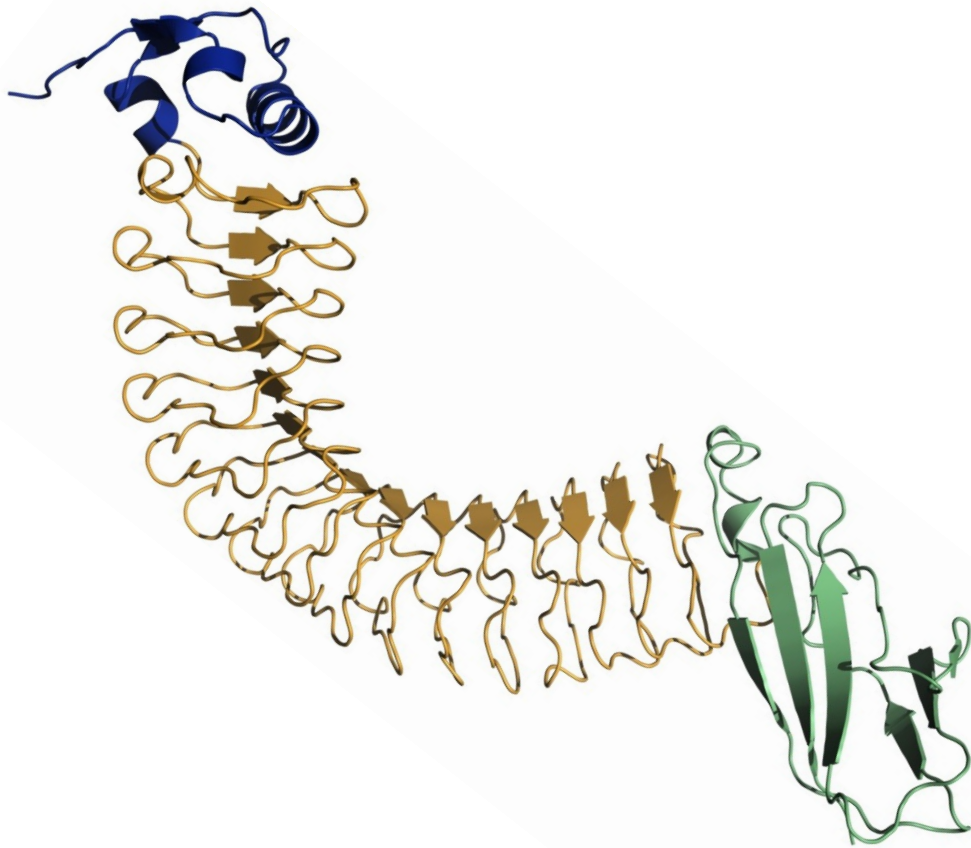


Institut für Biochemie und Biologie
Arbeitsgruppe für Physikalische Biochemie

Faltungseigenschaften des extrazellulären Proteins Internalin J und seine Cysteinleiter



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.-Biochem. Natalie Baumgart**
Potsdam, Juni 2013

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/2014/6960/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-69603](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69603)
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69603>

Für meine kleine Familie

Zusammenfassung

Die Proteinfehlfaltung ist eine wenig beachtete Problematik der medizinischen Forschung und spielt z.B. eine zentrale Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen. Daher ist es wichtig, ein umfassendes Verständnis über die Mechanismen und Triebkräfte der Proteinfaltung zu erlangen. Im Vergleich zum ubiquitären Vorkommen der sogenannten *repeat*-Proteine in der Natur sind Studien zu ihrer Stabilität und Faltung nicht äquivalent vertreten. Die zentrale Eigenschaft der *repeat*-Proteine ist ihr modularer Aufbau, der durch einfache Topologie gekennzeichnet ist und auf kurzreichenden Wechselwirkungen basiert. Diese Topologie macht *repeat*-Proteine zu idealen Modellproteinen, um die stabilitätsrelevanten Wechselwirkungen zu separieren und zuzuordnen.

Internalin J (InIJ) gehört zu der Klasse der bakteriellen, cysteinhaltigen (*leucine rich repeat*) LRR-Proteine. Bei den Internalinen handelt es sich um meist invasions-assoziierte Proteine der Listerien. Die LRR-Domäne von InIJ ist aus 15 regelmäßig wiederkehrenden, stark konservierten Sequenzeinheiten (*repeats*, 21 Aminosäuren) aufgebaut. Ein interessantes Detail dieses Internalins ist das stark konservierte Cystein innerhalb der *repeats*. Daraus ergibt sich eine ungewöhnliche Anordnung von 12 Cysteinen in einem Stapel. Die Häufigkeit von Cysteinen in InIJ ist für ein extrazelluläres Protein von *L. monocytogenes* außergewöhnlich, und die Frage nach ihrer Funktion daher umso brennender.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Faltung und Entfaltung von InIJ umfassend charakterisiert und die Relevanz der Cysteine näher beleuchtet. Im Vorfeld der Charakterisierung wurden zunächst das Proteinkonstrukt sowie dessen Präparation optimiert. Die spektroskopische Charakterisierung von InIJ zeigte, dass dessen Faltungszustand durch zwei Tryptophane im N- und C-Terminus fluoreszenzspektroskopisch gut zugänglich ist. Die thermodynamische Stabilität wurde mittels fluoreszenz-detektierten, GdmCl-induzierten Gleichgewichtsexperimenten bestimmt. Um die kinetischen Eigenschaften von InIJ zu erfassen, wurden die Faltungs- sowie die Entfaltungsreaktion spektroskopisch untersucht. Die Identifizierung der produktiven Faltungsreaktion war lediglich durch die Anwendung des reversen Doppelsprungexperiments möglich. Die Auswertung erfolgte nach dem Zweizustandsmodell, wonach die Faltung dem „Alles-oder-Nichts“ Prinzip folgt. Die Gültigkeit dieser Annahme wurde durch die kinetische Charakterisierung bestätigt. Es wurde sowohl in den Gleichgewichtsexperimenten ($\Delta G_N^{H_2O} = -86.7 \pm 21.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) als auch in den kinetisch erhaltenen Daten ($\Delta G_N^{H_2O} = -70.3 \pm 3.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) eine hohe freie Stabilisierungsenthalpie festgestellt. Die hohe Stabilität von InIJ geht mit hoher Kooperativität einher (Gleichgewichtsentfaltung: $m = 48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$; kinetischer Parameter: $m = 37.1 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Die kinetischen

Daten zeigen zudem, dass die hohe Kooperativität hauptsächlich der Faltungsreaktion entstammt ($m_f = -34.4 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $m_u = 2.66 \pm 0.26 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Der Tanford-Wert von 0.93 impliziert, dass die Oberflächenänderung während der Faltung bereits zum größten Teil erfolgt ist, bevor der Übergangszustand ausgebildet wurde.

Direkte strukturelle Informationen über den Übergangszustand wurden mit Hilfe von Mutationsstudien erhalten. Zu diesem Zweck wurden 12 der 14 Cysteine gegen ein Alanin ausgetauscht. Die *repeats* 1 bis 11 von InIJ beinhalten jeweils ein Cystein, deren Anordnung eine Leiter ergibt. Deren Substitutionen haben einen vergleichbar destabilisierenden Effekt auf InIJ von durchschnittlich 4.8 kJ mol^{-1} . Die Verlangsamung der Faltung deutet daraufhin, dass die Interaktionen der *repeats* 5 bis 11 im Übergangszustand bereits voll ausgebildet sind. Demnach liegt bei InIJ ein zentraler Faltungsnukleus vor.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine hohe Stabilität und ein stark-kooperatives Verhalten für das extrazelluläre Protein InIJ beobachtet. Diese Erkenntnisse könnten wichtige Beiträge zur Entwicklung artifizierlicher *repeat*-Proteine leisten, deren Verwendung sich stetig ausweitet. So eröffnen sich beispielsweise große Perspektiven für die medizinische Anwendung der *repeat*-Proteine als stabiler und kostengünstiger Ersatz von monoklonalen Antikörpern.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
CD	Circulardichroismus
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
Δ ASA	Änderung der Oberflächenzugänglichkeit (<i>accessible surface area</i>)
d	Tag (<i>day</i>)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>for</i>	<i>forward</i> -Primer
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
Gl.	Gleichung
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde (<i>hour</i>)
Da	Dalton
LB	Luria-Bertani-Kulturmedium
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	universelle Gaskonstante

<i>rev</i>	<i>reverse</i> -Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S/R	Signal/Rauschen
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SOB	komplexes Nährmedium (<i>super optimal broth</i>)
SOC	komplexes Nährmedium (<i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
SV	Säulenvolumen
T	absolute Temperatur
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
(v/v)	Volumenanteil
VIS	sichtbare Spektrum (<i>visible</i>)
(w/v)	Gewichtsanteil
wt	Wildtypprotein

Für die Aminosäuren wird der internationale Drei- und Einbuchstabencode verwendet.

Als Dezimaltrennzeichen wird der Punkt festgelegt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Proteinfaltung.....	2
1.1.1 Neue Betrachtungsweisen der Faltung: „old view“ und „new view“	3
1.1.2 Die Proteinfaltungsreaktion	4
1.2 Solenoidproteine.....	7
1.2.1 LRR-Proteine.....	8
1.2.2 Seitenkettenstapelung in <i>repeat</i> -Proteinen	11
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.3.1 Export und Verankerung der Oberflächenproteine bei Listerien.....	13
1.3.2 Die Internalin Proteinfamilie	14
1.3.3 Internalin J	16
1.3.4 <i>L. monocytogenes</i> und extrazelluläre Cysteine.....	19
1.4 Zielstellung dieser Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Enzyme	23
2.1.3 Standardmarker und Kits	24
2.1.4 Bakterien	24
2.1.5 Puffer und Nährmedien.....	24
2.1.6 Oligonukleotide.....	26

2.1.7	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.8	Geräte	27
2.1.9	Software	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Mikro- und Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1.1	<i>Bakterienkultivierung auf Agar-Platten</i>	29
2.2.1.2	<i>Bakterienanzucht in Flüssigkultur und Lagerung</i>	29
2.2.1.3	<i>Transformation von E. coli mit rekombinanter DNA</i>	29
2.2.1.4	<i>Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA</i>	29
2.2.1.5	<i>Restriktionsverdau unter Verwendung von Endonukleasen</i>	30
2.2.1.6	<i>Ligation der DNA-Fragmente</i>	30
2.2.1.7	<i>Dephosphorylierung der linearisierten Plasmid-DNA</i>	30
2.2.1.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	30
2.2.1.9	<i>PCR (Polymerase-Kettenreaktion)</i>	31
2.2.1.10	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	31
2.2.1.11	<i>Sequenzierung</i>	31
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	32
2.2.2.1	<i>Proteinexpression in E. coli</i>	32
2.2.2.2	<i>Zellernte und -aufschluss</i>	32
2.2.2.3	<i>Proteinreinigung mittels der Affinitätschromatographie sowie Abspaltung des GST-Tags</i>	32
2.2.2.4	<i>Größenausschlusschromatographie</i>	33
2.2.2.5	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	33
2.2.2.6	<i>Färbemethoden</i>	34
2.2.2.7	<i>Western-Blot und Immundetektion</i>	34
2.2.2.8	<i>Ultrafiltration zum Aufkonzentrieren der Proteinlösungen</i>	34
2.2.3	Biophysikalische Methoden	35
2.2.3.1	<i>Absorptionsspektroskopie (UV/VIS-Spektroskopie)</i>	35
2.2.3.2	<i>Bestimmung der Extinktionskoeffizienten</i>	35
2.2.3.3	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	36
2.2.3.4	<i>Stopped-flow Experimente</i>	36
2.2.3.5	<i>Inverse Doppelsprungexperimente (interrupted refolding experiments)</i>	37
2.2.3.6	<i>Gleichgewichtsübergänge</i>	37

2.2.3.7	<i>CD-Spektroskopie</i>	38
2.2.3.8	<i>Refraktometrie</i>	39
2.2.3.9	<i>MALDI-Massenspektroskopie</i>	39
2.2.3.10	<i>Lichtstremessungen</i>	39
2.2.4	Mathematische Auswertung.....	40
2.2.4.1	<i>Auswertung der Gleichgewichtsübergänge nach dem Zweizustandsmodell</i>	40
2.2.4.2	<i>Vorhersage von Kooperativitäten nach (Myers et al., 1995)</i>	41
2.2.4.3	<i>Auswertung der Faltungs- und Entfaltungskinetiken</i>	41
3	Ergebnisse und Diskussion	43
3.1	Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins InIj	43
3.1.1	Rationales Konstruktdesign zur Verbesserung der Proteinausbeute.....	43
3.1.1.1	<i>Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF</i>	44
3.1.2	Proteinexpression und Reinigung.....	45
3.1.3	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten.....	47
3.2	Spektroskopische Charakterisierung.....	48
3.2.1	UV-Absorptionsspektroskopie	49
3.2.2	Circulardichroismus Spektroskopie.....	51
3.2.3	Fluoreszenzspektroskopie	53
3.3	Faltung und thermodynamische Stabilität des Wildtyps InIj	56
3.3.1	Thermodynamische Studien.....	56
3.3.1.1	<i>GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge von InIj detektiert mittels Fluoreszenz</i>	56
3.3.1.2	<i>GdmCl-induzierte Übergänge von InIj detektiert mittels Fern-UV-CD</i>	60
3.3.1.3	<i>Untersuchungen zur Aggregationsneigung von InIj unter GdmCl-Einfluss</i>	62
3.3.1.4	<i>Thermisch-induzierte Entfaltung zur Stabilitätsuntersuchung</i>	63
3.3.2	Charakterisierung der Faltungsreaktion.....	65
3.3.2.1	<i>Chemisch-induzierte Entfaltungskinetiken von InIj</i>	65
3.3.2.2	<i>pH-Abhängigkeit der Entfaltung</i>	68
3.3.2.3	<i>Die schnelle Renaturierungsreaktion</i>	69
3.3.2.4	<i>Die Renaturierungsreaktion im Doppelsprungexperiment</i>	73

3.3.2.5	<i>Kinetische Analyse des Faltungsverhaltens von InIJ (Chevronplot)</i>	77
3.4	Faltung und thermodynamische Stabilität der InIJ-Varianten.....	81
3.4.1	GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge der Cystein-Alanin-Varianten.....	82
3.4.2	Einfluss der Cysteinleiter auf das Faltungsverhalten	86
4	Zusammenfassende Diskussion	97
4.1	Thermodynamischer und kinetischer Charakter der Faltungsreaktion von InIJ ..	97
4.2	Faltung und Entfaltung der InIJ-Varianten – Mutationsanalyse und die Rolle der Cysteine	102
	Literaturverzeichnis	107
	Anhang	119
	Danksagung	121

1 Einleitung

Die Frage, warum und wie Proteine zu ihrer 3D-Struktur finden, beschäftigt Wissenschaftler seit Jahrzehnten. Die Vorreiterrolle nahmen Wu (Wu, 1931, 1995) und kurze Zeit später Mirsky und Pauling (Mirsky & Pauling, 1936) bereits in der ersten Hälfte des vorherigen Jahrhunderts ein. Für seine umfangreichen Arbeiten zur chemischen Bindung, sowie für den Beitrag zur Strukturaufklärung von komplexen Substanzen wurde Linus Pauling 1954 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Anhand von Röntgenstrukturdaten erarbeitete er die grundlegenden Proteinsekundärstrukturelemente. Pauling schlug als erster die korrekten Modelle für die α -Helix und den β -Strang vor (Pauling & Corey, 1951; Pauling *et al.*, 1951). Gewissermaßen greifbar wurde das Problem der Proteinfaltung, als die erste Röntgenkristallstruktur bestätigen konnte, dass Proteine in einer definierten dreidimensionalen Anordnung vorliegen (Kendrew *et al.*, 1958).

Christian B. Anfinsen erkannte durch seine bahnbrechenden Experimente mit der RNaseA, dass die Strukturfindung ein spontaner Prozess ist und die Proteinsequenz der Code ist, der die Struktur bestimmt. Die gesamte Arbeit von Anfinsen im Laufe der 50-60er Jahre wurde 1973 letztendlich mit einem Nobelpreis gewürdigt (Anfinsen, 1973; Anfinsen *et al.*, 1961; Haber & Anfinsen, 1962). Die Strukturbiologen der ersten Stunde, Max Perutz und John Kendrew, wurden 1962 für die Bestimmung der ersten Röntgenkristallstruktur ebenfalls prämiert. Die Fülle an Nobelpreisen für dieses Forschungsgebiet verdeutlicht das ungebrochene allgemeine Interesse. Heute, ein halbes Jahrhundert später, ist die Fragestellung immer noch aktuell und reizt junge Wissenschaftler die Triebkräfte und Mechanismen der Proteinfaltung zu ergründen.

1.1 Proteinfaltung

Vereinfacht dargestellt sind Proteine Biopolymere, die aus Einzelbausteinen, den Aminosäuren, bestehen. Üblicherweise sind die Aminosäuren über die Amino- und die Carboxylfunktion kovalent miteinander verbunden. Somit ergibt sich eine lineare Abfolge, die die Primärsequenz genannt wird. Die berühmten Experimente von Christian Anfinsen an der RNase A zeigten, dass die Strukturfindung *in vitro* genauso wie *in vivo* zu funktionalem Protein führt (Anfinsen *et al.*, 1961). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Faltungsinformation intrinsisch vorliegt. Die dreidimensionale Struktur des Proteins wird also von seiner Aminosäuresequenz diktiert. Das Protein findet bei physiologischen Bedingungen unweigerlich in den nativen, biologisch-aktiven Zustand. Infolgedessen formulierte Anfinsen die weitgehend anerkannte Hypothese, die besagt, dass die Faltung thermodynamisch getrieben ist (Anfinsen, 1973; Haber & Anfinsen, 1962). Der native Zustand ist somit ein Ergebnis der Suche nach dem globalen Minimum der freien Enthalpie. Die thermodynamische Betrachtung des Faltungsproblems führt zu der Antwort auf die Frage, wieso Proteine grundsätzlich falten, erklärt aber nicht dessen Mechanismus. Dieses Problem wurde höchst anschaulich durch Cyrus Levinthal dargestellt und wurde unter der Bezeichnung „Levinthal-Paradoxon“ bekannt (Levinthal, 1969). Nach seiner Berechnung wäre das Leben in dem Universum unmöglich, wenn es sich bei der Proteinfaltung um eine rein statistische Suche nach der energetisch optimalen Konformation handeln würde (Levinthal, 1969; Zwanzig *et al.*, 1992). Damit wurde die Bedeutung der kinetischen Kontrolle hervorgehoben sowie die Notwendigkeit von Intermediaten und eines distinkten Faltungsweges (*folding pathway*) (Levinthal, 1968; Wetlaufer, 1973). Obwohl es natürlich Fortschritte gibt, sind wir immer noch auf dem Weg zur *ab initio* Strukturvorhersage. Das „*protein folding problem*“ bleibt bestehen mit der Frage, ob es das allgemeingültige Prinzip der Proteinfaltung in der erhofften Form gibt.

Die Struktur eines Proteins ist schon immer als der Schlüssel zu dessen biologischer Funktion erachtet worden (Struktur-Funktions-Paradigma). Eine Ausnahme bilden die unter der Bezeichnung *intrinsic disordered proteins* zusammengefassten Proteine. Erst spät wurde dieses spezielle Cluster von Proteinen und das Fehlen einer definierten Struktur bei nativen Bedingungen interessant (Gast *et al.*, 1995; Huber & Bennett, 1983). Analog zur Strukturfindung wird auch das Fehlen einer 3D-Struktur durch die Aminosäurezusammensetzung bestimmt. Eine hohe Gesamtladung und eine geringe Hydrophobizität sind dabei ausschlaggebend (Tompa, 2002; Uversky *et al.*, 2000). Für viele dieser Proteine wurde eine ligandeninduzierte Faltung beschrieben (Dunker *et al.*, 2001; Uversky *et al.*, 2000). Auch hier besitzt die Frage nach den Mechanismen der Proteinfaltung eine ungeahnte Brisanz, denn nach bioinformatischen Studien zählen ungefähr 25-30 % des eukaryotischen Proteoms zu den

intrinsisch ungeordneten Proteinen (Oldfield *et al.*, 2005). Man spricht in diesem Zusammenhang analog vom sogenannten „*protein non-folding problem*“.

1.1.1 Neue Betrachtungsweisen der Faltung: „*old view*“ und „*new view*“

Ein klassisches Konzept zur Beschreibung der Proteinfaltung stellt die Theorie des Übergangszustandes (*transition state theory*) dar. Dieses findet üblicherweise in der Beschreibung chemischer Reaktionen Anwendung (Eyring, 1935; Hammond, 1955; Leffler, 1953). In dem zweidimensionalen Reaktionsdiagramm ist das Energieprofil einer Faltungsreaktion dargestellt (Abb. 1.1). Das Diagramm beschreibt das minimale Zweizustandsmodell mit einem ungefalteten (*U*) und einem nativen (*N*) Zustand. Die beiden Grundzustände sind durch einen höherenergetischen Übergangszustand (*TS*) voneinander getrennt. Mit diesem Modell lassen sich die in Ensemble-Experimenten gewonnenen Daten am besten interpretieren. Sowohl die thermodynamische Stabilisierung als auch der kinetische Einfluss durch die Energiebarriere sind definiert. Allerdings lässt sich die sogenannte „ultraschnelle“ Faltung mit diesem Modell nicht erklären (Dill, 1990).

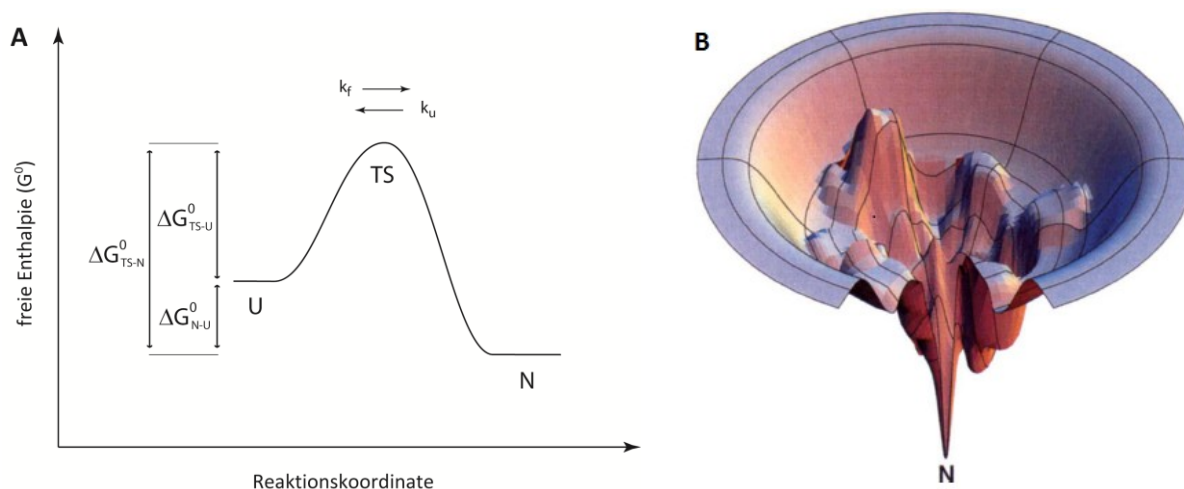


Abb. 1.1 Verschiedene Darstellungen einer Faltungsreaktion (A) Klassisches Energieprofil basierend auf dem Zweizustandsmodell mit dem entfalteten Zustand (*U*), dem nativen Zustand (*N*) und dem Übergangszustand (*TS*). (B) Energieprofil einer Proteinfaltungslandschaft mit vielfältigen Möglichkeiten zum nativen Zustand (*N*) zu gelangen (Dill & Chan, 1997). Aufgetragen wird freie Enthalpie ΔG_{N-U}^0 gegen die Entropie.

Ein neuer Impuls kam aus dem Umfeld der statistischen Physik durch die Einführung einer Energielandschaft (*energy landscape*) zur Beschreibung der Proteinfaltung (Bryngelson & Wolynes, 1987; Bryngelson *et al.*, 1995; Leopold *et al.*, 1992). Die trichterförmige Proteinfaltungslandschaft ergibt sich durch ein globales Energieminimum der nativen Konformation im multidimensionalen, konformationellen Raum (Dill & Chan, 1997). Diese Theorie entspricht einerseits statistischen Berechnungen im Rahmen von Simulationen, andererseits experimentellen Ergebnissen. Denn es gibt

nicht nur experimentelle Hinweise für wohldefinierte Faltungswege mit sequenziellem Auftreten von Intermediaten (Bachmann & Kiefhaber, 2001). In der Literatur wurden ebenfalls vermehrt parallele Faltungswege beschrieben (Mello & Barrick, 2004; Pletneva *et al.*, 2005; Zaidi *et al.*, 1997). Durch neue Methoden wie z.B. Einzelmolekülspektroskopie (FRET) (Deniz *et al.*, 2000; Schuler *et al.*, 2002), Protonenaustauschexperimente (*hydrogen exchange*, HX-MS und HX-NMR) (Udgaonkar & Baldwin, 1988; Wales & Engen, 2006) oder NMR-Relaxationsmessungen (*relaxation dispersion* NMR) (Huang & Oas, 1995; Mittermaier & Kay, 2006) wurden multiple Faltungswege und Intermediate erfasst. Das Modell der Faltungslandschaft (Abb. 1.1 B) hat vor allem den Vorteil, sowohl mit einem dominierenden Faltungsweg oder auch mit multiplen Faltungswegen vereinbar zu sein.

