGTTGACTG	Univ. PCR-Primer
<i>EcoRI</i> -uni	24	AGCTATGACATGATTACGAATGCT	für Trx-Mutanten
ThSeqH24	20	AAGGCGGAGCCCCGAGAAGAC	Sequenzier-Primer Cosmid Sch24
Hirrev	19	GTTCCCCTGCCCGCAGACG	Univ. Sequ.-Primer N- Terminus Hirudin

Tab. VIII-1 Aufstellung der synthetisierten Oligonukleotide.

5 Flüssig- und Festmedien

Ampicillin-Stammlösung (25 mg/mL)

1 g Ampicillin in 35 mL A. dest. aufnehmen. Tropfenweise 1N NaOH zufügen, bis das Ampicillin gerade gelöst ist. Auf 40 mL auffüllen. Die sterilfiltrierte Stammlösung in 4 mL Aliquots bei -20°C aufbewahren. Für Fest- und Flüssigmedien (100 $\mu\text{g/mL}$) 4 mL Stammlösung pro Liter Medium.

Thiostrepton-Stammlösung (50 mg/mL)

In DMSO lösen und bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahren. Für Flüssigmedien werden 12,5 $\mu\text{g/mL}$ zugesetzt, bei Festmedien 50 $\mu\text{g/mL}$.

Cloramphenicol-Stammlösung (25 mg/mL)

In Ethanol lösen und sterilfiltrieren, bei -20°C lagern. Die Endkonzentration variiert.

Kanamycin- Stammlösung (10 mg/mL)

In A. dest. lösen und sterilfiltrieren, bei -20°C lagern. Die Endkonzentration variiert.

Apramycin-Stammlösung (100 mg/mL)

In A. dest. lösen und sterilfiltrieren, für Fest- und Flüssigmedien 100 $\mu\text{g/ml}$ einsetzen.

Nalidixic acid/Apramycin

1 mg Nalidixinsäure und 1,5 mg Apramycin pro ml A. dest., tropfenweise mit NaOH bis zur Klärung der Lösung zugeben. Sterilfiltrieren und bei -20°C lagern. Die Endkonzentration variiert

Spurenelemente-Lösung

20 mg ZnCl_2 , 100 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5 mg MnCl_2 , 5 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$ und 5 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ werden auf 500 mL aufgefüllt und autoklaviert oder sterilfiltriert. 2 mL der Spurenelemente-Lösung werden für einen Ansatz des R2Yeast-Mediums benötigt.

LB-Medium

10 g Bactotrypton

10 g Bacto Yeast Extract

5 g NaCl in 800 mL aufnehmen.

20 Tropfen 5N NaOH zufügen und auf 1L auffüllen.

Für Festmedien 15g Bactoagar zusetzen. Nach dem Autoklavieren ggf. die auf 60°C temperierten Lösungen mit 4 mL Ampicillin-Stammlösung versetzen.

MS-Platten (enthalten 10 mM MgCl_2)

20 g Mannitol, 20 g Soya bean meal/flour (Tryptic Soy broth), 2,033 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 16 g Agar in 1L A. dest. lösen und autoklavieren. Kein Antibiotikum!

NL 701-Festmedium für den α -Amylase-Inhibitor-Plattentest (HOPWOOD ET AL., 1985)

22 g Bacto Agar

15 g Dextrin

5 g Tryptic Soy Broth

3 g Saccharose

2g Yeast Extract

1 g Beef Extract

0,5 g NaCl

0,5 g K_2HPO_4 0,5 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 10 mg $FeSO_4 \times 7 H_2O$ auf 1 L mit A. dem. auffüllen und autoklavieren.

Ggf. mit 1 mL Thiostrepton-Stammlösung supplementieren.

R2Yeast-Plattenmedium (nach HOPWOOD ET AL., 1985)

Lösung A: 103 g Saccharose

10 g Glukose

10,12 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 0,25 g K_2SO_4

0,1 g Casaminoacids in 800 mL A. dem. lösen (Endvolumen > 800 mL!)

Lösung B: 800 mL von Lösung A mit 22 g Bactoagar versetzen und autoklavieren.

Lösung C: Die sterile Lösung B wird auf 60°C temperiert und mit folgenden sterilen Lösungen ergänzt:

100 mL 5,73 % (w/v) TES-Puffer, pH 7,2

80 mL 3,68 % (w/v) $CaCl_2$

50 mL 10 % (w/v) Yeast Extract

15 mL 20 % (w/v) L-Prolin

10 mL 0,5 % (w/v) KH_2PO_4

5 mL 1 N NaOH

2 mL Spurenelemente-Lösung.

TES-Puffer: 45,84 g TES in 600 mL A. dem. lösen und mit 5 N NaOH auf pH 7,2 einstellen. Auf 800 mL auffüllen und in 100 mL-Aliquots autoklavieren.

Die Lösungen von $CaCl_2$, L-Prolin und Yeast Extract werden angesetzt und in den entsprechenden Aliquots autoklaviert. Alle übrigen Lösungen werden autoklaviert, steril zu den entsprechenden Aliquots abgefüllt und bei +4°C gelagert.

YEME-Flüssigmedium (nach HOPWOOD ET AL., 1985)

340 g Saccharose

10 g Glukose x H₂O

5 g Bacto Trypton

3 g Yeast Extract

3 g Malt Extract Broth werden in 998 mL A. dem. gelöst und autoklaviert. 2 mL 2,5 M MgCl₂ (steril) zufügen.

YEME-Flüssigmedium mit 0,5 % Glycin (w/v)

Wie oben, aber in 973 mL A. dem. lösen und autoklavieren. 2 mL 2,5 M MgCl₂ (steril) und 25 mL 20 % (w/v) Glycin (steril) zufügen.

MM-Flüssigmedium zu Expression (nach HOPWOOD ET AL., 1985, modifiziert)

Das Medium wird aus einzeln autoklavierten Grundlösungen zusammengegeben.

249 mL A. dem.

250 mL 20 % (w/v) Glukose x H₂O

200 mL 10 % (w/v) Casaminoacids

50 mL 300 mM Phosphatpuffer, pH 6,9 (29,12 g K₂HPO₄ und 18,36 g NaH₂PO₄ x H₂O in 1 L A. dem. lösen) *ad 100 mL*

30 mL 100 mM MgSO₄ *ad 100 mL*

10 mL 20 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ *ad 100 mL*

1 mL Spurenelemente-Lösung

Mit Thiostrepton supplementieren!

TS-Medium (modifiziert nach BINNIE ET AL., 1997)

17 g Bacto Tryptone, 3 g Bacto Soytone und 2,5 g K₂HPO₄ in 1 L A. dest. lösen. Der pH-Wert liegt bei 7,2 – 7,5.

S-Medium

Lösung I: 4 g Bacto Pepton, 4 g Yeast Extract, 4 g K₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 10 g Glycin in 800 ml A. dest. lösen.

Lösung II: 10 g Glukose und 0,5 g MgSO₄ in 200 ml A. dest. lösen.

Beide Lösungen getrennt autoklavieren und dann vereinigen.

6 Mikro- und Molekularbiologische Arbeiten

6.1 Arbeiten mit *E. coli*

6.1.1 Anzucht

E. coli werden generell in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Platten bei 37°C angezogen.

6.1.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung werden 750 µL einer ÜNRK mit 250 µL 80%igem Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt. Diese Zellen können mehrmals zum Animpfen von neuen ÜNRK verwendet werden. Stammhaltungsplatten wurden nicht angelegt.

6.1.3 Über-Nacht-Rollerkultur (ÜNRK)

Ein Reagenzglas wird mit 1,8 ml LB-Medium (mit Ampicillin) befüllt. Mit einem Klon der Transformationsplatte oder kompetenten DH5α-Zellen wird das Medium beimpft und bei 37° C im Rollinkubator über Nacht angezogen.

6.1.4 Präparation von kompetenten Zellen nach der CaCl₂-Methode (nach MANDEL UND HIGA, 1970, modifiziert)

In einem 1 L-Schüttelkolben werden 200 mL LB-Medium ohne Antibiotikum mit 2 mL einer frischen ÜNRK eines *E. coli*-Stammes (DH5α) beimpft. Die Kulturen werden bei 37°C und 250 rpm im Inkubationsschüttler bis zu einer OD_{600 nm} von 0,3 - 0,4 angezogen. Das Wachstum wird dann sofort durch Eiskühlung unterbrochen, die Kultur in einen GSA-Becher überführt und die Zellen bei 4°C, 2500 rpm (1000x g) in 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, die Zellen auf Eis mit 10 mL eiskalter CaCl₂-Lösung (70 mM) durch Invertieren mit einer 5 mL-Pipette resuspendiert. Die Suspension wird mit der CaCl₂-Lösung auf 100 mL aufgefüllt und die Zellen wie zuvor abzentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in insgesamt 100 mL eiskalter CaCl₂-Lösung stehen die Zellen für 45 min im Kühlraum auf Eis. Nach erneutem abzentrifugieren werden die Zellen vorsichtig in 10 mL CaCl₂-Glycerin-Lösung (70 mM CaCl₂; 146 g Glycerin/L) aufgenommen. Im Kühlraum wird

die Zellsuspension zu 200 µL-Aliquots in Eppendorfcaps abgefüllt und in einem Bad aus flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wird eine Transformation mit 1 µg eines geschlossenen Plasmids nach dem allgemeinen Protokoll durchgeführt. Direkt vor dem Ausplattieren werden 10^{-1} - 10^{-4} -Verdünnungen mit LB-Medium angesetzt und die 10^{-2} - 10^{-4} -Verdünnungen ausgestrichen.

6.1.5 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen (nach MANDEL UND HIGA, 1970, modifiziert)

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und auf 50 µl aliquotiert. Es folgt die Zugabe von max. 5 µl Plasmid-DNA oder Ligationsansatz. Nach kurzem Durchmischen bleiben die Zellen 20 min bei 0°C. Um einen Hitzeschock zu erzeugen, werden die Transformationsansätze je 5x für 30 sec bei 37°C und 0°C gehalten, danach noch einmal für 15 min auf Eis. Anschließend werden 150 µl 37°C warmes LB-Medium (ohne Antibiotikum!), zur Zellwandregenerierung und Ausbildung der Ampicillin-Resistenz, hinzugesetzt. Nach ½ h bei 37°C wird der Transformationsansatz auf einer LB-Platte mit Resistenzgift ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

6.1.6 DNA-Minipräparation (schnelle alkalische Lyse)

Die ÜNRK werden in ein Eppendorff-Cap eingefüllt und 2 min bei 10.000 rpm, RT zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt (erst ausgießen, dann absaugen) und das Pellet in 200 µl GTE-Lösung gut resuspendiert. Es werden 300 µl NaOH/SDS (0,2 M/1 %) zugesetzt und leicht geschüttelt (nicht vortexen!). Nach Zugabe von 300 µl KOAc (3M) wird erneut leicht geschüttelt und zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, RT). Soll ein RNA-Verdau erfolgen (optional, kann auch während des Restriktionsverdaus ablaufen), wird RNase zu einem Endvolumen von 20 µg/ml zugefügt. Es schließt sich eine Chloroformextraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) mit 400 µl an; die wässrige Phase wird in ein neues Cap gefüllt. Anschließend folgt eine Fällung der DNA mit dem gleichen Volumen Isopropanol und eine Zentrifugation für 10 min bei RT. Das Zellpellet wird mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 13.000 rpm, RT). Das Pellet wird vollständig von Ethanol befreit, an der Luft getrocknet und in 50 µl A. dest. aufgenommen und tiefgefroren.

GTE-LÖSUNG

50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0. 2,5 mL 1 M Tris, pH 8,0, 0,99 g Glukose x 1 H₂O und 2 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0 in 1 L A. dem. lösen und autoklavieren.

KOAC- LÖSUNG (3M)

73,61 g KOAc werden in einem Endvolumen von 250 mL A. dem. gelöst. Die pH-Einstellung erfolgt durch Zugabe von Eisessig. Die Lösung wird autoklaviert.

6.1.7 DNA-Minipräparation zur Gewinnung von Cosmid-DNA (nach HOLMES UND QUIGLEY, 1981)

Die 41 kb große Cosmid-DNA ließ sich über die Methode der schnellen alkalischen Lyse nicht isolieren. Vermutlich wurde sie während des Ausfällens der genomischen DNA mitgefällt. Daher wurde auf eine Methode zurückgegriffen, bei der die Gesamt-DNA isoliert wird. Die Zellpellets einer ÜNRK werden mit 350 µL STET-Lösung versetzt und resuspendiert. Nach Zugabe einer frisch hergestellten Lysozym-Lösung (10 mg/L in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) und kurzem Vortexen werden die Zellen im kochenden Wasserbad innerhalb von 40 sec lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und RT wird der Überstand mit 40 µL 2,5 M NaOAc, pH 5,2 und 420 µL Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Durchmischen und 5 minütiger Inkubation bei RT wird die DNA in 5 min bei 4°C und 13.000 rpm pelletiert. Nach dem Entfernen des Überstands schließt sich ein Waschschrift mit 70 % igem Ethanol an. Die DNA sollte von allen Ethanolrückständen befreit sein, bevor sie in A. dest. aufgenommen, mit RNase (20 µg/mL) versetzt und bei -20°C gelagert wird.

STET-LÖSUNG

Die STET-Lösung besteht aus 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0 und 5 % Triton X-100.

6.1.8 DNA-Minipräparation mit NucleoSpin Plus Kit (Macherey und Nagel)

Dieses Verfahren beinhaltet eine alkalische Lyse. Die Trennung der einzelnen Fraktionen erfolgt über Zentrifugationsschritte mit in Caps eingesetzten Membranen. Diese Methode zeigte bei einer hohen Probenzahl erheblich kürzere Isolationszeiten, darüber hinaus gelang eine höhere Ausbeute der Plasmid-DNA und mit einer größeren Reinheit. Ein RNA-Verdau ist ebenfalls enthalten.

6.2 Arbeiten mit *Streptomyces lividans*

6.2.1 Stammhaltung

Eine längerfristige Stammhaltung von Streptomyceten erfolgt über back ups einer Sporensuspension. Dies wurde hier für den Stamm TK24 und für die Tendamistat-Konstrukte durchgeführt. Eine kurzfristige Stammhaltung erfolgt über Transformationsplatten, die bis zu einer beginnenden Sporulation bei 28°C bebrütet und dann für ca. 4 Wochen bei +4°C aufbewahrt werden.

6.2.2 Herstellung einer Sporensuspension von *S. lividans*

Sporen für Protoplastenkulturen

Aus einer vorhandenen Sporensuspension werden mit einer Impföse 4 R2YE-Platten beimpft und für mindestens 14 Tage bei 28°C bebrütet.

Sporen für Expressionskulturen

Protoplasten werdennach Anleitung mit den jeweiligen Plasmiden transformiert, mit T-Puffer gemischt und auf mind. 3 R2YE-Platten pro Plasmid verteilt. Nach 7-10 Tagen bei 28°C sollten die Sporen geerntet werden.

Sporenernte

Zur Sporenernte wird auf jede Platte 10 mL sterile 0,9 % ige (w/v) NaCl/0,1 % ige (v/v) Tween80-Lsg gegeben, die Platte mit Parafilm verschlossen und die Sporen im Ultraschallbad abgeschwemmt. Die Sporensuspension wird abpipettiert und von allen Platten mit gleichem Plasmid / ohne Plasmid in ein SS 34-Röhrchen überführt. Die Sporen werden bei 5000 rpm, bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren wird das Pellet resuspendiert und mit 2 mL 20 % iger (w/v) Glycerin-Lsg aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

Zur Bestimmung des Sporentiters wird eine Verdünnungsreihe in steriler 0,9 % iger NaCl (w/v) angesetzt und die 10⁻⁵ bis 10⁻⁸ Verdünnungen auf NL 701-Platten ausplattiert. Es sollte sich für je vier beimpfte Platten ein Sporentiter von 10⁹-10¹⁰ ergeben.

6.2.3 Herstellung von Protoplasten (nach HOPWOOD ET AL., 1985 und HOFFMANN, 1992)

6 YEME-Kulturen (jeweils 25 mL) werden in 300 mL-Erlenmeyerkolben mit Drahtspirale mit je 5x10⁸ Sporen aus einer Sporensuspension angeimpft. Dafür wird ein

entsprechender Anteil der Sporensuspension zunächst zentrifugiert und in YEME-Medium aufgenommen. Die Kulturen schütteln bei 26°C und 300 rpm für 42-46 Stunden. Jeweils zwei Kulturen werden nach 42, 44 und 46 h vereinigt und wie folgt behandelt.

Je zwei Kulturen in einen sterilen GSA-Becher überführen, mit 30 mL steriler 10,3 % iger (w/v) Saccharose-Lösung auffüllen, zentrifugieren (10 min, 4°C, 2700 rpm). Nach dem Dekantieren wird das Pellet resuspendiert, in 30 mL steriler Saccharose-Lsg aufgenommen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschschritt wird noch einmal wiederholt. Das Pellet wird in der verbleibenden Lösung resuspendiert und mit 8 mL Lysozym-Lsg (1 mg Lysozym/mL P-Puffer) versetzt. Dieser Ansatz wird im GSA-Becher belassen und bei 28°C und 100 rpm für insgesamt 75 min inkubiert. Nach jeweils 20 min wird die gesamte Suspension mit einer 5 mL Pipette vorsichtig invertiert, um das Ausschwemmen der Protoplasten aus den Mycelklumpen zu erleichtern. Nach 75 min werden 16 mL eiskalter P-Puffer zugegeben und erneut invertiert. Nach Abzentrifugieren bei 2100 rpm für 10 min und Dekantieren wird das Pellet sofort in 4 mL eiskaltem P-Puffer resuspendiert und die so erhaltene Protoplasten-Suspension zu 200 µL-Aliquots abgefüllt. Die Proben werden in einer Schale mit Eis gemischt und mit der ganzen Schale über Nacht auf -80°C tiefgefroren (das langsame Abkühlen ist für die Transformationskompetenz essentiell). Am nächsten Tag werden die Caps aus dem Eis in eine Schachtel überführt und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Transformationskompetenz wird 1 µg eines geschlossenen Streptomycceten-Plasmids einer Transformation unterzogen, der Ansatz ausplattiert und die Kolonien der 10⁻¹, 10⁻² und 10⁻³ Verdünnungen und gezählt. Es sollten 10⁵ - 10⁶ Kolonien pro Transformation entstehen.

P-PUFFER

100 mL P-Puffer werden aus folgenden sterilen Lösungen zusammengesetzt: 85,8 mL A. dest., in dem 10 g Saccharose gelöst wurden, 1 mL 140 mM K₂SO₄, 1 mL 1 M MgCl₂, 1 mL 40 mM KH₂PO₄, 1 mL 250 mM CaCl₂, 0,2 mL Spurenelementelösung, 10 mL 250 mM TES-Puffer, pH 7,2 (s. R2YE-Platten).

6.2.4 Transformation von *S. lividans*

200 µL Protoplasten werden schnell aufgetaut und in 50 µL-Aliquots geteilt. Die Jeweils 50 µL werden auf Eis mit 1 bis 3 µL Plasmid-DNA versetzt, kurz durchmischt

und dann mit 200 μ L eiskaltem T-Puffer versetzt. Nach vorsichtigem Invertieren wird der Ansatz sofort auf R2YE-Platten ohne Antibiotikum verteilt. Dabei wird nur vorsichtig die Flüssigkeit mit einer Impföse verteilt, jede mechanische Beanspruchung der Zellen sollte vermieden werden. Darüber hinaus sollten die Platte mindestens eine Stunde bei 37°C vorgetrocknet worden sein, damit der Ansatz schnell in den Agar einzieht und der T-Puffer so nicht zu einer Zellyse führen kann. Die Transformationsplatten werden bei 28°C über Nacht inkubiert und dann mit Thiostrepton überschichtet. Dafür werden 20 μ L Stammlösung in 2 mL sterilem A. dest. suspendiert und auf der Platte verteilt. Die nachfolgende Inkubation erstreckt sich je nach Verwendungszweck über 4 bis 10 Tage.

T-PUFFER

Lösung A: 25 mL 10,3 % ige /w/v) Saccharose-Lösung, 0,2 mL Spurenelemente-Lösung, 1 mL 2,5 % ige (w/v) K_2SO_4 und 75 mL A. dest.. Lösung B: 9,3 mL Lsg A, 0,2 mL 5 M $CaCl_2$ und 0,5 mL Tris-Maleat-Puffer (1 M Tris mit Maleinsäure auf pH 8,0 eingestellt). 3 mL Lsg B und 1 g PEG 1000 ergeben den kompletten T-Puffer. Er wird nach Sterilfiltration in 4 mL-Aliquots bei $-20^\circ C$ gelagert.

6.2.5 Animpfen von Kulturen

Die Flüssigkultivierungen von *S. lividans* wurden in 300 mL-Erlenmeyer-Schüttelkolben durchgeführt. In den Kolben liegen je nach Verwendungszweck 50 mL (vergleichende Kulturen sowohl bei Hirudin-, als auch bei Tendamistat) bis 100 mL (Vorkulturen bei Hirudinexpression) eines Mediums vor. Die Kolben sind mit Drahtspiralen bestückt, um Zellen von den Transformationsplatten zu lösen, bzw. die großen Mycelklumpen zu zerschlagen. Als Medium werden Minimalmedium verschiedener pH-Werte (Tendamistat- und Hirudin-Expression), TS-Medium (Hirudin-Expression) und YEME-Medium (Herst. von Protoplasten) eingesetzt. Die Expressionskulturen werden mit 12,5 μ g Thiostrepton pro mL Kultur supplementiert.

Mit Transformationsplatten

Alle Hirudinvorkulturen wurden auf diese Art inokuliert. Aus den Transformationsplatten werden mit einer sterilen Impföse ca. 2 cm² große Stücke ausgestanzt und in einen Schüttelkolben mit Medium überführt.

Aus Vorkulturen

Bei den Kulturen, mit denen nachfolgend die vergleichende Hirudinanalytik betrieben wurde, wurden die jeweils gleichen Volumina an Vorkultur zum frischen Medium der

Hauptkulturen gegeben. Das Volumen schwankte bei verschiedenen Experimenten zwischen 0,5 und 5 mL.

Mit Sporensuspension

Die vergleichenden Tendamiostatkulturen wurden mit jeweils 5×10^6 Sporen pro mL Medium inokuliert. Dafür wird das entsprechende Volumen an Sporensuspension in ein Cap überführt und die Sporen abzentrifugiert. Nach Resuspendieren in 0,9 % iger NaCl wird die Suspension in das Medium im Schüttelkolben überführt.

