

Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe für Physikalische Biochemie

# **Bedeutung eines hydrophoben Seitenkettenstapels für Stabilität, Faltung und Struktur des P22 Tailspikeproteins**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Biochemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam  
von  
Diplom-Biochemikerin  
Marion Becker

Potsdam, November 2009

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen  
3.0 Deutschland  
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4267/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-42674>  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-42674>

Für meine Eltern



## Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Dissertation steht die Bedeutung eines hydrophoben Seitenkettenstapels für die Stabilität, Faltung und Struktur des P22 Tailspikeproteins. Das homotrimere Tailspikeadhäsins des Bakteriophagen P22 ist ein etabliertes Modellsystem, dessen Faltung, Assemblierung und Stabilität *in vivo* und *in vitro* umfassend charakterisiert ist. Das zentrale Strukturmotiv des Proteins ist eine parallele  $\beta$ -Helix mit 13 Windungen. Jede Windung beinhaltet drei kurze  $\beta$ -Stränge, die durch *turns* und *loops* unterschiedlicher Länge verbunden sind. Durch den sich strukturell wiederholenden, spulenförmigen Aufbau formen  $\beta$ -Stränge benachbarter Windungen elongierte  $\beta$ -Faltblätter. Das Lumen der  $\beta$ -Helix ist dicht gepackt und beinhaltet größtenteils hydrophobe Seitenketten, welche linear und sehr regelmäßig entlang der Längsachse gestapelt sind. Die  $\beta$ -Helix Domäne wird von einer N-terminalen Kapsidbindedomäne und einer C-terminalen Trimerisierungsdomäne flankiert.

Eine hoch repetitive Struktur, ausgedehnte  $\beta$ -Faltblätter und die regelmäßige Anordnung von ähnlichen oder identischen Seitenketten entlang der  $\beta$ -Faltblattachse sind ebenfalls typische Kennzeichen von unlöslichen Amyloidfibrillen, die bei Proteinfaltungskrankheiten wie etwa Alzheimer, der Creutzfeld-Jakob-Krankheit, Chorea Huntington und Typ-II-Diabetes gebildet werden. Es wird vermutet, dass die hohe Stabilität des P22 Tailspikeproteins und auch die der Amyloidfibrille durch Seitenkettenstapelung, einem geordneten Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und den rigiden, oligomeren Verbund bedingt ist.

Um den Einfluss der Seitenkettenstapelung auf die Stabilität, Faltung und Struktur des P22 Tailspikeproteins systematisch zu untersuchen, wurden sieben Valine in einem im Lumen der  $\beta$ -Helix begrabenen Seitenkettenstapel gegen das deutlich kleinere und weniger hydrophobe Alanin und das voluminösere und ähnlich hydrophobe Leucin substituiert. Durch dieses Vorgehen wurden identische Mutationen in unterschiedlichen Windungen über die gesamte Länge der  $\beta$ -Helixachse eingefügt. Der Einfluss aller Mutationen wurde anhand zweier Tailspikevarianten, dem trimeren, N-terminal verkürzten TSP $\Delta$ N-Konstrukt und der monomeren, isolierten  $\beta$ -Helix Domäne analysiert.

Generell wurde in fast allen Experimenten deutlich, dass Mutationen zu Alanin stärkere Effekte auslösen als Mutationen zu Leucin. Die dichte und hydrophobe Packung im Kern der  $\beta$ -Helix bildet somit die Basis für Stabilität und Faltung des Tailspikeproteins. Anhand hoch aufgelöster Kristallstrukturen jeweils zweier Alanin- und Leucin-Mutanten konnte verdeutlicht werden, dass das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix stark formbar ist und mutationsbedingte Veränderungen des Seitenkettenvolumens durch kleine und lokale Verschiebung der Haupt- und Seitenketten ausgeglichen werden, sodass mögliche Kavitäten gefüllt und sterische Spannung abgebaut werden können.

Viele Mutanten zeigten *in vivo* und *in vitro* einen temperatursensitiven Faltungsphänotyp (*tsf*-Phänotyp, *temperature sensitive for folding*), d.h. bei Temperaturerhöhung waren die Faltungsausbeuten des N-terminal verkürzten Trimers der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. Dieser Phänotyp wurde durch die Beeinflussung unterschiedlicher Stadien des Reifungsprozesses oder auch durch die Verminderung der kinetischen Stabilität des nativen Trimers ausgelöst.

Beispielsweise sind die drastisch verringerten Faltungsausbeuten der Mutante V498A (Windung 12), die im C-terminalen Bereich der  $\beta$ -Helix Domäne lokalisiert ist, auf eine deutlich verlangsamte, oder bei Temperaturanstieg unterbundene, Assoziation der Untereinheiten während der Trimerreifung zurückzuführen. Die der Position 498 in der Primärsequenz benachbarten Seitenketten weisen in die Grenzfläche zur Nachbaruntereinheit und sind in ein ausgedehntes Kontaktnetzwerk involviert, dessen Ausbildung bei V498A möglicherweise erschwert ist.

An Position 125 wiederum, die sich am äußersten N-terminalen Ende in der sogenannten *capping*-Region befindet, welche die  $\beta$ -Helix Domäne abschließt, vermindert ein Austausch von Valin gegen Leucin die *in vitro* Faltungsausbeuten aufgrund einer dramatischen Verringerung der kinetischen Stabilität des nativen Tailspiketrimers. Möglicherweise werden durch die Mutation Kontakte in oder mit einem 3-Helixbündel, welches aus den drei Untereinheiten geformt wird, geschwächt. Wildtyp-ähnliche Faltungsausbeuten anderer Mutanten, deren kinetische Stabilitäten im Vergleich zum Wildtyp stark vermindert sind, verdeutlichen jedoch, dass die kinetische Stabilität des trimeren Proteins nur einen untergeordneten Einfluss auf die Faltungsausbeuten hat und dass V125L somit einen Extremfall darstellt.

Durch Untersuchungen am vollständigen und am N-terminal verkürzten Wildtypprotein wurde gezeigt, dass die Entfaltungsreaktion des Tailspiketrimers komplex ist. Die Verläufe der Kinetiken folgen zwar einem apparenten Zweizustandsverhalten, jedoch sind bei Darstellung der Entfaltungsäste im *Chevronplot* die Abhängigkeiten der Geschwindigkeitskonstanten vom Denaturierungsmittel nicht linear, sondern in unterschiedliche Richtungen gewölbt. Diese Beobachtungen könnten, um nur einige Möglichkeiten zu nennen, durch ein hoch energetisches Intermediat bei der Entfaltung, einen breiten Übergangsbereich oder parallele Entfaltungswege hervorgerufen sein.

Bei Mutanten, welche in zentralen Windungen der  $\beta$ -Helixregion an den Positionen 272 (Windung 4), 321 (Windung 6) und 349 (Windung 7) lokalisiert sind, ist der *tsf*-Phänotyp durch die Destabilisierung eines Faltungsintermediates auf Monomerebene verursacht. Kinetiken der Untereinheitenfaltung der Mutanten sind bei Temperaturerhöhung verglichen zum Wildtyp deutlich verlangsamt und zeigen verminderte Signalamplituden, da die Mutationen ein entscheidendes thermolabiles Faltungsintermediat destabilisieren, hierdurch bedingt „*off-pathway*“ Aggregation fördern und somit die Bildung von nativen Tailspiketrimern unterbinden.

Mit Hilfe der monomeren, isolierten  $\beta$ -Helix Domäne, bei der die N-terminale Capsidbindedomäne und

die C-terminale Trimerisierungsdomäne deletiert sind und welche als unabhängige Faltungseinheit fungiert, wurde gezeigt, dass alle Stapelungsmutanten im Harnstoff-induzierten Gleichgewicht analog zum Wildtypprotein einem Zweizustandsverhalten mit vergleichbaren Kooperativitäten folgen. Die konformationellen Stabilitäten von in der  $\beta$ -Helix zentral gelegenen Alanin- und Leucin-Mutanten sind stark vermindert, während Mutationen in äußeren Bereichen der Domäne keinen Einfluss auf die Stabilität der  $\beta$ -Helix haben. Bei Verlängerung der Inkubationszeiten der Gleichgewichtsexperimente konnte die langsame Bildung von Aggregaten im Übergangsbereich der destabilisierten Mutanten detektiert werden.

In einer vorherigen Arbeit wurde vorgeschlagen, dass die Struktur der isolierten  $\beta$ -Helix einem für die Reifung des Tailspikeproteins entscheidenden thermolabilen Faltungsintermediat auf Monomerebene sehr ähnlich ist (Schuler, 1998). Die hier erlangten Erkenntnisse untermauern diese Hypothese und lassen vermuten, dass in diesem Intermediat ein zentraler Kern, der die Windungen 4 bis 7 und die „Rückenflosse“ beinhaltet, stabilitätsbestimmend ist. Dieser Kern könnte als Faltungsnukleus dienen, an den sich sequenziell weitere  $\beta$ -Helixwindungen anlagern und im Zuge der „Monomerreifung“ kompaktieren.

# Abkürzungen und Formelzeichen

## Abkürzungen

A	Absorption
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BHX	isolierte $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins (109-544)
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTE	1,4-Dithioerythrit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gl.	Gleichung
gp	<i>gene product</i> , Genprodukt
h	<i>hour</i> , Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
J	Joule (4.183 Joule = 1 Kalorie)
k	Geschwindigkeitskonstante
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
MW	<i>molecular weight</i> , Molekularmasse
NaP	Natriumphosphat
N-Terminus	Amino-Terminus

---

OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> , zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid-hydrochlorid
psi	<i>pounds per square inch</i> , Pfund pro Quadratzoll
rmsd	<i>root mean square deviation</i> , mittlere quadratische Abweichung
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	Tailspikeprotein (1-666)
TSP $\Delta$ N	Tailspikeprotein ohne N-terminale Capsidbindedomäne (109-666)
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>units</i> , Enzymaktivität
üN	über Nacht
UV/vis	<i>ultraviolet/visible light</i> , ultraviolett/sichtbares Licht
(v/v)	Volumenanteil
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteil

Aminosäuren wurden nach dem Ein- oder Drei-Buchstaben Standardcode abgekürzt.

## Formelzeichen

c	M, mg ml <sup>-1</sup>	Konzentration
c <sub>1/2</sub>	M	Übergangsmittelpunkt
d	cm	Schichtdicke
$\Delta G_{N \rightarrow U}$	kJ mol <sup>-1</sup>	freie Enthalpie der Entfaltung
$\Delta G_U^\ddagger$	kJ mol <sup>-1</sup>	Aktivierungsenergie der Entfaltung
$\epsilon$	M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	molarer Extinktionskoeffizient
k	s <sup>-1</sup> , min <sup>-1</sup>	Geschwindigkeitskonstante
$\lambda$	nm	Wellenlänge
m	kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>	Kooperativität
R	J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	allgemeine Gaskonstante
t	s, min, h	Zeit
t <sub>1/2</sub>	s, min, h	Halbwertszeit
T	°C, K	Temperatur in °C oder Kelvin
V	l	Volumen

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen und Formelzeichen.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Eigenschaften von Proteinfibrillen.....	1
1.1.1 Funktionen von Amyloid und amyloid-ähnlichen Strukturen.....	1
1.1.2 Strukturelle Eigenschaften von Proteinfibrillen.....	2
1.1.3 Strukturmodelle von Amyloid und amyloid-ähnlichen Fibrillen.....	4
1.2. Die parallele $\beta$ -Solenoidstruktur .....	8
1.2.1 Proteine mit paralleler $\beta$ -Solenoidstruktur.....	8
1.2.2 Seitenkettenstapelung in parallelen $\beta$ -Solenoiden.....	11
1.2.3 Solenoidproteine, Sequenzrepeats und Strukturvorhersage.....	12
1.2.4 Funktionen von $\beta$ -Solenoidproteinen.....	13
1.3 Das Tailspikeprotein des Bakteriophagen P22.....	15
1.3.1 Struktur und Funktion des P22 Tailspikeproteins.....	15
1.3.2 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Faltung des P22 Tailspikeproteins.....	17
1.3.3 Einfluss von Faltungsmutationen.....	18
1.3.4 Aggregation des Tailspikeproteins.....	19
1.3.5 Einfluss der Seitenkettenstapelung auf Stabilität und Faltung von $\beta$ -Solenoiden – Stand der Forschung.....	20
1.3.6 Zielstellung dieser Arbeit.....	22
<b>2. Experimenteller Teil.....</b>	<b>23</b>
2.1. Materialien.....	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Enzyme.....	23
2.1.3 Standardmarker und Kits.....	23
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.5 Geräte.....	24
2.1.6 Programme.....	25
2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien.....	26
2.1.8 Bakterienstämme.....	28
2.1.9 Plasmidvektoren.....	28

2.1.10 Oligonukleotid-Primer.....	29
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1 Kultivieren von Bakterien.....	30
2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese.....	30
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA.....	31
2.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA.....	31
2.2.5 Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	31
2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.7 Sequenzierung von Plasmiden.....	32
2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	32
2.3.1 Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	32
2.3.2 Zellaufschluss.....	32
2.3.3 Proteinreinigung.....	33
2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.4. Biophysikalische Methoden.....	34
2.4.1 Refraktometrie.....	34
2.4.2 Absorptionsspektroskopie.....	35
2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie.....	36
2.4.4 De- und Renaturierungskinetiken.....	36
2.4.5 Gleichgewichtsübergänge.....	37
2.4.6 Temperaturabhängigkeit der Faltung <i>in vivo</i> .....	37
2.4.7 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung <i>in vitro</i> .....	37
2.4.8 Assoziation der Monomere - Hybridisierung mit TSP $\Delta$ N G244R.....	38
2.4.9 Thermische Denaturierungskinetiken bei 71 °C und 2 % SDS.....	38
2.5. Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse.....	38
2.5.1 Kristallographie.....	39
2.5.2 Aufnahme der Röntgenbeugungsdaten.....	39
2.5.3 Strukturmodellbau und Verfeinerung.....	39
2.6 Mathematische Auswertung.....	40
2.6.1 Reversible Gleichgewichtsübergänge nach Pace und Santoro & Bolen (Pace, 1986).....	40
2.6.2 Bestimmung von $\Delta$ ASA und $m$ (Harnstoff) mit empirischen Gleichungen nach Myers (Myers et al., 1995).....	41
2.6.3 De- und Renaturierungskinetiken.....	41
2.6.4 Thermische Denaturierungskinetiken bei 71 °C.....	42
2.6.5 Bestimmung von $\Delta\Delta G^\ddagger$ .....	43
2.6.6 Fehlerfortpflanzung.....	43
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1. Einfluss der Seitenkettenstapelung auf die isolierte, monomere $\beta$ -Helix Domäne.....	45
3.1.1 Expression und Reinigung der $\beta$ -Helix Konstrukte.....	45
3.1.2 Strukturelle Eigenschaften der $\beta$ -Helix Konstrukte.....	46
3.1.3 Entfaltung und Rückfaltung der isolierten $\beta$ -Helix Domäne.....	48
3.1.4 Gleichgewichtsübergänge zur Analyse der thermodynamischen Stabilität.....	50

3.1.5 Aggregationsverhalten der destabilisierten Mutanten V272A, V321A und V349A.....	56
3.2. Bedeutung der Seitenkettenstapelung für die Faltung des Tailspikeproteins.....	58
3.2.1 Temperaturabhängigkeit der Faltungsausbeuten <i>in vivo</i> .....	59
3.2.2 Reinigung von TSP und TSP $\Delta$ N-Mutanten.....	61
3.2.3 Absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften der Mutanten.....	63
3.2.4 Temperaturabhängigkeit der Faltung <i>in vitro</i> .....	64
3.2.5 Faltungskinetiken auf Monomerebene.....	65
3.2.6 Assoziation der Monomere – Hybridisierungsexperimente von TSP $\Delta$ N wt und V498A mit der Ladungsmutante G244R.....	69
3.3. Einfluss der Seitenkettenstapelung auf die kinetische Stabilität des Tailspiketrimers.....	71
3.3.1 Thermische Denaturierung der TSP $\Delta$ N-Konstrukte bei 71 °C in Gegenwart von 2 % SDS.....	71
3.3.2 Thermische Denaturierung der TSP-Konstrukte bei 71 °C in Gegenwart von 2 % SDS.....	74
3.3.3 GdmHCl-induzierte Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N bei verschiedenen pH-Werten.....	76
3.3.4 Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N bei verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen.....	79
3.3.5 GdmHCl-induzierte Entfaltungskinetiken der TSP $\Delta$ N-Konstrukte.....	81
3.3.6 Zusammenfassung und Vergleich der Resultate.....	83
3.4. Einfluss der Punktmutationen auf die Struktur des Tailspiketrimers.....	86
3.4.1 Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung des Wildtyps und der Mutanten V125A, V125L, V450A und V349L .....	86
3.4.2 Besonderheiten der Struktur des TSP $\Delta$ N Wildtypproteins bei 100 K.....	87
3.4.3 Vergleich der Strukturen der Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L und dem Wildtyp.....	89
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>95</b>
4.1. Lokale und globale Auswirkungen von Valin-zu-Alanin- und Valin-zu-Leucin-Mutationen auf Struktur und Stabilität des $\beta$ -Helix Strukturmotivs im Tailspikeprotein.....	96
4.1.1 Besonderheiten nahe der Mutationsstellen.....	98
4.1.2 Besonderheiten der zentralen Windungen der $\beta$ -Helix Domäne.....	101
4.2. Die zentralen Windungen der parallelen $\beta$ -Helix fungieren als Stabilitätsnukleus und bilden das Faltungsintermediat I bei der Untereinheitenfaltung.....	104
4.3. Die Entfaltungsreaktion des Tailspiketrimers ist komplex und unter physiologischen Bedingungen irrelevant.....	109
4.3.1 Entfaltung des Wildtypproteins.....	109
4.3.2 Entfaltung der Stapelungsmutanten.....	114
4.4. Seitenketten der $\beta$ -Helixwindung 12 und die <i>capping</i> -Region sind wesentlich für Assoziation und strukturelle Integrität des Tailspiketrimers .....	116
4.4.1 Bedeutung der $\beta$ -Helixwindung 12.....	116
4.4.2 Bedeutung der <i>capping</i> -Region.....	118
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>129</b>



# 1. Einleitung

## 1.1. Eigenschaften von Proteinfibrillen

### **1.1.1 Funktionen von Amyloid und amyloid-ähnlichen Strukturen**

Die korrekte Faltung und Aufrechterhaltung der nativen dreidimensionalen Struktur bildet die Grundlage für die funktionelle Vielfalt von Proteinen im Organismus. Ist die Faltungsreaktion einer Polypeptidkette gestört oder der native Zustand eines Proteins destabilisiert, kann dies Faltungskrankheiten zur Folge haben. Bei solchen Krankheiten werden instabile oder fehlgefaltete Proteine entweder verstärkt durch zelluläre Kontrollsysteme abgebaut oder bilden im Gegensatz dazu unlösliche Ablagerungen in Zellen und Geweben (Chiti & Dobson, 2006). Diese Ablagerungen oder ihre monomeren oder oligomeren Vorstufen können zelltoxisch sein (Rubinsztein, 2006).

Nach der ursprünglichen Definition sind Amyloide *in vivo* extrazellulär abgelagerte Strukturen, deren Hauptkomponente ein vielfach angehäuften Protein oder Polypeptidfragment ist (Westermarck, 2005). Amyloidstrukturen haben einen fibrillären, unverzweigten Aufbau, binden den Farbstoff Kongorot, zeigen Doppelbrechung im polarisiertem Licht und erzeugen eine *cross-β* Signatur bei Röntgenbeugung an Fasern. Diese Eigenschaften weisen auch andere Proteinfibrillen auf, die deshalb als amyloid-ähnlich bezeichnet werden (Nelson & Eisenberg, 2006a).

Mittlerweile wurden etwa 25 verschiedene humane Proteine identifiziert, die Amyloide formen und Krankheiten wie Alzheimer (A $\beta$  Protein), Chorea Huntington (Huntingtin) oder die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (Prionprotein) auslösen können (Westermarck, 2005, Chiti & Dobson, 2006). Die Krankheiten treten in den meisten Fällen sporadisch auf. Sie können aber auch durch spezifische, vererbte Mutationen hervorgerufen oder übertragen werden (Chiti & Dobson, 2006). Beispielsweise ist bei Chorea Huntington Patienten eine aggregationsanfällige Polyglutaminsequenz im Huntingtin mutationsbedingt verlängert. Bei übertragbaren Prionenkrankheiten stellt wahrscheinlich die fehlgefaltete Form des Prionenproteins (PrP<sup>Sc</sup>) das infektiöse Material dar (Caughey & Baron, 2006).

Amyloid-ähnliche Strukturen sind nicht ausschließlich mit Krankheiten assoziiert. Die sogenannten funktionellen Amyloide erfüllen in Bakterien, Pilzen, Insekten und auch Säugern vielfältige physiologische Aufgaben (Bieler et al., 2005, Fowler et al., 2007). Ausführlich untersuchte Beispiele sind die Hefepurine Ure2p und Sup35p aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Proteine rufen in ihrer löslichen

und in ihrer polymerisierten Konformation unterschiedliche Phänotypen hervor, da aggregierte Proteine nicht mehr für Wechselwirkungen mit ihren zellulären Interaktionspartnern zur Verfügung stehen. Sie werden aus diesem Grund als *loss-of-activity* Prione bezeichnet (Baxa et al., 2006). Das HET-s Protein des filamentösen Pilzes *Podospora anserina* ist ein *gain-of-activity* Prion, die infizierte Zelle entwickelt eine neue Aktivität (Baxa et al., 2006). HET-s ist für die sogenannte Heterokaryon-Inkompatibilität verantwortlich, einen Mechanismus, der die Erkennung zwischen unterschiedlichen Spezies vermittelt (Wasmer et al., 2008). Ein weiteres funktionelles Amyloid ist das von *Escherichia coli* sekretierte Curlin Protein, welches in aggregierter Form eine extrazelluläre Proteinmatrix bildet, die die Besiedlung von Oberflächen und Kolonisation ermöglicht (Barnhart & Chapman, 2006).

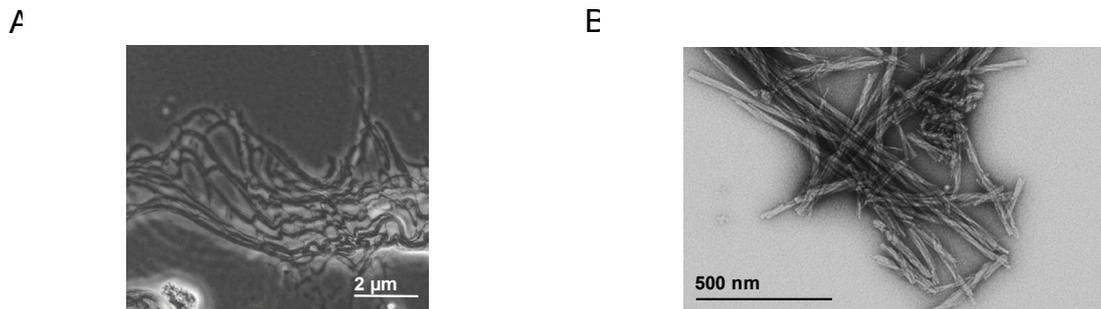
Auch lösliche Proteine, isolierte Proteindomänen und kurze Peptide, die nicht mit Fehlfaltungskrankheiten in Verbindung gebracht werden, können *in vitro* amyloid-ähnliche Fibrillen bilden. So beobachteten Christopher Dobson und Mitarbeiter an verschiedenen Modellen wie zum Beispiel dem kleinen Muskelprotein Acylphosphatase, Muskelmyoglobin, der SH3-Domäne von Phosphatidylinositol-3-Kinase und drei etwa 20 bis 40 Aminosäurereste langen Fragmenten des *Bacillus subtilis* Kälteschockproteins CspB (*cold shock proteinB*), dass die Ausbildung von amyloid-ähnlichen Strukturen unter geeigneten Konditionen möglicherweise eine generelle Eigenschaft von Polypeptidketten ist (Guijarro et al., 1998, Fändrich et al., 2001, Chiti et al., 1999, Gross et al., 1999, Dobson, 2003). Aggregationsfördernd sind mild denaturierende Bedingungen, unter denen die native Konformation destabilisiert wird und intermediäre Strukturen Fibrillen mit amyloid-ähnlicher Morphologie und Charakteristik bilden.

### **1.1.2 Strukturelle Eigenschaften von Proteinfibrillen**

In ihrem nativen Zustand sind fibrillen-bildende Proteine in Bezug auf Sequenz, Struktur und Funktion überaus divers (Chiti & Dobson, 2006). Im Gegensatz dazu weisen aggregierte Amyloid- und amyloid-ähnliche Strukturen gleichartige Charakteristika auf, die auf einheitliche strukturelle Merkmale zurückgeführt werden können. Eine grundlegende Eigenschaft, durch die Amyloide identifiziert werden können, ist beispielsweise die Bindung des Farbstoffes Kongorot (Westermarck, 2005). Die Anlagerung der Kongorotmoleküle ruft Doppelbrechung im polarisiertem Licht hervor und indiziert den hohen Ordnungsgrad der zusammengelagerten Moleküle (Abbildung 1.10). Ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch mit Amyloidstrukturen interagiert, ist Thioflavin T.

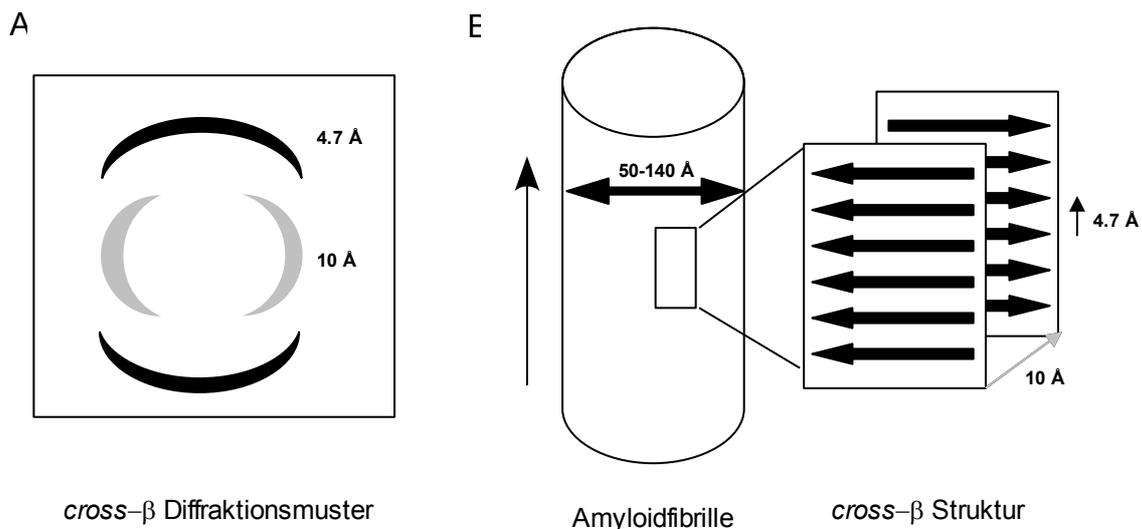
Licht- und elektronenmikroskopische Aufnahmen deckten auf, dass Amyloide aus langen, unverzweigten Fibrillen mit einem Durchmesser von etwa 50 Å bis 140 Å bestehen, welche wiederum aus kleineren Protofilamenten aufgebaut sind (Abbildung 1.1 und 1.10), (Nelson & Eisenberg, 2006b). Verschiedene Proteine, aber auch Proteine der gleichen Art können Fibrillen unterschiedlicher Morphologien bilden (siehe Abb. 1.1). Fibrillen variieren etwa in Stärke der Verdrillung entlang der Längsachse, Anzahl der Protofilamente, Krümmung oder Rigidität. Bei Hefeprioren wurde der Polymorphismus von Fibrillen mit dem Phänomen der Artenschränken (*species barriers*) und unterschiedlich stark ausge-

prägen Phänotypen in Zusammenhang gebracht (Kodali & Wetzel, 2007, Baxa et al., 2006).



**Abbildung 1.1: Morphologien von Proteinfibrillen. A)** Mit dem Lichtmikroskop sichtbare Aggregate der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins (Schuler et al., 1999). Die lang gestreckten und gekräuselten Fibrillen bildeten sich in Gegenwart von 2 M Harnstoff bei einer Proteinkonzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . **B)** Elektronenmikroskopisches Bild von Rinderinsulinaggregaten, die mit Uranylacetat negativ kontrastiert wurden. Die Strukturen scheinen rigide und entlang der Längsachse verdrillt. Fibrillen wurden in 2 M Essigsäure, pH 2.0, 0.5 M NaCl bei 50 °C und einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml erzeugt. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. Klaus Gast zu Verfügung gestellt.

Spektroskopische Analysen verdeutlichen, dass Amyloidfibrillen reich an  $\beta$ -Faltblattstrukturen sind. Weiterhin weisen Amyloidfibrillen eine sogenannte *cross- $\beta$*  Beugungssignatur bei Röntgendiffraktionsexperimenten an einheitlich orientierten Fasern auf (Serpell et al., 1997). Dieses Beugungsmuster deutet auf eine repetitive Struktur von  $\beta$ -Faltblättern hin, die parallel zur Fibrillenachse verlaufen, während die einzelnen  $\beta$ -Stränge senkrecht zur Längsachse stehen (Abbildung 1.2). In jedem Protofilament sind die  $\beta$ -Faltblätter mit einem Abstand von circa 10 Å dicht gepackt. Der Abstand der einzelnen  $\beta$ -Stränge im  $\beta$ -Faltblatt beträgt 4.7 Å. Donor- und Akzeptorpaare des Peptidrückgrats benachbarter  $\beta$ -Stränge bilden ein regelmäßiges Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen aus (Nelson & Eisenberg, 2006a). Mittels Röntgenbeugung an Fasern kann allerdings nicht geklärt werden, ob die Faltblätter parallel, antiparallel oder gemischt parallel/antiparallel verlaufen.



**Abbildung 1.2: Die cross-β Struktur von Proteinfibrillen.** **A)** Schematische Darstellung des cross-β Diffraktionsmusters, dessen klar definierte meridionalen Reflexe und die äquatorialen Reflexe charakteristisch sind. **B)** Amyloidfibrille und cross-β Struktur. Einzelne Protofilamente sind zu einer Amyloidfibrille mit einem Durchmesser zwischen 50-140 Å zusammen gelagert. Im Protofilament stehen sich ausgedehnte β-Faltblätter im Abstand von 10 Å gegenüber. Die β-Stränge des β-Faltblatts sind 4.7 Å distanziert und bilden ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen. Die Abbildung stammt von Nelson und Eisenberg und wurde verändert (Nelson & Eisenberg, 2006b).

### 1.1.3 Strukturmodelle von Amyloid und amyloid-ähnlichen Fibrillen

Da Amyloidfibrillen groß und nicht kristallisierbar sind, waren hoch aufgelöste Strukturen durch klassische Methoden über viele Jahre nicht zugänglich (Chiti & Dobson, 2006). Innerhalb der letzten Zeit wurden jedoch Techniken wie Festkörper-NMR-Spektroskopie von Amyloidfibrillen und Mikrokristallisation kurzer, amyloidogener (*amyloidogenic*) Peptide entwickelt, sodass mittlerweile verschiedene atomare Strukturmodelle zugänglich sind (Petkova et al., 2005, Nelson et al., 2005, Sawaya et al., 2007, Wasmer et al., 2008). Anhand dieser Modelle wurde deutlich, dass Amyloidfibrillen auch auf atomarer Ebene eine gewisse Diversität aufweisen und das Grundmotiv der elongierten β-Faltblätter verschieden eingebaut ist. Rebecca Nelson und David Eisenberg teilen die bekannten Strukturen in die drei Klassen i) „*gain-of-interaction*“, ii) „*natively disordered*“ und iii) „*refolding*“ Modelle ein, die im folgenden anhand einiger Beispiele dargestellt werden (Nelson & Eisenberg, 2006a).

#### i) *Gain-of-interaction*-Modelle:

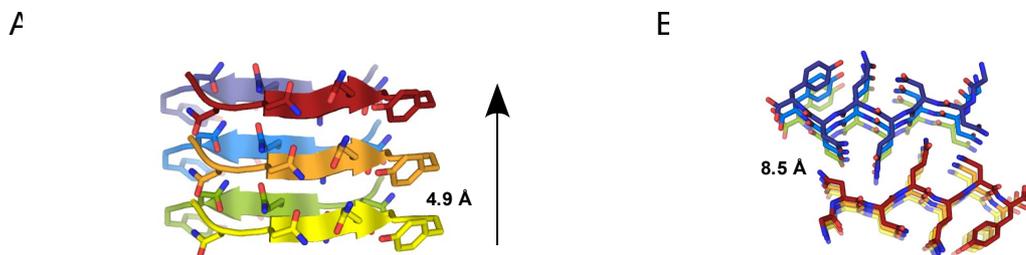
*Gain-of-interaction*-Modelle besagen, dass durch konformationelle Umlagerungen eines bestimmten Proteinbereiches eine im nativen Zustand nicht zugängliche Oberfläche lösungsmittel exponiert wird (Elam et al., 2003). Durch Interaktion dieser exponierten Oberfläche lagern sich einzelne Proteinmoleküle zu Fibrillen zusammen, wobei ein Großteil der nativen Konformation erhalten bleibt. *Gain-of-interaction*-Modelle werden weiterhin in a) „*direct stacking*“, b) „*cross-β-spine*“, c) „*3D domain swapping*“ und d) „*3D domain swapping with cross-β-spine*“ untergliedert:

a) *Direct stacking*:

Die *direct stacking*-Amyloidmodelle der Proteine Transthyretin und Superoxid-Dismutase, die in ihren nativen Zuständen längliche  $\beta$ -Faltblätter beinhalten, gehen von einer direkten Polymerisation nativ-ähnlicher Strukturen aus (Elam et al., 2003, Serag et al., 2002). In der Fibrille sind Bereiche, die im nativen Zustand die  $\beta$ -Faltblätter abschließen, umgelagert, sodass einzelne Monomere über *edge-to-edge*-Kontakte der  $\beta$ -Faltblätter polymerisieren und eine ausgedehnte  $\beta$ -Faltblattstruktur entsteht.

b) *Cross- $\beta$ -spine*:

Das *cross- $\beta$ -spine*-Modell besagt, dass in der Fibrille kurze entfaltete Segmente des nativen Proteins einen oder mehrere  $\beta$ -Stränge einer *cross- $\beta$ -spine* Struktur formen. Die Kristallstruktur des kurzen amyloidogenen GNNQQNY-Fragmentes des Hefeprions Sup35p bildet z.B. eine *cross- $\beta$ -spine* Struktur, bei der jedes Fragment einen  $\beta$ -Strang im  $\beta$ -Faltblatt bildet (Abbildung 1.3), (Nelson et al., 2005). In der Kristallstruktur sind zwei  $\beta$ -Faltblätter antiparallel mit einem Abstand von nur 8.5 Å dicht gepackt, sodass sie eine wasserfreie Grenzfläche ausbilden. Sich gegenüberliegende Glutamin- und Asparaginseitenketten greifen ineinander und formen einen sogenannten *steric zipper*. Amyloid-bildende Proteinsegmente vieler anderer Proteine wie etwa vom Prionprotein, A $\beta$  Protein, Insulin und Lysozym konnten mikrokristallisiert und röntgenkristallographisch untersucht werden. Sie weisen *cross- $\beta$ -spine* Strukturen auf, in denen  $\beta$ -Stränge parallel oder antiparallel angeordnet sind (Sawaya et al., 2007).



**Abbildung 1.3: Strukturmodell eines *cross- $\beta$ -spines*.** **A)** Mit Hilfe von Mikrokristallen erzeugtes Strukturmodell des amyloidogenen GNNQQNY-Fragmentes des Hefeprions Sup35p (PDB-Code: 1YJP), (Nelson et al., 2005).  $\beta$ -Faltblätter, die antiparallel ausgerichtet sind, werden aus kurzen  $\beta$ -Strangfragmenten geformt. Der Pfeil stellt die von den Autoren vorgeschlagene Fibrillenachse dar. **B)** Aufsicht entlang der Fibrillenachse. Die sich gegenüber liegenden Seitenketten in der wasserfreien Grenzfläche sind dicht gepackt. Seitenketten angrenzender  $\beta$ -Stränge sind einheitlich orientiert und formen sogenannte Seitenkettenstapel (siehe Abschnitt 1.2.2). Die einzelnen Polypeptidfragmente sind verschiedenfarbig dargestellt.

c) *3D domain-swapping*:

In *3D domain-swapping*-Modellen findet eine Umlagerung des nativen Zustandes statt, sodass zwei Proteinmoleküle häufig ganze Sekundärstrukturelemente austauschen und verwundene Oligomere formen (Bennett et al., 2006). Erstreckt sich dieser Domänen austausch fortlaufend über benachbarte Moleküle (*run-away domain swap*), entstehen fibrilläre Strukturen. Punktmutanten des Serpins

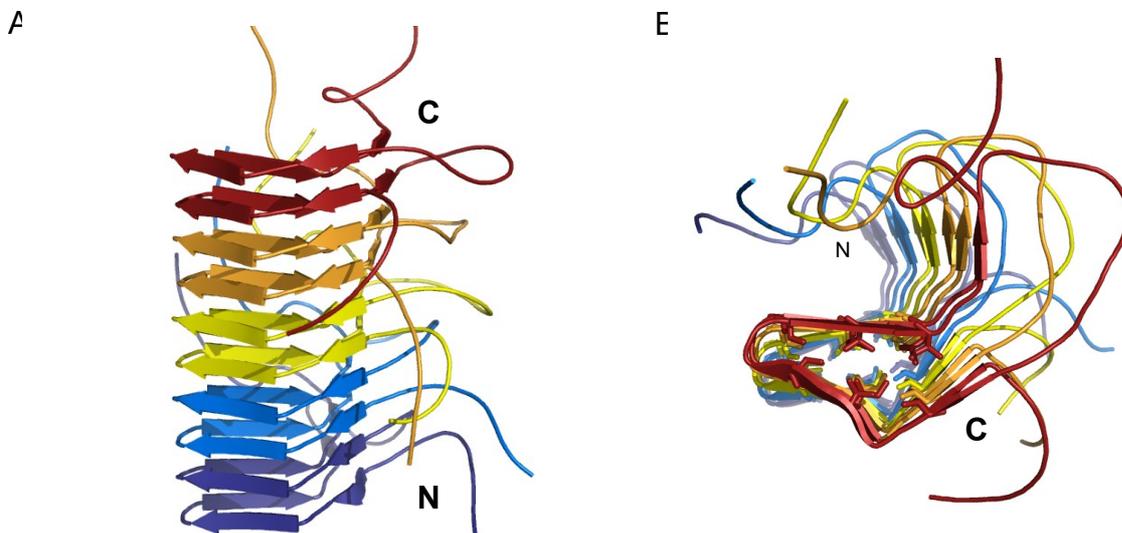
$\alpha$ 1-Antitrypsin bilden beispielsweise eine „hyperstabile“ Konformation aus, in der zwei  $\beta$ -Stränge zentral in ein ausgedehntes  $\beta$ -Faltblatt des Nachbarmoleküls eingebunden werden (Yamasaki et al., 2008).

d) *3D domain swapping with cross- $\beta$ -spine*:

Auch für Fibrillen eines Hybridkonstruktes der RNaseA, in deren C-terminale flexible *hinge*-Region eine Polyglutaminsequenz (GQ<sub>10</sub>G) eingebaut wurde, wurde ein *run-away domain swap* Modell vorgeschlagen (Sambashivan et al., 2005). Im Kristallstrukturmodell eines Hybriddimers, welcher enzymatisch aktiv ist, ist die native Struktur der Monomere weitestgehend erhalten. Die *hinge*-Region und die Polyglutamininsertion sind jedoch nicht in der Elektronendichte aufgelöst. Es wurde vorgeschlagen, dass in der fibrillären Form des Konstruktes C-terminale Domänen der Monomere in einer *run-away*-Art ausgetauscht sind und die Polyglutamininsertion jeweils einen  $\beta$ -Strang bildet. Fortlaufende  $\beta$ -Stränge formen einen ausgedehnten  $\beta$ -Faltblatt mit seitlich angelagerten nativ-ähnlich gefalteten Monomeren.

ii) *Natively disordered*-Modelle:

Die von Nelson und Eisenberg verwendete Bezeichnung *natively disordered*-Modelle bezieht sich auf das Merkmal einer großen Anzahl von Proteinen, die in ihrer nativen Konformation teilweise unstrukturiert vorliegen. Diese intrinsisch unstrukturierten Proteine (*intrinsically disordered proteins*) vollziehen einen strukturellen Wandel, sobald sie mit ihrem Bindungspartner interagieren (Fink, 2005).



**Abbildung 1.4: Strukturmodelle der HET-s Fibrille. A)** Festkörper-NMR Struktur der *Podospora anserina* HET-s(218-289) Fibrille (PDB-Code: 2RNM), (Wasmer et al., 2008). Jedes Fragment formt zwei Windungen einer linksgängigen  $\beta$ -solenoid-ähnlichen Struktur. **B)** Querschnitt der HET-s Fibrille. Seitenketten, welche in das hydrophobe Lumen der Struktur weisen sind als *sticks* dargestellt. Sie sind regelmäßig entlang der Längsachse gestapelt. In der Abbildung sind unterschiedliche Polypeptidketten verschiedenfarbig dargestellt.

Einige intrinsisch unstrukturierte Proteine wie z.B. die Prionen HET-s und Ure2p bilden Proteinfibrillen.

In den Festkörper-NMR Strukturen der isolierten HET-s Prionendomäne (218-289) und des vollständigen HET-s Prions formt die Prionendomäne, die im monomeren Protein ungeordnet ist, zwei Windungen einer  $\beta$ -solenoid-ähnlichen Struktur (Abbildung 1.4), (Wasmer et al., 2008, Wasmer et al., 2009).

iii) *Refolding*-Modelle:

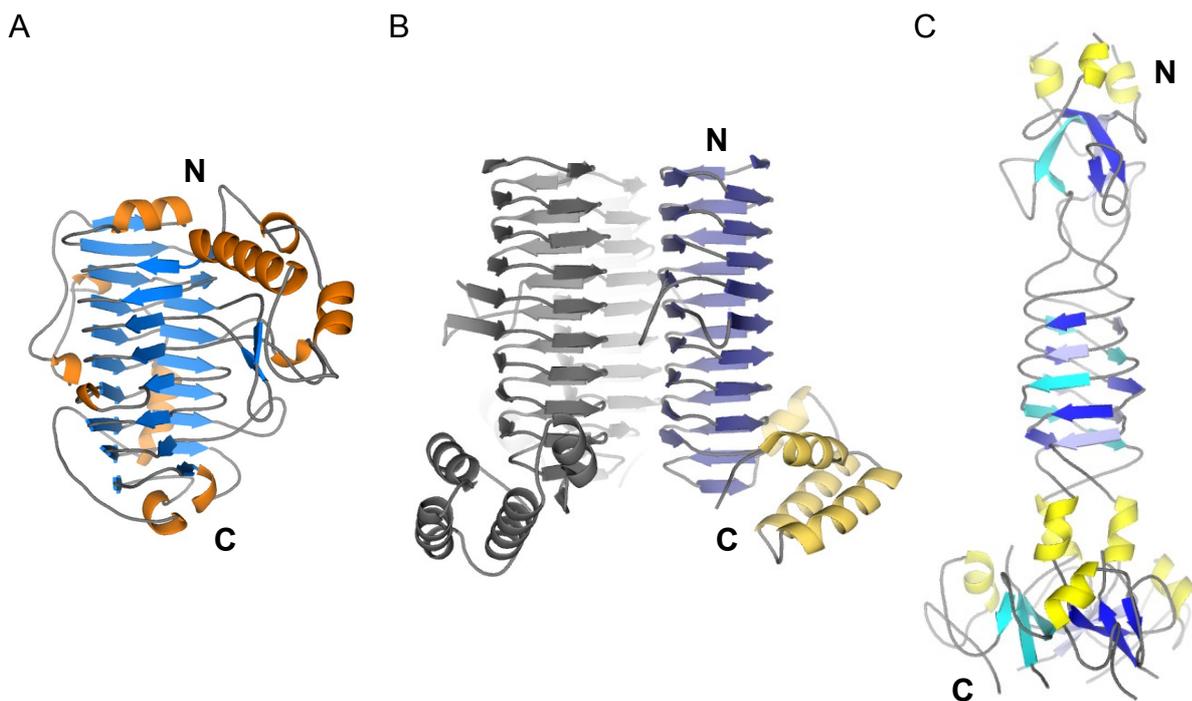
In *refolding*-Modellen wird angenommen, dass einige amyloid-formende Proteine beim Übergang aus dem nativen in den fibrillären Zustand komplett entfalten müssen, um dann, möglicherweise über Rückgradkontakte, zu assoziieren (Fändrich et al., 2001). Die native Form des Prionoproteins PrP<sup>C</sup> ist beispielsweise größtenteils  $\alpha$ -helikal mit einem ungeordneten N-terminalen Bereich, während in der infektiösen Form PrP<sup>Sc</sup> und in der aggregierten Fibrille der vormals  $\alpha$ -helikale Bereich einen hohen  $\beta$ -Strukturanteil aufweist. Govaerts et al. haben für Amyloidfibrillen, die aus einer verkürzten Form von PrP<sup>Sc</sup> gebildet wurden, auf Basis elektronenmikroskopischer Aufnahmen und 2D Kristallen eine links-gängige  $\beta$ -Helixstruktur mit vier Windungen vorgeschlagen (Govaerts et al., 2004).

Auch von anderen Autoren wurde die Ähnlichkeit zwischen  $\beta$ -Helices bzw.  $\beta$ -Solenoiden und *cross*- $\beta$  Strukturen erörtert (Lazo & Downing, 1998, Wetzel, 2002). Ein Vergleich liegt nahe, da in  $\beta$ -Solenoiden häufig keine spezifischen Sequenzmotive beobachtet wurden und variable Insertionen zwischen den  $\beta$ -Strängen möglich sind (siehe Abschnitt 1.2).

## 1.2. Die parallele $\beta$ -Solenoidstruktur

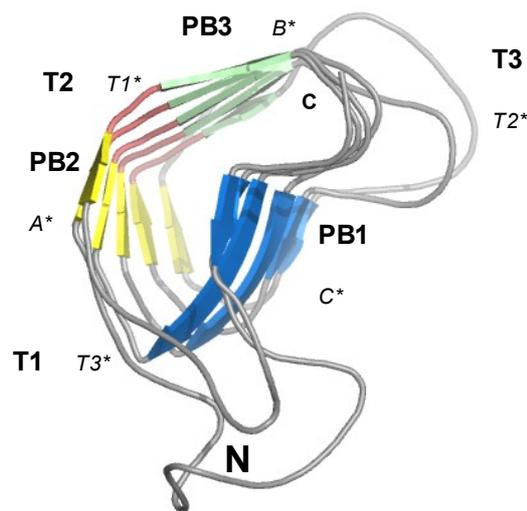
### 1.2.1 Proteine mit paralleler $\beta$ -Solenoidstruktur

Mit Aufklärung der Kristallstruktur der Pektatlyase C aus *Erwinia chrysanthemi* von Yoder wurde 1993 erstmalig das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix beschrieben (Yoder et al., 1993a). Bis dahin galten reine parallele  $\beta$ -Strukturen als instabil, doch zeigte sich rasch, dass das spulenförmige Faltungsmotiv von Bakterien, Bakteriophagen, Hefen, Pflanzen und höheren Eukaryoten genutzt wird (Jenkins et al., 1998, Kajava & Steven, 2006). Die Anzahl der aufgeklärten atomaren Strukturen, die das  $\beta$ -Helix Motiv beinhalten, hat in den letzten Jahren stark zugenommen und erlaubt nunmehr eine genaue Klassifizierung. Bei Eingabe des Suchbegriffs „parallel beta-helix“ werden aktuell in der RCSB Protein-datenbank (URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; abgerufen am: 8.10.2009) 207 von insgesamt 60606 Strukturen gefunden, dabei sind allerdings einige  $\beta$ -Helix Proteine mehrfach vertreten.



**Abbildung 1.5: Beispiele paralleler  $\beta$ -Helix Proteine.** **A)** Monomere Pektatlyase aus *Bacillus subtilis* mit rechtsgängiger, paralleler  $\beta$ -Helix (PDB-Code: 1BN8), (Pickersgill et al., 1994). **B)** Homotrimere UDP N-Acetylglucosamin Acyltransferase LpxA aus *Escherichia coli*. Eine Untereinheit mit linksgängiger, paralleler  $\beta$ -Helix ist farblich hervorgehoben (PDB-Code: 1LXA), (Raetz & Roderick, 1995). **C)** Fragment der kurzen Schwanzfaser (gp12) des Bakteriophagen T4. Drei Polypeptidketten sind zu einer rechtsgängigen, *triple-stranded*  $\beta$ -Helix verwunden (PDB-Code: 1H6W), (van Raaij et al., 2001). In den Abbildungen sind  $\beta$ -Stränge in blau und  $\alpha$ -Helices in gelb dargestellt.

Ursprünglich wurden Strukturen mit 2  $\beta$ -Strängen pro Windung als  $\beta$ -*rolls* und Strukturen mit 3  $\beta$ -Strängen pro Windung als  $\beta$ -Helices bezeichnet, jedoch sind mittlerweile einige Strukturen mit 4  $\beta$ -Strängen pro Windung gelöst und den  $\beta$ -Helices zugeordnet worden. Kajava und Steven haben zusammenfassend den Oberbegriff  $\beta$ -Solenoid für parallele  $\beta$ -Helices und parallele  $\beta$ -*rolls* vorgeschlagen, da ihre strukturellen Wiederholungseinheiten ausschließlich aus  $\beta$ -Strängen bestehen (Kajava & Steven, 2006).  $\beta$ -Solenoiden können nach Gängigkeit, Anzahl der Polypeptidketten, welche eine Windung bilden, Form der Windung und Oligomerisierungsgrad gruppiert werden, dabei bilden rechtsgängige, linksgängige und dreisträngige (*triple-stranded*), parallele  $\beta$ -Solenoiden die drei Hauptklassen (Abbildung 1.5), (Kajava & Steven, 2006). In  $\beta$ -Solenoiden verläuft die Polypeptidkette schraubenförmig entlang einer Längsachse mit einem Anstieg von 4.8 Å pro Windung bei einzelsträngiger und 14.5 Å (3 x 4.85 Å) pro Windung bei dreisträngiger Topologie. Die „klassische“  $\beta$ -Helixwindung wird aus drei  $\beta$ -Strängen (PB1, PB2 und PB3), die durch lange *loops* und kurze, enge *turns* unterschiedlicher Länge (T1, T2 und T3) verbunden sind, gebildet (Abbildung 1.6), (Yoder et al., 1993b, Yoder & Jurnak, 1995).



**Abbildung 1.6: Topologie und Nomenklatur einer parallelen rechtsgängigen  $\beta$ -Helix nach Yoder et al. (Yoder et al., 1993b). A)** Querschnitt der  $\beta$ -Helix im P22 Tailspikeprotein (Reste 356 bis 529). Drei  $\beta$ -Stränge PB2 (gelb), PB3 (grün) und PB1 (blau) sind durch die *loops* und *turns* T2, T3 und T1 verbunden. Viele rechtsgängige  $\beta$ -Helices haben einen L-förmigen Querschnitt, wobei die  $\beta$ -Stränge PB2 und PB1 ein antiparalleles  $\beta$ -*sandwich* bilden und der  $\beta$ -Strang PB3 im Winkel von etwa  $100^\circ$  zu PB1 und PB2 steht. Der kurze T2 *turn* (lachsfarben) ist meist invariant und stellt die am häufigsten vorkommende  $\beta$ -*arc* Konformation dar. Die mit \* gekennzeichnete Nomenklatur ist von Steinbacher für das P22 Tailspikeprotein eingeführt worden und wird entsprechend in dieser Arbeit verwendet (Steinbacher et al., 1997b).  $\beta$ -Stränge benachbarter Windungen bilden drei lang gestreckte  $\beta$ -Faltblätter. Aufsicht entlang der Längsachse vom N- zum C-terminalen Ende der Polypeptidkette.

*Loops* können mehrere hundert Aminosäuren umfassen und irreguläre Strukturen oder globuläre Subdomänen, wie beispielsweise die „Rückenflosse“ im P22 Tailspikeprotein, bilden. Kurze *turns* aus zwei bis sechs Aminosäuren werden anhand ihrer Länge und der Lage der Torsionswinkel Phi und Psi

der Aminosäuren im Ramachandran-Diagramm als  $\beta$ -arcs klassifiziert (Hennetin et al., 2006). Sie bestimmen den Winkel, in dem die verbundenen  $\beta$ -Stränge zueinander stehen und somit den Querschnitt einer Windung.

Fast alle Pektatlyasen und Tailspikeproteine weisen  $\beta$ -Helixwindungen mit L-förmigem Querschnitt auf, bei denen die  $\beta$ -Stränge PB1 und PB2 ein antiparalleles  $\beta$ -sandwich formen zu dem der  $\beta$ -Strang PB3 im Winkel von circa  $100^\circ$  ausgerichtet ist (siehe Abb. 1.6). Der Querschnitt von linksgängigen  $\beta$ -Helices ist meist T-förmig, d.h. drei  $\beta$ -Stränge formen ein etwa gleichseitiges Dreieck. Als O-förmig werden  $\beta$ -rolls mit 2  $\beta$ -Strängen bezeichnet und R-förmig sind quasi quadratische Windungen aus 4  $\beta$ -Strängen (Kajava & Steven, 2006).

$\beta$ -Stränge benachbarter Windungen formen lang gestreckte  $\beta$ -Faltblätter, welche die Wände der prismaförmigen Struktur darstellen. Dabei stehen aufeinander folgende Windungen meist nicht exakt übereinander, wodurch die gesamte  $\beta$ -Struktur eine leichte, fast immer linksgängige Drehung um die Längsachse beschreibt. Carbonyl- und Aminogruppen des Peptidrückgrats benachbarter Windungen bilden ein sehr regelmäßiges und umfassendes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen.

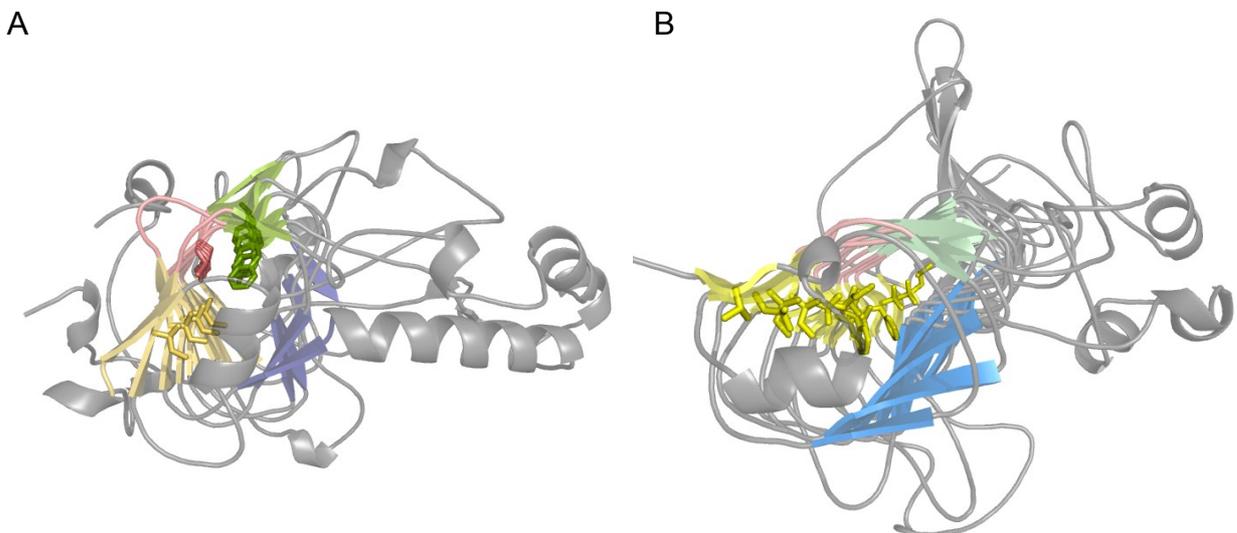
Die Anzahl der Windungen von  $\beta$ -Solenoiden kann stark variieren. Beispielsweise beinhaltet Serralyisin eine Metalloprotease aus *Serratia marcescens* eine  $\beta$ -roll aus nur 3 Windungen (Baumann, 1994). Besonders viele  $\beta$ -Helixwindungen haben virale und bakterielle Adhäsine, wie das P.69 Pertactin von *Bordetella pertussis* mit 16 Windungen oder das gp12 Protein des Bakteriophagen  $\Phi$ 29 mit etwa 20 Windungen (Emsley et al., 1996, Xiang et al., 2009). Für das filamentöse Hämagglutinin von *Bordetella pertussis* wurde auf Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Sequenzanalyse eine rechtsgängige  $\beta$ -Helix mit 80 Windungen vorhergesagt (Kajava et al., 2001).

An ihren C- und N-terminalen Enden sind  $\beta$ -Solenoiden meist durch sogenannte *capping*-Regionen abgeschlossen. Solche *caps* verhindern vermutlich lineare „edge-to-edge“-Polymerisation der  $\beta$ -Solenoiden über freie Wasserstoffbrückenbindungspartner, indem die endständigen Windungen Proline, geladene Reste, *loops* oder  $\alpha$ -Helices enthalten. (Richardson & Richardson, 2002, Kapp et al., 2004). *De novo* Design von *caps* kann Aggregation von  $\beta$ -Faltblättern unterbinden oder die Löslichkeit und Stabilität von durch Konsensusdesign hergestellten *Repeat*proteinen erhöhen (Wang & Hecht, 2002, Main et al., 2003a, Main et al., 2005).

Der Oligomerisierungsgrad vieler  $\beta$ -Solenoiden ist monomer (Abb. 1.5). Andere dimerisieren über Interaktion der *capping*-Regionen, Assoziation der  $\beta$ -Solenoid Domänen oder durch lineare Polymerisation von C- und N-terminalen Enden (Kajava & Steven, 2006). Virale Tailspikeproteine, bakterielle Transferasen und das YadA Adhäsin sind entlang der  $\beta$ -Solenoidachse assoziierte Homotrimere (Müller et al., 2008, Barbirz et al., 2008, Walter et al., 2008, Xiang et al., 2009, Raetz & Roderick, 1995). Bei *triple-stranded*  $\beta$ -Helices, die bisher ausschließlich in Schwanzfaserproteinen von Bakteriophagen gefunden wurden, sind drei Polypeptidketten verwunden und formen jeweils einen  $\beta$ -Strang einer gemeinsamen  $\beta$ -Helixwindung (Seckler 1998, Mittraki et al., 2006).

### 1.2.2 Seitenkettenstapelung in parallelen $\beta$ -Solenoiden

Ein herausragendes Strukturmerkmal aller  $\beta$ -Solenoiden ist die sehr regelmäßige Stapelung von Seitenketten entlang der Längsachse. Die im  $\beta$ -Strang alternierend innen und außen liegenden Seitenketten benachbarter Windungen formen lineare Stapel identischer oder ähnlicher Aminosäuren (Yoder et al., 1993b, Jenkins & Pickersgill, 2001). Dabei sind die Seitenketten nicht nur an gleicher Position angeordnet (*aligned*), wie es generell für parallele und anti-parallele  $\beta$ -Faltblätter zutrifft, sondern auch einheitlich orientiert. Definitionsgemäß ist in Stapeln im Minimum der Torsionswinkel  $\chi_1$  zwischen den  $C\alpha$ - und  $C\beta$ -Atomen an allen Positionen identisch (Petersen et al., 1997, Jenkins & Pickersgill, 2001). Meist sind auch die folgenden Seitenkettenatome bei gleichen Aminosäuren identisch oder bei ähnlichen Aminosäuren regulär ausgerichtet (Abb. 1.7). Im Kern von  $\beta$ -Solenoiden werden so hoch geordnete Stapel gleicher Reste gebildet, während an der Proteinoberfläche exponierte Aminosäuren stärker variieren können. Eine vergleichbar reguläre Packung von Seitenketten wird in globulären Proteinen nicht beobachtet, sie ist eine Besonderheit von Solenoiden, Faserproteinen und Amyloidfibrillen.



**Abbildung 1.7: Seitenkettenstapel in  $\beta$ -Helixproteinen. A)** Im Kern der *Bacillus subtilis* Pektatlyase sind drei Arten von Seitenkettenstapeln vertreten (PDB-Code: 1BN8). Ein aliphatischer Stapel aus Isoleucinen im  $\beta$ -Faltblatt PB2 (gelb), eine Asparaginleiter im T2 *turn* (lachsfarben) und ein planarer Stapel aus Phenylalaninen und Tyrosinen im  $\beta$ -Faltblatt PB3 (grün). **B)** Die Aminosäuren im hydrophoben Seitenkettenstapel im  $\beta$ -Faltblatt A einer Untereinheit des P22 Tailspikeproteins sind vielfältig (PDB-Code: 2VFM). Die Ansicht der Proteinstrukturmodelle ist vom N- zum C-Terminus. Seitenketten sind als *sticks* dargestellt.

Seitenkettenstapel können in drei Klassen gegliedert werden: aliphatische Stapel, planare Stapel und Stapel von Resten, die Wasserstoffbrücken ausbilden (Abb. 1.7 A), (Jenkins et al., 1998). Das begrabene Lumen von  $\beta$ -Solenoiden wird von ungeladenen, hydrophoben Resten wie Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin dominiert. Es wird vermutet, dass die dicht gepackten aliphatischen Stapel entscheidend zur hohen Stabilität von  $\beta$ -Solenoidproteinen beitragen (Branden & Tooze, 1998). In planaren Stapeln sind die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, bedingt durch die leichte

Drehung der  $\beta$ -Solenoidstruktur um ihre Längsachse, geringfügig versetzt und mit der Packung der Basen in doppelsträngiger DNA vergleichbar (Jenkins et al., 1998). Stapel polarer Asparagine, Serine, Threonine und Cysteine können im Inneren von  $\beta$ -Helices geordnete Netzwerke von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Stapels und mit Atomen des Peptidrückgrads formen. Die sogenannte „Asparaginleiter“ wird im kurzen, konservierten T2 *turn* fast aller Pektat- und Pektinlyasen beobachtet, weshalb vermutet wurde, dass sie bei der Ausbildung der nativen Proteinstruktur die relative Anordnung der Sekundärstrukturelemente zueinander, also das „Register“ bestimmen oder möglicherweise als Faltungsnukleus fungieren könnte (Jenkins et al., 1998, Walter, 2002, Heinz, 2006).

