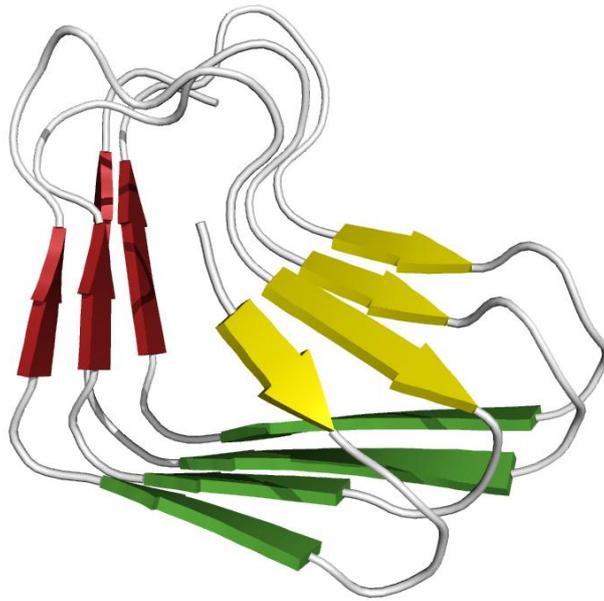


Institut für Biochemie und Biologie  
Arbeitsgruppe für Physikalische Biochemie

# Die Strukturbildung der $\beta$ -Helix in der Pektatlyase Pel-15



## 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  
**Dipl.-Biol. Christian Fiedler**

Potsdam, April 2010

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/2010/4725/>  
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-47250](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-47250)  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-47250>

*Für meine Eltern*



## Zusammenfassung

Pektatlyase (Pel-15) aus dem alkalophilen Bodenbakterium *Bacillus spec.* KSM-P15 ist mit 197 Aminosäuren eines der kleinsten, bekannten  $\beta$ -3-Solenoidproteine. Sie gehört zur Enzymfamilie der Pektatlyasen (EC 4.2.2.2), spaltet also Polygalakturonsäurederivate in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\beta$ -Eliminierungsprozess. Wie bei allen Proteinen dieser Enzymfamilie ist auch die Polypeptidkette von Pel-15 zu einer einsträngigen, rechtsgängigen, parallelen  $\beta$ -Helix aufgewunden. In diesem Strukturmotiv enthält jede Windung drei  $\beta$ -Stränge, die jeweils durch flexible Schleifenbereiche, sogenannte *turns*, miteinander verbunden sind. Insgesamt acht Windungen stapeln sich in Pel-15 übereinander und bilden entlang der Helixachse flächige, parallele  $\beta$ -Faltblätter aus. Im Bereich dieser  $\beta$ -Faltblätter existiert ein ausgedehntes Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen, durch das der hydrophobe Kern, der sich im Inneren der  $\beta$ -Helix befindet, vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt wird. Besondere Abschlussstrukturen an beiden Enden der  $\beta$ -Helix, wie sie typischerweise bei anderen Vertretern dieser Strukturklasse ausgeprägt werden, sind in Pel-15 nicht zu beobachten. Stattdessen sind die terminalen Bereiche der  $\beta$ -Helix über Salzbrücken und hydrophobe Seitenkettenkontakte stabilisiert.

Obwohl die Konzentration polarer Seitenketten im Bereich des C-Terminus die *head-to-tail* Aggregation benachbarter Pel-15 Moleküle verhindern sollte, bilden sich bei sehr hohen Konzentrationen im Proteinkristall elongierte Strukturen aus, die an das Organisationsprinzip von bestimmten Amyloidfibrillen erinnern. Letztere sind mit Proteinfehlfaltungskrankheiten wie Alzheimer, Chorea Huntington oder Typ-II-Diabetes assoziiert. Tatsächlich lassen sich zwischen der *cross*- $\beta$ -Struktur, die das prägende Merkmal von Amyloidfibrillen darstellt, und dem Organisationsprinzip der parallelen  $\beta$ -Helix zahlreiche strukturelle Gemeinsamkeiten feststellen. Diese umfassen unter anderem die Ausbildung flächiger, paralleler  $\beta$ -Faltblätter, die Stapelung identischer oder chemisch ähnlicher Seitenketten, einen Windungsabstand von ca. 4.8 Å und die Fähigkeit zur Oligomerisierung über laterale Kontakte. Darüber hinaus besitzen beide Struktur motive einen lösungsmittelunzugänglichen, hydrophoben Kern. Das Zusammenspiel dieser Strukturelemente ist die Ursache für die bemerkenswerte, thermodynamische Stabilität, die ein weiteres, wesentliches Charakteristikum beider Struktur motive darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Pektatlyase Pel-15 hinsichtlich ihres Faltungsgleichgewichtes, ihrer enzymatischen Aktivität und der Kinetik ihrer Strukturbildung charakterisiert. In eine evolutionär konservierte Helixwindung wurden destabilisierende Mutationen eingeführt, und deren Auswirkungen mittels spektroskopischer Methoden analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass Pel-15 in Gegenwart des Denaturierungsmittels Guanidiniumhydrochlorid (GdmHCl) einen hyperfluoreszenten Gleichgewichtszustand (HF) populiert, der nach Messungen von Faltungs- und Entfaltungskinetiken ein konformationelles Ensemble verschiedener Zustände darstellt. Bei diesen „HF-Zuständen“ handelt es sich um mindestens zwei, kinetisch separierte Spezies, die durch eine hohe Aktivierungsbarriere vonein-

ander getrennt sind. Inverse Doppelsprungexperimente der Art  $U \rightarrow N \rightarrow U$  erwiesen, dass bei der Rückfaltung aus dem denaturierten Zustand etwa 10 % der entfalteten Polypeptidketten schnell, d.h. innerhalb einer Totzeit von weniger als 2 s, den nativen Zustand erreichen. Die restlichen Moleküle populieren während ihrer Rückfaltung einen Zwischenzustand, der als  $HF_{\text{slow}}$  bezeichnet wird. Mit einer Zeitkonstante von ca.  $\tau = 100$  s reagiert  $HF_{\text{slow}}$  innerhalb des HF-Ensembles weiter zu  $HF_{\text{fast}}$ . Die Denaturierungsmittelabhängigkeit dieser langsamen Reaktion ist gering, was es wahrscheinlich macht, dass trans-/cis-Prolylisomerisierung ihre Geschwindigkeit limitiert. Ein cis-Peptid vor der Seitenkette P60 in der nativen Struktur untermauert diese Vermutung. Die Existenz dieses cis-Peptides macht es erforderlich, den denaturierten Zustand als ein Ensemble kinetisch separierter Konformationen, kurz: *DSE*, zu betrachten, das durch die Spezies  $U_{\text{fast}}$  und  $U_{\text{slow}}$  bevölkert wird. Fluoreszenzspektroskopisch lassen sich  $HF_{\text{slow}}$  und  $HF_{\text{fast}}$  nicht voneinander unterscheiden. Aus einfachen Rückfaltungskinetiken und Doppelsprungexperimenten der Art  $N \rightarrow HF \rightarrow N$  geht allerdings hervor, dass  $HF_{\text{fast}}$  aus thermodynamischer Sicht stabiler ist als  $HF_{\text{slow}}$ .

Aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten wurde ein Minimalmodell für den Faltungsweg von Pel-15 hergeleitet. Nach diesem Modell stehen die HF-Spezies ( $HF_{\text{slow}}$ ,  $HF_{\text{fast}}$ ) mit den Konformationen des *DSE* in einem thermodynamischen Kreisprozess. Das aufgestellte Faltungsmodell sagt die Existenz paralleler Faltungswege voraus, wie sie sich mehrfach in den Experimenten andeuteten. Ferner positioniert es  $HF_{\text{fast}}$  und die native Konformation N auf die gleiche, „native“ Seite der Aktivierungsbarriere und trägt damit der Tatsache Rechnung, dass die Gleichgewichtseinstellung zwischen diesen Spezies zu schnell ist, um mit manuellen Techniken bestimmt zu werden.  $HF_{\text{fast}}$  und N unterscheiden sich voneinander durch ihre Fähigkeit,  $Ca^{2+}$ -Ionen zu binden. Aufgrund der Existenz einer hochaffinen  $Ca^{2+}$ -Bindestelle ( $K_d = 10 \mu\text{M}$ ) verschiebt sich das Gleichgewicht bereits in Gegenwart von 1 mM  $CaCl_2$  soweit auf die Seite des nativen Zustandes, das  $HF_{\text{fast}}$  nicht länger nachweisbar ist. Titrationsexperimente mit verschiedenen Guanidiniumsalzen haben gezeigt, dass eine Deletion dieser hochaffinen Bindung dazu führt, dass die entsprechenden Pel-15-Varianten in Gegenwart mittlerer GdmHCl-Konzentrationen nicht mehr in der Lage sind, aus dem *ISE* in den nativen Zustand zu relaxieren. Die Existenz einer niedrigaffinen  $Ca^{2+}$ -Bindestelle ( $K_d = 3 \text{ mM}$ ) im Bereich des aktiven Zentrums wurde bestätigt. Sie ist nach Hatada *et al.* (2000) essentiell für die enzymatische Aktivität von Pel-15.

Entgegen der anfänglichen Vermutung kommt einer lokalen, evolutionär konservierten Disulfidbrücke im Zentrum der  $\beta$ -Helix eine wichtige Stabilisierungsfunktion zu. Die Disulfidbrücke befindet sich in einem kurzen T1-*turn* der  $\beta$ -Helix nahe dem aktiven Zentrum. Obwohl ihr Austausch gegen die Reste Val und Ala (VA-Mutation) die freie Stabilisierungsenthalpie des Proteins um ca. 10 kJ/mol reduziert, lässt die Struktur im Bereich der Mutationsstelle keine gravierende Veränderung erkennen. Die katalytisch relevante  $Ca^{2+}$ -Bindungsaffinität bleibt unbeeinflusst; dennoch zeigen Enzymaktivitätstests für VA-Mutanten eine Reduktion der enzymatischen Aktivität um fast 50 % an. Die Disulfidbrücke

besitzt demnach eine allosterische Funktion und stabilisiert die Interaktionsfläche zwischen PGA-Molekülen und bislang nicht identifizierten Resten des katalytischen Zentrums. Stark verlangsamte Rückfaltungskinetiken der VA-Mutanten führen überdies zu der Vermutung, dass der Disulfidbrücke während der Strukturbildung der  $\beta$ -Helix die Funktion eines Faltungsnukleus zukommt bzw. dass sie die Ausbildung des korrekten Helixregisters positiv beeinflusst. Die evolutionär konservierte Helixwindung im allgemeinen und die in ihr enthaltene Disulfidbrücke im Besonderen müssen nach den vorliegenden Ergebnissen also eine zentrale Funktion sowohl für die Struktur des katalytischen Zentrums als auch für die Strukturbildung der  $\beta$ -Helix während der Faltungsreaktion besitzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit den Faltungseigenschaften, die für PelC beschrieben wurden, und finden in bestimmten Punkten Anklang an die Faltungseigenschaften des strukturell ähnlichen Adhäsins Pertactin. Vor allem aber prädestinieren sie Pel-15 als ein neues,  $\beta$ -helikales Modellprotein. Aufgrund seiner einfachen Topologie, seiner niedrigen Windungszahl und seiner hohen thermodynamischen Stabilität ist Pel-15 sehr gut geeignet, die Determinanten von Stabilität und Strukturbildung des parallelen  $\beta$ -Helix-Motivs in einer Auflösung zu studieren, die aufgrund der Komplexität bisheriger  $\beta$ -helikaler Modellsysteme nicht zur Verfügung stand.

## Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure ( <i>amino acid</i> )
Abb	Abbildung
AS	Ammoniumsulfat
CD	Zirkulardichroismus ( <i>circular dichroism</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DSE	Ensemble denaturierter Zustände ( <i>denatured states ensemble</i> )
DTT	Dithiothreitol
FF	Fast Flow
GdmCl / GdmHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISE	Ensemble intermediärer Zustände ( <i>intermediate states ensemble</i> )
LB	Kulturmedium nach Luria-Bertani
M	Protein-Größenstandard ( <i>Low Marker</i> )
MCS	Multiple Cloning Site
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
OD	Optische Dichte
PA	Periplasma-Aufschluss
PBS	Polymyxin B Sulfat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGA	Polygalacturonsäure ( <i>polygalacturonic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
S/R	Signal/Rauschen
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SIM	Selbstinduzierendes Medium
SV	Säulenvolumen
üNK	Über-Nacht-Kultur

Für die Aminosäuren wurde der Ein-Buchstaben-Code verwendet.

Punkte dienen als Dezimaltrennzeichen.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Proteinfaltung „ <i>in-vitro</i> “ vs. „ <i>in-vivo</i> “ .....	1
1.2.	Solenoidproteine.....	3
1.2.1.	Allgemeine Merkmale von Solenoidproteinen .....	3
1.2.2.	Strukturelle Merkmale von $\beta$ -Solenoidproteinen.....	4
1.2.3.	Die rechtsgängige, parallele $\beta$ -Helix .....	6
1.3.	Pektatlyasen.....	9
1.3.1.	Vorkommen und Funktion .....	9
1.3.2.	Die Alkalische Pektatlyase (Pel-15) aus <i>Bacillus spec.</i> KSM-P15 .....	10
1.4.	Funktionen von Disulfidbrücken in Proteinen.....	16
1.5.	Amyloidfibrillen.....	17
1.5.1.	Hintergrund und Organisation des cross- $\beta$ Motivs .....	17
1.5.2.	Strukturelle Modelle von Fibrillierungsmechanismen .....	18
1.6.	Die Wechselwirkung von Peptiden mit GdmHCl und Harnstoff (Kurzzusammenfassung) .....	20
1.7.	Zielstellung.....	21
2.	Material und Methoden .....	23
2.1.	Material .....	23
2.1.1.	Chemikalien .....	23
2.1.2.	Enzyme.....	23
2.1.3.	Puffer, Medien und Antibiotika.....	23
2.1.4.	Organismen .....	25
2.1.5.	Plasmide und Primer .....	25
2.1.6.	Standards und Kits.....	26
2.1.7.	Sonstiges Material .....	26
2.1.8.	Küvetten .....	26
2.1.9.	Geräte .....	27
2.1.10.	Software .....	27
2.2.	Methoden.....	28
2.2.1.	Mikro- und molekularbiologische Methoden .....	28
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden .....	30
2.2.3.	Proteinbiophysikalische Methoden.....	36
2.2.4.	Mathematische Auswertung .....	40
3.	Ergebnisse .....	47
3.1.	Klonierung und Expression .....	47
3.1.1.	Klonierung des Pel-15 Gens in den Expressionsvektor pET22b(+)......	47
3.1.2.	Chromatographische Reinigung von Pel-15 .....	49
3.2.	Spektroskopische Charakterisierung .....	50
3.2.1.	Spektroskopische Eigenschaften des Pel-15 Wildtypproteins .....	50
3.2.2.	Spektroskopische Eigenschaften von Pel-15 DCCA, DVAA und AVAA.....	53
3.3.	Pel-15 im thermodynamischen Gleichgewicht .....	54
3.3.1.	Isothermale Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der hochaffinen $\text{Ca}^{2+}$ - Bindung .....	55
3.3.2.	Fluoreszenztitration zur Bestimmung der niedrigaffinen $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung .....	56

3.3.3.	<i>In-vitro</i> Faltung und thermodynamische Stabilität von Pel-15WT .....	57
3.3.4.	Pel-15 WT und Harnstoff.....	70
3.4.	Enzymaktivität .....	72
3.4.1.	Spezifische Aktivität und Konzentrationsabhängigkeit der Renaturierung .....	72
3.4.2.	Zeitabhängigkeit der Reaktivierung von Pel-15 .....	73
3.4.3.	Thermische Stabilität von Pel-15WT und der Varianten DVAC und DVAA .....	74
3.5.	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Pel-15 Variante AVAA .....	75
3.5.1.	Vorbemerkungen .....	75
3.5.2.	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse.....	76
3.5.3.	Einfluss der Punktmutationen C67V, C71A und C148A auf die strukturelle Integrität von Pel-15 .....	79
3.5.4.	Theoretische Lösungsmittelzugänglichkeit im Vergleich zwischen Pel-15 WT und Pel-15 AVAA .....	82
3.6.	Kinetische Charakterisierung von Pel-15 .....	83
3.6.1.	Die Entfaltungsreaktion von Pel-15 in GdmHCl.....	83
3.6.2.	Kinetische Stabilität der Pel-15 Varianten DCCA und DVAA .....	88
3.6.3.	Die Rückfaltungsreaktion aus GdmHCl .....	90
3.6.4.	Faltung und Entfaltung der Pel-15 Varianten DCCA und DVAA.....	95
3.6.5.	Entstehung einer schnell entfaltenden Spezies während der Rückfaltung: Inverse Doppelsprungexperimente .....	99
3.7.	Eigenschaften des hyperfluoreszenten Intermediates HF .....	102
3.7.1.	Rekonstruktion des Fluoreszenzspektrums von HF aus kinetischen Daten .....	102
3.7.2.	Fluoreszenzlöschung durch Acrylamid .....	107
3.7.3.	HF wird durch eine Wechselwirkung mit Gdm <sup>+</sup> induziert. ....	109
4.	Diskussion.....	112
4.1.	Proteinexpression und <i>in-vivo</i> Faltung .....	112
4.1.1.	Identifikation von Pel-15 im Rohextrakt und Temperaturabhängigkeit der periplasmatischen Expression .....	112
4.2.	Die Faltung von Pel-15.....	114
4.2.1.	Mögliche kinetische 3-Zustandsmodelle (Wildegger & Kiefhaber 1997b) .....	114
4.2.2.	Cis-/trans-Prolylisomerisierung und die Faltungsreaktion von Pel-15 .....	117
4.2.3.	Modellhafte Erklärung der Faltungs- und Entfaltungskinetiken.....	119
4.2.4.	Die verschiedenen Teilgleichgewichte des Pel-15 Faltungsmodells .....	122
4.2.5.	Besonderheiten der Mutante C148A (Pel-15 DCCA).....	127
4.2.6.	DCCA ohne Disulfidbrücke: die Mutanten DVAA und AVAA.....	130
4.3.	Hyperfluoreszenz in Pel-15 .....	134
4.4.	Zusammenfassende Diskussion.....	136
4.4.1.	Pel-15 im Vergleich mit anderen $\beta$ -Helixproteinen (PelC, Pertactin).....	136
4.4.2.	Pel-15 als Modellprotein für die $\beta$ -Helix-Forschung.....	138
4.5.	Anschlussprojekte .....	139
5.	Quellenverzeichnis.....	140
6.	Anhang.....	145

# 1. Einleitung

Als Grundlage des Lebens übernehmen Proteine katalytische Funktionen in fast allen biochemischen Reaktionen. Sie verleihen Zellen bzw. Geweben Struktur und Stabilität und bilden als Bindungspartner die Grundlage zellulärer Signal- und Reizweiterleitungen. Der Begriff „Protein“ (griech.: πρῶτος (*protos* – Erster, Vorderster) wurde 1840 von dem skandinavischen Chemiker Jens Jörn Berzelius (1779-1884) vorgeschlagen.

Proteine sind lineare Ketten aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Sie werden auch als Polypeptide oder als Eiweiße bezeichnet. Die funktionale Form von Proteinen ist eine kompakte, dreidimensional exakt bestimmte Struktur, die häufig Komplexe mit anderen Proteinen bildet.

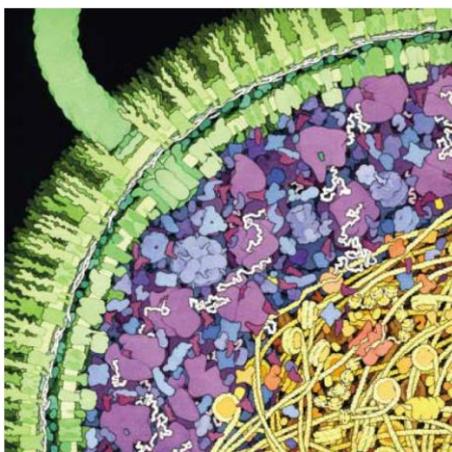
Mutationen des Erbmaterials können eine Veränderung der Aminosäuresequenz verursachen. In einigen Fällen kann dies dazu führen, dass während der Kompaktierung der Polypeptidkette fehlgefaltete Strukturen entstehen, was im äußersten Fall einen Funktionsausfall nach sich ziehen kann. Die fehlgefalteten Strukturen werden normalerweise von der Zelle abgebaut. Allerdings sind einige Proteine dazu prädestiniert, mit anderen fehlgefalteten Strukturen zu interagieren und hierdurch den Ausbruch sogenannter „Proteinfehlfaltungskrankheiten“ zu begünstigen. Bekannte Beispiele für solche Krankheiten sind die Chorea Huntington, die Alzheimer-Krankheit oder das Parkinson-Syndrom. In den letzten Jahren wurden viele Erkenntnisse über die Grundlage solcher Krankheitsbilder gewonnen, allerdings sind noch längst nicht alle Details verstanden, und die Entwicklung geeigneter Medikamente steckt noch in den Kinderschuhen.

## 1.1. Proteinfaltung „*in-vitro*“ vs. „*in-vivo*“

In seiner Arbeit „*Protein Denaturation and the Properties of Protein Groups*“ stellte Mortimer Louis Anson 1945 die Proteinfaltung als einen reversiblen, kooperativen Alles-oder-Nichts-Prozess dar und legte damit den Grundstein für die Anwendung des Konzepts der Thermodynamik auf die Faltung von Proteinen (Anson 1945). Mehr als 25 Jahre später gelang Robert Bruce Merrifield die chemische Synthese von enzymatisch aktiver Ribonuklease A, die sich durch Anwendung konventioneller Chromatographietechniken nicht vom gereinigten „Naturprodukt“ unterscheiden ließ (Gutte & Merrifield 1971). Damit war erstmals gezeigt worden, dass die dreidimensionale Struktur eines Protein allein durch die Aufeinanderfolge seiner Bausteine, der Aminosäuren, bestimmt ist und dass es für das Erreichen dieser dreidimensionalen Struktur nicht wesentlich ist, in welchem Ausgangszustand sich die Polypeptidkette befindet. Basierend auf diesen Erkenntnissen formulierte Christian B. Anfinsen 1973 seine „thermodynamische Hypothese“. Ihr folgend ist die Entstehung der dreidimensionalen Struktur ein gerichteter Prozess, dessen Triebkraft in der Minimierung der freien Energie der Polypeptidkette besteht (Anfinsen 1973).

Proteinfaltung *in-vivo* vollzieht sich unter reduzierenden Bedingungen in einer chemisch heterogenen Umgebung, die durch teils sehr hohe Proteinkonzentrationen im Bereich von 300 bis 450 mg/ml (Evans *et al.* 2008) und eine Vielzahl verschiedener Chaperone gekennzeichnet ist. Diese binden an die ungefalteten Polypeptidketten und stellen chemisch kompartimentierte Reaktionsräume zur Verfügung, in denen die Faltung entlang optimaler Trajektorien verlaufen kann (Hartl & Hayer-Hartl 2002). Zusätzlich besteht bei der *de-novo* Proteinsynthese am Ribosom die Möglichkeit vektorieller Faltungsreaktionen. Das bedeutet, dass die aminoterminalen Enden (die N-Termini) der naszierenden Polypeptidketten bereits konformationelle Freiheiten und die Möglichkeit zur Strukturierung besitzen, während die carboxyterminalen Enden (die C-Termini) das Ribosom noch gar nicht verlassen haben (Ignatova *et al.* 2007). Es ist faszinierend, dass die Geschwindigkeit, mit der die Polypeptidkette das Ribosom verlässt, die Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturelemente fördern oder unterdrücken kann und dass diese „Elongationsgeschwindigkeit“ auf Ebene der DNA durch die bevorzugte Verwendung bestimmter Codons bestimmt zu sein scheint (Zhang & Ignatova 2009). Diese Art der vektoriellen Kompaktierung könnte nach aktueller Auffassung eine Strategie darstellen, Aggregationsreaktionen mit anderen ungefalteten Polypeptiden zu vermeiden (Clark 2004). Außerdem wurde teils experimentell, teils theoretisch ein Zusammenhang zwischen den hohen Makromolekülkonzentrationen (*crowding*-Effekten) und der Stabilität von Polypeptidketten bzw. ihrem Bestreben aufgezeigt, einen kompakten, aggregationsresistenten Zustand zu erreichen (Cheung *et al.* 2005).

*In-vitro* Experimente laufen unter völlig anderen Bedingungen ab. Sie testen die Stabilität und die Faltung von Polypeptidketten in hochreinen, monodispersen Pufferlösungen bei konstanten Temperaturen und in chemisch einheitlichen, optimierten Reaktionsräumen. Die Konzentration der verwendeten Proteinlösungen kann je nach verwendeter Detektionsmethode bis zu sechs Größenordnungen unter der Proteinkonzentration in der Zelle liegen. Während der Faltung werden unter *in-vitro* Bedingungen Reaktionen geschwindigkeitsbestimmend, die *in-vivo* enzymatisch katalysiert werden (Seckler & Jaenicke 1992). Hierzu zählen beispielsweise die Isomerisierung von cis-Prolylpeptidbindungen durch cytosolische Prolinisoimerasen (Schmid 1993) oder die Katalyse der Ausbildung von



**„Molecular crowding“**

David S. Goodsell (*Chembiochem*, 2003)

Disulfidbrücken im oxidierenden Milieu des bakteriellen Periplasmas Gram-negativer Bakterien durch Thiol/Disulfid Oxidoreduktasen wie DsbA (Jonda *et al.* 1999). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass die Ausbildung von Disulfiden schon während der SecA-katalysierten Translokation über die bakterielle Membran stattfinden kann, was möglicherweise in Gram-positiven Bakterien von Bedeutung ist (Kadokura & Jon Beckwith 2009).

Der hauptsächliche Unterschied zur Faltung *in-vivo* besteht darin, dass die Faltung von Proteinen *in-vitro* kein

vektorieller Vorgang ist, sondern dass die vollständige Polypeptidkette aus chemisch bzw. thermisch induzierten Entfaltungszuständen in ihre native Struktur zurückfällt. Dabei verhält sie sich idealerweise als eine „kooperative Einheit“, deren Faltung dem Alles-oder-Nichts-Prinzip gehorcht (Kloss *et al.* 2008). Die Rückfaltung bei hohen Proteinkonzentrationen unter *in-vitro* Bedingungen führt häufig zur Aggregation eines Teils bzw. der Gesamtheit des renaturierenden Ensembles.

Angesichts der fundamentalen Unterschiede zwischen *in-vivo* und *in-vitro* Experimenten ist es nicht überraschend, dass sich nicht nur die Faltungswege unterscheiden, über die die Polypeptidketten *in-vivo* und *in-vitro* den nativen Zustand erreichen. Vielmehr ist es eingängig, dass in *in-vitro* Experimenten zum Teil Zwischenzustände populiert werden, die für das Erreichen des nativen Zustands *in-vivo* nicht relevant sind (Evans *et al.* 2008). Für das Verständnis der Prinzipien, die der Proteinfaltung und -aggregation zugrunde liegen, sind *in-vitro* Experimente trotz dieser Diskrepanz unverzichtbar.

## 1.2. Solenoidproteine

### 1.2.1. Allgemeine Merkmale von Solenoidproteinen

Unter Solenoidproteinen (engl. *Solenoid* – Spule) werden Proteine zusammengefasst, in denen sich eine Abfolge von Sekundärstrukturelementen ( $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Stränge,  $3_{10}$ -Helices) mehrmals in gleicher Weise wiederholt, sodass eine fortlaufende Superhelixstruktur entsteht. Benachbarte Spulenwindungen packen dabei dicht gegeneinander, sodass die Rückgratatomer der Polypeptidkette entlang der Spulenachse fortlaufend, stabilisierende Kontaktnetzwerke ausprägen (Kloss *et al.* 2008). Außerdem können benachbarte Spulenwindungen über Seitenkettenstapelung aromatischer und hydrophober Aminosäureseitenketten miteinander interagieren. Im Gegensatz zu globulären Proteinen können Seitenketten, die in der Primärstruktur von Solenoidproteinen weit voneinander entfernt sind, unter nativen Bedingungen keine stabilisierenden Kontakte ausprägen. Bei gleicher Länge sind Solenoidproteine daher flexibler als globuläre Proteine. Dies und die großen, elongierten Interaktionsflächen sind der Grund dafür, dass sich Solenoidproteine in funktioneller Hinsicht zumeist als Partner von Protein-Protein-Interaktionen beobachten lassen (Kobe & Kajava 2000).

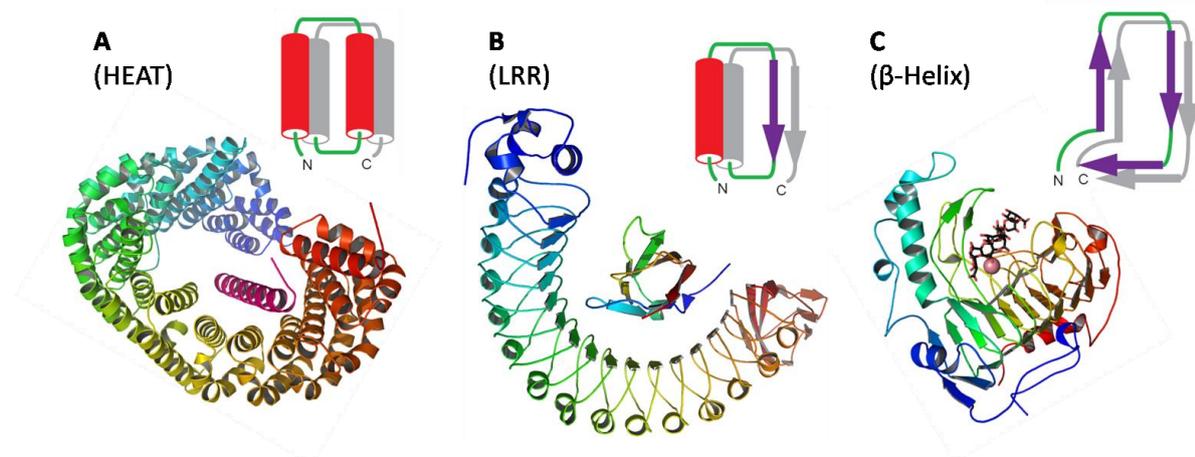
Man differenziert zwischen verschiedenen, solenoiden Strukturformen anhand von Händigkeit (*handedness*), Drehung (*twist*), Krümmung (*curvature*) und Oligomerisierungszustand. Anhand dieser Kriterien und unter Berücksichtigung der in den repetitiven Einheiten enthaltenen Sekundärstrukturelemente lassen sich ca. 20 verschiedene Klassen von Solenoidproteinen definieren (Kajava & Steven 2006).

*HEAT-Sequenzen* sind beispielsweise die Bausteine für rechtsgängige  $\alpha$ -2-Solenoidproteine. Proteine dieser Solenoidklasse sind durch eine vergleichsweise geringe Krümmung gekennzeichnet, besitzen allerdings einen sehr starken *twist*. Dadurch sind sie in der Lage, mit langgestreckten, flexiblen Strukturen zu interagieren. Ein Beispiel, das 1999 in der Zeitschrift *Nature* veröffentlicht wurde, ist

die Struktur des Karyopherins Importin- $\beta$  (Cingolani *et al.* 1999). Dieses Protein enthält eine Reihe aufeinanderfolgender HEAT-Sequenzen und ist in Verbindung mit Importin- $\alpha$  für die GTP-abhängige Translokation von Proteinen in den Zellkern verantwortlich.

*Leucine rich repeats* (LRR) sind Beispiele rechtsgängiger,  $\alpha/\beta$ -Solenoiden. Sie präsentieren auf der konkaven Seite ihrer stark gekrümmten Struktur ein paralleles  $\beta$ -Faltblatt, dem auf der konvexen Seite jeder Spulenwindung meist eine kurze  $\alpha$ - oder  $3_{10}$ -Helix gegenüberliegt. Die Verbindung von teils sehr starken Krümmungen und geringen Drehungen versetzen LRR-Proteine in die Lage, mit globulären Proteinen zu interagieren – so beobachtet im Fall eines RNase Inhibitors (Kobe & Deisenhofer 1993). Ein Vertreter der LRR-Proteine ist das hufeisenförmige Adhäsionsprotein Internalin A, dessen Interaktion mit dem humanen Rezeptor E-Cadherin das humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* dazu befähigt, von Epithelzellen phagozytiert zu werden.

*Ankyrin-Repeats* (AR) repräsentieren rechtsgängige  $\beta/\beta/\alpha/\alpha$ -Solenoiden, in denen die  $\alpha$ -Helices in jeder Spulenwindung durch jeweils einen  $\beta$ -hairpin (vgl. Abb. 1-2A) miteinander verbunden sind. Am Beispiel des AR-Protein tANK aus dem Archaeobakterium *Thermoplasma volcanium* wurde vor einiger Zeit die atomare Struktur eines im Gleichgewicht populierte Intermediates nachgewiesen (Löw *et al.*



**Abb. 1-1: Beispiele für Solenoidproteine.** Der Farbverlauf zeigt die Richtung der Polypeptidkette an (N-Terminus: blau, C-Terminus: rot). (A) Humanes Importin- $\beta$  im Komplex mit der IBB-Domäne von humanem Importin- $\alpha$  (Cingolani *et al.* 1999; PDB: 2QNA). (B) *Listeria monocytogenes* Internalin A im Komplex mit der N-terminalen Domäne des humanen E-Cadherin. (Wollert *et al.* 2007; PDB: 2OMX). (C) *Bacillus subtilis* Pektatlyase (BsPel) im Komplex mit Hexa- $\alpha$ -D-Galactopyranuronat. Die Kugel zeigt die Position eines  $\text{Co}^{2+}$ -Ions an (Seyedarabi *et al.* 2010, PDB: 3KRG). Die Abbildungen wurden mit PyMOL erstellt. Die Schemazeichnungen wurden der Arbeit von Kobe & Kajava (2000) entnommen.

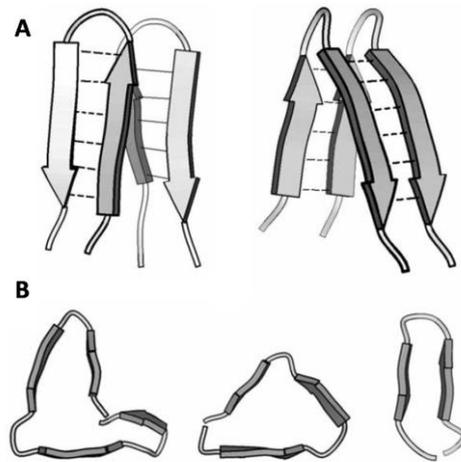
2008).

### 1.2.2. Strukturelle Merkmale von $\beta$ -Solenoidproteinen

Der Begriff „ $\beta$ -Solenoid“ wurde durch Kobe & Kajava (2000) geprägt und erlaubt eine feinere Unterscheidung als die ursprünglich von Yoder *et al.* eingeführten Begriffe  $\beta$ -roll ( $\beta$ -2-Solenoiden) und  $\beta$ -Helix für ( $\beta$ -3-Solenoiden). Neben den allgemeinen Unterscheidungskriterien wie Krümmung,

Drehung und Händigkeit werden  $\beta$ -Solenoiden zusätzlich anhand ihrer Querschnittsform und ihres Oligomerisierungszustandes unterschieden (Kajava & Steven 2006).

Die repetitiven Einheiten von Spulenproteinen sind zwischen 12 und 30 Aminosäuren lang. Jede Windung kann 2, 3 oder 4  $\beta$ -Stränge enthalten, die durch unstrukturierte Bereiche variabler Länge, die *Turns*, miteinander verbunden werden. Kurze *turns* von 2 bis 6 Resten werden anhand der Lage der Aminosäuren im „Ramachandran-Plot“ als  $\beta$ -*arcs* klassifiziert.  $\beta$ -*arc*-flankierende  $\beta$ -Stränge interagieren miteinander über ihre Seitenketten und bilden außerdem über ihre Rückgratatom-H-Brücken zu den  $\beta$ -Strängen benachbarter Helixwindungen aus (vgl. Abb. 1-2a, Hennetin *et al.* 2006; Kajava & Steven



**Abb. 1-2:**

**A** Schematische Darstellung eines Stapels aus zwei  $\beta$ -hairpins (links) bzw. aus zwei  $\beta$ -arches (rechts). Unterbrochene Linien zeigen H-Brücken an. **B** Lagebeziehungen der beta-Stränge in  $\beta$ -Solenoiden bei Betrachtung entlang der Solenoidachse. L-förmige Helix (links); dreieckige  $\beta$ -Helix (Mitte);  $\beta$ -roll (rechts) (entnommen aus: Hennetin *et al.* 2006).

2006). Auf diese Weise entstehen entlang der Achse der Superhelix flächige, parallele  $\beta$ -Faltblätter. Die Aufeinanderfolge Strang-*arc*-Strang wird als  $\beta$ -*arch* bezeichnet.  $\beta$ -*arches* wiederum stapeln sich innerhalb des Registers des  $\beta$ -Solenoids zu sogenannten  $\beta$ -Arkaden, die zwei aneinandergrenzende parallele  $\beta$ -Faltblätter enthalten. In vielen 2- und 3-zähligen  $\beta$ -Solenoiden interagieren diese Falblätter über ihre ins Lumen ragenden Seitenketten und bilden somit fortlaufende, antiparallele  $\beta$ -*sandwiches* aus. In globulären Proteinen wird das Auftreten von  $\beta$ -*arcs* nur selten beobachtet (Kobe & Kajava 2000). Dort interagieren die flankierenden  $\beta$ -Stränge über ihre Rückgratatom-H-Brücken, wodurch antiparallele Strukturen entstehen, die als  $\beta$ -*hairpins* bezeichnet werden.

Der Windungsabstand in  $\beta$ -Solenoiden beträgt an allen Windungspositionen  $4.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$  (Kajava & Steven 2006), was entlang der Superhelixachse nur sehr geringe Krümmungen zulässt. Demzufolge handelt es sich bei  $\beta$ -Solenoiden um langgestreckte, filamentöse Strukturen.

Häufig werden  $\beta$ -Solenoiden anhand der Form ihrer Querschnitte klassifiziert. Dabei werden L-, B-, O-, R- und T-förmige Querschnitte unterschieden (Kajava & Steven 2006). Die vornehmlich zu beobachtende Form ist die L-Form (Abb. 1-2b, links). Sie ist das Motiv in einer Vielzahl bakterieller, pflanzlicher und tierischer Enzyme, die auf die Bindung und Spaltung langkettiger Kohlenwasserstoffe spezialisiert sind. Im nachfolgenden Kapitel wird ihre Nomenklatur am Beispiel der rechtsgängigen, parallelen beta-Helix eingeführt. Die T-Form ist neben der L-Form die zweithäufigste Querschnittsform. Die O-Form ist der typische Querschnitt von  $\beta$ -2-Solenoiden ( $\beta$ -*rolls*).

Weitere Merkmale, durch die sich diese Strukturklasse von anderen Solenoiden abhebt, betreffen die Stapelung von Seitenketten im Inneren und Äußeren der Superhelix und die Ausbildung eines

abgeschirmten, hydrophoben Kerns. Beide Merkmale werden im nachfolgenden Abschnitt am Beispiel der rechtsgängigen, parallelen  $\beta$ -Helix ausführlicher besprochen.

Die Händigkeit der Solenoide betreffend wurde ursprünglich die Existenz linkshändiger Solenoidstrukturen zunächst ausgeschlossen, da aus der hierfür notwendigen Rückgratkonfiguration der Polypeptidkette eine zu geringe Stabilität resultiert (u.a. Cohen 1993). Mittlerweile gilt dies als widerlegt; etwa 30 % aller in der Protein Data Bank hinterlegten  $\beta$ -Solenoidstrukturen sind linksgängig (Kajava & Steven 2006). Linkshändige  $\beta$ -Solenoidproteine nehmen entweder O- oder T-förmige Querschnitte an.

Im kürzesten Fall bestehen  $\beta$ -Solenoidproteine aus drei aufeinanderfolgenden Windungen, wie im Fall der alkalischen Protease (Serralysin) aus *Pseudomonas aeruginosa* (Baumann *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu stapeln sich in filamentösem Hemagglutinin aus dem Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* offensichtlich mehr als 80 Windungen übereinander (Kajava *et al.* 2001).

### **1.2.3. Die rechtsgängige, parallele $\beta$ -Helix**

#### **1.2.3.1. Historie des Strukturmotivs und die Möglichkeit seiner Vorhersage**

Das Strukturmotiv der rechtsgängigen, parallelen  $\beta$ -Helix wurde erstmal 1993 am Beispiel von Pektatlyase C (PelC) aus *Erwinia chrysanthemii* beschrieben (Yoder *et al.* 1993).

Innerhalb eines Jahres wurde es auch in der Pektatlyase (BsPel) aus *Bacillus subtilis* (Pickersgill *et al.* 1994), der Pektatlyase E (PelE) aus *Erwinia chrysanthemi* (Lietzke *et al.* 1994), und in P22TSP, dem viralen Adhäsionsprotein des *Salmonella* Phagen P22 (Steinbacher *et al.* 1994) als zentraler Bestandteil identifiziert. Mittlerweile sind in der Protein Data Bank 103 (teilweise redundante) Literatureinträge mit dem Verweis auf das Motiv „*single stranded right-handed parallel beta-helix*“ hinterlegt. In der Arbeit von Hennes *et al.* (2006) werden aus den bis 2006 etwa 100 veröffentlichten Datenbankeinträgen 38 nicht redundante Strukturen abgeleitet.

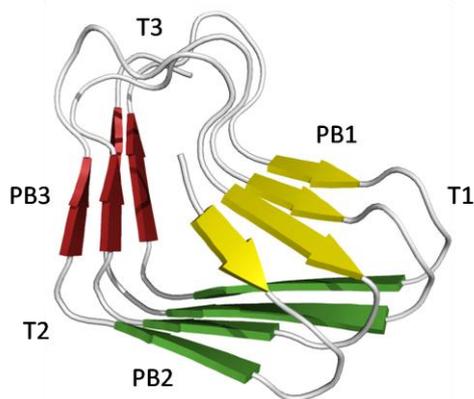
Wie dies bei Solenoidproteinen typisch ist, sind die aufeinanderfolgenden Spulenwindungen eines Proteins sequenziell nur wenig konserviert. Bereits in zwei aufeinanderfolgenden Spulenwindungen beträgt die mittlere Sequenzidentität durchschnittlich 25 % (Kloss *et al.* 2008), und dieses Ergebnis verschlechtert sich dramatisch, wenn die Sequenzen unterschiedlicher  $\beta$ -Helixproteine miteinander verglichen werden (Jenkins *et al.* 1998). Grundsätzlich ist dieser Befund konsistent mit der Beobachtung, dass der evolutionäre Druck, dem Proteinstrukturen unterliegen, erheblich stärker auf der Aufrechterhaltung der 3D-Struktur lastet als auf der Sequenz der Seitenkettenreste (Sander & Schneider 1991; Kobe & Kajava 2000). Zusätzlich erschwerend für eine theoretische Vorhersage paralleler  $\beta$ -Strukturen erweist sich der Umstand, dass *turn*-Bereiche mehrere hundert Seitenketten lang sein können, bevor die Polypeptidkette auf die Solenoidstruktur zurückgeht und diese weiterführt. Die Verteilung konservierter Reste, beispielsweise im Bereich der Seitenkettenstapel, wurde als potenzielle Methode erkannt, um aus einer „verdächtigen“ Aminosäuresequenz Informationen über die Verteilung von *turn* und  $\beta$ -Faltblattbereichen abzuleiten (Kajava & Steven 2006). Die große Sequenz-

heterogenität der  $\beta$ -Solenoiden lässt es nach wie vor zu einem fruchtbaren Forschungsfeld werden, diese Strukturen ohne *ab initio* Informationen aus genomweiten Datenbanken zu isolieren.

### 1.2.3.2. Strukturelle Besonderheiten der parallelen $\beta$ -Helix

Nach Cohen umfasst die rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helix pro Helixwindung im Minimum 22 Aminosäuren. Der Anstieg pro Rest (*pitch*) führt mit 0.22 Å zu einem mittleren Windungsabstand von 4.8 Å. Wasserstoffbrücken werden in parallelen  $\beta$ -Helices alternierend zwischen dem Carbonylsauerstoff von Rest  $i$  und dem Amidstickstoff von Rest  $i + 22$  bzw. zwischen dem Amidstickstoff von Rest  $i + 1$  und dem Carbonylsauerstoff von  $i + 22$  ausgebildet (Cohen 1993). Insgesamt ergibt sich auf diese Weise ein sehr dichtes Netzwerk von H-Brücken, das sich wie ein Schild um den hydrophoben Kern des Proteins windet und diesen effizient vom umgebenden, polaren Lösungsmittel abschirmt (Hennetin *et al.* 2006).

Bei 22 Seitenketten pro Windung wäre die parallele  $\beta$ -Helix ein Hohlzylinder mit einem Außendurchmesser von 27 Å und einem Innendurchmesser von 22 Å (Cohen 1993). Tatsächlich beobachtet man die  $\beta$ -Helix als „kollabierte“ Struktur mit einem annähernd L-förmigen Querschnitt (Yoder *et al.* 1993; Jenkins & Pickersgill 2001), sodass die ins Lumen verlagerten hydrophoben Reste ein ähnlich starkes Netzwerk hydrophober Interaktionen ausbilden können wie globuläre Proteine. Durch den Kollaps kann sich zwischen den  $\beta$ -Strängen PB1 und PB2 ein (anti)paralleles  $\beta$ -sandwich ausprägen, während der  $\beta$ -Strang PB3 einen annähernd rechten Winkel zu PB2 beschreibt (Abb 1-3). Die  $\beta$ -Stränge sind miteinander durch flexible *turns* (T1, T2 und T3) verbunden, die in der Struktur sehr unterschiedliche Funktionen erfüllen (Yoder & F. Jurnak 1995). Nach Hennetin *et al.* (2006) ist T2 als  $\beta$ -arc zu klassifizieren. Er wird aus nur zwei Resten gebildet und fungiert als Strukturbrecher zwischen PB2 und PB3 (Cohen 1993). Der T2-Bereich gilt als einer der am stärksten konservierten Bereiche in parallelen  $\beta$ -



**Abb 1-3: Die rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helix** in ihrer Nomenklatur nach Yoder *et al.* (1995) am Beispiel von vier Windungen der Alkalischen Pektatlyase Pel-15 aus *Bacillus spec.* KSM-P15. Pfeile kennzeichnen parallele  $\beta$ -Stränge, die entlang der Helixachse die parallelen  $\beta$ -Faltblätter PB1, PB2 und PB3 ausbilden und die durch unstrukturierte *turns* (T1, T2, T3) verbunden werden.

Helices von Pektatlyasen (Jenkins *et al.* 1998). Die *turns* T1 und T3 können deutlich mehr Reste enthalten und sind besonders im zentralen Bereich von Pektatlyasen am Aufbau der aktiven Zentren beteiligt.

Ein charakteristisches Merkmal paralleler  $\beta$ -Helices ist die Stapelung von Seitenketten aufeinanderfolgender Helixwindungen, die an äquivalenten Positionen in den hydrophoben Kern inserieren (Jenkins & Pickersgill 2001). Nach der Regelmäßigkeit der  $\chi$ -Winkel der beteiligten Reste (vornehmlich  $\chi_1$ ) und anhand der Gleichartigkeit ihrer Seitenketten lässt sich nach Petersen *et al.* (1997) zwischen gestapelten (*stacked*) und aneinander ausgerichteten (*aligned*) Stapeln unterscheiden. Typischerweise treten drei verschiedene

Arten von Seitenkettenstapeln im Inneren der Helix auf: polare, aliphatische und aromatische Stapel. Aliphatische Stapel sind am häufigsten und enthalten typischerweise die Reste Valin und Isoleucin. In aromatischen Stapeln packen die Ringflächen von Phenylalanin und Tyrosin gegeneinander, und polare Stapel sind beispielsweise durch „Asparaginleiter“ vertreten, die in PelC bereits das erste Mal beschrieben wurde. Nicht alle Stapel treten in allen parallelen  $\beta$ -Helices auf, allerdings scheinen aliphatische Stapel ein generelles Merkmal in allen Proteinen dieses Faltungstyps zu sein. Wie für die präzise Stapelung der T2-*turns* wird auch den Seitenkettenstapeln eine unterstützende Funktion bei der korrekten Ausbildung des Helix-Registers zugeschrieben (Jenkins *et al.* 1998). In der gleichen Arbeit wird vermutet, dass die Stapelung von Seitenketten es möglich macht, weitere Helixwindungen in die parallele  $\beta$ -Helix zu integrieren. Folgt man dieser Auffassung, kommt man zu der begründeten Vermutung, dass die Faltung paralleler  $\beta$ -Helices ein sequenzieller Prozess sein muss, wie dies von der Arbeitsgruppe um Patricia Clark aus *in-vivo* Faltungsstudien von P22TSP abgeleitet wurde (Evans *et al.* 2008).

Starke Evidenz für die Tatsache, dass die Seitenkettenstapel in der parallelen  $\beta$ -Helix eine wichtige Funktion für die Ausbildung des korrekten Seitenkettenregisters (Registrierung) haben, findet sich am Beispiel der Pektatlyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) in der Dissertation von Benjamin Heinz (2006). Überdies wurde in dieser nachgewiesen, dass die vollständige Entfernung des polaren Seitenkettenstapels die Stabilität des Strukturmotivs auf dramatische Weise beeinträchtigt, ohne jedoch seine korrekte Ausbildung zu verhindern. Nicht alle Seitenkettenreste tragen in vergleichbarer Weise zur Stabilisierung des Motivs bei, was die Vermutung nahelegt, dass es bei der Faltung paralleler  $\beta$ -Helices Sequenzbereiche gibt, die als Faltungsnuklei fungieren. Im Modellprotein P22TSP wurde ein solcher Faltungsnukleus im zentralen Bereich der  $\beta$ -Helix nachgewiesen (u.a. Marion Becker, Dissertation 2009). Abschließend sei erwähnt, dass nicht alle Stapel im Inneren paralleler  $\beta$ -Helices liegen müssen. In Alkalischer Pektatlyase aus *Bacillus spec.* KSM-P15 weisen kurze Stapel aus jeweils 3 Asn-Resten an zwei unterschiedlichen Positionen in Richtung des Lösungsmittels (Akita *et al.* 2001; Tsai *et al.* 2006).

Abschlussstrukturen an den C- und N-terminalen Windungen von  $\beta$ -Solenoiden schirmen deren hydrophobe Kernbereiche vom Lösungsmittel ab und verhindern auf diese Weise eine intermolekulare Assoziation zu fibrillären Strukturen (Kajava & Steven 2006). Diese Abschlussstrukturen können beliebig kompliziert organisiert sein. Im Fall paralleler  $\beta$ -Helices beobachtet man fast ausschließlich die Aufwindung der terminalen Polypeptidkette zu einer nicht-repetitiven Struktur, meist einer amphiphatischen  $\alpha$ -Helix, die orthogonal zur Achse der Superhelix verläuft. Hydrophobe Bereiche der Helix interagieren mit dem hydrophoben Spulenkern, während die hydrophilen Helixbereiche den Kontakt zum Lösungsmittel vermitteln (Richardson & Richardson 2002). Für Abschlussstrukturen dieser Art wurde vorgeschlagen, dass sie die Faltung  $\beta$ -solenoider Strukturen nukleieren können (u.a. Akita *et al.* 2001). Dies ist durchaus plausibel, wenn man bedenkt, dass Polygalacturonasen in der

Regel Sec-abhängig mit dem N-Terminus voran in das bakterielle Periplasma bzw. (im Fall Gram positiver Bakterien) direkt in den extrazellulären Raum transportiert werden. Seltener beobachtet man die Konzentration von polaren und geladenen Resten in den terminalen Spulenwindungen. Auch Proline und aromatische Reste werden häufig in die terminalen Windungen inseriert (Kajava & Steven 2006). Interessant ist die Beobachtung, dass bereits das Einfügen einer einzigen negativen Ladung an einer kritischen Position im N-Terminus assoziationskompetenter  $\beta$ -sandwiches dazu führt, dass diese Strukturen als lösliche Monomere vorliegen (Wang & Hecht 2002). Typische Vertreter, in denen diese einfachen Abschlussstrukturen auftreten, sind Pertactin (Emsley *et al.* 1996) und Pel-15. Globuläre Abschlussdomänen werden nur selten beobachtet.

## 1.3. Pektatlyasen

### 1.3.1. Vorkommen und Funktion

Pektine sind heterogene Polysaccharide (Polyuronide), die zum überwiegenden Teil aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften D-Galacturonsäureeinheiten bestehen. In pflanzlichen Zellwänden und Mittellamellen vernetzen sie Zellulose und Hemizellulosefasern und gewährleisten auf diese Weise deren strukturelle Integrität (Carpita & Gibeaut 1993). Die saprophytische Depolymerisation von Pektin erfordert die enzymatische Spaltung einer der stabilsten chemischen Bindungen in biologischen Makromolekülen (Wolfenden & Snider 2001). Sie ist von grundlegender Bedeutung für Rückführung von Pektin in den Stoffkreislauf.

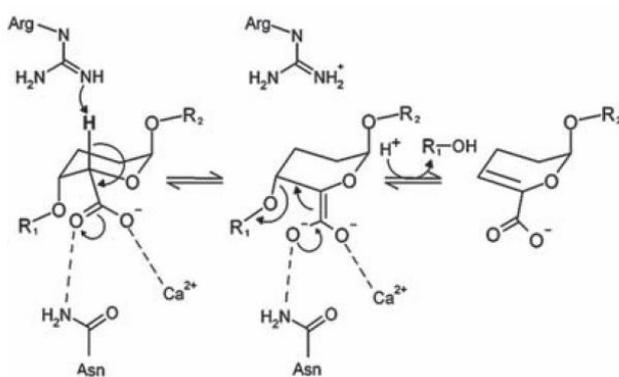
Zur Pektinolyse befähigte, saprobionte oder parasitäre Mikroorganismen aller Reiche sind in der Lage, pflanzliche Abschlussgewebe und Zellwände zu degradieren und auf diese Weise ernsthafte Erkrankungen auszulösen, die gemeinhin unter dem Begriff „Weichfäule-Erkrankungen“, *soft rot*, zusammengefasst werden. Außer dem Abbau pflanzlichen Gewebes scheinen Pektatlyasen auch an pflanzlichen Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein. Dies belegte in jüngerer Vergangenheit eine Studie, in der 27 Pektatlyasen-ähnliche Gene im Genom von *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen wurden (Marín-Rodríguez *et al.* 2002). Wirtschaftliche Relevanz erfahren Pektatlyasen in der nahrungsmittelverarbeitenden Industrie bzw. in der Gewinnung und Prozessierung von Zellulosefasern. Einige Bemühungen zielen darauf ab, durch die gezielte Einführung von Punktmutationen die thermodynamische Stabilität oder die enzymatische Aktivität von Pektatlyasen zu steigern (Xiao *et al.* 2008) und damit Verfahrensprozesse zu optimieren (Sakai *et al.* 1993).

Fünf der insgesamt 21 Polysaccharidlyaseklassen (EC 4.2.2.1-4.2.2.3; EC 4.2.2.9 und EC 4.2.2.10) enthalten Enzyme, die den Abbau von Pektin in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\beta$ -Eliminierungsreaktion katalysieren. Bei dieser Art der Eliminierung entsteht ein planares Reaktionsprodukt, das an seinem nicht-reduzierenden Ende eine ungesättigte Bindung zwischen C4 und C5 enthält. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 1-4 dargestellt. Er wurde durch das Labor von Francis Journak eingehend charakterisiert (Scavetta *et al.* 1999). In einem ersten Schritt wird das C5-Proton der betroffenen Uronylgruppe

durch eine Brønstedt-Base abstrahiert. Hierbei kann es sich nach bisherigem Kenntnisstand um Arginin (z.B. EC 4.2.2.2) oder um Lysin (EC 4.2.2.9) handeln. Die für den Abstraktionsprozess erforderliche Ansäuerung des C5-Protons wird gewährleistet, indem das in der Bindestelle gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion durch eines der C6-Carboxylsauerstoffatome koordiniert wird. Der durch die Protonenabstraktion entstehende Übergangszustand wird durch eine Verlagerung des freigewordenen Elektrons auf das C6-Carboxylat stabilisiert. Im zweiten Schritt erfolgt der eigentliche Spaltungsprozess durch die Umlagerung des freien Elektrons auf das C4-Sauerstoffatom. Das hierbei entstehende, ungesättigte Reaktionsprodukt wird anschließend aus der Bindungstasche entlassen (u.a. Abbott & Boraston 2008). Am Beispiel des Gram negativen Enterobakteriums *Erwinia chrysanthemi* wurde gezeigt, dass pektinolytische Mikroorganismen über eine ganze Batterie von periplasmatisch und extrazellulär lokalisierten Isoenzymen verfügen.

Die entstehenden Oligogalacturonide werden passiv ins bakterielle Periplasma transportiert, wo sie zu Di- und Trigalacturoniden abgebaut und ATP-abhängig ins Cytosol transportiert werden. Im Cytosol werden die Oligogalacturonide zu Pyruvat und 3-Phosphoglyceraldehyd degradiert, die als C-Quellen in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden und damit letztlich den Energiehaushalt der Zelle verbessern (Abbott & Boraston 2008).

Es ist nachgewiesen, dass die ungesättigten Polygalacturonide als Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen fungieren. Die Strategie dieser Abwehrreaktionen setzt zu einem großen Teil auf die Expression von Inhibitoren (Juge 2006). Dies mag ein weiterer wichtiger Grund dafür sein, dass alle bisher beschriebenen Pektatlyasen strukturell den parallelen  $\beta$ -Helices zuzuordnen sind (Abbott & Boraston



**Abb. 1-4: Allgemeiner Reaktionsmechanismus** der  $\text{Ca}^{2+}$ -unterstützten  $\beta$ -Eliminierungsreaktion, wie sie von Pektatlyasen typischerweise katalysiert wird [entnommen aus: Abbot & Boraston (2008)].

2008). Einerseits bildet die kollabierte  $\beta$ -3-Solenoidstruktur eine dieale Plattform für die Bindung linearer, langkettiger Polysaccharide (Kajava & Steven 2006). Andererseits stabilisieren die vorab beschriebene Seitenkettenstapelung, das intensive H-Brückennetzwerk im Rückgrat bzw. die hydrophoben Kontakte im Inneren der Superhelix das Protein stark genug, um den pflanzlichen Abwehrstrategien zu widerstehen.

### 1.3.2. Die Alkalische Pektatlyase (Pel-15) aus *Bacillus spec.* KSM-P15

Die Isolation von Pel-15 aus dem fakultativ alkalophilen Bodenbakterium *Bacillus spec.* (Stamm KSM-P15) wurde 1999 durch Thoru Kobayashi dokumentiert (Kobayashi *et al.* 1999). Ein Jahr später waren die Aminosäuren identifiziert, die an der katalytischen Spaltung von Polygalacturonsäure

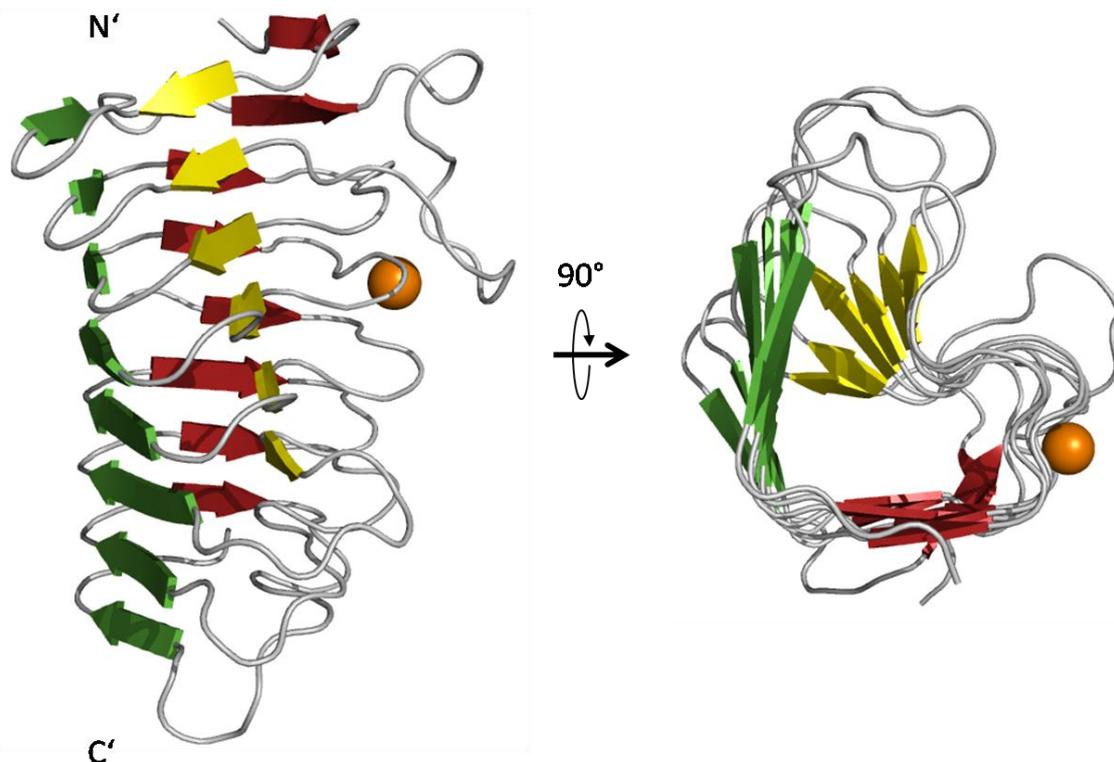
(PGA) beteiligt sind (Hatada *et al.* 2000). Im darauffolgenden Jahr schließlich wurde die Röntgenkristallstruktur von Pel-15 veröffentlicht, die Pel-15 als rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helix klassifizierte (Abb. 1-5; Akita *et al.* 2001).

### 1.3.2.1. Die biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von Pel-15

Pel-15 ist gemeinsam mit PelI in die Familie 3 der Polysacchaid-Lyasen (EC 4.2.2.x) einzuordnen (Creze *et al.* 2008). Pel-15 ist ein alkalophiles Protein mit einer Länge von 197 Aminosäuren (MW = 20.93 kDa) und einem isoelektrischen Punkt von 10.5 (Kobayashi *et al.* 1999). Maximale enzymatische Aktivität entfaltet Pel-15 bei einer Temperatur zwischen 55 °C und 60 °C. Diese Temperatur liegt bereits 10 K höher als die von KSM-P15 maximal tolerierte Kultivierungstemperatur. Je nach Veröffentlichung schwanken die Angaben zur spezifischen Aktivität von Pel-15 zwischen 220 und 300 U / mg Pel-15. Mittels IR-Spektroskopie,  $^{13}\text{C}$ -NMR und ESI-MS wurde nachgewiesen, dass es sich bei den von Pel-15 produzierten PGA-Spaltungsprodukten um 4,5-ungesättigte Oligogalacturonide handelt, was den Reaktionsmechanismus der  $\beta$ -Eliminierung für Pel-15 bestätigt.

### 1.3.2.2. Besonderheiten in der Röntgenkristallstruktur von Pel-15

Pel-15 ist aus 8 gestapelten Solenoidwindungen aufgebaut (Abb. 1-5). Regelmäßige polare oder aromatische Stapel im Inneren der  $\beta$ -Helix, wie sie in BsPel oder PelC dokumentiert wurden, fehlen.

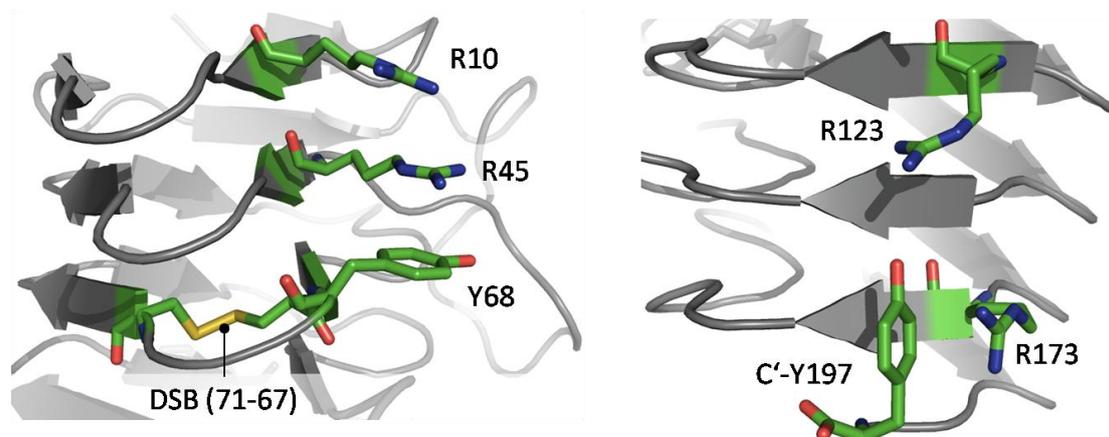


**Abb. 1-5: Cartoon-Repräsentation von Pel-15 (Akita *et al.* 2001, PDB: 1ee6).** Die  $\beta$ -Stränge der parallelen beta-Helix sind entsprechend der Nomenklatur aus Abb. 1-2 eingefärbt. Ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion wird mit hoher Affinität durch aufeinanderfolgende T3 *turns* gebunden. Links: Blick auf den T1-Turn, der eine enge Wendung zwischen PB1 und PB2 beschreibt und diese dadurch zu einem antiparallelen  $\beta$ -sandwich verbindet (C-Terminus liegt unten); rechts: Blick entlang der  $\beta$ -Helixachse (C-Terminus ist dem Betrachter zugewandt).

Dennoch ist der hydrophobe Kern im Inneren des Proteins dicht gepackt und es lassen sich unregelmäßige Stapel von gemischten, aliphatischen Resten finden. Diese enthalten vornehmlich Leucin, Isoleucin und Valinseitenketten. Pel-15 enthält eine Disulfidbrücke in der aus N-terminaler Richtung dritten Windung der  $\beta$ -Helix. Ein weiterer, ungepaarter Cysteinrest befindet sich begraben im hydrophoben Kern nahe dem C-Terminus im Bereich des  $\beta$ -Stranges PB2.

Im Gegensatz zu vielen anderen  $\beta$ -helikalen Proteinen werden die terminalen Windungen von Pel-15 nicht durch *capping*-Strukturen gegen *head-to-tail* Assoziationen geschützt. Stark verlängerte T1 oder T2 *turns* mit dekorierenden Sekundärstrukturelementen, sogenannte *bulging*-Regionen, wie sie in anderen Pektatlyasen vorkommen, sind ebenfalls nicht nachzuweisen, sodass Pel-15 im Grunde eine natürlich vorkommende, „nackte“  $\beta$ -Helix darstellt.

Beim Fehlen terminaler Abschlussstrukturen erwartet man eine veränderte Aminosäurezusammensetzung in den terminalen Spulenwindungen des Solenoids (Kajava & Steven 2006). Dies ist bei Pel-15 hauptsächlich im Bereich des C-Terminus zu beobachten. Hier ist der Anteil polarer und geladener Reste mit 80 % im Vergleich zur durchschnittlichen Zusammensetzung der zentralen Superhelixwindungen deutlich erhöht. Im Bereich des N-Terminus scheint der hydrophobe Kern weniger stark abgeschirmt zu sein. Der Anteil geladener und polarer Reste beträgt hier nur 50 %. Bemerkenswert ist die unregelmäßige Verteilung von Prolylresten im Molekül. Bezogen auf die Kettenlänge entspricht der Anteil von Prolin in Pel-15 zwar dem Durchschnitt, allerdings konzentrieren sich fünf der insgesamt sechs Prolylreste, einer davon in *cis*-Konfiguration, in den ersten zwei N-terminalen Helixwindungen, was in diesem Bereich einem erhöhten Prolinanteil von ca. 10 % entspricht. Der sechste Prolylrest liegt in der Windung am C-Terminus. Nach Mason *et al.* interagieren Gdm-Kationen bevorzugt mit den  $\pi$ -Elektronensystemen aromatischer Systeme. Dies kann innerhalb von Proteinen zur Ausbildung von lösungsmittel exponierten Seitenkettenstapeln führen. Im Fall von Pel-



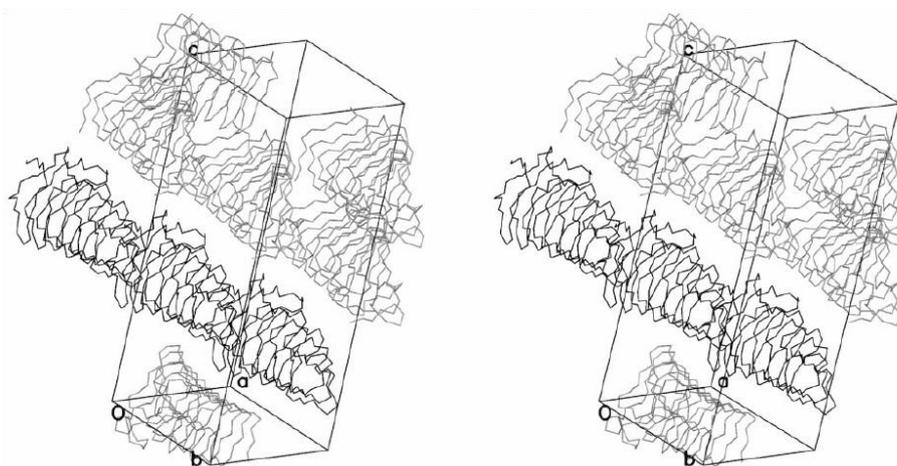
**Abb. 1-6: Nichtkovalente Stabilisierung des Pel-15 N- und C-Terminus über planare R-R bzw. R-Y-Interaktionen.**  
**Links:** N-Terminus. Y68 ist einer der Reste, die von der lokalen Disulfidbrücke eingeschlossen werden. **Rechts:** Y197 bildet des C-Terminus von Pel-15. Die Seitenkette steht parallel zur helikalen Achse und interagiert mit der Guanidin-Gruppe von R173. Zusätzliche Stabilisierung bewirkt eine H-Brücke zwischen R123 und Y197.

15 sind Interaktionen dieser Art an der nichtkovalenten Stabilisierung von C- und N-Terminus beteiligt (Abb. 1-6).

In Abhängigkeit von der Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  im Kristallisationspuffer wurden zwei unterschiedliche Kristallformen von Pel-15 beobachtet (Akita *et al.* 2001). Dabei wurde deutlich, dass Pel-15 in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen dazu neigt, langgestreckte, fibrilläre Strukturen auszubilden, in denen der N-Terminus eines Pel-15 Moleküls mit dem C-Terminus eines folgenden interagiert (Abb. 1-7). Die Pel-15 Kristallstruktur bestätigte die Ergebnisse umfassender Mutagenesestudien von Hatada *et al.* (2000), denen zufolge die katalytisch relevante Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch die Seitenketten D63, E83 und D84 vermittelt wird. Diese bilden im Bereich der Furche zwischen T3 und PB1 einen „sauren Cluster“ und schließen damit direkt an einen „basischen Cluster“ aus den Aminosäuren K107, K129 und R132 an. Eine Veränderung in einem dieser beiden Cluster führt in jedem Fall zum fast vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität (Hatada *et al.* 2000). Ein langer, aus der  $\beta$ -Helix herausragender T3 *turn* ( T3/2) könnte bei der Bindung von PGA eine Art Klammerfunktion übernehmen. Darüber hinaus enthält er in Höhe des „sauren Clusters“ einen weiteren Aspartatrest, der vermuten lässt, dass T3/2 an der katalytischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beteiligt ist. Eine zweite, anhand der Kristallstruktur identifizierte hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle wird durch lösungsmittel exponierte Oberflächenreste im Bereich von T3 ausgeprägt. Angesichts der Tatsache, dass durch die Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions in diesem Bereich die Ausbildung mehrerer Salzbrücken begünstigt wird, wird für diese zweite Bindestelle eine strukturfördernde Funktion vermutet. Ihre Entfernung beeinträchtigt die katalytische Aktivität des Proteins nur geringfügig (Hatada *et al.* 2000).

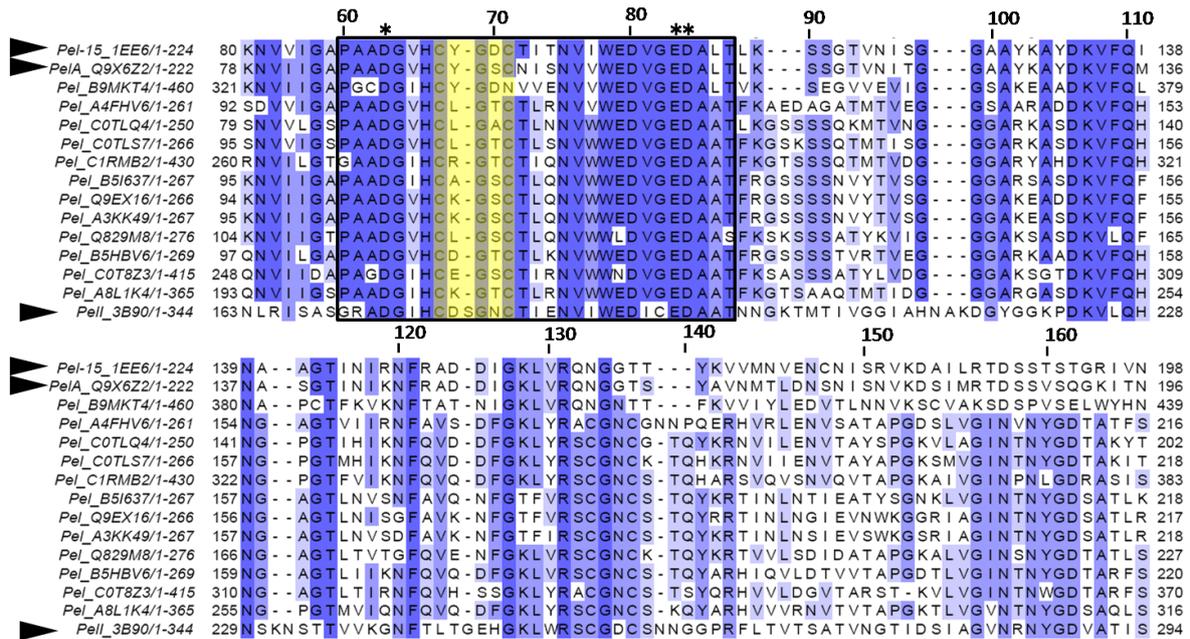
### 1.3.2.3. Sequenzbasierter Vergleich von Pel-15 mit anderen Pektatlyasen

Sequenzbasierte Vergleiche des aktiven Zentrums von Pel-15 mit aktiven Zentren anderer Pektatlyasen bestätigen teils sehr große Ähnlichkeiten (40-80 %) mit Pektatlyasen aus dem Schimmelpilz *Fusa-*



**Abb. 1-7: Stereodiagramm der Typ II - Kristallpackung von Pel-15 in Gegenwart von EDTA.**

Die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen scheint zum einen eine *head-to-tail* Polymerisation und zum anderen eine verstärkte laterale Interaktion der Pel-15 Moleküle zu begünstigen (entnommen aus Akita *et al.* (2001)).



**Abb. 1-8: Multiples, sequenzielles Alignment bakterieller Pektatylasen mit Pel-15 artiger Konsensussequenz.** Konservierte Reste sind in Schattierungen von Blau dargestellt. Bis auf Pel-15, PelA und PelI (schwarze Pfeile) entsprechen die angegebenen Sequenzen vorhergesagten Pektatylasen. PelI wies mit 68.5 % Sequenzidentität zum T3/2 turn von Pel-15 die geringste Sequenzidentität auf. Die schwarze Box markiert die Reste, die in Pel-15 im T3/2 turn enthalten sind. Die konservierte Disulfidbrücke und die von ihr eingeschlossenen Reste sind gelb hinterlegt. Sterne (\*) markieren die Reste, die in Pel-15 an der katalytischen Ca<sup>2+</sup>-Bindung beteiligt sind. BLAST Abfragen erfolgten webbasiert über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW berechnet. Die Darstellung erfolgte mit Jalview (<http://www.jalview.org>).

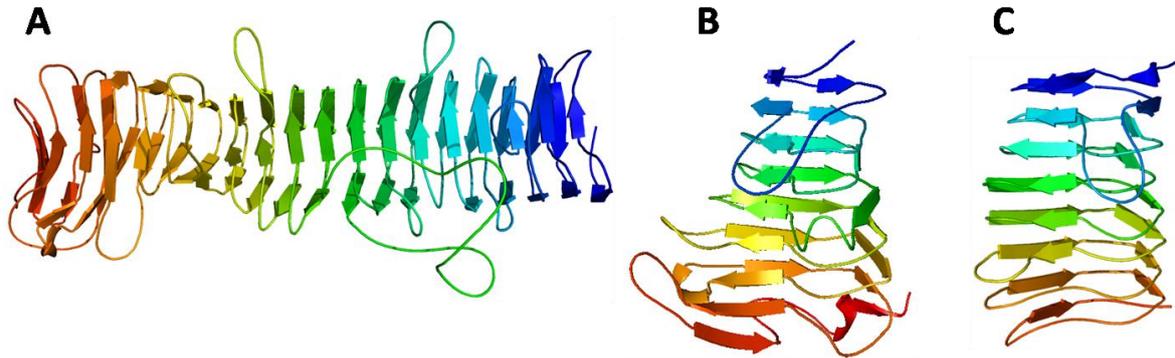
*rium solani* bzw. aus den Enterobakterien *Erwinia carotovora* und *E. chrysanthemi* (Heffron *et al.* 1998).