1.1.2 Die Proteinfaltungsreaktion

Kinetische Analyse

Verhalten sich Proteine nach dem Zweizustandsmodell ($N \leftrightarrow D$), lassen sich die Entfaltungs- (k_u) und Faltungsgeschwindigkeiten (k_f) in einen sogenannten Chevronplot auftragen (Fersht, 1999; Ikai *et al.*, 1973). Dabei lässt sich bei extrem stabilisierenden bzw. destabilisierenden Bedingungen (z.B. chemischer Denaturierung) die Rückreaktion vernachlässigen, und die makroskopische Geschwindigkeitskonstante (k) beschreibt demnach die mikroskopische Konstante. Die Darstellung der logarithmierten Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration ergibt in einem idealen Zweizustandsmodell einen V-förmigen Plot. Ebenso wie die Stabilisierungsenthalpie ΔG linear von der Denaturierungsmittelkonzentration abhängt [Gl. 1.1], hängt auch die freie Aktivierungsenthalpie ΔG_{TS-U} von der Denaturanzkonzentration ab [Gl. 1.2], [Gl. 1.3], wobei k die Geschwindigkeitskonstante bei einer bestimmten Denaturierungsmittelkonzentration ist, k^{H_2O} die extrapolierte Geschwindigkeitskonstante ohne Denaturierungsmittel und m die Steigung des Faltungs- bzw. des Entfaltungssastes.

$$\Delta G = \Delta G^{H_2O} + m \cdot [D] \quad [\text{Gl. 1.1}]$$

$$\ln k_f = \ln k_f^{H_2O} + m_f \cdot [D] \quad [\text{Gl. 1.2}]$$

$$\ln k_u = \ln k_u^{H_2O} + m_u \cdot [D] \quad [\text{Gl. 1.3}]$$

Charakterisierung des Übergangszustands

Auch wenn Erkenntnisse auf Strukturebene stets erwünscht sind, lassen sich die in klassischen Ensemble-Experimenten gemessenen Daten oft nur makroskopisch betrachten. Mittels der sogenannten ϕ -Wert-Analyse lassen sich dennoch Details über die Struktur des Übergangszustands erhalten (Fersht, 2000). Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse ist eine den nativen Zustand destabilisierende Mutation (Abb. 1.2 B). Durch Mutationen (*site directed mutagenesis*) können beliebige Aminosäuren ausgetauscht und nachfolgend die Faltungs- bzw. Entfaltungskinetiken analysiert werden. Die kinetischen Daten und deren Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration sind essentiell für die ϕ -Wert-Analyse (Matthews, 1987).

Grundlage für die ϕ -Wert-Analyse bietet die *transition state theory* (Abb. 1.2 A). Die Geschwindigkeitskonstante der Faltung (k_f) ergibt sich aus der Enthalpiedifferenz zwischen dem Übergangszustand (TS) und dem entfalteten Zustand (U) – der freien Aktivierungsenthalpie [Gl. 1.4], wobei der Vorfaktor k_0 berücksichtigt werden muss. Da die Höhe der Energiebarriere die Geschwindigkeit der Faltung bestimmt, verändert sich diese bei Störung des Übergangszustands. In Zusammenhang mit [Gl. 1.4] und [Gl. 1.5] lässt sich der ϕ -Wert daher mit [Gl. 1.6] definieren.

$$k_f = k_0 \exp(-\Delta G_{TS-U}/RT) \quad [\text{Gl. 1.4}]$$

$$\phi_f = \frac{\Delta \Delta G_{TS-U}}{\Delta \Delta G_{N-U}} \quad [\text{Gl. 1.5}]$$

$$\phi_f = \frac{RT \ln(k_f^{mut}/k_f^{wt})}{\Delta \Delta G_{N-U}} \quad [\text{Gl. 1.6}]$$

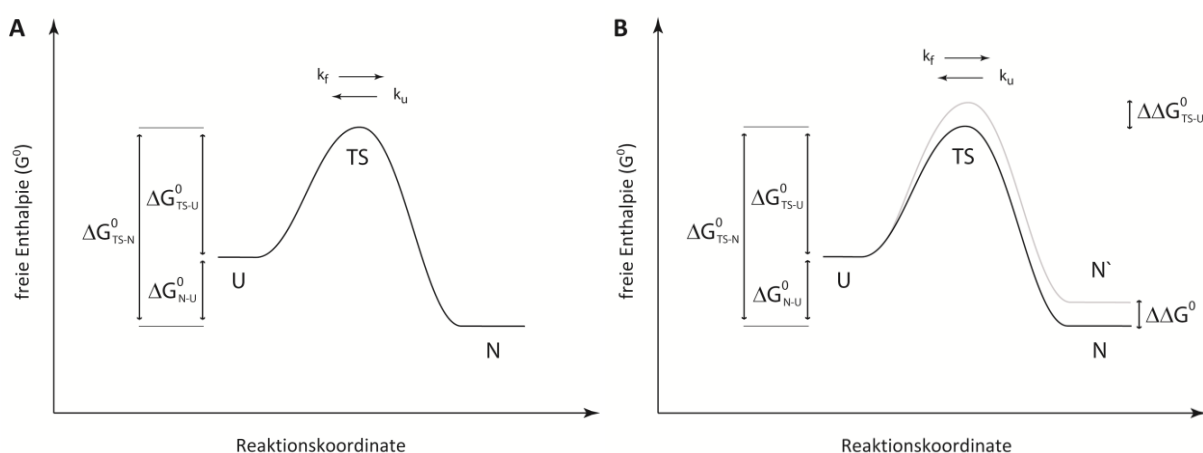


Abb. 1.2 Energieprofile einer Proteinfaltungsreaktion ohne (A) und mit Störung durch die Mutationsanalyse (B). Das Energieprofil des Wildtypproteins ist mittels einer durchgängigen schwarzen Linie dargestellt und das der destabilisierten Proteinvariante ist in grau dargestellt.

Wirkt sich die eingeführte Mutation nicht auf den Übergangszustand aus, so besitzt dieser an der mutierten Position gleiche Eigenschaften wie das ungefaltete Protein. Da ΔG_{TS-U} sich nicht ändert, ist der ϕ -Wert = 0 [Gl. 1.5]. Beeinflusst die Mutation den Übergangszustand im Idealfall um denselben Betrag wie die freie Enthalpie, ist der ϕ -Wert = 1. In letzterem Fall ist der Übergangszustand an der mutierten Position weitgehend nativähnlich (Matouschek *et al.*, 1990).

Die Position des Übergangszustands auf der Reaktionskoordinate kann im Allgemeinen durch den Tanford-Wert (β_T) abgeschätzt werden (Fersht, 1999; Jackson, 1998; Tanford, 1970). Dieser ergibt sich jeweils aus der Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten der Faltung (m_f) und Entfaltung (m_u) von der Denaturierungsmittelkonzentration [Gl. 1.7]. β_T ist demnach ein Maß für die relative Lösungsmittelzugänglichkeit bzw. die Kompaktheit des Übergangszustands. Ein β_T -Wert von 1 deutet auf eine nahezu native Struktur des Übergangszustands, wohingegen ein Wert von 0 auf ein nahezu unstrukturiertes Protein hinweist. Damit ist der Tanford-Wert β_T komplementär zum ϕ -Wert.

$$\beta_T = \frac{m_f}{m_f - m_u} \quad [\text{Gl. 1.7}]$$

1.2 Solenoidproteine

Proteine mit hintereinander angeordneten Wiederholungseinheiten (*repeats*) kommen in der Natur recht häufig vor. In 14 % aller Proteine sind repetitive Sequenzen zu finden, wobei diese in eukaryotischen Proteinen dreimal öfter auftreten als in prokaryotischen Sequenzen (Marcotte *et al.*, 1999). Die Wiederholungssequenzen variieren stark in ihrer Länge: beispielsweise lediglich eine Aminosäure in Polyglutaminabschnitten, oder 100 Aminosäuren im Protein Titin (Kajava, 2012; Matsushima *et al.*, 2008).

Eine Untergruppe der *repeat*-Proteine bilden die Solenoidproteine. Eine Besonderheit der Solenoide ist die tandemartige Anordnung der *repeats* in einer Superhelix (Abb. 1.3). Es ergibt sich damit eine elongierte und flexible Struktur, die wie geschaffen ist für Protein-Protein-Interaktionen. Die *repeats* sind um die Superhelixachse gewunden, und das Protein kann durch die Parameter Händigkeit (*handedness*), Krümmung (*curvature*) und Drehung (*twist*) charakterisiert werden (Kobe & Kajava, 2000). Eine Wiederholungseinheit besteht dabei meist aus 12-40 Aminosäuren. Im einfachsten Fall enthält eine Windung zwei Sekundärstrukturelemente. In der komplizierteren Anordnung beinhaltet eine Windung drei bis vier Strukturelemente und die jeweils verbindenden *turns* oder *loops*.

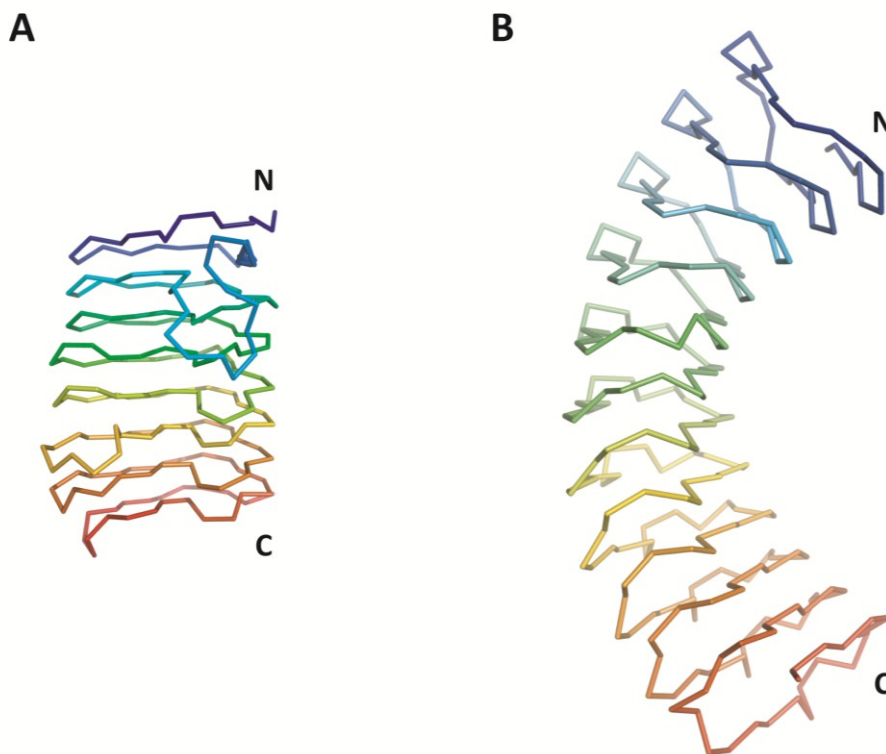


Abb. 1.3 Schematische Darstellung einer Superhelix anhand des Kohlenstoffrückgrats eines β -Solenoids (A) Alkalische Pektatlyase, Pel15 (1EE6; Akita *et al.*, 2001) und eines *leucine rich repeat*-Proteins (B) InlJ (3BZ5; Bublitz *et al.*, 2008). Die Farbe des Polypeptidrückgrats ändert sich kontinuierlich von Blau (N-Terminus) zu Rot (C-Terminus).

Die Anzahl der *tandem repeats* variiert stark von minimal drei (z.B. bei Serralysin) bis mehr als 80 (z.B. bei Filamentösem Hämmaglutimin) (Kajava & Steven, 2006). Weiterhin können solenoide Proteine verschiedene Sekundärstrukturelemente beinhalten wie β -Stränge, α -Helices, 3_{10} -Helices oder Polyprolin II-Helices (Kobe & Kajava, 2000). Einen Spezialfall bilden Proteine, die nur aus β -Strängen bestehen. Diese werden unter dem Begriff β -Solenoidproteine zusammengefasst, z.B. die alkalische Pektatlyase (Abb. 1.3 A).

Eine weitere Besonderheit der solenoiden Strukturen ist der Umstand, dass es mehrerer Wiederholungseinheiten bedarf um eine stabile Tertiärstruktur auszubilden, wobei sich zwischen den Windungen förmlich ein Wasserstoffbrückennetzwerk ausbildet. Im Inneren ergibt sich durch die dicht gepackten hydrophoben Reste ein ausgedehnter hydrophober Kern. Die *repeats* schützen auf eine optimale Art und Weise das hydrophobe Innere (Kajava & Steven, 2006). Dabei spielen die Stapelinteraktionen im Moleküllern eine bedeutende Rolle. Hydrophobe und aromatische Seitenketten, aber auch polare Aminosäuren bilden mehr oder weniger regelmäßige Stapel (siehe Kap. 1.2.2). Die meisten Solenoidproteine schützen den hydrophoben Kern durch abschirmende Strukturen am N- und am C-terminalen Ende, z.B. durch verstärkte Polarität oder aber größere, abschließende Domänen (Kajava & Steven, 2006; Kobe & Kajava, 2001).

1.2.1 LRR-Proteine

Leucinreiche-Wiederholungseinheiten (*leucine rich repeats*, LRR) bilden ein weitverbreitetes Strukturmotiv. LRR-Proteine sind in Viren genauso zu finden wie in Archaeen, Pro- und Eukaryoten. Mit ihrer gebogenen, länglichen Gestalt gehören sie zu der Klasse der solenoiden *repeat*-Proteine (Kajava, 2012). Die Länge der Wiederholungseinheit liegt bei den LRR bei 20-30 AS. LRR-Proteine sind relativ stark gekrümmt, aber nur leicht entlang der Superhelixachse gedreht (Abb. 1.4). Daher werden diese Proteine oft als hufeisen- oder bogenförmig beschrieben. Die Krümmung ist spezifisch für LRR-Proteine und unterscheidet sie somit von den β -Solenoiden (Abb. 1.3) (Jenkins & Pickersgill, 2001; Kajava & Steven, 2006). Bis *dato* wurden nur rechtsgängige LRRs vorgefunden. Die meisten dieser Proteine sind in Protein-Protein oder Protein-Ligand-Interaktionen involviert (Kobe & Kajava, 2001). Der Grund hierfür scheint die ausgedehnte Interaktionsfläche zu sein mit einer hohen Austauschbarkeit der lösungsmittlexponierten Aminosäuren, ohne die Struktur verändern zu müssen. Denn die Struktur eines LRR-Motivs wird durch die konservierten in das hydrophobe Innere orientierten Seitenketten bestimmt.

Durch die Krümmung ergeben sich eine konkave und eine konvexe Seite. Die konkave Seite der Superhelix wird durch ein paralleles β -Faltblatt definiert (Abb. 1.4). Diese ist auch üblicherweise die Proteininteraktionsfläche, aber es sind auch Beispiele für andere Bindungsmodi bekannt (siehe Bella

et al., 2008). Die Gesamtlänge der Wiederholungseinheit ist mitbestimmend dafür, welche Strukturelemente auf der konvexen Seite gebildet werden können und welche ausgeschlossen sind. Es existieren Beispiele für α -Helices, 3_{10} -Helices, Polyprolin II-Helices, β -Turns und kurze β -Stränge auf der konvexen Seite. In unregelmäßigen LRR-Proteinen mit *repeats* unterschiedlicher Länge liegen auch unterschiedliche Sekundärstrukturen vor, wie z.B. in Decorin (Abb. 1.4 A). In langen *repeats* von 24-30 AS werden vorrangig α -Helices oder 3_{10} -Helices vorgefunden. Kurze *repeats* von ca. 20-21 AS bilden eher Polyprolin II-Helices oder lang-gedehnte Strukturen. Das Sekundärstrukturelement spielt durch den Platzanspruch eine Rolle bei der Krümmung der Superhelix, bestimmt diese aber nicht allein (Enkhbayar *et al.*, 2004; Hindle *et al.*, 2009). Trotz sehr kurzer *repeats* (z.B. YopM, InIJ) kann eine Krümmung vorhanden sein, da strukturell gebundenes Wasser auf der konvexen Seite zwischen die *repeats* einlagert (Abb. 1.4 B) (Bublitz *et al.*, 2008; Evdokimov *et al.*, 2001). Auf diese Weise entstehen wasservermittelte Wasserstoffbrücken, die die gekrümmte Struktur stabilisieren (Bella *et al.*, 2008).

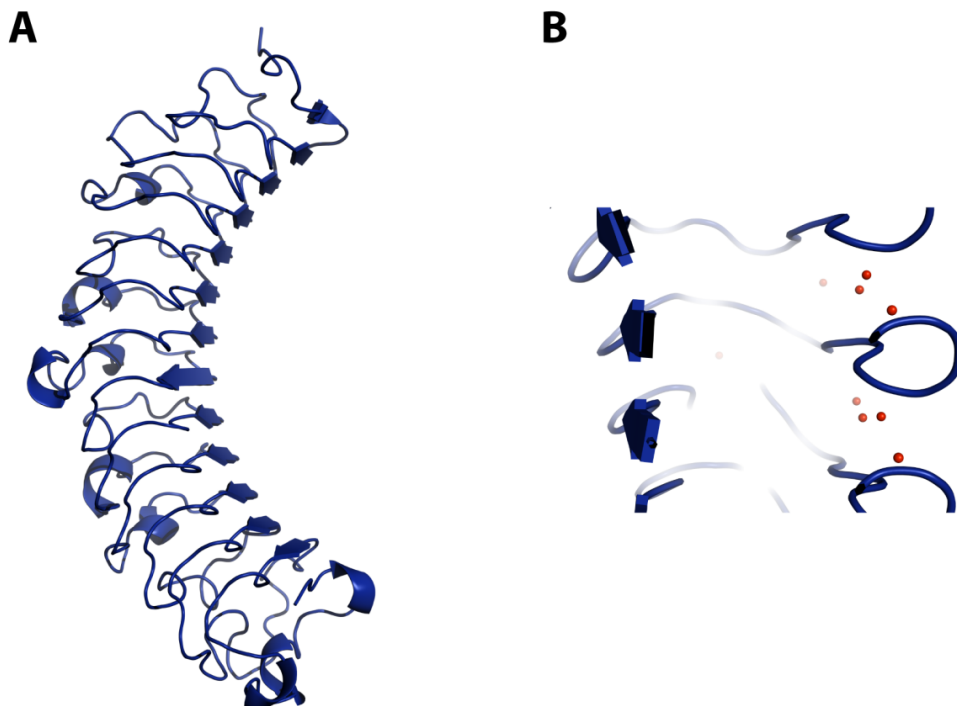


Abb. 1.4 Beispiele für LRR-Proteine (A) Decorin – ein Vertreter sehr unregelmäßiger LRR-Wiederholungssequenzen (1XKU; Scott *et al.*, 2004). (B) Längsschnitt durch die Windungen 10, 11 und 12 des Proteins InIJ. Mehrere Wassermoleküle (rot) sind als *strings* zwischen die Windungen auf der konvexen Seite eingelagert. Diese Wassermoleküle ermöglichen die Krümmung des Proteins und ebenfalls die Interaktion zwischen den *repeats*.

Der β -Strang auf der konkaven Seite und der C-terminal angrenzende *loop* sind hoch konserviert und besitzen folgende Konsensussequenz: **LxxLxLxxNxL** (Abb. 1.5), wobei „L“ für Leu, Ile, Val oder andere hydrophobe Reste, „N“ für Asn, Ser, Thr oder Cys und „x“ für eine beliebige Aminosäure steht

(Buchanan & Gay, 1996; Kobe & Deisenhofer, 1994). Die Reste 3-5 eines jeden *repeats* bilden in der Gesamtheit das parallele β -Faltblatt. Die charakteristische Einheit aus 11 Aminosäuren ist in allen LRR-Proteinen zu finden, der Rest der Wiederholungseinheit kann dagegen stark variieren (Kajava *et al.*, 1995). Das variable Segment unterteilt die LRR-Superfamilie in Unterfamilien. Eine Darstellung der Subfamilien, die aus Sequenzanalysen entstanden ist, ist im Übersichtsartikel von (Kajava, 1998) zu finden.

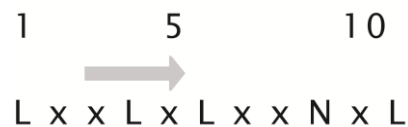


Abb. 1.5 Die hochkonservierte Konsensussequenz der LRR-Proteine. Der Pfeil markiert die β -Strang bildenden Reste. „L“ steht für Leu, Ile, Val oder andere hydrophobe Reste, „N“ für Asn, Ser, Thr oder Cys und „x“ für eine beliebige Aminosäure.

Manche LRR-Proteine beinhalten ein höchst regelmäßiges LRR-Motiv, welches aus einer wiederkehrenden Sequenz von 10/11 Aminosäuren besteht (Abb. 1.6). InIJ gehört zu diesem Typus des LRR, bei dem auch die konvexe Seite hoch konserviert ist (siehe Kap. 1.3.3). Der hydrophobe Kern eines LRR-Proteins liefert einen großen Beitrag zur Stabilität. Die konservierten, hydrophoben Reste sind sehr dicht gepackt und optimieren auf diese Weise die van-der-Waals-Wechselwirkungen. Kürzlich ist dieses hintereinander geschachtelte Motiv „IRREKO@LRR“ (IRREKO – japanisch für verschachtelt) benannt worden (Matsushima *et al.*, 2010). Die Autoren unterbreiten die Hypothese, dass es sich hierbei um einen LRR- Vorläufer handelt. Diese Anordnung ist ausschließlich in bakteriellen LRR-Proteinen gefunden worden.

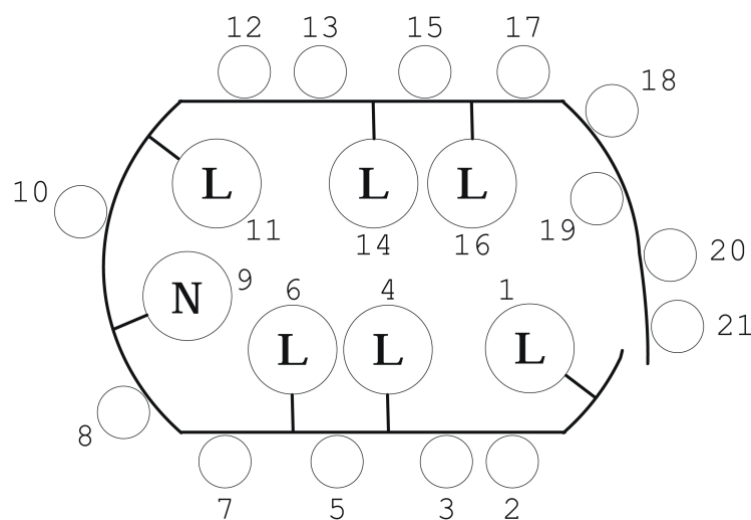


Abb. 1.6 Seitenkettenanordnung innerhalb einer Windung des „IRREKO@LRR“-Motivs. Die konservierten Reste der Konsensussequenz sind in die Abbildung eingetragen. „L“ steht für Leu, Ile, oder Val, „N“ für Asn, Ser, Thr oder Cys und „x“ für eine beliebige Aminosäure. Modifiziert nach (Matsushima *et al.*, 2010)

1.2.2 Seitenkettenstapelung in *repeat*-Proteinen

In den LRR-Proteinen, aber auch in anderen Solenoiden wie β -Helices, spielen *interrepeat*-Wechselwirkungen eine große Rolle. Da die Seitenkettenreste immer wieder dieselben Positionen innerhalb des *repeats* besetzen, bilden sie ausgedehnte Stapel. Hydrophobe Aminosäuren bilden mehr oder weniger regelmäßige Stapel, aber auch polare Reste werden im sonst hydrophoben Inneren in Stapeln koordiniert.

Den hydrophoben Kern bilden oft verzweigte Aminosäuren wie Leucine, Isoleucine, Valine. In den sehr regelmäßigen *repeats* werden Leucine bevorzugt. Stapel aus aromatischen Seitenketten sind hauptsächlich in β -Solenoiden zu finden und seltener in LRR-Proteinen (Jenkins & Pickersgill, 2001). In beiden Proteinfamilien lassen sich im Inneren oft Asparagine, aber auch Serine, Threonine oder Cysteine vorfinden (Kobe & Deisenhofer, 1995). Sind diese Reste gestapelt, können sie so Wasserstoffbrücken untereinander und mit dem Peptidrückgrat ausbilden (Yoder & Jurnak, 1995; Yoder *et al.*, 1993). Die konservierten Asparaginpositionen sind am Ende der β -Stränge in den *turns* zu finden. Nach dem β -Strang vollzieht die Peptidkette eine 90° -Drehung, damit die Carbonylgruppe ins hydrophobe Innere zeigt. Dies ist energetisch ungünstig, aber ein Asparagin an der Position 9 des *repeats* kann in dieser Konformation die *turn*-Bildung erleichtern (Abb. 1.7). (Evdokimov *et al.*, 2001; Kobe & Kajava, 2000). Die Asparaginreste sind in β -Solenoiden und auch LRR-Proteinen zu finden. In den LRR-Motiven gehört das Asparagin an der Position 9 zu den hochkonservierten Resten (Abb. 1.5).

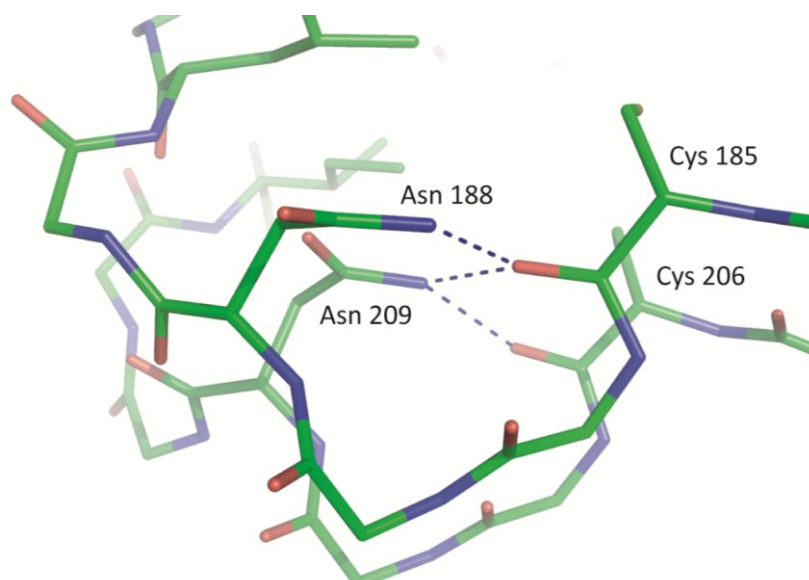


Abb. 1.7 Asparagin-Anordnung im *repeat* 5 und 6. Dargestellt ist das Peptidrückgrat der *repeats* 5 und 6 des Proteins InJ. Hervorgehoben sind die Seitenketten der Asparagine N188 und N209 bzw. der Cysteine C185, C206, sowie die Wasserstoffverbrückung durch gestrichelte Linien zwischen dem Stickstoff des Asparagins und der Carbonylgruppe des Cysteins.

1.3 *Listeria monocytogenes*

Listerien sind weitverbreitete, ubiquitär vorkommende Organismen. Sie gehören zu den Gram-positiven, nicht-sporulierenden, fakultativ anaeroben Bakterien. *L. monocytogenes* gehört nach dem „Bergey's Manual of Systematic Bacteriology“ (Vos *et al.*, 2009) taxonomisch zu dem Stamm *Firmicutes*, Klasse der *Bacilli*, Ordnung der *Bacillales* der Familie *Listeriaceae* und letztendlich zur Gattung der *Listeria*.