### **1.2.3 Solenoidproteine, Sequenzrepeats und Strukturvorhersage**

Solenoidproteine sind Proteine mit superhelikalem Verlauf der Polypeptidkette, bei denen, im Gegensatz zur komplex verknäulten Struktur globulärer Proteine, Einheiten eines sich wiederholenden Strukturmotivs eine längliche Topologie mit niedriger Kontaktordnung bilden (Kobe & Kajava, 2000, Baker, 2000). Insgesamt sind mehr als 20 Proteinfamilien mit einer solchen spulenförmigen Struktur bekannt. Sie vermitteln häufig Protein-Protein- oder Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen (Kobe & Kajava, 2000). Die einzelnen strukturellen Wiederholungseinheiten sind je nach Proteinklasse aus verschiedenen angeordneten Sekundärstrukturelementen aufgebaut. Das Ankyrin-Motiv besteht beispielsweise aus zwei  $\alpha$ -Helices, die durch einen  $\beta$ -*hairpin* oder *loop* verbunden sind. Das Tetratricopeptid-Motiv (TPR) wird aus zwei  $\alpha$ -Helices, welche durch einen *turn* verbunden sind, geformt. Die strukturelle Wiederholungseinheit von LRR-Proteinen (*leucine-rich repeat*) beinhaltet eine  $\alpha$ - oder  $3_{10}$ -Helix, welche über einen *loop* mit einem  $\beta$ -Strang verbunden ist, und  $\beta$ -Solenoidproteine bestehen, wie bereits beschrieben, aus durch  $\beta$ -*arcs* oder *loops* verbundenen  $\beta$ -Strängen.

Bei den meisten Solenoidproteinen liegt der strukturellen Wiederholungseinheit ein repetitives Sequenzmotiv (*repeat*) aus etwa 20 bis 40 Aminosäuren zugrunde (Kobe & Kajava, 2000). Dieses repetitive Sequenzmotiv kann wiederum aus Tandemwiederholungen kurzer Sequenzen bestehen, die symmetrische Sekundärstrukturelemente einer Windung, wie beispielsweise einzelne  $\beta$ -Stränge, bilden können. Bei sehr einheitlichen Sequenzmotiven und einer hinreichend großen Sequenzdatenbank ist es möglich, durch Sequenzalignments und Konsensusdesign Windungen in Solenoidproteine einzufügen oder neue stabile Proteine zu entwickeln (Main et al., 2003a). Durch ein solches Vorgehen konnte die Eisbindeaktivität des  $\beta$ -helikalen *Antifreeze*proteins des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* gesteigert werden (Marshall et al., 2004). Ein weiteres Beispiel ist ein aus unterschiedlich vielen Tetratricopeptid *repeats* hergestelltes Protein, bei dem thermische Stabilität und Kooperativität des Überganges mit Anzahl der Windungen steigt (Main et al., 2003b, Kloss et al., 2008a).

Bei parallelen  $\beta$ -Solenoiden sind Sequenzrepeats nicht immer offensichtlich und ohne Kenntnis der Tertiärstruktur manchmal schwer zu identifizieren (Kajava & Steven, 2006). Unregelmäßig lange *loops*, die die  $\beta$ -Stränge verbinden, erschweren eine Strukturvorhersage anhand der Primärsequenz. Die empirischen Algorithmen BETAWRAP und BetaWrapPro verwenden spezifische Eigenschaften von Seitenketteninteraktionen benachbarter  $\beta$ -Stränge im Lumen der  $\beta$ -Helixdomäne zur Strukturvorher-

sage (Bradley et al., 2001, McDonnell et al., 2006).

Offensichtliche Wiederholungsmotive, die in parallelen  $\beta$ -Solenoiden vorzufinden sind, sind das Hexapeptid-Motiv (HRP) in linksgängigen trimeren LpxA-ähnlichen Enzymen oder das T-X-T-Motiv des Antifreeze Proteins des Fichtenkäfers *Choristoneura fumiferana* (Graether et al., 2000, Leinala et al., 2002). Auch das rechtsgängige Antifreeze Protein des Mehlkäfers *Tenebrio molitor* interagiert über ein solches T-X-T-Motiv mit der Gitterstruktur von Eiskristallen, was eine konvergente Evolution der Proteine nahelegt (Liou et al., 2000). Die vier  $\beta$ -Stränge des rechtsgängigen MfpA Proteins von *Mycobacterium tuberculosis* sind aus jeweils einem Pentapeptid-Motiv gebildet (Hegde et al., 2005).

#### **1.2.4 Funktionen von $\beta$ -Solenoidproteinen**

Die meisten  $\beta$ -Solenoidproteine sind Virulenzfaktoren auf der Oberfläche von Bakterienzellen oder virale Adhäsine (Kajava & Steven, 2006). Darüber hinaus prognostizieren Sequenzanalysen  $\beta$ -Solenoidstrukturen für etliche weitere Toxine, Virulenzfaktoren, Adhäsine und Oberflächenproteine pathogener Bakterien und Pilzen (Bradley et al., 2001). Ein generelles Funktionsprinzip von  $\beta$ -Solenoiden ist die Interaktion mit elongierten Substraten, meist Kohlenhydratketten, wobei das elongierte und rigide Motiv als Gerüst für die Interaktion mit flexiblen Molekülen fungieren kann (Barbirz et al., 2009). Loopregionen mit variabler Länge können Furchen oder unterschiedliche aktive Zentren formen.

Bakterielle Virulenzfaktoren sind zum Beispiel von Bakterien und Pilzen sekretierte, monomere Pektinasen, die wie etwa Pektatlyasen, Polysaccharide von Pflanzenzellwänden verdauen und modifizieren (Kajava & Steven, 2006, Pickersgill et al., 1994).

Bakterielle Adhäsine, wie das Kollagen-Bindeprotein YadA aus *Yersinia enterocolitica* oder das P.69 Pertactin aus *Bordetella pertussis*, ermöglichen die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren der Wirtszelle. Beide Proteine sind Autotransporter, deren *transporter*-Domäne eine Pore in der äußeren Zellmembran bildet durch die die *passenger*-Domäne entlassen wird und außerhalb der Zelle in ihre  $\beta$ -Solenoidstruktur faltet (Nummelin et al., 2004, Junker et al., 2006).

Die bisher strukturell charakterisierten viralen Adhäsine sind sehr stabile Homotrimere, bei denen die drei Untereinheiten entweder seitlich assoziiert sind oder eine verwickelte *triple-stranded*  $\beta$ -Solenoidstrukturen aufweisen (Mitraki et al., 2006). Die Faserproteine binden und verdauen polymere Oberflächenrezeptoren, wie Lipopolysaccharid- (Phagen P22, Sf6, HK620, Det7, 9NA, T4, (Steinbacher et al., 1996, Müller et al., 2008, Barbirz et al., 2008, Walter et al., 2008, Wollin et al., 1981, van Raaij et al., 2001)), Teichonsäure- (Phage  $\Phi$ 29, (Xiang et al., 2009)), Polysialinsäure- (Phage K1F, (Stummeyer et al., 2005)) oder Hyaluronsäure-Rezeptoren (Prophage im *Streptococcus pyogenes* Stamm SF370 Genom, (Smith et al., 2005)), auf der Zelloberfläche des jeweiligen Wirtsbakteriums. Eine längliche Bindungsstelle und das katalytisch aktive Zentrum sind entweder mit der  $\beta$ -Solenoid Domäne und/oder einer zusätzlichen globulären Domäne assoziiert.

Auch das zellwanddurchlöchernde Werkzeug (*cell-puncturing device*, gp5) des Phagen T4 beinhaltet eine ausgedehnte *triple-stranded*  $\beta$ -Solenoidstruktur.

Die  $\beta$ -Solenoidstruktur kann auch als Gerüst für weitere Funktionen verwendet werden. Das MfpA Protein von *Mycobacterium tuberculosis* ahmt beispielsweise durch seine quadrilaterale  $\beta$ -Helixstruktur Größe, Form und elektrostatische Oberflächenbeschaffenheit doppelsträngiger DNA nach (Hegde et al., 2005).

Ein anderes Beispiel sind die bereits erwähnten, überaus regelmäßig aufgebauten Antifreeze Proteine einiger Insekten. Jeder  $\beta$ -Strang der  $\beta$ -Helix beinhaltet ein typisches T-X-T-Eisbindungsmotif, welches mit der Struktur des Eiskristallgitters interagieren und somit den Gefrierpunkt beeinflussen kann (Marshall et al., 2004, Leinala et al., 2002).

Die meisten linksgängigen  $\beta$ -Solenoiden sind bakterielle Acyl-Transferasen, die Acetat, Succinat, Hydroxy-Fettsäuren mit Hilfe von Acyl-Coenzym A oder Acyl-Carrier-Protein (ACP) übertragen. Die Substratbindestelle der Enzyme liegt zwischen den Monomeruntereinheiten (Raetz & Roderick, 1995, Wyckoff & Raetz, 1999).

## 1.3 Das Tailspikeprotein des Bakteriophagen P22

### 1.3.1 Struktur und Funktion des P22 Tailspikeproteins

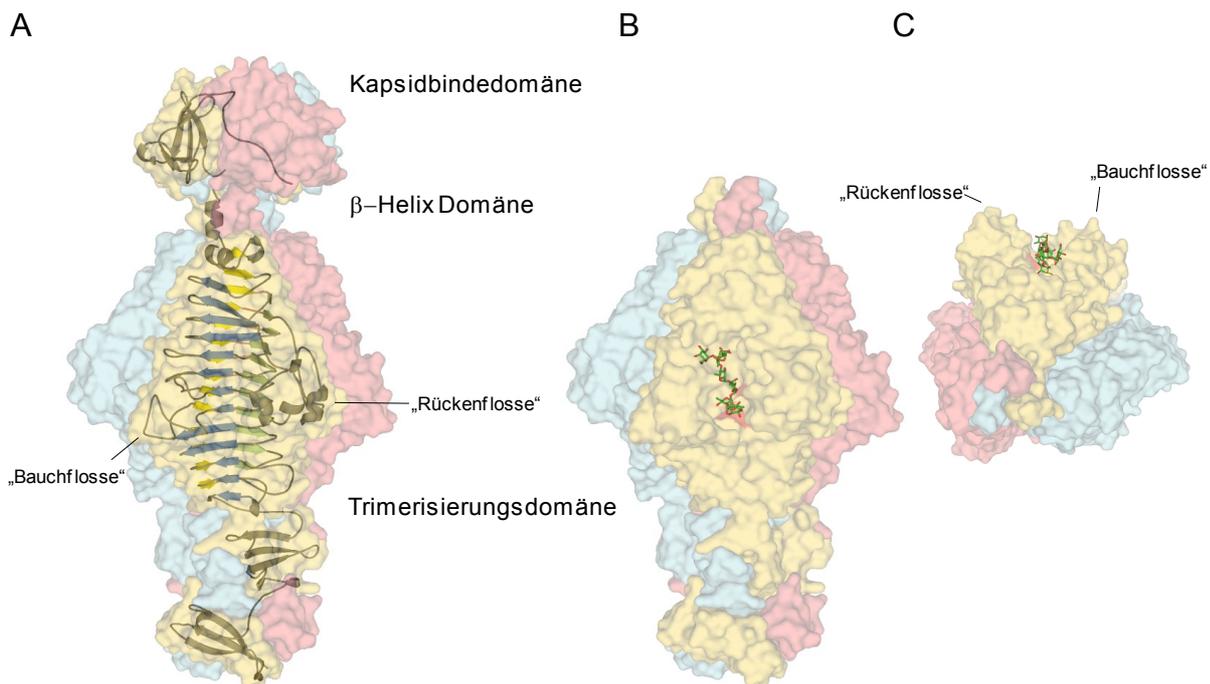
Das Tailspikeprotein des Bakteriophagen P22 ist ein hinsichtlich Faltung, Stabilität und Kohlenhydratinteraktion sehr detailreich untersuchtes Modellsystem. Sechs Kopien des homotrimeren Proteins sind am Portalkomplex des P22 Phagen verankert (Israel et al., 1972, Lander et al., 2006). Der Phage der Morphologiekategorie *Podoviridae*, die sich durch einen kurzen nicht-kontraktilen Schwanz, ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom und ein ikosaederförmiges Kapsid definiert, infiziert Salmonellen der Spezies *Salmonella enterica* mit den Serotypen A, B und D1 (Israel et al., 1967, Steinbacher et al., 1997b). Im ersten Schritt des Infektionszykluses des P22 Phagen bindet das Tailspikeprotein an das Lipopolysaccharid auf der Oberfläche der Gram-negativen Zelle und ermöglicht auf diese Weise die Adsorption des Phagen an seinen Wirt.

Das P22 Tailspikeprotein besteht aus 666 Aminosäureresten und hat eine Molekülmasse von 72 kDa. Drei Untereinheiten bilden ein elongiertes Homotrimer mit einer Länge von etwa 180 Å und einem Durchmesser von bis zu 80 Å (Steinbacher et al., 1997a, Seul, 2008). Das Protein ist in drei funktionelle Regionen gegliedert: eine aminoternale Kapsidbindedomäne (1-108), ein zentraler Lipopolysaccharid-Rezeptor mit Endorhamnosidaseaktivität (109-540) und eine carboxyterminale Trimerisierungsdomäne (541-666), (Abbildung 1.8 A).

Die Kapsidbindedomäne des Tailspikeproteins interagiert irreversibel doch nicht-kovalent mit dem Portalkomplex des Phagenkopfes (Israel et al., 1967, Lander et al., 2006). Die kuppelförmige Struktur ist reich an antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und *Loop*regionen (Steinbacher et al., 1997b).

Die zentral gelegene  $\beta$ -Helix Domäne erkennt und hydrolysiert Lipopolysaccharide und ermöglicht die Bindung des Phagen an die Salmonelle. Die Domäne beinhaltet einen sehr flexiblen Interdomänenlinker, eine N-terminale *capping*-Region und 13 Windungen des  $\beta$ -Helix-Strukturmotivs. Zwei ausgehende Insertionen im T2 *loop* der  $\beta$ -Helixwindung 3 bzw. im T3 *loop* der  $\beta$ -Helixwindung 9 formen die „Rücken-“ (197-259) und die „Bauchflosse“ (397-425). Das O-Antigen des Lipopolysaccharids wird im Zuge des Infektionsprozesses in einer durch diese beiden Subdomänen flankierten Furche im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix gebunden (Abbildung 1.8 B). Drei katalytisch aktive Reste, E359, D392, D395, spalten die  $\alpha(1,3)$ -O-glycosidische Bindung des O-Antigens zwischen Rhamnose und Galaktose (Baxa et al., 1996, Steinbacher et al., 1996, Steinbacher et al., 1997a, Baxa et al., 2001).

Am C-terminalen Ende der  $\beta$ -Helix Domäne formen die Polypeptidketten der Tailspikeuntereinheiten die Trimerisierungsdomäne. Die in diesem Bereich gebildeten  $\beta$ -Strang-reichen Struktur motive, *triple-stranded*- $\beta$ -Helix und *triple*- $\beta$ -Prisma, kommen auch in anderen stabilen, viralen Faserproteinen vor (Seckler, 1998, Mitraki et al., 2002, Mitraki & van Raaij, 2005).



**Abbildung 1.8: Strukturmodell des homotrimeren P22 Tailspikeproteins.** **A)** Manuell aus den Kristallstrukturen der N-terminalen (PDB-Code: 1LKT, (Steinbacher et al., 1997a), 5-108) und der C-terminalen Domäne (PDB-Code: 2VFM, 112-666) zusammengesetztes Modell des Tailspiketrimers. Die Untereinheiten des P22 Tailspikeproteins (hellblaue, rosa und orange Oberflächen) sind sowohl funktionell als auch strukturell in drei Domänen unterteilt. Sekundärstrukturelemente einer Untereinheit sind als *cartoon* dargestellt, wobei die  $\beta$ -Faltblätter A, B und C der  $\beta$ -Helix Domäne gelb, grün und blau gefärbt sind. **B)** O-Antigenfragment (cyan) in der Bindungsfurche einer Tailspikeuntereinheit. Die katalytisch aktiven Reste des Proteins E359, D392, D395 sind rot gefärbt. Zum Erhalt der Struktur wurden Kristalle des N-terminal verkürzten Tailspikeproteins mit Oktasaccharid *gesoakt* (PDB-Code: 1TYU, (Steinbacher et al., 1997b)). In Abbildung **C)** ist die Blickrichtung entlang der Bindungsfurche vom N- zum C-terminalen Ende des Proteins.

Die evolutiv eng mit P22 verwandten trimeren Tailspikeproteine der Bakteriophagen Sf6 und HK620 sind strukturell und funktionell sehr gleichartig und interagieren ebenfalls über eine längslaufende Furche, die sich auf dem Rücken einer Untereinheit oder zwischen jeweils zwei Untereinheiten erstreckt mit dem Lipopolysaccharid ihrer Gram-negativen Wirtszellen (Freiberg et al., 2003, Müller et al., 2008, Barbirz et al., 2008). Auch die Tailspikeproteine der Phagen Det7 und 9NA, die nicht zur Familie der Podoviridae sondern den Myoviridae bzw. Siphoviridae zugeordnet sind, sind dem P22 Tailspikeprotein funktionell und strukturell sehr ähnlich (Walter et al., 2008, Wollin et al., 1981, Barbirz, pers. Mitteilung).

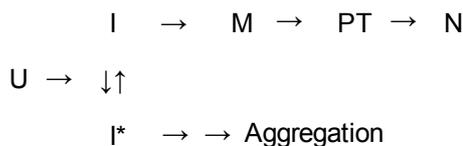
Die kürzlich publizierte Struktur des homotrimeren Tailspikeproteins (gp12) des  $\Phi$ 29 Phagen, der das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* infiziert, ist in mehrerlei Hinsicht aufschlussreich (Xiang et al., 2009). Im reifen Zustand besteht eine Untereinheit aus zwei linksgängigen  $\beta$ -Solenoid Domänen. Die N-terminale Domäne bildet 13 Windungen einer L-förmigen  $\beta$ -Helix und beherbergt auf ihrem Rücken die Bindungsfurche für den Teichonsäure-Rezeptor und das putative katalytisch aktive

Zentrum. Die C-terminale Domäne ist ebenfalls linksgängig  $\beta$ -solenoidal mit 8 Windungen einer  $\beta$ -roll. Im unreifen Zustand besitzt das  $\Phi 29$  Tailspikeprotein eine weitere C-terminale Domäne mit Autochaperonaktivität, welche die Trimerisierung des Proteins unterstützt und anschließend abgespalten wird.

### 1.3.2 *In vivo* und *in vitro* Faltung des P22 Tailspikeproteins

Das native P22 Tailspikeprotein ist resistent gegen Hitze, den Verdau durch Proteasen und das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bei Raumtemperatur. Deshalb kann der Faltungsweg des Proteins *in vivo* und *in vitro* mittels SDS-PAGE über die im Vergleich zum Monomer verminderte Mobilität des nativen Trimers verfolgt werden. SDS-labile Spezies wie Aggregate oder nicht-native Oligomere werden durch das Detergenz gelöst und entfaltet.

Obwohl die Bedingungen in der Bakterienzelle und im Reagenzglas überaus verschieden sind, zeigt der Reifungsprozess des P22 Tailspiketrimers *in vivo* und *in vitro* einen ähnlichen Verlauf und vergleichbare intermediäre Strukturen (Goldenberg et al., 1982, Seckler et al., 1989). *In vitro* faltet das Protein über mehrere kinetische Phasen nach dem in Abbildung 1.9 dargestellten Schema (Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993).



**Abbildung 1.9: Modell des *in vitro* Faltungswegs des P22 Tailspikeproteins nach Danner und Seckler (Danner & Seckler, 1993).** Dabei ist U das entfaltete Polypeptid, I ein thermolabiles Intermediat, I\* ein aggregationsanfälliges Intermediat, M das gefaltete Monomer, PT das SDS-sensitive Protrimer und N das native, SDS-resistente Trimer.

Der erste Schritt im Reifungsprozess ist die Faltung des Tailspikemonomers, die *in vitro* mittels spektroskopischer Methoden aufgezeichnet werden konnte (Seckler et al., 1989, Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993). Bei 10 °C kompaktiert die entfaltete Polypeptidkette innerhalb weniger Sekunden zu einem  $\beta$ -Faltblatt-reichen, thermolabilen Intermediat (I), welches mit einer Halbwertszeit von circa 7 Minuten zum assoziationskompetenten Monomer (M) reift. Drei gefaltete Untereinheiten lagern sich in einer Reaktion, die nach 90 Minuten abgeschlossen ist, zum sogenannten Protrimer (PT) zusammen. Im Protrimer, welches wegen seines größeren hydrodynamischen Radius durch Größenausschlusschromatographie und Nativgelelektrophorese vom nativen Trimer unterschieden werden konnte, sind die Untereinheiten stabil assoziiert, doch ist eine Dissoziation der Ketten mittels SDS und der Verdau durch Proteasen möglich. Die Reifung des Protrimers zum nativen, SDS- und Protease-resistenten Trimer (T) ist mit einer Halbwertszeit von 12 Stunden bei 10 °C langsam und der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltungsreaktion. Mutationen im Bereich der *triple*- $\beta$ -Helix können die Trimerbildung verlangsamen oder blockieren, weshalb vermutet wurde, dass die Verflechtung und

Kompaktierung der C-terminalen Domänen im Reifungsprozess entscheidend ist (Kreisberg et al., 2002).

*In vivo* konnte die Faltungskinetik des Tailspikeproteins mit Hilfe von Phagen-infizierten Salmonellen verfolgt werden (Goldenberg & King, 1981, Goldenberg & King, 1982). Dazu wurde in einem späten Stadium des Infektionsprozesses, wenn das Tailspikeprotein eines der Hauptsyntheseprodukte in der Zelle darstellt, das Protein mittels Pulsmarkierung mit radioaktiv-gekennzeichneten Aminosäuren markiert. Mit Nativgelelektrophorese der Zelllysate und Autoradiographie konnte die Kinetik der Protrimer-Trimer-Konversion direkt verfolgt werden. In neueren Untersuchungen wurde die cotranslationelle Faltung des Tailspikeproteins mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, welche mit verschiedenen intermediären Strukturen während des Reifungsprozesses des Tailspikeproteins interagieren, untersucht (Clark & King, 2001, Evans et al., 2005, Jain et al., 2005, Friguet et al., 1990). Es zeigte sich, dass sich *in vivo* noch am Ribosom gebundene monomere Tailspikeintermediate, strukturell von frühen *in vitro* Rückfaltungsintermediaten unterscheiden. Allerdings wird die Faltungsanalyse mit Hilfe von Antikörpern kontrovers diskutiert, da die Bindung eines Antikörpers Strukturbildung und Faltungsweg beeinflussen könnte.

### **1.3.3 Einfluss von Faltungsmutationen**

In den 1980er Jahren wurden für das Tailspikeprotein eine Vielzahl von durch UV-Bestrahlung oder chemische Behandlung verursachte Punktmutationen isoliert, die temperaturabhängig den Faltungsprozess beeinflussen (Smith et al., 1980, Fane & King, 1991). Diese Mutationen liegen fast ausschließlich im Bereich der Aminosäurepositionen 150 bis etwa 450, d.h. in der  $\beta$ -Helix Domäne (Yu & King, 1984, Villafane & King, 1988). Bei Mutationen, welche einen sogenannten temperatursensitiven Faltungsphänotyp (*temperature sensitive for folding, tsf*) hervorrufen, ist die Reifung des nativen Trimers bei erhöhter, restriktiver Temperatur (39 °C) stark verringert, bei niedriger, permissiver Temperatur (30 °C) dagegen wildtyp-ähnlich. *In vivo* und *in vitro* konnte gezeigt werden, dass *tsf*-Mutationen an vielen Positionen des Tailspikeproteins die Bildung von Aggregaten hervorrufen, indem sie das thermolabile Intermediat I der Monomereinfaltung destabilisieren und mit steigender Temperatur das Gleichgewicht in Richtung eines aggregationsanfälligen Intermediates I\* verschieben (Abbildung 1.9), (Goldenberg et al., 1983, Danner & Seckler, 1993, Haase-Pettingell & King, 1988, Mitraki & King, 1992). Aufgrund der hohen Stabilität und des komplexen Entfaltungsweges des Tailspike-trimers schienen native *tsf*-Mutanten ebenso stabil zu sein wie der native Wildtyp (Sturtevant et al., 1989). Basierend auf dieser Beobachtung und auf der auf Sequenzanalyse beruhenden Vermutung, dass sich die *tsf*-Mutationen an der Proteinoberfläche und in *turns* befänden, wurde die sogenannte Foldon-Hypothese aufgestellt, die besagt, dass es Reste in der Aminosäuresequenz gibt, die Informationsträger für die Ausbildung der Struktur und Faltungskinetik sind, im nativen Protein jedoch keine Rolle z.B. für die Stabilität spielen (Yu & King, 1984). *Tsf*-Mutanten würden quasi einen Faltungscode markieren, der die Polypeptidkette über bestimmte Intermediate zum nativen Zustand leitet.

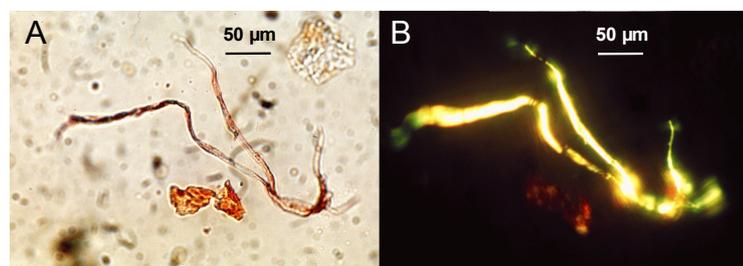
Erst mit Vereinfachung der Entfaltungskinetik durch Deletion der N-terminalen Kapsidbindedomäne

(TSP $\Delta$ N-Konstrukt, 109-666) und zudem durch Isolierung der  $\beta$ -Helix Domäne (BHX, 109-544), die im Gleichgewicht einen reversiblen Faltungsübergang zeigt und somit die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität erlaubt, konnte eindeutig der im Volllängenprotein maskierte destabilisierende Einfluss der *tsf*-Mutationen gezeigt und die Foldon-Hypothese widerlegt werden (Danner & Seckler, 1993, Miller et al., 1998a, Miller et al., 1998b, Schuler & Seckler, 1998).

Eine andere Art von Punktmutationen wirken als globale Suppressoren (*su*) des *tsf*-Phänotyps (Fane & King, 1991, Fane et al., 1991). Sie erhöhen die Faltungsausbeuten bei restriktiver Temperatur und können den *tsf*-Phänotyp ausgleichen. Die vier bekannten *su*-Mutationen erhöhen die thermodynamische Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix, vermutlich indem einige die sterische Spannung der Struktur verringern und andere die Seitenkettenstapelung im Inneren der  $\beta$ -Helix verbessern und hierdurch das kritische Faltungsintermediat I der Monomerfaltung stabilisieren (Beissinger et al., 1995, Miller et al., 1998b, Schuler & Seckler, 1998).

### 1.3.4 Aggregation des Tailspikeproteins

Wie für viele andere Proteine, die nicht mit Fehlfaltungskrankheiten in Verbindung gebracht werden (siehe Abschnitt 1.1.1), wurde auch für das vollständige P22 Tailspikeprotein und die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne (109-544) Aggregation und die Bildung von fibrillären Strukturen beobachtet und eingehend charakterisiert (Speed et al., 1995, Speed et al., 1997, Schuler et al., 1999). Schon das komplette Wildtypprotein bildet bei restriktiver Temperatur ausgehend vom aggregationsanfälligen, teilgefalteten Intermediat I\* *in vivo* und *in vitro* Aggregate. Durch Destabilisierung des Faltungsintermediates I, z.B. durch Einfügen von *tsf*-Mutationen kann die Aggregationstendenz zusätzlich gesteigert werden (Haase-Pettingell & King, 1988, Danner & Seckler, 1993). Der *in vitro* bei mild denaturierenden Bedingungen untersuchte Polymerisationsprozess des Volllängenproteins erfolgt über spezifische Interaktionen und nicht unspezifisch über entfaltete Ketten oder Koaggregation mit einem anderen im *in vitro* Rückfaltungsansatz aggregierenden Protein (Speed et al., 1996). Die langsame Reaktion konnte mittels Lichtstreuung und Nativgelelektrophorese verfolgt werden. Sie verläuft nach einem sogenannten *cluster-cluster*-Mechanismus, bei dem die Assoziation über lineare Polymerisation von Monomeren und größeren Polymeren erfolgt (Speed et al., 1997).



**Abbildung 1.10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von  $\beta$ -Helix Aggregaten. A)** Fibrilläre und amorphe Aggregate der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne in Gegenwart von 100  $\mu$ M Kongorot. **A)** Im polarisiertem Licht zeigen hoch geordneten Fibrillen der isolierten  $\beta$ -Helix Doppelbrechung. Die Abbildung ist von Schuler übernommen (Schuler et al., 1999).

Auch die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne kann bei mittleren Denaturantkonzentrationen in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen oder durch Einfügen von destabilisierenden *tsf*-Mutationen Aggregate bilden (Schuler et al., 1999). Diese Aggregate formen sich im Gegensatz zur schnellen Rückfaltungsreaktion der isolierten Domäne langsam und analog zum Volllängenprotein wahrscheinlich über *cluster-cluster* Polymerisation, ausgehend von einem nativ-ähnlichen, teilgefalteten Zustand. Die Aggregate zeigen unterschiedliche Morphologien, beispielsweise auch lineare Fibrillen, die Kongorot binden und im polarisiertem Licht Doppelbrechung zeigen (Abbildung 1.1 und 1.10), (Schuler et al., 1999). Ob in den Fibrillen  $\beta$ -Helices über *edge-to-edge*-Aggregation teilentfalteter Domänen assoziiert sind (*direct stacking* Modell) oder ob die Polypeptidketten über einen vollständig entfalteten Zustand in eine cross- $\beta$ -Struktur falten, ist eine interessante Fragestellung.

### **1.3.5 Einfluss der Seitenkettenstapelung auf Stabilität und Faltung von $\beta$ -Solenoiden – Stand der Forschung**

Hoch aufgelöste Strukturen von Amyloidfibrillen, welche aus kurzen amyloidogenen Peptiden oder aus vollständigen Proteindomänen gebildet wurden, verdeutlichen ihre strukturelle Ähnlichkeit zum  $\beta$ -Helix Strukturmotiv (Nelson & Eisenberg, 2006, Wasmer et al., 2008). Neben lang gestreckten  $\beta$ -Faltblättern und regelmäßigen Wasserstoffbrückenbindungen ist ein besonderes Merkmal beider Strukturen die lineare Stapelung identischer oder ähnlicher Seitenketten entlang der  $\beta$ -Faltblattachse.

Bisher wurde in nur wenigen Arbeiten explizit der Einfluss der Seitenkettenstapelung für Stabilität und Faltung von  $\beta$ -Solenoiden behandelt. Die beiden hierzu verwendeten Modellproteine waren die Pektatlyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) und das Tailspikeprotein des Bakteriophagen P22.

In ihrer Dissertation hatte Monika Walter einen in der Asparaginleiter der *Bacillus subtilis* Pektatlyase zentral gelegenen Asparaginrest gegen unterschiedliche Aminosäuren ausgetauscht (Walter, 2002). Die Mutanten zeigten einen temperatursensitiven Faltungsphänotyp, wildtyp-ähnliche Entfaltungsgeschwindigkeiten und verlangsamte Faltungsraten bei Temperaturanstieg, weshalb vermutet wurde, dass durch die Unterbrechung des Asparaginrests der BsPel ein thermolabiles Faltungsintermediat destabilisiert wird. In einer weiterführenden Arbeit wurden von Benjamin Heinz alle vier Reste der Asparaginleiter der BsPel jeweils einfach gegen Valin und in der Mutante Val4 gleichzeitig substituiert (Heinz, 2006). Die von ihm erhobenen Daten verdeutlichen, dass in BsPel eine Unterbrechung oder Entfernung der Asparaginleiter zwar die Stabilität des Proteins stark beeinflusst, die Faltungsreaktion jedoch nicht unterbindet. Die Asparaginleiter ist somit nicht essentiell für die Faltung der Pektatlyase aus *Bacillus subtilis*, und eine korrekte Registrierung der Sekundärstrukturelemente kann auch in ihrer Abwesenheit stattfinden.

Die Bedeutung der Seitenkettenstapelung für Faltung und Stabilität des P22 Tailspikeproteins wurde bisher in unterschiedlichen Zusammenhängen diskutiert:

Martina Beissinger und Ben Schuler hatten vermutet, dass das Supressor-Verhalten der von ihnen ausführlich charakterisierten Tailspikemutanten A334V und A334I durch die Vervollständigung eines im Wildtyp unterbrochenen hydrophoben Stapels im Inneren der  $\beta$ -Helix Region durch die verzweigten Seitenketten Valin und Isoleucin hervorgerufen ist (Beissinger et al., 1995, Schuler, 1998). Beissinger und Schuler beobachteten, dass die Substitutionen das frühe Intermediat der Monomerealtung stabilisieren, auf den nativen, trimeren Zustand jedoch destabilisierend wirken. Es wurde deshalb vermutet, dass im dicht gepackten Lumen der nativen Struktur Valin und Isoleucin nicht untergebracht werden können.

In einer Arbeit aus der Arbeitsgruppe von Jonathan King am Massachusetts Institute of Technology wurde die Bedeutung eines aromatischen Stapels im Inneren der  $\beta$ -Helix Domäne für die Faltungsausbeuten des kompletten trimeren P22 Tailspikeproteins analysiert (Betts et al., 2004). Die vier Phenylalanine F181 (Windung 2), F284 (Windung 4), F308 (Windung 5), F336 (Windung 6) eines im  $\beta$ -Faltblatt C lokalisierten hydrophoben Stapels wurden gegen hydrophobe Seitenketten verschiedener Volumina (Leucin, Valin und Alanin) substituiert. Es zeigte sich, dass bei einer Expressionstemperatur von 30 °C Alanin an keiner der Positionen ein Phenylalanin ersetzen konnte, nur Leucin-Mutationen und in einigen Fällen auch Valin-Mutationen erlauben die Bildung von geringen Mengen des löslichen Tailspiketrimers. Die Substitution von Phenylalaninen im  $\beta$ -Helixkern ist schwerwiegend, da vermutlich die kleinen oder verzweigten, hydrophoben Reste die Anordnung der planar, gepackten Aromaten nicht hinreichend nachahmen können.

In einem sehr umfangreichen Ansatz untersuchte Ryan Simkovsky, ebenfalls aus der Gruppe von King, den Einfluss aller ins Innere des hydrophoben Kerns weisenden Seitenketten der  $\beta$ -Helix Domäne sowie der N- (120-142) und C-terminalen (521-545) *capping*-Regionen auf die *in vivo* Faltungsausbeuten des kompletten Tailspikeproteins (1-666). Er mutierte diese Reste zu Alanin und testete die Faltungseffizienzen der insgesamt 145 Punktmutanten bei 18 °C, 30 °C und 37 °C mit Hilfe eines *high-throughput* Verfahrens (Simkovsky & King, 2006). Dabei stellte er fest, dass bei hohen Temperaturen (37 °C) die Mehrheit der nach innen gerichteten Seitenketten (95 der 103 Reste des  $\beta$ -Helix-Kerns) intolerant gegenüber einem Austausch zu Alanin ist, d.h., dass Trimere *in vivo* nicht gebildet werden. Bei niedrigen Temperaturen (18 °C) identifizierte Simkovsky einen so genannten „*minimal folding-spine*“, also ein minimales Faltungs-Rückgrat von 29 nicht-Glycin-Resten, welches für die produktive Faltung des Tailspiketrimers essentiell ist. Die Faltungseffizienz dieser 29 Punktmutanten ist bei 18 °C und auch bei 10 °C stark vermindert (Simkovsky, 2007). Das Faltungs-Rückgrat erstreckt sich als ein zusammenhängendes Netzwerk entlang der Achse der  $\beta$ -Helix Domäne. Seitenketten der Windungen 6 und 7 der  $\beta$ -Helix Domäne treten verstärkt auf. Simkovsky und King postulieren einen prozessiven Faltungsmechanismus der  $\beta$ -Helix Domäne nach einem „Nukleations-Elongations-Modell“. Die Reste des *folding-spines* dienen dabei als Nukleationskern und *template*, an das weitere Windungen der  $\beta$ -Helix durch Seitenkettenkontakte korrekt positioniert und assembliert werden (Simkovsky & King, 2006).

Verstärkt beinhaltet das minimale Faltungs-Rückgrat Leucine (6x), Isoleucine (4x) und Phenylalanine (8x), von denen drei an der Bildung eines aromatischen Stapels entlang der Windungen 5 bis 7 beteiligt sind. Es ist naheliegend, dass der Austausch eines Aromaten durch ein Alanin das dicht gepackte Lumen der  $\beta$ -Helix destabilisieren kann.

Die Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit schließt an eine von Johannes Roiner im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführten Studie an (Roiner, 1998). Roiner hatte fünf Valine in den Windungen 4, 6, 7, 10 und 13 im  $\beta$ -Faltblatt A der  $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins jeweils gegen Phenylalanin und Leucin substituiert. Seine Resultate am N-terminal verkürzten trimeren Tailspikeprotein und der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne deuteten an, dass Mutationen in der Mitte der  $\beta$ -Helix stärkere Effekte auf Faltung und Stabilität zeigten als Mutationen an den Enden. Betts hatte ähnliche Tendenzen für drei Mutanten des kompletten Tailspikeproteins, die sich im gleichen Seitenkettenstapel (Windungen 1, 8 und 14) befinden, beobachtet (Betts et al., 2004).

### **1.3.6 Zielstellung dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung eines hydrophoben Seitenkettenstapels für die Stabilität, Faltung und Struktur des P22 Tailspikeproteins zu untersuchen. Durch ortsgerichtete Mutagenese sollten dazu sieben Valine in einem im Lumen der  $\beta$ -Helix des Tailspikeproteins begrabenen hydrophoben Seitenkettenstapel gegen Alanin und Leucin ausgetauscht werden. Der ausgewählte Stapel befindet sich im  $\beta$ -Faltblatt A der zentralen  $\beta$ -Helix Domäne und erstreckt sich über die N-terminale *capping*-Region und die 13 Windungen der parallelen  $\beta$ -Helix. Die Valine befinden sich an den Positionen 125 (*capping*-Region), 272 (Windung 4), 321 (Windung 6), 349 (Windung 7), 450 (Windung 10), 498 (Windung 12), 523 (Windung 13) und sind somit über die gesamte Länge der  $\beta$ -Helix verteilt (Abbildung 3.2).

Der Einfluss der Mutationen auf die Stabilität, Faltung und Struktur des Tailspikeproteins sollte mit Hilfe von zwei Konstrukten charakterisiert werden. Das TSP $\Delta$ N-Konstrukt (109-666) ist um die N-terminale Kapsidbindedomäne verkürzt, das Protein liegt als Trimer vor und folgt einem wildtyp-ähnlichen Faltungsweg (Miller et al., 1998b). Die isolierte, monomere  $\beta$ -Helix Domäne (109-544), bei welcher die N-terminale Kapsidbindedomäne und die C-terminale Trimerisierungsdomäne deletiert sind, fungiert als eigenständige Faltungseinheit und folgt einem Zweizustandsverhalten im Gleichgewicht, was die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität erlaubt (Miller et al., 1998a).

## 2. Experimenteller Teil

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Desoxynukleotidtriphosphate	GE Healthcare, München
GdmHCl (ultra pure von Pierce)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Pefabloc SC PLUS	Roche, Mannheim
PhastGel Blue R	GE Healthcare, München
Tris	USB Corporation, Cleveland (USA)
Harnstoff (ultra pure)	MP Biomedicals, Eschwege

Alle nicht eigens aufgeführten Chemikalien wurden von Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen und hatten den Reinheitsgrad pro analysi (p.a.).

#### 2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
<i>PfuTurbo</i> Polymerase	Stratagene, La Jolla (USA)
<i>Pfu</i> Plus Polymerase	Roboklon GmbH, Berlin
RNaseA	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.3 Standardmarker und Kits

100 bp und 1 kb DNA-Leitern	New England Biolabs, Schwalbach
Protein-Molekularmassen-Marker	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
MW-SDS-200 (High Range), 30-200 kDa	
MW-SDS-70L (Low Range), 4-70 kDa	
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
PeqGold Plasmid Miniprep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

### **2.1.4 Verbrauchsmaterialien**

DE52 Cellulose	Whatman, Dassel
Dialyseschläuche Spectra/Por	Spectrum Europe, Breda (Niederlande)
Kunststoff UV/vis-Küvetten	Eppendorf, Hamburg
Kristallisationsschalen	Hampton Research, Aliso Viejo (USA)
Polysterol-Fluoreszenz-Küvetten	Semadeni, Düsseldorf
Protein LoBind Tubes	Eppendorf, Hamburg
Puradisc 30 Spritzenfilter (0.2 + 0.45 µm)	Whatman, Dassel
Quarzglas-Küvetten	Hellma, Müllheim
RC55 Cellulose-Membran (0.45 µm)	Whatman, Dassel
Ultrafiltrationsmembranen YM10, YM30	Millipore, Schwalbach
Zentrifugalkonzentratoren Amicon Ultra	Millipore, Schwalbach

### **2.1.5 Geräte**

Absorptionsspektrometer	Cary 50 (Varian) 8453 Spektrophotometer (Agilent)
Bakterienkulturschüttler	Innova 2300 Platform Shaker (New Brunswick Scientific)
Chromatographieanlagen	ÄktaFPLC (GE Healthcare) ÄktaPrime (GE Healthcare) ÄktaPurifier (GE Healthcare)
Chromatographiesäulen	Phenylsepharose FF (high sub) (GE Healthcare) HiLoad Superdex200 PG (GE Healthcare) HisTrap HP (5 ml) (GE Healthcare)
Elektrophoresegeräte	PROTEAN II xi (16 x 20 x 0.15 cm Gele) (Bio-Rad) SE260 Mighty small (10 x 8 x 0.075 cm) (Hoefler) Agargel mini (6.5 x 9 cm und 10 x 10 cm) (Biometra)
Fluoreszenzspektrometer	Spex FluoroLog (HORIBA Jobin Yvon) Spex FluoroMax 3 (HORIBA Jobin Yvon) beide mit Peltier-Element Modell LFJ-3751 (Wavelength Electronics, Inc.)
French-Press	20K und 40K Zellen (SLM.Aminco)
Gelscanner	ImageScanner III (GE Healthcare)
Heizblock	Stuart Scientific Block Heater
Kristallisationsbesteck	Hampton Research
PCR-Gerät	TGradient Thermocycler (Biometra)
pH-Meter	pH 597 (WTW)
pH-Messkette	BlueLine 18 pH (Schott)

Pipetten	Finnpipetten (Thermo) Multipette (Eppendorf)
Refraktometer	Zeiss
Reinstwasseranlage	Millipore
Spannungsquellen	Bio105, PP4000 (Biometra)
Sterilbank	HERAsafe (Heraeus)
Thermoschränke	Heraeus, Memmert
Thermoschüttler	Thermomixer compact (Eppendorf)
Ultrafiltrationszelle	Amicon
Waagen	Analysewaage Sartorius B 120 S Feinwaage Kern PB
Wasserbäder	Huber
Zentrifugen	MR22i (Jouan) RC-26 Plus (Sorvall) Sorvall Discovery M150 SE Ultrazentrifuge Biofuge Pico (Heraeus) Biofuge Fresco (Heraeus)
Synchrotronmessplatz am BESSY (Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie):	
Synchrotron Strahlungsquelle	BESSY, BL1
Monochromator	Si(111) Kristall
Detektor	Marmosaic Image Plate (Marresearch GmbH, Norderstedt)
Messplatz der AG Heinemann am MDC (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin):	
Kupfer-Drehanoden-Generator	Rigaku RU H2B (Rigaku, Kent, England)
Detektor	MAR345 Image Plate (Marresearch GmbH, Norderstedt)

Beide Messplätze waren mit Stickstoff-Kühlsystemen zur Verminderung von Strahlenschäden ausgestattet.

### **2.1.6 Programme**

BioEdit	Ibis Biosciences
GCG Wisconsin Package v10	Genetics Computer Group
Gelscan v5.1	BioSciTec
IgorPro v6.0	WaveMetrics
LabScan v6.0	GE Healthcare

Programme der CCP4 Suite  
PyMol v1.0  
SigmaPlot v9.0

Collaborative Computational Project, number 4  
DeLano Scientific LLC  
Systat Software

### **2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien**

Puffer und Lösungen wurden mit Millipore-gereinigtem Wasser hergestellt und bei Bedarf filtriert und entgast. pH-Werte wurden bei Raumtemperatur mit dem pH 597 pH-Meter von WTW und der pH-Einstabmesskette BlueLine 18 pH mit Glasmembran von Schott bestimmt.

#### *Puffer und Medien:*

GdmHCl- und Harnstofflösungen unterschiedlicher Konzentrationen wurden aus 8 M Stammlösungen und den homologen Puffern ohne Denaturierungsmittel durch Mischen hergestellt. Beide Ausgangspuffer waren auf den gewünschten pH-Wert der Ziellösung eingestellt. Der pH-Wert des resultierenden Puffers wurde nicht erneut überprüft oder korrigiert.

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert; für LB-Agar-Platten enthielt das LB-Medium zusätzlich 2 % (w/v) Agar-Agar
<u>TAE-Puffer:</u>	40 mM Tris/Acetat, pH 8.0, 1 mM EDTA
<u>6x DNA-Ladepuffer:</u>	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol, 15 % Ficoll Typ 400, 20 mM EDTA
<u>TEC-Puffer:</u>	40 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA
<u>Puffer A:</u>	20 mM NaP, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 30 mM Imidazol
<u>Puffer B:</u>	20 mM NaP, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 300 mM Imidazol
<u>4x SDS-Trenngelbuffer:</u>	1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.8 % SDS
<u>2x SDS-Sammelpuffer:</u>	0.25 M Tris/HCl, pH 6.8, 0.4 % SDS
<u>SDS-Laufpuffer:</u>	0.25 M Tris/HCl, pH 8.8, 1.92 M Glycin, 1 % SDS
<u>SDS-Ladepuffer:</u>	163 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5 % SDS, 250 mg/ml Glycerin, 0.25 mg/ml Bromphenolblau
<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0.025 %-0.05 % Coomassie blue R (PhastGel Blue R)
<u>Entfärber:</u>	10 % Essigsäure
<u>Fix 1:</u>	30 % EtOH, 10 % Essigsäure
<u>Fix 2:</u>	0.4 M Natriumacetat, 0.5 % Essigsäure, 30 % Ethanol; vor Gebrauch wurden 2 ml 25 % Glutaraldehyd und 100 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in 100 ml Fix 2 zugemischt

<u>Silber-Färbelösung:</u>	0.5 ml 29 % AgNO <sub>3</sub> und 25 µl 37 % Formaldehyd in 100 ml H <sub>2</sub> O
<u>Entwickler:</u>	5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> und 80 µl Formaldehyd in 200 ml H <sub>2</sub> O
<u>Stop-Lösung:</u>	50 mM EDTA, pH 8.0
<u>Nativpuffer:</u>	50 mM NaP, pH 5.7-8.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTE; DTE wurde direkt vor Gebrauch aus einer Stammlösung zugegeben
<u>Harnstoffpuffer:</u>	8 M Harnstoff, 50 mM NaP, 1 mM EDTA; mit 37 % HCl auf pH 7.0 eingestellt, bei -20 °C gelagert
<u>GdmHCl-Puffer:</u>	8 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM NaP, 1 mM EDTA; mit NaOH auf pH 5.7-8.0 eingestellt
<u>saurer Harnstoff:</u>	6.5 M Harnstoff; mit 50-65 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> auf pH 2.9-3.0 eingestellt und bei -20 °C gelagert
<u>Rückfaltungspuffer:</u>	50 mM NaP, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM DTE; DTE wurde direkt vor Gebrauch aus einer Stammlösung zugegeben
<u>2 % SDS-Entfaltungspuffer:</u>	50 mM NaP, pH 7.0, 2 % (w/v) SDS, 177.65 mM β-Mercaptoethanol
<u>HEPES-Puffer:</u>	10 mM HEPES, pH 7.0
<u>Kristallisationspuffer:</u>	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; mit 50 % NaOH auf pH 10.0 eingestellt
<u>Reservoir-Puffer:</u>	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; mit 50 % NaOH auf pH 10.0 eingestellt
<u>Kryopuffer:</u>	0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20 % Glycerol; mit 50 % NaOH auf pH 10.0 eingestellt
 <i>Stammlösungen:</i>	
<u>dNTP-Mix:</u>	25 mM von jedem dNTP; bei -20 °C gelagert
<u>Ampicillin-Stammlösung:</u>	100 mg/ml Ampicilin in H <sub>2</sub> O; sterilisiert und bei -20 °C gelagert
<u>IPTG-Stammlösung:</u>	1 M IPTG in H <sub>2</sub> O; sterilisiert und bei -20 °C gelagert
<u>EDTA-Lösung:</u>	0.5 M EDTA; mit 50 % NaOH auf pH 8.0 eingestellt
<u>APS-Stammlösung:</u>	10 % Ammoniumperoxydisulfat in H <sub>2</sub> O
<u>DTE-Stammlösung:</u>	0.5 M DTE in H <sub>2</sub> O

### 2.1.8 Bakterienstämme

*E. coli* XL1-Blue: Stratagene (La Jolla, USA), (Bullock et al., 1987);  
Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)*]

*E. coli* JM83: (Yanisch-Perron et al., 1985);  
Genotyp: F- *ara Δ(lac-proAB) rpsL (Strr)[φ80 dlacΔ(lacZ)M15] thi*

*E. coli* BL21 (DE3): Novagen (über Merck, Darmstadt),  
(Dubendorff & Studier, 1991b),  
(Dubendorff & Studier, 1991a);  
Genotyp: F- *ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm* (DE3 = ein λ Prophage, der das T7 RNA-Polymerasegen trägt)

### 2.1.9 Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurden Valine an sieben Positionen in einem hydrophoben Stapel der β-Helix Domäne des Tailspikeproteins gegen Alanine und Leucine substituiert. Die für die Mutagenese verwendeten Ausgangsplasmide (Tabelle 2.1) wurden von Miller hergestellt (Miller, 1995). Sie beruhen ursprünglich auf dem Expressionsvektor pASK31, der u.a. das β-Lactamase Gen (*bla*) trägt (Skerra, 1989). Die Expression des integrierten Tailspikegens wurde durch einen IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotor/Operator kontrolliert.

Plasmid	Größe in kb	Produkt	Nomenklatur in Miller, 1995*
pTSP	5.67	TSP Wildtyp T1-L666	pTSP
pTSF1	5.36	TSP $\Delta$ N M-D109-L666	pTSF1
pBHX	5.36	isolierte BHX M-D-109-G544-H <sub>6</sub>	pTSF14

**Tabelle 2.1: Eigenschaften der für die Mutagenese verwendeten Plasmide.**

\* (Miller, 1995)

Die durch QuickChange Mutagenese hergestellten Plasmidvektoren (siehe Tabelle 2.2) wurden gemäß des zu exprimierenden Genprodukts bezeichnet; z. B. p125ABHX. Hierbei steht 125 für die Position in der Aminosäuresequenz, A für die eingeführte Aminosäure Alanin und BHX bezeichnet das Protein, hier die isolierte β-Helix Domäne.

### 2.1.10 Oligonukleotid-Primer

PAGE-gereinigte Mutageneseprimer wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Das Lyophilisat wurde in sterilem Wasser gelöst, auf 10 µM eingestellt und bei -40 °C gelagert. Sequenzierprimer wurden von der Firma AGOWA GmbH (Berlin) erzeugt. Die für diese Arbeit verwendeten Mutagenese- und Sequenzierprimer sind in den Tabellen 2.2 sowie 2.3 zusammengefasst.

Primer	Sequenz	Enzym	Plasmide
prV125Afor prV125Arev	5'-CTGATAAAAAATTTAAGTATTCAG <b>cgA</b> gctTtTCAGATTATCCAACATTGCAGGATGCAG-3' 5'-CTGCATCCTGCAATGTTGGATAATCTGA <b>aa</b> gctT <b>cg</b> CTGAATACTTAAATTTTTTATCAG-3'	Hind III	p125ATSP p125AdN p125ABHX
prV272Afor prV272Arev	5'-GGGTGGAAG <b>cg</b> CATCGGGCTAGCG <b>gat</b> TAATGGCTGG-3' 5'-CCAGCCATT <b>aat</b> CCGCTAGCCCGAT <b>cg</b> CTTCGACCC-3'	Ase I	p272AdN p272ABHX
prV321Afor prV321Arev	5'-GGGGGAAGGGTAACATAT <b>cg</b> AT <b>c</b> GGGGACGAACC-3' 5'-GGTTGCTCCGCC <b>gAT</b> <b>cg</b> CATAGTTACCCTTCCCC-3'	Pvu I	p321AdN p321ABHX
prV349Afor prV349Arev	5'-GGCTTTGAACGTGATGGTGGAG <b>cg</b> AT <b>c</b> GGGTTTACTTCATATCG-3' 5'-CGATATGAAGTAAACCC <b>gAT</b> <b>cg</b> CTCCACCATCACGTTCAAAGCC-3'	Pvu I	p349AdN p349ABHX
prV450Afor prV450Arev	5'-GGTAAGGGCATGT <b>ac</b> g <b>c</b> GTCTAATATTACCCTAGAAGATTGCG-3' 5'-CGCAATCTTCTACGGTAATATTAG <b>ac</b> <b>g</b> C <b>g</b> TACATGCCCTTACC-3'	Mlu I	p450AdN p450ABHX
prV498Afor prV498Arev	5'-GGGGCTTGCCGT <b>gc</b> GA <b>at</b> GG <b>gc</b> T <b>c</b> CGTTTAATTGGGATCCGC-3' 5'-GCCGATCCCAATTAAC <b>cg</b> <b>g</b> CC <b>at</b> T <b>cg</b> CACGGCAAGCCCC-3'	Ban II	p498AdN p498ABHX
prV523Afor prV523Arev	5'-CAGAGTCTAACCATAGACGCCCTAAC <b>ag</b> TACT <b>cg</b> AGCGGTATAACC-3' 5'-GGTTATACCGCT <b>cg</b> CA <b>g</b> T <b>act</b> gTTAGGGCGTCTATGGTTAGACTCTG-3'	Sca I	p523AdN p523ABHX
prV125Lfor prV125Lrev	5'-CTGATAAAAAATTTAAGTATTC <b>ac</b> T <b>g</b> A <b>g</b> ctTtTCAGATTATCCAACATTGCAGGATGCAGCATCTG-3' 5'-CAGATGCTGCATCCTGCAATGTTGGATAATCTGA <b>aa</b> gctT <b>cg</b> GTGAATACTTAAATTTTTTATCAG-3'	Hind III	p125LTSP p125LdN p125LBHX
prV272Lfor prV272Lrev	5'-CGTTAGAAAT <b>ac</b> GtGAATGTATAGGGTTCGA <b>ac</b> T <b>g</b> CATCGGGC-3' 5'-GCCCGAT <b>gc</b> <b>ag</b> TTCGACCCCTATACAT <b>tc</b> C <b>g</b> tATTCTAAGC-3'	BsaA I	p272LdN p272LBHX
prV321Lfor prV321Lrev	5'-GGGAAGGGTAACAT <b>ct</b> T <b>g</b> ATTGGCGGAC <b>gc</b> AC <b>g</b> AGCTATGGG-3' 5'-CCCATAGCT <b>c</b> gT <b>g</b> CGTCCGCCAAT <b>c</b> <b>ag</b> ATAGTTACCCTTCCC-3'	BssS I	p321LdN p321LBHX
prV349Lfor prV349Lrev	5'-CGTGATGGTGG <b>cc</b> T <b>g</b> ATTGGCTTTACTTTCATATCGCGCTGGGG-3' 5'-CCCCAGCGGATATGAAGTAA <b>g</b> CCAAT <b>c</b> <b>ag</b> CCACCATCAGC-3'	Bgl I	p349LdN p349LBHX
prV450Lfor prV450Lrev	5'-GGGCATGTAT <b>ct</b> GT <b>c</b> CAATATTACCGT <b>g</b> GAAGATTGCGC-3' 5'-GCGCAATCTT <b>cc</b> ACGGTAATATT <b>g</b> GAC <b>ag</b> ATACATGCCC-3'	Xcm I	p450LdN p450LBHX
prV498Lfor prV498Lrev	5'-CTGGGGCTTGCC <b>gc</b> TGAACGGTTTACG-3' 5'-CGTAAACCGTT <b>ca</b> <b>g</b> CGGCAAGCCCCAG-3'	Nae I	p498LdN p498LBHX
prV523Lfor prV523Lrev	5'-GGCAGAGTCTAACCATAGACGCCCTAAC <b>ag</b> TACT <b>tc</b> T <b>g</b> AGCGGTATAACC-3' 5'-GGTTATACCGCT <b>ca</b> <b>g</b> AGT <b>act</b> gTTAGGGCGTCTATGGTTAGACTCTGCC-3'	Sca I	p523LdN p523LBHX

**Tabelle 2.2: Mutageneseprimer und hergestellte Plasmidvektoren.** Ausgetauschte Nukleotide, die eine Punktmutation erzeugen, sind klein, fett und rot gedruckt. Nukleotide, die eine stille Mutation zur Restriktionsanalyse einfügen, sind klein und fett gedruckt.

Primer	Sequenz
838-446-P1 for	5'-ACACTTTATGCTCCGGCTC-3'
838-446-P2 for	5'-GAGGGTGTCACTTCTGCAAG-3'
838-446-B1 rev	5'-TGCTCCGCTATCTAATGTCT-3'
838-446-T1 rev	5'-GTGGGGATCCGTGACGAG-3'
B3-446-F1 for	5'-ATGGAAAGCACTACAACACC-3'
B3-446-R1 rev	5'-TCCGCCAAAATCAACTGTC-3'

**Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Sequenzierprimer.**

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit sterilen Geräten und Lösungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.2.1 Kultivieren von Bakterien

Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht von *E. coli* Stämmen bei 37 °C in LB-Medium. Alle verwendeten Plasmide beruhen auf dem Expressionsvektor pASK31 und trugen das  $\beta$ -Lactamase Gen (*bla*), (Skerra, 1989). Bei Bedarf wurden 100  $\mu$ g/ml Ampicillin den Medien und Platten zugesetzt, somit konnten plasmidtragende Zellen auf Ampicillin-Resistenz selektiert werden. Vorkulturen wurden mit einer *E. coli* Kolonie von LB-Agar-Platten angeimpft und bei 37 °C üN geschüttelt. Hauptkulturen wurden im Verhältnis 1:100 angeimpft.

### 2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsggerichtete Mutagenese wurde nach dem QuickChange Verfahren von Stratagene mit doppelsträngiger Plasmid-DNA als *template* durchgeführt. Ausgehend von zwei komplementären Oligonukleotid-Primern (Tabelle 2.2) wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Durch die Primer wurde die gewünschte Mutation und eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle in das Plasmid eingeführt. Die Ansätze für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) enthielten folgende Komponenten:

<i>Pfu</i> Reaktionspuffer (10x)	2.5 $\mu$ l
DNA- <i>template</i>	30 ng
dNTP-Mix (100 mM)	0.25 $\mu$ l
<i>forward</i> Primer (10 $\mu$ M)	~125 ng
<i>reverse</i> Primer (10 $\mu$ M)	~125 ng
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

Die Amplifizierung erfolgte unter den Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	5 min 95 °C
16 Zyklen	
Denaturierung:	30 sek 95 °C
Anlagerung:	1 min 55 °C
Elongation:	6 min 68 °C (1 min/kb Plasmid)
finale Elongation:	10 min 68 °C

Anschließend wurden die PCR-Ansätze mit 0.5 µl Dpn I (10 U/µl) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert, um die methylierte *template*-DNA zu verdauen. 1-5 µl der Ansätze wurden in *E. coli* XL1blue transformiert und auf LB(Amp)-Platten ausplattiert.

### **2.2.3 Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA**

Kompetente *E. coli* Stämme wurden nach der Methode von Hanahan hergestellt (Hanahan, 1983). Für die Transformation wurden 50 µl Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt, dann direkt auf LB(Amp)-Platten ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.4 Reinigung von Plasmid-DNA**

Zur Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* XL1blue Zellen wurden entweder Spin Miniprep Kits von Sigma, Qiagen oder Peqlab nach Anleitung der Hersteller oder das Protokoll nach Sambrook et al. verwendet (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurden Zellen einer stationären 2 ml üN-Kultur durch alkalische Lyse aufgeschlossen (Birnboim & Doly, 1979). Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol bei RT gefällt und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Durch Zugabe von RNaseA und Inkubation bei 37 °C für 5 min wurden Verunreinigungen durch *E. coli* RNA entfernt. Die nach diesem Protokoll erhaltene Plasmid-DNA wurde für analytische Verdau mit Restriktionsendonucleasen verwendet. Die mit Spin Miniprep Kits gereinigte DNA wurde für alle anderen molekularbiologischen Arbeiten eingesetzt. Die Ausbeuten der Kits betragen üblicherweise circa 5 µg bis 10 µg dsDNA pro ml Kultur. Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.2.5 Verdau mit Restriktionsendonucleasen**

Für Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA mit Endonucleasen wurden Reaktionsansätze mit einem Volumen von 20 µl hergestellt und für 2.5 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze enthielten 10 µl Plasmid-DNA, 1 µl der entsprechenden Endonuklease (4-20 U/µl), 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten 10fach-Reaktionspuffers, gegebenenfalls 2 µl einer 10fachen BSA-Lösung und H<sub>2</sub>O. Zur Analyse der Fragmente wurden nach Verdau 5 µl des Ansatzes mit 1 µl 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt.

### **2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurde Agarose im Laufpuffer (TAE-Puffer) geschmolzen. Nach kurzem Abkühlen wurde die Lösung mit einem 1/10000 Volumen einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt und in 6.5 x 9 cm oder 10 x 10 cm große Kammern gegossen. 1 µl einer Miniprep wurden mit 4 µl Wasser und 1 µl 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. 6.5 x 9 cm Gele liefen bei einer konstanten Spannung von 80 V, 10 x 10 cm Gele bei 100 V.