Eine aktuellere, auf das Reich der Bakterien begrenzte Datenbankabfrage (minimale Sequenzidentität: 20 %), in der die Sequenz von Pel-15 als *template* verwendet wurde, identifizierte 43, größtenteils putative, Pel-Sequenzen (Abruf am 10. Juli 2009). Die erhaltenen Sequenzidentitäten waren meist schlechter als 30 %, was aufgrund der enormen Sequenzvariabilität paralleler  $\beta$ -Helices (Cohen 1993; Walter *et al.* 2008; Barbirz *et al.* 2009) keine Überraschung darstellte.

Ungewöhnlich hohe Sequenzidentitäten wurden bei 14 von 43 Sequenzen für eine spezifische Windung der Pel-15  $\beta$ -Helix erhalten (Abb. 1-8). Diese enthält in Pel-15 unter anderem den in cis-Konfiguration vorliegenden Prolinrest P60, die Seitenkettenreste der katalytischen Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle, den an der hochaffinen Ca<sup>2+</sup>-Bindung beteiligten Rest D80 und eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C67 und C71. Der in Pel-15 als Brønstedt-Base fungierende Aminosäurerest K107 (K224 in PelI; Creze *et al.*, 2008) ist in allen identifizierten Sequenzen an äquivalenten Positionen konserviert. Dies legt nahe, dass alle gefundenen Sequenzen in die Polysaccharid-Lyase Familie 3 einzuordnen sind. Dies bestätigt die Ergebnisse von Heffron *et al.* (1998).

#### 1.3.2.4. Pel-15 ähnliche beta-Helixproteine

Von allen bislang bekannten, rechtsgängigen, parallelen  $\beta$ -Helixproteinen ist die Struktur von Pel-15 am ehesten mit dem Adhäsin Pertactin (P.69, Emsley *et al.* 1996) aus dem Keuchhustenerreger



**Abb. 1-9: Pel-15 ähnliche, parallele  $\beta$ -Helices im Vergleich.**

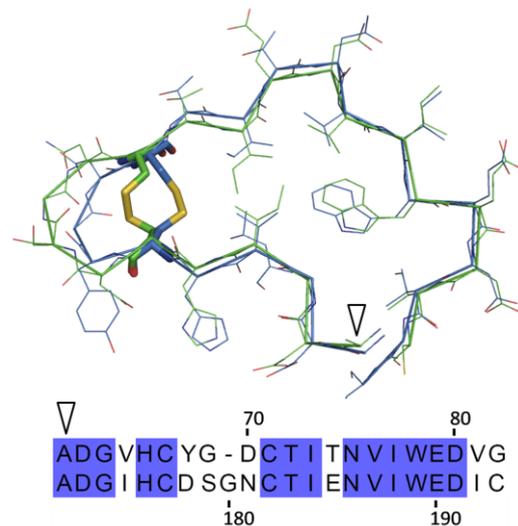
(A) Pertactin P.69 aus *B. pertussis* (Emsley *et al.* 1999) (B) Pell aus *E. chrysanthemi* (Creze *et al.* 2008) (C) Pel-15 aus *Bacillus spec.* (Akita *et al.* 2001). Jeweils Blick auf den T3/PB1-Bereich, der Farbverlauf reicht vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot)

*Bordetella pertussis* und der Pektatlyase I (Pell, Creze *et al.* 2008) aus *Erwinia chrysanthemi* zu vergleichen (Abb. 1-9). Die N-Termini aller drei  $\beta$ -Helices sind offen, d.h. sie schirmen den hydrophoben Kern nicht vom umgebenden Lösungsmittel ab. Unterschiede sind hingegen im Bereich der C-Termini zu erkennen. Hier sind die Polypeptidketten von Pertactin und Pell jeweils zu einem  $\beta$ -hairpin geformt und schirmen auf diese Weise den Großteil des hydrophoben Kern gegen das Lösungsmittel ab.

Pertactin ist mit 539 Resten und insgesamt 18 Solenoidwindungen fast dreimal so groß wie Pel-15. Für dieses Protein stehen ausführliche Daten über Faltung und Stabilität zur Verfügung, anhand derer die Ergebnisse zur Stabilität und Faltung von Pel-15 möglicherweise eingeordnet werden können.

Die Polypeptidkette von Pell ist mit 343 Resten ebenfalls erheblich länger als Pel-15, besitzt aber wie diese nur acht Helixwindungen. Die überzähligen Reste werden in diesem Fall in stärker ausladenden unstrukturierten *turn*-Bereichen akkomodiert. Trotz einer allgemeinen Sequenzidentität von nur 28.9% ergibt die  $\text{C}\alpha$ -Überlagerung der Strukturen von Pell und Pel-15 einen *rmsd*-Wert von 1.7 Å (Creze *et al.* 2008).

Pell enthält insgesamt fünf Disulfidbrücken, von denen sich eine an äquivalenter Position auch in Pel-15 befindet. Die übrigen vier Disulfidbrücken stabilisieren in Pell den ausladenden, unstrukturierten Bereiche in der Nähe des C-Terminus und die C-terminale Abschlussstruktur. Darüber hinaus verbinden sie den N-Terminus mit der benachbarten Helixwindung und schränken die Beweglichkeit des



**Abb. 1-10:  $\text{C}\alpha$ -Überlagerung** von Pel-15 (blau) und Pell (grün) (3. Helixwindung) und Pell. **Oben:**  $\text{C}\alpha$ -Alignment mit Darstellung der Rückgratkonformationen und der Seitenkettenpositionen. Die Disulfidbrücken beider Proteine sind als *sticks* dargestellt. **Unten:** Sequenzielles Alignment von Pel-15 und Pell. Die Sequenzidentität im T3/2 *turn* beträgt 68.5%. Pfeile kennzeichnen in beiden Überlagerungen den N-Terminus.

katalytisch bedeutsamen T3-*turns* (T3/2) ein. In Pel-15 werden die entsprechenden Bereiche vornehmlich durch Salzbrücken stabilisiert. Hierfür notwendige Paare saurer und basischer Oberflächenreste finden sich in Bereichen um das aktive Zentrum und um die beiden Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen sowie in der Nähe der terminalen Helixwindungen. Zusätzliche Stabilisierung erfahren der N- und der C-Terminus durch die Ausbildung hydrophober Stapelkontakte zwischen planaren Seitenketten von Arg- und Tyr-Resten.

Die äquivalent positionierte Disulfidbrücke ist auch in anderen Pel-Sequenzen konserviert. Im Fall von PelI und in Pel-15 stabilisiert sie den flexiblen T1/3 *turn* und schränkt auf diese Weise die Beweglichkeit der gesamten Helixwindung ein (Abb. 1-10). Die Disulfidbrücke liegt darüber hinaus in der gleichen Spulenwindung wie die Seitenketten D63, E83 und D84, die ebenfalls in allen gefundenen Sequenzen konserviert sind. Diese Reste sind, wie vorab erwähnt, für die katalytisch relevante Bindung eines Ca<sup>2+</sup>-Ions verantwortlich (Akita *et al.* 2001).

## 1.4. Funktionen von Disulfidbrücken in Proteinen

### *Disulfidbrücken stabilisieren den nativen Zustand*

Grundsätzlich haben Disulfidbrücken in Proteinen die Funktion, stabilisierende, kovalente Quervernetzungen zwischen entfernten Bereichen des Peptidrückgrates herzustellen. Es gilt als anerkannt, dass Disulfidbrücken die native Struktur eines Proteins stabilisieren, indem sie die konformationelle Entropie des Peptidrückgrats im denaturierten Zustand verringern und diesen damit destabilisieren (Thornton 1981). 1988 formulierte Nick Pace anhand der oxidativen Faltung von RNaseT1 und aufbauend auf den theoretischen Vorüberlegungen von Flory (1956) und Schellman (1955) die Hypothese, dass der Betrag, um den die konformationelle Entropie  $\Delta S$  des Disulfid-stabilisierten Rückgrats abnimmt, mit der Anzahl der Reste korreliert, die durch diese Disulfidbrücke eingeschlossen werden. Hierfür stellte er die empirische Gleichung

$$\Delta S = -2.1 - 1.5 R \ln n \quad (1)$$

auf, in der  $n$  die Zahl der Reste angibt, die von der Disulfidbrücke eingeschlossen werden (Pace *et al.* 1988). Die Abweichung der theoretischen Vorhersagen von den empirischen Entropien betrug weniger als 2 kJ/mol.

### *Disulfidbrücken generieren Faltungsnuklei*

In Abhängigkeit davon, wie weit entfernt ein Disulfid vom Nukleus einer Faltungsreaktion ist, können die beobachteten Rückfaltungsraten von Proteinen im Bereich von Sekunden oder von Stunden liegen (Abkevich & Shakhnovich 2000). Wenn eine Disulfidbrücke in der denaturierten Kette einen Cluster hydrophober Seitenketten von Lösungsmittel abschirmt, kann diese damit auch selbst zu einem Nukleus der Faltung werden (Wedemeyer *et al.* 2000). Dies ist in Pel-15 nicht der Fall; dennoch ist es gut vorstellbar, dass die Stabilisierung eines kompletten des T1/3 *turns* im Fall von Pel-15 die

Nukleations- oder Registrierungsfunktionen übernimmt, die in den „großen“  $\beta$ -Helices den internen Seitenkettenstapeln zukommt.

#### *Disulfidbrücken sind an katalytischen Prozessen beteiligt*

Stabilisierung oder Nukleation sind nicht die einzigen Effekte, die durch Disulfidbrücken gesteuert werden. Gelegentlich sind Disulfidbrücken auch am Aufbau aktiver Zentren beteiligt (Mamathambika & Bardwell 2008). In diesem Fall unterscheidet man zwischen katalytischen und allosterischen Disulfidbrücken. Katalytische Disulfidbrücken sind direkt am Katalysemechanismus beteiligt, wie dies typischerweise in Oxidoreduktasen zu beobachten ist. Für allosterische Disulfide gilt dies nicht. Vielmehr stabilisieren diese das aktive Zentrum bzw. sind an der Veränderung seiner Konformation beteiligt und tragen damit passiv zur katalytischen Effizienz des Enzyms bei.

## 1.5. Amyloidfibrillen

### 1.5.1. Hintergrund und Organisation des cross- $\beta$ Motivs

Die Erforschung der Faltung und der Stabilität paralleler  $\beta$ -Helices motiviert sich in vielen Teilen durch die zahlreichen strukturellen Gemeinsamkeiten, die zwischen  $\beta$ -Helices und dem cross- $\beta$ -Motiv von Amyloidfibrillen bestehen. Beide Struktur motive besitzen eine elongierte, unverzweigte Morphologie. Beide Struktur motive sind zudem gekennzeichnet durch die Existenz ausgedehnter  $\beta$ -Arkaden, einen Abstand von ca. 4.8 Å zwischen den  $\beta$ -Strängen aufeinanderfolgender *repeats*, eine geringe Krümmung der teils schraubenförmigen Superhelix und die in Elongationsrichtung verlaufende Ausbildung hochgeordneter, lumenaler Stapel identischer Seitenketten.

Unter dem Begriff „Amyloidfibrillen“ werden langgestreckte, unlösliche Proteinaggregate zusammengefasst, die *in vivo* abgelagert werden und mit krankhaften Zell- und Gewebsveränderungen, sogenannten Amyloid-Erkrankungen, in Zusammenhang stehen. Bekannte Krankheitsbilder sind Alzheimer-Krankheit, Chorea Huntington oder Parkinson. Amyloidartige Aggregate bilden sich *in vitro* als passive Reaktion der Proteinmoleküle auf bestimmte Veränderung von Lösungs- oder Umgebungsbedingungen (Nelson & Eisenberg 2006a). Mittlerweile sind mehr als 25 menschliche Proteine identifiziert, die die Fähigkeit zur Fibrillierung besitzen. Die Umstände, unter denen Fibrillierungsreaktionen ablaufen, sind noch immer teilweise unverstanden (Westermarck 2005).

Merkmale, die Amyloidfibrillen von  $\beta$ -Solenoidproteinen unterscheiden, sind die Bindung von Kongo-Rot und eine damit verbundene charakteristische, grüne Doppelbrechung sowie ein typisches Röntgen-Diffraktionsmuster. Dieses besitzt einen intensiven, scharf umrissenen Reflex bei ca. 4.7 Å und einem etwas diffuseren Reflex bei ca. 10 Å, was die Existenz einer „cross- $\beta$ “ Struktur andeutet. Bereits 1935 hatte Astbury dieses Diffraktionsmuster als Charakteristikum von Proteinfibrillen beschrieben (Astbury & Dickinson 1935).

In einer cross- $\beta$  Struktur sind zwei  $\beta$ -Faltblätter mit einem Abstand von 10 Å parallel zur fibrillären Achse orientiert. Die  $\beta$ -Stränge innerhalb der Faltblätter verlaufen senkrecht zur Faserrichtung und

haben jeweils einen Abstand von 4.7 Å. Die Faltblätter können eine parallele (Nelson *et al.* 2005) oder antiparallele (Makin & Serpell 2005) Orientierung besitzen.

### 1.5.2. Strukturelle Modelle von Fibrillierungsmechanismen

Mittlerweile existieren zahlreiche Vorschläge für Mechanismen, nach denen aus nativen Proteinen fibrilläre Strukturen entstehen. Nelson & Eisenberg (2006) klassifizierten diese Mechanismen in drei grundsätzliche Modellklassen, die sich danach richten, wie groß die Strukturänderung ist, die ein Protein während der Fibrillierungsreaktion erfährt (Abb. 1-11). Proteine, die erst entfalten müssen, um Fibrillen zu bilden, werden unter der Klasse der „*refolding models*“ zusammengefasst. Proteine hingegen, bei denen während der Fibrillierung der größte Teil der nativen Struktur erhalten bleibt, sind in die Gruppe der „*gain-of-interaction models*“ einzuordnen. Fibrillierungsmodelle, die sich keiner der vorab benannten Modellklassen zuordnen lassen, werden zu „*models of natively disordered proteins*“ zusammengefasst. Keines dieser Modelle ist ausreichend, um alle Eigenschaften von Amyloidfibrillen zu erklären (Nelson & Eisenberg 2006b).

#### 1.5.2.1. *refolding* Modelle

In dieser Modellklasse werden Proteine zusammengefasst, die in zwei distinkten Zuständen vorliegen, dem nativen und dem fibrillären Zustand. Um vom nativen in den fibrillären Zustand zu wechseln, muss das native Protein entfaltet werden. Unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz sind die

Fibrillenstrukturen der Proteine, die nach diesem Modell fibrillieren, sehr ähnlich. Auf dieser Beobachtung beruht die Vermutung, dass Rückgratkontakte bei der Fibrillierungsreaktion bestimmend sind (Fändrich *et al.* 2001). Prominente Beispiele für Proteine, die nach dem *refolding model* fibrillieren, sind Insulin, die SH3 Domäne, Myoglobin oder das Prion-Protein (PrP). In allen Fällen wird in den entstehenden Fibrillen ein ausgeprägtes *cross-β*-Muster gefunden.

#### 1.5.2.2. *Gain-of-Interaction* Modelle

In dieser Modellklasse wird davon ausgegangen, dass nur ein Teil der nativen Proteinstruktur entfalten muss, um die Fibrillenbildung zu bewirken. Dies hat zur Folge, dass in der Proteinfibrille ein großer Teil der nativen Struktur noch vorhanden ist. Dies geht konform mit der thermodynamischen Hypothese von Anfinsen, nach der die Polypeptidkette dem Zustand niedrigster Energie entgegenstrebt (Anfinsen 1973). In Fibrillen dieses Strukturtyps besitzen die Proteine unter Umständen noch

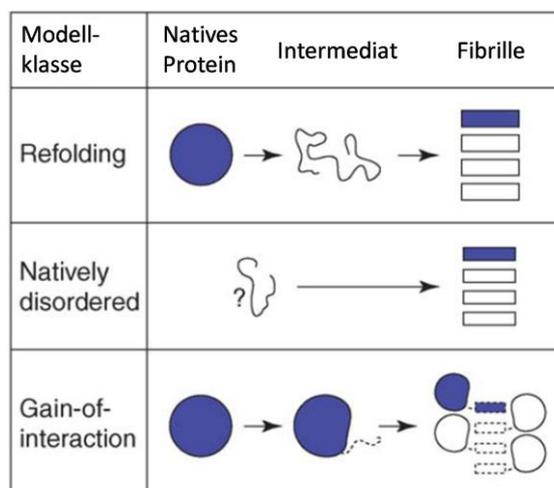


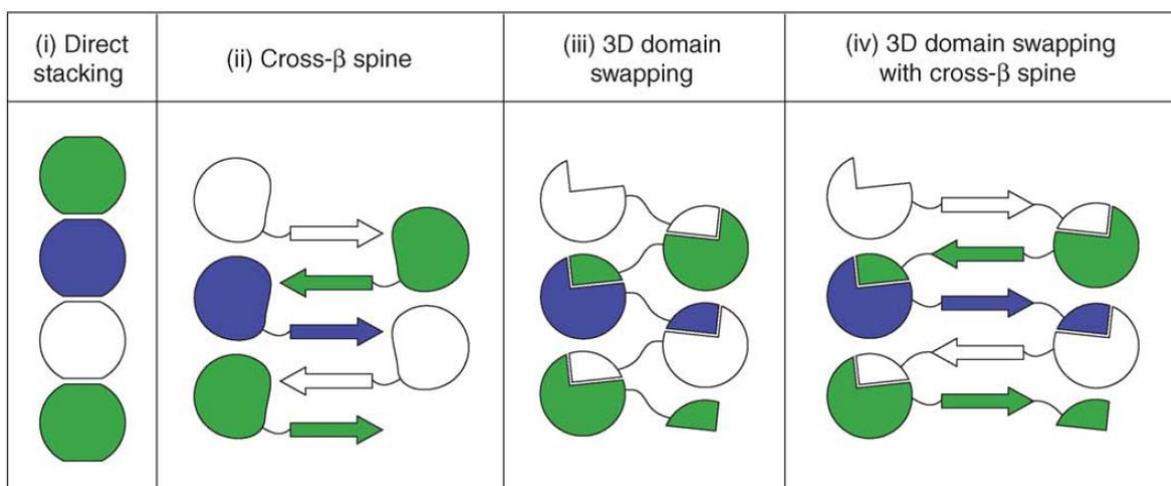
Abb. 1-11: Klassifizierung von Strukturmodellen (verändert entnommen aus: Nelson & Eisenberg (2006))

enzymatische Aktivität. Innerhalb der „Gain-of-Interaction“ Modelle lassen sich vier Typen von Fibrillierungsmechanismen definieren (Typen I bis IV; vgl. Abb. 1-12).

Typ-I-Modelle beschreiben Mechanismen, in denen Fibrillierung bereits durch geringfügige konformationelle Umlagerungen begünstigt wird. Die Proteinmoleküle bilden nach diesem Modell langgestreckte Fibrillen; *cross-β*-Strukturen werden nicht ausgebildet. Ausführlich untersucht ist ein solches Fibrillierungsmuster im Fall des Transporterproteins Transthyretin, für das eine „head-to-head“ bzw. „tail-to-tail“ Assemblierung vorgeschlagen wurde und das nachweislich *cross-β* Struktur besitzt (u.a. Serag *et al.* 2002; Olofsson *et al.* 2004). Das Beispiel der Superoxid-Dismutase ist weniger eindeutig. Die Fibrillierung dieses Protein entspricht einer *head-to-tail* Interaktion ohne das Auftreten von *cross-β* Struktur. Im weitesten Sinne entspricht das TypI-Modell dem Assemblierungstyp, wie er für Pel-15 während der Kristallisation beobachtet wurde (vgl. Abb. 1-7).

Typ II-Modelle umfassen Fibrillierungsreaktionen, in denen die entfalteten Teile der Polypeptidkette einen *cross-β spine* ausbilden. Gemäß dem Modell wird dieser beiderseits durch globuläre Strukturen gesäumt. Proteine, auf die ein solches Fibrillierungsverhalten zutrifft, sind  $\beta$ 2-Mikroglobulin oder Sup35, für dessen *cross-β spine* seit 2005 eine atomar aufgelöste Röntgenkristallstruktur zur Verfügung steht (Nelson *et al.* 2005).

Typ III und Typ IV-Modelle beschreiben den Umstand, dass zwei identische Proteine miteinander äquivalente Bereiche austauschen, was im einfachsten Fall zu einem „domain-swapped dimer“ führt. Fortlaufende (*run-away*) Fibrillen entstehen, wenn sich der Domänen-Austausch so vollzieht, dass an beiden Enden der entstehenden Fibrille „partnerlose“ Domänen verbleiben. Bemerkenswert an dieser Fibrillierungsform ist, dass für einen „domain swap“ die partielle Entfaltung des Proteins notwendig ist, dass aber nach Abschluss des Domänenaustausches die einzig dauerhafte Veränderung in der Umlagerung des flexiblen Bereiches besteht, der die Domänen miteinander verbindet. Inwiefern ein solcher „hinge loop“ mit anderen flexiblen Linkern eine *cross-β*-Struktur ausbildet oder nicht, bestimmt letztlich den Unterschied zwischen dem Typ III und dem Typ IV Modell. Für die



**Abb. 1-12: Einteilung der Gain-of-Interaction Modelle nach der Art der intermolekularen Interaktion** (entommen aus Nelson & Eisenberg (2006))

Fibrillierung von Cystatin C wird beispielsweise ein Typ III Modell diskutiert. Bei diesem ist noch ungeklärt, ob die entstehenden Fibrillen fortlaufende Strukturen darstellen oder ob Dimere mit jeweils ausgetauschten Domänen nach einem *direct stacking* Modell miteinander interagieren.

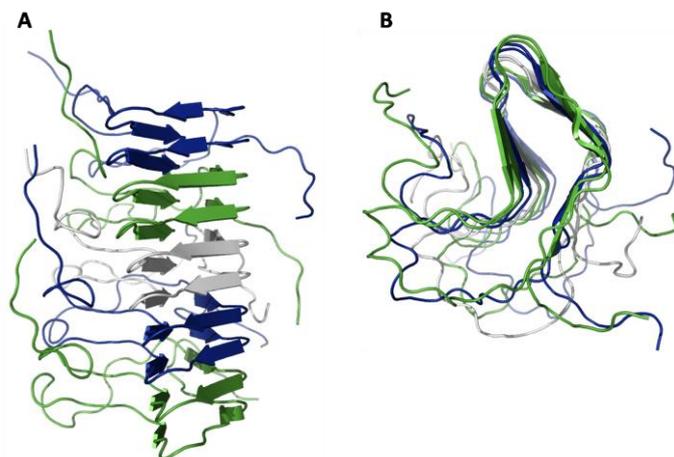
### 1.5.2.3. Modelle nativer ungeordneter Proteine (*natively disordered proteins*)

Proteine, die nach diesem Modell fibrillieren, lassen sich in keine der vorgenannten Klassen einordnen. Zumindest ein Teil ihrer Struktur ist unter nativen Bedingungen unstrukturiert, weshalb ihr Faltungszustand als intrinsisch ungeordnet (*intrinsically disordered*) bezeichnet wird. Durch die Interaktion mit Partnermolekülen gewinnen die intrinsisch unstrukturierten Regionen zwar an Ordnung, allerdings ist noch nicht erhärtend geklärt, ob die hierdurch induzierte Struktur einen Einfluss auf die Konformation der fertigen Proteinfibrille hat (Nelson & Eisenberg 2006b).

In die Modellklasse der „*natively disordered proteins*“ fallen unter anderem das Hefeprienon Ure2p, die C-terminale Domäne des Prions HET-s aus dem filamentösen Ascomycet *Podospora anserina* oder das humane A $\beta$ -Protein. Letzteres gehört zu den wohl am weitesten erforschten amyloidogenen Sequenzen, da sich die A $\beta$ -Fibrillen in Gehirnen von Alzheimer-Patienten zu Plaques formen. Die Amyloidstruktur des Prions HET-s wurde mittels *solid-state* NMR gelöst (Wasmer *et al.* 2008 & 2009). Sie hat die Form einer linkshändigen, parallelen  $\beta$ -Helix, wodurch sich die Frage motiviert, ob Amyloidfibrillen auch durch rechtsgängige, parallele b-Helices motiviert werden können.

## 1.6. Die Wechselwirkung von Peptiden mit GdmHCl und Harnstoff (Kurzzusammenfassung)

Chaotrope Hofmeister-Salze wirken als Denaturierungsmittel von Proteinen. Sie stören das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen den Wassermolekülen des Lösungsmittels. Zudem erhöhen sie die Löslichkeit von Proteinen, indem sie mit bestimmten Bereichen der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche bevorzugte Interaktionen eingehen (*preferential interaction*) (Lee & Timasheff 1974; Timasheff



**Abb. 1-13: Cartoon-Repräsentation der Amyloidstruktur des *Podospora anserina* Prions HET-s(218-289)**  
Die Fibrille enthält 3  $\beta$ -Stränge pro Windung und ähnelt in der Orientierung ihrer  $\beta$ -Stränge einer linkshändigen, parallelen  $\beta$ -Helix (PDB: 2RNM; Wasmer *et al.* 2008)

1992; Nettels *et al.* 2009). Bei hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen führt diese präferentielle Interaktion zur Entfaltung der nativen Struktur. Der umgekehrte Fall, der Ausschluss von Hofmeister-Salzen aus der Hydrathülle (*excluded volume effect*), fördert eine Stabilisierung der Proteinstruktur und bedingt letztlich die Präzipitation des Proteins. Verbindungen, die einen solchen Effekt verursachen, werden als Kosmotrope bezeichnet. Die Stärke von Denaturierungsmitteln wird durch ihren spezifischen Verteilungskoeffizienten beschrieben. Er spiegelt das Verhältnis der Chaotropkonzentrationen in der Hydrathülle und im Lösungsmittel wider (Courtenay *et al.* 2000; 2001).

Häufig verwendete Denaturierungsmittel sind Harnstoff und Guanidiniumsalze. Das Guanidiniumkation ( $\text{Gdm}^+$ ) ist ein nicht-physiologisches, starkes Denaturierungsmittel mit einem Verteilungskoeffizient von etwa 1.6. Es stellt nach neueren Befunden eines der am schlechtesten hydratisierten Kationen dar. Harnstoff ist wesentlich besser hydratisiert und physiologisch, wird aber im Bereich der Hydrathüllen weniger konzentriert, sodass sein Verteilungskoeffizient nur etwa 1.1 beträgt (Courtenay *et al.* 2001). Zum besseren Verständnis der Wechselwirkung zwischen Proteinen und Denaturierungsmitteln haben Moleküldynamiksimulationen von Harnstoff und  $\text{Gdm}^+$  mit Proteinoberflächen beigetragen. Demnach ist die Wechselwirkung von Denaturierungsmitteln mit Peptiden durch direkte und indirekte Effekte bestimmt. Indirekte Effekte beinhalten die oben angesprochene Störung der Lösungsmittelstruktur (Das & Mukhopadhyay 2009). Direkte Effekte beinhalten die Interaktion der Chaotrope mit spezifischen Proteinregionen. Im Fall von Harnstoff handelt es sich dabei vor allem um die Region des Peptidrückgrats (Das & Mukhopadhyay 2009; Bennion & Daggett 2003; Lim *et al.* 2009). Für  $\text{Gdm}^+$  wurde eine präferentielle Interaktion mit den planaren Arg-Seitenketten bzw. mit den  $\pi$ -Elektronensystemen von Trp, Tyr und Gln vorgeschlagen (Mason *et al.* 2007; 2009).

## 1.7. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Faltungsweg von Pel-15 aufzuklären und die Struktur eines vorab beobachteten Gleichgewichtsintermediates zu charakterisieren. Angesichts der sehr einfachen, solenoiden Grundstruktur dieses Proteins wurde davon ausgegangen, dass der Faltungsweg von Pel-15 repräsentativ für die Faltung der Strukturklasse der  $\beta$ -Helices sein würde. In diesem Sinne stellte sich Pel-15 als ein vielversprechender Kandidat für das isolierte Studium der  $\beta$ -Helixfaltung dar. In Ergänzung zur einzigen, bislang verfügbaren Quelle biochemischer Daten (Kobayashi *et al.* 1999) stand am Anfang der Arbeit die umfassende, biophysikalische Charakterisierung von Pel-15.

Die strukturellen Unterschiede, die Pel-15 zu anderen Pektatlyasen auszeichnen, warfen die Frage auf, ob sich in der „neuen“ Pektatlyase Regionen identifizieren lassen, die die Funktion von geordneten Seitenkettenstapeln, flexiblen Schleifenbereichen und terminalen Abschlussstrukturen übernehmen. Die evolutionär konservierte Disulfidbrücke im Zentrum der  $\beta$ -Helix sowie die stabilisierende, hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle im Bereich des T3-*turns* stellten für Fragestellungen dieser Art vielversprechende Mutageneseziele dar.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Desoxynukleotide	GE Healthcare, München
GdmHCl (ultra pure)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Harnstoff (ultra pure)	MP Biomedicals, Eschwege
Hellmanex	Hellma (Müllheim)
Polygalacturonsäure (97 %)	Sigma Aldrich (Fluka)
Tris	USB Corporation, Cleveland (USA)

Chemikalien, die in dieser Liste nicht aufgeführt sind, aber in der Arbeit Erwähnung finden, wurden von den Herstellern Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (St. Louis, USA) bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Pufferlösungen wurden mit quartzbidestilliertem Wasser oder mit Milliporegereinigtem Wasser hergestellt.

#### 2.1.2. Enzyme

<i>Pfuplusplus</i> -Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Pfuplus</i> -Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
Taq-Gold Polymerase	Applied Biosciences, Foster City, USA
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)

Kommerziell erworbene Enzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben in mitgelieferten Puffer- und Additivilösungen (100x BSA, 50x MgCl<sub>2</sub>) verdünnt verwendet.

#### 2.1.3. Puffer, Medien und Antibiotika

Bakterienkultivierung, Zellaufschluss, Proteinreinigung

LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl, mit 1.0 N NaOH auf pH 7.0 eingestellt, autoklaviert LB-Kulturplatten enthielten zusätzlich 2 % Agar-Agar
Selbstinduktionsmedium	Zusammensetzung nach Studier (2005)
Periplasma-Aufschlusspuffer	50 mM MOPS, pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA
Puffer für Hochdruck-Zelllyse (TEC)	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5 (25 °C), 5 mM EDTA
Ionenaustauschchromatographie	
Tandem-Äquilierungspuffer	0.5 M Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C), 1 mM EDTA

Tandem-Auftragspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C), 1 mM EDTA
SP-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C), 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA
Hydrophobe Interaktionschromatographie	
Auftrag	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C), 1.5 M Amm.-Sulfat
Elution	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C)
Agarose-Gelelektrophorese, SDS-PAGE, Färbelösungen	
6x DNA-Ladepuffer	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % Xylenyanol, 15 % Ficoll Typ 400, 20 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat, pH 8.0, 1 mM EDTA
SDS-Probenpuffer	325 mM Tris/HCl, pH 6.8, 5 % SDS, 500 mg/ml Glycerin, 0.5 mg/ml Bromphenol-Blau, ca. 10 mM DTT
2x SDS-PAGE Sammelgel-Puffer	0.25 M Tris/HCl, pH 6.8, 0.4 % SDS
4x SDS-PAGE Trenngel-Puffer	1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 0.8 % SDS
Coomassie-Färbelösung	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure, 0.05 % Coomassie Blue R
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure
Fix 1 (Silberfärbung)	30 % EtOH, 10 % Essigsäure
Fix 2 (Silberfärbung)	0.4 M Natriumacetat, 0.5 % Essigsäure, 30 % Ethanol (vor Verwendung in 100 ml Fix 2 zu lösen: 2 ml 25 % Glutaraldehyd, 100 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )
Färbelösung (Silberfärbung)	0.5 ml 29 % AgNO <sub>3</sub> , 25 µl 37 % Formaldehyd ad 100 ml H <sub>2</sub> O bd.
Entwickler-Lösung (Silberfärbung)	5 g NaCO <sub>3</sub> , 80 µl 37 % Formaldehyd ad 200 ml H <sub>2</sub> O bd.
Stop-Lösung (Silberfärbung)	50 mM EDTA, pH 8.0
Puffer für Proteinlösungen	
Standard-Nativpuffer	25 mM MOPS/NaOH, pH 7.0
Standard-Denaturierungspuffer	25 mM MOPS/NaOH, pH 7.0, 8 M GdmHCl (Harnstoff-Denaturierungslösungen wurden mit verschiedenen Puffersubstanzen und pH-Werten im Bereich zwischen pH 2.0 und pH 7.0 hergestellt)
Aktivitätstestpuffer	50 mM Glycin/NaOH, pH 10.5, 0.2 % PGA, 1 mM CaCl <sub>2</sub>
Quenchlösung	25 mM MOPS, pH 7.0, var. [GdmHCl], 2 M Acrylamid
Stammlösungen:	
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O bidest
IPTG (1000x Stammlösung)	1.0 M in H <sub>2</sub> O bidest
APS-Stammlösung	10 % Ammoniumperoxydisulfat in H <sub>2</sub> O
PGA Stammlösung (bidest.)	2 % PGA in H <sub>2</sub> O bidest.
PGA Stammlösung (gepuffert)	1 % PGA in 25 mM Glycin/NaOH, pH 10.5
CaCl <sub>2</sub> -Stammlösung	1.05 M CaCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O bidest.
EDTA-Stammlösung	0.5 M EDTA, pH 8.0
dNTP-Mix	25 mM von jedem dNTP, Lagerung bei -20 °C

## 2.1.4. Organismen

Für die Vermehrung von Plasmid DNA wurden die *E. coli* Stämme DH5 $\alpha$  und XL1blue verwendet. Proteine wurden rekombinant im Stamm BL21 DE3 exprimiert.

<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene (La Jolla, USA) Genotyp: endA1 gyrA96(nal <sup>R</sup> ) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ (lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) Resistenzen: <i>nalidixic acid</i> , Tetracyclin (lokalisiert auf dem F-Plasmid)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Grant <i>et al.</i> (1990) Genotyp: F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ - Resistenzen: <i>nalidixic acid</i>
<i>E. coli</i> BL21 DE3	Novagen (über Merck, Darmstadt); Studier & Moffatt (1986) Genotyp: F <sup>-</sup> ompT gal dem lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) Resistenzen: - (Dieser <i>E. coli</i> -Stamm enthält den $\lambda$ -Prophagen DE3, auf dem das Gen zur Expression der T7 RNA Polymerase und das lacI <sup>q</sup> -Gen lokalisiert sind)

## 2.1.5. Plasmide und Primer

### Plasmide

Das pel-15 Gen, wie es ursprünglich von Thoru Kobayashi zur Verfügung gestellt wurde, war in dem Bacillus-Vektor pHY300PLK lokalisiert. Für eine rekombinante Expression in *E. coli* BL21 DE3 wurde das Gen in den Vektor pET22b(+) kloniert. Dieser enthält eine N-terminale pelB-Signalsequenz, die den Sec-abhängigen Export des Expressionsproduktes ins bakterielle Periplasma vermittelt. Das pET-Expressionssystem wurde von Novagen<sup>®</sup> bezogen.

### Mutageneseprimer

Mutageneseprimer wurden durch die Firmen Invitak (Berlin) und Sigma Genosys (Sigma Aldrich) synthetisiert. Basenaustauschpositionen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Stille Mutationen, die zusätzliche Schnittstellen einführen, sind fett dargestellt.

D80Afw	5' catcctcaccaacaGcctcc <b>catatg</b> acatttgaatc	NdeI
D80Abw	5' gattacaatgt <b>catatg</b> ggaggCgttggtgaggatg	NdeI
VAfw	5' gtaatcgtAGCatcccc <b>gtagac</b> gtgcaccccg	AccI
VAbw	5' cggggtgcac <b>gtctac</b> gggatGCTacgattac	AccI
C148Afw	5' cactctggaatgttgGCgttt <b>caac</b> gttcatcaccac	AccII

C148Abw	5' gtggtgatgaac <b>gttg</b> aaaacGCcaacattccagagtg	AclI
(-)PelBfw	5' gcagcagcggtcggcagcaggtattca <b>Catg</b> tatatctccttc	AflIII
(-)PelBbw	5' gaaggagatata <b>catG</b> tgaataacctgctgccgaccgctgctgc	AflIII

### *Klonierungs-Primer*

(Restriktionsstellen sind fett gekennzeichnet.)

NcoI-forward	5' aggttgccg <b>ccatgg</b> cccgac	NcoI
NcoI-reverse	5' tgaggctca <b>agctt</b> aataactgcg	HindIII

## 2.1.6. Standards und Kits

PCR Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
PCR purification Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Miniprep Kit	Qiagen (Veno, Niederlande)
MW-SDS 70L, 4-70 kDa	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
DNA-Größenstandards (100bp, 1kb)	New England Biolabs (Schwalbach)

## 2.1.7. Sonstiges Material

Dialyseschläuche	Spectrum (Houston, USA)
(Ausschlussvolumen: 12-14 kDa)	
Millipore-Zentrifugalkonzentratoren	Millipore (Schwalbach)
Plastikküvetten (Typ "UVette")	Eppendorf, Hamburg
Puradisc Spritzenfilter (0.2 µm, 0.45 µm)	Whatman (Dassel)
Membran-Filter (0.45 µm)	Renner (Darmstadt)
Chromatographiematerial	GE Healthcare (Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg)
(Q-Sepharose FastFlow, SP-Sepharose FastFlow , Phenylsepharose FastFlow , Sephadex SD75, XK23-Chromatographiesäulen)	

## 2.1.8. Küvetten

Für proteinspektroskopische Anwendungen wurden UV-fähige Quartz-Suprasil-Küvetten der Firma (Hellma, Müllheim) verwendet (Messbereich: 200 nm-2.5 µm).

Fluoreszenzküvetten

Vollküvetten (10 x 10 mm)

Rührbar	101-QS
Nicht rührbar	119.000F-QS

Halbmikroküvetten (4 x 10 mm)

Rührbar	104F-QS
Nicht rührbar	109.004F-QS

Absorptionsküvetten

Pfadlängen: 1 mm, 4 mm, 10 mm) 100-QS, 105.004B-QS

Pfadlängen: 0.1 mm, 0.01 mm 106-QS

### 2.1.9. Geräte

Absorptionsspektrometer:	Cary 50 Probe (Varian, Darmstadt) ChemStation Diodenarray-Photometer (Typ: 89090A) (Agilent)
Abbé-Refraktometer:	Zeiss, Jena
CD-Spektrometer:	J-715* mit Peltier-Temperierung, J-815* mit Peltier-Temperierung (Jasco GmbH, Groß-Umstadt)
Chromatographie-Einheiten:	ÄKTA FPLC, ÄKTA prime, ÄKTA Purifier (GE Healthcare)
Elektrophoreseeinheiten:	Mighty Small SE260 für 10x8x0.075cm (Hoefer) PROTEAN II xi für 16x20x0.15cm Gele (Bio-Rad) Agargel Mini (Biometra)
Fluoreszenzspektrometer:	Fluoromax3 mit Peltier-Temperierung (LFI-3751), Fluorolog mit Peltier-Temperierung (LFI-3751) (Horiba Scientific, Unterhaching)
Geldokumentation:	Flachbett-Scanner
Hochdruckzellyse ( <i>French Press</i> )	20K und 40K Zellen (SLM Aminco)
Horizontalschüttler	Innova 2300 Platform Shaker (New Brunswick Scientific)
pH-Meter & Glaselektrode	pH 979 (WTW) & BlueLine 18 pH (Schott)
Pipetten	Finnpipetten (Thermo) Multipette (Eppendorf)
Reinstwasseranlage	Millipore
Sterilbank	HERAsafe (Heraeus)
Thermoschränke	Heraeus
Thermoschüttler	Thermomixer compact (Eppendorf)
Titrationsskalorimetrie:	Microcal ITC (GE Healthcare (Microcal), Freiburg)
Vakuum Filtrationseinheit	Amicon
Waagen	Sartorius B 120 S Feinwaage Kern PB
Wasserbäder	Huber
Zentrifugen	Biofuge Pico (Heraeus) Biofuge Fresco (Heraeus) MR22i (Jouan) RC-26 Plus (Sorvall) Sorvall Discovery M 150 (Ultrazentrifuge)

### 2.1.10. Software

Datenauswertung: IGOR Pro, Sigma Plot 9, MS Office

Primerdesign und Sequenzalignments: gcg, BioEdit, Ape, Jalview, BLAST

Proteinvisualisierung: PyMOL, RasMol, Coot,

Webbasierte Applikationen (Auswahl): Protein Data Bank, ExPASy, UniProt, PubMed, Web of Knowledge, WhatIf, IMolProt,

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Mikro- und molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Kultivierung und Lagerung von Bakterienzellen

Zur Anreicherung wurden *E. coli* Zellen bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in LB-Kulturmedium kultiviert. Zu Expressionszwecken wurde die Kultivierungstemperatur auf 30 °C abgesenkt. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden 0.8 ml der transformierten Bakterien mit 0.2 ml 87.5 % (v/v) Glycerin überschichtet und durch Invertieren gemischt. Nach mehrstündiger Inkubation auf Eis konnten die so vorbereiteten Zellen über Monate bei -80 °C gelagert werden, ohne ihre Expressionskompetenz zu verlieren.

#### 2.2.1.2. Klonierung des pel-15 Gens in den Vektor pET22b(+)

Das pel-15 gen wurde freundlicherweise von Dr. Thoru Kobayashi (Kao Corporation, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Umklonierung des Gens aus dem *Bacillus*- Expressionsplasmid pHY300PLK in Expressionsplasmid pET22b(+) war nötig, um Pel-15 rekombinant periplasmatisch exprimieren zu können.

Für die Amplifikation wurden die PCR-Primer „NcoI-forward“ und „NcoI-reverse“ verwendet. Die amplifizierende PCR und die abschließende Reinigung der PCR Fragmente wurden mit Hilfe eines Qiagen PCR Kits nach Herstellerempfehlung durchgeführt. Der Ablauf der PCR Reaktionen folgte den Herstellerangaben und umfasste 35 Zyklen. Vor der Ligation wurden die PCR-Fragmente und der Zielvektor mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII verdaut und das Ergebnis überprüft. Nach abschließender Ligation mittels T4-Ligase wurde das pET22b(+)-pel-15 Konstrukt in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, vermehrt und nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gereinigt. Die Überprüfung des Klonierungsfortschrittes erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese.

#### 2.2.1.3. Ortsgerichtete Mutagenese und Nomenklatur der hergestellten Mutanten

Basierend auf dem GC-Gehalt und der Zahl der Basenfehlpaarungen wurden die Schmelzpunkte der verwendeten Mutageneseprimer berechnet und für die Optimierung der PCR-Bedingungen verwendet. Die Wahl von Polymerase-, Puffer- und Additivkonzentrationen basierte auf den Empfehlungen zur Quickchange-Mutagenese (Stratagene). Um eine prognostizierte Ausbildung intramolekularer Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurden die Mutagenesen in Gegenwart von 1 mM DMSO durchgeführt. Jeder Mutageneseprimer erzeugte eine stille Mutation, die dem Einbau einer zusätzlichen Restriktionsschnittstelle in die Zielsequenz diente.

#### 2.2.1.4. Nomenklatur der hergestellten Konstrukte und Position der eingeführten Mutationen

Die hergestellten Pel-15 Varianten enthalten Mutationen an vier verschiedenen Positionen der  $\beta$ -Helix. Für eine bessere Übersicht werden die Varianten daher mit Kurzformen bezeichnet, deren Herkunft sich aus den enthaltenen Mutationen ableitet. Die folgende Tabelle fasst diese Kurzformen zusammen.

**Tab. 2-1: Nomenklatur der verwendeten Pel-15 Varianten**

Konstrukt-bezeichnung	Pos. 80	Pos. 67	Pos. 71	Pos. 148
Pel-15 WT	D	C	C	C
Pel-15 ACCC	<b>A</b>	C	C	C
Pel-15 DCCA	D	C	C	<b>A</b>
Pel-15 DVAC	D	<b>V</b>	<b>A</b>	C
Pel-15 DVAA	D	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Pel-15 AVAA	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	<b>A</b>

**Anmerkung:** Eingeführte Punktmutationen sind fett gekennzeichnet.

#### 2.2.1.5. Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

Transformationskompetente Bakterienzellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde 50-100 ng Plasmid-DNA in die Zellsuspension gegeben und die Zellen für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30-45 s. Unmittelbar nach dem Hitzeschock wurden die Bakterienzellen für weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor 50  $\mu$ l der Zellsuspension mittels steriler Glaskugeln auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurden. Die Ampicillinkonzentration im Agar betrug 1 mM. Nach ca. 10 min Lufttrocknung unter sterilen Bedingungen wurden die Platten im Brutschrank bei 37 °C über Nacht bzw. bei Raumtemperatur für eine Dauer von 48 h inkubiert.

#### 2.2.1.6. Restriktionsanalysen von isolierter Plasmid DNA

Restriktionsanalysen erfolgten, um den Erfolg von Klonierungen und Mutagenesen zu dokumentieren. Die Zusammensetzung der Restriktionsansätze folgte den Herstellerangaben (New England Biolabs) und wurde für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Die DANN-Konzentration in den Restriktionsansätzen betrug 1-2 ng/ $\mu$ l. Nach abgeschlossenem Verdau wurde 1  $\mu$ l Restriktionsansatz mit DNA-Auftragspuffer auf eine DNA-Konzentration von ca. 0.2 ng/ $\mu$ l verdünnt. Die Taschen von 1 % Agarosegelen wurden jeweils mit 5  $\mu$ l Probenlösung beladen. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte in Flachbettelektrophorese-Anlagen bei einer Spannung von 80 V. Fragmentgrößen und -konzentrationen wurden anhand von 1 kb und 100 bp Größenstandards abgeschätzt.

#### 2.2.1.7. Vermehrung und Präparation von DNA-Expressionsplasmiden

Die Vermehrung von Expressionsplasmiden erfolgte in den *high-copy*-Stämmen DH5 $\alpha$  und XL1*blue*. Zellen aus 3 ml über-Nacht-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C geerntet.

Die Resuspension der Zellen und anschließende Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse erfolgte unter Benutzung von QiaPrep Kits und orientierte sich in Durchführung und Probenzusammensetzung an den Herstellerangaben. Im Anschluss an die Präparation wurden die isolierten Plasmide mit 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektroskopisch anhand der Absorption bei 260 nm.

### **2.2.1.8. Rekombinante Expression von Pel-15**

#### *i) Einleitung der Expression durch Induktion mit IPTG*

Alle Kulturmedien enthielten 1 mM Ampicillin zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks. Die Proteinexpression wurde rekombinant in *E. coli* BL21 DE3 durchgeführt. Während der Kultivierung der Bakterienzellen wurde die Zelldichte als Trübung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei Erreichen einer optischen Dichte zwischen 0.8 und 1.0 wurde die Kultivierungstemperatur von 37 °C auf 30 °C gesenkt und die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Expression wurde unter aeroben Bedingungen für mindestens 4 Stunden, meist jedoch 16 Stunden durchgeführt.

#### *ii) Expression mit selbstinduzierendem Medium nach F. W. Studier (Studier 2005)*

Die Zusammensetzung des selbstinduzierenden Mediums wurde unverändert aus der genannten Literaturstelle übernommen. Bakterienzellen wurden aus einer anreichernden Übernachtskultur 1:100 in steriles, ampicillinhaltiges Kulturmedium verdünnt. Die Ampicillinkonzentration betrug 1 mM. Schließlich wurde die Expression für 48 h unter aeroben Bedingungen bei 30 °C durchgeführt.

## **2.2.2. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1. Periplasma-Aufschluss**

Der Aufschluss von Proteinen aus dem Periplasma erforderte einen sehr sanften Umgang mit den Bakterien. Der Aufschluss wurde konsequent bei 4 °C durchgeführt, um bakterielle Stoffwechselprozesse zu unterdrücken und im späteren Verlauf Proteaseaktivitäten zu minimieren. Zunächst wurden Zellen aus 5 l Kulturmedium durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 15 min in lockeren Pellets gesammelt und in insgesamt 150 ml Periplasma-Aufschlusspuffer mit Hilfe von Kunsthaarpinseln resuspendiert, die zuvor in 70 % (v/v) EtOH, 10 mM EDTA und H<sub>2</sub>O bidest. gereinigt worden waren. Im nächsten Schritt wurde der Zellsuspension unter langsamem Rühren in der Kälte 1 ml 150 mg/ml (w/v) PBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde die Suspension bei 20.500 rpm und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der viskos-gelbliche, leicht opaleszente Überstand (PA, ca. 150 ml) wurde dekantiert und mindestens 6 h gegen insgesamt 15 l Chromatographie-Puffer (25 mM Tris/HCl, pH 8.0 (4 °C), 1 mM EDTA) dialysiert.

### 2.2.2.2. Reinigung von Pel-15

#### *Reinigung nach periplasmatischer Expression*

Alle Prozesse der chromatographischen Reinigung vollzogen sich unter kontinuierlicher Detektion der Absorption bei 280 nm sowie der elektrischen Leitfähigkeit. Reinigungsfortschritte wurden mittels SDS PAGE bewertet.

Der dialysierte Periplasmaaufschluss wurde mit einer Flussrate von 1.5 ml/min auf ein mit Puffer C äquilibriertes Säulentandem von Q- und SP Sepharose FF (Gesamt-SV: ca. 100 ml) aufgetragen. Dabei diente die anionenauschende Q-Sepharose als „Fänger“ für einen Großteil der bakteriellen Proteine, während Pel-15 zusammen mit bakteriellen Proteinen höherer isoelektrischer Punkte durch die kationenauschende SP-Sepharose gebunden wurde. Das vollständig beladene Säulentandem wurde mit mindestens 5 Gesamt-SV Chromatographie-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von Säulentandem zu entfernen. Im Anschluss wurde die Q-Sepharose aus dem Fluss-Schema entfernt und separat mit 2 NaCl unter inversem Fluss gereinigt. Die SP-Sepharose-Säule wurde isokratisch mit einem ansteigenden Gradienten von 0.0 M (A) auf 0.5 M NaCl (B) eluiert und das Eluat ab einem Anteil von 10 % B in Fraktionen à 5 ml aufgefangen. Eluat-Fraktionen, die Pel-15 als prominente Bande enthielten, wurden vereinigt und gemäß dem Ergebnis der fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung unter langsamem Rühren in der Kälte auf 1.5 M (w/v) Ammoniumsulfat (AS) eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 h wurde das Gemisch mit einer Flussrate von 0.5 ml/min auf eine mit 25 mM Tris/HCl, 1.5 M AS, 1 mM EDTA, pH 8.0 (4 °C) äquilibrierte Phenyl-sepharose-Säule aufgetragen, die unmittelbar nach Ende des Probenauftrages durch einen linear auf 0.0 M AS abfallenden Gradienten isokratisch eluiert wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen à 3 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE auf seinen Pel-15 Gehalt hin untersucht. Die qualitative Bewertung der Reinheit aller Fraktionen erfolgte mittels einer Silberfärbung. Fraktionen, die neben Pel-15 keine weiteren Proteinbanden aufwiesen, wurden vereinigt und über Nacht gegen insgesamt 10 l Nativpuffer dialysiert. Nach einer Konzentrationsbestimmung anhand der Absorption bei 280 nm wurde das Endvolumen in Aliquots à 1 ml in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -20 °C dauerhaft gelagert.

Hergestellte Aminosäureaustausch-Varianten von Pel-15 wurden gemäß dem für Pel-15WT etablierten Protokoll gereinigt und in gleicher Weise gelagert.

#### *Reinigung nach cytosolischer Expression (Ladungsmutante Pel-15 AVAA)*

Die cytosolische Expression erfolgte in selbstinduzierendem LB-Medium und wurde ausschließlich mit der cysteinfreien Pel-15 Variante AVAA durchgeführt, da hier keine oxidativen Faltungsbedingungen zur Ausbildung nativer Disulfidbrücken realisiert werden mussten. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis, um Proteaseaktivitäten zu unterdrücken.

Zellen aus 5 l Kulturmedium wurden durch Zentrifugation (4 °C, 5000 rpm, 15 min) gesammelt und in 150 ml TEC Puffer resuspendiert. Nachdem die Zellen mittels Hochdruck-Zellyse aufgeschlossen

worden waren, wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (4 °C, 18.000 rpm, 45 min). Das lockere, leicht klebrige Pellet wurde mit 100 ml 20 % SDS in Lösung gebracht und bis auf weiteres bei -20 °C gelagert, während der dunkel-opaleszent gefärbte Überstand (V = 105 ml) mit 22.05 g AS auf eine AS-Konzentration von 1.5 M eingestellt wurde. Nach 1 h Rühren in der Kälte wurde ausgefälltes Protein durch eine erneute Zentrifugation abgetrennt. Der erhaltene Überstand war deutlich heller und wurde im Folgenden gegen 11 L Puffer C dialysiert. Das leicht gelbliche Protein-Pellet wurde in 100 ml TEC Puffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Der dialysierte Überstand wurde mit einer Flussrate von 1.5 ml/min auf das oben beschriebene Säulentandem von Q- und SP-Sepharose FF aufgetragen. Im Verlauf der Reinigung wurden Fraktionen á 5 ml aufgefangen und mittels SDS PAGE auf ihren Pel-15-Gehalt überprüft. Pel-15-haltige Fraktionen wurden vereinigt, auf 1.5 M AS eingestellt und wie oben beschrieben einer hydrophoben Interaktionschromatographie unterzogen. Fraktionen, die neben Pel-15 laut Ergebnis der Silberfärbung keine weiteren Proteinbanden aufwiesen, wurden vereinigt (ca. 60 ml) und gegen insgesamt 10 L Nativ-Puffer dialysiert. Nachdem die Pel-15 Lösung mittels einer Amicon Ultrafiltrationsmembran (Ausschluss: 10 kDa) auf 7.5 mg/ml eingestellt worden war, wurde die Proteinlösung in Aliquots á 1 ml in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C dauerhaft gelagert.

### **2.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Elektrophoresen dienen der Auftrennung von Proteingemischen gemäß ihrer Größe und wurden im Wesentlichen zur Dokumentation von Reinigungsfortschritten und zur qualitativen Analyse von Enzymaktivitäten verwendet. Die Zusammensetzung der SDS-Gele basierte auf dem von King & Laemmli vorgeschlagenen, diskontinuierlichen Puffersystem (King & Laemmli 1973). Die verwendeten Polyacrylamid-Gele hatten eine Größe von 10 x 8 x 0.075 cm und enthielten im Trenngel eine Acrylamid-Konzentration von 15 % (w/v). Je nach Anwendung lag die aufgetragene Proteinmenge in einem Bereich zwischen 1 und 100 ng (Silberfärbung) bzw. 10 und 50 µg (Coomassie-Färbung) Protein. Vor ihrem Auftrag auf das Gel wurden Proteinlösungen in ein Volumen SDS-Probenpuffer verdünnt und 3 bis 5 min bei mindestens 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde diskontinuierlich bei 90 V (Sammelgel) und 150 V (Trenngel) durchgeführt. Große Gele (16x20x0.15cm ) der gleichen Zusammensetzung wurden benutzt, um eine bessere Auflösung der einzelnen Proteinkomponenten zu erreichen.

#### 2.2.2.4. Färbemethoden

##### *Coomassie-Färbung*

Coomassie-Färbungen wurden zu Übersichtszwecken (Größenvergleich, Pel-15 Gehalt während Reinigungen, etc.) durchgeführt. Sie sind geeignet, Proteinmengen bis zu 0.2 µg zuverlässig zu detektieren. Die Färbung orientierte sich an der von (Fairbanks *et al.* 1971) vorgeschlagenen Methode.

##### *Silberfärbung*

Silberfärbungen wurden durchgeführt, um abschließende Reinigungserfolge zu dokumentieren bzw. um Abbauprodukte qualitativ zu analysieren. Die untere Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt etwa bei 0.1 ng Protein. Der Ablauf der Färbung und die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen wurde aus der Arbeit von (Heukeshoven & Dernick 1988) übernommen.

##### *Zymogramm*

Zymogramme wurden genutzt, um Proteinen bestimmter Molekularmassen bereits im Vorfeld der spektroskopischen Charakterisierung enzymatische Aktivität zuordnen zu können. Zur Herstellung von Aktivitätstest-Gelen wurde den Trenngelansätzen 2 % (w/v) Polygalacturonsäure (PGA) zugegeben, sodass die Endkonzentration 0.1 % (w/v) PGA betrug. Proteinproben wurden 1:1 in SDS-Probenpuffer verdünnt und vor dem Auftragen auf die Gele nicht thermisch denaturiert. In Abweichung vom Standard-Protokoll erfolgten Zymogramm-Elektrophoresen durchgehend bei 90 V unter konsequenter Kühlung durch Metallplatten bzw. durch den Anschluss an Kühlwasseranlagen. Nach abgeschlossener Trennung wurden die PGA-Gele 30 min in 2.5 % (w/v) Triton-X 100 bei RT inkubiert. Die anschließende Reaktivierung erfolgte in Aktivitätspuffer für 30 min bei 37 °C. Ein Nachweis von PGA-Spaltungsaktivität erfolgte durch das Anfärben im Gel verbliebener Polygalacturonsäure mit 0.05 % (w/v) Ruthenium-Rot für mind. 2 h. Nach der Färbung wurde überschüssiger Farbstoff durch H<sub>2</sub>O bidest. entfernt und das Gel im Durchlicht dokumentiert.

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

##### *Isothermale Titrationskalorimetrie*

Mit dieser Methode wurde die hochaffine Bindung von Ca<sup>2+</sup> an die Oberfläche von Pel-15 untersucht. Die jeweils für die Titrationsen eingesetzten Proteinkonzentrationen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Vor ihrer Verwendung wurden die Proteinlösungen in Amicon Zentrifugalkonzentratoren in aufkonzentriert und im Anschluss daran mit salzfreiem Nativ-Puffer über 5ml-*HiTrap*-Säulchen entsalzt. Als Titrationslösung diente eine 0.56 M CaCl<sub>2</sub> Lösung. Die ITC-Messungen wurden mit den folgenden Parametern durchgeführt:

<i>total injections:</i>	27	<i>stirring speed</i>	270 rpm
<i>cell temperature:</i>	20 °C	<i>titration volume</i>	2 µl
<i>reference power:</i>	10 µcal/sec	<i>duration</i>	4.8 sec
<i>initial delay:</i>	300 sec	<i>filter period</i>	2 sec

Die mathematische Auswertung der ITC Daten nutzte das von MicroCal zur Verfügung gestellte Regressionspaket. Die Daten wurden an das Modell „OneSite“ angepasst, das den einfachsten Fall der Bindung beschreibt und eine Bindestelle pro Proteinmolekül annimmt.

Nach Beendigung der Titrationsexperimente erfolgte die exakte Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mittels ICP. Die Vorbereitung und Durchführung dieser Messungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Meina Neumann-Schaal aus der Arbeitsgruppe Molekulare Enzymologie an der Universität Potsdam. Die zur Titration verwendeten Puffer wurden mit käuflich erworbenem Wasser der Firma Sigma hergestellt und nach Sterilfiltration durch Amicon Spritzenfilter in Plastikgefäßen aufbewahrt. Für den als  $\text{Ca}^{2+}$ -frei betrachteten Nativ-Puffer wurde mittels ICP ein Wert von  $[\text{CaCl}_2] = 0.9 \mu\text{M}$  bestimmt.

#### *Fluoreszenztitration*

Fluoreszenztitrationen wurden zur Charakterisierung der niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle von Pel-15WT, Pel-15 DCCA und Pel-15 AVAA durchgeführt. Die Messungen erfolgten in rührbaren Fluoreszenz-Halbmikroküvetten bei 20 °C unter Verwendung einer 0.1 M bzw. einer 1.02 M wässrigen Lösung von  $\text{CaCl}_2$ . Die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  erfolgte in Schritten von 2  $\mu\text{l}$ , wobei zwischen Zugabe und Start der Messung eine Inkubationszeit von 60 s eingehalten wurde.

Die Fluoreszenz wurde bei den Emissionswellenlängen 320 nm und 355 nm detektiert (Integrationszeit: 1.0 s, Anregungspfad: 4 mm, Emissionspfad: 10 mm). Leertitrationen von  $\text{CaCl}_2$  in proteinfreien Nativpuffer dienten bei der Auswertung der Daten als Referenz. Die zur Korrektur der Fluoreszenzintensitäten verwendeten Volumenfaktoren sowie die nach jedem Titrationschritt in der Lösung vorliegende  $\text{CaCl}_2$ - bzw. Proteinkonzentration sind Tabelle 2-1 zu entnehmen. Die mathematische Auswertung der Fluoreszenztitrationen wird unter 2.2.4.4 beschrieben (S. 43).

#### **2.2.2.6. Bestimmung der enzymatischen Aktivität**

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurde in Anlehnung an Kobayashi *et al.*, 1999 ein Volumen von 990  $\mu\text{l}$  Aktivitätspuffer (50 Glycin/NaOH, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 % PGA, pH 10.5) im Probenhalter für mindestens 2 min bei der zu charakterisierenden Temperatur temperiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Proteinlösung gestartet. Die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz wurde jeweils an das Experiment angepasst und ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (Standardwert: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Nach schnellem Invertieren wurde die Zunahme der Absorption bei 235 nm über einen Zeitraum von 60 s detektiert. Die ersten 10 s jeder Reaktion wurden genutzt, um aus den Anfangssteigungen (*initial rates*) die Enzymaktivität zu berechnen. Hierfür wurde der Zusammenhang

$$4.6 \text{ OD}/\text{min} = 1 \mu\text{mol Produkt}/\text{min} = 1 \text{ Unit} \quad (2)$$

verwendet. Alle verwendeten Proteinlösungen und Aktivitätstestpuffer waren cryostatisch temperiert.

**Tabelle 2-1: Verdünnungsfaktoren ( $f_v$ ), Protein- bzw. Ligandenkonzentrationen** Kursiv gedruckte Zeilen beziehen sich auf die Titration mit einer 0.1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung. Alle anderen Titrationsen erfolgten mit einer 1.015 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung.

$f_v$	[ $\text{CaCl}_2$ ] (mM)	[AVAA] ( $10^{-3}$ mM)	[DCCA] ( $10^{-3}$ mM)	$f_v$	[ $\text{CaCl}_2$ ] (mM)	[Pel-15WT] ( $10^{-3}$ mM)
1.000	0.00	0.317	0.479	<i>1.0000</i>	<i>0.00</i>	<i>0.506</i>
1.002	2.00	0.316	0.478	<i>1.0008</i>	<i>0.08</i>	<i>0.505</i>
1.004	3.98	0.315	0.477	<i>1.0016</i>	<i>0.16</i>	<i>0.505</i>
1.006	5.96	0.315	0.476	<i>1.0024</i>	<i>0.24</i>	<i>0.504</i>
1.008	7.94	0.314	0.475	<i>1.0032</i>	<i>0.32</i>	<i>0.504</i>
1.010	9.90	0.313	0.474	<i>1.0040</i>	<i>0.40</i>	<i>0.504</i>
1.012	11.86	0.313	0.473	1.0048	1.21	0.503
1.014	13.81	0.312	0.472	1.0056	2.02	0.503
1.016	15.75	0.312	0.471	1.0064	2.82	0.502
1.018	17.68	0.311	0.470	1.0072	3.63	0.502
1.020	19.61	0.310	0.469	1.0080	4.43	0.502
1.022	21.53	0.310	0.468	1.0088	5.23	0.501
1.024	23.44	0.309	0.467	1.0108	7.23	0.500
1.026	25.34	0.309	0.467	1.0128	9.22	0.499
1.028	27.24	0.308	0.466	1.0148	11.20	0.498
1.030	29.13	0.307	0.465	1.0168	13.18	0.497
1.032	31.01	0.307	0.464	1.0188	15.14	0.496
1.034	32.88	0.306	0.463	1.0228	19.05	0.494
1.036	34.75	0.306	0.462	1.0268	22.93	0.492
1.038	36.61	0.305	0.461	1.0308	26.78	0.491
1.040	38.46	0.304	0.460			
1.042	40.31	0.304	0.459			
1.044	42.15	0.303	0.458			
1.046	43.98	0.303	0.458			

Die Erfassung der Aktivitätsdaten erfolgte mindestens als 3-fach Bestimmungen in Küvetten des Typs 100-QS. Alle Messungen wurden an einem Peltier-gesteuerten Diodenarray-Spektralphotometer (ChemStation) der Firma Agilent erfasst.

### Spezielle Anwendungen

#### a) Zeitabhängigkeit der Renaturierung

Für dieses Experiment wurde 5.6 mg/ml Pel-15 in 5 M GdmHCl denaturiert. Die Rückfaltung bei 20 °C wurde durch 1:10 Verdünnung der Probe in Rückfaltungspuffer (25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  / EDTA, pH 7.0) eingeleitet, sodass die residuale GdmHCl-Konzentration 0.5 M betrug. Nach unterschiedlichen Renaturierungszeiten wurde ein Aliquot des Rückfaltungsansatzes 1:4 in 25 mM MOPS, 2.5 M GdmHCl, pH 7.0 verdünnt und auf Eis inkubiert. Nach 2 bis 3 h wurde die

Probe 1:40 im Aktivitätstest eingesetzt. Die Proteinkonzentration im Aktivitätstest betrug 0.35 µg/ml.

### b) Konzentrationsabhängigkeit der Renaturierung

Die Renaturierungseffizienz von Pel-15WT und Pel-15AVAA wurde bei den Konzentrationen 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 70 µg/ml und 100 µg/ml für die Rückfaltung bei 20 °C analysiert. Die Herstellung der Rückfaltungsansätze erfolgte in allen Fällen durch die Verdünnung einer 1 mg/ml Lösung denaturierten Proteins in Rückfaltungspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurden die Ansätze jeweils 1:100 in Aktivitätstestpuffer verdünnt und die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität bei 30 °C untersucht. Native Kontrollen identischer Konzentration wurden der gleichen Behandlung unterzogen und dienten als Referenz.

## 2.2.3. Proteinbiophysikalische Methoden

### 2.2.3.1. Bestimmung von Extinktionskoeffizienten und Proteinkonzentrationen

Die Extinktionskoeffizienten der denaturierten Proteine wurden berechnet. Alle Messungen zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurden dreifach unabhängig nach Methode von Pace *et al.* (1995) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten als unabhängige Dreifachwiederholungen in Quartzküvetten (Typ 100-QS) bei einer Pfadlänge von 1 cm. Die für diese Arbeit verwendeten Extinktionskoeffizienten der denaturierten und nativen Proteine sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst. Proteinkonzentrationen wurden spektroskopisch mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt.

**Tabelle 2-2: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Pel-15 Varianten**

Pel-15 Konstrukt	denaturiert (berechnet)	nativ (experimentell bestimmt)	
	molarer Extinktionskoeffizient [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	molarer Extinktionskoeffizient [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	spezifischer Extinktionskoeffizient [ml mg <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
Pel-15DCCC (WT)	14770	15260	0.73
Pel-15ACCC	14660	15480	0.74
Pel-15DCCA*	14770	15260	0.73
Pel-15DVAA	14650	15250	0.72
Pel-15AVAA**	14650	15250	0.72

**Anmerkung:** \*) Für Pel-15 DCCA wurde der Extinktionskoeffizient von Pel-15 DCCC angenommen.

\*\*) Für Pel-15 AVAA wurden die Extinktionskoeffizienten von Pel-15 DVAA angenommen.

### 2.2.3.2. Absorptionsspektroskopie

Proteinabsorptionsspektren wurden mit Hilfe eines Diodenarray-Spektralphotometers (ChemStation) der Firma Agilent erfasst. Während der Messungen betrug die Integrationszeit pro Datenpunkt 3 s. Die Spektren wurden in einem Bereich zwischen 240 und 350 nm detektiert. Zur Korrektur der auftretender Basisliniendrifts wurde der Bereich zwischen 320 nm und 350 nm linear extrapoliert. Das

für die Wellenlänge 280 nm erhaltene Ergebnis als Hintergrundsignal von der gemessenen Extinktion abgezogen.

### 2.2.3.3. Fluoreszenzspektroskopie

#### *Fluoreszenz-Spektren*

Fluoreszenz-Spektren wurden mit einer Integrationszeit von 0.5 s und einem Messpunktintervall von 1.0 nm aufgenommen. Je nach Anregungswellenlänge wurde die Emission in einem Bereich zwischen 290 nm und 450 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm) bzw. zwischen 300 nm und 450 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm) detektiert. Die spektralen Bandbreiten im Anregungs- und Emissionspfad betragen 2.5 nm und 5.0 nm. Alle Messungen erfolgten, sofern nicht abweichend gekennzeichnet, bei 20 °C in Küvetten des Typs 109.004F-QS. Dabei betrug die Pfadlänge in der Anregung 0.4 cm und in der Emission 1.0 cm.

#### *Fluoreszenz-Kinetiken*

Zur Messung von Denaturierungs- und Renaturierungskinetiken wurden Proteinstammlösungen unter Rühren 1:100 in eine mit Pufferlösung befüllte, temperierte Fluoreszenzküvette des Typs 104F-QS verdünnt. Die Totzeit manueller Mischung wurde durch eine Stoppuhr aufgezeichnet und zur Korrektur der Zeitachse verwendet. Die Anregungspfadlänge betrug 0.4 cm, die der Emission 1,0 cm. In allen Experimenten waren die spektralen Bandbreiten 2.5 nm für den Anregungspfad und 5.0 nm für den Emissionspfad. In allen Fällen betrug die Anregungswellenlänge 280 nm. Die Wahl der Detektionswellenlänge variierte in Abhängigkeit von der Fragestellung und ist den entsprechenden Abbildungen zu entnehmen.

Kinetische Messungen erfolgten, sofern nicht anders vermerkt, bei einer Temperatur von 20 °C. Die Inkubationszeit vor Start der Kinetiken betrug mindestens zwei Minuten.

Um ein zu starkes Bleichen der Chromophore (*photo bleaching*) zu minimieren, wurde der Anregungsstrahl zwischen den einzelnen Messpunkten verschlossen. Aus dem gleichen Grund betrug das Messpunktintervall 7 s und wurde die Zahl der Messpunkte pro Kinetik auf 250 begrenzt.

#### *Limitierte Doppelsprungexperimente ( $N \rightarrow HF \rightarrow N$ )*

In diesem Experiment wurde das Gleichgewicht zwischen dem nativen und dem intermediären Zustand von Pel-15 untersucht. Hierfür wurde eine 1.36 mg/ml Lösung nativer Pel-15 1:5 für verschiedene lange Zeiten in 1.0 M GdmHCl inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 1:20 in Nativ-Puffer verdünnt und die Renaturierungskinetiken bei 325 nm detektiert. Die Pel-15-Konzentration im Rückfaltungsansatz betrug 13.6 µg/ml. Im Anschluss an jede Kinetik wurden Fluoreszenzspektren der rückgefalteten Proben aufgenommen und mit dem nativen Ausgangszustand verglichen.

*Inverse Doppelsprungexperimente ( $U \rightarrow N \rightarrow U$ )*

Die Planung und Durchführung der inversen Doppelsprungexperimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Monika Walter und orientierte sich an Vorgaben von Thomas Kiefhaber (Wildegger & Kiefhaber 1997a).

In Vorbereitung der inversen Doppelsprungexperimente wurde 0.51 mg/ml Pel-15 in 5.01 M GdmHCl denaturiert und bei 20 °C für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden Rückfaltungsreaktionen durch eine 1:10 Verdünnung in Nativpuffer eingeleitet. Nach verschiedenen Zeiten wurden die rückfaltenden Ensembles 1:5 in Denaturierungspuffer verdünnt (Endkonzentration: 6.01 M GdmHCl) und die Denaturierungskinetiken bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 353 nm detektiert.

*Fluoreszenzlöschung mit Acrylamid*

Zur Vorbereitung der Fluoreszenzlöschexperimente wurden Stammlösungen von 1 mg/ml Pel-15 und von 1.0 M Acrylamid in 0.0 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.6 M 1.0 M, 2.0 M bzw. 5.0 M GdmHCl verdünnt und für 24 Stunden bei RT inkubiert. Die GdmHCl-haltigen Proteinlösungen hatten eine Endkonzentration von 50 µg/ml. Die GdmHCl-haltigen Acrylamidlösungen wurden auf eine Konzentration von 0.2 M Acrylamid eingestellt.

Für die Acrylamid-Titrations wurde jeweils 1 ml der Proteinstammlösungen in eine Fluoreszenzküvette (Typ 109.004F-QS) überführt und für 5 min bei 20 °C inkubiert. Die Zugabe von Acrylamid erfolgte in Schritten à 10 µl bis zu einer Endkonzentration von 80 mM. Nach jeder Zugabe wurde eine Inkubationszeit von zwei Minuten eingehalten, bevor ein Fluoreszenzspektrum im Bereich zwischen 305 nm und 450 nm aufgezeichnet wurde. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Integrationszeit 0.5 s und der Messpunktabstand 1.0 nm.

Für jede GdmHCl-Konzentration wurde eine Leertitration von Acrylamid in proteinfreiem MOPS-Puffer durchgeführt, die als Hintergrundsignal von den gemessenen Proteinspektren abgezogen wurde. Der durch die Zugabe von *Quencher*-Lösung verursachte Verdünnungseffekt wurde durch Multiplikation der Spektren mit Volumenfaktoren ( $f_V$ ) ausgeglichen, die sich nach folgender Gleichung errechneten:

$$f_V = \frac{V}{V_0} \quad (3)$$

Hier kennzeichnet  $V$  das Volumen nach Zugabe von *Quencher*-Lösung und  $V_0$  das Ausgangsvolumen. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzlöschung erfolgte nach der Stern-Volmer-Gleichung:

$$\frac{F}{F_0} - 1 = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

Dabei ist  $k_q$  die bimolekulare Quenchkonstante und  $\tau_0$  die Lebenszeit des angeregten Fluorophors in Abwesenheit von Quencher.  $F_0$  und  $F$  sind die Fluoreszenzintensitäten in Abwesenheit und in Anwesenheit von Quencher.  $K_{SV}$  ist die Stern-Volmer-Konstante unter Annahme eines dynamischen Quenchs. Unter nativen Bedingungen wurden die  $K_{SV}$ -Werte für den Wellenlängenbereich zwischen

305 nm bis 325 nm bestimmt. Im Fall vollständig denaturierter Pel-15 wurden  $K_{SP}$ -Werte aus den Emissionen zwischen 345 nm und 365 nm bestimmt. Bei einer GdmHCl-Konzentration von 2.0 M wurden die Tryptophane der entfalteten Moleküle selektiv gequenchet. In diesem Fall wurde der Wellenlängenbereich zwischen 380 nm und 400 nm zur Analyse herangezogen und somit lediglich das Signal denaturierter Pel-15 ausgewertet.

#### 2.2.3.4. Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD)

CD Spektren wurden mit verschiedenen Küvetten unter Einsatz variierender Proteinkonzentrationen aufgenommen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gewonnenen Daten unter Nutzung der folgenden Gleichung zu molaren Elliptizitäten ( $[\Theta]_{MRW}$ ) umgerechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot M_W \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{aa}} \quad (5)$$

Dabei kennzeichnen  $\theta$  die molare gemessene Elliptizität (grad),  $M_W$  die Molekularmasse des Proteins,  $c$  die Proteinkonzentration (mg/ml),  $d$  die Schichtdicke der Küvette (cm) und  $N_{aa}$  die Anzahl der Aminosäuren.

##### *Nah-UV CD-Spektren*

Nah-UV CD Spektren wurden in Absorptionsküvetten (Typ 105.004B-QS) erfasst. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen variierten zwischen 250 µg/ml und 1.8 mg/ml. Spektren wurden in einem Bereich zwischen 350 nm und 250 nm aufgezeichnet und um küvetten-spezifische Basislinien sowie um pufferspezifische Hintergrundabsorptionen korrigiert. Die verwendeten Geräteeinstellungen umfassten eine spektrale Bandbreite von 1.0 nm, eine Integrationszeit von 8 sec und einen Messpunkt-Abstand von 1.0 nm. Spektren wurden in aller Regel 10-fach akkumuliert.

##### *Fern-UV CD-Spektren*

Fern-UV-CD Spektren wurden in Absorptionsküvetten mit Pfadlängen von 1.0 mm und 0.1 mm in einem Wellenlängenbereich zwischen 250 nm und 190 nm erfasst. Die in Abhängigkeit von der Pfadlänge eingesetzten Proteinkonzentrationen sind den jeweiligen Abbildungsunterschriften zu entnehmen. Während der Messungen betrug die Bandbreite 1.0 nm, der Messpunkt-Abstand 1.0 nm und die Integrationszeit 4 s. Spektren wurden mehrfach akkumuliert, um das ungünstige Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zu kompensieren. Die Zahl der Akkumulationen ist in den jeweiligen Abbildungen vermerkt.

##### *Fern-UV CD-Kinetiken*

Fern-UV CD-Kinetiken wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Dr. Monika Walter gemessen. Für die Kinetiken wurde eine Pel-15 Stammlösung unter Rühren 1:20 in Absorptionsküvetten mit Nativ- bzw. Denaturierungspuffer verschiedener GdmHCl-Konzentrationen verdünnt. Die finale Proteinkonzentration in allen Kinetiken betrug 50 µg/ml. Kinetische Messungen wurden mit einer Bandbreite von 2.0 nm, einer Integrationszeit von 4 s und einem Messpunktintervall von 10 s aufgenommen.

### 2.2.3.5. Harnstoff- und GdmHCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge

#### *Nah-UV CD Übergänge*

In Vorbereitung der Übergangsexperimente wurde eine verdünnte Pel-15 Lösung mit Hilfe von Amicon Zentrifugalkonzentrator-Röhrchen auf eine Konzentration von 30 mg/ml konzentriert und anschließend 1:1 in Nativ- und Denaturierungspuffer verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden jeweils 10  $\mu$ l Protein-Stammlösungen mit einer Eppendorf Multipette in Eppendorf *low binding* Reaktionsgefäße aliquotiert und mit 990  $\mu$ l Übergangspuffer schwallartig auf eine Proteinkonzentration von 300  $\mu$ g/ml verdünnt. Proteinfreie Kontrollen wurden auf gleiche Weise hergestellt. Alle Proben wurden 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und 14 Tage bei 20 °C inkubiert.