6.2.6 Trockengewichtsbestimmung

Um das Zellwachstum in den Vergleichskulturen zu dokumentieren, wird ab dem zweiten Kulturtag jeweils 1 mL Überstand in ein vorgewogenes Cap überführt. Dafür werden abgeschnittene Spitzen benutzt, da das teilweise recht voluminöse Mycel sonst die Spitze verstopft. Die Zellen werden zunächst bei 4°C und 1.000 rpm innerhalb von 10 min pelletiert und nach dem Entfernen des Überstands mit 0,8 mL PBS-Puffer resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 13.000 rpm wird der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet für mindestens 4 h in der SpeedVac unter Hitze getrocknet. Die abgekühlten Caps werden ausgewogen, der Mittelwert aus je drei Kulturen ergibt den Messwert.

PBS-PUFFER

150 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 , 1,9 mM KH_2PO_4 . 8,76 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,25 g KH_2PO_4 werden in 1 L A. dem. gelöst und autoklaviert.

6.2.7 Zellaufschluß

Analog zur Trockengewichtsbestimmung werden jeden Tag Proben gezogen und die Zellen pelletiert. Für den Zellaufschluß werden die Zellpellets allerdings dreimal dem Waschschrift mit PBS-Puffer unterzogen. Nach dem letzten Waschen wird der Überstand vollständig entfernt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Unmittelbar vor dem Zellaufschluß wird das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in 200 μL PBS-Puffer resuspendiert. Der Aufschluß erfolgt mittels eines Ultraschallfingers innerhalb von 1,5 min. Das Cap wird dabei mit Eiswasser gekühlt. Die Zelltrümmer werden bei 4°C und 13.000 rpm in 5 min pelletiert. Der Überstand ist klar und viskos, aus ihm werden Aliquots für die Bradford-Proteinbestimmung und den Inhibitortest

entnommen, die übrige Lösung wird in flüssigem N₂ schockgefroren und bei –80°C gelagert.

6.3 Arbeiten mit *Streptomyces lividans* und *E. coli*

6.3.1 Konjugativer Transfer von Plasmid-DNA von *E. coli* auf *S. lividans*

(verändert nach FLETT ET AL., 1997)

Vorbereitung des Donors

E. coli ET12567 (pUZ8002) als kompetente Zellen werden nach dem allgemeinen Transformationsprotokoll mit 1-2 µl Plasmidlösung versetzt und auf LB-Platten mit Apramycin ausplattiert. Von diesen Platten werden ÜNRK angeimpft. Die Roller-kulturen bestehen aus LB-Medium mit 25 µg/ml Chloramphenicol, 30 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Apramycin. Um frische Zellen zu erhalten, werden die Roller-kulturen 1:25 mit frischem Medium verdünnt und wachsen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3–0,4 (=1x10⁸ lebensfähige Zellen/ml). Nach Zentrifugation werden die Zellen mit S-Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und 5 x 10⁷-1 x 10⁸ Zellen in 0,5 ml S-Medium resuspendiert.

Vorbereitung des Akzeptors

10⁶-10⁸ lebensfähige *S. lividans* Sporen werden in 1 ml S-Medium aufgenommen, gewaschen und nach dem Abzentrifugieren (6000 rpm, 5-10 min) in 0,5 ml S-Medium aufgenommen. Durch Inkubation bei 50°C für 10 min wird die Keimung aktiviert.

Konjugation

Ca. 10⁸ Donor-Zellen (in 0,5 ml) werden zu den 0,5 ml aktivierter Sporensuspension gegeben. Das Gemisch wird auf MS-Platten ausgestrichen und bei 28°C für 16-22 Stunden inkubiert.

Selektion

Auswaschen der *E. coli*-Zellen mit Wasser und durch leichtes Abschrubben mit einem Drigalsky-Spatel. Nach kurzem Trocknen wird die Platte dann mit 1 ml einer wässrigen Lösung aus 0,5-1 mg Nalidixinsäure und 1-2 mg Apramycin überschichtet. Die Platte sollte noch 3-5 Tage inkubiert werden.

6.4 Arbeiten mit DNA allgemein

6.4.1 Konzentrationsbestimmung DNA

OD₆₀₀

Konzentrationen von synthetisch hergestellten, kurzen Oligonukleotiden mit bekannter Sequenz können am schnellsten photometrisch bestimmt werden. Gemessen wird die optische Dichte einer Oligonukleotidlösung bei 600 nm (OD_{600}), die über die bekannten Extinktionskoeffizienten der Basen in nmol umgerechnet werden kann. Die Formel hierfür lautet:

$$1 \text{ nmol} = \frac{100}{a \times A + g \times G + c \times C + t \times T} \times 0,895 \times OD_{600}$$

Hierbei sind a, g, c und t die Anzahl der Basen, die Großbuchstaben kennzeichnen die Extinktionskoeffizienten der Basen ($A=1,54$, $G=1,17$, $C=0,73$, $T=0,88$), der Faktor 0,895 korrigiert das Basenstacking.

Darüberhinaus wurden verschiedene Computerprogramme zur Berechnung eingesetzt.

Konzentrationsbestimmung über Agarosegele

Um Konzentrationen von größeren DNA-Fragmenten, z. B. Vektorfragmenten, zu bestimmen, werden bestimmte Volumina von DNA-Lösungen auf ein Agarosegel aufgetragen. Eine bekannte Menge an *Bst*EII-geschnittener λ -DNA läuft als Vergleich im Gel mit. Unter UV-Licht kann die Helligkeit der verschiedenen Banden verglichen werden und über die bekannten Fragmentgrößen der λ -DNA die Konzentrationen bestimmt werden. Die Helligkeit der Banden ist dabei proportional zu der Länge und der Konzentration der Fragmente.

6.4.2 Restriktion von Plasmid-DNA

Bei der Berechnung der benötigten Enzyme wurde die Faustformel verwendet, dass 1 U Restriktionsenzym in 1 h 1 μ g DNA schneiden. Bei Restriktionsansätzen über Nacht wurde 1/6 der berechneten Menge eingesetzt. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass pro Ansatz das Volumen des zugefügten Enzyms 1/10 nicht überschreitet, da sonst der Glycerinanteil der Enzym-Stammlösung ein effektives Arbeiten des Enzyms verhindert. Als Puffer wurden die Standardpuffer von New

England Biolabs eingesetzt. Ist ein RNA-Verdau nicht in der Minipräparation enthalten, kann zu Beginn der Restriktion auch RNAse zugesetzt werden.

Für Testverdaue von Plasmid-DNA aus Minipräparationen werden je 2 bis 5 μL Plasmidlösung eingesetzt, das Endvolumen beträgt dann 20 μL . Bei präparativen Verdauen sind die Volumina entsprechend größer. Die Analytik der Restriktionsansätze erfolgt in Agarosegelen (siehe dort).

6.4.3 Kinasieren/Hybridisieren

Kinasiert wurden die synthetisierten DNA-Linker, die die neuen Signalsequenzen aufbauen sollten. Vor der Kinasierung werden die Konzentrationen der Oligonukleotide bestimmt und dann die später zu hybridisierenden Linkerpaare zu je 100 pM in einem Cap vereinigt. In einem Gesamtansatz von 20 μL sind Kinasepuffer, 1 μL Kinase und 2 μL ATP (10 mM) enthalten. Die Reaktion findet statt bei 37°C (1h).

Die nachfolgende Hybridisierung des Linkerpaares erfolgt durch einminütiges Aufkochen im Wasserbad und langsames Abkühlen im Wasserbad über Nacht.

6.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Standard-Ligationsansätze von 20 μL enthalten die zu ligierenden Oligonukleotide und Vektorfragmente in molaren Verhältnissen von 2:1 bis 20:1. Maximal 1 μL T4-Ligase und Ligase-Puffer komplettieren den Ansatz. Die Ligation erfolgt bei 16°C über Nacht oder innerhalb von 1h bei RT.

6.4.5 Agarosegel-Elektrophorese

Für unterschiedlich große Fragmente werden unterschiedliche Mengen an Agarose eingesetzt:

Agarose (w/v)	0,3 %	0,5 %	0,8 %	1,0 %	1,2 %	1,5 %	2,0 %
Größe der DNA (kb)	1-70	0,7-45	0,4-20	0,3-10	0,2-8	0,2-6	0,1-5

Für das Gel wird die entsprechende Menge an Agarose eingewogen, mit 1 x TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Versetzen mit Ethidiumbromid (5 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ TBE) wird die Lösung in den Gelträger gegossen, der dann sofort mit einem Probenkamm versehen wird.

Für eine Standardanalytik von Restriktionsverdauen werden je 20 µL Ansatz mit 5 µL 5 x Ladungspuffer versetzt und in die Taschen eingefüllt. Kleinere Volumina (5 µL), z. B. für DNA-Leitern, sind möglich, ebenso größere für die quantitative Isolierung von präparativen Restriktionsansätzen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt bei 200 V innerhalb von 0,5 bis 1,5 h. Die Detektion erfolgt im UV-Licht, dabei wird die Größe der Fragmente über ebenfalls aufgetragene DNA-Marker abgeschätzt. Das Bandenmuster wird entweder zur Dokumentation fotografiert oder die gewünschten Banden zur DNA-Isolation ausgeschnitten.

6.4.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen / Elektroelution (verändert nach MANIATIS ET AL., 1989)

Der präparative Verdau der betreffenden Plasmid-DNA wird auf ein 1-1,2 % iges Agarosegel aufgetragen und bei 160 - 200 V aufgetrennt. Das Gelstück mit der gewünschten Fragmentbande wird unter UV-Licht (302 nm oder 366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Schneiden sollte möglichst schnell erfolgen, das UV-Licht dann wieder ausgeschaltet werden, um Mutationen zu vermeiden. Die Dokumentation über die ausgeschnittenen Fragmente erfolgt mit dem Restgel, da auch die Zeitdauer des Fotografierens Mutationen bewirken kann. Die Gelstücke werden zunächst in 4 mL Greiner Caps überführt. Nach dem Vorbereiten der Dialyseschläuche (Verschließen der einen Seite mit einer Dialyseklammer) werden die Gelstücke in den Schlauch transferiert und 500 µL 1x TBE mit eingefüllt. Nach dem luftblasenfreien Verschließen des Schlauches mit einer zweiten Dialyseklammer wird er quer zum Stromfluss in die Dialysekammer gelegt. Bei vollständiger Bedeckung des Schlauches mit Puffer wird die DNA bei 200 V innerhalb von 30-50 min aus dem Gelstück isoliert. Nach erfolgter Elution wird der Schlauch für ca. 2 min um 180° gedreht, um die DNA von der Dialysemembran zu lösen. Eine vollständige Elution aus dem Gel kann unter UV-Licht kontrolliert werden. Der Schlauch wird an einer Seite geöffnet, das Gel vorsichtig herausgedrückt und der enthaltene Puffer in ein Eppendorfcap überführt. Um das Ethidiumbromid zu entfernen, wird einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die obere, wässrige Phase wird nach Zentrifugation bei 13000 rpm, 5 min in der Tischzentrifuge sofort abgezogen und in ein neues Cap überführt. Die Präzipitation der DNA erfolgt durch Zugabe von 2,5x Volumen abs. Ethanol und 1/10x Volumen 3M NaOAc, pH 5,2 innerhalb von 20 min bei -20°C. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm, 4°C für 15

min wird der Überstand vollständig entfernt und das Pellet mit 500 µL 70 % igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand wiederum vollständig entfernt und das Pellet in der SpeedVac lyophilisiert. Die DNA-Fragmente werden in A. dest. aufgenommen, quantifiziert und bei -20°C gelagert.

10X TBE-PUFFER

Für 1 L: 121,1 g Tris, 51,4 g Borsäure und 3,7 g Na₄EDTA werden in 1L A. dem. gelöst und autoklaviert.

LAUFPUFFER FÜR AGAROSEGELE

1L 1x TBE-Puffer wird mit 0,5 mg EtBr versetzt.

ETHIDIUMBROMID-STAMMLÖSUNG

1g EtBr wird in einem Endvolumen von 100 mL A. dem. gelöst und in einer dunklen Flasche aufbewahrt (10 mg/mL).

5X LADUNGSPUFFER FÜR AGAROSEGELE

Mit 5x TBE-Puffer wird eine Lösung mit 60 % (w/v) Saccharose und 100 mM Na₂EDTA angesetzt und autoklaviert. Danach werden 2,5 mg/mL Bromphenolblau und 2,5 mg/mL Xylencyanol FF zugegeben. Die Lösung wird in Caps aliquotiert und bei -20°C gelagert.

6.4.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mit NucleoSpin Extrakt Kit (Macherey und Nagel)

Die Isolation der DNA aus dem Gel erfolgt über ein Auflösen des Gels, Ausfällen der DNA, Abzentrifugieren der verschiedenen Inhaltsstoffe über Membranen. Im letzten Schritt wird die gesäuberte, ausgefällte DNA renaturiert und mit A. dest. von der Membran gespült. Diese Methode hat eine erheblich einfachere Handhabung, ist wesentlich schneller durchzuführen und resultierte in sehr sauberer DNA.

Mit leicht geänderten Protokoll kann dieses Kit auch zur Isolation und Säuberung der amplifizierten DNA aus PCR-Ansätzen eingesetzt werden.

6.4.8 PCR

Um DNA-Sequenzen zu amplifizieren, wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Dafür werden zunächst zu der zu amplifizierenden DNA passende Primer, dNTPs, Polymerase-Puffer und Formamid gegeben (Endvolumen 50 µL), die enthaltene DNA durch Aufkochen denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Erst jetzt wird die Polymerase zugegeben, wenn nötig mit Mineralöl überschichtet (beim DNA

Thermo Cycler, PE) und die automatische Reaktion gestartet. Beispiel-Zyklus für das PCR Sprint-Gerät (mit beheizbarem Deckel, wird bestückt mit sehr dünnwandigen 200 µL Caps): Denaturieren bei 98°C für 5 min, auf Eis abschrecken, 1 µL Polymerase zufügen, kurz Durchmischen. Innerhalb von 25 Zyklen wird die PCR nun gestartet durch das Annealing der Primer innerhalb von 30 sec, Verlängern der Primer innerhalb von 15 sec bei 72°C, Denaturieren bei 93°C 30 sec. Der letzte Zyklus endet mit einer erhöhten Verlängerungszeit.

Die Annealing-Temperatur variiert stark und richtet sich zunächst nach der Schmelztemperatur (T_M) der Primer. Meist wurde jedoch eine Annealing-Temperatur leicht über dem T_M -Wert der Primer gewählt, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken.

Die Analyse der PCR erfolgt über Agarose-Gelelektrophorese, ebenso die quantitative Gewinnung einzelner DNA-Banden.

6.4.9 Sequenzierungen

Neu generierte Plasmide werden zunächst über einen Kontroll-Restriktionsverdau überprüft und dann bei Seqlab, Göttingen, sequenziert. Es werden entweder Standardprimer oder selbst hergestellte verwendet. Die Sequenzierungen der meist GC-reichen Sequenzen resultierten immer in eindeutigen Ergebnissen, was durch die mitgelieferten Chromatogramme überprüfbar war.

7 Proteinanalytische Arbeiten

7.1 Ent- und Rückfaltungsexperimente mit Hirudin

Zum Entfalten werden 2 mg Hirudin (entspr. 3,6 mg Lyophilisat) in 2 mL 6 M GdnHCl, 0,5 M TRIS/HCl pH 8,5, 0,1 M DTE gelöst und über Nacht bei RT entfaltet. Der Entfaltungsansatz wird auf 2,5 mL mit A. dest. aufgefüllt und auf eine mit 25 mL A. dest. vorgespülte Säule gegeben. Nach dem Einsickern des Probenansatzes und Verwerfen des Eluats wird der Proteinanteil mit 3,5 mL A. dest. von der Säule eluiert. Aliquots von je 90 µL (enthalten ~50 µg Hirudin) werden entweder sofort schockgefroren oder mit Stammlösungen verschiedener Puffer versetzt. Die Rückfaltung wird bei verschiedenen Temperaturen über Nacht durchgeführt. Die

genauen Zusammensetzungen der Rückfaltungslösungen sind im experimentellen Teil angegeben. Die Analytik erfolgt über silbergefärbte Nativgele.

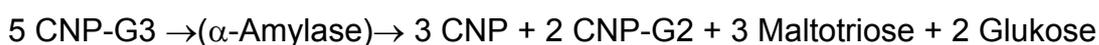
7.2 α -Amylase-Inhibitor-Plattentest (qualitativer Tendamistat-Nachweis)

Dieser Test beruht auf der Eigenschaft des Tendamistats α -Amylase zu inhibieren. Es werden je sechs *Streptomyces lividans*-Klone von einer Transformationsplatte auf je vier NL 701-Testplatten überimpft und diese 3 Tage bei 28° C inkubiert. Die Koloniegröße liegt dann bei 2-3 mm. Eine Pankreatinlösung wird aus 0,6 g Pankreatin und 20 ml Phosphatpuffers (10 mM K₂HPO₄, pH 7,3) durch 20 minütiges Rühren bei 0° C und anschließendem Zentrifugieren mit 10000 rpm, 4° C hergestellt (3 % an α -Amylase). Die Lösung wird auf 0,5 % und 2,0 % α -Amylase verdünnt, 1,5 ml auf den Parallelplatten verteilt und 30 min bei RT inkubiert. Danach werden 5 ml einer auf 50° C temperierten Stärke-Agarose-Lösung (1 %/0,8 %) gleichmäßig auf den Testplatten verteilt und 90 min bei 28° C inkubiert. Nun werden 2,5 ml einer KJ/J₂-Lösung (3 %/1,3 %) auf die Platte pipettiert. Ist sekretiertes Tendamistat vorhanden, bilden sich um die Kolonien blaue Hemmhöfe, die nicht abgebaute Stärke anzeigen. Zur Dokumentation werden die Hemmhöfe innerhalb von drei min abfotografiert.

7.3 Tendamistat-Aktivitätstest mit α -Amylase und chromogenem Substrat

Wirkungsweise des Tests

α -Amylase hydrolysiert das CNP-G3 in der Reagenzlösung, das freigesetzte CNP (2-Chloro-4-Nitrophenol) färbt die Lösung gelb. Die Absorption der Gelbfärbung wird bei 405 nm bestimmt. Ist Tendamistat im Ansatz enthalten, wird die α -Amylase gehemmt, die Spaltung des CNP-G3 kann nicht erfolgen. Tendamistat ist ein 100 %iger Inhibitor für die α -Amylase, sowohl die Affinität als auch die Geschwindigkeit der Inhibierung sind sehr groß.



CNP-G2 (2-Chloro-4-Nitrophenyl- α -maltosid)

Durchführung des Tests

Die Volumina der einzufüllenden Lösungen sind dem Schema zu entnehmen, der Test wird in 96er well Mikrotiterplatten durchgeführt. Zuerst werden die entsprechenden Volumina an DNSS-Puffer (Multipette) in den Kavitäten vorgelegt, dann werden

jeweils 10 μL an Probe oder Eichlösung durch Invertieren dazupipettiert. Nachfolgend werden spaltenweise je 50 μL α -Amylase-Lösung dazugegeben. Die Zugabe in den einzelnen Spalten erfolgt im Abstand von 30 sec. Nach 5-minütiger Präinkubation erfolgt die Zugabe von 50 μL Reagenz-Lsg analog im 30-sec-Abstand für jede Spalte. Endvolumen ist 210 μL . Nach einer Inkubationszeit von ca. 8 min sollte der Gesamt-Blindwert eine Extinktion von 1 erreicht haben. Dann wird die Messung gestartet. Im Abstand von 30 sec erfolgen so viele Messungen, wie Spalten auf der Mikrotiterplatte beladen sind.

Eichreihe mit Tendamistat

Es werden von einem Tendamistat-Standard (Gehalt der Lösung photometrisch bestimmt) 10 verschiedene Verdünnungen angesetzt. Der Gehalt dieser Eichstammlösungen beträgt: 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 und 90 ng/mL. Die Eichlösungen werden mit DNSS/BSA-Puffer angesetzt und bei -20°C gelagert. Für jeden Aktivitätstest muss täglich eine Eichreihe vermessen werden, da auch die α -Amylase-Lsg jeweils frisch angesetzt werden muss!

	<i>Puffer</i>	<i>Probe / Eich-Lsg</i>	<i>α-Amylase</i>	<i>Reagenz-Lsg</i>
<i>Gesamt-BW</i>	160 μL	-	-	50 μL
<i>0-Wert (Eichreihe)</i>	110 μL	-	50 μL	50 μL
<i>Eichreihe</i>	100 μL	10 μL	50 μL	50 μL
<i>Proben-BW</i>	150 μL	10 μL	-	50 μL
<i>Probe</i>	100 μL	10 μL	50 μL	50 μL

DNSS-PUFFER (20 MM PHOSPHATPUFFER, PH 6,9; 10 MM NaCl)

1,97 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 1,23 g KH_2PO_4 in 800 mL A. dem. lösen. 65 mL 0,9 % ige NaCl zugeben und den pH-Wert mit HCl auf 6,9 einstellen. Auf 1 L auffüllen, autoklavieren und in Aliquots bei -20°C einfrieren.

DNSS-PUFFER + 0,1 % BSA

Jeweils frisch ansetzen, hält sich einen Tag auf Eis. 100 mg BSA ad 100 mL Puffer.

α -AMYLASE (Endkonzentration bei Gebrauch: 0,25 U/mL)

Lösung jeweils frisch mit DNSS/BSA-Puffer ansetzen, hält sich einen Tag auf Eis.

Beispiel-Rechnung: Boehringer-Suspension: 22 mg/mL; 830 U/mg \rightarrow 18260 U/mL

1 μ L ad 1000 μ L \rightarrow 18,26 U/mL \rightarrow \rightarrow 1 U = 54,8 μ L

54,8 μ L ad 4000 μ L = 0,25 U/mL

Chromogenes Substrat (WAK-Chemie) (enthält NaN_3 !)

Die Reagenz-Lsg besteht aus: 50 mM MES-Puffer, pH 6,9; 70 mM NaCl; 6 mM CaCl_2 ; 900 mM Aktivator; 2,27 mM CNP-G3 (2-Chloro-4-Nitrophenyl- α -maltotriosid).

Die Lagerung erfolgt bei +4°C. Die Lösung kann so lange verwendet werden, bis die Eigen-Abs. bei 405 nm (1 cm) 0,60 beträgt.