### **2.2.7 Sequenzierung von Plasmiden**

Die Plasmid-DNA aller hergestellten Mutanten wurde im Bereich des gesamten Tailspikegens durch die Firma AGOWA GmbH (Berlin) sequenziert. Die verwendeten Sequenzierprimer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet. Für Plasmide auf pTSP1 und pBHX Basis wurden die vier Primer 838-446-P1, 838-446-P2, 838-446-B1 und 838-446-T1 verwendet. Für Plasmide auf pTSP1 Basis zudem B3-446-F1 und B3-446-R1. Chromatogramme und Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und GCG ausgewertet.

## **2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1 Überexpression rekombinanter Proteine in *E.coli***

Rekombinante Proteine wurden in *E.coli* JM83 oder BL21 (DE3) Zellen überexprimiert. Dazu wurde 1 l LB(Amp)-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer üN-Kultur des plasmidtragenden *E. coli* Stammes angeimpft und unter Schütteln in Schikanekolben bei maximal 37 °C bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600nm} = 0.8-1.0$  kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf die geeignete Expressionstemperatur gebracht. Diese betrug für TSP- und TSP $\Delta$ N-Konstrukte 30 °C. Wildtyp und Mutanten der isolierten  $\beta$ -Helix wurden bei 25 °C oder bei Raumtemperatur expremiert. Die Proteinbiosynthese des rekombinanten Zielproteins wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Inkubation üN wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 rpm geerntet. Das LB-Medium wurde verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert.

### **2.3.2 Zellaufschluss**

Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 20 ml kaltem TEC-Puffer mit frisch zugesetztem Proteaseinhibitor Pefabloc SC PLUS (Endkonzentration 0.5 mg/ml) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch zweimaligen Hochdruckaufschluss in einer French-Press 40K Zelle bei maximal 18000 psi. Durch Zentrifugation bei 18000 rpm und 4 °C für 45 min wurden Zelltrümmer pelletiert. Im klaren Überstand befanden sich die löslichen Zellproteine.

### **2.3.3 Proteinreinigung**

Alle Chromatographieschritte wurden mit filtrierten und entgasten Puffern durchgeführt. Die Reinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie- oder Silberfärbung verfolgt.

#### *Reinigung von TSP und TSP $\Delta$ N*

Alle TSP- und TSP $\Delta$ N-Konstrukte konnten mit dem von Miller etablierten Verfahren gereinigt werden (Miller, 1995). Der Überstand des Zelllysates wurde auf 35 % Ammoniumsulfat eingestellt. Durch einstündiges Rühren bei 4 °C und Zentrifugation bei 18000 rpm und 4 °C für 45 min konnte das Tailspikeprotein gefällt und im Pellet angereichert werden. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml TEC gelöst,  $\text{üN}$  gegen 2 x 4 l TEC dialysiert und auf einen DE52 Anionenaustauscher geladen. Nach Waschen bis zur Basislinie des Pufferwertes (Messung der Absorption bei 280 nm) erfolgte die Elution über einen linearen NaCl-Gradienten von 0-200 mM NaCl in TEC. Gipfelfractionen wurden vereinigt, auf 0.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt und auf eine Phenylsepharose FF Säule aufgetragen. Tailspikeprotein eluierte am Ende des linearen Gradienten von 0.2 M bis 0 M Ammoniumsulfat. Als letzter Reinigungsschritt wurde eine Gelfiltration mit HiLoad Superdex 200 26/60 mit 200 mM NaCl in TEC durchgeführt. Tailspike enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration konzentriert und mit 40 % Ammoniumsulfat gefällt. Die Präzipitate wurden bei 4 °C gelagert.

#### *Reinigung der isolierten $\beta$ -Helix Domäne*

Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne (D109-G544-H<sub>6</sub>) wurde mittels Affinitätschromatographie über einen Hexahistidyl-Tag gereinigt. Da das Protein zur Bildung von Aggregaten tendierte, wurden alle Reinigungsschritte vorsichtig aber zügig und bei 4 °C durchgeführt. Zudem wurde das von Miller et al. publizierte Reinigungsprotokoll geringfügig verändert (Miller et al., 1998a). Der klare Überstand des Zellextrakts wurde mit 35 % Ammoniumsulfat versetzt, 1 h auf Eis gerührt und anschließend 45 min bei 4 °C und 18000 rpm zentrifugiert. Das gefällte Protein wurde in 10 ml Puffer A gelöst, erneut zentrifugiert und über einen Superloop auf eine mit Puffer A äquilibrierte 5 ml HisTrap HP Säule geladen. Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne band über den C-terminalen Hexahistidyl-Tag an die Nickel-Sephrose. Nicht oder unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen bis zur Basislinie der Pufferabsorption bei 280 nm mit 10 Säulenvolumen Puffer A entfernt. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte über einen zweistufigen Gradienten nach 300 mM Imidazol (Puffer B): 1. Stufe: 0-40 % Puffer B in 6 SV, 2. Stufe: 40-100 % B in 5 SV. Um eine Komplexbildung der Hexahistidyl-Tags mit zweiwertigen Ionen und somit eine mögliche Aggregation der Proteine zu vermeiden, wurden Peakfraktionen mit EDTA (Endkonzentration 10 mM) versetzt. BHX-haltige Fraktionen wurden vereinigt, durch einen Spritzenfilter filtriert und für kurze Zeit bei 4 °C gelagert.

### **2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach King und Lämmli durchgeführt (King & Laemmli, 1971). Als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach Fling und Gregerson verwendet (Fling & Gregerson, 1986).

Wenn nicht anders angegeben, enthielten Sammelgele 5 % (w/v) Acrylamid und Trenngele 10 % (w/v) Acrylamid. Zur Analyse wurden die Proben mit 1/3 Volumen SDS-Ladepuffer versetzt und gegebenenfalls 5 min bei 100 °C denaturiert. Große Gele (16 x 20 x 0.15 cm) wurden gekühlt und mit einer Spannung von 125 V im Sammelgel und 250-300 V im Trenngel verwendet, kleine Gele (10 x 8 x 0.075 cm) mit jeweils 90 V und 150 V.

### *Coomassie-Färbung*

Die Färbung von SDS-Gelele mit Coomassie wurde mit einem veränderten Protokoll nach Fairbanks et al. (Fairbanks et al., 1971) durchgeführt. Gele wurden für mindestens 30 Minuten in Färbelösung inkubiert und im Anschluss in 10 % Essigsäure entfärbt. Die Nachweisgrenze der Coomassie-Färbung liegt bei etwa 200-400 ng/0.5 cm Bande.

### *Silberfärbung*

Die Silberfärbung ist mit einer Nachweisgrenze von 5-300 ng/0.5 cm Bande deutlich sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Färbung erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll von Heukeshoven & Dernick (Heukeshoven & Dernick, 1988). Die Gele wurden zunächst für 15 min in Fix 1 inkubiert und dann für 30 min in frisch hergestellter Fix 2-Lösung. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für 5 min wurden Gele 30 min in Silber-Färbelösung gegeben. Die Entwicklung erfolgte nach kurzem Waschen mit 5 g Natriumcarbonat, 80 µl Formaldehyd in 200 ml H<sub>2</sub>O. Die Reaktion wurde in einer Stop-Lösung von 50 mM EDTA, pH 8.0 gestoppt.

### *Densitometrische Analyse von SDS-Polyacrylamidgelen*

Gele wurden mit dem Durchlichtscanner ImageScanner III von GE Healthcare und der Software LabScan aufgenommen. Für Silber- und Coomassie-gefärbte Gele wurde einheitlich ein grüner Farbfilter verwendet. Zur Quantifizierung von Proteinbanden wurde das Programm Gelscan verwendet. Die gemessenen Intensitäten wurden mit der Hintergrundfärbung der Gele korrigiert. Zudem wurden Tailspike Trimer- oder Monomerbanden auf einen geeigneten Proteinstandard normiert.

## **2.4. Biophysikalische Methoden**

Proteine wurden vor Verwendung gegen 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 dialysiert, bei Bedarf mit Zentrifugalkonzentratoren konzentriert und bei 40000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert.

### **2.4.1 Refraktometrie**

Konzentrationen von Denaturierungsmittel in Pufferlösungen wurden refraktometrisch über die Messung des Brechungsindex bestimmt. Die Harnstoff- und GdmHCl-Konzentrationen in der Einheit M ergeben sich aus folgenden Gleichungen (Pace, 1986):

$$[\text{Harnstoff}] = 117.66(\Delta N) + 29.753(\Delta N)^2 + 185.65(\Delta N)^3 \quad (\text{Gl. 2.1})$$

$$[\text{GdmHCl}] = 57.147(\Delta N) + 38.68(\Delta N)^2 - 91.60(\Delta N)^3 \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$\Delta N$  ist die Differenz der Brechungsindices von Puffern mit und ohne Denaturant.

## Spektroskopische Methoden

### 2.4.2 Absorptionsspektroskopie

Konzentrationen von Protein- und Nukleinsäurelösungen wurden spektralphotometrisch durch Messung der Absorption bei 280 nm beziehungsweise 260 nm bestimmt. UV-Spektren wurden im Bereich von 240 bis 400 nm bei Raumtemperatur registriert und mit dem jeweiligen Pufferspektrum korrigiert. Verunreinigungen der Probe mit Aggregaten wurden durch Lichtstreuung oberhalb 300 nm detektiert. Mit einem von Dr. Klaus Gast verfassten Quellprogramm wurde eine Trübungskorrektur der Absorption bei 280 nm nach der Gleichung

$$A_{\text{korr}} = A_{280} - \frac{(A_{320})^{2.5}}{(A_{350})^{1.5}} \quad (\text{Gl. 2.3})$$

durchgeführt. Die korrigierte Absorption  $A_{\text{korr}}$  bei 280 nm wurde zum Bestimmen der Konzentration nach Lambert-Beer eingesetzt. In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Extinktionskoeffizienten sowie weitere Eigenschaften der Tailspikeproteine zusammengefasst.

Protein	Reste	Molekülmasse [kDa]*	Anzahl Tyr, Trp, Phe	molarer Extinktionskoef. 280 nm [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]*	spez. Extinktionskoef. 280 nm [ml mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
TSP	666 (T1-L666)	71857	7 Trp 27 Tyr 25 Phe	74390	1.01 (Sauer et al., 1982)
TSP $\Delta$ N	559 (M-D109-L666)	60175	7 Trp 21 Tyr 23 Phe	66710	1.11
BHX	443 (M-D109-G544-H6)	48032	6 Trp 17 Tyr 19 Phe	56260	1.17

**Tabelle 2.4: Strukturelle und biophysikalische Eigenschaften der Tailspike Konstrukte.**

\* berechnet mit PROTEIN CALCULATOR v3.3 (URL: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>; abgerufen am 13.9.2009)

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde über den Zusammenhang  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$  dsDNA bestimmt.

### **2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie**

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spex FluoroMax 3 oder Spex FluoroLog Spektrofluorometer mit thermostatisierbaren Küvettenhaltern durchgeführt. Für die Messungen wurden entweder Halbmikro-Quarzglasküvetten (Hellma, Typ 109.004F-QS) oder fluoreszenzgeeignete Vollsicht-Küvetten aus Polystyrol verwendet. Die Anregung der Tyrosine und Tryptophane erfolgte bei 280 nm. Spaltbreiten der Anregungs- und Emissionsmonochromatoren wurden entsprechend der Lampenintensität des verwendeten Gerätes angepasst. Alle Messungen wurden pufferkorrigiert.

Spektren wurden in einem Emissionswellenlängenbereich von 295-450 nm registriert. Der Messpunktabstand war 1 nm.

### **2.4.4 De- und Renaturierungskinetiken**

Kinetiken wurden, wie von Miller beschrieben, bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 342 nm verfolgt (Miller, 1995). Die Proteinlösung wurde unter Rühren manuell in die Fluoreszenzküvette verdünnt, sodass die Registrierung des Messsignals etwa 3 bis 8 Sekunden nach dem Zusammenmischen startete. Die Verzögerungszeit wurde aufgezeichnet und alle Kinetiken diesbezüglich korrigiert. Um Photobleichung zu reduzieren, wurde der Messpunktabstand so gewählt, dass maximal 100 Messpunkte über den Messzeitraum detektiert wurden.

Zur Aufnahme von Denaturierungskinetiken wurde eine 1 mg/ml Proteinlösung aus Nativpuffer im Verhältnis 1:100 in GdmHCl-Puffer oder Harnstoffpuffer verdünnt. TSP $\Delta$ N wt und Mutanten wurden in 5 M GdmHCl, 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE bei 25 °C in Halbmikroküvetten (Endvolumen 1000  $\mu$ l) entfaltet. Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N bei verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen und pH-Werten wurden in Plastikvollküvetten (Endvolumen 2500  $\mu$ l) durchgeführt. Rückfaltungskinetiken wurden bei 10 °C und 25 °C aufgenommen. Dazu wurde 1 mg/ml TSP $\Delta$ N für mindestens 1 h bei 25 °C in 5 M saurem Harnstoff entfaltet. Die Rückfaltung erfolgte durch Verdünnen von 10  $\mu$ l entfaltetem Protein in 990  $\mu$ l Rückfaltungspuffer.

Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne wurde in 5 M Harnstoff, 1 mM EDTA, 50 mM NaP, pH 7.0 bei 10 °C entfaltet. Ihre Rückfaltung wurde in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 und zudem unter Zugabe verschiedener EDTA und DTE-Konzentrationen untersucht.

#### *Auswertung der Fluoreszenzkinetiken*

Entfaltungskinetiken wurden auf die Fluoreszenz einer Nativkontrolle normiert. Dafür wurden drei unabhängige Spektren der nativ gefalteten Proteinprobe registriert, ihr Mittelwert gebildet und die Fluoreszenz bei 342 nm als Nativkontrolle (= 100 % nativ) gesetzt. Der Endwert der Entfaltungskinetik (= 0 % nativ) wurde durch nicht-lineare Regression bestimmt (siehe 2.6.1). Bei Rückfaltungskinetiken wurde analog auf die Fluoreszenz einer Denaturiertkontrolle normiert.

#### **2.4.5 Gleichgewichtsübergänge**

Die Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne wurde mit Harnstoff-induzierten Faltungs- und Entfaltungsübergängen analysiert. 1 mg/ml Protein wurde entweder in 5 M Harnstoff, 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei 25 °C 1 h entfaltet oder in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 auf Eis inkubiert. 10  $\mu$ l der jeweiligen Stammlösung wurden mit einer Multipette plus in Protein LoBind Tubes von Eppendorf auf Eis vorgelegt. Die Rück- bzw. Entfaltung wurde durch Schwallen mit 990  $\mu$ l Harnstoffpuffer verschiedener Molaritäten induziert. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und kurz anzentrifugiert. Die Gleichgewichtseinstellung erfolgte bei 10 °C im Wasserbad für 1 h. Fluoreszenzspektren wurden bei 10 °C in Halbmikroküvetten aus Quarzglas (Hellma, Typ 104F-QS) detektiert. Anregungswellenlänge war 280 nm, die Emission wurde zwischen 295-450 nm aufgenommen.

#### **SDS-PAGE Analysen zum Nachweis des SDS-resistenten Trimers**

##### **2.4.6 Temperaturabhängigkeit der Faltung *in vivo***

*In vivo* Faltungsausbeuten wurden temperaturabhängig im Bereich von 27 °C bis 42 °C untersucht. Hierzu wurde TSP $\Delta$ N in *E.coli* JM83 Zellen expremiert und die Ausbeute an Trimer im Zelllysate mittels SDS-PAGE quantifiziert. Alle TSP $\Delta$ N Mutanten und der Wildtyp wurden zur Vergleichbarkeit simultan bei der erforderlichen Expressionstemperatur getestet. Zum Bestimmen des Hintergrundlevels der zellulären Proteinexpression wurde eine nicht-induzierte Kontrolle und zudem JM83 Zellen ohne Plasmid mitgeführt. 100 ml LB(Amp)-Medium wurde im Verhältnis 1:100 mit einer stationären  $\mu$ N-Kultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600nm} = 0.8-1.0$  kultiviert. Die Expression von TSP $\Delta$ N wurde durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Expressionskulturen bei einer Temperatur von 27 °C wurden nach 16.5 h, bei 32 °C nach 6.5 h und bei 37 °C bis 42 °C nach 4.5 h geerntet. Dazu wurde eine definierte Zellmenge von  $2.4 \times 10^{11}$  Zellen (1 ml  $1 OD_{600} = 2 \times 10^9$  Zellen, entnommen und durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert (Studier, 2005). Das Zellpellet wurde in 2 ml TEC gelöst und anschließend durch zweimaligen French-press Aufschluss mit einer 20K Minizelle bei etwa 17000 psi lysiert. Das Lysat wurde geteilt und entweder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt oder für 1h bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entnommen, das Pellet gewaschen und in 1 ml TEC gelöst. 3  $\mu$ l der mit SDS-Ladepuffer versetzten Proben wurden auf kleinen 10 %igen Gelen getrennt; dies entspricht etwa  $2.16 \times 10^8$  Zellen pro Tasche.

##### **2.4.7 Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung *in vitro***

*In vitro* Faltungsausbeuten wurden nach der von Danner und Seckler entwickelten Methode mit gereinigtem Tailspike zwischen 10 °C und 45 °C untersucht (Danner & Seckler, 1993). 1 mg/ml TSP $\Delta$ N in Nativpuffer wurde für mindestens 1 h bei 25 °C in 5 M saurem Harnstoff entfaltet. Zur Renaturierung wurden mit 5 % Tween 20 behandelte Protein LoBind Tubes von Eppendorf verwendet. Das entfaltete

Protein wurde im Verhältnis 1:100 in 500 µl temperierten Rückfaltungspuffer verdünnt, die Proteinendkonzentration im Ansatz betrug somit 10 µg/ml. Nach Inkubation für 72 h wurde die Reaktion gestoppt, indem 100 µl des Rückfaltungsansatzes in 66 µl SDS-Ladepuffer pipettiert wurden. 10 µl Probe, d.h. 60 ng pro Tasche, wurde auf 10 x 8 x 0.075 cm SDS-Gelen analysiert. Gele wurden Silber gefärbt und Anteile an Monomer und Trimer wurden densitometrisch quantifiziert. Homolog wurde mit einer Nativkontrolle verfahren, die 72 h bei 40 °C temperiert wurde.

### **2.4.8 Assoziation der Monomere - Hybridisierung mit TSP $\Delta$ N G244R**

Untersuchungen zur Assoziation der Untereinheiten wurden mit der Ladungsmutante G244R nach Danner und Seckler (Danner & Seckler, 1993) bei 10 °C durchgeführt. Tailspikes (G244R und wt oder V498A) wurden bei einer Konzentration von 2 mg/ml in 5 M saurem Harnstoff bei 25 °C für >1 h entfaltet. Die Rückfaltung der Proteine wurde gleichzeitig durch 100faches Verdünnen in 990 µl temperierten Rückfaltungspuffer initiiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden jeweils 50 µl der beiden Ansätze gemischt und für weitere 72 h bei 10 °C inkubiert. Der Rückfaltungsansatz wurde mit 66 µl SDS-Ladepuffer versetzt. 15 µl der Probe wurden auf 10 %igen SDS-Gelen getrennt, Silber gefärbt und densitometrisch analysiert.

### **2.4.9 Thermische Denaturierungskinetiken bei 71 °C und 2 % SDS**

Die Stabilität des Tailspiketrimers gegenüber Hitze und dem Detergenz SDS wurde nach Danner und Seckler mit TSP und TSP $\Delta$ N ermittelt (Danner & Seckler, 1993). Proteine wurden gegen 50 mM NaP, pH 7.0 dialysiert, 30 min bei 40000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert und auf 1 mg/ml eingestellt. 40 µl Entfaltungsansätze enthielten 50 µg/ml Protein in 50 mM NaP, pH 7.0, 2 % (w/v) SDS und 177.65 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Ansätze wurden bei 71 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten wurden die Reaktionen in einem Eisbad gestoppt. Zur Vergleichbarkeit wurden alle Mutanten einer Reihe (Alanin- oder Leucin-Reihe) und der Wildtyp parallel untersucht. Als Kontrolle diente eine Probe, die nicht bei 71 °C inkubiert wurde, sondern direkt ins Eisbad gestellt wurde sowie eine Probe, die durch fünfminütiges Inkubieren bei 100 °C vollständig entfaltet wurde. Die Ansätze wurden mit 10 µl SDS-Ladepuffer versetzt, auf 10 %igen SDS-Gelen bei TSP $\Delta$ N oder 7.5 %igen SDS-Gelen bei TSP analysiert und mit Coomassie gefärbt. Gele wurden fotografiert und mit Gelscan v5.1 ausgewertet.

## **2.5. Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse**

Alle kristallographischen Arbeiten wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Heinemann unter Betreuung von Dr. Jürgen Müller am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt.

### **2.5.1 Kristallographie**

Zur Kristallisation wurden frisch gereinigte Proteine gegen HEPES-Puffer dialysiert, mit Zentrifugalkonzentratoren konzentriert und bei 40000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. In Ammoniumsulfat präzipitierte Proteine wurden zudem nach Dialyse mit HiLoad Superdex 200 26/60 in HEPES-Puffer rechromatographiert. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde auf 10 mg/ml eingestellt. Der TSPAN Wildtyp und die untersuchten N-terminal verkürzten Mutanten (V125A, V450A, V125L und V349L) kristallisierten im hängenden Tropfen innerhalb von ein bis zwei Tagen bei 4 °C unter den von Steinbacher etablierten Pufferbedingungen (Steinbacher et al., 1994). 5 µl der Proteinlösung wurden mit 3 µl des Kristallisationspuffers vermischt. Das Volumen des Reservoir-Puffers betrug 750 µl. Die Kristalle wurden mit Hilfe einer Nylonschleife aus dem Kristallisationstropfen in den Kryopuffer transferiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### **2.5.2 Aufnahme der Röntgenbeugungsdaten**

Die Streuqualität von Kristallen wurde am Messplatz der AG Heinemann in Berlin-Buch überprüft. Vollständige Röntgenbeugungsdaten von hochauflösenden Kristallen wurden dann am Synchrotron-Speicherring BESSY von Dr. Jürgen Müller bei 100 K detektiert. Die Wellenlänge an den beiden Messtagen war 0.92018 Å und 0.95373 Å. Alle Proteine kristallisierten in der Raumgruppe  $P2_13$ , d.h. primitiv kubisch. Diffraktionsbilder wurden von Jürgen Müller mit dem Software Paket XDS prozessiert (Kabsch, 1993). Jedes Bild deckte einen Drehwinkel des Kristalls im Röntgenstrahl von 0.3 ° ab. Die Datensätze der fünf Proteine hatten eine Auflösung von bis zu 1.5 Å bei Gesamtvollständigkeiten zwischen 68.8 % und 89.3 %.

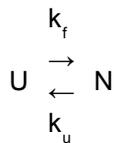
### **2.5.3 Strukturmodellbau und Verfeinerung**

Strukturmodelle konnten durch molekularen Ersatz mit den Phasen der publizierten Struktur des Wildtyps (PDB-Code: 1TYV, (Steinbacher et al., 1997b) oder der Mutanten V125L (PDB-Code: 2VFO) oder V450A (PDB-Code: 2VFQ) als Startmodelle mit dem Programm Phaser (McCoy et al., 2007) ermittelt werden. Wassermoleküle wurden mit ARP\_wARP (Perrakis et al., 1997) lokalisiert und visuell mit dem Programm O7 (Jones et al., 1991) überprüft. Durch mehrere alternierende Verbesserungsrounds mit REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) und manuelles Einpassen des Strukturmodells in die Elektronendichte mit O7 konnten die Modelle verfeinert und vervollständigt werden. Die kristallographischen R-Faktoren  $R_{\text{work}}$  und  $R_{\text{free}}$  lagen zwischen 11.4 % bis 13.5 % bzw. 14.4 % bis 16.4 % für alle ermittelten Strukturen. Molekülstatistiken, wie Bindungslängen und -winkel, Wasserstoffbrückenbindungen und „Ausreißer“ im Ramachandran-Plot, wurden mit der PROCHECK Suite (Laskowski et al., 1993), WHAT\_CHECK (Hoof et al., 1996b) und dem Rampage-Server (URL: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>; abgerufen am 13.9.2009), (Lovell et al., 2003) validiert. Sekundärstrukturelemente wurden mit Promotif zugeordnet und anschließend bearbeitet (Hutchinson & Thornton, 1996). Die Strukturkoordinaten sind in der RCSB Proteindatenbank hinterlegt. Ausführliche Datensatz- und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle A1 im Anhang dieser Arbeit zusammengestellt.

## 2.6 Mathematische Auswertung

### 2.6.1 Reversible Gleichgewichtsübergänge nach Pace und Santoro & Bolen (Pace, 1986)

Harnstoff-induzierte Faltungs- und Entfaltungsübergänge der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne können bei den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen nach einem Zweizustandsmodell



ausgewertet werden (Miller et al., 1998a). Nur gefaltete und entfaltete Konformationen liegen in signifikanten Konzentrationen vor.  $k_f$  und  $k_u$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Faltungs- bzw. Entfaltungsreaktion; ihre Summe ist die in Kinetiken detektierte apparente Geschwindigkeitskonstante  $k_{app}$ . Im Gleichgewicht der Reaktion

$$k_f * [U] = k_u * [N] \quad (\text{Gl. 2.4})$$

ist die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung  $K_U$  über das Fluoreszenzsignal zugänglich.

$$K_U = \frac{k_u}{k_f} = \frac{[U]}{[N]} = \frac{f_u}{f_n} = \frac{(F_N - F)}{(F - F_U)} \quad (\text{Gl. 2.5})$$

In Gleichung 2.5 stehen  $f_n$  und  $f_u$  für die jeweiligen Anteile von nativen und entfaltenen Protein,  $F$  ist das gemessene Signal,  $F_N$  und  $F_U$  sind die theoretischen Fluoreszenzintensitäten, welche im Übergangsbereich durch lineare Regression der Vor- bzw. Nachübergangsbasislinie extrapoliert werden können:

$$F_N \text{ oder } F_U = m_N \text{ oder } m_U * [D] + n \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Dabei sind  $m_N$  und  $m_U$  die Steigungen der Vor- und Nachübergangsbasislinien,  $[D]$  ist die Harnstoffkonzentration und  $n$  der y-Achsenabschnitt. Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  ist nach van't Hoff

$$\Delta G_{(N \rightarrow U)} = -RT * \ln(K_U) \quad (\text{Gl. 2.7})$$

über die Gleichgewichtskonstante gegeben.  $R$ , die allgemeine Gaskonstante, ist  $8.314 \text{ J} * \text{mol}^{-1} * \text{K}^{-1}$ . Die Temperatur  $T$  war 283.15 Kelvin.  $\Delta G_{N \rightarrow U}$  ist im Übergangsbereich linear von der Denaturierungsmittel-

konzentration [D] abhängig. Durch lineare Extrapolation kann somit die Proteinstabilität in Abwesenheit von Denaturierungsmittel  $\Delta G_{N \rightarrow U}^0$  über

$$\Delta G_{(N \rightarrow U)} = \Delta G_{(N \rightarrow U)}^0 - m * [D] \quad (\text{Gl. 2.8})$$

berechnet werden. Die Steigung m beschreibt die Kooperativität des Übergangs, die Abhängigkeit der freien Enthalpie der Entfaltung von [D]. Am Übergangsmittelpunkt  $c_{1/2}$  liegt jeweils die Hälfte der Population im nativen und im entfalteten Zustand vor.

$$c_{1/2} = \frac{\Delta G_{(N \rightarrow U)}^0}{m} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Mit Hilfe der kombinierten Gleichung 2.9 können aus den bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Übergangs direkt die Parameter m,  $\Delta G^0$ ,  $F_N$ ,  $F_U$ ,  $m_N$ ,  $m_U$  erhoben werden (Santoro & Bolen, 1988).

$$F = \frac{[(F_N + m_N * [D]) + (F_U * m_U * [D]) * e^{-\left(\frac{\Delta G_{(N \rightarrow U)}^0}{R * T} + \frac{m * [D]}{R * T}\right)}]}{[1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{(N \rightarrow U)}^0}{R * T} + \frac{m * [D]}{R * T}\right)}]} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

### 2.6.2 Bestimmung von $\Delta ASA$ und $m(\text{Harnstoff})$ mit empirischen Gleichungen nach Myers (Myers et al., 1995)

Bei kleinen globulären Proteinen besteht eine linearer Zusammenhang zwischen der Kooperativität der Entfaltung und der lösungsmittelzugänglichen Proteinoberfläche (*accessible surface area*, ASA), d.h. der Größe des Proteins. Nach Myers können aus den empirischen Gleichungen

$$\Delta ASA = -907 + 93 * (\text{Anzahl der Reste}) \quad (\text{Gl. 2.11})$$

$$m(\text{Harnstoff}) = 374 + 0.11 * (\Delta ASA) \quad (\text{Gl. 2.12})$$

der m-Wert in  $\text{cal} * \text{mol}^{-1} * \text{M}^{-1}$  und die Änderung von ASA bei Entfaltung in der Einheit  $\text{Å}^2$  berechnet werden.

### 2.6.3 De- und Renaturierungskinetiken

Denaturierungskinetiken in GdmHCl-Puffer und Renaturierungskinetiken in Nativpuffer wurden durch Messung der Fluoreszenzemission detektiert. Emissionsspektren des nativen (N) und entfalteten Zustands (U) der Tailspikevarianten unterscheiden sich vor allem durch die etwa dreifache Verringerung der Tryptophanfluoreszenz bei Entfaltung. Diese Eigenschaft diente als Sonde für N und U.

Die zeitabhängige Veränderung der Intensität des Fluoreszenzsignals  $F$  kann entsprechend der Anzahl der kinetischen Spezies mono- oder biexponentiell beschrieben werden:

$$F_{(t)} = a + b * e^{(-k * t)} \quad \text{(Gl. 2.13)}$$

$$F_{(t)} = a + b * e^{(-k_1 * t)} + c * e^{(-k_2 * t)} \quad \text{(Gl. 2.14)}$$

Dabei ist  $F_{(t)}$  die Intensität des Fluoreszenzsignals zum Zeitpunkt  $t$ ,  $a$  ist der Endwert der Kinetik,  $k$  bzw.  $k_1$  und  $k_2$  sind die apparenten Geschwindigkeitskonstanten und  $b$  bzw.  $c$  die jeweils zugehörigen Amplituden der Signaländerung. Bei Denaturierung des Tailspikeproteins war eine Abnahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten, bei Faltung ein Anstieg; die Vorzeichen der Exponentialfunktionen sind somit positiv bzw. negativ.

Eine zusätzliche Exponentialfunktion zur Beschreibung der Daten wurde verwendet, wenn ihre Amplitude mindestens 10 % der Gesamtamplitude betrug.

### 2.6.4 Thermische Denaturierungskinetiken bei 71 °C

Das Trimer des kompletten Tailspikeproteins (1 - 666) denaturiert bei Hitze in Gegenwart von SDS über ein transient populierte trimeres Intermediat mit entfalteter N-terminaler Domäne (Danner & Seckler, 1993). Der Verlauf



dieser konsekutiven Reaktionen erster Ordnung kann durch zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden. Durch SDS-Bindung an entfaltete Bereiche der Polypeptidkette wird die Rückreaktion unterbunden. Die Verhältnisse der drei Spezies T, I und M im zeitlichen Verlauf der Reaktion wurden global mit den folgenden Gleichungen angepasst:

$$[T]_t = [T]_0 * e^{(-k_1 * t)} \quad \text{(Gl. 2.15)}$$

$$[I]_t = [T]_0 * \left( \frac{k_1}{k_2 - k_1} \right) * (e^{(-k_1 * t)} - e^{(-k_2 * t)}) \quad \text{(Gl. 2.16)}$$

$$[M]_t = [T]_0 * \left( 1 - \frac{1}{k_2 - k_1} \right) * (k_2 * e^{(-k_1 * t)} - k_1 * e^{(-k_2 * t)}) \quad \text{(Gl. 2.17)}$$

Dabei steht  $[T]_0$  für die Ausgangskonzentration des Trimers zur Reaktionsbeginn und  $t$  für die Denaturierungszeit in Minuten.  $k_1$  und  $k_2$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Exponentialfunktionen. Deletion der aminoterminalen Domäne (109-666) ermöglicht eine monophasische Auswertung der thermischen Entfaltungskinetik für das Modell



Gleichung 2.18 beschreibt den exponentiellen Zeitverlauf der Monomierzunahme. Die Rate der Monomerbildung  $k_{\text{Denat}}$  kann als Maß für die Proteinstabilität herangezogen werden (Schuler & Seckler, 1998)

$$M_{(t)} = 100 * (1 - e^{(-k_{\text{Denat}} * t)}) \quad (\text{Gl. 2.18})$$

### 2.6.5 Bestimmung von $\Delta\Delta G^\ddagger$

Aus den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten können Unterschiede in den Aktivierungsenergien zwischen Mutanten und dem Wildtyp  $\Delta\Delta G^\ddagger$  unter Anwendung der Theorie des Übergangszustandes (*transition state theory*) bestimmt werden. Bei monoexponentiellen Reaktionsverläufen sind die kinetischen Spezies U und N durch eine Energiebarriere, mit dem Übergangszustand  $\ddagger$  als Punkt der höchsten freien Energie, getrennt. Die Energiedifferenz zwischen U und  $\ddagger$  bzw. N und  $\ddagger$  ist die Aktivierungsenergie der Faltung  $\Delta G_{\text{F}}^\ddagger$  bzw. der Entfaltung  $\Delta G_{\text{U}}^\ddagger$ . Die *transition state theory* setzt die kinetischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{f}}$  oder  $k_{\text{u}}$  und die Aktivierungsenergie der Faltung bzw. Entfaltung in Zusammenhang:

$$k = k_0 * e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

In Gleichung 2.19 ist  $k_0$  ein Faktor, der die maximale Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit einer Energiebarriere repräsentiert (Bieri & Kiefhaber, 2000). Werden Geschwindigkeitskonstanten von Wildtyp und Mutanten ins Verhältnis gesetzt kann  $\Delta\Delta G^\ddagger$  nach

$$\Delta\Delta G^\ddagger = -RT * \ln \frac{k_{\text{Mutante}}}{k_{\text{Wildtyp}}} \quad (\text{Gl. 2.20})$$

berechnet werden (Guydosh & Fersht, 2005).

### 2.6.6 Fehlerfortpflanzung

Fehler der  $\Delta G_{\text{N} \rightarrow \text{U}}^0$ - und  $\Delta\Delta G^\ddagger$ -Werte wurden nach Regeln auf Basis der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung ermittelt. Sind bei den Funktionen

$$z = x + y \quad \text{oder} \quad z = x - y \quad (\text{Gl. 2.21})$$

x und y mit den jeweiligen Fehlern  $\Delta x$  und  $\Delta y$  behaftet, ist der Gesamtfehler  $\Delta z$  durch

## 2. Experimenteller Teil

---

$$\Delta z = \sqrt{(\Delta x^2 + \Delta y^2)} \quad \text{(Gl. 2.22)}$$

gegeben. Bei der Bildung von Produkten oder Quotienten

$$z = x * y \quad \text{oder} \quad z = \frac{x}{y} \quad \text{(Gl. 2.23)}$$

gilt

$$\Delta z = \sqrt{\left[ \left( \frac{\Delta x}{x} * z \right)^2 + \left( \frac{\Delta y}{y} * z \right)^2 \right]} \quad \text{(Gl. 2.24)}$$

Wird ein Wert  $x$ , der mit dem Fehler  $\Delta x$  behaftet ist, logarithmiert

$$y = \ln x \quad \text{(Gl. 2.25)}$$

ist der Fehler

$$\Delta y = \frac{1}{x} * \Delta x \quad \text{(Gl. 2.26)}$$

## 3. Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil ist in vier Kapitel gegliedert. Im ersten Kapitel ist der Einfluss der Punktmutationen auf die isolierte, monomere  $\beta$ -Helix Domäne (BHX, 109-544) charakterisiert. Die anschließenden drei Kapitel befassen sich mit der Bedeutung der Seitenkettenstapelung im Hinblick auf Faltung, Stabilität und Struktur des Tailspike trimers. Wenn nicht explizit hervorgehoben, wurden die Untersuchungen des Trimers am N-terminal verkürzten Konstrukt TSP $\Delta$ N (109-666) durchgeführt.

### 3.1. Einfluss der Seitenkettenstapelung auf die isolierte, monomere $\beta$ -Helix Domäne

Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne ist geeignet, durch Punktmutationen induzierte Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität des Tailspikeproteins zu quantifizieren (Schuler & Seckler, 1998). Die Domäne entfaltet unter geeigneten Bedingungen reversibel und liegt bei geringen Proteinkonzentrationen ( $<1 \mu\text{M}$ ) als Monomer vor (Miller et al., 1998a). Diese Attribute ermöglichen die Messung von Harnstoff-induzierten Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtsübergängen und auf diese Weise die Bestimmung der freien Enthalpie der Faltung  $\Delta G^0_{\text{U} \rightarrow \text{N}}$  bzw. der Entfaltung  $\Delta G^0_{\text{N} \rightarrow \text{U}}$ .

In diesem Kapitel wird die Reinigung, strukturelle Charakterisierung und Bestimmung der konformationellen Stabilität  $\Delta G^0$  der  $\beta$ -Helix-Konstrukte beschrieben. Am Ende des Kapitels wird das Aggregationsverhalten von drei destabilisierten Mutanten V272A, V321A und V349A beobachtet.

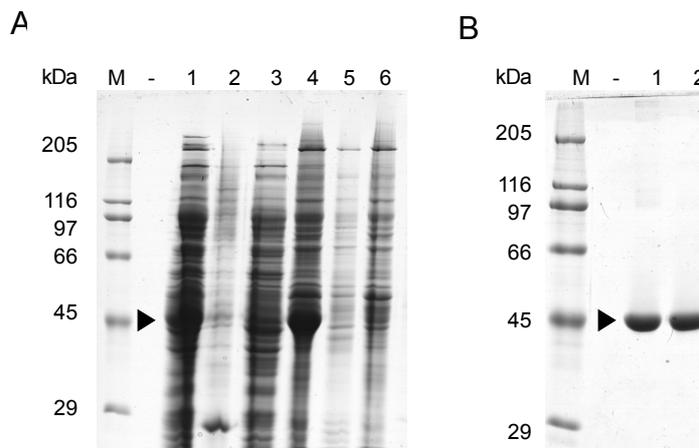
#### 3.1.1 Expression und Reinigung der $\beta$ -Helix Konstrukte

Plasmidvektoren, welche die gewünschten Mutationen im hydrophoben Stapel der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne tragen, wurden durch das QuickChange Verfahren hergestellt. Nach Transformation der Plasmide in *E. coli* JM83 wurde die Überexpression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 25 °C getestet. Wildtyp und Mutanten der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne sind im Überstand des Rohextraktes nach Zellyse und Zentrifugation nachweisbar, werden demnach bei dieser Temperatur löslich exprimiert. Die Proteine können aus dem Extrakt durch Fällung mit 35 % Ammoniumsulfat und anschließender Affinitätschromatographie über Bindung des C-terminalen Hexahistidyl-Tags an eine Nickel-Sepharosematrix angereichert und gereinigt werden (Abb. 3.1). Das Arbeiten bei 4 °C und die Zugabe von 10 mM EDTA direkt nach Elution von der Säule sind bei der Reinigung der isolierten

### 3. Ergebnisse

$\beta$ -Helix wesentlich, da der Wildtyp, vor allem aber destabilisierte Mutanten, bei hohen Konzentrationen unlösliche Aggregate bilden können (Schuler & Seckler, 1998).

Der Wildtyp und alle untersuchten Mutanten eluieren über einen steigenden Gradienten bei etwa 160 mM bis 180 mM Imidazol von der Säule. Durch Anlegen eines zweistufigen Gradienten kann der BHX-haltige Proteinpeak im Fall des Wildtyps und bei den meisten Mutanten gut von einer durch Verunreinigungen hervorgerufenen vorgelagerten Schulter im Elutionsprofil getrennt werden. Für die Mutanten V498A, V523A und V450L war jedoch eine deutlich verminderte Trennschärfe zu beobachten. Hier wurde die isolierte  $\beta$ -Helix über einen ausgedehnten Fraktionsbereich eluiert, der mit den Verunreinigungen überlappte. Aus diesem Grund war der Reinheitsgrad der Proteinproben nach Vereinigung ausgewählter Peakfraktionen unterschiedlich. Er betrug für die Mutanten V498A, V523A und V450L etwa 94 %. Der Wildtyp und alle anderen Mutanten hatten eine Reinheit von mehr als 97 %. Reinigungsausbeuten der Proteine aus einem Liter Expressionskultur lagen zwischen 7 mg und 48 mg. Proteinproben wurden steril filtriert und bei 4 °C für kurze Zeit gelagert. Nach längerer Lagerung konnten in einigen Proteinlösungen von Mutanten mit dem Auge sichtbare Aggregate und eine Verringerung der Proteinkonzentration beobachtet werden. Durch Ultrazentrifugation für 30 min bei 4 °C konnten jedoch alle Schwebeteilchen entfernt werden, sodass im Absorptionsspektrum oberhalb von 300 nm eine stabile Basislinie erhalten wurde.

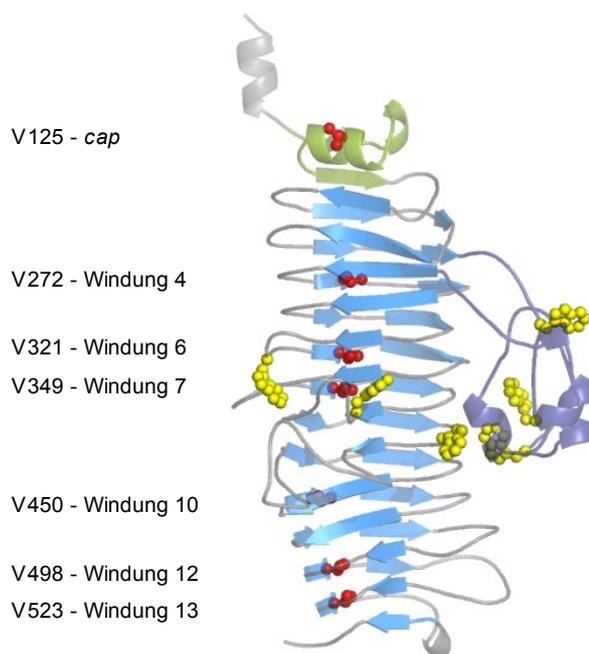


**Abbildung 3.1: A) und B) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Reinigung von BHX V125L.** Die isolierte  $\beta$ -Helix hat eine Molekularmasse von circa 48 kDa. **A)** M: Molekularmassenmarker; Spur 1: lösliche Fraktion des Zelllysates; Spur 2: unlösliche Fraktion des Zelllysates; Spur 3: Überstand nach Ammoniumsulfatfällung Spur 4: Pellet nach Ammoniumsulfatfällung; Spuren 5 und 6: Durchflussfraktionen nach Binden des Proteins an eine His-Trap HP Säule. **B)** M: Molekularmassenmarker; Spur 1: gereinigtes Protein (2.5  $\mu$ g/Spur); Spur 2: gereinigtes Protein nach Inkubation für 5 min bei 100 °C (2.5  $\mu$ g/Spur).

#### 3.1.2 Strukturelle Eigenschaften der $\beta$ -Helix Konstrukte

Die Tertiärstruktur der BHX-Konstrukte wurde mittels Fluoreszenzemissionsspektroskopie bei einer Proteinkonzentration von 10  $\mu$ g/ml bei 10 °C untersucht. Das Emissionsspektrum der nativ gefalteten

$\beta$ -Helix Domäne des Wildtyps ist dem des kompletten Tailspikes und dem des trimeren TSP $\Delta$ N Konstrukt sehr ähnlich (Abb. 3.4 A), (Miller et al., 1998a). Es wird durch die Lösungsmittelzugänglichkeit und strukturelle Umgebung von sechs Tryptophanresten bestimmt, die in der "Rückenflosse" (W202, W207, W213) und im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix (W315, W365, W391) lokalisiert sind (Abb. 3.2). Denaturierung des Proteins führt zu einer etwa dreifachen Verringerung der Fluoreszenzintensität und zur Rotverschiebung des Emissionsmaximums von circa 340 nm im nativen Zustand zu 353 nm im entfalteten Zustand. Die Schulter im Spektrum bei 305 nm im entfalteten Zustand wird von 17 im BHX-Konstrukt vorhandenen Tyrosinresten hervorgerufen (Abb. 3.4 A).

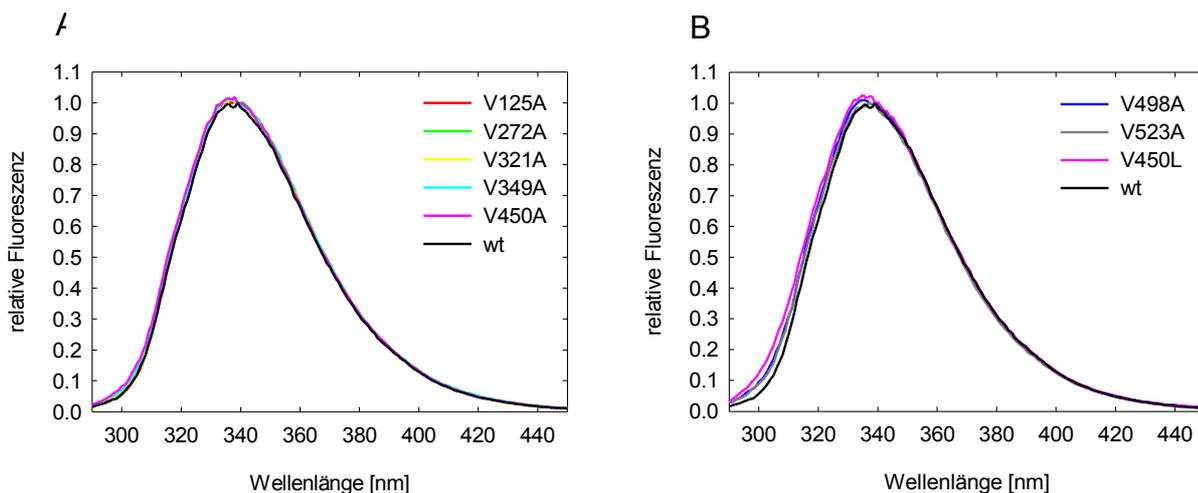


**Abbildung 3.2: Positionen von Tryptophanresten in der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne. A)** Strukturmodell der BHX (109-544) abgeleitet aus den Koordinaten von TSP $\Delta$ N (PDB-Code: 2VFM). Hervorgehoben sind die N-terminale *capping*-Region (120-142, grün), die  $\beta$ -Helix Region (143-540, blau) und die „Rückenflosse“ (197-259, dunkelblau). 7 Tryptophane (gelb) bestimmen das Fluoreszenzsignal des Konstrukts. Sie sind in der „Rückenflosse“ (W202, W207, W213), in *turn*-Regionen, welche die LPS-Bindungsfurche flankieren (W365, W391) und am „Bauch“ (W315) des Tailspikeproteins lokalisiert. Substituierte Valine (rot) im hydrophoben Lumen der  $\beta$ -Helix Domäne.

In Abbildung 3.3 A werden die Emissionsspektren einiger Mutanten der A-Reihe und des Wildtyps miteinander verglichen. Emissionsspektren der Mutanten V125L, V272L, V321L, V349L, V498L und V523L sind deckungsgleich, zur Übersichtlichkeit jedoch nicht dargestellt. Die einheitliche Form der Spektren spricht für eine ähnliche strukturelle Umgebung der Fluorophore im Wildtyp und in den Mutanten. Die Lage der Emissionsmaxima bei circa 340 nm belegt die native gefaltete Struktur der Proteine.

Abbildung 3.3 B zeigt Emissionsspektren der Mutanten V498A, V523A, V450L und des Wildtyps. Das Emissionsmaximum der Spektren liegt vergleichbar bei etwa 340 nm; die drei Mutanten sind nativ gefaltet. Im kurzwelligen Bereich weicht der Verlauf der Spektren der Mutanten, besonders bei V450L,

von dem des Wildtyps ab. Bei längeren Wellenlängen sind die Kurven identisch. Proteinlösungen von V498A, V523A und V450L sind weniger rein als die Proben der anderen Mutanten und des Wildtyps (s. 3.1.1). Die verschobenen Flanken der Spektren unterhalb von 340 nm könnten durch zusätzliche fluoreszierende Gruppen anderer Proteine in der Lösung hervorgerufen sein. Diese Verunreinigungen sind aber gering und ihr Einfluss auf das Gesamtspektrum des nativen und des denaturierten Zustands (Daten nicht gezeigt) ist marginal.



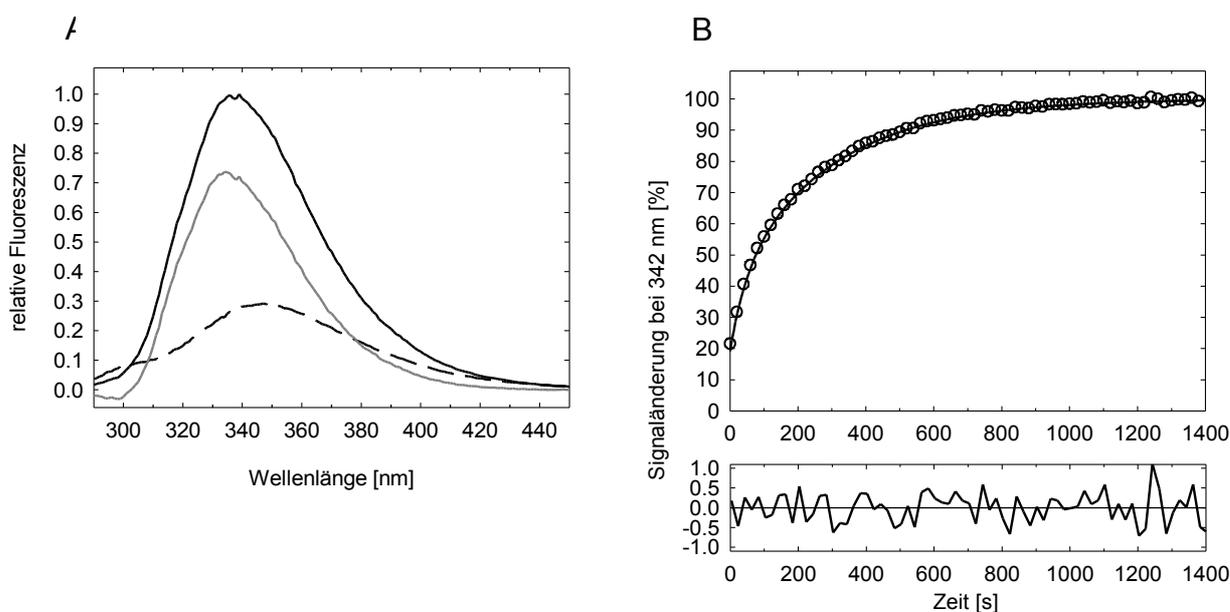
**Abbildung 3.3: Fluoreszenzemissionsspektren der BHX-Konstrukte. A) und B)** Spektren der nativ gefalteten Proteine der A-Reihe und V450L in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0. Anregungswellenlänge war 280 nm, die Proteinkonzentration betrug 10 µg/m und die Temperatur war 10 °C.

#### 3.1.3 Entfaltung und Rückfaltung der isolierten $\beta$ -Helix Domäne

Zur Vorbereitung der Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergänge wurden Ent- und Rückfaltungskinetiken des Wildtypproteins im Hinblick auf die Ergebnisse von Miller (Miller et al., 1998a) und Schuler (Schuler & Seckler, 1998) überprüft. Die Kinetiken wurden über die Signaländerung der Fluoreszenz bei 342 nm verfolgt. Pufferbedingungen und Temperaturen wurden so gewählt, dass sie mit den Bedingungen der Gleichgewichtsexperimente übereinstimmten.

Die Signaländerung der Entfaltungsreaktion der BHX in 5 M Harnstoff, 1 mM EDTA, 50 mM NaP, pH 7.0 ist bei 10 °C innerhalb von 10 Sekunden abgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Der Verlauf der Rückfaltung aus 5 M Harnstoffpuffer in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei 10 °C (1:100 Verdünnung) ist spektroskopisch gut zu erfassen, die Reaktion ist nach circa 20 min im Gleichgewicht (Abb. 3.4 B). Nach Einleitung der Rückfaltung ist ein etwa 20 %iger Anstieg des Signals innerhalb der Totzeit des manuellen Mischens zu beobachten. Diese Phase ist auch durch schnelle Mischtechniken (Fluoreszenz-*stopped-flow* und CD-*stopped-flow*) nicht auflösbar und wurde als Anpassung der Polypeptidkette an die veränderten Pufferbedingungen interpretiert (Schuler, 1998). Der detektierbare Verlauf der Kinetik kann durch eine biexponentielle Funktion mit apparenten Geschwindigkeitskonstanten von

$k_1 = 2.3 \cdot 10^{-2} \pm 0.2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.5$  Minuten) und  $k_2 = 3.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 3.3$  Minuten) beschrieben werden; die Amplituden der Phasen sind  $b = 21 \pm 1 \%$  und  $c = 60 \pm 2 \%$ . Die angegebenen Werte sind Mittel aus drei Messungen. Die schnelle initiale Phase spiegelt die Bildung eines Faltungsintermediates wieder, in dem schon ein hoher Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegt. Die langsame Phase wurde als „Monomerreifung“ gedeutet (Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993, Miller et al., 1998a).



**Abbildung 3.4: Struktur und Faltung der isolierten BHX. A)** Fluoreszenzemissionsspektren der gefalteten (–) und in 4.4 M Harnstoff, 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 entfalteten (– –) isolierten  $\beta$ -Helix Domäne. In grau ist das Differenzspektrum abgebildet. Die maximale Signaländerung zwischen dem gefalteten und entfalteten Zustand ist bei etwa 338 nm zu beobachten. **B)** Rückfaltungskinetik der isolierten  $\beta$ -Helix aus 5 M Harnstoffpuffer in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei 10 °C. Detektiert wurde die Signaländerung bei 342 nm, die durch eine biexponentielle Funktion beschrieben werden kann (–). Der unterstehende Graph zeigt die Residuen der Regression.

Bei Kinetiken, welche in Gegenwart eines etwa 5000fachen Überschusses des Reduktionsmittels DTE (1 mM) aufgenommen wurden, sind keine Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten oder der Signalamplituden zu beobachten. Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne enthält sechs Cysteine, die im gefalteten Zustand ins Lumen der  $\beta$ -Helix weisen. Sie liegen in *turns* und *loops* zwischen den  $\beta$ -Strängen an den Positionen 169, 267, 287, 290, 458, 496. Die Exposition dieser Cysteine im entfalteten Zustand oder im „unreifen“ Monomer könnte die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit einhergehende Fehlfaltung oder Multimerisierung der Polypeptidketten ermöglichen.

Die Messung der Rückfaltungskinetik bei einer hohen EDTA-Konzentration von 11 mM führte zu keiner maßgeblichen Veränderung des Verlaufes. Das EDTA-Anion bildet Chelatkomplexe mit im Puffer enthaltenen Ionen und sollte die Komplexbildung von zweiwertigen Ionen mit den C-terminalen Hexahistidyl-*Tags* der Proteine vermeiden.

Bei einer Zusammenlagerung oder Aggregation wäre eine verminderte Signalintensität zu erwarten,

da es zur Löschung der Tryptophanfluoreszenz kommt (Schuler & Seckler, 1998). Bei den hier verwendeten geringen Proteinkonzentrationen (10 µg/ml, i.e. 208 nM) und der niedrigen Temperatur wird bei der Faltung keine Aggregation über die C-terminalen Hexahistidyl-Tags oder Multimerisierung durch Disulfidbrückenbildung beobachtet.

#### **3.1.4 Gleichgewichtsübergänge zur Analyse der thermodynamischen Stabilität**

Thermodynamische Stabilitäten der BHX-Konstrukte wurden mit Hilfe von Faltung- und Entfaltungsgleichgewichtsübergängen bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml bei 10°C analysiert. Nach Inkubation der nativen und entfalteten Proteine bei unterschiedlichen Harnstoff-Konzentrationen sind die Verhältnisse der beiden Konformationen über Messung der Fluoreszenz zugänglich. Fluoreszenzspektren der Proben wurden nach Anregung bei 280 nm detektiert. Die im Maximum der Signaländerung bei 338 nm gemessenen Intensitäten wurden unter Annahme eines Zweizustandsmodell im Gleichgewicht nach Santoro und Bolen (Santoro & Bolen, 1988) ausgewertet. Die Gleichgewichtseinstellung der Ent- und Rückfaltungsreaktionen bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen war bei 10 °C nach 1 h abgeschlossen. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass Ent- und Rückfaltungsübergänge nicht bei allen Mutanten reversibel sind. Im Folgenden werden die Ergebnisse der reversibel und nicht-reversibel faltenden Mutanten getrennt beschrieben und analysiert. Sie werden am Ende des Abschnitts zusammenfassend erläutert.

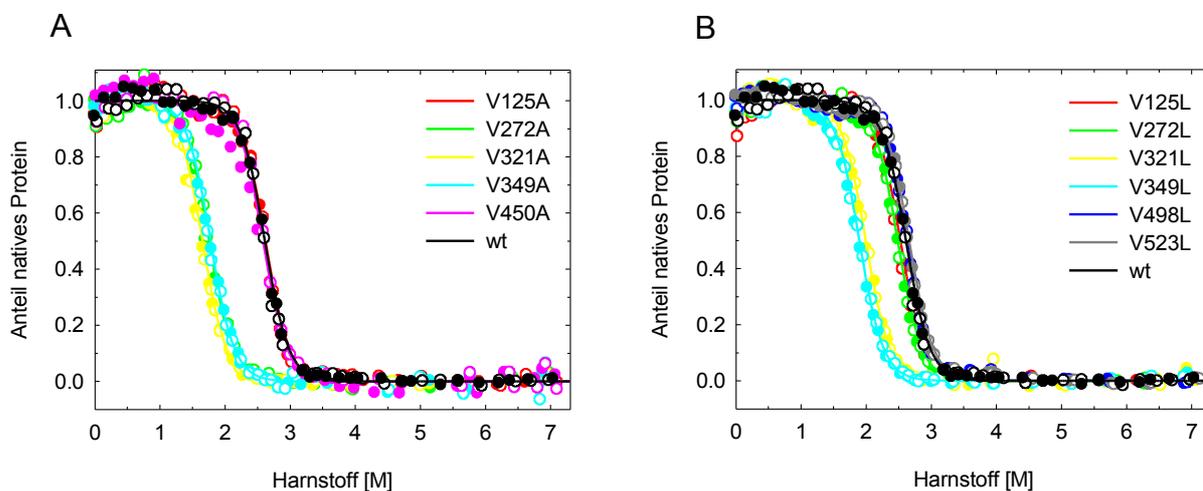
##### *Reversibel-faltende BHX-Mutanten*

De- und Renaturierungsübergänge bestätigen für die meisten Mutanten ein reversibles Gleichgewicht, das durch ein Zweizustandsmodell beschrieben werden kann. Ein Gleichgewichtsintermediat ist nicht zu beobachten (Abb. 3.5). Zudem sind die Kooperativitäten der Übergänge und die Steigungen der Vor- und Nachübergangsbasislinien einheitlich. Übergangsmittelpunkte des Wildtyps und der Mutanten V125A, V450A, V125L, V272L, V498L und V523L liegen bei circa 2.6 M Harnstoff. Die Übergangsmittelpunkte der Mutanten V272A, V321A, V349A, V321L und V349L sind zu kleineren Harnstoffkonzentrationen verschoben. Diese Mutationen induzieren eine Destabilisierung des Proteins.

Abbildung 3.6 stellt Emissionsspektren aus den Ent- und Rückfaltungsübergängen der Mutanten der A-Reihe bei geringen Harnstoffkonzentrationen dar. Spektren der nativen und renaturierten Proteine sind identisch; die Form der Spektren und die Lage der Maxima sind gleichartig. Diese Beobachtung trifft auch auf die Mutanten der L-Reihe, deren Daten nicht abgebildet sind, zu. Dies bestätigt die Rückfaltung der Proteine in ihre native Struktur.

Die Analyse der Rohdaten zeigt, dass die Ausbeuten der Rückfaltung im Vorübergangsbereich nicht vollständig sind (Daten nicht gezeigt). Sie liegen bei den reversiblen Übergängen im Mittel bei etwa  $90 \% \pm 3.5 \%$ . Mit steigenden Harnstoffkonzentrationen ist im Bereich von 0 M bis 1 M häufig eine schwache Zunahme der Fluoreszenzintensitäten der renaturierten Proben zu beobachten. Geringe Mengen des entfalteten Polypeptids scheinen während der Rückfaltung bei kleinen Harnstoffkonzentrationen an der Wand des Reaktionsgefäßes zu kleben oder zu aggregieren eine Erhöhung der Harn-

stoffkonzentrationen vermindert diesen Effekt. Die Verhältnisse der Spezies im Ent- und Rückfaltungsübergang, auch im Vorübergangsbereich, sind jedoch gleich. Nach Normierung der Intensitäten auf den Anteil des gefalteten Proteins sind Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge identisch (Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: Gleichgewichtsübergänge der reversibel faltenden BHX-Konstrukte.** Denaturierungsübergänge (gefüllte Symbole) und Renaturierungsübergänge (offene Symbole) der Mutanten der A-Reihe (**A**) und L-Reihe (**B**). Proteine im nativen Zustand oder nach kompletter Entfaltung in 5 M Harnstoffpuffer wurden in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei den angegebenen Harnstoffkonzentrationen für 1 h bei 10 °C inkubiert. Die Proteinkonzentration war 10 µg/ml. Für die Abbildungen wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei 338 nm basislinienkorrigiert und auf den Anteil des nativ gefalteten Proteins normiert. Gemeinsame *Fits* der Ent- und Rückfaltungsübergänge nach einem Zweizustandsmodell sind als Regressionslinien dargestellt.