Nach der Inkubationsphase wurde eine bei 20 °C temperierte Absorptions-Küvette des Typs 105.004B-QS nacheinander mit Puffer-, Denaturierungs- und Renaturierungsprobe befüllt und das Elliptizitätssignal für 60 s bei jeweils 5 verschiedenen Wellenlängen (258 nm, 278 nm, 289 nm, 291 nm und 293 nm) detektiert. Innerhalb dieser 60 s wurden jeweils 6 Messpunkte aufgezeichnet; die Bandbreite betrug 2.0 nm und die Integrationszeit lag bei 8 s pro Messwert. Die Messwerte wurden um die korrespondierenden Hintergrundsignale korrigiert und mittels Gleichung (5) in molare Elliptizitäten umgerechnet.

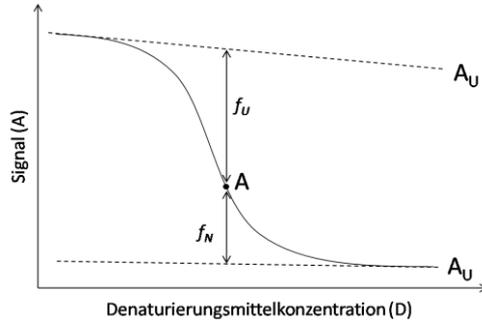
#### *Fluoreszenz-Übergänge*

Die Herstellung der Fluoreszenz-Übergangsproben erfolgte analog zur Herstellung der CD-Übergangsproben. Die Proteinkonzentration in den Übergangsproben betrug 10  $\mu$ g/ml. Dazu wurden native und denaturierte Stammlösungen mit der Schwallmethode 1:100 in Übergangspuffer verschiedener GdmHCl-Konzentrationen verdünnt. Nach einer Inkubationszeit, die in Abhängigkeit von der verwendeten Denaturierungsmethode zwischen 8 d und 5 Wochen betrug, wurden die Proben nacheinander in eine temperierte Fluoreszenzküvette des Typs 109.004F-QS überführt und für 2 min temperiert. Anschließend wurden Fluoreszenz-Emissionsspektren unter Anregung der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm bzw. bei  $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm in einem Wellenlängenbereich von 290 nm und 450 nm bzw. 305 nm und 450 nm detektiert. Die erhaltenen Fluoreszenzemissionsspektren wurden um die mittleren GdmHCl-abhängigen Hintergrundsignale korrigiert. Die jeweils verwendeten Proteinkonzentrationen, Inkubationszeiten und zusätzlich in den Übergangspuffern enthaltene Additivkonzentrationen sind den jeweiligen Abbildungsunterschriften zu entnehmen.

### 2.2.4. Mathematische Auswertung

#### 2.2.4.1. Auswertung von Übergängen nach dem 2-Zustandsmodell

Wird ein kooperativer Faltungs- bzw. Entfaltungsübergang (Abb. 2-1) allein durch den nativen Zustand N und den denaturierten Zustand U bestimmt, so lassen sich die Anteile  $f_N$  und  $f_U$  nach der linearen Extrapolationsmethode berechnen (Bolen & Santoro 1988). Das Verhältnis dieser Anteile bestimmt die Gleichgewichtskonstante  $K_N$ :



**Abb. 2-1: 2-Zustands-Gleichgewichtsübergang.** Der Signalverlauf (durchgezogene Linie) ergibt sich aus dem Abfall von  $f_N$  (bzw. der Zunahme von  $f_U$ ) bei zunehmend entfaltenden Bedingungen. Gestrichelte Linien zeigen die Extrapolation der Basislinien  $A_N$  und  $A_U$  des Vor- bzw. Nachüberganges auf jeweils entfernte Bedingungen.

$$K_N = \frac{f_N}{f_U} = \frac{A - A_N}{A_U - A} \quad (6)$$

Die Basislinien  $A_N$  und  $A_U$  sind durch einfache lineare Funktionen zu beschreiben:

$$A_N = m_N \cdot D + n_N \quad (7)$$

bzw.

$$A_U = m_U \cdot D + n_U \quad (8)$$

Für die Gleichgewichtskonstante  $K_N$  gilt nach der Gleichung zur Berechnung der freien Enthalpie ( $\Delta G_N$ ):

$$K_N = e^{-(m \cdot D + \Delta G_N^0)/RT} \quad (9)$$

Dabei entspricht  $\Delta G_N^0$  der freien Stabilisierungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel und  $m$  der Kooperativität, also der Denaturierungsmittelabhängigkeit von  $\Delta G_N$ .

Nach Umstellen und Separation der Variablen in Gleichung (6) ergibt sich für die Abhängigkeit des gemessenen Signals  $A$  von der Denaturierungsmittelkonzentration  $D$  die Gleichung

$$A(D) = \frac{K_N A_U - A_U}{1 + K_N} = \frac{(m_U \cdot D + n_U) e^{-(m \cdot D + \Delta G_N^0)/RT} - (m_N \cdot D + n_N)}{1 + e^{-(m \cdot D + \Delta G_N^0)/RT}} \quad (10)$$

Insgesamt sind also für die nichtlineare Anpassung von Übergangsdaten sechs Parameter zu bestimmen. Am Übergangsmittelpunkt  $D_{1/2}$  ist  $K_N = 1$ , d.h.  $\Delta G_N = 0$ . Damit ergibt sich  $D_{1/2}$  gemäß

$$D_{1/2} = -\frac{\Delta G_N^0}{m} \quad (11)$$

#### 2.2.4.2. Auswertung von Übergängen nach einem linearen 3-Zustandsmodell

Bei Vorliegen eines linearen Faltungs- bzw. Entfaltungsgleichgewichts der Form  $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$  muss das zuvor beschriebene 2-Zustandsmodell erweitert werden. Unter idealen Bedingungen entspricht dann die

Denaturierungsmittelabhängigkeit des gemessenen Signals dem Schema in Abb. 2-2, und für die Teilgleichgewichte lassen sich analog zur Herleitung in Abschnitt 2.2.4.1 die Gleichgewichtskonstanten  $K_{IN}$  und  $K_{UI}$  aufstellen:

$$K_{IN} = f_I/f_N = e^{-\frac{\Delta G_{IN} + m_{IN} \cdot [D]}{RT}} \quad (12)$$

$$K_{UI} = f_U/f_I = e^{-\frac{\Delta G_{UI} + m_{UI} \cdot [D]}{RT}} \quad (13)$$

Dabei bezeichnen  $\Delta G_{UI}$  und  $\Delta G_{IN}$  die freien Stabilisierungsenthalpien der Reaktionen  $U \rightarrow I$  bzw.  $I \rightarrow N$  in Abwesenheit von Denaturierungsmittel und  $m_{UI}$  und  $m_{NI}$  die entsprechenden Kooperativitäten, d.h. Denaturierungsmittelabhängigkeiten dieser Stabilisierungsenthalpien. Das spektroskopische Signal jeder der im Übergang populierte Faltungsspezies besitzt eine eigene Denaturierungsmittelabhängigkeit, die sich analog zum 2-Zustandsmodell durch die Basislinien  $E_N$ ,  $E_I$  und  $E_U$  ausdrücken lässt.

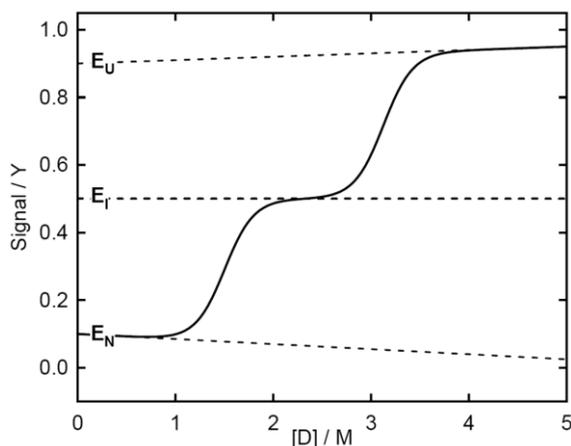
$$E_N = m_N D + n_N \quad (14)$$

$$E_I = m_I D + n_I \quad (15)$$

$$E_U = m_U D + n_U \quad (16)$$

Zusammen mit den Parametern, die die Lage der Teilgleichgewichte beschreiben, erfordert die Regression von 3-Zustandsübergängen also die simultane Anpassung von 10 Parametern. Das detektierte Signal  $Y$  ergibt sich bei Annahme eines 3-Zustandsübergangs als Summe aus den Beiträgen aller drei Faltungsspezies, was sich in folgendem Zusammenhang verdeutlicht:

$$Y(D) = Y_N E_N + Y_I E_I + Y_U E_U \quad (17)$$



**Abb. 2-2: Theoretisches, lineares 3-Zustandsgleichgewicht.** Im dargestellten idealen Modell ist das beobachtete Signal  $Y$  (z.B. Fluoreszenz) für alle drei im Gleichgewicht populierte Spezies unterschiedlich empfindlich, sodass gesicherte Aussagen über alle Rahmenbedingungen des Modells getroffen werden können.  $E_N$ ,  $E_I$  und  $E_U$  bezeichnen die Denaturierungsmittelabhängigkeiten der nativen, der intermediären und der denaturierten Faltungsspezies.  $[D]$  bezeichnet die Konzentration an Denaturierungsmittel. Der dargestellte Übergang wurde mit folgenden Parametern berechnet:

$n_N = 0.10$ ;  $m_N = -0.02 \text{ M}^{-1}$ ;  $n_I = 0.5$ ;  $m_I = 0.0 \text{ M}^{-1}$ ;  
 $n_U = 0.9$ ;  $m_U = 0.01 \text{ M}^{-1}$ ;  $\Delta G_{IN} = 6.0 \text{ kcal/mol}$ ;  
 $A_{IN} = 4.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ;  $\Delta G_{UI} = 12.0 \text{ kcal/mol}$ ;  
 $A_{UI} = 4.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ;  $T = 300 \text{ K}$ . Dabei sind  $y_n$ ,  $y_i$  bzw.  $y_u$  die Y-Achsenabschnitte und  $s_n$ ,  $s_i$  und  $s_u$  die Anstiege der drei Basislinien  $E_N$ ,  $E_I$  und  $E_U$ .  $\Delta G_{IN}$  ist die freie Enthalpie der Intermediatsentstehung aus N und  $\Delta G_{UI}$  die der Bildung des denaturierten Zustandes aus I.  $m_{NI}$  und  $m_{UI}$  sind die Kooperativitäten der jeweiligen Teilgleichgewichte.

Dabei repräsentieren  $Y_N$ ,  $Y_I$  und  $Y_U$  die Anteile der an der Faltungsreaktion beteiligten Spezies am Gesamtsignal. Das lineare 3-Zustandsmodell wurde der Formelbibliothek des globalen Analyse-

programmes SAVUKA (© Osman Bilsel) entnommen. Es beschreibt das gemessene Signal als die denaturierungsmittelabhängige, additive Verteilung der Faltungsspezies N, I und U:

$$Y(D) = E_N \frac{1}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}} + E_I \frac{K_{IN}}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}} + E_U \frac{K_{IN}K_{UI}}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}} \quad (18)$$

Um die Verlässlichkeit der Regressionsergebnisse zu erhöhen, wurden die meisten 3-Zustandsanpassungen global vorgenommen. Hierfür waren einige *ab initio* Beschränkungen notwendig. Diese und die bei der Regression global angepassten Parameter werden detailliert in Abschnitt 3.3.3.3 des Ergebnisteils dargelegt (S. 60).

#### 2.2.4.3. Auswertung von Faltungs- und Entfaltungskinetiken

Im einfachsten Fall reflektierte die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals  $Y$  eine Reaktion erster Ordnung und konnte somit an monoexponentielle Abklingkurven der Art

$$Y(t) = Y_0 + Ae^{(-kt)} \quad (19)$$

angepasst werden. Dabei beschreibt  $Y_0$  den Startwert,  $A$  die Amplitude und  $k$  die apparente Geschwindigkeitskonstante der beobachteten Reaktion. Einfache Verläufe dieser Art konnten beispielsweise bei den meisten Entfaltungskinetiken von Pel-15 beobachtet werden. Komplexere Zusammenhänge, wie zum Beispiel der Großteil der beobachteten Rückfaltungsreaktionen oder die Entfaltung in Gegenwart von niedrigeren Denaturierungsmittelkonzentrationen, wurden an biexponentielle Zusammenhänge angepasst. Diese hatten die Form

$$Y(t) = Y_0 + A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} \quad (20)$$

#### 2.2.4.4. Bestimmung von Dissoziationskonstanten aus Titrationsexperimenten

Titrationsexperimente wurden an hyperbole Bindungsmodelle mit einer Bindestelle angepasst. Diese hatten die Form

$$f(x) = \frac{x}{x + K_d} \quad (21)$$

Dabei beschreibt  $x$  die Ligandenkonzentration und  $K_d$  die Dissoziationskonstante. Im Fall der Fluoreszenzexperimente wurden die Fluoreszenzdaten zuvor mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren  $f_V$  multipliziert (Tabelle 2-1), wodurch die volumenkorrigierten Fluoreszenzdaten  $F$  erhalten wurden. Diese Werte wurden anschließend auf die maximale Signaländerung ( $F_{max}$ ) normiert:

$$F_{norm} = \frac{F - F_0}{F_{max}} \quad (22)$$

Dabei beschreibt  $F_0$  die Fluoreszenz vor Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und  $F_{max}$  das maximal erreichbare Intensitätssignal.  $F_{norm}$  entspricht dem normierten Signal, das als Gleichung (21) angepasst wurde.

#### 2.2.4.5. Berechnung des Modellspektrums des Pel-15 Faltungsintermediates

Zur Entwicklung des Modellspektrums des kinetischen Pel-15 Faltungsintermediates wurde eine Serie von Rückfaltungsreaktionen unter gleichen Bedingungen induziert und bei verschiedenen Emissions-

wellenlängen detektiert. Die Messung der Rückfaltungskinetiken erfolgte bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (7.9 µg/ml, 11.3 µg/ml und 22.6 µg/ml). Alle gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden nach ihrer Messung auf die Intensität einer Pel-15-Lösung mit der Konzentration 10 µg/ml normiert. Ebenso wurde mit den Fluoreszenzspektren verfahren, die nach jeder Renaturierungskinetik zu Kontrolle des Renaturierungserfolges im Bereich zwischen 290 nm und 450 nm aufgezeichnet wurden.

Die monoexponentielle Regression der Renaturierungskinetiken erfolgte im Zeitfenster zwischen 15 s und 1400 s, um Mischungsartefakte auszuschließen. Die Rekonstruktion des HF-Spektrums erfolgte unter der Annahme, dass die Emissionsanteile der zum Gesamtspektrum beitragenden Fluorophore Tyrosin und Tryptophan unabhängig voneinander sind, sodass das Emissionsprofil des Intermediates als eine Summe zweier Gauss-Funktionen der Form

$$y(\lambda) = a + e^{\frac{1}{4}\left(\frac{\lambda-b}{c}\right)^2} \quad (23)$$

beschrieben werden kann. Desweiteren wurde angenommen, dass ein geringer Anteil der vorliegenden Proteinmoleküle zum beobachteten Zeitpunkt noch im entfalteten Zustand vorliegt. Die Verteilung der kinetischen Startwerte ( $SV$ ) ergibt sich somit als

$$SV = \left( a_1 + e^{\frac{1}{4}\left(\frac{\lambda-b_1}{c_1}\right)^2} \right) + \left( a_2 + e^{\frac{1}{4}\left(\frac{\lambda-b_2}{c_2}\right)^2} \right) + uU \quad (24)$$

wobei  $u$  einen Faktor und  $U$  das intensitätskorrigierte Fluoreszenzspektrum entfalteter Pel-15 beschreibt. Das HF-Modellspektrum ergab sich als Summe der beiden Gauss-Verteilungen. Das Verhältnis zwischen den Fluoreszenzmaxima von HF und  $U$  ergab den Korrekturfaktor  $Z = 1.09$ .

#### 2.2.4.6. Nutzung des HF-Modellspektrums zur Dekonvolution von Fluoreszenzspektren

Da die Intensitätsmaxima von  $U$  und HF zueinander in einem festen Intensitätsverhältnis standen, ( $Z = 1.09$ ), war es möglich, aus dem Fluoreszenzmaximum einer denaturierten Pel-15-Probe beliebiger Konzentration das korrespondierende HF-Fluoreszenzspektrum zu berechnen. Das Maximum dieses korrespondierenden HF-Spektrums ergab sich gemäß

$$F_{\max, HF} = F_{\max, denat} \times 1.09 \quad (25)$$

Die Anpassung des Pel-15 WT Gleichgewichtsübergangs erfolgte unter Nutzung der Modellspektren  $N$ ,  $U$  und HF mittels der Gleichung

$$f(N, HF, U) = aN + bHF + cU \quad (26)$$

wobei die Faktoren  $a$ ,  $b$  und  $c$  den Einschränkungen  $0 < a, b, c < 1$  und  $a + b + c = 1$  unterworfen waren.

### 2.2.4.7. Normierung von Daten; Abschätzung der Regressionsqualität ( $\chi^2$ -Tests)

Die Anpassung der experimentellen Daten erfolgte unter Nutzung des Levenberg-Marquardt Algorithmus, der die Minimierung der Abweichungsquadrate zum Ziel hat. Demzufolge wurde die Güte der *fits* anhand ihrer  $\chi^2$ -Werte abgeschätzt. Der  $\chi^2$ -Wert eines Regressionsergebnisses berechnet sich gemäß

$$\chi^2 = \sum \Delta x_i^2 \quad (27)$$

Dabei sind  $\Delta x_i$  die Residuen der Regression. Je niedriger der  $\chi^2$ -Wert ist, desto zuverlässiger ist also das Fitergebnis. Das Prinzip der  $\chi^2$ -Tests war es, den zu bewertenden Parameter auf einen Wert festzulegen, der in aufeinanderfolgenden Regressionsrunden immer weiter von seinem Optimalwert entfernt wurde. Die daraus resultierende Verschlechterung des Regressionsergebnisses zeigte sich in der stetigen Erhöhung der  $\chi^2$ -Werte. Dieses Vorgehen wurde bis sich zu einer Verschlechterung des  $\chi^2$ -Wertes um 10 % wiederholt. Da das Levenberg-Marquardt-Prinzip auf der Reduktion der Abweichungsquadrate beruht, war es für die methodenübergreifende Regression von spektroskopischen Daten notwendig, alle Messwerte auf einen einheitlichen Amplitudenbereich zu normieren. Diese Normierung erfolgte gemäß

$$Y_N = \frac{Y_i}{\sigma} \quad (28)$$

wobei  $Y_N$  die normierten Messwerte und  $\sigma_i$  die Standardabweichung des zu normierenden Datensatzes darstellt.

### 2.2.4.8. Bestimmung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius, gewichtete Regressionen

Die empirische Arrhenius-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit einer Reaktion und der Temperatur. Sie hat die Form

$$\ln k(T) = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad (29)$$

Dabei beschreibt  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion,  $A$  den Frequenzfaktor und  $E_A$  die Aktivierungsenergie. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden nach Gleichung (29) linearisiert und gewichtet angepasst. Als Gewichtungskriterium dienten die relativen Varianzen ( $Var$ ) der Geschwindigkeitskonstanten. Sie berechneten sich gemäß

$$Var = \left(\frac{\sigma}{k}\right)^2 \quad (30)$$

Dabei bezeichnet  $\sigma$  die Standardabweichungen von  $k$ .



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Klonierung und Expression

#### 3.1.1. Klonierung des Pel-15 Gens in den Expressionsvektor pET22b(+)

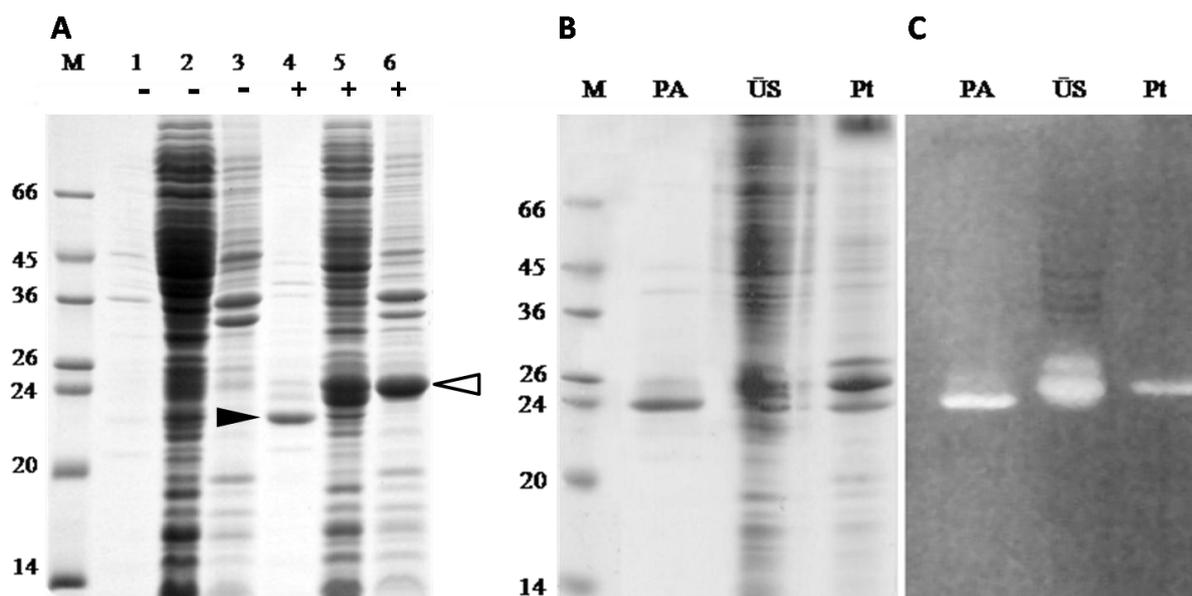
Das pel-15-Gen wurde freundlicherweise von Dr. Thoru Kobayashi (Kao Corporation, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung des Gens in den Expressionsvektor pET22b(+) wurde im Vorfeld dieser Arbeit von Dr. Monika Walter durchgeführt. Die Ergebnisse der Klonierung wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung bestätigt und werden hier nicht detailliert diskutiert.

##### 3.1.1.1. Expressions- und Aktivitätstests

*E. coli* BL21 DE3 Zellen wurden unmittelbar vor Verwendung durch Hitzeschock mit dem Konstrukt pET22b(+)-Pel-15 transformiert. Die Expression der Pel-15 Konstrukte erfolgte unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 30 °C.

##### Induzierbarkeit der Expression und enzymatische Aktivität von Pel-15

Nach einer Dauer von 10 Stunden war in nicht-induzierten Zellkulturen (-IPTG) keine unspezifische Expression von Pel-15 nachweisbar (Abb. 3-1A). Die Induktion mit IPTG (+IPTG) führte zur

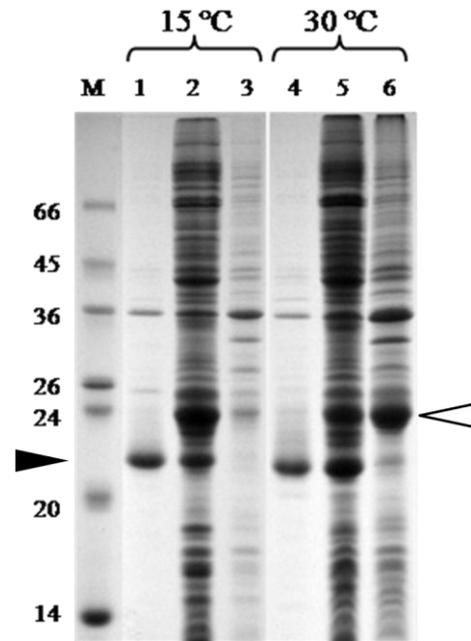


**Abb. 3-1: Expression und Überprüfung der enzymatischen Aktivität von Pel-15 WT**

(A) (15 % SDS - Trenngele, Coomassie-Färbung, Auftrag pro Tasche: 15 µl 1:2 verd. Zellextrakt aus Expressionstest in Gegenwart (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 mM IPTG). *Aufgetragene Fraktionen:* (1) Periplasma-Aufschluss (PA), (2) lösliche zytosolische Fraktion, (3) unlösliche zytosolische Fraktion; (4) PA, (5) lösliche Fraktion, (6) unlösliche Fraktion. *Pfeile:* (weiß) unprozessiertes Pel-15 WT Protein in der unlöslichen Fraktion, (schwarz) prozessiertes Pel-15 WT Protein im PA. (B) (Auftrag pro Tasche: 10 µl 1:10 verd. Zellextrakt aus Periplasmaaufschluss (PA), lösliche Fraktion (ÜS) und unlöslicher Fraktion (Pt). (C) Nachweis des PGA-Abbaus im Gel (Zymogramm). Der graue Hintergrund zeigt den Bereich, in dem die im Gel enthaltene 0.1 % (w/v) PGA durch den kationischen Farbstoff Ruthenium-Rot irreversibel gebunden wurde. Hellere Banden zeigen den enzymatischen Abbau von PGA nach 30 min Inkubation in Aktivitätspuffer (50 mM Glycin, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 10.5) bei 30 °C. (B) und (C) stammen aus Parallelexperimenten.

Entstehung einer 21 kDa Bande im periplasmatischen Aufschluss. Die nach dem Periplasmaaufschluss verbliebenen Zellen wurden durch Hochdruck-Zellyse aufgebrochen. Lösliche und unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt. In der unlöslichen Zellfraktion ist eine starke Bande bei etwa 23 kDa erkennbar. Zur Identifikation der Expressionsprodukte wurden Zymogramme angefertigt, mittels derer der PGA-Abbau im Gel nachgewiesen wurde. (Abb. 3-1B). Dafür wurden zwei gleichartige SDS-Gele hergestellt, deren Trenngele zusätzlich 0.1 % PGA enthielten. Nach Durchführung der SDS-Gelelektrophorese unter schonenden Bedingungen (kontinuierliche Trennung bei 80 V und 4 °C) und anschließender Entfernung des SDS aus dem Gel wurden die Gele für 30 min in Aktivitätspuffer (50 mM Glycin, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 10.5) inkubiert. Im Anschluss wurde der PGA-Gehalt in einem der Gele durch eine Ruthenium-Rot-Färbung qualitativ nachgewiesen. Das Referenzgel wurde einer Coomassiefärbung unterzogen. Der Vergleich beider Gele zeigt, dass die Position der enzymatischen Aktivität im Zymogramm der Position der Expressionsprodukte entspricht. Dies gilt sowohl für die 21 kDa Bande als auch für die 23 kDa Bande. In der löslichen, zytosolischen Fraktion wurde für beide Molekularmassen eine enzymatische Aktivität beobachtet.

In Abb. 3-2 ist das Ergebnis eines Expressionstests abgebildet, in dem die Effizienz der periplasmatischen Expression bei den Temperaturen 15 °C und 30 °C untersucht wurde. Bei 15 °C wird das Expressionsprodukt zum großen Teil in der periplasmatischen und in der löslichen zytosolischen Fraktion akkumuliert, während die unlösliche zytosolische Fraktion nur sehr geringe Mengen des unprozessierten Proteins enthält. Die lösliche, zytosolische Zellfraktion enthält beide Formen des Expressionsproduktes, wobei der Anteil unprozessierten Proteins deutlich höher ist als der Anteil prozessierten Proteins. Bei einer Expressionstemperatur von 30 °C verbleibt ein Großteil des Zielproteins in unprozessierter Form in der unlöslichen Zellfraktion. Der Anteil an prozessiertem Protein im Periplasma-Aufschluss ist relativ zur Gesamtmenge bakteriellen Proteins reduziert. Die lösliche, zytosolische Zellfraktion enthält bei 30 °C etwa zu gleichen Teilen das prozessierte und das unprozessierte Produkt.

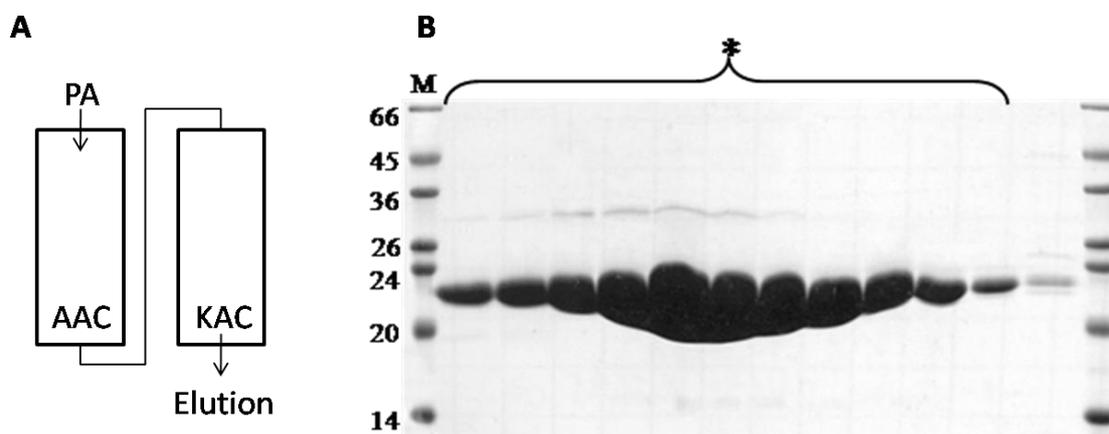


**Abb. 3-2: Temperaturabhängigkeit der periplasmatischen Expression** (15 % SDS-Gele, Coomassiefärbung): Nach Expression bei 15 °C liegen im Periplasma-Aufschluss (1) und in der löslichen zytosolischen Fraktion (2) vergleichbare Mengen des prozessierten Expressionsproduktes vor. Die unlösliche zytosolische Fraktion (3) enthält nur sehr geringe Mengen unprozessierten Proteins. Nach Expression bei 30 °C ist der Anteil prozessierter Pel-15 im Periplasma (4) relativ zum prozessierten Anteil in der löslichen, zytosolischen Fraktion (5) reduziert. Ein großer Teil des synthetisierten Proteins liegt in unprozessierter Form in der unlöslichen Zellfraktion vor.

Die rekombinante, periplasmatische Expression von Pel-15 stellte sich als geeignete Methode heraus, um das Protein zuverlässig in hohen Ausbeuten zu gewinnen. Die offensichtliche Temperaturabhängigkeit der Expression geht auf die Tatsache zurück, dass Pel-15 in der Lage ist, unter reduzierenden Bedingungen im bakteriellen Zytoplasma zu falten, sodass der Export ins Periplasma in kinetischer Konkurrenz zur Faltung der Polypeptidketten steht. Dieser Effekt wird in Abschnitt 4.1 (S. 112) näher diskutiert. Expressionen im größeren Maßstab (5 bis 10 Liter LB-Kulturmedium) wurden aerob für ca. 10 h bei 25 °C durchgeführt.

### 3.1.2. Chromatographische Reinigung von Pel-15

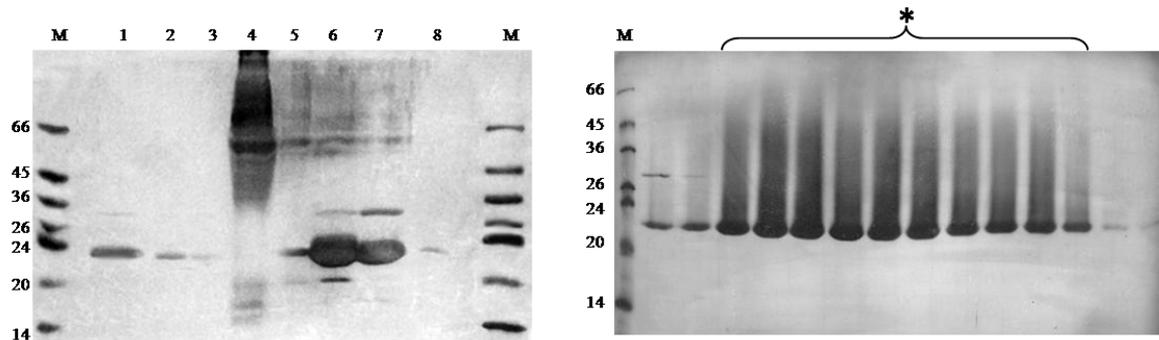
Insgesamt wurden aus dem Periplasma von 5 L Bakterienkultur etwa 310 mg Pel-15 WT gewonnen. Die Expressionsausbeuten der Pel-15 Mutanten DCCA, DVAC, DVAA und AVAA (vgl. Pel-15-Nomenklatur: Abschnitt 2.2.1.4, S. 29) lagen in einem ähnlichen Bereich mit 210 und 270 mg aus 5 L



**Abb. 3-3:** (A) Prinzip der Tandem-IEC (Gekoppelte Anionen (AAC)-/Kationenaustauschchromatographie (KAC)). Der Periplasmaaufschluss wird auf eine mit 50 mM Tris/HCl äquilibrierte Tandemsäule aufgetragen. Nach vollständigem Auftrag wird die KAC-Säule separat mit einem aufsteigenden NaCl-Gradienten isokratisch eluiert. (B) Eluatfraktionen aus KAC-Elution am Beispiel Pel-15 ACCC (15 % SDS-Gele, Coomassiefärbung). Bis auf ein koelulierendes bakterielles Protein einer ungefähren Molekularmasse von 30 kDa und einige niedermolekulare Verunreinigungen lag Pel-15 nach dem ersten Reinigungsschritt bereits in sehr reiner Form vor. (\*) Zur Weiterverwendung vereinigte Eluat-Fractionen.

Kulturmedium. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Pel-15 Reinigung exemplarisch am Beispiel der Ladungsmutante Pel-15 ACCC vorgestellt.

Der Kern der Pel-15 Reinigung bestand in einer gekoppelten Anionen-/Kationenaustauschchromatographie, wie sie in Abb. 3-3A abgebildet ist. Hierfür wurde der Periplasma-Aufschluss nach einer Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 (4 °C) auf ein Säulentandem aus einer Q- und einer SP-Sepharosesäule aufgetragen. Bei pH 8.0 bindet der Großteil der bakteriellen Proteine an die AAC-Säule. Pel-15 ist ein basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 10.5 und bindet daher zusammen mit sehr wenigen weiteren bakteriellen Proteinen an die KAC-Säule. Durch die separate Elution der KAC-Säule mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten wurde Pel-15 auf diese Weise bereits in sehr reiner Form gewonnen (Abb. 3-3B).



**Abb. 3-4: (A) Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von Pel-15WT** (15 % SDS-Gele, Coomassiefärbung) Nach Zugabe von 30 % (2), 40 % (3), 50 % (4), 60 % (5), 70 % (6), 80 % (7) und 90 % (8) Ammoniumsulfat wurden die jeweils entstandenen Protein-Pellets 25 MOPS, pH 7.0 gelöst und 1:1 mit DTT-haltigem SDS-Auftragspuffer versetzt. Zum Größenvergleich ist in Spur 1 eine 1:10 Verdünnung der vereinigten KAC-Eluatfraktionen aufgetragen. Vor dem Auftrag wurden die Proben für 3 min auf  $> 95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. **(B) Pel-15 ACCC Eluat-Fraktionen nach HIC** (15 % SDS Gele, Silberfärbung). Durch Vereinigung der Fraktionen 39 bis 69 (\*) wurden 110 ml einer 1.2 mg/ml Pel-15ACCC Lösung erhalten. Die „Schleifspuren“ oberhalb der Pel-15 Banden sind auf die hohe AS Konzentration zurückzuführen.

Der wesentliche Vorteil dieser gekoppelten Methode liegt in der Möglichkeit, zwei Chromatographie-schritte zusammenzufassen und auf diese Weise einen Dialyseschritt einzusparen. Die Pel-15 haltigen KAC-Eluatfraktionen wurden vereinigt und mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) separiert.

Zuvor wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung für Pel-15 durchgeführt, um die kritische Ammoniumsulfat-Konzentration zu bestimmen, bei der Pel-15 aus der wässrigen Lösung reversibel präzipitiert (Abb. 3-4). Das Ergebnis zeigte, dass dies bei einer Löslichkeitskonzentration von ca. 60 % Ammoniumsulfat der Fall ist. Bakterielle Proteine, die bei ähnlichen AS-Konzentrationen aus der Lösung ausfallen, wurden in der HIC durch die Anwendung eines breiten Elutionsgradienten (500 ml) in Verbindung mit einer langsamen Flussrate (0.5 ml/min) vom Großteil der eluierenden Pel-15 Moleküle separiert. Die Analyse der Reinheit mittels SDS-PAGE und Silberfärbung bestätigte nach Anwendung der HIC eine Pel-15 Reinheit von 99 %.

## 3.2. Spektroskopische Charakterisierung

Nach ihrer Herstellung wurden die gereinigten Pel-15 Varianten zunächst spektroskopisch charakterisiert, um das Auftreten von Aggregationseffekten auszuschließen und um den Faltungszustand sowie den Signalunterschied zwischen gefalteter (= nativer) und entfalteter (= denaturierter) Pel-15 zu analysieren. Das Methodenspektrum der spektroskopischen Charakterisierung umfasste Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie sowie Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD) im Bereich der Aromaten und der Peptidabsorption.

### 3.2.1. Spektroskopische Eigenschaften des Pel-15 Wildtypproteins

#### 3.2.1.1. Absorptionsspektroskopie (Abb. 3-5A)

Pel-15 besitzt ein charakteristisches UV-Absorptionsspektrum mit einem doppelschultrigen Maximum im Bereich zwischen 277 nm und 282 nm sowie einer stark ausgeprägten Absorptionsschulter bei

290 nm. Durch die Denaturierung verschwindet diese vollständig, während die Absorption oberhalb von 290 nm leicht erhöht ist. Die Doppelschulter im Bereich von 277 nm und 282 nm ist auch unter denaturierenden Bedingungen zu beobachten. Die Intensität ist in diesem Bereich erniedrigt. Die Inkubation bei RT führte nach frühestens 72 h im Bereich zwischen 320 nm und 350 nm zu einer leichten Signalzunahme, die einen Anstieg in der Basislinie verursachte (Daten nicht gezeigt). Die Filtration der Proteinlösung durch eine Membran aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlussgröße von 0.2  $\mu\text{m}$  oder die Zentrifugation der Probe bei 40.000 rpm für 20 min machte diesen Effekt rückgängig.

### 3.2.1.2. Fluoreszenzspektroskopie (Abb. 3-5B).

Wird die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei einer Wellenlänge von 280 nm angeregt, weist das Fluoreszenzspektrum nativer Pel-15 WT ein einzelnes Emissionsmaximum bei 310 nm auf. Die Integration der Spektren, d.h. die Berechnung der durch das Spektrum eingeschlossenen Fläche, ergab im Wellenlängenbereich zwischen 290 nm und 450 nm für die native Fluoreszenz 43 % des Signals der vollständig entfalteten Kette. Bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm ergab sich die Fläche unter dem nativen Fluoreszenzspektrum mit lediglich 14 % der Fluoreszenz denaturierter Pel-15.

**Tabelle 3-1: Vergleich der integrierten Fluoreszenzsignale von Pel-15 DCCC und Pel-15 DVAA in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge**

Konstrukt	Integrierte Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{em}} = 280 \text{ nm}$ ) / cps <sup>2</sup>		Integrierte Fluoreszenzintensität ( $\lambda_{\text{em}} = 295 \text{ nm}$ ) / cps <sup>2</sup>	
	Nativ	Denaturiert	Nativ	Denaturiert
Pel-15 WT (DCCC)	12.1 x 10 <sup>7</sup> (43 %)	28.2 x 10 <sup>7</sup> (=100 %)	1.37 x 10 <sup>6</sup> (14 %)	9.79 x 10 <sup>6</sup> (=100 %)
Pel-15 DVAA	14.9 x 10 <sup>7</sup> (52 %)	28.6 x 10 <sup>7</sup> (=100 %)	2.21 x 10 <sup>6</sup> (22 %)	9.89 x 10 <sup>6</sup> (=100 %)

**Anmerkung:** Die Integration der Fluoreszenzsignale erfolgte jeweils in den Grenzen des aufgenommenen Spektralbereiches, also zwischen 290 nm und 450 nm bei Anregung mit 280 nm und zwischen 305 und 450 nm bei Anregung mit 295 nm. Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die Fluoreszenz der vollständig entfalteten Polypeptidkette.

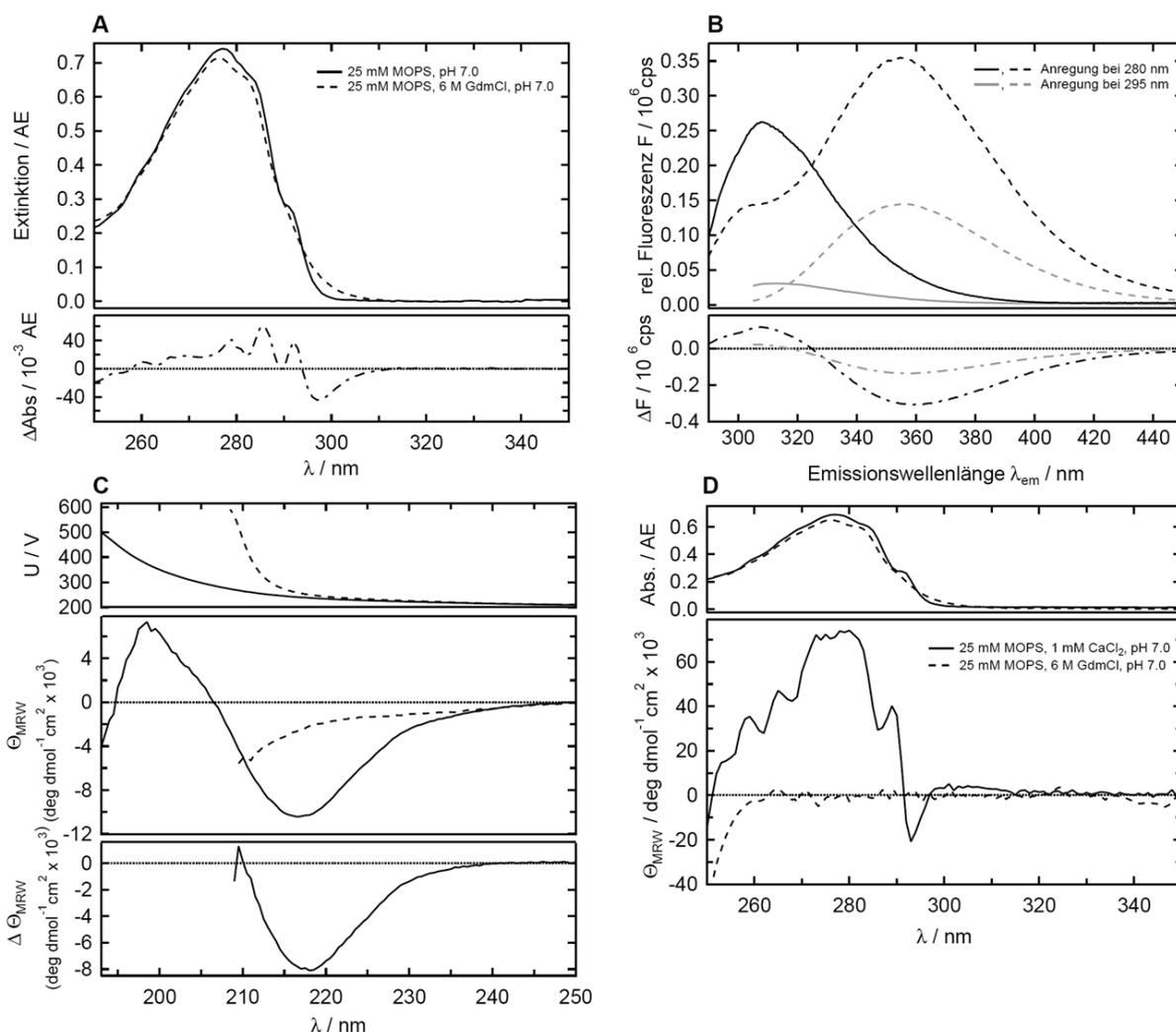
Im Zuge der Denaturierung von Pel-15 in GdmHCl oder in Harnstoff verschiebt sich das Maximum der Tryptophanfluoreszenz auf 355 nm. Gleichzeitig wird im Emissionsspektrum denaturierter Pel-15 eine Fluoreszenzschulter bei 308 nm erkennbar. Ein Isofluoreszenzpunkt zwischen N und U wird im Fall von Pel-15WT bei einer Emissionswellenlänge von 325 nm beobachtet. Die selektive Anregung der W78 Fluoreszenz mit der Wellenlänge 295 nm verschiebt diesen Punkt auf 317 nm.

### 3.2.1.3. Zirkulardichroismus-Spektroskopie (Abb. 3-5C,D).

Aufgrund der sekundärstrukturspezifischen Orientierung der Peptidbindungen liefert das im Bereich zwischen 250 und 180 nm detektierte CD-Signal Informationen über den Sekundärstrukturgehalt von Proteinen. Dagegen wird der Zirkulardichroismus im nahen UV (260-320 nm) durch die chirale Umgebung der aromatischen Seitenketten und der Disulfide induziert.

Der Verlauf des Fern-UV CD-Spektrums nativer Pel-15 ist durch ein Elliptizitätsminimum bei 217 nm ( $\theta_{MRW} = -10.400 \text{ deg dmol}^{-1} \text{ cm}^2$ ) und ein Maximum bei ca. 198 nm ( $\theta_{MRW} = 7.300 \text{ deg dmol}^{-1} \text{ cm}^2$ ) gekennzeichnet. Das Maximum der Elliptizitätsdifferenz der Form (N-U) liegt bei 217 nm. Das erhaltene fern-UV CD-Signal hat alle Charakteristika des CD-Spektrums, für das Kobayashi *et al.* (1999) einen Helixanteil von maximal 6.6 % bestimmt haben.

Unter nativen Bedingungen besitzt das Nah-UV CD-Spektrum von Pel-15 einen charakteristischen Verlauf mit einem ausgeprägten Elliptizitätsminimum bei 293 nm und mehreren Maxima im Bereich



**Abb. 3-5: Spektroskopische Charakterisierung von Pel-15 WT** und Vergleich zwischen nativer (N, *durchgezogene Linien*) und denaturierter (U, *unterbrochene Linien*) Form des Proteins in 25 mM MOPS, pH 7.0, 20 °C. Differenzspektren der Form N – U sind als *Strich-Punkt-Linien* dargestellt. **(A)** UV-Absorptionsspektren ([Pel-15WT] = 1 mg/ml) Die Messungen erfolgten in 1 cm Quartzküvetten bei RT. Pfeile kennzeichnen isosbestische Punkte bei 258 nm und 291 nm. **(B)** Fluoreszenzspektren ([Pel-15WT] = 10 µg/ml), Anregungswellenlängen: 280 nm (schwarz) und 295 nm (grau). Die Messungen erfolgten in Quartz-Halbmikroküvetten (Anregung: 4 mm, Emission: 10 mm). Pfeile kennzeichnen Isofluoreszenzpunkte zwischen N und U bei 325 nm für die Anregung bei 280 nm bzw. bei 317 nm für die Anregung bei 295 nm. **(C)** Fern-UV CD-Spektren ([Pel-15WT] = 50 µg/ml). Die Messungen erfolgten in 1 mm Quartz-Küvetten bei 20 °C. Die maximale Signaldifferenz zwischen N und U liegt bei 218 nm. **(D)** Nah-UV CD-Spektren: Die Messungen erfolgten in Halbmikro-Fluoreszenzküvetten unter Verwendung einer Pfadlänge von 0.4 cm für die native Probe und 1.0 cm für die denaturierte Probe. Die Proteinkonzentration der nativen Pel-15 Lösung betrug 1.4 mg/ml und die der denaturierten Probe 0.3 mg/ml. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Hochspannungsverläufe beider Messungen in Absorptionseinheiten umgerechnet und auf die Absorption einer 1 mg/ml Pel-15 Lösung mit 1.0 cm Schichtdicke normiert. Die Umrechnung der Detektor-Hochspannung in Absorptionseinheiten erfolgte mittels DATAMAX® 2.0 (Jasco). Alle spektroskopischen Signale wurden um ihre jeweiligen Referenzen korrigiert.

zwischen 255 nm und 285 nm (Abb. 3-5D). Das nah-UV CD-Signal im Bereich zwischen 293 nm und 295 nm liefert selektive Informationen über die Asymmetrie der chemischen Umgebung des einzigen Tryptophanrests W78. Die molare Elliptizität nativer Pel-15 WT Lösungen beträgt in diesem Bereich etwa  $\theta_{MRW} = -20 \text{ deg dmol}^{-1} \text{ cm}^2$ . Unterhalb von 260 nm ist im nah-UV CD-Spektrum nativer Pel-15 ein schroffer Elliptizitätsabfall zu beobachten.

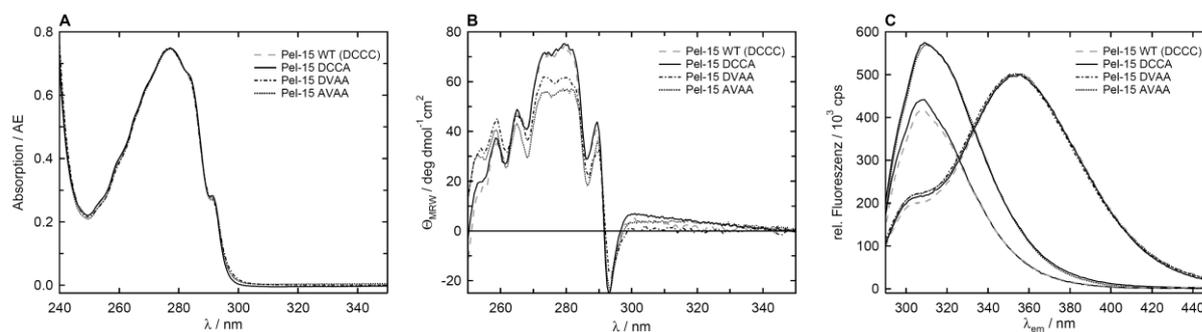
### 3.2.2. Spektroskopische Eigenschaften von Pel-15 DCCA, DVAA und AVAA

#### 3.2.2.1. Absorptionsspektroskopie (Abb. 3-6A)

Die Absorptionsspektren nativer und denaturierter Varianten von Pel-15 WT waren nicht von denen des WT Proteins zu unterscheiden. Das Intensitätsverhältnis zwischen den Absorptionsschultern bei 290 nm und bei 282 nm bzw. bei 280 nm und 260 nm war in allen beobachteten Fällen gleich. Systematische Anstiege in der Absorptionskennlinie (*drifts*) zwischen 320 nm und 350 nm ließen sich nach einer Inkubationszeit von  $> 72 \text{ h}$  bei Raumtemperatur erkennen und mittels Filtration durch eine Zellulosemembran mit einer Ausschlussgröße von  $0.2 \mu\text{m}$  oder durch Ultrazentrifugation bei 40.000 rpm für 20 min wieder entfernen (Daten nicht gezeigt). Auch bei sehr hohen Proteinkonzentrationen bis  $75 \text{ mg/ml}$  wurden unter nativen Bedingungen keine Anzeichen spontaner Aggregation beobachtet. Der Einfluss höherer Proteinkonzentrationen auf die Aggregation von Pel-15 wurde nicht getestet.

#### 3.2.2.2. CD-Spektroskopie (Abb. 3-6B)

An den nah-UV CD-Spektren lassen sich hinsichtlich der Elliptizitätsamplitude deutliche Unterschiede zwischen Pel-15 WT und den einzelnen Mutanten erkennen. Diese sind im Wellenlängenbereich zwischen 255 nm und 291 nm besonders prominent und treten ausschließlich bei den cysteinfreien Varianten DVAA und AVAA auf. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Unterschiede nicht auf eine veränderte Tertiärstruktur hinweisen, sondern durch den fehlenden spektroskopischen Beitrag der Disulfidbrücke verursacht werden. Die nah-UV CD-Spektren von Pel-15 WT und Pel-15



**Abb. 3-6: Spektroskopische Charakterisierung der Pel-15 Varianten DCCA, DVAA und AVAA**

(A) UV-Absorptionsspektren von  $1 \text{ mg/ml}$  Proteinlösungen in  $25 \text{ mM}$  MOPS,  $\text{pH } 7.0$ . Die Spektren wurden auf eine einheitliche Absorption von  $A_{280} = 0.704$  normiert. (B) Nah-UV CD - Spektren von  $0.3 \text{ mg/ml}$  Protein in  $25 \text{ mM}$  MOPS,  $\text{pH } 7$ . Unterschiede in den gemessenen Elliptizitätsamplituden werden im Text beschrieben. (C) Fluoreszenzspektren von  $10 \mu\text{g/ml}$  Protein in  $25 \text{ mM}$  MOPS,  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{pH } 7.0$ ; Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von  $280 \text{ nm}$  und bei einer Temperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

DCCA sind im Bereich der Aromatenabsorption nicht voneinander zu unterscheiden, was angesichts der in DCCA eingefügten, spektroskopisch unauffälligen Mutation auch erwartet wurde. Auch die Formen der nah-UV CD-Spektren von DVAA und AVAA sind sehr ähnlich. Die in Pel-15 AVAA zusätzlich enthaltene Mutation D80A wirkt sich demgemäß unter nativen Bedingungen nicht auf die Chiralität der Umgebung der aromatischen Seitenketten aus.

### 3.2.2.3. Fluoreszenzspektroskopie (Abb. 3-6C)

Die Maxima der nativen Tryptophanfluoreszenzen aller betrachteten Pel-15 Varianten lagen wie im Fall des WT-Proteins bei 310 nm. Die Pel-15 Variante DCCA wies eine WT-artige native Fluoreszenz auf, und es wurde wie im Fall des WT-Proteins ein iso fluoreszenter Punkt zwischen N und U bei 325 nm identifiziert. Unter denaturierenden Bedingungen (25 mM MOPS, > 3 M GdmHCl, pH 7.0) waren die Spektren von Pel-15 DVAA/AVAA identisch mit dem Fluoreszenzspektrum denaturierter Pel-15 WT. Daraus ist zunächst zu entnehmen, dass die Disulfidbrücke in Pel-15 WT bzw. DCCA unter denaturierenden Bedingungen keinen Einfluss auf die Lösungsumgebung von W78 hat (Stabilisierung hydrophober Cluster o.ä.).

Die Fluoreszenz von Pel-15 DVAA und AVAA war unter nativen Bedingungen (25 mM MOPS, pH 7.0) im Vergleich zum WT-Protein deutlich erhöht. Aus diesem Umstand lässt sich erkennen, dass der große Anteil des Fluoreszenzverlustes im Fall des WT-Proteins auf eine fluoreszenzlöschende Wirkung der lokalen Disulfidbrücke zurückgeht. Für DVAA/AVAA ergab sich bei 330 nm ein Isofluoreszenzpunkt zwischen N und U von 330 nm.

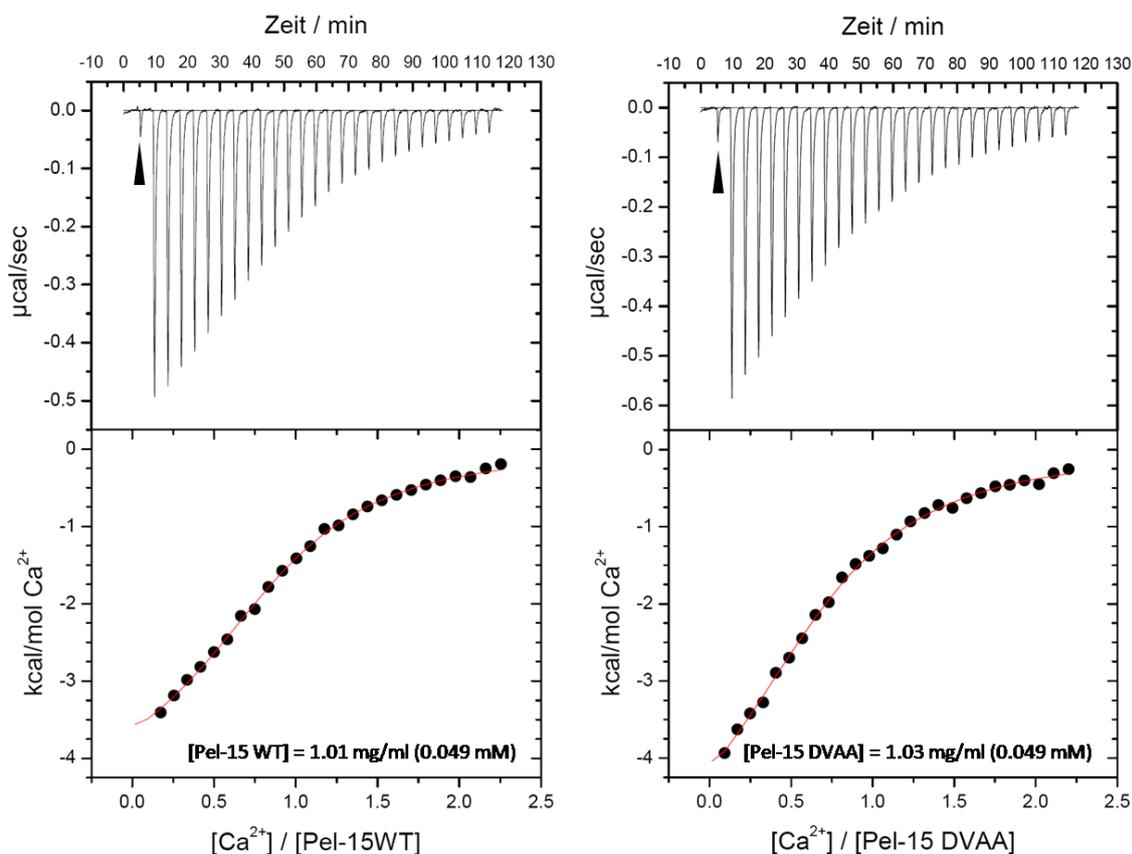
## 3.3. Pel-15 im thermodynamischen Gleichgewicht

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse vorgestellt, die unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt wurden. Hierzu zählen neben denaturierungsmittelabhängigen Faltungs- und Entfaltungsübergängen die Untersuchung der Ca<sup>2+</sup>-Bindung, Experimente zur Induzierbarkeit des Gleichgewichtsintermediates und die Ergebnisse der Kristallisation der Pel-15 Variante AVAA. Überdies werden am Ende dieses Kapitels die Experimente zur Enzymaktivität von Pel-15 besprochen.

Für das Verständnis der Gleichgewichtsentfaltung ist die Eigenschaft von Pel-15 relevant, Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu binden. Im Zuge der Lösung der Kristallstruktur durch Akita *et al.* im Jahr 2001 wurden auf der Oberfläche von Pel-15 zwei Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen identifiziert. Dabei wurde vermutet, dass dem durch die Reste G34, D80, V81, K103 gebundenen Ca<sup>2+</sup>-Ion eine zentrale Strukturbildungsfunktion zukommt, während das Ca<sup>2+</sup>-Ion, das durch die Seitenketten der Reste D63, E83 und D84 gebunden wird, eine wesentliche Funktion für die enzymatische Aktivität von Pel-15 besitzt (Akita *et al.* 2001).

### 3.3.1. Isothermale Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der hochaffinen $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung

Die Dissoziationskonstanten für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Pel-15 WT, DCCA, ACCC, DVAC, DVAA und AVAA wurden mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt. Dabei wurde die Existenz einer hochaffinen Bindestelle bestätigt, die bereits von Monika Walter bestimmt worden war (Walter, unveröffentlichte Ergebnisse). Exemplarisch sind die Bindungsisothermen für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von Pel-15WT und Pel-15 DVAA in Abb 3-7 dargestellt. Die Ergebnisse der ITC Experimente lassen sich gruppieren. Sie zeigen, dass die Mutation D80A (enthalten in den Varianten ACCC und AVAA) zu einem vollständigen Verlust der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung führt. Die gemessenen Enthalpiedifferenzen waren im Fall der betroffenen Mutanten nicht von den Verdünnungswärmen zu unterscheiden, die bei Leertitrations ( $\text{Ca}^{2+}$  in Pufferlösung) beobachtet worden waren. Die Pel-15 Variante DCCA entsprach in ihrem  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungseigenschaften dem WT Protein. Für beide Proteine ergaben sich nach wiederholten Messungen Dissoziationskonstanten von  $11.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$  (WT) bzw.  $11.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$  (DCCA). Der Austausch der Disulfidbrücke C67-C71 gegen das hydrophobe Paar V67/A71 im Fall von Pel-15 DVAC führte zu keiner messbaren Verschlechte-



**Abb 3-7: Isothermale Titrationskalorimetrie zur Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$**  für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die titrationskalorimetrische Bestimmung der Bindungsisothermen erfolgte in 25 mM MOPS, pH 7.0 bei 20 °C. Vor ihrer Verwendung in der ITC waren die Proteinproben über 5ml-HiTrap Säulen entsalzt und von EDTA-Rückständen befreit worden. In den Bindungsisothermen des Wildtyps und der 3-fach Mutante DVAA sind keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Die Ergebnisse der Anpassung an das „OneSite“ Modell des MicroCal Regressionspaketes ist jeweils durch die rote Linie dargestellt. Die mit Pfeilen markierten Peaks wurden in der Auswertung vernachlässigt.

rung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung. Einzig für die Dreifachmutante Pel-15 DVAA ergab sich im Vergleich zum WT Protein eine um den Faktor 1.3 reduzierte Bindungsaffinität ( $14.6 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ).

Die Quantifizierung der residualen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration mittels ICP war geeignet, den experimentellen Fehler der Titrationsexperimente auf 8.6 % abzuschätzen. Im Rahmen dieses Fehlers sind die Bindungsaffinitäten von Pel-15WT und Pel-15 DVAA gleich.

**Tabelle 3-2: Ergebnisse der Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung mittels ITC**

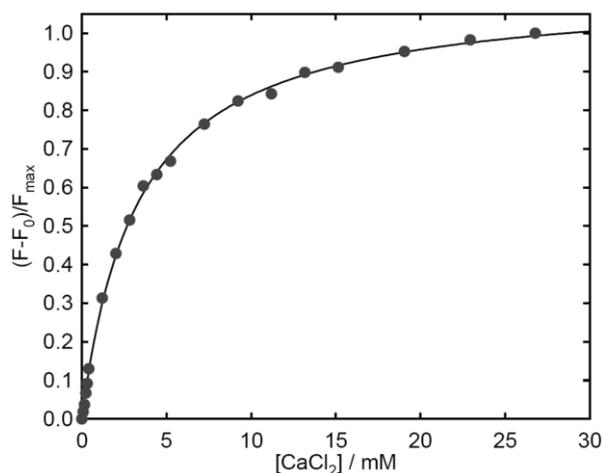
Konstrukt	N	$K_d / \mu\text{M}$	$\Delta H / \text{kJ/mol}$	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{final}} / \mu\text{M}$
DCCC	$0.78 \pm 0.02$	$11.3 \pm 0.9$	$-1.01 \pm 0.03$	$88.7 \pm 2.5$
DCCA	$1.02 \pm 0.02$	$11.1 \pm 0.8$	$-0.95 \pm 0.02$	$73.2 \pm 0.2$
DVAA	$0.71 \pm 0.01$	$14.6 \pm 0.8$	$-1.38 \pm 0.04$	$97.8 \pm 18.6$
DVAC*	$0.56 \pm 0.01$	$9.45 \pm 0.4$	$-3.24 \pm 0.10$	76.6
AVAA, ACCC	n.a.			

**Anmerkung:** Genutztes Modell: „OneSite“, frei bewegliche Parameter. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Für die Pel-15 Varianten AVAA / ACCC war keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung nachweisbar. (\*) Dieses Experiment wurde nur in Einfachbestimmung durchgeführt.

### 3.3.2. Fluoreszenztitration zur Bestimmung der niedrigaffinen $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung

Mit dem Ziel, eine mögliche Beteiligung der Disulfidbrücke C67-C71 an der niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung im Bereich des katalytischen Zentrums zu untersuchen, wurde die W78-Fluoreszenz von Pel-15 in Abhängigkeit von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration analysiert. Die Titrationen wurden mit zwei verschiedenen  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen ( $c = 0.1 \text{ M}$  und  $c = 1.0 \text{ M}$ ) durchgeführt, sodass im Bereich zwischen 0 mM und 5 mM  $\text{CaCl}_2$  mehr Punkte gemessen werden konnten. Bei sukzessiver Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  stieg die Fluoreszenzintensität bei allen Pel-15 Varianten an und erreichte bei etwa 30 mM  $\text{CaCl}_2$  einen Sättigungswert.

In Abb. 3-8 ist das Ergebnis eines charakteristischen Titrationsexperimentes für Pel-15 WT dargestellt. Die Dissoziationskonstanten für die Pel-15 Konstrukte DCCA und AVAA sind in der darunter befindlichen Tabelle angegeben.



**Abb. 3-8: Bindungsisotherme** der niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung von Pel-15 WT. ( $c = 10.6 \mu\text{g/ml}$  ( $0.51 \mu\text{M}$ ); 25 mM MOPS, pH 7.0, 20 °C; Detektion bei 310 nm). Die durchgezogene Linie zeigt die Anpassung der Daten an ein einfaches, hyperboles Bindungsmodell (Gleichung (22)).

**Tabelle 3-3: Dissoziationskonstanten für die niedrigaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung**

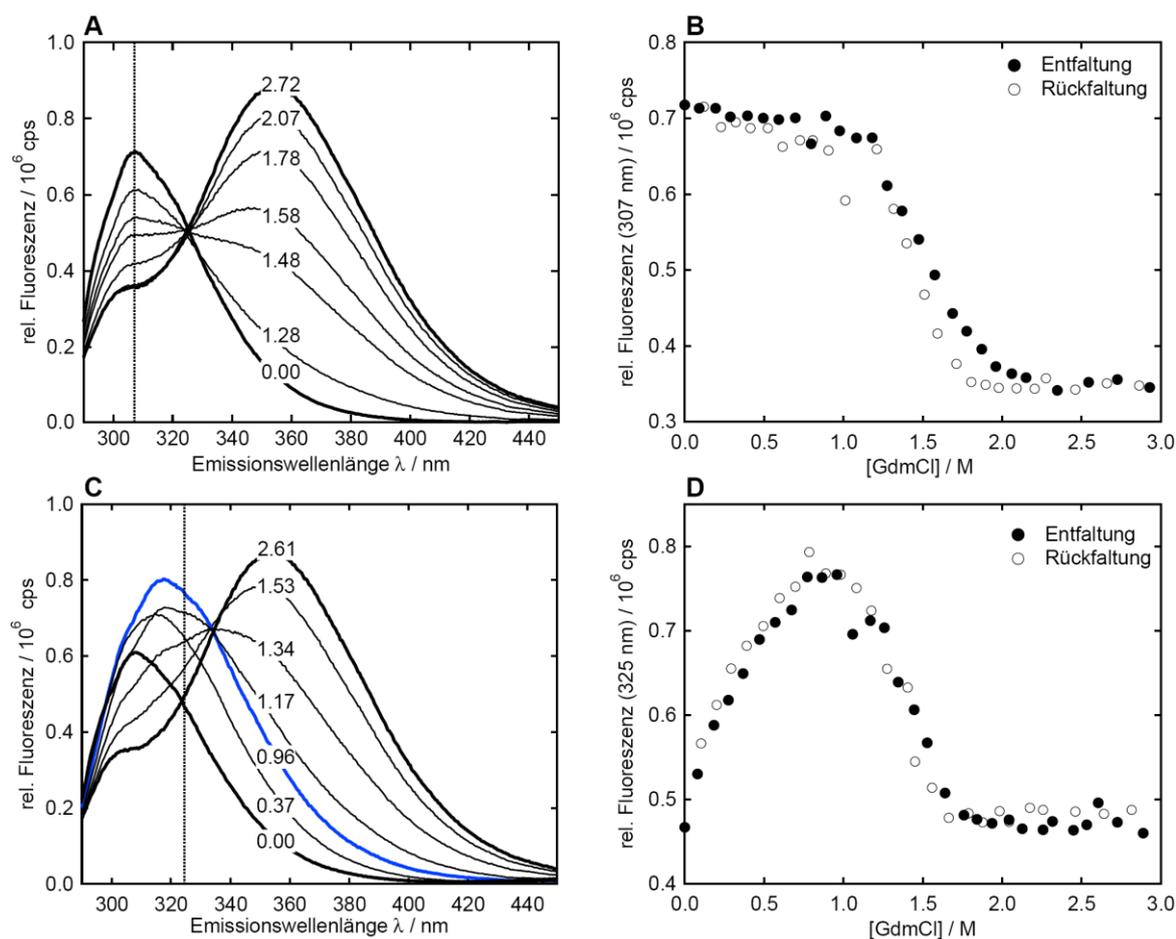
Konstrukt	$K_d / \text{mM}$
DCCC	$3.29 \pm 0.12$
DCCA	$4.50 \pm 0.17$
AVAA	$2.58 \pm 0.10$

**Anmerkung:** Ergebnisse aus Doppelbestimmungen, die Unsicherheit der Ergebnisse beträgt ca. 4 %.

### 3.3.3. *In-vitro* Faltung und thermodynamische Stabilität von Pel-15WT

#### 3.3.3.1. Fluoreszenz-Übergänge

GdmHCl-induzierte Gleichgewichtsfaltungs- und Entfaltungsübergänge wurden in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 1 mM EDTA gemessen. Der in Abb. 3-9A dargestellte Gleichgewichtsübergang wurde neun Tage inkubiert. In Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> ließen sich im Übergang keine populierten Intermediate erkennen, sodass dieser allein durch die GdmHCl-abhängige Verteilung der **nativen Spezies N** und der **denaturierten Spezies U** zu beschreiben war. Das Auftreten des iso fluoreszenten Punktes bei 325 nm scheint diesen Befund zu bestätigen. In Abb. 3-9B ist der Übergang für die Wellenlänge 307 nm dargestellt. Der Mittelpunkt des Renaturierungsübergangs lag nach einer Inkubationszeit von drei Tagen in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> konstant bei etwa  $D_{1/2} = 1.47$  M GdmHCl. Zwischen dem Renaturierungs- und dem Denaturierungsübergang ließ sich nach dieser Zeit noch eine



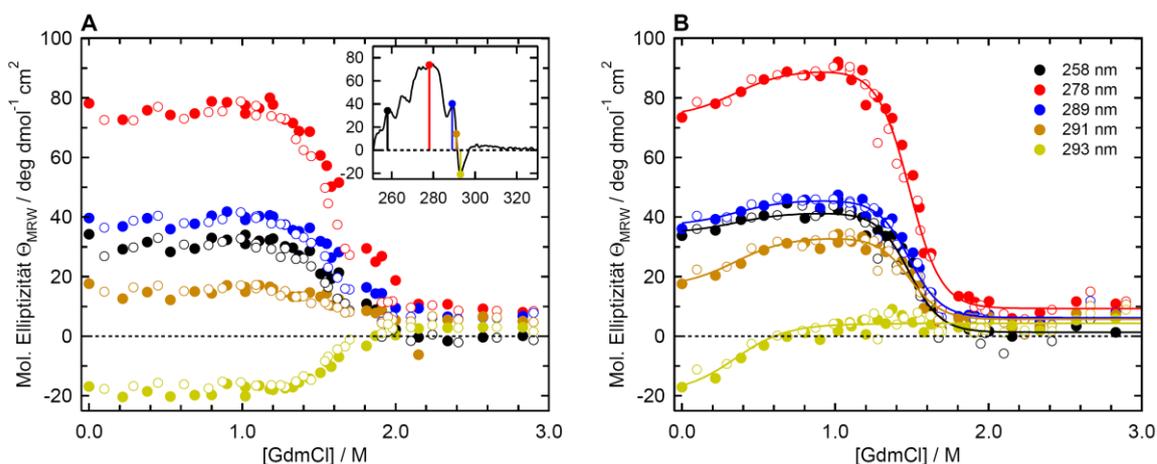
**Abb. 3-9:** Fluoreszenzspektren zur Bestimmung des Gleichgewichtsübergangs der Pel-15 Faltung und Entfaltung (13 µg/ml Pel-15 WT, Inkubationszeit: 9 Tage, Anregungswellenlänge: 280 nm) (A) Fluoreszenzspektren von Pel-15 WT in 25 mM MOPS, pH 7.0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Zahlen im Diagramm bezeichnen GdmHCl-Konzentrationen in Molar (B) Änderung der Fluoreszenz bei 307 nm in Abhängigkeit von [GdmCl]; gefüllte Symbole kennzeichnen den Denaturierungsübergang, offene Symbole kennzeichnen den Renaturierungsübergang (C) Fluoreszenzspektren von Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0. Zahlen im Diagramm bezeichnen GdmHCl-Konzentrationen in Molar. Im blau dargestellten Fluoreszenzspektrum (0.96 M GdmHCl) ist der Anteil des Intermediates maximal. (D) Änderung der Fluoreszenz bei 325 nm in Abhängigkeit von [GdmCl]; gefüllte Symbole kennzeichnen den Denaturierungsübergang, offene Symbole kennzeichnen den Renaturierungsübergang. Pel-15 WT besitzt bei 325 nm einen Iso-Fluoreszenzpunkt für die Faltungsspezies N und U. Die abgebildeten Daten entstammen der Zusammenarbeit mit Dr. Monika Walter.

deutliche Hysterese beobachten. Durch die wiederholte Messung des Übergangs nach neun Tagen zeigte sich, dass diese Hysterese das Ergebnis einer sehr langsamen Entfaltungsreaktion ist, die sich über die Zeit an das Renaturierungsgleichgewicht annähert (Monika Walter, unveröffentlichte Ergebnisse). Aufgrund dieser Hysterese wurde von einer quantitativen Analyse der Faltungs- und Entfaltungsübergänge abgesehen. Die Basislinie im Bereich des Vorübergangs ist in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  linear und folgt einem leicht abfallenden Trend. Wahrscheinlich spiegelt dies eine Reaktion der nativ gefalteten Pel-15 auf die Erhöhung der Ionenstärke wider (Kamen *et al.* 2000). Die Basislinie im Bereich des Nachübergangs ist ebenfalls linear, lässt aber im betrachteten Konzentrationsbereich keinen Trend erkennen.

In Gegenwart von EDTA ließ sich keine Hysterese zwischen Faltung und Entfaltung feststellen. Dafür zeigten die Übergangsspektren sehr deutlich die Population eines zusätzlichen, metastabilen **Gleichgewichtsintermediates** an (Abb. 3-9C). Dieses wurde zwischen 0.8 und 1.1 M GdmHCl maximal populiert und aufgrund seiner **hyper-fluoreszenten Eigenschaften** als **HF-Zustand (HF)** bezeichnet. Bei 307 nm ließen sich die Teilgleichgewichte  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}$  und  $\text{HF} \rightleftharpoons \text{U}$  optimal analysieren (Abb. 3-9D). Da der Anteil von HF auch bei sehr geringen GdmHCl-Konzentrationen stetig zunahm, ließ sich für das „vordere“ Teilgleichgewicht  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}$  keine eindeutige Vorübergangsbasislinie identifizieren. Der Übergangsmittelpunkt dieses Teilgleichgewichtes ergab sich ungefähr bei 0.5 M GdmHCl. Für den „hinteren“ Übergang  $\text{HF} \rightleftharpoons \text{U}$  ergab sich ein Übergangsmittelpunkt von ca. 1.35 M GdmHCl. Der Wert für die Kooperativität dieses Teilgleichgewichtes entsprach in etwa dem, der für die Kooperativität des Rückfaltungsüberganges in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  gemessen worden war. Die Steigung im Bereich der Nachübergangsbasislinie oberhalb von 2.0 M GdmHCl wies keinen Trend auf und hatte das gleiche Intensitätsniveau wie bei der Gleichgewichtsfaltung/-entfaltung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$ .

### 3.3.3.2. Nah-UV CD Übergänge

Um zu untersuchen, inwiefern die Entstehung von HF mit einer Veränderung der Tertiärstruktur einher geht, wurde die Gleichgewichtsentfaltung von Pel-15 WT anhand der Änderung des Nah-UV CD-Signals bei den Wellenlängen 258 nm, 278 nm, 289 nm, 291 nm und 293 nm beobachtet. Das zwischen 258 nm und 291 nm detektierte CD-Signal setzt sich zwar grundsätzlich gemäß der molaren Absorptionskoeffizienten von Tyrosin und Tryptophan zusammen, wird aber im konkreten Fall aufgrund des stöchiometrischen Verhältnisses von Tyrosin und Tryptophan (7:1) zu einem großen Teil durch die Tyrosinabsorption bestimmt. Im Gegensatz dazu ist die Elliptizitätsänderung bei 293 nm eine spezifische Sonde für die Asymmetrie der chemischen Umgebung von W78. Der Zirkulardichroismus im Bereich der Aromatenabsorption ist typischerweise sehr gering. Aus diesem Grund wurde die Proteinkonzentration auf 300  $\mu\text{g/ml}$  angehoben und betrug damit das 30-fache der Proteinkonzentration, die in den zuvor dargestellten Fluoreszenz-Übergängen eingesetzt wurde. Trotz dieser hohen Proteinkonzentration erwies sich die GdmHCl-induzierte Entfaltung in Gegenwart von



**Abb. 3-10: Nah-UV CD-Gleichgewichtsfaltungs-/Entfaltungsübergang Pel-15 WT.** Die Proteinkonzentration betrug 0.3 mg/ml (14.3  $\mu$ M). Die Pufferbedingungen waren 25 mM MOPS, pH 7.0. Inkubation und Messung erfolgten bei 20 °C nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen. Entfaltungsübergänge sind durch gefüllte Symbole dargestellt. Offene Kreise kennzeichnen Rückfaltungsübergänge. **(A) Gleichgewichtsübergang in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$ :** Es kann kein Anzeichen für die Population eines Gleichgewichtsintermediates gefunden werden. *Inset:* Nah-UV CD-Spektrum von Pel-15 WT unter nativen Bedingungen. Farbige Linien kennzeichnen die unterschiedlichen Detektionswellenlängen 258 nm, 278 nm, 281 nm, 287 nm und 293 nm. **(B) Gleichgewichtsübergang in Gegenwart von 1 mM EDTA.** Durchgezogene Linien geben das Ergebnis der methodenspezifischen Regression durch ein lineares 3-Zustandsmodell wieder. Die erhaltenen Parameter finden sich in Tabelle 3-4.