7.4 Thrombinhemmtest zur Hirudin-Aktivitätsbestimmung (verändert nach Patentschrift „Produktion von rekombinantem Hirudin“, 1994)

Der Test wird bei einem Gesamtvolumen von 200 μ l in 96-Well-Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach 10-minütiger Präinkubation des Thrombins mit Hirudin (verdünnt mit Testpuffer) erfolgt der Reaktionsstart durch Zugabe des chromogenen Substrats. Nach 5-10 minütiger Inkubation des freien Restthrombins mit Chromozym wird das freigesetzte Nitroanilin photometrisch bei 405 nm bestimmt. Der Messbereich des Tests liegt zwischen 0,01 und 0,15 AT-U (Antithrombin-Units). Ein Hirudin-Standard ist prinzipiell nicht notwendig, da durch den Einsatz der definierten Thrombinaktivität eine absolute Bestimmung der Antithrombin-Units möglich ist. Die allmähliche Inaktivierung der Gebrauchslösung führt aber zu einem systematischen Fehler, der durch den Standard behoben werden kann.

Kontrollen sind: Nullwert (Thrombinlösung durch Puffer ersetzen, Photometer-Nullabgleich), Thrombin-Wert (Messwert ohne Inhibitor), Hirudin-Standard (0,07-0,1 AT-U eines Hirudin-Standards)

50 μ l Testpuffer *minus Probenvolumen* in der Mikrotiterplatte vorlegen, Probe zusetzen, danach 50 μ l Thrombin-Gebrauchslösung zusetzen. Nach Vorinkubation von 10 min werden mit der Multipipette 100 μ l Chromozym-Gebrauchslösung spaltenweise zugefügt. Nach 5-10 Minuten (Thrombinwert bei ca. 1) erfolgt die photometrische Bestimmung mit dem Elisa-Reader bei 405 nm.

Die unten angegebene Konzentration der Thrombinlösung ist ein Richtwert, der vor jedem Test überprüft werden sollte. Wie die Abb. VII-1 zeigt, wurden für ver-

schiedene Konzentrationen der Thrombinlösung Kinetiken bestimmt. Eine lineare Anfangssteigung und die Voraussetzung für eine Eichmessung sind bei jeder Thrombinverdünnung vorhanden. Dabei gilt: Je steiler die Anfangssteigung, desto kürzer muß die Zeit der Chromozyminkubation sein und desto schneller verändern sich die Meßwerte innerhalb des Messzeitraumes. Bei einer Konzentration von 2 NIH-U/mL ist die Steigung relativ steil, die gemessenen Eichwerte aber über einen großen Messbereich linear.

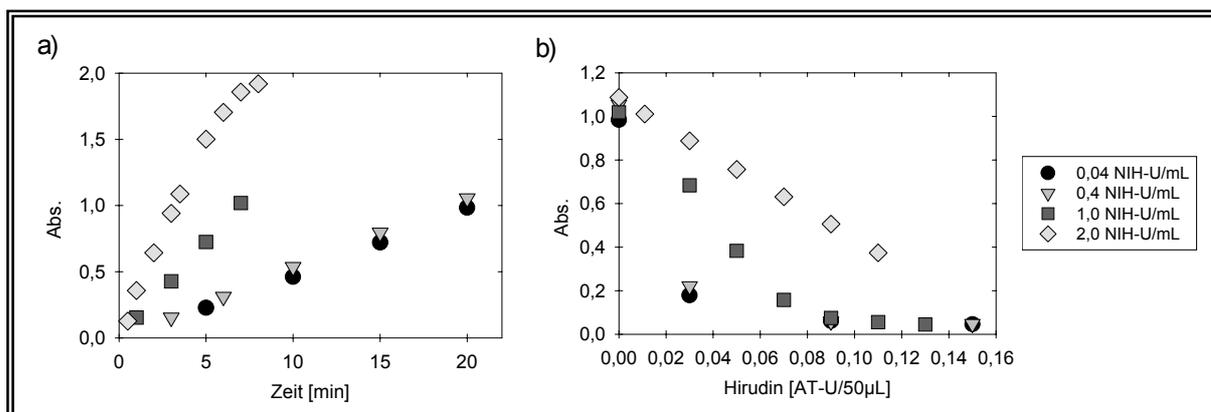


Abb. VIII-2 a) Kinetiken für verschiedene Thrombinkonzentrationen im Hemmtest. b) Eichmessungen mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen. Die Messungen erfolgten nach 3 min (2 NIH-U/mL), 5 min (1 NIH-U/mL), 10 min (0,4 und 0,04 NIH-U/mL).

TESTPUFFER

50 mM Tris/HCl, pH 8; 154 mM NaCl; 0,2% PEG 6000

THROMBINPUFFER

20 mM MES pH 6,0; 154 mM NaCl; 0,2% PEG 6000; 1% BSA

THROMBINLÖSUNG (RINDERTHROMBIN 50 NIH-U/MG; MERCK, ART.-NR. 12374)

Stammlösung: 40 NIH-U/ml in Thrombinpuffer. Gebrauchslösung: 4 NIH-U/ml in Thrombinpuffer

CHROMOZYMLÖSUNG

Stammlösung: 10 mM Chromozym TH (Fa. Boehringer, Art.-Nr. 206849) in Wasser/HCl, pH 6. Gebrauchslösung: 1 mM in Testpuffer verdünnt.

HIRUDIN-STANDARD

Hirudin Pentapharm „purified by affinity chromatography“, spez. Aktivität: 10 AT-U/µg, Konzentration: 0,1 AT-U/50µl

7.5 Gesamtprotein-Bestimmung nach Bradford (verändert nach BRADFORD, 1979)

Diese Proteinbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Die Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm. Die Erhöhung der Absorption bei 595 nm steht in proportionalem Zusammenhang zur in der Probe enthaltenen Proteinmenge. Gerätetechnisch bedingt wurden die photometrischen Messungen an einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm durchgeführt. Für den Test wurden 96er well Mikrotiterplatten eingesetzt; die maximale Proteinmenge pro Kavität sollte 10 µg nicht überschreiten.

Für die Bestimmung werden je 50 µL Probe- oder Eichlösung vorgelegt und mit einer Multipette je 200 µL Reagenzlösung zugegeben. Die Messung erfolgt nach 5 min. Die Eichlösungen beinhalten 0,5 bis 10 µg BSA pro 50 µL. Als Proben wurden zunächst je 50 µL unverdünnter Kulturüberstand eingesetzt.

BRADFORD-REAGENZ

20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 lösen in 10 mL 96 % igem Ethanol, 20 mL 85 % ige Phosphorsäure zugeben und mit A. dest. auf 200 mL auffüllen. Kühl und Dunkel lagern.

7.6 Fällen und Entsalzen von Proteinen aus Kulturüberstand

Ammoniumsulfatfällung

Um größere Mengen an Protein aus dem Überstand auszufällen, wird zunächst das Volumen bestimmt. Danach errechnet sich die Zugabe an Ammoniumsulfat. Die Proteine können entweder in einer fraktionierten Fällung gewonnen werden, bei der nur eine bestimmte Fraktion mit genau definiertem Salzgehalt das gewünschte Protein enthält. Hierbei muß darauf geachtet werden, dass das Ammoniumsulfat nur in kleinen Portionen zum Überstand gegeben wird.

Acetonfällung

Kulturüberstand mit dem fünf- bis zehnfachen Volumen an Aceton versetzen, vortexen und die ausgefällten Proteine abzentrifugieren. Diese Fällung kann meist nur als Vorreinigung eingesetzt werden, da auch Inhaltsstoffe des Mediums und viele Salze in dem Pellet enthalten sind.

Methanol/Chloroform-Fällung

1 Teil Überstand wird mit 4 Teilen Methanol und 1 Teil Chloroform versetzt. Nach gründlichem Vortexen werden drei Teile A. dest. zugefügt und nach nochmaligem Vortexen bei RT und 13.000 rpm eine Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Phase wird verworfen (die Proteine befinden sich in der Interphase). Nach Zufügen von 3 Teilen Methanol und vortexen werden die ausgefallenen Proteine bei 13.000 rpm pelletiert.

Entsalzen über eine PD-10-Säule (Pharmacia)

PD-10-Säulen sind gefüllt mit Sephadex G-25 M, das Volumen ist 9,1 mL. Auf der mit 25 mL A. dest. equilibrierten Säule werden maximal 2,5 mL Überstand aufgetragen und mit 3,5 mL A. dest eluiert. Alle mit HPLC gereinigten Proben wurden zunächst auf diese Art entsalzt.

7.7 Nativgelelektrophorese (nach DAVIS, 1964; ORNSTEIN, 1964 und GOLDENBERG, 1989)

Bei dieser Art der Elektrophorese erfolgt die Wanderung der Proteine in Abhängigkeit von Nettoladung und Konformation. Bei gleicher Ladung bestimmt die Mobilität des Proteins die Wanderungsgeschwindigkeit. Im Falle des Hirudins kann so zwischen den verschiedenen Konformationen (Faltungen) des Proteins unterschieden werden. Zunächst wird das Trenngel (20 % T) gegossen, was aus 20 mL Lösung 1, 7,5 mL Trenngelpuffer, 2,5 mL A. dest. und 200 µL APS (10 %) besteht. Das Trenngel wird während der Polymerisation mit n-Butanol überschichtet. Nach dem Ausspülen des n-Butanols wird das Sammelgel (2,5 % T), bestehend aus 4 mL Lösung 2, 2,0 mL Sammelgelpuffer, 10 mL A. dest. und 170 µL APS, zwischen die Gelträger gegossen und sofort der Probenkamm eingeführt. Maximal 20 µL Probe werden mit je 5 µL Inkubationspuffer gemischt und in die vorher gespülten Taschen gefüllt. Der Gellauf wird bei 4°C durchgeführt, zunächst bei ca. 160 V, bis die Proben das Trenngel erreichen, dann weiter bei 200 V. Ein Lauf dauert bis zu 20 Stunden. Die Proteinbanden werden anschließend über eine Silberfärbung sichtbar gemacht oder über ein Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue G-250.

LÖSUNG 1 (ACRYLAMID/BIS-STAMMLÖSUNG, 30,8 % T / 2,6 % C)

300 g Acrylamid und 8 g BIS werden in 1 L A. dest. gelöst.

TRENNGELPUFFER

1,5 M Tris, pH 8,9, 0,32 % (v/v) TEMED. 182 g Tris werden in 900 mL A. dest. gelöst und mit konz. HCl auf pH 8,9 eingestellt. Nach Zugabe von 2,3 mL TEMED wird auf 1 L aufgefüllt.

LÖSUNG 2 (ACRYLAMID/BIS-STAMMLÖSUNG, 12,5 % T / 20 % C)

100 g Acrylamid und 25 g BIS werden in 1 L A. dest. gelöst.

SAMMELGELPUFFER

0,47 M Tris, pH 6,9, 0,46 % (v/v) TEMED. 57 g Tris werden in 900 mL A. dest. gelöst und mit konz. HCl auf pH 6,9 eingestellt. Nach Zugabe von 4,6 mL TEMED wird auf 1 L aufgefüllt.

10 X LAUFPUFFER

56 mM Tris, 390 mM Glycin. 6 g Tris und 28,8 g Glycin werden in einem Endvolumen von 1 L A. dest. gelöst. Die Stammlösung wird autolaviert, bei 4°C gelagert und vor Gebrauch mit A. dest. verdünnt.

5 X PROBENPUFFER (INKUBATIONSPUFFER)

40 % (w/v) Glycerin, 100 mM Tris, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, mit 1 N HCl auf pH 6,8 eingestellt.

7.8 Nativgel nach der Methylenblau-Methode (nach GOLDENBERG, 1997)

Statt TEMED und APS werden hier andere Starter für die Polymerisation des Acrylamids eingesetzt. Die Katalysatoren sind Diphenyljodoniumchlorid und Na-Toluolsulfonat, als Starter der Reaktion fungiert Methylenblau. Dieses Gel wirkt weniger oxidierend auf die Proben. Das Herstellen des Gels erfolgt analog zum oben beschriebenen Nativgel. Der Acrylamidgehalt (% T) im Trenngel ist hier mit 16,7 % und im Sammelgel mit 2 % leicht niedriger als im oben beschriebenen Nativgel, da diese Art der Polymerisation zu dichteren Gelen führt, in denen das Hirudin nicht mehr die erforderliche Mobilität aufweist. Die Gelpuffer werden in konzentrierterer Form und ohne den Zusatz von TEMED eingesetzt. Das Trenngel setzt sich zusammen aus 15 mL Lösung 1 (s. o.), 4,5 mL 6 x Trenngelpuffer, 3,45 mL A. dest., je 1,35 mL Lösung A, Lösung B und Methylenblau-Lösung. Das Sammelgel besteht aus 4 mL Lösung 2 (s. o.), 2,5 mL 8 x Sammelgelpuffer, 10,5 mL A. dest. und je 1 mL Lösung A, Lösung B und Methylenblau-Lösung. Zum Polymerisieren ist UV-Licht notwendig, es hat sich gezeigt, dass ein Platz am Fenster das Gel gleichmäßiger polymerisieren lässt als eine danebengestellte UV-Quelle. Die anfängliche Blau-

färbung des Gels wird bei erfolgter Polymerisation schwächer und stört nicht bei der Silberfärbung.

LÖSUNG A (1MM)

32 mg Diphenyljodoniumchlorid in 100 mL A. dest. lösen. Nur eine Woche haltbar!

LÖSUNG B (20MM)

178 mg Na-Toluolsulfonat in 50 mL A. dest. lösen. Nur eine Woche haltbar!

METHYLENBLAU-LÖSUNG (2 MM)

64 mg Methylenblau in 100 mL A. dest. lösen. Bis zu einem Monat haltbar.

7.9 Tricine-SDS-Gele (SCHÄGGER UND VON JAGOW, 1987)

Tricine-SDS-Gele sind reduzierend. Das an die Proteine angelagerte SDS bewirkt eine elektrophoretische Auftrennung nach der Größe, da die negative Ladung der Protein-SDS-Moleküle sich direkt proportional zur Masse des Proteins verhält. Es wurden sowohl Minigele als auch Gele der Größe 20 x 20 cm verwendet. Das in den ursprünglichen Vorschriften beschriebene Spacergel wurde nicht verwendet, so dass die Gele aus einem Trenngel (16,5 % T / 6 % C) und einem Sammelgel (4 % T / 3 % C) bestehen. Im Gegensatz zur Nativgelelektrophorese wird mit verschiedenen Laufpuffern für Anode und Kathode gearbeitet. Der Gellauf erfolgt bei einer Spannung von 50 V über vier Stunden (Minigele), bzw. bei 150 V über Nacht.

Zur Vorbereitung der Elektrophorese werden Proben und Marker, bzw. Standard mit dem gleichen Volumen an 2 x Probenpuffer und 2 µL β-Mercaptoethanol versetzt und fünf Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach dem Abschrecken auf Eis werden die Lösungen (max. Volumen 25 µL) in die Taschen des Gels gefüllt.

	Trenngel		Sammelgel	
AA-Lösung 1	3,3 mL	10 mL	-	-
AA-Lösung 2	-	-	527 µL	1 mL
Gelpuffer	3,3 mL	10 mL	2,214 mL	3,1 mL
H ₂ O	3,3 mL	10 mL	3,181 mL	6,95 mL
10 % APS	50 µL	150 µL	71 µL	140 µL
TEMED	5 µL	15 µL	7,1 µL	14 µL
Gesamtvolumen	10 mL	30 mL	6 mL	12,5 mL

AA-LÖSUNG 1 (49,5 % T, 6 % C)

465 g Acrylamid und 30 g Bis unter leichtem Erwärmen in 1 L A. dem. lösen. Dunkel bei 4°C aufbewahren.

AA-LÖSUNG 2 (49,5 % T, 3 % C)

480 g Acrylamid und 15 g Bis wie oben lösen und aufbewahren.

GELPUFFER

3 M Tris, 0,3 % (w/v) SDS, pH 8,45. 90,83 g Tris und 0,75 g SDS in 200 mL A. dem. lösen und mit konz. HCl pH 8,45 einstellen. Endvolumen: 250 mL.

ANODENPUFFER

0,2 M Tris pH 8,9 im 1 x Puffer. Zum Aufbewahren einen 10 x Puffer mit 242,2 g Tris in 900 mL A. dem. lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen und auf 1 L auffüllen.

KATHODENPUFFER

1 M Tris, 0,1 M Tricine, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,25 im 1 x Puffer. Zum Aufbewahren einen 10 x Puffer aus 121,1 g Tris, 179,2 g Tricine und 10 g SDS in 1 L A. dem. lösen. Der pH-Wert sollte stimmen.

2 x PROBENPUFFER

8 M Harnstoff, 0,2 M Tris, 0,2 M DTE, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % Bromphenolblau. 48,05 g Harnstoff, 2,42 g Tris, 3,09 g DTE, 2 g SDS, 100 mg Bromphenolblau in 100 mL A. dest. lösen und aliquotiert bei -20°C aufbewahren.

7.10 Silberfärbung (übernommen von der GBF, Braunschweig)

Zunächst werden die Proteinbanden fixiert. Dazu wird das Gel 15 min in einer Lösung aus 100 mL Methanol, 4 g CuCl₂, 2,4 g TCA ad 200 mL A. dest. geschwenkt. Nach einem Spülschritt (10-minütiges Inkubieren des Gels in Isopropanol/Eisessig (10 % / 5 %)) wird das Gel für 10 min in einer 0,01 % igen KMnO₄-Lösung oxidiert. Der Spülschritt wird wiederholt, dann wird das Gel zweimal je 10 min in A. dest. geschwenkt. Zur Silberanlagerung wird das Gel 10 min mit 0,1 % iger AgNO₃-Lösung behandelt, das Entwickeln erfolgt in zwei Schritten. Hierzu werden zunächst 100 mL einer 2 % igen Na₂CO₃-Lösung mit 0,1 % Formaldehyd zu dem Gel gegeben. Die entstehende trübe Lösung wird abdekantiert und mit weiteren 100 mL der Lösung versetzt. Die Carbonatlösung sollte bis zur gewünschten Färbung der Banden einwirken, ein schneller Reaktionsstop erfolgt durch Zugabe von 5 bis 10 mL Eisessig. Nach dem schnellen Quenchen wird das Gel noch einige Zeit mit 1 % iger Essigsäure nachbehandelt.

7.11 Färbung mit Coomassie

SDS- und Methylenblau-Gele werden mit Coomassie gefärbt. Ein vorheriges Fixieren der Proteinbanden ist nicht notwendig. Nach einem Einwirken über Nacht wird überschüssiger Farbstoff mit einer 10%igen Essigsäurelösung entfernt. Ein schnelleres Entfärben wird durch Zellstofftücher erreicht, die mit in die Lösung gegeben werden und den Farbstoff aufnehmen, oder durch Erhitzen der verdünnten Essigsäure in der Mikrowelle.

FÄRBELÖSUNG

0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 in 7,5% Essigsäure und 50% Methanol.

7.12 HPLC-Methoden

Trennung der nicht-nativen Hirudin-Konformere (HIR3)

Säule: C4 Nucleosil, 300 Å, 250 x 4 mm.

Laufmittel: **A** A. dest., 0,1 % TFA; **B** Acetonitril, 0,1 % TFA

Gradient: 0 bis 35 % in 40 min; bzw. 0 bis 5 % in 5 min, 5-25 % in 40 min

Flußrate: 1 ml/min

7.13 Kapillarelektrophorese (CE)

Die CE-Analytik wird an dem P/ACE System 2100 der Firma Beckmann durchgeführt. Die offenen Kapillare hat eine Länge von 37 cm und ist mit Tricinpuffer (0,1 M, pH 8,0) gefüllt. Die Proben der Rückfaltungsansätze werden mit Hochdruck innerhalb von 8 Sekunden in die Kapillare eingebracht, der verdünnte Standard wird innerhalb von 3 Sekunden in die Kapillare geladen. Bei 18 µA und 5kV dauert ein Lauf 30 Minuten. Vor Beginn der Messungen und zwischen jedem Analytiklauf wird die Kapillare mit Puffer gespült. Die Detektion der Proteine erfolgt bei 214 nm.

7.14 Massenanalytik

Für die Massenanalytik werden die Proteine aus dem Überstand über eine Methanol/Chloroform-Fällung gefällt und entsalzt, oder der Überstand wird über eine PD-10-Säule entsalzt und eventuell HPLC-gereinigt.

MALDI: Matrix mit Sinapinsäure (evtl. zusätzliche Masse von 180 g/mol), bei einigen Messungen mit Hirudin ist zusätzlich Ammoniumcitrat als Puffer zugesetzt worden.

1 Literaturverzeichnis

- ACHSTETTER, T.,** Nguyen-Juilleret, M., Findeli, A., Merkamm, M., Lemoine, Y. (1992) A new signal peptide useful for secretion of heterologous proteins from yeast and its application for synthesis of hirudin. *Gene*, **110**, 25-31.
- AKITA, M., SASAKI, S., MATSUYAMA, S., MIZUSHIMA, S. (1990)** SecA interacts with secretory proteins by recognizing the positive charge at the amino terminus of the signal peptide in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 8164-8169.
- ANDERSON UND SEILHAMMER (1997)** *Elektrophoresis*, **18**, 533-537.
- ARETZ, W., KOLLER, K.P., RIEß, G. (1989)** Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **65**, 31-36.
- ASCHAUER, H., VÉRTESY, L., BRAUNITZER, G. (1981)** Die Sequenz des α -Amylase-Inhibitors Hoe-467 aus *Streptomyces tendae*. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 465-467.
- ASLUND, F., BERNDT, K.D., HOLMGREN, A. (1997)** Redox potential of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30780-30786.
- BAN, E., RYU, J.C., YOO, Y.S. (2001)** Detection of recombinant hirudin using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Microchemical J.*, **70**, 211-217.
- BATENBURG, A. M., BRASSEUR, R., RUYSSCHAERT, J.-M., VAN SCHARRENBURG, G.J.M., SLOTBOOM, A.J., DEMEL, R.A., DE KRUIJFF, B. (1988)** Characterization of the interfacial behaviour and structure of the signal sequence of *Escherichia coli* outer membrane pore protein PhoE. *J. Biol. Chem.*, **263**, 4202-4207.
- BENDER, E. (1989)** Untersuchungen zur sekretorischen Proteinsynthese durch Streptomycceten anhand des α -Amylase-Inhibitors Tendamistat. Dissertation im Fachbereich Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- BENTLEY, S. D. ET AL. (2002)** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**, 141-147.
- BERKS, B.C. (1996)** A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors. *Mol. Microbiol.*, **22**, 393-404.
- BERKS, B.C., SARGENT, F., PALMER, T. (2000)** The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol.*, **35**, 260-274.