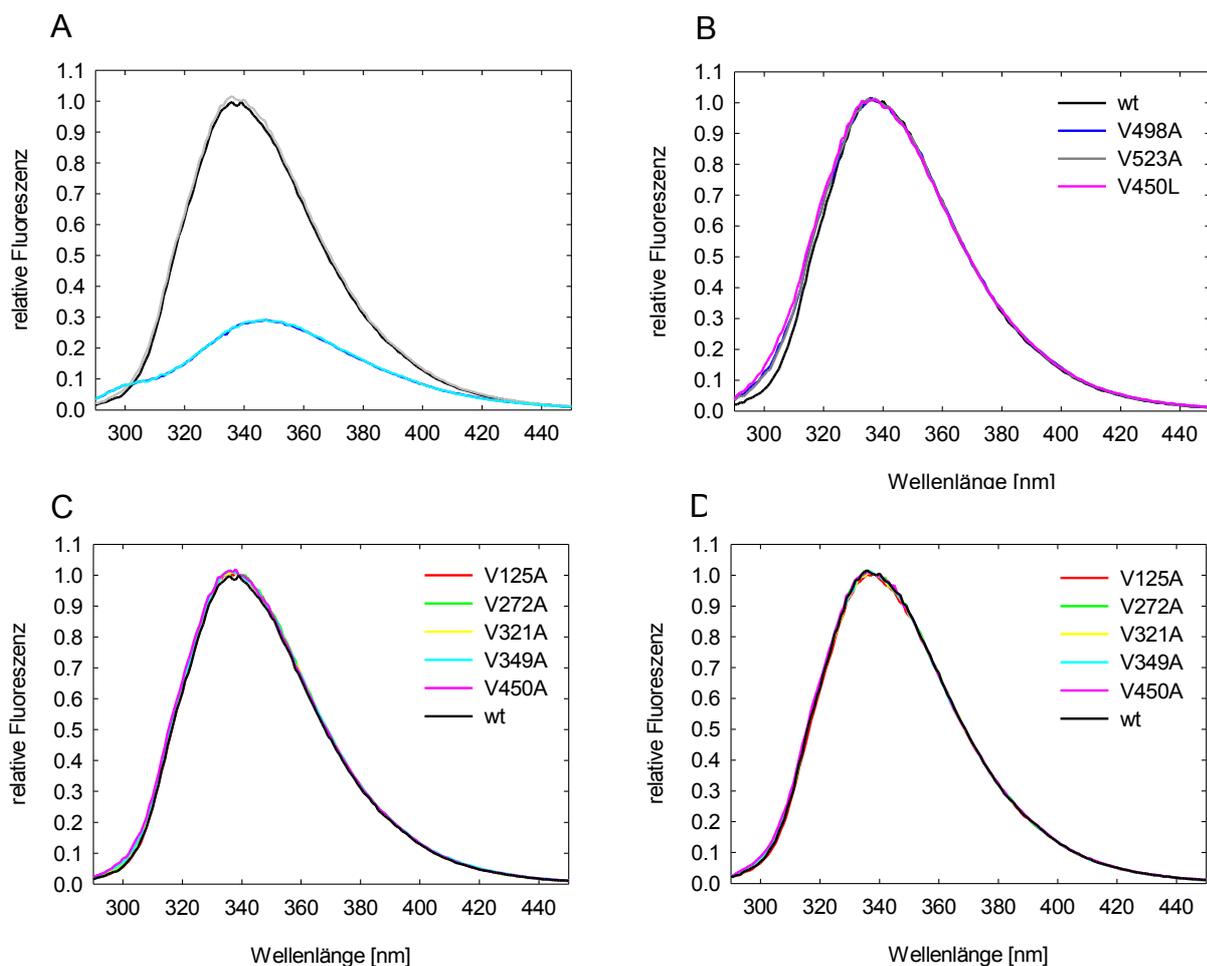
Bei der Auswertung wurde aus den Rohdaten aller Übergänge die mittlere Steigung der Vorübergangsbasislinie bestimmt. Hierzu wurden, entsprechend der Länge des Vorübergangsbereiches, die Daten bis 2 M Harnstoff für V125A, V450A, V125L, V272L, V498L, V523L und den Wildtyp verwendet. Für die destabilisierten Mutanten V272A, V321A, V349A, V498A, V321L und V349L wurden die Intensitäten bis 1 M Harnstoff herangezogen. Da bei Rückfaltung, wie oben beschrieben, die Fluoreszenzintensität bis etwa 1 M ansteigt, wurden für die Bestimmung der Steigung der mittleren Vorübergangsbasislinie hier nur Daten zwischen 1 M bis 2 M Harnstoff verwendet. Zur Vergleichbarkeit der Intensitäten wurden alle Daten der verschiedenen Übergänge durch den jeweils ersten Wert geteilt. Die somit normierten Intensitäten wurden mit einer linearen Regression ausgewertet. Die mittlere Steigung der Vorübergangsbasislinie  $m_N$  ist  $-0.028 \text{ J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

In einem weiteren Schritt wurden die Faltungs- und Entfaltungsübergänge unabhängig mit der Steigung der Vorübergangsbasislinie als Einschränkung nach Gleichung 2.10 *gefittet*. Die durch die Regressionen erhaltenen Kooperativitäten  $m$  der Übergänge sind sehr ähnlich, ihr Mittelwert ist  $12.8 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Bei Verwendung einer gemittelten Kooperativität der Übergänge wird davon ausgegangen, dass die eingefügten Punktmutationen im Inneren des hydrophoben Kerns der  $\beta$ -Helix

### 3. Ergebnisse

Domäne keine großen strukturellen Veränderungen auslösen und somit auch die Veränderung in der Lösungsmittelzugänglichkeit zwischen nativen und entfalteten Zustand ( $\Delta$ ASA) gleich ist. Dies scheint im Hinblick auf die Ergebnisse aus 3.1.2 und den Kristallstrukturen der  $\Delta$ N-Konstrukte (s. Abschnitt 3.4.3) zulässig.

Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge der reversibel faltenden Proteine wurden gemeinsam durch nicht-lineare Regression nach Gleichung 2.10 mit festgesetzter Vorübergangsbasislinie  $mN$  von  $-0.028 \text{ J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und einer Kooperativität  $m$  von  $12.8 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengetragen.

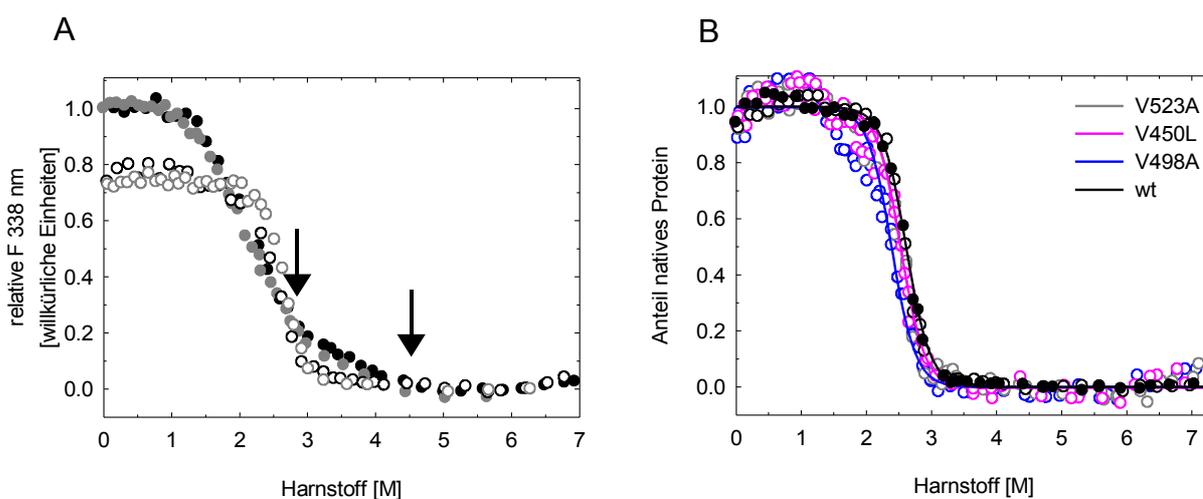


**Abbildung 3.6: Fluoreszenzemissionsspektren der nativen und renaturierten Mutanten.** **A)** Spektren aus dem Entfaltungsübergang des Wildtyps bei 0 M (–) und 4.4 M (–) Harnstoff und dem Rückfaltungsübergang bei 0.05 M (–) und 4.5 M (–) Harnstoff. **C)** zeigt Nativspektren der Mutanten der A-Reihe im Entfaltungsübergang. Die Abbildungen **B)** und **D)** zeigen die Mutanten der A-Reihe und V450L nach Rückfaltung bei Harnstoffkonzentrationen  $< 0.1 \text{ M}$ .

#### *Nicht-reversibel faltende Mutanten*

Für die Mutanten V498A, V523A und V450L stimmten De- und Renaturierungsübergänge nicht überein. Dies ist in Abbildung 3.7 A am Beispiel der Mutante V523A dargestellt. Im Entfaltungsübergang sind die Vorübergangsbereiche im Gegensatz zur Rückfaltung verkürzt, die Kooperativitäten sind

geringer und es tritt eine zweite Phase im Übergang bei circa 2.5 M bis 4 M Harnstoff auf (durch Pfeile in Abb. 3.7 A gekennzeichnet). Die Renaturierungsübergänge der drei Mutanten sind hingegen einphasig und ihre Kooperativität ist dem Wildtyp entsprechend (Abb. 3.7). Renaturierungsausbeuten des Vorübergangsbereiches liegen im Durchschnitt bei  $73\% \pm 5\%$  verglichen mit der Signalintensität der Entfaltungsübergänge. Zur Bestimmung des Übergangsmittelpunktes der Rückfaltung wurden die Kurven mit Gleichung 2.10 (mit  $mN = -0.028 \text{ J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  und  $m = 12.8 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ) beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 gesammelt. Die Übergangsmittelpunkte der Rückfaltung der Mutanten liegen wildtyp-ähnlich bei 2.4 M und 2.5 M Harnstoff.



**Abbildung 3.7: Gleichgewichtsübergänge der nicht-reversibel faltenden BHX-Konstrukte. A)** Denaturierung (geschlossene Symbole) und Renaturierung (offene Symbole) von V523A in 50 mM NaP, pH 7.0 mit 1 mM EDTA ( $\circ \bullet$ ) oder 11 mM EDTA, 1 mM DTE ( $\circ \bullet$ ). **B)** Renaturierungsübergänge der Mutanten V498A, V523A und V450L in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 sind basislinienkorrigiert und auf den Anteil des nativen Proteins normiert. Die nicht-lineare Regression der Daten ist als Linie dargestellt.

Die Reste V450, V498 und V523 befinden sich in den letzten vier Windungen am C-Terminus der BHX-Domäne. Um zu überprüfen, ob die veränderten Kooperativitäten und die dreistufigen Verläufe der Entfaltungsübergänge von V498A, V523A und V450L durch Aggregation über Hexahistidyl-*Tags* oder Disulfidbrückenbildung zwischen teilweise entfaltetten Proteinen hervorgerufen ist, wurde die thermodynamische Stabilität der Mutante V523A zusätzlich in Gegenwart von 11 mM EDTA und 1 mM DTE untersucht (Abb. 3.7 A). Die jeweiligen Verläufe der Faltungs- und Entfaltungsübergänge bei 1 mM EDTA oder 11 mM EDTA, 1 mM DTE sind allerdings analog und Aggregation über Disulfidbrücken oder Hexahistidyl-*Tags* während der Entfaltungsreaktion im Übergang kann somit ausgeschlossen werden.

Die Reinheit der Proteinproben von V498A, V523A, V450L liegt bei etwa 94 %. Der Zweizustandsverlauf der Rückfaltungsübergänge zeigt, dass das beobachtete Fluoreszenzsignal nicht durch Überlagerung des Signals der BHX Domäne und anderen fluoreszierenden Gruppen in der Proteinlösung ausgelöst wird.

Ein möglicher Grund für die Ausbildung einer Schulter im Entfaltungsübergang könnten heterogene native Proteinlösungen sein. Bei der vergleichsweise hohen Expressionstemperatur von 25 °C *in vivo* könnten Mutanten, deren C-Terminus weniger rigide oder kompakt ist, fehlgefalten und aggregieren. Fehlgefaltetes Protein könnte schon bei geringen Harnstoffkonzentrationen entfalten, wodurch die Signalintensität abnimmt. Aggregate könnten durch eine höhere Stabilität die Verlängerung des Übergangsbereiches bis 4.5 M hervorrufen. Im Gegensatz dazu würde die Rückfaltung bei einer niedrigen Temperatur von 10 °C den Mutanten ermöglichen ihre korrekte Struktur auszubilden. Auch Schuler hatte bei den stark destabilisierten *tsf*-Mutanten D238S und G244R, die in der „Rückenflosse“ lokalisiert sind, die Bildung von Aggregaten in nativen Proteinlösung beobachtet. Allerdings war die Aggregationstendenz der beiden *tsf*-Mutanten so stark, dass sie einen *Quench* der Fluoreszenz der nativen Proteinlösung hervorriefen (Schuler & Seckler, 1998). Ein Fluoreszenzquench wurde hier nicht beobachtet.

#### *Zusammenfassende Erläuterung*

Tabelle 3.1 fasst die thermodynamischen Stabilitäten der untersuchten Mutanten im hydrophoben Seitenkettenstapel der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne zusammen. Die Daten basieren auf der Annahme, dass die BHX bei den verwendeten Bedingungen im Gleichgewicht ein Zweizustandsverhalten aufweist; d.h. die gemessenen Fluoreszenzsignale sind nur durch die Beiträge der nativen und entfaltenen Population bedingt.

Der Übergangsmittelpunkt  $c_{1/2}$  des Wildtypproteins liegt bei 2.6 M Harnstoff. Hier liegt jeweils die Hälfte der Population in der gefalteten bzw. der entfaltenen Konformation vor. Die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_{N \rightarrow U}^0$  ist  $33.4 \pm 1.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Kooperativität der Rückfaltungsübergänge und fast aller Entfaltungsübergänge ist gleich, die Konstrukte falten und entfalten als eine kooperative Einheit. Bei kleinen globulären Proteinen umfasst die kooperative Einheit das gesamte Protein. Je größer die kooperative Einheit, um so größer die Steilheit des Übergangs, also die Kooperativität  $m$  (Myers et al., 1995). Die hier detektierte kooperative Einheit umfasst im Minimum die sieben Tryptophansonden im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Domäne (W202 bis W391). Die Kooperativität ist  $12.8 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Die Werte stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit mit den für den Wildtyp gemessenen Daten von Miller (Miller et al., 1998a) und Schuler (Schuler & Seckler, 1998) überein.

Der für ein Protein mit 443 Aminosäuren nach Myers (Gleichung 2.12) berechnete theoretische  $m$ -Wert ist mit  $20.1 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  deutlich höher als der hier gemessene Wert (Myers et al., 1995). Dies ist nicht verwunderlich, da die verwendete empirische Gleichung auf der Korrelation von  $\Delta \text{ASA}$  und  $m$ -Werten kleiner globulärer Proteine mit maximal 415 Aminosäuren basiert, der native Zustand elongierter Proteine jedoch einen höheren Anteil an lösungsmittelzugänglichen Resten aufweist.

Wie die wildtyp-ähnlichen  $c_{1/2}$ - und  $\Delta G_{N \rightarrow U}^0$ -Werte verdeutlichen haben neun der 14 untersuchten Mutanten keinen Einfluss auf die Stabilität der isolierten BHX-Domäne. Bei den fünf Mutanten V272A, V321A, V349A, V321L und V349L ist der Übergangsmittelpunkt  $c_{1/2}$  verglichen zum Wildtyp deutlich zu kleineren Harnstoffkonzentrationen verschoben; die Proteine sind destabilisiert. Substitutionen zu

Alanin haben dabei einen größeren Effekt auf die Stabilität ( $\Delta c_{1/2}$  sind -0.9 M und -0.8 M für V321A und V349A) als eingefügte Leucine ( $\Delta c_{1/2}$  sind -0.6 M und -0.7 M für V321L und V349L). An Position 272 ist die Mutation zu Leucin wildtyp-ähnlich während ein Alanin an dieser Position die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne um etwa  $10.9 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$  destabilisiert. Mutation des Valins an Position 321 zu Alanin löst die stärkste Destabilisierung aus. Die Positionen 272, 321 und 349 befinden sich in den Windungen 4, 6 und 7 im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Region. Die "Rückenflosse" (197-259) packt gegen die Windungen 3 bis 9. Die Destabilisierung der drei Mutanten ist ebenso stark wie bei der ausgiebig charakterisierten *tsf*-Mutante G244R. Der Übergangsmittelpunkt von G244 liegt bei  $c_{1/2} = 1.76 \pm 0.06 \text{ M}$ , die freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G^0_{N \rightarrow U}$  ist  $22 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Schuler & Seckler, 1998). G244R ist in der "Rückenflosse" der  $\beta$ -Helix Domäne lokalisiert.

## A-Reihe

Protein	$\Delta G^0_{N \rightarrow U}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	SF <sup>a</sup> ±	$\Delta \Delta G^0_{N \rightarrow U}$ <sup>b</sup> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta \Delta G^0_{N \rightarrow U}$ ±	$c_{1/2}$ [M]	$\Delta c_{1/2}$ <sup>c</sup> [M]
wt	33.4	1.6	-	-	2.6	-
V125A	33.5	1.8	0.1	2.4	2.6	0
V272A	22.5	1.3	-10.9	2.1	1.8	-0.8
V321A	21.2	0.9	-12.2	1.8	1.7	-0.9
V349A	22.7	1.2	-10.7	2.0	1.8	-0.8
V450A	33.1	2.5	-0.3	3.0	2.6	0
V498A*	30.6	4.1	-2.8	4.4	2.4	-0.2
V523A*	32.4	2.9	-1.0	3.3	2.5	-0.1

## L-Reihe

Protein	$\Delta G^0_{N \rightarrow U}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	SF <sup>a</sup> ±	$\Delta \Delta G^0_{N \rightarrow U}$ <sup>b</sup> [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta \Delta G^0_{N \rightarrow U}$ ±	$c_{1/2}$ [M]	$\Delta c_{1/2}$ <sup>c</sup> [M]
wt	33.4	1.6	-	-	2.6	-
V125L	32.3	1.8	-1.1	2.4	2.5	-0.1
V272L	31.8	1.3	-1.6	2.1	2.5	-0.1
V321L	25.5	1.3	-7.9	2.1	2.0	-0.6
V349L	24.3	1.0	-9.1	1.9	1.9	-0.7
V450L*	32.4	3.4	-1.0	3.8	2.5	-0.1
V498L	33.9	1.4	0.5	2.1	2.6	0
V523L	34.0	1.3	0.6	2.1	2.7	0.1

**Tabelle 3.1: Thermodynamische Stabilitäten der BHX-Konstrukte.**

<sup>a</sup> mit SigmaPlot wurde beim Fit der Standardfehler (SF) ausgegeben.

<sup>b</sup> Unterschied in der freien Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G^0_{U \rightarrow N}$  zwischen der jeweiligen Mutante und dem Wildtyp.

<sup>c</sup> Unterschied der Übergangsmittelpunkte  $c_{1/2}$  zwischen Mutante und Wildtyp.

\* Ergebnisse stammen aus nicht-linearer Regression des Rückfaltungsübergangs der nicht-reversibel faltenden Mutante.

Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge von V498A, V523A und V450L sind nicht reversibel.

Die Entfaltungsübergänge dieser Mutanten verlaufen dreistufig mit einer Schulter bei 2.5 M bis 4 M Harnstoff. Die Rückfaltungsübergänge der Mutanten weisen dagegen ein Zweizustandsverhalten auf. Ihre Übergangsmittelpunkte belegen eine wildtyp-ähnliche Stabilität der Mutanten V498A, V523A und V450L.

Zusammenfassend betrachtet vermindern somit Mutationen im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Domäne die thermodynamische Stabilität, während Mutationen an den C- und N-terminalen Enden der Region keinen detektierbaren Einfluss haben.

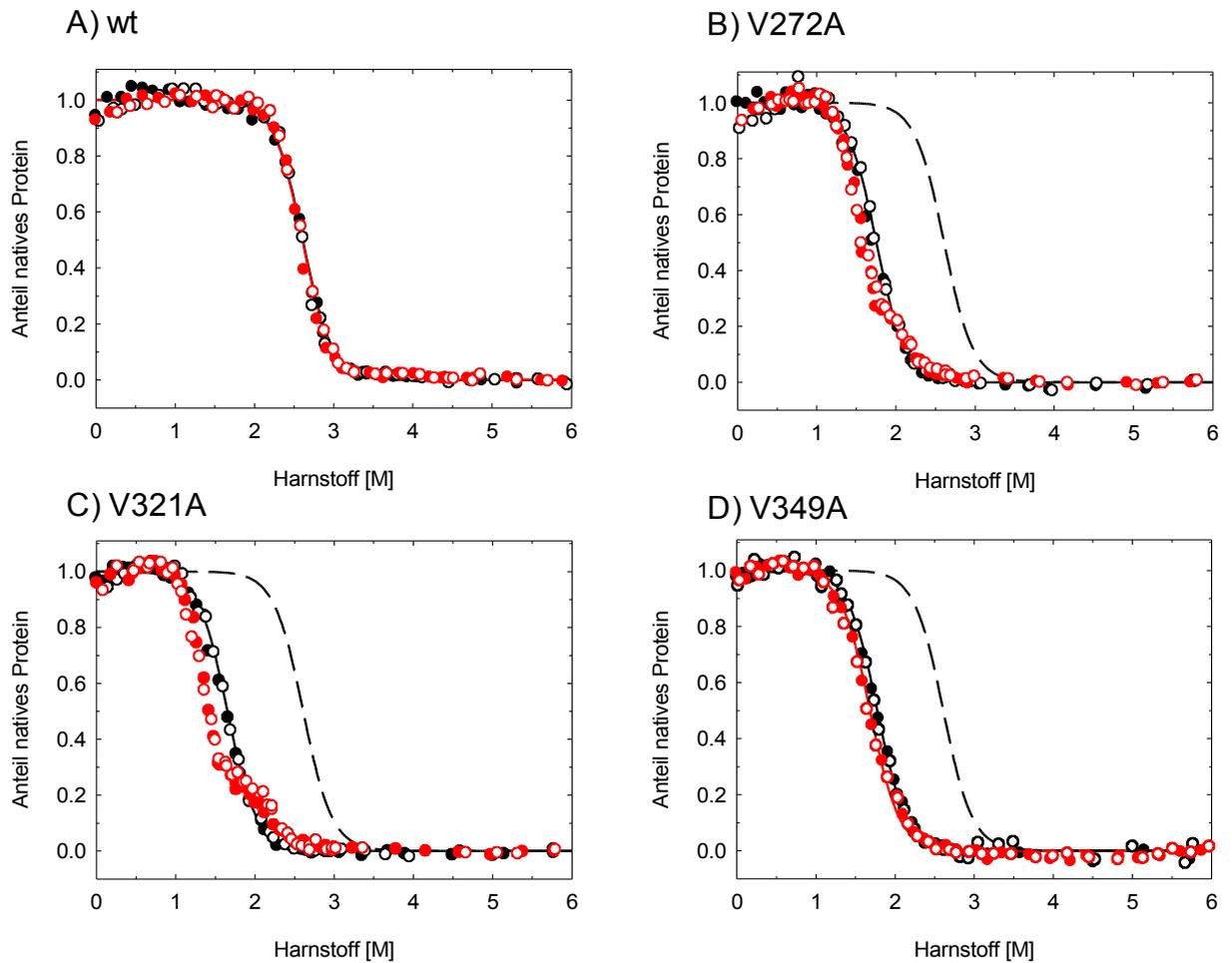
#### **3.1.5 Aggregationsverhalten der destabilisierten Mutanten V272A, V321A und V349A**

Schuler hatte festgestellt, dass bei hohen Salzkonzentrationen ein aggregationsfähiges Gleichgewichtsintermediat nach verlängerten Inkubationszeiten des Überganges gebildet wird (Schuler et al., 1999). Wird die isolierte  $\beta$ -Helix bei 0.5 M NaCl, 10  $\mu\text{g/ml}$  und 10 °C für mehrere Tage inkubiert, ist die langsame Ausbildung einer Schulter im Übergang zwischen 2 M bis 4 M Harnstoff bei Messung der Tryptophanfluoreszenz zu beobachten. Analytische Ultrazentrifugation und Größenausschlusschromatographie zeigten, dass die isolierte  $\beta$ -Helix in diesen Proben irreversibel aggregiert war. Darüber hinaus bestätigten licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, dass die isolierte BHX lang gestreckte Fibrillen und amorphe Aggregatstrukturen bilden kann, welche Kongorot binden und eine Doppelbrechung im polarisierten Licht aufweisen. Weiterhin konnte eine Korrelation zwischen der Aggregationsanfälligkeit und dem Ausmaß der durch *tsf*- und *su*-Mutationen hervorgerufenen Destabilisierung bzw. Stabilisierung festgestellt und charakterisiert werden (siehe Abschnitt 1.3.4), (Schuler et al., 1999).

Um das Aggregationsverhalten der destabilisierten Mutanten V272A, V321A und V349A zu untersuchen, wurden Übergänge des Wildtyps und der drei Mutanten bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  angesetzt und bei 10 °C für 1 h und 24 h oder 48 h inkubiert. Dann wurden Fluoreszenzspektren der Proben detektiert.

Verlängerung der Inkubationszeiten der destabilisierten Mutanten V272A, V321A und V349A auf 24 h oder 48 h bei 10 °C führt zu einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes zu kleineren Harnstoffkonzentrationen in unterschiedlicher Stärke (Abb. 3.8). Darüber hinaus ist bei den Mutanten V272A und V321A die Ausbildung einer Schulter im Bereich des Übergangsmittelpunktes im Faltungs- sowie im Entfaltungsübergang zu beobachten. Der einstufige Verlauf der Übergänge nach einstündiger Inkubation verändert sich also bei Langzeitinkubation. Dies zeigt, dass der Aggregationsprozess im Vergleich zur Faltung und Entfaltung langsam passiert. Für das Wildtypprotein sind Faltungs- und Entfaltungsübergänge, welche nach 1 h oder nach 24 h aufgenommen wurden deckungsgleich.

Diese Beobachtungen sind analog zu den Ergebnissen von Schuler für die *tsf*-Mutante G244R und den Wildtyp in Gegenwart von Salz. Er postulierte, dass die Aggregation nicht vom nativ gefalteten Zustand, sondern von einem durch Mutationen oder Salze begünstigten destabilisierten Zustand ausgeht. Die Ergebnisse der hier untersuchten Mutanten untermauern diese Hypothese.



**Abbildung 3.8: Gleichgewichtsübergänge nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 10°C.** Denaturierung (geschlossene Symbole) und Renaturierung (offene Symbole). Fluoreszenzspektren des Wildtyps (**A**) und der Mutanten V272A (**B**) und V349A (**D**) wurden nach 1 h (○ ●) und nach 24 h (○ ●) registriert; Spektren der Mutante V321A (**C**) nach 1h (○ ●) und 48 h (○ ●). Die Übergänge sind basislinienkorrigiert und auf den Anteil des nativen Proteins normiert, zudem sind nicht-lineare Regressionen für Übergänge, die nach 1 h aufgezeichnet wurden (—) und für den Wildtyp (---) als Linie dargestellt.

### 3.2. Bedeutung der Seitenkettenstapelung für die Faltung des Tailspikeproteins

Rückfaltungsausbeuten *in vitro* werden durch kinetische Konkurrenz zwischen der unimolekularen Faltung und der mindestens bimolekularen Aggregationsreaktion bestimmt. Mit steigenden Proteinkonzentrationen ist die Faltungsgeschwindigkeit konstant, die Aggregationsrate nimmt jedoch zu. Deshalb dominiert bei hohen Proteinkonzentration *in vitro* die Aggregation über die Faltung (Kiefhaber et al., 1991). In der Zelle sind die Ausbeuten der Faltungsreaktion durch Synthese- und Faltungsgeschwindigkeit der Polypeptidkette und durch die Aggregationsrate bedingt. Mit steigenden Temperaturen ist häufig eine verstärkte Bildung von *inclusion bodies* bei heterologer Expression zu beobachten (Rudolph & Lilie, 1996). Während langsam faltende Proteine bei hohen Temperaturen aggregieren, können schnell faltende Proteine ihre native Konformation erreichen, da aggregationsanfällige intermediäre Strukturen nicht hinreichend populiert werden (Kiefhaber et al., 1991).

Faltung *in vivo* und Rückfaltung *in vitro* wurden für das P22 Tailspikeprotein in beispielhaftem Detail charakterisiert (Goldenberg & King, 1982, Seckler et al., 1989, Fuchs et al., 1991). Die Polypeptidkette faltet über ein thermolabiles Intermediat (I) zum assoziationskompetenten Monomer. Nach Assemblierung der drei Untereinheiten zum sogenannten „Protrimer“, bestimmt die Trimerreifung die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion (siehe Abschnitt 1.3.2 und 1.3.3). Die Faltungsausbeuten des Proteins sind durch ein temperaturabhängiges Gleichgewicht zwischen I und einem aggregationsanfälligen Intermediat (I\*) bestimmt. I entfaltet in einem schmalen Temperaturfenster zwischen 30 °C und 35 °C kooperativ (Haase-Pettingell & King, 1988). *tsf*-Mutationen verlangsamen die apparente Faltungsrate des Monomers, da sie I destabilisieren und somit das Gleichgewicht nach I\* verschieben. Bei hohen Temperaturen *in vivo* und *in vitro* führen diese Mutationen zur Aggregatbildung des Proteins und rufen somit den temperatursensitiven Faltungsphänotyp hervor. *su*-Mutanten stabilisieren I. Sie können den *tsf*-Phänotyp unterdrücken und Fehlfaltung bei erhöhten Temperaturen vermindern (Danner & Seckler, 1993, Beissinger et al., 1995, Miller et al., 1998b). GroE Chaperone haben keinen Einfluss auf die Faltungsausbeuten des Tailspiketrimers *in vitro* (Brunschier et al., 1993).

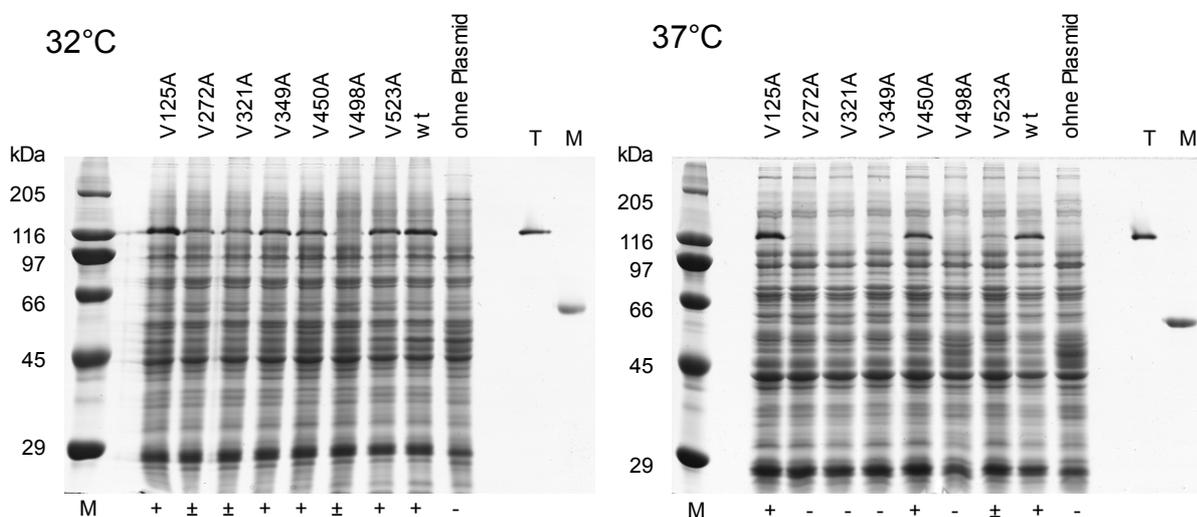
In diesem Kapitel wird der Einfluss der Seitenkettenstapelung im Hinblick auf verschiedene Aspekte der Tailspikefaltung dargestellt. *In vivo* und *in vitro* Faltungsausbeuten der Mutanten werden temperaturabhängig untersucht und verglichen. Die Reinigung von rekombinant erzeugten Tailspikevarianten erfolgte nach einem über Jahre etablierten Standardprotokoll und wird deshalb nicht im Detail erklärt. Ergebnisse sind kurz im Abschnitt 3.2.2 eingefügt und werden in Bezug auf die Temperaturabhängigkeit der Faltung *in vivo* besprochen. Weiterhin werden fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften der gereinigten TSP- und TSP $\Delta$ N-Konstrukte dargestellt. Die zeitabhängigen Verläufe der Monomerfaltung bei 10 °C und 25 °C wurden fluoreszenzspektroskopisch detektiert. Am Ende des Kapitels wird die



### 3. Ergebnisse

Tailspike-trimer löslich exprimiert. Es befindet sich kein Monomer in der Pelletfraktion. Durch fünfminütige Inkubation bei 100 °C in SDS-Ladepuffer kann das Trimer dissoziiert und entfaltet werden. Es läuft dann seiner Molekülmasse entsprechend bei circa 60 kDa. Ohne IPTG-Zugabe wird kein Tailspikeprotein gebildet, d.h. dass der Expressionsvektor keine basale Hintergrundexpression des Zielproteins zeigt.

In Abbildung 3.10 sind Gele, welche zur Analyse der *in vivo* Faltung der Mutanten der A-Reihe und des Wildtyps verwendet wurden, exemplarisch bei zwei Expressionstemperaturen abgebildet. Das Wildtyp-trimer wird löslich bis zu einer Temperatur von 37 °C exprimiert. Bei höheren Temperaturen (39 °C und 42 °C) ist die Trimerreifung unterbunden. Monomeres Tailspikeprotein, welches bei 60 kDa entsprechend der bei 100 °C dissoziierten Kontrolle nachweisbar sein sollte, ist bei keinem der Experimente sichtbar. Offensichtlich wird fehlgefaltetes Protein von zellulären Proteasen abgebaut.



**Abbildung 3.10: Repräsentative SDS-Gele zur Analyse der *in vivo* Faltungsausbeuten von Mutanten der A-Reihe.** Die Proteine wurden bei 32 °C und 37 °C überexprimiert. Gleiche Zellmengen wurden geerntet, mittels *French-press* aufgeschlossen und komplette Zellextrakte wurden auf die Gele geladen. Als Negativkontrolle wurden bei den jeweiligen Temperaturen JM83-Zellen, die kein Plasmid enthielten, mitgeführt. T: 600 ng/Spur des gereinigten TSPΔN-Wildtyps; M: 600 ng/Spur des gereinigten Wildtyps nach Inkubation für 5 Minuten bei 100 °C. Gele sind mit Coomassie gefärbt.

Tabelle 3.2 fasst die temperaturabhängigen Faltungsausbeuten aller Stapelungsmutanten qualitativ zusammen. Punktmutationen an unterschiedlichen Positionen des hydrophoben Seitenkettenstapels von TSPΔN vermindern oder erhöhen die Faltungsausbeuten in der Zelle bei den untersuchten Expressionstemperaturen in unterschiedlicher Stärke. Generell vermindern die meisten Alanin-Mutationen die Faltungsausbeuten des Tailspikes, während Leucin-Mutanten eher eine dem Wildtyp vergleichbare Temperaturabhängigkeit der Faltung aufweisen. *In vivo* Faltungsausbeuten der Mutanten V125A, V125L, V272L sowie V498L sind erhöht und die Konstrukte bilden auch bei 39 °C SDS-resistentes Trimer. Bei 37 °C wird die Trimerbildung der Mutanten V272A, V321A, V349A und V498A unterbunden. Darüber hinaus ist für V272A und V321A bei 32 °C eine deutlich verminderte Intensität der Trimerbande zu beobachten. Ein Alanin an Position V498 führt bei Temperaturen von

27 °C und 32 °C zu stark verminderten Faltungsausbeuten, wohingegen die Leucin-Mutante noch bei 39 °C zum Trimer reifen kann. Die Mutanten V321L und V450L verhalten sich wildtyp-ähnlich in Bezug auf ihre maximale Expressionstemperatur, ihre Ausbeuten sind jedoch auch bei niedrigen Temperaturen gering.

#### A-Reihe

T [°C]	V125A	V272A	V321A	V349A	V450A	V498A	V523A	wt
27	+	+	+	+	+	±	+	+
32	+	±	±	+	+	±	+	+
37	+	-	-	-	+	-	±	+
39	+	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ausbeute [mg]</b>	58	13	24	22	8	9	30	42

#### L-Reihe

T [°C]	V125L	V272L	V321L	V349L	V450L	V498L	V523L	wt
27	+	+	+	+	±	+	+	+
32	+	+	±	+	±	+	+	+
37	+	+	±	+	±	+	+	+
39	±	+	-	-	-	±	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Ausbeute [mg]</b>	31	36	47	46	32	5	37	42

**Tabelle 3.2: Temperaturabhängigkeit der *in vivo* Faltungsausbeuten der TSP $\Delta$ N-Konstrukte.** Gezeigt wird die Anwesenheit der Trimerbande bzw. ihre Ausprägung. In der letzten Zeile sind jeweils die Reinigungsausbeuten aus einem Liter Expressionskultur angegeben.

### 3.2.2 Reinigung von TSP und TSP $\Delta$ N-Mutanten

Für die Reinigung wurden Tailspikeproteine in *E. coli* JM83 oder BL21 (DE3) bei einer Temperatur von 30 °C exprimiert. Wie in Tabelle 3.2 zu sehen ist, werden bei dieser Temperatur alle Mutanten löslich gebildet und können mit dem von Stefan Miller etablierten Standardverfahren gereinigt werden (Miller et al., 1998b). Zellen wurden dazu mittels French-Press aufgeschlossen und Zellextrakte durch Zentrifugation fraktioniert. Tailspikeproteine können aus der löslichen Fraktion des Extraktes mit 35 % Ammoniumsulfat gefällt und in einem dreistufigen Verfahren mittels Ionenaustauschchromatographie (DE52 Anionenaustauscher), hydrophober Interaktionschromatographie (Phenylsepharose FF) und abschließender Gelfiltration (HiLoad Superdex200 PG) gereinigt werden. Nach der Gelfiltration liegt der Reinheitsgrad der Mutanten bei mindestens 95 %, wie durch SDS-PAGE und Silberfärbung bestätigt wurde. In Tabelle 3.2 sind die Ausbeuten eines einmalig durchgeführten Reinigungsdurchlaufes aufgeführt. Die Proteinmengen, welche aus einem Liter Expressionskultur erhalten wurden, waren für die Mutanten deutlich verschieden. Hier setzten sich die bei den Experimenten zur *in vivo* Faltungsausbeute beobachteten Trends fort. Verglichen mit dem Wildtyp lieferten Reinigungen der Mutanten V450A, V498A und V498L sehr geringe Mengen an Protein. Da dieses Ergebnis für V498L rückbli-

### 3. Ergebnisse

---

ckend auf seine Fähigkeit Trimer auch bei 39 °C zu bilden unerwartet war, wurde eine erneute Testexpression der Mutanten V498A und V498L durchgeführt. Aus jeweils 4 ml der Vorkulturen des Expressionsansatzes wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung erneut überprüft und bestätigt. Ergebnisse der Testexpression stimmten mit den bereits für die beiden Mutanten beobachteten Resultaten überein.

Wie in der Einleitung beschrieben hatte Simkovsky alle ins Innere des hydrophoben Lumens weisenden Seitenketten gegen Alanine substituiert und die *in vivo* Faltungseffizienzen der Mutanten im Rahmen des kompletten Tailspikeproteins (1-666) bestimmt (siehe 1.3.5) (Simkovsky, 2007). Simkovsky identifizierte ein sogenanntes minimales Faltungsrückgrat, welches für die produktive Faltung des Tailspiketrimers auch bei niedrigen Temperaturen essentiell ist. Die in dieser Arbeit charakterisierten Aminosäurepositionen sind nicht Bestandteil des minimalen Faltungsrückgrats, im Gegensatz zu den im gleichen hydrophoben Stapel enthaltenen Resten L144 (Windung 2), I167 (Windung 3), F381 (Windung 9) und F472 (Windung 12). Die von Simkovsky bestimmten *in vivo* Faltungsausbeuten der Seitenkettenstapelmutanten des kompletten Tailspikeproteins (Tabelle 3.3) werden im folgenden mit den hier für TSP $\Delta$ N erhobenen Daten verglichen (Simkovsky, 2007).

T [°C]	V125A	V272A	V321A	V349A	V450A	V498A	V523A	wt
18	99.8 ± 5.3	100.7 ± 3.2	98.3 ± 2.5	101.5 ± 2.0	98.9 ± 3.3	90.7 ± 3.5	99.6 ± 0.8	100.0 ± 1.8
30	104.6 ± 2.6	14.3 ± 3.8	12.1 ± 7.9	77.6 ± 12.4	102.2 ± 2.2	19.1 ± 9.3	98.4 ± 10.7	100.0 ± 5.7
37	110.9 ± 5.4	2.8 ± 2.5	1.4 ± 1.6	13.4 ± 4.5	70.8 ± 13.3	0.5 ± 0.7	21.5 ± 15.2	100.0 ± 9.9

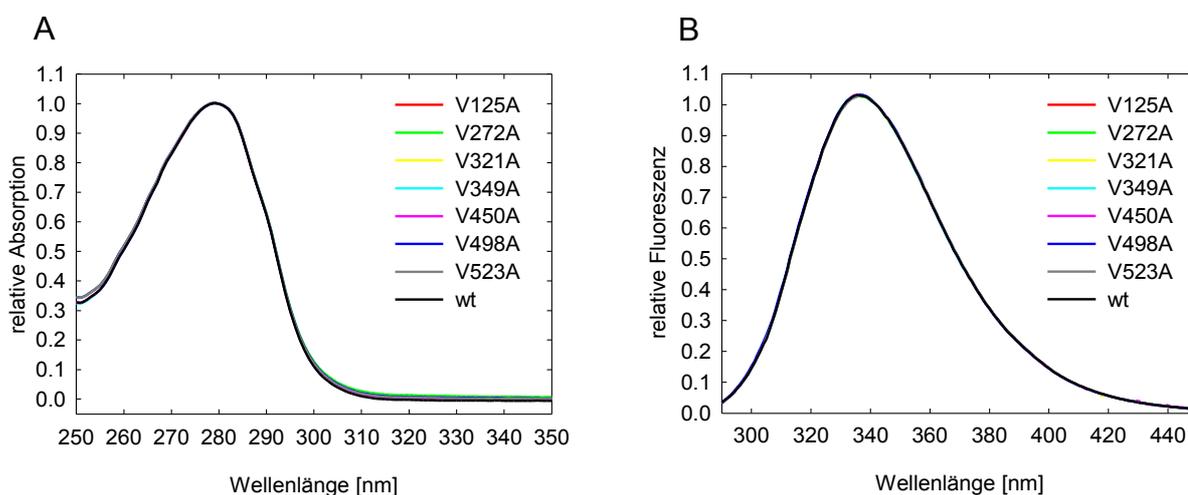
**Tabelle 3.3: Prozent der *in vivo* Faltungseffizienz des TSP-Wildtyps (1-666).** *In vivo* Faltungsausbeuten der Alanin-Reihe im kompletten Tailspikeprotein. Die Ergebnisse sind zum Vergleich der Doktorarbeit von Ryan Simkovsky entnommen (Simkovsky, 2007).

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse verdeutlicht, dass die Effekte der Mutationen auf die *in vivo* Faltungsausbeuten des kompletten Tailspikeproteins und der N-terminal verkürzten Variante direkt vergleichbar sind. Zum Beispiel liegen bei 30 °C die Faltungseffizienzen der TSP-Konstrukte V321A, V349A und V498A zwischen 10 % und 20 % und auch die äquivalenten TSP $\Delta$ N-Konstrukte zeigen bei 32 °C eine verminderte Intensität der Trimerbande (siehe Abb. 3.10). Darüber hinaus falten die Mutanten V125A, V450A und V523A bei 37 °C in beiden Konstrukten produktiv, während für V272A, V321A, V349A und V498A kein oder nur sehr wenig (V349A) Trimer gebildet wird. Es ist hervorzuheben, dass die Faltungseffizienz der Mutante V498A bei 18 °C im kompletten Tailspikeprotein 91 % der Ausbeute des Wildtyps beträgt. Dies zeigt, dass bei einer geringen Temperatur V498A produktiv Trimer bilden kann.

### 3.2.3 Absorptions- und fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften der Mutanten

Die strukturelle Integrität der gereinigten TSP- und TSP $\Delta$ N-Punktmutanten wurde mittels Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie routinemäßig geprüft. Vor Gebrauch wurden dazu alle Proteinlösungen 30 Minuten bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die relative Extinktion der aromatischen Aminosäuren der TSP $\Delta$ N Alanin-Mutanten im Wellenlängenbereich zwischen 250 nm bis 350 nm ist in Abbildung 3.11 A dargestellt. Durch die eingefügten Mutationen wurde die Anzahl und das Verhältnis der chromophoren Gruppen der Proteine nicht verändert (Tabelle 2.4). Das Maximum der Spektren liegt bei 278 nm. Es dominiert die Absorption der 7 Tryptophane. Die untersuchten Proteinlösungen waren homogen und frei von Aggregaten. Eine durch Lichtstreuung hervorgerufene Schulter im Absorptionsspektrum oberhalb von 300 nm ist nicht sichtbar.

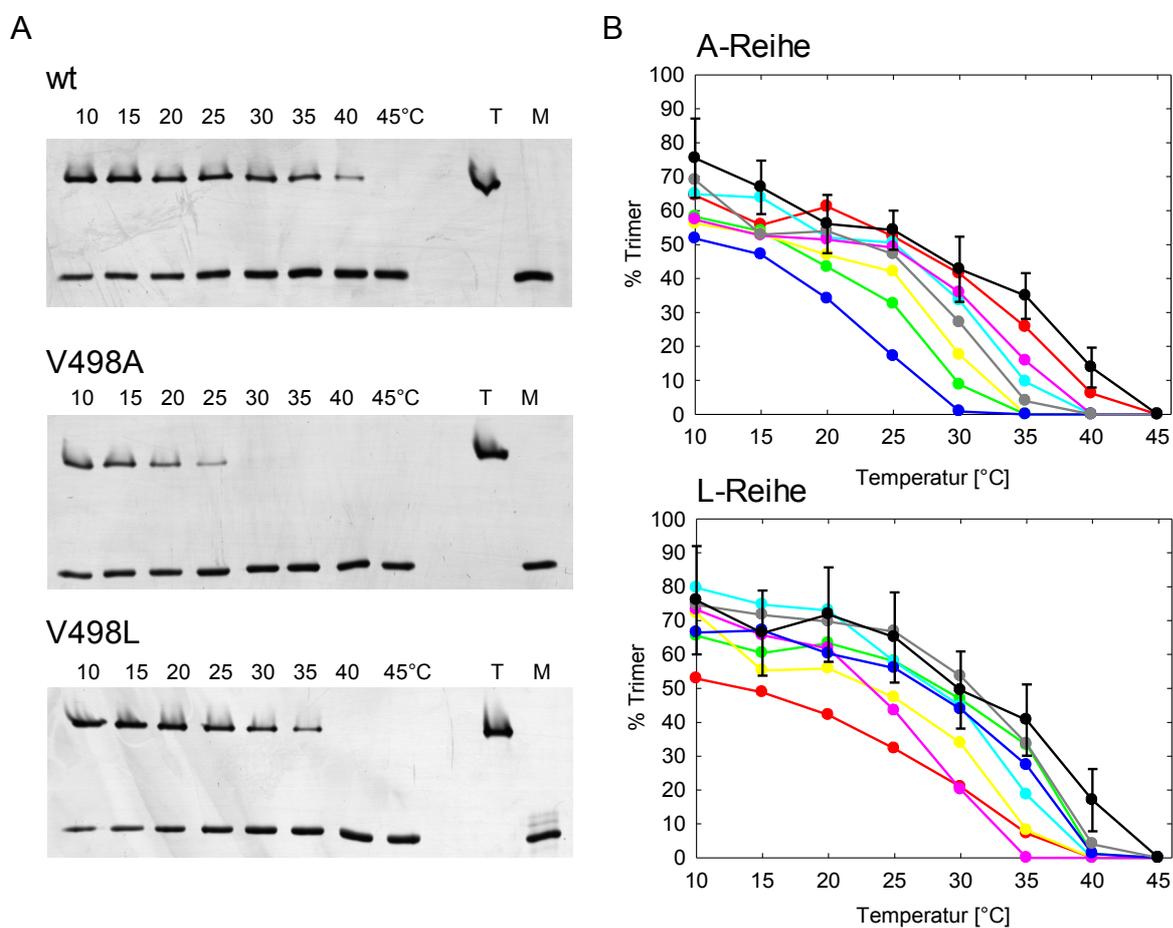
Fluoreszenzspektren der N-terminal verkürzten Tailspikes in nativ gefalteter Konformation finden sich in Abbildung 3.11 B. Die Spektren der Varianten TSP, TSP $\Delta$ N und BHX sind im nativen und entfaltenen Zustand sehr ähnlich. Sie sind, wie in Abbildung 3.2 verdeutlicht, durch 7 (bzw. 6 im BHX-Konstrukt) Tryptophane bestimmt, welche im entfaltenen Zustand der Polypeptidkette stark durch das Lösungsmittel gequench werden. Die Form der Spektren ist durch die Emission der Tryptophane hervorgerufen, welche im gefalteten Zustand nur teilweise lösungsmittlexponiert sind. Eine Schulter im Maximum der Tyrosinfluoreszenz bei 304 nm kann nur im entfaltenen Zustand des Polypeptids beobachtet werden (s. Abb. 3.13 A). In nativer Konformation wird die Energie der 21 Tyrosine auf die Tryptophane transferiert. Die einheitliche Form der Spektren verdeutlicht die wildtyp-ähnliche, native Tertiärstruktur der Punktmutanten. Identische bzw. ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren wurden auch für Mutanten der Leucin-Reihe und für die Vollängen-Konstrukte aufgenommen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.11: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der TSP $\Delta$ N-Konstrukte. A)** Die Absorptionsspektren der Alanin-Mutanten wurden bei Raumtemperatur in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 und einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm aufgezeichnet. Spektren wurden auf die Absorption im Maximum bei 278 nm normiert. **B)** Normierte Fluoreszenzemissionsspektren von nativen Proteinlösungen in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei 10 °C. Die Proteinkonzentration war 10  $\mu$ g/ml und die Anregungswellenlänge der Fluoreszenz 280 nm.

### 3.2.4 Temperaturabhängigkeit der Faltung *in vitro*

*In vitro* wurden die Ausbeuten der Rückfaltung der Stapelungsmutanten mit gereinigtem Tailspikeprotein bei Temperaturen von 10 °C bis 45 °C untersucht. Die Proteine wurden dazu für mindestens 30 Minuten in 5 M sauren Harnstoff bei 25 °C entfaltet und ihre Rückfaltung wurde durch Verdünnen (1:100) in temperierten Phosphatpuffer in Gegenwart von EDTA und DTE initiiert. Die Proteinkonzentrationen in den Ansätzen betrug 10 µg/ml und die Restkonzentration an Harnstoff war 50 mM. Die Mutanten einer Reihe und der Wildtyp wurden jeweils parallel in einem Experiment untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden die Proben mit SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Monomer- und Trimeranteile wurden densitometrisch bestimmt. Die Halbwertszeit der geschwindigkeitsbestimmenden Trimerreifung ist temperaturabhängig und liegt bei 10 °C in einer Größenordnung von etwa 10 Stunden, während sie bei 25 °C nur circa 30 Minuten beträgt (Danner & Seckler, 1993).



**Abbildung 3.12: Temperaturabhängigkeit der *in vitro* Faltungsausbeuten der TSP $\Delta$ N-Konstrukte. A)**

Silber-gefärbte SDS-Gele der Rückfaltung der Mutanten V498A und V498L und des Wildtyps. Pro Tasche wurden 60 ng TSP $\Delta$ N geladen. T: Nativkontrolle, die nicht in Harnstoff entfaltet, sondern direkt in den Rückfaltungspuffer verdünnt wurde und für 72 h bei 40 °C inkubierte = 100 % Trimer. M: Nativkontrolle, die durch Hitzedenaturierung entfaltet wurde = 100 % Monomer. **B)** Prozentualer Anteil des Trimers nach Rückfaltung im Temperaturbereich von 10 °C bis 45 °C. Für jede Reihe wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt. Hier sind die Mittelwerte von • wt, • V125, • V272, • V321, • V349, • V450, • V498 und • V523 abgebildet. Standardabweichungen sind zur Übersichtlichkeit nur für den Wildtyp angegeben, allerdings sind Mittelwerte und Standardabweichungen aller Messungen in der Tabelle A2 im Anhang zusammengestellt.

Abbildung 3.12 A zeigt 10 %ige SDS-Gele von Rückfaltungsexperimenten des Wildtyps und der Mutanten V498A und V498L. Mit steigender Temperatur sind die Ausbeuten an korrekt gefalteten Trimer vermindert. Bei 45 °C ist in keiner Probe natives Tailspikeprotein mittels Silberfärbung mehr nachzuweisen, und der Großteil des eingesetzten Proteins bildet die Monomerbande. Dies zeigt, dass die Entfaltungsreaktion in saurem Harnstoff vollständig passierte, und dass die Trimerreifung bei 45 °C unterbunden ist, bzw. dass das Protein nicht-native Oligomere oder Aggregate bildet oder weiterhin in monomerer Form vorliegt. Bei einer Versuchstemperatur von 10 °C falten alle Mutanten und der Wildtyp zurück in die trimere SDS-resistente Form (Abb. 3.12 B). Die Ausbeuten der *in vitro* Rückfaltung bei 10 °C liegen zwischen ~75 % für den Wildtyp und ~50 % für V498A und V125L. Bei 40 °C bilden nur V125A und der Wildtyp signifikante Mengen an reifen Trimer.

Auch *in vitro* reifen Mutanten der L-Reihe effektiver als Mutanten der A-Reihe. Bei 30 °C sind die Ausbeuten der Leucin-Mutanten relativ zum Wildtyp deutlich höher als die der Alanin-Mutanten. Die Mutanten V125L und V498A falten am wenigsten effektiv. Ihre Ausbeuten sind über den gesamten Temperaturbereich vermindert und schon bei 30 °C wird die Reifung von V498A unterbunden. Für V498A wurden geringe Faltungsausbeuten auch *in vivo* beobachtet (s. Tabelle 3.2). V125L hingegen faltet *in vivo* mit wildtyp-ähnlicher Effizienz und bildet, wenn auch mit sehr niedriger Ausbeute, selbst bei einer Expressionstemperatur von 39 °C SDS-resistente Trimere. Bei 30 °C falten V125A, V349A, V450A, V272L, V349L, V498L und V523L wildtyp-ähnlich. Die Ausbeuten von V272A, V321A, V498A, V523A, V125L, V321L und V450L sind signifikant niedriger.

Nach Abbildung 3.12 B können die Faltungseffizienzen der Mutanten in folgende Reihenfolgen gebracht werden: wt > V125A > V450A > V349A > V523A > V321A > V272A > V498A und wt > V498L > V272L > V523L > V349L > V321L > V125L > V450L. Für die Alanin-Reihe sind die Temperaturabhängigkeiten der *in vivo* und *in vitro* Faltungsausbeuten direkt vergleichbar. Auch für die Leucin-Reihe stimmen die Ergebnisse, abgesehen von dem hohen Expressionslevel der Mutante V125L, tendenziell überein.

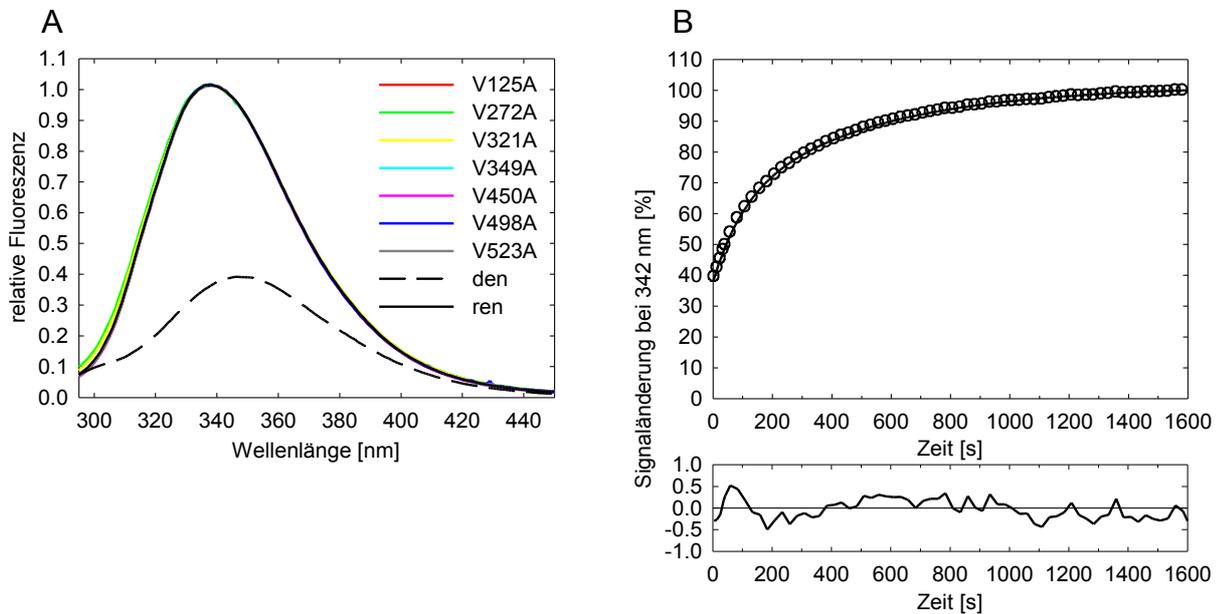
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es das Tailspikesystem ermöglicht, Proteinfaltung *in vivo* und *in vitro* vergleichend zu untersuchen. Obwohl die Bedingungen im Hinblick auf Effekte wie *molecular crowding* oder kotranslationelle Faltung kaum unterschiedlicher sein könnten, sind der Faltungsweg (Goldenberg & King, 1982, Fuchs et al., 1991) und die Auswirkungen einzelner Punktmutationen einheitlich.

### 3.2.5 Faltungskinetiken auf Monomerebene

Der zeitliche Verlauf der Rückfaltungsreaktion der TSP $\Delta$ N-Konstrukte wurde fluoreszenzspektroskopisch bei 10 °C und 25 °C untersucht. Bei Rückfaltung des Proteins werden die Aromaten in hydrophober Umgebung abgeschirmt, sodass die Quantenausbeute etwa um ein dreifaches zunimmt und das Intensitätsmaximum von 353 nm zu kleineren Wellenlängen verschoben wird (Abb. 3.13 A). Tryptophan W640 befindet sich in der "Schwanzflosse" des Tailspikeproteins, alle anderen hingegen in der  $\beta$ -Helix Domäne. Da keines der Tryptophane an den Kontaktflächen zwischen den Untereinheiten

### 3. Ergebnisse

lokalisiert ist, konnte die Trimerassoziation mittels Fluoreszenz nicht verfolgt werden. Die Signalverläufe und Raten der Faltung von BHX und TSP $\Delta$ N sind sehr ähnlich, es wird die Monomere Faltung detektiert (vgl. Abschnitt 3.1.3), (Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993, Miller et al., 1998a, Miller et al., 1998b).



**Abbildung 3.13: Struktur und Rückfaltung von TSP $\Delta$ N-Wildtyp und den Mutanten der A-Reihe bei 25 °C. A)** Fluoreszenzemissionsspektren des in 5 M Harnstoff, 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH >3.0 entfalteten TSP $\Delta$ N wt (den) nach Anregung bei 280 nm. Und Spektren von TSP $\Delta$ N wt (ren) und den Mutanten der Alanin-Reihe im Gleichgewicht nach Rückfaltung in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE, pH 7.0. **B)** Renaturierungskinetik von TSP $\Delta$ N wt. Die Fluoreszenz wurde bei 280 nm angeregt und die Emission bei 342 nm detektiert. Der Verlauf der Kinetik kann durch eine einphasige Exponentialfunktion nach Gleichung 2.13 beschrieben werden (–). Die Residuen der Anpassung sind im unterstehenden Graphen dargestellt. Proteinkonzentrationen waren 10  $\mu$ g/ml.

Zur Untersuchung der Kinetik der Rückfaltung wurden die TSP $\Delta$ N-Mutanten und der Wildtyp in 5 M Harnstoff, pH 2.9-3.0 entfaltet. Anschließend wurde die Faltungsreaktion manuell durch Verdünnen in temperierten Rückfaltungspuffer initiiert. Die Proteinkonzentration im Ansatz betrug 10  $\mu$ g/ml und die Restkonzentration an Harnstoff etwa 50 mM. Die Reaktion wurde nach Anregung bei 280 nm bei 342 nm detektiert.

Innerhalb der experimentellen Totzeit (3 bis 8 Sekunden) war für das Wildtypprotein ein Sprung in der Signalamplitude zu verzeichnen, welcher bei 10 °C etwa 40 % und bei 25 °C etwa 55 % der gesamten Signaländerung ausmacht. Solche Intensitätssprünge sind häufig ein Indiz für die Bildung von „on-pathway“ Intermediaten oder wurden, wenn sie sehr schnell waren, als Kollaps der Polypeptidkette bei Veränderung des Puffers diskutiert (siehe auch Abschnitt 3.1.3), (Bachmann & Kiefhaber, 2005, Schuler, 1998).

Die zeitlichen Signalverläufe bei 10 °C und 25 °C können monoexponentiell beschrieben werden (Abbildung 3.13 B). Bei 10 °C ist die apparente Geschwindigkeitskonstante der Faltung des Wildtyps

$3.1 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , die Halbwertszeit beträgt 3.7 Minuten und die Amplitude ist 60 %. Dieser Wert stimmt mit der von Stefan Miller bestimmten Rate der TSP $\Delta$ N Rückfaltung unter identischen Bedingungen überein (Miller et al., 1998b). Bei 25 °C ist die apparente Geschwindigkeitskonstante der Faltung des Wildtypproteins nach monoexponentieller Anpassung des Reaktionsverlaufes  $16.6 \cdot 10^{-3} \pm 1.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , ihre Halbwertszeit beträgt 0.7 Minuten und die Amplitude 45 %. Die Temperaturerhöhung um 15 °C beschleunigt die Entfaltungsrate des Wildtyps um den Faktor 5.4.

Tabelle 3.4 fasst die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung der Stapelungsmutanten bei 10 °C und 25 °C zusammen. Generell ist zu erkennen, dass die Mutationen sowohl eine Beschleunigung als auch eine Verlangsamung der Monomerfaltung des Tailspikeproteins hervorrufen können. V125A, V349A, V450A V523A und V272L falten bei 10 °C und 25 °C mit wildtyp-ähnlichen Raten und Signalamplituden.