EDTA als reversibel. In Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  wurde auch nach der langen Inkubationszeit eine Hysterese zwischen der Faltungs- und der Entfaltungsreaktion beobachtet, wie dies auch in Fluoreszenzexperimenten beobachtet wurde. Die Rückfaltungsausbeuten betragen nach Abschätzung der Elliptizitätssignale in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sowohl in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  als auch in Gegenwart von EDTA mindestens 90 %.

Das Ergebnis der nah-UV CD-Experimente zur Gleichgewichtsfaltung ist in Abb. 3-10 zusammengefasst. Die Übergänge, die in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  gemessen wurden, ließen keine Gleichgewichtsintermediate erkennen. Die Anstiege der Vor- und Nachübergangsbasislinien besaßen nur unwesentliche GdmHCl-Abhängigkeiten und das nah-UV CD-Signal fiel oberhalb von 1 M GdmHCl kooperativ ab, wodurch sich ein abzuschätzender Übergangsmittelpunkt bei etwa 1.6 M GdmHCl ergab. In Gegenwart von EDTA wiesen die nah-UV CD-Signale bereits unter 1 M Denaturierungsmittel signifikante GdmHCl-Abhängigkeiten auf (Abb. 3-10B), und es ließ sich ein weiterer Übergangsmittelpunkt bei etwa 0.5 M GdmHCl abschätzen. Besonders deutlich wurde das Auftreten dieses zusätzlichen Übergangs am GdmHCl-abhängigen Verlust des CD-Signals im Bereich von 293 nm. Ein Elliptizitätsverlust in diesem Wellenlängenbereich weist darauf hin, dass die chemische Umgebung von W78 durch die Zugabe von GdmHCl verändert wird. Oberhalb von 1 M GdmHCl fiel das CD-Signal bei allen anderen, kürzeren Detektionswellenlängen auch in Gegenwart von EDTA kooperativ ab, und es ergab sich ein zweiter Übergangsmittelpunkt im Bereich von etwa 1.5 M GdmHCl. Die Konzentration an Denaturierungsmittel, bei der das CD-Signal bei 293 nm nicht länger vom CD-Signal des entfalteten Proteins zu unterscheiden war, betrug in Gegenwart von EDTA ungefähr 1.1 M GdmHCl und in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ungefähr 1.8 M.

In Abwesenheit von Denaturierungsmittel betrug das nah-UV CD-Signal im Denaturierungsübergang von Pel-15 in Gegenwart von 1 mM EDTA mindestens 80 % des CD-Signals, das in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  gemessen wurde. Die Anteile nativer Pel-15 in Gegenwart und Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  waren demnach sehr ähnlich.

### 3.3.3.3. Mathematische Beschreibung der Pel-15WT Gleichgewichtsübergänge

#### *Das verwendete Modell*

Um die GdmHCl-abhängige Verteilung der Spezies N, HF und U im Gleichgewicht zu quantifizieren, wurden die nah-UV- und Fluoreszenzübergänge global an ein Modell angepasst, das ein lineares 3-Zustandsgleichgewicht der Form  $\text{N} \rightleftharpoons \text{I} \rightleftharpoons \text{U}$  beschreibt. Da die intermediäre Spezies HF nur in Gegenwart von EDTA und GdmHCl zu beobachten war, musste sich diese Auswertung auf die Übergänge beschränken, die in Gegenwart von EDTA gemessen wurden. Abgesehen davon war in den  $\text{CaCl}_2$ -bestimmten Faltungs- und Entfaltungsübergängen die Gleichgewichtsbedingung ohnehin nicht erfüllt. Das verwendete Modell wurde der Formelsammlung des globalen Analyseprogramms SAVUKA (<http://www.osmanbilsel.net/software/savuka>) entnommen. Es folgt der Form

$$Y([D]) = E_N \frac{1}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}} + E_I \frac{K_{IN}}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}} + E_U \frac{K_{IN}K_{UI}}{1 + K_{IN} + K_{IN}K_{UI}}$$

und beschreibt die Denaturierungsmittelabhängigkeiten der spektroskopischen Signale der nativen ( $E_N$ ), der intermediären ( $E_I$ ) und der denaturierten Gleichgewichtsspezies ( $E_U$ ). Die miteinander verknüpften Gleichgewichte  $\text{N} \rightleftharpoons \text{I}$  und  $\text{I} \rightleftharpoons \text{U}$  werden durch die Gleichgewichtskonstanten  $K_{IN}$  und  $K_{UI}$  ausgedrückt. Insgesamt waren somit für jeden Übergang 10 Parameter anzupassen:

Basislinien-Anstiege für N, HF und U (*slopes*):  $s_N, s_{HF}, s_U$

y-Achsenabschnitte der Basislinien:  $y_N, y_{HF}, y_U$

Freie Stabilisierungsenthalpien:  $\Delta G_{UI}, \Delta G_{IN}$

Denaturierungsmittelabhängigkeiten von  $\Delta G_{UI}$  und  $\Delta G_{IN}$  (Kooperativitäten):  $m_{UI}, m_{IN}$

#### *Einschränkung der Parameter-Beweglichkeit*

Angeichts dieser Vielzahl von frei beweglichen Parametern bestand die Gefahr von Nebenlösungen, die zwar lokal das Minimum der Abweichungsquadrate darstellten, aber im globalen Kontext noch nicht das Optimum der Anpassung repräsentieren. Umgekehrt war auch zu erwarten, dass ein Ergebnis die erhaltenen Daten zwar sehr gut beschreibt, aber physikalisch irrelevante Ergebnisse liefert. Um Derartiges zu verhindern, wurde die Beweglichkeit der Parameter im Rahmen der Möglichkeiten eingeschränkt. Es ergaben sich folgende, allgemeine Regressionsbedingungen:

(A)  $\Delta G_{UI} < 0; m_{IN}, m_{UI} > 0$

**Erläuterung:** Diese Beschränkung schließt physikalisch irrelevante Ergebnisse aus.

$$(B) \quad s_N = s_{HF}$$

**Erläuterung:** Diese Bedingung wurde ausschließlich bei der Regression von nah-UV CD-Daten verwendet. Sie beruht auf der Beobachtung, dass N und I sehr ähnliche Sekundärstrukturen besitzen und dass die Tertiärstrukturen, wie sie sich qualitativ aus den nah-UV CD-Daten abschätzen lassen, ebenfalls sehr ähnlich sind. Aus diesem Grund wurden für die nah-UV CD-Signale von HF die gleichen Denaturierungsmittelabhängigkeiten angenommen wie für N.

In Gegenwart von EDTA waren die Basislinien des Vorübergangs des ersten Teilgleichgewichts  $N \rightleftharpoons HF$  weder anhand der nah-UV CD-Daten noch anhand der Fluoreszenz-Daten mit Sicherheit zu bestimmen, weil der Anteil von HF bereits bei geringen GdmHCl-Konzentrationen zunahm. Hingegen waren die GdmHCl-Abhängigkeiten des spektroskopischen Signals von N in Gegenwart von  $CaCl_2$  sehr gut abzuschätzen. Für die mathematische Auswertung wurde vereinfachend davon ausgegangen, dass die Denaturierungsmittelabhängigkeit der spektroskopischen Signale von N in Gegenwart von 1 mM EDTA und 1 mM  $CaCl_2$  vergleichbar sind. Dies fand während der Regression Ausdruck in der folgenden Einschränkung:

$$(C) \quad s_{N, CaCl_2} = s_{N, EDTA} \text{ und } s_{U, CaCl_2} = s_{U, EDTA}$$

**Erläuterung:** Die Basisliniensteigungen  $s_{N, CaCl_2}$  und  $s_{U, CaCl_2}$  bei den entsprechenden Wellenlängen wurden durch einfache lineare Regressionen der Vor- und Nachübergangsbereiche bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden dann als Konstanten für die Regression der EDTA-bestimmten Gleichgewichtsübergänge verwendet.

Zusätzlich ließen sich für das Teilgleichgewicht  $N \rightleftharpoons HF$  Erwartungen formulieren, die auf den Ergebnissen der nah-UV CD-Übergänge beruhen. In diesen hatte sich herausgestellt, dass N auch in Abwesenheit von  $CaCl_2$  zu mindestens 80 % in der nativen Lösung vorliegt. Außerdem ist für den Übergangsmittelpunkt dieses Gleichgewichts mit großer Sicherheit ein Wert im Bereich zwischen 0.4 M und 0.5 M GdmHCl anzunehmen. Legt man ferner die Annahme zu Grunde, dass die Denaturierungsmittelabhängigkeit von  $s_N$  in EDTA der Denaturierungsmittelabhängigkeit von  $s_N$  in  $CaCl_2$  entspricht, so ist unter Verwendung von Einschränkung (B) eine Stabilisierungsenthalpie  $\Delta G_{NI}$  von mindestens

$$\Delta G_{NI} = -RT \ln \frac{[HF]}{[N]} = -8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1} \cdot 293 \text{ K} \cdot \ln \frac{20}{80} = 3.37 \text{ kJ/mol}$$

zu erwarten. Bei einem erwarteten Übergangsmittelpunkt im Bereich von 0.4 bis 0.5 M GdmHCl bedeutet dies, dass der Betrag für die Kooperativität  $m_{NI}$  ungefähr doppelt so hoch sein muss wie der Betrag von  $\Delta G_{NI}$ . Die Beweglichkeit des Parameters  $m_{NI}$  (sofern dieser nicht festgesetzt war) wurde daher folgendermaßen eingeschränkt:

$$(D) \quad \Delta G_{NI} < m_{NI} < 3\Delta G_{NI}$$

### *Methodenspezifische Regression*

Mit diesen Vorüberlegungen wurde zunächst das nah-UV CD-Signal bei 293 nm beschrieben. Wie bereits erwähnt, ist dieses Signal spezifisch für die Änderung der chemischen Umgebung von W78. Ein kooperativer Übergang oberhalb von 1 M GdmHCl ließ sich bei dieser Detektionswellenlänge nicht beobachten, sodass es gerechtfertigt war, die bei 293 nm beobachtete Elliptizitätsänderung vereinfachend durch ein 2-Zustandssystem zu beschreiben.

Tabelle 3-4: Methodenspezifische Regressionsergebnisse der Pel-15 WT Gleichgewichtsübergänge

Parameter	2-Zustands-Anpassung	Ergebnisse der methodenspezifischen Regression	
	nah-UV CD-Signal (293nm)	nah-UV CD Übergänge	Fluoreszenz - Übergänge
$\Delta G_{NI}$ (kJ/mol)	$3.32 \pm 49.6$	3.32 (fest)	3.32 (fest)
$m_{NI}$ (kJ/mol/M)	$7.5 \pm 2.0$	$8.91 \pm 0.51$	10.00 (obere Grenze)
$D_{1/2, NI}$ (M)	$0.44 \pm 14.9$	0.41	0.33
$\Delta G_{IU}$ (kJ/mol)	--	$27.86 \pm 1.89$	$25.15 \pm 2.12$
$m_{IU}$ (kJ/mol/M)	--	$18.44 \pm 1.25$	$18.30 \pm 1.31$
$D_{1/2, IU}$ (M)	--	$1.51 \pm 0.10$	$1.37 \pm 0.11$

**Anmerkung:** **Spalte 1:** Die Anpassung des nah-UV CD-Signals bei 293 nm wurde mit den folgenden Beschränkungen durchgeführt:  $\Delta G_{NI} > 0$ ;  $\Delta G_{NI} < m_{NI} < 3\Delta G_{NI}$ ;  $s_N = 0.001$ . **Spalten 2 und 3:** Die methodenspezifischen Regressionen durch das lineare 3-Zustandsmodell wurden mit den folgenden Beschränkungen durchgeführt:  $\Delta G_{NI} = 3.32$  kJ/mol;  $0 < m_N < 10$  kJ/mol/M,  $\Delta G_{UI}, 0 < m_{UI}, s_N, s_{HF} = 0.001$

Die Stabilisierungsenthalpie  $\Delta G_{NI}$ , die aus der 2-Zustandsanpassung des nah-UV CD-Signals bei 293 nm erhalten wurde, ging als Konstante in die globalen Regressionen der übrigen Fluoreszenz- und nah-UV CD-Übergänge ein. Zunächst wurden diese methodenspezifisch, d.h. separat für die Fluoreszenz- und die nah-UV CD-Übergänge durchgeführt. Für die nah-UV CD-Übergänge wurde dabei ein zufriedenstellendes Ergebnis erhalten, in dem die erhaltenen Werte für  $\Delta G_{UI}$  und  $m_{UI}$  mit keiner der festgelegten Grenzen in Konflikt traten. Bei der Regression der Fluoreszenz-Übergänge wurde nur das Teilgleichgewicht  $HF \rightleftharpoons U$  zufriedenstellend beschrieben. Die Signalentwicklung im Bereich zwischen 0.0 und 0.5 M GdmHCl ließ sich trotz der Festlegung von  $\Delta G_{NI}$  nur unvollständig beschreiben. Die Ergebnisse der methodenspezifischen Regressionen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

#### Methodenunabhängige Regression

Vor einer methodenunabhängigen Regression, d.h. der gemeinsamen Anpassung aller zur Verfügung stehenden Fluoreszenz- und nah-UV CD-Übergangsdaten, war es notwendig, die absoluten Messwerte der Elliptizität bzw. der Fluoreszenzemission auf einen einheitlichen Amplitudenbereich zu normieren. Auf diese Weise war sichergestellt, dass die Fluoreszenz- und die nah-UV CD-Daten bei der Minimierung der Abweichungsquadrate gleichberechtigt berücksichtigt wurden. Die Vereinheitlichung

Tabelle 3-5: Ergebnis der methodenunabhängigen Anpassung der Pel-15 Gleichgewichtsfaltung

Parameter	$\Delta G_{NI} = 3.32$ kJ/mol	alle $P > 0$
$\Delta G_{NI}$ (kJ/mol)	3.32 (fest)	$0.63 \pm 0.66$
$m_{NI}$ (kJ/mol/M)	$8.96 \pm 0.38$	$5.25 \pm 0.79$
$D_{1/2, NI}$ (M)	$0.37 \pm 1.38$	$0.12 \pm 1.06$
$\Delta G_{IU}$ (kJ/mol)	$27.81 \pm 1.79$	$27.44 \pm 1.42$
$m_{IU}$ (kJ/mol/M)	$18.56 \pm 1.09$	$18.24 \pm 0.93$
$D_{1/2, IU}$ (M)	$1.52 \pm 0.09$	$1.50 \pm 0.07$

**Anmerkung:** Zusätzlich zu den Einschränkungen, die im Tabellenkopf vermerkt wurden, wurde die Beweglichkeit der freien Parameter folgendermaßen eingeschränkt:  $s_N = s_I$ . Die grau hinterlegte Spalte enthält das Ergebnis einer Regression, in der  $\Delta G_{NI}$  keinen zusätzlichen Beschränkungen unterworfen wurde. Diese Ergebnisse dienten als Basis für die Durchführung der  $\chi^2$ -Tests.

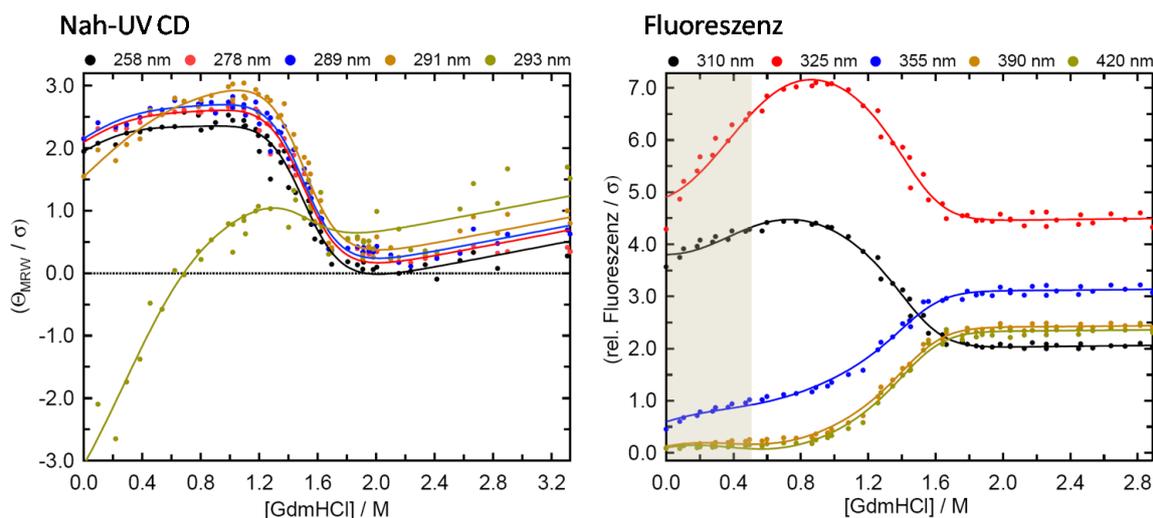


Abb. 3-11: **Fluoreszenz- und Nah-UV CD-Übergänge der Faltung und Entfaltung von Pel-15 WT.**

Bedingungen: 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0, 20 °C; Alle dargestellten Daten wurden auf ihre Standardabweichung normiert. Die Detektionswellenlängen der verschiedenen Übergänge sind farblich gekennzeichnet. Durchgezogene Linien entsprechen der globalen, methodenunabhängigen Regression durch ein lineares 3-Zustandsmodell. **Nah-UV CD-Übergänge:** 300 µg/ml Protein, Inkubationsdauer: 14 Tage, Integrationszeit pro Datenpunkt: 8 sec. **Fluoreszenz-Übergänge:** 10 µg/ml Protein, Messung nach 9 Tagen Inkubation, Anregungswellenlänge: 280 nm; Anregungs-/Emissionspfad: 10 mm). Im grau hinterlegten Bereich ist die Anpassung der Fluoreszenzdaten durch die festgelegten Parameter unzureichend. Bei der globalen Regression der Daten war die Beweglichkeit der freien Parameter folgenden Einschränkungen unterworfen:  $\Delta G_{NI} = 3.32$  kJ/mol;  $m_N < 10$  kJ/mol/M,  $\Delta G_{UI}$ ;  $s_N = s_{HF}$

der Signalamplitude wurde erreicht, indem die Messwerte jedes Übergangs jeweils durch die Standardabweichung der Übergangsdaten dividiert wurden.

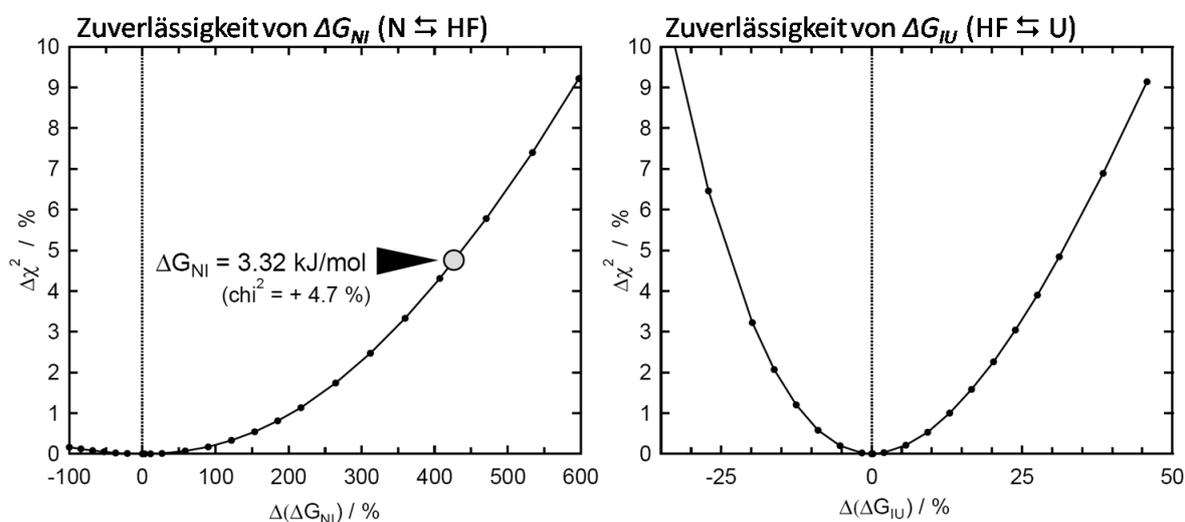
Im Bereich unterhalb von 0.5 M GdmHCl war das Modell mit den verwendeten Parametern nur näherungsweise geeignet, die Fluoreszenz-Daten zu beschreiben. Der betroffene Bereich ist in der graphischen Darstellung der Regressionsergebnisse (Abb. 3-11) grau hinterlegt. Möglicherweise wirkt sich in diesem GdmHCl-Bereich eine bislang nicht verstandene, zusätzliche Komponente auf das Fluoreszenzsignal aus. Wesentlich wahrscheinlicher ist es allerdings, dass die beobachteten Abweichungen auf die GdmHCl-abhängige Adhäsion von Pel-15 mit der Wandung der Reaktionsgefäße zurückzuführen sind. Höhere Proteinkonzentrationen, wie sie zur Messung der nah-UV CD-Experimente eingesetzt wurden, reduzieren die Auswirkungen dieses Effektes.

#### Zuverlässigkeit der ermittelten Parameter

Die Zuverlässigkeit der ermittelten Parameter ließ sich anhand einfacher  $\chi^2$ -Tests ( $\chi^2$ ) abschätzen. Hierfür wurde zunächst eine globale, methodenunabhängige Regression durchgeführt, in der die Beweglichkeit der globalen Parameter ( $P$ ) durch die allgemeine Bedingung  $P > 0$  eingeschränkt wurde. Das Ergebnis dieser Regression ist zur Kenntnisnahme in die grau hinterlegte Spalte in Tabelle 3-5 eingetragen. Das Prinzip der  $\chi^2$ -Tests war es dann, den zu bewertenden Parameter auf einen Wert festzulegen, der in aufeinanderfolgenden Regressionsrunden immer weiter von seinem Optimalwert entfernt wurde. Die daraus resultierende Verschlechterung des Regressionsergebnisses zeigte sich in der stetigen Erhöhung der  $\chi^2$ -Werte. Das Ergebnis des Tests ist für die Parameter  $\Delta G_{NI}$  und  $\Delta G_{UI}$  in

Abb. 3-12 dargestellt. Ohne äußere Einschränkungen wurde für  $\Delta G_{NI}$  ein optimales Anpassungsergebnis von ca. 0.7 kJ/mol bestimmt. Eine signifikante Veränderung des Regressionsergebnisses ( $\Delta\chi^2 > 10\%$ ) wurde ab  $\Delta G_{NI} = 4.5$  kJ/mol erreicht, was einer Erhöhung dieses Parameters um ca. 500 % entspricht. Durch die Festlegung von  $\Delta G_{NI}$  auf 3.32 kJ/mol wurde das Anpassungsergebnis demnach um weniger als 5 % verschlechtert.

Der Parameter  $\Delta G_{IU}$  wurde durch das verwendete Modell wesentlich zuverlässiger bestimmt als  $\Delta G_{NI}$ . Eine signifikante Verschlechterung des Regressionsergebnisses wurde hier bereits erreicht, wenn  $\Delta G_{IU}$  um 37 % verringert bzw. um 47 % erhöht wurde. Die  $\chi^2$ -Parabel, die beim  $\Delta G_{IU}$ -Test beobachtet wird, ist asymmetrisch. Sicherlich ist dies ein Hinweis auf die Existenz naheliegender, lokaler Minima, in

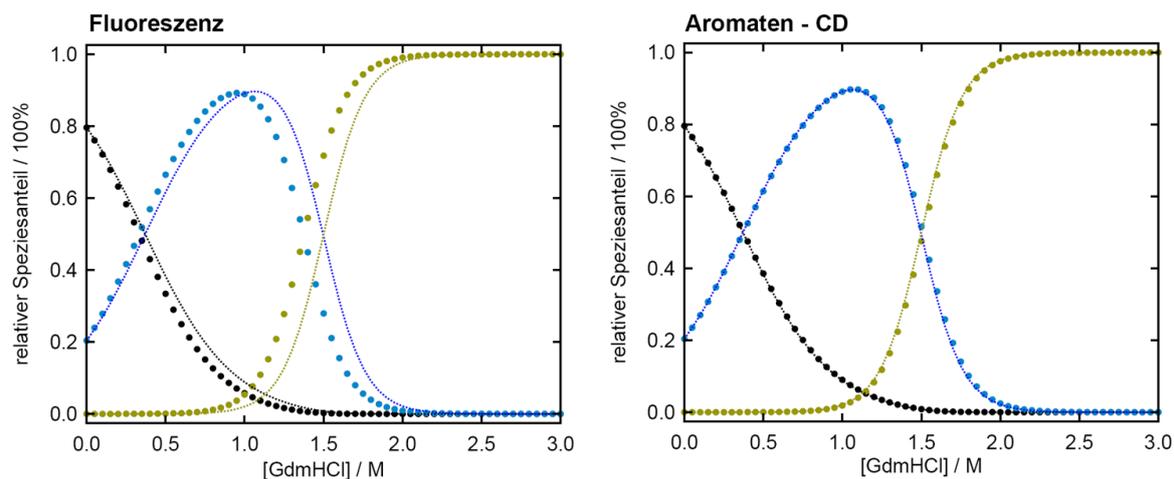


**Abb. 3-12:  $\chi^2$ -Tests zur Bestimmung der Zuverlässigkeit von  $\Delta G_{NI}$  und  $\Delta G_{IU}$ .** Dargestellt ist die relative Änderung der  $\chi^2$ -Werte bei Erhöhung bzw. Erniedrigung des betrachteten Parameters. Je steiler die entstehende Parabel, desto sicherer wird der betreffende Parameter durch das lineare 3-Zustandsmodell bestimmt. Asymmetrische Parabeläste deuten auf die Existenz alternativer Lösungsmöglichkeiten hin. Die Minima der dargestellten  $\chi^2$ -Parabeln entsprechen den Regressionsergebnissen, die in der grau hinterlegten Spalte in Tabelle 3-5 angegeben sind.

denen sich die Regression bei der Wahl ungeeigneter Startparameter „verfangen“ kann. Der Parameter  $\Delta G_{IU}$  erwies sich als unempfindlich für die Lage des ersten Teilgleichgewichts. Mit und ohne Beschränkung von  $\Delta G_{NI}$  wurde für  $\Delta G_{IU}$  ein Betrag im Bereich um 27 kJ/mol erhalten.

#### *Berechnung der GdmHCl-abhängigen Verteilung von N, HF und U*

Basierend auf den ermittelten thermodynamischen Parametern, die in Tabelle 3-5 zusammengefasst wurden, lässt sich die relative Verteilung von N, HF und U berechnen, wie sie sich nach der methodenunabhängigen Regression aller Übergangsdaten darstellt. Die Grundlage dieser Berechnung bildete das Modell, an das die Übergangsdaten angepasst wurden. Es zeigt sich, dass das hyperfluoreszente Gleichgewichtsintermediat HF im Bereich zwischen 0.75 M und 0.95 M GdmHCl zu ca. 85 % populiert ist. Der Anteil von 80 % N in Abwesenheit von Denaturierungsmittel ergibt sich allein aus der Festlegung von  $\Delta G_{NI} = 3.32$  kJ/mol, die ihrerseits aus der 2-Zustandsregression des nah-UV CD-Übergangs bei 293 nm hervorgegangen ist. Vor dem Hintergrund, dass dieser nah-UV CD-Übergang vergleichsweise hohen Streuungen unterworfen war, kann der reale Anteil von N durchaus



**Abb. 3-13: GdmHCl-abhängige Verteilung der Spezies N, HF und U.** Geschlossene Kreise zeigen die Ergebnisse, die aus der methodenspezifischen Regression erhalten wurden. Gestrichelte Linien zeigen in beiden Diagrammen das Ergebnis der methodenunabhängigen Regression. Zur Berechnung der Speziesverteilungen wurden die Parameter verwendet, die in Tabelle 3-4 und in Tabelle 3-5 zusammengefasst sind.

größer sein. Eine bessere Annahme stand allerdings nicht zur Verfügung. Signifikante Mengen denaturierten Proteins (als signifikant werden 5 % des Gesamtanteils betrachtet) werden gemäß der Verteilungsrechnung ab einer GdmHCl-Konzentration von etwa 1.1 M GdmHCl beobachtet.

Ein Vergleich der Verteilungsberechnungen, die sich aus Fluoreszenz- und aus nah-UV CD-Daten ergeben, verdeutlicht, dass das Ergebnis der methodenunabhängigen Regression durch die nah-UV CD-Übergänge wesentlich stärker beeinflusst wird als durch die Fluoreszenz. Angesichts der vergleichsweise großen hohen Messwerteunsicherheit der CD-Daten war dieses Ergebnis zunächst befremdlich; es zeigt aber im Grunde nur an, dass das Teilgleichgewicht  $N \rightleftharpoons HF$  durch die nah-UV CD-Daten wesentlich besser beschrieben wird als durch die Fluoreszenz-Daten bzw. dass die  $\chi^2$ -Werte im Fall der stärker streuenden CD-Daten stärker von den Fitparametern beeinflusst werden als von den Fluoreszenzwerten.

#### 3.3.3.4. Das Faltungs- und Entfaltungsgleichgewicht von Pel-15 DCCA, DVAA und AVAA

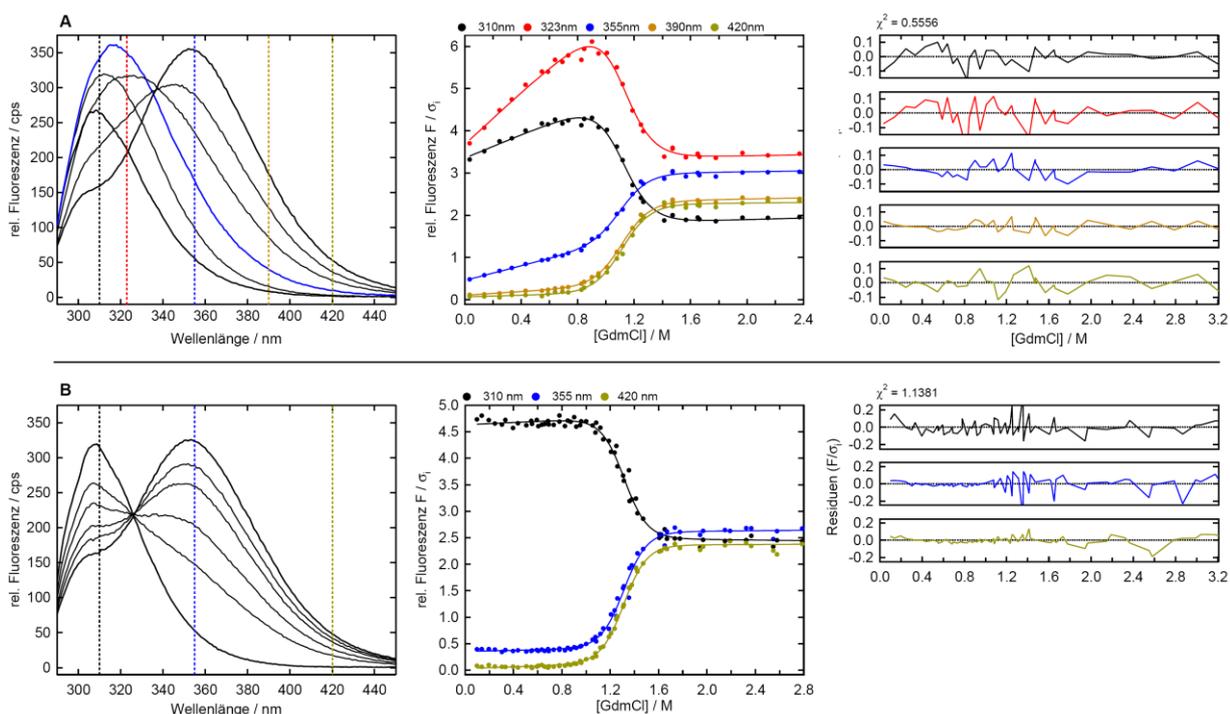
Das GdmHCl-abhängige Faltungs- und Entfaltungsgleichgewicht aller Pel-15 Varianten wurde in Gegenwart von 1 mM  $Ca^{2+}$  bzw. 1 mM EDTA vergleichend mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Im Fall von Pel-15 AVAA wurde zusätzlich das Aromaten-CD bei den Absorptionswellenlängen 258 nm, 278 nm, 289 nm, 291 nm und 293 nm detektiert und zur globalen Analyse der Gleichgewichtsfaltung/-entfaltung herangezogen. Alle Übergänge befanden sich zum Zeitpunkt ihrer Untersuchung im thermodynamischen Gleichgewicht, sodass zwischen Denaturierung und Renaturierung keine apparenten Hysteresen beobachtet werden konnten. Die mathematische Auswertung erfolgte global unter Nutzung des linearen 3-Zustandsmodells.

##### *Charakterisierung des Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtes von Pel-15 DCCA*

In Anwesenheit von 1 mM EDTA populierte die Pel-15 Variante DCCA zwischen 0.8 und 1.0 M GdmHCl ein hyperfluoreszentes Gleichgewichtsintermediat. Der Gleichgewichtsübergang, wie er sich

für DCCA in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  bzw. EDTA darstellt, ist in Abb. 3-14 gezeigt. Die Übergänge in Gegenwart von EDTA wurden unter Anwendung der üblichen Beschränkungen (vgl. Abschnitt 3.3.3.3, S. 60) global an das lineare 3-Zustandsmodell angepasst, das bereits beim WT-Protein verwendet wurde. Die Analyse der  $\chi^2$ -Werte, wie sie sich in Abb. 3-15A dargestellt ist, verdeutlicht, dass sich für Teilgleichgewicht  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}$  im physikalisch sinnvollen Bereich ( $\Delta G_{\text{NI}} > 0$ ) kein zuverlässiges Minimum ermitteln ließ.

Aus diesem Grund wurden die DCCA-Übergänge durch zwei verschiedene Regressionen mit jeweils unterschiedlich starken Einschränkungen für  $\Delta G_{\text{NI}}$  durchgeführt. In der ersten Runde wurde die vergleichsweise tolerante Beschränkung  $\Delta G_{\text{NI}} > 0.5$  kJ/mol eingeführt, was einer Verschlechterung des Fitergebnisses um etwa 1 % entspricht. Diese Einschränkung hatte zum Ziel, das Regressionsergebnis auf einen physikalisch sinnvollen Bereich zu beschränken. In der zweiten Anpassungsrunde wurde in Analogie zur Anpassung des WT-Übergangs  $\Delta G_{\text{NI}} = 3.32$  kJ/mol festgelegt. Der  $\chi^2$ -Werte Verteilung ist zu entnehmen, dass das Regressionsergebnis durch diese Beschränkung um mehr als 20 % verschlechtert wird, was sich allerdings ausschließlich im Bereich des ersten Teilgleichgewichts



**Abb. 3-14: DCCA Faltungs- und Entfaltungsübergänge (Fluoreszenz)**

**(A) linkes Diagramm: Fluoreszenzspektren aus dem EDTA-abhängigen Renaturierungsübergang** von Pel-15 DCCA in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0 bei 0.03, 0.43, 0.90, 1.08, 1.19 und 1.47 M GdmCl. Senkrechte, farbige Linien kennzeichnen die Wellenlängen, für die der Übergang im rechten Diagramm dargestellt ist. Das blau markierte Fluoreszenzspektrum wurde bei 0.9 M GdmCl aufgezeichnet. Bei dieser Konzentration ist der Anteil von HF maximal. **Mittleres Diagramm:** Rückfaltungsübergänge, detektiert bei 5 unterschiedlichen Wellenlängen (Punkte), sowie das Ergebnis der globalen Anpassung dieser Übergänge an ein 3-Zustandsmodell (farbige Linien). Dargestellt ist das Ergebnis der Anpassung, in der  $\Delta G_{\text{NI}}$  auf 0.5 kJ/mol festgelegt wurde. **Rechtes Panel:** Residuen (Differenz zwischen Messwert und Fitergebnis) unter Angabe des für den gesamten Fit erhaltenen  $\chi^2$ -Wertes. **(B) Linkes Diagramm: Fluoreszenzspektren aus dem  $\text{CaCl}_2$ -abhängigen Faltungsübergang** von Pel-15 DCCA in 25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0 bei 0, 1.24, 1.31, 1.38, 1.42 und 1.53 M GdmCl. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  wird im DCCA-Übergang ein isofluoreszenter Punkt bei 325 nm beobachtet. **Mittleres Panel:** Faltungsübergänge, detektiert bei 3 unterschiedlichen Wellenlängen (Punkte) und das Ergebnis ihrer nichtlinearen Regression durch ein 2-Zustandsmodell (Linien). **Rechtes Panel:** Residuen (Differenz zwischen Messwert und Fitergebnis) unter Angabe des für den gesamten Fit erhaltenen  $\chi^2$ -Wertes.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der nichtlinearen Regression der Pel-15 DCCA Gleichgewichtsfaltungsreaktion.

Parameter	EDTA		CaCl <sub>2</sub>
Regressionsmodell	N $\rightleftharpoons$ I $\rightleftharpoons$ U		N $\rightleftharpoons$ U
$\Delta G_{NI}$ (kJ / mol)	0.50 (fest)	3.32 (fest)	--
$m_{NI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	4.09 $\pm$ 0.50	7.79 $\pm$ 0.46	--
$D_{1/2, NI}$ (M)	0.12	0.43	--
$\Delta G_{UI}$ (kJ / mol)	29.95 $\pm$ 1.04	30.08 $\pm$ 1.15	33.57 $\pm$ 1.33
$m_{UI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	27.01 $\pm$ 0.86	26.91 $\pm$ 0.97	25.57 $\pm$ 1.00
$D_{1/2, UI}$ (M)	1.11 $\pm$ 0.05	1.12 $\pm$ 0.05	1.31 $\pm$ 0.07

äußert. Die Ergebnisse, die aus beiden Anpassungsrunden für das zweite Teilgleichgewicht erhalten wurden, liegen konsistent bei etwa 30 kJ/mol mit Übergangsmittelpunkten von ungefähr 1.43 M GdmHCl. Diese Lösung stellt ein stabiles Minimum in der  $\chi^2$ -Verteilung dar. Für das erste Teilgleichgewicht werden aus den Fluoreszenzdaten keine verlässlichen Informationen gewonnen.

In Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> vereinfachten sich die DCCA-Faltungs- und Entfaltungsübergänge apparent zu einem reversiblen 2-Zustands-Gleichgewicht der Form N  $\rightleftharpoons$  U, was sich in der Existenz eines isofluoreszenten Punktes bei 325 nm bestätigte. Es war aus diesem Grund möglich, die DCCA Gleichgewichtsfaltung in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> mittels der linearen Extrapolationsmethode (Bolen & Santoro 1988) global an ein 2-Zustandsmodell anzupassen.

Die Ergebnisse aller Regressionen sind in Tabelle 3-6 zusammengetragen. Der Stabilitätsgewinn, den Pel-15 DCCA durch die Bindung von Ca<sup>2+</sup> erfährt, beträgt etwa 3.6 kJ/mol. Dies bewirkt eine Verschiebung des Übergangsmittelpunktes von  $D_{1/2} = 1.11$  (EDTA) auf  $D_{1/2} = 1.31$  (Ca<sup>2+</sup>).

Im Vergleich zum WT-Protein sind die Übergangsmittelpunkte von DCCA zu niedrigeren GdmHCl-Konzentrationen verschoben. Aus diesem Umstand jedoch auf eine Destabilisierung der Mutante zu schließen, ist nicht möglich, da die Kooperativität der DCCA-Übergänge deutlich höher war als die Kooperativität der WT-Übergänge. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen

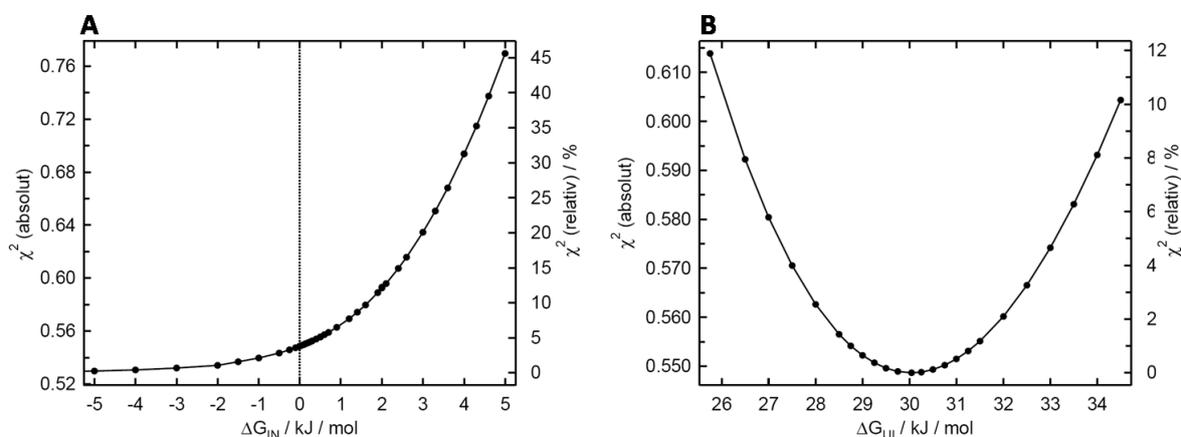
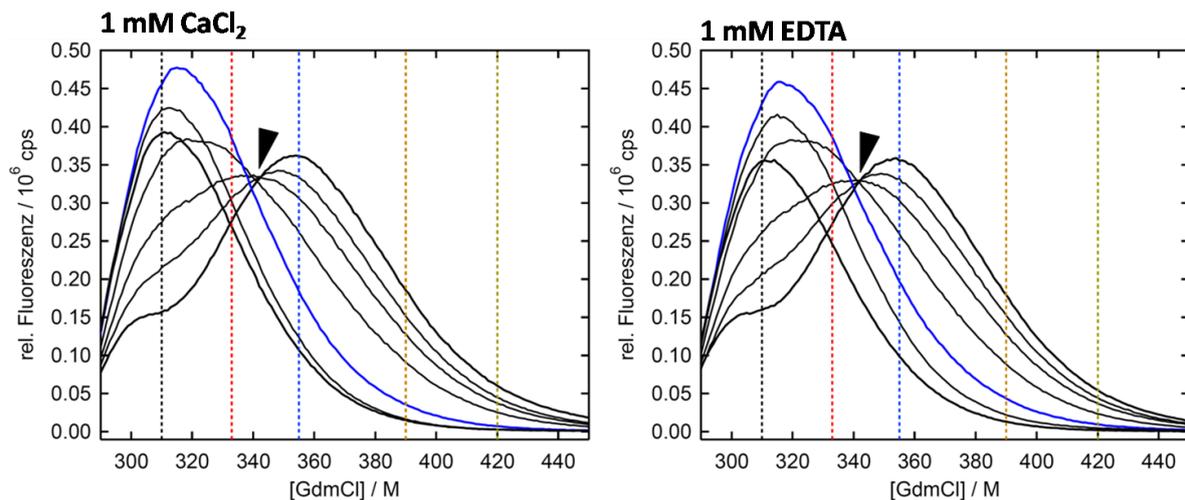


Abb. 3-15:  $\chi^2$ -Wert – Verteilung für die globale 3-Zustandsanpassung der Pel-15 DCCA Gleichgewichtsfaltung. Im Fall der  $\Delta G_{NI}$ -abhängigen  $\chi^2$ -Verteilung (linkes Panel) lässt sich für  $\Delta G_{NI} > 0$  kein Minimum feststellen. Für das Gleichgewicht U  $\rightleftharpoons$  I war der  $\chi^2$ -Wert bei  $\Delta G_{UI} = 30.04 \pm 1.02$  kJ / mol minimal und wies im Bereich von  $\pm 4$  kJ / mol keine Anzeichen von zusätzlichen Minima auf.

Kooperativitäten wird in Abschnitt 4.2.4.4 (S. 126) gegeben. Die aus den Stabilitätsdaten von Pel-15 DCCA berechneten, GdmHCl-abhängigen Gleichgewichtsverteilungen der Spezies N, HF und U sind vergleichend zu den Speziesverteilungen des WT-Proteins in Abb. 3-18 dargestellt.

#### Charakterisierung des Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtes von Pel-15 DVAA und AVAA

Die Übergänge der Pel-15 Varianten DVAA und AVAA unterschieden sich nicht nachweislich. Daher



**Abb. 3-16: Fluoreszenzspektren von Pel-15 DVAA zur Analyse von GdmCl-induzierten Gleichgewichtsübergängen der Faltung und Entfaltung.** (10 µg/ml Pel-15 DVAA in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA / 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0; var. [GdmCl]); Messung nach 14 Tagen Inkubation bei 20 °C; Anregungswellenlänge: 280 nm) Farbige senkrechte Linien kennzeichnen die Wellenlängen, die der globalen Anpassung an ein lineares 3-Zustandsmodell der Gleichgewichtsfaltung angepasst wurden. Blau markierte Spektren (aufgezeichnet bei [GdmCl] = 0.91 M) mit maximaler Population von HF. Linkes Diagramm: Fluoreszenzspektren der Gleichgewichtsentfaltung in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Dargestellt sind die bei 0.11, 0.20, 0.60, 0.82, 0.91, 1.01 und 1.81 M GdmCl gemessenen Fluoreszenzspektren. Rechtes Diagramm: Gleichgewichtsentfaltung in Gegenwart von 1 mM EDTA. Dargestellt sind die bei 0.09, 0.41, 0.65, 0.77, 0.91, 1.00 und 2.71 M GdmCl gemessenen Fluoreszenzspektren. Sowohl in Gegenwart von EDTA als auch von CaCl<sub>2</sub> war bei 341 nm ein isofluoreszenter Punkt zwischen HF und U zu beobachten (schwarze Pfeile).

werden sie in diesem Abschnitt gemeinsam behandelt. Die Fluoreszenzübergänge werden exemplarisch an der Mutante Pel-15 DVAA vorgestellt (Abb. 3-16). Das AVAA-Faltungsgleichgewicht wurde zusätzlich mittels Nah-UV CD-Spektroskopie im Bereich zwischen 258 nm und 293 nm analysiert.

Im Fall beider Mutanten (DVAA/AVAA) ließ sich die Population eines hyperfluoreszenten Gleichgewichtszustandes (HF) sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> beobachten, was einen wesentlichen Unterschied zur Gleichgewichtsfaltung von Pel-15 WT bzw. DCCA darstellt. Die korrekt eingestellte CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Übergangsproben von Pel-15 DVAA/AVAA wurden stichpunktweise mittels ICP bestätigt (Daten nicht gezeigt). Entgegen dem WT -Protein waren bei DVAA/AVAA bereits Denaturierungsmittelkonzentrationen im Bereich von 0.5 M bis 0.7 M GdmHCl ausreichend, um HF maximal zu populieren. Ein isofluoreszenter Punkt zwischen HF und U wurde bei einer Wellenlänge von 341 nm beobachtet. Er scheint das Faltungsgleichgewicht HF ⇌ U zu charakterisieren. Das Erscheinungsbild der Spektrenschär hat in Gegenwart und in Abwesenheit von CaCl<sub>2</sub> sehr große Ähnlichkeit mit dem Muster, das für Pel-15 WT in Gegenwart von 1 mM EDTA

**Tabelle 3-7: Ergebnisse der Anpassung der DVAA/AVAA Gleichgewichtsfaltung**Einschränkung:  $\Delta G_{NI} > 0.5$  kJ / mol

Parameter	DVAA		AVAA	
	CaCl <sub>2</sub>	EDTA	CaCl <sub>2</sub>	EDTA
$\Delta G_{NI}$ (kJ / mol)	0.50 ± 2.33	0.50 ± 1.24	0.50 ± 3.12	0.50 ± 2.00
$m_{NI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	5.27 ± 3.27	8.45 ± 1.98	6.15 ± 4.96	9.41 ± 3.27
$D_{1/2, NI}$ (M)	0.09 ± 0.45	0.06 ± 0.15	0.08 ± 0.51	0.05 ± 0.21
$\Delta G_{UI}$ (kJ / mol)	21.43 ± 0.26	21.31 ± 0.16	21.11 ± 0.31	21.72 ± 0.15
$m_{UI}$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	26.29 (fest)			
$D_{1/2, UI}$ (M)	0.82 ± 0.04	0.81 ± 0.04	0.80 ± 0.04	0.83 ± 0.04

**Anmerkung:** AVAA-Ergebnisse entstammen der globalen Auswertung von Fluoreszenz- und nah-UV CD-Übergängen. Die ermittelten Ergebnisse für den Parameter  $\Delta G_{NI}$  stießen in allen Fällen gegen die festgelegte, untere Grenze von 0.5 kJ/mol.

beobachtet wurde. Offensichtlich bewirkt die Doppelmutation C67V, C71A bei den Mutanten DVAA und AVAA den Verlust der stabilitätsrelevanten Ca<sup>2+</sup>-Affinität. Übereinstimmend zeigte sich dies in den nah-UV CD-Spektren des Faltungs- und Entfaltungsübergangs von Pel-15 AVAA.

#### Zusätzliche Einschränkungen für die Regression der DVAA/AVAA Übergänge

Die Übergangsspektren von Pel-15 DVAA und AVAA wurden wie die von Pel-15 WT durch das Modell eines linearen 3-Zustandsgleichgewichtes angepasst. Zusätzlich zu den bereits eingeführten Einschränkungen (globale Parameter  $P > 0$ ;  $s_N = s_I$ ) wurden im Fall der AVAA/DVAA Gleichgewichtsfaltung folgende Einschränkungen angewendet:

1. Die Kooperativität des  $U \rightleftharpoons I$  Gleichgewichtes wurde auf 26.3 kJ/mol festgelegt.

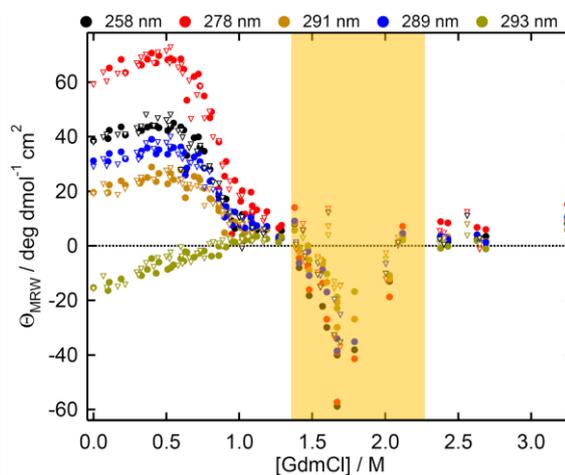
**Erläuterung:** Dies entspricht der mittleren Kooperativität des DCCA-Faltungsgleichgewichtes. Die Beschränkung wurde verwendet, um den stabilisierenden Beitrag der Disulfidbrücke C67-C71 abschätzen zu können.

2. Die Regressionen wurden mit  $\Delta G_{NI} > 0.5$  kJ / mol durchgeführt.

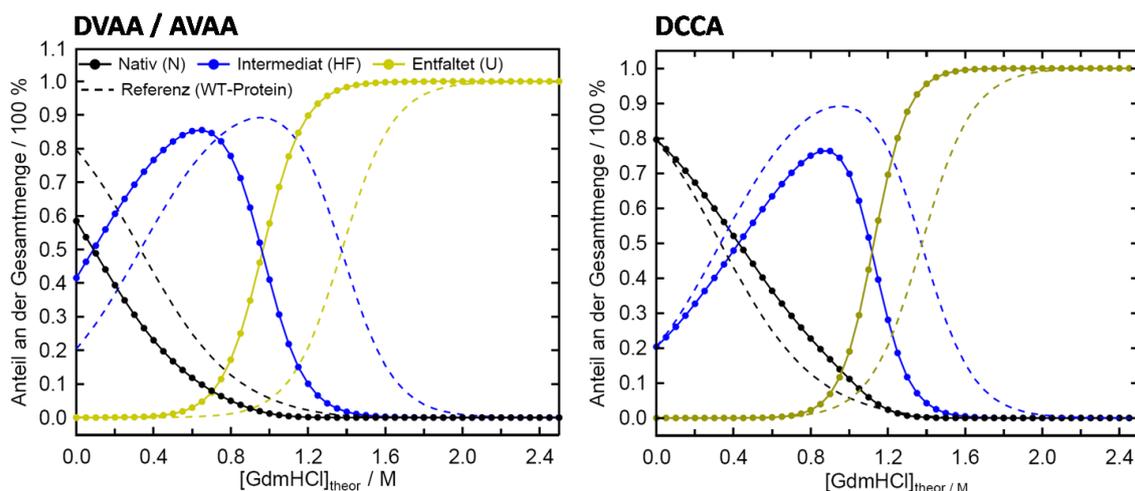
**Erläuterung:** Der Parameter  $\Delta G_{NI}$  war nach dem Ergebnis der  $\chi^2$  Verteilungstests nicht zuverlässig zu bestimmen. Die Festlegung auf diesen Wert ist ein Kompromiss. Sie verschlechtert das Regressionsergebnis um nur etwa 1 %, beschränkt den Ergebnisraum aber auf einen physikalisch sinnvollen Bereich. Die Festlegung von  $\Delta G_{NI}$  auf einen konstanten Wert war angesichts der großen Stabilitätseinbußen von DVAA/AVAA nicht berechtigt.

Eine Besonderheit wurde bei der AVAA-Gleichgewichtsfaltung beobachtet, die mittels nah-UV CD-Spektroskopie analysiert wurde.

Hier wurde nach einer Inkubationsdauer von 14 Tagen im GdmHCl-Konzentrationsbereich von 1.4 M bis 2.3 M GdmHCl eine deutliche Trübung der Proteinlösungen beobachtet, die

**Abb. 3-17: Aggregation im AVAA CD-Übergang**

(Nah-UV CD-Daten; 0.3 mg/ml Pel-15 DVAA in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA / 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0, Inkubationszeit: 14 Tage) Kreise: Denaturierung, Dreiecke: Renaturierung. Der farblich hinterlegte Bereich kennzeichnet den GdmHCl-Bereich, in dem eine starke Trübung der Übergangsproben beobachtet wurde.



**Abb. 3-18: GdmHCl-abhängige Gleichgewichtsverteilung von N, HF und U bei Pel-15 AVAA und DCCA.** Geschlossene Kreise kennzeichnen die Anteile von N, HF und U für DVAA/AVAA bzw. DCCA. Unterbrochene Linien geben die Anteile von N, HF und U des WT-Proteins an. Die Speziesverteilungen wurden mit Hilfe des 3-Zustandsmodells mit den Werten für  $\Delta G_{NI}$ ,  $m_{NI}$ ,  $\Delta G_{IU}$  und  $m_{IU}$  berechnet, die aus den globalen Anpassungen erhalten worden waren.

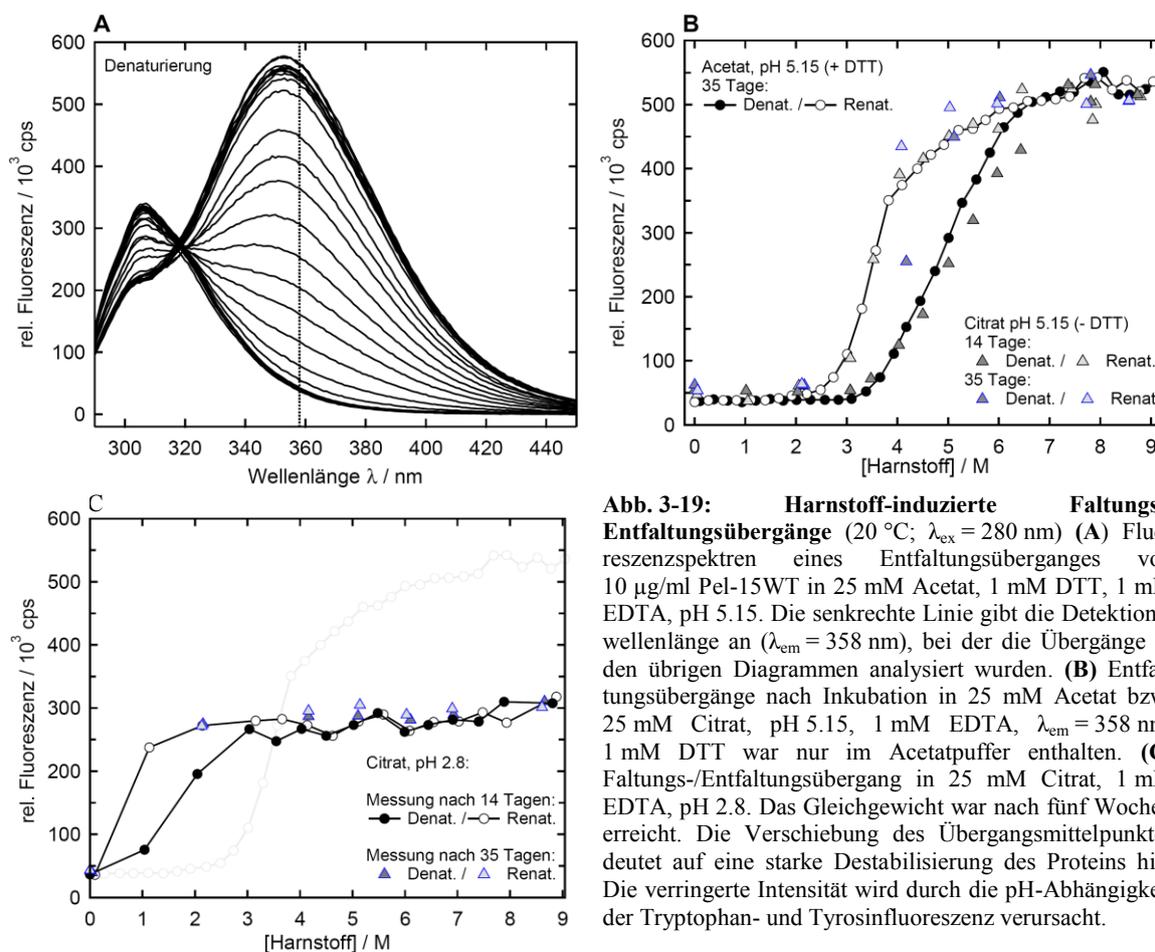
sich in einer starken Signalabnahme äußerte. Dieser konzentrationsbedingte Effekt war bei 1.7 M GdmHCl maximal. Für die mathematische Auswertung der AVAA nah-UV CD-Übergänge wurden die Elliptizitätssignale der betroffenen Lösungen vernachlässigt.

Die Regressionsergebnisse für die Gleichgewichtsfaltung/-entfaltung sind in Tabelle 3-7 zusammengetragen. Die grafische Zusammenfassung der Übergänge befindet sich in den Anhängen A6 und A7. Aus den erhaltenen Stabilitätsparametern ließ sich die GdmHCl-abhängige Verteilung der Pel-15 AVAA Faltungszustände N, HF und U berechnen und mit den Ergebnissen vergleichen, die für das WT-Protein bzw. für Pel-15 DCCA erhalten wurden (Abb. 3-18). Gemäß dieser Berechnung wird das Gleichgewichtsintermediat im Fall von Pel-15 DVAA/AVAA bereits bei einer GdmHCl-Konzentration von 0.6 M maximal populiert (86 %). Der Anteil von N in Abwesenheit von Denaturierungsmittel liegt im Fall von DVAA und AVAA unterhalb von 60 %. Betrachtet man in Abb. 3-17 die Intensität des nah-UV CD-Signals von AVAA in Abwesenheit von GdmHCl, so ist dieses nur unwesentlich geringer als das WT-Signal (vgl. Abb. 3-10, S. 59). Vor diesem Hintergrund ließe sich vermuten, dass der reale Anteil nativer Spezies in Pel-15 AVAA/DVAA deutlich größer ist als 60 %, und dass es eventuell berechtigt gewesen wäre, auch für die Regression der AVAA- und DVAA Übergänge einen Wert von mindestens 3.32 kJ/mol für  $\Delta G_{NI}$  festzulegen. Angesichts des großen Stabilitätsverlustes, der sich bei beiden Mutanten im Übergangsgleichgewicht  $HF \rightleftharpoons U$  aufzeigte, wurde auf die Anwendung dieser Einschränkung allerdings verzichtet.

### 3.3.4. Pel-15 WT und Harnstoff

Das Faltungs-/Entfaltungsgleichgewicht von Pel-15 wurde unter leicht sauren Bedingungen in 25 mM Acetat, pH 5.15, 1 mM DTT, 1 mM EDTA bzw. 1 mM  $CaCl_2$  untersucht (Abb. 3-19A). Ein deutlich vorhandener „Knick“ im Übergang der Rückfaltung verschwand mit zunehmenden Inkubationszeiten

und war nach fünf Wochen nicht mehr nachweisbar; hierin deutet sich die Existenz sehr langlebiger Faltungsintermediate an. Der Entfaltungsübergang hatte keine erkennbaren Stufen; auch nach fünf Wochen war er noch nicht vollständig an den Rückfaltungsübergang angenähert. Das gleiche Muster – ein Entfaltungsübergang, der sich über die Zeit dem Rückfaltungsübergang annähert – war bereits von Monika Walter in GdmHCl-abhängigen Faltungs- und Entfaltungsübergängen beobachtet worden (Walter, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Wiederholung des Experimentes in Abwesenheit von DTT führte im Fall des Rückfaltungsübergangs zum gleichen Ergebnis. Der Entfaltungsübergang war unter



**Abb. 3-19: Harnstoff-induzierte Faltungs-/Entfaltungsübergänge** (20 °C;  $\lambda_{ex} = 280$  nm) (A) Fluoreszenzspektren eines Entfaltungsüberganges von 10 µg/ml Pel-15WT in 25 mM Acetat, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 5.15. Die senkrechte Linie gibt die Detektionswellenlänge an ( $\lambda_{em} = 358$  nm), bei der die Übergänge in den übrigen Diagrammen analysiert wurden. (B) Entfaltungsübergänge nach Inkubation in 25 mM Acetat bzw. 25 mM Citrat, pH 5.15, 1 mM EDTA,  $\lambda_{em} = 358$  nm; 1 mM DTT war nur im Acetatpuffer enthalten. (C) Faltungs-/Entfaltungsübergang in 25 mM Citrat, 1 mM EDTA, pH 2.8. Das Gleichgewicht war nach fünf Wochen erreicht. Die Verschiebung des Übergangsmittelpunktes deutet auf eine starke Destabilisierung des Proteins hin. Die verringerte Intensität wird durch die pH-Abhängigkeit der Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz verursacht.

diesen Bedingungen nach Ablauf der gleichen Inkubationszeit zwar wesentlich weiter an den Renaturierungsübergang angenähert, dennoch ließ sich noch immer eine Hysterese zwischen Faltung und Entfaltung erkennen.

Parallel zu diesem Experiment wurde die Faltung/Entfaltung von Pel-15 bei verschiedenen pH Werten im Bereich zwischen pH 2.8 und pH 6.5 in unterschiedlichen Puffersystemen untersucht. Die Messungen erfolgten jeweils nach zwei und nach fünf Wochen. Sie zeigten, dass die beobachtete Hysterese bei allen pH-Werten durch eine langsame Entfaltungsreaktion verursacht wird. Unter stark sauren Bedingungen ( $\text{pH} < 2.8$ ) ließ sich für Pel-15 WT ein reversibles Gleichgewicht zwischen Faltung und Entfaltung nachweisen. Das Protein war unter diesen Bedingungen sehr stark destabilisiert, was sich in einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes um drei Molaritäten auf

unter 1 M Harnstoff und durch das Fehlen einer Vorübergangsbasislinie andeutete. Bereits bei pH 3.13 ließ sich kein Gleichgewicht mehr etablieren.

Ein hyperfluoreszentes Gleichgewichtsintermediat, wie es in GdmHCl-abhängigen Faltungs- und Entfaltungsexperimenten beobachtet worden war, ließ sich durch die Gegenwart von Harnstoff nicht induzieren. Auch der Versuch, das Denaturierungsmittel GdmHCl durch eine Kombination aus Harnstoff und NaCl zu simulieren, erzielte keine Erfolge. Erst durch den Einsatz von guanidinhaltigen Salzen war es möglich, das Auftreten der Hyperfluoreszenz zu induzieren, die sich dann genauso verhielt wie bei der Induktion durch GdmHCl. Angesichts der notwendigerweise sehr langen Inkubationszeiten war die Nutzung von Harnstoff als Denaturierungsmittel im Fall von Pel-15 nicht zielführend. Dies begründete sich zum einen in der Tatsache, dass der pH-Wert wässriger, leicht saurer Harnstofflösungen über die Zeit um 1 bis 2 pH-Einheiten steigen kann. Zum anderen ließ sich nicht ausschließen, dass die Proteinmoleküle durch die Zersetzungsprodukte von Harnstoff (Ammoniumcyanat, Ammoniak, etc.) kovalent modifiziert wurden.

### **3.4. Enzymaktivität**

Die Pel-15 katalysierte  $\beta$ -Eliminierung von PGA (Poly-(1,4)- $\alpha$ -D-galacturonan) führt zur Entstehung von Oligosacchariden, deren nicht-reduzierende Enden ungesättigte Galacturonosyleinheiten enthalten. Diese ungesättigten Reaktionsprodukte besitzen ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 235 nm, das es erlaubt, die Zunahme des Spaltungsproduktes spektroskopisch zu analysieren und auf diese Weise die biologische Aktivität der in dieser Arbeit verwendeten Pel-15 Varianten miteinander zu vergleichen. Die Durchführung der Aktivitätstests und die Berechnung der Enzymaktivität orientierte sich an den Empfehlungen von Kobayashi *et al.*, 1999.

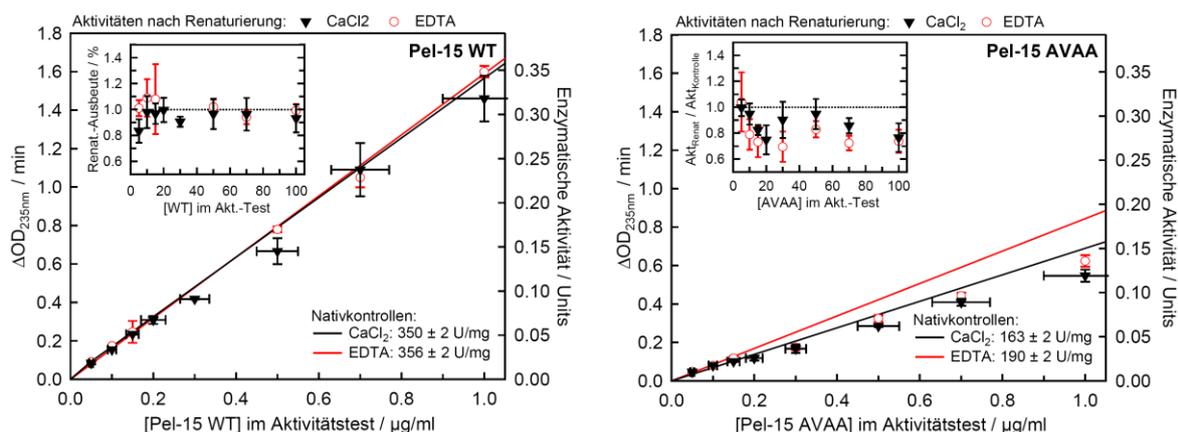
Schnelle, qualitative Enzymaktivitätstests erfolgten in der Regel anhand von Zymogrammen, wie sie im Abschnitt 3.1.1.1 (S. 47) dargestellt sind.

#### **3.4.1. Spezifische Aktivität und Konzentrationsabhängigkeit der Renaturierung**

Dieses Experiment wurde vergleichend für das Pel-15 Wildtypprotein und die am stärksten destabilisierte Mutante AVAA durchgeführt (Abb. 3-20). Die spezifische Aktivität von Pel-15WT wurde als Mittelwert aus den Aktivitäten acht verschiedener Proteinkonzentrationen bestimmt. Sie betrug  $350 \pm 2$  U/mg nach 12 h Inkubation in 25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0 bzw.  $356 \pm 2$  U/mg nach der Inkubation in Gegenwart von 1 mM EDTA. Unter beiden Rückfaltungsbedingungen und bei allen untersuchten Proteinkonzentrationen lag die Ausbeute nativer, enzymatisch aktiver Pel-15 Moleküle im Rahmen der experimentellen Unsicherheit bei 100 %. Die spezifische Aktivität der Pel-15 Variante AVAA war in Relation zur Aktivität des WT-Proteins reduziert. Nach Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Nativpuffer betrug sie im Mittel  $163 \pm 2$  U/mg und entsprach damit etwa 47 % der WT-Aktivität. Nach der Inkubation in 1 mM EDTA betrug die spezifische Aktivität etwa 53 % der WT-Aktivität. Die Rückfaltungsausbeuten von Pel-15 AVAA wurden durch die Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$

im Rückfaltungspuffer nicht beeinflusst. Sie schienen bei Proteinkonzentrationen bis zu 50  $\mu\text{g/ml}$  dem WT-Protein vergleichbar zu sein und sanken oberhalb dieser Konzentration systematisch ab. Bei 100  $\mu\text{g/ml}$  betrug die Rückfaltungsausbeuten 76 % in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  und 74 % in Gegenwart von EDTA.

Die Unsicherheit in der Bestimmung der Enzymaktivität wurde sehr wahrscheinlich durch eine fehlerbehaftete Proteinkonzentration bestärkt. Aus den hier vorgestellten Enzymaktivitätstests geht nicht hervor, wie hoch der Anteil der denaturierten oder partiell gefalteten Proteinmoleküle ist, die während der Renaturierung an die Gefäßwandungen und/oder beim Transfer in den Aktivitätstest an



**Abb. 3-20: Spektroskopische Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Pel-15 WT und Pel-15 AVAA**

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bei 30 °C erfolgte über die Detektion der Absorption bei 235 nm. Dies ist das Absorptionsmaximum von ungesättigten Galacturonosylresten, die während der  $\beta$ -Eliminierung von PGA entstehen. Die enzymatische Aktivität von Pel-15 wurde über den Zusammenhang  $1 \text{ U} = 4.6 \text{ OD}_{235}/\text{min}$  berechnet. Alle Messungen sind das Ergebnis von 3-fach Bestimmungen. Vertikale Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte wieder. Horizontale Fehlerbalken entsprechen einer Konzentrationsunsicherheit von 10 %. Inset: Grafische Auftragung der Renaturierungsausbeuten, angegeben als Anteil wiederhergestellter Enzymaktivität nach der Rückfaltung in GdmCl-freiem Renaturierungspuffer in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  bzw. EDTA.

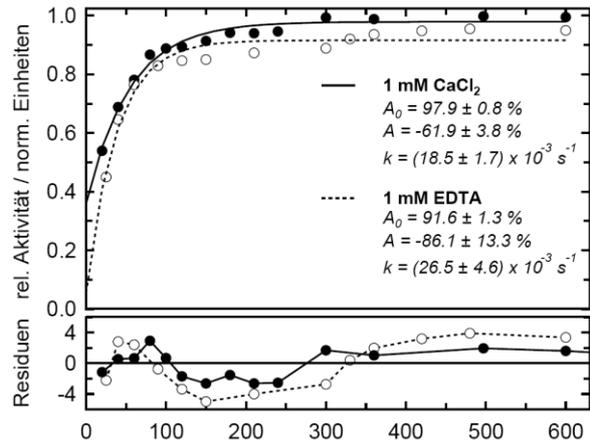
die Pipettenspitze adsorbieren. Vereinfachend wurde hierfür eine Unsicherheit von 10 % der eingesetzten Proteinkonzentration angenommen.

### 3.4.2. Zeitabhängigkeit der Reaktivierung von Pel-15

Die Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität von Pel-15WT wurde zeitabhängig untersucht. In diesem Experiment wurde analysiert, mit welcher Zeitabhängigkeit sich die enzymatische Aktivität während der Rückfaltung von Pel-15 wiederherstellt. Prinzipiell handelte es sich bei dieser Art von Experimenten um inverse Doppelsprungexperimente der Art  $\text{U} \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{U}$ , wie sie im Abschnitt 3.6.5.1 (S. 98) beschrieben werden. Hierfür wurde ein Aliquot des Rückfaltungsansatzes nach unterschiedlichen Zeiten in eine leicht denaturierende Lösung von 25 mM MOPS, 2 M GdmHCl, pH 7.0 (4 °C) transferiert. Geht man davon aus, dass teilgefaltete Intermediate unter diesen Bedingungen schnell entfalten, misst man im darauffolgenden Aktivitätstest nur den Anteil vollständig rückgefalteter Pel-15 Moleküle.

In der Fluoreszenz (vgl. Renaturierungskinetiken 3.6.3.1) hatte sich die Rückfaltungsreaktion in Gegenwart von 0.5 M GdmHCl als eine biphasische Reaktion dargestellt. Die Wiederherstellung der

enzymatischen Aktivität war sowohl in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  als auch in Gegenwart von EDTA nach 150 bis 200 Sekunden zu mehr als 90 % abgeschlossen. Die Reaktivierungsausbeuten betragen unter beiden Bedingungen nach etwa 600 Sekunden mindestens 95 %. Nach dem Faltungsmodell, das in Abschnitt 4.2.1.1 (S. 115) auf Basis der Fluoreszenz- und fern-UV CD-Kinetiken hergeleitet wird, war die Zunahme der Aktivität als einfache Reaktion erster Ordnung zu erwarten. Die monoexponentielle Regression der Daten lieferte für die Reaktivierung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  und in Gegenwart von EDTA sehr ähnliche Geschwindigkeitskonstanten ( $\text{CaCl}_2$ :  $26.5 \pm 4.6 \text{ s}^{-1}$ ; EDTA:  $18.5 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$ ). Diese entsprachen in Näherung der schnellen Renaturierungsphase, wie sie in Fluoreszenz- und fern-UV CD-Kinetiken gemessen wurde.

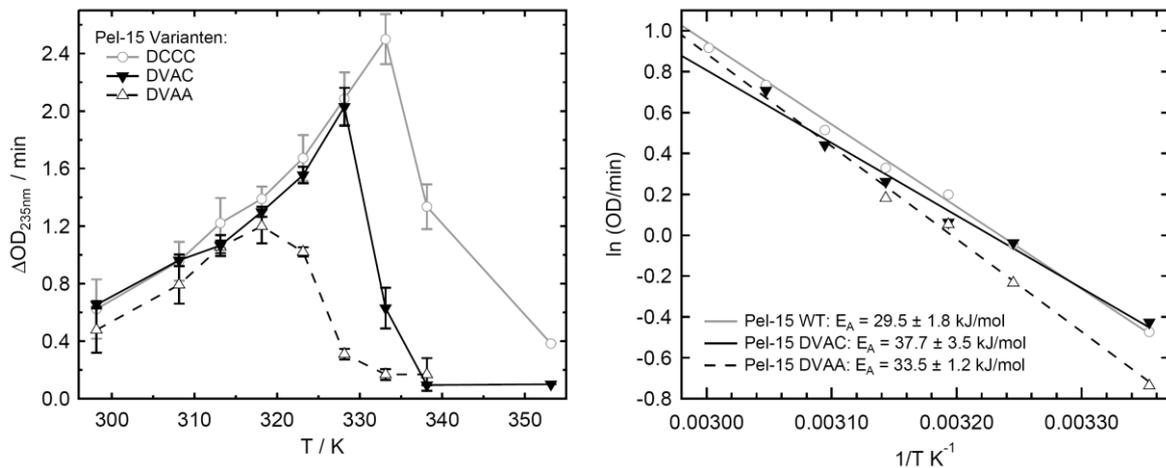


**Abb. 3-21: Reaktivierung von Pel-15WT**

Nach der Denaturierung in 5 M GdmCl wurde Pel-15WT in 0.52 M GdmCl renaturiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurde ein Aliquot des Rückfaltungsansatzes in 2 M GdmCl transferiert, um teilgefaltete Zustände wieder zu entfalten, native Spezies aber im gefalteten Zustand zu belassen. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte 2-3 h später bei einer Temperatur von 55 °C anhand der Änderung der Absorption bei 235 nm. Die Proteinkonzentration im Aktivitätstest betrug 0.35 µg/ml. Diese Daten entstammen der Zusammenarbeit mit Monika Walter.