Zu der Gattung *Listeria* gehören insgesamt acht Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und die 2009 zuletzt entdeckten *L. rocourtaie* und *L. marthii* (den Bakker *et al.*, 2010). Pathogen sind lediglich die zwei *Listeria*-Arten *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, wobei erstere hauptsächlich humanpathogen und letztere überwiegend tierpathogen ist.

L. monocytogenes toleriert ein breites Temperaturspektrum (1-45 °C) (Junttila *et al.*, 1988), niedrigen pH (Parish & Higgins, 1989), hohe NaCl-Konzentrationen (McClure *et al.*, 1997) sowie NaNO₂-Konzentrationen bis 200 mg l⁻¹ (Junttila *et al.*, 1989). Diese hohe Widerstandsfähigkeit ermöglicht eine effektive Verbreitung dieses Bakteriums und damit eine hohe Kontaminationsgefahr. Zusammen mit der wachsenden Beliebtheit von verarbeiteten Lebensmitteln und Fertigprodukten, die lange gelagert werden, ergibt sich ein hohes Risiko mit diesem Krankheitserreger in Kontakt zu kommen (EFSA, 2008; Heaton & Jones, 2008; Meyer *et al.*, 2012).

Angesichts des hohen Kontaminationsrisikos stellt sich die Frage nach der Pathogenität des Bakteriums. *L. monocytogenes* gehören zu den gastrointestinal aufgenommenen Erregern (Pentecost *et al.*, 2010). Bei gesunden, immunkompetenten Personen äußert sich eine Infektion meist mit einer leichten Gastroenteritis (Hof, 2001). Bei immunsuppressiven Personen kann eine Infektion dagegen zu Enzephalitis, Meningitis oder Listeriose führen. Zur Risikogruppe gehören Schwangere, Säuglinge, Krebs- und AIDS-Erkrankte. Die größte Gefahr dieses Bakteriums geht von dessen Fähigkeit aus, zwei wichtige Barrieren des menschlichen Körpers überwinden zu können. Da die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta-Schranke keine Hindernisse darstellen, führt dies zu einer Gefährdung des Fötus, aber auch zu einer systemisch-septischen Infektion und letztendlich zum Tode (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Die Infektion wird durch Invasionsproteine ermöglicht, durch die die Phagozytose in die Makrophagen, die Darmepithelzellen sowie viele andere Gewebe und Organe provoziert wird (Cossart, 2011; Ireton, 2007). Das intrazelluläre Vorkommen und die Verbreitungsmechanismen stellen ein erfolgreiches Konzept dar und schützen den Erreger vor der Immunantwort des Wirts. Die Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* wurden umfangreich untersucht, viele von ihnen gehören zu der Proteinfamilie der Internaline (Bierne & Cossart, 2007; Camejo *et al.*, 2011).

1.3.1 Export und Verankerung der Oberflächenproteine bei Listerien

Listerien besitzen eine beachtliche Menge an Zelloberflächenproteinen, mit deren Hilfe die Interaktion der Bakterien mit der Umwelt erfolgt. Viele der Oberflächenproteine sind virulenzassoziiert. Eine Grundvoraussetzung für die Translokation dieser Proteine über die Zellmembran ist das N-terminale Signalpeptid. Zusätzlich wird C-terminal ein Signalpeptid zum Verankern des Proteins an der Zelloberfläche benötigt (Abb. 1.9). *L. monocytogenes* besitzt sieben unterschiedliche Protein-Exportsysteme (Desvaux & Hébraud, 2006). Allerdings wurden alle zellwandassoziierten Proteine wie z.B. die LPxTG-Motiv tragenden Proteine bis jetzt dem Sec-Translokon zugesprochen (Desvaux *et al.*, 2010). Unter diesen ist InI als Substrat für Sec identifiziert worden (Desvaux & Hébraud, 2006).

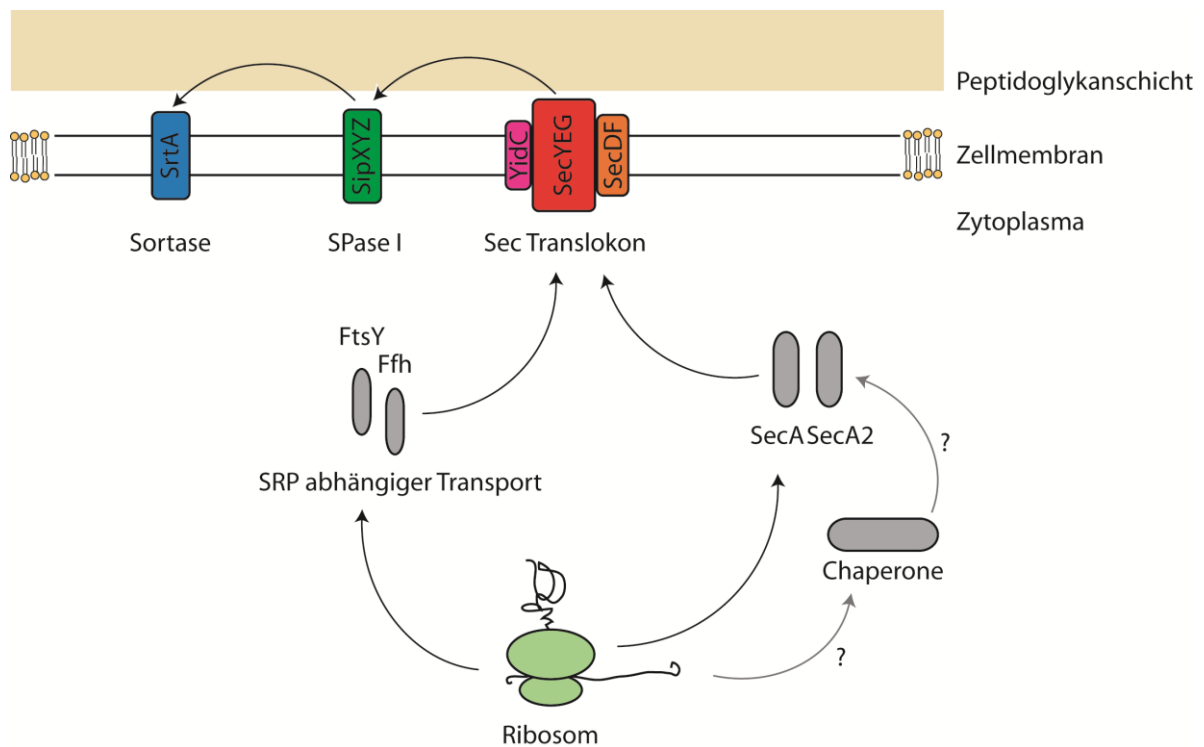


Abb. 1.8 Übersicht über das Zusammenspiel der am Export beteiligten Proteine. Das Signalpeptid des entstehenden Proteins wird erkannt und je nach Sequenz durch Interaktion mit SecA/A2 oder SRP (*signal recognition particle*) aber auch möglicherweise mittels Chaperonen zum Sec-Translokon eskortiert. Am Sec-Homotrimer findet die Translokation über die Membran statt. Anschließend wird durch die SPasen SipX,Y,Z das Signalpeptid entfernt, und nachfolgend wird das mit dem *sorting signal LPxTG* markierte Protein kovalent in der Peptidoglykanschicht verankert. (modifiziert nach (Desvaux & Hébraud, 2006))

Der heterotrimeren SecYEG-Komplex bildet einen Kanal durch die Membran und die Zellwand (Abb. 1.8). Dieser Kanal erlaubt nur die Translokation von ungefalteten Substraten. Dementsprechend wird das Protein entweder durch Chaperone translokationskompetent gehalten, oder das Ribosom samt dem naszierenden Polypeptid wird durch das SRP (*signal recognition particle*) zum Translokon

geleitet (du Plessis *et al.*, 2011). Erst nach Translokation wird das N-terminale Signalpeptid durch die SPase I entfernt.

Neunzehn der bekannten Internaline besitzen C-terminal ein sogenanntes *LPxTG sorting signal*, sowie nachfolgend eine vorrangig hydrophobe Region von ca. 20 AS und einen positiv-geladenen C-Terminus. Über dieses Motiv erkennt das Enzym Sortase A (SrtA) ihr Substrat (Abb. 1.8) (Navarre & Schneewind, 1999; Schneewind *et al.*, 1992), spaltet es zwischen Threonin und Glycin und verankert es schließlich kovalent in der Peptidoglykanschicht (Dhar *et al.*, 2000). Diesem Mechanismus kommt eine essentielle Bedeutung zu, denn fehlt SrtA, ist die Virulenz drastisch reduziert (Bierne *et al.*, 2002).

Eine nicht-kovalente Verankerung an der Bakterienoberfläche ist ebenfalls möglich. Die Assoziation mit der Zellwand ist über die sogenannten GW- oder WxL-Domänen möglich (Cabanès *et al.*, 2002). Die Funktion der GW-Domäne ist am Beispiel von InIB gut untersucht worden (Jonquière *et al.*, 1999). Einige Internaline, unter anderem InIC, werden sekretiert.

1.3.2 Die Internalin Proteinfamilie

Eine spezielle Klasse der Invasionsproteine der Listerien sind Internaline. Diese sind durch das Vorhandensein der Leucinreichen-Wiederholungseinheiten (LRR, siehe Kap. 1.2.1) charakterisiert. Die Zahl der putativen Internalingene variiert unter den Stämmen von *L. monocytogenes* zwischen 18 und 28. Tendenziell besitzen nicht-pathogene *Listeria*-Stämme weniger Internalingene im Vergleich zu *L. monocytogenes* (den Bakker *et al.*, 2010). Die Mitglieder der Internalinproteinfamilie haben alle einen ähnlichen modularen Aufbau. Die N-terminale Internalin-Superdomäne besteht aus dem α -helikalen Cap und der LRR-Domäne (Schubert *et al.*, 2001). Bei zumindest 11 Internalinen gehört ebenfalls eine Ig-ähnliche *inter-repeat* (IR) Domäne dazu (Abb. 1.9).

Das LRR-Motiv ist wie bereits beschrieben (Kap. 1.2.1) optimal für Protein-Protein-Interaktionen geeignet. Die Anzahl der LRR-Einheiten variiert stark von 3 bis 28 (Bierne *et al.*, 2007). Das längste Internalin ist das InII. Die LRR-Domäne dieses Proteins besteht aus 28 Wiederholungseinheiten, wobei diese Cysteine beinhalten. Die Anordnung der repetitiven Einheiten ergibt eine rechtsgängige Superhelix, die an eine β -Helix erinnert (Kap. 1.2). Die typische LRR-Einheit der Internaline besteht aus 22 Aminosäuren (Kap.1.2.1).

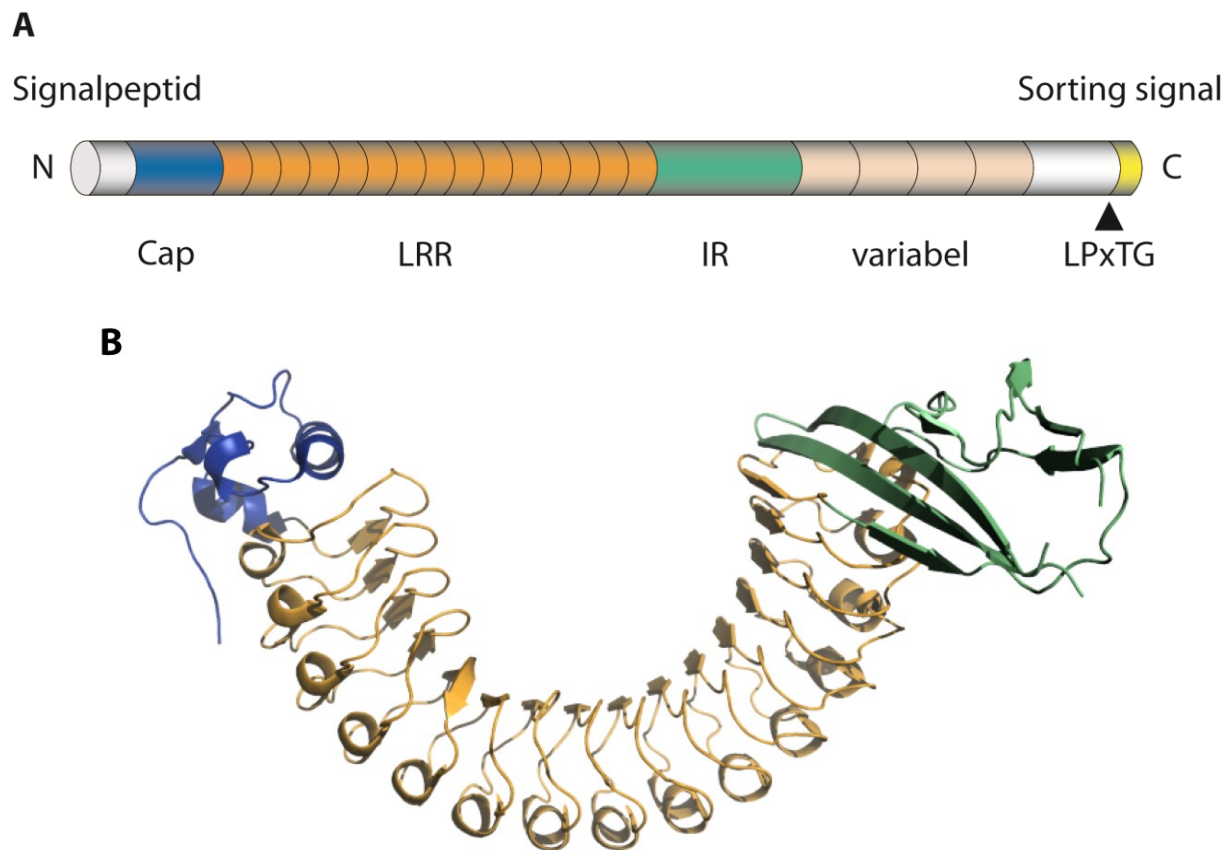


Abb. 1.9 Domänenstruktur der Internaline. **(A)** Schematische Domänenorganisation eines typischen Internalins: N-terminales Signalpeptid, α -helikale *Cap*-Domäne, (LRR) leucinreiche Wiederholungseinheit, (IR) *Ig-like inter-repeat*-Domäne, variabler Bereich mit (z.B. *B-repeats* bei InIA, *PKD-repeats* bei InII, *MucBP-repeats* bei InI usw.) (siehe Bierne *et al.*, 2007), nachfolgend Zellwandanker und *LPxTG*-Motiv. **(B)** Domänenorganisation der Internalindomäne am Beispiel der Struktur von InIA (1O6T; Schubert *et al.*, 2002). Die Domänen sind mit A übereinstimmend eingefärbt. Die Sekundärstrukturelemente sind in der *cartoon*-Darstellung abgebildet.

Einige Internaline der *L. monocytogenes* wurden bereits umfangreich untersucht. Mittlerweile sind zu 9 Internalinen strukturelle Daten vorhanden (Tab. 1.1) und von 6 Internalinen ist die Funktion bekannt. Es liegen Röntgenkristallstrukturen zu InIA (Schubert *et al.*, 2002), InIB (Marino *et al.*, 1999), InIC (Ooi *et al.*, 2006), InIE (Schubert & Heinz, 2003) InIG (Bublitz, 2007), InIH (Schubert *et al.*, 2001), InIJ (Bublitz *et al.*, 2008) vor. Seit kurzem sind auch Daten zu InIF (4FMZ) und InIC2 (4FHO) in der Proteindatenbank hinterlegt, allerdings ohne eine zugehörige Publikation.

Die Wirkungsweise der Internaline InIA und InIB ist bereits aufgeklärt. Sowohl InIA als auch InIB sind essentielle Invasionsproteine (Dramsi *et al.*, 1995; Gaillard *et al.*, 1991). InIB besitzt außerdem eine Signalfunktion (Bierne & Cossart, 2002). Von beiden Proteinen sind Kristallstrukturen samt Interaktionspartner verfügbar (Niemann *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2002). InIA interagiert mit humanem E-Cadherin und InIB mit dem Rezeptor Tyrosin-Kinase c-Met. Vier andere Internaline, die

mit dem Invasionsprozess verknüpft sind, auch wenn diese nicht direkt als Invasionsproteine wirken, sind InIC, InIH, InIJ und InIK (Wirkungsweise siehe Übersichtsartikel (Cossart, 2011)).

Tab. 1.1 Die zur Verfügung stehenden Röntgenkristallstrukturen von Internalinen (Stand März 2013) mit der Übersicht über die Anzahl der LRR und die durchschnittliche Länge der *repeats*. Von InIA und InIB sind jeweils nur die ersten Veröffentlichungen mit PDB-Code vertreten.

Protein	LRR-Anzahl	Konsensus-sequenz	PDB ID	Literatur
InIA	15	22	1O6S, 1O6T, 1O6V	(Schubert <i>et al.</i> , 2002)
InIB	7	22	1DOB	(Marino <i>et al.</i> , 1999)
InIC	6	22	1XEU	(Ooi <i>et al.</i> , 2006)
InIC2	8	22	4FHO	-
InIE	9	22	-	(Schubert & Heinz, 2003)
InIG	5	22	-	(Bublitz, 2007)
InIH	8	22	1H6U	(Schubert <i>et al.</i> , 2001)
InIF	13	22	4FMZ	-
InIJ	15	21	3BZ5	(Bublitz <i>et al.</i> , 2008)

1.3.3 Internalin J

InIJ gehört zu der vorher beschriebenen Proteinfamilie der Internaline. Vergleichende Genomstudien offenbarten, dass InIJ nur in pathogenen *L. monocytogenes* Stämmen vorkommt (den Bakker *et al.*, 2010). Überraschenderweise gelingt der Umkehrschluss, dass alle pathogenen *Listeria*-Arten InIJ im Genom verschlüsseln, nicht. InIJ ist z.B. nicht in *L. ivanovii* zu finden, obwohl es sich hierbei um einen pathogenen Erreger handelt. Möglicherweise handelt es sich bei InIJ um einen der Faktoren, die die Artspezifität des pathogenen Erregers bestimmen. Auch experimentelle Studien zeigen, dass InIJ ein virulenzassoziiertes Protein darstellt. Im Mausmodell weist die InIJ-Deletionsmutante 72 h nach Infektion eine deutlich verminderte Bakterienbelastung in der Leber, Bauchspeicheldrüse und Mesenteriallymphknoten auf (Sabet *et al.*, 2005, 2008). Der Zusammenhang mit der Virulenz wird ebenfalls durch weitere Indizien unterstützt. Beispielsweise wurde in einer Veröffentlichung über die gemeinsame Anreicherung von InIJ mit dem Hauptinvasionsprotein InIA an den Polen der Bakterienzellen berichtet (Bruck *et al.*, 2011).

Bisher konnte noch kein spezifischer Interaktionspartner für InIJ ermittelt werden. Allerdings konnte bereits eine Interaktion von InIJ mit humanem MUC2 nachgewiesen werden (Lindén *et al.*, 2008). MUC2 ist ein Glykoprotein und ein Hauptbestandteil der Mukusschicht, die den Gastrointestinaltrakt auskleidet. Allerdings scheint diese Interaktion, lediglich auf dem LRR-Strukturmotiv zu beruhen. Die Interaktion bewirkt eine Adhäsion und somit verminderte Ausscheidung des Pathogens. Interessanterweise wurde für ein Homolog von InIJ von *Porphyromonas gingivalis* eine Rolle bei der Biofilmbildung nachgewiesen (Capestany *et al.*, 2006). Das homologe Protein InII wurde bis jetzt nur in den *Listeria*-Stämmen identifiziert, die ebenfalls InIJ kodieren. Im Gegensatz zu InIJ zeigt die InII-Deletionsmutante aber keine verminderte Virulenz (Sabet *et al.*, 2005).

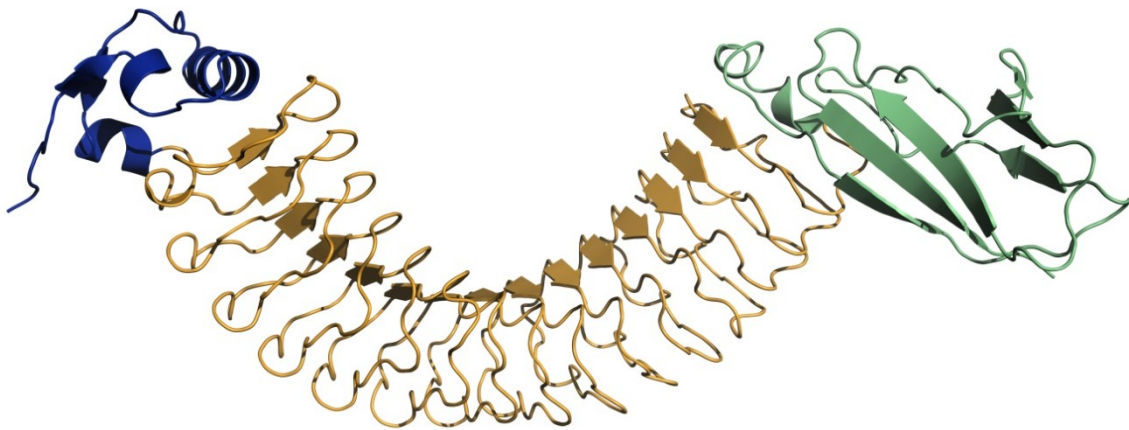


Abb. 1.10 Röntgenkristallstruktur des InIJ (3BZ5; Bublitz *et al.*, 2008). Das Protein wurde farblich in drei Domänen unterteilt, α -helikale *Cap*-Domäne (blau), (LRR) leucinreiche Wiederholungseinheit (gelb), (IR) *Ig-like inter-repeat*-Domäne (grün). Die Sekundärstrukturelemente sind als *cartoon* dargestellt.

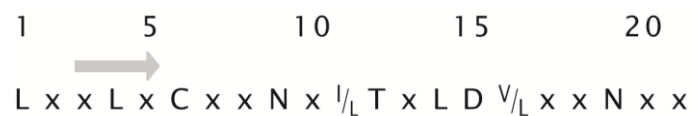


Abb. 1.11 Konsensussequenz des LRR-Motivs von InIJ. Konservierte Aminosäuren sind durch die Buchstaben gekennzeichnet. „x“ markiert Positionen, die keine präferentielle Besetzung zeigen. Der graue Pfeil markiert die β -Strangregion.

Durch die typische Domänenanordnung ergibt sich auch für InIJ eine elongierte, solenoide Struktur (Abb. 1.10). Dem N-terminalen *Cap* folgen 15 LRR-Einheiten und die IR-Domäne. C-terminal von der Internalindomäne, und nicht in der Kristallstruktur erfasst, folgen vier *MucBP-repeats* (*mucine binding protein*) und das *LPKTG*-Motiv. Außergewöhnlich ist die LRR-Konsensussequenz dieses Internalins. Üblicherweise ist eine Wiederholungseinheit der Internaline 22 Aminosäuren lang. Die Konsensussequenz des InIJ-LRR besteht stattdessen aus 21 Aminosäuren (Abb. 1.12 A).

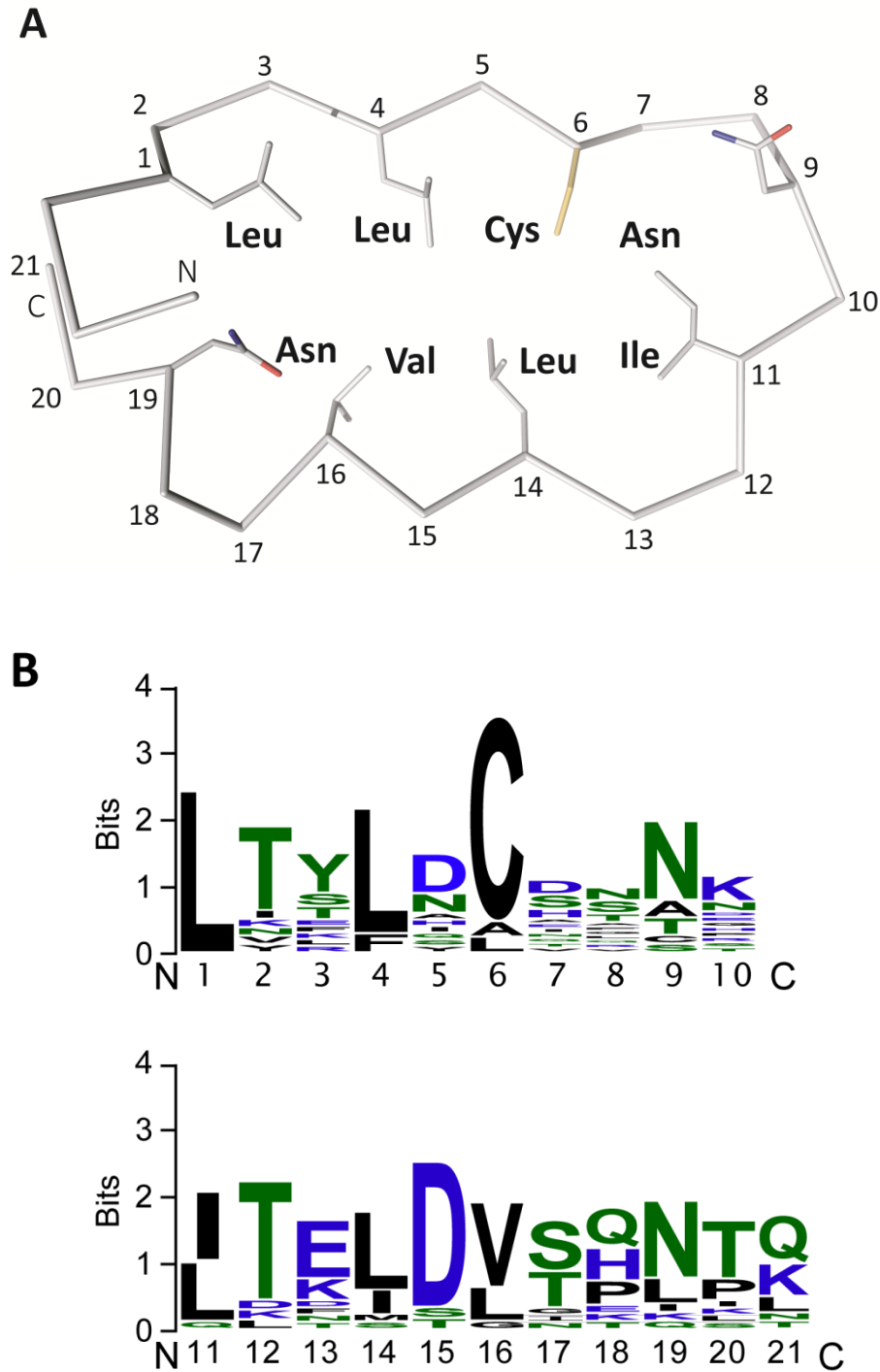


Abb. 1.12 Die leucinreichen Wiederholungseinheiten von InIJ (A) Der *repeat 6* ist im Querschnitt dargestellt und die nach innen gerichteten, konservierten Aminosäuren als *stick*. **(B)** Ergebnis des Sequenzalignments aller 15 InIJ-LRR als Logo-Darstellung abgebildet. Die farbliche Gestaltung richtet sich nach der Hydrophobizität. Hydrophobe AS sind schwarz, hydrophile AS grün und geladene AS blau eingefärbt worden. Die Konsensussequenz ist mithilfe des multiplen Alignments des Programms „Unipro Ugene“ (Okonechnikov *et al.*, 2012) erhalten worden. Die Darstellung wurde mit der *web*-basierten Anwendung „Seq2Logo“ erzeugt (Thomsen & Nielsen, 2012).