- BERNSTEIN, H.D., ZOPF, D., FREYMAN, D.M., WALTER, P. (1993)** Functional substitution of the signal recognition particle 54-kDa subunit by its *Escherichia coli* homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5229-5233.
- BETZ, A., HOFSTEENGE, J., STONE, S.T. (1992)** Interaction of the N-terminal region of hirudin with the active-site cleft of thrombin. *Biochemistry*, **31**, 4557-4562.
- BINNIE, C., COSSAR, J.D., STEWART, D.I.H. (1997)** Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Tibtech*, **15**, 315-320.
- BLANCO, J., COQUE, J.J.R., MARTIN, J.F. (1996)** Characterization of the SecA gene of *Streptomyces lividans* encoding a protein translocase which complements an *Escherichia coli* mutant defective in the ATPase activity of SecA. *Gene*, **176**, 61-65.
- BLANCO, J., DRIESSEN, A-J.M., COQUE, J.J.R., MARTIN, J.F. (1998)** Biochemical characterization of the SecA protein of *Streptomyces lividans*. Interaction with nucleotides, binding to membrane vesicles and *in vitro* translocation of proAmy protein. *Eur. J. Biochem.*, **257**, 472-478.
- BOGSCH, E.G., BRINK, S., ROBINSON, C. (1997)** Pathway specificity for a delta-pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a Sec-avoidance motif in the transfer peptide and a Sec-incompatible mature protein. *EMBO J.*, **18**, 3851-3859.
- BOLHUIS, A., Sorokin, A., Azevedo, V., Ehrlich, S.D., Braun, P.G., de Jong, A., Venema, G., BRON, S., VAN DIJL, J.M. (1996)** *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of the *sipS* gene for signal peptidase I. *Mol. Microbiol.*, **22**, 605-618.
- BRADFORD, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Chemistry*, **72**, 248-254.
- BUCCA, G., FERINA, G., PUGLIA, A.M., SMITH, C.P. (1995)** The *dnaK* operon of *Streptomyces coelicolor* encodes a novel heat-shock protein which binds to the promoter region of the operon. *Mol. Microbiol.*, **17**, 663-674.
- BUCHANAN, B.B., SCHÜRMAN, P., DECOTTIGNIES, P., LOZANO, R.M. (1994a)** Perspectives in biochemistry and biophysics. Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and Medicine. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **314**, 157-260.
- BUCHANAN, B.B., SCHÜRMAN, P., JACQUOT, J.-P. (1994b)** In: Seminars in Cell Biology. Editor: A. R. Grossman, Vol. 5, Academic Press, London.

- BUKAU, B., HESTERKAMP, T., LUIRINK, J. (1996)** Growing up in a dangerous environment: a network of multiple targeting and folding pathways for nascent polypeptides in the cytosol. *Trends Cell. Biol.*, **6**, 480-486.
- CAI, C.Q. AND FANG, R.X. (2001)** Technical improvements in genetic manipulation of *Pichia pastoris* and their application in hirudin expression. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, **17**, 155-160.
- CAPIELLO, M. VILARDO, P.G., LIPPI, A., CRISCUOLI, M., DEL CORSO, A., MURA, U. (1996)** Kinetics of human thrombin inhibition by two novel peptide inhibitors (hirunorm IV and hirunorm V). *Biochemical Pharmacology*, **52**, 1141-1146.
- CHANG, J.-Y. (1991)** Stability of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10829-10834.
- CHANG, J.-Y. (1994)** Controlling the speed of hirudin folding. *Biochem. J.*, **300**, 643-650.
- CHANG, S.C., SU, M.H., LEE, Y.H. (1997)** Roles of the signal peptide and mature domains on the secretion and maturation of the neutral metalloprotease from *Streptomyces cacaoi*. *Biochem. J.*, **321**, 29-37.
- CHATRENET, B AND CHANG, J.-Y. (1992)** The folding of hirudin adopts a mechanism of trial and error. *J. Biol. Chem.*, **267**, 3038-3043.
- CHATRENET, B AND CHANG, J.-Y. (1993)** The disulfide folding pathway of hirudin elucidated by stop/go experiments. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20988-20996.
- CHEN, G.F.T. AND INOUE, M. (1990)** Suppression of the negative effect of minor arginin codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acid Res.*, **18**, 1465-1473.
- CHEN, C.W. (1996)** Complications and implications of linear bacterial chromosomes. *Trends Genet.*, **12**, 192-196.
- CHIVERS, P.T., LABOISSIÈRE, M.C.A., RAINES, R.T. (1996)** The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *EMBO J.*, **15**, 2659-2667.
- COHEN, G., YANKO, M., MISLOVATI, M., ARGAMAN, A., SCHREIBER, R., AVGAY, Y., AHARONOWITZ, Y. (1993)** Thioredoxin-thioredoxin reductase system of *Streptomyces clavuligerus* – sequences, expression, and organization of the genes. *J. Bacteriol.*, **175**, 5159-5167.

- COLLIER, D.N., BANKAITIS, V.A., WEISS, J.B., BASSFORD JR., P.J. (1988) The anti-folding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *Cell*, **53**, 273-283.
- CREIGHTON, T.E. (1997) Protein folding coupled to disulphide bond formation. *Biol. Chem.*, **378**, 731-744.
- DALBEY, R.E AND ROBINSON, C. (1999) Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 17-22.
- DALBEY, R.E., LIVELY, M.O., BRON, S., VAN DIJL, J.M. (1997) The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.*, **6**, 1129-1138.
- DARBY, N.J. AND CREIGHTON, T.E. (1993) Dissecting the disulphide-coupled folding pathway of bovine pancreatic trypsin inhibitor. Forming the first disulphide bonds analogues of the reduced protein. *J. Mol. Biol.*, **232**, 873-896.
- DAVIS, B.J. (1964) Disc electrophoresis II: methods and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
- DEBARBIEUX, L. AND BECKWITH, J. (1998) The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the *Escherichia coli* periplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10751-10756.
- DEBARBIEUX, L. AND BECKWITH, J. (2000) On the functional interchangeability, oxidant versus reductant, of members of the thioredoxin superfamily. *J. Bacteriol.*, **182**, 7237-727.
- DE LEON, P., MARCO, S., ISIEGAS, C., MARINA, A., CARRASCOSA, J.L., MELLADO, R.P. (1997) *Streptomyces lividans* groES, groEL1 and groEL2 genes. *Microbiology*, **143**, 3563-3571.
- DERMAN, A.I., Prinz, W.A., Bellin, D., Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, **262**, 1744-1747.
- DHARMALINGAM, K. AND CULLUM, J. (1996) Genetic instability in *Streptomyces*. *J. Biosci.*, **21**, 433-444.
- DODT, J. (1995) Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirudin zu Hirudinmimetica. *Angew. Chem.*, **107**, 948-962.
- DODT, J., SEEMÜLLER, U., MASCHLER, R., FRITZ, H. (1985) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 379-385.

- DODT, J., MACHLEIDT, W., SEEMÜLLER, U., MASCHLER, R., FRITZ, H. (1986)** *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **367**, 803-811.
- DRIESSEN, A.J.M., FEKKES, P., VAN DER WOLK, J.P.W. (1998)** The Sec System. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**, 216-222.
- DOUD, S.K., CHOU, M.M., KENDALL, D.A. (1993)** Titration of protein transport activity by incremental changes in signal peptide hydrophobicity. *Biochemistry*, **32**, 1251-1256.
- DUCHÊNE, A.M., THOMPSON, C.J., MAZODIER, P (1994)** Transcriptional analysis of groEL genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.*, **245**, 61-68.
- ECONOMOU, A. (1999)** Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.*, **7**, 315-320.
- EISENHABER, F., IMPERIALE, F., ARGOS, P., FROEMMEL, C. (1996a)** Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. I. New analytic vector decomposition methods. *Proteins: Struct.,Funct., Design*, **25**, N2, 157-168.
- EISENHABER, F., FROEMMEL, C., ARGOS, P. (1996b)** Prediction of secondary structural content of proteins from their amino acid composition alone. II. The paradox with secondary structural class. *Proteins: Struct.,Funct., Design*, **25**, N2, 169-179.
- FABRIS, F., LUZZATTO, G., STEFANI, P.M., GIROLAMI, B., CELLA, G., GIROLAMI, A. (2000)** Heparin-induced thrombocytopenia. *Haematologica*, **85**, 72-81.
- FAB, S. (1994)** Proteinsekretion in *Streptomyces* am Beispiel des α -Amylase-Inhibitors Tendamistat. Dissertation im Fachbereich Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- FAB, S.H. AND ENGELS, J.W. (1996)** Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the alpha-amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 15244-15252.
- FEKKES, P. AND DRIESSEN, A.J.M. (1999)** Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 161-173.
- FEKKES, P., de Witt, J.G., van der Wolk, J.P.W., Kimsey, H.H., Kumamoto, C.A., Driessen, A.J.M. (1998)** Preprotein transfer to *Escherichia coli* translocase requires the cooperative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol. Microbiol.*, **29**, 1179-1190.

- FIERS, W., CONTRERAS, R., DUERNICK, F., HAEGMAN, G., MERREGAERT, J., MIN JOU, W., RAEMAEKERS, A., VOLCKAERT, G., YSEBAERT, M., VAN DE KERCKHOVE, J., NOLF, F., VAN MONTAGU, M. (1975)** A-protein gene of Bakteriophage MS2. *Nature*, **256**, 273-278.
- FISCHER, G., DECARIS, B., LEBLOND, P. (1997)** Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J. Bacteriol.*, **179**, 4533-4558.
- FLETT, F., MERSINIAS, V., SMITH, C.P. (1997)** High efficiency intergeneric conjugal transfer of Plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **155**, 223-229.
- FUJII, T. AND MIYASHITA, K. (1993)** Multiple domain structure in a chitinase gene (*chiC*) of *Streptomyces lividans*. *Gen. Microbiol.*, **139**, 677-686.
- GILBERT, H.F. (1990)** Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv. Enzymol.*, **63**, 69-172.
- GILBERT, H.F. (1997)** Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.*, **272**, 29399-29402.
- GILBERT, M., MOROSOLI, R., SHARECK, F., KLUEPFEL, D. (1995)** Production and secretion of proteins by Streptomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **15**, 13-39.
- GILBERT, M., OSTIGUY, S., KLUEPFEL, D., MOROSOLI, R. (1996)** Cloning a *secA* homolog from *Streptomyces lividans* 1326 and overexpression in both *S. lividans* and *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 9-12.
- GOLDENBERG, D.P. (1997)** Analysis of protein conformation by gel elektrophoresis. In: Protein structure – a practical approach, 2nd edition, editor: T.E. Creighton, Practical Approach Series, IRL Press.
- GRANDVALET, C., DE CRÉCY-LAGARD, V., MAZODIER, P. (1999)** The ClpB ATPase of *Streptomyces albus* G belongs to the HspR heat shock regulon. *Mol. Microbiol.*, **31**, 521-532.
- GRANT, C.M. (2001)** Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.*, **39**, 533-541.
- GRAUSCHOPF, U., WINTHER, J.R., KORBER, P., ZANDER, T., DALLINGER, P., BARDWELL, J.C. (1995)** Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**, 947-955.
- GRAVIUS, B., BEZMALINOVIC´, T., HRANUELLI, D., CULLUM, J. (1993)** Genetic instability

and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2220-2228.

GREINACHER, A. AND LUBENOW, N. (2001) Recombinant hirudin in clinical practise – focus on lepirudin. *Circulation*, **103**, 1479-1484.

GRÜTTER, M.G., PRIESTLE, J.P., RAHUEL, J., GROSSENBACHER, H., BODE, W., HOFSTEENGE, J., STONE, S.R. (1990) *EMBO J.*, **9**, 2361-2365.

GUSEK, T.W. AND KINSELLA, J.E. (1992) Review of the *Streptomyces lividans* vektor pIJ702 system for gene cloning. *Crit. Rev. Microbiol.*, **18**, 247-260.

HABER, E AND ANFINSEN, C.B. (1962) Site-chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1839-1844.

HALE, V.A. AND SCHOTTEL, J.L. (1996) Mutational analysis of the *Streptomyces scabies* esterase signal peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 189-198.

HANAHAH, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.

HARDY, S.J.S AND RANDALL, L.L. (1991) A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science*, **251**, 439-443.

HARTL, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-580.

HARTL, F.U., HLODAN, R., LANGER, T. (1994) Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trens Biochem. Sci.*, **19**, 20-25.

HEIM, J., TAKABAYASHI, K., MEYHACK, B., MÄRKI, W., POHLIG, G., (1994) C-terminal proteolytic degradation of recombinant desulfato-hirudin and its mutants in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 341-353.

HENDERSON, G., KRYGSMANN, P., LIU, C.J., DAVEY, C.C., MALEK, L.T. (1987) Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **169**, 3778-3784.

HIRAYAMA, K., TAKAHASHI, R., AKASHI, S., FUKUHARA, K., OUCHI, N., MURAI, A. (1987) Primary structure of PaimI, an α -amylase inhibitor from *Streptomyces corchorushii*, determined by the combination of Edman degradation and fast atom bombardement mass spectroscopy. *Biochemistry*, **26**, 6483-6488.

HOFFMANN, H. (1992) Untersuchungen zur heterologen Genexpression in *Strepto-*

myces lividans. Dissertation im Fachbereich Chemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.

HOFMANN, O., VÉRTESY, L., BRAUNITZER, G. (1985) The primary structure of the α -amylase inhibitor Z-2685 from *Streptomyces parvullus* FH-1641. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **366**, 1161-1168.

HOLMES, D.S. AND QUIGLEY, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.*, **114**, 193.

HOPWOOD, D.A., BIBB, M.J., CHATER, K.F., KIESER, T., BRUTON, C.J., KIESER, H.M., LYDIATE, D.J., SMITH, C.P., WARD, J.M., SCHREMPF, H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

HONDA, K., NAKAMURA, A., NISHIGUCHI, M., YAMANE, K (1993) Cloning and characterization of a *Bacillus subtilis* gene encoding a homolog of the 54-kilodalton subunit of mammalian signal recognition particle and *Escherichia coli* Ffh. *J. Bacteriol.*, **175**, 4885-4894.

HORECKÁ, T., PRECKO, D., KUTEJOVÁ, E., MUCHOVÁ, K., KOLLÁROVÁ, M. (1996) purification and partial characterization of two thioredoxins from *Streptomyces aureofaciens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **40**, 497-505.

HUBER-WUNDERLICH, M. AND GLOCKSHUBER, R. (1998) A single dipeptide sequence modulates the redox properties of a whole enzyme family. *Folding & Design*, **3**, 161-171.

IKEMURA, T. (1981) Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J. Mol. Biol.*, **146**, 1-21.

IKEMURA, T. (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Bio. Evol.*, **2**, 13-34.

JACKMANN, M.P., PARRY, M.A.A., HOFSTEENGE, J., STONE, S.R., (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 15375-15383.

JONDA, S., HUBER-WUNDERLICH, M., GLOCKSHUBER, R., MÖSSNER, E. (1999) Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals a crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *EMBO J.*, **18**, 3271-3281.

- KENDALL, D.A., BOCK, S.C., KAISER, E.T. (1986)** Idealization of the hydrophobic segment of the alkaline phosphatase signal peptide. *Nature*, **32**, 706-708.
- KESSLER, H., SCHMIEDER, P., BERMEL, W. (1989)** Complete assignment of noncarbo-nylic carbon-13 resonances of tendamistat. *Biopolymers*, **30**, 465-476.
- KIESER, T., BIBB, M.J., BUTTNER, M.J., CHATER, K.F., HOPWOOD, D.A. (2000)** Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- KHOKHLATCHEV, A., XU, S., ENGLISH, J., WU, P., SCHAEFER, E., COBB, M.H. (1997)** Reconstitution of Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylation Cascades in Bacteria. Efficient Synthesis of active Protein Kinases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 11057-11062.
- KLEIN, M., MEENS, J., FREUDL, R. (1995)** Functional characterization of the *Staphylo-coccus carnosus* SecA protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* secA mutant strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 271-277.
- KLIN, A.D., Braun, W., Wütherich, K. (1986)** Studies by ¹H nuclear magnetic resonance and distance geometry of the solution conformation of the α -amylase inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.*, **189**, 377-382.
- KOLSTØ, A.-B. (1997)** Dynamic bacterial genome organisation. *Mol. Microbiol.*, **24**, 241-248.
- KRAUSE, G., LUNDSTRÖM, J., BAREA, J.L., PUEYO DE LA CUESTA, C., HOLMGREN, A. (1991)** Mimicking the active site of protein disulfide isomerase by substitution of prolin 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 9494-9500.
- KROGH, A., LARSSON, B., VON HEIJNE, G., SONNHAMMER, E.L.L. (2001)** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 567-580.
- KRUBASIK, P. (1999)** persönliche Mitteilung nach Anzucht des Stammes *S. lividans* TK 24 im Botanischen Institut der J. W. Goethe-Universität.
- KUHSTOSS, S. AND RAO, R.N. (1991)** Analysis of the integration function of the streptomycete bacteriophage phiC31. *J. Mol. Biol.*, **222**, 897-908.
- KUMAMOTO, C.A. AND NAULT, A.K. (1989)** Characterization of the *Escherichia coli* protein-export gene secB. *Gene*, **75**, 167-175.
- LABUDOVÁ, O., NÉMETHOVÁ, M., TURNA, J., KOLLÁROVÁ, M. (1994)** PCR cloning and sequencing of the coding portion of the thioredoxin-encoding gene from *Streptomyces aureofaciens* BMK. *Gene*, **138**, 263-264.

- LAMINET, A.A AND PLÜCKTHUN, A. (1989) The precursor of β -lactamase: purification, properties and folding kinetics. *EMBO J.*, **8**, 1469-1477.
- LAMMERTYN, E., VAN MELLAERT, L., BIJNENS, A.P., JORIS, B., ANNÉ, J. (1996) Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in *Streptomyces lividans* can lead to a decreased mRNA stability and protein yield. *Mol. Gen. Genet.*, **250**, 223-229.
- LAMMERTYN, E. (2000) Isolation and characterisation of a novel subtilisin inhibitor from *Streptomyces venezuelae* and evaluation of its regulatory sequences for heterologous protein secretion by *streptomyces lividans*. Dissertation an der Katholieke Universiteit Leuven, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen.
- LAMOUREUX, G.V. AND WHITESIDES, G.M. (1993) Synthesis of dithiols as reducing agents for disulfides in neutral aqueous solution and comparison of reduction potentials. *J. Org. Chem.*, **58**, 633-641.
- LAMPEL, J.S., APHALE, J.S., LAMPEL, K.A., STROHL, W.R. (1992) Cloning and sequencing of a gene encoding a novel extracellular neutral proteinase from *Streptomyces* sp. strain C5 and expression of the gene in *Streptomyces lividans* 1326. *J. Bacteriol.*, **174** (9), 2797-2808.
- LEBLOND, P., REDENBACH, M., CULLUM, J. (1993) Physical map of the *Sreptomyces lividans* 66 genome and a comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.*, **175**, 3422-3499.
- LEBLOND, P. AND DECARIS, B. (1994) New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **123**, 225-232.
- LEES, W.J. AND WHITESIDES, G.M. (1993) Equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions: a coherent, corrected set. *J. Org. Chem.*, **58**, 642-647.
- 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**, 20108-20113.
- LEZHAVA, A., MIZUKAMI, T., KAJITANI, T., KAMEOKA, D., REDENBACH, M., SHINKAWA, H., NIMI, O., KINASHI, H. (1995) Physical map of the linear chromosome of *streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **177**, 6492-6498.
- LILL, R. CUNNINGHAM, K., BRUNDAGE, L.A., ITO, K., OLIVER, D., WICKNER, W. (1989) SecA protein hydrolyzes ATP and is an essentiell component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **8**, 961-966.

- LIN, T.-Y. AND KIM, P.S. (1991) Evaluating the effects of a single amino acid substitution on both the native and denatured state of a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10573-10577.
- LÖTZBEYER, M. (1991) Konstruktion eines induzierbaren Expressionssystems für *Streptomyces lividans*. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- LOMBARDI, A., NASTRI, F., DELLA MORTE, R., ROSSI, A., DE ROSA, A., STAIANO, N., PEDONE, C., PAVONE, V. (1996a) Rational design of true hirudin mimetics: synthesis and characterization of multisite-directed α -thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.*, **39**, 2008-2017.
- LORIA, R., BUKHALID, R.A., FRY, B.A., KING, R.R. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease*, **81**, 836-846.
- LUNDSTRÖM, J AND HOLMGREN, A. (1993) Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfid-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry*, **32**, 6649-6655.
- MANDEL, M. AND HIGA, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162.
- MANIATIS, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.
- MARAGANORE, J.M., BOURDON, P., JABLONSKI, J., RAMACHANDRAN, K.L., FENTON II, J.W. (1990) Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, **29**, 7095-7101.
- MARCO, S., PARRO, V., CARRASCOSA, J.L., MELLADO, R.P. (1992) *Streptomyces lividans* possesses a GroEL-like chaperonin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **72**, 127-132.
- MARKWARDT, F (1957) Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **312**, 85-89.
- MARKWARDT, F. (2001) Development of direct thrombin inhibitors in comparison with glycosaminoglycans. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **27**, 523-530.
- MARTIN, J.L. (1995) Thioredoxin – a fold for all reasons. *Structure*, **3**, 245-250.
- MARTIN, J.L., BARDWELL, J.C.A., KURIYAN, J. (1993) Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, **365**, 464-468.