### 3.4.3. Thermische Stabilität von Pel-15WT und der Varianten DVAC und DVAA

Die Temperaturabhängigkeiten der enzymatischen Aktivität von Pel-15WT, Pel-15 DVAC und DVAA wurden vergleichend untersucht. Kobayashi *et al.* hatten für Pel-15WT die maximale Enzymaktivität bei pH 10.5 und 55 °C ( $T_{opt}$ ) bestimmt. Nach mehrfach unabhängigen Wiederholungen ergab sich für Pel-15WT ein Temperaturoptimum von etwa 60 °C. Die Pel-15 Variante DVAC entfaltete



**Abb. 3-22: Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität von Pel-15WT, DVAC und DVAA**

Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte bei verschiedenen Temperaturen über die Zunahme der Absorption bei 235 nm (Absorptionsmaximum der während der PGA Spaltung entstehenden ungesättigten Galacturonosylreste). Die Proteinkonzentration im Aktivitätstest betrug 0.5 µg/ml. Vor Start der Messung wurde die Aktivitätstestlösung mindestens 2 min temperiert.

ihre maximale Aktivität bei etwa 55 °C, während diese im Fall der Dreifachmutante DVAA auf etwa  $T_{opt} = 45$  °C verschoben war. Unterhalb von 45 °C schien die Aktivität von DVAA generell niedriger zu sein als die von Pel-15WT und DVAC; eine zuverlässige Unterscheidung war aber im Rahmen der experimentellen Unsicherheiten nicht möglich. Aus den jeweiligen Zunahmen der enzymatischen Aktivität mit steigenden Temperaturen ließen sich gemäß der Arrhenius-Gleichung die Aktivierungsenergien  $E_A$  bestimmen (Abb. 3-22). Gemäß dieser Ergebnisse ist die Aktivierungsenergie für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes im Fall von Pel-15WT am geringsten. Die  $E_A$  von Pel-15 DVAC und DVAA sind im Rahmen des experimentellen Fehlers nicht voneinander zu unterscheiden.

Bei der thermischen Denaturierung von Pel-15 betrachtet man einen irreversiblen Prozess. Die Analyse der thermischen Denaturierung von Pel-15 anhand des fern-UV CD-Signales ergab während der Aufheizphase einen apparenten Schmelzpunkt, der die Befunde aus den Aktivitätstests bestätigte (Daten nicht gezeigt).

## 3.5. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Pel-15 Variante AVAA

### 3.5.1. Vorbemerkungen

Die Struktur des Pel-15 Wildtypproteins wurde im Jahr 2001 von Akita *et al.* veröffentlicht. Die publizierten Kristallisationsbedingungen waren 20 mg/ml Pel-15 in 50 mM MES, 28 % (w/v) Polyethylenglycol 8000, pH 6.7. Unter diesen Bedingungen und in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  in den Kristallisationsansätzen waren innerhalb weniger Tage zwei unterschiedliche Kristallformen entstanden (Typ I und Typ II), die beide der orthorhombischen Raumgruppe  $P2_12_12_1$  zuzuordnen gewesen waren und unterschiedlich gute Streuqualität besessen hatten. Die schlechter streuenden Typ-I-Kristalle hatten Reflexe in einem Auflösungsbereich zwischen 20.0 und 2.3 Å geliefert. Im abgeleiteten Strukturmodell war für die Seitenkettenreste E7, K20, N39 keine Elektronendichte gefunden worden. Kristalle des Typ-II hatten eine Auflösung von bis zu 1.5 Å erzielt. In diesem Fall war aufgrund hoher Beweglichkeiten für die Reste A1, R10, K20, E38, N39, K41 und K185 keine Entsprechung in der Elektronendichte gefunden worden.

Die cysteinfreie Pel-15 Variante AVAA enthält die Mutationen C67V, C71A, D80A und C148A. Sie besitzt etwa 50 % der enzymatischen Aktivität des Wildtyp-Proteins, bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit millimolarer Affinität und ist im Vergleich zum Wildtyp-Protein weniger resistent gegen das Denaturierungsmittel GdmHCl. Die Kristallisation von AVAA sollte klären, wie sich die eingeführten Mutationen auf die lokale Umgebung der Mutationsstelle auswirken.

### 3.5.2. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Durchführung der Kristallisation und die Lösung der Pel-15 AVAA Kristallstruktur erfolgte in Kooperation mit Dr. Yvette Roske aus der Arbeitsgruppe Prof. Udo Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch. Der Versuch, Pel-15 AVAA, und testweise auch Pel-15 WT, unter den publizierten Bedingungen mit der *sitting drop* Methode zu kristallisieren, lieferte für Pel-15WT sehr kleine, unregelmäßige Kristalle. Die Kristallisation von Pel-15 AVAA hatte auch nach mehrwöchiger Inkubation keinen Erfolg. Durch die systematische Veränderung der Kristallisationsbedingungen wurden geeignetere Bedingungen identifiziert. Pel-15 WT kristallisierte innerhalb weniger Tage in 0.1 M Natriumacetat, 3 M NaCl, pH 4.5 zu großen, regelmäßigen Kristallen. Pel-15 AVAA kristallisierte unter diesen Bedingungen zwar auch, allerdings waren die erhaltenen Kristalle wesentlich kleiner und unregelmäßiger, weshalb für die Mutanten zusätzliche Kristallisationsbedingungen getestet wurden. Für die Mutante erwies sich die Kristallisationsbedingungen 1 M Ammoniumsulfat, 1 % PEG 3350, 0.1 M BisTris, pH 5.5 als optimal. Nach erfolgreicher Kristallisation wurden die Kristalle aus den Kristallisationstropfen in glycerolhaltigen Kryopuffer transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Messung der Beugungsmuster durch Dr. Yvette Roske erfolgte unter Cryobedingungen (100 K) mit Synchrotronstrahlung am Helmholtz-Zentrum Berlin

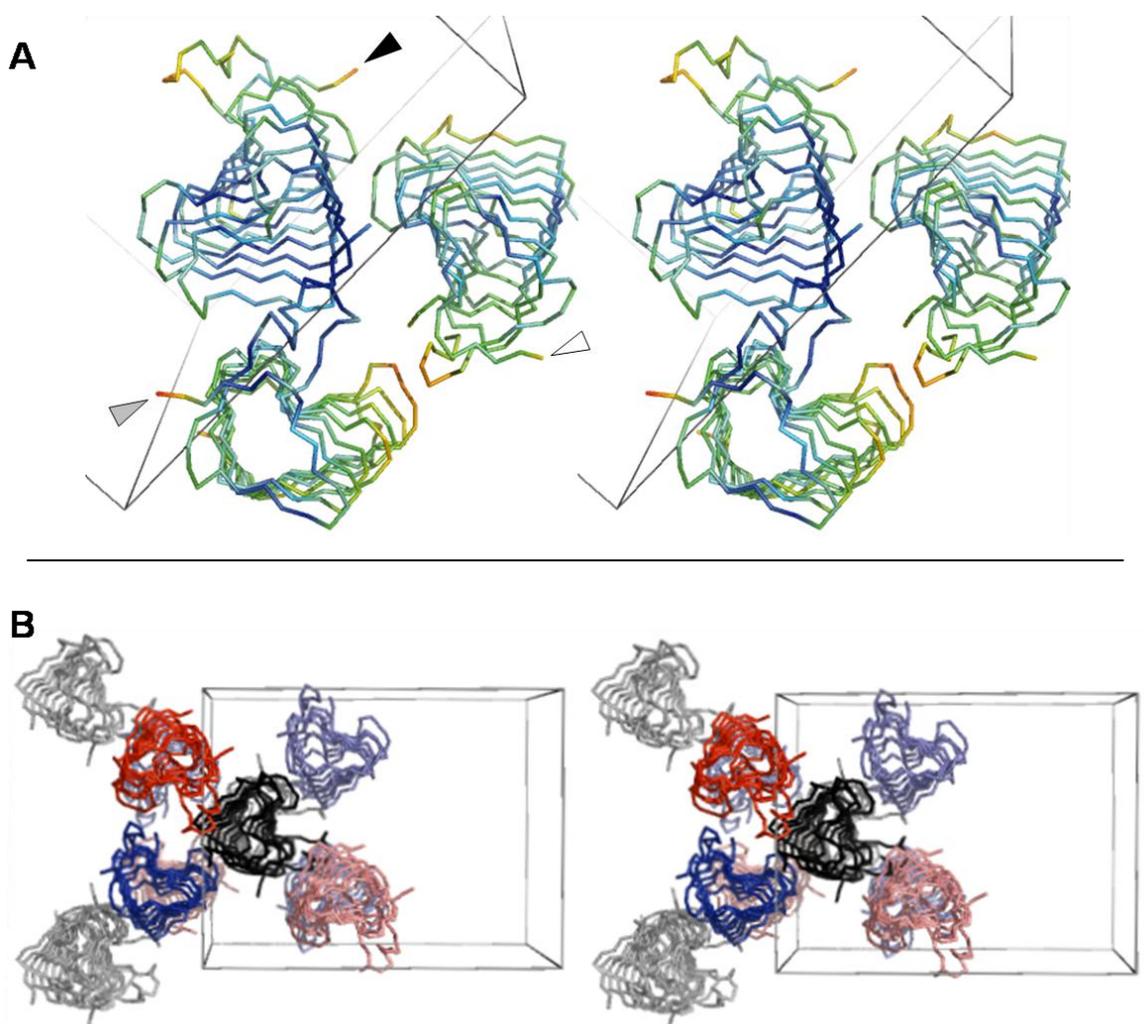
**Tabelle 3-8: Datensatz- und Verfeinerungsstatistik für die Strukturbestimmung von Pel-15 AVAA.**

Datensatz	
Raumgruppe	$C_{121}$ (monoklin, azentral)
Auflösung / Å	32.28 - 1.50
Einmalige Reflexe	108427
Vollständigkeit / %	96.12
Verfeinerungsstatistik ( <i>refinement statistics</i> )	
Dimension der Einheitszelle (Å)	
a	78.08
b	99.84
c	69.81
Ebenenwinkel ( $\alpha / \beta / \gamma$ ) / deg	90.00 / 89.96 / 90.00
Auflösungsbereich / Å	1.50 - 1.54
R-Faktor ( $R_{free}$ )	0.178 (0.265)
Mittlerer B-Wert / Å <sup>2</sup>	13.240
Anisotrope B-Werte / Å (B11 / B22 / B33 / B12 / B13 / B23)	6.56 / -8.90 / 2.34 / 0.00 / -0.44 / 0.00
Geschätzter Koordinatenfehler (basierend auf $F_{free}$ ) / Å	0.018
Korrelationskoeffizienten (F0-Fc) / (F0-Fc free)	0.944 / 0.919
rms Abweichungen vom Idealwert	
Bindungslängen / Å	0.018
Bindungswinkel / deg	1.7
cis Peptide	Ala59, Pro60
fehlende Elektronendichte	B-chain: pos.1, pos. 36-39

(ehem. BESSYII). Die Kristalle streuten sehr gut und lieferten Reflexe in einem Auflösungsbereich von 32.28 Å bis 1.38 Å. Für die Lösung der Struktur wurde ein Datensatz mit einer maximalen Streuqualität von 1.5 Å verwendet. Die Phasen der Strukturfaktoren wurden durch die Methode des molekularen Ersatzes bestimmt, indem die Struktur von Pel-15 WT als Modell genutzt wurde. Die Verfeinerungsrunden, die abschließende Kontrolle der Seitenkettenposition sowie die Optimierung des Modells durch die Positionierung von Heteroatomen lag in den Händen von Dr. Yvette Roske. Die Datensatz- und Verfeinerungsstatistiken sind in Tabelle 3-8 zusammengefasst.

### 3.5.2.1. Kristallpackung und strukturelle Besonderheiten von Pel-15 AVAA

Im Gegensatz zum Pel-15 Wildtypprotein ergab sich für die Einheitszelle von Pel-15 AVAA die monokline Raumgruppe C121, die durch ein azentrales Symmetriezentrum gekennzeichnet ist und deren Ebenen zueinander die Winkel  $\alpha = 90.00^\circ$ ,  $\beta = 89.96^\circ$  und  $\gamma = 90.00^\circ$  einnehmen. Die asymmetrische Einheit enthält im Unterschied zu Pel-15WT drei Moleküle (im Folgenden bezeichnet als

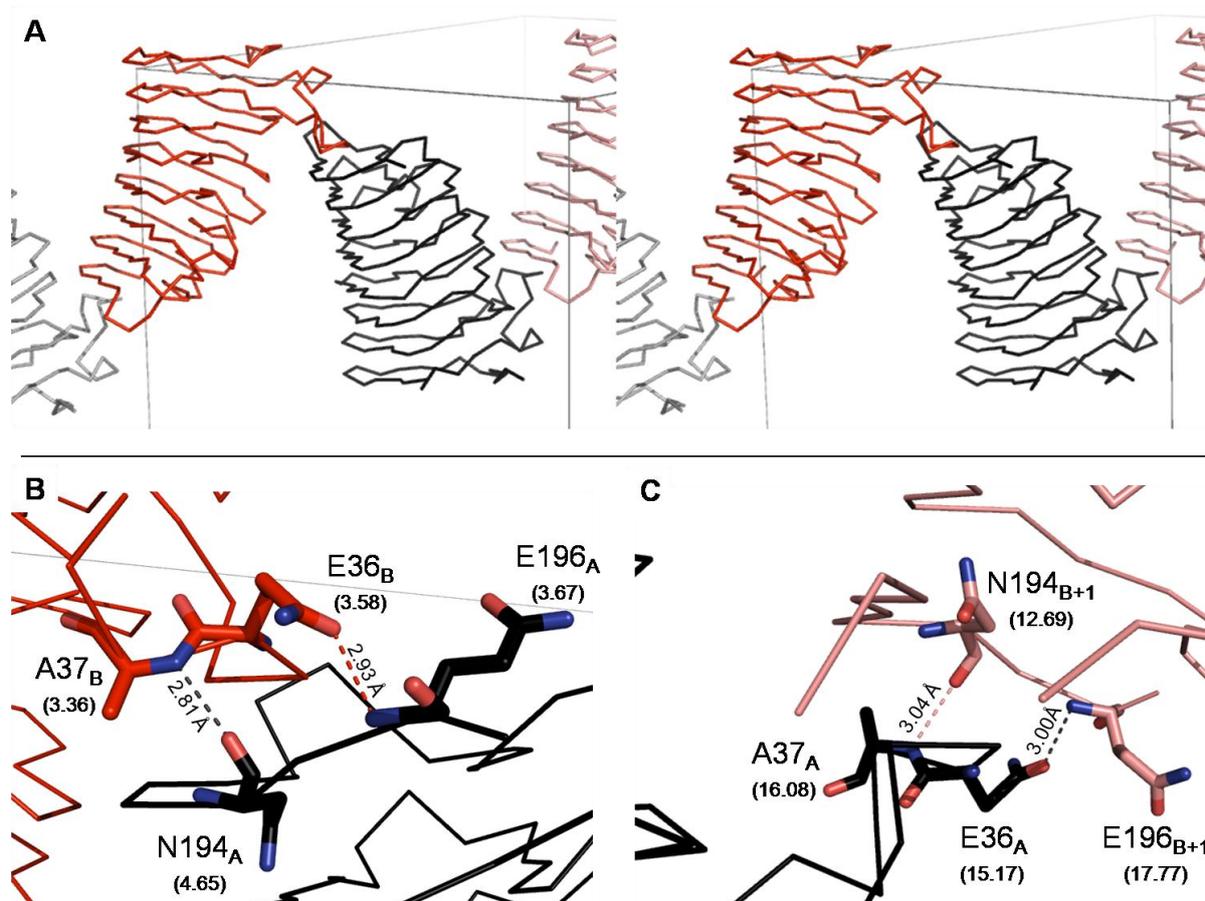


**Abb. 3-23: Kristallpackung von Pel-15 AVAA.** Stereodiagramme zur Veranschaulichung der Kristallpackung von Pel-15 AVAA. **(A)** Rückgrat-Repräsentation der Moleküle der asymmetrischen Einheit. Darstellung der B-Werte der  $\text{Ca}$ -Atome als Farbverlauf von *rot* (heiß) bis *blau* (kalt). Pfeile kennzeichnen die N-Termini der Ketten A (*schwarz*), B (*grau*) und C (*weiß*). **(B)** Lage der Ketten der asymmetrischen Einheit in Bezug zu ihren nächsten Symmetrieverwandten. *Schwarz*: A-Kette, *Rot*. B-Kette, *Blau*: C-Kette. Die jeweiligen Symmetrieverwandten sind blässer gefärbt.

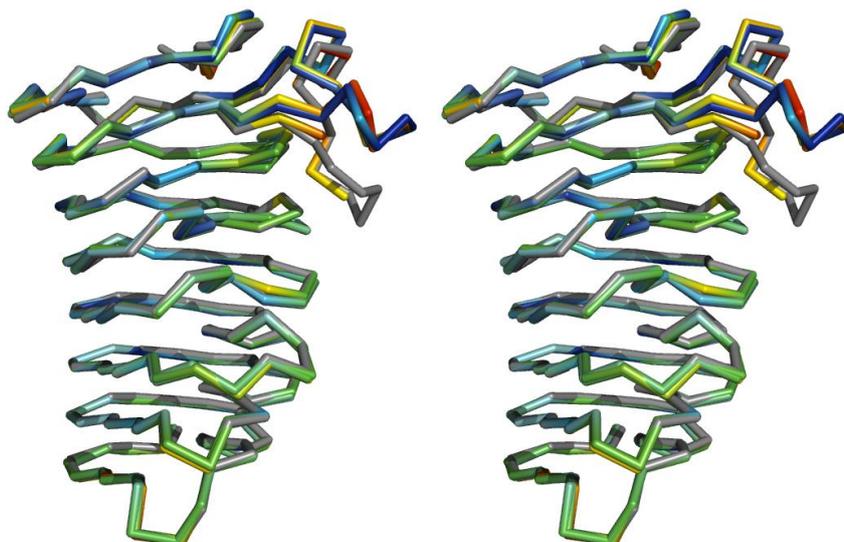
Ketten A, B und C). Strukturelemente der Ketten A, B und C werden nachfolgend in der Form  $XX_A$ ,  $XX_B$  und  $XX_C$  angegeben.

In der C-Kette konnte für die in T3/2 enthaltenen Reste  $Q36_C$ ,  $A37_C$ ,  $E38_C$  und  $N39_C$  sowie für den N-terminalen Rest  $A1_C$  keine Elektronendichte gefunden werden. Bei der Verfeinerung der Struktur wurden Besetzungszahlen von 0.2 / 0.8, 0.7 / 0.3 und 0.5 / 0.5 zugelassen. In der B-Kette wurde u.a. den Atomen des Seitenkettenrests  $V67_B$  Besetzungszahlen von 0.5 zugewiesen. Eine Übersicht über Reste mit alternativen Konformationen oder fehlender Elektronendichte ist in Tabelle A1 im Anhang gegeben.

Ausgehend von der Zahl der Reste mit alternativen Konformationen erscheint die C-Kette rigider zu sein als die Ketten A und B. In ihr wurden nur die Atome der Seitenketten  $I9_C$ ,  $R45_C$  und  $S90_C$  mit Besetzungszahlen von 0.5 markiert. Auch bei der vergleichenden Überlagerung der WT-Struktur ist die Abweichung der Positionen der Rückgratome für Kette C am geringsten. Vergleicht man Rigidität der einzelnen Ketten allerdings anhand der  $C\alpha$ -Temperaturfaktoren, ist die A-Kette weitaus steifer als die Ketten B und C. Dies ist mit Blick auf die Position dieser Kette im Kristall verständlich.



**Abb. 3-24:** (A) Stereodiagramm zur Veranschaulichung intermolekularer Wechselwirkung der Ketten A (schwarz) und B (rot) mit ihren benachbarten Symmetrieverwandten  $A_{-1}$  (grau) bzw.  $B_{+1}$  (lachs). Die Interaktion erfolgt in beiden Fällen über den flexiblen T3/2 turn, der sehr wahrscheinlich ohne eine solche Interaktion nicht auflösbar gewesen wäre. (B) Detailansicht der Interaktionsfläche T3/2<sub>B</sub>-C'<sub>A</sub>. Die gesamte Kontaktfläche ist vergleichsweise starr. (C) Detailansicht der Interaktionsfläche T3/2<sub>A</sub>-C'<sub>B+1</sub>. Die Flexibilität dieser Kontaktfläche ist insgesamt deutlich höher. Klammerangaben bezeichnen die B-Werte der jeweiligen  $C\alpha$ -Atome in  $\text{\AA}^2$ .



**Abb. 3-25:**  $\alpha$ -überlagerte Rückgratstrukturen der Ketten A, B und C der asymmetrischen Einheit der Pel-15 AVAA Kristallstruktur mit der Rückgratstruktur des Pel-15 WT Proteins (grau). Der Farbverlauf illustriert die Temperaturfaktoren der  $C\alpha$  Atome. Der N-Terminus befindet sich oben.

Unter den angegebenen Kristallisationsbedingungen richten sich die Pel-15 AVAA Moleküle entlang ihrer Helixachse aus (Abb. 3-23), wie dies bereits in den Typ-II Kristallen von Pel-15 WT beobachtet worden war. Im Gegensatz zum Wildtyp sind allerdings die Kristallkontakte bei Pel-15 AVAA nicht auf die Termini der  $\beta$ -Helix beschränkt, sondern schließen auch einige laterale Kontakte zu benachbarten Symmetriepartnern ein. Die Ketten B und C haben im Kristall die gleiche Orientierung, d.h. ihre C- und N-Termini weisen grob in die gleichen Raumrichtungen. Die A-Kette liegt in umgekehrter Orientierung im Kristall, wodurch ihr C-Terminus mit dem flexiblen  $T3/2$ -turn einer benachbarten A-Kette interagieren kann (AB-Packung). Diese A-Kette packt ihrerseits mit dem C-Terminus gegen den  $T3/2$ -turn einer benachbarten B-Kette (BA-Packung) usw. (Abb. 3-24).

Nach Anwendung entsprechender Symmetrieeoperationen wurden die Abstände der Seitenketten des C-Terminus und des  $T3/2$  Bereiches untersucht. Als Ergebnis stellte sich heraus, dass die besondere Art der intermolekularen Interaktion zwischen C-Terminus und  $T3/2$  durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Seitenketten Q36 ( $T3/2$ ) und E197 (C,) bzw. A37 ( $T3/2$ ) und N194 (C,) stabilisiert wird. An der Kontaktfläche  $T3/2_A-C'_B$  betragen die Abstände zwischen den Bindungspartnern 3.00 Å bzw. 3.04 Å. Die Bindungspartner an der Kontaktfläche  $T3/2_B-C'_A$  sind 2.93 Å und 2.81 Å voneinander entfernt und damit wesentlich fester. Dieser Umstand spiegelt sich auch in den Temperaturfaktoren der Bindungspartner wieder. Sie sind auf ein Maß reduziert, das sich sonst nur in den sehr zentralen Windungen der  $\beta$ -Helix findet.

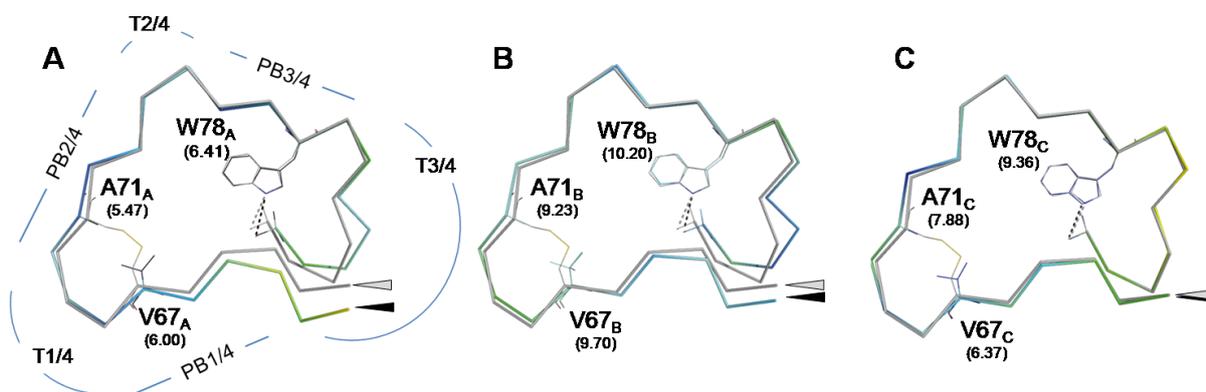
### 3.5.3. Einfluss der Punktmutationen C67V, C71A und C148A auf die strukturelle Integrität von Pel-15

Die Mutationspositionen 67 und 71 betreffen die in Pel-15 enthaltene Disulfidbrücke. Grundsätzlich ist der Einfluss der eingeführten Punktmutationen auf die Gesamtstruktur von Pel-15 AVAA gering.

Dies war angesichts der nachweislich vorhandenen niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung und der 50 %igen residualen Enzymaktivität erwartet worden.

### Mutationspositionen 67 und 71

Bei genauerer Betrachtung der Positionen 67 und 71 fiel allerdings auf, dass der Abstand zwischen den Mutationspositionen 67 und 71 in allen drei Ketten im Vergleich zum Wildtyp-Protein erweitert ist (Tabelle 3-9). Der Grund hierfür liegt in einer Relaxation des Bindungswinkels um G69, dem zentralen Rest des „umklammerten“ T1/3-turns. Dieser ist im WT-Protein erheblich kleiner als in AVAA. Die Torsionswinkel an den Mutationspositionen 67 und 71 liegen alle in erlaubten Bereichen des Ramachandran-Diagramms und unterscheiden sich nur geringfügig in den einzelnen Ketten der asymmetrischen Einheit. Für die Berechnung des optimalen H-Brückennetzwerkes wurde das Web-Interface von WHATIF verwendet (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). Trotz der veränderten Position der Rückgrat-Atome ergab sich für alle drei Ketten im Bereich der Mutationspositionen ein wildtyp-artiges H-Brückenmuster. Auch die Wasserstoffbrücke zwischen dem Rückgratcarbonyl-sauerstoffatom von G69 zu einem begrabenen Wasser in der Höhe des T1/2 turns war in AVAA in allen Ketten der asymmetrischen Einheit konserviert.



**Abb 3-26: Auswirkung der Doppelmutation C67V, C71A auf die strukturelle Integrität von Pel-15 AVAA.** Die Farbverläufe geben die Temperaturfaktoren der  $\text{C}\alpha$ -Atome wieder (rot = heiß, blau = kalt). Überlagerung der WT-Struktur zur Veranschaulichung der Verschiebung von PB1/4 und T3/4. Die zwischen den Resten W78 und A85 ausgebildete Brücke hat eine Länge von 3.35 Å (Kette A), 3.02 Å (Kette B) und 2.89 Å (Kette C). Umklammerte Zahlen bezeichnen B-Werte der betreffenden  $\text{C}\alpha$ -Atome in Å<sup>2</sup>.

**Tabelle 3-9: Einfluss der Mutationen C67V und C71A auf die Geometrie des T3/2 Turns:**

	WT	Kette A	Kette B	Kette C
Rückgrat - Torsion				
Position 67	phi -119.5	-124.4	-125.7	-128.9
	psi 128.8	126.0	127.3	119.0
Position 71	phi -156.3	-159.6	-158.4	-154.4
	psi 139.3	159.7	157.9	154.5
Rückgrat - Position				
$\text{C}\alpha$ -Bindungswinkel (Y68-G69-D70)	126.5°	133.9° (+ 7.4°)	131.4° (+ 4.9°)	128.3° (+ 1.8°)
$\text{C}\alpha$ -Distanz 67-71 (Å)	6.13	7.09 (+ 0.95)	7.01 (+ 0.88)	6.85 (+ 0.72)

### Mutationsposition 80

Die Mutationsposition 80 betrifft den an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beteiligten Aspartylrest. Er wurde gegen Alanin ausgetauscht, was die hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung nachweislich vollständig deletiert. Im Bereich des an D80 angrenzenden T3-*turns* ist eine deutlich erhöhte Beweglichkeit des Peptidrückgrates zu verzeichnen. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit hängt dies nicht mit der Entfernung der Disulfidbrücke zusammen, sondern geht auf die deletierte hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle zurück. Im WT-Protein existiert ein wasservermittelter H-Brückenkontakt zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  und dem flexiblen T3/2 *turn*. Außerdem wird durch die Koordination des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions auf der Oberfläche die Ausbildung von zwei Salzbrücken zwischen D80 und K103 ermöglicht, was die lokale, konformationelle Stabilität noch erhöhen dürfte. In diesem Zusammenhang ist anzunehmen, dass der Verlust der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung letztlich auch Konsequenzen für die Lagebeziehung von A85 zu W78 hat (Abb 3-26).

Die zwischen dem Indolstickstoff von W78 und dem Carbonylsauerstoff von A85 ausgeprägte H-Brücke ist in Kette A mit 3.35 Å deutlich länger als in Pel-15WT (+ 11.6%) und genaugenommen nicht mehr als stabilisierende H-Brücke zu bezeichnen. In der B-Kette entspricht die Länge der H-Brücke mit 3.02 Å etwa der H-Brücke im WT Protein, wengleich auch hier die der Seitenketten stark verschoben ist. Im Fall der C-Kette ist die H-Brücke dagegen um 0.11 Å (-3.6 %) kürzer als das Original.

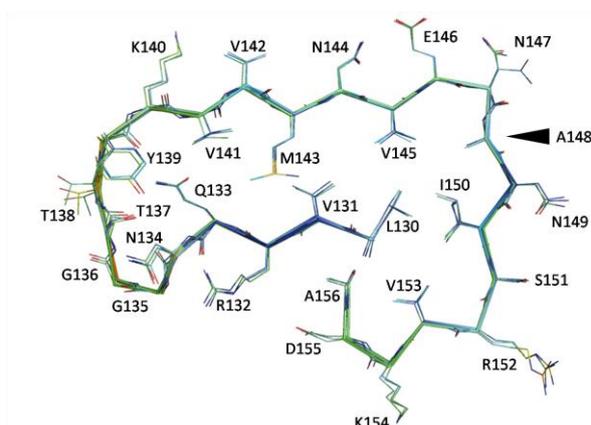
### Mutationsposition 148

Die Mutationsposition 148 betrifft den in Pel-15WT begrabenen, freien Cysteinrest. Die Mutation C148A hat keinen Einfluss auf die Position der Rückgratotope (Abb. 3-27). Der B-Wert des  $\text{C}\alpha$ -Atoms an der Austauschpositionen 148 ist in der B-Kette leicht erhöht ( $B(\text{A148}_B) = 9.45 \text{ \AA}^2$ ), während er in den Ketten A und C jeweils eine vergleichsweise geringe Beweglichkeit des Rückgrats belegt

( $B(\text{A148}_A) = 5.84 \text{ \AA}^2$ ,  $B(\text{A148}_C) = 5.86 \text{ \AA}^2$ ).

Das H-Brückennetzwerk entsprach in allen drei Ketten dem des WT-Proteins. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse hat die Entfernung des begrabenen Thiolrests an Position 148 keine Auswirkung auf die Struktur des Proteins, und es wird nicht evident, warum sich die Temperaturoptima der Enzymaktivität von Pel-15 DVAA und Pel-15 DVAC um 20 K unterscheiden.

Seitenkettenpositionen in benachbarten Helixwindungen verhielten sich unauffällig in Bezug auf mögliche Umlagerungen oder die Einnahme alternativer Konformationen, aus



**Abb. 3-27: Auswirkung der Mutation C148A**

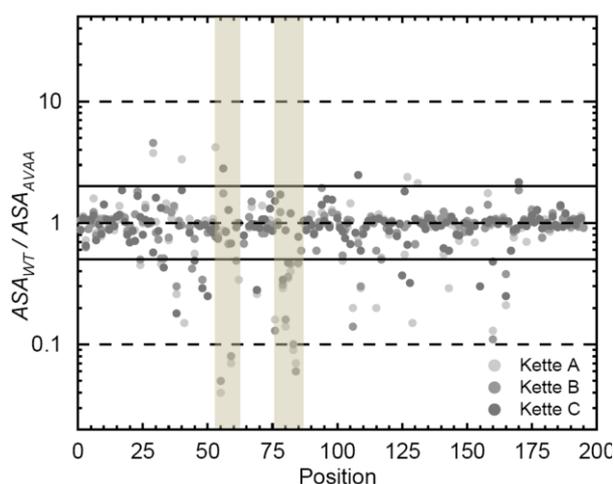
Überlagerte Rückgratkonformationen der Positionen 130 bis 156 in den Ketten A, B und C mit farblicher Darstellung der jeweiligen B-Werte der  $\text{C}\alpha$ -Atome (rot=heiß; blau = kalt). Eine mutationsbedingte Abweichung vom WT lässt sich nicht erkennen.

denen Hinweise auf einen lokalen Rigiditätsverlust zu entnehmen wären. Alle Seitenketten um die Mutationsposition herum lagen in WT-ähnlichen Konfigurationen vor.

### 3.5.4. Theoretische Lösungsmittelzugänglichkeit im Vergleich zwischen Pel-15 WT und Pel-15 AVAA

Die *ASA*-Berechnungen wurden auf den Web-Servern des Protein interfaces, surfaces and assemblies service PISA des European Bioinformatics Institute durchgeführt (Krissinel & Henrick 2007), ([http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)).

Unterschiede der Lösungsmittelzugänglichkeit von Seitenketten in WT und Mutante liefern Informationen über die Güte der hydrophoben Packung eines Proteins (Bhardwaj & Gerstein 2009). Je kleiner die Werte für *ASA* sind, desto geringer ist der Anteil des betrachteten Rests an der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Proteins. Da die Berechnung der *ASA*-Werte die vollständigen Seitenketten betrachtet, lassen sich aufgrund der besonderen Architektur von  $\beta$ -Helixproteinen in diesen Strukturmotiven kaum vollständig begrabene Reste finden, und geringste Abweichungen der Seitenkettenpositionen können teils erhebliche Unterschiede in der theoretisch zugänglichen Oberfläche bewirken. Aus diesem Grund wurden nur solche Reste als verstärkt lösungsmittelzugänglich eingestuft, deren *ASA*-Werte sich in den Strukturen von Pel-15 WT und Pel-15 AVAA um mehr als 1 Größenordnung unterscheiden. Dies betrifft zum einen die Seitenketten in PB3/2 (Positionen 55 bis 60) und in T3/4 (Positionen 80 bis 85), beschränkt sich also auf den Bereich um die Mutationsposition D80 (Abb. 3-28, grau hinterlegte Bereiche). Es ist offensichtlich,



**Abb. 3-28: Relative Lösungsmittelzugänglichkeit der Seitenketten in Pel-15 AVAA.** Waagerechte, durchgezogene Linien kennzeichnen den Bereich, innerhalb dessen sich die *ASA*-Werte um den Faktor 2 vom WT unterscheiden. Unterbrochene Linien kennzeichnen den Bereich, außerhalb dessen die *ASA*-Werte von WT und AVAA um mehr als eine Größenordnung voneinander abweichen. Grau hinterlegte Bereiche weisen auf Sequenzabschnitte hin, die besonders starken Fluktuationen unterworfen sind. Näheres im Text.

dass die erhöhte Lösungsmittelzugänglichkeit dieser Reste mit der erhöhten Flexibilität des T3/2-turns zu erklären ist.

Um das Ausmaß der hydrophoben Interaktionen abzuschätzen, in die ein Seitenkettenrest eingebunden ist, besteht die Möglichkeit, für jede Aminosäure die Höhe der theoretischen Solvatisierungsenthalpie ( $\Delta G_s$ ) zu berechnen, die sich bei dem Transfer aus ihrer nativen Position in eine ideale hydrophobe Umgebung ergibt. Durch Berechnungen dieser Art ließen sich zwischen den Kristallstrukturen von Pel-15 WT und Pel-15 AVAA keine zuverlässig interpretierbaren Unterschiede feststellen.

## 3.6. Kinetische Charakterisierung von Pel-15

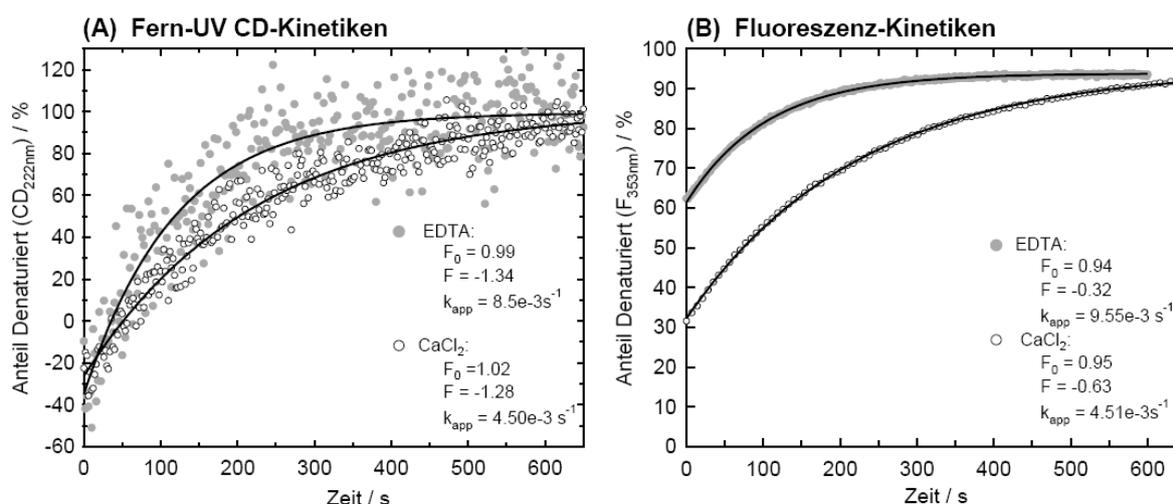
### 3.6.1. Die Entfaltungsreaktion von Pel-15 in GdmHCl

Die Entfaltungsreaktion von Pel-15 wurde mittels fern-UV- und mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, nacheinander vorgestellt. Die erhaltenen apparenten Entfaltungsgeschwindigkeiten sind im Entfaltungsast des Pel-15 WT Chevron-Plots (Abb. 3-31B) zusammengefasst.

#### 3.6.1.1. Charakterisierung der Entfaltung mittels Fern-UV CD-Spektroskopie

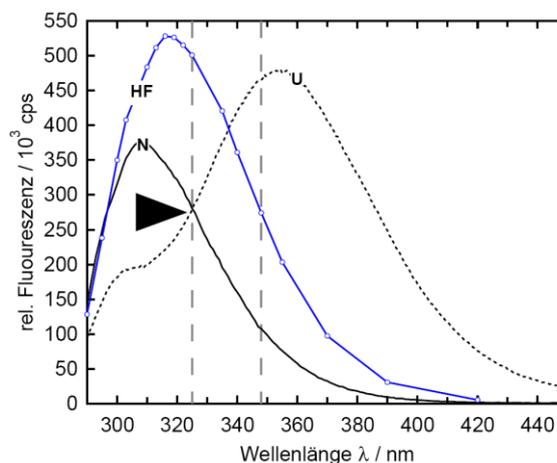
In fern-UV CD-Kinetiken stellte sich die Entfaltung von Pel-15 als monoexponentieller Prozess dar. An der Entfaltung in 6.0 M GdmHCl ist dies beispielhaft dargestellt (Abb. 3-29). Die Entfaltung von Pel-15 WT war in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> grundsätzlich langsamer als in Gegenwart von 1 mM EDTA. Unter keiner der getesteten Bedingungen war bei den CD-Entfaltungskinetiken eine Totzeitamplitude zu beobachten. Vor dem Hintergrund, dass in Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken ausgeprägte Totzeitamplituden ausgeprägt waren, ist dies ein sehr wichtiger Hinweis darauf, dass sich der wesentliche Sekundärstrukturverlust während der Entfaltung bei der Reaktion von HF zu U vollzieht, das also N und HF ähnliche Sekundärstrukturen ausprägen müssen.

Obwohl die fern-UV CD-Kinetiken der Anpassung an monoexponentielle Zusammenhänge genügten, ließ ihre Auftragung im Entfaltungsast des Chevron-Plots eine leicht abwärts gerichtete Krümmung erkennen (Abb. 3-31B). Ein solcher Effekt wird typischerweise durch das Auftreten mehrerer Teilreaktionen erklärt, deren Geschwindigkeitskonstanten unterschiedliche Denaturierungsmittelabhängigkeiten aufweisen (Chan & Dill 1998). Da die Krümmung im betrachteten Konzentrationsbereich vergleichsweise gering ausfiel, ließ sich der Effekt bei der Berechnung der theoretischen Halbwertzeit



**Abb. 3-29: Denaturierung von Pel-15 WT in 6.0 M GdmHCl** (25 mM MOPS, pH 7.0, 1 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 1 mM EDTA, 6.0 M GdmHCl; 20 °C): Durchgezogene Linien sind das Ergebnis monoexponentieller Anpassungen. **(A) Fern-UV CD-Kinetiken.** (Bandbreite: 1 nm; Integrationszeit: 1 s) Detektion der Elliptizität bei 322 nm, Einleitung der Denaturierung durch 1:20 Verdünnung auf 50 µg/ml (2.48 µM) Pel-15. **(B) Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken.** Detektion bei 348 nm; Einleitung der Denaturierung durch 1:100 Verdünnung auf 14 µg/ml (0.67 µM) Pel-15 WT). Die Totzeitamplituden der Denaturierung waren bei allen GdmHCl-Konzentrationen ungefähr konstant.

(HWZ) der Denaturierung in Abwesenheit von GdmHCl zunächst vernachlässigen. Die Entfaltungssteigungen der Entfaltungsreaktion in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. EDTA besitzen sehr ähnliche Steigungen. Dies lässt vermuten, dass die Übergangszustände der Entfaltungsreaktion in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  und EDTA in sehr ähnlicher Weise durch das Denaturierungsmittel beeinflusst werden. Daher wurde bei der Berechnung der HWZ ein gemeinsamer (= globaler) Anstieg verwendet. Die HWZ der Entfaltung war in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  etwa um einen Faktor 2 größer als in Gegenwart von 1 mM EDTA (Tabelle 3-10). Weiterhin wurde durch die Extrapolation deutlich, dass der Entfaltungsast der Entfaltungsreaktion in Anwesenheit von EDTA gegenüber der  $\text{Ca}^{2+}$ -beeinflussten Entfaltung um etwa 0.56 M GdmHCl in Richtung niedrigerer GdmHCl-Konzentrationen verschoben ist. Dieses Ergebnis zeigt eine stärkere Destabilisierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Pel-15 an, als dies aus den Übergangsmittelpunkten der Faltungs- und Entfaltungsübergänge von Pel-15 WT (Abb. 3-9, S. 57) zu schlussfolgern gewesen wäre. Dies korrespondiert sehr gut mit den Ergebnissen zur Gleichgewichtsfaltung des Pel-15 Pseudo-Wildtyps DCCA (vgl. Abschnitt 3.3.3.4, S. 65).



**Abb. 3-30: Fluoreszenzspektren von Pel-15WT** in 25 mM MOPS, pH 7.0. Vergleich der Spektren nativer (N) und in 3 M GdmCl denaturierter (U) Pel-15 mit dem Spektrum des Intermediates (HF). Die Berechnung von HF erfolgte durch die globale Anwendung des 3-Zustandsmodells auf 17 Wellenlängen (290 – 420 nm) des Pel-15 Entfaltungsübergangs. Die senkrechten, unterbrochenen Linien kennzeichnen die Wellenlängen 325 nm und 348 nm, bei denen die Faltungskinetiken detektiert wurden. Der Pfeil markiert den Isofluoreszenzpunkt zwischen N und U.

### 3.6.1.2. Charakterisierung der Pel-15 WT-Entfaltung mittels Fluoreszenzspektroskopie

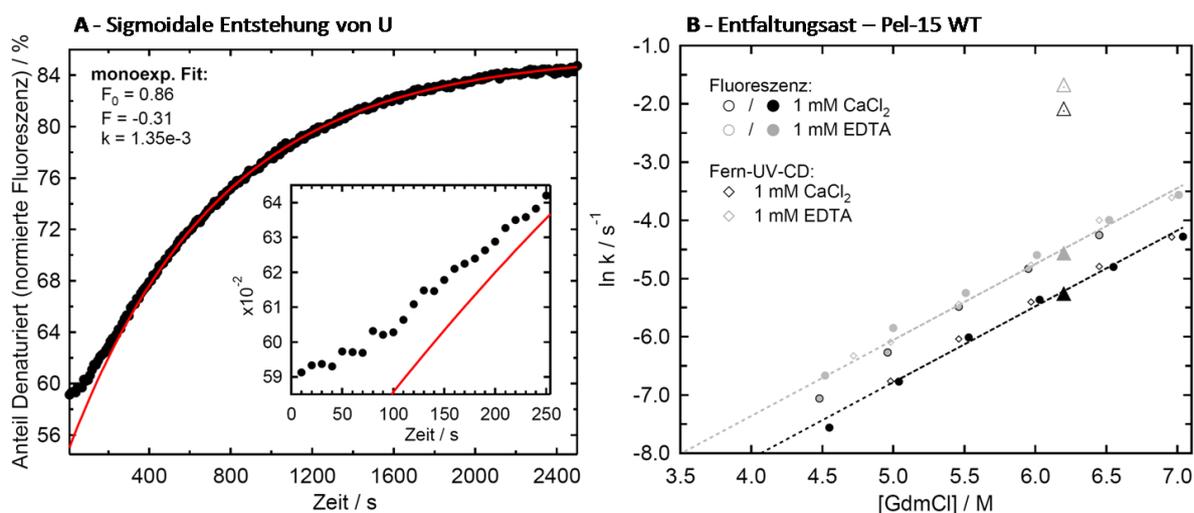
*Vorüberlegung: Welche Wellenlängen sind für die Beobachtung der Faltungsreaktion interessant?*

Die Gleichgewichtsfaltungs- und Entfaltungsexperimente aller Pel-15 Varianten weisen auf die Existenz eines Faltungsintermediates hin, das in Gegenwart von Guanidin und in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  induziert wird. Das Fluoreszenzspektrum dieses Intermediates, wie es sich nach seiner Berechnung mit einem linearen 3-Zustandsmodell darstellt, unterscheidet sich deutlich von den Spektren der nativen (N) und der denaturierten (U) Form des Proteins (Abb. 3-30). Es fluoresziert im Wellenlängenbereich zwischen 310 nm und 420 nm stärker als N. Aus diesem Grund wird das Intermediat als **HF** bezeichnet. Bei einer Emissionswellenlänge von 325 nm, dem Isofluoreszenzpunkt zwischen N und U ließ sich die Zu- bzw. Abnahme von HF selektiv charakterisieren, da sich die Signale von U und N an dieser Stelle nicht verändern. Messungen im langwelligen Fluoreszenzbereich (353 nm) waren geeignet, die Totzeitamplituden quantitativ zu bestimmen und daraus Rückschlüsse auf den Anteil von HF in der nativen Probe zu ziehen.

### Entfaltungssreaktion im langwelligen Emissionsbereich (353 nm)

In der Fluoreszenz stellte sich die Entfaltung von Pel-15 WT als mehrphasige Reaktion mit einer schnellen und mindestens einer langsamen Entfaltungsphase dar. Die schnelle Entfaltungsphase wurde als Totzeitamplitude detektiert. Ihr Anteil am Gesamtsignal betrug in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  etwa 30 % und in Gegenwart von 1 mM EDTA etwa 60 %. Der zeitlich auflösbare Teil der Pel-15 Entfaltung ließ sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Eine Entfaltungskinetik, wie sie im langwelligen Fluoreszenzbereich typischerweise gefunden wurde, ist in Abb. 3-29B für den Fall der Denaturierung in 6.0 M GdmHCl abgebildet.

Wurde die Denaturierung von Pel-15 WT bei niedrigen GdmHCl-Konzentrationen ( $< 5.0$  M) durchgeführt, verkomplizierten sich die Entfaltungskinetiken zu sigmoidalen Zusammenhängen, in denen die Bildung von U um etwa 100 s verzögert mit einer *lag*-Phase entstand (Abb. 3-31). In diesem Fall wurde die monoexponentielle Regression erst ab 550 s vorgenommen. Sigmoidale Kinetiken wurden auch in früheren Experimenten zur Pel-15 Entfaltung von Monika Walter gefunden (Walter, unveröffentlichte Ergebnisse). Dass es sich bei diesem sigmoidalen Verlauf nicht etwa um eine artifizielle Beobachtung handelt, die auf fehlerhafte Mischmethoden o.ä. zurückzuführen ist, wurde



**Abb. 3-31: (A) Sigmoidale Pel-15 WT Fluoreszenz - Entfaltungskinetik von 14  $\mu\text{g/ml}$  Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0; 20  $^{\circ}\text{C}$ ; Detektion bei 353 nm. (B) Entfaltungssast des Pel-15 WT Chevron-Plots: Vergleich der Denaturierungsreaktion von Pel-15 WT in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM EDTA. Unterbrochene Linien geben das Ergebnis der linearen Regression der logarithmierten  $k_{app}$  der Entfaltung wieder; der Anstieg  $m_{global} = 1.30 \pm 0.03 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$  wurde für beide Entfaltungssäste global angepasst. Dreieckige Symbole kennzeichnen die schnellen und langsamen  $k_{app}$  der Entfaltung, die mittels inverser Doppelsprungtechnik bestimmt wurden (grau: EDTA, schwarz:  $\text{CaCl}_2$ ).**

**Tabelle 3-10: Entfaltungsgeschwindigkeiten von Pel-15 WT in Abwesenheit von GdmHCl (20  $^{\circ}\text{C}$ )**

Detektionsmethode	Entfaltung in 1 mM EDTA		Entfaltung in 1 mM $\text{CaCl}_2$	
	$k_{app}$ ( $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )	HWZ / h	$k_{app}$ ( $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ )	HWZ / h
Fluoreszenz	5.36	35.8	1.52	126.8
Fern-UV CD	4.19	45.9	2.46	78.4
global bestimmt (methodenunabhängig)	3.45	55.7	1.67	115.3

**Anmerkung:** Die für die Bestimmung der Halbwertszeiten (HWZ) notwendige lineare Extrapolation erfolgte unter Vernachlässigung der Abwärtskrümmung, die teilweise in den Entfaltungssästen beobachtet wurde.

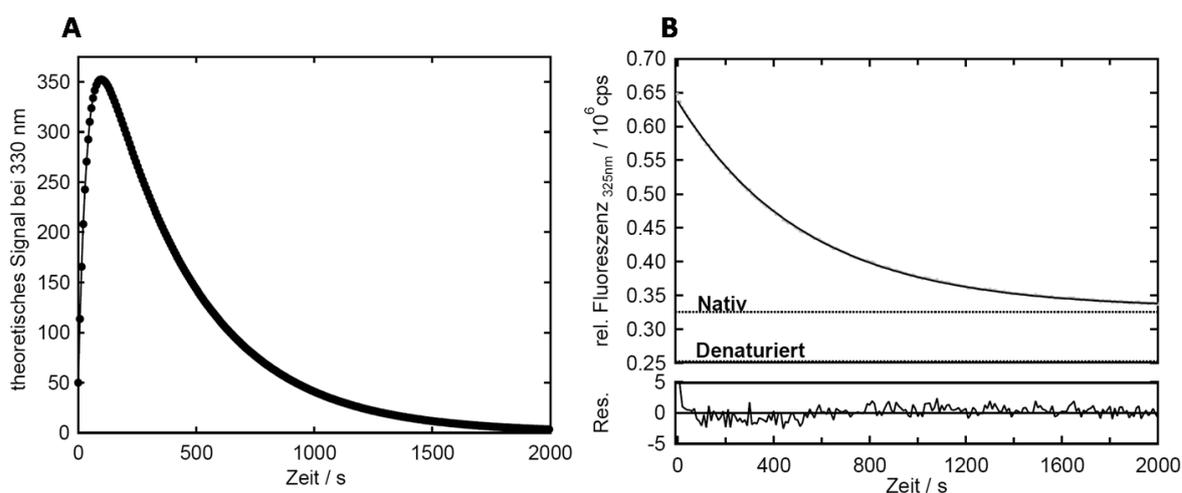
durch die Anwendung unterschiedlicher Mischtechniken und die Messung der Entfaltung in unterschiedlichen Küvettentypen nachgewiesen.

Wenn der denaturierte Zustand von Pel-15 in einer sigmoidalen Kinetik entsteht, so ist dies ein sicheres Anzeichen dafür, dass das Faltungsintermediat HF im Faltungsweg von Pel-15 eine *on-pathway* Position einnimmt (vgl. Diskussion Abschnitt 4.2.1.1, S. 115).

Die in Tabelle 3-10 angegebenen apparenten Raten bzw. Halbwertszeiten der Denaturierung in Abwesenheit von GdmHCl wurden durch eine einfache, lineare Extrapolation der Entfaltungsäste des Pel-15 Chevron-Plots in den Gleichgewichtsbereich ermittelt. Die leichte Krümmung der Entfaltungsäste wurde hierbei vernachlässigt. Für die Pel-15-Entfaltung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  entspricht das Extrapolationsergebnis einer HWZ von ca. 16 Stunden. Das Auftreten der apparenten Hysterese zwischen den Pel-15-Faltungs- und Entfaltungsübergängen in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  (vgl. Abb. 3-9, S. 57) steht diesem Ergebnis klar entgegen. Dies kann bedeuten, dass eine lineare Extrapolation der Entfaltungsraten nicht zulässig ist, weil die Struktur des Übergangszustandes sehr stark von der Denaturierungsmittelkonzentration abhängt. Alternativ ließe sich annehmen, dass Faltung und Entfaltung über alternative Wege verlaufen und dass in beiden Wegen intermediäre Konformationen existieren, die in Abhängigkeit von  $\text{CaCl}_2$  unterschiedlich stark populiert werden.

#### Entfaltungsreaktion bei 325 nm (Beobachtung eines HF-Zustands während der Entfaltung)

Bei einer linearen Entfaltungsreaktion der Form  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF} \rightleftharpoons \text{U}$ , wie sie sich in den sigmoidalen Denaturierungskinetiken im langwelligen Fluoreszenzbereich andeutet, erwartet man für Messungen von Faltungs- und Entfaltungskinetiken am Iso-Fluoreszenzpunkt von N und U anhand der Fluoreszenzspektren aus Abb. 3-30 einen Signalverlauf, wie er modellhaft in Abb. 3-32A dargestellt



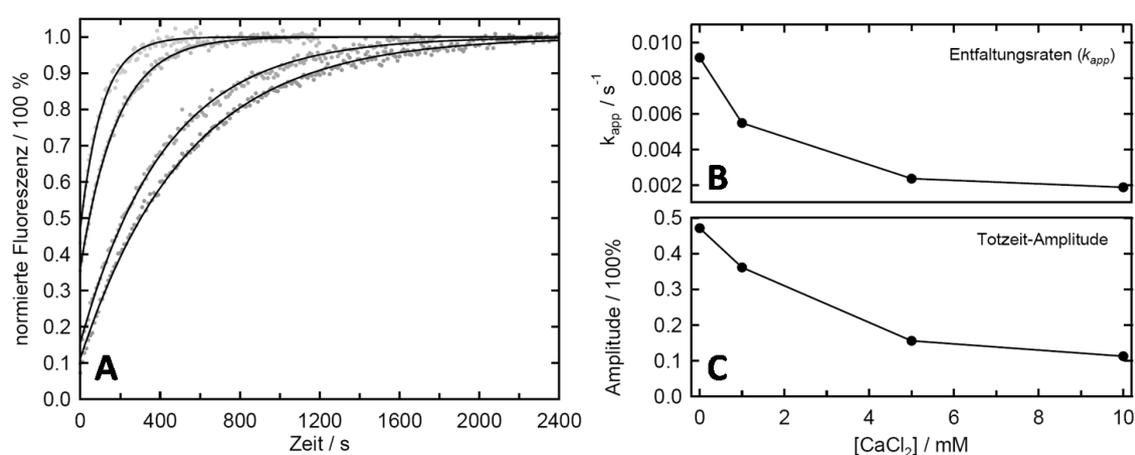
**Abb. 3-32:** (A) Hypothetische biexponentielle Kinetik der Form  $F = F_0 + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$  ( $A_1 = -450.000$  cps;  $k_1 = 0.025$  s $^{-1}$ ;  $A_2 = 500.000$  cps;  $k_2 = 0.005$  s $^{-1}$ ) mit  $k_2$  im Bereich der langsamen Entfaltungsphase von Pel-15 WT. Die schnelle Phase der Entfaltung gerät ab ca.  $k_1 > 0.5$  s $^{-1}$  in die Totzeit manueller Mischung (ca. 2 - 3 s) (B) Fluoreszenz-Entfaltungskinetik von Pel-15 WT (25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0, 20 °C; Detektion: 325 nm) Die durchgezogene Linie zeigt das Ergebnis einer monoexponentiellen Regression. Die Residuen bestätigen die Gültigkeit dieses Modells.

ist. Ist die Entwicklung des Zwischenzustandes im Vergleich zur Mischzeit schnell, verschwindet ein Großteil der Amplitude in der Totzeit des Mischvorganges, sodass nur der zweite Teil der Reaktion erfasst wird. Um den ersten Teil der Reaktion zu erfassen, muss die Mischzeit verkürzt bzw. die ablaufende Reaktion verlangsamt werden.

Die Messung von Kinetiken bei 325 nm bestätigte die Existenz eines hyperfluoreszenten, transient populierten Totzeit-Intermediates in der Entfaltungsreaktion von Pel-15. Beispielhaft ist dies in Abb. 3-32B für die Denaturierungskinetik bei ca. 5.0 M GdmHCl gezeigt. Der zeitlich auflösbare Teil der Kinetik ließ sich in guter Näherung monoexponentiell beschreiben, und die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten lagen in sehr guter Übereinstimmung mit den Entfaltungsraten, die bei 353 nm bestimmt worden waren.

### *Einfluss von $\text{CaCl}_2$ auf die Entfaltungsgeschwindigkeit und auf die Totzeitamplitude*

Um den Einfluss von  $\text{CaCl}_2$  auf die Entfaltungsreaktion zu systematisieren, wurde Pel-15 WT in Gegenwart von verschiedenen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen durch 6 M GdmHCl denaturiert. Als Sonde für die Denaturierung diente die Tryptophanfluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 353 nm. Im zeitlich aufzulösenden Bereich waren alle aufgezeichneten Denaturierungskinetiken durch monoexponentielle Funktionen zu beschreiben. Totzeitamplituden belegten darüber hinaus die Existenz mindestens einer schnell entfaltenden Spezies. In Gegenwart von 1 mM EDTA betrug die Totzeitamplitude 50 % des Gesamtsignals. Unter Berücksichtigung der Intensitätsverhältnisse von N, HF und U entsprach dieses Ergebnis recht genau der Erwartung (vgl. Abb. 3-45; S. 104). Mit zunehmenden  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen nahm die Totzeitamplitude stetig ab und betrug bei der Entfaltung in Gegenwart von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  nur noch ca. 10 % des Gesamtsignals. Gleichzeitig wurde durch die Erhöhung der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration eine Reduktion der apparenten Entfaltungsraten erzielt. Es stellte sich heraus, dass eine zehnfache Steigerung der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration sowohl die Totzeitamplitude als auch die



**Abb. 3-33: (A) Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken von Pel-15WT bei variablen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen** (10.2  $\mu\text{g/ml}$  (0.57  $\mu\text{M}$ ) Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 0.2 mM EDTA, 6.2 M GdmHCl, pH 7.0, 20 °C;  $\lambda_{em} = 353$  nm). Messwerte sind als Punkte dargestellt, schwarze Linien zeigen die Ergebnisse der monoexponentiellen Regression. Die Kinetiken wurden in Gegenwart von (v.l.n.r.) 0, 2, 5 und 10 mM  $\text{CaCl}_2$  aufgezeichnet. **(B) Entfaltungsgeschwindigkeiten** in Abhängigkeit von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, bestimmt durch monoexponentielle Regression der Entfaltungskinetiken. **(C) Fluoreszenz -Amplituden** der dargestellten Denaturierungskinetiken in Abhängigkeit von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration (Die Daten entstammen der Zusammenarbeit mit Monika Walter).

Entfaltungsgeschwindigkeit etwa um den Faktor 5 reduziert.

Legt man ein lineares Faltungsmodell zu Grunde, wie es in den Gleichgewichtsfaltungsexperimenten verwendet wurde (vgl. Abschnitt 3.3.3.3, S. 60), bedeutet dies, dass der native Zustand von Pel-15 in Gegenwart von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  und 6 M GdmHCl qualitativ 5 mal stabiler ist als das schnell entfaltende, kinetische Intermediat.

Obgleich diese Ergebnisse aus qualitativer Sicht das Faltungsmodell von Pel-15 zu stützen scheinen, ergibt sich bei quantitativer Näherung ein Widerspruch zu den übrigen Faltungsdaten. Im Diskussions- teil wird dieser Sachverhalt näher beleuchtet (vgl. Abschnitt 4.2.3.2, S. 120).

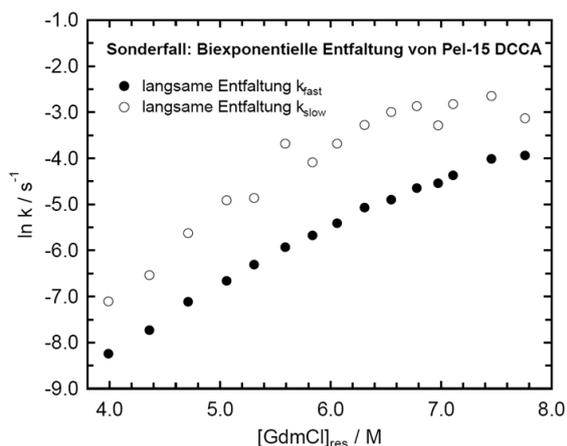
### **3.6.2. Kinetische Stabilität der Pel-15 Varianten DCCA und DVAA**

Um den Einfluss der Disulfidbrücke auf die kinetische Stabilität von Pel-15 zu untersuchen, wurden Denaturierungskinetiken mit den Cystein-Austauschvarianten DCCA und DVAA vorgenommen. Hinter der Bezeichnung DCCA verbirgt sich die Einfach-Mutante C148A. DVAA ist eine Dreifach-Mutante, die die Punktmutationen C67V, C71A und C148A enthält. Die Entfaltungskinetiken von DCCA, DVAA und AVAA wurden im Bereich der jeweiligen Iso-Fluoreszenzpunkte zwischen N und U bei den Wellenlängen 330 nm (DVAA / AVAA) bzw. 320 nm (DCCA) vorgenommen. Die kinetischen Stabilitäten der Mutanten DVAA und AVAA waren nicht zu unterscheiden, weshalb sich bei der Ergebnisdarstellung auf die Präsentation der Entfaltungsreaktion von DVAA beschränkt wird. Wie im Fall des WT-Proteins entstand während der Entfaltungskinetiken von DCCA und DVAA ein hyperfluoreszentes Intermediat in der Totzeit des Mischens (Repräsentative Denaturierungskinetiken von DCCA und DVAA finden sich in den Anhängen B1 und B2.). Wie im Fall von Pel-15WT relaxierte die Fluoreszenz anschließend im zeitlich erfassbaren Bereich mit einer langsamen, monoexponentiellen Kinetik. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten, die aus der Anpassung dieser Kinetiken gewonnen wurden, sind in den Entfaltungsästen der Chevron-Plots von Pel-15 DVAA und DCCA in Abb. 3-35 dargestellt.

#### **3.6.2.1. Kinetische Stabilität von Pel-15 DCCA**

Die Chevron-Entfaltungsäste der Mutante DCCA liegen in sehr guter Übereinstimmung mit den Geschwindigkeitskonstanten, die für das Wildtyp-Protein bestimmt wurden. Unabhängig von der Gegenwart oder Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zeigten beide Entfaltungsäste eine deutliche, abwärts gerichtete Krümmung. Die Entfaltungsgeschwindigkeit in Abwesenheit von Denaturierungsmittel ist in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  gegenüber der Entfaltung in EDTA ungefähr um den Faktor 2 erhöht.

Als Besonderheit der DCCA-Entfaltung ließen sich die langsamen HF-Relaxationskinetiken in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  biexponentiell anpassen. Hierdurch wurde eine zusätzliche schnellere Entfaltungsphase identifiziert. Im DCCA-Chevron Plot stellte sich diese als zusätzlicher Entfaltungsast dar, dessen Anstieg dem der langsamen Entfaltungsphase sehr ähnlich war (Abb. 3-34). Bei Denaturierungsmittelkonzentrationen von mehr als 6.5 M GdmHCl wichen beide Entfaltungsäste in vergleichba-



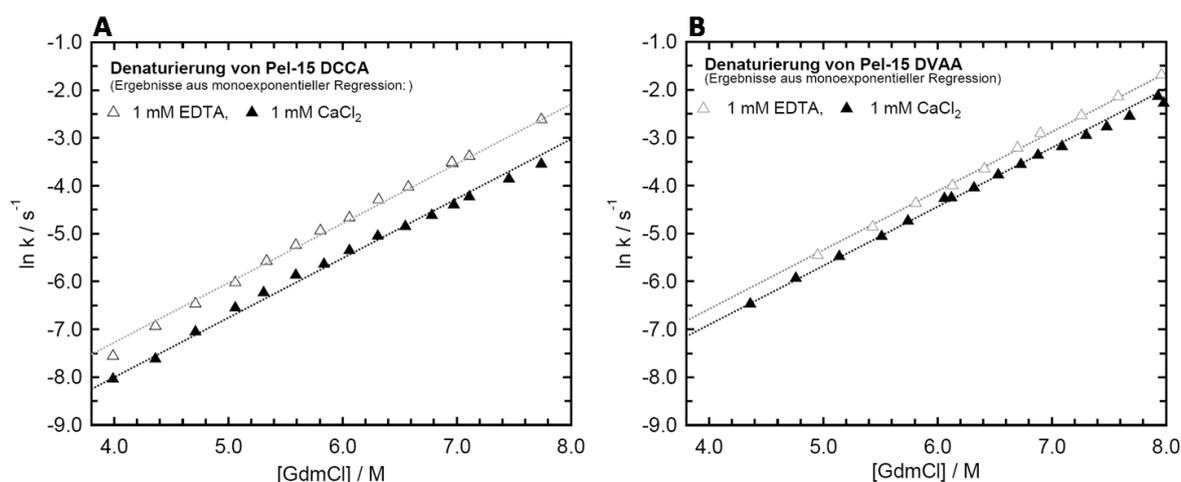
**Abb. 3-34: Chevron-Entfaltungssast von DCCA bei biexponentieller Regression der Entfaltungskinetiken.**

In Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  ließ sich die HF-Relaxation der DCCA-Entfaltung durch einen biexponentiellen Zusammenhang darstellen. In diesem Fall ergab sich zu der normalerweise beobachteten Relaxationsphase (gefüllte Kreise) eine schnellere Phase (offene Kreise) mit ähnlicher Denaturierungsmittelabhängigkeit.

rer Weise von einem linearen Zusammenhang ab. Die Amplitude der zusätzlich ermittelten, schnelleren Entfaltungsphase lag unabhängig von der GdmHCl-Konzentration bei etwa 15 % des Gesamtsignals.

### 3.6.2.2. Kinetische Stabilität von Pel-15 DVAA

Die Entfaltung von DVAA erlaubte nur die gesicherte Beschreibung einer exponentiellen Faltungsphase. Der Entfaltungssast im DVAA-Chevron-Plot (Abb. 3-35) ließ nur für die Denaturierung



**Abb. 3-35: Entfaltungssäste der Chevron-Plots von Pel15 DCCA und DVAA**

(Entfaltungsbedingungen: 25 mM MOPS, 1 mM EDTA bzw. 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0, 20 °C) Die dargestellten Geschwindigkeitskonstanten stammen aus monoexponentiellen Regressionen. *Offene Dreiecke*: Entfaltungsgeschwindigkeit in Gegenwart von 1 mM EDTA; *geschlossene Dreiecke*: Entfaltungsgeschwindigkeit in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$ . Gepunktete Linien stellen das Ergebnis der linearen Extrapolation auf 0 M GdmHCl dar. Die DCCA- bzw. DVAA-Entfaltungssäste wurden jeweils mit einem global bestimmten Wert für die Steigung ( $m$ ) extrapoliert.

**Tabelle 3-11: Entfaltungsgeschwindigkeiten von DCCA und DVAA in Abwesenheit von GdmHCl**

Mutante	1 mM EDTA		1 mM $\text{CaCl}_2$		$m / \text{sM}^{-1}$ (global bestimmt)
	$k_{app} (10^{-6} \text{ s}^{-1})$	HWZ / h	$k_{app} (10^{-6} \text{ s}^{-1})$	HWZ / h	
DCCA	$4.8 \pm 1.2$	$40.4 \pm 10.5$	$2.3 \pm 0.6$	$83.7 \pm 22.1$	$1.24 \pm 0.02$
DVAA	$12.6 \pm 2.8$	$15.3 \pm 3.4$	$8.7 \pm 1.9$	$22.2 \pm 4.8$	$1.19 \pm 0.01$

Anmerkung: Die für die Bestimmung der Halbwertzeiten (HWZ) notwendige lineare Extrapolation erfolgte unter Vernachlässigung der Abwärtskrümmung, die teilweise in den Entfaltungssästen beobachtet wurde.

in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  eine leichte Krümmung erkennen. Die EDTA-bestimmte Entfaltung wich auch bei sehr hohen GdmHCl-Konzentrationen nicht vom idealen „Chevron-Verhalten“ ab, was bedeutet, dass  $\text{HF}_{\text{DVAA}}$  in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  etwas langsamer entfalten muss, als Gegenwart von EDTA. Grundsätzlich wurde die Entfaltungsgeschwindigkeit von DVAA durch die Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  allerdings nur geringfügig beeinflusst. Die HWZ der Entfaltung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  und in Abwesenheit von Denaturierungsmittel war gegenüber der Entfaltung in Anwesenheit von EDTA lediglich um das 1.4fache verringert. Die Totzeitamplituden der DVAA-Entfaltungskinetiken zeigten keine Abhängigkeit von der GdmHCl-Konzentration. Ihre Amplitude in Anwesenheit von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  war gegenüber der Entfaltung in 1 mM EDTA etwa um das 1.3fache erhöht.

Die kinetische Stabilität von DVAA beträgt in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  etwa 25 % der Stabilität von Pel-15 WT bzw. DCCA (vgl. HWZ der Entfaltung bei 0 M GdmHCl, Tabelle 3-11). Die Steigung der DVAA-Entfaltungsäste war geringer als im Fall der anderen Mutanten – ein Hinweis darauf, dass der Übergangszustand der  $\text{HF}_{\text{DVAA}}$ -Entfaltung stärker durch GdmHCl destabilisiert wird als die Übergangszustände, die sich bei der Entfaltung von  $\text{HF}_{\text{WT}}$  bzw.  $\text{HF}_{\text{DCCA}}$  einstellen.

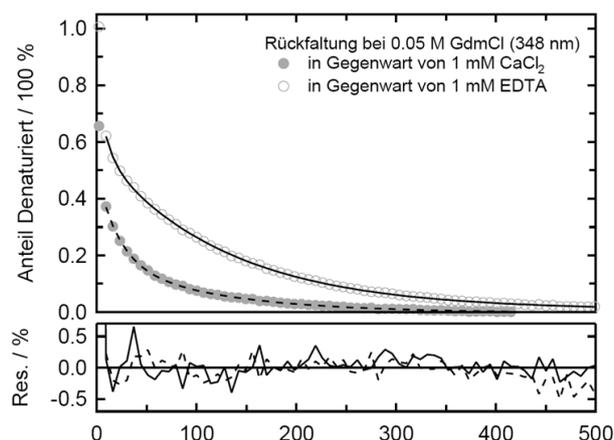
### **3.6.3. Die Rückfaltungsreaktion aus GdmHCl**

Die Rückfaltung von Pel-15 WT wurde bei den Wellenlängen 348 nm und 325 nm gemessen. Die Messungen an beiden Positionen waren konsistent in Bezug auf die Anzahl und die Dimensionen der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten. Die Rückfaltungsreaktion von Pel-15 bestand im Wesentlichen aus zwei unterschiedlichen Teilreaktionen, von denen eine der spontanen Entstehung von HF und eine der langsamen Relaxationsreaktion entspricht. Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse, die aus den Messungen bei 325 nm und bei 348 nm erhalten wurden, getrennt dargestellt. Die Messergebnisse der fern-UV CD-Kinetiken werden am Ende des Kapitels vorgestellt.

#### **3.6.3.1. Die Rückfaltungsreaktion von Pel-15 WT in der Fluoreszenz**

##### *Die Rückfaltungsreaktion im langwelligen Emissionsbereich (348 nm)*

Bei 348 nm ließen sich zwei Rückfaltungsphasen beobachten. Nach Einleitung der Rückfaltung in Gegenwart von EDTA sank das Signal zunächst schnell ( $k_{\text{fast}} > 5$  s in 50 mM GdmHCl) auf das Niveau des Zwischenzustands ab (Abb. 3-37) und relaxierte dann in einer langsameren Reaktion auf das Fluoreszenzniveau des entfalteten Zustands. Eine Totzeitamplitude war bei 348 nm nicht zu beobachten. In Gegenwart von EDTA ließen sich die Rückfaltungskinetiken bei 348 nm in guter Näherung durch die Summe aus zwei Exponentialfunktionen beschreiben. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  stellte sich die Rückfaltung qualitativ sehr ähnlich dar; allerdings wichen die Residuen auch bei biexponentieller Regression der Daten systematisch ab, was einen Hinweis auf die Existenz einer weiteren Rückfaltungsphase darstellen könnte. Der Versuch einer triexponentiellen Regression der Rückfaltungskinetiken lieferte keine eindeutig zu interpretierenden Ergebnisse.



**Abb. 3-36: Fluoreszenz-Rückfaltungskinetiken** von Pel-15 WT (Detektion bei 348 nm; 25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. EDTA, 0.05 M GdmHCl, pH 7.0, 20 °C) Durchgezogene Linien zeigen die Ergebnisse biexponentieller Regressionen unter Vernachlässigung des ersten Messwertes.

Sowohl in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  als auch in Gegenwart von EDTA unterschieden sich die Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und der langsamen Faltungsphase bei Abwesenheit von GdmHCl etwa um eine Größenordnung (Tabelle 3-12). Die Raten werden daher mit  $k_{fast}$  und  $k_{slow}$  bezeichnet. Sie sind als „schneller Faltungsast“ und als „langsamer Faltungsast“ in den Pel-15 Chevron-Plot eingetragen (Abb. 3-38, S. 94).

i) *Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{fast}$  der schnellen Rückfaltungsphase (schneller Faltungsast)*

Im Bereich unterhalb von 0.4 M GdmHCl ließen die schnellen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{fast}$  unter beiden Rückfaltungsbedingungen ( $\text{Ca}^{2+}$  bzw. EDTA) jeweils einen ausgeprägten *roll-over* Effekt erkennen, was wiederum ein Hinweis auf die Existenz einer weiteren Faltungsphase sein kann.

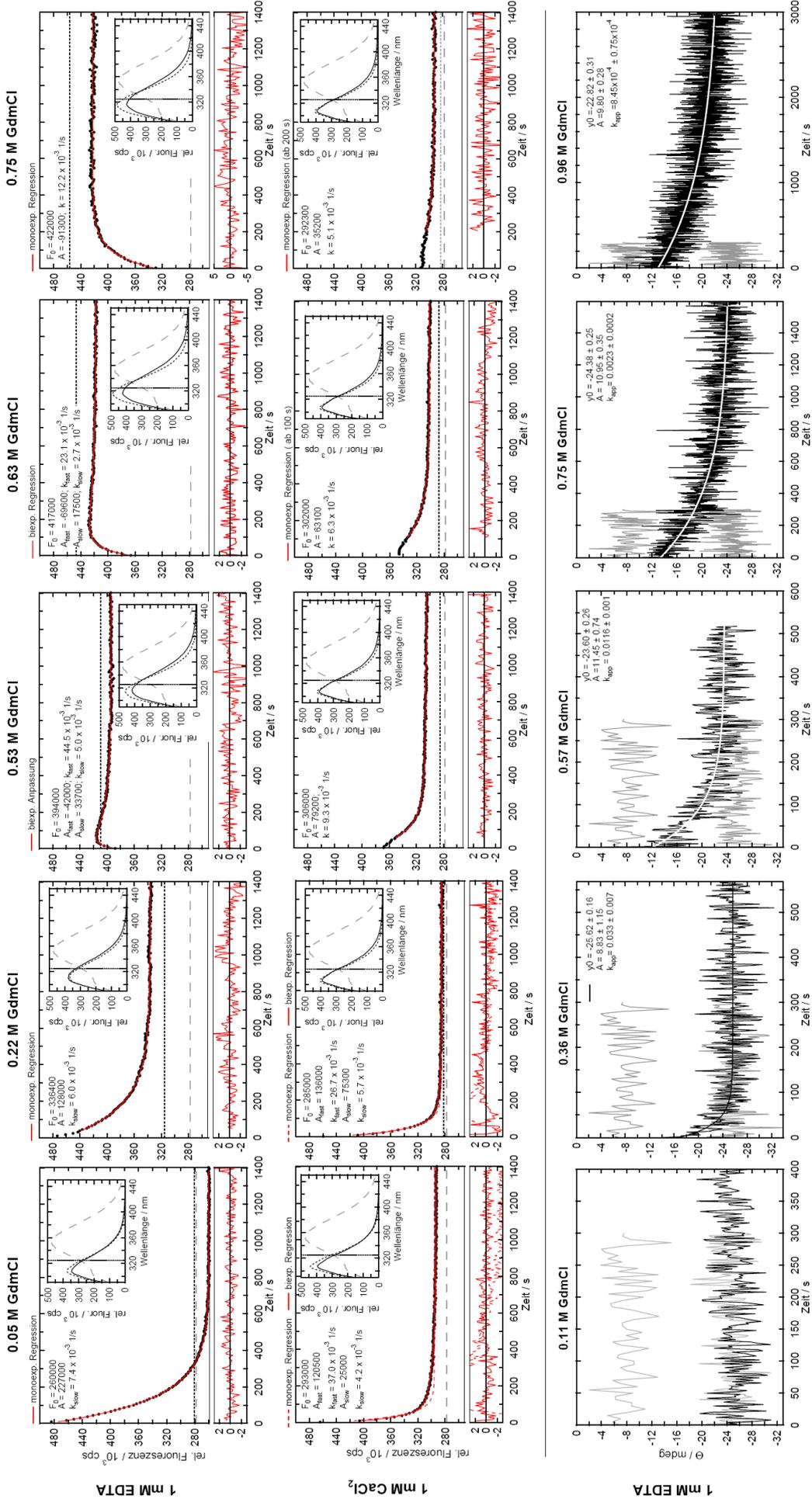
Oberhalb von 0.4 M GdmHCl zeigten die schnellen Faltungsreaktionen von Pel-15 ein typisches „Chevron-Verhalten“, das darauf hindeutet, dass der Übergangszustand der betrachteten Reaktion ( $\text{HF}^\#$ ) weniger native, stabilisierende Kontakte ausprägen kann, als der Endzustand (HF) (O'Brien *et al.* 2009). Die Extrapolation der linearen Teile der Faltungsäste auf entfernte GdmHCl-Konzentrationen lieferte Schnittpunkte mit den extrpolierten Entfaltungsraten. Im Fall von  $\text{CaCl}_2$  lag dieser bei  $1.62 \pm 0.01$  M und im Fall von EDTA bei  $1.52 \pm 0.01$  M GdmHCl (Pfeile in Abb. 3-38).

ii) *Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_{slow}$  der langsamen Rückfaltungsphase (langsamer Faltungsast)*

Die Beträge der langsamen Faltungsphasen  $k_{slow}$  waren für die Rückfaltung in  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber der Rückfaltung in EDTA nur geringfügig erhöht (Faktor 1.4) und wiesen deutlich geringere GdmHCl-Abhängigkeiten auf als die schnellen Faltungsraten. In Abwesenheit von Denaturierungsmittel war die langsame Phase der Rückfaltungsreaktion etwa eine Größenordnung langsamer als die schnelle Rückfaltungsphase.