Die hochkonservierte β -Strangregion weicht von der üblicherweise aus 11 Aminosäuren bestehenden Sequenz (**LxxLxLxxNxL**) ab, wobei „L“ für Leu, Ile, oder Val, „N“ für Asn und „x“ für eine beliebige Aminosäure steht (Abb. 1.11). Das Leucin an der Position 6 ist durch ein innerhalb von InI konserviertes Cystein ersetzt. Dies ist verwunderlich, da die ersten sechs Aminosäuren der Konsensussequenz **LxxLxL** als notwendig und ausreichend erachtet wurden, um die typische hufeisenförmige Struktur der LRR-Proteine zu erhalten (Kajava & Kobe, 2002). Durch die regelmäßige Anordnung der Windungen ergibt sich eine ausgedehnte Cysteinleiter im Proteinkern (Abb. 1.13). Hoch-konservierte Bereiche erfüllen oft unabdingbare Funktionen, damit stellt sich die bedeutsame Frage nach der Rolle der Cysteine.



Abb. 1.13 Das hochgeordnete Arrangement der Cysteine in InI. Der dargestellte Ausschnitt erfasst die Windungen 2 bis 7. Das Proteinrückgrat ist als *cartoon*-Darstellung abgebildet und die Cysteine als *sticks* (rot).

1.3.4 *L. monocytogenes* und extrazelluläre Cysteine

Es ist bekannt, dass per Disulfidbindungen verknüpfte Cysteine einen erheblichen Beitrag zur Proteinestabilität in einer oxidierenden Umgebung liefern. Einige prominente Beispiele dafür sind Antikörper oder das Insulin. Vor allem extrazelluläre Proteine werden durch die zusätzliche, kovalente Bindung stabilisiert. Die allgemeine Tendenz zur Disulfidbildung bei extrazellulären Proteinen wurde in einigen bioinformatischen Studien nachgewiesen und äußert sich in ganzzahligen Vorkommen von Cysteinen (Dutton *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 1999). Ausnahmen davon bilden extrazelluläre Proteine von einigen aeroben, grampositiven Organismen (Daniels *et al.*, 2010).

Bakterien des Stammes *Firmicutes* tendieren dazu, die Cysteinmenge extrazellulär soweit wie möglich zu minimieren. Diese Strategie ermöglicht erfolgreich das Wachstum unter wechselnden und auch reduzierenden Bedingungen (Daniels *et al.*, 2010). Interessanterweise ist die Tendenz zur Exklusion nicht nur bei extrazellulären, sondern auch bei cytosolischen Proteinen erkennbar. Alle drei getesteten *Listeria*-Arten, (*L. monocytogenes*, *L. innocua* und *L. welshimeri*) zählten zu dem Cystein-ausschließenden Typ. Möglicherweise ist dies eine evolutionäre Entwicklung, die auf den oxidativen Druck zurückgeht.

Es wurde bereits früh festgestellt, dass Cystein sowie Methionin für *L. monocytogenes* essentiell sind (Premaratne *et al.*, 1991; Tsai & Hodgson, 2003). Neuere Studien zeigen, dass der Oligopeptid-transporter Lmo0135-0137, der mit dem Cysteintransport assoziiert ist, eine wichtige Rolle bei der Replikation und der Virulenz des Bakteriums spielt. Die Deletionsmutante zeigte eine deutlich verminderte Bakterienbelastung in Leber und Bauchspeicheldrüse von infizierten BALB/c-Mäusen (Schauer *et al.*, 2010).

Damit sind Cysteine in extrazellulären Proteinen für fakultative Anaerobier wie *L. monocytogenes* riskant und aus metabolischen Aspekten sehr teuer.

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

Verglichen mit globulären Proteinen ist die Stabilität von *repeat*-Proteinen, insbesondere von LRR-Proteinen, ein vernachlässigtes Forschungsgebiet. Dabei eignen sich Solenoidproteine auf eine besondere Weise zur Untersuchung von Faltungsprinzipien. Durch die superhelikale Anordnung sind die langreichenden Interaktionen weitgehend eliminiert. Die kurzreichenden Wechselwirkungen dominieren das Faltungsgeschehen. Durch die vereinfachte Sequenz-Struktur-Funktions-Beziehung bieten sich Solenoide als Modellproteine für Faltungsstudien an. Damit ist die Hoffnung verbunden, auf grundlegende Faltungsprinzipien zu stoßen, die auch für globuläre Proteine gültig sind.

InIJ aus dem Bakterium *L. monocytogenes* stellt ein attraktives Modellprotein dar. Das LRR-Protein zeichnet sich durch eine sehr hohe Regelmäßigkeit, eine kurze Wiederholungseinheit von 21 AS sowie einem Stapel von Cysteinen aus (Abb. 1.13) (Kap. 1.3.3). Das außergewöhnliche Arrangement der Cysteine in einem ausgedehnten Stapel eignet sich hervorragend zur Untersuchung der Rolle von Cysteinen bei der Proteinfaltung.

Die Fragestellung ergibt sich aus der Annahme, dass dieser Cysteinestapel funktional sein muss, denn reduzierte Cysteine sind für ein extrazelluläres Protein nicht unbedenklich. Wie bereits im Kap. 1.3.4 erläutert, werden Cysteine in *L. monocytogenes* bevorzugt vermieden und sind metabolisch sehr wertvoll. Extrazelluläre, Cystein-haltige Proteine, wie z.B. Sortasen oder Lipoproteine, besitzen diese aus funktional unabdingbaren Gründen. Die Cysteine wären, ohne diese essentielle Rolle, durch Selektionsdruck bereits verdrängt worden.

In dieser Arbeit sollten die thermodynamische Stabilität und die kinetischen Parameter der InIJ-Faltung in Ensemble-Experimenten bestimmt werden. Eine grundlegende und ausführliche Charakterisierung des Wildtypproteins InIJ sollte die Grundlage für weitergehende Untersuchungen legen. Dabei sollten durch gerichtete Mutagenese die Cysteine gegen Alanin substituiert werden. Die damit herbeigeführten Veränderungen in der Stabilität und Faltung sollten beobachtet und analysiert werden. Mit Hilfe dieser Perturbationen lassen sich einerseits Aussagen über den Stabilisierungsbeitrag der Cysteine treffen, andererseits lässt sich damit die Struktur des Übergangszustands näher definieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar, Trypton, Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Coomassie-Brilliant-Blue G-250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide	GE Healthcare, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
GdmCl (<i>ultra pure</i>)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Hellmanex	Hellma, Müllheim
TCEP	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Tris HCl	USB Corporation, Cleveland, USA

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

2.1.2 Enzyme

<i>mAb</i> Anti-GST-Maus IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<i>pAb</i> Anti-Maus-AP IgG	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Alkalische Phosphatase	Roboklon GmbH, Berlin

Dnase I	Serva, Heidelberg
<i>Pfu</i> -Polymerase	Roboklon GmbH, Berlin
<i>Taq</i> -Polymerase	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

His₆-TEV-Protease wurde zur eigenen Verwendung rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Das Plasmid pET9d samt Konstrukt wurde uns freundlicherweise von Gunter Stier zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Standardmarker und Kits

DNA-Molekulargewichtsmarker	New England Biolabs, Schwalbach
Protein-Molekulargewichtsmarker	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.1.4 Bakterien

<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Genotyp: F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> Novagene (Merck, Darmstadt)
<i>E. coli</i> XL1-blue	Genotyp: <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI</i> _q <i>ΔM15 Tn10</i> (Tet _r)], Stratagene (La Jolla, USA)

2.1.5 Puffer und Nährmedien

Tab. 2.1 Nährmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.0
LB-Agar	LB-Medium mit 2 % (w/v) Agar
SOB-Medium	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.6 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, pH 7.0
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM Glukose, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
Selbstinduktionsmedium	
ZYM-5250	nach (Studier, 2005)

Tab. 2.2 Pufferlösungen

Puffer	Anwendung	Zusammensetzung
Standard-Nativpuffer	Probenpuffer	50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7.0
Standard-Denaturierungspuffer	Entfaltung	8 M GdmCl, 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 7.0
PBS-Puffer	Zellyse	140 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
TEV-Puffer	Tag-Entfernung	50 mM Tris/HCl, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8.0
6 x DNA-Auftragspuffer	Agarose-Gelelektrophorese	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 15 % (w/v) Ficoll Typ 400, 20 mM EDTA
TAE-Puffer	Elektrophorese	40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
SDS-Ladepuffer	SDS-PAGE	163 mM Tris/HCl, 5 % (w/v) SDS, 250 mg/ml Glycerin, 0.25 mg/ml Bromphenolblau, pH 6.8
10x SDS-Laufpuffer	SDS-PAGE	0.25 M Tris/HCl, 1.92 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8.8
2x SDS-Sammelgelpuffer	SDS-PAGE	0.25 M Tris/HCl, 0.4 % (w/v) SDS, pH 6.8
4x SDS-Trenngelpuffer	SDS-PAGE	1.5 M Tris/HCl, 0.8 % (w/v) SDS, pH 8.8
Fixierlösung	Coomassie-Färbung	50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Färbung	10 % (v/v) Essigsäure, 0.03 % (w/v) Brilliant-Blue G-250
Coomassie-Entfärber	Coomassie-Färbung	10 % (v/v) Essigsäure
Entwickler	Silberfärbung	5 g Na ₂ CO ₃ , 80 µl Formaldehyd, 200 ml H ₂ O
Färbelösung	Silberfärbung	0.5 ml 29 % (w/v) AgNO ₃ , 25 µl 37 % (v/v) Formaldehyd, 100 ml H ₂ O
Fixierlösung 1	Silberfärbung	30 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierlösung 2	Silberfärbung	kurz vor Gebrauch 2 ml 25 % (v/v) Glutaraldehyd, 100 mg Na ₂ S ₂ O ₃ in 100 ml 0.4 M NaAcetat, 0.5 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol lösen
Stopp-Lösung	Silberfärbung	50 mM EDTA, pH 8.0
Transferpuffer	Western-Blot	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol
Blocking-Puffer	Western-Blot	3 % (w/v) BSA in PBS-Puffer
Ponceau-Rot-Lösung	Western-Blot	6 mM Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure
NBT	Western-Blot	50 mg/ml in 70 % (v/v) Dimethylformamid
BCIP	Western-Blot	50 mg/ml in Dimethylformamid

2.1.6 Oligonukleotide

Tab. 2.3 Klonierungsprimer. Die Großbuchstaben markieren die dem Plasmid komplementäre Basensequenz. Die Restriktionsstellen für *NcoI* und *EcoRI* wurden unterstrichen.

Name	Sequenz (5'-3')	Länge (bp)	T _m (°C)
53-508 for	caatg <u>accatggcc</u> ACACTCAAAGCCGGTCAAACAC	36	78
53-508 rev	gctc <u>gaattCGGATCACTTTATGGGTTGAGGTGCTTC</u>	37	78

Tab. 2.4 Mutageneseprimer. Die zur ortsgerichteten Mutagenese ausgetauschten Basen sind durch Großbuchstaben hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'-3')	Länge (bp)	T _m (°C)
C100A for	gctactctaacaagtctagatGCc <u>c</u> ataattcatccataaccg	43	78
C100A rev	cggttatggatgaattatggGCatctagactgttagagtagc	43	78
C122A for	ctggtttaacaaaattaattGCcacaagtaacaacattaccacccttg	48	77
C122A rev	tcaagggtggtaatgtgttactgtgGC <u>a</u> attaatttgttaaaccag	48	77
C143A for	caaacactaatttaacttatctggcGCt <u>g</u> attcaataaacttacaaccttg	55	77
C143A rev	caaggttgaagtttattgaatcaGCtgcagataagttaaattagtgtttg	55	77
C164A for	ccgcttacaaaattaacctacttaaatGCc <u>g</u> acacgaacaaactc	45	79
C164A rev	gagtttgttcgtgtcgcGCatttaagtaggttaatttgaagcgg	45	79
C185A for	ccactgttaacttattaaacGCcgcgcgcaacaccttaaccg	43	81
C185A rev	cggttaaggtgttcgcgcgcGCtttaataagttaacagtgg	43	81
C206A for	gccacaatacacaattaaccgagctagacGCcatttaataaaaaaatcacc	53	80
C206A rev	ggtgattttttatttaaatggGCgtctagctcggttaattgtgtattgtggc	53	80
C206S for	gccacaatacacaattaaccgagctagacAGcatttaataaaaaaatcacc	53	80
C206S rev	ggtgattttttatttaaatggCTgtctagctcggttaattgtgtattgtggc	53	80
C228A for	ctcaattaacaaccttagacGCtagctttaataaaaactg	42	73
C228A rev	cagttatttattaagctaGCgtctaggttgaattgag	42	73
C249A for	ctgaaccgtctaaacGCcgcactaataatataactaaactggacc	46	80
C249A rev	ggtccagtttagttatattattagtgctgGCtttagacggttcag	46	80
C270A for	cagctaacttcctagatGCctccagtaacaaattaaccgaaatag	46	79
C270A rev	ctatttcggttaattgttactggagGCatctaggaaagttagctg	46	79
C291A for	ccgcttacacagttaacatattttgatGCtagcgtaaatcctttaac	47	78
C291A rev	gttaaaggatttacgctaGCatcaaaatagttaactgtgtaagcgg	47	78
C312A for	cgctttcaaaaattaactacactacatGCtatacaaacagatttattagaatagacc	57	78
C312A rev	ggtctatttctaataaatctgtttgtataGCatgtagttagttaatttgaagcg	57	78
C355A for	cgcataatacacaattatatttagacGCc <u>a</u> agccgctgg	43	78
C355A rev	ccagcggcttggGCgtctaaataatataattgtgtattatgctg	43	78
W65F for	cacaaagttaacgactTTtttctgatgacaattttg	39	72
W65F rev	caaaattgtcatcagggaaaAAagtcgttaaaactttgtg	39	72
W472F for	gcaacaaatacaataactTTgaaatctcagcacagac	39	73
W472F rev	gtccgtgctgagattttcAAagttattgtattgttgc	39	73

Als Sequenzierprimer wurden die Standardprimer T7 prom, T7 term sowie der pGEX5-Primer von GATC Biotech AG (Konstanz) verwendet.

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiematerial:

Glutathionsepharose 4 B	GE Healthcare, München
Superdex 75 <i>prep grade</i>	GE Healthcare, München

Einmalküvetten:

UVette®	Eppendorf, Hamburg
PMMA-Makro-Küvetten	Brand, Wertheim

Millipore-Zentrifugalkonzentratoren	Millipore, Schwalbach
Protein LoBind Tubes (1.5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Siliconkautschuk (Scrintec® 600)	Scrint GmbH, Friedrichsdorf
Verschlussdeckel für Einmalküvetten	Roth, Karlsruhe

2.1.8 Geräte

Absorptionsspektrometer:	Varian Cary 50 Probe (Agilent, Böblingen) ChemStation Diodenarray-Photometer Typ: 89090A (Agilent, Böblingen)
CD-Spektrometer:	J-715 mit Peltier-Temperierung (Jasco GmbH, Groß-Umstadt) J-815 mit Peltier-Temperierung
Fluoreszenzspektrometer:	Spex Fluorolog®-3 mit Peltier-Temperierung (LFI-3751) (Horiba Scientific, Unterhaching)
<i>stopped-flow</i> -Apparatur	SX.18MV Spektrofluorimeter (Applied Photophysics, Leatherheads, UK)
Chromatographieanlagen:	ÄKTA FPLC, ÄKTA prime, ÄKTA Purifier (GE Healthcare, München) Uvicord SII, Peristaltikpumpe P1, Fraktionssammler RediFrac, Rec 102 Schreiber (ehem. Pharmacia LKB)

Elektrophoresegeräte	Mighty Small SE250 (Hoefer, Holliston, USA) Agargel Mini (Biometra, Göttingen)
Blotting System	Fast Blot B33 (Biometra, Göttingen)
Brutschränke:	Innova 2300 Platform Shaker, Inova 42 (New Brunswick Scientific, Enfield, USA)
French-Press	20K und 40K Zellen (SLM Aminco)
Geldokumentation:	Image-Scanner III (GE Healthcare, München)
PCR-Gerät	TGradient Thermocycler (Biometra, Göttingen)
pH-Meter	pH 979 (WTW, Weilheim)
pH-Glaselektrode	BlueLine 18 pH (Shott, Mainz)
Refraktometer	Abbé-Reftaktometer (Zeiss, Jena)
Thermoschüttler	Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg)
Waagen	Feinwaage 434 (Kern, Balingen) Analysenwaage B 120 S (Sartorius, Göttingen)
Thermostaten	Thermoschränke (Heraeus, Hanau) Wasserbäder (Huber, Offenburg)
Zentrifugen	Discovery M150 SE Ultrazentrifuge (Sorvall) RC-26 Plus (Sorvall) MR22i (Jouan, Winchester, USA) Biofuge Fresco (Heraeus, Hanau) Biofuge Pico (Heraeus, Hanau)

2.1.9 Software

BioEdit	Ibis Biosciences (USA)
IgorPro v6.0	WaveMetrics (Portland, USA)
PyMol v0.99 rc6	DeLano Scientific LLC (San Francisco, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikro- und Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkultivierung auf Agar-Platten

Zur *E. coli*-Anzucht wurden Agarplatten als Nährböden verwendet. Hergestellt wurden diese durch Auflösen von 15 g Agar in 1 l LB-Medium. Die Lösung wurde nachfolgend für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C bleibt die Lösung flüssig und kann auf Petrischalen verteilt werden. Vor dem Verteilen des Agarmediums wurde gegebenenfalls das Antibiotikum zugesetzt. Zum Ausbringen der Bakterien, wurden entweder eine Impföse, oder ein Drigalskispatel eingesetzt.

2.2.1.2 Bakterienanzucht in Flüssigkultur und Lagerung

Zur Plasmidextraktion wurden die Bakterien im LB-Medium angezogen. Den Medien wurde stets Antibiotika (Kanamycin, 30 µg ml⁻¹) zur Selektion zugesetzt. Nach dem Animpfen der Kulturen erfolgte die Anzucht unter aeroben Bedingungen bei Schüttelgeschwindigkeiten von 150-180 rpm, bei 37 °C üN.

Zur Lagerung wurden 700 µl Bakterienkultur mit 300 µl sterilem 87.5 % (v/v) Glycerin versetzt und bis zur Homogenität gemischt. Die Zellen wurden mind. 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Die chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurden nach der Hitzeschockmethode transformiert, basierend auf der Arbeit von (Hanahan, 1983). Hierzu wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Ein 100 µl Aliquot wurde mit 20-100 ng DNA versetzt und über 30 min auf Eis belassen. Es folgte ein Hitzeschock von 60 s bei 42 °C, danach wurden die Zellen rasch wieder auf Eis transferiert. Nach der 2 min dauernden, Abkühlungsphase wurden die Zellen mit 900 µl vorgewärmten (37 °C) SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nachfolgend wurden die Transformanten auf LB(Kan)-Platten ausgestrichen und üN bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.4 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Vermehrung der rekombinanten DNA wurden Präparationen im kleinen Maßstab durchgeführt. Dazu wurden 5 ml LB-Kultur mit frisch transformierten DH5α-Zellen inokuliert. Die Bakterien wurden

bei 37 °C und 180 rpm üN vermehrt. Nach der Zellernte erfolgte die Plasmidpräparation unter der Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits.

Weiterhin wurde nach den PCR-Reaktionen sowie Restriktionsspaltungen das QIAquick PCR Purification Kit verwendet. Zur Extraktion der DNA nach der agarosegelelektrophoretischen Auftrennung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit benutzt. Die Verwendung der Kits erfolgte stets nach den Herstellerangaben.

Die DNA-Konzentration wurde spektroskopisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt (Kap. 2.2.3.1).

2.2.1.5 Restriktionsverdau unter Verwendung von Endonukleasen

Plasmid-DNA sowie die PCR-Produkte wurden zu Klonierungszwecken mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* behandelt. Die Reaktionsbedingungen sowie die Pufferbedingungen wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Analyse und Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte per Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.1.8).

2.2.1.6 Ligation der DNA-Fragmente

Der linearisierte, dephosphorylierte Vektor und das gewünschte Insert wurden in einem Verhältnis von 1:9 zusammengegeben. Es wurden 100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit der T4 DNA-Ligase und dem mitgelieferten Puffer angesetzt und es wurde die Inkubationszeit von 1 h bei RT eingehalten. Es wurden 1-2 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation eingesetzt.

2.2.1.7 Dephosphorylierung der linearisierten Plasmid-DNA

Das Dephosphorylieren der Plasmid-DNA nach der Restriktion verhindert die Religation des Plasmids ohne das gewünschte Insert. Dazu wurde nach der Hitzeinaktivierung des Restriktionsansatzes das Enzym Alkalische Phosphatase hinzugegeben und nach der Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurde das Enzym ebenfalls hitzeinaktiviert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 62 °C für 20 min.

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse und Auftrennung der DNA-Proben erfolgte unter Verwendung von 1 %igen (w/v) Agarosegelen. Zur Herstellung wurde die Mischung aus Agarose und TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid versetzt und zum Verfestigen in die Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Die Proben wurden mit dem 6x DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Probenaschen gegeben. Die bestmögliche Auftrennung erfolgte

bei 80 V nach ca. 1 h Laufzeit. Anschließend wurden die Ergebnisse durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm visualisiert und dokumentiert.

2.2.1.9 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die Vervielfachung der DNA ist zu Klonierzwecken unerlässlich, dies wurde mit der Polymerase-Kettenreaktion möglich. Plasmid-DNA sowie die Insertfragmente wurden auf diese Art und Weise in ausreichender Menge erhalten. Der Standardansatz enthielt:

Ansatz (40 µl):	DNA- <i>template</i>	10-20 ng	
	Primer- <i>forward</i>	20 pmol	
	Primer- <i>reverse</i>	20 pmol	
	dNTP's	200 µM	
	<i>Pfu</i> Reaktionspuffer (10 x)	4 µl	
	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	2.5 U	
	ddH ₂ O (steril)	auffüllen	
Amplifikationsschritte:	1. Initiale Denaturierung	2 min	95 °C
	2. Annealing	1 min	50 °C
	3. Elongation	1.5 min	72 °C
	4. Denaturierung	1 min	95 °C
	5. Annealing	1 min	55 °C
	6. Elongation	1.5 min	72 °C
	7. Endtemperatur		4 °C

Schritte 1 bis 3 wurden 3-mal wiederholt. Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt. Zur gesamten Plasmidamplifikation wurden die Elongationsschritte auf 6 min verlängert.

2.2.1.10 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Oligonukleotidprimer zur Einführung der ortsspezifischen Mutation wurden unter Beachtung des GC-Gehaltes und der damit verbundenen Schmelztemperatur hergestellt (Primer siehe Kap. 2.1.6.).

Das veränderte Produkt wurde mit Hilfe der PCR-Reaktion (Kap. 2.2.1.9) amplifiziert. Als *template* wird dabei das doppelsträngige DNA-Plasmid benutzt. Die Primer enthalten die gewünschte Mutation. Ausgehend von den Primern wird das gesamte Plasmid amplifiziert. Das DNA-*template* wurde nach der Reaktion mit dem Enzym *DpnI* verdaut. Der Verdau wurde 1 h bei 37 °C durchgeführt.

2.2.1.11 Sequenzierung

Die Ergebnisse der Klonierung sowie der Mutagenesen wurden mittels der DNA-Sequenzierung bestätigt. Die Sequenzieraufträge wurden durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinexpression in E. coli

Nach einer erfolgreichen Transformation wurde die Vorkultur mit einer Kolonie von der Agarplatte angeimpft. Für die Vorkultur wurde das LB-Medium benutzt. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C unter Schütteln. Das Expressionsmedium wurde mit der Vorkultur im Verhältnis von 1:500 inokuliert.

Für die Expression erwies sich das Selbstinduktionsmedium (Studier, 2005) als optimal. Um ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurden für die Expressionskulturen Kolben mit Schikanen benutzt. Die ersten 3 h nach dem Animpfen, bis zur einer OD_{600nm} von ca. 0.6, betrug die Wachstumstemperatur 37 °C. Danach wurde diese auf 23 °C gesenkt, und nach 24 h wurden die Zellen geerntet.

2.2.2.2 Zellernte und -aufschluss

Zur Ernte wurden die Zellen für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20 °C bis zum Zellaufschluss eingelagert.

Zum Zellaufschluss wurden die Zellen aufgetaut und auf Eis im PBS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Bakterien durch den Hochdruckaufschluss. Es wurden zwei Durchläufe in der French-Press-Zelle 40K bei 1250 psi durchgeführt. In dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt von 2 h bei 4 °C und 18000 rpm wurden die löslichen Bestandteile von den unlöslichen getrennt. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine sowie das Zielprotein. Das Pellet wurde verworfen.

2.2.2.3 Proteinreinigung mittels der Affinitätschromatographie sowie Abspaltung des GST-Tags

Internalin J sowie alle hergestellten InIJ-Varianten wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert. Somit konnte der höchst selektive Aufreinigungseffekt der Affinitätschromatographie genutzt werden. Glutathion-S-Transferase (GST) wird häufig als *Tag* verwendet, da eine hohe Affinität zum Substrat Glutathion besteht und dieses, an die Trägermatrix gebunden, in der Aufreinigung verwendet werden kann. In diesem Fall wurde das Glutathion an das Material Sepharose 4B gekoppelt (GE Healthcare).