## A-Reihe 10 °C

## 25 °C

Protein	10 <sup>3</sup> *k	SD	b <sup>a</sup>	k n. <sup>b</sup>	SD k n. <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub>	Protein	10 <sup>3</sup> *k	SD	b <sup>a</sup>	k n. <sup>b</sup>	SD k n. <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub>
	[s <sup>-1</sup> ]	10 <sup>3</sup> *k	[%]	[s <sup>-1</sup> ]	±	[min]		[s <sup>-1</sup> ]	10 <sup>3</sup> *k	[%]	[s <sup>-1</sup> ]	±	[min]
wt	3.1	0.1	60	1.00	0.05	3.7	wt	16.6	1.3	45	1.00	0.08	0.7
V125A	3.0	0.1	59	0.96	0.02	3.8	V125A	16.1	0.4	47	0.97	0.03	0.7
V272A	2.3	0.2	55	0.73	0.06	5.0	V272A	5.1	0.2	28	0.31	0.01	2.3
V321A	2.5	0.2	59	0.80	0.07	4.6	V321A	6.6	0.3	36	0.40	0.02	1.7
V349A	3.3	0.0	61	1.06	0.01	3.5	V349A	16.9	0.4	44	1.02	0.02	0.7
V450A	3.9	0.1	55	1.24	0.03	3.0	V450A	18.6	1.4	43	1.12	0.08	0.6
V498A	4.5	0.1	56	1.44	0.05	2.6	V498A	22.6	0.6	41	1.36	0.04	0.5
V523A	3.4	0.1	61	1.08	0.04	3.4	V523A	18.5	0.4	43	1.11	0.03	0.6

## L-Reihe 10 °C

## 25 °C

Protein	10 <sup>3</sup> *k	SD	b <sup>a</sup>	k n. <sup>b</sup>	SD k n. <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub>	Protein	10 <sup>3</sup> *k	SD	b <sup>a</sup>	k n. <sup>b</sup>	SD k n. <sup>b</sup>	t <sub>1/2</sub>
	[s <sup>-1</sup> ]	10 <sup>3</sup> *k	[%]	[s <sup>-1</sup> ]	±	[min]		[s <sup>-1</sup> ]	10 <sup>3</sup> *k	[%]	[s <sup>-1</sup> ]	±	[min]
wt	3.1	0.1	60	1.00	0.05	3.7	wt	16.6	1.3	45	1.00	0.08	0.7
V125L	2.0	0.2	54	0.64	0.05	5.7	V125L	10.5	1.1	37	0.63	0.07	1.1
V272L	3.2	0.3	56	1.03	0.09	3.6	V272L	16.0	0.2	45	0.96	0.01	0.7
V321L	3.7	0.2	74	1.17	0.05	3.1	V321L	16.8	0.4	43	1.01	0.02	0.7
V349L	4.6	0.3	53	1.48	0.10	2.5	V349L	19.0	0.4	38	1.14	0.02	0.6
V450L	3.5	0.1	54	1.13	0.03	3.3	V450L	21.1	0.1	47	1.27	0.01	0.5
V498L	4.0	0.6	63	1.28	0.20	2.9	V498L	20.5	0.3	48	1.23	0.02	0.6
V523L	3.8	0.2	59	1.20	0.07	3.1	V523L	24.1	0.9	48	1.45	0.05	0.5

**Tabelle 3.4 Rückfaltungsraten der TSP $\Delta$ N-Konstrukte bei 10 °C und 25 °C.**

<sup>a</sup> Amplitude der detektierten Signaländerung relativ zum Signal der Denaturiertkontrolle, siehe 2.4.4.

<sup>b</sup> Auf die Rate des Wildtypproteins normiert.

Eine gegenüber dem Wildtyp verminderte Faltungsrates ist bei den Mutanten V272A, V321A und V125L zu beobachten. Schon bei 10 °C falten alle drei Mutanten langsamer als das Wildtypprotein. Dabei zeigt V125L mit einer Halbwertszeit von 5.7 Minuten den stärksten Effekt. Ihre Faltung ist

1.6fach langsamer als die des Wildtyps. Die Raten von V272A und V321A sind jeweils circa 1.4fach und 1.3fach verlangsamt. Bei Temperaturerhöhung auf 25 °C bleibt der Unterschied zwischen Wildtyp und V125L konstant. Die Temperaturerhöhung beschleunigt die Rate von V125L etwa 5.2fach. Die Raten der Mutanten V272A und V321A nehmen jedoch relativ zum Wildtyp weiter ab. Mit Halbwertszeiten von 2.3 Minuten und 1.7 Minuten falten beide Mutanten je 3.2fach und 2.5fach langsamer als das Wildtypprotein, welches bei 25 °C eine Halbwertszeit von 0.7 Minuten aufweist. Die Amplituden der Signaländerungen der Mutanten bei 25 °C fallen mit 28 % (V272A), 36 % (V321A) und 37 % (V125L) deutlich geringer aus als die Signalamplitude des Wildtyps (45 %).

Eine verminderte Rückfaltungsgeschwindigkeit und die deutliche Abnahme der Signalamplitude bei Temperaturerhöhung wurden auch für die „klassischen“ und umfangreich analysierten *tsf*-Mutanten D238S und G244R beobachtet. D238S faltet bei 10 °C 1.4fach und bei 25 °C 2.1fach schneller als das Wildtypprotein. Bei G244R sind die Faktoren relativ zum Wildtyp jeweils 1.2 bei 10 °C und 1.7 bei 25 °C (Miller et al., 1998b). Die Ausprägung der für die Stapelungsmutanten V272A und V321A beobachteten Effekte ist stärker als bei D238S und G244R. Die Kinetiken der Monomerfaltung von V272A und V321A sind *tsf*-ähnlich. Das Faltungsintermediat I ist aufgrund der Substitution der Valine 272 und 321 gegen Alanine stärker destabilisiert als durch die Mutationen D238S und G244R. I\* wird bei hoher Temperatur populiert und aggregiert, weshalb die Signalamplituden vermindert sind.

Die Auswirkungen der Mutationen V321L und V349L auf die Faltungskinetiken sind weniger offensichtlich. Bei 10 °C falten die Mutanten schneller als das Wildtypprotein und sind bei 25 °C eher wildtyp-ähnlich. Es fällt auf, dass V349L sowohl bei 10 °C als auch bei 25 °C deutlich niedrigere Signalamplituden als der Wildtyp aufweist. Bei V321L ist die Signalamplitude bei 10 °C mit 74 % um 14 % höher als die der Wildtypfaltung, wohingegen sie bei 25 °C in der Größenordnung des Wildtyps liegt. Man könnte bei V321L und V349L ein „verstecktes *tsf*-Verhalten“ erahnen.

Betrachtet man den Faktor der Beschleunigung der Entfaltungsrates, der durch eine Temperaturerhöhung um 15 °C für das jeweilige Protein hervorgerufen wird, ist dieser, wie bereits erwähnt, für den Wildtyp 5.4 und liegt für wildtyp-ähnliche Mutanten zwischen 5 und 5.4. Bei den *tsf*-ähnlichen Mutanten V272A und V321A ist der Faktor mit 2.2 bzw. 2.6 viel kleiner. Bei V321L und V349L beträgt der Beschleunigungsfaktor jeweils 4.5 und 4.1, er ist also leicht verringert, was auf eine Destabilisierung des Faltungsintermediates I hindeutet. Eine ausführliche Analyse der Temperaturabhängigkeiten der Faltungsrates der Mutanten V272A, V321A, V321L und V349L könnte eine Charakterisierung des Intermediates I ermöglichen.

Eine deutliche Beschleunigung der Faltungsrates gegenüber dem Wildtyp ist bei beiden Temperaturen jeweils für die Mutanten V498A, V498L und V523L sichtbar. V498A faltet etwa 1.4fach und V498L circa 1.2fach schneller als das Wildtypprotein. Der Faktor der Beschleunigung der Faltungsrate bei Temperaturerhöhung bleibt mit 5.0 und 5.1 für beide Mutanten wildtyp-ähnlich. Die Faltungsgeschwindigkeiten von V450A und V523L nehmen bei Temperaturanstieg zu. V450A faltet bei 10 °C mit wildtyp-ähnlicher Geschwindigkeit und bei 25 °C circa 1.3fach schneller. Die Faltung von V523L ist um 1.2fach bei 10 °C bzw. 1.4fach bei 25 °C beschleunigt. Die Beschleunigungsfaktoren sind jeweils 6.0 und 6.3. Die

Mutationen könnten I stabilisieren und eine produktivere Faltung ermöglichen. Bei 25 °C sind die Signalamplituden von V450L, V498L und V523L etwas höher als die Amplitude des Wildtyps.

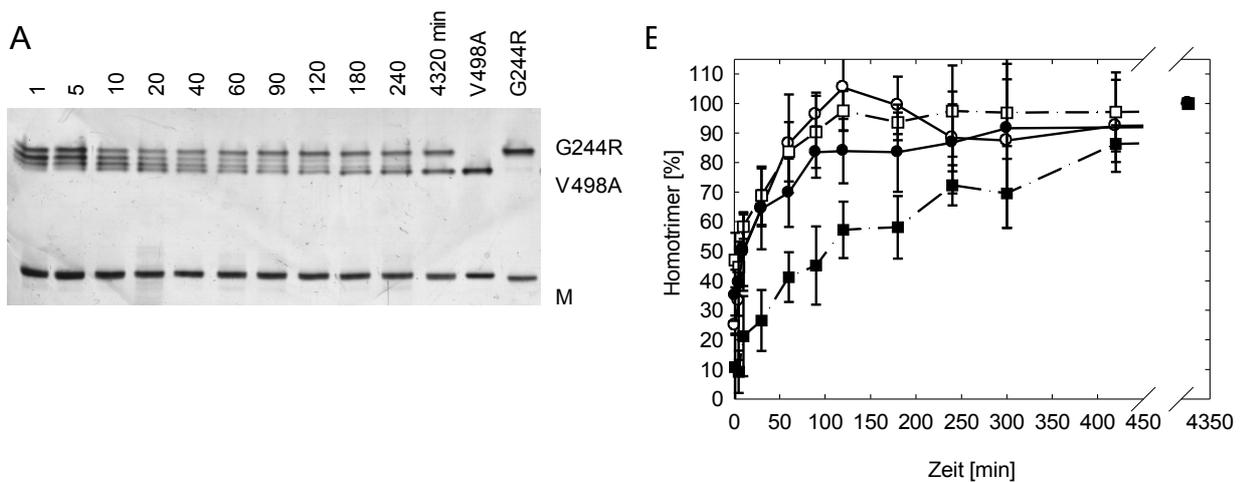
Abbildung 3.13 A stellt normierte Emissionsspektren der Mutanten der Alanin-Reihe dar, welche jeweils am Endpunkt der Faltungskinetiken aufgenommen wurden. Entsprechende Emissionsspektren der Mutanten der Leucin-Reihe sind deckungsgleich und ebenso ein analog normiertes Spektrum des nativen Tailspike-trimers. Die Maxima und Formen der Spektren stimmen überein, d.h., dass alle zurück gefalteten Proteine eine sehr ähnliche Tertiärstruktur haben bzw. in nativer Konformation vorliegen.

### **3.2.6 Assoziation der Monomere – Hybridisierungsexperimente von TSP $\Delta$ N wt und V498A mit der Ladungsmutante G244R**

Im Vergleich zum Wildtyp weist die *tsf*-Mutante G244R aufgrund ihrer zusätzlichen positiven Ladung ein verzögertes Migrationsverhalten bei SDS-PAGE auf. Werden Rückfaltungsansätze von G244R beispielsweise mit dem Wildtypprotein gemischt, bilden sich G244R/Wildtyp-Hybride, deren Laufgeschwindigkeit durch die jeweiligen Anteile der beiden Konstrukte (1:2 oder 2:1) im Trimer bedingt ist. Bei Mischung von Reaktionsansätzen nach verschiedenen Inkubationszeiten, kann hierdurch eine Kinetik der Untereinheitenassoziation verfolgt werden, da Trimere nicht dissoziieren (Danner & Seckler, 1993).

Die Assoziationskinetik der Untereinheiten wurde für die Mutante V498A bei 10 °C untersucht und mit dem TSP $\Delta$ N Wildtypprotein verglichen. Wie in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt, sind die Ausbeuten der Faltung von V498A *in vivo* und *in vitro* stark verringert. Ihre Faltungskinetik auf Monomerebene ist jedoch, sowohl bei 10 °C als auch bei 25 °C etwa 1.4fach schneller als die Rate des Wildtyps. Dies legt nahe, dass ein Alanin an Position 498 einen späteren Schritt im Reifungsprozess des Tailspikeproteins signifikant beeinflusst und hierdurch die Faltungseffizienz auf Trimerebene verringert. Im Gegensatz dazu steigert ein Leucin an Position 498 die Faltungsausbeuten *in vivo*. *In vitro* ist die Faltungseffizienz nur geringfügig gegenüber dem Wildtyp vermindert.

G244R und V498A bzw. TSP $\Delta$ N wt wurden bei einer Konzentration von 2 mg/ml in 5 M sauren Harnstoff bei 25 °C vollständig entfaltet. Zur Rückfaltung wurden 10  $\mu$ l der Proteine in je 990  $\mu$ l auf 10 °C temperierten Rückfaltungspuffer verdünnt, sodass die Restkonzentration an Harnstoff in den Ansätzen 50 mM und die Konzentration des Proteins 20  $\mu$ g/ml war. Zu verschiedenen Zeiten nach Einleitung der Rückfaltung wurden G244R und V498A bzw. Wildtyp zu gleichen Verhältnissen gemischt. Proben wurden weiterhin für 72 h bei 10 °C inkubiert, bis die Trimerreifung abgeschlossen war. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE getrennt, mit Silber gefärbt und densitometrisch ausgewertet.



**Abbildung 3.14 Hybridisierung von TSP $\Delta$ N wt und V498A mit der Ladungsmutante G244R bei 10 °C.**

**A)** 10 %iges SDS-Gel der Hybridbildung. 2 mg/ml G244R und wt oder V498A wurden in 5 M saurem Harnstoff bei 25 °C entfaltet. Die Rückfaltung wurde parallel durch Verdünnen in Rückfaltungspuffer bei 10 °C initiiert. Je 50  $\mu$ l der Rückfaltungsansätze wurden nach verschiedenen Zeiten gemischt und für weitere 72 h bei 10 °C inkubiert. Homotrimere und Hybride können elektrophoretisch getrennt und densitometrisch analysiert werden. **B)** Zunahme der Homotrimere mit der Zeit. Intensitäten wurden auf die Bande des entsprechenden Homotrimers einer Kontrolle normiert, die nach 72 h (4320 min) gemischt wurde (= 100 % mögliches Homotrimer). Wildtyp ● und G244R ○, eines gemeinsamen Hybridisierungsansatzes. V498A ■ und G244R □ im gemeinsamen Ansatz. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 bis 5 Experimenten pro Datenpunkt.

In Abbildung 3.14 A ist ein SDS-Gel der Untereinheitenassoziation von G244R und V498A abgebildet. Ausbeuten in den Rückfaltungsansätzen von V498A und G244R, die nicht gemischt wurden, sind fast identisch. Bei Mischung der Reaktionsansätze nach steigenden Inkubationszeiten nehmen die Homotrimerbanden zu und die Hybridbanden ab. In Abbildung 3.14 B sind die prozentualen Anteile an Homotrimer von G244R, V498A und Wildtyp gegen die Zeit aufgetragen. Zwar sind die Fehlerbalken der abgebildeten Mittelwerte recht groß, doch ist deutlich erkennbar, dass die Zusammenlagerung der Untereinheiten von V498A gegenüber dem Wildtyp und G244R verlangsamt ist. Die Halbwertszeiten der Assoziation von G244R und Wildtyp liegen unter den hier verwendeten Bedingungen bei circa 20 Minuten. Die Homotrimerbildung von V498A vollzieht sich verlangsamt mit einer Halbwertszeit von etwa 120 Minuten. Valin 498 liegt in Windung 12 am C-terminalen Ende der  $\beta$ -Helix.

### 3.3. Einfluss der Seitenkettenstapelung auf die kinetische Stabilität des Tailspike trimers

Das P22 Tailspikeprotein ist sehr stabil, so liegt beispielsweise der Schmelzpunkt des reifen Trimers bei etwa 88 °C (Sargent et al., 1988, Sturtevant et al., 1989). Das native Protein ist resistent gegen das Detergenz Natriumdodecylsulfat bei Raumtemperatur und den Verdau durch Proteasen. Da der Faltungs- und Assoziationsprozess des Trimers komplex und nicht vollständig reversibel ist, ist die Bestimmung der freien Stabilisierungsenthalpie  $\Delta G^0$  des Proteins nicht möglich. Beispielsweise weisen chemisch-induzierte Gleichgewichtsübergänge eine deutliche Hysterese zwischen Faltung und Entfaltung auf (Fuchs et al., 1991). Weiterhin aggregiert das Protein bei Messung von thermischen Schmelzkurven irreversibel (Sturtevant et al., 1989, Miller et al., 1998b). Eine Denaturierungsmittel-abhängige Analyse der kinetischen Faltungs- und Entfaltungsraten stellt prinzipiell eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von  $\Delta G^0$  dar. Das Fluoreszenzsignal der GdmHCl-induzierten Entfaltung des Tailspikeproteins ist einphasig, jedoch verlaufen Faltung des Monomers, Assoziation der Untereinheiten und Trimerreifung über verschiedene intermediäre Strukturen, von denen nicht alle spektroskopisch auflösbar sind (Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993, Miller, 1995). Thermodynamische Stabilitätsparameter, sind somit nicht zugänglich und die Proteinstabilität kann nur indirekt untersucht werden. Danner, Miller und Schuler zeigten, dass erhöhte oder verminderte Entfaltungsraten mit *tsf*- bzw. *su*-Phänotypen und den thermodynamischen Stabilitäten dieser Mutanten korrelieren (Danner & Seckler, 1993, Miller et al., 1998b, Schuler & Seckler, 1998).

Die kinetischen Stabilitäten der Stapelungsmutanten der Alanin- und Leucin-Reihe wurden im Kontext des N-terminal verkürzten Tailspike trimers ( $TSP\Delta N$ ) untersucht, indem Entfaltungskinetiken bei 71 °C in Gegenwart von SDS und GdmHCl-induziert bei 25 °C beobachtet wurden. Weiterhin wurden die Substitutionen V125A und V125L, die in der *capping*-Region (120-142) der  $\beta$ -Helix Domäne lokalisiert sind, im kompletten Tailspikeprotein (TSP) analysiert. Ergebnisse dieser Analysen werden am Ende des Kapitels zusammengetragen und verglichen.

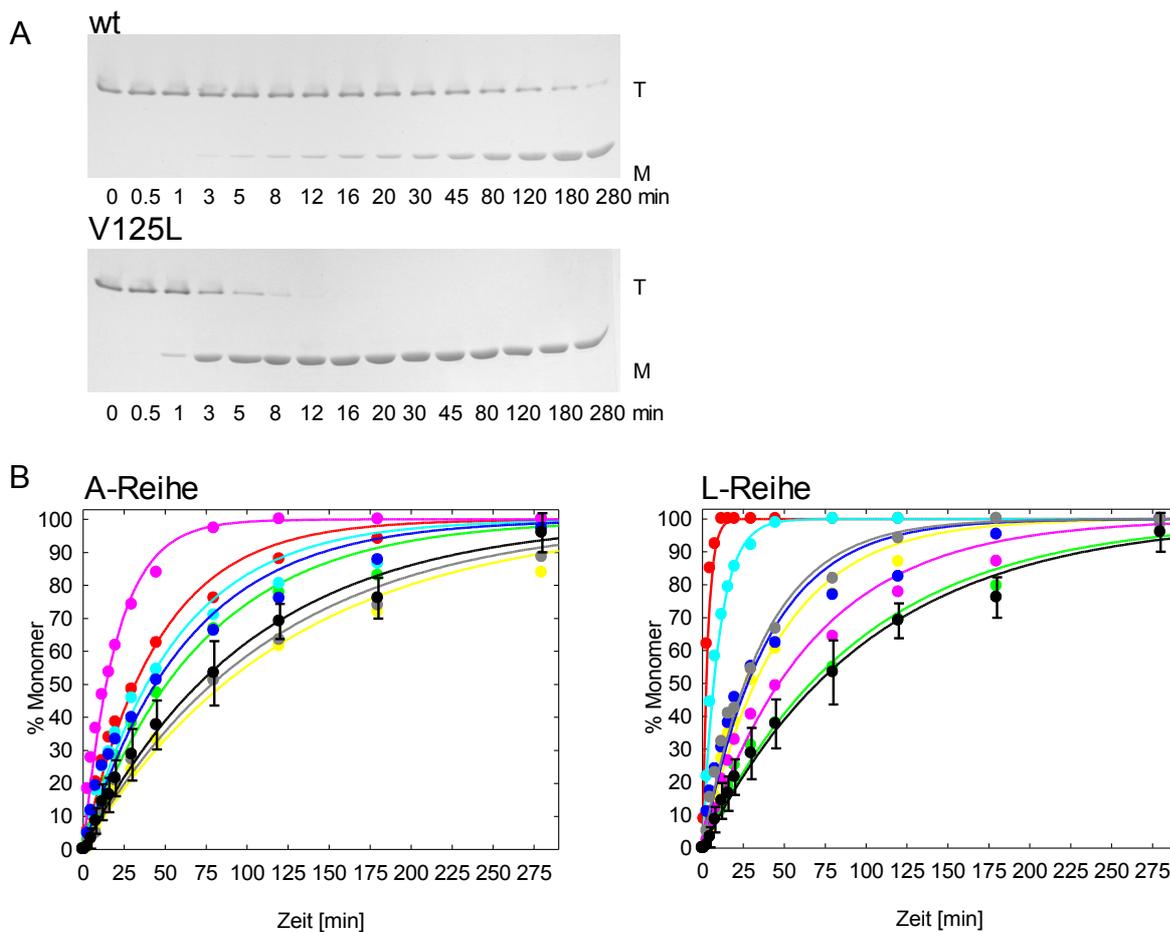
#### 3.3.1 Thermische Denaturierung der $TSP\Delta N$ -Konstrukte bei 71 °C in Gegenwart von 2 % SDS

Die Messung von Entfaltungskinetiken bei hohen Temperaturen in Gegenwart von SDS ermöglichen es, den Einfluss von Mutationen auf die kinetische Stabilität zu vergleichen (Miller et al., 1998b). Dabei verhindert die Zugabe von SDS Aggregatbildung über teilentfaltete Strukturen und die Rückfaltungsreaktion.

Entfaltungskinetiken der  $TSP\Delta N$ -Mutanten und des Wildtyps wurden bei 71°C und 2 % SDS durchge-

### 3. Ergebnisse

führt. Bei dieser Temperatur ist es möglich, den zeitlichen Verlauf schnell und langsam entfaltender Mutanten parallel in einer sinnvollen Auflösung zu verfolgen. Der Zerfall des Trimers wurde nach unterschiedlichen Zeiten durch Transfer der Reaktionsgefäße in ein Eisbad gestoppt. SDS-resistentes Trimer wurde vom denaturierten Monomer mittels SDS-PAGE getrennt, und die Proteinbanden wurden nach Coomassie-Färbung densitometrisch quantifiziert (Abb. 3.15 A). Abbildung 3.15 B zeigt die zeitabhängige Zunahme der Intensität der Monomerbande aller Mutanten der Alanin- und Leucin-Reihe. Die abgebildeten Datenpunkte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messreihen, bei denen alle Mutanten einer Reihe und der Wildtyp zur Vergleichbarkeit parallel untersucht wurden.



**Abbildung 3.15: Entfaltungskinetiken der TSP $\Delta$ N-Konstrukte bei 71 °C und 2 % SDS. A)** 10%ige SDS-PAGE der Entfaltung des Wildtyps und der Mutante V125L. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde die Entfaltungsreaktion gestoppt und die beiden Spezies elektrophoretisch getrennt. **B)** Kinetiken der Monomerbildung der Alanin- und Leucin-Reihen von ● wt, ● V125, ● V272, ● V321, ● V349, ● V450, ● V498 und ● V523. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Messungen. Zur Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung nur für den Wildtyp angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen aller Datenpunkte sind jedoch in den Tabellen A3 im Anhang aufgelistet. Die Monomerzunahme wurde mit Gleichung 2.18 *gefit*tet; die Regressionskurven sind als Linien dargestellt.

Die Bildung des Monomers kann durch eine einphasige Exponentialfunktion nach Gleichung 2.18 beschrieben werden. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{\text{Denat}}$  der Reaktionen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet. Der Wildtyp des N-terminal verkürzten Tailspikeproteins entfaltet bei 71 °C mit einer Rate von

$0.01 \pm 0.0004 \text{ min}^{-1}$ . Dies entspricht einer Halbwertszeit von 70 Minuten. Miller und Schuler hatten bei  $71 \text{ }^\circ\text{C}$  (in Tris/HCl-Puffer pH 7.0 bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , das entspricht circa pH 5.5 bei  $71 \text{ }^\circ\text{C}$ ) Halbwertszeiten von 13 Minuten bzw. 50 Minuten bestimmt (Miller et al., 1998b, Schuler et al., 2000). Dies verdeutlicht, dass nur kleine Temperaturschwankungen zu deutlich unterschiedlichen Raten führen, was zum einen die starke Temperaturabhängigkeit der Entfaltung und zum anderen die Sensitivität der Ergebnisse gegenüber geringfügig unterschiedlichen Versuchsbedingungen hervorhebt.

Protein	$k_{\text{Denat}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	SD ±	$k_{\text{Denat}} \text{ norm.}^{\text{a}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	SD norm. ±	Halbwertszeit [min]	$\Delta\Delta G_{\text{U}}^{\text{b}}$ [ $\text{kJ mol}^{-1}$ ]	Fehler $\Delta\Delta G_{\text{U}}^{\text{c}}$ ±
$\Delta\text{N wt}$	0.0099	0.0004	1.00	0.04	70	–	–
V125A	0.0219	0.0010	2.2	0.1	32	-2.3	0.2
V272A	0.0137	0.0006	1.4	0.1	51	-0.9	0.2
V321A	0.0081	0.0003	0.82	0.03	86	0.6	0.2
V349A	0.0179	0.0011	1.8	0.1	39	-1.7	0.2
V450A	0.0494	0.0020	5.0	0.2	14	-4.6	0.2
V498A	0.0158	0.0011	1.6	0.1	44	-1.3	0.2
V523A	0.0088	0.0004	0.89	0.04	79	0.3	0.2
V125L	0.3012	0.0267	30.4	2.7	2	-9.8	0.3
V272L	0.0105	0.0004	1.06	0.04	66	-0.2	0.2
V321L	0.0217	0.0010	2.2	0.1	32	-2.3	0.2
V349L	0.1004	0.0044	10.1	0.4	7	-6.6	0.2
V450L	0.0148	0.0008	1.5	0.1	47	-1.2	0.2
V498L	0.0251	0.0019	2.5	0.2	28	-2.7	0.2
V523L	0.0269	0.0012	2.7	0.1	26	-2.9	0.2

**Tabelle 3.5: Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung der TSP $\Delta\text{N}$ -Konstrukte (109-666) bei  $71 \text{ }^\circ\text{C}$  und 2 % SDS.**

<sup>a</sup> Entfaltungsraten auf die Geschwindigkeit des Wildtyps normiert.

<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G^{\ddagger} = -RT \cdot \ln k_{\text{Mutante}}/k_{\text{Wildtyp}}$ , siehe Abschnitt 2.6.5.

Fast alle Mutanten entfalten schneller als der Wildtyp. Den stärksten Effekt zeigt V125L, deren Entfaltung mit einer Halbwertszeit von circa 2 Minuten um den Faktor 30 beschleunigt ist. Die Entfaltungsgeschwindigkeiten der Mutanten V349L und V450A sind mit Halbwertszeiten von jeweils 7 und 14 Minuten um das 10fache bzw. 5fache schneller. Die Mutanten V125A, V349A, V498A, V321L, V498L und V523L entfalten etwa doppelt so schnell wie der Wildtyp. Entfaltungsraten von V272A, V321A, V523A, V272L und V450L sind wildtyp-ähnlich. Im Vergleich hierzu denaturieren die stark destabilisierten *tsf*-Mutanten G244R und D238S bei  $68 \text{ }^\circ\text{C}$  etwa 10fach schneller als der Wildtyp, während die *su*-Mutante V331A bei  $71 \text{ }^\circ\text{C}$  5fach langsamer als der Wildtyp entfaltet (Miller et al., 1998b). Der Austausch des Valins an Position 125 gegen ein Leucin löst den stärksten bisher untersuchten Anstieg der Entfaltungsrates bei thermischer Denaturierung aus. Die Destabilisierung von V450A liegt in der Größenordnung von G244R und D238S.

Aus den Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten der thermischen Entfaltung des Wildtyps und

der Mutanten wurde nach Gleichung 2.20 die durch die Substitution bedingte Änderung der freien Energie zwischen dem nativen Zustand und dem Übergangszustand  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  berechnet. Die Höhe der Aktivierungsbarriere bestimmt die Entfaltungsrates, welche bei Destabilisierung des nativen Zustandes oder des Übergangszustandes beschleunigt ist (Klemm et al., 1991, Dong et al., 2008). Die Aktivierungsenergien der Entfaltung von V125L und V349L sind mit  $-9.8 \pm 0.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $-6.6 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1}$  stark vermindert (Tabelle 3.5). Eine mäßige Destabilisierung des nativen Zustandes oder des Übergangszustandes zeigen V125A, V450A, V321L, V498L und V523L. Die Aktivierungsenergie der Entfaltung ist für die restlichen Mutanten nur minimal vermindert bzw. wildtyp-ähnlich. V321A und V523A sind minimal stabilisiert.

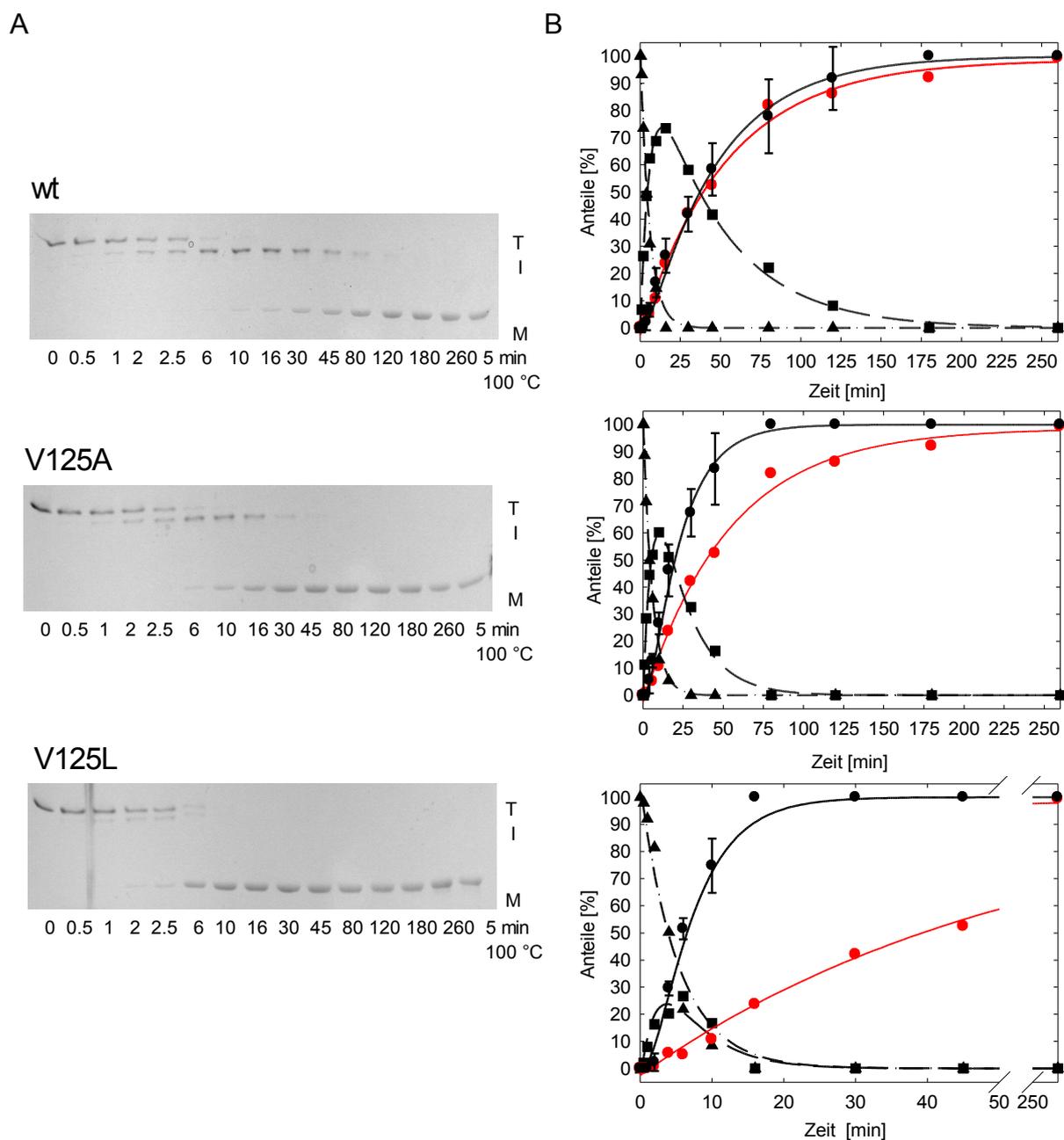
#### **3.3.2 Thermische Denaturierung der TSP-Konstrukte bei 71 °C in Gegenwart von 2 % SDS**

Um festzustellen, ob sich die Stabilitäten der N-terminalen (1-108) und C-terminalen Domänen (109-666), besonders im Hinblick auf die *capping*-Region (120-142), beeinflussen, wurden die Substitutionen V125A und V125L auch in das komplette Tailspikeprotein (1-666) eingefügt.

Bei thermischen Denaturierungskinetiken entfaltet das Volllängenprotein sequenziell über ein metastabiles Intermediat, in welchem die N-terminalen 107 Aminosäuren entfaltet sind, während die C-terminale Domäne gefaltet und trimerisiert vorliegt. SDS-Bindung an den entfalteten N-Terminus führt zu einer gesteigerten Mobilität des Intermediates im 7.5 %igen SDS-Gel im Vergleich zum nativen Trimer (Abb. 3.16 A). In Abwesenheit von SDS ist die Entfaltung der N-terminalen Domäne reversibel (Chen & King, 1991).

Entfaltungskinetiken wurden ebenso wie in Abschnitt 3.3.1 bei 71 °C und 2 % SDS durchgeführt, zudem wurde der TSP $\Delta$ N wt parallel als Referenz verwendet. Der konsekutive Verlauf der Reaktion wird in Abbildung 3.16 dargestellt. Die zeitabhängigen Verhältnisse der drei kinetischen Spezies wurden global nach den Gleichungen 2.15 bis 2.17 beschrieben. Die Geschwindigkeitskonstanten der beiden Phasen sind für den Wildtyp  $k_1 = 0.173 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$  und  $k_2 = 0.023 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$  (Tabelle 3.6). Die Halbwertszeit der Entfaltung der N-terminalen Domäne bei 71 °C beträgt somit 4 Minuten und die der C-terminalen Domäne 30 Minuten. Verglichen mit der sehr stabilen C-terminalen Domäne des Proteins ist die N-terminale Domäne sensitiv gegenüber Hitze und SDS.

Der als Kontrolle mitgeführte TSP $\Delta$ N Wildtyp entfaltet hier mit einer Halbwertszeit von 40 Minuten. Die Versuchstemperatur war anscheinend etwas höher als bei den unter 3.3.1 dargestellten Entfaltungskinetiken der TSP $\Delta$ N-Konstrukte. Wie schon von Miller (Miller, 1995) beschrieben, entfaltet TSP bei thermischer Denaturierung ebenso schnell wie TSP $\Delta$ N. Ein Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und  $k_{\text{Denat}}$  deutet an, dass die C-terminale Domäne (109-666) im Kontext des Volllängenproteins sogar etwas instabiler ist, bzw. dass ihre Denaturierung durch die entfaltete Polypeptidkette am N-Terminus beschleunigt wird.



**Abbildung 3.16: Entfaltungskinetiken des kompletten Tailspikeproteins bei 71 °C und 2 % SDS. A)** 7.5%ige SDS-Gele der Entfaltung des Wildtyps und der Mutanten V125A und V125L. **B)** Prozentuale Anteile von Trimer ▲, Intermediat ■ und Monomer ● bei Denaturierung. Die Verhältnisse wurden nach dem Modell einer konsekutiven Reaktion erster Ordnung analysiert. Regressionslinien: Trimer (---) Intermediat (- - -), Monomer (-). Zur Gegenüberstellung ist der beim Experiment mitgeführte TSP $\Delta$ N wt (●) abgebildet, der mit Gleichung 2.18 gefittet wurde (-). Mittelwerte und Standardabweichungen aller Daten sind in Anhang A.4 zu finden.

Die Halbwertszeiten der Entfaltung der N-terminalen Domäne der Mutanten V125A und V125L sind mit etwa 4 Minuten dem Wildtyp entsprechend. Beide Mutationen beschleunigen jedoch den Zerfall des Intermediates zum Monomer, also  $k_2$ . Mit Halbwertszeiten von 13 Minuten für V125A und 2 Minuten für V125L sind die Geschwindigkeitskonstanten etwa 2fach bzw. 18fach erhöht. Sowohl Chen und

King als auch Danner und Seckler hatten beobachtet, dass *tsf*- und *su*-Mutationen große Effekte auf  $k_2$  haben können,  $k_1$  hingegen unbeeinflusst bleibt (Chen & King, 1991, Danner & Seckler, 1993).

Die Mutation V125A verhält sich in den Konstrukten TSP und TSP $\Delta$ N analog. Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten  $k_2$  und  $k_{\text{Denat}}$  sind in beiden Fällen circa doppelt so hoch wie die des jeweiligen Wildtyps. Bei V125L  $\Delta$ N ist  $k_{\text{Denat}}$  verglichen mit dem Wildtyp 30fach erhöht und  $k_2$  bei V125L TSP etwa 18fach beschleunigt. Allerdings sind bei der schnellen Entfaltung von V125L TSP die Mittelwerte für Trimer und Intermediat mit hohen Fehlern behaftet (siehe Tabelle A3 und A4 im Anhang).

Die Ergebnisse zeigen, dass im Kontext des Volllängenproteins die Entfaltung der N-terminalen Domäne nicht von der Stabilität der C-terminalen Domäne beeinflusst ist und umgekehrt.

Zudem wurde bei den Untersuchungen deutlich, dass die von Miller und Schuler beobachtete zweiminütige Verzögerung der Entfaltung, welche als Aufheizdauer des Systems im Wasserbad diskutiert wurde, durch die Empfindlichkeit der Coomassie-Färbung bedingt ist, da geringe Mengen an Monomer zu Beginn der Kinetik mit Coomassie nicht nachgewiesen werden können. Für die Mutante V125L, die rapide entfaltet, ist jedoch die Monomerbande schon nach einer Minute hinreichend stark populiert (Abb. 3.15 A). Weiterhin kann durch Silberfärbung das Auftreten des Monomers 0.5 Minuten früher detektiert werden als bei Färbung mit Coomassieblau (Daten nicht gezeigt). Zudem ist bei Entfaltung des Volllängenproteins das Intermediat und eine Abnahme der Trimerbande schon nach 0.5 Minuten sichtbar (Abb. 3.16).

Protein	$k_1$ [min <sup>-1</sup> ]	SD $k_1$ ±	$t_{1/2}$ NTD [min]	$k_2$ [min <sup>-1</sup> ]	SD $k_2$ ±	$k_2$ norm. <sup>a</sup> [min <sup>-1</sup> ]	SD $k_2$ norm. ±	$t_{1/2}$ CTD [min]	$\Delta\Delta G_{k_2}^{\text{b}}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta\Delta G_{k_2}^{\text{c}}$ ±
TSP wt	0.173	0.007	4	0.023	0.001	1.00	0.04	30	-	-
TSP V125A	0.171	0.005	4	0.052	0.002	2.26	0.09	13	-2.4	0.2
TSP V125L	0.190	0.010	4	0.413	0.045	17.96	1.96	2	-8.3	0.3
$\Delta$ N wt	-	-	-	0.017	0.001	0.75	0.03	40	-	-

**Tabelle 3.6: Geschwindigkeitskonstanten Entfaltung der TSP-Konstrukte (1-666) bei 71 °C und 2 % SDS.**

<sup>a</sup> Entfaltungsraten auf die Geschwindigkeit des TSP Wildtyps normiert.

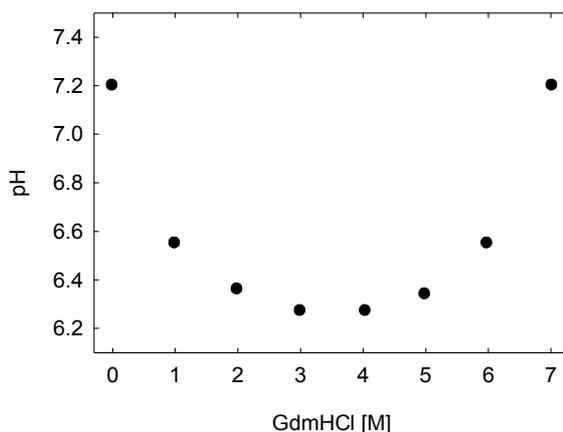
<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G^{\text{c}} = -RT \cdot \ln k_{\text{Mutante}}/k_{\text{Wildtyp}}$ , siehe Abschnitt 2.6.5.

### 3.3.3. GdmHCl-induzierte Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N bei verschiedenen pH-Werten

Bei initialen Denaturierungsexperimenten des N-terminal verkürzten Tailspikeproteins in Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl) wurde beobachtet, dass die Entfaltungsraten des Proteins pH-abhängig ist. Als Basis für die Analyse von Entfaltungskinetiken der Seitenkettenstapelmutanten wurde deshalb die Denaturierung des kompletten Tailspikeproteins TSP und des N-terminal verkürzten Konstruktes TSP $\Delta$ N bei 25 °C pH- und GdmHCl-abhängig untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden darge-

stellt.

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit in Gegenwart von Denaturierungsmitteln wie GdmHCl oder Harnstoff erfordert eine einheitliche experimentelle Vorgehensweise, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die mit Glasmembranelektroden bestimmten pH-Werte weichen mit steigender Konzentration des Denaturierungsmittels deutlich von den tatsächlichen pH-Werten ab (Garcia-Mira & Sanchez-Ruiz, 2001). So ist beispielsweise der gemessene pH-Wert einer 6 M GdmHCl-Lösung um circa 0.8 pH-Einheiten niedriger als der tatsächliche pH-Wert. Im Gegensatz dazu ist bei einer 6 M Harnstofflösung der gemessene pH-Wert um 1.5 pH-Einheiten höher als der tatsächliche. Die Abhängigkeit des pH-Wertes von der Denaturierungsmittelkonzentration zeigt einen nicht-linearen Zusammenhang (Acevedo et al., 2002). pH-Werte von Denaturierungsmittelpuffern sind beispielsweise unterschiedlich, wenn der Puffer durch Verdünnung aus einer hochmolaren Stammlösung hergestellt oder direkt bei der gewünschten Denaturierungsmittelkonzentration titriert wurde (Abbildung 3.17). Bei hohen Cosolvenskonzentrationen verhalten sich Lösungen nicht mehr ideal und pH-Messungen mit Glasmembranelektroden sind fehlerbehaftet. Deshalb wurden die in dieser Arbeit verwendeten Denaturierungsmittelpuffer einheitlich durch Verdünnen aus 8 M Stammlösungen hergestellt (siehe Abschnitt 2.1.7).



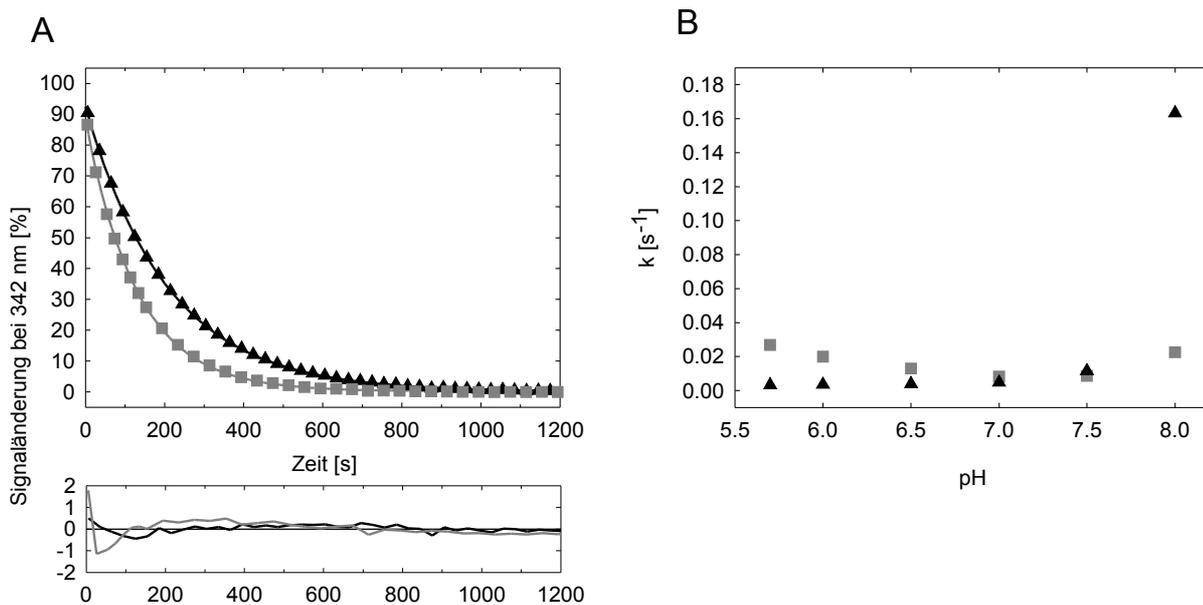
**Abbildung 3.17: Mit einer Glasmembranelektrode bestimmte pH-Werte von GdmHCl-Puffern.** GdmHCl-Lösungen wurden aus einer Stammlösung von 7.025 M GdmHCl, 50 mM NaP, pH 7.2 bei RT und dem analogen Puffer ohne Denaturierungsmittel 50 mM NaP, pH 7.2 gemischt.

Fluoreszenzkinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N wurden nach Anregung bei 280 nm bei einer Wellenlänge von 342 nm detektiert. Zur Entfaltung wurde natives Protein mit einer Konzentration von 1 mg/ml im Verhältnis 1:100 in auf 25 °C temperierten GdmHCl-Puffer verdünnt. TSP wurde bei einer Konzentration von 7 M GdmHCl und TSP $\Delta$ N bei 5 M entfaltet. Der untersuchte pH-Bereich der Natriumphosphatpuffer lag zwischen 5.7 und 8.0.

Abbildung 3.18 A zeigt die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz bei Entfaltung von TSP und TSP $\Delta$ N in 7 M bzw. 5 M GdmHCl-Puffer bei pH 7.0. Keines der sieben Tryptophane in TSP und TSP $\Delta$ N befindet

### 3. Ergebnisse

sich an der Kontaktfläche der drei Untereinheiten, weshalb die Signaländerung die Entfaltung des Monomers nach Dissoziation des Trimers widerspiegelt (Fuchs et al., 1991, Danner et al., 1993). Die bei verschiedenen pH-Werten aufgenommenen Kinetiken sind einphasig und wurden mit einer Exponentialfunktion nach Gleichung 2.13 analysiert. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bei pH 7.0 sind für TSP  $0.0082 \pm 0.0004 \text{ s}^{-1}$  und für TSP $\Delta$ N  $0.0047 \pm 0.0001 \text{ s}^{-1}$ , die Halbwertszeiten sind somit 1.4 Minuten und 2.5 Minuten. Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten bei den pH-Werten sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Graphisch sind die Ergebnisse in Abbildung 3.18 B dargestellt.



**Abbildung 3.18: Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N in GdmHCl.** **A)** Entfaltung in 7 M GdmHCl (TSP ■) bzw. 5 M GdmHCl (TSP $\Delta$ N ▲), 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE bei pH 7.0 und 25 °C. Die Proteinkonzentration der Entfaltungsansätze war 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kinetiken wurde über die Fluoreszenzemission bei 342 nm detektiert. Der zeitliche Signalverlauf ist monoexponentiell beschreibbar (Linien). Die Residuen der *Fits* sind in der unterstehenden Abbildung gezeigt. **B)** Apparente Geschwindigkeitskonstanten von TSP ■ und TSP $\Delta$ N ▲ bei unterschiedlichen pH-Werten. Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen. Standardabweichungen sind klein, sodass Fehlerbalken durch die Symbole verdeckt sind.

Die Entfaltungsraten des Volllängenproteins TSP sind über den untersuchten pH-Bereich relativ einheitlich, was im Hinblick auf die Funktion des Tailspikes als Adhäsionsprotein des Bakteriophagen P22 und seinem Vorkommen im extrazellulären Milieu plausibel ist. Das Stabilitätsoptimum liegt bei pH 7.0 und das Minimum bei pH 5.7. Deletion der N-terminalen Domäne macht das Protein empfindlicher gegenüber hohen pH-Werten in Gegenwart von GdmHCl. Am schnellsten entfaltet TSP $\Delta$ N in 5 M GdmHCl und 25 °C bei pH 8.0, am langsamsten bei pH 5.7. Die Halbwertszeiten betragen jeweils wenige Sekunden und 3.5 Minuten. Der immense Sprung der Entfaltungsgeschwindigkeiten im Basischen zwischen pH 7.5 und 8.0 wird im pH-Profil (Abbildung 3.18 B) deutlich. Der Protonierungszustand der ionisierbaren Gruppen, welche für die Stabilität relevant sind, ändert sich somit zwischen

pH 7.5-8.0. pK-Werte der Aminosäuren im gefalteten Protein sind durch ihre kovalente Verknüpfung, durch polare Reste in der Umgebung und durch Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Hohe Salzkonzentrationen beeinflussen die pK-Werte der ionisierbaren Gruppen und deren elektrostatische Interaktionen im gefalteten Protein (Garcia-Mira & Sanchez-Ruiz, 2001).

pH-Wert, Salzkonzentration und Messfehler der pH-Glasmembranelektrode können die Bestimmung der Entfaltungsraten der Tailspikevarianten beeinflussen. Da sich diese Faktoren gegenseitig bedingen, kann dieses mehrdimensionale Problem nur durch ein einheitliches experimentelles Vorgehen kontrolliert werden.

TSP (1 - 666)

pH	$10^{3 \cdot k}$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^{3 \cdot k}$	Halbwertszeit [min]
5.7	26.87	0.35	0.4
6	19.95	0.54	0.6
6.5	12.95	0.69	0.9
7	8.22	0.42	1.4
7.5	8.56	0.18	1.3
8	22.52	0.28	0.5

TSP $\Delta$ N (109 - 666)

pH	$10^{3 \cdot k}$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^{3 \cdot k}$	Halbwertszeit [min]
5.7	3.31	0.09	3.5
6	3.43	0.03	3.4
6.5	3.78	0.13	3.1
7	4.68	0.11	2.5
7.5	11.47	0.78	1.0
8	163.33	5.48	0.1

**Tabelle 3.7: pH-Abhängigkeit der Entfaltungsraten von TSP in 7 M GdmHCl und TSP $\Delta$ N in 5 M GdmHCl bei 25 °C.** Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Messungen.

### 3.3.4. Entfaltungskinetiken von TSP und TSP $\Delta$ N bei verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen

Ebenso wie andere SDS-resistente Proteine (Manning & Colón, 2004) weisen Tailspikeproteine eine sehr hohe kinetische Stabilität auf (Freiberg et al., 2003, Barbirz et al., 2009). Da die Aktivierungsenergien sehr hoch sind, sind Entfaltungsraten auch in hochmolaren Denaturantlösungen langsam, sodass die Proteine regelrecht im gefalteten Zustand gefangen sind. Beispielsweise entfaltet das SDS-resistente Protein Avidin in Abwesenheit eines Chaotrops mit einer Halbwertszeit von 270 Jahren. Bei SDS-sensitiven Proteinen liegen hingegen die Halbwertszeiten in Abwesenheit eines Denaturierungsmittels im Minuten- bis Stundenbereich (Manning & Colón, 2004).

Um die Halbwertszeiten von TSP und TSP $\Delta$ N in Abwesenheit eines Denaturierungsmittels festzustellen wurden Entfaltungskinetiken bei steigenden GdmHCl-Konzentrationen bei pH 7.0 untersucht. Die durch manuelles Mischen induzierten Kinetiken wurden für das komplette Tailspikeprotein in einem Konzentrationsbereich von 6 M bis 8 M GdmHCl detektiert. Kinetiken von TSP $\Delta$ N wurden im Bereich von 4.5 M bis 6.5 M aufgenommen. Der Verlauf der Entfaltung kann für beide Proteine über den gesamten Konzentrationsbereich an Denaturierungsmittel durch eine monoexponentielle Funktion nach Gleichung 2.13 beschrieben werden (Tabelle 3.8). TSP entfaltet in 6.55 M GdmHCl mit der Rate  $3.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.01 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  und TSP $\Delta$ N bei 5 M GdmHCl mit  $4.8 \cdot 10^{-3} \pm 0.03 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Die Amplituden

### 3. Ergebnisse

der Signaländerung liegen zwischen 96 % bei langsamer und 67 % bei sehr schneller Entfaltung. Die Raten sind weitestgehend mit den bereits für einige Denaturierungsmittelkonzentrationen publizierten Raten identisch. Zum Beispiel hatte Danner für die Entfaltung von TSP in 6 M GdmHCl, 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE pH 7.0 bei 25 °C eine Rate von  $1.5 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bestimmt (Danner & Seckler, 1993). Miller hatte für TSP $\Delta$ N in 5 M GdmHCl unter sonst identischen Bedingungen eine Rate von  $3.9 \cdot 10^{-3} \pm 0.2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  gemessen (Miller, 1995).

#### TSP (1 - 666)

#### TSP $\Delta$ N (109 - 666)

GdmHCl [M]	$10^3 \cdot k$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^3 \cdot k$	lnk [s <sup>-1</sup> ]	SD lnk	b <sup>a</sup> [%]	t <sub>1/2</sub> [min]	GdmHCl [M]	$10^3 \cdot k$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^3 \cdot k$	lnk [s <sup>-1</sup> ]	SD lnk	b <sup>a</sup> [%]	t <sub>1/2</sub> [min]
6.02	1.63	0.06	-6.42	0.035	88	7.1	4.52	1.13	0.02	-6.78	0.017	90	10.2
6.28	2.25	0.01	-6.10	0.005	94	5.1	4.78	2.42	0.02	-6.02	0.007	96	4.8
6.55	3.46	0.01	-5.67	0.002	86	3.3	5.03	4.82	0.03	-5.33	0.007	95	2.4
6.78	5.07	0.01	-5.29	0.002	88	2.3	5.27	8.86	0.18	-4.73	0.021	95	1.3
7.03	7.64	0.02	-4.87	0.002	88	1.5	5.51	15.60	0.01	-4.16	0.001	92	0.7
7.31	13.00	0.07	-4.34	0.005	85	0.9	5.80	27.20	0.21	-3.61	0.008	90	0.4
7.54	23.00	0.04	-3.77	0.002	87	0.5	6.03	40.80	0.09	-3.20	0.002	87	0.3
7.79	50.30	0.26	-2.99	0.005	81	0.2	6.29	60.70	0.08	-2.80	0.001	78	0.2
7.99	109.60	0.58	-2.21	0.005	70	0.1	6.55	86.00	1.83	-2.45	0.021	67	0.1

**Tabelle 3.8: GdmHCl-Abhängigkeit der Entfaltungsraten von TSP und TSP $\Delta$ N bei pH 7.0 und 25 °C.**

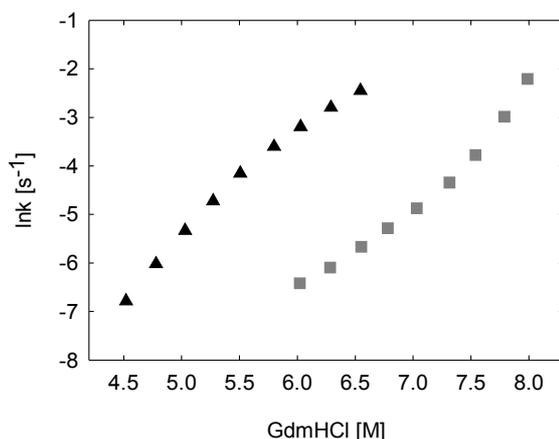
<sup>a)</sup> Amplitude der detektierten Signaländerung relativ zum Signal einer Nativkontrolle (s. 2.4.4).

In Abbildung 3.19 sind die Logarithmen der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von TSP und TSP $\Delta$ N gegen die GdmHCl-Konzentrationen aufgetragen. Der Entfaltungssast des sogenannten *Chevronplots* (lnk vs. [D]) ist für keines der beiden Proteine linear, die Kurven sind in entgegengesetzte Richtungen gewölbt.

TSP $\Delta$ N zeigt einen konkav gebogenen Verlauf, d.h. bei niedrigen (4.5 M) und hohen GdmHCl-Konzentrationen (6.55 M) ist die Entfaltung langsamer als bei Extrapolation aller Datenpunkte mittels linearer Regression zu erwarten wäre. Bei TSP ist die Krümmung konvex. Bei niedrigen (6 M) und ganz hohen (8 M) GdmHCl-Konzentrationen ist die Entfaltung schneller als erwartet. Ignoriert man die gekrümmten Verläufe der Denaturierungsmittelabhängigkeiten der apparenten Geschwindigkeitskonstanten und extrapoliert mit linearer Regression auf 0 M GdmHCl, ergibt sich für TSP $\Delta$ N eine Halbwertszeit der Entfaltung von circa 83 Tagen und für TSP eine Halbwertszeit von 4.6 Jahren. TSP ist demnach etwa 20fach stabiler als die N-terminal verkürzte Variante. Manning und Colón hatten für das Vollängenprotein TSP eine Halbwertszeit von 13 Jahren bestimmt, indem sie Geschwindigkeitskonstanten zwischen 6 M und 7 M bei 20°C in 25 mM Phosphatpuffer, 0.2 M NaCl pH 7.2 gemessenen und die logarithmierten Raten auf 0 M GdmHCl extrapoliert hatten (Manning & Colón, 2004).

Die Steigungen der Kurvenverläufe für TSP $\Delta$ N und TSP verändern sich mit der Denaturierungsmittelkonzentration. Bei TSP $\Delta$ N wird die Steigung bei hohen Denaturantkonzentrationen flacher, bei TSP wird sie bei hohen Konzentrationen steiler. Dies bedeutet, dass für TSP bei hohen GdmHCl-Konzen-

trationen die Entfaltungsgeschwindigkeiten stärker denaturantabhängig sind als bei niedrigen Konzentrationen. Extrapolation der Datenpunkte zwischen 6 M bis 7 M GdmHCl auf 0 M GdmHCl würde eine geringere Proteinestabilität ergeben als Extrapolation der Daten zwischen 7 M bis 8 M GdmHCl. Bei TSP $\Delta$ N ist der Zusammenhang umgekehrt.



**Abbildung 3.19: GdmHCl-Abhängigkeit der logarithmierten Entfaltungsraten von TSP und TSP $\Delta$ N.**

Entfaltung von TSP ■ und TSP $\Delta$ N ▲ bei verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen in 50 mM NaP, 1 mM EDTA, 1 mM DTE bei pH 7.0 und 25 °C. Die Proteinkonzentration der Entfaltungsansätze war 10  $\mu$ g/ml. Die Symbole stellen Mittelwerte aus drei Messungen dar. Die Standardabweichung ist gering, sodass die Fehlerbalken durch die Symbole verdeckt sind.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass GdmHCl und hohe Temperaturen in Gegenwart von SDS unterschiedlich auf das Tailspikeprotein wirken. Bei hohen Temperaturen und 2 % SDS sind TSP und TSP $\Delta$ N ähnlich stabil, in Gegenwart von GdmHCl weist TSP jedoch eine deutlich höhere Stabilität auf als die N-terminal verkürzte Variante.

### 3.3.5 GdmHCl-induzierte Entfaltungskinetiken der TSP $\Delta$ N-Konstrukte

Nach diesen Vorexperimenten wurde die Empfindlichkeit der TSP $\Delta$ N-Mutanten gegenüber dem chemischen Denaturierungsmittel GdmHCl bei 25 °C, pH 7.0 und einer Konzentration von 5 M analysiert. Die einphasigen Kinetiken wurden mit Gleichung 2.13 ausgewertet und die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Messungen werden in den Tabellen 3.9 gezeigt. Die Entfaltung der Mutante V498A kann auch mithilfe einer biexponentiellen Funktion nach Gleichung 2.14 beschrieben werden. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten sind dann  $k_1 = 0.0082 \pm 0.0001 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 1.4 \text{ min}$ ) und  $k_2 = 0.045 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0.3 \text{ min}$ ). Die Amplituden der beiden Phasen sind jeweils 73 % und 16 %. Die meisten Mutanten entfalten in 5 M GdmHCl schneller als der Wildtyp. Äquivalent zur Entfaltung durch thermische Denaturierung bei 71 °C und 2 % SDS ist V125L am stärksten destabilisiert; die Entfaltungsrate ist gegenüber dem Wildtyp um das 6fache beschleunigt. Bei V498A, V125A, V349L und V450A sind die Entfaltungsraten jeweils etwa 2fach, 3fach und 3.5fach erhöht. Alle anderen Mutanten verhalten sich wildtyp-ähnlich oder ihre Entfaltungsrate ist minimal verlangsamt.

## A-Reihe

Protein	$10^{3*k}$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^{3*k}$	b <sup>a</sup> [%]	k auf wt norm. [s <sup>-1</sup> ]	SD k norm. ±	Halbwertszeit [min]	$\Delta\Delta G_U^{\ddagger b}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta\Delta G_U^{\ddagger}$ ±
$\Delta N$ wt	4.56	0.04	90	1.00	0.01	2.5	–	–
V125A	12.90	0.21	88	2.83	0.05	0.9	-2.58	0.05
V272A	5.19	0.13	85	1.14	0.03	2.2	-0.32	0.06
V321A	5.10	0.03	92	1.12	0.01	2.3	-0.28	0.03
V349A	6.05	0.04	90	1.33	0.01	1.9	-0.70	0.03
V450A	15.30	0.33	86	3.36	0.07	0.8	-3.00	0.06
V498A	9.71	0.12	83	2.13	0.03	1.2	-1.87	0.04
V523A	3.70	0.04	92	0.81	0.01	3.1	0.52	0.03

## L-Reihe

Protein	$10^{3*k}$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^{3*k}$	b <sup>a</sup> [%]	k auf wt norm. [s <sup>-1</sup> ]	SD k norm. ±	Halbwertszeit [min]	$\Delta\Delta G_U^{\ddagger b}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta\Delta G_U^{\ddagger}$ ±
$\Delta N$ wt	4.56	0.04	90	1.00	0.01	2.5	–	–
V125L	26.90	0.33	80	5.90	0.07	0.4	-4.40	0.04
V272L	4.17	0.02	93	0.914	0.004	2.8	0.22	0.03
V321L	8.37	0.10	93	1.84	0.02	1.4	-1.51	0.04
V349L	13.30	0.16	91	2.92	0.04	0.9	-2.65	0.04
V450L	4.25	0.06	90	0.93	0.01	2.7	0.17	0.04
V498L	6.02	0.08	88	1.32	0.02	1.9	-0.69	0.04
V523L	4.11	0.05	86	0.90	0.01	2.8	0.26	0.04

Tabelle 3.9: Entfaltungsraten der TSP $\Delta N$ -Konstrukte in 5 M GdmHCl bei pH 7.0 und 25 °C.