- McKNIGHT, C.J., BRIGGS, M.S., GIERASCH, L.M. (1989)** Functional and nonfunctional LamB signal sequences can be distinguished by their biophysical properties. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17293-17297.
- McKNIGHT, C.J., RAFALSKI, M., GIERASCH, L.M. (1991)** Fluorescence analysis of tryptophan-containing variants of the LamB signal sequence upon insertion into a lipid bilayer. *Biochemistry*, **30**, 6241-6246.
- MEIJER, W.J.J., DE JONG, A., WISMAN, B., TJALSMA, H., VENEMA, G., BRON, S., VAN DIJL, J.M. (1995)** The endogenous *Bacillus subtilis* (natto) plasmids pTA1015 and pTA1040 contain signal peptidase-encoding genes: identification of a new structural module on cryptic plasmids. *Mol. Microbiol.*, **17**, 621-631.
- MESSMORE, H.L. (1999)** Heparin-induced thrombocytopenia: historical review. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, **5**, 2-6.
- MÖSSNER, E., HUBER-WUNDERLICH, M., GLOCKSHUBER, R. (1998)** Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci.*, **7**, 1233-1244.
- MOLLER, S., CRONING, M.D.R., APWEILER, R. (2001)** Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics*, **17**, 646-653.
- MOROSOLI, R., SHARECK, F., KLUEPFEL, D. (1997)** Protein secretion in streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **146**, 167-174.
- MÜLLER, M., BRON, S., VENEMA, G., VAN DIJL, J.M. (2000)** Chaperone-like activities of the CsA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146**, 77-88.
- MURAI, H., HARA, S., IKENAKA, T., GOTO, A., ARAI, M., MURAO, S. (1985)** Amino acid sequence of a protein α -amylase inhibitor from *Streptomyces giseosporus* YM-25. *J. Biochem.*, **97**, 1129-1133.
- MUSIALOWSKI, M.S., FLETT, F., SCOTT, G.B., HOBBS, G., SMITH, C., OLIVER, S.G. (1994)** Functional evidence that the principal DNA replication origin of the *Streptomyces coelicolor* chromosome is close to the *dnaA-gyrB* region. *J. Bacteriol.*, **176**, 5123-5125.
- NETZER, W.J AND HARTL, F.U. (1998)** Protein folding in the cytosol: chaperonon-dependent and -independent mechanisms., *TIBS*, **23**, 68-73.
- NIELSEN, H. AND KROGH, A. (1998)** Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 6)*, AAAI Press, Menlo Park, California, 122-130

- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. (1997)** Identification of procaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, **10**, 1-6.
- NIELSEN, H., BRUNAK, S., VON HEIJNE, G. (1999)** Review. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other sorting signals. *Protein Engineering*, **12**, 3-9.
- NILSSON, I. AND VON HEIJNE, G. (1990)** Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids. *Cell*, **62**, 1135-1141.
- NORRANDER, J., Kempe, T., Messing, J. (1983)** Construction off improved M13 vectors using oligodeoxy-nucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, **26**, 101-106.
- NOVAK, P. AND DEV, I.K. (1988)** Degradation of a signal peptide by protease IV and oligopeptidase A. *J. Bacteriol.*, **170**, 5067-5075.
- OGURA, A., KAKESHITA, H., HONDA, K., TAKAMATSU, H., NAKAMURA, K., YAMANE, K (1995)** srb: a *Bacillus subtilis* gene encoding a homologue of the alpha-subunit of the mammalian signal recognition particle receptor. *DNA Res.*, **2**, 95-100.
- 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.*, **92**, 3626-3630.
- ORNSTEIN, L. (1964)** Disc electrophoresis I: background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349.
- OSTERMEIER, M., DE SUTTER, K., GEORGIU, G. (1996)** Eukaryotic protein disulfid isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous protein with disulfide bonds. *J. Biol. Chem.*, **271**, 10616-10622.
- OTTO, A AND SECKLER, R (1991)** Characterization, stability and refolding of recombinant hirudin. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 67-73.
- PAGÉ, N., SHARECK, F., KLUEPFEL, D., MOROSOLI, R. (1996)** Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosom-binding sites. *Nature Biotechn.*, **14**, 756-759.
- PANDZA, K., PFALZER, G., CULLUM, J., HRANUELE, D. (1997)** Physical mapping shows that the untabel oxytetracycline gene cluster of *Streptomyces rimosus* lies

close to one end of the linear chromosome. *Microbiology*, **143**, 1493-1501.

- PARK, J.S., HORINOUCI, S., BEPPU, T. (1991)** Characterization of the leader peptide of an endo-type cellulase produced by an alkalophilic *Streptomyces* strain. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1745-1750.
- PARRO, V. AND MELLADO, R.P. (1998)** A new signal peptidase gene from *Streptomyces lividans* TK21. *DNA Sequence*, **9**, 71-77.
- PARRO, V., SCHACHT, S., ANNÉ, J., MELLADO, R.P. (1999)** Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. *Microbiology*, **145**, 2255-2263.
- PFLUGRATH, J.W., WIEGAND, G., HUBER, R. (1986)** Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the α -amylase inhibitor Hoe-467A. *J. Mol. Biol.*, **189**, 383-396.
- POCTA, D. (1991)** Verwendung von Genmodulen von Actinomyceten in Streptomyces-Klonierungsvektoren zur positiven Selektion und Transduktion. Dissertation im Fachbereich Biologie der Ludwig Maximilian Universität München.
- PÖHLING, S., PIEPERSBERG, W., WEHMEIER, U.F. (1997)** Protein secretion in *Streptomyces griseus* N2-3-11: characterisation of the *secA* gene and its growth phase-dependent expression. *FEMS Microbiol. Lett.*, **156**, 21-29.
- POLLOCK, W.B.R.; ROSELL, F.I.; TWITCHETT, M.B.; DUMONT, M.E.; MAUK, A.G. (1998)** Bacterial Expression of a Mitochondrial Cytochrome *c*. Trimethylation of Lys72 in Yeast *iso-1*-Cytochrome *c* and the Alkaline Conformational Transition. *Biochemistry*, **37**, 6124-6131.
- PRINZ, W.A., ÅSLUND, F., HOLMGREN, A., BECKWITH, J. (1997)** The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathway in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15661-15667.
- PUGSLEY, A.P. (1993)** The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**, 50-108.
- PULIDO, D. AND JIMÉNEZ, A. (1987)** Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 4227-4240.
- RANDALL, L.L. (1992)** Peptide binding by chaperone SecB: implications for recognition of nonnative structure. *Science*, **257**, 241-245.
- RANDALL, L.L., TOPPING, T.B., SUCIU, D., HARDY, S.J.S. (1998)** Calorimetric analysis of the interaction between SecB and its ligands. *Protein Sci.*, **7**, 1195-1200.

- RANDALL, L.L. AND HARDY, S.J.S. (1995)** High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 65-69.
- RASSOW, J. AND PFANNER, N. (1996)** Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides. *Current Biology*, **6**, 115-118.
- REDENBACH, M., Kieser, H.M., Denapaite, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H., Hopwood, D.A. (1996)** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.*, **21**, 77-96.
- RIEHL-BELLON, N., CARVALLO, D., ACKER, M., VAN DORSSELAER, A., MARQUET, M., LOISON, G., LEMOINE, Y., BROWN, W., COURTNEY, M., POITSCH, C. (1989)** Purification and biochemical characterization of recombinant hirudin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, **28**, 2941-2949.
- RIETSCH, A. AND BECKWITH, J. (1998)** The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.*, **32**, 163-184.
- ROSENBERG, A.H., GOLDMAN, E., DUN, J.J, STUDIER, F.W., ZUBAY, G. (1993)** Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *J. Bacteriol.*, **175**, 716-722.
- ROTHWARF, D.M. AND SCHERAGA, H.A. (1993a)** Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A. 1. Steady-state distribution. *Biochemistry*, **32**, 2671-2679.
- ROTHWARF, D.M. AND SCHERAGA, H.A. (1993b)** Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A. 3. Dependence on the nature of the redox reagent. *Biochemistry*, **32**, 2690-2697.
- RYDEL, T.J., RAVICHANDRAN, K.G., TULINSKY, A., BODE, W., HUBER, R., ROITSCH, C., FENTON II, J.W. (1990)** The structure of a complex of recombinant hirudin and human α -Thrombin. *Science*, **149**, 277-280.
- SANTINI, C.L., IZE, B., CHANAL, A., MULLER, M., GIORDANO, G., WU., L.F. (1998)** A novel Sec-independent periplasmic translocation pathway in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, **17**, 101-112.
- SCACHERI, E., NITTI, G., VALSASINA, B., ORSINI, G., VISCO, C., FERRERA, M., SAWYER, R.T., SARMIENTOS, P. (1993)** Novel hirudin variants from the leech *Hirudinaria manillensis*. Amino acid sequence, cDNA cloning and genomic organisation. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 295-304.

- SCHACHT, S.,** Van Mellaert, L., Lammertyn, E., TJALSMA, H., VAN DIJL, J.M., BRON, S., ANNÉ, J. (1998) The *Sip(Sli)* gene of *Streptomyces lividans* TK24 specifies an unusual signal peptidase with a putative C-terminal transmembrane anchor. *DNA Sequence*, **9**, 79-88.
- SCHÄGGER, H. AND V. JAGOW, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.
- SCHATZ, P.J. AND BECKWITH, J. (1990)** Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.*, **24**, 215-248.
- SCHIEBEL, E.,** Driessen, A.J.M., Hartl, F.-U., Wickner, W. (1991) Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell*, **64**, 927-939.
- SCHLEGEL, H.G. (1992)** Allgemeine Mikrobiologie. 7., überarbeitete Ausgabe, Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York.
- SCHMITT-JOHN, T. (1991)** Transkriptionsstudien zur Tendamistat-Sekretions-expression in *Streptomyces lividans*. Dissertation, Fachbereich Biologie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
- SCHMITT-JOHN, T. AND ENGELS, J.W. (1992)** Promoter construction for efficient secretion expression in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 493-498.
- SETTLES, A.M.,** YONETANI, A., BARON, A., BUSH, D., CLINE, K., MARTIENSSEN, R. (1997) Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science*, **278**, 1467-1470.
- SHARECK, F.,** BIELY, P., MOROSOLI, R., KLUEPFEL, D. (1995) Analysis of DNA flanking the *xlnB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene*, **153**, 105-109.
- SHARP, P.M.,** Tuohy, T.M.F., Mosurski, K. (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucl. Acids Res.*, **14**, 5125-5143.
- SHIELDS, D.C.,** SARP, P.M., HIGGINS, D.G., WRIGHT, F. (1988) "Silent sites" in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Mol. Biol. Evol.*, **5**, 283-285.
- SNYDER, G.H.,** CENNERAZZO, M.J., KARALIS, A.J., FIELD, D. (1981) Electrostatic influence of local cysteine environments on disulfide exchange kinetics. *Biochemistry*, **20**, 6509.

- SONNHAMMER, E.L.L., VON HEIJNE, G., KROGH, A. (1998)** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In: J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff and C. Sensen, editors, *Proceedings of the sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 175-182, Menlo Park, CA. AAAI Press.
- STEINER, V., KNECHT, R., BÖRNSEN, K.O., GASSMANN, E., STONE, S.R., RASCHDORF, F., SCHLAEPI, J.-M., MASCHLER, R. (1992)** Primary structure and function of novel O-glycosylated hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Biochemistry*, **31**, 2294-2298.
- STEWART, E.J., ÅSLUND, F. BECKWITH, J. (1998)** Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.*, **17**, 5543-5550.
- STONE, S.R. AND HOFSTEENGE, J. (1986)** Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, **25**, 4622-4628.
- STROHL, W. R. (1992)** Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 961-974.
- STRUBE, K.-H., KRÖGER, B., BIALOJAN, S., OTTE, M., DODT, J. (1993)** Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. An anticoagulant peptide from the Indian leech *J. Biol. Chem.*, **268**, 8590-8595.
- STRUCK, J.C., VOGEL, D.W., ULBRICH, N., ERDMANN, V.A. (1988)** The *Bacillus subtilis* scRNA is related to the 4.5S RNA from *Escherichia coli*. *Nucleic Res.*, **16**, 2719.
- SUN, J., KELEMEN, G.H., FERNÁNDEZ-ABALOS, J.M., BIBB, M.J. (1999)** Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, **145**, 2221-2227. (integr. Vektor)
- TAGUCHI, S., NISHIYAMA, K., KUMAGAI, I., MOMOSE, H., MIURA, K. (1991)** Relationship between utilization of dual translational initiation signals and protein processing in *Streptomyces*. *Mol. Gen. Genet.*, **226**, 328-31.
- TAGUCHI, S., YOSHIDA, Y., KUMAGAI, I., MIURA, K., MOMOSE, H. (1993)** Effect of downstream message secretory structure on the secretory expression of *Streptomyces* subtilisin inhibitor. *FEMS Microbiol. Lett.*, **107**, 185-190.
- THANNHAUSER, T.W., ROTHWARF, D.M., SCHEREGA, H.A. (1997)** Kinetic studies of the regeneration of a recombinant hirudin variant with oxidized and reduced dithiothreitol. *Biochemistry*, **36**, 2154-2165.

- TSCHANTZ, W.R., SUNG, M., DELGADO-PARTIN, V.M., DALBEY, R.E. (1993)** A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the *Escherichia coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 27349-27354.
- UEDA, Y., TAGUCHI, S., NISHIYAMA, K., KUMAGAI, I., MIURA, K. (1993)** Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1172**, 262-266.
- VALENT, Q.A., KENDALL, D.A., HIGH, S., KUSTERS, R., OUDEGA, B., LUIRINK, J. (1995)** Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *EMBO J.*, **14**, 5494-5505.
- VAN DIJL, J.M., DE JONG, A., VEHEMAANPERÄ, J., VENEMA, G., BRON, S. (1992)** Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases. *EMBO J.*, **11**, 2819-2828.
- VAN DIJL, J.M., DE JONG, A., VENEMA, G., BRON, S. (1995)** Identification of the potential active site of the signal peptidase SipS of *Bacillus subtilis*: structural and functional similarities with LexA-like proteases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3611-3618.
- VAN MELLAERT, L., MEI, L., LAMMERTYN, S., SCHACHT, S., ANNÉ, J. (1998)** Site-specific integration of bacteriophage VWB genome into *Streptomyces venezuelae* and construction of a VWB-based integrative vector. *Microbiology*, **144**, 3351-3358.
- VÉRTESY, L., OEDING, V., BENDER, R., ZEPF, K., NESEMANN, G. (1984)** Tendamistat (Hoe-467), a tight-binding α -amylase inhibitor from *Streptomyces tendae* 4158. *Eur. J. Biochem.*, **141**, 505-512.
- VÉRTESY, L. AND TRIPIER, D. (1985)** Isolation and structure elucidation of an α -amylase inhibitor, AI-3688, from *Streptomyces aureofaciens*. *FEBS*, **185**, 187-190.
- VIGAL, T., GIL, J.A., DAZA, A., GARCIA-GONZALES, M.D., VILLADAS, P., MARTIN, J.F. (1991)** Effects of replacements of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of alpha-amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.*, **231**, 88-96.
- VOLFF, J.-N. AND ALTENBUCHNER, J. (1998)** Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome. *Mol. Microbiol.*, **27** (2), 139-246.
- VON HEIJNE, G. (1983)** Patterns of amino acids near signal sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.*, **133**, 17-21.

- VON HEIJNE, G. (1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol.*, **173**, 243-251.
- VON HEIJNE, G. (1986) The N-C imbalance may be important for signal sequence function in bacteria. *J. Mol. Biol.*, **192**, 287-290.
- VON HEIJNE, G. AND ABRAHMSEN, L. (1989) Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.*, **244**, 439-446.
- WATANABE, M AND BLOBEL, G. (1989) High-affinity binding of *Escherichia coli* SecB to the signal sequence region of a presecretory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10133-10136.
- 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**, 141-146.
- WEYDEMANN, U., KEUP, P., PIONTEK, M., STRASSER, A.W.M., SCHWEDEN, J., GELLISSEN, G., JANOMICZ, Z.A. (1995) High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha*. Authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 377-385.
- WITTMANN, S., SHARRECK, F., KLUEPFEL, D., MOROSOLI, R. (1994) Purification and characterization of the CelB endoglucanase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (5), 1701-1703.
- WOJCZEWSKI, S. (1999) Heterologe Genexpression in *Streptomyces lividans*. Dissertation, Fachbereich Chemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main
- WOYCECHOWSKY, K.J., WIITRUP, K.D., RAINES, RT. (1999) A small-molecule catalyst of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Chemistry & Biology*, **6**, 871-879.
- WRIGHT, F. AND BIBB, M.J. (1992) Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene*, **113**, 55-65.
- WUNDERLICH, M. AND GLOCKSHUBER, R. (1993) Redox properties of protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.*, **2**, 717-726.
- WUNDERLICH, M., OTTO, A., SECKLER, R., GLOCKSHUBER, R. (1993) Bacterial protein disulfide isomerase: efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry*, **32**, 12251-12256.

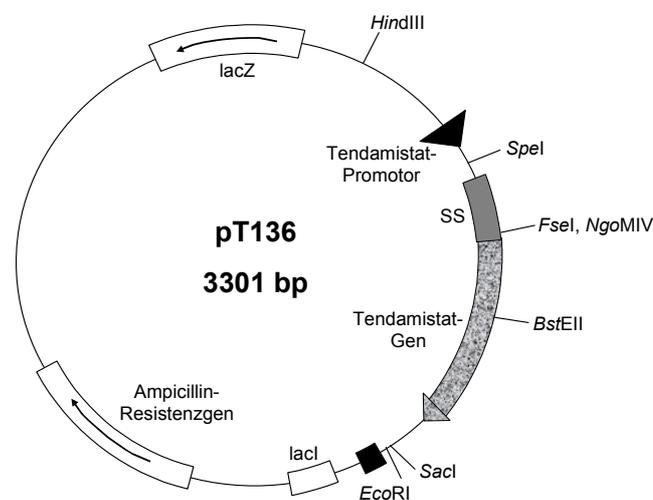
- WUNDERLICH, M. AND GLOCKSHUBER, R. (1994)** Katalyse von Disulfid-Austauschreaktionen und oxidativer Proteinfaltung durch Protein-Disulfidisomerase. *GIT*, **4**, 262-270.
- YANISCH-PERRON, C., VIERA, J., MESSING, J. (1985)** Improved M13 phage coding vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA, J. AND SCHREMPF, H. (1992)** Characterization of an autonomously replicating region from the *Streptomyces lividans* chromosome. *J. Bacteriol.*, **174**, 2688-2693.
- ZAPUN, A., MISSIAKAS, D., RAINA, S., CREIGHTON, T.E. (1995)** Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **30**, 5075-5089.
- ZANG, R.M. AND SNYDER, G.H. (1989)** Dependence of formation of small disulphide loops in two-cysteine peptides on the number and types of intervening amino acids. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18472-18478.
- Patentschrift zur Produktion von rekombinantem Hirudin, Publikationsnummer: 0 576 792 A2 (1994)

2 Plasmidkarten

pT136

Klonierungsplasmid für alle Tendamistat- und Thioredoxin-Vektoren

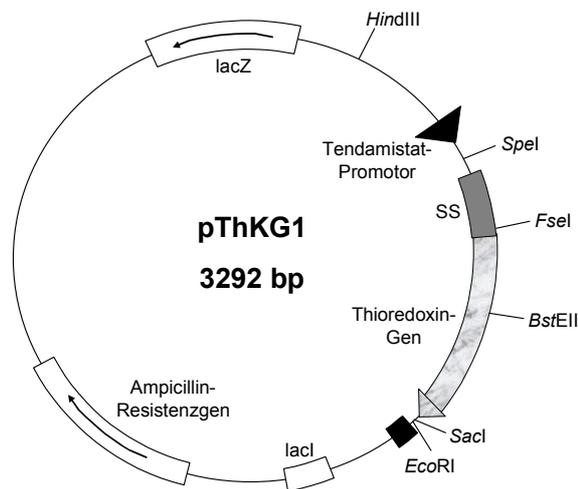
Das Plasmid pT136 [SCHMITT-JOHN, 1991] ist als Derivat von pUC18 ein *E. coli*-Vektor mit einer Ampicillin-Resistenz. Das Plasmid enthält das über *EcoRI* und *HindIII* inserierte Tendamistat-Genfragment. Im nicht-codierenden 5'-Bereich des Tendamistatgens ist eine *SpeI*-Schnittstelle generiert worden, die den Austausch des gesamten Tendamistat-Fragments in den Expressionsvektor erlaubt.



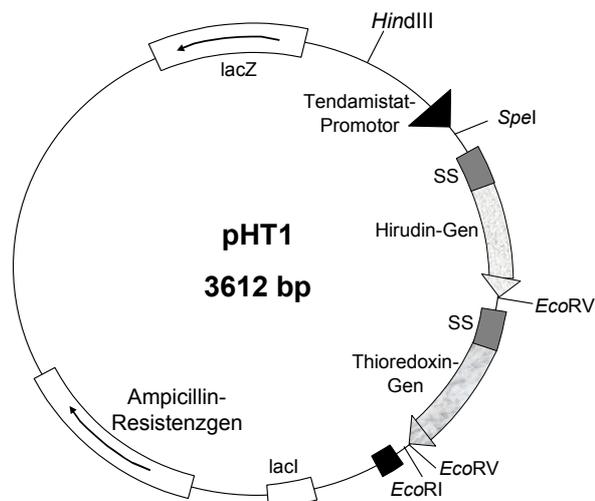
- pTKG1 (3301 bp) aus pT136. Zusätzliche *PfIF* I-Schnittstelle zu Beginn des Tendamistatgens.
- pTKG2 (3334 bp) aus pTKG1. Tendamistat-SS gegen Axe A-SS (zwischen *SpeI* und *NgoMIV*) ausgetauscht. Zusätzliche *Fsp* I-Schnittstelle innerhalb der SS.
- pTKG2-L aus pTKG2. Linkeraustausch zwischen *NgoMIV* und *PfIF*, Erzielen des natürlichen C-Terminus des SS.
- pTKG3 (3331 bp) aus pTKG1. Tendamistat-SS gegen Cel B-SS (zwischen *SpeI* und *NgoMIV*) ausgetauscht.
- pTKG3-L aus pTKG3. Linkeraustausch zwischen *NgoMIV* und *PfIF*, Erzielen des natürlichen C-Terminus des SS.
- pTKG4 (3301 bp) aus pTKG1. Tendamistat-SS gegen Chi C-SS (zwischen *SpeI* und *NgoMIV*) ausgetauscht. Zusätzliche *SacII*-Schnittstelle innerhalb der SS.
- pTKG4-L aus pTKG4. Linkeraustausch zwischen *NgoMIV* und *PfIF*, Erzielen des natürlichen C-Terminus des SS.
- pTKG5 (3295 bp) aus pTKG1. Tendamistat-SS gegen Snp A-SS (zwischen *SpeI* und *NgoMIV*) ausgetauscht. Zusätzliche *Fspl*-Schnittstelle innerhalb der SS.

pThKG1**Klonierungsplasmid mit Tendamistat-SS und Thioredoxingen**

Basierend auf pT136. Auch genutzt als PCR-Templat für die Generierung der CXXC-Fragmente und des Thioredoxin-Fragmentes, welches in pIJ8600 kloniert wurde.

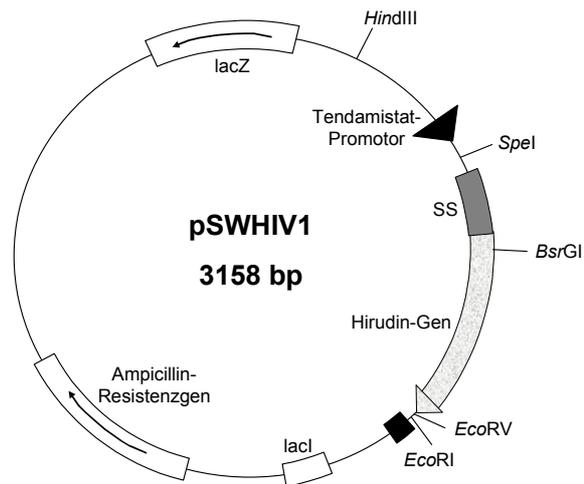
**pHT1****Klonierungsplasmid mit dem bicistronischen Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt**

Basierend auf pSHWIV1. Auch genutzt als PCR-Templat für die Generierung des Hirudin/Thioredoxin-Fragmentes, welches in pIJ8600 einkloniert werden sollte.