Zu Beginn wurde das Material mit kaltem PBS-Puffer equilibriert. Der das lösliche Protein enthaltende Überstand des Zelllysats wurde mit dem Material für eine Stunde bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Das GST-getaggte Fusionsprotein sollte nach diesem Schritt an das

Säulenmaterial gebunden haben. Die unspezifisch-interagierenden *E. coli*-Proteine wurden durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Das Waschen erfolgte bis zum Erreichen der Pufferbasislinie. Es wurde die Extinktion bei 280 nm beobachtet.

Der GST-Tag ist zwar hilfreich bei der Aufreinigung, könnte aber auch aufgrund der enormen Größe (25 kDa) die Eigenschaften des Proteins beeinflussen. In der Proteinsequenz des Fusionproteins ist eine TEV-Schnittstelle zwischen dem Internalin und dem GST-Tag eingearbeitet worden. Bei der TEV-Protease handelt es sich um eine hochspezifische Protease. Die Abspaltung des GST-Tags erfolgte direkt auf der Säule. Deswegen wurde erst der Puffer gegen den TEV-Puffer ausgetauscht. Es wurde wieder bis zum Erreichen der Basislinie gewaschen. Zum Starten der Spaltreaktion wurden 500 µg der TEV-Protease zugegeben und über 18 h auf dem Überkoprotator bei 4 °C inkubiert. Die Elution erfolgte durch das Herauswaschen mit dem TEV-Puffer. Somit befindet sich das Zielprotein im Durchfluss und in den ersten Waschfraktionen. Die Beurteilung der Reinheit des Proteins im Eluat erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Das Säulenmaterial wurde nachfolgend entsprechend Herstellerangaben durch Wiederaufbereitungsschritte regeneriert.

2.2.2.4 Größenausschlusschromatographie

Der letzte Reinigungsschritt diente der Abtrennung der eventuell noch vorhandenen Verunreinigungen sowie der TEV-Protease, gleichzeitig wurde der Puffer ausgetauscht. Es wurde die Säule HiLoad Superdex 75 *high prep* 26/60 (GE Healthcare) verwendet. Bis zu 5 ml der hochkonzentrierten Proteinlösung wurden injiziert und bei 1 ml/min Laufgeschwindigkeit im InJ-Puffer laufen gelassen. Nachdem die Reinheit per SDS-PAGE und nachfolgender Silberfärbung überprüft wurde, wurden die InJ-enthaltenden Fraktionen vereinigt, auf ca. 10-15 mg/ml aufkonzentriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80 °C.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Vorhandensein des Proteins sowie die Fortschritte der Reinigung wurden mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese wurde nach (King & Laemmli, 1971) durchgeführt. Die Acrylamidkonzentration betrug in dem Trenngel 10 %, dieses wurde mit dem 5 %igen Sammelgel überschichtet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen 1:1 mit dem SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die aufgetragene Proteinmenge wurde je nach der Färbemethode variiert. Bei einer nachfolgenden Silberfärbung wurden nur jeweils 10-100 ng aufgetragen, bei der Coomassiefärbung hingegen 10-100 µg. Die Fokussierung im Sammelgel wurde bei einer Spannung von 90 mV erzielt und die Trennung im Trenngel bei 125 mV.

2.2.2.6 Färbemethoden

Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung wurde zur Dokumentation der Reinigungsfortschritte durchgeführt. Diese Färbemethode lehnt sich an der von (Schägger & von Jagow, 1987) publizierten an. Die untere Nachweisgrenze liegt bei ca. 0.2 µg Protein.

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine weitaus sensitivere Methode, da die Nachweisgrenze bei ca. 0.1 ng Protein liegt. Die Silberfärbung wurde verwendet um die letztendliche Reinheit zu überprüfen und zu bestimmen. Die Visualisierung der Proteine erfolgte dabei nach der von (Heukeshoven & Dernick, 1985) beschriebenen Methode.

2.2.2.7 Western-Blot und Immundetektion

Beim Western-Blot wird zum Proteinnachweis die Antigen-Antikörper-Interaktion ausgenutzt. Nach der SDS-gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgt der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran in einem *semidry*-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979). Der elektrische Transfer findet in der Blotkammer bei 100 mA für 1.5 h statt. Anschließend wird der Transfer mit einer reversiblen Färbung durch Ponceau-Rot (Salinovich & Montelaro, 1986) überprüft.

Die Membran wurde für mind. 1 h in *Blocking*-Puffer behandelt. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte in PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4° C über Nacht. Die Antikörper wurden in PBS verdünnt. Der Anti-GST-Antikörper wurde in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Nach dem Waschen (3 × 10 min) wurde die Membran mit dem alkalische Phosphatasegekoppelten Antikörper (Anti-Maus-IgG) für 1 h inkubiert. Nach kurzem Waschen erfolgte der Nachweis mit chromogenen Substrat. NBT- und BCIP-Lösungen wurden auf den Blot gegeben. Nachdem eine klare Färbung zu sehen war, wurde die Reaktion mit PBS-Puffer beendet.

2.2.2.8 Ultrafiltration zum Aufkonzentrieren der Proteinlösungen

Die Proteinlösung wurde entweder vor der Verwendung der Grössenausschlusschromatographie aufkonzentriert, um das Auftragsvolumen zu verkleinern oder zum Einstellen der Proteinkonzentration vor der dauerhaften Lagerung bei -80 °C.

Das Einengen und Aufkonzentrieren der Proteinlösung erfolgte mit den Zentrifugalkonzentratoren der Firma Millipore. Es wurde die Membran mit der Ausschlussgröße von 30 kDa verwendet.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

Für alle in diesem Abschnitt erklärten Messungen wurden die Proteinlösungen nach dem Auftauen auf Eis standardmäßig ultrazentrifugiert. Dies erfolgte bei 40000 rpm und 4 °C für 30 min um eventuell vorhandene Aggregate oder Schwebeteilchen aus der Lösung zu entfernen. Unter Berücksichtigung des hohen Cysteingehaltes in InJ wurde die Proteinlösung jeweils nur einen Tag zur Experimentvorbereitung genutzt.

2.2.3.1 Absorptionsspektroskopie (UV/VIS-Spektroskopie)

Mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie lässt sich der Extinktionskoeffizient (Kap. 2.2.3.2, Kap. 3.1.3) bestimmen. Mit Hilfe dessen bestimmt man über die Absorption die Proteinkonzentration, vorausgesetzt die Proteinlösung ist ausreichend rein. Die UV-Spektren von Proteinen wurden üblicherweise in dem Bereich von 250 bis 350 nm aufgenommen und mittels des Puffersignals korrigiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte gemäß Lambert-Beer. Die Messungen wurden an dem Diodenarray-Spektralphotometer (ChemStation, Agilent) durchgeführt. Zusätzlich lässt sich die Lösung mit derselben Messung auf das Vorhandensein von Aggregaten überprüfen. Aggregate streuen das Licht und bewirken somit einen Signalanstieg im Basislinienbereich von 320 bis 350 nm.

Ebenso lässt sich die Nukleinsäurekonzentration über die Extinktion bei 260 nm bestimmen. Mit Hilfe der Annahme, dass eine Absorptionseinheit bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entspricht, wird die DNA-Konzentration errechnet.

2.2.3.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteinkonstrukte wurden nach (Pace & Schmid, 1997) experimentell bestimmt. Die Proben für die Messungen wurden unabhängig angesetzt. Dabei handelte es sich um Fünffachbestimmungen, und es wurden die daraus ermittelten Durchschnittswerte angegeben. Zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten der nativ vorliegenden Proteine wurden zunächst die molaren Extinktionskoeffizienten des vollständig entfalteten Proteins berechnet. Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde unter Einbeziehung der Molekularmasse (siehe Anhang) berechnet. Die zur Bestimmung verwendeten sowie die ermittelten molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten wurden in Tab. 3.1 im Ergebnisteil (Kap. 3.1.3) dargestellt.

2.2.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluorolog[®]-3 Spektrofluorimeter mit einem mittels Peltier-Element thermostatisierten Küvettenhalter durchgeführt. Alle Messungen wurden pufferkorrigiert.

Fluoreszenzspektren

Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission wurde in dem Bereich von 290 bis 450 nm registriert. Das Messpunktintervall betrug 1 nm und die Integrationszeit 0.5 s. Die spektralen Bandbreiten für die Anregung und Emission betrugen 2.5 nm bzw. 5 nm. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in Halbmikro-Quarzküvetten (Helma, 109.004 F-QS).

Fluoreszenzkinetiken

Die zeitliche Änderung der Fluoreszenz bei der Denaturierung wurde nach dem manuellen Mischen detektiert. Dazu wurde die Proteinlösung in einem Verhältnis von 1:100 unter Rühren in eine Quarzküvette (Helma, 109.004 F-QS) verdünnt. Die Zeit zwischen dem Mischen und dem Starten der Messung wurde mittels Stoppuhr registriert und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt. Die verwendete Proteinlösung wurde vor dem Verdünnen auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, um eine Proteinkonzentration von 10 µg/ml während der Messung zu gewährleisten.

Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Detektion des Signals bei der Emissionswellenlänge von 330 nm. Die spektralen Spaltbreiten betrugen für die Anregung 2.5 nm und für die Emission 5 nm. Die Integrationszeit betrug hierbei 1 s. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Messungen mit vortemperierten Puffern bei 20 °C durchgeführt. Für die Messungen wurde der Nativpuffer mit variierten Konzentrationen an GdmCl benutzt.

2.2.3.4 Stopped-flow Experimente

Die schnellen Rückfaltungsreaktionen wurden an einem SX.18MV *stopped-flow*-Apparat durchgeführt. Die Renaturierung wurde durch eine 1:6 Verdünnung des vollständig entfalteten Proteins in Puffer geringer GdmCl-Konzentrationen gestartet. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm bei einer spektralen Bandbreite von 6 nm. Es wurde ab 305 nm durch den Einsatz eines *cut-off*-Filters detektiert. In der Regel wurden für eine Messung ca. 10 Einzelmessungen gemittelt. Es erfolgte eine Wasserbadtemperierung auf 20 °C.

2.2.3.5 Inverse Doppelsprungexperimente (*interrupted refolding experiments*)

Die Doppelsprungexperimente wurden zur Identifizierung eines langsamen Schrittes der Faltung durchgeführt. Die Doppelsprünge wurden manuell ausgeführt. Alle Inkubationszeiten erfolgten bei 20 °C. Die Fluoreszenzdetektion der Kinetiken und Spektren erfolgte am Fluorolog®-3 wie bereits zuvor beschrieben (Kap. 2.2.3.3).

Die produktive Faltungsreaktion wird indirekt verfolgt, indem die Renaturierung ausgehend vom komplett entfaltetem Protein nach unterschiedlich langen Renaturierungszeiten abgebrochen wird und mit Hilfe der Entfaltung der absolute Anteil an bereits gebildetem nativem Protein bestimmt wird. Dazu wurde in einem Kontrollexperiment zunächst die Entfaltung des nativen Proteins bei 2.6 M GdmSCN registriert. Das im Vergleich zu GdmCl stärkere Denaturierungsmittel GdmSCN wurde eingesetzt, um die Entfaltung in einen gut messbaren Bereich zu bringen. Damit betrug die Halbwertszeit der Entfaltung ca. 3 min.

Zu Beginn des Experiments wurde eine Stammlösung mit vollständig entfaltetem Protein hergestellt. InIJ wurde in der Proteinkonzentration von 1 mg/ml in 7.4 M GdmCl denaturiert. Die Inkubationszeit betrug genau 2 h. Ob das Protein komplett denaturiert vorlag, wurde durch das Verdünnen in 2.6 M GdmSCN überprüft. Ist keine Entfaltungskinetik detektierbar, so ist kein natives Protein mehr in der Proteinlösung. Der Rückfaltungsschritt wurde durch das Verdünnen des denaturierten Proteinstocks auf 40 µg/ml in Standardpuffer initiiert. Hierzu wurden 20 µl denaturierten Stocks (1 mg/ml InIJ) mit 230 µl Standardpuffer (1.2-1.4 M GdmCl) unter Rühren vermischt. Die GdmCl-Endkonzentrationen von 1.45 bis 1.65 M GdmCl wurden somit erreicht. Die Renaturierungszeit wurde sekundengenau detektiert. Abgebrochen wurde die Rückfaltung durch die Zugabe von 750 µl Standardpuffer mit 2.6 M GdmSCN. Die finale Proteinkonzentration bei der Entfaltung betrug 10 µg/ml. Die Denaturierungskinetik wurde mittels Fluoreszenz registriert. Zur Auswertung wurden die Amplituden der Entfaltung gegen die Amplitude der Kontrolle normiert. Die so erhaltenen relativen Amplituden wurden gegen die Renaturierungszeit aufgetragen. Mittels monoexponentieller Regression (Kap. 2.2.4.3) konnte die Rate der langsamen Faltung bestimmt werden.

2.2.3.6 Gleichgewichtsübergänge

Die thermodynamische Stabilität der Faltung und Entfaltung wurde mit Hilfe der Gleichgewichtsübergänge untersucht. Zu Beginn wurden Stammlösungen vom nativen und vollständig entfaltetem Protein in der Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Das denaturierte Protein wurde in 7.8 M GdmCl-haltigen Standardpuffer für 2 h denaturiert. Die Proteinlösungen wurden in den De- bzw. Renaturierungspuffern 1:100 verdünnt (Proteinendkonzentration: 10 µg/ml).

Die Puffer mit unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen wurden durch Mischung aus dem Standard-Nativpuffer und dem Standard-Denaturierungspuffer hergestellt. Die Probenherstellung erfolgte in Einmalfluoreszenzküvetten durch Vorlegen der Proteinstammlösung mit einer *Multipette plus* und durch schnelles, schwallartiges Hinzupipettieren der Puffer. Die Küvetten wurden anschließend zur Langzeitinkubation mit Verschlussdeckel unter Zuhilfenahme von Silikon abgedichtet. Die Temperierung bei 20 °C erfolgte in Thermoschränken. Nach der Einstellung des Gleichgewichts, meist nach 7 d, wurden Fluoreszenzemissionen in dem Bereich von 300 bis 400 nm detektiert. Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Das Messpunktintervall betrug 2 nm und die Integrationszeit 0.5 s. Die spektralen Bandbreiten für die Anregung und Emission betragen 2.5 nm bzw. 5 nm. Die Messungen erfolgten bei 20 °C.

2.2.3.7 CD-Spektroskopie

Die CD-Messungen wurden in Standardpuffer bei 20 °C aufgenommen. Für die Fern-UV CD-Spektren (180-250 nm) wurden Quarzküvetten (Firma: Helma) mit 1 mm oder 0.1 mm Schichtdicke verwendet, für die Nah-UV-CD (250-350 nm) die Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke. Zu jeder Messung wurde ein Pufferspektrum aufgenommen und zur Korrektur verwendet.

CD-Spektren

Der Messpunktabstand betrug 1 nm, die Spaltbreite in der Regel 1 nm und die Integrationszeit 1 s. Es wurde 10-fach akkumuliert, außer bei der Messung der Gleichgewichtsproben. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Spektren zu gewährleisten, wurden die Spektren auf die verwendete Proteinkonzentration und Schichtdicke der Küvette normiert. Für die Fern-UV CD wurden die erhaltenen Messwerte in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet:

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{d \cdot c \cdot N_{AS}} \quad [\text{Gl. 2.1}]$$

Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität in mdeg, M die molare Masse des Proteins in g/mol, d die Schichtdicke der Küvette in cm, c die Proteinkonzentration in mg/ml, und N die Anzahl der AS im Protein.

CD-Kinetiken

Für die Fern-UV CD-Kinetiken wurde die InJ Stammlösung außerhalb der Küvette in Standardpuffern verschiedener GdmCl-Konzentration verdünnt und schnellstmöglich in die Küvette überführt. Die Totzeit der Messung wurde registriert und betrug ca. 30 s. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml.

Die spektrale Bandbreite betrug bei diesen Messungen 2 nm, die Integrationszeit 4 s und der Messpunktabstand war von der verwendeten GdmCl-Konzentration abhängig.

Thermische Denaturierung

Die thermische Stabilität wurde bei 217 nm und in einem Temperaturbereich von 10-70 °C verfolgt. Die Aufheizrate betrug dabei 1 K min⁻¹, die Spaltbreite 2 nm und die Integrationszeit 4 s. Während des Experimentes wurden alle 10 °C Spektren aufgenommen. Die Proteinkonzentration und die Pufferbedingungen sind in dem Ergebnissteil angegeben.

2.2.3.8 Refraktometrie

Da die Denaturierungsmittelkonzentration für die Faltungsreaktionen eine sehr wichtige Rolle spielt, muss sie möglichst genau bestimmt werden. Mit Hilfe eines Abbe-Refraktometers werden die Brechungsindizes der Pufferlösungen bestimmt. Die Brechungsindexdifferenzen (Δn) von Puffern mit und ohne Denaturanz werden für die Berechnung benötigt. Die molaren Konzentrationen von Lösungen mit Guanidiniumchlorid und Guanidiniumthiocyanat werden folgendermaßen berechnet:

$$[GdmCl] = 57.147 \cdot (\Delta n) + 36.68 \cdot (\Delta n)^2 - 91.6 \cdot (\Delta n)^3 \quad [\text{Gl. 2.2}]$$

(Pace, 1986)

$$[GdmSCN] = \Delta n / 0.02475 \quad [\text{Gl. 2.3}]$$

(Takase *et al.*, 1974)

2.2.3.9 MALDI-Massenspektroskopie

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden mit Unterstützung von Dr. habil. Fettke (Universität Potsdam) am Reflex II Bruker Massenspektrometer durchgeführt. Als Matrixsubstanz wurde Sinapinsäure in 50 % (v/v) Acetonitril und 0.1 % (v/v) Trifluoressigsäure verwendet. Die Proteinprobe wurde gemeinsam mit der Matrixsubstanz kristallisiert. Es wurde im direkten Modus gemessen.

2.2.3.10 Lichtstreuungsmessungen

Die Lichtstreuungsmessungen (dynamische und statische Lichtstreuung) wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Klaus Gast (Universität Potsdam) durchgeführt. Beide Methoden konnten durch die selbstgebaute

Apparatur simultan angewendet werden. Das selbstgebaute Gerät besteht hauptsächlich aus einem Argonlaser (Spectraphysics Millennia IIS), einem mittels Peltier-Element thermostatisierten Küvettenhalter und einem Photonendetektor (nähere Beschreibung der Komponenten sowie der angewendeten Korrelationsfunktion sind bereits beschrieben (Gast *et al.*, 1992, 1997). Die Laserleistung betrug je nach Anwendung 0.2 bzw. 0.5 W. Es wurden relative Streuintensitäten detektiert und zur Berechnung von Radien benutzt. Als Referenzsubstanz wurde Toluol verwendet.

2.2.4 Mathematische Auswertung

2.2.4.1 Auswertung der Gleichgewichtsübergänge nach dem Zweizustandsmodell

Die chemisch-induzierten Faltungs- und Entfaltungsübergänge wurden unter der Annahme des Zweizustandsmodells nach (Santoro & Bolen, 1988) ausgewertet. Es wurde die Modifikation von (Clarke & Fersht, 1993) $\Delta G_N^{[D]} = m([D]_{0.5} - [D])$ in [Gl. 2.4] verwendet. Die Anpassung erfolgte über die nichtlineare Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate.

$$S = \frac{(y_N + m_N[D]) + (y_U + m_U[D]) \exp\left(\frac{-m([D] - [D]_{0.5})}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-m([D] - [D]_{0.5})}{RT}\right)} \quad [\text{Gl. 2.4}]$$

Dabei ist S das detektierte Signal, y_N das Signal des nativen Proteins bei 0 M Denaturierungsmittel, m_N der Anstieg der Vorübergangsbasislinie mit der Denaturierungsmittelkonzentration $[D]$, y_U das Signal des vollständig entfalteten Proteins bei 0 M Denaturierungsmittel und m_U der Anstieg der Nachübergangsbasislinie. m stellt die Kooperativität dar und $[D]_{0.5}$ ist der Übergangsmittelpunkt, an dem 50 % der Moleküle denaturiert vorliegen. Die Abhängigkeit der freien Stabilisierungsenthalpie ΔG_N von der Denaturierungsmittelkonzentration $[D]$ ist nach dem linearen Extrapolationsmodell in [Gl. 2.5] dargestellt.

$$\Delta G_N = \Delta G_N^{H_2O} + m[D] \quad [\text{Gl. 2.5}]$$

Damit gilt am Übergangsmittelpunkt:

$$\Delta G_N^{H_2O} = -m [D]_{0.5} \quad [\text{Gl. 2.6}]$$

Mit diesen Parametern lässt sich die freie Stabilisierungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel berechnen.

2.2.4.2 Vorhersage von Kooperativitäten nach (Myers et al., 1995)

Für globuläre Proteine, die nach dem Zweizustandsmodell falten, ist eine signifikante Korrelation zwischen der Änderung der solvenzzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, ΔASA) bei Entfaltung und der damit verbundenen Kooperativität (m) gezeigt. Für globuläre Proteine ist ΔASA direkt proportional zu der Proteingröße (Myers et al., 1995).

Berechnen lassen sich ΔASA (\AA^2) und der m -Wert ($\text{cal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$) anhand von empirischen Gleichungen:

$$\Delta ASA = -907 + 93 (\#AS) \quad [\text{Gl. 2.7}]$$

$$m_{GdmCl} = 953 + 0.23 (\Delta ASA) \quad [\text{Gl. 2.8}]$$

2.2.4.3 Auswertung der Faltungs- und Entfaltungskinetiken

Die Faltungs- und Entfaltungskinetiken sind je nach Komplexität monophasig oder mehrphasig angepasst worden. Der einfachste Fall ist dabei die monoexponentiell-verlaufende Kinetik [Gl. 2.9]. Dabei ist y_0 der Endwert der Kinetik, A die Amplitude und k die apparente Geschwindigkeitskonstante.

$$y(t) = y_0 + A \exp(-k t) \quad [\text{Gl. 2.9}]$$

$$y(t) = y_0 + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) \quad [\text{Gl. 2.10}]$$

$$y(t) = y_0 + A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + A_3 \exp(-k_3 t) \quad [\text{Gl. 2.11}]$$

Die Anpassung der *stopped-flow* Ergebnisse erfolgte mittels bi- bzw. triexponentieller Funktionen [Gl. 2.10] bzw. [Gl. 2.11]. Die Funktionen wurden um eine Phase ergänzt, wenn die Amplitude 8 % der Gesamtamplitude überschritten hat.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins InIJ

3.1.1 Rationales Konstruktdesign zur Verbesserung der Proteinausbeute

Die Proteinherstellung erfolgte anfänglich mit einem Internalin J-Konstrukt, das die Aminosäurereste Thr34 bis Lys508 enthielt. Dieses Konstrukt (InIJ 34-508) in dem Vektor pETM30 (Anhang, Abb. 4.2) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dirk Heinz (Molekulare Strukturbiologie, HZI Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

Die Reinigung wurde zunächst nach einem bereits publizierten Protokoll durchgeführt (Bublitz *et al.*, 2008). Die Menge InIJ 34-508-Konstrukts war nach dem Zellaufschluss so gering, dass der Nachweis der Expression nur durch einen anschließenden Western Blot gelang (Abb. 3.1). Da die Detektion mittels eines anti-GST-Antikörpers erfolgte, konnten auch die GST-haltigen Abbaubanden beobachtet werden. Aus einem Liter Bakterienkultur konnten nach der Reinigungsprozedur lediglich ca. 2 mg InIJ 34-508 gewonnen werden. Aufgrund experimenteller Hinweise bezüglich geringer Proteinstabilität von InIJ 34-508 wurde ein rationaler Ansatz zur Konstruktoptimierung verfolgt, um die Proteinausbeute zu erhöhen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das Aufreinigungsprotokoll ebenfalls optimiert (siehe Kap. 2.2.2).

Die ersten experimentellen Hinweise stammen von Maike Bublitz (Molekulare Strukturbiologie, HZI Braunschweig). Diese zeigten, dass nach der Aufreinigungsprozedur und der *tag*-Abspaltung das Konstrukt InIJ 34-508 in voller Länge (52.9 kDa) erhalten werden konnte. Nach einer kurzen Inkubationszeit bei Raumtemperatur lag InIJ 34-508 jedoch geringfügig verkürzt vor (Bublitz, 2007).

Die von Maike Bublitz in Auftrag gegebene N-terminale Sequenzierung bestätigte, dass das Protein N-terminal trunziert vorlag.

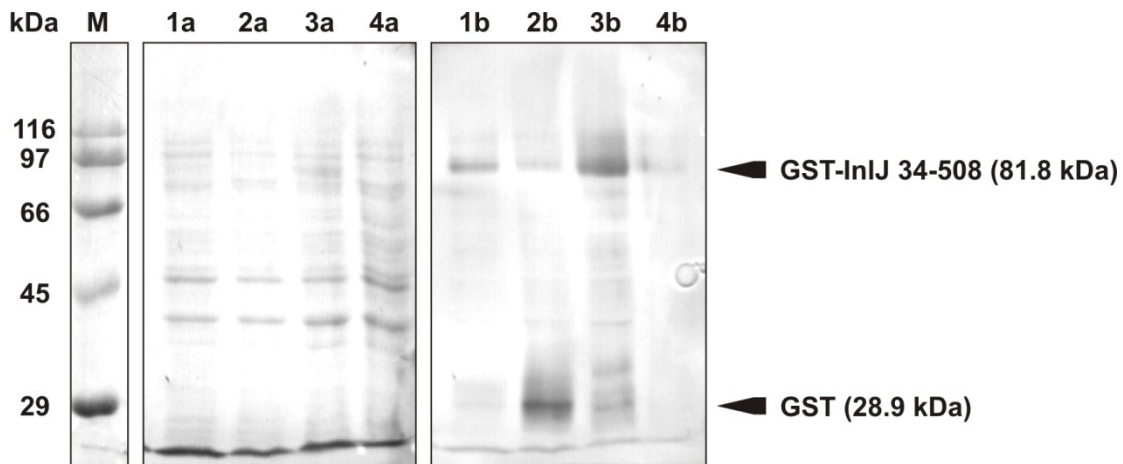


Abb. 3.1 Nachweis von InIJ 34-508 im Expressionstest mittels SDS-PAGE (a) und Western Blot (b). Dargestellt sind der Molekulargewichtsmarker (M) in kDa, die Färbung aller in der löslichen Fraktion vorhandenen *E. coli*-Proteine durch Ponceau-Rot (1-4a) und selektive Detektion der GST-markierten Proteine per Western Blot im gleichen Ausschnitt (1-4b). Aufgetragen ist die lösliche Fraktion des *E. coli*-Lysats in **Spur (1)** 2 h nach der Induktion bei 20 °C; in **Spur (2)** 2 h nach Induktion bei 37 °C; in **Spur (3)** nach der Expression über Nacht bei 20 °C; und in **Spur (4)** ohne Induktion. Pfeile zeigen auf die anti-GST-Antikörper markierten Banden.