<sup>a</sup> Amplitude der detektierten Signaländerung relativ zum Signal der Nativkontrolle, siehe 2.4.4.

<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G^{\ddagger} = -RT \cdot \ln k_{\text{Mutante}}/k_{\text{Wildtyp}}$ , siehe Abschnitt 2.6.5.

Protein	$10^{3*k}$ [s <sup>-1</sup> ]	SD $10^{3*k}$	b <sup>a</sup> [%]	k auf wt norm. [s <sup>-1</sup> ]	SD k norm. ±	Halbwertszeit [min]	$\Delta\Delta G_U^{\ddagger b}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	Fehler $\Delta\Delta G_U^{\ddagger}$ ±
TSP wt	3.079	0.001	90	1.000	0.0004	3.8	–	–
TSP V125A	3.48	0.02	88	1.130	0.006	3.3	-0.30	0.01
TSP V125L	18.00	0.13	85	5.846	0.042	0.6	-4.38	0.02

Tabelle 3.10: Entfaltungsraten der TSP-Konstrukte in 6.5 M GdmHCl bei pH 7.0 und 25 °C.

<sup>a</sup> Amplitude der detektierten Signaländerung relativ zum Signal der Nativkontrolle, siehe 2.4.4.

<sup>b</sup>  $\Delta\Delta G^{\ddagger} = -RT \cdot \ln k_{\text{Mutante}}/k_{\text{Wildtyp}}$ , siehe Abschnitt 2.6.5.

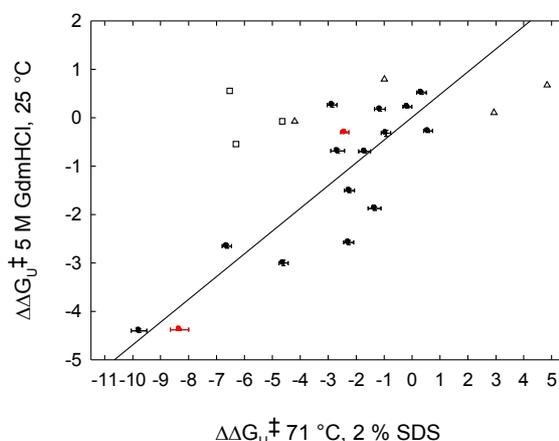
Die Entfaltung der Mutanten V125A und V125L wurde auch im Kontext des kompletten Tailspikeproteins TSP untersucht. Analog zum Wildtyp kann die Signaländerung der Entfaltung der beiden Mutanten in 6.5 M GdmHCl monoexponentiell beschrieben werden (Tabelle 3.10). Aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten ist ersichtlich, dass V125A ebenso schnell wie der Wildtyp entfaltet. Die

Entfaltung von TSP V125L ist deutlich schneller, sodass die Mutante, wie im TSP $\Delta$ N-Kontext, um das 6fache destabilisiert ist.

Aus den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung wurden die Unterschiede der Aktivierungsenergien  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  zwischen den Mutanten und dem Wildtyp nach Gleichung 2.20 berechnet (siehe Tabelle 3.9 und 3.10). Die Aktivierungsenergie der Mutante V125L ist in 5 M GdmHCl verglichen mit dem Wildtyp um  $4.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  verringert. Auch die Destabilisierungen der Mutanten V450A, V349L und V125A sind mit  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$ -Werten von jeweils  $-3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $-2.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $-2.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  deutlich ausgeprägt. V498A und V321L sind in geringem Maße destabilisiert und alle weiteren Mutanten haben eine wildtypentsprechende Aktivierungsenergie der Entfaltung.

### 3.3.6 Zusammenfassung und Vergleich der Resultate

Miller konnte keinen Zusammenhang zwischen den Denaturierungsgeschwindigkeiten in GdmHCl und den thermisch-induzierten Entfaltungsraten, der von ihm untersuchten *tsf*- und *su*-Mutanten, feststellen. Er schlussfolgerte, dass „[...] sich die Denaturierungsraten in GdmHCl nicht zum Stabilitätsvergleich [...] eignen (Miller, 1995). In Abbildung 3.20 sind die  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$ -Werte der Stapelungsmutanten aus GdmHCl-induzierter Entfaltung und thermischen Denaturierungsexperimenten gegeneinander aufgetragen.



**Abbildung 3.20: Unterschiede der Aktivierungsenergien aus thermisch- und chemisch-induzierten Entfaltungsexperimenten.**  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$ -Werte der TSP $\Delta$ N-  $\bullet$  und TSP-Varianten  $\bullet$ . Die Korrelation der Datenpunkte wurde mittels linearer Regression (–) analysiert. Zur Veranschaulichung wurden auch die Ergebnisse von Stefan Miller in den Vergleich aufgenommen, bei der Regressionsanalyse aber nicht berücksichtigt. Mutanten mit *su*-Phänotyp sind als  $\Delta$  und Mutanten mit *tsf*-Phänotyp als  $\square$  dargestellt.

Die hier untersuchten Mutanten der TSP $\Delta$ N- und TSP-Varianten verhalten sich hinsichtlich ihrer Stabilität in beiden Experimenten ähnlich. Die Stärke des Zusammenhangs der Daten wurde mittels linearer Regression und Korrelationsanalyse bestimmt. Der  $r^2$ -Wert, das Bestimmtheitsmaß, ist 0.75, die Korrelation der  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$ -Werte ist also hoch. Zum Vergleich sind außerdem  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$ -Werte der *tsf*- und

### 3. Ergebnisse

*su*-Mutanten aus thermischer und GdmHCl-induzierter Entfaltung in den Plot aufgenommen. Sie wurden bei der Regressionsanalyse nicht berücksichtigt. Die Werte sind aus Ergebnissen von Miller berechnet und in Tabelle 3.11 aufgelistet (Miller et al., 1998b, Miller, 1995). Unterschiede der Aktivierungsenergien der *su*- und *tsf*-Mutanten GdmHCl-induzierter Entfaltung streuen um 0 kJ mol<sup>-1</sup>. Im Gegensatz dazu verhalten sich die Mutanten V331A *su*, V331G *su*, G244R *tsf* und D238S *tsf* bei thermischer Denaturierung ihren Phänotypen entsprechend stark stabilisierend bzw. destabilisierend.

Beim Vergleich der  $\Delta\Delta G_{U^\ddagger}$ -Werte aus thermischer und GdmHCl-induzierter Entfaltung wird deutlich, dass die mit 5 M GdmHCl bei 25 °C bestimmten  $\Delta\Delta G_{U^\ddagger}$ -Werte sich weniger stark unterscheiden, Effekte von Mutationen deshalb weniger offensichtlich sind. Eine deutlichere Ausprägung der Mutationseffekte ist in thermischen Entfaltungsexperimenten bei hohen Temperaturen zu beobachten. Nichtsdestotrotz stimmen die Ergebnisse der beiden Methoden überein und erlauben zusammenfassende Erläuterung der Beobachtungen.

Mutante	$\Delta\Delta G^\ddagger$ 71°C, 2% SDS <sup>a</sup> kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta\Delta G^\ddagger$ 5M GdmHCl, 25°C <sup>b</sup> kJ mol <sup>-1</sup>	Mutante	$\Delta\Delta G^\ddagger$ 71°C, 2% SDS <sup>a</sup> kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta\Delta G^\ddagger$ 5M GdmHCl, 25°C <sup>b</sup> kJ mol <sup>-1</sup>
V331A <i>su</i>	4.8	0.7	G244R <i>tsf</i>	-6.3	-0.5
V331G <i>su</i>	2.9	0.1	D238S <i>tsf</i>	-6.5	0.6
A334V <i>su</i>	-1.0	0.8	A334I <i>su</i>	-4.7	-0.1
A334I <i>su</i>	-4.2	-0.1			

**Tabelle 3.11:**  $\Delta\Delta G_{U^\ddagger}$ -Werte von TSPAN-Mutanten mit *tsf*- und *su*-Phänotypen.

<sup>a</sup> berechnet aus von Stefan Miller publizierten Ergebnissen (Miller et al., 1998b).

<sup>b</sup> berechnet aus von Stefan Miller publizierten Ergebnissen (Miller, 1995).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass destabilisierende Mutationen entlang des gesamten Bereichs der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne verteilt sind und nicht in einer spezifischen Region lokalisiert. Die kinetische Stabilität der Mutante V125L ist sehr stark vermindert. Valin 125 befindet sich in der *capping*-Region am N-Terminus der parallelen  $\beta$ -Helix Domäne. Das Einfügen eines Leucins an diese Position steigert die Entfaltungsrates bei thermisch- und chemisch-induzierter Denaturierung enorm. Die durch die Substitution ausgelöste Änderung der freien Stabilisierungsenthalpie zwischen dem nativen Zustand und dem Übergangszustand der Entfaltung ist -9.8 kJ mol<sup>-1</sup> bei Denaturierung bei 71 °C und 2 % SDS und -4.4 kJ mol<sup>-1</sup> bei Entfaltung in 5 M GdmHCl und 25 °C. Die native Konformation oder der Übergangszustand der Entfaltung ist durch die eingefügte Mutation stark destabilisiert. Zur Orientierung: Die freie Stabilisierungsenthalpie  $\Delta G^0$  globulärer Proteine ist relativ gering und liegt zwischen 20 bis 80 kJ mol<sup>-1</sup> (Pfeil, 2001). Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und im Kern begrabene -CH<sub>2</sub>-Gruppen stabilisieren Proteine durchschnittlich um ~5.4 kJ mol<sup>-1</sup> (Shirley et al., 1992, Pace, 1992, Dong et al., 2008).

Substitution des Valins 125 gegen ein Alanin verringert die Aktivierungsenergie in einem deutlich geringeren Maße ( $\Delta\Delta G_{U^\ddagger}$  71 °C, 2 % SDS = -2.3 kJ mol<sup>-1</sup>;  $\Delta\Delta G_{U^\ddagger}$  5 M GdmHCl, 25 °C = -2.6 kJ mol<sup>-1</sup>). Position 125 ist Teil der N-terminalen *capping*-Region (120-142), welche die  $\beta$ -Helix-Domäne an

diesem Ende abschließt.

Auch bei den Mutationen V450A und V349L sind deutliche Effekte in beiden Experimenten sichtbar ( $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  71 °C, 2 % SDS = -4.6 kJ mol<sup>-1</sup>;  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  5 M GdmHCl, 25 °C = -3 kJ mol<sup>-1</sup> und  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  71 °C, 2 % SDS = -6.6 kJ mol<sup>-1</sup>;  $\Delta\Delta G_U^\ddagger$  5 M GdmHCl, 25 °C = -2.7 kJ mol<sup>-1</sup>). Die Reste befinden sich im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Domäne in den Windungen 7 und 10. Die Mutanten V321L, V498L und V523L ist die Aktivierungsenergie bei thermischer Denaturierung mäßig verringert, bei chemisch-induzierter Entfaltung verhalten sie sich jedoch wildtyp-ähnlich. Die restlichen sieben Mutationen haben keinen Einfluss auf die Entfaltungsgeschwindigkeiten.

### **3.4. Einfluss der Punktmutationen auf die Struktur des Tailspike trimers**

Innerhalb der letzten 15 Jahre wurden verschiedene Strukturmodelle der N-terminal verkürzten Variante des P22 Tailspikeproteins und einiger Mutanten veröffentlicht. Diese Strukturen konnten u.a. zum Verständnis der Substratkatalyse und dem Funktionsmechanismus von *tsf*- und *su*-Mutationen auf atomarer Ebene beitragen (Steinbacher et al., 1994, Steinbacher et al., 1997b, Baxa et al., 1999, Schuler et al., 2000). Kürzlich ist es Anait Seul und Jürgen Müller gelungen, die Struktur des vollständigen Tailspikeproteins bei einer Auflösung von 1.65 Å zu klären (Seul, 2008). Bisher konnten Strukturen der N-terminalen Capsidbindedomäne (PDB-Code: 1LKT, 5-108, (Steinbacher et al., 1997a)) und der C-terminalen Rezeptorbindedomäne TSP $\Delta$ N (PDB-Code: 1TYV, 113-666, (Steinbacher et al., 1994)) nur separat gelöst werden, da Kristalle des kompletten Tailspikeproteins von nur geringer Qualität waren. Diese Tatsache wurde auf die hohe Flexibilität des Interdomänenlinkers (109-112) zurück geführt, dem bisher in keiner Struktur Elektronendichte zugeordnet werden konnte. Seul und Müller war es nun gelungen, durch Einfügen der Punktmutation Y108W die Flexibilität des linkers einzuschränken, hochauflösende Proteinkristalle zu erzeugen, Elektronendichte für den linker-Bereich zu identifizieren und die erste Struktur eines vollständigen Tailspikes zu lösen.

Um den Einfluss der eingefügten Alanine und Leucine auf die Packung des hydrophoben Lumens der  $\beta$ -Helix Domäne auf atomarer Ebene zu klären, wurden die Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L und der TSP $\Delta$ N Wildtyp kristallisiert. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, vermindern die vier Mutationen die kinetische Stabilität des Tailspikeproteins mäßig bis stark. Mittels Röntgenbeugung und molekularen Ersatz konnten die Kristallstrukturen in Zusammenarbeit mit Dr. Jürgen Müller aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch gelöst werden. Im folgenden wird das im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Strukturmodell des TSP $\Delta$ N Wildtypproteins bei 100 K mit einer bei RT gemessenen 1.56 Å Struktur (Steinbacher et al., 1997a) verglichen. Auf dieser Grundlage werden dann in 3.4.3 die Strukturen von V125A, V450A, V125L und V349L besprochen.

#### **3.4.1 Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung des Wildtyps und der Mutanten V125A, V125L, V450A und V349L**

Proteinkristalle des TSP $\Delta$ N Wildtyps und der Mutanten wuchsen nach den von Stefan Steinbacher eingeführten Konditionen im hängenden Tropfen innerhalb von ein bis zwei Tagen bei 4 °C. Die Kristalle wurden aus dem Tropfen in glycerolhaltigen Kryopuffer transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Beugungsmuster von hochauflösenden Kristallen wurden von Dr. Jürgen Müller mit

Synchrotronstrahlung unter Kryobedingungen bei 100 K aufgenommen und mit dem Programmpaket XDS (Kabsch, 1993) zusammengefügt und verarbeitet. Die Streuqualität der untersuchten Kristalle war hoch, sodass Reflexe in einem Auflösungsbereich von 50 Å bis 1.5 Å (wt, V125A, V125L) oder bis 1.55 Å (V450A, V349L) detektiert wurden.

Tabelle A1 im Anhang der Arbeit fasst die Datensatz- und Verfeinerungsstatistiken der Proteinstrukturen zusammen. Analog zu allen bisher untersuchten TSP $\Delta$ N Proteinen ist die Raumgruppe der Einheitszelle P2<sub>1</sub>3, d.h. primitiv kubisch, mit Winkeln von 90 °C und Kantenlängen von circa 120 Å (Steinbacher et al., 1994, Baxa et al., 1999, Schuler et al., 2000). Die Qualität der Datensätze ist hoch, so liegen beispielsweise bei Berücksichtigung der äußeren Auflösungsschale die Vollständigkeitsgrade zwischen 68.8 % (V450A) und 89.3 % (V125A). Im Mittel wurde jeder Reflex etwa 10 mal gemessen. Die kristallographischen Temperaturfaktoren sind gering und liegen zwischen 15.5 Å<sup>2</sup> für V450A und 18.4 Å<sup>2</sup> für 125A, d.h. die mittlere Auslenkung um die Gleichgewichtsposition der Atome ist 0.443 Å für V450A bzw. 0.483 Å für V125A.

Die Phasen der Strukturfaktoren wurden mit der Methode des molekularen Ersatzes bestimmt, indem die Strukturen des Wildtyps (PDB-Code: 1TYV) oder der Mutanten V125L (PDB-Code: 2VFO) oder V450A (PDB-Code: 2VFQ) als Suchmodelle in der Einheitszelle dienten. Die dabei erhaltenen Strukturmodelle wurden durch mehrere alternierende Verbesserungsrounds mit REFMAC5 (Murshudov et al. 1997) und manuell mit dem Visualisierungsprogramm O7 (Jones et al., 1991) verfeinert und vervollständigt. Dabei dienten die kristallographischen R-Werte als Maß für den Verbesserungsfortschritt. Die R-Werte berechnen sich aus dem Verhältnis der beobachteten Strukturfaktoren ( $F_o$ ) und der durch das Modell kalkulierten Strukturfaktoren ( $F_c$ ) nach  $R = \frac{\sum | |F_o| - |F_c| |}{\sum |F_o|}$ . Durch das Einfügen von Wassermolekülen und anderen Heteroatomen konnten die Modelle optimiert werden, sodass die R-Werte der in der RCSB Proteindatenbank hinterlegten Strukturfiles zwischen 11.6 % (V450A) und 13.6 % (wt) liegen. R-Werte von Vergleichsdatsätzen, welche von der Verfeinerung ausgeschlossen wurden ( $R_{\text{free}}$ , 5 % der Gesamtgröße), sind 14.4 % (V125L) bis 16.4 % (wt).

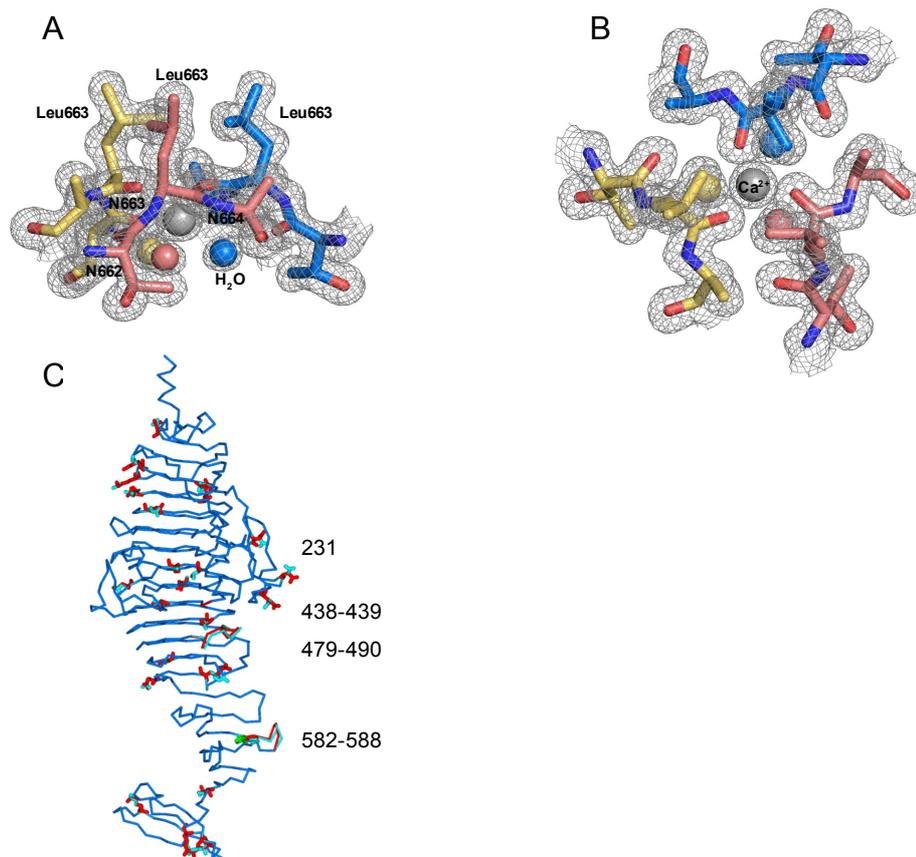
### **3.4.2 Besonderheiten der Struktur des TSP $\Delta$ N Wildtypproteins bei 100 K**

Im Strukturmodell des TSP $\Delta$ N Wildtyps sind die Reste 112 bis 666 aufgelöst. Die Bereiche 401 bis 406 und 508 bis 512, welche in bei Raumtemperatur detektierten Strukturen fehlen, können hier in der 1.5 Å Dichtekarte positioniert werden.

825 Wassermoleküle pro Monomer bilden die geordnete Hydrathülle des Proteins. Entlang der Trimerachse der  $\beta$ -Helix Domäne erstreckt sich ein lösungsmittelzugänglicher Kanal und auch an den Untereinheitenkontaktflächen im Bereich der  $\beta$ -Helix Domäne sind teilweise Wassermoleküle lokalisiert. Die Kontaktflächen der verwundenen C-terminalen "Schwanzflossen" und der Kern der  $\beta$ -Helix Domäne sind dicht gepackt und weitestgehend frei von Wasser. Aus dem Kristallisations- und Kryopuffer sind zwei Sulfationen und 12 Glycerole pro Monomer an der Proteinoberfläche gebunden. Am äußersten C-terminalen Ende wird ein Calciumion auf der dreizähligen Trimerachse durch drei Wasser und die Rückgrat Carbonylsauerstoffe der Reste 663 aus jeweils einer Untereinheit oktaedrisch koordiniert

### 3. Ergebnisse

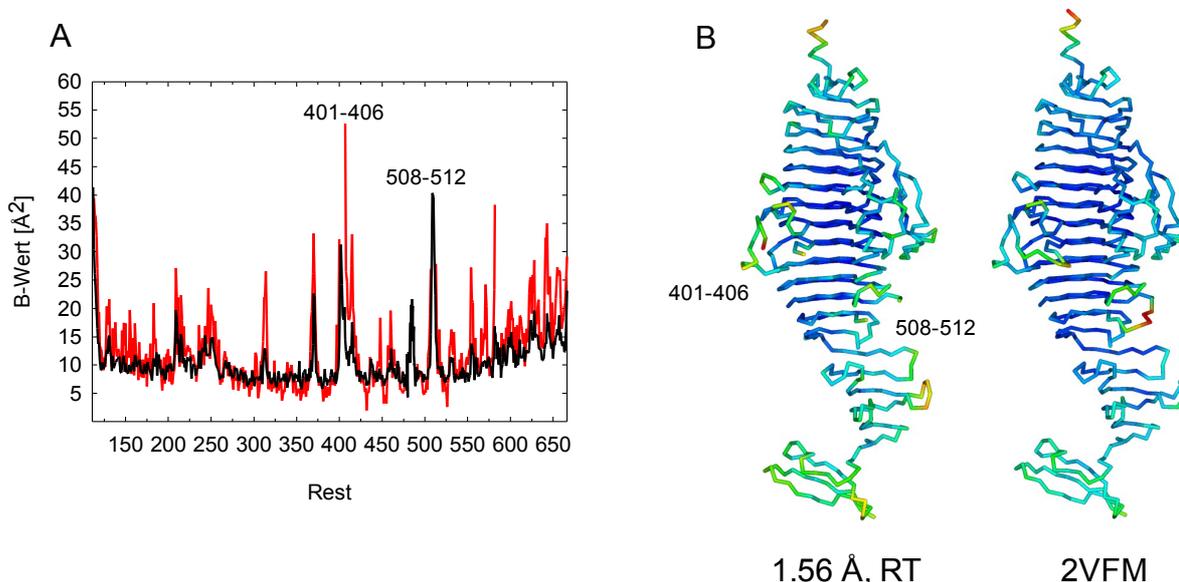
(siehe Abbildung 3.21 A+B). Die Gegenwart von 0 mM bis 10 mM des Komplexbildners EDTA bei thermischen Denaturierungsexperimenten bei 71 °C und 2 % SDS beeinflusst die Entfaltungsrate nicht (Daten nicht gezeigt). In der Elektronendichtekarte konnten 48 Seitenketten alternative Rotamerkonformationen zugewiesen werden (Abbildung 3.21 C). In den Bereichen 231, 438-439, 479-490 und 582-588 nimmt zudem das Peptidrückgrat alternative Konformationen ein. Bei der Darstellung der Torsionswinkel Phi ( $\Phi$ , N-C $\alpha$ ) und Psi ( $\Psi$ , C $\alpha$ -C) des Peptidrückgrats wurde I504 im Ramachandran-Plot als einziger „Ausreißer“ deklariert. Die Torsionswinkel sind  $\Phi = +82.24^\circ$  und  $\Psi = +125.25^\circ$ .



**Abbildung 3.21: Strukturelle Eigenschaften des TSP $\Delta$ N Wildtyps bei 100 K. A+B)** Elektronendichtekarte (2Fo-Fc, bei 1  $\sigma$  konturiert) und Modell der Calciumbindestelle am C-Terminus des Tailspike-trimers. Das Calciumion (grau) wird durch Carbonylsauerstoffe der Leucine 663 aus den drei Nachbaruntereinheiten (gelb, lachsfarben und blau) und durch drei Wassermoleküle (gelb, lachsfarben und blau) koordiniert. **A)** Blick von der Seite und **B)** entlang der Trimerachse vom N- zum C-Terminus. **C)** Abbildung des Peptidrückgrats des Tailspikeproteinmonomers. Seitenketten, welche alternative Konformationen einnehmen, sind in rot und cyan dargestellt. Die Seitenkette des Histidins 579 nimmt drei alternative Konformationen ein (grün). In den Bereichen 231, 438-439, 479-490, 582-588 sind alternative Rückgratkonformationen im Wildtypprotein zu beobachten (ebenfalls rot und cyan dargestellt).

In Abbildung 3.22 A und B sind die Temperaturfaktoren der C $\alpha$ -Atome für die hier aufgeklärte Struktur und die 1.56 Å Struktur bei Raumtemperatur verglichen. Bei Tieftemperatur ist die Auslenkung der C $\alpha$ -Atome von der Ruhelage deutlich geringer als bei Raumtemperatur. Die B-Werte sind am N-Termi-

nus nahe der flexiblen *linker*-Region, in der „Bauchflosse“ (397-425) und im lösungsmittelzugänglichen *turn* der Windung 12 der  $\beta$ -Helix Domäne hoch. Die Regionen 401-406 und 508-512 sind flexibel und liefern bei Raumtemperatur keine Elektronendichte. Der Kern der  $\beta$ -Helix Domäne ist starr, während die *turns*, „Schwanz-“, „Bauch-“ und „Rückenflossen“ beweglicher sind.



**Abbildung 3.22: Darstellung der Temperaturfaktoren der  $C\alpha$ -Atome. A)** B-Werte an den Positionen in der Aminosäuresequenz bei RT (rot; 1.56 $\text{\AA}$ , RT) und 100 K (schwarz; PDB-Code: 2VFM). **B)** Strukturelle Zuordnung der Temperaturfaktoren. Die Farbskala verläuft von niedrigen (blau) zu hohen (rot) B-Werten.

### 3.4.3 Vergleich der Strukturen der Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L und dem Wildtyp

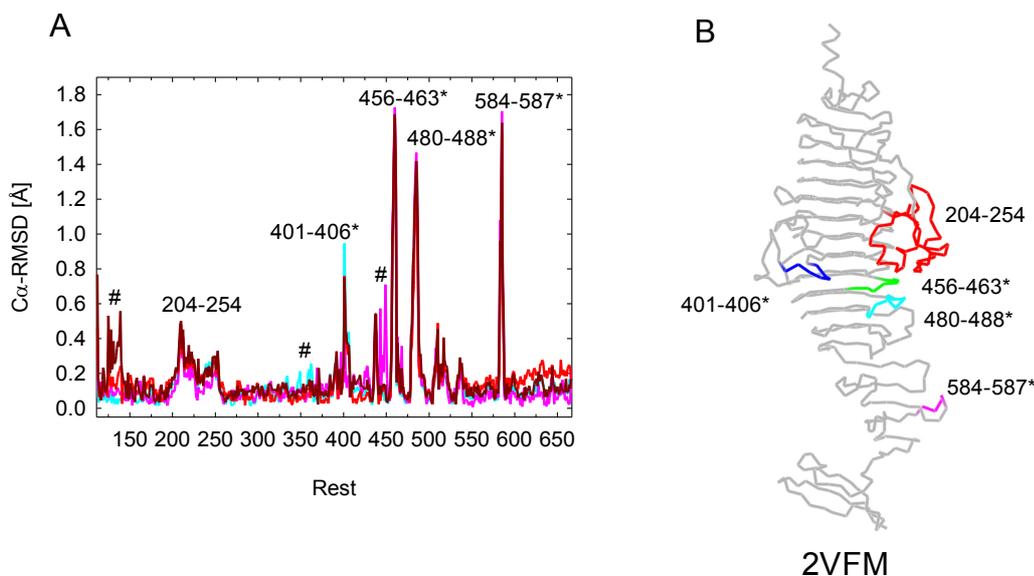
In dieser Arbeit wurden Valine an unterschiedlichen Positionen entlang der  $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins gegen Alanine und Leucine substituiert. Beim Einfügen eines Valins gegen ein Leucin wird das Seitenkettenvolumen im Inneren der  $\beta$ -Helix um eine Methylengruppe vergrößert. Beim Austausch eines Alanins werden eine Methyl- und eine Methylgruppe entfernt.

Analog zum TSP $\Delta$ N Wildtyp konnten die Kristallstrukturen der vier Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L bis zu einer Auflösung von 1.5  $\text{\AA}$  gelöst werden. Die Substitutionen sind in den Elektronendichten klar definiert und die kristallographischen Temperaturfaktoren im Bereich der Mutationsstellen sind niedrig.

Mit dem Programm LSQKAB (Kabsch, 1976) wurden die  $C\alpha$ -Atome der Konformation mit dem höchsten Besetzungsgrad von Wildtyp und Mutanten superpositioniert. Die ausgegebenen mittleren quadratischen Abweichungen sind gering und für V125L 0.27  $\text{\AA}$ , für V349L 0.24  $\text{\AA}$ , für V125A und V450A 0.25  $\text{\AA}$ . Ein Vergleich der  $C\alpha$ -Atome der bei Kryobedingungen und Raumtemperatur gemessenen Wildtypproteine liefert mit 0.36  $\text{\AA}$  einen größeren Unterschied. Die Standardunsicherheit der Atomkoordinaten ist für die aufgeklärten Strukturen geringer als 0.09  $\text{\AA}$  (s. Tabelle A1 im Anhang). In Abbil-

### 3. Ergebnisse

Abweichungen von 3.23 Å sind die  $C_{\alpha}$ -Abweichungen zwischen Wildtyp und den Mutanten für jeden Rest in der Aminosäuresequenz aufgetragen. In Bereichen, in denen das Peptidrückgrat im Wildtyp und/oder in den Mutanten alternative Konformationen einnimmt sowie im Bereich der flexibleren „Rückenflosse“ (197-259) sind die Unterschiede groß. Substitutionsspezifische Veränderungen sind gering und betreffen nur die direkte Umgebung der jeweiligen Mutationsstelle. In diesen Bereichen liegen die  $C_{\alpha}$ -Abweichungen für V125L und V450A bei etwa 0.6 Å. Bei V125A und V349L liegen sie unter 0.2 Å.



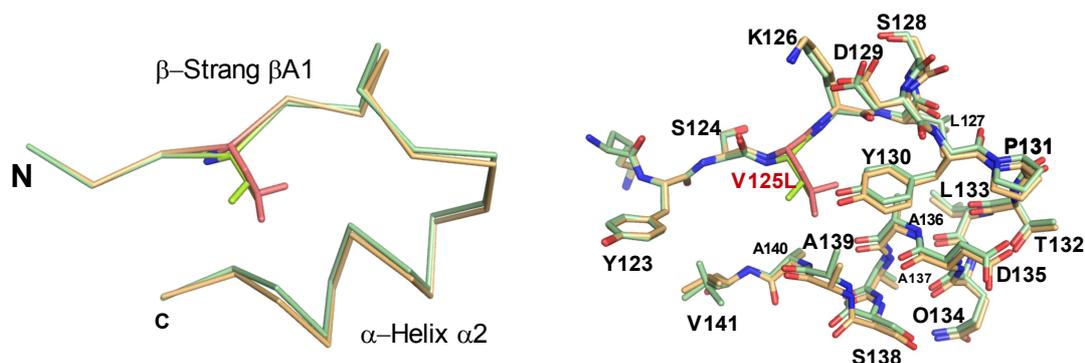
**Abbildung 3.23:  $C_{\alpha}$ -RMSD an allen Positionen in der Aminosäuresequenz. A)** Abweichungen zwischen dem TSP $\Delta$ N Wildtyp und V125A (–), V450A (–), V125L (–) und V349L (–). Die \* kennzeichnen Regionen mit alternativen Rückgratkonformationen. Die # markieren substitutionsspezifische Unterschiede. **B)** Strukturelle Zuordnung von Bereichen mit besonders hohen  $C_{\alpha}$ -Abweichungen zwischen Wildtyp und den Mutanten.

In Abbildung 3.24 sind die Strukturmodelle des Wildtyps und der Mutanten V125L bzw. V450A übereinander gelegt. Beide Mutationen induzieren lokale Veränderungen der Tertiärstruktur, welche ausschließlich die Windung der  $\beta$ -Helix betreffen in der sich der Rest befindet. Valin 125 liegt in der N-terminalen *capping*-Region. In den Kristallstrukturmodellen des Wildtyps und V125L weisen an Position 125 die Endgruppen der Seitenketten, d.h.  $C_{\chi 1}$  und  $C_{\chi 2}$  des Valins im Wildtyp bzw.  $C_{\delta 1}$  und  $C_{\delta 2}$  des Leucins in V125L, in entgegengesetzte Richtungen. Im Inneren des hydrophoben Kerns sind die umliegenden Seitenketten dem Leucin ausgewichen und das Peptidrückgrat des  $\beta$ -Strangs  $\beta A1$  und der gegenüberliegenden  $\alpha$ -Helix  $\alpha 2$  sind etwas verschoben, wodurch die gesamte Windung geweitet ist und die nach außen weisenden Seitenketten verrückt sind.

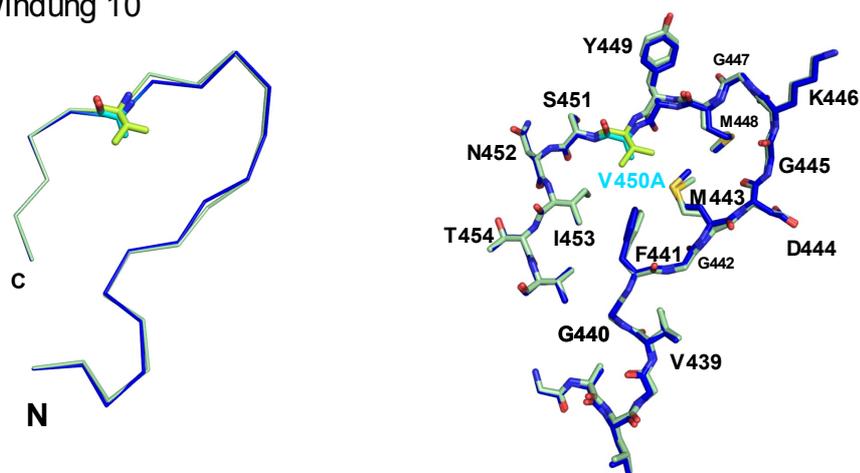
Position V450 ist in Windung 10 der  $\beta$ -Helix Domäne lokalisiert. Wie Abbildung 3.24 verdeutlicht, sind auch hier die durch Einfügen eines Alanins ausgelösten strukturellen Veränderungen klein. Gegenteilig zu V125L sind die der Mutationsstelle gegenüberliegenden Seitenketten F441 und M443 und das Peptidrückgrat in die entstandene Kavität vorgerückt.

Beim visuellen Vergleich der Strukturmodelle des Wildtyps mit V125A und V349L sind bis auf die deletierten bzw. eingefügten Atome kaum Unterschiede sichtbar (keine Abbildung). Bei 125A ist an Position 125 die Seitenkette und das Peptidrückgrat minimal in die Kavität verschoben. Bei 349L ist das Rückgrat an der Mutationsstelle wildtyp-ähnlich, jedoch ist auf der gegenüberliegenden Seite die Seitenkette von V362 durch das Leucin 349 verdrängt worden.

#### A) Position 125 – *capping*-Region



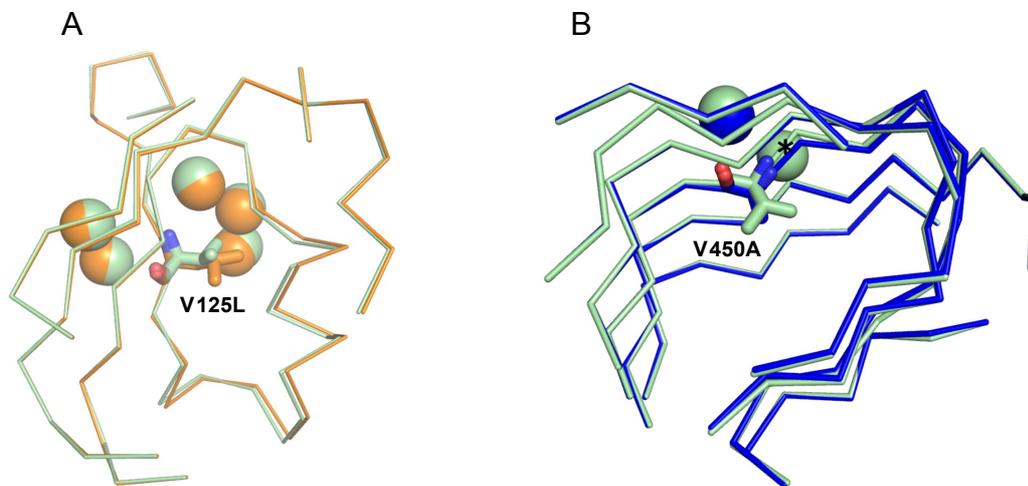
#### B) Position 450 – Windung 10



**Abbildung 3.24: Vergleich der Kristallstrukturmodelle von Wildtyp und der destabilisierten Mutanten V125L und V450A.** **A)** Strukturelle Unterschiede in der *capping*-Region bei Superposition der  $C\alpha$ -Atome des Wildtyps (hellgrün) und der Mutante V125L (orange). Das Valin (grün) wurde gegen ein Leucin (rot) ausgetauscht. Blick vom N-Terminus auf die *capping*-Region. **B)** Darstellung des Wildtyps (hellgrün) und der Mutante V450A (blau). Die Seitenkette des Valins ist grün und die des eingefügten Alanins ist cyan dargestellt. Blick vom C-zum N-Terminus.

Beim Vergleich der geordneten Wassermoleküle in der näheren Umgebung der Substitutionen zeigt sich, dass diese unverändert sind. An der N-terminalen *capping*-Region bei Position 125 sind Wassermoleküle innerhalb eines Radius von 5.2 Å in Wildtyp und den Mutationen V125A und V125L gleich lokalisiert (siehe Abbildung 3.25). Im zentralen hydrophoben Kern der  $\beta$ -Helix Domäne an Positionen 349 und 450 befinden sich keine Wassermoleküle. Der durch Einfügen eines Alanins frei gewordene

Raum wird in keiner der Strukturen von geordnetem Wasser besetzt.



**Abbildung 3.25: Wassermoleküle Nahe der Aminosäuren 125 und 450. A)** Wassermoleküle innerhalb eines Radius von 5.2 Å im Wildtyp (hellgrün) und V125A (orange). Ansicht vom C- zum N-Terminus. **B)** Wassermoleküle innerhalb von 5.0 Å von Position 450 im Wildtyp (grün) und der Mutante V450A (blau). Das mit \* gekennzeichnete Wasser hat kein Äquivalent in der Struktur von V450A. Aufsicht ist vom C-zum N-Terminus.

Eriksson et al. hatten beobachtet, dass die Stärke des destabilisierenden Effekts von „Ile-zu-Ala-Mutationen“ im hydrophoben Kern des T4 Phagen Lysozyms durch einen festen Term, welcher durch die gegenüber dem Isoleucin verminderte Hydrophobizität des Alanins hervorgerufen ist, und durch die Größe des durch die Mutation entstandenen Hohlraums bedingt wird (Eriksson et al., 1992). Im T4 Lysozym relaxierte an einigen Positionen die Polypeptidkette bei Verkleinerung Seitenkettenvolumen. In anderen Bereichen blieben Seitenketten und Rückgrat im Vergleich zum Wildtyp unverändert, wodurch ein Hohlraum in den hoch aufgelösten Kristallstrukturen beobachtet wurde. Mutationen, welche eine große Höhlung erzeugten destabilisierten das Protein stärker als Mutationen, bei denen die Kette um die Mutationsstelle relaxierte (Eriksson et al., 1992).

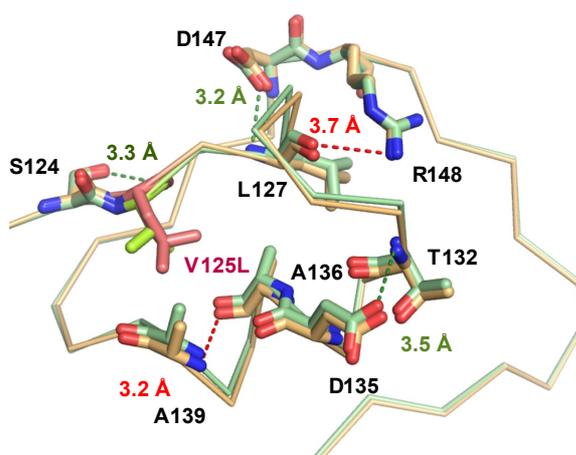
Das Webtool CASTp (*computed atlas of surface topography of proteins*; URL: <http://sts-fw.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php>; abgerufen am 13.9.2009) bestimmt Taschen an Proteinoberflächen und vom Lösungsmittel abgeschlossene Kavitäten im Proteininneren mit einer Kugelprobe nach Richards (*solvent accessible surface*) und Connolly (*molecular surface*), (Dundas et al., 2006, Richards, 1977, Connolly, 1983). Eine Analyse der hier erzeugten Kristallstrukturen mit CASTp bei einem Kugelradius von 1.4 Å zeigte, dass an Position 125 weder im Wildtypprotein noch in den Mutanten V125A und V125L ein detektierbarer Hohlraum im Inneren des Kerns vorhanden ist (s. Tabelle A5 im Anhang). An Position 349 wurde im Wildtypprotein eine kleine Kavität mit einem Volumen von circa 19 Å<sup>3</sup> und einer Länge von 4 Å gefunden, welche sich von Windung 7 (Position 349) bis Windung 8 erstreckt. In der Struktur der Mutante V349L ist dieser Hohlraum durch das größere Seitenkettenvolu-

men des Leucins ausgefüllt. An Position 450 befindet sich im Wildtypprotein eine große Kavität mit einem Volumen von  $106 \text{ \AA}^3$  und einer Länge von  $49 \text{ \AA}$ . Diese Kavität erstreckt sich von Windung 10 (Position 450) bis Windung 12 (Position 498). Ein Alanin an Position 450 grenzt nach CASTp-Analyse an keine im Inneren liegende Kavität an. Der Hohlraum ist in der Mutante V450A verkleinert und erstreckt sich dort entlang der Windungen 11 und 12. Sein Volumen ist auf  $37 \text{ \AA}^3$ , die Länge auf  $13 \text{ \AA}$  vermindert.

Die Auswertungen der Strukturmodelle mit LSQKAB und CASTp zeigen, dass die Windungen der  $\beta$ -Helix formbar sind und sich an die jeweilige Substitution anpassen. Eine starre Polypeptidkette, wie sie in einigen Bereichen des T4 Lysozyms von Eriksson beobachtet wurde, ist weder am äußeren Rand (Position 125) noch im Zentrum der  $\beta$ -Helix Domäne (Positionen 349 und 450) sichtbar. Die Mutationen V125A und V450A erzeugen keine großen Hohlräume durch welche die unterschiedlichen kinetischen Stabilitäten erklärt werden könnten. Auch Baxa und Schuler hatten die hohe Plastizität der  $\beta$ -Helix Domäne beobachtet und diskutiert (Baxa et al., 1999, Schuler et al., 2000).

Der stabilisierende Effekt von Wasserstoffbrückenbindungen ist mit circa  $5.4 \text{ kJ/mol}$  im Vergleich zur gesamten konformationellen Stabilität von kleinen globulären Proteinen ( $0$  bis  $80 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) hoch, ihre Deletion kann deshalb einen beträchtlichen Effekt auf die Proteinestabilität haben (Shirley et al., 1992, Dong et al., 2008, Pfeil, 2001).

Wasserstoffbrückenbindungen an den Untereinheitenkontakflächen wurden mit dem PISA-Server (*Protein Interfaces Surfaces and Assemblies*; URL: [http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/cgi-bin/piserver](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver); abgerufen am 13.9.2009) im Bereich der Mutationen analysiert. PISA untersucht Grenzflächen in Kristallstrukturen, um Informationen über mögliche Assemblierungszustände herzuleiten. Dabei werden auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen Polypeptidketten ausgegeben. Im Wildtyp und den Mutanten bilden an der Untereinheitenkontakfläche die gleichen Donor- und Akzeptorpaare Wasserstoffbrücken aus.



**Abbildung 3.26: Spezifische Wasserstoffbrücken im TSP $\Delta$ N Wildtyp und der Mutante V125L.** Wildtyp-spezifische Wasserstoffbrücken sind grün dargestellt und V125L-spezifische rot. Blick vom N-Terminus auf die *capping*-Region.

Wasserstoffbrücken innerhalb einer Untereinheit wurden mit dem Whatif-Server (*optimal hydrogen bonding network*; URL: <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>; abgerufen am 13.9.2009) untersucht (Hoof et al., 1996a). Whatif bestimmt für V125L und den Wildtyp fünf Wasserstoffbrücken, die in der Nähe von Position 125 unterschiedlich sind (Abbildung 3.26). Von ihnen sind drei spezifisch für den Wildtyp und zwei 125L-spezifisch. Bei V125A werden von Whatif vier wildtyp-spezifische und eine 125A-spezifische Wasserstoffbindung detektiert. Beim Vergleich der Wasserstoffbrücken des Wildtyps und V450A werden insgesamt zehn Unterschiede gefunden, wobei der Wildtyp zwei spezifische Wasserstoffbrücken und V450A acht spezifische bildet. Für V349L sind alle Wasserstoffbrücken dem Wildtyp entsprechend.

Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der von Whatif analysierten spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen und der beobachteten Verminderung der kinetischen Stabilität der Mutanten ist nicht offenkundig. Es ist anzumerken, dass die Energie der Bindung durch Bindungswinkel und den Abstand des Donor-Akzeptorpaars bestimmt ist. Unterschiedliche Wasserstoffbrücken können somit unterschiedlich zur Proteinstabilität beitragen. Mit 3.2 Å bis 3.7 Å zwischen Donor und Akzeptor sind die von Whatif spezifisch für V125L und den Wildtyp detektierten Distanzen groß und die Bindungen eher schwach.

Die Strukturmodelle der Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L beinhalten unterschiedlich viele Wassermoleküle, Sulfationen, Glycerole, alternative Seitenketten- und Rückgratkonformationen (s. Tabelle A1 im Anhang). Eine Herleitung der destabilisierenden Effekte mit Hilfe von bioinformatischen Hilfsprogrammen wie FoldX (URL: <http://foldx.crg.es/>; abgerufen am 13.9.2009) oder FIRST (*Floppy Inclusions and Rigid Substructure Topography*; URL: <http://flexweb.asu.edu/software/first/>; abgerufen am 13.9.2009) bei Verwendung der unterschiedlichen Kristallstrukturen ist nicht möglich, da sich die kleinen Differenzen der Strukturkoordinaten summieren und letztendlich das Gesamtbild bestimmen. FoldX ist ein auf empirischen Beobachtungen basierender Algorithmus zur Berechnung von Stabilitätsunterschieden kleiner, globulärer Proteine (Schymkowitz et al., 2005, Reich et al., 2009). FIRST analysiert flexible Bereiche in Proteinstrukturen und wurde unter anderem auch zur Simulation von Proteinfaltung und des Übergangszustandes herangezogen (Rader et al., 2002).

Die Mutationen V125A, V450A, V125L, V349L setzen die kinetische Stabilität des Tailspikeproteins herab, jedoch sind die durch die Mutationen induzierten strukturellen Veränderungen in Bezug auf die Geometrie des Peptidrückgrats und die Seitenkettenpackung und -stapelung im Lumen der  $\beta$ -Helix gering. Dies verdeutlicht, dass das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix Veränderungen an verschiedenen Positionen ausgleichen kann.

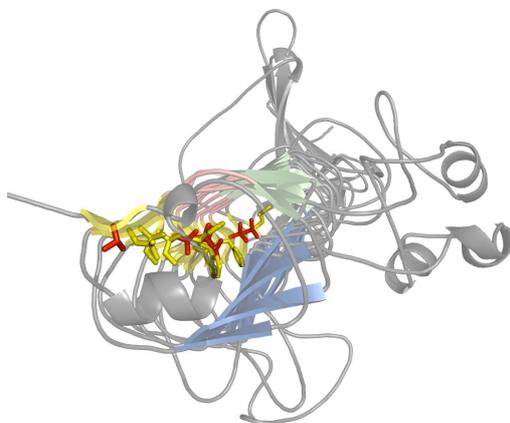
## 4. Diskussion

Im  $\beta$ -Faltblatt A der parallelen  $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins bilden die Aminosäuren V125, L144, I167, I190, V272, M292, V321, V349, F381, I428, V450, F472, V498, V523 und L540 einen ausgedehnten, begrabenen Seitenkettenstapel (Abbildung 4.1 A).

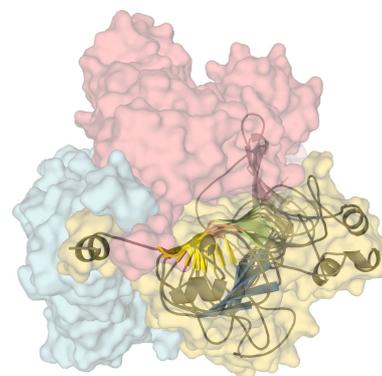
**A**

	i	a	a	a	a	i	a	a	a	a	i	a	a							
cap	v																			
1	G	L	L	.	.	Y	.	N	.	.	.	E	T	V	D					
2	T	I	E	.	.	F	.	I	.	.	.	.	L	I	F	T				
3	S	R	I	A	G	V	F	M	.	E	.	.	L	E	I	R				
4	V	E	V	H	R	A	S	G	.	L	M	A	.	G	F	L	F	R		
5	C	K	M	V	D	A	N	N	P	S	G	G	K	D	G	I	I	T	F	E
6	N	Y	V	I	G	G	R	T	.	S	Y	G	S	V	S	S	A	Q	F	L
7	.	G	V	I	G	F	T	S	.	Y	R	A	G	E	S	G	V	K	T	W
8	L	E	F	R	D	S	V	V	.	I	Y	P	V	W	D	G	F	D	L	G
9	H	L	I	D	N	L	L	V	.	R	G	A	L	G	V	G	F	G	M	D
10	M	Y	V	S	N	I	T	V	.	E	D	C	A	G	S	G	A	Y	L	L
11	S	V	F	T	N	I	A	I	.	I	D	T	.	N	Q	I	Y	I	S	.
12	C	R	V	N	G	L	R	L	.	.	.	.	L	T	I	D	A	P	.	.
13	S	T	V	S	G	I	T	.	.	.	.	.	.	.	.	I	N	V	.	.
$\beta$ -Faltblatt	A			B				C												
*	PB2			PB3				PB1												

**B**



**C**



**Abbildung 4.1: Strukturelle Einordnung des analysierten Seitenkettenstapels im P22 Tailspikeprotein.** **A)** Alignment der übereinander liegende Aminosäuren in den Windungen 1 bis 13 der  $\beta$ -Helix Domäne. In den Spalten sind die nach innen (i) und nach außen (a) weisenden Reste der Domäne arrangiert. Punkte indizieren eingefügte oder deletierte Reste in der  $\beta$ -Helix. Aminosäuren der  $\beta$ -Faltblätter A, B, und C sind gelb, grün und blau hinterlegt. Reste des in dieser Arbeit analysierten Seitenkettenstapels sind fett gedruckt. \* PB1, PB2 und PB3 beziehen sich auf die von Yoder eingeführte Nomenklatur von  $\beta$ -Faltblättern in Pektatlyasen (Yoder et al., 1993). Die Abbildung wurde nach Steinbacher adaptiert (Steinbacher et al., 1997). **B)** Strukturmodell einer Tailspikeuntereinheit. Die farbige Markierung der  $\beta$ -Faltblätter A, B und C ist analog zu Abbildung A. In lachsfarben ist der kurze T1 *turn* dargestellt. Die Seitenketten des hydrophoben Stapels im Faltblatt A sind als *sticks* dargestellt. Die durch Alanin und Leucin substituierten Valine sind rot gefärbt. **C)** Assoziation der Untereinheiten (hellblau, rosa und orange) im Homotrimer und Lokalisation der  $\beta$ -Faltblätter. Blickrichtung in den Abbildungen B und C ist vom N- zum C-Terminus der Proteine.

Die Reste befinden sich in aufeinander folgenden Windungen des Strukturmotivs mit regelmäßigen  $C\alpha$ -Atomabständen zwischen 4.6 Å bis 5.3 Å (Tabelle A5 im Anhang). Auch die  $C\beta$ -Atome der Seitenketten sind regelmäßig angeordnet. Zwischen Valin 125 und Leucin 144 ist der Abstand der  $C\beta$ -Atome mit 5.7 Å im Vergleich zu allen anderen Seitenketten, deren  $C\beta$ -Atomabstände zwischen 4.4 Å und 5.4 Å liegen, besonders groß. Die Ausrichtung der  $C\beta$ -Atome bzw. der Torsionswinkel  $\chi_1$  ist an allen Positionen des Stapels einheitlich. Die Anordnung der folgenden Seitenkettenatome und der Torsionswinkel  $\chi_2$ , ist an den meisten Positionen regulär.

Die  $\beta$ -Faltblätter der  $\beta$ -Helix Region bilden im Querschnitt eine L-förmige Topologie (siehe Abschnitt 1.2.1). Dabei formen die einzelnen  $\beta$ -Stränge A und C ein antiparalleles  $\beta$ -sandwich und der kurze, invariante *turn* T1 verbindet Strang A mit Strang B, welcher im Winkel von etwa 100 ° zu A und C positioniert ist (Abbildung 4.1 B). Die  $C\alpha$ -Atome des hier untersuchten Seitenkettenstapels sind je nach Enge der Windung etwa 8 Å bis 10 Å von dem nächsten im gegenüberliegenden Faltblatt C lokalisierten  $C\alpha$ -Atom entfernt (Tabelle A5). Nach innen gerichtete Seitenketten der  $\beta$ -Faltblätter sind somit in dichtem Kontakt.

Im oligomeren Kontext des Tailspike trimers stellt der *turn* T1 gewissermaßen die Wirbelsäule der drei Rücken-an-Rücken stehenden Untereinheiten dar (Abbildung 4.1 C). Die  $\beta$ -Faltblätter A und B bilden die hydrophoben Grenzflächen zwischen den Untereinheiten.

### **4.1. Lokale und globale Auswirkungen von Valin-zu-Alanin- und Valin-zu-Leucin-Mutationen auf Struktur und Stabilität des $\beta$ -Helix Strukturmotivs im Tailspikeprotein**

Die Stabilität eines Proteins ist ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Einflüsse. Die Stärke von Mutationseffekten kann durch Faktoren wie i) der Hydrophobizität des eingefügten Restes (Pace, 1992, Dong et al., 2008), ii) Lösungsmittelzugänglichkeit der Mutationsstelle (Takano et al., 1998, Myers et al., 1995), iii) Packungsdichte im Proteinkern (Baldwin & Matthews, 1994, Lim et al., 1992), iv) Größe der entstandenen oder entfernten Kavität (Eriksson et al., 1992, Ishikawa et al., 1993) v) Anzahl der umliegenden Methyl- und Methylengruppen (Jackson et al., 1993), vi) Anzahl von deletierten bzw. eingefügten elektrostatischen Interaktionen (Shirley et al., 1992, Pace, 2001) und vii) Torsionsstress des Peptidrückgrads (Schuler et al., 2000) beeinflusst werden. Durch ihre komplexe Struktur ist bei globulären Proteinen, an denen ein Großteil der Stabilitäts- und Faltungsanalysen durchgeführt wurde, der Beitrag dieser Faktoren an verschiedenen Mutationsstellen umgebungsbedingt unterschiedlich. *Repeat*- und *Solenoid*proteine wie das P22 Tailspikeprotein ermöglichen eine systematische Untersuchung von Einflüssen der Tertiär- und Quartärstruktur auf die Proteinstabilität und Faltung in „einfacheren“, aber physiologisch relevanten Systemen.

Der Einfluss von Seitenkettenstapeln im Hinblick auf Stabilität, Faltung und Struktur des Tailspikepro-

teins wurde durch Austausch von sieben Valinen, die über die gesamte Länge der Helixachse positioniert sind, untersucht. Durch seine elongierte Form sich strukturell wiederholender Einheiten ermöglicht das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix die Analyse von Mutationseffekten im lokal ähnlichen Kontext der Helixwindung, jedoch in global unterschiedlichen Zusammenhängen.

Im folgenden Abschnitt werden die Auswirkungen der Mutationen auf thermodynamische Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix und Faltungsausbeute des trimeren Tailspikeproteins in Bezug auf die hoch aufgelösten Kristallstrukturen des Wildtyps (PDB-Code: 2VFM) und der Mutanten V125A (PDB-Code: 2VFN), V450A (PDB-Code: 2VFQ), V125L (PDB-Code: 2VFO) und V349L (PDB-Code: 2VFP) diskutiert. Die Standardunsicherheit der Atomkoordinaten ist für die hier diskutierten Strukturmodelle geringer als 0.09 Å (siehe Tabelle A1 im Anhang). In Tabelle A6 im Anhang sind zur Übersichtlichkeit alle Ergebnisse zusammengefasst.

Die Mutationen V272A, V321A und V349A, die in den zentralen  $\beta$ -Helixwindungen 4 bis einschließlich 7 lokalisiert sind, vermindern die thermodynamische Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix Domäne um etwa 11 bzw.  $12 \pm 2$  kJ mol<sup>-1</sup> (Abbildung 3.2). Weiter außen liegende Alanin-Mutanten sind nicht destabilisiert und mit etwa  $33 \pm 2$  kJ mol<sup>-1</sup> wildtyp-ähnlich stabil. Im kompletten trimeren Tailspikeprotein und auch in der aminoterminal verkürzten Variante TSP $\Delta$ N sind die Faltungsausbeuten von V272A, V321A und V349A *in vivo* und *in vitro* gleichermaßen vermindert. V272A und V321A sind dabei etwas stärker betroffen als die Mutante V349A. *In vivo* ist bei 37 °C und *in vitro* bei 35 °C die Reifung der Mutanten V272A und V321A zum SDS-resistenten Trimer unterbunden. Für V349A liegen die Faltungsausbeuten bei den jeweiligen Temperaturen *in vivo* und *in vitro* bei circa 10 %.

Auch zentral gelegene Leucin-Mutationen destabilisieren die isolierte  $\beta$ -Helix, während sie an den Enden der Domäne keine Effekte zeigen. Mit  $8 \pm 2$  kJ mol<sup>-1</sup> und  $9 \pm 2$  kJ mol<sup>-1</sup> sind jedoch die Einflüsse der Mutationen V321L und V349L auf die konformationelle Stabilität etwas weniger stark ausgeprägt als die der Alanin-Mutationen an diesen Positionen. Interessanterweise ist die Mutante V272L ebenso stabil wie der Wildtyp. Alle TSP $\Delta$ N Leucin-Konstrukte falten *in vivo* generell besser als Mutanten der Alanin-Reihe. Faltungsausbeuten von V272L und V349L sind bei 37 °C wildtyp-ähnlich, während die *in vivo* Faltungseffizienz von V321L bei 32 °C und bei 37 °C etwas geringer als die des Wildtypproteins ist. V272L faltet bei 39 °C, d.h. effektiver als der Wildtyp. *In vitro* sind bei 35 °C jeweils 10 % und etwa 25 % der Mutanten V321L und V349L korrekt in die SDS-resistente Form zurück gefaltet. Bei dieser Temperatur verhält sich die Mutante V272L wildtyp-ähnlich.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Stabilität der zentralen Region der  $\beta$ -Helix Domäne die Faltungsausbeuten des trimeren Proteins *in vivo* und *in vitro* bestimmen kann. Identische Mutationen an unterschiedlichen Positionen im hydrophoben Kern der parallelen  $\beta$ -Helix des P22 Tailspikeproteins destabilisieren die isolierte Domäne verschieden stark. Substitutionen an den Enden der  $\beta$ -Helix induzieren kleinere Effekte als Mutationen in den zentralen Windungen.

Da alle sieben Valine entlang der  $\beta$ -Helix gegen Alanine und Leucin substituiert wurden, die Mutanten

sich aber positionsabhängig unterschiedlich verhalten, sind die molekularen Charakteristika der eingefügten Aminosäure, wie Hydrophobizität oder Seitenkettenvolumen, nicht der einzige Schlüssel zum Verständnis der Stabilität der  $\beta$ -Helix. Vielmehr muss die Stärke der Destabilisierung durch den strukturellen Kontext der Mutationsstelle bedingt sein. Im folgenden werden daher die möglichen Einflussfaktoren dargestellt und diskutiert.

### **4.1.1 Besonderheiten nahe der Mutationsstellen**

#### *i) Hydrophobizität des eingefügten Restes*

Der Beitrag einer im Kern von globulären Proteinen begrabenen Methylengruppe zur Stabilisierungsenthalpie des gefalteten Proteins wurde unter anderem von Pace ausführlich untersucht (Pace, 1992). Bei 72 Mutanten aus vier unterschiedlichen Proteinen, in denen aliphatische Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin) gegen Alanin und Glycin ausgetauscht wurden, liegen die Beiträge von Methylengruppen zur Proteinstabilität zwischen 0 bis 10 kJ mol<sup>-1</sup>. Der Mittelwert ist  $5.4 \pm 2.1$  kJ mol<sup>-1</sup>. Für die bei der Analyse betrachteten 11 Valin-zu-Alanin-Mutationen ist die mittlere Stabilisierungsenthalpie  $5.2$  kJ mol<sup>-1</sup> pro CH<sub>2</sub>-Gruppe (Pace, 1992).