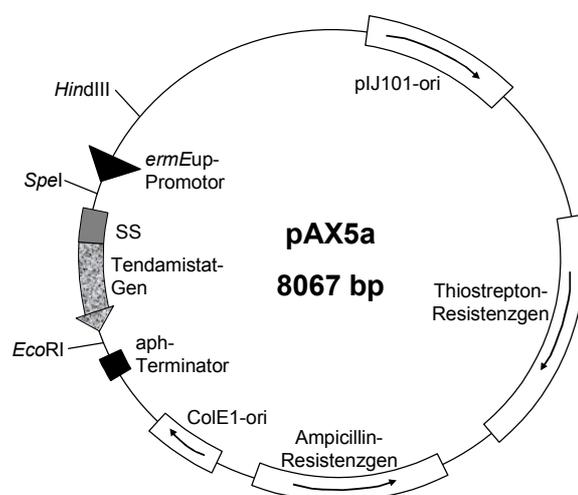
pSHWIV1**Klonierungsplasmid / Ausgangsplasmid für das bicistronische Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt**

Enthält die Gensequenz für Hirudin nach der *S. lividans*-codon usage. Bis auf die Sequenz zwischen *SpeI* und *EcoRI* identisch zu pT136. Auch genutzt als PCR-Templat für die Generierung Hirudin-Fragmentes, welches in pIJ8600 kloniert wurde.



pAX5a**Expressionsplasmid, analog zu allen Expressionsplasmiden dieser Arbeit**

Bei den pAX-Vektoren handelt es sich um *E. coli*/*S. lividans*-Schaukelvektoren, deren Ursprungsvektor das *E. coli*-Plasmid pUC19 und der *Streptomyces*-Vektor pIJ702 sind. In pAX5a ist die promotorlose Tendamistat-Wildtypsequenz durch einen *ermEup*-Promotor aus *Saccharopolyspora erythraea* ergänzt worden. Alle anderen Expressionsplasmide beruhen auf pAX5a, die ausgetauschten Sequenzen befinden sich innerhalb der Region von *SpeI* bis *EcoRI*.

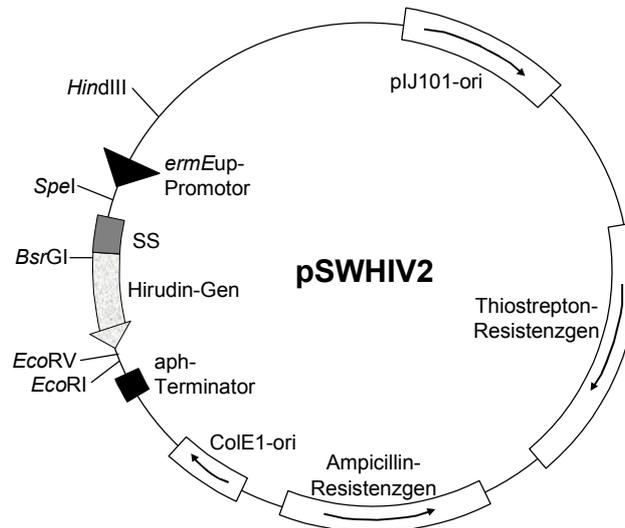


- pTKG100 *SpeI/EcoRI*-Genfragment aus pTKG1 in pAX5a einkloniert.
 pTKG102 *SpeI/EcoRI*-Genfragment aus pTKG2-L in pAX5a einkloniert.
 pTKG103 *SpeI/EcoRI*-Genfragment aus pTKG3-L in pAX5a einkloniert.
 pTKG104 *SpeI/EcoRI*-Genfragment aus pTKG4-L in pAX5a einkloniert.
 pTKG105 *SpeI/EcoRI*-Genfragment aus pTKG5 in pAX5a einkloniert.

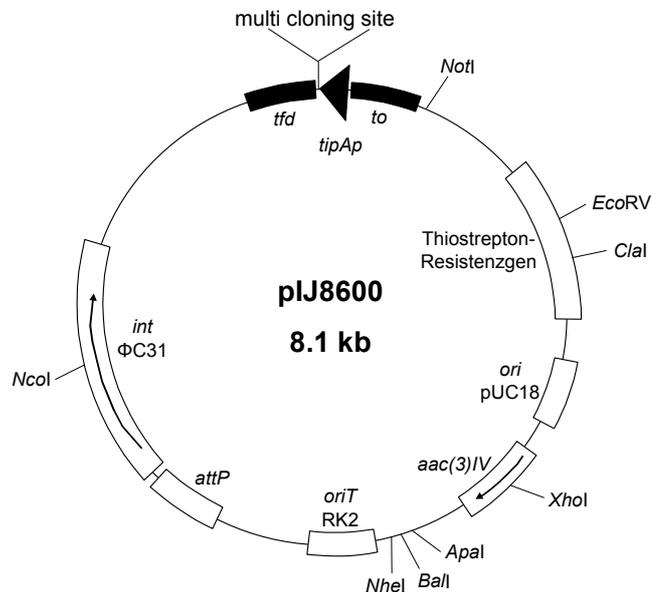
- pThGH Veränderung des CXXC-Motivs in pTHKG100 durch PCR zu CGHC
 pThGY Veränderung des CXXC-Motivs in pTHKG100 durch PCR zu CGYC
 pThPH Veränderung des CXXC-Motivs in pTHKG100 durch PCR zu CPHC

pSWHIV2 Expressionsplasmid mit der Hirudinsequenz

Basierend auf pAX5a. In dieses Plasmid wurden direkt die PCR-Signalsequenz-Fragmente einkloniert.



- pHAxeA In pSWHIV2 Tendamistat-SS gegen Axe A-SS (zwischen *SpeI* und *BsrGI*) ausgetauscht.
- pHCeIB In pSWHIV2 Tendamistat-SS gegen Cel B-SS (zwischen *SpeI* und *BsrGI*) ausgetauscht.
- pHChiC In pSWHIV2 Tendamistat-SS gegen Chi C-SS (zwischen *SpeI* und *BsrGI*) ausgetauscht.
- pHSnpA In pSWHIV2 Tendamistat-SS gegen SnpA-SS (zwischen *SpeI* und *BsrGI*) ausgetauscht.

pIJ8600**Plasmid zur Integration von Gensequenzen ins *Streptomyces*-Genom**

MCS : GAGAAGAAGGGAGCGGACATATGAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGA

*Bam*HI *Sma*I *Kpn*I *Sac*I *Eco*RI *Bgl*II
 GGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCCCAGATCT

int ϕ C31 → Integrasegen des Phagen ϕ C31

att P → attachment site des Phagen ϕ C31

*ori*T RK2 → origin of transfer des Plasmids RK2

aac(3)IV → Apramycin-Resistenzgen in *E. coli* und *Streptomyces*

to → Transkriptionsterminator des Phagen λ

*tip*Ap → *tipA* Promotor

tfd → Haupt-Transkriptionsfaktor des Phagen fd

pInHir1 aus pIJ8600, Tendamistat-SS plus Hirudingen zwischen *Xba*I / *Nde*I einkloniert.

pInTh1 aus pIJ8600, Tendamistat-SS plus Thioredoxingen zwischen *Xba*I / *Nde*I einkloniert. Insert aus pThKG100 amplifiziert.

3 DNA-Sequenzen

Tendamistat (in pT136)

SpeI

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC M R V R A L R L A A L V
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCTTCCACTTGGCGG TAC GCG CAT GCC CGT GAA GCT GAA CGC CGC GAC CAC

← Signalsequenz

NgoMIV

649 GGT GCG GGC GCC GCA CTC GCC CTG TCT CCC CTC GCG GCC GGG CCG GCC TCC GCC GAC ACG ACC GTG
 CCA CGC CCG CGG CGT GAG CGG GAC AGA GGG GAG CGC CGG CCC GGC CGG AGG CGG CTG TGC TGG CAC

Signalsequenz → ← Tendamistat-

715 TCC GAG CCC GCA CCC TCC TGC GTG ACG CTC TAC CAG AGC TGG CGG TAC TCA CAG GCC GAC AAC GGC
 AGG CTC GGG CGT GGG AGG ACG CAC TGC GAG ATG GTC TCG ACC GCC ATG AGT GTC CGG CTG TTG CCG

Strukturgen

BstEII

781 TGT GCC GAG ACG GTG ACC GTG AAG GTC GTC TAC GAG GAC GAC ACC GAA GGC CTG TGC TAC GCC GTC
 ACA CGG CTC TGC CAC TGG CAC TTC CAG CAG ATG CTC CTG CTG TGG CTT CCG GAC ACG ATG CGG CAG

847 GCA CCG GGC CAG ATC ACC ACC GTC GGC GAC GGC TAC ATC GGC TCG CAC GGC CAC GCC CGC TAC CTC
 CGT GGC CCG GTC TAG TGG TGG CAG CCG CTG CCG ATG TAG CCG AGC GTG CCG GTG CGG GCG ATG GAG

Tendamistat-

913 GCT CGC TGC CTT TAG CCCACAGCCGCCTTACGCGGGCGCTGCTCCTCGGCGTCCGCGGGCGCAGCCCGCGTCTGGTCCGGCGC
 CGA GCG ACG GAA ATC GGGTGTGCGGGGAAGTGCAGCCGCGACGAGGAGCCGAGGCGCCCGTCTGGGCGCAGCACCGCCGCG

Strukturgen →

SacI EcoRI

995 CGAGCGAGGTCCACCACGCTTCGACGAGCGGGCCCTCCACGTCCGCGCGGACGGCGAGCTCGAATTCGTAATCA
 GCTCGCTCCAGGTGGTCGCAAGCGTCGTCGCCGCGAGGTGCAGGCGCGCCTGCCGCTCGAGCTTAAGCATTAGT

Thioredoxin

TrxA aus Cosmid H24 aus *S. coelicolor* (8080 – 7681) (Sanger-Datenbank)

Länge des Gens: 332 bp

ccacccccatc cccccgacca accagtttagg agccccgccGT GGCCCGCACC CTGAAGCATG TGAAGTACGA CTCCTTCGAG
 ggtgggtag ggggctggt tggtaaatcc tcgggcgca CCGGCCGTGG GACTTCGTAC ACTGACTGCT GAGGAAGCTC

Q D V L K N D K P V L V D F W A A W C G P C R Q I A P
 CAGGACGTC TCAAGAACGA CAAGCCCGTC CTGGTGGACT TCTGGGCCGC CTGGTGCGGT CCGTGCCGCC AGATCGCGCC
 GTCCTGCAGG AGTTCCTGCT GTTCGGGCAG GACCACCTGA AGACCCGGCG GACCACGCCA GGCACGGCGG TCTAGCGCGG

S L E A I A A E Y G D K I E I V K L N I D E N P G T
 GTCCCTCAGG GCCATCGCCG CCGAGTATGG CGACAAGATC GAGATCGACA AGCTGAACAT CGACGAGAAC CCGGGTACGG
 CAGGGAGCTC CCGTAGCGGC GGCTCATAAC GCTGTCTTAG CTCTAGCAGT TCGACTTGTA GCTGCTCTTG GGCCATGCC

A A K Y G V M S I P T L N V Y Q G G E V A K T I V G A
 CCGCCAAGTA CCGCGTCATG TCCATCCCGA CCCTGAACGT CTACCAGGGT GGCGAGGTCG CCAAGACCAT CATCGGTGCG
 GGCGGTTTCC GCCGAGTAC AGGTAGGGCT GGGACTTGCA GATGGTCCCA CCGCTCCAGC GGTTCTGGTA GCAGCCACGC

K P K A A I V R D L E D F I A D STOP
 AAGCCGAAG CCGCGATCGT CCGCGACCTC GAGGACTTCA TCGCCGACTG Acgtttcacg tgaaacacga atgggcccac
 TTCGGCTTCC GCGCTAGCA GGCGTGGAG CTCCTGAAGT AGCGGCTGAC Tgcaaagtgc actttgtgct taccggctg

Hirudin (in pSWHIV1, korrigierte Sequenz mit ValValTyrThr)

Spel

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC ATG CGC GTA CGG GCA CTT CGA CTT GCG GCG CTG GTG
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCTTCCACTTGGCGG TAC GCG CAT GCC CGT GAA GCT GAA CGC CGC GAC CAC

← Signalsequenz

NgoMIV

BsrGI

649 G A G A A L A L S P L A A G P A S A V V Y T
 GGT GCG GGC GCC GCA CTC GCC CTG TCT CCC CTC GCG GCC GGG CCG GCC TCC GCC GTC GTG TAC ACC
 CCA CGC CCG CGG CGT GAG CGG GAC AGA GGG GAG CGC CGG CCC GGC CGG AGG CGG CAC CAC ATG TGG

Signalsequenz → ← Hirudin-

715 D C T E S G Q N L C L C E G S N V C G Q G N
 GAC TGC ACC GAG TCG GGC CAG AAC CTG TGC CTG TGC GAG GGC AGC AAC GTC TGC GGG CAG GGG AAC
 CTG ACG TGG CTC AGC CCG GTC TTG GAC ACG GAC ACG CTC CCG TCG TTG CAG ACG CCC GTC CCC TTG

Strukturgen

781 K C I L G S D G E K N Q C V T G E G T P K P
 AAG TGT ATC CTC GGA TCC GAC GGC GAG AAG AAC CAG TGT GTC ACC GGC GAG GGG ACC CCG AAG CCC
 TTC ACA TAG GAG CCT AGG CTG CCG CTC TTC TTG GTC ACA CAG TGG CCG CTC CCC TGG GGC TTC GGG

847 Q S H N D G D F E E I P E E Y L Q STP STP EcoRV EcoRI
 CAG TCC CAC AAC GAC GGC GAC TTC GAG GAA ATC CCC GAG GAA TAC CTG CAG TGA TGA GATATCGAATTC
 GTC AGG GTG AAG CTG CCG CTG AAG CTC CTT TAG GGG CTC CTT ATG GAC GTC ACT ACT CTATAGCTTAAG

Hirudin-Strukturgen →

Hirudin/Thioredoxin-Konstrukt (in pHTh1)

847 Q S H N D G D F E E I P E E Y L Q STP STP EcoRV
 CAG TCC CAC AAC GAC GGC GAC TTC GAG GAA ATC CCC GAG GAA TAC CTG CAG TGA TGA GATATCTCTCAGG
 GTC AGG GTG AAG CTG CCG CTG AAG CTC CTT TAG GGG CTC CTT ATG GAC GTC ACT ACT CTATAGCTTAAGC

Hirudin-Strukturgen →

M R V R A L R L A A L V G A G A A L A
 AAGGTGAACCGCC ATG CGC GTA CGG GCA CTT CGA CTT GCG GCG CTG GTG GGT GCG GGC GCC GCA CTC GCC
 TTCCACTTGGCGG TAC GCG CAT GCC CGT GAA GCT GAA CGC CGC GAC CAC CCA CGC CCG CGG CGT GAG CGG

L S P L A A G P A S A M A G T L K H V T D D
 CTG TCT CCC CTC GCG GCC GGG CCG GCC TCC GCC GTG GCC GGC ACC CTG AAG CAT GTG ACT GAC GAC
 GAC AGA GGG GAG CGC CGG CCC GGC CGG AGG CGG CAC CGG CCG TGG GAC TTC GTA CAC TGA CTG CTG

Signalsequenz → ← Thioredoxin-Strukturgen

S F E Q D V L K N D K P V L V D F W A A W C
 TCC TTC GAG CAG GAC GTC CTC AAG AAC GAC AAG CCC GTC CTG GTG GAC TTC TGG GCC GCC TGG TGC
 AGG AAG CTC GTC CTG CAG GAG TTC TTG CTG TTC GGG CAG GAC CAC CTG AAG ACC CGG CGG ACC ACG

G P C R Q I A P S L E A I A A E Y G D K I E
 GGT CCG TGC CGC CAG ATC GCG CCG TCC CTC GAG GCC ATC GCC GCC GAG TAT GGC GAC AAG ATC GAG
 CCA GGC ACG GCG GTC TAG CGC GGC AGG GAG CTC CGG TAG CGG CGG CTC ATA CCG CTG TTC TAG CTC

I V K L N I D E N P G T A A K Y G V M S I P
 ATC GAC AAG CTG AAC ATC GAC GAG AAC CCG GGT ACG GCC GCC AAG TAC GGC GTC ATG TCC ATC CCG
 TAG CAG TTC GAC TTG TAG CTG CTC TTG GGC CCA TGC CGG CGG TTC ATG CCG CAG TAC AGG TAG GGC

T L N V Y Q G G E V A K T I V G A K P K A A
 ACC CTG AAC GTC TAC CAG GGT GGC GAG GTC GCC AAG ACC ATC ATC GGT GCG AAG CCG AAG GCC GCG
 TGG GAC TTG CAG ATG GTC CCA CCG CTC CAG CGG TTC TGG TAG CAG CCA CGC TTC GGC TTC CGG CGC

I V R D L E D F I A D STP STP EcoRV EcoRI
 ATC GTC CGC GAC CTC GAG GAC TTC ATC GCC GAC TGA TGA CCGATATCGAATTCGTAATCATG
 TAG CAG GCG CTG GAG CTC CTG AAG TAG CGG CTG ACT ACT GGCTATAGCTTCCGCATTAGTAC

Thioredoxin-Strukturgen →

4 Sequenzen der eingesetzten Signalpeptide

Acetylxyylan Esterase Axe A (in pTKG2-L)

Signalsequenz: 41 Aminosäuren, Nettoladung +4

Spel

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC M R T S T G P R A S S R
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCCTTCCACTTGGCGG TAC GCA TGG TCA TGG CCT GGT GCG CGC AGG AGC GCG

649 T L R T L A S G V A V T A L A A A G T V A A
 ACC CTG GCG ACC CTG GCT TCC GGC GTC GCC GTC ACC GCG CTC GCC GCC GCG GGC ACG GTG GCG GCC
 TGG GAC GCG TGG GAC CGA AGG CCG CAG CGG CAG TGG GCG GAG CGG CGG CGC CCG TGC CAC CGC CGG

NgoMIV PfIF1
 G A A P A Q A ↓ Tendamistat _____
 715 GGC GCC GCG CCG GCC CAG GCC GAC ACG ACC GTG TCC
 CCG CGG GCG GGC CGG GAC CGG CTG TGC TGG CAC AGG

β-1,4-Endoglucanase CelB (in pTKG3-L)

Signalsequenz: 40 Aminosäuren, Nettoladung +4

Spel

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC M R T L R P Q A R A P R
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCCTTCCACTTGGCGG TAC GCT TGC AAT GCC GGG GTC CGG GCG CGG GGC GCG

649 G L L A A L G A V L A A F A L V S S L V T A
 GGC CTC TTG GCG GCC CTG GGC GCG GTC TTA GCG GCC TTC GCC CTC GTG TCG TCC CTG GTG ACA GCC
 CCG GAG AAC CGC CGG GAC CCG CGC CAG AAT CGC CGG AAG CGG GAG CAC AGC AGG GAC CAC TGT CGG

NgoMIV PfIF1
 A A P A Q A ↓ Tendamistat _____
 715 GCC GCG CCG GCC CAG GCG/GAC ACG ACC GTG TCC
 CCG CGG GGC CGG GTC CGC CTG TGC TGG CAC AGG

Chitinase ChiC (in pTKG4-L)

Signalsequenz: 30 Aminosäuren, Nettoladung +3

Spel

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC M R F R H K A A A L A A
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCCTTCCACTTGGCGG TAC GCG AAG TCT GTG TTT CGG CGC CGT GAG CGT CGC

649 T L A L P L A G L V G L A S P A Q A ↓ Tendamistat _____
 ACC CTG GCG CTT CCC CTC GCC GGT CTG GTC GGC CTC GCG TCG CCG GCC CAG GCG/GAC ACG ACC GTG
 TGG GAC GCG GAA GGG GAG CGG CCA GAC CAG CCG GAG CGC AGC GGC CGG GTC CGC CTG TGC TGG CAC

Proteinase (in pTKG5)

Signalsequenz: 28 Aminosäuren, Nettoladung +1

Spel

585 TTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCC M R M P L S V L T A A G
 AAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCCTTCCACTTGGCGG TAC GCG TAC GGG GAC AGG CAA GAG TGG CGG CGG CCT

649 l S L A T L G L G T A G P A S A ↓ Tendamistat _____
 CTG AGC CTG GCG ACC CTC GGT CTC GGC ACC GCC GGG CCG GCC TCG GCG/GAC ACG ACC GTG TCC
 GAC TCG GAC CGC TGG GAG CCA GAG CCG TGG CGG CCA GGC CGG AGC CGC CTG TGC TGG CAC AGG