*Die Rückfaltungsreaktion im kürzerwelligen Emissionsbereich (325 nm)*

Die Messung von Kinetiken am isofluoreszenten Punkt von N und U eignete sich sehr gut, um die sprungartige Entstehung und die sich anschließende langsame Relaxation der Hyper-Fluoreszenz (HF) während der Rückfaltungsreaktion getrennt von anderen Effekten zu beobachten (vgl. Abb. 3-30).



**Abb. 3-37: GdmHCl-abhängige Rückfaltungskinetiken von Pel-15 WT bei verschiedenen Rückfaltungsbedingungen. Obere Reihe: Fluoreszenz-Kinetiken, detektiert bei 325 nm.** Rückfaltung von 10  $\mu\text{g/ml}$  Pel-15 in 25 mM MOPS, pH 7.0 in Gegenwart von 1 mM EDTA. Ab einer Konzentration von ca. 0.45 M GdmCl kann die schnelle Faltungsreaktion zeitlich aufgelöst als separate exponentielle Phase beschrieben werden. Die Faltung bei 0.75 M GdmCl ist hier durch eine einzige exponentielle Phase angepasst. **Mittlere Reihe: Fluoreszenz-Rückfaltungskinetiken von Pel-15 WT in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .** Deutliche Ausprägung eines „HF“-Zustandes innerhalb der Totzeit des Mischens auf das 1.6fache der Native-Fluoreszenz. Mit steigender  $[\text{GdmCl}]_{\text{res}}$  nimmt die Gesamtamplitude stark ab. Zwischen 0 s und 100 s tritt eine lag-Phase aus der Kinetiken zunehmend sigmoidal erscheinen. Mit (\*) markierte Daten waren erst nach Ablauf der angegebenen Zeitspanne mit einer monoexponentiellen Kinetik zu beschreiben. *Insets:* Darstellung der als Native- und Denaturierungskontrollen gemessenen Fluoreszenzspektren. Schwarze, durchgezogene Linien zeigen Spektren, die nach Messung der Kinetik aufgezeichnet wurden. **Untere Reihe: nah-UV CD-Rückfaltungskinetiken von 50  $\mu\text{g/ml}$  Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0.** Detektion der Elliptizität bei 222 nm. Durchgezogene schwarze bzw. weiße Linien zeigen jeweils das Ergebnis der Anpassung der Faltungskinetiken an eine Reaktion 1. Ordnung. Die ermittelten Fit-Parameter sind in den jeweiligen Diagrammen zusammengefasst. (Die CD-Daten wurden freundlicherweise von Monika Walter zur Verfügung gestellt.)

Bei geringstmöglichen GdmHCl-Konzentrationen (50 mM GdmHCl) nahm die Fluoreszenzintensität innerhalb der Totzeit um das 1.9fache (1 mM EDTA) bzw. das 1.6fache (1 mM CaCl<sub>2</sub>) zu.

In Abb. 3-36 (obere und mittlere Reihe) sind einige repräsentative Rückfaltungskinetiken dargestellt, wie sie sich in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> bzw. EDTA bei 325 nm darstellen. Es zeigt sich, dass zwischen beiden Rückfaltungsbedingungen wesentliche Unterschiede bestehen. Im Fall der Rückfaltung in Gegenwart von EDTA ließen sich die HF-Abklingkurven bei allen GdmHCl-Konzentrationen monoexponentiell beschreiben; die Geschwindigkeitskonstanten lagen in sehr guter Übereinstimmung mit den langsamen Rückfaltungsraten, die bei 348 nm detektiert wurden. Unter Ca<sup>2+</sup>-Bedingungen war dies nicht der Fall. Hier ergab sich die Relaxation von HF bis zu einer Konzentration von 0.35 M GdmHCl als biphasische Reaktion (vgl. Abb. 3-36, mittlere Reihe). Das bedeutet zwingend, dass die Rückfaltung von Pel-15 in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> insgesamt durch die Summe von mindestens drei Exponentialfunktionen beschrieben werden muss, von denen eine auf die Entstehung von HF und zwei weitere auf die Relaxationsreaktion von HF zu N entfallen. Da die Amplitude der langsameren relaxationsphase mit zunehmender GdmHCl-Konzentration abnimmt, vereinfacht sich die Rückfaltungsreaktion bereits ab 0.33 M GdmHCl apparent zu einem monoexponentiellen Zusammenhang. Trägt man vergleichend die bei 348 nm und bei 325 nm bestimmten Geschwindigkeitskonstanten in einem Chevron-Plot gegen die GdmHCl-Konzentration auf, so erhält man drei Faltungsäste mit unterschiedlichen Anstiegen (Abb. 3-38A). Die Auftragung der apparenten Raten der EDTA-bestimmten Rückfaltung liefert zwei Faltungsäste (Abb. 3-38B, S. 94).

Unter EDTA-Bedingungen (obere Reihe in Abb. 3-36) ändert sich bei steigenden Denaturierungsmittelkonzentrationen die „Richtung“ der Rückfaltungskinetiken. Die Ursache dieses Phänomens ist komplex: Zum einen sinkt mit der Erhöhung der GdmHCl-Konzentration die Amplitude der langsamen Phase, die nach dem Faltungsmodell von Pel-15 (vgl. Abschnitt 4.2.1.1, S. 115) die Konversion von HF<sub>slow</sub> zu HF<sub>fast</sub> anzeigt. Die apparente Rate dieser Reaktion bleibt in etwa konstant (vgl. Chevron-Plot, Abb. 3-38A, S. 94). Die Amplitude der schnellen Phase, die der Entstehung von HF entspricht, ändert sich zwar wenig, allerdings nimmt ihre beobachtete Geschwindigkeit mit steigenden GdmHCl stetig ab. Als Konsequenz steigt der Endwert der Rückfaltungskinetiken systematisch an und die Rückfaltung ergibt sich als ein komplexes kinetisches Signal, das sich nur bei sehr niedrigen und bei sehr hohen GdmHCl-Restkonzentrationen eindeutig einer bestimmten Teilreaktion zuordnen lässt. Bei sehr niedrigen GdmHCl-Konzentrationen ist der Anteil von HF im Renaturierungsansatz sehr gering (Abb. 3-36, obere Reihe, linkes Diagramm). Man beobachtet daher mit großer Amplitude die langsame Entstehung von HF<sub>fast</sub> aus HF<sub>slow</sub>. Bei sehr hohen GdmHCl-Restkonzentrationen (> 0.75 M) entsprechen die Renaturierungskinetiken von Pel-15 WT nur noch der monoexponentiellen Entstehung von HF (Abb. 3-36, obere Reihe, rechtes Diagramm).

Der grundlegende Unterschied zwischen der Rückfaltung in EDTA und der Rückfaltung in CaCl<sub>2</sub> besteht – neben der Existenz einer zusätzlichen Rückfaltungsphase – in der Anreicherung von HF am

Ende der Rückfaltungsreaktion. Wie sich dies bereits in den Gleichgewichtsübergängen angekündigt hat (vgl. Abb. 3-9; S.57) und wie es sich in den Kontroll-Fluoreszenzspektren (Einschubdiagramm in Abb. 3-36) andeutet, genügen millimolare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, um den nativen Zustand zu stabilisieren und die Anreicherung von HF während der Rückfaltungskonzentration fast vollständig zu unterdrücken.

### 3.6.3.2. Die Rückfaltungsreaktion von Pel-15 WT im fern-UV CD

In der unteren Reihe von Abb. 3-36 sind Rückfaltungskinetiken dargestellt, die mittels CD-Spektroskopie im Fern-UV Bereich bei einer Wellenlänge von 222 nm gemessen wurden. Die Rückfaltung bei minimalen GdmHCl-Restkonzentrationen führte zu einer sprungartigen Wiederherstellung des Signals der nativen Kontrolle. Für die Auswertung nach einem monophasischen Modell stand erst ab 0.36 M GdmHCl eine ausreichend hohe Elliptizitätsamplitude zur Verfügung. Hinsichtlich ihrer Beträge und ihrer Denaturierungsmittelabhängigkeiten entsprechen die  $k_{app}$  der Faltung aus den CD-Experimenten in etwa den  $k_{fast}$  aus den Fluoreszenzexperimenten. Eine Entsprechung für die langsame Phase der HF-Relaxation war in den CD-Kinetiken nicht nachweisbar.

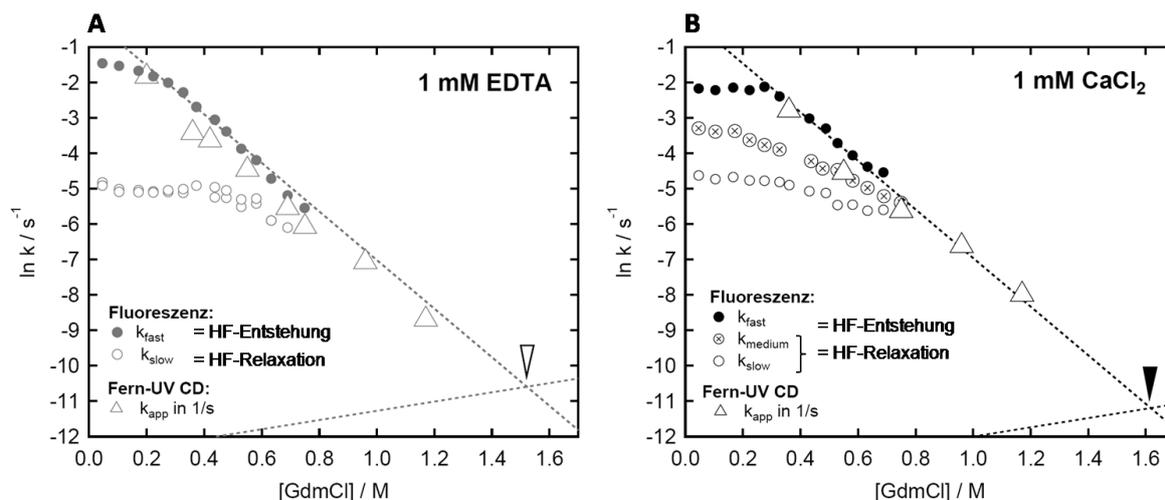


Abb. 3-38: Apparente Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung von Pel-15 aus GdmHCl. (A) Rückfaltung in Gegenwart von 1 mM EDTA. (B) Rückfaltung in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Kreise entsprechen apparenten Raten aus Fluoreszenzexperimenten. Dreiecke kennzeichnen Raten aus fern-UV CD-Kinetiken. Punktierete Linien sind lineare Extrapolationen der Faltungsäste. Pfeile kennzeichnen die Schnittpunkte mit den linear extrapolierten Entfaltungsraten.

Tabelle 3-12: Apparente Raten in Abwesenheit von GdmHCl

	$k_{fast} \times 10^2 / s^{-1}$ (schneller Faltungsast)		$k \times 10^2 / s^{-1}$ (mittlerer Faltungsast) - nur $\text{CaCl}_2$ -	$k_{slow} \times 10^2 / s^{-1}$ (langsamer Faltungsast)	
	EDTA	$\text{CaCl}_2$		EDTA	$\text{CaCl}_2$
Fluoreszenz (348 nm)	$86.42 \pm 22.09$	$65.62 \pm 16.77$	$5.17 \pm 0.74$	$0.92 \pm 0.07$	$0.78 \pm 0.42$
Peptid-CD	$53.69 \pm 15.95$	$41.85 \pm 16.38$	--	--	--
Steigung des Faltungsastes ( $m / sM^{-1}$ )					
global (Fluor. & CD)	-7.01	-6.13	$-3.11 \pm 0.13$	$0.90 \pm 0.23$	$0.58 \pm 0.16$

Anmerkung: Die lineare Extrapolation zur Bestimmung von  $k_{fast}$  (0M GdmHCl) erfolgte unter Vernachlässigung der roll-over Phase.

### 3.6.4. Faltung und Entfaltung der Pel-15 Varianten DCCA und DVAA

Ziel der kinetischen Untersuchungen von DCCA und DVAA war es, die Existenz hyper-fluoreszierender Faltungszustände in den Rückfaltungsreaktionen beider Mutanten nachzuweisen und den Einfluss der eingeführten Punktmutationen auf den Faltungstyp zu untersuchen. Dabei galt es festzustellen, inwiefern sich die unter Gleichgewichtsbedingungen beobachtete Destabilisierung von DCCA und DVAA auf eine veränderte kinetische Kooperativität einzelner Faltungsphasen zurückführen lässt. Die Rückfaltungskinetiken beider Mutanten wurden mittels Fluoreszenz im Bereich der jeweiligen Iso-Fluoreszenzpunkte zwischen N und U bei den Wellenlängen 320 nm (DCCA) und 330 nm (DVAA) vergleichend zum Wildtyp-Protein gemessen.

Die Rückfaltungsreaktionen von DCCA und DVAA werden separat voneinander dargestellt.

#### *Die Faltungsreaktion der Pel-15 Variante DCCA*

Die oberen zwei Reihen in Abb. 3-41 (S. 95) stellen die DCCA-Rückfaltungsreaktion bei verschiedenen GdmHCl-Konzentrationen vergleichend für EDTA und CaCl<sub>2</sub> dar. Sie verdeutlichen, dass DCCA auch in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> ein hyperfluoreszentes Faltungsintermediat (HF) populierte. Dies ist ein grundlegender Unterschied zur Faltungsreaktion des WT-Proteins, in dem HF nur bei Anwesenheit von EDTA nachweisbar war. Das Intermediat trat im Fall von DCCA bei GdmHCl-Konzentrationen von mehr als 0,45 M GdmHCl aus der Totzeit des Mischens heraus und war dann als separate, kinetische Phase zu beschreiben. Die Kinetik der HF-Relaxation war ein biexponentieller Prozess. Insgesamt ergeben sich daher für die Faltungsreaktion von Pel-15 DCCA im „Chevron-Plot“ drei Faltungsäste (Abb. 3-39). Die zwei langsameren Faltungsäste charakterisieren die Kinetik, mit der der HF-Zustand verlassen wird. Der schnelle Faltungsast, der erst bei höheren GdmHCl-Konzentrationen aufzulösen war, charakterisierte die Denaturierungsmittelabhängigkeit der Entstehung von HF.

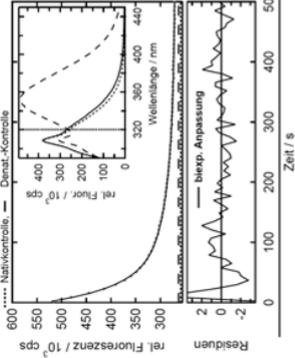
In Gegenwart von EDTA lief die Rückfaltung von DCCA deutlich langsamer ab als in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub>. Das grundlegende Muster der Faltungsreaktion war allerdings nicht verändert. Die Amplituden der einzelnen Faltungsphasen belegen, dass jede der ermittelten kinetischen Phasen durch ausreichend große Anteile am Gesamtsignal bestimmt ist. Amplituden mit negativem Vorzeichen wurden jeweils für die Reaktionen erhalten, die die Entwicklung der Hyperfluoreszenz beschreiben. Alle Faltungsäste der DCCA-Chevron-Plots unterlagen sehr ähnlichen Denaturierungsmittelabhängigkeiten. Eine GdmHCl-unabhängige Teilreaktion, wie sie im Fall des WT-Proteins beobachtet wurde, war bei

#### Umseitige Abbildung:

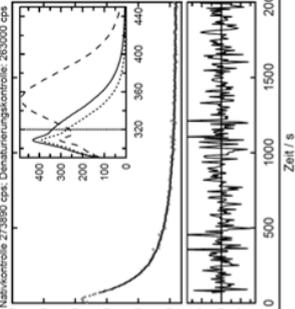
**Abb. 3-39: GdmHCl-abhängige Renaturierungskinetiken in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. 1 mM EDTA** - Vergleich der Pel-15 Varianten DCCA und DVAA (Einleitung der Rückfaltung: 1:100 Verdünnung von 1 mg/ml GdmCl-denaturiertem Protein in GdmHCl-haltigen Rückfaltungspuffer, 20 °C; Anregungswellenlänge: 280 nm; Detektionswellenlänge: 320 nm (DCCA) / 330 nm (DVAA)); die Intensitätsniveaus nativer und denaturierter Kontrollen sind als punktierte bzw. unterbrochene Linien in die Diagramme eingezeichnet oder als numerische Angaben über den entsprechenden Diagrammfeldern angegeben. Insets zeigen die Fluoreszenzspektren der Nativ- und Denaturierungskontrollen sowie die nach Beendigung der jeweiligen Messung aufgezeichneten Fluoreszenzspektren der renaturierten Probe. Konzentrationsangaben über den Diagrammen geben die GdmHCl-Konzentration an, bei der die jeweilige Rückfaltungsreaktion beobachtet wurde.

Pel-15 DCCA

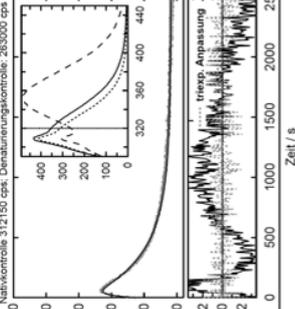
0.03 M GdmCl



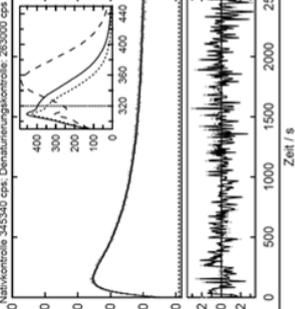
0.24 M GdmCl



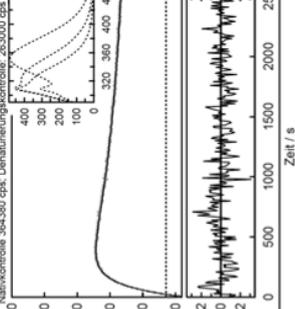
0.34 M GdmCl



0.43 M GdmCl

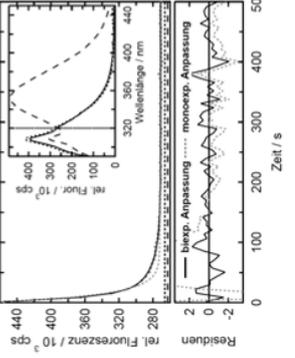


0.59 M GdmCl

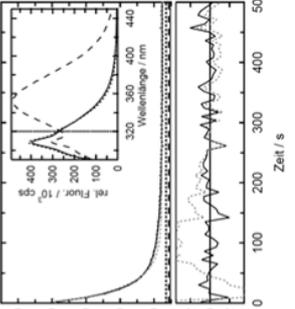


1 mM CaCl<sub>2</sub>

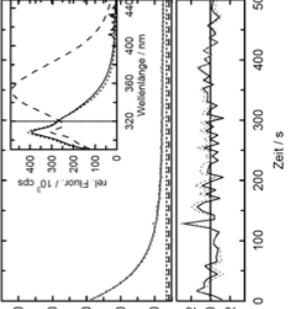
0.03 M GdmCl



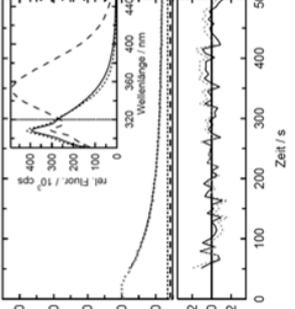
0.19 M GdmCl



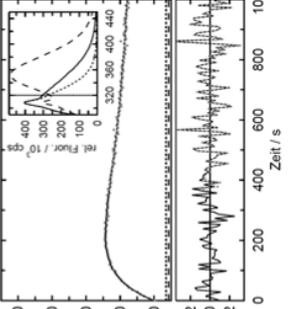
0.33 M GdmCl



0.43 M GdmCl

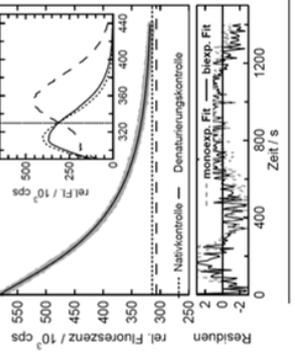


0.68 M GdmCl

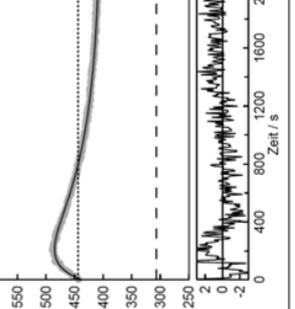


Pel-15 DVAA

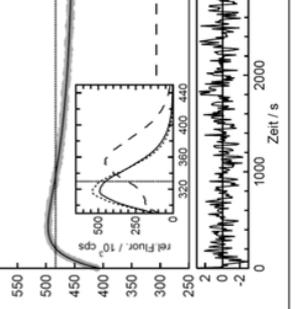
0.06 M GdmCl



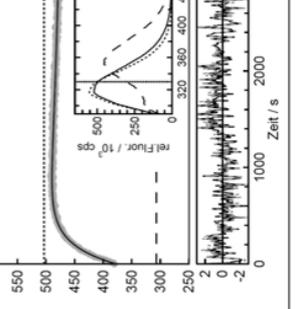
0.12 M GdmCl



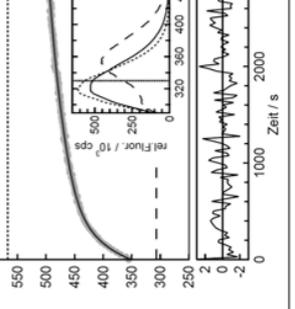
0.18 M GdmCl



0.22 M GdmCl

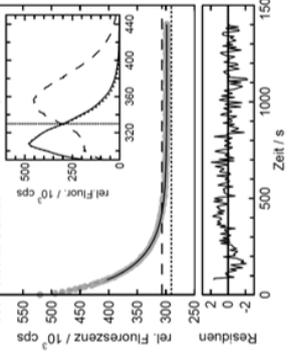


0.33 M GdmCl

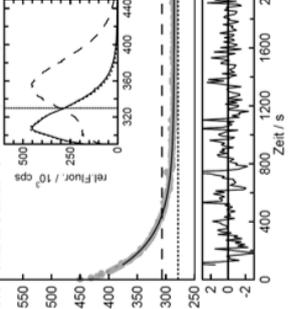


1 mM CaCl<sub>2</sub>

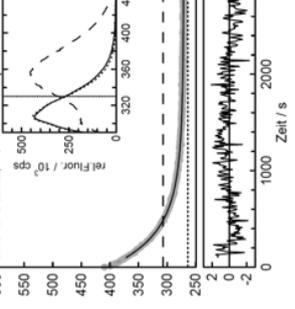
0.06 M GdmCl



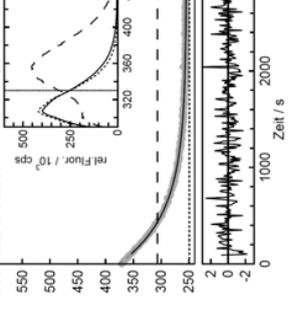
0.12 M GdmCl



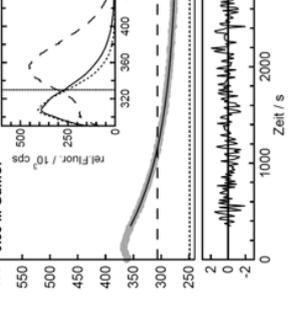
0.18 M GdmCl

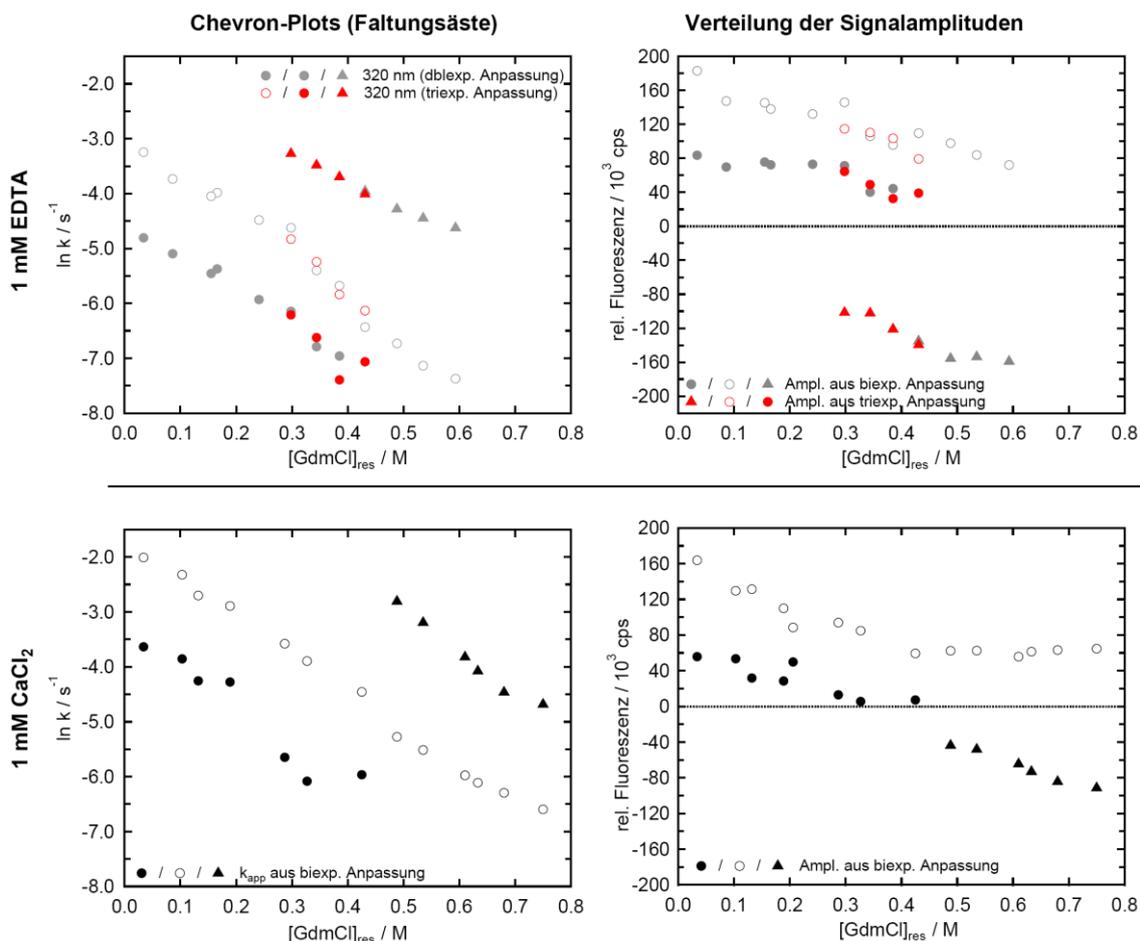


0.22 M GdmCl



0.33 M GdmCl





**Abb. 3-40: Übersicht über die Faltungsreaktion von Pel-15 DCCA Obere Reihe:** Faltung in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden, aufgetragen über die residuale GdmHCl-Konzentrationen; schwarze Symbole:  $k_{app}$  aus biexponentieller Regression; rot:  $k_{app}$  aus triexponentieller Regression. **Untere Reihe:** Faltung in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$ . Die Durchführung triexponentieller Regressionen war in diesem Fall nicht notwendig, da die HF-Abklingkurve ab etwa 0.5 M GdmCl einer Reaktion 1. Ordnung entsprach.

**Tabelle 3-13: Geschwindigkeit der Pel-15 DCCA Rückfaltung in Abwesenheit von Denaturierungsmittel**

	Rückfaltungsraten $k_{app} \times 10^2 / \text{s}$			Steigung der Faltungsäste $m / (\text{sM})^{-1}$		
	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$m_1$	$m_2$	$m_3$
1 mM $\text{CaCl}_2$	$1.2 \pm 0.3$	$6.2 \pm 1.6$	$15.3 \pm 11.4$	$-6.40 \pm 0.45$	$-7.78 \pm 0.31$	$-4.78 \pm 0.73$
1 mM EDTA	$3.8 \pm 1.3$	$18.1 \pm 4.9$	$222.8 \pm 316.0$	$-7.19 \pm 0.62$	$6.82 \pm 0.26$	$-7.54 \pm 0.99$

**Anmerkung:** Rückfaltung in Gegenwart von 25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. 1 mM EDTA, pH 7.0, 20 °C;  $k_1$ ,  $k_2$  und  $k_3$  bezeichnen die schnelle, die mittlere und die langsame Faltungsrate von DCCA. Die Steigungen der Faltungsäste sind in der gleichen Weise gekennzeichnet.

Pel-15 DCCA unter keiner Bedingung festzustellen.

Die lineare Extrapolation der schnellen Faltungsäste auf GdmHCl-freie Bedingungen ergab für die DCCA-Rückfaltung in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  eine HWZ von  $t_{1/2} = 0.3 \pm 0.59$  s. Die Bildung von HF unter EDTA-Bedingungen war mit einer HWZ von  $t_{1/2} = 4.5 \pm 0.17$  s fast um eine Größenordnung langsamer.

### Die Faltungsreaktion der Pel-15 Variante DVAA

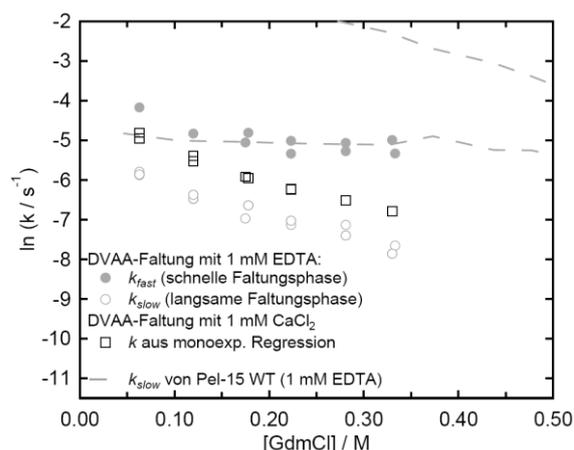
Die Faltung der cysteinfreien Pel-15 Variante DVAA wurde bei den GdmHCl-Restkonzentrationen 0.06 M, 0.12 M, 0.18 M, 0.22 M, 0.28 M und 0.33 M analysiert (Abb. 3-41, untere zwei Reihen).

Das Muster der DVAA-Rückfaltung aus GdmHCl war den Rückfaltungskinetiken von DCCC bzw. DCCA sehr ähnlich: In allen Fällen wurde innerhalb der Totzeit ein hyperfluoreszenter Zustand populiert, der in einer langsamen Folge-reaktion wieder abklang. Lediglich in der Stabilität des hyperfluoreszenten Zustands sowie in den Zeitkonstanten dieser Abklingreaktion unterschied sich DVAA gravierend von den anderen Pel-15 Varianten. So verkomplizierten sich die beobachteten Kinetiken bereits bei vergleichsweise niedrigen GdmHCl-Restkonzentrationen zu biexponentiellen Zusammenhängen. In Gegenwart von EDTA wurde es hierdurch möglich, die schnelle Entstehung von HF<sub>renat</sub> ab 0.12 M GdmHCl als eigene kinetische Phase zu beschreiben (=schnelle Phase). In Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> war dies nicht möglich, da sich die Entstehung von HF in diesem Fall lediglich als *lag*-Phase abzeichnete.

Die Totzeitamplituden, die die Entstehung von HF<sub>renat</sub> zu Beginn der Rückfaltungsreaktionen anzeigten, wurden in allen Fällen durch steigende GdmHCl-Konzentrationen verringert; dies begründet sich in einer verlangsamten Entwicklung von HF<sub>renat</sub>. Die in den Einschubdiagrammen in Abb. 3-41 dargestellten DVAA-Fluoreszenzspektren, zeigen an, dass die renaturierten Proben mit zunehmender Denaturierungsmittelkonzentration eine langwellige Emissionsflanke hinzugewinnen. Wie im Fall des WT-Proteins ist dies ein Hinweis auf einen steigenden Anteil von HF<sub>renat</sub>. Die Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> reduzierte diesen Effekt erheblich.

Die „Chevron-Faltungsäste“ der langsamen HF<sub>renat</sub>-Relaxation sind ungefähr linear und weisen, ganz im Gegensatz zum WT-Protein, jeweils deutliche Denaturierungsmittelabhängigkeiten auf.

Die Tatsache, dass Ca<sup>2+</sup>-Ionen die Rückfaltung von DVAA im beobachteten Maße beeinflussen, ist auffällig und widerspricht den Gleichgewichtsexperimenten; anhand dieser hätte man erwartet, dass die Kinetiken in Gegenwart und Abwesenheit von CaCl<sub>2</sub> identisch sind (vgl. Abschnitt 3.3.3.4, S. 65).



**Abb. 3-41: DVAA Chevron-Plot (Faltungsast)**

Vergleich der DVAA-Faltungsraten in 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM EDTA. Die Faltung unter Ca<sup>2+</sup>-Bedingungen erlaubte nur die Auswertung der langsamen HF<sub>renat</sub> ⇌ N Reaktion. Unter EDTA-Bedingungen ließen sich beide Phasen ermitteln. Schwarze Symbole kennzeichnen die k<sub>app</sub> der Faltung in Gegenwart von 1 mM CaCl<sub>2</sub>, graue Symbole kennzeichnen die Faltung in Gegenwart von 1 mM EDTA. Die Faltung wurde eingeleitet durch eine 1:100 Verdünnung von 1 mg/ml Pel-15 DVAA (3 M GdmCl) in Renaturierungspuffer bei 20 °C. Die Kinetiken wurden bei 330 nm und bei 348 nm gemessen.

**Tabelle 3-14: Rückfaltung von DVAA in 0 M GdmHCl**

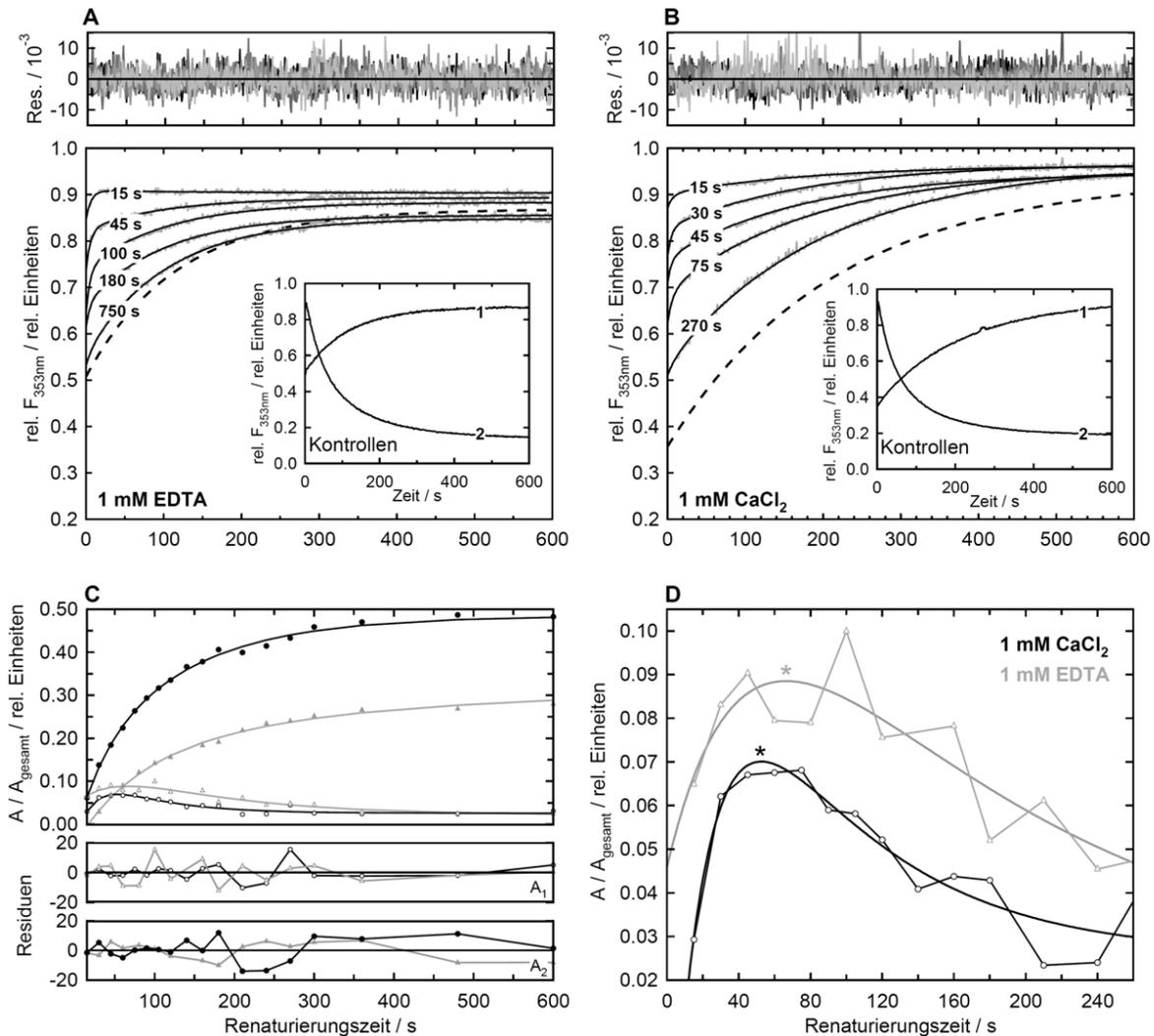
	k <sub>slow</sub>	m <sub>slow</sub>	k <sub>fast</sub> , m <sub>fast</sub>
CaCl <sub>2</sub>	1.06 ± 0.21	-7.22 ± 0.45	n.d.
EDTA	0.39 ± 0.10	-6.65 ± 0.50	n.d.

**Anmerkung:** k<sub>slow</sub>: langsame k<sub>app</sub> der Faltung in 10<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>;  
m<sub>slow</sub>: Anstiege der langsamen Faltungsäste

### 3.6.5. Entstehung einer schnell entfaltenden Spezies während der Rückfaltung: Inverse Doppelsprungexperimente

Während der Entfaltung einer Lösung nativen Proteins ist die Identifizierung von transient auftretenden Faltungsintermediaten normalerweise nicht möglich, da diese energetisch ungünstigen Spezies nicht populiert werden, sondern sofort zu einem energetisch günstigeren Faltungszustand weiterreagieren. Durch inverse Doppelsprungexperimente ist es möglich, die Zeitabhängigkeit der Population solcher produktiven Faltungsintermediate zu überprüfen. Die Identifikation der unterschiedlichen Faltungsspezies erfolgt anhand ihrer charakteristischen  $k_{app}$  der Entfaltung. Hierzu wird eine vollständig denaturierte Proteinlösung zum Zeitpunkt  $t_0$  renaturiert und nach Ablauf eines bestimmten Zeitintervalls ( $\Delta t$ ) wieder denaturiert. Nach kurzen  $\Delta t$  wird ein Großteil der Moleküle des Rückfaltungsansatzes noch im entfalteten (U) oder bereits in einem intermediären ( $I_0, I_1, \text{etc.}$ ) Zustand vorliegen. Der Anteil nativer Spezies N wird zu diesem Zeitpunkt noch gering sein. Überführt man ein solches Speziesgemisch in denaturierende Bedingungen, wird die Signalintensität zu Beginn der Entfaltungskinetik durch das Mischungsverhältnis aller in der Lösung vorliegender Faltungsspezies bestimmt. Die detektierte Abklingkurve ergibt sich als Summe der apparenten Geschwindigkeitskonstanten aller ablaufenden Teilreaktionen, wobei partiell gefaltete Zustände in der Regel schneller entfalten als die N-Form. Wird die Entfaltung des gleichen Renaturierungsansatzes nach unterschiedlichen  $\Delta t$  wiederholt, kann die Veränderung der  $k_{app}$ -spezifischen Amplituden analysiert und daraus die Zeitabhängigkeit der Entstehung von I und N geschlossen werden. Für die in Abb. 3-42 zusammengefassten inversen Doppelsprungkinetiken wurde Pel-15 in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  bzw. 1 mM EDTA in 6.3 M GdmHCl entfaltet. Die Differenz zwischen den Fluoreszenzintensitäten von Lösungen vollständig denaturierter ( $F_U$ ) und nativer Pel-15WT ( $F_N$ ) diente als Normierungsgrundlage für die Kontroll-Kinetiken und für die nach  $\Delta t$  aufgezeichneten Denaturierungskinetiken. Die Totzeit-Amplituden der Denaturierungskinetiken betragen 49.1 % bei der Entfaltung in Gegenwart von 1 mM EDTA und 35.9 % bei der Entfaltung in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Die Rückfaltungsreaktion von Pel-15 WT wurde in einem zeitlichen Bereich zwischen 15 s und 1800 s bei einer Restkonzentration von 0.5 M durchgeführt, um die Entstehung von N zu verzögern und dadurch die Population transients Intermediate zu begünstigen. Die nach verschiedenen Renaturierungszeiten ( $\Delta t$ ) aufgezeichneten Entfaltungskinetiken wurden auf die Niveaus nativer und denaturierter Kontrollen normiert und biexponentiell angepasst. Aus den *Fits* ergaben sich zwei unterschiedlich schnell entfaltende Spezies, die gemäß ihrer Entfaltungsgeschwindigkeit mit  $X_{slow}$  und  $X_{fast}$  bezeichnet wurden. Die Entfaltungsgeschwindigkeiten von  $X_{fast}$  und  $X_{slow}$  unterschieden sich um etwa eine Größenordnung und betragen für die Entfaltung in Gegenwart von 1 mM EDTA  $k_{fast,EDTA} = 0.18 \pm 0.06 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{slow,EDTA} = 0.010 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$ . Die Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  verlangsamte die Entfaltung von  $X_{fast}$  um den Faktor 1.9 auf  $k_{fast,CaCl_2} = 5.28 \times 10^{-3} \pm 0.26 \times 10^{-3}$ . Die Geschwindigkeit der Entfaltung von  $X_{slow}$  war kaum verändert und betrug  $k_{slow,Ca^{2+}} = 0.12 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ . Die



**Abb. 3-42: InvDS Experimente [Denat. (5.0 M GdmHCl) > Renat. (0.5 M) > Denat. (6.2 M GdmHCl)]**

(A), (B) Darstellung repräsentativer Denaturierungskinetiken. Zeitangaben entsprechen der Renaturierungsdauer  $\Delta t$ . Die Kontroll-Kinetiken der Denaturierung zum Zeitpunkt  $\Delta t = \infty$  sind als dicke, unterbrochene Linie dargestellt. Alle Denaturierungskinetiken wurden vor ihrer biexponentiellen Anpassung auf den maximalen Signalunterschied zwischen der nativen (N) und der denaturierten (U) Kontrolle normiert. Die Abweichungen der Fitergebnisse von den jeweiligen Messwerten sind als Residuen in verschiedenen Graustufen über den Diagrammen abgebildet. *Insets*: Kontroll-Kinetiken der Denaturierung in 6.2 M GdmCl (1) bzw. der Renaturierung in Gegenwart von 0.5 M GdmCl (2). (C) Aus biexponentiellen Regressionen erhaltene Amplituden der schnellen (*offene Symbole*) und der langsamen Entfaltungphase (*geschlossene Symbole*), aufgetragen über die Renaturierungsdauer  $\Delta t$ . Durchgezogene Linien im oberen Diagrammfeld illustrieren die Ergebnisse der biexponentiellen Anpassung der Amplitudenverteilungen. (D) Zu- und Abnahme von  $A_{fast}$ . Durchgezogene Linien zeigen das Ergebnis der biexponentiellen Regression der Zu- und Abnahme von  $X_{fast}$  im Vergleich zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  (grau) und EDTA (schwarz). Sterne (\*) markieren jeweils die Renaturierungszeit  $\Delta t_{max}$  nach Ablauf derer  $X_{fast}$  maximal populiert ist. Alle Fluoreszenz-Kinetiken wurden bei einer Wellenlänge von 353 nm detektiert.

Entfaltungsgeschwindigkeiten von  $X_{slow}$  finden ihre Entsprechung in den zuvor dargestellten Entfaltungsexperimenten (vgl. Pel-15WT Entfaltungsst, Abb. 3-31).

Mit dem Fortschreiten der Renaturierungsreaktion ließ sich aus den veränderten Amplitudenanteilen der schnellen und der langsamen Entfaltungphase die An- bzw. Abreicherung von  $X_{fast}$  und  $X_{slow}$  ablesen. Die Entstehung von  $X_{slow}$  ließ sich bei Renaturierungszeiten von  $\Delta t > 60$  s durch eine monoexponentielle Funktion mit einer Rate von  $8.7 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  beschreiben. In Gegenwart von EDTA war diese Rate auf  $6.5 \times 10^{-3} \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  verlangsamt, unterschied sich also nur geringfügig

**Tabelle 3-15: Ergebnisse der Inversen Doppelsprungexperimente in 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM EDTA**

Biexponentielle Anpassung der Denaturierungs-Amplituden				
	1 mM EDTA		1 mM CaCl <sub>2</sub>	
	$k_1 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_2 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_1 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_2 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$
Entstehung/Verschwinden $X_{fast}$	21 ± 14	7 ± 3	44 ± 22	13 ± 5
Entstehung* $X_{slow}$	–	8.7 ± 0.5	–	6.5 ± 0.3

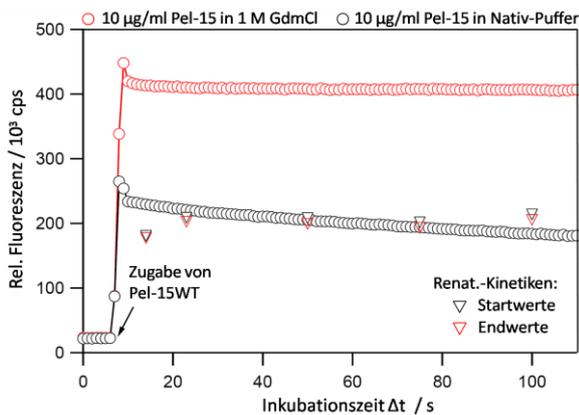
Mittlere Geschwindigkeitskonstanten der Kontroll-Kinetiken				
	1 mM EDTA		1 mM CaCl <sub>2</sub>	
	$k_1 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_2 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_1 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$	$k_2 \times 10^3 / \text{s}^{-1}$
Renaturierung (0.5 M GdmHC)	16.1 ± 0.1	3.52 ± 0.04	22.5 ± 0.1	5.59 ± 0.04
Denaturierung der Renat.-Proben	0.18 ± 0.06	–	0.12 ± 0.04	–

\*) berechnet nach einer Renaturierungszeit  $\Delta t = 60$  sec.

vom Ca<sup>2+</sup>-Fall.  $X_{fast}$  war nach  $\Delta t_{max} = 53$  s (1 mM CaCl<sub>2</sub>) bzw. nach  $\Delta t_{max} = 67$  s (EDTA) maximal populiert und nahm dann wieder ab. Die Entstehung und das Verschwinden von  $X_{fast}$  wurde durch eine biexponentielle Funktion beschrieben. Es ergab sich für die Entstehung von  $X_{fast}$  in Gegenwart von EDTA eine Rate von  $0.021 \pm 0.014 \text{ s}^{-1}$  und in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> von  $0.044 \pm 0.022 \text{ s}^{-1}$ . Die Abklingphasen waren in beiden Fällen deutlich langsamer. Sie betragen  $0.007 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$  für die Abnahme von  $X_{fast}$  in Gegenwart von EDTA und  $0.013 \pm 0.005 \text{ s}^{-1}$  für die Abnahme von  $X_{fast}$  in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub>. Bei der Entstehung von  $X_{slow}$  wurde die Existenz einer Totzeitamplitude beobachtet, deren Anteil am Gesamtsignal GdmHCl-unabhängig zwischen 10 % und 20 % liegt.

### 3.6.5.1. Limitierte Doppelsprungexperimente (N → HF → N)

Nach dem Faltungsmodell, das anhand der in dieser Arbeit zusammengetragenen Daten postuliert wird (vgl. Abschnitt 4.2.1.1, S. 115), muss sich HF als heterogener Zustand darstellen. Das Ziel der limitierten Doppelsprungexperimente war es, zu überprüfen, inwiefern die für diesen heterogenen Zustand vorhergesagten Spezies HF<sub>slow</sub> und HF<sub>fast</sub> in einem Isomerisierungsgleichgewicht stehen. Dazu wurde eine Lösung nativer Pel-15 für verschieden lange Zeiten in 25 mM MOPS, 1 mM GdmHCl, 1 mM EDTA, pH 7.0 inkubiert, bevor ein Aliquot dieses Ansatzes in GdmHCl-freien Rückfaltungspuffer verdünnt und die damit einhergehende Änderung des Fluoreszenzsignals detektiert wurde. Im Fall einer langsamen Isomerisierung zwischen konformationell unterschiedlichen HF-Zuständen würde man erwarten, dass die beobachtete Rückfaltungsreaktion bei kurzen  $\Delta t$  schneller ist bzw. eine größere Totzeitamplitude besitzt als nach langen  $\Delta t$ . In Abb. 3-43 sind die Start- und Endwerte der Rückfaltungskinetiken gegen  $\Delta t$  aufgetragen. Sie zeigen im Zeitraum von 100 s keine Veränderung – die Kinetik der Bildung von N war stets in der Totzeit des Mischens abgeschlossen. Die Entstehung einer zweiten HF-Konformation deutete sich weder in einer veränderten Fluoreszenzemission des Entfaltungsansatzes an, noch war diese anhand einer veränderten Rückfaltungsreaktion aufzulösen.



**Abb. 3-43: Limitierte Doppelsprungexperimente** zur Induktion von HF und zeitabhängigen Beobachtung der Renaturierungsreaktion. Im betrachteten Zeitfenster waren die Rückfaltungskinetiken innerhalb der Totzeit des Mischens beendet. *Kontrollen:* Zugabe von 10 µl 1 mg/ml Pel-15WT zu Nativpuffer (○) oder zu Nativpuffer mit 1 M GdmCl (○) unter kontinuierlicher Detektion der Fluoreszenz. HF ist in der Totzeit des Mischens vollständig populiert.

### 3.7. Eigenschaften des hyperfluoreszenten Intermediates HF

In diesem Ergebnisteil sind Ergebnisse dargestellt, die den Kenntnisstand zu strukturellen und dynamischen Eigenschaften von HF vertiefen und die spätere Postulation eines gültigen Faltungsmodells unterstützen.

#### 3.7.1. Rekonstruktion des Fluoreszenzspektrums von HF aus kinetischen Daten

##### 3.7.1.1. Kurzzusammenfassung

Bei der Rückfaltung von Pel-15 WT aus einem GdmHCl-induzierten Entfaltungszustand entwickelt sich das hyperfluoreszente Intermediat HF innerhalb der Totzeit des manuellen Mischens. Unter  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Bedingungen konnten die aufgezeichneten Kinetiken in guter Näherung als monoexponentielle Abklingkurven beschrieben werden, die im Faltungsweg der Reaktion  $\text{HF} \rightleftharpoons \text{N}$  zugeordnet wurden.

##### 3.7.1.2. Rekonstruktion des Fluoreszenzspektrums von HF aus kinetischen Daten

Für eine Rekonstruktion der Fluoreszenzeigenschaften von Pel-15 zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  s wurden Rückfaltungskinetiken bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert und unter Vernachlässigung der ersten 10 s monoexponentiell angepasst. Aus den Startwerten der *fits* ließ sich das Fluoreszenzspektrum des Pel-15 Rückfaltungsansatzes zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  s rekonstruieren. Die Spektren aller renaturierten Proben wurden gemittelt und den Endwerten der Fits überlagert, um die Reproduzierbarkeit der Rückfaltungsreaktion zu überprüfen. Die Faltungskinetiken wurden vergleichend bei 7.9 µg/ml, 11.3 µg/ml und bei 22.6 µg/ml gemessen, um den Einfluss der Proteinkonzentration auf das Rückfaltungsergebnis zu überprüfen.

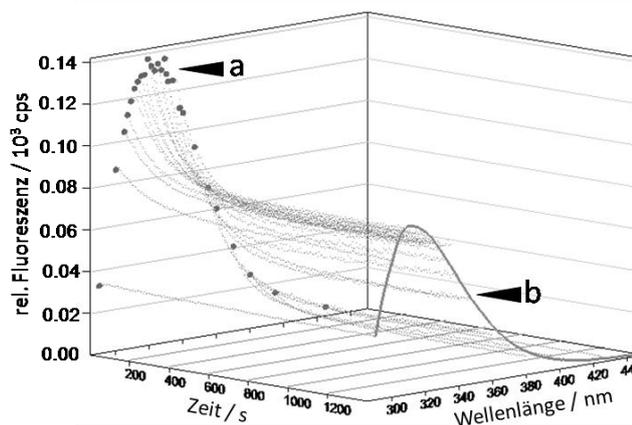
Abb. 3-44 verdeutlicht noch einmal das Prinzip des Experimentes. Zur besseren Übersicht sind nur die Rückfaltungskinetiken gezeigt, die bei einer Proteinkonzentration von 7.9 µg/ml gemessen wurden. Punkte bei  $t = 0$  s entsprechen den Startwerten, die aus den monoexponentiellen Regressionen der Kinetiken gewonnen wurden. Die durchgezogene Linie am Ende der Zeitachse stellt das Spektrum der renaturierten Probe dar, wie es sich als Mittel aus allen in diesem Experiment gemessenen Kinetiken ergibt. Dies zeigt die sehr gute Reproduzierbarkeit des Experimentes an.

Im Vergleich zu dem Spektrum einer nativen Kontrolllösung weisen die Fluoreszenzspektren der renaturierten Pel-15 Proben bei allen Rückfaltungskonzentrationen eine langwellige Fluoreszenzflanke auf, die sich mit steigender Proteinkonzentration stärker ausprägt. Die Raten der Rückfaltungsreaktionen ließen keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration erkennen. Sie lagen im Mittel bei  $k_{app} = 0.007 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$ , was frühere Experimente zur Rückfaltung von Pel-15 WT bestätigt. Die Startwerte aller Rückfaltungskinetiken wurden auf das Intensitätsniveau einer  $7.9 \mu\text{g/ml}$  Lösung normiert, wobei als Normierungsfaktor jeweils das Intensitätsverhältnis der entsprechenden Denaturierungskontrollen verwendet wurde.

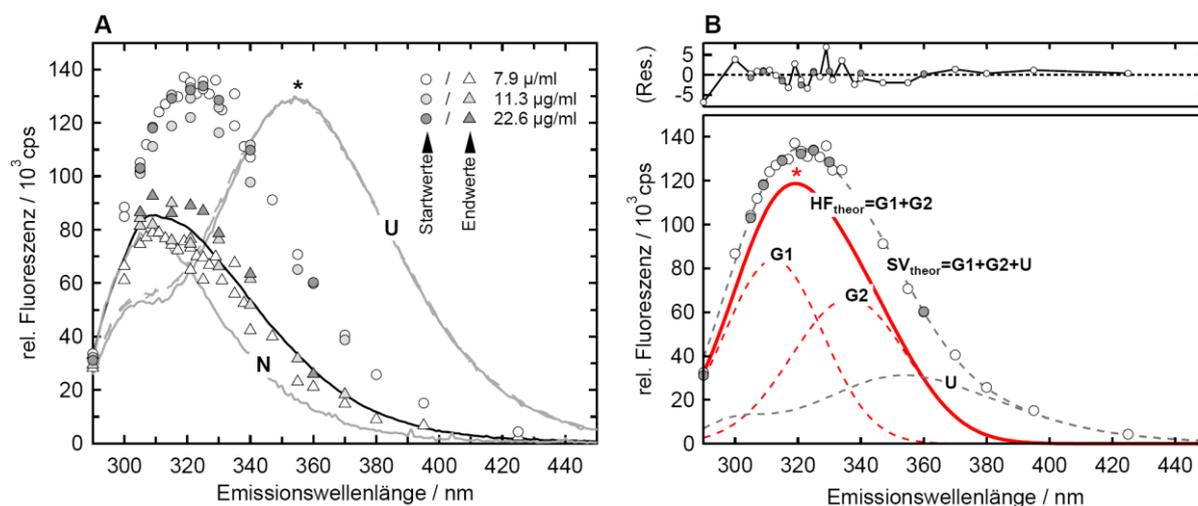
Die experimentell bestimmte Startwerte-Verteilung ( $SV_{exp}$ ) wurde einer Regression nach Gleichung (25) unterzogen. Das aus dieser Regression erhaltene Ergebnis ist die theoretische Startwerteverteilung  $SV_{theor}$ . Die verwendete Gleichung besaß die allgemeine Form  $SV_{theor} = G_1 + G_2 + U$ . Die Maxima der Gaussverteilungen  $G_1$  und  $G_2$  wurden auf den Emissionsbereich von Tryptophan und Tyrosin (290 nm bis 450 nm) festgelegt. Zusätzlich gestattete das verwendete Modell zum Zeitpunkt  $t_0$  die Anwesenheit denaturierten Proteins (U) im Renaturierungsansatz.  $HF_{theor}$  ergab sich als Summe der Gauss-Faktoren  $G_1$  und  $G_2$  ( $G_1 + G_2 = SV_{theor} - U$ ). Für die Anpassung an das Modell wurden lediglich die Startwerte aus den Renaturierungsexperimenten bei  $7.9 \mu\text{g/ml}$  bzw. bei  $22.6 \mu\text{g/ml}$  genutzt. Die Startwerte der Kinetiken, die bei  $11.3 \mu\text{g/ml}$  gemessen worden waren, trugen aufgrund hoher Abweichungen nicht zum Anpassungsergebnis bei (Daten nicht gezeigt). Die Parameter der ermittelten Gauss-Kurven sowie der theoretische Anteil denaturierten Proteins sind Tabelle 3-16 zu entnehmen. In Abb. 3-45 ist das Ergebnis dieser Berechnung graphisch dargestellt.

Wie bereits erwähnt, ließ sich für das Verhältnis zwischen U und  $SV_{exp}$  keine Konzentrationsabhängigkeit feststellen. Das Intensitätsverhältnis  $Z$  zwischen dem Emissionsmaximum denaturierter Pel-15 WT ( $F_{max,denat} = 355 \text{ nm}$ ) und dem von  $HF_{theor}$  ( $F_{max,HF} = 319 \text{ nm}$ ) betrug  $Z = 1.1$ . Dieser Wert wurde als Korrekturfaktor verwendet, um  $HF_{theor}$  anhand einer beliebig konzentrierten Lösung denaturierter Pel-15 WT zu berechnen.

### 3.7.1.3. Dekonvolution von Pel-15WT Fluoreszenzspektren mittels $HF_{theor}$



**Abb. 3-44: Pel-15 Fluoreszenz - Rückfaltungskinetiken zur Rekonstruktion von HF** ( $7.9 \mu\text{g/ml}$  Pel-15 in  $25 \text{ mM}$  MOPS,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $\text{pH } 7.0$  bei  $[\text{GdmCl}]_{res} = 0.03 \text{ mM}$ ;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Messung von Rückfaltungskinetiken bei Wellenlängen im Bereich zwischen  $300 \text{ nm}$  und  $420 \text{ nm}$ . Die gemessenen Abklingkurven sind punktiert dargestellt. Pfeile: (a) Startwerte der Kinetiken, erhalten aus monoexponentiellen Fits. Die Fits selbst sind nicht abgebildet. (b) Die Endwerte der Kinetiken ergeben das Fluoreszenzspektrum renaturierter Pel-15 WT.

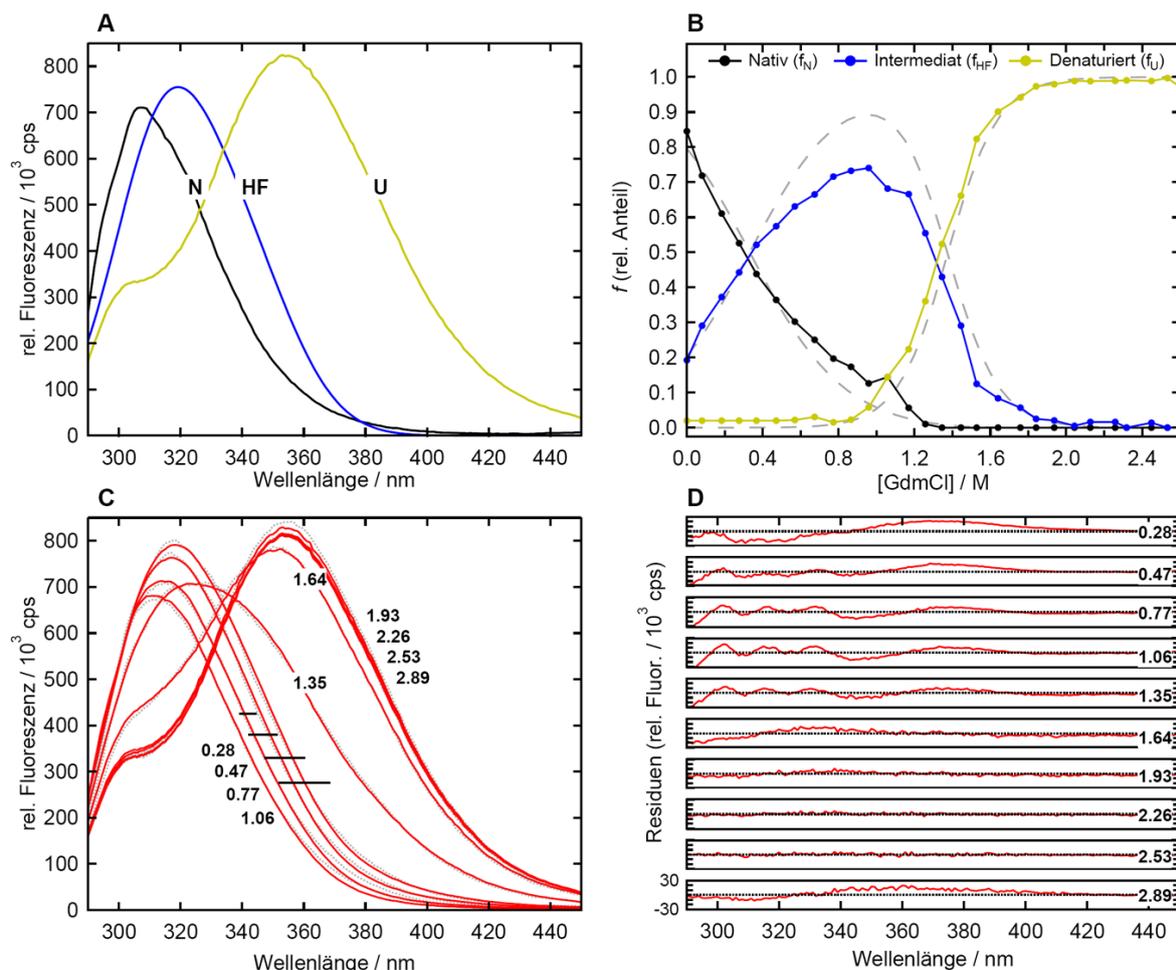


**Abb. 3-45: Wellenlängenabhängige Startwerte-Verteilung von Fluoreszenzkinetiken; Rekonstruktion von HF** (Renaturierungsbedingungen: 7.9 µg/ml Pel-15 in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0; [GdmCl]<sub>res</sub> = 0.03 mM; 20 °C). **(A)** Start- und Endwerte aus Fluoreszenzkinetiken, erhalten durch monoexponentielle Regression und normiert auf die Fluoreszenzintensität einer 7.9 µg/ml Lösung denaturierter Pel-15 bei 355 nm ( $F_{max,denat}$  = ca. 130000 cps) (\*). *Spektren:* (grau) Fluoreszenzspektren der nativen (N) und der denaturierten (U) Kontrollen; (schwarz) Mittelwert aus allen Fluoreszenzspektren, die nach der Renaturierung von Pel-15 gemessen wurden. *Symbole:* (Dreiecke) Endwerte nach Ablauf der Renaturierung, erhalten aus monoexponentiellen Regressionen. (Kreise) Startwerte der Renaturierungskinetiken, erhalten aus monoexponentieller Regression. Unterschiedliche Schattierungen (weiß, hellgrau, dunkelgrau) kennzeichnen die Proteinkonzentrationen in den Renaturierungsansätzen. **(B)** Die Anpassung der empirischen Startwerte-Verteilung  $SV_{exp}$  (Kreise) an Gleichung (24) ergibt die berechnete Startwerteverteilung  $SV_{theor}$ . Das modellhafte Fluoreszenzspektrum von HF ( $HF_{theor}$ ) ergibt sich als Differenz aus  $SV_{exp}$  und dem Anteil denaturierten Proteins (U). Das Emissionsmaximum von  $HF_{theor}$  liegt bei 319 nm (\*) und beträgt im konkreten Fall  $F_{max,HF}$  = 118700 cps. Das Intensitätsverhältnis zwischen  $F_{max,denat}$  und  $F_{max,HF}$  beträgt 1.1.

**Tabelle 3-16: Parameter für die Anpassung der Startwerteverteilung an Gleichung (24).**

Parameter	Gauss 1	Gauss 2	Anteil U
a1	$66.2 \pm 13.4 \times 10^3$	$83.9 \pm 18.5 \times 10^3$	--
b1	$336.4 \pm 4.4$	$312.4 \pm 1.9$	--
c1	$-18.3 \pm 1.7$	$15.5 \pm 0.7$	--
u	--	--	$0.24 \pm 0.01$

Durch eine Komponentenanalyse der Fluoreszenzspektren des Pel-15WT Übergangs sollte gezeigt werden, dass es möglich ist, den Gleichgewichtsübergang der Faltung und Entfaltung von Pel-15WT mit dem aus kinetischen Daten rekonstruierten Intermediat HF zu beschreiben. Für die Dekonvolution wurde jedes Fluoreszenzspektrum (F) des Pel-15 WT Gleichgewichtsentfaltungsüberganges als Summe aus den modellhaften Spektren von N, HF und U beschrieben ( $F = aN + bHF + cU$ ). Die Anteile von N, HF und U bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen gehen als Faktoren in die Dekonvolutionsgleichung ein. Sie wurden auf Werte zwischen 0 und 1 beschränkt. Ein Anpassungsergebnis von  $a = 0.2$ ,  $b = 0.6$  und  $c = 0.2$  bedeutet, dass das vorliegende Spektrum zu 20 % aus N, zu 60 % aus HF und zu weiteren 20 % aus U zusammengesetzt ist. Wenn im Folgenden von „Verteilungsberechnungen“ die Rede ist, meint dies die GdmHCl-abhängige Zu- oder Abnahme der Faktoren a, b und c.



**Abb. 3-46: Dekonvolution von Pel-15 Fluoreszenzspektren mit Hilfe von Modellspektren für „N“, „U“ und „HF“**  
**(A) Modellspektren denaturierter (U), intermediärer (HF) und nativer (N) Pel-15WT** in 25 mM MOPS, pH 7.0 bei 20 °C (Messgerät: JobinYvon Fluoromax3). Die Spektren wurden über eine Faktorkorrektur an das Intensitätsniveau des in Abschnitt 3.3.3.1 (S. 57) vorgestellten Gleichgewichtsüberganges angepasst. **(B) Ergebnis der Dekonvolution:** GdmHCl-abhängige Verteilung der relativen Anteile von U, HF und N. Unterbrochene Linien geben die Speziesverteilung wieder, die unter Nutzung des linearen 3-Zustandsmodelles berechnet wurde. **(C) Darstellung ausgewählter Übergangsspektren** (grau punktiert) und der jeweiligen Dekonvolutionsergebnisse (rot). Zahlen kennzeichnen die GdmCl-Konzentration in Molar. **(D) Residuen** der Spektren-Fits. Die Skalierung aller Residuenachsen ist identisch.

Für die Dekonvolution war die Kenntnis der Fluoreszenz aller am Übergang beteiligten Komponenten erforderlich. Für das modellhafte Fluoreszenzspektrum der denaturierten Komponente U wurde das nach 9 Tagen bei 3 M GdmHCl gemessene Fluoreszenzspektrum aus dem Entfaltungsübergang von Pel-15 WT verwendet. Die native Komponente N wurde vereinfachend durch das Übergangsspektrum beschrieben, das in 25 mM MOPS, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.0 aufgenommen worden war. Das modellhafte Fluoreszenzspektrum der intermediären Komponente HF ergab sich, wie vorab dargestellt, aus den Startwerten der Rückfaltungskinetiken und wurde mittels Korrekturfaktor Z auf die korrekte Proteinkonzentration ( $c = 14 \mu\text{g/ml}$ ) normiert.

Die Modellspektren N, U und HF sind in Abb. 3-46A dargestellt. Das Ergebnis der Komponentenanalyse ist exemplarisch in Abb. 3-46C-D für 10 verschiedene Übergangsspektren im Bereich zwischen 0.28 M und 2.89 M GdmHCl abgebildet. Die Residuen, die sich als Differenz aus den Über-

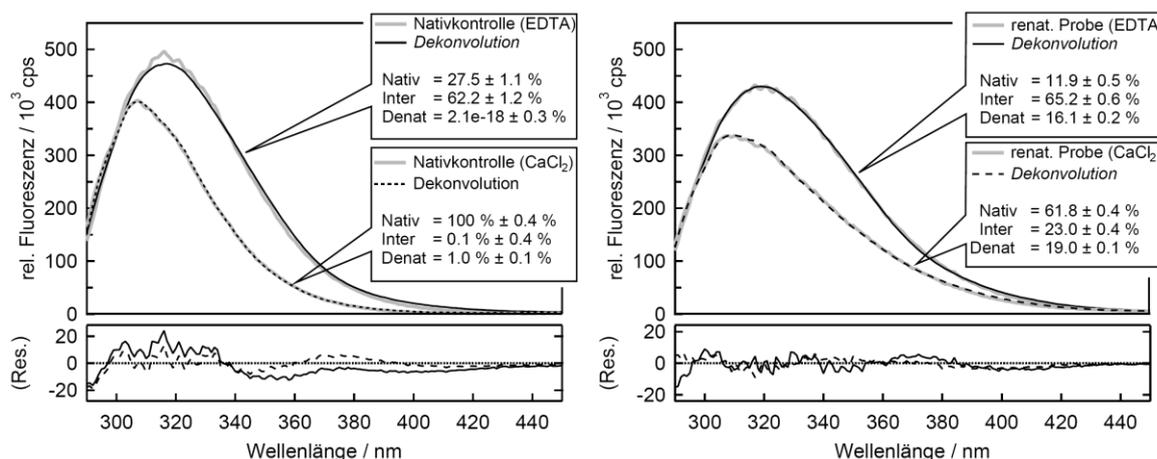
gangsdaten und dem berechneten Spektrum ergaben, betragen im Bereich zwischen 0.28 M GdmHCl und 1.35 M GdmHCl bis zu 3% des gemessenen Signals und ähnelten sich in ihrem Verlauf. In diesem Konzentrationsbereich enthalten die Übergangsspektren einen hohen Anteil an HF, wie sich an der blau dargestellten Verteilungsberechnung in Abb. 3-46B zeigt. Besonders hoch sind die Residuenabweichungen in der langwelligen Fluoreszenz-Flanke zwischen 340 nm und 400 nm. Zwischen 1.93 M und 2.89 M GdmHCl sind die Spektren im Wesentlichen durch das Modellspektrum von U und nur zu einem geringen Anteil durch HF definiert, was ebenfalls aus der olivgrün dargestellten Verteilungsberechnung in Abb. 3-46B hervorgeht. Im Fall des Fluoreszenzspektrums von Pel-15 WT in 2.89 M GdmHCl war die Abweichung der Messwerte vom berechneten Spektrum außergewöhnlich hoch (Abb. 3-46D, untere Reihe).

An diesem Beispiel lässt sich eine wichtige Grenze des verwendeten Modells veranschaulichen: Als ideales Spektrum für U wurde das Übergangs-Fluoreszenzspektrum verwendet, das bei der höchsten GdmHCl-Konzentration im Übergang gemessen wurde. Muss während des Anpassungsprozesses ein Spektrum X dekonvolviert werden, das ebenfalls einen vollständig denaturierten Zustand repräsentiert, dessen Fluoreszenzintensität aber höher ist als die des Modellspektrums für U, liefert das Modell das Ergebnis  $a = 0.0$ ,  $b = 0.0$  und  $c = 1.0$ . Die erhaltenen Fehler reflektieren in diesem Fall das Differenzspektrum zwischen U und X.

Die GdmHCl-abhängige Verteilungsberechnung für die Faktoren a, b und c ist in Abb. 3-46B dargestellt. Der Vergleich mit den Anteilen für N, HF und U, die mittels der globalen 3-Zustandsanalyse erhalten wurden (unterbrochene, graue Linien), zeigt für den Übergang  $\text{HF} \rightleftharpoons \text{U}$  eine sehr gute Übereinstimmung beider Auswertemethoden. Im Fall des Teilgleichgewichtes  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}$  liegen zumindest die Übergangsmittelpunkte und die GdmHCl-Konzentrationen, bei denen HF jeweils maximal populiert wird, in guter Übereinstimmung. Die *Fits* der Übergangsspektren im Bereich zwischen 0.0 M und 0.5 M GdmHCl erfolgten mit der Beschränkung  $0 < U < 0.02$ . Ohne diese Beschränkung lieferte das Regressionsergebnis einen ansteigenden Anteil denaturierten Proteins, was kein sinnvolles Ergebnis darstellt.

Durch die Kenntnis des HF-Fluoreszenzspektrums war es möglich, quantitative Informationen über Rückfaltungsausbeuten zu erhalten. Abb. 3-47 zeigt dies am Beispiel einer Rückfaltungsreaktion in Gegenwart von 0.75 M GdmHCl. Gegenübergestellt sind die Fluoreszenzspektren von unbehandelten Nativkontrollen (Pel-15 in 25 mM MOPS, pH 7.0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  / EDTA, 0.75 M GdmHCl) und Spektren von renaturierten Proben (Renaturierung aus 3 M GdmHCl). In beiden Nativkontrollen war der Anteil denaturierten Proteins zu vernachlässigen; das Gleichgewicht  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}$  war, ebenfalls erwartungsgemäß, in Gegenwart von EDTA deutlich in Richtung von HF verschoben, während es unter  $\text{Ca}^{2+}$ -Bedingungen fast vollständig auf der Seite von N lag. Die Konzentrationsverhältnisse in den renaturierten Proben folgten diesem Muster und bestätigten damit die Erwartungen: In Gegenwart von EDTA betrug die Rückfaltungsausbeute, gemessen als der Anteil von N, nur etwa 12 %. Die Rückfaltungsausbeute in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  betrug etwa 62 %. Die Anteile für N, HF und U sollten

in der Summe stets 100 % ergeben. Dies ist zumindest für die Nativkontrolle in Gegenwart von EDTA nicht der Fall; die Summe aller Spezies beträgt dort etwa 90 %. Drei unterschiedliche Erklärungen kommen hierfür in Frage. Zum einen könnte dies als Hinweis darauf verstanden werden, dass eines der verwendeten Modellspektren nicht ideal ist. Sehr wahrscheinlich betrifft dies das Modellspektrum von HF, für das allerdings keine genauere Bestimmung möglich ist. Zum anderen wäre es vorstellbar, dass die Fluoreszenzspektren von N und HF nicht GdmHCl-unabhängig sind, wie dies vereinfachend



**Abb. 3-47: Zerlegung von Fluoreszenzspektren nativer Kontrollen und renaturierter Proben**

(Pufferbedingungen: 25 mM MOPS, 1 mM CaCl<sub>2</sub>/EDTA, 0.75 M GdmCl, pH 7.0, 20 °C) graue Linien: Messwerte; schwarze Linien: Ergebnisse der Dekonvolutionen und die entsprechenden Residuen. **Links:** Fluoreszenz „nativer“ Pel-15 unter den angegebenen Bedingungen (= Nativkontrollen). **Rechts:** Fluoreszenz von Pel-15 nach Abschluss der Renaturierung aus 3 M GdmHCl (= renaturierte Proben).

angenommen wurde. Die dritte Erklärungsmöglichkeit wäre, dass durch die Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> nicht nur die Konzentrationsverhältnisse zwischen N und HF verändert werden, sondern dass die Bindung von CaCl<sub>2</sub> auch die spektralen Eigenschaften nativer Pel-15 beeinflusst.