Die mittlere Stabilisierungsenthalpie pro Methylengruppe für die hier untersuchten  $\beta$ -Helix Konstrukte V272A, V321A und V349A ist mit  $5.7 \pm 1.7$  kJ mol<sup>-1</sup> ähnlich wie bei globulären Proteinen. Bei Berücksichtigung aller sieben Alanin-Mutanten ergibt sich jedoch ein sehr kleiner Mittelwert von  $2.7 \pm 3.8$  kJ mol<sup>-1</sup> pro CH<sub>2</sub>-Gruppe.

Die Hydrophobizität eines Alaninrestes ist mit einem Wert von 1.8 im Hydrophobizitätsindex deutlich geringer als die eines Valins, welches einen Wert von 4.2 aufweist (Kyte & Doolittle, 1982). Der Index von Leucin ist mit 3.8 valin-ähnlich.

#### *ii) Lösungsmittelzugänglichkeit der Mutationsstelle*

Die Lösungsmittelzugänglichkeiten der Seitenketten sind im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Region (Windungen 1 bis 12) weitestgehend einheitlich. Die hier ausgetauschten Reste sind im dicht gepackten hydrophoben Lumen geborgen und nicht zugänglich.

In der Kristallstruktur des TSP $\Delta$ N Wildtypproteins sind die wenigen geordneten Wasser im Inneren der  $\beta$ -Helix in den längeren *loops* der *turns* T2 und T3 lokalisiert. Ausnahmen sind drei Wassermoleküle, welche in den aufeinander folgenden kurzen T1 *turns* der Windungen 3, 4, und 5 nahe der Valine 272 und 321 gebunden sind. Im Umkreis von 5 Å befinden sich im Strukturmodell des Wildtypproteins (PDB-Code: 2VFM) bei V125 fünf Wasser, bei V272 drei Wasser (im Kern), bei V321 ein Wasser (im Kern), bei V349 kein Wasser, bei V450 zwei Wasser (an der Proteinoberfläche) und jeweils ein Wassermolekül nahe der Reste V498 und V523 (an der Proteinoberfläche), (Tabelle A5).

Im Vergleich zur Kristallstruktur des Wildtyps wurden keine veränderten Wassermoleküle in der näheren Umgebung der Mutationsstellen (Radius circa 5 Å) in den jeweiligen Strukturen bei V125A, V450A, V125L und V349L beobachtet.

Im sehr stabilen Trimerverbund sind die Reste V125 und V523 vom Lösungsmittel abgeschirmt. In den

Konstrukten der monomeren, isolierten  $\beta$ -Helix (109-544) könnten die *capping*-Region und die äußersten C-terminalen Windungen jedoch weniger dicht gepackt und zugänglich sein. Für das Wildtypprotein und Mutanten im Zentrum sowie der *capping*-Region der  $\beta$ -Helix scheint dies jedoch nicht zuzutreffen. Alanin-Mutationen am C-Terminus des BHX-Konstruktes scheinen allerdings die Fehlfaltung dieses Bereiches bei erhöhten Temperaturen zu fördern. Diese Beobachtungen werden im Rahmen des folgenden Kapitels 4.2 ausführlicher diskutiert.

### *iii) Packungsdichte im Proteinkern*

Der Kern der  $\beta$ -Helix Domäne ist dicht gepackt und beinhaltet hauptsächlich hydrophobe Reste. In der Struktur des Wildtyps sind die Distanzen der  $C\alpha$ -Atome der einzelnen Windungen im analysierten Stapel gering und liegen zwischen 4.7 Å und 5.3 Å, die Abstände der  $C\alpha$ -Atome der Faltblätter A und C liegen zwischen 8 Å und 10 Å (Tabelle A5).

Die Kristallstrukturen der Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L verdeutlichen, dass die Windungen der  $\beta$ -Helix formbar sind und die eingefügten Mutationen nur lokale und kleine Strukturveränderungen hervorrufen. Beim Austausch eines Valins gegen ein Alanin wird eine CH- und eine CH<sub>3</sub>-Gruppe deletiert. Dabei wird das Seitenkettenvolumen im Proteininneren um circa 49 Å<sup>3</sup> reduziert, wodurch ein Hohlraum entstehen könnte (Harpaz et al., 1994). Beispielsweise führt die Verminderung des Seitenkettenvolumens an Position 450 (Windung 10) bei Substitution von Valin durch Alanin zur Verengung der Helixwindung. Auch in der strukturell andersartigen *capping*-Region induziert das Einfügen eines Alanins eine Relaxation der Peptidkette. In der Struktur der Mutante V125A ist die Seitenkette und das Peptidrückgrat des mutierten Alanins minimal verschoben.

Durch eine zusätzliche CH<sub>2</sub>-Gruppe ist das Seitenkettenvolumen eines Leucins um 26 Å<sup>3</sup> größer als das eines Valins. Die Packungsdichte im Kern der  $\beta$ -Helix wird durch Einfügen eines sperrigen Leucins somit erhöht. Wie die Kristallstrukturen von V125L und V349L verdeutlichen, weiten sich die plastischen Helixwindungen der Mutationsregionen bei V125L deutlich und bei V349L minimal, um den sterischen Stress auszugleichen, der im Helixlumen entstanden ist.

An allen atomstrukturell analysierten Positionen der  $\beta$ -Helix werden demnach die Einflüsse der Mutationen ausgeglichen, um die dichte Packung des Kerns zu erhalten.

### *iv) Größe der entstandenen oder entfernten Kavität*

In früheren Arbeiten von Eriksson et al. wurde erstmals am hydrophoben Kern des T4 Phagen Lysozyms verdeutlicht, dass die Größe eines durch Mutation entstandenen Hohlraums im Proteininneren mit der Stärke der Destabilisierung korrelieren kann (Eriksson et al., 1992). Weiterhin zeigten Ishikawa et al. an *E. coli* RNase HI, dass umgekehrt das Ausfüllen einer im Proteinkern befindlichen Kavität bei Valin-zu-Leucin- oder Valin-zu-Isoleucin-Austausch die Stabilität des Proteins erhöht, während Austausch zu Alanin eine starke Destabilisierung hervorruft (Ishikawa et al., 1993). Die von den Autoren aufgeklärten hoch aufgelösten Kristallstrukturen der Leucin- und Isoleucin-Mutanten sind fast identisch. Sie verdeutlichen, dass nur in direkter Nachbarschaft der Mutationsstelle der Hohlraum entweder verkleinert oder ausgefüllt ist.

Aus diesem Grund wurde auch die hier erhobene Kristallstruktur des Wildtypproteins mit dem CASTp-Server bei einem Probenradius von 1.4 Å analysiert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass im Inneren des  $\beta$ -Helix-Kerns bei nahezu allen mutierten Valinen kleine Hohlräume existieren (Tabelle A5). V272 grenzt beispielsweise an zwei Kavitäten mit Volumina von 43 Å<sup>3</sup> und 21 Å<sup>3</sup>. Die größere der beiden Kavitäten liegt zentral zwischen den Faltblättern A und C. Die kleinere erstreckt sich entlang des T1 *turns*. Auch bei V321 werden zwei Kavitäten, die zentral (25 Å<sup>3</sup>) und am T1 *turn* (19 Å<sup>3</sup>) lokalisiert sind, gefunden. Eine Mutation zu Alanin könnte an beiden Positionen die Kavitäten verbinden. An Position 349 erstreckt sich im Wildtyp ein 19 Å<sup>3</sup> Hohlraum entlang der Windungen 7 und 8. Valine an Positionen 450 und 498 grenzen an eine sehr ausgedehnte Kavität mit einem Volumen von 106 Å<sup>3</sup>, die sich mit einer Länge von 49 Å entlang der Windungen 10 bis 12 erstreckt. Lediglich die Valine an den Positionen 125 und 523 grenzen an keine der innen liegenden Kavitäten.

In den Kristallstrukturen der Mutanten konnten an einigen Positionen mutations-induzierte Veränderungen beobachtet werden. Analog zur Struktur des Wildtyps wurde in V125L in der *capping*-Region keine Kavität detektiert. Bei Mutation der Valine 125 und 450 zu Alanin ist in den jeweiligen Strukturen eine durch die hohe Plastizität der  $\beta$ -Helix induzierte Verengung der Helixwindung und – dadurch bedingt – an Position 450 die Verkleinerung der ausgedehnten Kavität zu beobachten. Beim Einfügen eines Leucins an Position 349 ist in der Struktur der Mutante die im Wildtyp vorhandene 19 Å<sup>3</sup> große Kavität ausgefüllt. Die Verschiebung der Polypeptidkette ist deshalb im Leucin-Konstrukt nur gering, während ein Leucin im dichter gepackten Bereich bei Position 125 eine deutlich stärkere Vergrößerung der Helixwindung hervorruft.

##### *v) Anzahl der umliegenden Methyl- und Methylengruppen*

Die Stärke des destabilisierenden Effektes von kavitätsinduzierenden Mutationen kann mit der Anzahl von CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen korrelieren, die im Umkreis von 6 Å nahe des substituierten Restes liegen (Jackson et al., 1993). Je größer die Anzahl desto größer die Destabilisierung bei Verkleinerung einer hydrophoben Seitenkette. Eine hohe Anzahl an CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen zeigt die dichte Packung (Jackson et al., 1993) und die Unpolarität (Pace et al., 1996) der Umgebung an. In Tabelle A5 ist die Anzahl der Methyl- und Methylengruppen im Wildtypprotein nahe der gestapelten Valinreste zusammengefasst. Die Anzahl ist mit insgesamt 44 Gruppen an Position V349 im Zentrum der Domäne am höchsten und nimmt zu den Seiten hin ab. Die Umgebungen der Positionen V125, V498 und V523 sind mit insgesamt 17 (125) und 29 (498 und 523) CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen demnach weniger dicht gepackt als das Zentrum der  $\beta$ -Helix.

##### *vi) Anzahl von deletierten bzw. eingefügten elektrostatischen Interaktionen*

Das Strukturmotiv der parallelen  $\beta$ -Helix wird durch ein ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert. In den drei  $\beta$ -Faltblättern bilden die Carbonyl- und Aminogruppen des Peptidrückgrats aufeinander folgender Windungen reguläre Wasserstoffbrücken. Die gezielte Deletion einer Wasserstoffbrücke, z.B. beim Austausch eines Asparagins gegen ein Alanin, reduziert durchschnittlich die

Proteinstabilität um  $5.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Shirley et al., 1992). Die unpolaren, aliphatischen Seitenketten von Valin, Alanin und Leucin bilden keine Wasserstoffbrücken. Innerhalb des Radius von  $5 \text{ \AA}$  befinden sich in der Umgebung der Valine des Seitenkettenstapels jeweils ähnlich viele Wasserstoffbrücken (Tabelle A5).

Durch Mutationen induzierte, kleine strukturelle Verschiebungen der  $\beta$ -Helixwindungen können das Wasserstoffbrückennetzwerk verändern. Zum Beispiel wurden für die kinetisch destabilisierten Mutanten V125A, V450A, V125L und V349L mit dem Whatif-Server mutantenspezifische Wasserstoffbrücken nahe der Mutationsstelle detektiert, allerdings konnte kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl der veränderten Bindungen und der kinetischen Stabilität der vier Mutanten erkannt werden.

Im Kern der  $\beta$ -Helix befinden sich keine geladenen Aminosäuren und somit keine Salzbrücken.

#### *vii) Torsionsstress des Peptidrückgrads*

Die Torsionswinkel Phi und Psi aller in dieser Arbeit mutierten Reste liegen in den „erlaubten“ Bereichen des Ramachandran-Diagramms.

Die in Tabelle A5 zusammengefassten strukturellen Eigenschaften des TSPAN Wildtypproteins verdeutlichen, dass sich in der Umgebung der gestapelten Valine nur kleine lokale Verschiedenheiten abzeichnen.

Beispielsweise sind Lösungsmittelzugänglichkeit, Anzahl der Wassermoleküle und Wasserstoffbrücken in den Windungen (bis auf den *cap*) ähnlich. Zudem wurden Hohlräume über den gesamten Bereich der  $\beta$ -Helix detektiert. Durch die hohe Plastizität der Region werden mutationsinduzierte Veränderungen des Seitenkettenvolumens ausgeglichen, um strukturelle Konflikte zu vermeiden und die dichte Packung des Lumens zu erhalten. Ein einheitlich herausragendes Merkmal der Windungen bei den Positionen 272, 321 und 349, welches mit der starken Destabilisierung der Proteine im Vergleich zu Mutationen an anderen Positionen korreliert, tritt nicht hervor. Umgekehrt ist auch nicht evident, warum Substitutionen an den Rändern der Domäne, Positionen 125, 450, 498 und 523 keinen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität der  $\beta$ -Helix-Konstrukte haben (nach Renaturierungsübergang von V498A, V523A und V450L).

#### **4.1.2 Besonderheiten der zentralen Windungen der $\beta$ -Helix Domäne**

Im globalen Kontext, spielt der zentrale Bereich der  $\beta$ -Helix eine besondere Rolle, da die "Rückenflosse" (197-259), ein ausgedehnter T2 *turn* zwischen den  $\beta$ -Strängen B und C der Windung 3, als Subdomäne gegen die Windungen 3 bis 9 packt. In diesem Bereich ist die Anzahl der hydrophoben CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen im  $\beta$ -Helixlumen etwas höher, und in den Windungen fünf bis acht liegen die  $\beta$ -Faltblätter A und C sehr dicht beieinander (Tabelle A5). Die "Rückenflosse" enthält sechs Proline und viele aromatische Aminosäuren, wodurch ihre Flexibilität eingeschränkt ist. Schuler hatte versucht, die drei dort vorhandenen Tryptophane auszutauschen, jedoch waren die erzeugten

Konstrukte so aggregationsanfällig, dass eine Charakterisierung nicht möglich war (Schuler, 1998). Am unteren Ende der Kontaktfläche zwischen  $\beta$ -Helix und „Rückenflosse“, also bei Windung 9, wird die Domäne durch ein hydrophobes *cluster* fixiert. W213 aus der „Rückenflosse“ wird von Y388 und L437 aus *turns* der  $\beta$ -Helixwindungen 8 und 9 kontaktiert. Weiterhin packt L241 („Rückenflosse“) zwischen W391 (Windung 8) und L437 (Windung 9). Der Großteil der temperatursensitiven Mutanten befindet sich in der "Rückenflosse", der Kontaktfläche mit der  $\beta$ -Helix und im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix (Windungen 3 bis 9). Die "Rückenflosse" ist proteaseresistent und ihre Deletion führt bei heterologer Expression des Konstruktes in *E. coli* zur Bildung von nicht-renaturierbaren *inclusion bodies* (Miller, 1995). „Bauch-“ und „Rückenflosse“ grenzen die LPS-Bindungsfurche mit den katalytisch aktiven Resten D392, D395 und E359 ein.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Resultate erlauben bei Berücksichtigung der umfangreichen Kenntnisse über das P22 Tailspikeprotein die Annahme, dass ein zentraler Kern bestehend aus der „Rückenflosse“ und den Windungen 4 bis 7 die Stabilität der gesamten Faltungseinheit bestimmt. Besonders relevant scheinen hierbei die Positionen 321 (Windungen 6) und 349 (Windung 7), die weder Substitution zu Alanin noch zu Valin tolerieren, auch wenn, wie in der Kristallstruktur von V349L sichtbar, strukturell nur minimale Veränderungen induziert werden. Die Position 272 (Windung 4) ist hingegen weniger sensitiv; die Mutante V272L ist wildtyp-ähnlich stabil.

Im folgenden werden die Besonderheiten der zentralen Helixwindungen bei den Positionen V272, V321 und V349 beschrieben und die möglichen Auswirkungen der Substitutionen vorgeschlagen.

V272 grenzt an zwei Kavitäten mit Volumina von  $43 \text{ \AA}^3$  und  $21 \text{ \AA}^3$ , in welchen das zusätzliche Seitenkettenvolumen eines Leucins, analog der Struktur von V349L und den Beobachtungen an RNase HI, problemlos Platz finden könnte. Die wildtyp-ähnliche Stabilität von V272L im Gegensatz zum destabilisierten V272A-Konstrukt zeigt, dass an dieser Position die Hydrophobizität und das Volumen der Seitenkette stabilitätsbestimmend sind.

Position 272 befindet sich in Windung 4 der  $\beta$ -Helix direkt nach Insertion der "Rückenflosse" (197-259). Die Polypeptidkette kehrt aus der Subdomäne zurück in den  $\beta$ -Strang C3 und verläuft über einen relativ kurzen *turn* in den  $\beta$ -Strang A4, in welchem V272 lokalisiert ist. Die  $\beta$ -Faltblätter A und C der Windung 4 sind mit einem minimalen  $C\alpha$ -Atomabstand von  $9.7 \text{ \AA}$  relativ weit voneinander entfernt. Die Seitenkettenpackung ist im Vergleich zum dann folgenden C-terminaleren Bereich weniger dicht. Die Windungen 3 und 4 könnten als „Klammern“ dienen, die die  $\beta$ -Helix vor und nach Ausstülpung der "Rückenflosse" zusammen halten. Eine Verminderung der Hydrophobizität und Packungsdichte beim Einfügen eines Alanins destabilisiert die  $\beta$ -Helix Domäne und das gesamte Tailspike-trimer möglicherweise deshalb stark, weil der Zusammenhalt des Bereiches vermindert und die Fluktuation der Polypeptidkette der Windungen und der "Rückenflosse" erhöht wird.

Die Reste 321 und 349 liegen in den aufeinander folgenden Windungen 6 und 7 der  $\beta$ -Helix. Hier ist

der Abstand der  $\beta$ -Faltblätter mit etwa 8 Å sehr gering. In der Struktur der Mutante V349L wird eine im Wildtyp vorhandene Kavität durch das zusätzliche Volumen des Leucins fast vollständig ausgeglichen. Die der Mutationsstelle gegenüberliegende Seitenkette V362 und das Rückgrat dieses Restes werden nur minimal verschoben. Nichtsdestotrotz ist die Mutante V349L stark destabilisiert. Eine Stabilisierung des Proteins wie bei RNase HI beobachtet, erfolgt nicht, allerdings ist der destabilisierende Effekt geringer als bei Substitution zu Alanin.

Analog zu V349L wären auch die an Position 321 vorhandenen Kavitäten geeignet, die Seitenkette eines Leucins aufzunehmen. Auch hier ist die Mutante V321L weniger destabilisiert als V321A. Bei Verminderung der Hydrophobizität und Packungsdichte und bei kleinen Verschiebungen im Lumen des Peptidrückrads könnten durch eine erhöhte Beweglichkeit des  $\beta$ -Strangs A Fluktuationen in den T3 *turns* zunehmen und die Integrität der kompakten Region zerstören.

## 4.2. Die zentralen Windungen der parallelen $\beta$ -Helix fungieren als Stabilitätsnukleus und bilden das Faltungsintermediat I bei der Untereinheitenfaltung

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, korrelieren die geringen *in vivo* und *in vitro* Faltungsausbeuten der Mutanten V272A, V321A, V349A, V321L und V349L mit der verminderten thermodynamischen Stabilität der  $\beta$ -Helix Domäne. Der Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Faltungsdaten (Tabelle A6 im Anhang) aller Stapelungsmutanten zeigt jedoch, dass auch andere Bereiche der  $\beta$ -Helix Domäne einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Reifung zum nativen Trimer haben. Markante Beispiele sind die Mutanten V498A und V125L, bei denen die  $\beta$ -Helix Domänen wildtyp-ähnlich stabil scheinen (nach Rückfaltungsübergang von V498A), deren Faltungsausbeuten jedoch stark vermindert sind. Zur Übersichtlichkeit und Vereinfachung der Diskussion werden die Mutanten anhand gemeinsamer Eigenschaften klassifiziert. Die Gruppen sind:

- i) wildtyp-ähnliche Mutanten: V125A und V272L
- ii) *tsf*-ähnliche Mutanten: V272A, V321A, V349A, V321L, V349L
- iii) Mutanten am C-Terminus der  $\beta$ -Helix: V450A, V498A, V523A, V450L, V498L, V523L
- iv) markante Mutanten: V498A, V125L

Faltung, Reifung und kinetische Stabilität der Mutanten V498A und V125L werden in Kapitel 4.4 diskutiert. Konformationelle Stabilität, Faltungsausbeuten und Kinetiken der Monomerfaltung aller übrigen Mutanten werden im folgenden ihrer Klassifizierung entsprechend zusammengefasst und am Ende des Kapitels zueinander in Bezug gesetzt. Zur Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse in Tabelle A6 im Anhang zusammengefasst.

### *i) wildtyp-ähnliche Mutanten: V125A und V272L*

Ein im Hinblick auf thermodynamische Stabilität, *in vitro* Faltung und Rate der Monomerfaltung wildtyp-ähnliches Verhalten zeigen nur V125A und V272L. *In vivo* reifen beide Mutanten sogar bei 39 °C und somit produktiver als das Wildtypprotein.

### *ii) tsf-ähnliche Mutanten: V272A, V321A, V349A, V321L, V349L*

Analog zu den meisten kleinen globulären, aber auch zu etlichen *Solenoid*- und *Repeat*proteinen faltet die isolierte parallele  $\beta$ -Helix Domäne des P22 Tailspikeproteins bei den hier verwendeten Bedingungen im Gleichgewicht kooperativ nach einem Zweizustandsmodell (Main et al., 2005, Kloss et al., 2008b, Freiberg et al., 2004).

Die fünf Mutationen V272A, V321A, V349A, V321L und V349L, welche in den Windungen 4 bis 7 der elongierten Domäne lokalisiert sind, verschieben den Mittelpunkt von Harnstoff-induzierten Gleichge-

wichtsübergängen zu kleineren Denaturierungsmittelkonzentrationen. Unabhängig von der Art der eingefügten Mutation beträgt die Kooperativität der Übergänge  $12.8 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Die Stabilität des zentralen Bereiches der  $\beta$ -Helix Domäne bestimmt folglich die Stabilität der gesamten kooperativen Faltungseinheit. Die drei zentralen Alanin-Mutanten destabilisieren das Protein in vergleichbarem Maße um etwa  $11$  bis  $12 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Dabei ist der mittlere stabilisierende Beitrag einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit  $5.7 \pm 1.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  ähnlich groß wie im hydrophoben Kern globulärer Proteine ( $5.4 \pm 2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), (Pace, 1992). Die Verringerung der thermodynamischen Stabilität der Leucin-Mutanten V321L und V349L ist mit  $8$  bis  $9 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$  etwas geringer.

Die Mutanten zeigen *in vivo* und *in vitro* einen temperatursensitiven Faltungsphänotyp. Dabei ist die Verminderung der Faltungsausbeuten schon bei geringen Temperaturen bei den Alanin-Mutanten V272A, V321A und V349A deutlich ausgeprägter als bei den Leucin-Mutanten V321L und V349L. Goldenberg und Haase-Pettingell hatten gezeigt, dass *tsf*-Mutationen Faltungsintermediate destabilisieren und somit die Bildung von nativem Tailspikeprotein durch *off-pathway* Aggregation bei restriktiven Temperaturen vermindern können (Haase-Pettingell & King, 1988, Goldenberg et al., 1983). Beispielsweise destabilisieren die *tsf*-Mutationen G244R und D238S das termolabile Faltungsintermediat I der Untereinheitenfaltung und verschieben das Gleichgewicht in Richtung eines aggregationsanfälligen Intermediates I\* (siehe Schema 1.9), (Danner & Seckler, 1993, Miller et al., 1998b, Schuler & Seckler, 1998). Analog zu G244R und D238S destabilisieren auch V272A, V321A, V321L und V349L das termolabile Faltungsintermediat I. Schon bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  sind die Kinetiken der Untereinheitenfaltung von V272A und V321A im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt. Die verglichen mit dem Wildtyp um  $17 \%$  bis  $20 \%$  geringeren Signalamplituden und die 2.5fache bzw. 3.2fache Verlangsamung der Faltungsraten von V321A bzw. V272A bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  zeigen, dass die Mutationen temperaturabhängig das Gleichgewicht von I nach I\* verschieben. Die Raten und Signalamplituden der Faltungskinetiken von V349A sind bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  wildtyp-ähnlich. Die Monomerfaltungsraten der Leucin-Mutanten V321L und V349L sind bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  1.2fach und 1.5fach höher als die des Wildtyps. Die Differenz der Geschwindigkeitskonstanten zwischen Wildtyp und beiden Mutanten nimmt jedoch bei Temperaturerhöhung ab, d.h. bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  falten V321L und V349L jeweils nur noch wildtyp-ähnlich und 1.1fach schneller. Analog zu V272A, V321A, G244R und D238S werden die Faltungsraten bei Temperaturanstieg im Vergleich zum Wildtyp geringer. Folglich destabilisieren auch V321L und V349L das Faltungsintermediat I und verschieben somit das Gleichgewicht zu I\*.

Bei Gleichgewichtsexperimenten bildet sich nach Verlängerung der Inkubationszeiten (von  $1 \text{ h}$  auf  $24 \text{ h}$  bzw.  $48 \text{ h}$ ) der Ent- und Rückfaltungsübergänge bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  eine Schulter im Übergangsbereich von V272A und V321A aus. Ebenfalls korrespondierend zur *tsf*-Mutante G244R scheint bei Destabilisierung der  $\beta$ -Helix, genauer des zentralen Bereiches der Domäne, durch V272A und V321A die langsame Bildung von Aggregaten auch bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  über einen wahrscheinlich nicht-nativen Zustand begünstigt (Schuler et al., 1999). Schuler hatte gezeigt, dass hohe Salzkonzentrationen und die destabilisierende *tsf*-Mutation G244R die langsame Aggregation der isolierten  $\beta$ -Helix auslösen. Die von ihm charakterisierten  $\beta$ -Helix-Aggregate sind amyloid-ähnlich, d.h. sie binden Kongorot, zeigen Doppelbrechung unter polarisiertem Licht und bilden fibrilläre Strukturen (Schuler et al., 1999). Im thermody-

namischen Gleichgewicht von V349A ist der Übergangsmittelpunkt nach einer Inkubationszeit von 24 h geringfügig zu niedrigeren Harnstoffkonzentrationen verschoben. Die Herausbildung einer Schulter ist nicht sichtbar. Die wildtyp-ähnlichen Faltungsraten bei 10 °C und 25 °C und die bei den hier verwendeten Untersuchungsbedingungen nicht sichtbare Aggregationstendenz von V349A stimmen mit der gegenüber V272A und V321A besseren *in vivo* und *in vitro* Faltungseffizienz der Mutante überein. Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne von V349A ist jedoch mit einem Übergangsmittelpunkt von 1.8 M ebenso instabil wie das BHX-Konstrukt der Mutante V272A.

Zusammenfassend beruhen die beobachteten Verminderungen der *in vivo* und *in vitro* Faltungsausbeuten von V272A, V321A, V349A, V321L und V349L bei Temperaturanstieg analog zu G244R und D238S auf der Destabilisierung des Faltungintermediates I der Monomereinfaltung. Die unterschiedlich starken Einflüsse der Mutationen auf die Faltungskinetiken und Faltungsausbeuten korrelieren mit den thermodynamischen Stabilitäten der BHX-Konstrukte der Mutanten. Die Ausprägungen der Effekte sind teilweise stärker als bei G244R ( $\Delta\Delta G_{N \rightarrow U}^0 = -10 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und D238S ( $\Delta\Delta G_{N \rightarrow U}^0 = -4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), was die Bedeutung der zentralen Windungen der  $\beta$ -Helix Domäne hervorhebt.

#### *iii) Mutanten am C-Terminus der $\beta$ -Helix: V450A, V498A, V523A, V450L, V498L, V523L*

Die Mutante V498A wird detailliert in Kapitel 4.4 besprochen, in diesem Abschnitt wird lediglich das Verhalten der monomeren isolierten  $\beta$ -Helix im Gleichgewicht behandelt.

Die BHX-Konstrukte der Mutanten V498A, V523A und V450L weisen anhand des Rückfaltungsüberganges bei 10 °C eine dem Wildtyp entsprechende konformationelle Stabilität auf. Im Gegensatz dazu verlaufen ihre Entfaltungsübergänge dreistufig, was vermutlich durch nicht homogene native Proteinlösungen hervorgerufen ist. Möglicherweise ist die Packung der Mutanten V498A, V523A und V450L am C-Terminus weniger kompakt, wodurch bei einer vergleichsweise hohen Expressionstemperatur von 25 °C die C-terminalen Enden exponiert sind und Fehlfaltung und/oder Aggregatbildung über hydrophobe Bereiche begünstigt ist. Auch die *in vitro* Faltungsausbeuten der trimeren TSP $\Delta$ N-Konstrukte von V523A und V450L sind verringert. Besonders auffällig ist die starke Temperaturabhängigkeit der Reifung der Mutante V450L, die bei niedrigen Temperaturen wildtyp-ähnlich faltet, deren Ausbeuten bei höheren Temperaturen jedoch rapide abnehmen. *In vivo* verhalten sich die Mutanten V523A und V450L wie der Wildtyp. Bei den C-terminalen Leucin-Mutanten V498L und V523L sind Faltungs- und Entfaltungsübergänge reversibel und die thermodynamischen Stabilitäten wildtyp-ähnlich. Bei V523L ist der Übergangsmittelpunkt sogar geringfügig (0.1 M) zu höheren Harnstoffkonzentrationen verschoben. Weiterhin falten die TSP $\Delta$ N-Konstrukte beider Mutanten *in vivo* und *in vitro* weitestgehend dem Wildtyp entsprechend.

Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut den wichtigen Beitrag der hydrophoben Packung des  $\beta$ -Helix Lumens für die Stabilität und Faltungsausbeuten des Tailspikeproteins. Möglicherweise haben weniger kompakte C-terminale Enden der  $\beta$ -Helix zwar keinen Einfluss auf die Gesamtstabilität der isolierten  $\beta$ -Helix, jedoch können „ausgefranzte“ Enden bei höheren Temperaturen Fehlfaltung und Aggregatbildung fördern. Eine Ausnahme stellt allerdings Position 450 dar. Hier faltet die

Alanin-Mutante im Übergang reversibel und die Leucin-Mutante mit einem dreistufigen Verlauf. Eine Erklärung auf Basis der Kristallstruktur liegt nicht direkt auf der Hand, da die 106 Å<sup>3</sup> große Kavität bei Position 450 das Leucin möglicherweise aufnehmen könnte. Allerdings sind vorheriger I428 und nachfolgender F472 Rest im Seitenkettenstapel groß und packen eng gegen V450, sodass ein Leucin die korrekte Stapelung stören könnte.

Die Kinetiken der Untereinheitenfaltung von V523A bei 10 °C und 25 °C sind wildtyp-ähnlich. Bei V450A, V450L, V498L und V523L sind die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung gegenüber dem Wildtyp erhöht. Sie scheinen bei diesen Temperaturen das Faltungsintermediat I zu stabilisieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass Windungen am C-Terminus der  $\beta$ -Helix Domäne für die Trimerbildung durchaus von Bedeutung sind, allerdings treten Effekte nur bei höheren Temperaturen hervor. Wie es scheint sind die C-terminalen Windungen weniger dicht gepackt und verursachen Aggregation bei höheren Temperaturen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Zentrum der  $\beta$ -Helix gelegene Mutationen die isolierte Domäne und auch das thermolabile Faltungsintermediat I der TSP $\Delta$ N-Monomerfaltung destabilisieren, während Mutationen an den Enden keine oder sogar eine stabilisierende Wirkung haben. Die Ergebnisse legen nahe, dass der zentrale, die Stabilität der Faltungseinheit bestimmende Kern der  $\beta$ -Helix schon im Faltungsintermediat I der Monomerfaltung von TSP $\Delta$ N ausgebildet ist, was einen sequenziellen Faltungsmechanismus des Tailspikemonomers vermuten lässt. Bei diesem Modell formt sich frühzeitig ein „Faltungsnukleus“, an welchen sich fortlaufend weitere  $\beta$ -Helixwindungen anlagern, die im Zuge der Monomereifung kompaktieren. Der Bereich dieses Faltungsnukleus, der im Minimum die Windungen 4 bis 7 und der „Rückenflosse“ einschließt, ist dicht gepackt und fungiert ähnlich wie ein hydrophober Kern in globulären Proteinen. Mutationen, die den Kern destabilisieren, wirken auf das Fundament der Faltungseinheit und fördern Aggregation.

Schuler hatte postuliert, dass die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne strukturell dem thermolabilen Faltungsintermediat I der Monomerfaltung sehr ähnlich ist (Schuler, 1998). Die hier erhobenen Daten untermauern diese Hypothese und ermöglichen darüber hinaus eine Eingrenzung des kritischen Intermediates auf den beschriebenen Faltungsnukleus. Dieses Modell steht ebenfalls in Einklang mit dem von Simkovsky und King beschriebenen „minimalen Faltungs-Rückgrat“ der  $\beta$ -Helix Domäne (Simkovsky & King, 2006).

Bei vielen *Repeat*proteinen wurden trotz ihrer elongierten, modularen Form und der kurzreichenden Wechselwirkungen hoch kooperative Zweizustandsgleichgewichte beobachtet (Main et al., 2005, Kloss & Barrick, 2008, Kloss et al., 2008b). Es wird angenommen, dass das Zweizustandsverhalten von Repeatproteinen im Gleichgewicht durch sehr stabile Kontakte zwischen den Wiederholungseinheiten hervorgerufen ist (Kloss & Barrick, 2008). Zum Beispiel faltet die Ankyrin Domäne des Notch-Rezeptors von *Drosophila melanogaster* als eine kooperative Faltungseinheit im Gleichgewicht (Bradley & Barrick, 2002). Analog zu den hier dargestellten Ergebnissen an der isolierten  $\beta$ -Helix Do-

mäne verschieben destabilisierende Mutationen (Alanin zu Glycin) in den Wiederholungseinheiten der Ankyrin Domäne den Übergangsmittelpunkt zu kleineren Denaturierungsmittelkonzentrationen ohne die Kooperativität der Übergänge maßgeblich zu verändern. In einem anderen mit dieser Arbeit vergleichbaren Ansatz wurden Leucin-zu-Alanin-Mutationen in konsekutiven *repeats* der *leucine-rich-repeat*-Domäne (LRR) des Internalin Bs (InIB) eingefügt (Courtemanche & Barrick, 2008). Dabei zeigte sich, dass fast alle Austausch in etwa gleichem Maße die thermodynamische Stabilität der Domäne verringern, die Stabilität der Faltungseinheit somit offensichtlich gleichmäßig verteilt ist. Nur Mutationen in der N-terminalen *capping*-Region verhielten sich auffällig. Genaue Analysen der Faltungskinetiken und des Übergangszustandes wiesen darauf hin, dass die *capping*-Region des Internalin Bs als Faltungsnukleus dient an den sich im Zuge der Faltungsreaktion weitere *repeats* anlagern können.

Ein Gleichgewicht mit mehreren Zuständen (*multi-state*) wurde bisher nur bei besonders langen *Repeat*proteinen wie zum Beispiel der rechtsgängigen parallelen  $\beta$ -Helix Region des Autotransporters P.69 Pertactin und dem D34 Fragment des AnkyrinR Proteins beobachtet (Junker et al., 2006, Werbeck & Itzhaki, 2007). Beim reversibel faltenden P.69 Pertactin sind die C-terminalen Windungen der  $\beta$ -Helix deutlich stabiler als die N-terminalen Windungen. Es wird angenommen, dass der C-terminale Bereich der  $\beta$ -Helix, der als erstes in den extrazellulären Raum sekretiert wird, als *template* für die Anlagerung weiterer Windungen dient. Ähnliches wurde für das AnkyrinR D34 Fragment beobachtet. Bei dem im Entfaltungsübergang detektierten Intermediat sind die C-terminalen Windungen des Fragmentes strukturiert und der N-Terminus entfaltet. P.69 Pertactin und das AnkyrinR D34 Fragment haben besonders viele Windungen, und ihre *Multistate*-Gleichgewichte lassen vermuten, dass es für elongierte Proteine vielleicht eine Maximalgröße für kooperatives Verhalten im Gleichgewicht gibt (Kloss et al., 2008b). Kinetische Untersuchungen an *Repeat*proteinen konnten die unter Gleichgewichtsbedingungen beobachteten Zweizustandsgleichgewichte nur selten bestätigen. Häufig verlaufen die Faltungs- und Entfaltungsäste der entsprechenden *Chevron*-Plots nicht-linear und über kinetische Intermediate (Kloss et al., 2008b).

Ähnlich wie andere Solenoidproteine scheint somit das Tailspikemonomer vektoriell zu falten. Hierbei bildet sich jedoch der Faltungsnukleus zentral und nicht am N- oder C-terminalen Ende der Solenoidstruktur.

### 4.3. Die Entfaltungsreaktion des Tailspiketrimers ist komplex und unter physiologischen Bedingungen irrelevant

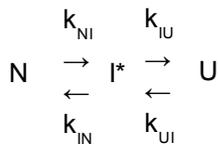
#### 4.3.1 Entfaltung des Wildtypproteins

Wie die pH- und GdmHCl-Abhängigkeiten der Entfaltung des kompletten und des N-terminal verkürzten Tailspiketrimers zeigen, ist schon die Entfaltungsreaktion des Wildtypproteins komplex. Besonders auffällig sind die, trotz der einphasig verlaufenden Denaturierungskinetiken, in entgegengesetzte Richtungen gewölbten Entfaltungsäste von TSP und TSP $\Delta$ N im *Chevronplot* (siehe Abbildung 3.19). Bei TSP $\Delta$ N ist die Wölbung konkav, die logarithmierten Entfaltungsraten bei niedrigen und hohen Gdm HCl-Konzentrationen sind geringer als bei linearer Extrapolation der Datenpunkte erwartet werden würde. Bei TSP ist die Wölbung konvex und der Zusammenhang umgekehrt. Als Basis für eine anschließende Diskussion dieser Beobachtungen sind im folgenden Entfaltungsmodelle vorgestellt, die gebogene *Chevronplots* hervorrufen können.

Bei Proteinen, welche nach einem Zweizustandsmodell über einen Übergangszustand falten bzw. entfalten, hängen die Geschwindigkeitskonstanten linear von der Denaturierungsmittelkonzentration ab. Die Auftragung der logarithmierten Faltungs- und Entfaltungsraten gegen die Denaturierungsmittelkonzentration ergibt einen V-förmigen Verlauf. Die Steigung des Faltungsastes  $m_f$  bzw. des Entfaltungsastes  $m_u$ , korreliert mit der Veränderung der Lösungsmittelzugänglichkeit ( $\Delta$ ASA) zwischen dem entfalteten Zustand und dem Übergangszustand bzw. dem nativen Zustand und dem Übergangszustand. Sie ist somit ein Maß für die Ähnlichkeit der Konformationen. Weichen Faltungs- und/oder Entfaltungsast im *Chevronplot* von der Linearität ab, ist dies ein Indiz für komplexere Faltungsmechanismen, auch wenn die Signalverläufe der Kinetiken einphasig sind und kein Sprung des Signals während der Totzeit der Messung zu beobachten ist (apparentes Zweizustandsverhalten), (Bachmann & Kiefhaber, 2005, Brockwell & Radford, 2007). Die Nicht-Linearität der m-Werte impliziert, dass bei verschiedenen Denaturierungsmittelkonzentrationen die Ähnlichkeit zwischen den jeweiligen Konformationen (native Konformation und Konformation des Übergangszustandes) unterschiedlich ist, d.h. dass sich eine oder beide Strukturen Denaturierungsmittel-abhängig verändern.

Ein nach unten gekrümmter Entfaltungsast im *Chevronplot* wurde bei mehr als 50 % der untersuchten apparenten Zweizustandsfalter beobachtet (Sánchez & Kiefhaber, 2003) und durch folgende Modelle erklärt:

i) Ein von der Denaturierungsmittelkonzentration abhängiger Wechsel zwischen zwei Übergangszuständen ( $\ddagger$ 1 und  $\ddagger$ 2) in einem sequenziellen Faltungsweg:



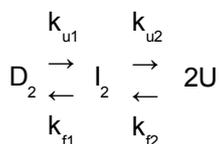
Dabei liegt auf dem Faltungsweg ein hochenergetisches Faltungsintermediat  $I^*$  („on-pathway Intermediat“), welches, da es weniger stabil als  $N$  und  $U$  ist, spektroskopisch nicht detektiert werden kann. Ein Knick im *Chevronplot* indiziert den Wechsel zwischen dem Übergangszustand, der bei mittleren und dem Übergangszustand, der bei hohen Denaturantkonzentrationen geschwindigkeitsbestimmend ist. Die beiden Übergangszustände unterscheiden sich strukturell in ihrer Kompaktheit, weshalb die  $m_u$ -Werte ihrer „Einflussbereiche“ verschieden sind (Bachmann & Kiefhaber 2001, Bachmann & Kiefhaber, 2005). Sánchez und Kiefhaber konnten mit diesem Modell gekrümmte *Chevronplots* vieler Proteine interpretieren. Es wird postuliert, dass das Vorkommen von hoch-energetischen Faltungsintermediaten auf dem Faltungsweg, auch bei kleinen Proteinen, häufig ist (Sánchez & Kiefhaber, 2003, Brockwell & Radford, 2007).

ii) Eine breite Übergangsbarriere und die graduelle Veränderung der Position des geschwindigkeitsbestimmenden Übergangszustands entlang der Reaktionskoordinate (Hammond-Effekt). Dieser Mechanismus wurde zum Beispiel für Mutanten des ribosomalen Proteins S6 von *Thermus thermophilus* vorgeschlagen (Otzen et al., 1999). Destabilisierende Mutationen führen bei S6 zu unterschiedlich stark gebogenen Entfaltungssästen im *Chevronplot*. Diese Beobachtung wurde durch eine breite Übergangsbarriere in der Energielandschaft erklärt, in der der Übergangszustand zwar die höchste freie Energie aufweist, jedoch von ähnlich stabilen Zuständen umgeben ist. Die Zustände weisen, da sie strukturell unterschiedlich kompakt sind, unterschiedliche Abhängigkeiten vom Denaturierungsmittel ( $m_u$ -Werte) auf. Bei steigenden Denaturierungsmittelkonzentrationen sind die relativen Stabilitäten der Zustände verschieden, d.h. unterschiedliche Zustände werden geschwindigkeitsbestimmend, also zum Übergangszustand. Mit steigenden Denaturierungsmittelkonzentrationen wird der native Zustand destabilisiert und dem Übergangszustand ähnlicher.



$\ddagger$  und  $\ddagger'$  symbolisieren die bei hoher und niedriger Denaturantkonzentration vorherrschenden Übergangszustände. Da es mehr als zwei relevante Übergangszustände gibt, ist eine Biegung und kein Knick im Entfaltungssast des *Chevronplots* sichtbar. Verschiedene destabilisierende Mutationen beeinflussen die Stabilität von unterschiedlichen Zuständen und dadurch deren „Gewichtung“ bei steigenden Denaturantkonzentrationen. Die Wölbung des Entfaltungssastes kann deshalb von Mutation zu Mutation anders sein.

iii) Konzentrationsabhängige Effekte auf die apparente Geschwindigkeitskonstante bei der Entfaltung von oligomeren Proteinen. In einem kürzlich publizierten Review haben Rumfeldt et al. unter anderem die Abhängigkeit der Entfaltungsrates von der Proteinkonzentration für dimere Proteine simuliert (Rumfeldt et al., 2008). Bei der Entfaltung eines Dimers über ein monomeres Intermediat nach dem Verlauf



ist bei Denaturantkonzentrationen nahe des Übergangsmittelpunktes eine Abwärtskrümmung im Entfaltungskinetikogramm zu beobachten. Mit steigenden Proteinkonzentrationen nimmt diese Krümmung zu und erstreckt sich über einen längeren Bereich zu höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen. Die apparente Rate der Dimerentfaltung wird langsamer, weil die bimolekulare Assoziation des Monomers mit steigender Konzentration wahrscheinlicher wird, die Rate der Monomerentfaltung ist unimolekular und somit konzentrationsunabhängig.

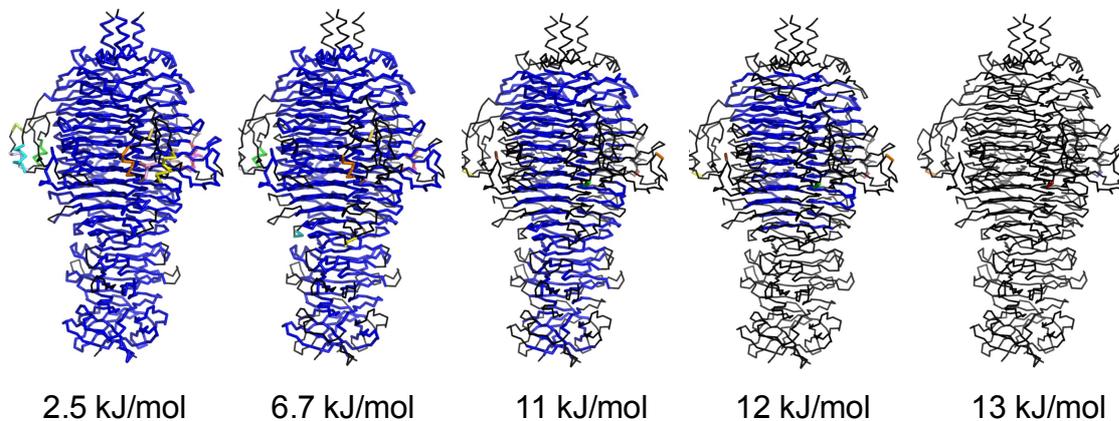
iv) Nicht-Linearität der experimentellen Bedingungen, wie zum Beispiel die Abhängigkeit der pH-Wertmessung (Acevedo et al., 2002) oder der Lösungsmittelviskosität von der Denaturierungsmittelkonzentration (Jacob & Schmid, 1999).

Die abwärts gekrümmte Abhängigkeit der logarithmierten Entfaltungsrates von der GdmHCl-Konzentration bei TSP $\Delta$ N kann mit dem bisherigen Ergebnisstand explizit keinem der unter i) bis iv) beschriebenen Modelle zugeordnet werden.

Bei der Entfaltung und Dissoziation des großen oligomeren Tailspikeproteins ist z.B. das Auftreten eines Entfaltungsintermediates wahrscheinlich. Aufgrund der einphasigen Verläufe der Kinetiken müsste ein solches metastabiles Intermediat jedoch hinter dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion liegen, da es sonst im Verlauf der Kinetik, z.B. als Sprung des Signals während der Totzeit oder als zweite kinetische Phase, detektierbar wäre.

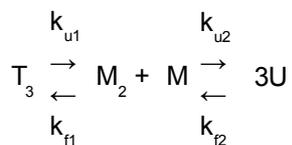
Eine breite Übergangsbarrriere der Entfaltungsreaktion wäre auch vorstellbar. Bei Simulation der Entfaltung von TSP $\Delta$ N (PDB-Code: 2VFM) mit FIRST (*Floppy Inclusions and Rigid Substructure Topography*; URL: <http://flexweb.asu.edu/software/first/>; abgerufen am 13.9.2009), (Rader et al., 2002) sind zum Beispiel über einen weiten Energiebereich nur kleine Veränderungen im *cluster* der flexiblen bzw. rigiden Proteinareale zu verzeichnen (Abbildung 4.2). Beim „Aufschmelzen“ der nichtkovalenten Bindungen aller Atome sind *loops* und *turns* als erstes flexibel, während ein starrer Kern, welcher die  $\beta$ -Helices und die Trimerisierungsdomänen umfasst, über weite Strecken stabil ist. Dieser starre Kern entfaltet in einem schmalen „Energiefenster“ als letzter Schritt der Reaktion. Eine breite Übergangsbarrriere mit ähnlich stabilen Zuständen, welche unterschiedliche Denaturierungsmittelabhängigkeiten aufweisen, könnte in der Energielandschaft durch den starren Kern und jeweils verschieden entfaltete

*loops* und *turns* erklärt werden.



**Abbildung 4.2: Simulation der Entfaltung von TSP $\Delta$ N Wildtyp (PDB-Code: 2VFM) mit FIRST.** Dargestellt sind rigide (farbig) und flexible (schwarz) Bereiche des Tailspikeproteins. Bei der Simulation werden nicht-kovalente Wechselwirkungen anhand ihrer Bindungsenergien eingestuft und schrittweise „aufgeschmolzen“ (Rader et al., 2002).

Da das Tailspikeprotein ein Homotrimer ist, ist auch eine Konzentrationsabhängigkeit der Entfaltungsrates analog zur Entfaltung von Dimeren nach



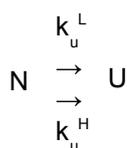
plausibel (Reaktionsschema adaptiert nach (Seckler, 2000)). Mit steigenden Proteinkonzentrationen würde die Trimerisierung wahrscheinlicher und die apparente Geschwindigkeitskonstante der Monomerenentfaltung würde beeinflusst. Durch Aufklärung der Proteinkonzentrationsabhängigkeit könnte es möglich sein, den Mechanismus der Dissoziation, Entfaltung und Assoziation des Trimers genauer zu analysieren. Da die Reaktion einer höheren Ordnung folgt, könnten Simulationen helfen, die möglicherweise komplizierten Beobachtungen zu deuten.

Allerdings hatte Fuchs in anfänglichen CD- und fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen am kompletten Tailspikeprotein keine Abhängigkeit der apparenten Entfaltungsgeschwindigkeit von der Konzentration beobachten können (Fuchs, 1992). Die Entfaltungsrates des Trimers in 6 M GdmHCl bei 25 °C waren im Konzentrationsbereich zwischen 20 µg/ml bis 500 µg/ml sehr ähnlich. Dies weist darauf hin, dass die Stabilität des Trimers geschwindigkeitsbestimmend ist. Monomere Strukturen entfalten in hochmolaren Denaturierungsmittellösungen vermutlich umgehend, wie es in dieser Arbeit auch für das isolierte  $\beta$ -Helix Konstrukt beobachtet wurde (siehe 3.1.3).

Ein weiterer Grund für Abwärtskrümmung des Entfaltungspastes könnte auch die Bildung von transienten „*off-pathway*“ Intermediaten und ihre Aggregation bei mittleren Denaturantkonzentrationen nahe

des Übergangsmittelpunktes sein. Gerade bei langsamer Ent- und Rückfaltung im Übergangsbereich kompetitiert Aggregation mit Faltung bzw. Entfaltung. Das Tailspikeprotein faltet und entfaltet mit sehr langsamen Kinetiken. Bei Aggregationsreaktionen müsste die Konzentration des faltungs- und assoziationskompetenten Proteins bei mittleren Denaturantkonzentrationen abnehmen, und die Signalamplituden im Übergangsbereich müssten vermindert sein bzw. mit Zunahme der GdmHCl-Konzentration wieder ansteigen. Bei höheren Denaturantkonzentrationen wäre die Aggregation unterbunden, da Intermediate destabilisiert wären. Beispielsweise wird, wie in 4.2 beschrieben, ein aggregationsanfälliges Faltungsintermediat I\* durch Verlangsamung der Faltungsraten des Monomers stabilisiert (Danner & Seckler, 1993, Beissinger et al., 1995, Seckler, 2000).

v) Eine Aufwärtswölbung des Entfaltungssastes des *Chevronplots* mit steigender Denaturantkonzentration, wie in Abbildung 3.19 für das Volllängenprotein TSP gezeigt ist, wurde bisher nur selten beobachtet. Dieses kinetische Verhalten wurde bei der 27. Immunoglobulin-domäne des Titins (TI I27) und einigen TI I27 Mutanten genauer charakterisiert (Wright et al., 2003, Wright et al., 2004). Aus den Daten wurde hergeleitet, dass das Protein über zwei parallele Reaktionswege entfalten kann:



Bei geringen Denaturierungsmittelkonzentrationen ist der Entfaltungsweg L, d.h. die Entfaltung über einen kompakten und nativ-ähnlichen Übergangszustand ‡L, dominant. Mit steigenden Konzentrationen an Denaturierungsmittel entfalten immer mehr Proteine über den Übergangszustand ‡H, welcher dem ungeordneten, entfalteten Zustand ähnlicher ist. Chemische Denaturantien stabilisieren weniger geordnete Zustände stärker als geordnete Zustände und somit bei höherer Konzentration ‡H. Da die apparente Geschwindigkeitskonstante die Summe der Raten  $k_u^L$  und  $k_u^H$  ist, ergibt sich eine graduelle Aufwärtswölbung des Entfaltungssastes. Dieser Effekt wird als Anti-Hammond bezeichnet, da mit steigenden Denaturierungsmittelkonzentrationen der Übergangszustand dem nativen Zustand immer unähnlicher wird. Einige TI I27 Mutanten weisen unterschiedlich starke Aufwärtswölbungen des Entfaltungssastes im *Chevronplot* auf. Sie beeinflussen den Fluss über die beiden Entfaltungswege, indem entweder ‡L oder ‡H destabilisiert wird. Mutanten, welche eine lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration hervorrufen, zeigen, dass diese Reste essentiell für einen der beiden Übergangszustände sind, welcher bei Mutation entfällt. Die Faltung oder Entfaltung über multiple parallele Reaktionswege wurde durch Simulationen vorhergesagt, konnte experimentell bisher jedoch nur selten beobachtet werden (Wright et al., 2003).

Die Entfaltung des kompletten Tailspiketrimers über parallele Wege ist durchaus denkbar. Durch seine elongierte Form und die niedrige Kontaktordnung sind die drei funktionellen Domänen, N-terminale Capsidbindedomäne, zentrale Ligandenbindedomäne und C-terminale Trimerisierungsdomäne,

nicht nur strukturell unabhängig, sondern liegen auch in der Aminosäuresequenz weit voneinander entfernt. Da die Anwesenheit der N-terminalen Domäne im kompletten Tailspikeprotein einen zu TSP $\Delta$ N unterschiedlichen Verlauf des Entfaltungsweges des *Chevronplots* hervorruft, wird ein Entfaltungsweg möglicherweise durch den N-terminalen Bereich kontrolliert. Denkbar wäre, dass Entfaltungsreaktionen an den Enden des Proteins beginnen. Am N-Terminus wäre die *linker*-Region, welche sehr flexibel und sensitiv gegenüber Proteasen ist, ein vorstellbares Areal in dem durch hohe Fluktuation Entfaltung starten könnte. Durch unterschiedliche Abhängigkeiten der Domänen vom Denaturierungsmittel könnte der Fluss über die Wege und hierdurch die apparenten Geschwindigkeitskonstanten beeinflusst sein.

Eines der wenigen Beispiele für den experimentellen Nachweis paralleler Entfaltungswege ist neben TI 127 ein großes *Repeat*protein. Das D34 Fragment des AnkyrinR Proteins beinhaltet 12 Ankyrinwiederholungseinheiten und entfaltet über einen komplexen Entfaltungsweg (Werbeck et al., 2008). Die kinetische Analyse von Alanin-zu-Glycin-Mutanten, welche an identischen Positionen in aufeinander folgenden *repeats* lokalisiert sind, lassen vermuten, dass die Entfaltung dieses 426 Aminosäuren große Proteins am N-Terminus startet und über ein Intermediat verläuft. In einem weiteren Schritt entfaltet der C-terminale Bereich über zwei parallele Wege, bei denen unterschiedliche *repeats* dieser Region entfaltet sind.

### **4.3.2 Entfaltung der Stapelungsmutanten**

Für die *tsf*- und *su*-Mutanten G244R, D238S, V331A und V331G konnte eine Korrelation zwischen den Entfaltungsraten bei thermischer Denaturierung, ihren *in vivo* und *in vitro* Faltungseffizienzen und der thermodynamischen Stabilität der  $\beta$ -Helix Konstrukte beobachtet werden. Kinetisch instabile *tsf*-Mutanten zeigten verminderte Faltungsausbeuten und eine thermodynamisch weniger stabile isolierte  $\beta$ -Helix Domäne. Bei den kinetisch stabileren *su*-Mutanten war die Beziehung umgekehrt (Miller et al., 1998b, Schuler & Seckler, 1998).

Ein ähnlich eindeutiger Zusammenhang liegt bei den hier untersuchten Stapelungsmutanten nicht auf der Hand (Tabelle A6). Beispielsweise verlaufen die thermisch- und chemisch-induzierten Entfaltungskinetiken der „*tsf*-ähnlichen“ Mutanten V272A, V321A und V349A genauso wie Kinetiken des Wildtyps. Kinetisch instabiler als der Wildtyp sind V125A, V450A, V125L, V321L und V349L, dabei sind die substitutions-induzierten Änderungen der freien Energien zwischen dem nativen und dem Übergangszustand für V125L, V450A und V349L am größten. Abgesehen von Position 125, liegen die destabilisierenden Mutationen eher im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix Region.

Bei V450A und V125L könnten die geringen *in vitro* Faltungsausbeuten mit den stark verminderten kinetischen Stabilitäten dieser Mutanten in Zusammenhang gebracht werden. Die Mutation V125L löst den bisher stärksten untersuchten Anstieg der Entfaltungsrate aus. V450A faltet auf Monomerebene etwas schneller als der Wildtyp. Interessanterweise reifen V450A und V125L *in vivo* ebenso effektiv wie das Wildtypprotein. Ferner sind auch die thermodynamischen Stabilitäten der isolierten  $\beta$ -Helix Konstrukte beider Mutanten wildtypähnlich.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kinetische Stabilität des Tailspike trimers einen untergeordneten Einfluss auf die Faltungsausbeuten der Stapelungsmutanten hat, da kinetisch stark destabilisierte Mutanten *in vivo* und *in vitro* nicht explizit auffallen. Der Extremfall, die Mutante V125L, stellt hierbei die einzige Ausnahme dar und wird in Kapitel 4.4 näher beleuchtet. Um in der harschen Umgebung des extrazellulären Raums seine Funktion erfüllen zu können, ist das Tailspikeprotein stark stabilitäts-optimiert. Kinetisch destabilisierende Mutationseffekte, die unter sehr extremen Denaturierungsbedingungen hervortreten, sind unter den Bedingungen, bei denen die sensitivere Faltung passieren kann, wahrscheinlich irrelevant bzw. maskiert.

Insgesamt betrachtet folgt also die chemisch-induzierte Entfaltungsreaktion des trimeren Tailspikeproteins einem komplexen Verlauf. Punktmutationen im Lumen der  $\beta$ -Helix Region und besonders in der *capping*-Region an Position 125 (siehe Kapitel 4.4) können die Entfaltungsrates des Trimers stark beeinflussen. Um den Wirkmechanismus der Mutationen genauer einzugrenzen, sollte initial Entfaltung mit Hilfe der monomeren  $\beta$ -Helix Konstrukte untersucht werden. Da die Mutationen Verformungen einzelner  $\beta$ -Helixwindungen induzieren können, könnte geklärt werden, ob die Interaktion und Stabilität der Trimeruntereinheiten oder die Entfaltung auf Monomerebene betroffen ist.

Für das Wildtypprotein wäre zu klären, inwieweit sich die Kurvenverläufe der Entfaltungsäste von TSP und TSP $\Delta$ N ähneln. Als erster Schritt ist deshalb die Messung von Entfaltungskinetiken über einen weiteren Denaturierungsmittelbereich mithilfe schneller Mischtechniken notwendig. Weiterhin ist die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Entfaltung von TSP $\Delta$ N interessant.

## **4.4. Seitenketten der $\beta$ -Helixwindung 12 und die capping-Region sind wesentlich für Assoziation und strukturelle Integrität des Tailspiketrimers**

### **4.4.1 Bedeutung der $\beta$ -Helixwindung 12**

Verglichen mit dem Wildtyp und allen anderen Stapelungsmutanten faltet die Mutante V498A *in vivo* und *in vitro* am wenigsten effizient. Schon bei 27 °C sind die Faltungsausbeuten der Mutante in der Zelle verringert und auch *in vitro* faltet bei 10 °C nur 50 % des denaturierten Proteins zurück in die SDS-resistente Form. Bei 37 °C *in vivo* und 30 °C *in vitro* ist die Reifung von V498A völlig unterbunden. Die isolierte  $\beta$ -Helix Domäne von V498A ist im Gegensatz hierzu jedoch wildtyp-ähnlich stabil (nach Renaturierungsübergang). Weiterhin ist die Geschwindigkeit der Monomerfaltung des V498A TSP $\Delta$ N-Konstruktes bei 10 °C und 25 °C 1.4fach schneller als die des Wildtyps. Ein Leucin an Position 498 verbessert, wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, sogar geringfügig die Stabilität der  $\beta$ -Helix in Relation zum Wildtyp. Hybridisierungsexperimente mit der Ladungsmutante G244R zeigen, dass die Homotrimerbildung von 498A im Vergleich zum Wildtyp und G244R etwa 6fach langsamer abläuft. Verkleinerung des Seitenkettenvolumens und Verminderung der Hydrophobizität an Position 498 im Kern der  $\beta$ -Helix Domäne erschweren somit die Assoziation des Trimers nach Monomerfaltung.

Valin 498 befindet sich in Windung 12 am C-terminalen Ende der  $\beta$ -Helix Domäne. Im Inneren des hydrophoben Kerns ist der Rest zwischen den Seitenketten F472 und V523 gestapelt. Wenn man als Maß die Anzahl der umliegenden CH-, CH<sub>2</sub>- und CH<sub>3</sub>-Gruppen und den Abstand des gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblatts C heranzieht, ist hier das Lumen der  $\beta$ -Helix weniger dicht gepackt als in den zentralen Windungen der Region (siehe Tabelle A5). Zudem grenzt Valin 498 an einen ausgedehnten 106 Å<sup>3</sup> großen Hohlraum im Inneren der  $\beta$ -Helix.