5 Signalsequenzen sekretorischer Proteine aus Streptomyces

exprimiertes Protein (Lad./Länge, Cysteine im Protein)	Signalpeptid	Protein
<i>S. lividans</i> : Cellulase A +2/27 6 Cys	LKRLAL LATGVSIVGL TALAGPPAQA	ATGCKA
<i>S. halstedii</i> JM8: Endo- β -1,4-glucanase celA1 +3/27 4 Cys	MSRKLRT LMAALCALPL AFAAAPPAHA	ADPTTM
<i>S. sp.</i> KSM-9: Cellulase CasA +8?/70	MENPRTP TPLRRRRSER RARGGRVLTAL TGVTLLAGL AIAPATGAS PSPAPPASPA PSADSGTADA	GTTALP
<i>S. lividans</i> 66: β -1,4-Endoglucanase CelB +4/40 6 Cys	MRTLRPQARA PRGLLAALGA VLAALFVSS LVTAAPAQA	DTTICE
<i>S. rochei</i> A2: Endoglucanase EglS +4/37 6 Cys	MPRLRHH PRTLRAVSAA LLTALAALAA LLTATAPAQA	DTTICE
<i>S. lividans</i> : Xylanase A (xlnA) +4/41 10 Cys	M GSYALPRSGV RRSIRVLLAA LVGVLTAT ALIAPPGAHA	AESTLG
<i>S. lividans</i> : Xylanase B (xlnB) +7/40 1 Cys	MNLLVQPRRR RRGVPTLLVR SAWAVALARS PLMLPGTAQA	DTVVTT
<i>S. lividans</i> : Xylanase B (xlnB) +6/41 1 Cys	M NLLVQPRRRR RGPVPTLLVRS AWAVALAALA ALMLPGTAQA	DTVVTT
<i>S. lividans</i> : Xylanase C (xlnC) +2/49 2 Cys	MQQDGTQQD RIKQSPAPLN GMSRRGFLGG AGTLALATAS GLLLPGTAHA	ATTITT
<i>S. sp.</i> 36A: Xylanase +1/50	MNQDQKRYES EQNPPPFSGL SRRGFLVGAG AGAAAAGVGS GLLLPGTAAHA	A
<i>S. lividans</i> : α -Amylase +6/33 3Cys	MPA TRRTARVRRV AAVTVALAA ALLPPLAARA	DTPPAP
<i>S. venezuelae</i> : α -Amylase +2/28	MARKTVAA ALALVAGAAV AVTGNAPAQA	VPPGEK
<i>S. limosus</i> : α -Amylase +1/28 8 Cys	MARRLATA SLAVLAAAAT ALTAPTPAAA	APPGAK
<i>S. hygroscopicus</i> : α -Amylase +2/30 6 Cys	MQQRSRVLGG TLAGIVAAAA ATVAPWPSQA	TPPGQA
<i>S. griseus</i> : α -Amylase +2/28	MARRLATA SLAVLAAAAT ALTAPTPAAA	A
<i>S. thermoviolaceus</i> CUB74: α -Amylase +1/21 8 Cys	M ASRTLSGALA LAAAATAVLAP	APATVA
<i>S. sp.</i> WL6: α -Amylase +2/31 6 Cys	M QHRFRLIGGT LAGVLTAVAGL TTLAPWQSQA	TPPGEK
<i>S. sp.</i> R61: DD-Peptidase/Penic.-binding Protein +1/31 2 Cys	M VSGTVGRGTA LGAVLLALLA VPAQAGTAAA	ADLPAP
<i>S. sp.</i> K15: DD-Peptidase +3/29	VRLRRAAAT VITGALLAA GTLGATPATA	VTKPTI
<i>S. albogriseolus</i> S-3253: Subtilisin-Inhibitor +2/31 4 Cys	M RNTGAGSPSPS VSRPPSAAP LSGAALA/APG	DAPSAL*
<i>S. lividans</i> : Trypsin-Inhibitor STI-1 +2/35 4 Cys	MRNTA RWAATLGLTA TAVCGPLAGA SLASPATAPA	SLYAPS
<i>S. longisporus</i> : Trypsin-Inhibitor STI-2 +2/28 4 Cys	MRNTARWA ATLALTATAV CGPLTGAALA	TPAAAP*
<i>S. griseus</i> : Trypsin SGT +4/32 6 Cys	MK HFLRALKRCS VAVATVAIV VGLQPVTASA	APNP*
<i>S. fradiae</i> : Trypsin SFT +4/34 6 Cys	MQLK NTLVRALKRP AAVGAVVLA VSLQPTSASA	APAP*
<i>S. erythraeus</i> : Trypsin-like Protease +4/30 6 Cys	MTRGSRRLAR LAGVTAVALS AFAAASVANA	TPAPPS*
<i>S. griseus</i> : Protease A sprA (SS87C) +4/38 wahrsch. 4 Cys	MTFKRFSP LSSTSRYARL LAVASGLVAA AALATPSAVA	APEAE*
<i>S. griseus</i> : Protease B sprB +7/38 wahrsch. 4 Cys	MRIKRTSN RSNAARRVRT TAVLAGLAAV AALAVPTANA	ETPRTF*
<i>S. griseus</i> : Protease C sprC +3/40 7 Cys	MERTTLRRA LVAGTATVAV GALALAGLTG VASADPAATA	APPV* [*]
<i>S. griseus</i> : Protease D sprD +17/64 4 Cys	MCV S RRRNSGRPIL RVRAPHLLRA RPHRRSKLKH RRISRKRATL AGSAVVALVA AGFTFQTANA	SDDVP*
<i>S. sp.</i> C5: Proteinase +1/28 2 Cys	MRMPLSVL TAAGLSLATL GLGTAGPASA	TPTAEG*
<i>S. fradiae</i> ATCC 14544: Proteinase SFase +4/29 4 Cys	MRRTTRART GLSALLLAAS LGLGAAPAGA	DAPQR*
<i>S. cacaoi</i> : Metalloprotease +3/34 6 Cys	MPMF RIRLPKPAAL IAAGGIGACI ATVAVPSAYA	AAPA*
<i>S. cacaoi</i> : β -Lactamase -1/24	(V)ACG QASGSESGQQ PGLGGCGTSA	HGSADA
<i>S. albus</i> : β -Lactamase +4?/39	VHPSTSRPS RRTLLTATAG AALAAATLVP GTAHASSGGR	GH
<i>S. cellulosa</i> : β -Lactamase +4/33?/36? 4 Cys	MRK PTSSLTRRSV LGAGLGLGGA LALGSTTASA	ASA/ASAG
<i>S. lividans</i> 66: Tripeptidyl-Amino-peptidase +5/39 8 Cys	MRKSSIRRR ATAFGTAGAL VTATLIAGAV SAPAASAAPA	DGHGHG
<i>S. lividans</i> : β -Galactosidase +5/56	MMPHSPV SPAESPAPQP GRPRPVVSR RLLGGAAVL GALALSASPL TAQAAVRRAA	ADEPPE
<i>S. sp.</i> SA-COO: Cholesteroloxidase (choB) +4/45 4 Cys	VTAQQ HLSRRRMLG MAAFGAAALA GGTTIAAPR AAAAAKSAA	APSRTL
<i>S. sp.</i> SA-COO: Cholesteroloxidase +5/42	VT ANNLSRRRM LGMAAFGAAA LAGGTTIAAP RAAAAKSAA	?
<i>S. sp.</i> M11: Lipase +5/48 2 Cys	MPQHLLPA RRQAARPSRP RLTGLLAAA AATAGLLSG LAPGAQAAAA	AANPYE
<i>S. cinnamomeus</i> : Lipase +4/30 6 Cys	MRLRRTVRFL IAAAATAALG LTGLSAPAAA	SVLDVP
<i>S. antibioticus</i> : Phospholipase D PLD +5/47 8 Cys	MTSDQRP ARLPTHKGL LAPHRLHRLI PVSVALTTVC AALPSSTAYA	ADTPPT
<i>S. antibioticus</i> : Tyronase ORF 438 +2/30	MPELTRRRAL GAAAVVAAGV PLVALPAAPA	DDRGHH
<i>S. antibioticus</i> : Tyrosinase ORF438 +4/40 0 Cys	MP?LTRRRAL GAAAVVAAGV PLVALPAARA	DDRGHH

<i>S. avidinii</i> : Streptavidin +2/24 0 Cys	MRKI VVAIAVSLT TVSITASASA	DPSKDS*
<i>S. vermezuelae</i> : Streptavidin-like biotin-binding Protein Sav1 +2/24 0 Cys	MRKI VVAIAVSLT TVSITASASA	DPSKDS*
<i>S. vermezuelae</i> : Streptavidin-like biotin-binding Protein Sav2 +2/24 0 Cys	MRKI VVAIAVSLT TVGITASASA	DPSKDS*
<i>S. scabies</i> : Esterase +4/39 6 Cys	MSSAMRKTT NSPUURRLTA AAVALGSCLA LAGPAGSAGA	APADPU
<i>S. diastatochromogenes</i> : Esterase +3/36 6Cys	MARFRT RLALLGSAAA LAAGAVVPAQ LAGAQPAAAA	ADLQWV
<i>S. lavendulae</i> H646-SY2: Cholesterol Esterase che +4/38 2 Cys	MSSQVRGG TRWKRFALVM VPSIAATAAV GVGLAQQGALA	ASFSVS
<i>S. lividans</i> : Acetylxylan Esterase AxeA +4/41 4 Cys	M RTSTGPRASS RTLRTLASGV AVTALAAAAGT VAAGAAPAQA	AACNGY
<i>S. olivaceoviridis</i> : Chitin-binding protein CHB1 +3/30 4 Cys	MRTRTKGLYA AAVGLATTGA LVVSSGGASG	HGYTDL
<i>S. clavuligerus</i> : β -Lactamase-Inhibitor BLIP +4/36 4 Cys	MRTVGI GAGVRRLLGRA VVMAAAVGG LGLSAGASNA	AGVMTG
<i>S. plicatus</i> : Chitinase 63 (SF6) +3/30	MRIRHKAAL AATLALPLAG LVGLASPAQA	ATSATA
<i>S. griseus</i> HUT 6037: Chitinase +2/29 6 Cys	MYRRVMSLL VALGAIVAAL IVLPATTAQA	ATCATA
<i>S. thermoviolaceus</i> OPC-520: Chitinase +2/41 6 Cys	M RFAHRAAAGF ATLLLPLGGL LGFSAAAQAA TDHSPTVETR	AAADNG
<i>S. lividans</i> 66: Chitinase chiA +6/36 6 Cys	VDPVRR RSRGRRLGSL TGAVTAALAL AFTAVGPASA	ADVNNA
<i>S. tendae</i> : α -Amylase-Inhibitor Tendamistat +3/30 4 Cys	MRVRALRLAA LVGAGAALAL SPLAAGPASA	DTTVSE
<i>S. nitrosporeus</i> : α -Amylase-Inhibitor T-76 +3/33 4 Cys	MTN RMKRISPALT LAATVAAGLM TLAAPSAAA	ATGAPA
<i>S. griseosporus</i> : α -Amylase-Inhibitor Haim II +2/37	M KRYVCSTFVA CVMVLCVIPA SGAAHEAVA	?EDAGNR
<i>S. sp.</i> N174: Cytosinase/Endoglucosidase CSN +2/40 1 Cys	MHSQHRTARI ALAVVLTaip ASLATAGVGY ASTQASTAVK	AGAGLD
<i>S. plicatus</i> : Endo- β -N-acetylglucosamidase H (endo H) +4/42	MF TPVRRRVRTA ALALSAAAAL VLGSTAASGA SATPSPAPAP	AP/APVK
<i>S. coelicolor</i> A3(2): Agarase +1/30	MVNRRDLIKW SAVALGAGAG LAGPAPAAHA	ADLEWE
<i>S. lividans</i> : β -Mannanase manA +2/35 3 Cys	MRNAR STLITTAGMA FAVLGLLFAL AGPSAGRAEA	AAGGIH
<i>S. coelicolor</i> : spore associated protein sapA +2/37	MKRSMQA VGATLTAVGA IGAGLLVTAP AAGAATAGAT	ASYNGV
<i>S. coelicolor</i> „Müller“: Lysozym +4/37	MPATSSL ARRGRRPVV LLGGLVSASL ALTLAPTAAA	APLAPP
<i>S. halstedii</i> JM 8: "ORF1" cel2 +3/37 4 Cys	MRALPHG PRTPRSLLGA LLLALATVAA VLAAAPAAHA	DTLVCE
<i>S. halstedii</i> JM 8: "ORF2" p40 +3/34 6 Cys	MARG KRLLVSLTAV FATLLGGIAL TLFQGGNAQA	HGVTMT

6 Strukturauswertungen

6.1 Signalpeptidase-Schnittstellen

Die in der Literatur für die Signalpeptide eindeutig bestimmten Signalpeptidase-Schnittstellen wurden anhand des Programms **SignalP V1.1** [NIELSEN ET AL., 1997 und 1999] überprüft. Die einzelnen Parameter bedeuten:

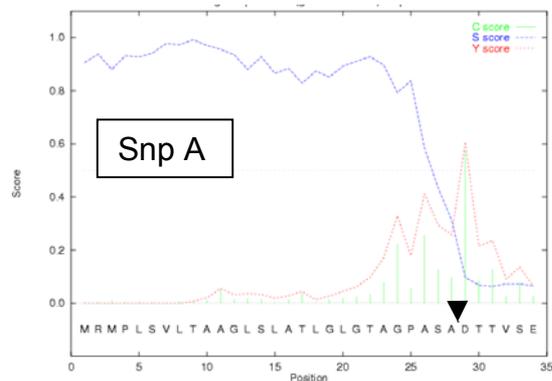
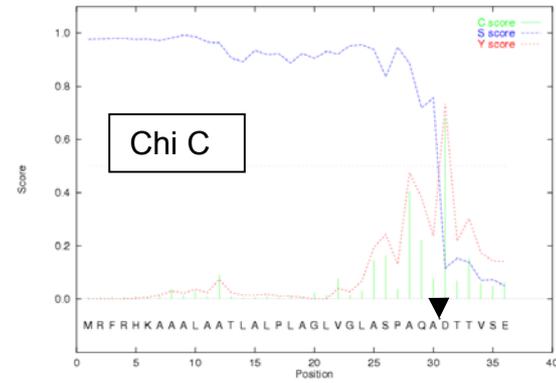
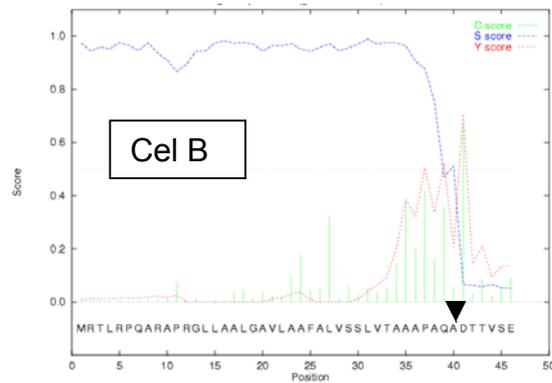
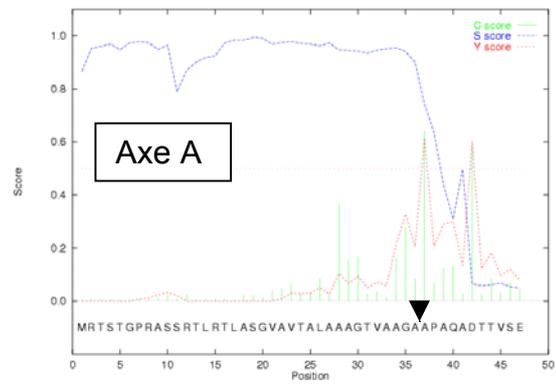
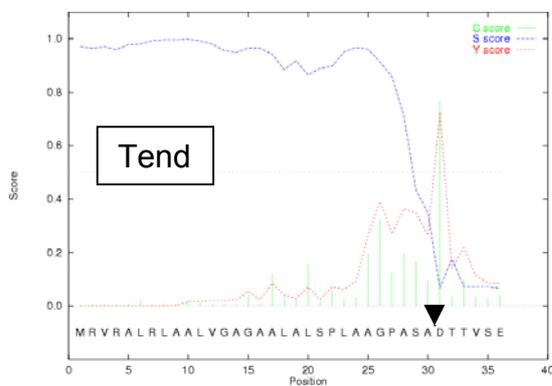
C-score (raw cleavage site score): ist an der Position +1 hoch, an allen anderen niedrig.

S-score (signal peptide score): ist an allen Positionen vor der Schnittstelle hoch, danach niedrig.

Y-score (combined cleavage site score): kombiniert die Höhe des C-scores mit der Neigung des S-scores.

Maximalwerte zeigen die Signalpeptidase-Schnittstelle an.

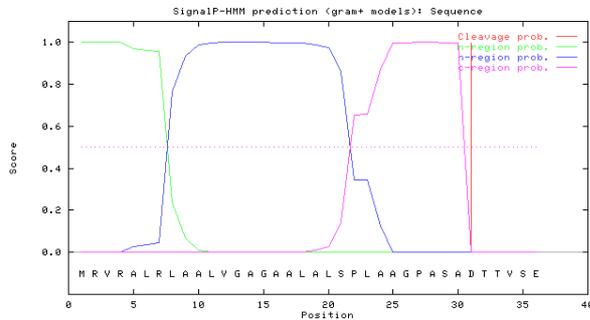
Graphiken für die an Tendamistat fusionierten Signalpeptide



▼ = vorhergesagte Schnittstellen

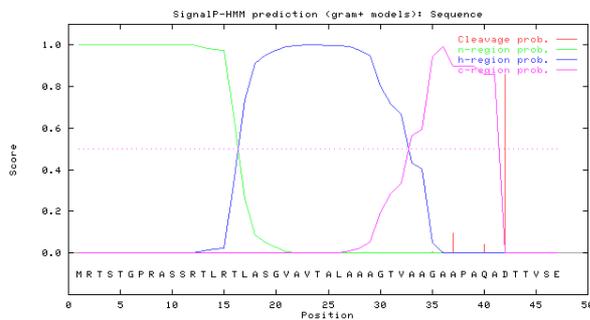
HMM-(hidden Markov modell)Plots des Programms **SignalIP V2.0** [Nielson and Krogh, 1998]

Wahrscheinliche Einteilung der n-, h- und c-Domänen des Signalpeptids und Angabe der Wahrscheinlichkeit für die Signalpeptidase-Schnittstelle.



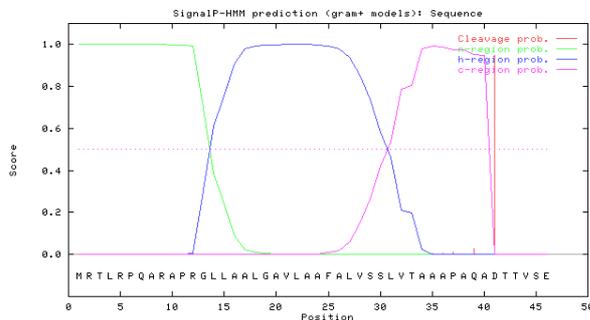
Tend

Max. cleavage site probability: 0.998 at 31



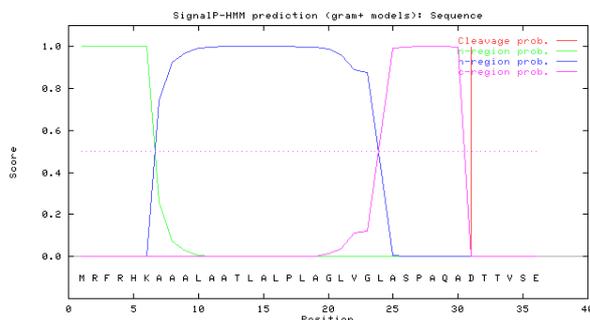
Axe A

Max. cleavage site probability: 0.859 at 42



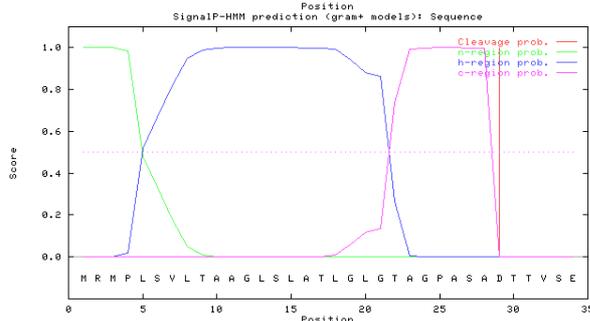
Cel B

Max. cleavage site probability: 0.950 at 41



Chi C

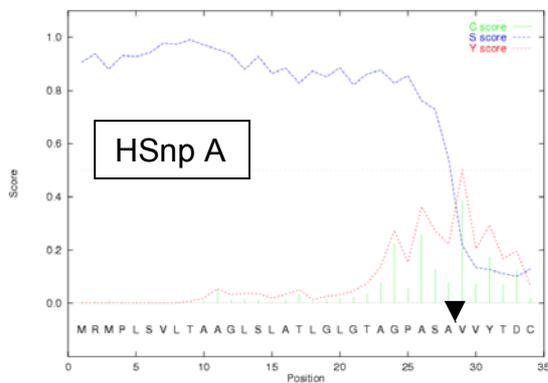
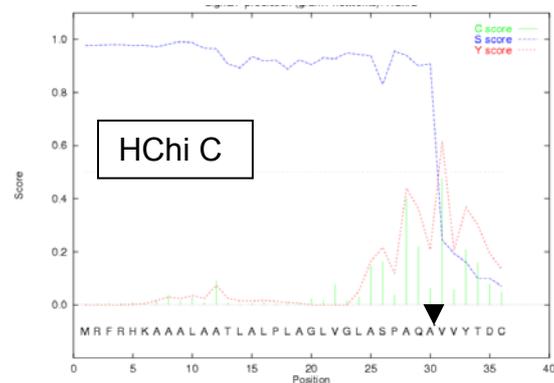
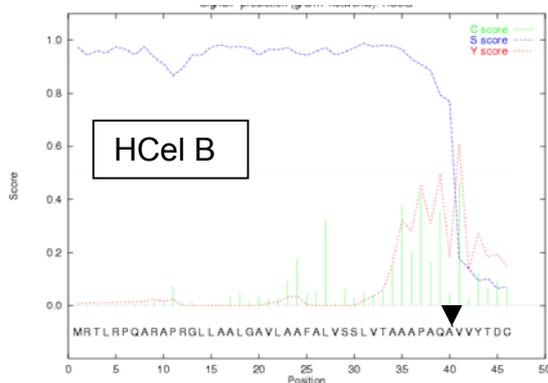
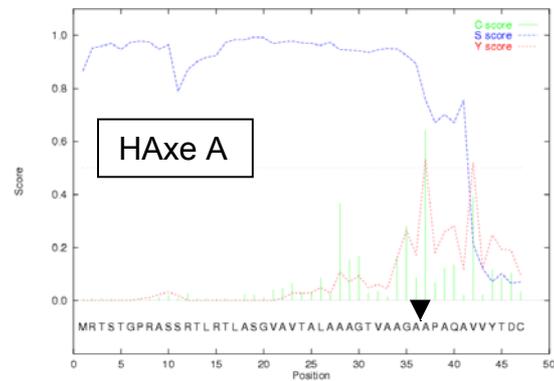
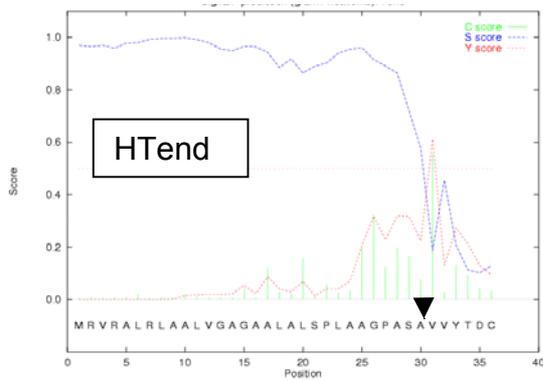
Max. cleavage site probability: 0.999 at 31