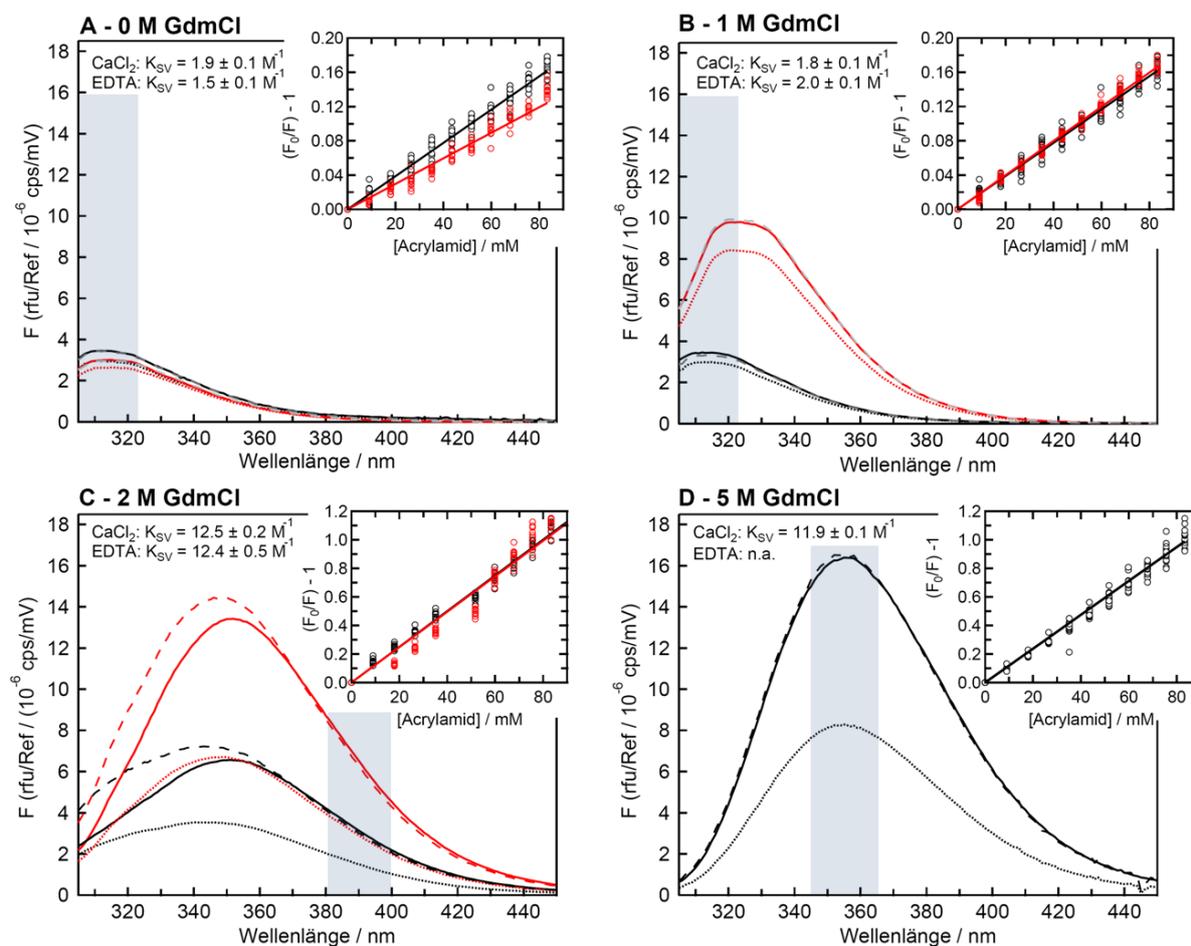
### 3.7.2. Fluoreszenzlöschung durch Acrylamid

Fluoreszenzlöschung (*quenching*) wird beobachtet, wenn ein angeregtes Fluorophor seinen Anregungszustand strahlungslos verlässt, indem es diesen auf ein anderes Molekül (*Quencher*) überträgt.

Ausgewählte Spektren aus Quenchversuchen mit Pel-15 sind in Abb. 3-48 dargestellt. Sie zeigen die bei 295 nm angeregte Tryptophanfluoreszenz von Pel-15 vor und nach Zugabe von 80 mM Acrylamid bei 0 M, 2 M und 5 M GdmHCl. Die Einschubdiagramme zeigen Stern-Volmer-Diagramme, aus denen der lineare Zusammenhang zwischen der relativen Fluoreszenz ( $F_0/F$ ) und der eingesetzten *Quencher*-Konzentration hervorgeht. Die aus den linearen Regressionen erhaltenen Anstiege sind in den Diagrammen als Stern-Volmer-Konstanten ( $K_{SV}$ ) angegeben. Sofern alle Pel-15-Moleküle in der Lösung ähnliche Konformationen besaßen, war in der Lösung nur eine Klasse von Fluorophoren vorhanden. In diesem Fall waren die erhaltenen  $K_{SV}$ -Werte unabhängig von der Detektionswellenlänge, und die Fluoreszenzemission sank bei Zugabe von Acrylamid bei jeder Emissionswellenlänge

mit der gleichen Rate. Dies war bei den GdmHCl-Konzentrationen zwischen 0 M und 1 M bzw. 5 M der Fall.

Lediglich bei *Quench*-Versuchen in Gegenwart von 2.0 M GdmHCl wurde beobachtet, dass die Fluoreszenz der Proben im langwelligeren Emissionsbereich viel stärker gelöscht wurde als im kurzwelligen Bereich. Der Grund hierfür lag nachweislich in der konformationellen Heterogenität der Pel-15 Probe: Bei 2.0 M GdmHCl denaturiert Pel-15 mit einer Zeitkonstante von etwa 6 Stunden. Da die Pel-15 Probe zum Zeitpunkt ihrer Verwendung etwa 15 Stunden alt war, lag nur ein Teil der Pel-15 Moleküle in der Lösung denaturiert vor, sodass die Fluorophore unterschiedlichen Lösungsmittelzugänglichkeiten besaßen. Jene, die sich in entfalteten Ketten befanden, wurden mit der  $K_{SV}$  gelöscht, die für die vollständig entfaltete Kette beobachtet wurde. Solche, die noch in kompakten Strukturen begraben waren, lieferten nativ-typische  $K_{SV}$ -Werte. Um die symmetrische bzw. asymmetrische Abnahme der Fluoreszenz während der Titrationsexperimente zu verdeutlichen, wurden die Spektren der maximal gequenchten Proben nach Abschluss des Experimentes auf die Fluoreszenz des

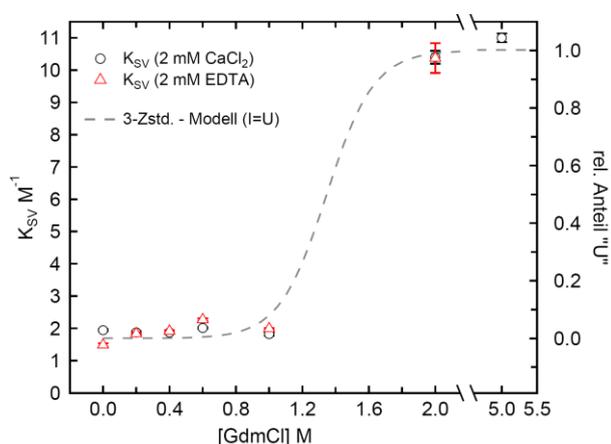


**Abb. 3-48: Löschung der Pel-15 Fluoreszenz mittels Acrylamid (AA).** Fluoreszenzspektren von Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA (rot) /  $\text{CaCl}_2$  (schwarz), pH 7.0 bei 20 °C vor und nach der Zugabe von 80 mM AA. Die Fluoreszenzspektren der maximal gequenchten Proben (*Punkte*) wurden durch den Faktor  $(F_0/F)_{370\text{nm}}$  normiert (*unterbrochene Linien*) und dem Ausgangszustand (*Linien*) überlagert. Bei GdmCl-freien Lösungen (Diagramm A – 0 M GdmCl) erfolgte die Normierung aufgrund der geringen Signalamplitude anhand von  $(F_0/F)_{330\text{nm}}$ . *Graue Bereiche* geben die Wellenlängen an, die zur Auswertung der AA-abhängigen Fluoreszenzlöschung herangezogen wurden. *Insets* zeigen die Stern-Volmer Auftragung der Fluoreszenzdaten für alle ausgewerteten Wellenlängen. Geraden zeigen das Ergebnis der linearen Regression zur Bestimmung der  $K_{SV}$ . Die Anstiege der Geraden entsprechen den  $K_{SV}$ ; sie sind in den entsprechenden Diagrammflächen angegeben.

ungequenchten Ausgangssignals normiert. Bei Proben, in denen die Lösungsmittelzugänglichkeiten der Fluorophore einheitlich waren, bildete sich das normierte Spektrum der gequenchten Proben sehr gut auf das Ausgangsspektrum ab. Für das Quenchexperiment in Gegenwart von 2.0 M GdmHCl wich das Spektrum der maximal gequenchten Probe stark vom Ausgangsspektrum ab. Neben dieser Normierungsmethode lässt sich die Inhomogenität der Fluorophor-Umgebungen einer zu analysierenden Probe einfach daran erkennen, dass die Stern-Volmer-Auftragung von einem linearen Zusammenhang abweicht. Dies ist für das Titrationsexperiment von Pel-15 in 2.0 M GdmHCl definitiv der Fall, obwohl der Unterschied zwischen nativer und denaturierter Fluoreszenz im betrachteten Emissionsbereich sehr gering sein sollte. Die Emissionsbereiche, die jeweils genutzt wurden, um die  $K_{SV}$ -Werte zu bestimmen, sind in Abb. 3-48 blau hinterlegt.

In Abb. 3-49 sind die erhaltenen Quenchkonstanten gegen die jeweils vorherrschende GdmHCl-Konzentration aufgetragen. Die Fluorophorumgebungen waren bis zu 1.0 M GdmHCl homogen. Die Stern-Volmer-Konstanten betragen im Bereich nicht-denaturierender GdmHCl-Konzentrationen im Mittel  $K_{SV} = 1.9 \text{ M}^{-1}$ ; sie ließen keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit erkennen.

Die Effizienz von Kollisionsquenchs ist unter anderem eine Funktion der Viskosität des Lösungsmittels. Da es in diesem Experiment nicht darum ging, die Quench-Effizienz zu quantifizieren, kann der Viskositätseffekt vernachlässigt werden.



**Abb. 3-49: [GdmHCl]-Abhängigkeit von  $K_{SV}$**   
 $K_{SV}$  aus Fluoreszenzlöschungsexperimenten von Pel-15WT. Im Bereich zwischen 0 M und 1 M GdmHCl wird kein wesentlicher Unterschied in den sind Lösungsmittelzugänglichkeiten von W78 beobachtet. „N“ und „HF“ lassen sich auf Basis von Quench-Experimenten nicht voneinander unterscheiden. Die unterbrochene Linie gibt als Referenz für den Faltungszustand von Pel-15 den GdmHCl-abhängigen Anteil denaturierter Pel-15 in relativen Einheiten zwischen 0 und 1 an.

### 3.7.3. HF wird durch eine Wechselwirkung mit $\text{Gdm}^+$ induziert.

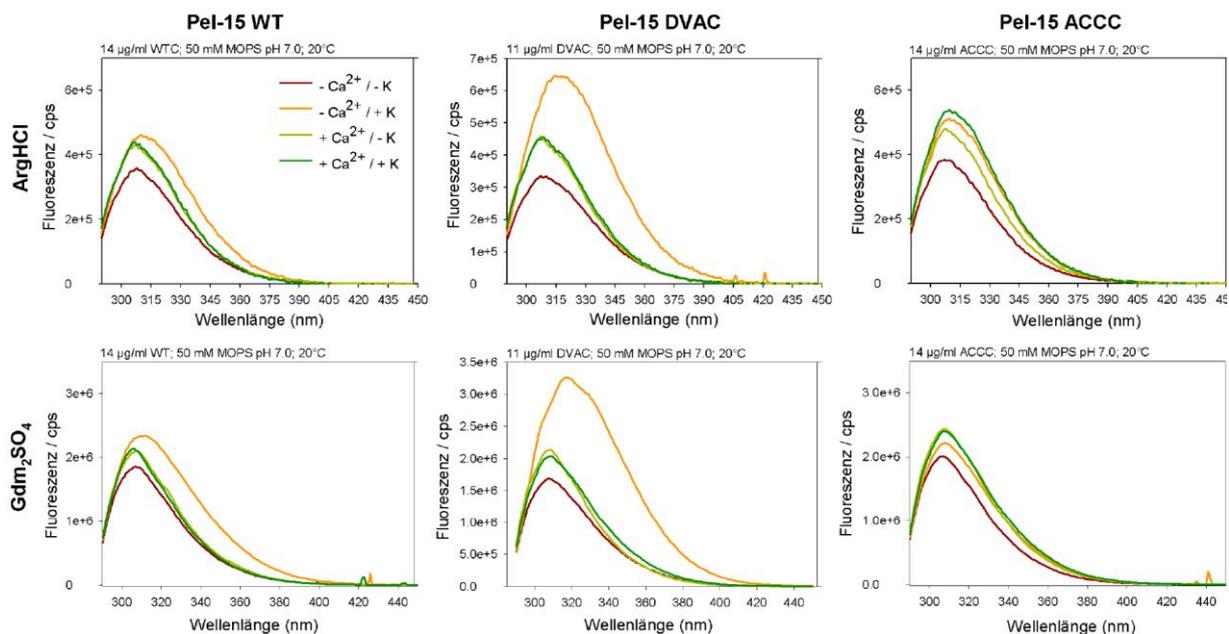
Die Tatsache, dass HF sich in Gegenwart von GdmHCl nachweisen ließ, aber durch Harnstoff (bzw. durch Harnstoff & NaCl) nicht zu induzieren war, provozierte die Frage, inwiefern die Entstehung von HF mit der Guandin-Gruppe von GdmHCl im Zusammenhang steht und ob sich HF auch in nicht-denaturierenden, guanidinhaltigen Kosmotropen (K) nachweisen lässt.

Die Inkubation von 10  $\mu\text{g/ml}$  Pel-15 WT in 0.8 M Argininhydrochlorid (ArgHCl) bzw. Guanidiniumsulfat ( $\text{Gdm}_2\text{SO}_4$ ) bewirkte die Induktion eines HF-ähnlichen Zustandes, wie er bereits zuvor in Gegenwart von GdmHCl beobachtet worden war (Abb. 3-50). Durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  ließ sich

dieser Zustand wieder depopulieren, sodass das im Anschluss gemessene Fluoreszenzspektrum wieder dem Spektrum der  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen K-freien Kontrolle entsprach.

Für die Pel-15 Variante DVAC wurden in ArgHCl die gleichen Effekte beobachtet wie in Pel-15 WT. Die Depopulation des durch  $\text{Gdm}_2\text{SO}_4$  induzierten Zustandes durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  war unvollständig. Dies zeigte sich daran, dass das Fluoreszenzspektrum von Pel-15 DVAC in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  sich im langwelligen Emissionsbereich vom Fluoreszenzspektrum der entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen, K-freien Kontrolle unterschied.

In der Pel-15 Mutante ACCC, einer Pel-15 Variante mit deletierter, hochaffiner  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle, sind ArgHCl und  $\text{Gdm}_2\text{SO}_4$  bei der Induktion von der Hyperfluoreszenz unterschiedlich effizient. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Guanidgruppe von Arginin besser mit der Proteinoberfläche interagieren kann, als das freie  $\text{Gdm}^+$ -Kation.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind im Fall von ACCC nicht in der Lage, den HF-Zustand zu negieren. Vielmehr wirkt die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  additiv und verursacht eine weitere Erhöhung des Fluoreszenzniveaus.



**Abb. 3-50: Fluoreszenzspektren von Pel-15 WT, Pel-15 DVAC und Pel-15 ACCC in ArgHCl und  $\text{Gdm}_2\text{SO}_4$**

(Pel-15 WT in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 7.0; Messung nach 5 min; Anregung: 280 nm, 20 °C, Kosmotrope (K):  $[\text{ArgHCl}] = 0.8 \text{ M}$ ,  $[\text{Gdm}_2\text{SO}_4] = 0.8 \text{ M}$ ) Einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung von Pel-15 (rotbraune Spektren) wurde ArgHCl bzw.  $\text{Gdm}_2\text{SO}_4$  zugegeben (orange Spektren). Anschließend wurde  $\text{Ca}^{2+}$  auf eine Endkonzentration von 2 mM zugegeben (grüne Spektren). Oliv gefärbte Spektren ergaben sich nach Messung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen, nativen Kontrolle.

Aus der Titration von Pel-15 mit den kosmotropen Guanidiniumsalzen leiten sich folgende Erkenntnisse ab:

1. Der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle kommt bei der Stabilisierung von N eine kritische Funktion zu.
2. Die Entwicklung der Hyperfluoreszenz wird durch die Interaktion von  $\text{Gdm}^+$ -Kationen mit Regionen in der Nähe der hochaffinen Bindestelle verursacht. Die Negation der Hyperfluoreszenz könnte auf elektrostatische Abstoßung zwischen  $\text{Gdm}^+$  und oberflächlich gebundenem  $\text{Ca}^{2+}$  zurückzuführen sein.

Die Interaktion von  $\text{Gdm}^+$  mit der Proteinoberfläche von Pel-15 ist nach diesen Ergebnissen ein unspezifischer Effekt. Er wird nicht nur durch exponierte planare Seitenketten, sondern auch durch lösungsmittelzugängliche Carboxylgruppen begünstigt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Proteinexpression und *in-vivo* Faltung

#### 4.1.1. Identifikation von Pel-15 im Rohextrakt und Temperaturabhängigkeit der periplasmatischen Expression

Die Klonierung von Pel-15WT in ein pET-Expressionssystem ermöglichte die Expression von Pel-15 mit einem N-terminalen pelB-*leader*. Dieses erlaubte es, Pel-15 unter Nutzung des Sec-abhängigen Transportsystems ins bakterielle Periplasma zu transportieren (Stephenson 2005). Der Grund für die periplasmatische Expression von Pel-15 bestand, neben einer Verringerung des Reinigungsaufwands, vor allem in der Tatsache, dass Pel-15WT drei Cysteine enthält, von denen im nativen Molekül zwei zu einer Disulfidbrücke verbunden sind (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.3.2.4, S. 14). Im Periplasma von *E. coli* wird die Ausbildung von Disulfidbrücken durch das Protein DsbA katalysiert, wobei ein Intermediat auftritt, in dem DsbA eine Disulfidbrücke zu einem Thiolrest des Zielproteins ausprägt (Bardwell *et al.* 1991). Aus dem Periplasma wurde das Protein in vergleichsweise hohem Maßstab (>60 mg/L Kulturmedium) gewonnen und in insgesamt drei Chromatographieschritten zu einer homogenen Lösung aufgereinigt.

Der Sec-abhängige Transport ins bakterielle Periplasma wird durch eine Interaktion zwischen dem membranständigen Translokon SecA mit dem cytoplasmatischen Chaperon SecB vermittelt. Da SecB ausschließlich an ungefaltete Polypeptidketten binden kann, ist der Sec-abhängige Transport nur solchen Polypeptidketten vorbehalten, deren Faltungs- bzw. Aggregationsraten nicht maßgeblich mit der SecB-Bindung konkurrieren (Randall & Hardy 1986). In spektroskopischen *in-vitro* Experimenten zeigte sich, dass Pel-15 in der Lage ist, ohne die Hilfe von Chaperonen vollständig aus chemisch induzierten Entfaltungszuständen zurückzufalten. Ferner wurde deutlich, dass die Faltungsreaktion auch unter stark reduzierenden Bedingungen (10 mM DTT) ohne einen nachweisbaren Verlust der Renaturierungsausbeute abläuft. Die Faltung in eine kompakte, nativ-ähnliche Struktur ist schnell, wodurch eine temperaturabhängige Konkurrenz zur SecB-Bindung entsteht (Hardy & Randall 1991). Sehr wahrscheinlich ist die Geschwindigkeit der Pel-15-Faltung *in-vivo* wesentlich niedriger als die Faltungsgeschwindigkeit unter *in-vitro*-Bedingungen. Grund für diese Annahme liefert die Arbeit von Hardy & Randall, nach der eine wesentliche Rolle von Signalpeptiden darin besteht, die Faltungsgeschwindigkeit von *precursor*-Proteinen zu senken und hierdurch die Wahrscheinlichkeit der SecB-Bindung zu erhöhen (Hardy & Randall 1991).

In Testexpressionen wurde durch Zymogramme festgestellt, dass Pel-15 sowohl in seiner prozessierten als auch in seiner unprozessierten Form aus SDS-induzierten Entfaltungszuständen zurückfalten und seine enzymatische Aktivität zurückgewinnen kann. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen zur

Struktur der katalytischen Untereinheit von *Erwinia chrysanthemi* Pektatlyase PelI (Creze *et al.* 2008). PelI stellt hinsichtlich seines extrazellulären Vorkommens, seines Katalysemechanismus, und der Struktur seiner katalytisch aktiven Domäne den nächsten „Verwandten“ der Alkalischen Pektatlyase Pel-15 dar. Die rechtsgängige, parallele  $\beta$ -Helix von PelI ist an eine ausgedehnte, N-terminale Domäne gekoppelt, deren Funktion bislang nicht vollständig verstanden ist, die aber die Faltung der parallelen  $\beta$ -Helix nicht beeinflusst (Creze *et al.* 2008).

Bei einer Expressionstemperatur von 15 °C ist die Bindung von SecB an entfaltete Pel-15 Moleküle offenbar schneller als die Faltung unprozessierter Pel-15. Daher ist in der unlöslichen Fraktion nur ein geringer *precursor*-Anteil nachzuweisen. Dass auch in der löslichen, zytosolischen Fraktion nur wenig prozessierte Pel-15 detektiert wird, belegt einen effizienten Transport über die innere, bakterielle Membran. Bei 30 °C ist die Expressionsrate erhöht. Zudem ist die Faltungsgeschwindigkeit bei dieser Temperatur wahrscheinlich hoch genug, um in Konkurrenz zur Rate zu treten, mit der SecB an entfaltete Ketten bindet. In der Konsequenz erhöht sich die Konzentration unprozessierter Pel-15 Moleküle im Cytosol, bis es zur konzentrationsbedingten Aggregation kommt. Neben diesen *precursor*-Aggregaten befinden sich in der unlöslichen *French-Press-Fraktion* sehr wahrscheinlich auch Polypeptidketten, die zum Zeitpunkt der Zellernte mit zellulären Komponenten assoziiert waren. Demnach ist es vorstellbar, dass ein Teil der unlöslichen Pel-15-Fraktion auf eine Überlastung der SecA-Translokons zurückzuführen ist. Mit den temperaturabhängigen Expressionstests wurde das von Randall & Hardy aufgestellte Modell der kinetischen Konkurrenz zwischen der Bindung von SecB an entfaltete Pel-15 Moleküle und der Faltung der unprozessierten Form von Pel-15 bestätigt (Randall & Hardy 1986).

Bislang sind keine zielgerichteten Experimente auf dem Gebiet der *in-vivo* Aggregation von Pel-15 beschrieben worden. Die einzige Evidenz für die Bereitschaft von Pel-15, bei hohen Proteinkonzentrationen fibrillenähnliche Strukturen auszubilden, stammt aus Kristallisationsexperimenten des Wildtyp-Proteins (Akita *et al.* 2000) (siehe Abschnitt 1.3.2.2 in der Einleitung). Es ist nicht abwegig zu vermuten, dass Pel-15 auch in der Zelle *head-to-tail*-Interaktionen ausbildet, die zur Entstehung von  $\beta$ -3-Solenoiden führen. Dass die Interaktionen innerhalb eines solchen  $\beta$ -Solenoids geeignet sind, lange Fibrillen zu stabilisieren, wurde in der Literatur für das Beispiel des Hefe-Prions HETs(218-289) gezeigt. Dieses bildet – wenn auch mit anderer Händigkeit – eine dreizählige Fibrille mit *cross*- $\beta$ -artiger Struktur aus (Wasmer *et al.* 2008).

Für die zukünftige Optimierung der Expressionsausbeuten von Pel-15 wäre es zum einen denkbar, die Expression von Pel-15 durch die gleichzeitige Überexpression von SecA zu verbessern. Experimente dieser Art wurden bereits 1999 erfolgreich durchgeführt (Cook & Kumamoto 1999). Eine andere Möglichkeit wäre es, die Expressionstemperatur einfach soweit abzusenken ( $\vartheta < 20^\circ\text{C}$ ), dass die Geschwindigkeit der Faltung von Pel 15 nicht mehr mit dem Sec-vermittelten Export konkurrieren

kann. Die in dieser Arbeit verwendete Pel-15 entstammt noch einer Expression bei 30 °C (aerob, 10 h).

Die beschriebene kinetische Konkurrenz zwischen SecB-Bindung und *precursor*-Faltung bietet die vielversprechende Möglichkeit, die Faltungsgeschwindigkeit von Pel-15 *in-vivo* zu studieren und diese beispielsweise mit unterschiedlichen, faltungsdefizienten Mutanten des Proteins zu vergleichen. Die Detektion könnte mit einem verfeinerten Zymogramm-Assay erfolgen. Hierfür müssten wahrscheinlich nur die Konzentration von PGA im Gel etwas erhöht und die Entwicklungstemperatur deutlich herabgesetzt werden.

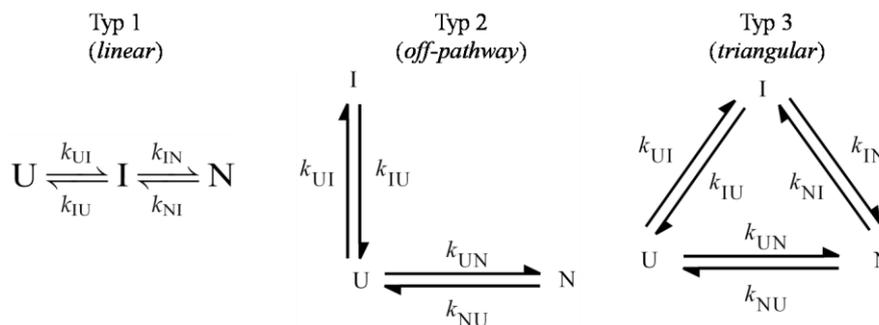
## 4.2. Die Faltung von Pel-15

In diesem Diskussionsteil werden die Ergebnisse zusammengeführt, die das Verständnis für die Faltung von Pel-15 vertiefen. Die ersten beiden Abschnitte dienen dazu, die Informationen aus Gleichgewichts- und kinetischen Experimenten in einem Minimalmodell der Pel-15-Faltung unterzubringen. Im Anschluss daran werden die Teilgleichgewichte des Modells näher betrachtet, und Experimente, die ihre Existenz begründen, werden evaluiert. Anschließend werden die Erkenntnisse zur Faltung der Mutanten DCCA, DVAA und AVAA zusammenfassen diskutiert.

Der Auffassung von Thomas Kiefhaber folgend validiert sich ein Faltungsmodell nicht einfach dadurch, dass es keinem beobachteten Effekt widerspricht (Wildegger & Kiefhaber 1997a). Hierfür genügt es schließlich, immer noch ein „Intermediat in der Hinterhand“ zu haben. Ein Modell kann erst als gesichert gelten, wenn die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten aller seiner Teilreaktionen reproduzierbar bestimmt wurden. Dies war durch diese eine Arbeit nicht zu leisten. Zukünftige Schwerpunkte, deren Bearbeitung sich an diese Arbeit anschließen sollte, sind im Ausblick zusammengefasst.

### 4.2.1. Mögliche kinetische 3-Zustandsmodelle (Wildegger & Kiefhaber 1997b)

Betrachtet man die Zustände N, HF und U vereinfachend als kinetisch separierte Ensembles von Konformationen ähnlicher Energie, dann können die Gleichgewichtsspezies N, HF und U kinetisch auf drei unterschiedliche Weisen miteinander in Beziehung stehen (Abb. 4-1).



**Abb. 4-1: Mögliche 3-Zustandsmodelle (I = HF).** Die Gleichgewichte, über die die Faltungszustände N (nativ), U (entfaltet) und I (Intermediat) in Beziehung stehen, sind durch die Denaturierungsmittelabhängigkeit der mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_{UI}$ ,  $k_{IU}$ ,  $k_{NI}$  und  $k_{IN}$  bestimmt.

Im Typ-1-Modell liegt das Intermediat I (=HF) auf dem (Ent-)Faltungsweg zwischen N und U. Betrachtet man ein Signal, das spezifisch für U ist, erwartet man eine *lag*-Phase der Entstehung von U. Im umgekehrten Fall, der Rückfaltung, würde man eine *lag*-Phase der Entstehung von N erwarten, sofern sich N und I spektroskopisch voneinander unterscheiden lassen.

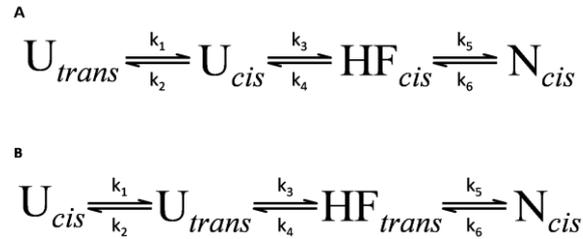
Für die Unterscheidung von Typ II und Typ III Faltungsmodellen muss die Renaturierung in Abhängigkeit eines externen Parameters, beispielsweise der Temperatur oder der Denaturierungsmittelkonzentration, gemessen werden, um die *in vitro* Stabilität der einzelnen Faltungszustände relativ zueinander zu verschieben. Stehen diese so zueinander in Beziehung, wie es für das Typ 2 Modell gezeigt ist, entspricht dies im Grunde einer Konkurrenzreaktion zwischen I und N um die entfaltete Spezies U. Da I weniger stabil ist als N, beschleunigt sich die Entstehung von N mit steigenden Denaturierungsmittelkonzentrationen. Die Entstehung von N setzt in diesem Szenario die Entfaltung von U voraus, sodass sich I bei niedrigen Denaturierungsmittelkonzentrationen in einer kinetischen Falle befindet. Der Faltungsast im „Chevron-Pot“ würde in diesem Fall von einem linearen Zusammenhang ab, und es lassen sich *roll-over* Bereiche bzw. Faltungsäste mit positiven Anstiegen identifizieren. Ein derartiges Verhalten wurde beispielsweise von Thomas Kiefhaber für die Faltungsreaktion von Lysozym veröffentlicht. Für Barnase und mehrere Varianten von Ubiquitin (Khorasanizadeh *et al.* 1996) wurden ähnliche Effekte dokumentiert. Auf der Grundlage dieser drei möglichen Modelle lässt sich für Pel-15 ein vorläufiges Faltungsmodell herleiten.

#### 4.2.1.1. Herleitung des vorläufigen Faltungsmodells für Pel-15

HF muss anhand der Erkenntnisse aus den Fluoreszenz-Denaturierungskinetiken im Faltungsweg zwischen N und U positioniert sein (vgl. Abschnitt 3.6.1.2, S. 84). Dies suggeriert ein lineares Faltungsmodell, wie es in Abb. 4-1 repräsentiert ist.

Der in Pel-15 an Position 60 befindliche Prolylrest liegt in *cis*-Konfiguration vor. Das Fluorophor W78 befindet sich zu P60 in enger, räumlicher Nachbarschaft, sodass davon auszugehen ist, dass strukturelle Veränderungen, die mit der Änderung der P60-Konfiguration einhergehen, durch W78 sehr sensitiv detektiert werden.

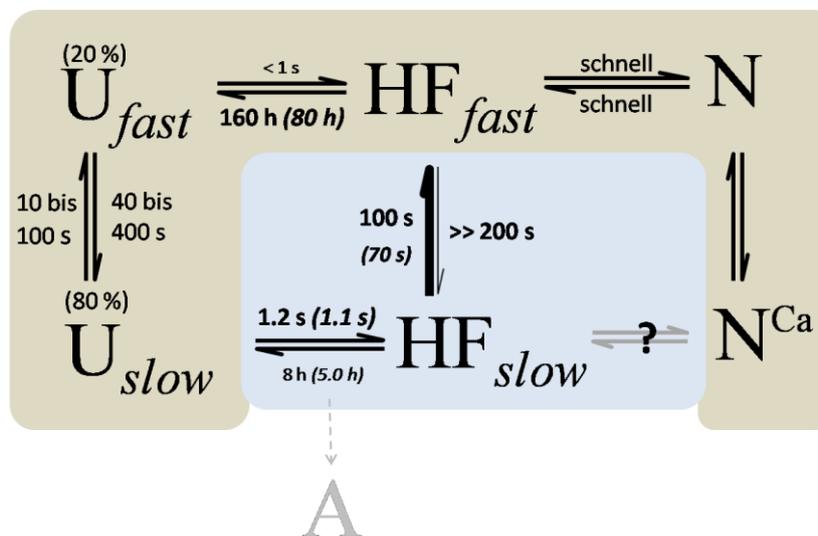
Ersetzt man im linearen 3-Zustandsmodell den denaturierten Zustand U durch ein prolinabhängiges Isomerisierungsgleichgewicht der Art  $U_{cis} \rightleftharpoons U_{trans}$ , so ergeben sich zwei mögliche, lineare Faltungswege (Abb. 4-2). Mit keinem dieser beiden Modelle lassen sich alle kinetischen Eigenschaften von Pel-15 erhärtend erklären. Zunächst sei Variante B ausgeschlossen. Wäre dieses Modell gültig, dann ließe sich der HF Zustand bei der Entfaltung nicht innerhalb der Totzeit populieren, da die *cis*-/*trans*-Prolylisomerisierung an dieser Stelle geschwindigkeitsbestimmend wäre. Die Bildung von HF während der Entfaltung wäre ein GdmHCl-unabhängiger Schritt, und man würde im Entfaltungsbereich des Chevron-Plots einen flachen Entfaltungsast erwarten. Dies ist nicht der Fall. Die umgekehrte Betrachtungsweise ist geeignet, das Modell A auszuschließen: Bei Gültigkeit dieses Faltungsweges müsste HF in einer langsamen, prolinabhängigen Reaktion entstehen. Die Population des Inter-



**Abb. 4-2: Hypothetische, lineare Faltungsmodelle bei Erweiterung des einfachen 3-Zustandmodells** um den Aspekt der Prolylisomerisierung im entfalteten Zustand. In vereinfachender Annahme betrachtet dieses Modell nur die Konfiguration von P60 (cis- oder trans-Konfiguration). Keines der beiden Modelle erklärt den Faltungs- und Entfaltungsweg von Pel-15.

mediats in der Totzeit der Rückfaltungsreaktion ließe sich mit diesem Modell nicht erklären. Die Tatsache, dass die kinetischen Eigenschaften von HF sich in keines der beiden Modelle einordnen lassen, macht es wahrscheinlich, dass im Faltungsweg von Pel-15 mindestens zwei verschiedene Intermediate auftauchen, die eine HF-Charakteristik besitzen.

Auf Basis aller in dieser Arbeit erhobenen kinetischen Daten, der Vorüberlegungen in diesem Kapitel und den Betrachtungen in den nachfolgenden Abschnitten wird für den Faltungsweg von Pel-15 das folgende Minimalmodell vorgeschlagen (Abb. 4-3):



**Abb. 4-3: Minimalmodell des Pel-15-Faltungsweges**, erstellt anhand der in dieser Arbeit dargestellten Gleichgewichts- und kinetischen Daten. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet die Zustände, die im Gleichgewicht populierte werden. Der blau hinterlegte Bereich hat im Gleichgewicht und bei der Entfaltungsreaktion keine Relevanz, ist aber wesentlicher Bestandteil der Rückfaltungsreaktion. Zahlen über den Reaktionspfeilen geben apparente Geschwindigkeitskonstanten an. **Fett markierte Zahlen** sind das Ergebnis der kinetischen Charakterisierung. **Kleine Zahlen** beziehen sich auf geschätzte Geschwindigkeitskonstanten, die noch nicht experimentell abgesichert wurden. **Zahlen in Klammern** geben die Rate der Reaktion an, wie sie in Gegenwart von  $CaCl_2$  bestimmt wurde. Aggregationseffekte wurden während der langsamen Entfaltung nahe dem Übergangsmittelpunkt und unter Gleichgewichtsbedingungen im Übergang zwischen U und HF beobachtet.

In diesem Modell werden die Zustände U und HF als konformationelle Ensembles (*DSE*, *ISE*) betrachtet, die sich in der Konfiguration von P60 unterscheiden. Der graue Bereich umschließt solche

Faltungszustände, die nach der Modellvorstellung im denaturierungsmittelabhängigen Gleichgewicht populiert werden. Dies betrifft die kinetisch separierten Spezies  $U_{\text{fast}}$  und  $U_{\text{slow}}$ , das hyperfluoreszente Gleichgewichtsintermediat  $HF_{\text{fast}}$  sowie die nativen Konformationen N bzw.  $N^{\text{Ca}}$ . Das Intermediat  $HF_{\text{slow}}$  (blau hinterlegt) ist weniger stabil als  $HF_{\text{fast}}$  und wird aus diesem Grund nur als transiente Spezies während der Rückfaltung beobachtet. Fluoreszenzspektroskopisch sind die Spezies, die das Ensemble intermediärer Konformationen (*ISE*) populieren, nicht zu unterscheiden.

#### 4.2.2. Cis-/trans-Prolylisomerisierung und die Faltungsreaktion von Pel-15

##### *Hintergrund*

Peptidbindungen zwischen „normalen“ Seitenketten liegen hauptsächlich in trans-Konfiguration vor. Die cis-Konfiguration ist aufgrund sterischer Behinderungen wesentlich ungünstiger, weshalb sich nur etwa 0.05 % aller Nicht-Prolin-Peptidbindungen in cis-Konfiguration befinden (Schmid 1993). Durch den Ringschluss innerhalb von Prolylresten ist die sterische Behinderung für die cis-/trans-Isomerisierung weniger stark ausgeprägt – die Stabilisierungsenthalpie liegt aus diesem Grund nur in einem Bereich von 2 bis 5 kJ/mol. Der partielle Doppelbindungscharakter der X-Pro-Peptidbindung allerdings führt zu einer sehr hohen Aktivierungsenergie ( $E_A = 85$  kJ/mol) (Schmid 1993), sodass sich die Gleichgewichtsverteilung zwischen beiden Konfigurationen bei 25 °C mit einer Zeitkonstante von 10 bis 100 s einstellt (Cheng & Bovey 1977) – dass diese langsame Zeitkonstante den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Faltungsreaktion von Proteinen darstellen könnte, wurde erstmals von Brandts *et al.* (1975) in Betracht gezogen.

Die nativen Konformationen der meisten Proteine sind auf eine spezifische Prolylkonfiguration angewiesen; in diesem Fall können nur jene Polypeptidketten den N-Zustand erreichen, die eine „korrekte“ Prolylkonfiguration enthalten. In allen anderen Ketten muss vor dem Erreichen des nativen Zustands eine Prolylpeptid-Isomerisierung (PPI) stattfinden. Spätestens seit der Veröffentlichung von Jakob & Schmid (2008) ist nachgewiesen, dass es Proteine gibt, deren native Strukturen an bestimmten Positionen sowohl cis- als auch trans-Prolylpeptide enthalten können. Illustriert wurde dies am Beispiel der N2 Domäne des filamentösen *E. coli* Phagen G3P. Das betreffende Peptid Asp-Pro<sup>cis</sup> ist dort im *turn* eines  $\beta$ -*hairpins* lokalisiert; sein cis/trans Verhältnis in der nativen Struktur beträgt 85/15. In einer weiterführenden Studie dieses Proteins wurde gezeigt, dass aus den Wechselwirkungen zwischen den  $\beta$ -Strängen des *hairpins* etwa 10 kJ/mol zur Verfügung stehen, um die cis-Konfiguration des Prolylrests zu begünstigen wird.

Der kritische Einfluss von PPI auf die Faltung  $\beta$ -helikaler Proteine wurde 2002 am Beispiel einer PelC-Mutagenesestudie von Kamen und Woody nachgewiesen (Kamen & Woody 2002). Ein Gegenbeispiel hierfür findet sich in der die parallelen  $\beta$ -Helix von Pertactin. Junker und Clark konnten zeigen, dass cis-Prolylpeptide, die in peripheren, flexiblen *turn*-Segmenten untergebracht sind, keinen signifikanten Einfluss auf die Faltungsrate der  $\beta$ -Helix ausüben (Junker & Clark 2009).

In Pel-15 befindet sich ein cis-Prolylpeptid (Ala-Pro60<sup>cis</sup> = P60<sup>cis</sup>) ausgehend von N-Terminus am Ende der zweiten Helixwindung im T3 *turn* zwischen PB3/2 und PB1/3. Die strukturelle Umgebung des Prolylrestes in Pel-15 weist also Ähnlichkeiten zur Umgebung des Asp-Pro<sup>cis</sup> Peptids im N2,-Protein auf. Da die flankierenden  $\beta$ -Stränge im Fall von Pel-15 allerdings keine Interaktionen miteinander eingehen, muss die Stabilisierung des cis-Peptids durch die Seitenketteninteraktionen in den parallelen Faltblättern PB3 und PB1 erfolgen.

P60<sup>cis</sup> „eröffnet“ in Pel-15 die evolutionär konservierte, dritte Helixwindung. Vier der übrigen Proline, deren Funktion bislang nicht erforscht wurde, konzentrieren sich ebenfalls in den N-terminalen Windungen des Proteins. Spekulieren ließe sich, dass sie an der Ausbildung des richtigen Registers während der Faltung beteiligt sind. Ein sechstes Prolin schließlich ist an der Abschirmung des hydrophoben Kerns im C-terminalen Teil des Proteins beteiligt.

#### *Prolylisomerisierung in Pel-15*

Die Entfaltungsreaktion von Pel-15 ist sehr langsam. Sie vollzieht sich auch bei sehr hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen etwa im gleichen Zeitfenster wie die Isomerisierung von Prolylpeptiden. Versuche, die Einstellung des Gleichgewichtes  $U_{\text{fast}} \rightleftharpoons U_{\text{slow}}$  direkt durch kinetische Sprungexperimente (Schmid *et al.* 1986) zu charakterisieren, waren aus diesem Grund nicht erfolgreich. Allerdings erlaubten es inverse Doppelsprungexperimente der Form  $U \rightarrow N \rightarrow U$ , aus der Totzeitamplitude, die bei der Entstehung von N beobachtet wurde, einen  $U_{\text{fast}}$ -Anteil von etwa 20 % abzuschätzen (vgl. Abschnitt 3.6.5, S. 98). Die anderen 80 % der entfalteten Pel-15 Moleküle im *DSE* entsprechen demnach der Form  $U_{\text{slow}}$ ; ihre Rückfaltung muss einen langsamen Isomerisierungsschritt enthalten.

Alle experimentellen Befunde stimmen in der Feststellung überein, dass die Rückfaltung von Pel-15 durch die schnelle Population des *ISE* eingeleitet wird. Ganz offensichtlich spielt es keine Rolle, in welcher Konfiguration sich das Ala-Pro Peptid gerade befindet; andernfalls müsste bei der Entstehung von HF eine langsamere Phase zu beobachten sein. Die trans-zu-cis-Konversion zwischen  $HF_{\text{slow}}$  und  $HF_{\text{fast}}$  ist sehr wahrscheinlich sterisch behindert, da in beiden Spezies bereits ein großer Anteil von  $\beta$ -Struktur ausgebildet ist. In dieser Hinsicht ähneln sich möglicherweise die Faltungswege von Pel-15 und N2,, stärker als zunächst vermutet: In beiden Proteinen isomerisiert die X-Pro Peptidbindung innerhalb einer strukturierten Umgebung, was für diese Art der Reaktion nach bisherigem Kenntnisstand eher ungewöhnlich ist.

Weitere Möglichkeiten, die sich bieten, um den Einfluss von Prolin auf die Faltung eines Proteins zu überprüfen, sind die Beobachtung der Rückfaltungsreaktion in Gegenwart von Prolylpeptid-Isomerasen (PPIasen) oder die zielgerichtete Mutagenese der betreffenden Prolylreste gegen andere Seitenketten. Da PPIasen typischerweise mit entfalten Ketten interagieren müssen, um die Prolylpeptidisomerisierung zu katalysieren, ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die langsame Faltungs-

phase durch ihre Gegenwart „verschwindet“. Die Mutation von Prolylresten ist demzufolge die erfolgversprechendere Methode, um die Funktion von P60 zu analysieren.

### 4.2.3. Modellhafte Erklärung der Faltungs- und Entfaltungskinetiken

#### 4.2.3.1. Die Rückfaltungsreaktionen: Die Entstehung von N bzw. N<sup>Ca</sup>

Bei der Rückfaltung aus dem *DSE* renaturieren 20 % der Moleküle in der Totzeit über HF<sub>fast</sub> zu N (bestätigt durch inverse Doppelsprungexperimente). Die anderen 80 % bilden gemäß der Modellvorstellung in der Totzeit einen hyperfluoreszenten Zustand mit nicht-nativer P60 Konfiguration aus. Die schnellen Faltungsäste im Pel-15 Chevron-Plot, die mit dieser Reaktion assoziiert werden, waren in Gegenwart von EDTA und CaCl<sub>2</sub> und in Abwesenheit von Denaturierungsmittel gleich schnell, was bedeutet, dass HF<sub>slow</sub> keine Affinität zu Ca<sup>2+</sup>-Ionen besitzen kann. Andernfalls würde man erwarten, dass die schnelle Faltungsphase durch die Zugabe von Ca<sup>2+</sup>-Ionen noch beschleunigt werden könnte. An die Totzeit-Entstehung von HF<sub>slow</sub> schließt sich die langsame Relaxation zu HF<sub>fast</sub> an. Die niedrige Zeitkonstante von ca. 100 s und die geringe Denaturierungsmittelabhängigkeit machen es wahrscheinlich, dass diese Reaktion durch cis/trans Prolylisomerisierung limitiert ist (Brandts *et al.* 1975; vgl. Abschnitt 4.2.2).

Da das Gleichgewicht zwischen HF<sub>fast</sub> und N sehr schnell ist (nachgewiesen durch diverse Titrationsexperimente und durch limitierte Doppelsprungexperimente), muss die Reaktion von HF<sub>slow</sub> zu HF<sub>fast</sub> den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Pel-15 Rückfaltungsreaktion darstellen.

Dem Faltungsmodell folgend ist der Faltungszustand N das verbindende Element zwischen den Spezies N<sup>Ca</sup> und HF<sub>fast</sub>. In Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> endet die Rückfaltung unabhängig von der Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration bei N<sup>Ca</sup>. In Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> stellt sich der Endzustand der Rückfaltungsreaktion bei zunehmenden Denaturierungsmittelkonzentrationen als Mischung aus N und HF<sub>fast</sub> dar. Unter „faltungshemmenden“ Bedingungen, also in Gegenwart höherer GdmHCl-Konzentrationen, ist HF<sub>fast</sub> relativ zu N soweit stabilisiert, dass letzteres nicht mehr populiert wird – HF<sub>fast</sub> ist unter diesen Bedingungen der energetisch günstigste Zustand in der Faltungslandschaft.

*Weiterführende Fragen bezüglich der Pel-15 Rückfaltung:*

1) Ca<sup>2+</sup> hat keine PPIase-Aktivität, beschleunigt aber die Reaktion HF<sub>slow</sub> ⇌ HF<sub>fast</sub>. Warum?

Die langsame Faltungsreaktion HF<sub>slow</sub> ⇌ HF<sub>fast</sub> durch die Gegenwart von Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu beschleunigen, dürfte nicht möglich sein, wenn ihre Rate tatsächlich nur durch die Isomerisierung von P60 limitiert ist. Tatsächlich erfährt die Rate dieser Reaktion in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> eine Zunahme um den Faktor 1.4. Hierin deutet sich an, dass während der Rückfaltung eine Reaktion stattfindet, die im Faltungsweg noch vor dem prolinabhängigen Schritt ablaufen muss. Eine mögliche Erklärung wäre es, die Reaktion von HF<sub>slow</sub> zu HF<sub>fast</sub> als einen Prozess zu betrachten, der durch mehrere Teilreaktionen bestimmt wird.

## II) An welcher Stelle im Faltungsweg entstehen Aggregate?

Die Bildung von  $HF_{\text{slow}}$  und bei höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen auch von  $HF_{\text{fast}}$  konkurriert mit der Entstehung fehlgefalteter Aggregate. Effekte dieser Art wurden in Langzeitexperimenten bei GdmHCl-Konzentrationen nahe dem Übergangsmittelpunkt beobachtet. Kinetische Konkurrenzreaktionen (*kinetic partitioning*) wurden für in *in-vitro* Rückfaltungsexperimente mehrfach beschrieben (Jahn & Radford 2005).

### 4.2.3.2. Biphaseische Entfaltungsreaktion: Entstehung des DSE ( $U_{\text{fast}} \rightleftharpoons U_{\text{slow}}$ )

Dass während der Entfaltungsreaktion tatsächlich ein HF-ähnliches Intermediat auftritt, wurde durch Messungen am isofluoreszenten Punkt zwischen N und U zweifelsfrei nachgewiesen. Es wurde ferner gezeigt, dass ein Entfaltungsintermediat das Gleichgewicht zwischen N und U vermittelt, dass die Entfaltungsreaktion demzufolge linear verlaufen muss.

Wenig evident ist, dass die in der Fluoreszenz beobachtete *lag*-Phase der Entstehung von U nur in Fluoreszenzexperimenten nachzuweisen ist. CD-Kinetiken laufen verzögerungsfrei ab (Monika Walter, unveröffentlichte Ergebnisse).

Bislang unvollständig verstanden ist der Einfluss von  $\text{CaCl}_2$  auf die Denaturierung von Pel-15 (vgl. Abschnitt 3.6.1.2, S. 84). Um dies zu verdeutlichen, sollen die Ergebnisse noch einmal kurz zusammengefasst werden: Bei der Entfaltung von Pel-15 in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  (detektiert bei 353 nm, nahe der maximalen Fluoreszenz des denaturierten Proteins) beobachtet man eine Totzeitamplitude von ca. 55 %, was in sehr guter Näherung der Fluoreszenz des hyper-fluoreszenten Intermediates entspricht. Modellhaft formuliert bedeutet dies, dass in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  das Gleichgewicht  $N^{\text{Ca}} \rightleftharpoons N$  weit auf der Seite von N liegt, welches dann innerhalb von Sekundenbruchteilen („schnell“) zu  $HF_{\text{fast}}$  reagiert. Die Durchführung der Denaturierung in Gegenwart höherer  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen führt zur Population des Zustandes  $N^{\text{Ca}}$  in gleichem Maße, wie der Anteil von N sinkt. Da  $N^{\text{Ca}}$  stabiler ist als N, äußert sich dies in einer Reduktion der Totzeitamplituden und im Zusammenhang damit in einer Abnahme der apparenten Entfaltungsgeschwindigkeit. Dass diese Art der Betrachtung formal richtig ist, bestätigt sich darin, dass der Faktor, um den die Totzeitamplitude der Entfaltung reduziert wird, dem Faktor entspricht, um den sich die Entfaltungsrate verlangsamt: In Gegenwart von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  sind beide Werte auf ungefähr ein Fünftel ihrer jeweiligen Ausgangswerte reduziert.

Qualitativ scheinen die Denaturierungskinetiken also das postulierte Modell zu unterstützen. Quantitativ beschrieben zeigt sich hier allerdings eine Diskrepanz. Stellt man die Entfaltung von  $N^{\text{Ca}}$  als konsequente Reaktion der Art



dar, so ist das initiale Verteilungsgleichgewicht unmittelbar vor Beginn der Denaturierung durch die Gleichgewichtskonstanten  $K_{N\text{NCa}}$  und  $K_{\text{NHF}}$  bestimmt. Sie berechnen sich nach dem Massenwirkungsgesetz gemäß

$$K_{\text{NHF}} = \frac{[\text{HF}]}{[\text{N}]} = \frac{f_{\text{HF}}}{f_{\text{N}}} \quad (32)$$

bzw.

$$K_{\text{Ca}} = \frac{[\text{N}] \cdot [\text{Ca}^{2+}]}{[\text{NCa}]} \quad (33)$$

Dabei ist  $[\text{Ca}^{2+}]$  die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Lösung. Ferner sind unter den betrachteten Bedingungen nur die Zustände  $\text{N}^{\text{Ca}}$ ,  $\text{N}$  und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  populiert, sodass sich schreiben lässt:

$$\frac{[\text{N}^{\text{Ca}}] + [\text{N}] + [\text{HF}_{\text{fast}}]}{[\text{P}]_{\text{gesamt}}} = f_{\text{N}^{\text{Ca}}} + f_{\text{N}} + f_{\text{HF}_{\text{fast}}} = 1 \quad (34)$$

Dabei sind  $f_{\text{N}^{\text{Ca}}}$ ,  $f_{\text{N}}$  und  $f_{\text{HF}_{\text{fast}}}$  die relativen Anteile an der Gesamt-Proteinkonzentration ( $P_{\text{gesamt}}$ ). Die apparente Rate der Entfaltung von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  ( $k_{\text{app, HF} \rightarrow \text{U}}$ ) ergibt sich als Produkt der mikroskopischen Entfaltungsrates  $k_{\text{HF}_{\text{fast}}}$  und dem relativen Anteil von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  an der Gesamtkonzentration ( $f_{\text{HF}_{\text{fast}}}$ ):

$$k_{\text{app, HF} \rightarrow \text{U}} = k_{\text{HF}} \cdot \frac{[\text{HF}]}{[\text{P}]_{\text{gesamt}}} = k_{\text{HF}} \cdot f_{\text{HF}} \quad (35)$$

Setzt man die Gleichungen (32)-(34) in Gleichung (35) ein, so erhält man nach Isolation und Separation der Variablen:

$$k_{\text{app, HF} \rightarrow \text{U}} = k_{\text{HF}} \cdot \frac{K_{\text{NHF}}}{1 + K_{\text{NHF}} + \frac{[\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{Ca}}}} \quad (36)$$

Aus dem Pel-15-Faltungsmodell geht hervor, dass das Gleichgewicht zwischen  $\text{N}$  und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  in Gegenwart von 6 M GdmHCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  weit auf der Seite des Intermediates liegen muss. Für  $K_{\text{NHF}}$  ist demzufolge ein sehr großer Wert anzunehmen. Bedenkt man ferner, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsgleichgewicht zwischen  $\text{N}$  und  $\text{N}^{\text{Ca}}$  unter diesen Bedingungen sehr wahrscheinlich in Richtung von  $\text{N}$  verschoben ist und dass daraus ein großer Wert für  $K_{\text{Ca}}$  resultiert, so dürfte sich die apparente Entfaltungsrates nach Gleichung (36) auch durch eine 10fache Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration theoretisch nicht oder nur unwesentlich verändern.

Obgleich das postulierte Faltungsmodell sehr viele Aspekte in der Faltung und Entfaltung von Pel-15 erklärt, weist die Diskrepanz in den Denaturierungskinetiken deutlich darauf hin, dass es notwendig ist, die Pel-15 Faltung/Entfaltung durch zusätzliche Experimente zu beleuchten. Zum einen muss in diesen Experimenten die Existenz zusätzlicher Gleichgewichte oder Faltungszustände getestet werden. Zum anderen sollte geprüft werden, wieviele scheinbare Widersprüche sich klären, wenn die

Oberfläche von Pel-15 so optimiert wird, dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  keine Veränderung der Fluoreszenz mehr nach sich ziehen kann.

#### 4.2.3.3. Implikationen aus dem Faltungsmodell

##### 1) Die Berechnung der freien Stabilisierungsenthalpie aus Gleichgewichtsübergängen

Aufgrund der Gleichgewichtslage zwischen  $\text{HF}_{\text{slow}}$  und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  wird in Faltungs- und Entfaltungsübergängen ausschließlich  $\text{HF}_{\text{fast}}$  detektiert, sodass sich die ermittelten Stabilitäten auf die Gleichgewichte  $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}_{\text{fast}}$  (festgelegt auf 3.32 kJ/mol) und  $\text{HF}_{\text{fast}} \rightleftharpoons \text{DSE}$  (ca. 27 kJ/mol) beziehen.

##### 2) Die Berechnung von Übergangsmittelpunkten aus Chevron-Ästen

Die Entfaltungsreaktion vollzieht sich modellgemäß über  $\text{HF}_{\text{fast}}$  und endet in einem Gleichgewicht denaturierter, kinetisch separierter Zustände (*DSE*). Die Rückfaltung verläuft hingegen zu mindestens 80 % über  $\text{HF}_{\text{slow}}$ . Folglich entsprechen der Entfaltungsast und der Rückfaltungsast unterschiedlichen Teilreaktionen im Faltungsweg. Die GdmHCl-Konzentration, bei der der schnelle Faltungsast den Entfaltungsast schneidet, als Übergangsmittelpunkt des Teilgleichgewichtes  $\text{HF}_{\text{fast}} = U_{\text{fast}}$  zu betrachten, ist daher nur gestattet, wenn für die Rückfaltungsreaktion über  $\text{HF}_{\text{fast}}$  und über  $\text{HF}_{\text{slow}}$  die gleichen Raten und die gleichen Denaturierungsmittelabhängigkeiten angenommen werden.

##### 3) Genauigkeit der geschätzten Zeitkonstanten für a) $\text{HF}_{\text{slow}} \rightleftharpoons U_{\text{slow}}$ und b) $U_{\text{fast}} \rightleftharpoons \text{HF}_{\text{fast}}$

Die Zeitkonstanten, die im Modell für a) und b) angegeben sind, stellen lediglich Erwartungswerte dar, die anhand bekannter Parameter geschätzt wurden.

Im Fall a) beruhte diese Schätzung auf der Annahme, dass die Entstehung von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  mindestens ebenso schnell verlaufen muss, wie die Entstehung von  $\text{HF}_{\text{slow}}$ . In diesem Fall läge die Rate der Bildung von HF unabhängig von der P60 Konfiguration bei höchstens 1 s.

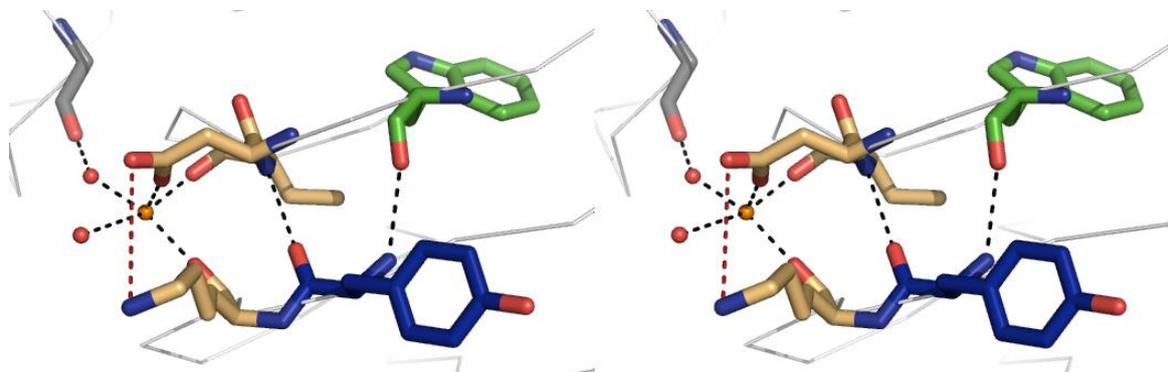
Der Abschätzung im Fall b) liegt die Annahme zu Grunde, dass die langsame Entfaltung von  $\text{HF}_{\text{slow}}$  eine ähnliche Denaturierungsmittelabhängigkeit besitzt wie die Entfaltungsreaktion von  $\text{HF}_{\text{fast}}$ . Die Entfaltungsäste beider Reaktionen wären nach dieser Idee parallel. Ausgehend von der  $\text{HF}_{\text{slow}}$ -Entfaltungsrate in 6.2 M GdmHCl, die mittels Doppelsprungtechnik bestimmt wurde, ergibt sich damit für die Entfaltung von  $\text{HF}_{\text{slow}}$  in Abwesenheit von Denaturierungsmittel eine Zeitkonstante im Bereich zwischen fünf und acht Stunden. Dies wäre etwa das 20fache der Rate, mit der  $\text{HF}_{\text{fast}}$  entfaltet und würde die prognostizierte Stabilitätsdifferenz zwischen  $\text{HF}_{\text{fast}}$  und  $\text{HF}_{\text{slow}}$  bestätigen.

#### 4.2.4. Die verschiedenen Teilgleichgewichte des Pel-15 Faltungsmodells

##### 4.2.4.1. Das Teilgleichgewicht $\text{N} \rightleftharpoons \text{N}^{\text{Ca}}$

Der Zustand  $\text{N}^{\text{Ca}}$  stellt die stabilste, enzymatisch aktive Form von Pel-15 dar. Auf der Oberfläche von Pel-15 befinden sich zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen, die den hochbeweglichen *turn*-Bereich T3/2 flankieren. Ihre Affinitäten betragen gemäß der Bestimmung mittels ITC und Fluoreszenztitrationen 3 mM und

10  $\mu\text{M}$ . Akita *et al.* postulierten bei Veröffentlichung der Pel-15 Struktur, dass die hochaffine Bindestelle strukturell relevant ist, während die bei neutralem pH niedrigaffine Bindestelle lediglich katalytische Funktionen übernimmt (Akita *et al.* 2001). Die strukturelle Bedeutsamkeit der hochaffinen Bindestelle hat sich in vielen Experimenten zweifelsfrei nachweisen lassen: In Gleichgewichtsexperimenten beispielsweise genügt 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , um den HF-Effekt vollständig zu unterdrücken und den Übergangsmittelpunkt um eine halbe Molarität zu niedrigeren Konzentrationen zu verschieben. Auf der anderen Seite zeigten  $\text{Gdm}^+$ -Titrationsexperimente, die an einer bindungsdefizienten Variante von Pel-15 (Mutation D80A) durchgeführt wurden, dass ein Teil der Hyperfluoreszenz auch dann gelöscht werden kann, wenn Pel-15 nur über die niedrigaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verfügt. Dies widerspricht der These von Akita und zeugt eher davon, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Stabilisierung ein additiver



**Abb. 4-4: Stereodiagramm der Struktur im Bereich hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$  - Bindungsstelle.** Reste, die direkt an der Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  - Ions (orange) beteiligt sind, sind als ockerfarbene *sticks* dargestellt (D80, V81, K103). Der Rückgrat-Carbonylsauerstoff von G34 (grau) ist auf dem flexiblen T3/2-*turn* lokalisiert und ist über ein vermittelndes Wassermolekül (rote Kugeln) an der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligt; Schwarze, gestrichelte Linien kennzeichnen H-Brücken zwischen Rückgrat-Atomen. Ihre Länge ist geringer als 3.0 Å. Die rot-gestrichelte Linie (Länge: 5.0 Å) entspricht einer potentiellen Salzbrücke zwischen den Seitenketten von K103 und D80. Die Ringsysteme von Y102 (blau) und W78 (grün) sind etwa 8.8 Å voneinander entfernt, liegen also in FRET-Distanz.

Effekt beider Bindestellen ist. Die in späteren Abschnitten diskutierten Stabilitätsverluste der Pel-15 Varianten AVAA und DVAA lassen Ähnliches vermuten.

An verschiedenen Stellen in dieser Arbeit wurde die Vermutung geäußert, dass die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  möglicherweise nicht nur das Gleichgewicht zwischen N und  $\text{N}^{\text{Ca}}$  verschiebt, sondern sich direkt auf die Quantenausbeute der W78-Fluoreszenz auswirkt. Evidenz für das Auftreten eines solchen Phänomens war z.B. durch den Vergleich der DCCA Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtsübergänge gefunden worden, in denen die  $\text{Ca}^{2+}$ -bedingte Stabilisierung nur etwa 60 % dessen betrug, was man anhand von Bindungstitrationsexperimenten hätte erwarten können. Anhand der Röntgenkristallstruktur von Akita *et al.* lässt sich die Ursache dieses Phänomens erklären (Abb. 4-4). Demnach beruht die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der nativen Fluoreszenz auf der engen räumlichen Nähe von Y102 und W78. Die Rückgrat-Atome von Y102 prägen H-Brücken zu W78 und D80 aus. Darüber hinaus wird die Ausrichtung von Y102 durch das benachbarte Lysin (K103) beeinflusst, dessen Carbonylsauerstoff einen Teil der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle darstellt und das mit seiner Seitenkette eine Salzbrücke zum Asparatrest D80 ausbildet. D80 seinerseits stellt den kritischen Rest der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -

Bindung dar. Seine Entfernung führt zum vollständigen Verlust der Bindungsaffinität und wirkt sich sogar leicht negativ auf die enzymatische Aktivität aus (Hatada *et al.*, 2000). Die aromatischen Ringsysteme von Y102 und W78 liegen in FRET Distanz zueinander, und eine Verringerung ihres Abstandes, beispielsweise ausgelöst durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ , ist sehr gut vorstellbar. Hierdurch würde sich die FRET-Effizienz von Y102 auf W78 und damit auch die Quantenausbeute der W78-Fluoreszenz erhöhen. Solange Experimente bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durchgeführt werden, ist die ohnehin recht geringe Auswirkung dieses Effektes nicht wesentlich. Lediglich die Durchführung von Messungen in verschiedenen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen erforderte es, für jede Bedingung separate Kontrollen durchzuführen und die Ergebnisse vor ihrem Vergleich darauf zu normieren.

#### 4.2.4.2. Das schnelle Teilgleichgewicht $\text{N} \rightleftharpoons \text{HF}_{\text{fast}}$

Die hohe Geschwindigkeit des Gleichgewichts zwischen N und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  lässt vermuten, dass beide Spezies nur durch eine sehr geringe Aktivierungsbarriere voneinander getrennt sind. Aus struktureller Sicht lässt sich dies untermauern: Die sekundärstrukturempfindlichen fern-UV CD-Signale beider Spezies sind nicht voneinander zu unterscheiden. Ferner stellten sich sowohl die GdmHCl-induzierte Entstehung von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  als auch die Rückgewinnung von N durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  als sprunghafte Signaländerungen dar, die innerhalb der Totzeit manueller Mischmethoden abgeschlossen waren. Dies wurde beispielsweise durch limitierte Doppelsprungexperimente deutlich (vgl. Abschnitt 3.6.5.1, S. 101), in denen das Gleichgewicht zwischen N (bzw.  $\text{N}^{\text{Ca}}$ ) und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  getestet wurde. Die Enthalpiedifferenz in Abwesenheit von Denaturierungsmittel, wie sie für dieses Teilgleichgewicht aus nah-UV CD-Übergängen der Pel-15 Variante DCCA hervorging, liegt in Abwesenheit von  $\text{CaCl}_2$  bei etwa 3.3 kJ/mol. Den Regressionsergebnissen zufolge ist dieser Wert mit einer großen Unsicherheit behaftet. Dies ist zum einen durch die nur sehr schwach ausgeprägte Basislinie des nah-UV CD-Vorübergangsbereiches und zum anderen durch die starke Messwerte-Streuung zu erklären, die sich zwangsläufig ergibt, wenn sehr kleine Amplitudenunterschiede mittels nah-UV CD-Spektroskopie aufgelöst werden müssen. Die bestimmte Enthalpiedifferenz entspricht einem ungefähren  $\text{HF}_{\text{fast}}$ -Anteil von ca. 15-20 % in Abwesenheit von Denaturierungsmittel.

Eine interessante Frage ist die nach dem strukturellen Unterschied zwischen N und  $\text{HF}_{\text{fast}}$ . Nach den Ergebnissen der nah-UV CD-Spektroskopie liegt der strukturelle Unterschied zwischen beiden Faltungszuständen in einer erhöhten Beweglichkeit des begrabenen Seitenkettenrestes W78 – ein offensichtlicher Hinweis darauf, dass die Packung des hydrophoben Kerns von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  gegenüber N verändert ist. Eine schnelle Kompaktierungsreaktion in den zentralen Windungen der  $\beta$ -Helix würde eine gute Erklärung sowohl für das schnelle Reaktionsgleichgewicht als auch für die ähnlichen Sekundärstrukturen beider Zustände liefern. An der Kristallstruktur von Pel-15-AVAA wurde deutlich, dass die H-Brücke zwischen dem Heterostickstoffatom im Indolring von W78 und dem Carbonylsauerstoff im Rückgrat von A85 sehr sensibel auf konformationelle Veränderungen zu reagieren scheint. Eine Wasserstoffbrückenbindung trägt im Durchschnitt etwa 4-5 kJ/mol zur

Stabilität eines Proteins bei (Baldwin 2007). Angesichts dessen ist es verlockend zu behaupten, dass die beobachtete Enthalpiedifferenz von 3.3 kJ/mol dem stabilisierenden Beitrag dieser Wasserstoffbrückenbindung entspricht.

#### 4.2.4.3. Das Teilgleichgewicht $\text{HF}_{\text{slow}} \rightleftharpoons \text{HF}_{\text{fast}}$

Modellgemäß wird der hyperfluoreszente Zustand von Pel-15 durch zwei Zwischenzustände populiert, die fluoreszenzspektroskopisch nicht zu differenzieren sind und deren Gleichgewicht (unter anderem) durch die langsame cis-/trans-Isomerisierung des Ala59-Pro60-Peptides bestimmt sein muss. Dass das Gleichgewicht dieser Isomerisierungsreaktion auf der Seite von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  liegt, implizieren die Ergebnisse der limitierten Doppelsprungexperimente ( $\text{N} \rightarrow \text{HF} \rightarrow \text{N}$ ; vgl. Abschnitt 3.6.5.1). In diesen hatte sich herausgestellt, dass im Zeitraum vieler Minuten keine zusätzliche, langsame Rückfaltungsphase auftritt, wenn  $\text{HF}_{\text{fast}}$  durch GdmHCl induziert wird; eben diese langsame Phase wäre allerdings erwartet worden, wenn  $\text{HF}_{\text{slow}}$  durch eine solche Isomerisierungsreaktion aus  $\text{HF}_{\text{fast}}$  entstehen könnte.

Die langsame Reaktion von  $\text{HF}_{\text{slow}}$  zu  $\text{HF}_{\text{fast}}$  bei höheren GdmHCl-Konzentrationen wird in der Fluoreszenz als monoexponentielle Kinetik beobachtet. Zukünftig wären Sprungexperimente denkbar, die darauf abzielen,  $\text{HF}_{\text{slow}}$  und  $\text{HF}_{\text{fast}}$  noch besser voneinander zu separieren. Der einfachste Fall, Sprungexperimente der Form  $\text{U} \rightarrow \text{HF}_{\text{slow}} \rightarrow \text{N}$ , sind nicht praktikabel, da  $\text{HF}_{\text{slow}}$  auch in Gegenwart von 1 M GdmHCl mit einer Zeitkonstante zu  $\text{HF}_{\text{fast}}$  konvergiert, die es verhindert, es gegenüber  $\text{HF}_{\text{fast}}$  zu akkumulieren. Eine Möglichkeit bietet sich allerdings in dem nachgelagerten Gleichgewicht  $\text{HF}_{\text{fast}} \rightleftharpoons \text{N}$ : Sobald  $\text{HF}_{\text{fast}}$  aus  $\text{HF}_{\text{slow}}$  entstanden ist, kann es sehr schnell zu N reagieren. Es ist daher vielleicht möglich, Sprungexperimente zu designen, in denen das Gleichgewicht  $\text{HF}_{\text{fast}} \rightleftharpoons \text{N}$  nach verschiedenen Zeiten der Rückfaltung durch die Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  in Richtung von N verschoben wird. Sofern die Isomerisierungsreaktion von  $\text{HF}_{\text{slow}}$  zu  $\text{HF}_{\text{fast}}$  tatsächlich nur durch Prolylisomerisierung bestimmt wird, wäre es auf diese Weise möglich, diese isoliert zu betrachten.

Zu diskutieren bleibt die Frage, worin der energetische Vorteil von  $\text{HF}_{\text{fast}}$  gegenüber  $\text{HF}_{\text{slow}}$  liegt. Da fern-UV CD-Experimente keinen Hinweis auf eine nachhaltige Veränderung der Sekundärstruktur während der Konversion von  $\text{HF}_{\text{slow}}$  zu  $\text{HF}_{\text{fast}}$  liefern, kann der energetische Unterschied zwischen beiden Zuständen nicht in einer einfachen Strukturierung zuvor unstrukturierter Bereiche bestehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass bereits strukturierte Bereich durch die Ausbildung des cis-Peptids eine Optimierung ihres H-Brückennetzwerkes erfahren. Aus der Kristallstruktur leitet sich ab, warum es energetisch vorteilhaft ist; das Rückgratcarbonylsauerstoffatom von A61 wird aufgrund der besonderen Struktur von T3/2 ins Innere der  $\beta$ -Helix verlagert und ist daher in der Lage, zwei H-Brücken zu den Rückgrat-Amiden von D63 und G64 auszuprägen. Abgesehen davon, dass eine solche Rückgratstruktur für parallele  $\beta$ -Helices ungewöhnlich ist, bewirkt cis-Peptid auf diese Weise eine ele-

gante Stabilisierung der Rückgrat-Position von D63, dessen exakte Lage kritisch für die katalytisch relevante  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung ist.

#### 4.2.4.4. Das Teilgleichgewicht $\text{HF}_{\text{fast}} \rightleftharpoons \text{U}_{\text{fast}}$

Aus der globalen Regression aller für Pel-15 WT gemessenen Gleichgewichtsübergänge ergab sich für das Reaktionsgleichgewicht zwischen HF und U eine freie Enthalpie der Stabilisierung von etwa 27 kJ/mol. Die Dekonvolution der Übergangsspektren mit Hilfe des aus kinetischen Daten rekonstruierten HF-Spektrums hat dieses Ergebnis zuverlässig bestätigt (vgl. Abschnitte 3.3.3.3, S. 60 und 3.7.1.3, S. 103).

Die Kooperativität der Pel-15 WT-Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtsübergänge ist mit etwa  $18 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  wesentlich geringer als im Fall von Pel-15 DCCA (vgl. Abschnitt 3.3.3.4, S. 65), in denen sie durchschnittlich  $27 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  betrug. Sehr wahrscheinlich lässt sich diese Diskrepanz auf unspezifische Thiolreaktionen zurückführen, die während der WT-Gleichgewichtsfaltung unter oxidierenden Bedingungen auftreten. Die Reaktivität freier Thiole ist bei neutralem pH Wert zwar gering (Wedemeyer *et al.* 2000), Inkubationszeiten im Bereich von Tagen oder Wochen können aber durchaus ein langsames „disulfide shuffling“ begünstigen, in dem „native“ Disulfidbrücken in entfalteteten oder teilgefalteten Ketten durch freie C148-Thiolate angegriffen werden. Die Konsequenz solcher Reaktionen wäre das Auftreten von kovalent verknüpften Pel-15 Dimeren und fehlgefalteten Polypeptidketten. Für letztere ist kein sehr hoher Anteil zu erwarten, weil die räumliche Nähe zwischen C67 und C71 einen „Rückangriff“ des freigewordenen Thiolats sehr wahrscheinlich macht. Die Existenz von Dimeren hingegen kann mit ziemlicher Sicherheit angenommen werden.

Das ungepaarte Cystein an Position 148 ist unter nativen Bedingungen vollständig im Lumen der  $\beta$ -Helix begraben (Kobayashi *et al.* 1999; Akita *et al.* 2001). Tests mit DTNB haben dies bestätigt (Daten wurden nicht gezeigt). Aus diesem Grund ist die Lösungsmittelzugänglichkeit der hydrophoben Reste dimerisierter Pel-15 Moleküle gegenüber den nativen Monomeren erhöht. Da die Kooperativität  $m$  linear mit der Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche ( $\Delta ASA$ ) skaliert (Courtenay *et al.* 2001; O'Brien *et al.* 2009), erwartet man im Fall einer solchen kovalenten Verbrückung eine Verringerung der Übergangskooperativität.

Nach der Theorie von Myers ist es möglich, die theoretische Kooperativität eines Proteins anhand der Lösungsmittelzugänglichkeiten ( $\Delta ASA$ ) seiner Seitenketten zu berechnen (Myers *et al.* 1995). Sowohl für  $\Delta ASA$  als auch für die Kooperativität  $m$  werden in der Arbeit von Myers empirische Zusammenhänge hergeleitet. Für ein durchschnittliches, globuläres Protein der Größe von Pel-15 ergibt sich daraus ein theoretischer Wert für  $\Delta ASA$  von ca.  $17400 \text{ \AA}^2$ . Unter Berücksichtigung der in Pel-15 WT enthaltenen Disulfidbrücke entspricht dies einer theoretischen Kooperativität von etwa  $19 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Der für Pel-15 WT gefundene Stabilitätsterm liegt zwar ungefähr in diesem Bereich, allerdings muss auf Basis der obigen Betrachtungen davon ausgegangen werden, dass diese Ähnlichkeit ein Zufallsprodukt darstellt und dass die Kooperativität der Gleichgewichtsfaltung von Pel-15 eher im

Bereich von 25-26 kJ mol<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> anzusiedeln wäre, wenn Langzeit-Thiolreaktionen dies nicht verhindern würden.

#### 4.2.5. Besonderheiten der Mutante C148A (Pel-15 DCCA)

##### 4.2.5.1. Die Mutationsposition 148 in der Kristallstruktur

Die Sequenz der Pel-15 Mutante DCCA wurde durch Restriktionsanalysen, durch Sequenzierung und durch den Nachweis ihrer enzymatischen Aktivität bestätigt. Die Mutationsposition 148 befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums nahe dem C-Terminus. Sie bildet den Anfang des parallelen  $\beta$ -Stanges PB3/6. Aufgrund von zehn möglichen Salzbrücken, die zwischen den O-Atomen der Seitenkette E146 und den N-Atomen in den Seitenketten von R168 bzw. R120 ausgeprägt werden können, befindet sich die Mutationsstelle C148A in einem der rigidesten Bereiche der gesamten Pel-15  $\beta$ -Helix. Überdies wurde durch ein strukturelles Alignment der  $\beta$ -Helix-Proteine PelC, PelE, Bspel und PInA festgestellt, dass der Bereich PB2-T2-PB3 in den untersuchten parallelen  $\beta$ -Helices sequenziell am stärksten konserviert ist (Jenkins *et al.* 1998) und sich für die Identifikation sequenzverwandter Pektatlyasen eignet.