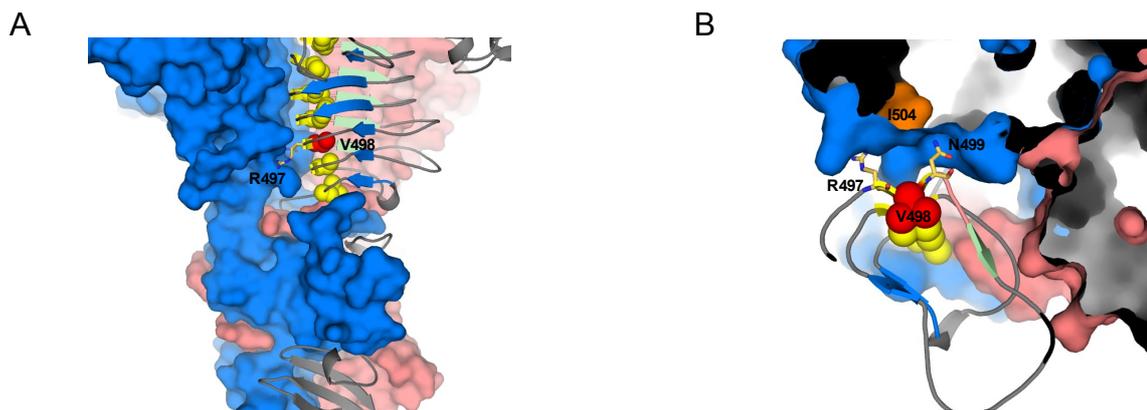
Die zu Valin 498 in der Primärsequenz benachbarten Reste sind Arginin 497 und Asparagin 499. Beide Seitenketten weisen in die Kontaktfläche der Untereinheiten und interagieren mit Haupt- und Seitenkettenatomen des  $\beta$ -Faltblatts B und des T2 *turns* der Windungen 12 und 13 (Abbildung 4.3).

Im Strukturmodell des N-terminal verkürzten Wildtypproteines (PDB-Code: 2VFM) ist die Seitenkette von R497 zwischen I506 und M529 der aufeinander folgenden Windungen gepackt. Der Rest ist teilweise lösungsmittlexponiert und stark mit Molekülen der geordneten Hydrathülle verbrückt. Ferner besteht eine Salzbrücke mit dem Carbonylsauerstoff von G505 der Nachbaruntereinheit.

Asparagin 499 liegt tief in der Grenzfläche und packt in eine Tasche, die von Seitenketten der Nachbaruntereinheit gebildet wird. Von Pymol v1.0 werden polare Interaktionen zwischen dem  $\delta$ 2-Stickstoff des Asparagins 499 und den Hauptkettensauerstoffen der Aminosäuren L503, I504 und T527 angezeigt. Ein weiterer Kontakt besteht zwischen dem  $\gamma$ 1-Carbonylsauerstoff des Asparagins und der  $\delta$ 1-

Hydroxylgruppe von T527. Die Reste 503 bis 506, die sowohl von R497 und von N499 kontaktiert werden, befinden sich im *turn* T2 der Windung 12. I503 und I504 weisen ins Lumen der  $\beta$ -Helix und I506 nach außen.

R497 und D499 sind somit stark in ein Kontaktnetzwerk im Grenzflächenbereich der Trimeruntereinheiten involviert. Interessant ist, dass der Rest I504 den einzigen „Ausreißer“ im Ramachandran-Plot darstellt. Die Torsionswinkel Phi und Psi der Hauptkette liegen mit Werten von  $\Phi = +82.24^\circ$  und  $\Psi = +125.25^\circ$  in der nur für Glycine erlaubten Region des Diagramms.



**Abbildung 4.3: Umgebung des Valins 498. A)** Valin 498 (rot) ist in Windung 12 im hydrophoben Seitenkettenstapel des  $\beta$ -Faltblatts A (gelb) lokalisiert. Die Seitenketten R497 (orange) und N499 (orange) stehen in Kontakt mit der benachbarten Untereinheit (blaue Oberfläche). **B)** Hauptkettenatome von I504 (orange Oberfläche) nehmen ungewöhnliche Torsionswinkel ein.  $\beta$ -Faltblätter A, B, und C der  $\beta$ -Helix einer Untereinheit sind gelb, grün und blau gezeigt. Der T1 *turn* ist lachsfarben. Aufsicht ist entlang der  $\beta$ -Helixachse vom N- zum C-Terminus.

Positionen mit ungünstigen Dihedralwinkeln der Hauptkette weisen manchmal auf eine funktionelle Bedeutung dieser Reste hin. Beispielsweise liegen im P22 Tailspikeprotein Phi- und Psi-Winkel des Valins 331 nur in der „erlaubten“ und nicht in der „erwünschten“ Region des Ramachandran-Plots. Mutation des Restes zu Glycin oder Alanin vermindert die sterische Spannung des Peptidrückgrats und erhöht die thermodynamische Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix Region. Weiterhin steigern die Mutationen die Geschwindigkeit der Monomerfaltung, die Faltungseffizienz und die thermische Stabilität des nativen Trimers (Schuler & Seckler, 1998, Miller et al., 1998b). V331G und V331A sind zwei von vier für das Tailspikeprotein identifizierte globalen Supressormutanten (Fane & King, 1991, Fane et al., 1991). Im Gegensatz zur verbesserten Faltung und Stabilität der Mutanten ist jedoch die Bindung des O-Antigens stark vermindert. Es wird deshalb angenommen, dass V331 evolutiv funktions- aber nicht stabilitätsoptimiert ist (Baxa et al., 1999).

Verkleinerung des Seitenkettenvolumens von Valin 498 könnte, wie es für V125A und V450A beobachtet wurde, eine Verengung der Windung 12 und somit die Verformung der  $\beta$ -Helix in diesem Bereich auslösen. Es wäre auch denkbar, dass durch die schon geringere Packungsdichte in diesem Bereich und den großen Hohlraum der  $\beta$ -Strang A12 weniger stark fixiert wird. Beide Effekte könnten eine

falsche Positionierung oder eine höhere Flexibilität der Seitenketten R497 und N499 auslösen. Hierdurch wäre deren Einbindung in die Kontaktfläche der Untereinheiten und die Ausbildung der zahlreichen Vernetzungen erschwert. Temperaturerhöhung würde Fluktuationen erhöhen, die Assoziation und Interaktion der Untereinheiten vermeiden und somit den Reifungsprozess des Trimers unterbinden. Seitenketten der  $\beta$ -Helixwindung 12 sind demnach wesentlich für die Assoziation der Tailspikeuntereinheiten.

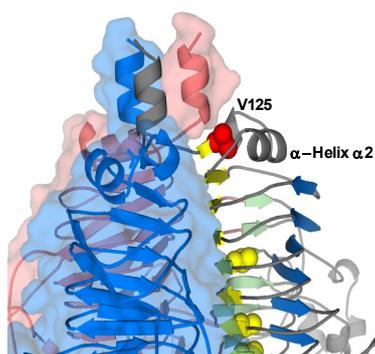
Durch ortsgerichtete Mutagenese der Reste R497, D499 und I504 und Assoziationsexperimente der Untereinheiten könnte die hier beschriebene Hypothese genauer beleuchtet und die Bedeutung der Seitenketten bei der Trimerbildung geklärt werden.

#### 4.4.2 Bedeutung der capping-Region

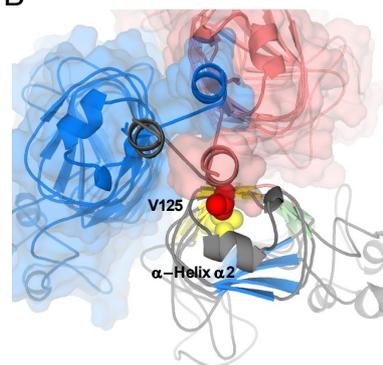
Mutation Valin 125 zu Leucin führt zu einer dramatischen Beschleunigung der Entfaltungsgeschwindigkeit des Tailspiketrimers bei TSP und TSP $\Delta$ N. Faltungsausbeuten des Proteins sind *in vitro* schon bei 10 °C um circa 25 % geringer als die Ausbeuten des Wildtyps. Im Gegensatz dazu ist die konformationelle Stabilität der isolierten  $\beta$ -Helix wildtyp-ähnlich und die Faltung des TSP $\Delta$ N-Konstruktes *in vivo* effizienter als die Reifung des Wildtyptrimers. Faltung und Stabilität der Alanin-Mutante sind dem Wildtyp entsprechend.

Position 125 befindet sich in der N-terminalen *capping*-Region (120-142). Die Region besteht aus dem  $\beta$ -Strang  $\beta$ A1, einem kurzen *loop* und der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ 2.  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen werden häufig durch solche *capping*-Regionen verschlossen. Es wird vermutet, dass sie die Entwindung der  $\beta$ -Helix und *edge-to-edge*-Aggregation über freie Wasserstoffbindungspartner verhindern (Richardson & Richardson, 2002, Kapp et al., 2004).

A



B



**Abbildung 4.4: Umgebung des Valins 125. A)** Valin 125 (rot) befindet sich im  $\beta$ -Strang  $\beta$ A1 der N-terminalen *capping*-Region, welche außerdem die  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ 2 und einem kurzen *loop* umfasst.  $\beta$ -Faltblätter A, B, und C der  $\beta$ -Helix einer Untereinheit sind gelb, grün, blau und der T1 *turn* lachsfarben dargestellt. Zwei Untereinheiten sind in blau und rosa dargestellt. **B)** Blickrichtung entlang der  $\beta$ -Helixachse vom N- zum C-terminalen Ende des Tailspiketrimers.

Die Kristallstrukturen von V125A und V125L verdeutlichen, dass ebenso wie die Windungen der  $\beta$ -Helix auch die N-terminale *capping*-Region formbar ist. Das Alanin löst eine Verengung und das

Leucin eine Ausdehnung der Region aus. Verglichen zum Valin im Wildtyp ist die Ausrichtung der Seitenkette des Leucins in V125L verändert. Die jeweils endständigen Methylgruppen weisen in Wildtyp und der Mutante in entgegengesetzte Richtungen. Die Hauptkette ist an der Mutationsstelle geringfügig Richtung N-Terminus verschoben, wodurch der Abstand zur nachfolgenden Windung 1 der  $\beta$ -Helix vergrößert ist. Der  $C\alpha$ -Atomabstand zwischen Position 125 und 144 ist von 5.0 Å auf 5.10 Å aufgeweitet. In den Kristallstrukturen von V125L, V125A und des Wildtyps ist die *capping*-Region dicht gepackt, sodass CASTp keine Hohlräume detektiert.

Im Kontext des Tailspiketrimers ist das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta A1$ , in welchem V125 lokalisiert ist, in Kontakt mit der  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$  der rechtsliegenden Nachbaruntereinheit.  $\alpha 1$   $\alpha$ -Helices von den drei Monomeren formen ein 3-Helixbündel. Durch die Ausweitung der *capping*-Region in V125L könnte der Kontakt zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt  $\beta A1$  und  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$  geschwächt sein. Vielleicht ist auch die Positionierung der  $\alpha$ -Helix  $\alpha 1$  und des gesamten 3-Helixbündels verändert, wodurch die Integrität des Trimers gestört wird.

## 5. Literaturverzeichnis

- Acevedo, O., Guzman-Casado, M., Garcia-Mira, M.M., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J.M. (2002). pH corrections in chemical denaturant solutions. *Anal. Biochem.* 306, 158-161.
- Bachmann, A. & Kiefhaber, T. (2001). Apparent two-state tendamistat folding is a sequential process along a defined route. *J. Mol. Biol.* 306, 375-386.
- Bachmann, A. & Kiefhaber, T. (2005). Kinetic Mechanisms in Protein Folding. In *Protein Folding Handbook* (J. Buchner & T. Kiefhaber, Hrsg.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Baker, D. (2000). A surprising simplicity to protein folding. *Nature* 405, 39-42.
- Baldwin, E.P. & Matthews, B.W. (1994). Core-packing constraints, hydrophobicity and protein design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 396-402.
- Barbirz, S., Becker, M., Freiberg, A. & Seckler, R. (2009). Phage tailspike proteins with beta-solenoid fold as thermostable carbohydrate binding materials. *Macromol. Biosci.* 9, 169-173.
- Barbirz, S., Müller, J.J., Uetrecht, C., Clark, A.J., Heinemann, U. & Seckler, R. (2008). Crystal structure of Escherichia coli phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol. Microbiol.* 69, 303-316.
- Barnhart, M.M. & Chapman, M.R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 131-147.
- Baumann, U. (1994). Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from *Serratia marcescens*. *J. Mol. Biol.* 242, 244-251.
- Baxa, U., Cooper, A., Weintraub, A., Pfeil, W. & Seckler, R. (2001). Enthalpic barriers to the hydrophobic binding of oligosaccharides to phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* 40, 5144-5150.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R. & Seckler, R. (1996). Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, Salmonella O-antigen polysaccharide. *Biophys. J.* 71, 2040-2048.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Weintraub, A., Huber, R. & Seckler, R. (1999). Mutations improving the folding of phage P22 tailspike protein affect its receptor binding activity. *J. Mol. Biol.* 293, 693-701.
- Baxa, U., Cassese, T., Kajava, A.V. & Steven, A.C. (2006). Structure, function, and amyloidogenesis of fungal prions: filament polymorphism and prion variants. *Adv. Protein Chem.* 73, 125-180.
- Beissinger, M., Lee, S.C., Steinbacher, S., Reinemer, P., Huber, R., Yu, M.H. & Seckler, R. (1995). Mutations that stabilize folding intermediates of phage P22 tailspike protein: folding in vivo and in vitro, stability, and structural context. *J. Mol. Biol.* 249, 185-194.
- Bennett, M.J., Sawaya, M.R. & Eisenberg, D. (2006). Deposition diseases and 3D domain swapping. *Structure* 14, 811-824.
- Betts, S., Haase-Pettingell, C., Cook, K. & King, J. (2004). Buried hydrophobic side-chains essential for the folding of the parallel beta-helix domains of the P22 tailspike. *Prot. Sci.* 13, 2291-2303.
- Bieler, S., Estrada, L., Lagos, R., Baeza, M., Castilla, J. & Soto, C. (2005). Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein. *J. Biol. Chem.* 280, 26880-26885.
- Bieri, O. & Kiefhaber, T. (2000). Kinetic Models in Protein Folding. In *Protein Folding: Frontiers in Molecular Biology* (R. Pain, Hrsg.), Oxford University Press, Oxford.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7, 1513-1523.
- Bradley, C.M. & Barrick, D. (2002). Limits of cooperativity in a structurally modular protein: response of the Notch ankyrin domain to analogous alanine substitutions in each repeat. *J. Mol. Biol.* 324, 373-386.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J. & Berger, B. (2001). BETAWRAP: successful prediction of parallel beta-helices from primary sequence reveals an association with many microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14819-14824.

- Branden, C. & Tooze, J. (1998). Introduction to Protein Structure. Garland Publishing Inc., New York.
- Brockwell, D.J. & Radford, S.E. (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 30-37.
- Brunschier, R., Danner, M. & Seckler, R. (1993). Interactions of phage P22 tailspike protein with GroE molecular chaperones during refolding in vitro. *J. Biol. Chem.* 268, 2767-2772.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Caughey, B. & Baron, G.S. (2006). Prions and their partners in crime. *Nature* 443, 803-810.
- Chen, B. & King, J. (1991). Thermal unfolding pathway for the thermostable P22 tailspike endorhamnosidase. *Biochemistry* 30, 6260-6269.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & Dobson, C.M. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3590-3594.
- Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
- Clark, P.L. & King, J. (2001). A newly synthesized, ribosome-bound polypeptide chain adopts conformations dissimilar from early in vitro refolding intermediates. *J. Biol. Chem.* 276, 25411-25420.
- Connolly, M.L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science* 221, 709-713.
- Courtemanche, N. & Barrick, D. (2008). The leucine-rich repeat domain of Internalin B folds along a polarized N-terminal pathway. *Structure* 16, 705-714.
- Danner, M., Fuchs, A., Miller, S. & Seckler, R. (1993). Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 215, 653-661.
- Danner, M. & Seckler, R. (1993). Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. *Prot. Sci.* 2, 1869-1881.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.
- Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K. & Kanaya, S. (2008). Hydrophobic effect on the stability and folding of a hyperthermophilic protein. *J. Mol. Biol.* 378, 264-272.
- Dubendorff, J.W. & Studier, F.W. (1991a). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45-59.
- Dubendorff, J.W. & Studier, F.W. (1991b). Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J. Mol. Biol.* 219, 61-68.
- Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. & Liang, J. (2006). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acid Res.* 34, W116-118.
- Elam, J.S., Taylor, A.B., Strange, R., Antonyuk, S., Doucette, P.A., Rodriguez, J.A., Hasnain, S.S., Hayward, L.J., Valentine, J.S., Yeates, T.O. & Hart, P.J. (2003). Amyloid-like filaments and water-filled nanotubes formed by SOD1 mutant proteins linked to familial ALS. *Nat. Struct. Biol.* 10, 461-467.
- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F. & Isaacs, N.W. (1996). Structure of Bordetella pertussis virulence factor P.69 pertactin. *Nature* 381, 90-92.
- Eriksson, A.E., Baase, W.A., Zhang, X.J., Heinz, D.W., Blaber, M., Baldwin, E.P. & Matthews, B.W. (1992). Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science* 255, 178-183.
- Evans, M.S., Ugrinov, K.G., Frese, M. & Clark, P.L. (2005). Homogeneous stalled ribosome nascent chain complexes produced in vivo or in vitro. *Nature Methods* 2, 757-762.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Fändrich, M., Fletcher, M.A. & Dobson, C.M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410, 165-166.
- Fane, B. & King, J. (1991). Intragenic suppressors of folding defects in the P22 tailspike protein. *Genetics* 127, 263-277.
- Fane, B., Villafane, R., Mitraki, A. & King, J. (1991). Identification of global suppressors for temperature-sensitive folding mutations of the P22 tailspike protein. *J. Biol. Chem.* 266, 11640-11648.

- Fink, A.L. (2005). Natively unfolded proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 35-41.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83-88.
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E. & Kelly, J.W. (2007). Functional amyloid-from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 32, 217-224.
- Freiberg, A., Machner, M.P., Pfeil, W., Schubert, W., Heinz, D.W. & Seckler, R. (2004). Folding and stability of the leucine-rich repeat domain of internalin B from *Listeria monocytogenes*. *J. Mol. Biol.* 337, 453-461.
- Freiberg, A., Morona, R., Van den Bosch, L., Jung, C., Behlke, J., Carlin, N., Seckler, R. & Baxa, U. (2003). The tailspike protein of Shigella phage Sf6. A structural homolog of Salmonella phage P22 tailspike protein without sequence similarity in the beta-helix domain. *J. Biol. Chem.* 278, 1542-1548.
- Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Haase-Pettingell, C.A., King, J. & Goldberg, M.E. (1990). Properties of monoclonal antibodies selected for probing the conformation of wild type and mutant forms of the P22 tailspike endorhamnosidase. *J. Biol. Chem.* 265, 10347-10351.
- Fuchs, A., Seiderer, C. & Seckler, R. (1991). In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* 30, 6598-6604.
- Fuchs, A. (1992). Faltungs- und Assoziationsweg des P22 Tailspike-Proteins. Dissertation, Universität Regensburg.
- Garcia-Mira, M.M. & Sanchez-Ruiz, J.M. (2001). pH corrections and protein ionization in water/guanidinium chloride. *Biophys. J.* 81, 3489-3502.
- Goldenberg, D. & King, J. (1982). Trimeric intermediate in the in vivo folding and subunit assembly of the tail spike endorhamnosidase of bacteriophage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3403-3407.
- Goldenberg, D.P., Berget, P.B. & King, J. (1982). Maturation of the tail spike endorhamnosidase of Salmonella phage P22. *J. Biol. Chem.* 257, 7864-7871.
- Goldenberg, D.P. & King, J. (1981). Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit of the bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30 degrees C. *J. Mol. Biol.* 145, 633-651.
- Goldenberg, D.P., Smith, D.H. & King, J. (1983). Genetic analysis of the folding pathway for the tail spike protein of phage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7060-7064.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8342-8347.
- Graether, S.P., Kuiper, M.J., Gagné, S.M., Walker, V.K., Jia, Z., Sykes, B.D. & Davies, P.L. (2000). Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* 406, 325-328.
- Gross, M., Wilkins, D.K., Pitkeathly, M.C., Chung, E.W., Higham, C., Clark, A. & Dobson, C.M. (1999). Formation of amyloid fibrils by peptides derived from the bacterial cold shock protein CspB. *Prot. Sci.* 8, 1350-1357.
- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D. & Dobson, C.M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4224-4228.
- Guydosh, N.R. & Fersht, A.R. (2005). A Guide to Measuring and Interpreting Phi-Values. In *Protein Folding Handbook* (J. Buchner & T. Kiefhaber, Hrsg.), WILEY-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Haase-Pettingell, C.A. & King, J. (1988). Formation of aggregates from a thermolabile in vivo folding intermediate in P22 tailspike maturation. A model for inclusion body formation. *J. Biol. Chem.* 263, 4977-4983.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Harpaz, Y., Gerstein, M. & Chothia, C. (1994). Volume changes on protein folding. *Structure* 2, 641-649.
- Hegde, S.S., Vetting, M.W., Roderick, S.L., Mitchenall, L.A., Maxwell, A., Takiff, H.E. & Blanchard, J.S. (2005). A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* 308, 1480-1483.
- Heinz, B. (2006). Stabilität und Faltung der Pektatlyase aus *Bacillus subtilis*: Der Austausch der Asparaginleiter gegen einen hydrophoben Stapel. Dissertation, Universität Potsdam.
- Hennetin, J., Jullian, B., Steven, A.C. & Kajava, A.V. (2006). Standard conformations of beta-arches in

- beta-solenoid proteins. *J. Mol. Biol.* 358, 1094-1105.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.
- Hooff, R.W., Sander, C. & Vriend, G. (1996a). Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures. *Proteins* 26, 363-376.
- Hooff, R.W., Vriend, G., Sander, C. & Abola, E.E. (1996b). Errors in protein structures. *Nature* 381, 272.
- Hutchinson, E.G. & Thornton, J.M. (1996). PROMOTIF-a program to identify and analyze structural motifs in proteins. *Prot. Sci.* 5, 212-220.
- Ishikawa, K., Nakamura, H., Morikawa, K. & Kanaya, S. (1993). Stabilization of Escherichia coli ribonuclease HI by cavity-filling mutations within a hydrophobic core. *Biochemistry* 32, 6171-6178.
- Israel, J.V., Anderson, T.F. & Levine, M. (1967). In vitro morphogenesis of phage P22 from heads and base-plate parts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57, 284-291.
- Israel, V., Rosen, H. & Levine, M. (1972). Binding of bacteriophage P22 tail parts to cells. *J. Virol.* 10, 1152-1158.
- Jackson, S.E., Moracci, M., elMasry, N., Johnson, C.M. & Fersht, A.R. (1993). Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry* 32, 11259-11269.
- Jacob, M. & Schmid, F.X. (1999). Protein folding as a diffusional process. *Biochemistry* 38, 13773-13779.
- Jain, M., Evans, M.S., King, J. & Clark, P.L. (2005). Monoclonal antibody epitope mapping describes tailspike beta-helix folding and aggregation intermediates. *J. Biol. Chem.* 280, 23032-23040.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R. (1998). Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J. Struct. Biol.* 122, 236-246.
- Jenkins, J. & Pickersgill, R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77, 111-175.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr.* 47 110-119.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B. & Clark, P.L. (2006). Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4918-4923.
- Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr.* 32, 922-923.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* 26, 795-800.
- Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. & Steven, A.C. (2001). Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.* 42, 279-292.
- Kajava, A.V. & Steven, A.C. (2006). Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. *Adv. Protein Chem.* 73, 55-96.
- Kapp, G.T., Richardson, J.S. & Oas, T.G. (2004). Kinetic role of helix caps in protein folding is context-dependent. *Biochemistry* 43, 3814-3823.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H. & Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Nature Biotechnol.* 9, 825-829.
- King, J. & Laemmli, U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62, 465-477.
- Klemm, J.D., Wozniak, J.A., Alber, T. & Goldenberg, D.P. (1991). Correlation between mutational destabilization of phage T4 lysozyme and increased unfolding rates. *Biochemistry* 30, 589-594.
- Kloss, E., Courtemanche, N. & Barrick, D. (2008a). Repeat-protein folding: new insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Arch. Biochem. Biophys.* 469, 83-99.
- Kloss, E. & Barrick, D. (2008b). Thermodynamics, kinetics, and salt dependence of folding of YopM, a large leucine-rich repeat protein. *J. Mol. Biol.* 383, 1195-1209.
- Kobe, B. & Kajava, A.V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem. Sci.* 25, 509-515.

- Kodali, R. & Wetzel, R. (2007). Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 48-57.
- Kreisberg, J.F., Betts, S.D., Haase-Pettingell, C. & King, J. (2002). The interdigitated beta-helix domain of the P22 tailspike protein acts as a molecular clamp in trimer stabilization. *Prot. Sci.* 11, 820-830.
- Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lander, G.C., Tang, L., Casjens, S.R., Gilcrease, E.B., Prevelige, P., Poliakov, A., Potter, C.S., Carragher, B. & Johnson, J.E. (2006). The structure of an infectious P22 virion shows the signal for headful DNA packaging. *Science* 312, 1791-1795.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- Lazo, N.D. & Downing, D.T. (1998). Amyloid fibrils may be assembled from beta-helical protofibrils. *Biochemistry* 37, 1731-1735.
- Leinala, E.K., Davies, P.L. & Jia, Z. (2002). Crystal structure of beta-helical antifreeze protein points to a general ice binding model. *Structure* 10, 619-627.
- Lim, W.A., Farruggio, D.C. & Sauer, R.T. (1992). Structural and energetic consequences of disruptive mutations in a protein core. *Biochemistry* 31, 4324-4333.
- Liou, Y.C., Tocilj, A., Davies, P.L. & Jia, Z. (2000). Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. *Nature* 406, 322-324.
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S. & Richardson, D.C. (2003). Structure validation by C $\alpha$  geometry: phi, psi and C $\beta$  deviation. *Proteins* 50, 437-450.
- Main, E.R.G., Jackson, S.E. & Regan, L. (2003a). The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 482-489.
- Main, E.R.G., Lowe, A.R., Mochrie, S.G.J., Jackson, S.E. & Regan, L. (2005). A recurring theme in protein engineering: the design, stability and folding of repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 464-471.
- Main, E.R.G., Xiong, Y., Cocco, M.J., D'Andrea, L. & Regan, L. (2003b). Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure* 11, 497-508.
- Manning, M. & Colón, W. (2004). Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry* 43, 11248-11254.
- Marshall, C.B., Daley, M.E., Sykes, B.D. & Davies, P.L. (2004). Enhancing the activity of a beta-helical antifreeze protein by the engineered addition of coils. *Biochemistry* 43, 11637-11646.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C. & Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674.
- McDonnell, A.V., Menke, M., Palmer, N., King, J., Cowen, L. & Berger, B. (2006). Fold recognition and accurate sequence-structure alignment of sequences directing beta-sheet proteins. *Proteins* 63, 976-985.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998a). A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike protein with native structure: the isolated beta-helix domain. *Biochemistry* 37, 9160-9168.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998b). Phage P22 tailspike protein: removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability. *Prot. Sci.* 7, 2223-2232.
- Miller, S. (1995). Deletions- und Punktmutanten des P22-Tailspike-Proteins: Klonierung, Reinigung, Kristallisation und Physikalisch-Biochemische Analyse. Dissertation, Universität Regensburg.
- Mitraki, A. & King, J. (1992). Amino acid substitutions influencing intracellular protein folding pathways. *FEBS Letters* 307, 20-25.
- Mitraki, A., Miller, S. & van Raaij, M.J. (2002). Review: conformation and folding of novel beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple beta-spiral and triple beta-helix. *J. Struct. Biol.* 137, 236-247.
- Mitraki, A., Papanikolopoulou, K. & van Raaij, M.J. (2006). Natural triple beta-stranded fibrous folds. *Adv. Protein Chem.* 73, 97-124.
- Mitraki, A. & van Raaij, M.J. (2005). Folding of beta-structured fibrous proteins and self-assembling peptides. *Methods. Mol. Biol.* 300, 125-140.
- Müller, J.J., Barbirz, S., Heinle, K., Freiberg, A., Seckler, R. & Heinemann, U. (2008). An intersubunit active site between supercoiled parallel beta helices in the trimeric tailspike

- endorhamnosidase of *Shigella flexneri* Phage Sf6. *Structure* 16, 766-775.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* 53, 240-255.
- Myers, J.K., Pace, C.N. & Scholtz, J.M. (1995). Denaturant  $m$  values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Prot. Sci.* 4, 2138-2148.
- Nelson, R. & Eisenberg, D. (2006a). Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 260-265.
- Nelson, R. & Eisenberg, D. (2006b). Structural models of amyloid-like fibrils. *Adv. Protein Chem.* 73, 235-282.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.Ø., Riek, C., Grothe, R. & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* 435, 773-778.
- Nummelin, H., Merckel, M.C., Leo, J.C., Lankinen, H., Skurnik, M. & Goldman, A. (2004). The *Yersinia* adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel beta-roll. *EMBO J.* 23, 701-711.
- Otzen, D.E., Kristensen, O., Proctor, M. & Oliveberg, M. (1999). Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots. *Biochemistry* 38, 6499-6511.
- Pace, C.N. (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* 226, 29-35.
- Pace, C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* 131, 266-280.
- Pace, C.N. (2001). Polar group burial contributes more to protein stability than nonpolar group burial. *Biochemistry* 40, 310-313.
- Pace, C.N., Shirley, B.A., McNutt, M. & Gajiwala, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.* 10, 75-83.
- Perrakis, A., Sixma, T.K., Wilson, K.S. & Lamzin, V.S. (1997). wARP: improvement and extension of crystallographic phases by weighted averaging of multiple-refined dummy atomic models. *Acta Crystallogr.* 53, 448-455.
- Petersen, T.N., Kauppinen, S. & Larsen, S. (1997). The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure* 5, 533-544.
- Petkova, A.T., Leapman, R.D., Guo, Z., Yau, W., Mattson, M.P. & Tycko, R. (2005). Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* 307, 262-265.
- Pfeil, W. (2001). *Protein stability and folding - A collection of thermodynamic data*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J. (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nat. Struct. Biol.* 1, 717-723.
- van Raaij, M.J., Schoehn, G., Burda, M.R. & Miller, S. (2001). Crystal structure of a heat and protease-stable part of the bacteriophage T4 short tail fibre. *J. Mol. Biol.* 314, 1137-1146.
- Rader, A.J., Hespeneide, B.M., Kuhn, L.A. & Thorpe, M.F. (2002). Protein unfolding: rigidity lost. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3540-3545.
- Raetz, C.R. & Roderick, S.L. (1995). A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. *Science* 270, 997-1000.
- Reich, L., Becker, M., Seckler, R. & Weikl, T.R. (2009). In vivo folding efficiencies for mutants of the P22 tailspike beta-helix protein correlate with predicted stability changes. *Biophysical Chemistry* 141, 186-192.
- Richards, F.M. (1977). Areas, volumes, packing and protein structure. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 6, 151-176.
- Richardson, J.S. & Richardson, D.C. (2002). Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2754-2759.
- Roiner, J. (1998). Gerichtete Mutagenese eines hydrophoben Stapels im Inneren der beta-Helix-Domäne der Tailspike-Endorhamnosidase des *Salmonella* Bakteriophagen P22. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* 443, 780-786.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56.
- Rumfeldt, J.A.O., Galvagnon, C., Vassall, K.A. & Meiering, E.M. (2008). Conformational stability and folding mechanisms of dimeric proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 98, 61-84.
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M.R., Gingery, M. & Eisenberg, D. (2005). Amyloid-like fibrils of

- ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* 437, 266-269.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, I.E. & Kiefhaber, T. (2003). Evidence for sequential barriers and obligatory intermediates in apparent two-state protein folding. *J. Mol. Biol.* 325, 367-376.
- Santoro, M.M. & Bolen, D.W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063-8068.
- Sargent, D., Benevides, J.M., Yu, M.H., King, J. & Thomas, G.J. (1988). Secondary structure and thermostability of the phage P22 tailspike. XX. Analysis by Raman spectroscopy of the wild-type protein and a temperature-sensitive folding mutant. *J. Mol. Biol.* 199, 491-502.
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J.W., McFarlane, H.T., Madsen, A.Ø., Riek, C. & Eisenberg, D. (2007). Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457.
- Schuler, B., Fürst, F., Osterroth, F., Steinbacher, S., Huber, R. & Seckler, R. (2000). Plasticity and steric strain in a parallel beta-helix: rational mutations in the P22 tailspike protein. *Proteins* 39, 89-101.
- Schuler, B., Rachel, R. & Seckler, R. (1999). Formation of fibrous aggregates from a non-native intermediate: the isolated P22 tailspike beta-helix domain. *J. Biol. Chem.* 274, 18589-18596.
- Schuler, B. & Seckler, R. (1998). P22 tailspike folding mutants revisited: effects on the thermodynamic stability of the isolated beta-helix domain. *J. Mol. Biol.* 281, 227-234.
- Schuler, B. (1998). Faltungsmutanten des P22 Tailspikeproteins: Stabilität der beta-Helix-Domäne. Dissertation, Universität Regensburg.
- Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F. & Serrano, L. (2005). The FoldX web server: an online force field. *Nucleic Acid Res.* 33, 382-388.
- Seckler, R. (1998). Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *J. Struct. Biol.* 122, 216-222.
- Seckler, R., Fuchs, A., King, J. & Jaenicke, R. (1989). Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains in vitro. *J. Biol. Chem.* 264, 11750-11753.
- Seckler, R. (2000). Assembly of multi-subunit structures. In *Mechanisms of Protein Folding*. Oxford University Press, New York.
- Serag, A.A., Altenbach, C., Gingery, M., Hubbell, W.L. & Yeates, T.O. (2002). Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet. *Nat. Struct. Biol.* 9, 734-739.
- Serpell, L.C., Sunde, M. & Blake, C.C. (1997). The molecular basis of amyloidosis. *Cell. Mol. Life. Sci.* 53, 871-887.
- Seul, A. (2008). Tailspike Interactions in Bacteriophage P22. Dissertation, Universität Potsdam.
- Shirley, B.A., Stanssens, P., Hahn, U. & Pace, C.N. (1992). Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1. *Biochemistry* 31, 725-732.
- Simkovsky, R. (2007). The role of buried stack residues in the folding of the beta-helix domain of P22 tailspike. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology.
- Simkovsky, R. & King, J. (2006). An elongated spine of buried core residues necessary for in vivo folding of the parallel beta-helix of P22 tailspike adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3575-3580.
- Skerra, A. (1989). Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in Escherichia coli. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Smith, D.H., Berget, P.B. & King, J. (1980). Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail-spike protein. I. Fine-structure mapping. *Genetics* 96, 331-352.
- Smith, N.L., Taylor, E.J., Lindsay, A., Charnock, S.J., Turkenburg, J.P., Dodson, E.J., Davies, G.J. & Black, G.W. (2005). Structure of a group A streptococcal phage-encoded virulence factor reveals a catalytically active triple-stranded beta-helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 17652-17657.
- Speed, M.A., King, J. & Wang, D.I. (1997). Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. *Biotechnology and Bioengineering* 54, 333-343.
- Speed, M.A., Wang, D.I. & King, J. (1995). Multimeric intermediates in the pathway to the aggregated inclusion body state for P22 tailspike polypeptide chains. *Prot. Sci.* 4, 900-908.

- Speed, M.A., Wang, D.I. & King, J. (1996). Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology* 14, 1283-1287.
- Steinbacher, S., Baxa, U., Miller, S., Weintraub, A., Seckler, R. & Huber, R. (1996). Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with Salmonella sp. O-antigen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10584-10588.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, N., Weintraub, A., Seckler, R. & Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *J. Mol. Biol.* 267, 865-880.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Weintraub, A. & Seckler, R. (1997b). Interaction of Salmonella phage P22 with its O-antigen receptor studied by X-ray crystallography. *Biol. Chem.* 378, 337-343.
- Steinbacher, S., Seckler, R., Miller, S., Steipe, B., Huber, R. & Reinemer, P. (1994). Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. *Science* 265, 383-386.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein. Expr. Purif.* 41, 207-234.
- Stummeyer, K., Dickmanns, A., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R. & Ficner, R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 90-96.
- Sturtevant, J.M., Yu, M.H., Haase-Pettingell, C. & King, J. (1989). Thermostability of temperature-sensitive folding mutants of the P22 tailspike protein. *J. Biol. Chem.* 264, 10693-10698.
- Takano, K., Yamagata, Y. & Yutani, K. (1998). A general rule for the relationship between hydrophobic effect and conformational stability of a protein: stability and structure of a series of hydrophobic mutants of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* 280, 749-761.
- Villafane, R. & King, J. (1988). Nature and distribution of sites of temperature-sensitive folding mutations in the gene for the P22 tailspike polypeptide chain. *J. Mol. Biol.* 204, 607-619.
- Walter, M. (2002). Die parallele beta-Helix der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*: Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten. Dissertation, Universität Potsdam.
- Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Biebl, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X.L., Llamas-Saiz, A.L., Seckler, R., Miller, S. & van Raaij, M.J. (2008). Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage *det7*: a podoviral tail spike in a myovirus. *J. Virol.* 82, 2265-2273.
- Wang, W. & Hecht, M.H. (2002). Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric beta-sheet proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2760-2765.
- Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A.B., Riek, R. & Meier, B.H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* 319, 1523-1526.
- Wasmer, C., Schütz, A., Loquet, A., Buhtz, C., Greenwald, J., Riek, R., Böckmann, A. & Meier, B.H. (2009). The Molecular Organization of the Fungal Prion HET-s in Its Amyloid Form. *J. Mol. Biol.* 394, 119-127.
- Werbeck, N.D. & Itzhaki, L.S. (2007). Probing a moving target with a plastic unfolding intermediate of an ankyrin-repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7863-7868.
- Werbeck, N.D., Rowling, P.J.E., Chellamuthu, V.R. & Itzhaki, L.S. (2008). Shifting transition states in the unfolding of a large ankyrin repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9982-9987.
- Westermarck, P. (2005). Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J.* 272, 5942-5949.
- Wetzel, R. (2002). Ideas of order for amyloid fibril structure. *Structure* 10, 1031-1036.
- Wollin, R., Eriksson, U. & Lindberg, A.A. (1981). Salmonella bacteriophage glycanases: endorhamnosidase activity of bacteriophages P27, 9NA, and KB1. *J. Virol.* 38, 1025-1033.
- Wright, C.F., Lindorff-Larsen, K., Randles, L.G. & Clarke, J. (2003). Parallel protein-unfolding pathways revealed and mapped. *Nat. Struct. Biol.* 10, 658-662.
- Wright, C.F., Steward, A. & Clarke, J. (2004). Thermodynamic characterisation of two transition states along parallel protein folding pathways. *J. Mol. Biol.* 338, 445-451.
- Wyckoff, T.J. & Raetz, C.R. (1999). The active site of *Escherichia coli* UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. Chemical modification and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 27047-27055.
- Xiang, Y., Leiman, P.G., Li, L., Grimes, S., Anderson, D.L. & Rossmann, M.G. (2009). Crystallographic insights into the autocatalytic assembly mechanism of a bacteriophage tail spike. *Mol. Cell* 34, 375-386.

- Yamasaki, M., Li, W., Johnson, D.J.D. & Huntington, J.A. (2008). Crystal structure of a stable dimer reveals the molecular basis of serpin polymerization. *Nature* 455, 1255-1258.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yoder, M.D. & Jurnak, F. (1995). Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *FASEB J.* 9, 335-342.
- Yoder, M.D., Keen, N.T. & Jurnak, F. (1993a). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* 260, 1503-1507.
- Yoder, M.D., Lietzke, S.E. & Jurnak, F. (1993b). Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure*, 1, 241-251.
- Yu, M.H. & King, J. (1984). Single amino acid substitutions influencing the folding pathway of the phage P22 tail spike endorhamnosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6584-6588.

## 6. Anhang

Protein	wt	V125A	V125L	V349L	V450A
<b>Datensatz</b>					
Wellenlänge (Å)	0.92018	0.92018	0.92018	0.95373	0.95373
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 3	P2 <sub>1</sub> 3	P2 <sub>1</sub> 3	P2 <sub>1</sub> 3	P2 <sub>1</sub> 3
Auflösung (Å)	50 – 1.59 (50 – 1.5)	50 – 1.59 (50 – 1.5)	50 – 1.59 (50 – 1.5)	50 – 1.59 (50 – 1.55)	50 – 1.59 (50 – 1.55)
beobachtete / einmalige Reflexe	794833 / 74828 (803277 / 80540)	990424 / 76620 (1001397 / 82923)	706035 / 76307 (718247 / 82256)	760305 / 72574 (765990 / 73581)	552655 / 50813 (588807 / 57335)
Vollständigkeit (%) gesamt / äußere Schale	97.1 / 86.8 (87.9 / 39.3)	98.1 / 90.5 (89.3 / 42.6)	98.1 / 90.6 (88.9 / 40.4)	93.3 / 55.8 (87.6 / 38.9)	88.9 / 58.3 (68.8 / 15.0)
<I / σ(I)> gesamt / äußere Schale	37.9 / 7.2 (35.5 / 4.5)	34.9 / 10.2 (32.6 / 6.8)	32.2 / 8.9 (26.4 / 5.3)	26.1 / 4.0 (22.8 / 3.6)	46.2 / 23.0 (36 / 8.8)
Rsym <sup>a</sup> (%) gesamt / äußere Schale	4.0 / 15.2 (4.0 / 18.1)	5.1 / 10.3 (5.1 / 10.1)	4.4 / 9.9 (5.6 / 12.3)	5.8 / 21.1 (7.0 / 22.2)	3.9 / 7.4 (5.0 / 15.7)
Mittlere Redundanz gesamt / äußere Schale	10.6 / 3.1 (10.0 / 1.9)	12.9 / 3.6 (12.1 / 1.7)	9.3 / 2.5 (8.7 / 1.7)	10.5 / 1.7 (10.4 / 2.0)	10.9 / 7.7 (10.3 / 4.1)
B-Wert (Å <sup>2</sup> ) Wilson Statistik / Mittelwert	18.1 (17.8)	18.4 (17.9)	16.5 (16.6)	16.7 (16.7)	15.5 (16.0)
Mosaizität (°)	0.16	0.11	0.10	0.15	0.21

s. folgende Seite

<b>Verfeinerung</b>									
Dimensionen der Einheitszelle a = b = c (Å)	119.90	120.44	120.27	120.29	119.99				
R <sup>b</sup> / R <sub>w</sub> ork / R <sub>free</sub> (%)	13.6 / 13.5 / 16.4	12.8 / 12.7 / 15.5	12.3 / 12.2 / 14.4	12.5 / 12.3 / 15.2	11.6 / 11.4 / 14.5				
Korrelationskoeffizient (Fo-Fc) <sub>w</sub> ork und (Fo-Fc) <sub>f</sub> ree	0.972 / 0.957	0.977 / 0.965	0.976 / 0.967	0.974 / 0.964	0.974 / 0.961				
Gesamter Koordinatenfehler (von R <sub>w</sub> ork und R <sub>free</sub> ) (Å)	0.064 / 0.066	0.058 / 0.061	0.059 / 0.06	0.068 / 0.07	0.081 / 0.08				
rmsd Bindungslängen (Å)	0.010	0.010	0.009	0.011	0.011				
rmsd Bindungswinkel (°)	1.330	1.338	1.263	1.376	1.213				
rmsd Torsionswinkel (°)	6.857	6.809	6.689	6.625	6.629				
B-Wert, Hauptkettenatome (Protein) (Å <sup>2</sup> )	10.90	11.46	10.80	8.47	10.01				
B-Wert, Seitenkettenatome (Protein) (Å <sup>2</sup> )	13.34	14.22	13.55	11.10	12.54				
B-Wert, alle Atome (Protein) (Å <sup>2</sup> )	12.08	12.78	12.12	9.74	11.22				
B-Wert, Lösungsmittel- und Heteroatome (Å <sup>2</sup> )	28.7 / 31.18	30.19 / 31.31	29.38 / 31.36	26.56 / 30.89	28.5 / 36.14				
Ramachandran Regionen									
erwünschte / erlaubte / Ausreißer (%)	97.1 / 2.7 / 0.2	97.1 / 2.7 / 0.2	97.5 / 2.4 / 0.2	97.3 / 2.5 / 0.2	97.1 / 2.7 / 0.2				
<b>Strukturmodell</b>									
Monomere pro Einheitszelle	1	1	1	1	1				
Aminosäuren	112-666	112-666	112-666	111-666	111-666				
Anzahl der Atome (ohne Wasserstoffe)	5356	5267	5415	5485	5251				
Wassermoleküle / Sulfationen	825 / 2	804 / 1	797 / 1	776 / 1	813 / 2				
Glycerol	11	10	7	6	4				
Ca <sup>2+</sup>	1	1	1	1	1				
Alternative Konformationen	48	41	60	76	38				
Eintrag in der RCSB Proteindatenbank (PDB-Code)	2VFM	2VFN	2VFO	2VFP	2VFAQ				

**Tabelle A1: Datensatz- und Verfeinerungsstatistiken.** In Klammern sind die Werte unter Berücksichtigung der letzten Auflösungsschale aufgelistet.

<sup>a</sup> R sym =  $\sum ||<i>-</i>| / \sum |$ , wobei | die Intensität des gemessenen Reflexes ist und <i>-</i> die durchschnittliche Intensität des Reflexes.

<sup>b</sup> R =  $\sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ , hierbei ist F<sub>o</sub> die gemessene Amplitude des Strukturfaktors und F<sub>c</sub> die mit dem Modell berechnete Amplitude.

Temperatur [°C]	wt	V125A	V272A	V321A	V349A	V450A	V498A	V523A
10	75 ± 12	64 ± 9	58 ± 12	56 ± 5	65 ± 11	57 ± 11	52 ± 6	69 ± 15
15	67 ± 8	56 ± 6	54 ± 8	53 ± 6	64 ± 16	53 ± 17	47 ± 9	53 ± 17
20	56 ± 9	61 ± 9	43 ± 4	47 ± 9	52 ± 13	51 ± 11	34 ± 7	54 ± 10
25	54 ± 6	52 ± 7	33 ± 4	42 ± 7	51 ± 8	49 ± 9	17 ± 4	47 ± 9
30	43 ± 10	41 ± 9	9 ± 2	18 ± 6	34 ± 12	36 ± 9	1 ± 1	27 ± 8
35	35 ± 7	26 ± 8	0 ± 0	0 ± 0	10 ± 4	16 ± 5	0 ± 0	4 ± 2
40	14 ± 6	6 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
45	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Temperatur [°C]	wt	V125L	V272L	V321L	V349L	V450L	V498L	V523L
10	76 ± 16	53 ± 15	65 ± 13	72 ± 10	80 ± 22	73 ± 15	67 ± 6	75 ± 20
15	66 ± 13	49 ± 17	60 ± 19	55 ± 7	75 ± 16	66 ± 19	67 ± 9	72 ± 20
20	72 ± 14	42 ± 12	63 ± 7	56 ± 9	73 ± 15	62 ± 15	60 ± 12	70 ± 11
25	65 ± 13	32 ± 14	58 ± 8	47 ± 14	58 ± 15	43 ± 16	56 ± 5	67 ± 19
30	49 ± 11	21 ± 15	47 ± 4	34 ± 9	45 ± 9	20 ± 10	44 ± 11	54 ± 11
35	41 ± 10	7 ± 8	33 ± 7	8 ± 7	19 ± 7	0 ± 0	27 ± 5	34 ± 6
40	17 ± 9	0 ± 0	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	4 ± 4
45	0 ± 0							

**Tabelle A2: Temperaturabhängigkeit der *in vitro* Faltungsausbeute.** Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen mit SD.

Zeit [min]	V125A	SD V125A	V272A	SD V272A	V321A	SD V321A	V349A	SD V349A	V450A	SD V450A	V498A	SD V450A	SD V450A	V523A	SD V523A	wt (A)	SD wt (A)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6	5	2	2	1	1	5	4	18	8	5	8	4	1	2	1	2
5	10	5	6	4	3	3	11	4	28	10	12	10	4	3	2	5	2
8	20	5	10	6	6	6	18	7	37	9	19	9	6	5	4	11	4
12	27	8	14	7	12	5	25	7	47	6	25	6	6	12	5	18	5
16	34	7	21	10	15	6	29	8	54	6	29	6	5	17	3	20	4
20	39	6	28	11	18	6	35	8	62	6	33	6	3	21	1	25	5
30	49	5	38	5	24	5	46	10	74	7	40	7	3	27	2	33	6
45	63	7	47	4	33	3	54	10	84	4	51	4	3	38	9	41	3
80	76	8	67	8	51	8	71	8	97	5	66	5	5	51	3	60	5
120	88	4	78	7	62	5	80	6	100	0	76	0	5	63	3	71	6
180	94	3	83	5	72	4	87	4	100	0	88	0	4	74	3	80	3
280	100	0	98	2	84	10	100	0	100	0	97	0	5	89	3	92	6

s. folgende Seite

Zeit [min]	V125L	SD V125L	V272L	SD V272L	V321L	SD V321L	V349L	SD V349L	V450L	SD V450L	V498L	SD V450L	V523L	SD V523L	wt (L)	SD wt (L)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	62	1	2	3	2	4	22	16	2	1	11	1	5	2	0	0
5	85	4	4	5	5	7	44	7	7	2	17	2	15	1	1	2
8	92	3	9	6	16	6	58	8	12	3	24	4	23	1	6	2
12	100	0	12	8	27	7	71	7	21	5	30	7	32	2	11	3
16	100	0	19	7	35	6	79	6	26	4	38	2	41	8	13	3
20	100	0	25	7	38	5	85	4	33	7	46	6	42	6	18	3
30	100	0	31	8	51	7	92	7	40	7	55	5	54	5	25	8
45	100	0	38	14	60	8	99	2	49	11	62	6	67	9	34	10
80	100	0	55	8	77	6	100	0	64	10	77	7	82	10	47	10
120	100	0	70	9	87	4	100	0	78	7	82	7	94	10	67	5
180	100	0	80	7	100	0	100	0	87	5	95	8	100	0	72	6
280	100	0	98	3	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

**Tabellen A3: Prozentuale Monomierzunahme bei Entfaltung von TSPAN in 2 % SDS bei 71 °C.** Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen mit SD.

Zeit [min]	wk T	SD wk T	wk I	SD wk I	wk M	SD wk M	V125A T	SD V125A T	V125A I	SD V125A I	V125A M	SD V125A M	V125L T	SD V125L T	V125L I	SD V125L I	V125L M	SD V125L M	$\Delta$ nmk M	SD $\Delta$ nmk M
0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
0.5	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	98	4	2	4	0	0	0	0
1	93	3	7	3	0	0	89	7	11	7	0	0	92	3	8	3	0	0	0	0
2	74	1	26	1	0	0	72	5	28	5	0	0	81	5	16	5	2	3	1	1
4	49	5	49	4	2	3	50	6	45	7	6	5	50	4	20	4	30	3	6	2
6	31	6	62	5	7	3	36	7	52	7	13	3	22	19	27	23	52	4	5	6
10	15	1	69	5	17	5	13	13	60	10	27	4	8	9	17	14	75	10	11	5
16	0	0	73	6	27	6	5	5	51	10	46	10	0	0	0	0	100	0	24	6
30	0	0	58	6	42	6	0	0	33	9	67	9	0	0	0	0	100	0	42	12
45	0	0	42	10	58	10	0	0	16	13	84	13	0	0	0	0	100	0	52	14
80	0	0	22	14	78	14	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	82	7
120	0	0	8	12	92	12	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	86	14
180	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	92	14
260	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100	0	99	1

**Tabelle A4: Prozentuale Anteile von Trimer, Intermediat und Monomer bei Entfaltung von TSP in 2 % SDS bei 71 °C.**

Angegeben sind Mittelwerte aus drei Messungen mit SD.

Rest (Windung)	H <sub>2</sub> O Radius 5 Å	C $\alpha$ -Abstände Windung <sup>a</sup> [Å] / (Reste)	C $\alpha$ -Abstand $\beta$ -Faltblätter <sup>b</sup> [Å] / (Rest)	Kavitäten <sup>c</sup>		CH-Gruppen Radius 6 Å	CH <sub>2</sub> -Gruppen Radius 6 Å	CH <sub>3</sub> -Gruppen Radius 6 Å	H-Brücken <sup>d</sup> Radius 5 Å
				Volumen [Å <sup>3</sup> ]	Länge [Å]				
125 (cap)	5	5 (V125-L144)	6.7 (A136*)	-	-	5	5	7	9
272 (4)	3	4.7; 5.1 (I190-V272-M292)	9.7 (L262)	43 und 21 <sup>#</sup>	17 und 6 <sup>#</sup>	19	9	11	11
321 (6)	1	4.8; 4.8 (M292-V321-V349)	8.0 (I306)	19 und 25 <sup>#</sup>	4 und 8 <sup>#</sup>	18	8	9	9
349 (7)	0	4.8; 5 (V321-V349-P381)	8.1 (A334)	19	4	24	11	9	8
450 (10)	2	5.3; 4.9 (K428-V450-P472)	10.2 (M443)	106**	49**	15	9	9	8
498 (12)	1	4.7; 4.7 (P472-V498-V523)	9.8 (I492)	106**	49**	8	11	10	7
523 (13)	1	5 (V523-L540)	8.9 (A518)	-	-	7	8	14	9

**Tabelle A5: Lokale Merkmale beim Seitenkettenstapel in TSPΔN Wildtyp (PDB-Code: 2VFM).**

Die Standardunsicherheit der Atomkoordinaten ist für die hier diskutierten Strukturen geringer als 0.09 Å (s. Tabelle A1 im Anhang).

<sup>a</sup> Abstände der C $\alpha$ -Atome von Windung zu Windung zwischen den angegebenen Resten des Seitenkettenstapels.

<sup>b</sup> Abstände der C $\alpha$ -Atome in den sich gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblättern A und C. \* Abstand der C $\alpha$ -Atome von V125 und A136 in der  $\alpha$ -Helix  $\alpha$ 2.

<sup>c</sup> von CASTp detektierte Hohlräume. Der Radius der Kugelprobe war 1.4 Å. <sup>#</sup> Es wurden zwei Kavitäten detektiert. \*\* Entlang der Windungen 10 bis 12 erstreckt sich ausgedehnte Kavität.

<sup>d</sup> mit Pymol v1.0 angezeigte polare Kontakte.

		TSPAN											
BHX		in vivo Faltung <sup>b</sup>		in vitro Faltung <sup>c</sup>		Faltung bei 10 °C <sup>d</sup>		Faltung bei 25 °C <sup>d</sup>		Denat. 71 °C, 2 % SDS <sup>e</sup>		Denat. 5 M GdmHCl, 25 °C <sup>f</sup>	
Übergänge <sup>a</sup> $\Delta\Delta G_{N \rightarrow U}^0$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]		$T_{max}$ (Ausprägung) [°C]		$T_{max}$ (Ausbeute [%]) [°C]		k auf w t norm. [s <sup>-1</sup> ]		k auf w t norm. [s <sup>-1</sup> ]		$\Delta\Delta G_{U}^{\ddagger}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]		$\Delta\Delta G_{U}^{\ddagger}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	
wt		37 (+)		40 (14 ± 6)		1 ± 0.05		1 ± 0.08		-		-	
V125A		39 (+)		40 (6 ± 2)		0.96 ± 0.02		0.97 ± 0.03		-2.3 ± 0.2		-2.6 ± 0.05	
V272A		32 (±)		30 (9 ± 2)		0.73 ± 0.06		0.31 ± 0.01		-0.9 ± 0.2		-0.3 ± 0.06	
V321A		32 (±)		30 (18 ± 6)		0.8 ± 0.07		0.4 ± 0.02		0.6 ± 0.2		-0.3 ± 0.03	
V349A		32 (+)		35 (10 ± 4)		1.06 ± 0.01		1.02 ± 0.02		-1.7 ± 0.2		-0.7 ± 0.03	
V450A		37 (+)		35 (16 ± 5)		1.24 ± 0.03		1.12 ± 0.08		-4.6 ± 0.2		-3 ± 0.06	
V498A		32 (±)		25 (17 ± 4)		1.44 ± 0.05		1.36 ± 0.04		-1.3 ± 0.2		-1.9 ± 0.04	
V523A		37 (±)		35 (4 ± 2)		1.08 ± 0.04		1.11 ± 0.03		0.3 ± 0.2		0.5 ± 0.03	
V125L		39 (±)		30 (21 ± 15)		0.64 ± 0.05		0.63 ± 0.07		-9.8 ± 0.3		-4.4 ± 0.04	
V272L		39 (+)		35 (33 ± 7)		1.03 ± 0.09		0.96 ± 0.01		-0.2 ± 0.2		0.2 ± 0.03	
V321L		37 (±)		35 (8 ± 7)		1.17 ± 0.05		1.01 ± 0.02		-2.3 ± 0.2		-1.5 ± 0.04	
V349L		37 (+)		35 (19 ± 7)		1.48 ± 0.10		1.14 ± 0.02		-6.6 ± 0.2		-2.7 ± 0.04	
V450L		37 (±)		30 (20 ± 10)		1.13 ± 0.03		1.27 ± 0.01		-1.2 ± 0.2		0.2 ± 0.04	
V498L		39 (±)		35 (27 ± 5)		1.28 ± 0.20		1.23 ± 0.02		-2.7 ± 0.2		-0.7 ± 0.04	
V523L		37 (+)		40 (34 ± 6)		1.2 ± 0.07		1.45 ± 0.05		-2.9 ± 0.2		0.3 ± 0.04	

Tabelle A6: Stabilität und Faltung der Stapelungsmutanten.

<sup>a</sup> Gleichgewichtsübergänge bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml und 10 °C; # aus Entfaltungübergang.

<sup>b</sup> Temperaturabhängigkeit der Faltung *in vivo*. Maximaltemperatur der Trimerbildung in *E. coli* JM83-Zellen.

<sup>c</sup> Temperaturabhängigkeit der Rückfaltung *in vitro*. Die Faltungsreaktion erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml für 72 h.

<sup>d</sup> Renaturierungskinetiken bei einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml. Werte sind auf die apparente Geschwindigkeitskonstante des Wildtyps 3.1 \* 10<sup>-3</sup> ± 0.1 \* 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> (10 °C) bzw. 16.6 \* 10<sup>-3</sup> ± 1.3 \* 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> (25 °C) normiert.

<sup>e</sup> Thermische Denaturierungskinetiken bei 71 °C und 2 % SDS. Die Ansätze enthielten 50 µg/ml Protein. Werte sind auf die Entfaltungsrate des Wildtyps 0.01 ± 0.0004 min<sup>-1</sup> normiert.

<sup>f</sup> Denaturierungskinetiken in 5 M GdmHCl bei 25 °C und einer Proteinkonzentration von 10 µg/ml. Werte sind auf die apparente Geschwindigkeitskonstante des Wildtyps 4.56 \* 10<sup>-3</sup> ± 0.04 \* 10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup> normiert.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Diese Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Potsdam, den 3.11.2009

(Marion Becker)



## Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Seckler, der mich so freundlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und in den letzten Jahren an die Themen und Techniken der Proteinfaltung herangeführt hat. Seine positive Art und die ansteckende Begeisterung für naturwissenschaftliche Themen und im Speziellen für die Biochemie und Proteinfaltung macht Spaß und schafft ein produktives Arbeitsklima. Besonders möchte ich Robert Seckler für das Vertrauen, welches er seinen Doktoranden und Mitarbeitern entgegen bringt, danken. Durch die vielen Gestaltungsfreiräume ermöglicht er jedem, seinen eigenen Weg in der Wissenschaft zu finden und diesen zu verfolgen. Bei Diskussionsbedarf hat er immer ein offenes Ohr und die richtigen Lösungen, Strategien und Gedankenanstöße parat. Die Unterstützung, die wir von ihm erfahren, ist nicht selbstverständlich und dafür danke ich ihm.

Dr. Klaus Gast möchte ich für seine freundliche Art und für die tausend technischen, experimentellen und theoretischen Hilfestellungen danken. Weiterhin für die gemeinsame Betreuung des Forschungspraktikums, bei dem ich einiges gelernt habe und welches mir immer Freude bereitet hat.

Christian Fiedler danke ich unter anderem dafür, dass er den Großteil dieser Arbeit trotz der Geburt von Jannik Adrian und eigenem Doktorarbeitsendphasenstress überaus sorgfältig durchgearbeitet hat und mich mit kritischem Rat und hilfreichen Ideen unterstützt hat. Zudem vielen Dank an ihn, Carl Camurça und Benjamin Heinz für die Administration unseres Netzwerkes und die Betreuung der Rechner.

Ganz lieben Dank den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der „Secklerei“: Sabine, Jan, Christian, Natalie, Nina, Igor, Antje, Steffi, Karolin, Dorothee, Christin, Robert, Swetlana, Klaus, Jana, Mandy, Simone, Franziska, Jasmin, Peter, Stefan, Anait, Jeannette, Ben, Steffi, Andreas, Alex, Sonja, Armin, Ben, und Anwar für ihren Beistand in schönen, witzigen, spannenden, experimentell kniffligen, traurigen, gemütlichen, informativen und aufregenden Stunden!

Unseren technischen Assistentinnen Jana Kramer, Mandy Schietke, Simone Brockmann, Jasmin Kurtzke und Franziska Block danke ich zudem für ihre kontinuierliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft. Zudem danke ich ihnen und Dr. Steffi Barbirz für den stetigen Kampf gegen das Laborchaos und etliche hilfreiche Ratschläge. Jana Kramer danke ich besonders für ihre enorme Hilfe bei der Reinigung der Tailspikemutanten und bei den thermischen Denaturierungsexperimenten.

Den ehemals studentischen Hilfskräften Katja Haike, Pavel Lulchev, Sebastian Rämisch und Igor Gayk danke ich für ihre Unterstützung bei Klonierungen, Reinigungen, Tailspikehybridisierungen und so einigen gemessenen Faltungs- und Entfaltungskinetik.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Udo Heinemann, Dr. Jürgen-Joachim Müller und der gesamten Arbeitsgruppe Heinemann vom Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch für die erfolgreiche Kooperation und entspannende Mittagspausen weitab vom Dunkelkern. Der hervorragenden

Betreuung durch Dr. Müller sind die fünf hoch aufgelösten Kristallstrukturen der Tailspikeproteine zu verdanken.

Für die gute und produktive Zusammenarbeit möchte ich auch den theoretischen Proteinfaltern PD Dr. Thomas Weigl und Dr. Lothar Reich aus der Abteilung für Theorie und Bio-Systeme unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhard Lipowsky am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Potsdam danken. Weiterhin danke ich Prof. Lipowsky dafür, dass ich seine Arbeitsgruppe auf zwei Tagungsreisen begleiten durfte.

Weiterhin danke ich Kerstin Hinrichsen für ihre professionelle und geduldige Korrektur meiner Grammatik- und Rechtschreibfehler. Ich freue mich schon darauf, wenn Du mir - und auch bitte Lisa und Charlotte - erklärst, was ich bloß die ganzen Jahre gemessen habe.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre Liebe, das Vertrauen und die Sicherheit, die sie mir schenken. Sie bilden die stetige Basis, die alles ermöglicht und mich zur Freiheit ermutigt.