3.1.1.1 Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte massenspektrometrische Größenbestimmung bestätigte, dass das hergestellte InIJ 34-508 nach kurzer Zeit trunziert vorlag (Abb. 3.2). Für InIJ 34-508 wurden mehrere Signale im Spektrum detektiert. Diese ergaben sich aus der Mehrfachionisierung. Das Protein wurde als ein-, zwei- und dreifach-geladenes Signal bei 51082 m/z $[M+H]^+$, 25505 m/z $[M+H]^{2+}$ und 17036 m/z $[M+H]^{3+}$ detektiert, wobei das dreifach-geladene Ion ein verhältnismäßig schwaches Signal zeigte. Im ungeladenen Zustand ergibt sich im Durchschnitt die Konstruktmasse von 51067 ± 51 Da. Die Masse entspricht einem Fragment der Länge Pro48-Lys508 (51060 Da). Dies entspricht einer Verkürzung um 14 Aminosäuren.

Somit liegt die Bruchstelle zwischen den Aminosäuren Gln47 und Pro48. Die Literatur bestätigt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit einer spontanen Spaltung der Peptidbindung hinter den Aminosäuren Asp, Asn, Glu und Gln (Capasso *et al.*, 1996; Geiger & Clarke, 1987). Schließt C-terminal ein Prolin (Pro48) an, so handelt es sich um eine höchst labile Peptidbindung, und die Wahrscheinlichkeit einer Peptidspaltung nimmt weiter zu (Wang *et al.*, 2000).

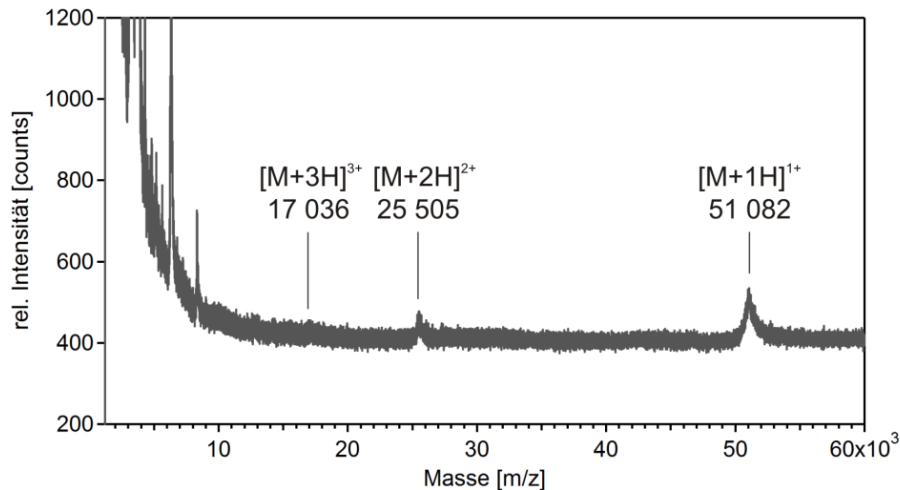


Abb. 3.2 MALDI-TOF-Spektrum von InIJ 34-508. Das Protein wurde als einfach- $[M+1H]^{1+}$, zweifach- $[M+1H]^{2+}$ und dreifach-geladenes Ion $[M+1H]^{3+}$ detektiert.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die N-terminalen 19 Aminosäuren (Thr34-Thr52) durch Klonierung entfernt. Das für diese Arbeit verwendete Konstrukt umfasst demnach die Aminosäuren Leu53 bis Lys508 (InIJ 53-508) (Sequenz siehe Anhang). Somit beinhaltet das Konstrukt N-terminal nur die Aminosäuren, die röntgenkristallographisch zugänglich waren (Bublitz *et al.*, 2008) und zusätzlich die vier Aminosäuren Gly-Ala-Met-Ala aus der TEV-Erkennungssequenz nach proteolytischer Spaltung. Nachfolgend wird das Konstrukt InIJ 53-508 als Internalin J, InIJ bzw. InIJ wt bezeichnet. Die Klonierungsergebnisse wurden durch DNA-Sequenzierungen bestätigt. Für die Herstellung aller im Rahmen dieser Promotionsarbeit entstandenen InIJ-Varianten wurde ebenfalls ausschließlich dieses optimierte Konstrukt verwendet.

3.1.2 Proteinexpression und Reinigung

Zur Expression von Internalin J wurde der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Das Konstrukt befand sich in dem Plasmid pETM30 (siehe Anhang), welches auch zur Herstellung aller InIJ-Varianten verwendet wurde. Das produzierte Fusionsprotein beinhaltet außer InIJ einen N-terminalen 6×His- sowie GST-Tag. Der Affinitätstag ist durch eine TEV-Schnittstelle von dem Zielprotein abspaltbar, denn sogar kleine Tags können die Faltung beeinflussen (Hamill *et al.*, 1998).

Nach der Durchführung von Expressionstests, in denen der Expressionsstamm, das Medium, die Temperatur und auch die Expressionsdauer variiert wurden, konnten die optimalen Expressionsbedingungen identifiziert werden. Die Expression erfolgte unter Verwendung eines Selbstinduktionsmediums (Studier, 2005). Nach der über Nacht erfolgten Expression bei 20 °C wurde im Durchschnitt eine OD_{600nm} von 5 erreicht. Das Nasszellgewicht nach der Ernte betrug ca. 12 g / 1 l Zellkultur.

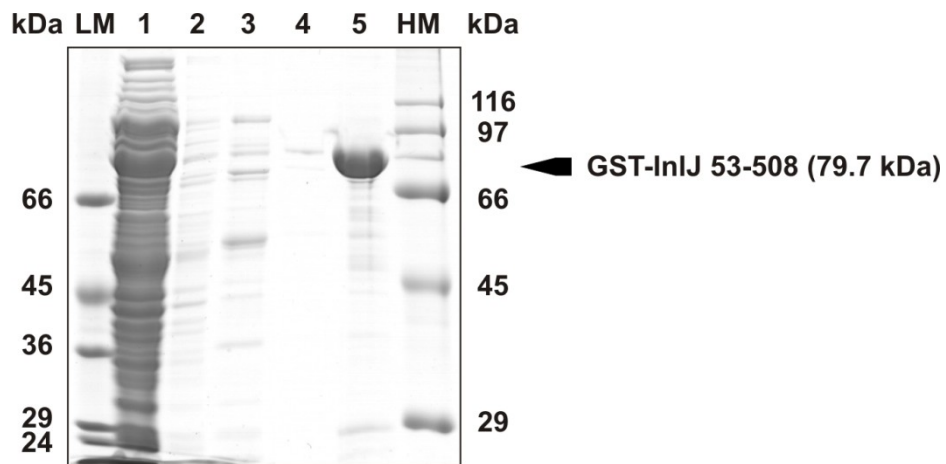


Abb. 3.3 SDS-PAGE zur Glutathionaffinitätschromatographie von InIJ. Dargestellt sind **(LM)** low-Molekulargewichtsmarker; **Spur (1)**: lösliche Fraktion des *E. coli*-Lysats; **Spur (2)**: Durchfluss; **Spur (3,4)**: Fraktionen aus dem Waschschritt; **Spur (5)**: Probe des GST-Materials samt gebundenem InIJ, nach dem Auftragen; **(HM)** high-Molekulargewichtsmarker. (Coomassiefärbung)

In der löslichen Fraktion des Zellextraktes konnte das überexprimierte, rekombinante Protein mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf der Höhe von ca. 80 kDa nachgewiesen werden (Spur 1; Abb. 3.3). Durch die Glutathion-Affinitätschromatographie wurden unerwünschte *E. coli*-Genprodukte nahezu vollständig entfernt und im selben Zuge das InIJ angereichert (Spur 5; Abb. 3.3).

Die Abspaltung der *Tag*-Sequenz mittels TEV-Protease erfolgte direkt auf dem Säulenmaterial, um Verunreinigungen durch GST-Fragmente zu vermeiden. Die anschließend durchgeführte Größenausschlusschromatographie erzielte eine Reinheit von mind. 95 % (Abb. 3.4).

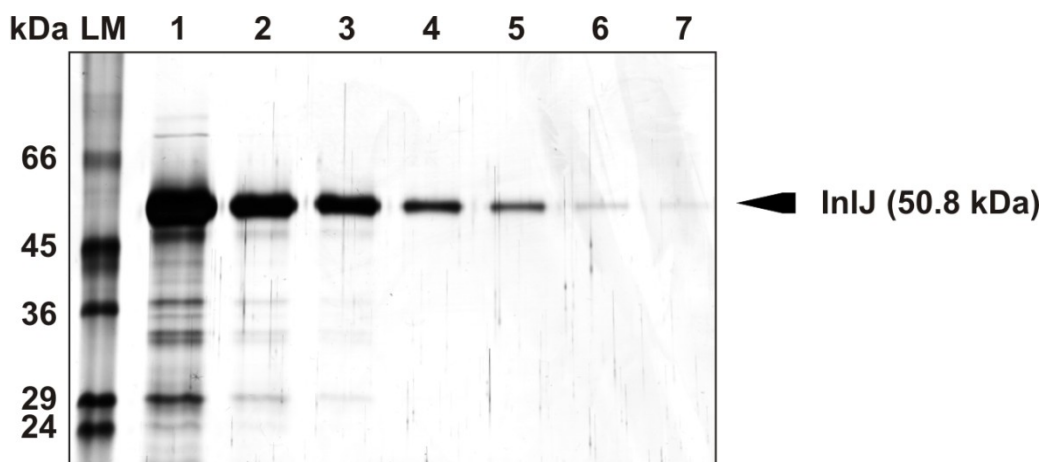


Abb. 3.4 Reinheit der Proteinpräparation von InIJ. Aufgetragen sind unterschiedliche Mengen InIJ pro Spur. **Spur (1)**: 5 µg; **Spur (2)**: 1 µg; **Spur (3)**: 500 ng; **Spur (4)**: 100 ng; **Spur (5)**: 50 ng; **Spur (6)**: 10 ng; **Spur (7)**: 5 ng. (Silberfärbung)

Die Ausbeute betrug ca. 10 mg InJ aus einem Liter *E. coli*-Bakterienkultur. Damit konnte durch das Konstrukt InJ 53-508 eine etwa 5-fach erhöhte Ausbeute gegenüber dem InJ 34-508 erreicht werden. Darüber hinaus wies das optimierte Konstrukt keinerlei Degradation auf. Alle erzeugten Proteinvarianten zeigten keine Unterschiede bezüglich der Expression, der Aufreinigung sowie der Ausbeute. Dies deutet darauf hin, dass die *in vivo* Faltungseffizienz der InJ-Varianten keine gravierende Beeinträchtigung durch die eingeführten Mutationen erfuhr.

3.1.3 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Der Extinktionskoeffizient des Internalin J und der Tryptophanvarianten (W65F; W472F) wurde experimentell bestimmt (Kap. 2.2.3.2).

Der Extinktionskoeffizient der InJ-Varianten, bei denen Cystein ersetzt wurde, wurde probeweise überprüft. Dieser entsprach dem für den Wildtyp bestimmten Extinktionskoeffizienten. Reduzierte Cysteine tragen bei Wellenlängen über 275 nm nicht zu dem Absorptionssignal bei, ganz im Gegensatz zu den disulfidverbrückten Cysteinen (Bailey, 1968).

Tab. 3.1: Extinktionskoeffizienten der verwendeten InJ-Konstrukte bei 278 nm

Konstrukt	molarer $\epsilon_{278\text{nm}}$	molarer $\epsilon_{278\text{nm}}$	spezifischer $\epsilon_{278\text{nm}}$
	denaturiert*	nativ [§]	nativ [§]
	[M ⁻¹ cm ⁻¹]	[M ⁻¹ cm ⁻¹]	[ml mg ⁻¹ cm ⁻¹]
InJ wt	25200	25930	0.51
W65F	21000	21310	0.419
W472F	21000	21590	0.425

* berechnet und [§] experimentell bestimmt nach (Pace & Schmid, 1997), siehe Kap. 2.2.3.2

3.2 Spektroskopische Charakterisierung

Die spektroskopische Charakterisierung erfolgte mit InIJ Wildtyp (InIJ wt) sowie mit den hergestellten Varianten. Das InIJ-Konstrukt umfasst die gesamte Internalindomäne einschließlich N-terminaler *capping*-Domäne, LRR-Motiv (*leucine rich repeat*) und IR-Domäne (Kap. 1.3.3).

Die spektroskopischen Eigenschaften von InIJ werden hauptsächlich durch zwei Tryptophanreste (W65, W472) bestimmt und im geringen Maße durch 10 Tyrosine beeinflusst. Das W65 befindet sich in dem *capping*-Motiv der Internalindomäne. Das W472 findet man dagegen in der Ig-ähnlichen IR-Domäne des Internalins. Die besondere Positionierung der Tryptophanreste, am N- und am C-Terminus (Abb. 3.5), erlaubt das Beobachten der Konformationsänderungen des ganzen Proteins.

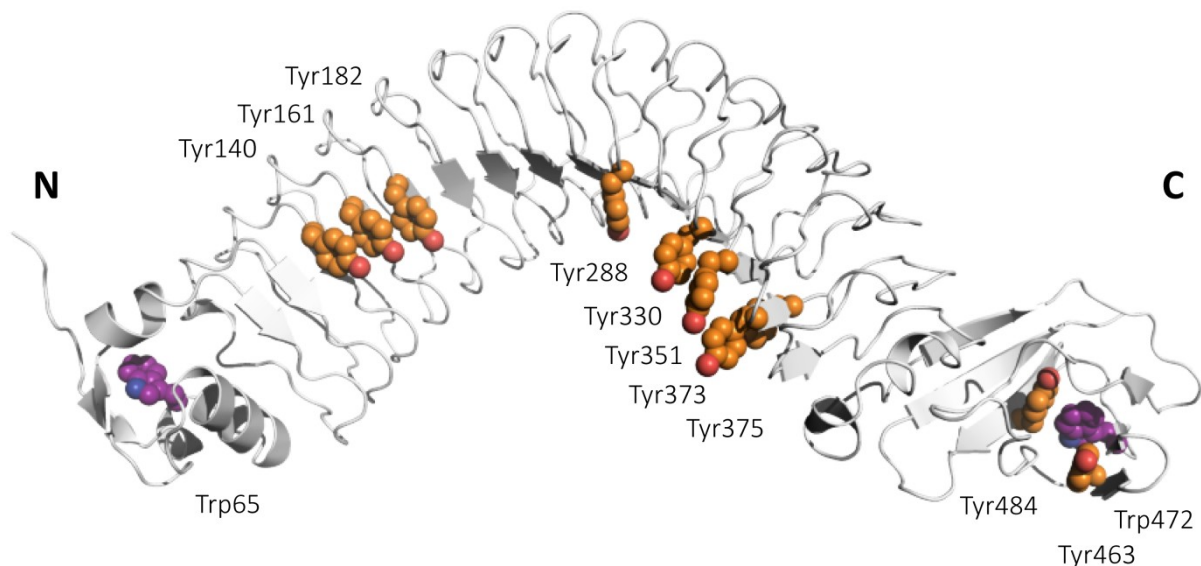


Abb. 3.5: Kristallstruktur von InIJ (3BZ5; Bublitz *et al.*, 2008) sowie die Positionierung der Tryptophane und Tyrosine. Cartoon-Darstellung der Internalindomäne des Proteins InIJ. Die Aminosäurereste Tryptophan (violett) und Tyrosin (orange) sind durch die Sphärendarstellung hervorgehoben.

InIJ besitzt 14 freie Cysteine im LRR-Bereich (Kap. 1.3.3). Die räumliche Anordnung der Cysteine im Inneren des Proteins erinnert an eine Leiter. Cysteine sind hochreaktive Aminosäuren, vor allem als ionisiert vorliegende Thiolate. Die Reaktivität ist abhängig von der Lösungsmittelzugänglichkeit, den pK_a -Werten der individuellen Cysteinreste und natürlich von dem pH-Wert der Umgebung. Die Cysteine des InIJ sind allerdings in das hydrophobe Innere der LRR-Domäne eingebettet und sollten somit nicht lösungsmittelzugänglich sein. Mit Hilfe des Ellman-Assays (Ellman, 1958; Riddles *et al.*, 1983) wurde nachgewiesen, dass in nativ gefaltetem InIJ die Cysteine erstens nahezu unzugänglich und zweitens reduziert vorliegen (Tymieniecki, 2010).

Um unerwünschte Oxidation und mögliche Disulfidverbrückungen zu vermeiden, wurde das Reduktionsmittel Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP) benutzt. Von der Verwendung thiolhaltiger Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) wurde Abstand genommen. TCEP besitzt eine längere Haltbarkeit und stört keine der verwendeten spektroskopischen Methoden. Die Disulfidbildung des oxidierten DTT bewirkt dagegen eine stark erhöhte Absorption bei 280 nm. Dies stört bei den absorptionsbasierten Methoden wie der UV- oder CD-Spektroskopie und ist weiterhin für *innerfilter*-Effekte bei der Fluoreszenz verantwortlich. Bei den durchgeführten Experimenten waren lange Inkubationsphasen notwendig. Dies erhöhte aber den Anteil des oxidierten Reduktionsmittels und somit die störenden Effekte von DTT.

Die spektroskopischen Eigenschaften des nativen und denaturierten Zustandes eines Proteins unterscheiden sich für gewöhnlich. Dieser Umstand wird zur Charakterisierung der thermodynamischen Stabilität sowie der Faltung des InternalinJ genutzt. Die Konformationsänderungen werden in sogenannten Ensemble-Experimenten untersucht. Dabei liegen alle Zustände nebeneinander vor und es wird das Durchschnittssignal erfasst. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der spektroskopischen Charakterisierung dargestellt.

3.2.1 UV-Absorptionsspektroskopie

Die Ergebnisse der UV-spektroskopischen Charakterisierung von InIJ sind in Abb. 3.6 A dargestellt. Wie bereits dargelegt, wird das Absorptionsverhalten von InIJ vorrangig durch die beiden Tryptophane W65 und W472 sowie durch 10 Tyrosine bestimmt (Abb. 3.5). In dem Wellenlängenbereich von 275-285 nm ist ein Doppelmaximum zu beobachten (Abb. 3.6 A). Das absolute Maximum bei 277 nm wird durch die Tyrosinabsorption verursacht. Die Tryptophane dagegen verstärken die Schulter bei 283 nm. Die Schulter bei 292 nm kommt ausschließlich durch die Tryptophanabsorptionsbande in diesem Bereich zustande. InIJ enthält weiterhin 13 Phenylalanine. Das Absorptionsmaximum von Phenylalaninen liegt bei 260 nm und ist durch den kleinen Beitrag allenfalls für die Feinstrukturen bei 260 nm verantwortlich.

Nach Denaturierung von InIJ kann eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums sowie eine leichte Intensitätsabnahme beobachtet werden. Der größte Unterschied zwischen dem Spektrum des nativen und denaturierten Proteins liegt bei 285 nm und kommt durch die Blauverschiebung des Spektrums zustande (Abb. 3.6 B). Die Tryptophanschulter bei 292 nm verschwindet gänzlich, was auch an dem zweithöchsten Maximum bei 293 nm im Differenzspektrum erkennbar ist.

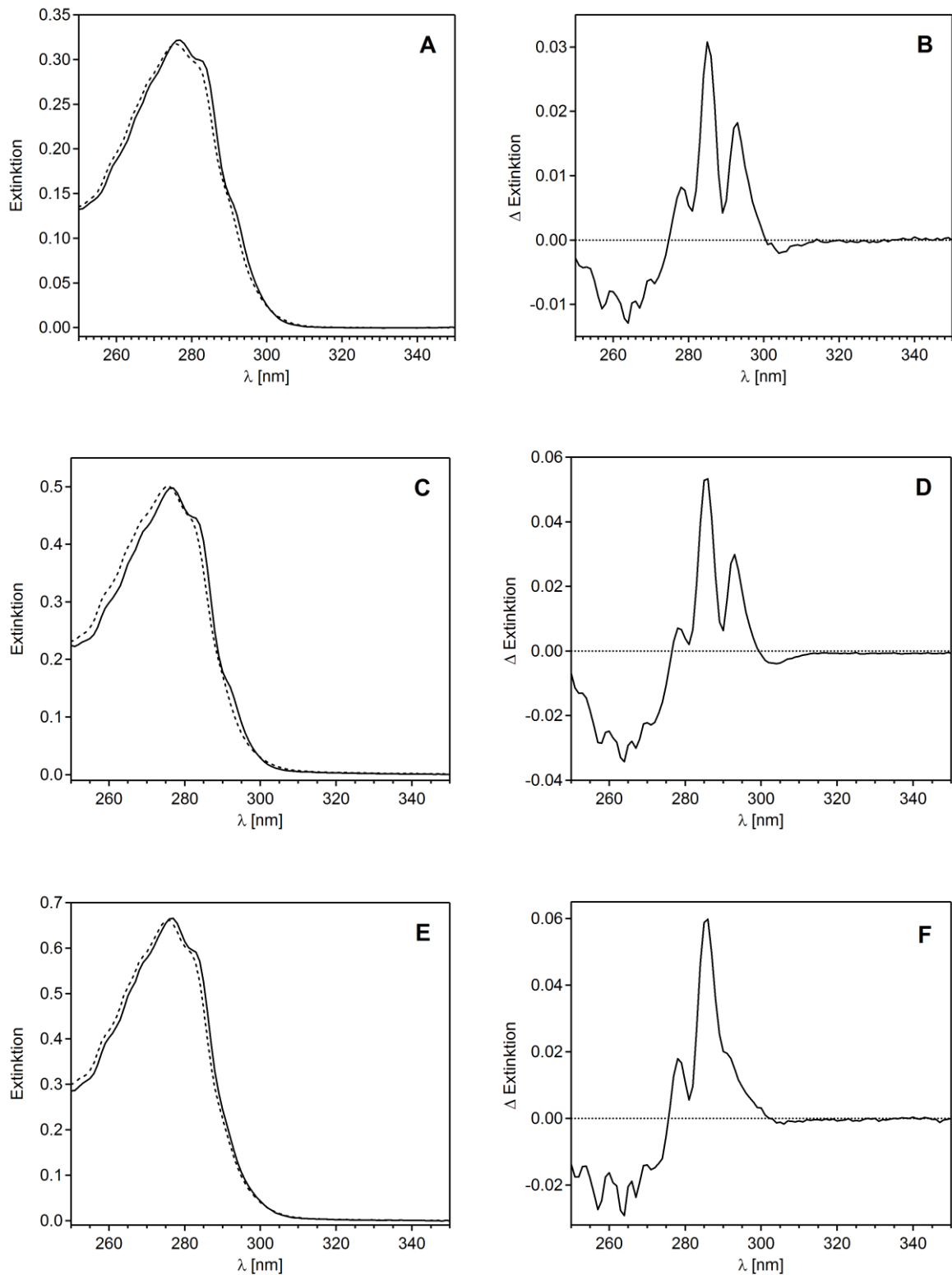


Abb. 3.6 Absorptionsspektren von InIJ (A), (B) sowie der Varianten W65F (C), (D) und W472F (E), (F). Dargestellt sind Spektren des nativen Proteins (—) in Standard-Nativpuffer, sowie Spektren des entfalteten Proteins in Standardpuffer mit 6 M GdmCl (---) (A), (C), (E). Die Proteinkonzentrationen betragen 0.65 mg ml^{-1} für das InIJ, 1.17 mg ml^{-1} für die Variante W65F und 1.5 mg/ml für die Variante W472F. In (B), (D), (F) sind Differenzspektren der gezeigten Absorptionsspektren zu sehen.

Interessante Erkenntnisse konnten aus den Absorptionsspektren der Tryptophanvarianten W65F und W472F (Abb. 3.6 C und E) gewonnen werden. Bei beiden Varianten wird die Schulter bei 283 nm erniedrigt und es ergibt sich ein leicht schärferer Peak bei 277 nm, da das Verhältnis von Tryptophan zu Tyrosin verringert wird. Die Tryptophanschulter bei 293 nm wird unterschiedlich stark beeinflusst. Bei der Variante W472F verschwindet die Schulter nahezu vollständig (Abb. 3.6 E, F). Diese Veränderung lässt sich deutlich im Differenzspektrum beobachten. Möglicherweise ist das noch vorhandene W65 stärker lösungsmittelzugänglich und damit eher einer polaren Umgebung ausgesetzt. Allerdings sind Schlussfolgerungen anhand von Absorptionsspektren sehr ungenau, da die individuelle Umgebung der Chromophore wichtig ist (S. Yanari & F. A. Bovey, 1960).

Die InJ-Varianten, bei denen Cystein durch Alanin ersetzt wurde, zeigen vollständig identische Spektren zu InJ Wildtyp (Spektren nicht dargestellt).

3.2.2 Circular dichroismus Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine sehr sensitive Methode, die zur Untersuchung der Struktur und Stabilität einen Beitrag liefern kann. Es wird hierbei zwischen zwei Wellenlängenbereichen unterschieden. Das CD-Spektrum im Fern-UV (170-250 nm) gibt Informationen über Sekundärstrukturelemente wieder. Die Absorption der Peptidbindungen bestimmt das Signal. Das CD-Spektrum von 250 bis 350 nm wird dagegen durch die Tertiärstruktur des Proteins beeinflusst. In diesem Nah-UV-Bereich zeigt sich die Auswirkung der asymmetrischen Umgebung auf die aromatischen Seitenketten und Disulfidbrücken.

Die IR-Domäne von InJ sowie die konkave Seite des LRR-Motivs bestehen aus β -Faltblättern (Bublitz *et al.*, 2008). Dies spiegelt das in der Fern-UV-Region aufgenommene CD-Spektrum wider (Abb. 3.7 A). Sowohl die Lage des Elliptizitätsminimums bei 217 nm als auch dessen moderate Intensität (ca. $-10\,000\text{ deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$) sind charakteristisch für ein von β -Faltblättern dominiertes Spektrum (Greenfield, 1996; Whitmore & Wallace, 2008). Ein Beitrag des α -helikalen *capping*-Motivs zum Gesamtsignal ist nicht detektierbar. Vergleicht man das gewöhnlich resultierende Signal Θ_{MRW} einer α -Helix und eines β -Faltblattes, ist die Elliptizität der α -Helix um das Dreifache intensiver als die des β -Faltblattes. Die typische β -Faltblattcharakteristik des InJ-Spektrums ist nicht verwunderlich unter Berücksichtigung der relativen Verhältnisse des *capping*-Motivs (42 AS) zu dem Restprotein (412 AS).