Die vergleichende Analyse der  $C_{\alpha}$ -Temperaturfaktoren der WT-Struktur und der Struktur der 4fach-Mutante AVAA ließ im Bereich um die Mutationsposition 148 keine Verschlechterung der B-Faktoren erkennen. Die *in-silico* Analyse des H-Brücken-Netzwerkes war ohne Befund. Ein lokaler Kollaps des Peptidrückgrates, wie er sich bei dem vorgenommenen Austausch aus der Reduktion des VdW-Volumens ableiten lassen würde, war in der Kristallstruktur von AVAA nicht ersichtlich. Aus den Ergebnissen zur Lösungsmittelzugänglichkeit ließ sich kein Muster ableiten, dass mit der Mutationsposition in Zusammenhang zu bringen gewesen wäre, und in der spektroskopischen Charakterisierung durch Absorptions-, Fluoreszenz- und nah-UV CD-Spektroskopie waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen Pel-15 DCCA und dem WT-Protein festzustellen. Auch die Dissoziationskonstanten der hoch- und niedrigaffinen Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen waren WT-ähnlich.

##### 4.2.5.2. Thermodynamische und kinetische Stabilität von DCCA im Vergleich zu Pel-15 WT

###### *Thermodynamische Stabilität unter besonderer Berücksichtigung der Ca<sup>2+</sup>-Affinität*

Im Gegensatz zu den GdmHCl-abhängigen WT-Übergängen war in den DCCA-Übergängen die Gleichgewichtsbedingung erfüllt. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Hysterese des WT-Überganges tatsächlich ein Produkt unspezifischer Thiolreaktionen ist. DCCA ist demnach ein „besserer“ Wildtyp als der Wildtyp.

Die Übergänge in Abwesenheit von CaCl<sub>2</sub> haben für den „großen“ DCCA-Übergang zwischen dem *DSE* und HF<sub>fast</sub> eine freie Stabilisierungsenthalpie von ca. 30 kJ/mol ergeben. Anhand der reversiblen DCCA-Übergänge in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> ergab sich eine Enthalpiedifferenz zwischen U und N<sup>Ca</sup> von ca. 33.6 kJ/mol. Ein verlässlicher Wert für das Gleichgewicht  $N \rightleftharpoons HF_{fast}$  war nicht zu ermitteln; er dürfte aber per Analogieschluss zum WT-Protein zwischen 0.5 und 3.5 kJ/mol liegen. Je nachdem, wie

hoch man diesen Wert ansetzt, ergibt sich für das Bindungsgleichgewicht  $N \rightleftharpoons N^{Ca}$  also eine Enthalpiedifferenz im Bereich zwischen ca. 0.1 und 3.1 kJ/mol. Dem steht das Ergebnis der Titrationsexperimente entgegen, in denen sowohl für Pel-15 DCCA als auch für Pel-15WT Dissoziationskonstanten im Bereich von  $K_d = 10 \mu\text{M}$  bestimmt wurden, was bedeutet, dass in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$  ( $\approx 100 K_d$ ) ungefähr 99 % aller hochaffinen Bindestellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abgesättigt sind.. Der Grund für diese Diskrepanz lässt sich wahrscheinlich im ionischen Charakter von GdmHCl finden. Der DCCA-Übergang in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  hat seinen Mittelpunkt bei ca. 1.1 GdmHCl. Dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsaffinitäten bei Ionenstärken dieser Größenordnung nur eingeschränkt mit den nativen Affinitäten zu vergleichen sind, liegt auf der Hand.

Weitere Faktoren, die bei der Interpretation der erhaltenen Stabilisierungsenthalpien berücksichtigt werden müssen beinhalten die folgenden Punkte:

1) *Das DCCA-Faltungsgleichgewicht folgt auch in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  keinem 2-Zustandsmodell*  
Die Übergangs-Fluoreszenzspektren von DCCA wiesen in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  einen isofluoreszenten Punkt auf. Ein solches Modell für DCCA anzunehmen, stellt mit großer Sicherheit eine starke Vereinfachung der Realität dar, ist aber durchaus berechtigt.

Ein Beispiel dafür, dass auch ein hochkooperatives, reversibles Faltungsgleichgewicht durch das enge Zusammenspiel mehrerer Teilreaktionen bestimmt sein kann, wurde an PelC demonstriert. Hier stellte sich die denaturierungsmittelabhängige Gleichgewichtsfaltung als ein Alles-oder-Nichts-Prozess dar. Die kalorimetrische Analyse der thermischen Entfaltung lieferte hingegen Hinweise auf die Existenz zweier unabhängiger Faltungskerne (= kooperative Einheiten). Es zeigte sich, dass die Faltungs- und Entfaltungsreaktionen dieser beiden „strukturellen Blöcke“ so stark ineinander verzahnt sind, dass sie durch denaturierungsmittelabhängige Gleichgewichtsexperimente nicht voneinander zu separieren waren (Kamen *et al.* 2000).

2) *Die Quantenausbeute der Fluoreszenz von N ist abhängig von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration.*

Auf diesen Effekt wurde bereits an anderer Stelle eingegangen. (vgl. Abschnitt 4.2.4.1, S. 122)

Auf der anderen Seite sind mehrfach Beispiele für *repeat*-Proteine (vornehmlich Ankyrin-*repeats*) veröffentlicht worden, die im Gleichgewicht auch nach kalorimetrischen Gesichtspunkten der Beschreibung durch ein Zwei-Zustandsmodell standhalten (Kloss *et al.* 2008). Eine zusätzliche Abhängigkeit von Bindungsgleichgewichten ist in diesen Fällen allerdings nicht dokumentiert.

#### *Faltungs- und Entfaltungskinetiken*

Die kinetischen Eigenschaften von DCCA sind in vielen Punkten deckungsgleich mit denen, die für das WT-Protein beschrieben wurden.

Die Entfaltungsreaktionen von Pel-15 und Pel-15 DCCA laufen nach dem gleichen Muster ab. Es werden die gleichen Totzeitamplituden für  $\text{HF}_{\text{fast}}$  beobachtet, und die Denaturierungsmittelabhängigkeiten der apparenten Geschwindigkeitskonstanten entsprechen einander in guter Näherung. Die kinetischen

Stabilitäten – abgeschätzt durch lineare Extrapolation der apparenten Entfaltungsraten auf GdmHCl-freie Bedingungen sind vergleichbar. DCCA ist daher auf Basis der Denaturierungskinetiken als Pseudo-Wildtyp einzustufen.

Die Rückfaltungsreaktionen von DCCA und DCCC weisen in vielen wesentlichen Punkten Gemeinsamkeiten auf, lassen allerdings auch deutliche Unterschiede erkennen, die teils noch nicht vollständig verstanden sind. Gemeinsamkeiten betreffen zunächst die Position von HF<sub>slow</sub> im Faltungsweg und dessen Denaturierungsmittelabhängigkeit. In beiden Proteinen erfolgt die Zu- und Abnahme des Zwischenzustandes nach dem gleichen Muster, d.h. HF<sub>slow</sub> entsteht schnell innerhalb der Totzeit und relaxiert anschließend langsam weiter zu N.

Unterschiede zwischen der Rückfaltung von DCCA und DCCC betreffen die folgenden Punkte:

1) *Die Population von HF<sub>slow</sub> während der Rückfaltung wird durch Ca<sup>2+</sup> nicht unterdrückt*

In den Renaturierungskinetiken zeigt sich deutlich, dass die Population von HF<sub>slow</sub> während der Rückfaltung deutlich weniger durch die Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> beeinflusst wird als im Fall des WT-Proteins. Dieses Phänomen scheint erklärlich, wenn man bedenkt, dass bei der schnellen Entstehung von DCCA-HF<sub>slow</sub> statt einer Cysteinseitenkette nur noch eine Methylgruppe „begraben“ werden muss. Offenbar wird die Entwicklung von HF<sub>slow</sub> hierdurch begünstigt, wohingegen die Folgereaktion HF<sub>slow</sub> ⇌ HF<sub>fast</sub> noch ähnlichen Einschränkungen unterworfen ist wie im WT-Protein; auch die Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> kann in einem solchen Fall nicht verhindern, dass sich HF<sub>slow</sub> in der Rückfaltungsreaktion akkumuliert.

2) *Die Zahl der kinetischen Phasen während der Renaturierung ist erhöht*

Die Rückfaltung des WT-Proteins hat nur in Gegenwart von CaCl<sub>2</sub> drei nachweisbare kinetische Phasen. Im Fall von DCCA ist auch die Rückfaltung in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> ein deutlich triexponentieller Prozess. Da wie im Fall des WT-Proteins die schnellste Phase auf die Entstehung von HF<sub>slow</sub> entfällt, drängt sich die Frage auf, wie die anderen beiden Phasen im vorgeschlagenen Faltungsmodell zu akkomodieren sind. Eine experimentell gesicherte Antwort auf diese Frage steht aus, allerdings bestehen zwei Möglichkeiten: Zum einen ist es vorstellbar, dass die Konversion von HF<sub>slow</sub> zu HF<sub>fast</sub> einen mehrstufigen Prozess darstellt, der nicht nur von Prolylisomerisierung sondern auch von einem Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Teilschritt abhängig ist. Zum anderen könnte man annehmen, dass in Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> eine Gleichgewichtsreaktion der Art N<sup>Ca</sup> ⇌ HF<sub>slow</sub> möglich wird. In beiden Fällen ist es erforderlich, HF<sub>slow</sub> eine gewisse Ca<sup>2+</sup>-Bindungsaffinität zugestehen. Hierdurch würde sich auch erklären, warum es möglich ist, die Rückfaltungsreaktion durch die Gegenwart von Ca<sup>2+</sup> zu beschleunigen.

### 3) Eine denaturierungsmittelunabhängige, prolinbestimmte Faltungsreaktion fehlt

Dieser Unterschied zum WT-Protein ist bemerkenswert und stellt gegenwärtig den Fokus eines Anschlussprojektes dar (Pavel Lulchev, Stabilität und Faltung von Pel-15 C148A, Projekt im Aufbau / unveröffentlichte Ergebnisse).

Keine der bei Pel-15 DCCA beobachteten Rückfaltungsphasen ist unabhängig von der GdmHCl-Konzentration; Prolylisomerisierung stellt in der Rückfaltung von DCCA daher möglicherweise nicht länger den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Diese Vermutung wird verstärkt durch die Tatsache, dass die Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer allgemeinen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führt – auch die langsamste der drei Rückfaltungsphasen ist unter diesen Umständen schneller als die langsame Faltungsphase, die während der Rückfaltung des WT-Proteins beobachtet wurde.

Pel-15 DCCA wird in zukünftigen Studien zur Faltung paralleler  $\beta$ -Helices das Wildtyp-Protein ersetzen. Zum einen begründet sich dies auf seiner reversiblen Entfaltungsreaktion. Zum anderen sind während der Rückfaltung von DCCA auch bei extremen Proteinkonzentrationen oder unter reduzierenden Bedingungen keine unspezifischen Thiolreaktionen oder gar konkurrierende Dimerisierungsreaktionen zu erwarten. Es ist überdies ein sehr vielversprechendes Projekt, die Struktur des Gleichgewichtsintermediates von DCCA-HF mittels NMR-Spektroskopie auf atomarer Ebene zu charakterisieren, wie dies in jüngerer Zeit für ein Ankyrin-repeat Protein aus *Thermoplasma volcanium* beschrieben worden ist (Löw *et al.* 2008).

## 4.2.6. DCCA ohne Disulfidbrücke: die Mutanten DVAA und AVAA

### 4.2.6.1. Strukturelle Effekte der Punktmutationen C67V, C71A und D80A

#### *Mutationspositionen C67/C71*

Die Cysteine C 67 und C71 sind in den Disulfid-freien Mutanten durch die hydrophoben Reste V67 und A71 ersetzt. Diese Kombination beruhte auf der Überlegung, dass ein solches „hydrophobes Paar“ in der nativen Struktur etwa das gleiche Van-der-Waals-Volumen (VdW) okkupiert wie eine Disulfidbrücke. Auf diese Weise sollte der „Kollaps“ bzw. die lokale Erweiterung des T1/3-turns vermieden und das WT-spezifische H-Brückenmuster aufrecht erhalten werden. Ebenfalls für die Kombination Ala/Val spricht, dass beide Aminosäuren nur einen sehr geringen Einfluss auf die Packungsdichte hydrophober Umgebungen ausüben (Bhardwaj & Gerstein 2009).

In der Kristallstruktur von Pel-15 AVAA wurde eine Relaxation des Peptidrückgrats im T1/3 Turn erkennbar. Ein Hinweis auf eine Veränderung des H-Brücken-Netzwerkes im Bereich der Mutationspositionen C67/C71 wurde nicht gefunden. Aus der Dilatation des Polypeptidrückgrates ließe sich vermuten, dass die Packungsdichte im Bereich um die Mutationspositionen erniedrigt ist. Die rechnerische Analyse von hydrophoben Kontakten begrabener Reste lieferte allerdings keine zuverlässige Evidenz, dass dies tatsächlich zutrifft.

### *Mutationsposition D80A*

Die in AVAA zusätzlich enthaltene Mutation D80A führt nicht zu einer spektroskopisch nachzuweisenden Veränderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur. Die Mutation D80A führt nachweislich zur vollständigen Deletion der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung (vgl. Abschnitt 3.3.1, S. 55). Daher ließ sich mit der Mutante AVAA ein möglicher Einfluss der niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle auf die thermodynamische Stabilität von Pel-15 untersuchen. Dass die Dissoziationskonstante der niedrigaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung in AVAA nicht beeinträchtigt ist, wurde durch Titrationsexperimente nachgewiesen (vgl. Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2, S. 55f.).

Im WT-Protein wird die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  unter anderem durch eine wasservermittelte H-Brücke zwischen dem Rückgratcarbonylsauerstoff von G34 stabilisiert. Dieser Rest befindet sich im flexiblen T3/2 *turn*, dessen Beweglichkeit demzufolge durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  eingeschränkt wird. Ohne die hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle ist die Flexibilität des flexiblen *turns* so stark erhöht, dass in der Kristallstruktur keine Elektronendichte mehr nachweisbar ist. Ähnliche Effekte wurden bereits von Akita *et al.* bei dem Versuch beobachtet, das WT-Protein in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  zu kristallisieren (Akita *et al.* 2001).

Das Alignment mit der WT-Struktur (vgl. Abb. 3-25, S. 79) zeigt deutlich, dass sich die erhöhte, konformationelle Freiheit des T3/2-*turns* auf die Beweglichkeit der benachbarten T3-*turns* überträgt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dies auch die Konsequenz zweier fehlender Salzbrücken, die im WT-Protein zwischen D80 und K103 ausgebildet sind. Das H-Brückennetzwerk scheint dieser erhöhten Beweglichkeit erstaunlicherweise standzuhalten. Die Berechnung der Wasserstoffbrückenbindungen mit WHATIF hat in den entsprechenden Bereichen keine Veränderung des Verbrückungsmusters erkennen lassen. Deutlicher sind die Einflüsse der Mutation auf Ebene der Lösungsmittelzugänglichkeiten. Hier weisen die Reste im Bereich um D80 bis zu zehnmal höhere Lösungsmittelzugänglichkeiten auf als im WT.

Vergleicht man die Strukturen von Pel-15 und PelI, so scheint dem flexiblen Turn T3/2 eine besondere Bedeutung zuzukommen. Angesichts der teils gravierenden lokalen Veränderungen, die die übermäßige Flexibilität dieses Bereiches nach sich zieht, scheint es durchaus sinnvoll zu sein, seine konformationelle Flexibilität durch kovalente Verknüpfungen zu stabilisieren, wie dies in PelI durch die Ausprägung einer Disulfidbrücke realisiert ist. Zukünftige Tests werden darauf abzielen, ob die Existenz des flexiblen *turn*-Bereichs für die katalytische Funktion wirklich notwendig ist. Hierfür ist es denkbar, eine Pel-15 Variante herzustellen, in der T3/2 auf ein Mindestmaß verkürzt ist.

#### **4.2.6.2. Thermodynamische und kinetische Stabilität von AVAA und DVAA**

Beide Mutanten liegen in Lösung als korrekt gefaltete Monomere vor. Anhand der Lage der Emissionsmaxima und ihrer Verschiebung im Zuge der Denaturierung zeigt sich, dass beide Mutanten einen WT-artigen, hydrophoben Kern besitzen. Die Disulfid-freien Pel-15 Mutanten wiesen eine

erhöhte Fluoreszenz der nativen Ketten auf, was sich durch die Abwesenheit der Disulfidbrücke als *Quencher* erklärt.

Die Gleichgewichtsfaltungs- und Entfaltungsübergänge der Mutanten AVAA und DVAA waren reversibel und nicht voneinander zu unterscheiden. Sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  wurde die Population eines hyperfluoreszenten Gleichgewichtsintermediates beobachtet, dessen Übergang zu U durch die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  nicht verändert wurde. Nah-UV CD-Gleichgewichtsübergänge von Pel-15 AVAA zeigten, dass dieses Gleichgewichtsintermediat konformationell von N und U verschieden ist. Wie im Fall des WT-Proteins war die Seitenkettenbeweglichkeit von W78 in dieser Spezies deutlich erhöht, während sich die globale Struktur des Zwischenzustandes nicht wesentlich vom WT zu unterscheiden schien. Im Vergleich zur Gleichgewichtsfaltung des Pseudo-Wildtyps (DCCA) in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  war der Mittelpunkt des Übergangs  $\text{HF} \rightleftharpoons \text{U}$  bei DVAA / AVAA um 0.5 M zu niedrigeren GdmHCl-Konzentrationen verschoben; die Kooperativitäten der Übergänge waren sehr ähnlich. Ein isofluoreszenter Punkt in den Übergangsspektren von DVAA/AVAA zeigt an, dass sich im „großen“ Faltungsübergang zwischen HF und U keine weiteren Spezies akkumulieren und dass es daher berechtigt ist, die Übergänge nach einem 3-Zustandmodell auszuwerten.

Die thermodynamische Stabilität des Gleichgewichts  $\text{HF}_{\text{DVAA/AVAA}} \rightleftharpoons \text{U}$  betrug in 25 mM MOPS pH 7.0 bei 20 °C ca. 21.5 kJ/mol, was im Vergleich zu DCCA einer Stabilitätsdifferenz von  $\Delta\Delta G = 8.5$  kJ/mol entspricht. Ähnlich wie vorab für DCCA/WT beobachtet, ließ sich die Stabilisierungsenthalpie für das Gleichgewicht zwischen N und HF nicht exakt bestimmen. Alles deutet allerdings darauf hin, dass N und HF nur geringfügige Unterschiede in ihren thermodynamischen Stabilitäten aufweisen. Anhand der  $\chi^2$ -Tests lässt sich  $\Delta G_{\text{NI}}$  auf Werte unterhalb von 1 kJ/mol eingrenzen.

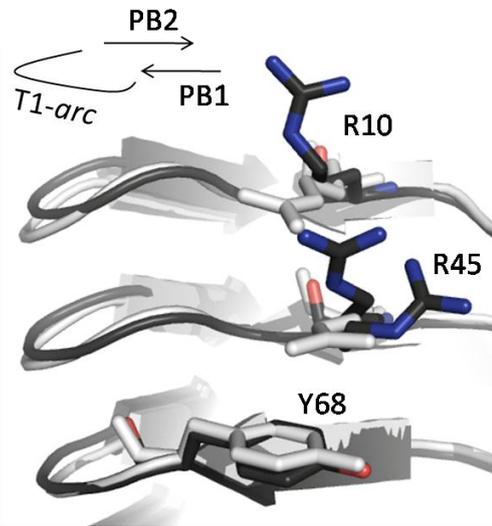
Aus Gleichung (1) (vgl. Einleitung, S. 16) lässt sich in theoretischer Näherung berechnen, welchen Beitrag die Disulfidbrücke in Pel-15 zur Nettostabilisierung des Proteins leistet. Dieser Gleichung liegt die Annahme zu Grunde, dass der Stabilitätsgewinn, den ein Protein durch eine Disulfidbrücke erfährt, mit der Zahl der Reste korreliert, die durch diese Disulfidbrücke eingeschlossen werden (Pace *et al.* 1988). Da die Disulfidbrücke in Pel-15 den C-Terminus von PB1/3 mit dem N-Terminus von PB2/3 verknüpft und damit nur die Reste Y68, G69 und D70 einschließt, reduziert sie die konformationelle Entropie des Pel-15 Rückgrates um

$$-2 - 1.5 * 8.314 - \ln(3) = 15.8 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

Bei einer Temperatur von 20 °C entspricht dies einem Stabilitätsgewinn von 4.6 kJ/mol. Die Unsicherheit dieser Rechnung beträgt nach Literaturangaben weniger als 2 kJ/mol. Nach dieser Rechnung liegt die Differenz zwischen dem theoretischen und dem empirischen Stabilitätsverlust in einem Bereich zwischen 2 und 6 kJ/mol. Im einfachsten Fall ließe sich dies durch den Verlust einer stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung erklären (Baldwin 2007). Die Unversehrtheit des AVAA-H-Brückennetzwerkes im Bereich der Mutationsstellen wurde zwar nachgewiesen, allerdings ist es in Anbetracht der besonderen Orientierung der AVAA-Moleküle in der asymmetrischen Einheit

durchaus möglich, dass bestimmte H-Brücken, die im Kristall durch Kristallkontakte stabilisiert sind, in Lösung nicht ausgebildet werden.

Zwei weitere Erklärungsmöglichkeiten existieren. Erstens wurde bereits erwähnt, dass  $Gdm^+$ -Ionen nach Erkenntnissen von Mason *et al.* (2008; 2009) bevorzugt mit den planaren Seitenketten aromatischer Aminosäuren bzw. mit den Guanidylgruppen von Arginin interagieren. In der Kristallstruktur des WT-Proteins wurde im Bereich des N-Terminus ein „YRR-Stapel“ identifiziert, der die äußere, N-terminale Windung zusätzlich stabilisiert (vgl. Abb. 1-6; S. 12). In den drei Molekülen der AVAA-Kristallstruktur ist die Ordnung dieses kurzen Stapels aufgehoben, was es im Fall der Kette B der asymmetrischen Einheit sogar notwendig machte, für den Seitenkettenrest R45 eine Besetzungszahl von 0.5 zuzulassen. In Abb. 4-5 der betreffende Bereich im vergleichend zum WT-Protein dargestellt. Inwiefern dieser Bereich tatsächlich zur Stabilisierung des N-Terminus beitragen kann, ließe sich durch eine Mutation der Art Y68A analysieren.



**Abb. 4-5:** Lösungsmittlexponierter YRR-Stapel in Pel-15WT (weiß) und in Pel-15 AVAA (schwarz, Kette B). Blick auf den Bereich PB1-T1 der drei N-terminalen Helixwindungen. Durch die Entfernung der lokalen Disulfidbrücke werden die Interaktionen zwischen den planaren Seitenketten gestört.

Zweitens ließe sich der „zu große“ Stabilitätsverlust durch den Verlust attraktiver, hydrophober Interaktionen (z.B. Van-der-Waals-Interaktionen) im Lumen der AVAA  $\beta$ -Helix (Baldwin 2007) erklären. Da diese Interaktionen mit der Abstandsabhängigkeit  $1/r^6$  skalieren, kann bereits die Relaxation des  $\alpha$ -Bindungswinkels Y68-G69-D70 im T1/3 Turn von AVAA dazu führen, dass die begraben Seitenketten größere Abstände zueinander ausprägen. In Kette B der asymmetrischen Einheit sind die Abstände im Bereich der ausgetauschten Disulfidbrücke sogar so groß, dass Valin an Position 67 alternative Konformationen einnehmen kann. Die Abschwächung hydrophober (VdW) Interaktionen hat typischerweise eine Verringerung der thermischen Stabilität des Proteins zur Folge (Dahiyat & Mayo 1997). Enzymaktivitätstests mit der Pel-15 Doppelmutante C67V, C71A (DVAC) zeigen, dass das Temperaturoptimum der enzymatischen Aktivität durch die Entfernung der Disulfidbrücke um ca. 5 K auf ca. 55 °C reduziert wird. Der zusätzliche Austausch von C148 gegen ein Alanin wirkt additiv und reduziert das Maximum der enzymatischen Aktivität um zusätzliche 15 K auf ca. 45 °C (vgl. Abschnitt 3.4.3, S.74).

Trotz ihrer veränderten, hochaffinen  $Ca^{2+}$ -Bindungseigenschaften waren die kinetischen Stabilitäten von DVAA und AVAA nicht zu unterscheiden. Bei gleichen Denaturierungsmittelkonzentrationen liefen die Entfaltungsreaktionen von DVAA/AVAA im Vergleich zu WT/DCCA beschleunigt ab. Das grundlegende Muster der Entfaltung scheint aber dem aufgestellten Modell zu entsprechen (vgl.

Abschnitt 4.2.1.1, S. 115): Während der Denaturierungsreaktion entstehen bei beiden Mutanten transiente HF-Zustände in der Totzeit, nach deren Population das Fluoreszenzsignal langsam in Richtung U abklingt. In Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  ist die kinetische Stabilität des nativen Zustandes – eingeschätzt anhand der Reduktion der Totzeitamplituden – nur geringfügig erhöht.

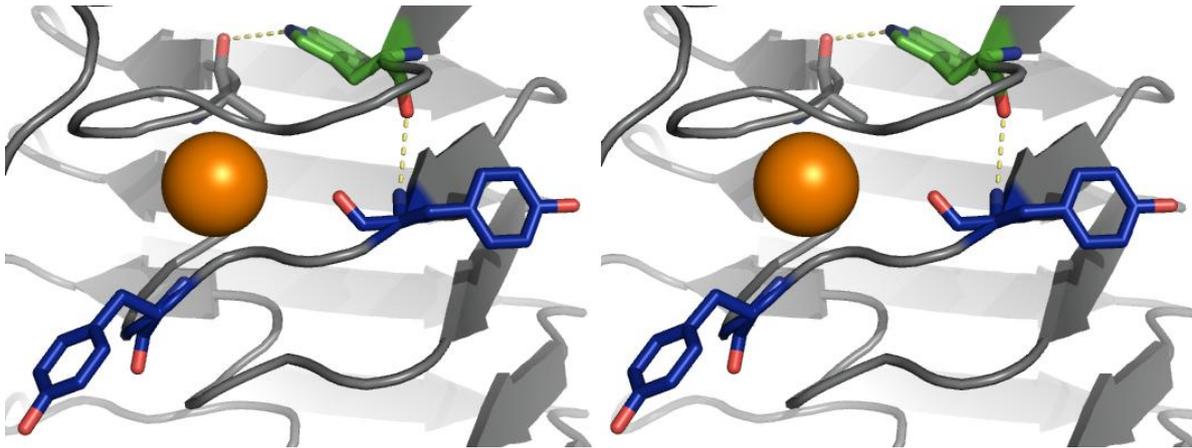
Die Chevron-Äste der Entfaltung in Gegenwart von EDTA bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  liegen deutlich dichter beieinander, als dies bei den Entfaltungsästen von DCCA oder dem WT-Protein der Fall ist, und die Steigungen der Entfaltungsäste von DVAA/AVAA sind niedriger als beim WT-Protein (vgl. Abschnitt 3.6.4, S. 95). Der Übergangszustand der Entfaltungsreaktion von DVAA/AVAA scheint demnach stärker durch das Denaturierungsmittel destabilisiert zu werden als der Übergangszustand der Entfaltungsreaktion von WT/DCCA, was die erhebliche Verringerung der kinetischen Stabilität um einen Faktor von bis zu 3.7 nach sich zieht.

Die Tatsache, dass die Entfaltungen von DVAA und AVAA sehr ähnlich abzulaufen scheinen und dass beide Mutanten in Abwesenheit von Denaturierungsmittel sehr ähnliche kinetische Stabilitäten besitzen, veranschaulicht zunächst, dass der Stabilitätsverlust, den Pel-15 durch Deletion der Disulfidbrücke erfährt, weder durch die hochaffine noch durch die niedrigaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung kompensiert werden kann. Wenn dem so ist, dann stellt die Disulfidbrücke in Pel-15 – und sehr wahrscheinlich auch in allen anderen Pektatlyasen, die dieses Strukturelement konservieren – einen integralen Stabilitätskern dar, der nicht nur die Rigidität im Zentrum der parallelen  $\beta$ -Helix verursacht, sondern in Verbindung damit die enzymatische Aktivität der Pektatlyasen bei mittleren und hohen Temperaturen gewährleistet.

Es wäre vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses ein aufschlussreiches Projekt, die Disulfidbrücke an anderen Positionen in der  $\beta$ -Helix von Pel-15 einzusetzen und zu beobachten, ob es bei diesem Strukturelement nur auf dessen grundsätzliches Vorhandensein ankommt, oder ob auch die Position wesentlich ist, an der sich die Disulfidbrücke befindet. Ein Projekt ähnlicher Art, das allerdings auf die Oberfläche einer parallelen  $\beta$ -Helix abzielte, wurde für eine Pektatlyase aus *Xanthomonas campestris* beschrieben (Xiao *et al.* 2008). Hier wurde durch die Einführung einer einzelnen, stabilisierenden Mutation eine Erhöhung der Thermostabilität um 6 K und eine 23-fache Erhöhung der Halbwertszeit der Inaktivierung bei 45 °C erzielt.

### 4.3. Hyperfluoreszenz in Pel-15

Die Fluoreszenzeigenschaften von Pel-15 werden durch Harnstoff und durch GdmHCl unterschiedlich beeinflusst. So weisen die Übergangs-Fluoreszenzspektren in harnstoffabhängigen Faltungs- und Entfaltungsübergängen isosbestische Punkte auf, die die Existenz von nur zwei unterschiedlichen Faltungszuständen vermuten lassen. In Gegenwart von GdmHCl hingegen stellten sich die Übergänge in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  als ein 3-Zustandssystem dar. Versuche, den ionischen Charakter von GdmHCl durch die Zugabe teils sehr hoher Salzkonzentrationen in Gegenwart und Abwesenheit von



**Abb. 4-6: T3-Bereich in Höhe der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle von Pel-15WT (Akita *et al.* 2001).** Dargestellt sind die lösungsmittlexponierten Seitenketten Y105 (links) und Y102 (rechts). Letztere bildet zum Rückgrat von W78 eine H-Brücke (3.03 Å) aus. Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion ist orange dargestellt. Die H-Brücke zwischen der Seitenkette des Fluorophors W78 (grün) und dem Rückgrat von A85 (grau) hat im Kristall eine Länge von 3.00 Å.

Harnstoff zu simulieren und auf diese Art einen HF-ähnlichen Zustand zu induzieren waren nicht erfolgreich.

Die Struktur von Pel-15 in 1.0 M GdmHCl und 1 mM EDTA – eingeschätzt anhand der Zugänglichkeit des Fluorophors, dem nah-UV CD-Signal im Bereich der Tyrosinabsorption und dem fern-UV CD-Signal im Bereich der Peptidabsorption – ist nativ-ähnlich. Die beobachtete Hyperfluoreszenz muss also mit einer lokalen Veränderung der chemischen Umgebung von W78 im Zusammenhang stehen. Diese Veränderung wiederum ist nachweislich das Produkt einer Wechselwirkung exponierter planarer Seitenkettenreste mit  $\text{Gdm}^+$ -Kationen (Mason *et al.* 2009; Vondrášek *et al.* 2009). Bereits in der Einleitung wurde angedeutet, dass Interaktionen dieser Art an der Stabilisierung des N- und des C-Terminus beteiligt sind.

Mechanistisch ließe sich vermuten, dass eine derartige Ausbildung von *stacks* im Bereich der lösungsmittlexponierten Tyrosine lokale Veränderungen in der Rückgrat-Torsion und im Zusammenhang damit eine Veränderung des H-Brückenmusters nach sich zieht. Da der nativ gequenchte Zustand von W78 zu großen Teilen auf die Existenz einer H-Brücke zu A85 zurückgeht, kann davon ausgegangen werden, dass die Oberflächeninteraktion von Pel-15 mit  $\text{Gdm}^+$  zum „Entquenchen“ von W78 führt, ohne dass dabei der  $\beta$ -helikale *fold* aufgebrochen wird.

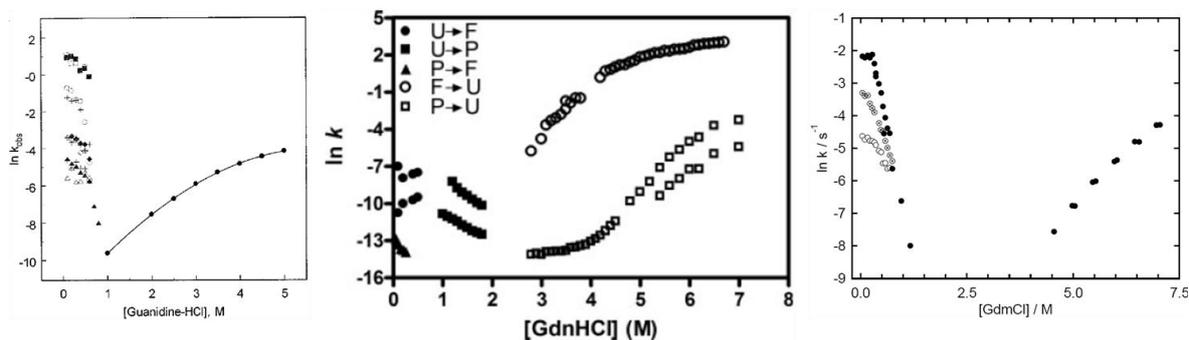
Die millimolare Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  genügt, um den strukturverändernden Effekt von  $\text{Gdm}^+$  zu negieren und die H-Brücke zwischen W78 und A85 auch in Gegenwart von 1.0 M in einem nativ-ähnlich Zustand zu stabilisieren. In der Kristallstruktur (Abb. 4-6) zeigt sich, dass in unmittelbarer Nähe der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle zwei lösungsmittlexponierte Tyrosinseitenketten für eine bevorzugte Interaktion mit  $\text{Gdm}^+$  zur Verfügung stehen. Die hochaffine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  führt offensichtlich zu einer Coulomb-Abstoßung, im Zuge derer das Zentrum der  $\beta$ -Helix in einem nativ-ähnlichen Zustand stabilisiert wird. Zur endgültigen Klärung dieser These bedarf es der Kristallisation von Pel-15 in Anwesenheit verschiedener Guanidiniumsalze.

## 4.4. Zusammenfassende Diskussion

### 4.4.1. Pel-15 im Vergleich mit anderen $\beta$ -Helixproteinen (PelC, Pertactin)

Beispiele für  $\beta$ -Helixproteine mit teils umfassend charakterisierten Faltungsreaktionen sind PelC aus *Erwinia chrysanthemi* und Pertactin aus *Bordetella pertussis*. Mit einer Molekularmasse von 21 kDa ist Pel-15 etwas kleiner als PelC und verfügt über deutlich einfachere *turn*-Strukturen. Hinsichtlich der Größe seiner unstrukturierten *turns* und des Fehlens einer N-terminalen Abschlussstruktur lassen sich überdies Ähnlichkeiten zu dem weitaus größeren Pertactin erkennen. Die Faltungseigenschaften von PelC und Pertactin besitzen Charakteristika, die auch bei Pel-15 von Bedeutung zu sein scheinen.

PelC gilt von allen bislang identifizierten  $\beta$ -Helix-Proteinen als das mit Abstand am ausführlichsten charakterisierte Modellsystem (Kamen *et al.* 2000; Kamen & Woody 2002a; Kamen & Woody 2002b). Unter *steady-state* Bedingungen stellt sich das Protein zunächst als eine hochkooperativ faltende Einheit dar, deren Übergänge 2-Zustands-Charakter besitzen (Abb. 4-8). Verhält sich ein *repeat*-Protein als eine kooperative Einheit, wie dies bei PelC der Fall ist, so besteht nach Kloss *et al.* (2008) eine thermodynamische Kopplung zwischen dem N- und dem C-terminalen *repeat* des Proteins. Mit zunehmender Windungszahl kann das Protein allerdings in mehrere, unabhängig



**Abb. 4-7: Chevron-Diagramme ausgewählter  $\beta$ -Helixproteine.** Links: PelC-Chevron-Plot (Kamen *et al.*, 2000); Mitte: Pertactin-Chevron-Plot (Junker *et al.*, 2009) Rechts: Pel-15 Chevron-Plot (diese Arbeit, 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Messungen jeweils bei neutralem pH und im Bereich zwischen 20 und 25 °C.

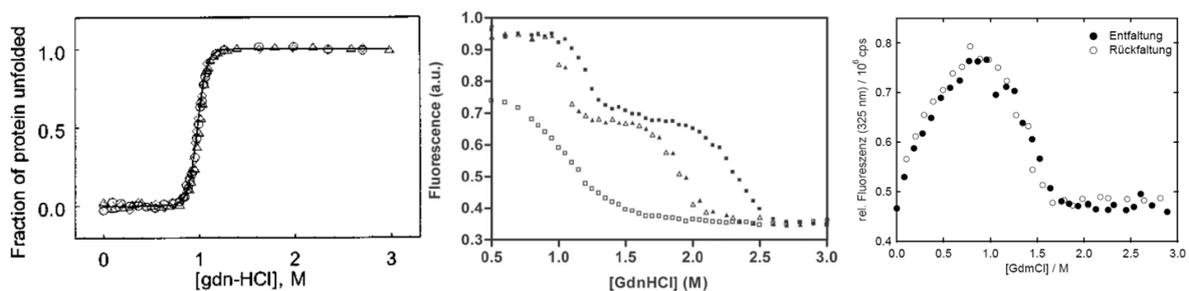
faltende/entfaltende, kooperative Einheiten zerfallen. Sind die Stabilitäten dieser kooperativen Einheiten sehr ähnlich, so kann es einen hohen methodischen Aufwand erfordern, diese zu identifizieren. Tatsächlich war erst durch die kalorimetrische Analyse der thermischen Entfaltung von PelC der Nachweis zweier kooperativ faltender Einheiten möglich (Kamen *et al.* 2000), die so ähnliche Stabilitäten aufwiesen, dass sie sich in denaturierungsmittelabhängigen Gleichgewichtsübergängen nicht separieren ließen.

Pertactin, dessen Faltung in den letzten Jahren von der Arbeitsgruppe um Patricia Clark bearbeitet wurde, stellt ein langes *repeat*-Protein dar, in dem mehrere Bereiche existieren, die unabhängig voneinander falten und entfalten können. Diese Bereiche besitzen jeweils sehr unterschiedliche Stabilitäten, sodass Pertactin unter *steady-state* Bedingungen im Bereich um 1.5 M GdmHCl ein

Gleichgewichtsintermediat populiert (Abb. 4-8), dessen N-Terminus bereits in denaturierter Form vorliegt, während sein C-Terminus noch strukturiert und proteaseresistent ist (Junker *et al.* 2006).

Für Pel-15 hätte man anhand seiner geringen Größe und der niedrigen Zahl seiner Windungen vermutet, dass es einen PelC-ähnlichen Faltungstyp aufweist, sich also im besten Fall als reversibles, hochkooperativ faltendes System darstellt. Tatsächlich ist dies nur dann zu beobachten, wenn die Gleichgewichtsfaltung von Pel-15 in Gegenwart von  $\text{CaCl}_2$  betrachtet wird. Sobald die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die Proteinoberfläche verhindert wird, verkompliziert sich die *steady-state* Verteilung und es lässt sich ein zusätzlicher, intermediärer Zustand beobachten (Abb. 4-8), der wie im Fall von Pertactin bei moderaten GdmHCl-Konzentrationen stabil ist. Die Experimente, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, haben übereinstimmend gezeigt, dass das Pel-15-Intermediat im Unterschied zu dem von Pertactin eine nativ-ähnliche Struktur und einen vollständig lösungsmittelunzugänglichen, hydrophoben Kern besitzt.

Wenn Pel-15, dem Konzept von Kloss folgend, aus verschiedenen kooperativen Einheiten besteht (was angesichts der hohen Prolinkonzentration im Bereich des N-Terminus wahrscheinlich ist), so sind die thermodynamischen Stabilitäten dieser Einheiten in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  offensichtlich sehr ähnlich. Der mit der Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einhergehende Verlust an stabilisierenden Salz-



**Abb. 4-8: Faltungs- und Entfaltungsgleichgewichtsübergänge ausgewählte beta-helikaler Modellproteine**  
**Links:** PelC (Kamen *et al.* 2000); **Mitte:** Pertactin (Junker *et al.*, 2006); **Rechts:** Pel-15 (diese Arbeit)

brücken führt nach der Theorie dazu, dass sich die Stabilitäten beider Bereiche stärker voneinander unterscheiden, sodass in Gegenwart von GdmHCl das erwähnte Intermediat populiert werden kann.

Die Faltungs- und Entfaltungskinetiken von PelC (Kamen & Woody 2002a; Junker & Clark 2009), Pertactin (Junker & Clark 2009) und Pel-15 sind komplex. Für PelC beispielsweise stellte sich die Denaturierungsreaktion zwar bei allen Denaturierungsmittelkonzentrationen als monoexponentieller Zusammenhang dar, die semilogarithmische Auftragung der Raten im „Chevron-Plot“ zeigte allerdings deutliche Krümmungen, wie sie typischerweise mit der Existenz paralleler Entfaltungswege oder mit einer denaturierungsmittelabhängigen, strukturellen Veränderung des Übergangszustandes erklärt werden (u.a. Sosnick *et al.* 1997). Während der Rückfaltung von PelC werden bis zu vier verschiedene exponentielle Phasen (Zeitkonstanten zwischen 0.4 s und 400 s) mit größtenteils sehr ähnlichen Denaturierungsmittelabhängigkeiten beobachtet. Ähnlich komplex, wenngleich auf einer deutlich niedrigeren Zeitskala angesiedelt, stellt sich der Faltungsweg von Pertactin dar. Dort ergeben

sich sowohl die Rückfaltung als auch die Entfaltung als Summen aus drei Exponentialfunktionen, was sich im Chevron-Plot in Form von jeweils drei Faltungs- und Entfaltungsästen äußert. Wie bei PelC und Pel-15 weichen diese „Chevron-Äste“ auch bei Pertactin deutlich von einem idealen „Chevron-Verhalten“ ab.

Die faltungskinetischen Eigenschaften von Pel-15 weisen sowohl Gemeinsamkeiten zu PelC als auch zu Pertactin auf. Beide Pektatlyasen erreichen innerhalb von Sekundenbruchteilen eine nativ-ähnliche,  $\beta$ -helikale Konformation. Am Beispiel von Pel-15 wurde nachweislich gezeigt, dass innerhalb dieser intermediären Struktur noch genügend konformationelle Freiheit existiert, um das Wasserstoffbrücken-Netzwerk bzw. die Packung begrabener Seitenketten zu optimieren – so gezeigt am Beispiel des begrabenen Tryptophanylrestes W78. Eine entscheidende Funktion in diesem Optimierungsschritt könnte die Isomerisierung von Prolylresten darstellen. Sie ist – direkt oder indirekt – am Aufbau der katalytischen Zentren von Pel-15 und PelC beteiligt und „erzwingt“ darüber hinaus in Pel-15 die Ausbildung zusätzlicher H-Brücken. Zumindest für Pel-15 ist nachgewiesen, dass die Prolylisomerisierung während der  $\beta$ -Helixfaltung einen irreversiblen Schritt darstellt.

Die Faltung von Pertactin folgt offensichtlich einem alternativen Konzept und ist nicht ohne weiteres mit den Faltungsreaktionen der vergleichsweise „kleinen“ Pektatlyasen zu vergleichen. Die parallele  $\beta$ -Helix von Pertactin ist wesentlich länger und faltet nur sehr langsam in ihre native Konformation. Die großen Stabilitätsunterschiede zwischen den kooperativen Einheiten innerhalb des Pertactinmoleküls korrespondieren mit einem Faltungsweg, der für den vektorialen Export über die äußere Membran optimiert ist (Junker *et al.* 2009). Bedenkt man die strukturelle Ähnlichkeit in der Organisation von Pertactin und Pel-15, ist es vorstellbar, dass auch die vergleichsweise „kleine“ Pektatlyase ihren nativen Zustand über einen solchen vektorialen Faltungsweg erreicht. Zu bedenken ist an dieser Stelle allenfalls, dass Pertactin im extrazellulären Raum zuerst einen C-terminalen *hairpin* präsentiert, während Pel-15 im Sec-abhängigen Transport mit dem N-Terminus voran die Membran passiert.

#### **4.4.2. Pel-15 als Modellprotein für die $\beta$ -Helix-Forschung**

Die Alkalische Pektatlyase (Pel-15) aus dem Bodenbakterium *Bacillus spec.* KSM-P15 stellt ein repräsentatives,  $\beta$ -helikales Protein dar, das sich zur weiteren, modellhaften Charakterisierung der Faltung und der Stabilität rechtsgängiger, paralleler  $\beta$ -Helices sehr gut eignet.

Die Unempfindlichkeit gegen Aggregation, hohe Proteinkonzentrationen und erhöhte Temperaturen sowie seine unkomplizierte Reinigung machen dieses Protein zu einem sehr gut handhabbaren Forschungs- und Schulungsobjekt. Pel-15 ist in hohen Ausbeuten rekombinant zu exprimieren und lässt sich auch im gelösten Zustand über viele Monate bei  $-20\text{ °C}$  weitgehend verlustfrei lagern.

Die Verwendung von spektroskopischen Methoden zur Charakterisierung seiner Faltung und Stabilität wird begünstigt durch die Tatsache, dass Pel-15 nur ein einzelnes begrabenes Tryptophan im Zentrum der  $\beta$ -Helix enthält, dessen Fluoreszenzmuster sehr sensitiv auf Veränderungen der äußeren Umge-

bung reagiert. Das nah-UV CD-Signal von Pel-15 präsentiert im Bereich der Tryptophan-Absorption eine spezifische Elliptizitätsbande, die geeignet ist, das Wesen des abgeschirmten, hydrophoben Kerns unter verschiedenen Bedingungen zu studieren.

Auffällig im Vergleich mit anderen  $\beta$ -helikalen Modellproteinen (u.a. PelC, Pertactin, BsPel) ist bei Pel-15 das Fehlen jeglicher zusätzlicher Sekundärstruktur. Hierdurch wird die Interpretation spektroskopischer Daten erheblich vereinfacht: alle beobachteten Effekte hängen direkt mit der Strukturierung bzw. dem Strukturverlust der  $\beta$ -Helix zusammen. Die Dekonvolution des Sekundärstruktursignals bestätigt einen  $\alpha$ -Helix-Anteil von höchstens 6 % (Kobayashi *et al.* 1999). Die geringe Größe, die hohe Löslichkeit und die geringe Aggregationsanfälligkeit prädestinieren Pel-15 zukünftig für die Anwendung von NMR-spektroskopischen Methoden. Mit diesen wird es beispielsweise möglich sein, die atomare Struktur des Gleichgewichtsintermediates zu charakterisieren.

## 4.5. Anschlussprojekte

Die Stabilität und die Faltung von Pel-15 DCCA stehen derzeit im Fokus der Diplomarbeit von Herrn Pavel Lulchev. Den Kern der Arbeit werden Experimente darstellen, die geeignet sind, die Temperaturabhängigkeit der DCCA-Faltungs- und Entfaltungskinetik zu analysieren. Neben der Messung zeit aufgelöster Fluoreszenz-Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge soll die Aktivierungsbarriere zwischen HF<sub>fast</sub> und N durch die temperaturabhängige Messung der Rückfaltungsreaktion quantifiziert werden. Anhand der Denaturierungsmittelabhängigkeit des thermodynamischen Schmelzpunktes wird eine Abschätzung der Zahl der in Pel-15 enthaltenen, kooperativen Einheiten möglich.

Die Gleichgewichtsreaktion  $\text{HF}_{\text{slow}} \rightleftharpoons \text{HF}_{\text{fast}}$  steht im Fokus der Bachelorarbeit von Frau Bettina Neumann. Sie wird die GdmHCl-abhängige Gleichgewichtsverteilung innerhalb des DCCA-Ensembles und die Kinetik der DCCA-Rückfaltungsreaktion mittels Nah-UV CD-Spektroskopie analysieren. Anhand der kinetischen Untersuchungen soll die Tertiärstruktur von HF<sub>slow</sub> abgeschätzt werden. Die vergleichende Rückfaltung von Pel-15 DCCA und Pel-15 WT in Anwesenheit verschiedener PPIasen wird hoffentlich klären, inwiefern die trans-/cis-Isomerisierung von Pel-15 den limitierenden Schritt während der Rückfaltungsreaktion darstellt.

Mehrphasige HF-Relaxationskinetiken können ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei HF<sub>slow</sub> weniger um eine distinkte Konformation als vielmehr um ein Ensemble aus verschiedenen Konformationen handelt. Die Heterogenität dieses Ensembles ließe sich zukünftig durch stopped-flow Doppelsprungkinetiken der Art  $U \rightarrow N \rightarrow U$  nachweisen. Darüber hinaus ist es vielversprechend, die Struktur des Intermediates HF<sub>fast</sub> durch den Einsatz von NMR-Methoden auf atomarer Ebene zu bestimmen. Alternativ zur Anwendung von NMR wäre zu testen, ob es möglich ist, die Röntgenkristallstruktur von Pel-15 in Gegenwart hochmolarer Gdm<sup>+</sup>-Salzkonzentrationen zu lösen.

## 5. Quellenverzeichnis

- Abbott, D.W. & Boraston, A.B., 2008. Structural biology of pectin degradation by Enterobacteriaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 72(2), 301-316, table of contents.
- Abkevich, V.I. & Shakhnovich, E.I., 2000. What can disulfide bonds tell us about protein energetics, function and folding: simulations and bioinformatics analysis. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 975-985.
- Akita, M. *et al.*, 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of high-alkaline pectate lyase. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 56(Pt 6), 749-50.
- Akita, M. *et al.*, 2001. The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 57(Pt 12), 1786-92.
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (New York, N.Y.)*, 181(96), 223-230.
- Anson, M., 1945. Protein denaturation and the properties of protein groups. *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY*, 2, 361-386.
- Astbury, W.T. & Dickinson, S., 1935. The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *The Biochemical Journal*, 29(10), 2351-2360.1.
- Baldwin, R.L., 2007. Energetics of protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 371(2), 283-301.
- Barbirz, S. *et al.*, 2009. Phage tailspike proteins with beta-solenoid fold as thermostable carbohydrate binding materials. *Macromolecular Bioscience*, 9(2), 169-173.
- Bardwell, J.C., McGovern, K. & Beckwith, J., 1991. Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell*, 67(3), 581-589.
- Baumann, U. *et al.*, 1993. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *The EMBO Journal*, 12(9), 3357-3364.
- Bennion, B.J. & Daggett, V., 2003. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5142-5147.
- Bhardwaj, N. & Gerstein, M., 2009. Relating protein conformational changes to packing efficiency and disorder. *PROTEIN SCIENCE*, 18(6), 1230-1240.
- Bolen, D.W. & Santoro, M.M., 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, 27(21), 8069-8074.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R. & Brennan, M., 1975. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14(22), 4953-4963.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 3(1), 1-30.
- Chan, H.S. & Dill, K.A., 1998. Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins*, 30(1), 2-33.
- Cheng, H.N. & Bovey, F.A., 1977. Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers*, 16(7), 1465-1472.
- Cheung, M.S., Klimov, D. & Thirumalai, D., 2005. Molecular crowding enhances native state stability and refolding rates of globular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(13), 4753-4758.
- Cingolani, G. *et al.*, 1999. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, 399(6733), 221-229.
- Clark, P.L., 2004. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(10), 527-34.
- Cohen, F.E., 1993. The parallel beta helix of pectate lyase C: something to sneeze at. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5113), 1444-1445.
- Cook, H.A. & Kumamoto, C.A., 1999. Overproduction of SecA suppresses the export defect caused by a mutation in the gene encoding the *Escherichia coli* export chaperone secB. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3010-3017.
- Courtenay, E.S., Capp, M.W. & Record, M.T., 2001. Thermodynamics of interactions of urea and guanidinium salts with protein surface: relationship between solute effects on protein processes and changes in water-accessible surface

- area. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 10(12), 2485-2497.
- Courtenay, E.S. *et al.*, 2000. Thermodynamic analysis of interactions between denaturants and protein surface exposed on unfolding: interpretation of urea and guanidinium chloride m-values and their correlation with changes in accessible surface area (ASA) using preferential interaction coefficients and the local-bulk domain model. *Proteins*, Suppl 4, 72-85.
- Creze, C. *et al.*, 2008. The crystal structure of pectate lyase peli from soft rot pathogen *Erwinia chrysanthemi* in complex with its substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18260-8.
- Dahiyat, B.I. & Mayo, S.L., 1997. Probing the role of packing specificity in protein design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(19), 10172-10177.
- Das, A. & Mukhopadhyay, C., 2009. Urea-mediated protein denaturation: a consensus view. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(38), 12816-12824.
- Emsley, P. *et al.*, 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*, 381(6577), 90-92.
- Evans, M.S., Sander, I.M. & Clark, P.L., 2008. Cotranslational folding promotes beta-helix formation and avoids aggregation in vivo. *Journal of Molecular Biology*, 383(3), 683-92.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F., 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13), 2606-2617.
- Fändrich, M., Fletcher, M.A. & Dobson, C.M., 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, 410(6825), 165-166.
- Flory, P.J., 1956. Role of Crystallization in Polymers and Proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 124(3211), 53-60.
- Grant, S.G. *et al.*, 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4645-4649.
- Gutte, B. & Merrifield, R.B., 1971. The synthesis of ribonuclease A. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(6), 1922-1941.
- Hardy, S.J. & Randall, L.L., 1991. A kinetic partitioning model of selective binding of nonnative proteins by the bacterial chaperone SecB. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4992), 439-443.
- Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M., 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5561), 1852-1858.
- Hatada, Y. *et al.*, 2000. Deduced amino-acid sequence and possible catalytic residues of a novel pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 267(8), 2268-2275.
- Heffron, S. *et al.*, 1998. Sequence profile of the parallel beta helix in the pectate lyase superfamily. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2), 223-35.
- Hennetin, J. *et al.*, 2006. Standard conformations of beta-arches in beta-solenoid proteins. *Journal of Molecular Biology*, 358(4), 1094-105.
- 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(1), 28-32.
- Ignatova, Z. *et al.*, 2007. From the test tube to the cell: exploring the folding and aggregation of a beta-clam protein. *Biopolymers*, 88(2), 157-63.
- Jahn, T.R. & Radford, S.E., 2005. The Yin and Yang of protein folding. *The FEBS Journal*, 272(23), 5962-70.
- Jakob, R.P. & Schmid, F.X., 2008. Energetic coupling between native-state prolyl isomerization and conformational protein folding. *Journal of Molecular Biology*, 377(5), 1560-1575.
- Jenkins & Pickersgill, 2001. The architecture of parallel beta-helices and related folds. *PROGRESS IN BIOPHYSICS & MOLECULAR BIOLOGY*, 77(2), 111-175.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R., 1998. Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2), 236-46.
- Jonda, S. *et al.*, 1999. Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *The EMBO Journal*, 18(12), 3271-81.
- Juge, N., 2006. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science*, 11(7), 359-367.
- Junker, M., Besingi, R.N. & Clark, P.L., 2009. Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion. *Molecular Microbiology*, 71(5), 1323-1332.
- Junker, M. & Clark, P.L., 2009. Slow formation of aggregation-resistant beta-sheet folding intermediates. *Proteins*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847915> [Accessed November 18, 2009].

- Junker, M. *et al.*, 2006. Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13), 4918-23.
- Kadokura, H. & Beckwith, J., 2009. Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell*, 138(6), 1164-1173.
- Kajava & Steven, 2006. Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 73, 55-96.
- Kajava, A.V. *et al.*, 2001. Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Molecular Microbiology*, 42(2), 279-292.
- Kamen, Griko, Y. & Woody, R.W., 2000. The stability, structural organization, and denaturation of pectate lyase C, a parallel beta-helix protein. *Biochemistry*, 39(51), 15932-43.
- Kamen, D.E. & Woody, R.W., 2002a. Folding kinetics of the protein pectate lyase C reveal fast-forming intermediates and slow proline isomerization. *Biochemistry*, 41(14), 4713-23.
- Kamen, D.E. & Woody, R.W., 2002b. Identification of proline residues responsible for the slow folding kinetics in pectate lyase C by mutagenesis. *Biochemistry*, 41(14), 4724-32.
- Khorasanizadeh, S., Peters, I.D. & Roder, H., 1996. Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Structural Biology*, 3(2), 193-205.
- King, J. & Laemmli, U.K., 1973. Bacteriophage T4 tail assembly: structural proteins and their genetic identification. *Journal of Molecular Biology*, 75(2), 315-337.
- Kloss, E., Courtemanche, N. & Barrick, D., 2008. Repeat-protein folding: new insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 469(1), 83-99.
- Kobayashi, T. *et al.*, 1999. Purification and properties of a low-molecular-weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(1), 65-72.
- Kobe & Kajava, 2000. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(10), 509-515.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J., 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*, 366(6457), 751-756.
- Krissinel, E. & Henrick, K., 2007. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, 372(3), 774-797.
- Lee, J.C. & Timasheff, S.N., 1974. Partial specific volumes and interactions with solvent components of proteins in guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, 13(2), 257-265.
- Lietzke, S.E. *et al.*, 1994. The Three-Dimensional Structure of Pectate Lyase E, a Plant Virulence Factor from *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiology*, 106(3), 849-862.
- Lim, W.K., Rösgen, J. & Englander, S.W., 2009. Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2595-2600.
- Löw, C. *et al.*, 2008. Structural insights into an equilibrium folding intermediate of an archaeal ankyrin repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3779-3784.
- Makin, O.S. & Serpell, L.C., 2005. Structures for amyloid fibrils. *The FEBS Journal*, 272(23), 5950-5961.
- Mamathambika, B.S. & Bardwell, J.C., 2008. Disulfide-linked protein folding pathways. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 211-35.
- Marín-Rodríguez, M.C., Orchard, J. & Seymour, G.B., 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2115-9.
- Mason, P.E. *et al.*, 2007. The interaction of guanidinium ions with a model peptide. *Biophysical Journal*, 93(1), L04-6.
- Mason, P.E. *et al.*, 2009. Preferential interactions of guanidinium ions with aromatic groups over aliphatic groups. *Journal of the American Chemical Society*, 131(46), 16689-16696.
- 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. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(10), 2138-48.
- Nelson, R. & Eisenberg, D., 2006a. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 260-5.
- Nelson, R. & Eisenberg, D., 2006b. Structural models of amyloid-like fibrils. *Advances in Protein Chemistry*, 73, 235-282.
- Nelson, R. *et al.*, 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435(7043), 773-778.
- Nettels, D. *et al.*, 2009. Single-molecule spectroscopy of the temperature-induced collapse of unfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19933333> [Accessed March 31, 2010].
- O'Brien, E.P., Brooks, B.R. & Thirumalai, D., 2009. Molecular origin of constant m-values, denatured state collapse, and residue-dependent transition midpoints in globular proteins. *Biochemistry*, 48(17), 3743-3754.
- Olofsson, A. *et al.*, 2004. Probing solvent accessibility of transthyretin amyloid by solution NMR spectroscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5699-5707.
- Pace, C.N. *et al.*, 1988. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(24), 11820-5.
- Pace, C.N. *et al.*, 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(11), 2411-2423.
- Petersen, T.N., Kauppinen, S. & Larsen, S., 1997. The crystal structure of rhamnogalacturonase A from *Aspergillus aculeatus*: a right-handed parallel beta helix. *Structure (London, England: 1993)*, 5(4), 533-544.
- Pickersgill, R. *et al.*, 1994. The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology*, 1(10), 717-723.
- Randall, L.L. & Hardy, S.J., 1986. Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: a study in vivo of maltose-binding protein in *E. coli*. *Cell*, 46(6), 921-928.
- Richardson, J.S. & Richardson, D.C., 2002. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2754-2759.
- Sakai, T. *et al.*, 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.
- Sander, C. & Schneider, R., 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*, 9(1), 56-68.
- Scavetta, R.D. *et al.*, 1999. Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *The Plant Cell*, 11(6), 1081-1092.
- Schellman, J.A., 1955. The stability of hydrogen-bonded peptide structures in aqueous solution. *Comptes Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg. Série Chimique*, 29(14-15), 230-259.
- Schmid, F.X., 1993. Prolyl Isomerase: Enzymatic Catalysis of Slow Protein-Folding Reactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1), 123-143.
- Schmid, F.X. *et al.*, 1986. Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(4), 872-6.
- Seckler, R. & Jaenicke, R., 1992. Protein folding and protein refolding. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(8), 2545-52.
- Serag, A.A. *et al.*, 2002. Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet. *Nature Structural Biology*, 9(10), 734-739.
- Sosnick, T.R. *et al.*, 1997. Ultrafast signals in protein folding and the polypeptide contracted state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), 8545-8550.
- Steinbacher, S. *et al.*, 1994. Crystal structure of P22 tailspike protein: interdigitated subunits in a thermostable trimer. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5170), 383-386.
- Stephenson, K., 2005. Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway (Review). *MOLECULAR MEMBRANE BIOLOGY*, 22(1-2), 17-28.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A., 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
- Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207-34.
- Thornton, J.M., 1981. Disulphide bridges in globular proteins. *Journal of Molecular Biology*, 151(2), 261-287.
- Timasheff, S.N., 1992. Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*, 31(41), 9857-9864.
- Tsai, H.G., Gunasekaran, K. & Nussinov, R., 2006. Sequence and structure analysis of parallel beta helices: implication for constructing amyloid structural models. *Structure (London, England: 1993)*, 14(6), 1059-72.
- Vondrásek, J. *et al.*, 2009. The molecular origin of like-charge arginine-arginine pairing in water. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(27), 9041-9045.
- Walter, M. *et al.*, 2008. Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage det7: a podoviral tail spike in a myovirus. *Journal of Virology*, 82(5), 2265-73.

- Wang, W. & Hecht, M.H., 2002. Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric beta-sheet proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2760-2765.
- Wasmer, C. *et al.*, 2008. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5869), 1523–6.
- Wasmer, C. *et al.*, 2009. The molecular organization of the fungal prion HET-s in its amyloid form. *Journal of Molecular Biology*, 394(1), 119-127.
- Wedemeyer, W.J. *et al.*, 2000. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, 39(15), 4207-16.
- Westermarck, P., 2005. Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *The FEBS Journal*, 272(23), 5942-5949.
- Wildegger, G. & Kiefhaber, T., 1997a. Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *Journal of Molecular Biology*, 270(2), 294-304.
- Wildegger, G. & Kiefhaber, T., 1997b. Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate. *Journal of Molecular Biology*, 270(2), 294-304.
- Wolfenden, R. & Snider, M.J., 2001. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of Chemical Research*, 34(12), 938-945.
- Xiao, Z. *et al.*, 2008. Improvement of the thermostability and activity of a pectate lyase by single amino acid substitutions, using a strategy based on melting-temperature-guided sequence alignment. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1183-9.
- Yoder & Jurnak, 1995. Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(5), 335-342.
- Yoder, M.D., Keen, N.T. & Jurnak, F., 1993. New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5113), 1503-1507.
- Zhang, G. & Ignatova, Z., 2009. Generic algorithm to predict the speed of translational elongation: implications for protein biogenesis. *PLoS One*, 4(4), e5036.

## 6. Anhang

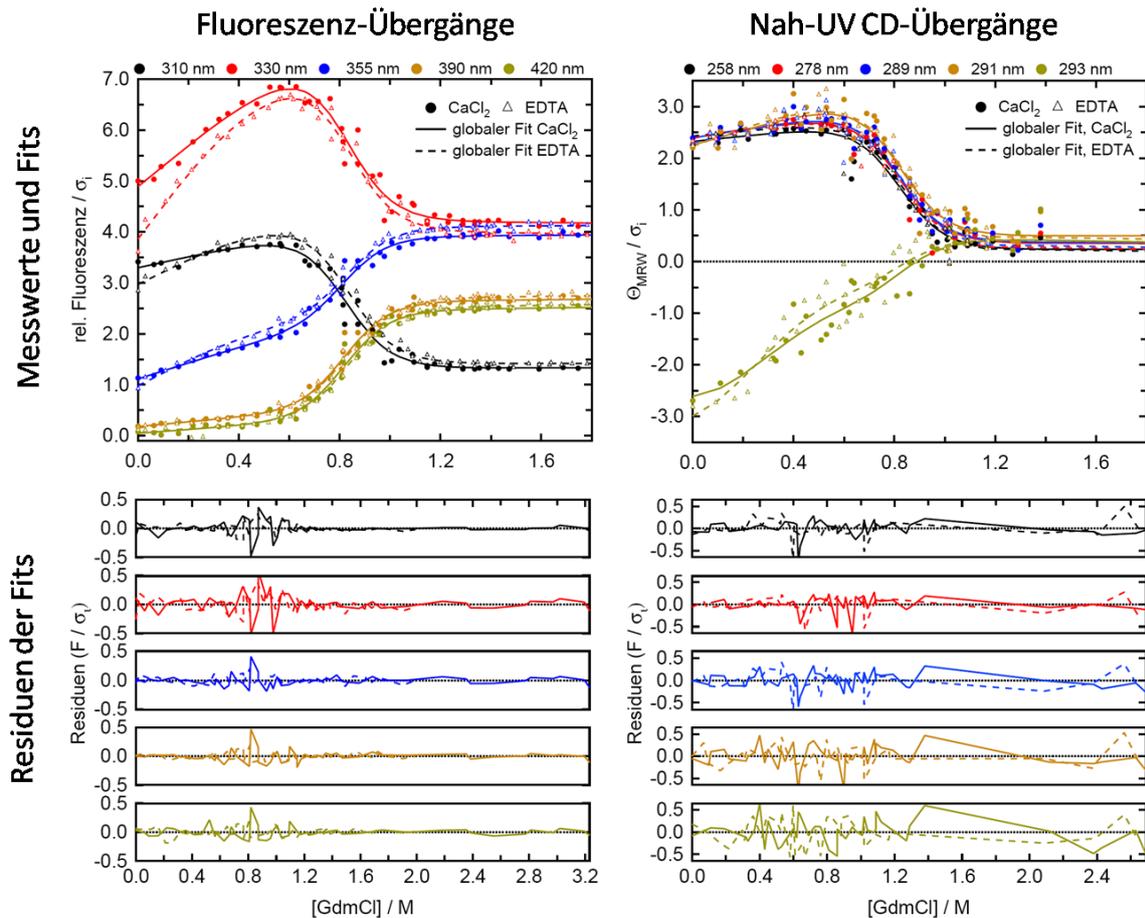
### A1 AVAA Kristallstruktur: Seitenkettenreste mit alternativen / nicht feststellbaren Konformationen

Pos.	Rest	Kette A	Kette B	Kette C
		Aufgelöste Reste: 100 %	Aufgelöste Reste: 97.5 %	Aufgelöste Reste: 100 %
1	A	1.0	1.0	---
9	I	0.5 / 0.5	0.5 / 0.5	0.5 / 0.5
36	Q	1.0	1.0	---
37	A	1.0	1.0	---
38	E	1.0	1.0	---
39	N	1.0	1.0	---
43	I	0.5 / 0.5	1.0	1.0
45	R	1.0	1.0	0.5 / 0.5
51	S	1.0	0.7 / 0.3	1.0
61	I	0.5 / 0.5	1.0	1.0
67	V	1.0	0.5 / 0.5	1.0
70	D	1.0	0.5 / 0.5	1.0
73	I	0.5 / 0.5	1.0	1.0
74	T	0.8 / 0.2	1.0	1.0
90	S	0.5 / 0.5	1.0	0.5 / 0.5
91	S	0.5 / 0.5	1.0	1.0
97	S	0.5 / 0.5	1.0	1.0
118	N	1.0	0.8 / 0.2	1.0
119	I	0.5 / 0.5	1.0	1.0
121	N	0.7 / 0.3	1.0	1.0
129	K	0.5 / 0.5	1.0	1.0
147	N	1.0	0.8 / 0.2	1.0
150	I	0.5 / 0.5	1.0	1.0
160	T	1.0	0.8 / 0.2	1.0
166	T	1.0	0.5 / 0.5	1.0
184	F	1.0	0.5 / 0.5	1.0
186	S	0.7 / 0.3	1.0	1.0
192	S	0.5 / 0.5	1.0	1.0
195	T	1.0	0.5 / 0.5	1.0

Anmerkung: Der schwarz umrahmte Bereich kennzeichnet die Reste, die sich im beweglichen T2/3-turn befinden.

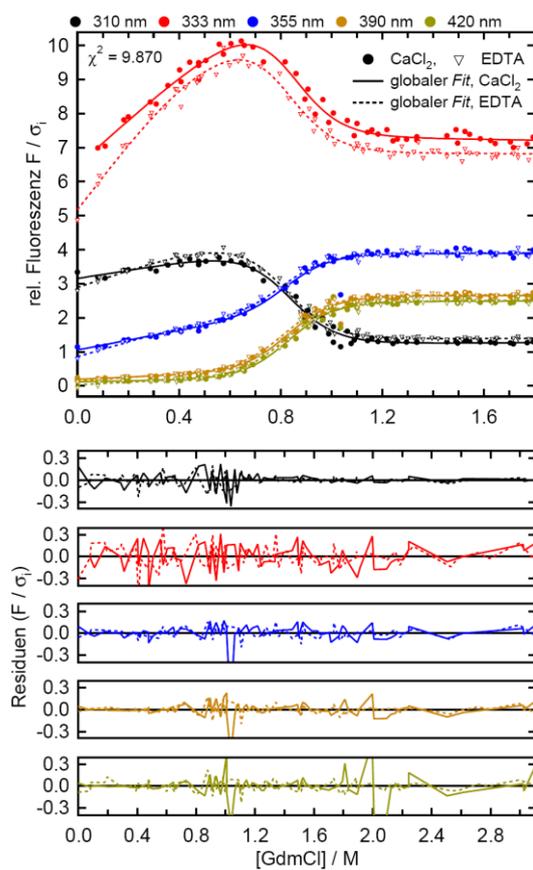
## A2

## Pel-15 AVAA Gleichgewichtsfaltungs- und Entfaltungsübergänge



Faltung/Entfaltung in 25 mM MOPS, 1 mM EDTA / CaCl<sub>2</sub>, pH 7.0, 20 °C, Unterschiedliche Detektionswellenlängen sind farblich gekennzeichnet, Inkubationszeitraum: 14 Tage *Offene Dreiecke* zeigen die Daten der Ca<sup>2+</sup> abhängigen Gleichgewichtsfaltung und *geschlossene Kreise* zeigen die Daten der EDTA-abhängigen Faltung. *Durchgezogene und unterbrochene Linien* stellen die Ergebnisse des jeweils global angepassten 3-Zustandsmodells dar. **Fluoreszenz-Übergänge:** (*Messwerte und Fits*) Die Fluoreszenzdaten wurden bei 5 Wellenlängen ausgewertet. Sie sind über dem Diagramm angegeben. (*Residuen der Fits*) Die Residuen berechneten sich als Differenz aus den Messwerten und den Fitergebnissen. Streuen sie zufällig um den Nullwert, ist dies ein Zeichen für eine gute Anpassung. Im Bereich von etwa 0.8 M GdmCl ist die Abweichung zwischen Messwerten und Fitergebnissen erhöht, folgt aber nach wie vor einer zufälligen Verteilung. **Nah-UV-CD Übergänge:** (*Messwerte und Fits*) Die CD-Daten wurden bei 5 verschiedenen Wellenlängen ausgewertet, die über dem Diagramm angegeben sind. Bis auf den Übergang, der bei 293 nm detektiert wurde, sind die Übergänge sehr ähnlich. Dieser wurde für die Regression der Daten nicht berücksichtigt. (*Residuen der Fits*) Die Residuenstreuung bei den CD-Daten ist insgesamt größer als in den Fluoreszenzexperimenten.

### A3 DVAA-Gleichgewichtsübergang



Darstellung und globale Auswertung der Gleichgewichts-faltung/entfaltung bei 5 repräsentativen Wellenlängen. Die 3-Zustandsanpassung der Daten wurde mit folgenden Beschränkungen ausgeführt:  $\Delta G_{NI} > 0$ ,  $m_{NI} > 0$ ,  $\Delta G_{IU} > 0$ ,  $s_n = 0 \text{ M}^{-1}$ ,  $s_i = 0 \text{ M}^{-1}$ ,  $m_{UI} = 26.9 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ .

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und unter ausschließlicher Nutzung der in dieser Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus anderen Werken entnommen wurden, sind grundsätzlich als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder veröffentlicht noch einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Christian Fiedler)

Potsdam, 5. April 2010

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Robert Seckler für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Physikalische Biochemie“, seine kompetente Betreuung und für die unzähligen Gespräche und Diskussionen, in denen ich viele biochemische und biophysikalische Denkanstöße von ihm erhalten habe und durch die er mir die Möglichkeit gegeben hat, immer wieder neue Blickpunkte auf mein eigenes Projekt und auf das vielschichtige Feld der Proteinfaltung zu gewinnen. Vielen Dank für die fantastische Möglichkeit, in der „Secklerei“ frei und selbstbestimmt Ziele entwickeln und verfolgen zu dürfen.

Klaus Gast danke ich mehr als herzlich für die ungezählten, erhellenden Gespräche und für seinen ungebrochenen, wissenschaftlichen Enthusiasmus. Gleichgültig ob Elektrotechnik, Optik, Proteinfaltung, NMR, Diplomatie, Zukunftsplanung oder einfach nur das Wetter – Klaus ist ein unerschöpflicher, vorbehaltloser Quell an Hilfe und fachlich fundierter Information. Vor allen diesen Dingen danke ich Klaus für das in mich gestellte Vertrauen während der letzten Monate, und ich freue mich sehr auf die Zeit unserer gemeinsamen Zusammenarbeit.

Monika Walter danke ich für die Einführung in das Gebiet der Pektatlyasen und für die Möglichkeit, viele methodische Details der Proteinfaltung von ihr zu lernen. Ihre Laborbücher waren mir in den letzten Jahren ein häufiger Begleiter, und einige der Experimente, die noch unter ihrer Anleitung durchgeführt wurden, sind Bestandteil dieser Arbeit.

Benjamin „Kuni“ Heinz und Jan Lengefeld danke ich sehr für ihre unschätzbaren, inhaltlichen Hilfestellungen und für die teils aufrührenden Diskussionen über proteinbiochemische und -physikalische Fragen und darüber, dass ich nun weiß, wie sich das Sonnenlicht auf der Liebesleben der Bahnsteigkanten auswirkt.

Allen amtierenden und ehemaligen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern der „Secklerei“ – Kuni, Moni, Jan, Klaus, Natalie, Marion, Nina, Basine, „Kollegin“ Anaït, Robert, Swetlana, Jana, Mandy, Simone, Franziska, Igor, Pavel, Doro, Christin, Jasmin, Stefan, Karolin, Antje, Jeanette, Steffi, Peter, Andreas, Anwar, Ben, Armin, Sonja und dem Mexikaner Alex – danke ich für die vielen, heiteren, euphorischen, nachdenklichen, ermutigenden, ernüchternden, aufrührenden und skurilen Momente im und um das Labor.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Nina, Patrick, Natalie, Steffi und Manfred – meine geduldigen Streiter im ewigen Kampf gegen orthographische Fribillen bzw. gegen inhaltliche und ungeschützte Leerzeichen. Natalie und Nina danke ich überdies für ihre ununerbrochene Motivation, fesselnde Bürogespräche und dafür, dass sie mich – insbesondere in der Endphase der Schreiberei – immer wieder zurück ins Fahrwasser geschoben haben.

Igor Gayk, Julia Schendel und Pavel Lulchev danke ich für die Unterstützung bei Proteinreinigungen und bei tagelangen Marathon-Messungen sowie für wertvolle Diskussionen und Denkanstöße.

Jeanette Wenzel und Simone Brockmann danke ich für das hingebungsvolle Bepinseln meiner Expressionskulturen – Dank auch das Gramm Protein; Mandy Schietke danke ich für ihre goldenen Mutagenese-Hände; Jana danke ich wie immer dafür, dass ihre klare Sicht jedem Suchenden zu seinem Ziel verhilft und dass sie tatsächlich immer einen Tip hat, der weiterhilft.

Der Arbeitsgruppe von Udo Heinemann am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin und insbesondere Yvette Roske danke ich für den sehr freundlichen Kontakt, die Durchführung des Kristallisationsscreens und die Lösung bzw. das Refinement der Kristallstruktur von Pel-15 AVAA.

Jo. Aus tiefstem Herzen danke ich dir für dein unerschütterliches Vertrauen in meine Arbeit, dein endloses Durchhaltevermögen, wenn ich mal wieder „nur nochmal kurz“ zur Uni musste und für deine elbische Gelassenheit, ohne die ich wahrscheinlich schon vor sehr langer Zeit heißgelaufen wäre, wie dereinst unser alter Polo. Jannik Adrian, dem kleinen Stern, danke ich für seine unermessliche Anstrengung beim Krabbeln, seine zwei leuchtenden Zähnen und für das schönste Lächeln der Welt. Besonders danke ich ihm für die diebische Freude, die ich verspüre, wenn er „papapa“ sagt und dabei Jo betrachtet.

Meinem Bruder Clemens und meinen meinen lieben Eltern danke ich für die immense Stärke in meinem Rücken, die Leichtigkeit auf meinen Schultern und die Festigkeit unter meinen Füßen. Mit ihrer kontinuierlichen Unterstützung haben sie es mir ermöglicht, dem Backsteinweg nach bestem Wissen und Gewissen zu folgen ohne dabei die farbenfrohe Vielfalt aus den Augen zu verlieren, die an seinen Seiten zu einem berausenden Tänzchen einlädt.

\*\*\*