Snp A

Max. cleavage site probability: 0.998 at 29

Graphiken für die an Hirudin fusionierten Signalpeptide. **SignalP V1.1**

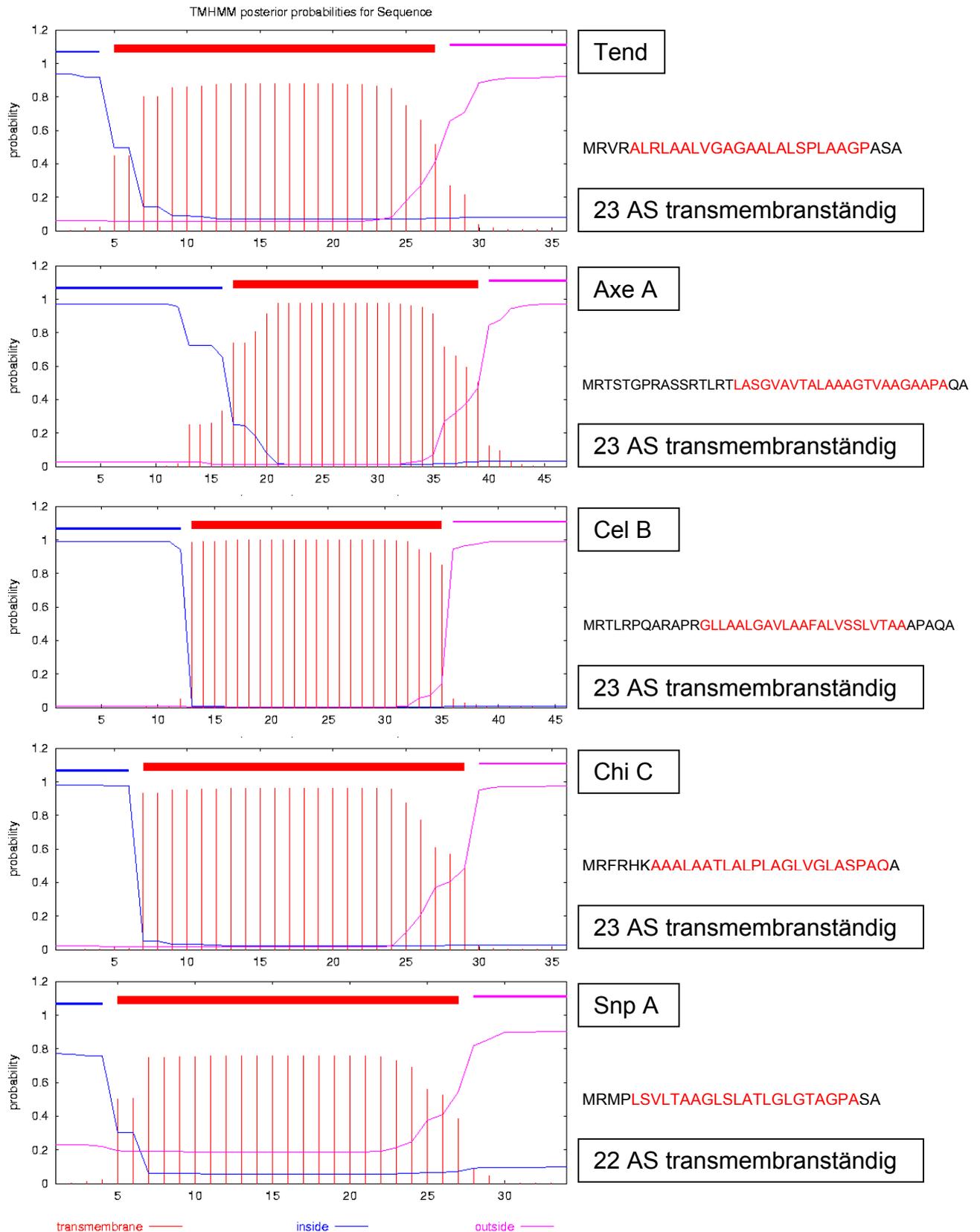


▼ = vorhergesagte Schnittstellen

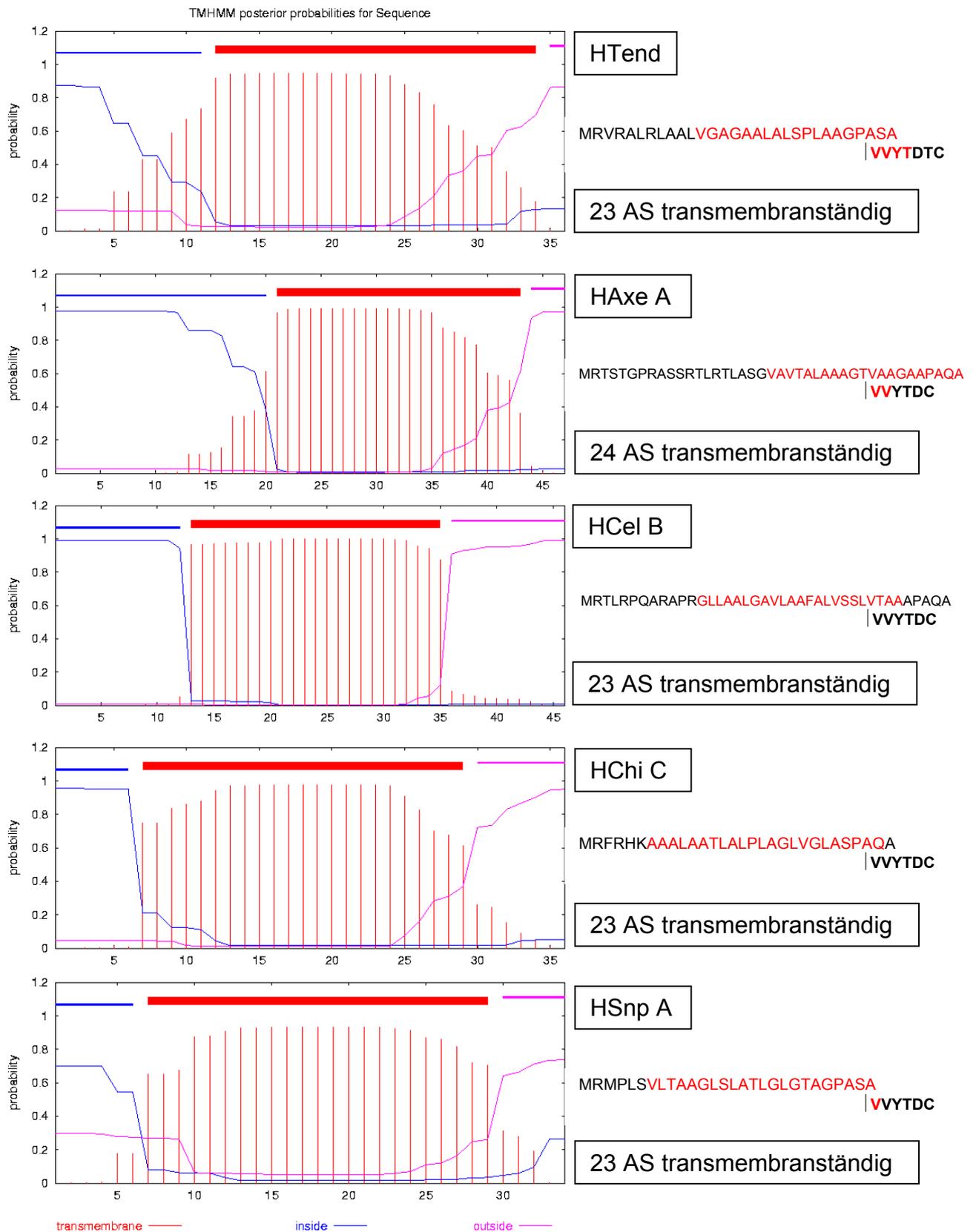
6.2 Transmembran-Regionen der Signalpeptide

TransMembran-Regionen nach dem Hidden Markov Modell (TMHMM). Das Programm ist eigentlich dafür gedacht, bei membranständigen Proteinen die Orientierung der einzelnen Bereiche zu definieren. Bei Proteinen mit Signalpeptiden kann es aber auch die transmembranalen Bereiche des Signalpeptids ausweisen.

Graphiken für die an Tendamistat fusionierten Signalpeptide



Graphiken für die an Hirudin fusionierten Signalpeptide



7 Verzeichnis aller Abbildungen und Tabellen

	Seite	
Abb. II-1	Komplexität des Lebenszyklus von Streptomyceten am Beispiel von <i>S. coelicolor</i> A3(2).	4
Abb. II-2	Schematischer Aufbau eines Signalpeptids.	11
Abb. II-3	Modell der koexistierenden Sekretionswege.	23
Abb. II-4	Energetisches Modell der Proteinfaltung.	30
Abb. II-5	Struktur des Thioredoxin-Faltungsmotivs.	32
Abb. II-6	Disulfid-Redoxreaktionen von Oxidoreduktasen.	33
Abb. II-7	Isomerisierung von Disulfiden am Beispiel von PDI.	34
Abb. II-8	A: Primärstruktur von Tendamistat. B: Sekundärstruktur von Tendamistat.	42
Abb. II-9	Sequenzvergleich von Primärstrukturen der Thrombininhibitoren des Hirudintyps aus Blutegeln.	43
Abb. II-10	Kovalente Struktur des in dieser Arbeit exprimierten Isohirudins.	44
Abb. II-11	Sekundärstruktur des N-terminalen Bereichs von Hirudin.	44
Abb. II-12	Rückfaltungsmodell von Hirudin nach CHATRENET UND CHANG.	50
Abb. II-13	Rückfaltungsmodell von Hirudin nach THANNHAUSER.	51
Abb. II-14	Dreidimensionale Struktur von reduziertem <i>E. coli</i> Thioredoxin.	53
Abb. IV-1	Bildung von Protein-Disulfidbindungen durch Thiol/Disulfidaustausch mit Thiolreagenzien.	57
Abb. IV-2	Rückfaltung von Hirudin bei Raumtemperatur und verschiedenen pH-Werten.	58
Abb. IV-3	Struktur des nativ disulfidverbrückten Hirudins.	61
Abb. IV-4	Rückfaltung von Hirudin bei GSH- und GSSG-Zugabe bei 4°C und RT.	62
Abb. IV-5	Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei GSH-Zugabe und einem pH von 8,0.	63
Abb. IV-6	Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei NAC-Zugabe.	65
Abb. IV-7	Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung von Hirudin bei DTE-Zugabe	66
Abb. IV-8	Logarithmische Auftragung der Laufstrecken der verschiedenen Banden von Hirudin.	68
Abb. IV-9	HPLC-Chromatogramme des Rückfaltungsansatzes von Hirudin.	70
Abb. IV-10	Nativgele des Rückfaltungsansatzes von Standard-Hirudin.	71
Abb. IV-11	HPLC-Chromatogramme der Chargen A und B.	72
Abb. IV-12	Nativgel der einzelnen HPLC-Fractionen der Chargen A und B.	73
Abb. IV-13	Rückfaltung von Hirudin mit verschiedenen Äquivalenten an Thioredoxin, dokumentiert anhand von verschiedenen Gelen/Färbungen.	77
Abb. IV-14	Kapillarelektrophorese von Standard-Thioredoxin und reduziertem Thioredoxin.	82
Abb. IV-15	Kapillarelektrophorese von verschiedenen Rückfaltungsansätzen von Hirudin.	83
Abb.V-1	Überstandsproben der Hauptkulturen mit Zusatz von 1 mM Glutathion.	88
Abb.V-2	MALDI-Massenspektren von Überstandsproben der Hirudinkulturen.	89
Abb.V-3	Überstandsproben der Hauptkulturen mit Zusatz von 10 mM Glutathion.	90
Abb.V-4	Übersicht über die Thioredoxin-Konstrukte im Expressionsvektor.	92
Abb.V-5	Klonierungsschema für den Aufbau der Thioredoxin-Konstruktes in pThKG100.	94
Abb.V-6	Klonierungsschema für den Aufbau der bicistronischen Hirudin/Thioredoxin-Konstruktes in pHTh100.	95
Abb.V-7	SDS-Gel der Überstände einer Thioredoxinkultur ThKG100.	96
Abb.V-8	ESI-Massenspektrum einer Überstandsprobe der Kultur ThKG100.	97
Abb.V-9	Nativ- und SDS-Gel von Überständen der HTh100-Kulturen.	99
Abb.V-10	Nativgel mit ent- und rückgefalteten Aliquots des Überstands vom 6. Kulturtag (HTh100).	99
Abb.V-11	ESI-Massenspektren von Überstandsproben der Hirudinkultur HTh100.	100

Abb.V-12	Schema der PCR zur Darstellung der Genfragmente, die in den integrierbaren Vektor einkloniert werden sollen.	104
Abb.V-13	Klonierungsschema für den Aufbau der integrativen Vektoren.	105
Abb.V-14	Nativgel von Überständen der InHir1-Kultur.	106
Abb.V-15	Schema der PCR zur Darstellung der drei Thioredoxin-CXXC-Mutanten.	110
Abb.V-16	SDS-Gel von Kulturüberständen der Thioredoxin-CXXC-Mutanten.	111
Abb. VI-1	Aminosäuresequenz der ausgewählten Signalpeptide und der nativen Proteine.	116
Abb. VI-2	Aufbau des Kassettensystems mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen.	119
Abb. VI-3	Klonierungsschema für den Aufbau der Tendamistat-Konstrukte mit verschiedenen Signalsequenzen.	121
Abb. VI-4	Klonierungsschema für den Aufbau der Hirudin-Konstrukte mit verschiedenen Signalsequenzen.	122
Abb. VI-5	Trockengewicht der Kulturen mit den verschiedenen Signalsequenzkonstrukten.	124
Abb. VI-6	Gesamt-Proteingehalt des Mediums der Kulturen der verschiedenen Signalsequenzkonstrukte.	125
Abb. VI-7	SDS-Gel der Tendamistat-Kulturüberstände.	126
Abb. VI-8	Expression von Tendamistat über die verschiedenen Signalsequenzkonstrukte.	127
Abb. VI-9	Tendamistatgehalt in mg/L in den einzelnen Kulturen der Signalsequenzkonstrukte.	128
Abb. VI-10	Gesamt-Proteingehalt der Zellextrakte der Kulturen der verschiedenen Signalsequenzkonstrukte.	131
Abb. VI-11	SDS-Gel der Tendamistat-Vorläuferproteine.	132
Abb. VI-12	Tendamistatgehalt in $\mu\text{g/L}$, bestimmt aus den Zellextrakten der einzelnen Kulturen der Signalsequenzkonstrukte.	132
Abb. VI-13	Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Überstände des fünften Kulturtages.	135
Abb. VI-14	Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide.	138
Abb. VI-15	Trockengewicht der Hirudinkulturen mit verschiedenen Signalsequenzkonstrukten.	139
Abb. VI-16	Nativgel der Hirudin-Kulturüberstände.	141
Abb. VI-17	Expression von Hirudin über die verschiedenen Signalsequenzkonstrukte.	142
Abb. VI-18	Anti-Thrombin-Aktivität in mg/L in den einzelnen Kulturen der Hirudin Signalpeptidkonstrukte.	143
Abb. VI-19	Ausschnitte der MALDI-Massenspektren der Überstände der Hirudin-Signalpeptidkonstrukte des fünften Kulturtages.	145
Abb. VI-20	Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide.	147
Abb. VI-21	Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide.	157
Abb. VI-22	Mögliche Spaltstellen der Signalpeptide.	158
Abb. VI-23	Vergleich der hydrophoben Bereiche der Signalpeptide bei anhängendem Tendamistat.	160
Abb. VI-24	Vergleich der hydrophoben Bereiche der Signalpeptide bei anhängendem Hirudin.	161
Abb. VIII-1	Aufstellung der synthetisierten Oligonukleotide.	173
Abb. VIII-2	a) Kinetiken für verschiedene Thrombinkonzentrationen im Hemmtest. b) Eichmessungen mit verschiedenen Thrombinkonzentrationen.	193
Tab. II-1	Codon usage in <i>Streptomyces lividans</i> .	14
Tab. II-2	GC-Gehalt in verschiedenen Organismen.	15
Tab. II-3	Aufstellung von rekombinant durch sekretorische Expression in <i>Streptomyces lividans</i> produzierten eukaryontischen Proteinen.	17
Tab. II-4	Vergleich der Redoxpotentiale von Oxidoreduktasen mit verschiedenen CXXC-Motiven und den pK_a -Werten des jeweils N-terminalen, nukleophilen Cysteins.	37
Tab. II-5	Vergleich von Standardsredoxpotential, pK_a -Werten und Anteil der Thiolatspezies von verschiedenen Enzymen und niedermolekularen Thiolen.	40
Tab. II-6	Zusammenfassung von Sequenzen und Strukturen von Hirudin und seinen Analogen und	48

	Mimetika.	
Tab. IV-1	Aufstellung der Ausbeute von nativem Hirudin bei verschiedenen Rückfaltungs-ansätzen.	67
Tab. IV-2	Zuordnung der HPLC-Fraktionen der Läufe 0, 1 und 2 zu den detektierten Banden des Nativgels in Abb. IV-10 B.	71
Tab. IV-3	Zuordnung der HPLC-Fraktionen der Cargen A und A zu den detektierten Banden des Nativgels in Abb. IV-12.	73
Tab. V-1	Übersicht über die CXXC-Motive, Redoxpotential und pK_a -Werte der verschiedenen Oxidoreduktasen.	109
Tab. VI-1	Positionen der verschiedenen Aminosäuren an der Signalpeptidase-Schnittstelle in Streptomyceten.	115
Tab. VI-2	Überblick über die Anzahl der Signalsequenzen mit NgoMIV-Schnittstelle.	116
Tab. VI-3	Aufstellung der Tendamistat- und Gesamtproteinausbeuten der Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte des siebten Kulturtags.	130
Tab. VI-4	Aufstellung des Tendamistat- und Gesamtproteingehalts der Zelllysate in den Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte.	134
Tab. VI-5	Aufstellung der im Kulturüberstand gefundenen Massenpeaks von Tendamistat für die Kulturtage 5 und 7.	136
Tab. VI-6	Aufstellung der Anti-Thrombin-Aktivität und des Trockengewichts der Kultivierungen der einzelnen Signalpeptid-Konstrukte des fünften Kulturtags.	144
Tab. VI-7	Aufstellung der im Kulturüberstand gefundenen Massenpeaks von Hirudin am vierten Kulturtag.	146
Tab. VI-8	Aufstellung der Ergebnisse der verschiedenen Methoden des SSCP für die Signalpeptide.	163
Tab. VIII-1	Aufstellung der synthetisierten Oligonukleotide.	172

Lebenslauf

Karen Geßner,
geboren am 2. Juli 1970 in Großburgwedel

Schulische Ausbildung

Aug. 1976 – Mai 1989 Grundschule Osterwald,
Orientierungsstufe Berenbostel,
Gymnasium Berenbostel,
Abschluß mit Allgemeiner Hochschulreife

Berufliche Ausbildung

Aug. 1989 – Juni 1991 Chemie- und Pharmazieschule Hannover, Abschluß zur
staatlich geprüften chemisch-technischen Assistentin mit
der Note gut

Okt. 1991 – Jan. 1997 Chemiestudium an der Universität Hannover
Feb. 1994 Diplomchemiker-Vorprüfung mit der Note gut
Juni 1996 Diplomchemiker-Hauptprüfung mit der Note sehr gut
Juli 1996 – Jan. 1997 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie bei Prof.
Dr. Thomas Scheper.
Thema: „Untersuchungen zum Phenanthrenabbau durch
Spingomonas yanoikuyae in Flüssigkultur und
Bodensuspension unter Zusatz von Sophoroselipiden“

Okt. 1997 – März 2002 Erstellung der Dissertation am Institut für Organische
Chemie der Johann W. Goethe-Universität Frankfurt am
Main bei Prof. Dr. Joachim W. Engels.
Thema: „Proteinexpression in *Streptomyces lividans*:
Untersuchungen zur Beeinflussung von Sekretion und
Faltung von Proteinen“

seit Juni 2002 Clinical Research Associate bei Abbott GmbH & Co. KG in
Wiesbaden.

Anwendung des Fachwissens

Juli 1991 – Sep. 1991 Vollzeitbeschäftigung im Fachbereich Umweltschutz und
Energietechnik, Zentralabteilung Technische Chemie des
Technischen Überwachungsvereins Hannover/Sachsen-
Anhalt e. V. nach Abschluß der CTA-Ausbildung

- Dez. 1991 – Sep. 1994
Mai – Juni 1997
- Beschäftigung beim TÜV in Teilzeit
Analyse der Keimzahlbelastung von Wasserproben für
das Institut für Solarenergieforschung Hameln-Emmertal
- Juli – Sep. 1997
- Mitarbeit in einem Industrieprojekt zur Ermittlung der
Widerstandsfähigkeit und antimikrobiellen Wirksamkeit
von Plastikfolien am Institut für Technische Chemie der
Universität Hannover
- Feb 1998 – März 2002
- Im Rahmen der Promotion verantwortliche Organisation
und Betreuung des Praktikums Biotechnologie, Betreuung
von Studenten im Grundpraktikum Organische Chemie
und in Fortgeschrittenen-Praktika innerhalb des Arbeits-
kreises.
- Nov 1998 – Mai 2002
- Mitarbeit in Teilzeit bei der Firma BioSpring, Gesellschaft
für Biotechnologie mbH, Frankfurt

Veröffentlichungen

- Artikel
- Microbial degradation of phenanthrene by addition of a
sophorolipid mixture. C. Schippers, K. Geßner, T. Müller,
T. Scheper (2000) J. Biotechnology, 83 (3), 189 - 198.
- wiss. Posterbeiträge
- Mikrobieller Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz in
Gegenwart von Boden. C. Schippers, K. Geßner, S.
Marose, M. Menge, T. Müller, T. Scheper. 15. DECHEMA-
Jahrestagung der Biotechnologen, 04.-06.03.1997,
Münster
- Heterologous protein expression in *Streptomyces lividans* –
thioredoxin as a catalyst of protein folding? K. Geßner und
J. W. Engels. VAAM Workshop „Biologie der
Actinomyceten“, 04.-06.10.1998, Kaiserslautern
- Influence of different *Streptomyces* signal peptides on
expression level and secretion of tendamistat. K. Geßner
und J. W. Engels. VAAM Workshop „Biologie der
Actinomyceten“, 26.-28.09.1999, Dresden
- Heterologous expression of hirudin in *Streptomyces*
lividans. K. Geßner und J. W. Engels. VAAM Workshop
„Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“, 24.-
26.09.2000, Bonn
- Vortrag
- Comparison of the influence of different *Streptomyces*
signal peptides on expression and secretion of a
homologous and a heterologous protein in *Streptomyces*
lividans. VAAM Workshop „Biologie bakterieller
Naturstoffproduzenten“, 15.-17.11.2001, Berlin