Typisch für ein CD-Spektrum von einem β -faltblattreichen Protein ist, neben dem Minimum bei 217 nm, ein Maximum bei 195 nm, welches im Falle von InJ fehlt. Es lässt sich stattdessen ein Maximum bei 203 nm sowie ein zusätzliches Minimum bei 195 nm beobachten (Abb. 3.7 A). Ein Minimum bei 195 nm ist an Modellspektren für Polyprolin-II-Sekundärstrukturelementen und auch

für ungeordnete Polypeptide beschrieben worden (Tiffany & Krimm, 1969; Woody, 2009). Begründet wird dies damit, dass chemisch- oder thermisch-entfaltetes Protein zu einem bestimmten Anteil in P_{II} -Konformation vorliegt. Das Maximum bei 203 nm kann sich aus einer Überlagerung ergeben. Letztendlich ist der Beitrag der β -Turns zu dem Fern-UV-Spektrum nicht zu beziffern.

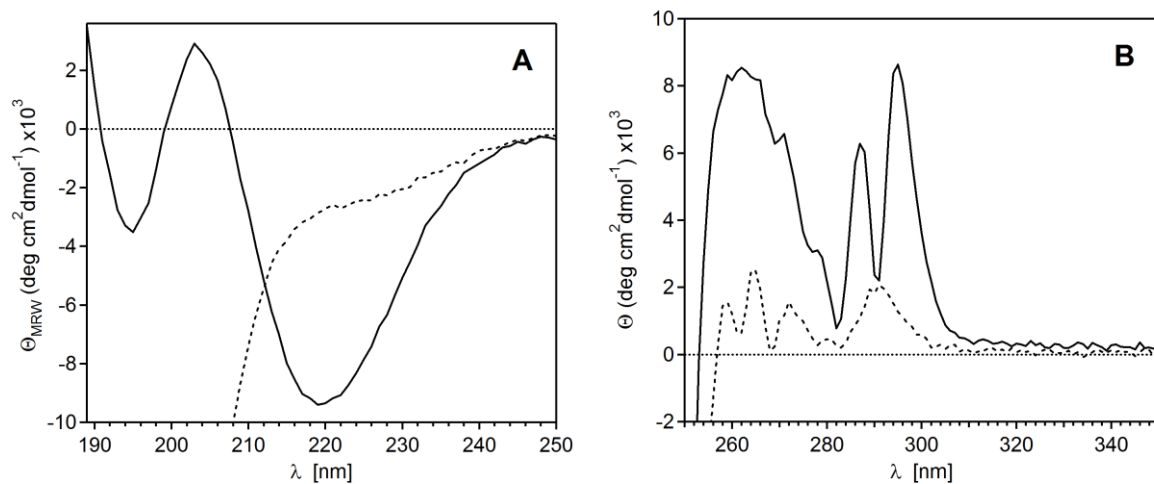


Abb. 3.7: Fern-UV und Nah-UV CD-Spektren. (A) Fern-UV-Spektrum von nativem InJ im Standardpuffer (—), sowie des in 3.6 M GdmCl haltigem Standardpuffer entfalteten Proteins (---) (jeweils $c = 1 \text{ mg ml}^{-1}$). (B) Nah-UV-Spektrum von nativem InJ (—) und des denaturierten Proteins in 6 M GdmCl-haltigem Standardpuffer (---) (jeweils $c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$).

Der Verlauf des CD-Spektrums im nahen ultravioletten Bereich liegt durchgehend im positiven Bereich (Abb. 3.7 B). Es ist eine ausgeprägte Feinstruktur zu beobachten. Auffällig sind die zwei Signalpeaks bei den Wellenlängen 295 nm und 287 nm. Diese resultieren aus der Tryptophanabsorption und werden am stärksten durch das Ersetzen des Tryptophans gegen ein Phenylalanin beeinflusst, was im nachfolgenden Abschnitt erläutert wird. Das Spektrum im Bereich von 280 bis 255 nm resultiert aus der Tyrosinabsorption und zu einem geringen Maße aus der Phenylalaninabsorption (260-270 nm).

Die eingeführten Tryptophanmutationen W64F bzw. W472F gehen mit starken Änderungen des Nah-UV-Spektrums einher (Abb. 3.8). Bei beiden Varianten werden die Signalpeaks bei 295 nm und 287 nm kleiner, wobei das Signal bei 282 nm im negativen Bereich zu finden ist. Das Spektrum der Variante W472F wird in dem Wellenlängenbereich von 280-300 nm stärker beeinflusst. Damit trägt das Tryptophan W472 einen größeren Beitrag zu der Tryptophanabsorption bei. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der UV-Absorption (Kap. 3.2.1). Die Variante W65F zeigt dagegen sowohl im vorderen als auch im hinteren Wellenlängenbereich Veränderungen. Eine Zuordnung der Banden zu einem bestimmten Tryptophanrest ist aufgrund der Komplexität der Veränderungen nicht möglich.

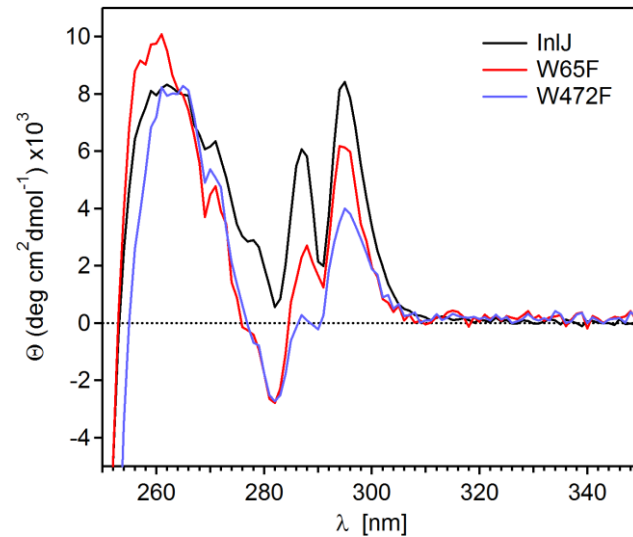


Abb. 3.8 Nah-UV CD-Spektren von InIJ wt und der Varianten W65F und W472F. Es sind Spektren der Proteine im Standardpuffer dargestellt (jeweils $c = 2 \text{ mg ml}^{-1}$).

Nah-UV-Spektren besitzen eine unverwechselbare Strukturierung, die nur im nativ gefalteten Protein erreicht wird. Somit eignet sich das Nah-UV-Spektrum zur Überprüfung der Tertiärstruktur. Die Alaninvarianten verschiedener Cysteine sowie die Serinvariante (C206S) wiesen keine Unterschiede in den Fern-UV oder Nah-UV-Spektren auf (Daten nicht gezeigt). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Substitution keine Veränderung der dreidimensionalen Proteinstruktur zur Folge hat.

3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenz von Proteinen beruht auf dem Vorliegen intrinsischer Fluorophore, z.B. Tryptophane und Tyrosine. Aufgrund ihrer Umgebungsempfindlichkeit eignen sich besonders die Tryptophane als Messsonden für strukturelle Veränderungen. Wie in Abb. 3.9 dargestellt, ist der Unterschied zwischen dem Fluoreszenzsignal des nativen und des denaturierten Proteins gravierend.

Im nativen Zustand weist das Spektrum von InIJ durch die Anregung bei 280 nm ein Emissionsmaximum bei 335 nm auf (Abb. 3.9 A). Dies spricht für eine moderate Abschirmung der Tryptophane von dem wässrigen Milieu. Da das Protein zwei Tryptophane besitzt (W65, W472), ist eine genauere Zuordnung nicht möglich. Mit der Denaturierung erhöht sich die Zugänglichkeit der Tryptophane und diese sind dem polaren Lösungsmittel ausgesetzt. Das Emissionsmaximum verschiebt sich zu längeren Wellenlängen (360 nm). Ferner nimmt die Gesamtintensität ab und eine Schulter bei 305 nm wird sichtbar. Diese Schulter ist auf die Emission der Tyrosinreste zurückzuführen. Im nativ-gefalteten InIJ wird die Tyrosinmission entweder auf die Tryptophane in

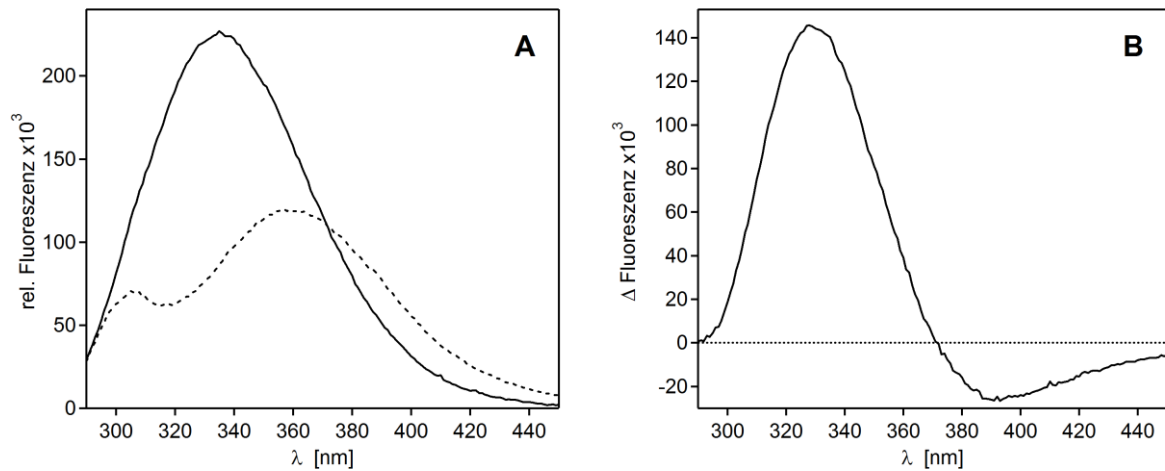


Abb. 3.9 Fluoreszenzemissionsspektren des Proteins InIJ. (A) Spektrum des nativen Proteins gemessen im Standard-Nativpuffer (—) und des denaturierten Proteins in 6 M GdmCl haltigem Standardpuffer (---) ($\lambda_{ex} = 280$ nm). Die Proteinkonzentration betrug in beiden Fällen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. (B) Differenzspektrum gebildet aus den beiden in A dargestellten Spektren.

räumlicher Nähe übertragen oder einfach überlagert. Regt man die Proteinlösung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 295 nm an, wird nur die Tryptophanemission induziert. Bei InIJ konnte so eine leicht erniedrigte Signalintensität beobachtet werden, die auf einen teilweisen Energietransfer der Tyrosinemission hinweist.

Die signifikante Änderung des Fluoreszenzsignals nach chemisch-induzierter Entfaltung eignet sich hervorragend zur Beobachtung von Tertiärstrukturänderungen und somit auch für Faltungsuntersuchungen (siehe Kap. 3.3). Der gravierendste Signalunterschied lässt sich anhand des Differenzspektrums (Abb. 3.9 B) bei 330 nm erkennen, weshalb die meisten Untersuchungen im Folgenden bei dieser Emissionswellenlänge durchgeführt wurden.

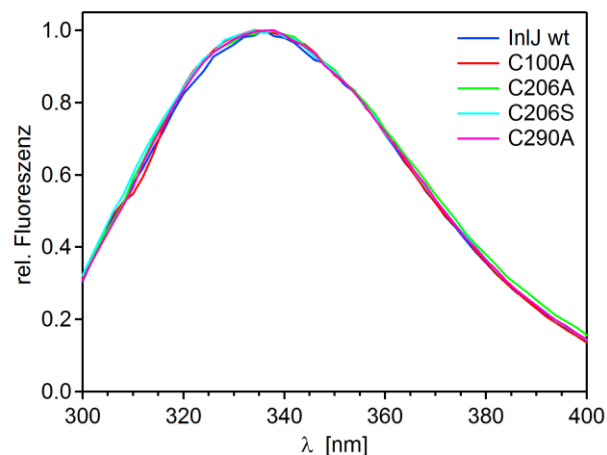


Abb. 3.10 Fluoreszenzemissionsspektren der InIJ-Varianten C100A, C206A, C206S und C290A im Vergleich zu InIJ wt. Abgebildet sind Spektren der Proteine gemessen im Standard-Nativpuffer. Die Proteinkonzentration betrug in allen Fällen $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Die Substitution der Cysteine gegen Serine sowie Alanine hatte keinen Einfluss auf die Spektrenverläufe und Fluoreszenzintensitäten. Um die Übersichtlichkeit zu wahren, wurden exemplarisch lediglich einige der hergestellten InJ-Varianten dargestellt (Abb. 3.10). Da keine signifikante Änderung des Emissionsmaximums zu beobachten war, wird davon ausgegangen, dass die Anordnung der Chromophore durch die Mutationen nicht verändert worden ist.

3.3 Faltung und thermodynamische Stabilität des Wildtyps InIj

Die Faltung von *repeat*-Proteinen ist ein wenig untersuchtes Gebiet gemessen an dem Vorkommen dieser Faltungsmotive. Die modulare Struktur der *repeat*-Proteine wird hauptsächlich durch kurzreichende Wechselwirkungen stabilisiert. Damit verspricht die relativ einfache Topologie einen vereinfachten Weg zur Lösung des Protein-Faltungsproblems. Letztendlich wurde noch nie ein Protein mit so immens vielen freien Cysteinen faltungstechnisch untersucht. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der grundlegenden thermodynamischen und kinetischen Charakterisierung dargestellt.

3.3.1 Thermodynamische Studien

3.3.1.1 GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge von InIj detektiert mittels Fluoreszenz

Die thermodynamische Stabilität von InIj wurde mittels chemischer Denaturierung untersucht. Als Denaturierungsmittel wurde GdmCl verwendet. Die Proteinkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ erwies sich für die fluoreszenzbasierte Detektion als zufriedenstellend. Das Gleichgewicht der Faltungsreaktion wurde erst nach 7 Tagen Inkubation bei 20°C erreicht. Dies wurde durch einen Vergleich der Denaturierungs- und Renaturierungsreaktion sichergestellt (Abb. 3.11 A). Von der Verwendung von Harnstoff als Denaturierungsmittel wurde Abstand genommen, da die aus der Harnstoffeinwirkung resultierenden Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich kleiner sind. Somit würde auch die Gleichgewichtseinstellung eine deutlich längere Zeit in Anspruch nehmen als mit GdmCl.

Die Gleichgewichtseinstellung ist nur unter der Voraussetzung der Reversibilität möglich. Nur bei vollständig reversiblen Übergängen kann das Zweizustandsmodell zur Bestimmung der Stabilität angewendet werden (Pace & Scholtz, 1997). Das Zweizustandsmodell setzt voraus, dass nur zwei Faltungsspezies vorhanden sind (nativ gefaltetes und vollständig entfaltetes Protein) und schließt ein stabiles Intermediat aus. In der Überlagerung der Emissionsspektren, die aus dem Gleichgewichtsübergang stammen, kann ein Bereich um 370 nm beobachtet werden in dem sich die Spektren schneiden (Pfeil in Abb. 3.11 B). Das Vorliegen eines so genannten isoemissiven Punktes spricht für das Vorhandensein von lediglich zwei Faltungsspezies. Liegt das Protein ausschließlich im nativen oder denaturierten Zustand vor, ergibt sich ein Schnittpunkt zwischen beiden Spektren. Bei dieser Wellenlänge sollte die Signalintensität unverändert bleiben, solange die Proteinkonzentration unverändert bleibt, egal in welchem Verhältnis sich die beiden Spezies zueinander befinden.

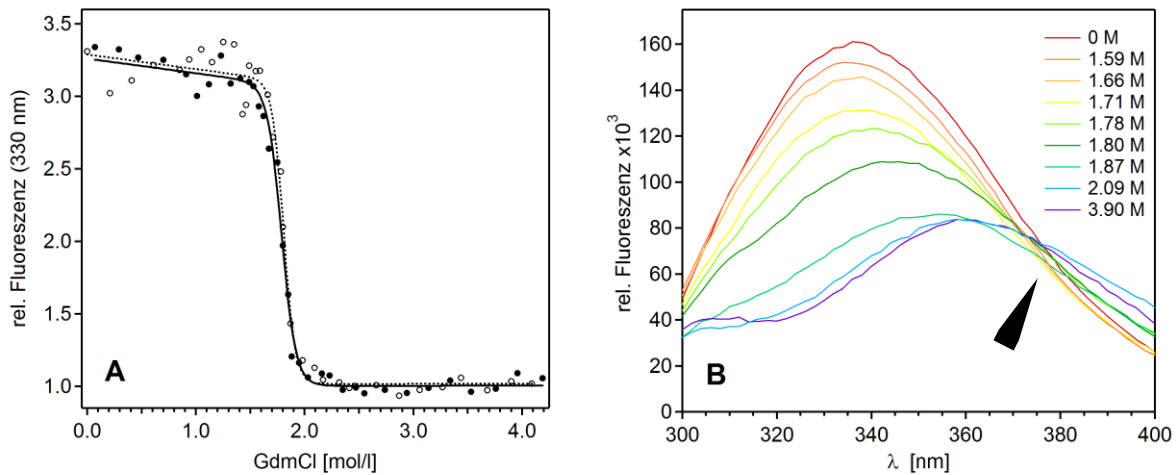


Abb. 3.11 Gleichgewichtsübergang von InIJ. (A) Dargestellt sind der Denaturierungsübergang (○) mit der zugehörigen Regression nach Zweizustandsmodell (---) und der Renaturierungsübergang (●) inklusive Regression (—). Die Gleichgewichtsproben wurden im Standardpuffer mit angegebenen GdmCl-Konzentrationen vorbereitet und nach 7 d Inkubationszeit bei 20 °C gemessen. Die Proteinkonzentration betrug 10 μg ml⁻¹. Die Anregungs- bzw. die Emissionswellenlänge betrug 280 nm bzw. 330 nm. Die Normierung erfolgte über die durchschnittliche Signalintensität der vollständig denaturierten Proben der GdmCl-Konzentrationen zwischen 2.5 M und 4 M. (B) Exemplarisch dargestellte Spektren aus dem Übergangsbereich des Denaturierungsübergangs. Der Pfeil markiert den Bereich, in dem der isoemissive Punkt liegt.

Der fluoreszenzdetektierte Übergang von InIJ zeigt sich reversibel und ebenfalls stark kooperativ (Abb. 3.11 A). Der typische sigmoidale Kurvenverlauf ist am Übergang steil und ohne Zwischenstufen. Zusätzlich führt die Analyse des Übergangs bei allen Emissionswellenlängen zwischen 310 und 360 nm zu identischen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Für die thermodynamische Charakterisierung des Internalin J erweist sich die Position der spektroskopischen Sonden als günstig. Da die Tryptophane am N- und C-Terminus lokalisiert sind, werden die strukturellen Veränderungen an beiden Enden des Proteins erfasst. Die gesamte Internalindomäne, bestehend aus der α -helikalen *capping*-Domäne, dem LRR-Motiv und der IR-Domäne, faltet und entfaltet in einem einzigen konzertierten Schritt. Dafür ist eine starke Kopplung zwischen dem N- und C-Terminus durch ein Netzwerk an Wechselwirkungen erforderlich (Kloss *et al.*, 2008). Die detektierte Übergangskurve ist extrem steil und damit hochkooperativ. Ein hochkooperativer Übergang spricht gegen das Vorhandensein von stabilen Intermediaten, da diese grundsätzlich eine Abflachung des Übergangs zur Folge haben (Myers *et al.*, 1995; Pace, 1986). Je kooperativer der Übergang, desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Gleichgewichtsintermediat in diesem schmalen Fenster stabil populierte wird.

Bei einer Auswertung nach dem Zweizustandsmodell lassen sich stabilitätsbestimmende, thermodynamische Parameter wie der Wendepunkt der Übergangskurve $[D]_{0.5}$, die Kooperativität m und die freie Stabilisierungsenthalpie ΔG_N extrahieren (Kap. 2.2.4.1). Zu diesem Zweck wurden sechs

unabhängig angesetzte Gleichgewichtsübergänge auf der Grundlage der Linearen-Extrapolations-Methode global nichtlinear gefittet (Pace, 1986). Die Bereiche jeweils vor und nach dem Übergang zeichnen sich durch schwankende Signalintensitäten aus (Abb. 3.11 A). Die Steilheit des Übergangs erschwert die Auswertung zusätzlich. Somit fallen Basislinienfehler stark ins Gewicht. Um die Verlässlichkeit der Regression zu verbessern, wurden die Steigungen der Vor- und Nachübergangsbasislinien m_N und m_U der sechs Übergangskurven miteinander in Abhängigkeit gesetzt. Diese Fiteinschränkung ist zulässig und auch physikalisch sinnvoll.

Der Übergangsmittelpunkt $[D]_{0.5}$ ist bei 1.78 ± 0.03 M GdmCl zu finden. Die Kooperativität m beziffert sich zu 48.7 ± 11.8 kJ mol⁻¹ M⁻¹. Daraus ergibt sich die freie Enthalpie der Faltung $\Delta G_N^{H_2O}$ mit -86.7 ± 21.5 kJ mol⁻¹. Die Fehlerangaben resultieren aus der Sechsfachbestimmung.

Die Kooperativität m ist direkt proportional zu der Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent accessible surface area*, ΔASA) (Myers *et al.*, 1995). Festgelegt wird ΔASA durch die Oberfläche eines Proteins im gefalteten Zustand und die Zunahme an zugänglicher Fläche nach Entfaltung. Diese Korrelation ist zwar eindeutig, jedoch für elongierte Proteine streng genommen nicht anwendbar. Der Zusammenhang zwischen Kooperativität und ΔASA , und demzufolge auch der Proteingröße, wurde überwiegend an kleinen globulären Proteinen gezeigt. Anhand empirischer Gleichungen, publiziert durch Myers *et. al.*, lässt sich die Gültigkeit dieser Annahmen für InJ (460 AS) überprüfen (Kap. 2.2.4.2). Die theoretisch vorhergesagte Kooperativität m_T beträgt 44.3 kJ mol⁻¹ M⁻¹. Damit stimmt die theoretisch zu erwartende Kooperativität m_T mit der experimentell bestimmten ($m = 48.7 \pm 11.8$ kJ mol⁻¹ M⁻¹) im Rahmen des angegebenen Messfehlers überein. Der angegebene Fehler von 24 % des Messwertes (Mehrfachmessung) ist beträchtlich. Unsicherheiten in der Basislinienbestimmung und im aktuellen Fall die extrem starke Abhängigkeit des Übergangs von der Denaturierungsmittelkonzentration erschweren eine hinreichend genaue Parameterbestimmung. Die m -Werte aus dem Gleichgewichtsexperiment sind durch die unsteten Basislinien oft fehlerbehaftet. Generell sind kinetische m -Werte genauer bestimmbar. Die Annahmen von Myers *et. al.* bezüglich der Kooperativität treffen, abgesehen von Ausnahmen z.B. TSP (Miller *et al.*, 1998), auch auf andere *repeat*-Proteine zu (Main *et al.*, 2003)

Die erhaltene Kooperativität ($m = 48.7 \pm 11.8$ kJ mol⁻¹ M⁻¹) sowie die thermodynamische Stabilität von InJ $\Delta G_N^{H_2O}$ mit -86.7 ± 21.5 kJ mol⁻¹ sind relativ hoch im Vergleich zu denen anderer, bereits charakterisierter Proteine (Jackson, 1998; Maxwell *et al.*, 2005). Üblicherweise liegen die Stabilisierungsenthalpien mesophiler Proteine bei Werten zwischen -30 und -60 kJ mol⁻¹ (Pfeil, 2001). Stabilitäten im Bereich von -100 kJ mol⁻¹ erreichen tendenziell eher hyperthermophile Proteine (Razvi & Scholtz, 2006).

Nicht produktive Faltungsprozesse wie Aggregation würden die Anwendbarkeit des Zweizustandsmodells einschränken. Deshalb wurde die Gleichgewichtsreaktion hinsichtlich möglicher Aggregationsprozesse untersucht. Da die Aggregation eine mit der Faltung konkurrierende Reaktion darstellt, hängt diese von der Proteinkonzentration ab (Kiefhaber *et al.*, 1991). Jedoch wurde in dem Proteinkonzentrationsbereich von 10 bis 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ keine Konzentrationsabhängigkeit bei der Faltungsreaktion festgestellt (Abb. 3.12). Weder die Renaturierungsausbeuten noch der Mittelpunkt des Übergangs veränderten sich bei höheren Proteinkonzentrationen.

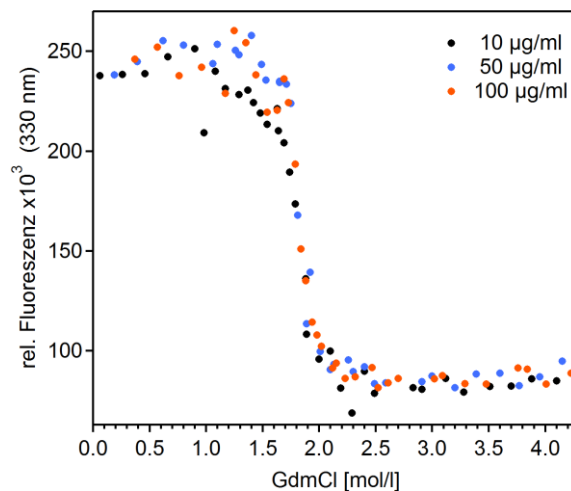


Abb. 3.12 Renaturierungsübergang im Gleichgewicht bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Es wurden Proteinkonzentrationen von 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (●) 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (●) und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (●) verwendet. Der Verlauf der Denaturierungsübergänge entsprach denen der Renaturierung (aus Übersichtlichkeitsgründen nicht dargestellt). Die Gleichgewichtsproben wurden im Standardpuffer mit unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen vorbereitet und nach 7 d Inkubationszeit bei 20 °C gemessen. Die Anregungs- bzw. die Emissionswellenlänge betrug 280 nm bzw. 330 nm. Die Normierung erfolgte über die durchschnittliche Signalintensität der vollständig denaturierten Proben bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 2.5 M und 4 M.

Um das Erreichen des Gleichgewichtszustandes zu dokumentieren, wurden die Proteinproben mehrmals nach unterschiedlicher Inkubationszeit vermessen. Somit konnte die äußerst langsame Denaturierung bei geringen Guanidiniumkonzentrationen erfasst werden (siehe Kap. 3.3.2.1). Bemerkenswert ist, dass keine typische Hysterese zu beobachten ist (Abb. 3.13). Das Fluoreszenzsignal der aus der Renaturierung stammenden Proben entspricht schon zum Zeitpunkt der ersten Messung (nach ca. 2 h) dem Übergang nach 6 Tagen Inkubation. Der Prozess der Denaturierung ist dagegen relativ langsam und ließ sich deutlich verfolgen.

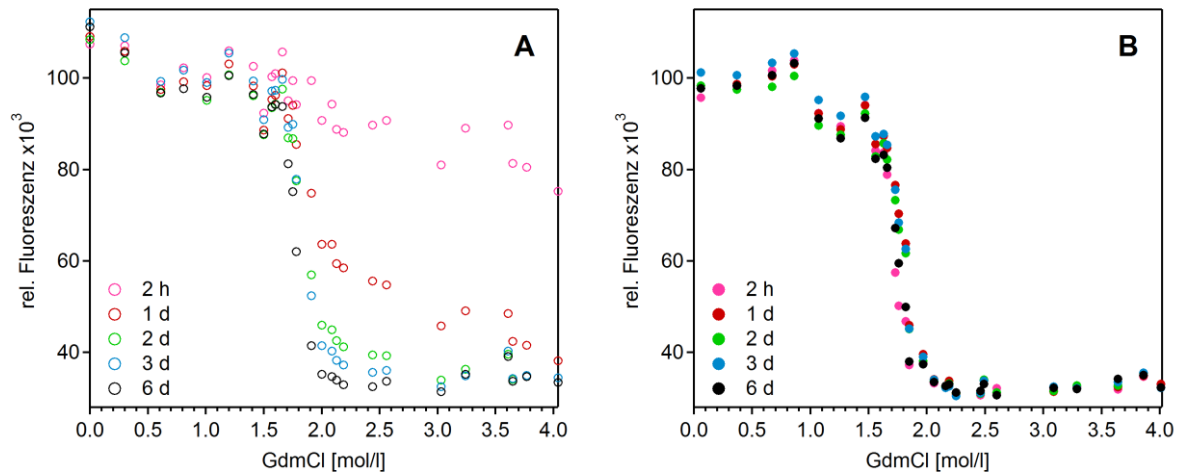


Abb. 3.13 De- und Renaturierungsübergänge nach verschiedenen Inkubationszeiten. Die Übergänge wurden im Standardpuffer unterschiedlicher GdmCl-Konzentrationen vorbereitet und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 20 °C vermessen. Die Denaturierung (○) und die Renaturierung (●) sind getrennt in (A) bzw. (B) dargestellt. Die erste Messung erfolgte bereits nach ca. 2 h (●), die nächsten nach 1 Tag (●), nach 2 Tagen (●), nach 3 Tagen (●) und nach 6 Tagen (●). Die Anregungs- bzw. die Emissionswellenlänge betrug 280 nm bzw. 330 nm. Die Proteinkonzentration betrug 10 µg ml⁻¹.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch ein kompliziertes Faltungsverhalten einfach erscheinen kann, wenn z.B. spektroskopische Signale beobachtet werden, die lediglich die Änderung der Tertiärstruktur anzeigen. Dagegen kann eine höhere Heterogenität aufgelöst werden, indem verschiedene spektroskopische Methoden zum Einsatz kommen, um die Proteinfaltung zu untersuchen. Das stärkste Argument für das Zweizustandsmodell ist allerdings die Übereinstimmung der Ergebnisse aus den Gleichgewichtsexperimenten mit den kinetischen Daten (siehe Kap. 3.3.2.5).

3.3.1.2 GdmCl-induzierte Übergänge von InIj detektiert mittels Fern-UV-CD

Um die Gültigkeit des Zweizustandsmodells zu bestätigen bzw. Aggregation als Konkurrenzprozess auszuschließen, ist es hilfreich, den Gleichgewichtsübergang mit einer weiteren spektroskopischen Methode zu untersuchen (Lumry *et al.*, 1966). Mit Hilfe der Fern-UV-CD-Spektroskopie lassen sich Veränderungen der Sekundärstruktur unter GdmCl-Einfluss beobachten. Für ein verlässliches Signal in der Fern-UV-Region (170-250 nm) wurden 100 µg ml⁻¹ InIj eingesetzt. Nach 7 Tagen Inkubation wurden die Proben vermessen.

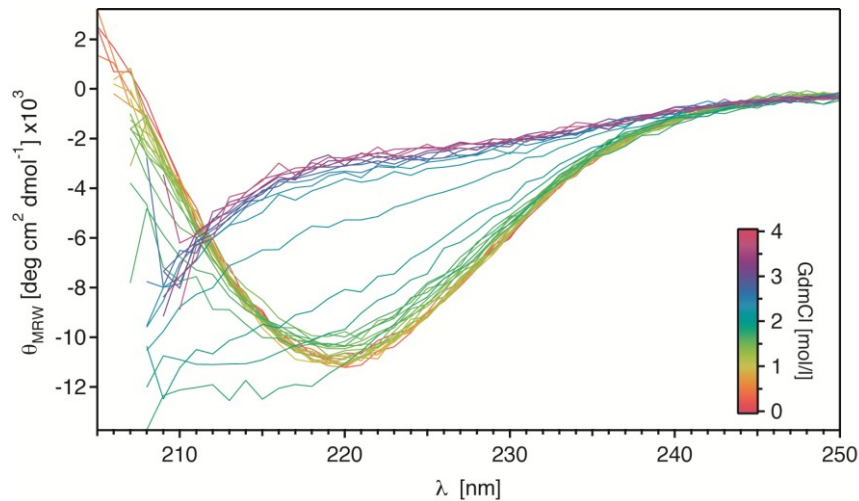


Abb. 3.14 Fern-UV CD-Spektren des Denaturierungsübergangs. Der Denaturierungsübergang wurde gemessen im Standardpuffer unterschiedlicher GdmCl-Konzentrationen, nach 7 d Inkubationszeit bei 20 °C. Die Proteinkonzentration betrug $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Der Übergang wurde bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 0 und 4 M angesetzt. Die Farbe der Spektren richtet sich nach der GdmCl-Konzentration (siehe Legende).

Analog zum isoemissiven Punkt in der Fluoreszenz (siehe Kap. 3.3.1.1) gibt es im Circular dichroismus beim Vorliegen des Zweizustandsmodells den isodichroischen Punkt. Die Voraussetzungen sind abermals, dass das Protein bei jeder GdmCl-Konzentration ausschließlich im nativen oder denaturierten Zustand vorliegt und dass es einen Schnittpunkt zwischen den Spektren beider Spezies gibt. Dann sollte die Signalintensität bei dieser Wellenlänge nur von der Proteinkonzentration abhängen. Die Spektren des nativen Proteins und des vollständig entfalteten Proteins kreuzen sich bei 212 nm (Abb. 3.14). Bei Vorliegen von lediglich zwei Zuständen, sollten sich alle Spektren des Übergangs in diesem Punkt schneiden. Für die Spektren, die dem Übergangsbereich entstammen, trifft dies jedoch nicht zu. Die Spektren der Proben zwischen 1.5 und 2.2 M GdmCl zeigen eine deutlich veränderte Form mit einem Signalminimum zwischen 210 und 220 nm. Die Ergebnisse des Renaturierungsübergangs entsprechen denen des Denaturierungsübergangs (Daten nicht dargestellt).

Die Abb. 3.15 A veranschaulicht die Elliptizitätsänderung bei 212 nm. Die Signalintensität bei 212 nm sinkt ab 1.5 M GdmCl und erreicht wieder das ursprüngliche Niveau bei 2.2 M GdmCl. Exakt dieser Konzentrationsbereich entspricht dem Übergang. Das Spektrum bei ca. 2 M GdmCl (Abb. 3.14) zeigt ein breites Minimum zwischen 210 und 220 nm in seiner maximalen Ausprägung. Diese Spektriform deutet auf die Beteiligung von aggregierten InI-Spezies hin. Die Proteinaggregate verstärken ebenfalls die Lichtstreuung in der Probe, was gleichzeitig zum Anstieg der gemessenen Absorption führt (Abb. 3.15 B). Am deutlichsten ist der Absorptionsanstieg bei der Wellenlänge von 220 nm zu beobachten. Proteinaggregation tritt oft im Bereich des Faltungsübergangs auf. Außerhalb des Übergangsbereichs destabilisieren geringe Denaturierungsmittelkonzentrationen die

potentiellen Aggregate, und sehr hohe Konzentrationen wiederum eliminieren meist jegliche Proteininteraktionen.

Das Auftreten von Aggregation widerspricht auf den ersten Blick dem postulierten Zweizustandsmodell für das Gleichgewichtssystem (Kap. 3.3.1.1). Allerdings muss dabei beachtet werden, dass Aggregationsprozesse stark von der Proteinkonzentration abhängen. Für die CD-Spektroskopie werden $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ verwendet, während die Proteinkonzentration für die Fluoreszenzmessungen nur $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ betrug. Bei einer um das 10-fache kleineren Proteinkonzentration ist es demnach möglich, dass Aggregation eine vernachlässigbare Rolle spielt (siehe auch Kap. 3.3.1.3.).

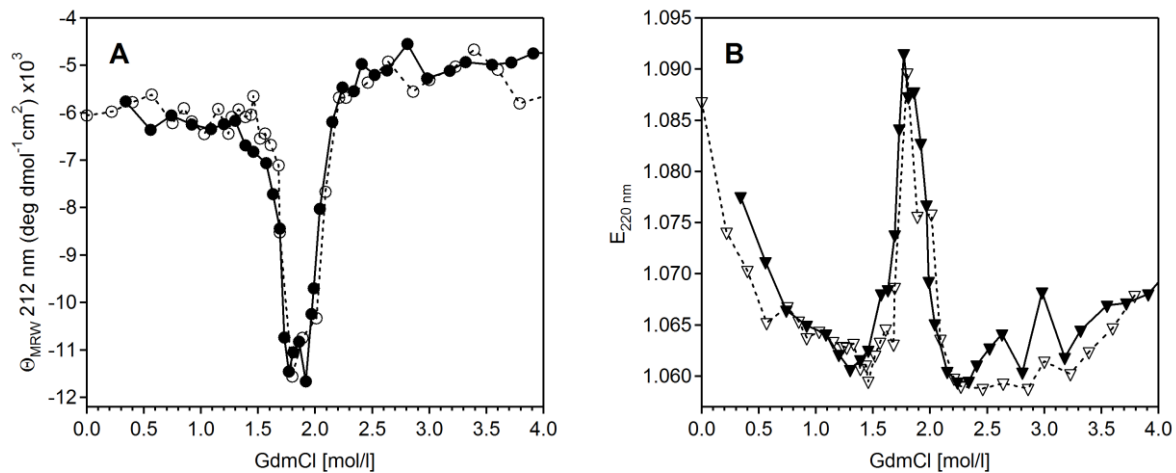


Abb. 3.15 Änderung des CD-Signals und der Extinktion in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. (A) Fern-UV CD-Signal bei 212 nm der Entfaltung (○) und der Faltung (●) (B) Extinktion bei 220 nm der Entfaltung (▽) und der Faltung (▼). Durchführung unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 3.14.

3.3.1.3 Untersuchungen zur Aggregationsneigung von InIj unter GdmCl-Einfluss

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnte die Zunahme an aggregierten Partikeln mit der Zeit verfolgt werden (Abb. 3.16). Dazu wurden Proben mit 10 und $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ InIj in 1.8 M GdmCl über mehrere Tage bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und täglich vermessen. Zu Beginn des Experiments wurde lediglich der monomere Zustand mit einem Stokes-Radius (S_R) von $3\text{-}4 \text{ nm}$ detektiert. Mit der Zeit nahmen die Streuintensitäten von großen Partikeln mit einem S_R von ca. 90 nm zu. Die Polydispersität der Proteinprobe nahm somit ebenfalls zu.

Die Auswertung der Streuintensitäten beider Spezies ergab, dass nach 7 Tagen Inkubation ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) und bei einer Proteinkonzentration von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ maximal 5% des Proteins aggregiert vorliegen. Bei einer Proteinkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ liegt dieser Anteil bei weniger als 1% . Für die hier durchgeführten Gleichgewichtsexperimente, die mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert wurden, kann daher der Einfluss von Proteinaggregation vernachlässigt werden.

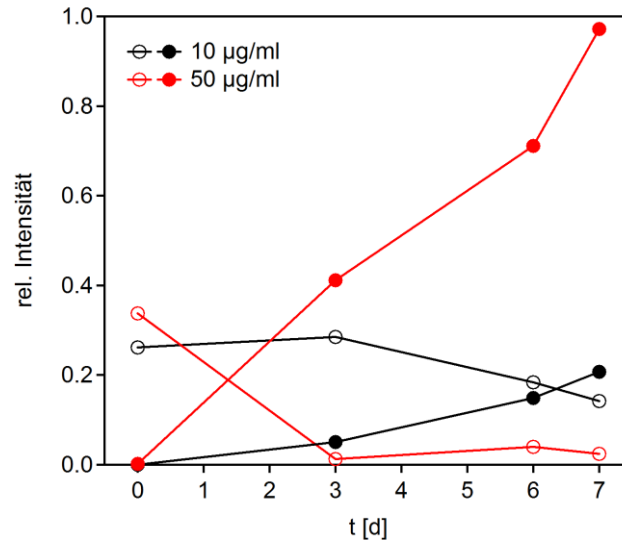


Abb. 3.16 Die Entwicklung der Streuintensitäten des Monomers und der aggregierten Spezies mit der Zeit. Dargestellt sind Monomerintensitäten (○) und Aggregatintensitäten (●) bei einer Proteinkonzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (○) und $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ (●). Die Messungen erfolgten bei 20°C im Standardpuffer mit 1.8 M GdmCl .

3.3.1.4 Thermisch-induzierte Entfaltung zur Stabilitätsuntersuchung

Eine weitere Möglichkeit, die Stabilisierungsenthalpie von InIJ (Kap. 3.3.1.1) zu überprüfen, bietet ein temperaturinduzierter Übergang. Auch hier ist das Zweizustandsmodell zur Auswertung nur anwendbar, wenn die Entfaltung und Faltung im Gleichgewicht stehen, und somit die Entfaltung reversibel verläuft.

Die thermische Entfaltung von InIJ wurde mittels Fern-UV-CD detektiert. Die Temperaturabhängigkeit des Signals bei 217 nm wurde in einem Temperaturbereich von 10 bis 70°C beobachtet. Die üblicherweise verwendeten Pufferbedingungen (Standard-Nativpuffer: 50 mM Natriumphosphat, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, $\text{pH } 7$) erwiesen sich als nicht zielführend. Die Entfaltung verlief irreversibel und führte zu Aggregation (Abb. 3.17 A). Das CD-Signal zeigte bis 45°C nur einen leichten Anstieg der Basislinie. Die weitere Temperaturerhöhung führte zunächst zu einem Anstieg des Signals und ab ca. 53°C zu einem starken Intensitätsabfall. Nach abgeschlossener Temperaturentwicklung (70°C) zeigte das Spektrum ein Profil (Abb. 3.17 B), das den Spektren im Übergang während der chemischen Entfaltung entsprach (Abb. 3.14). Die Aggregate waren offensichtlich niedermolekularer Art, da es keine optischen Anzeichen für Präzipitation gab.

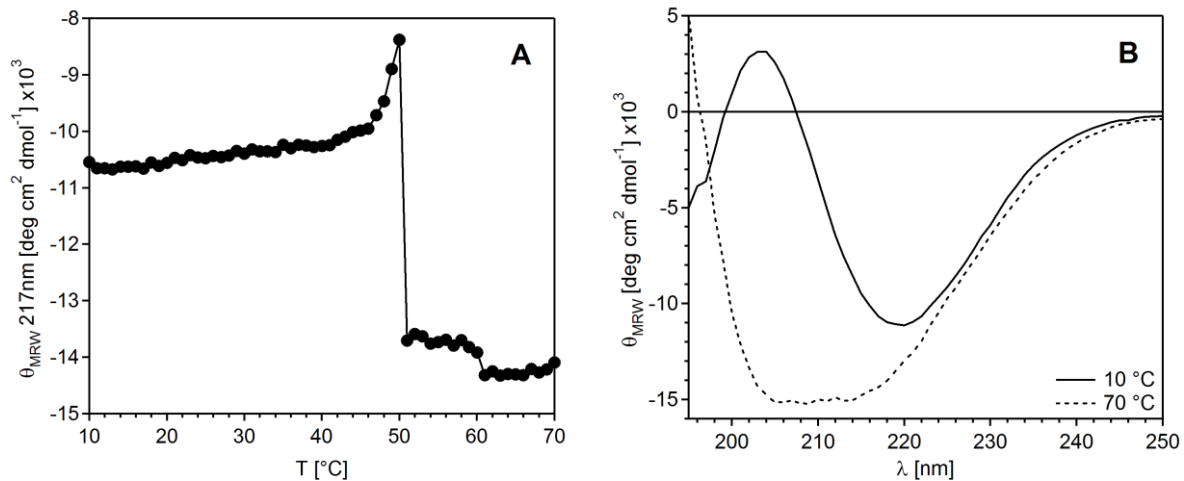


Abb. 3.17 Fern-UV-CD von InJ in Abhängigkeit von der Temperatur. (A) Fern-UV CD-Signal des InJ bei kontinuierlich steigender Temperatur von 10 bis 70 °C (1 K/min). **(B)** Fern-UV CD-Spektren des InJ bei 10 °C und bei 70 °C. Die Proteinkonzentration betrug $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, im Standard-Nativpuffer angesetzt.

Es wurde der Versuch unternommen, Pufferbedingungen zu identifizieren, die zu einer reversiblen Faltungsreaktion führen. Hierzu wurden Messungen in einem ausgedehnten pH-Bereich (pH 2-10) vorgenommen. Die Puffersubstanzen wurden in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt, die Salzkonzentration sowie die Konzentration an Reduktionsmittel TCEP wurden beibehalten. Die Puffer Glycin (pH 2), Acetat (pH 4), Citrat (pH 5), MES (pH 6) und Glycin (pH 10) führten zu hochmolekularen, unlöslichen Aggregaten, die bereits während der Messung sedimentierten. Die Puffer MOPS (pH 7), Tris (pH 8) und CHES (pH 9) führten zu den oben beschriebenen niedermolekularen Aggregaten. Die Proben aus diesen Experimenten waren optisch unauffällig, jedoch konnte das Vorhandensein von Aggregaten durch Lichtstreuungsmessungen bestätigt werden.

Das in der Abb. 3.17 dargestellte Experiment erfolgte bei einer Proteinkonzentration von $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. In weiteren Versuchen, die Aggregationsneigung zu reduzieren, wurde z.B. die Konzentration auf $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ erniedrigt. Weiterhin wurde auch der Einfluss des Reduktionsmittels überprüft. Denkbar ist, dass die Aggregationsneigung von InJ auf Cysteinen beruht, die durch die Entfaltung exponiert sind. Daher wurde z.B. mit und ohne Reduktionsmittel (TCEP, DTT) gearbeitet, jedoch konnten hierbei keine Veränderungen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Keine der verwendeten Pufferbedingungen ermöglichte eine thermisch-reversible Entfaltung.

Die thermisch-behandelte InJ Probe (Standardpufferbedingungen) wurde ebenfalls mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Dabei wurden zwei Spezies detektiert mit Stokes-Radien von 38 nm und 8-9 nm. Beide Populationen wurden in der DLS-Größenverteilung gut aufgelöst. Unter Annahme einer sphärischen Partikelform entspricht der Stokes-Radius von 38 nm in etwa der Größe eines Viruspartikels. Der beobachtete Partikelradius von 8-9 nm könnte einem weiteren

oligomerisierten Zustand entsprechen. Vergleichsmessungen mit nativem InIj ergaben einen Stokes-Radius von 3-4 nm für das monomere Protein. Die starken Streuintensitäten der größeren Spezies erschweren zwar die Größenbestimmung des kleineren Partikels, aber als grobe Abschätzung entspricht der Radius von 8-9 nm einem Oligomerisierungsgrad zwischen Tetramer und Dekamer. Eine genauere Auswertung ist nur bei Kenntnis der Morphologie möglich.

Auffällig ist, dass die Radien der temperaturinduzierten Partikel kleiner sind als die der in 1.8 M GdmCl beobachteten Spezies (Kap. 3.3.1.3). Außerdem sind die thermisch hervorgerufene Oligomere schärfer definiert im Vergleich zu den GdmCl-induzierten Partikeln. Es folgt daraus, dass es sich um unterschiedliche Spezies und damit unterschiedliche Assoziationsmechanismen handeln muss.

3.3.2 Charakterisierung der Faltungsreaktion

Zur allgemeinen Charakterisierung der Proteinfaltung gehört neben den thermodynamischen Studien auch die Bestimmung der kinetischen Parameter. Kinetische Experimente sind generell besser geeignet, um transient-populierte Intermediate zu detektieren. Daraus folgt, dass in Gleichgewichtsexperimenten weitaus mehr Proteine das Zweizustandsmodell unterstützen als in den kinetischen Untersuchungen. Die Auftragung der logarithmierten Geschwindigkeitsraten gegen die GdmCl-Konzentration wird aufgrund seiner typischen Form als Chevronplot bezeichnet. Eine solche Darstellung ermöglicht weitergehende Analysen der Faltungs- und Entfaltungsreaktionen sowie Aussagen über den Übergangszustand. Im Idealfall stimmen die kinetisch bestimmten Stabilitätsparameter mit den thermodynamischen Parametern überein (Kap. 3.3.2.5).

3.3.2.1 Chemisch-induzierte Entfaltungskinetiken von InIj

Die initiierten Entfaltungsreaktionen wurden in der Regel fluoreszenzspektroskopisch untersucht und resultierten in einer monophasisch verlaufenden Kinetik. Im Konzentrationsbereich von 4 bis 8 M GdmCl konnten die Kinetiken im Anschluss an die manuelle Mischung gemessen werden. GdmCl-Konzentrationen unter 4 M führten zu sehr langsamen Entfaltungsgeschwindigkeiten und damit unverhältnismäßig langen Messzeiten. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die zur Geschwindigkeitsbestimmung angesetzten Proben täglich vermessen und somit Langzeitkinetiken erhalten (siehe unten).

Ergebnisse aus der manuellen Mischung

Aufgrund der langsamen Entfaltungsgeschwindigkeiten konnte die gesamte Amplitudenänderung aufgelöst werden. Die Totzeit der manuellen Mischung betrug ca. 4-6 s. Die Daten konnten mit Hilfe einer einphasigen Exponentialfunktion angepasst werden (Abb. 3.18).

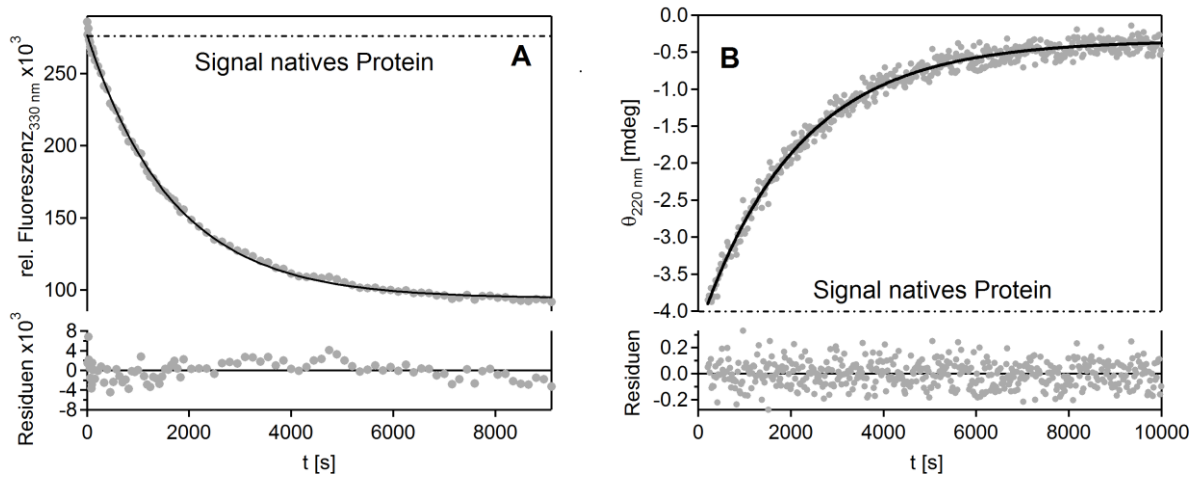


Abb. 3.18 Entfaltungskinetiken von InI. (A) Fluoreszenzänderung während der Denaturierung in 5.95 M GdmCl mit $k_u = 5.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Die Anregung erfolgte bei 280 nm und die Emission bei 330 nm. (B) Fern-UV CD-Signal während der Denaturierung in 5.9 M GdmCl mit $k_u = 4.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Die Detektion erfolgte bei 220 nm. Die Anpassung wurde nach der monophasischen Exponentialfunktion durchgeführt, und das Fitresultat ist durch eine Linie dargestellt. Im unteren Teil sind die Residuen der Regression abgebildet. Die Kinetiken wurden bei 20 °C im Standardpuffer wechselnder GdmCl-Konzentrationen aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug bei der Fluoreszenzmessung $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und im Falle der CD-Spektroskopie $50 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Die exemplarisch durchgeführten Fern-UV CD-Messungen zeigten übereinstimmende Ergebnisse zu den fluoreszenzspektroskopisch erhaltenen Daten. Abb. 3.18 B zeigt dies am Beispiel der Entfaltung bei 5.9 M GdmCl. Zum Vergleich betrug die Geschwindigkeit während der fluoreszenzdetektierten Entfaltung $5.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (5.95 M GdmCl) und während der CD-detektierten Entfaltung $4.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (5.9 M GdmCl).

Langzeitkinetiken

Da die Entfaltung bei GdmCl-Konzentrationen zwischen 2 M und 3.5 M mehrere Tage in Anspruch nahm, konnte diese nicht simultan verfolgt werden. Im ersten Schritt wurden die Proben analog zum Gleichgewichtsexperiment hergestellt und täglich vermessen. Im zweiten Schritt wurden die somit erhaltenen Messdaten nachträglich kombiniert und monophasisch angepasst (Abb. 3.19). Auf diese Weise konnten die Entfaltungskinetiken rekonstruiert und die Relaxationsraten bestimmt werden (Kuster & Seckler, 2008).

Bei logarithmischer Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten der Faltungs- und Entfaltungsreaktionen wird eine lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration erwartet (Kap. 1.1.2). In Abb. 3.20 ist die Gegenüberstellung der logarithmierten Entfaltungskonstanten gegen die GdmCl-Konzentration zu sehen. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung zeigen eine lineare Abhängigkeit und die Entfaltungsraten aus den Langzeitkinetiken bestätigen diese Linearität.

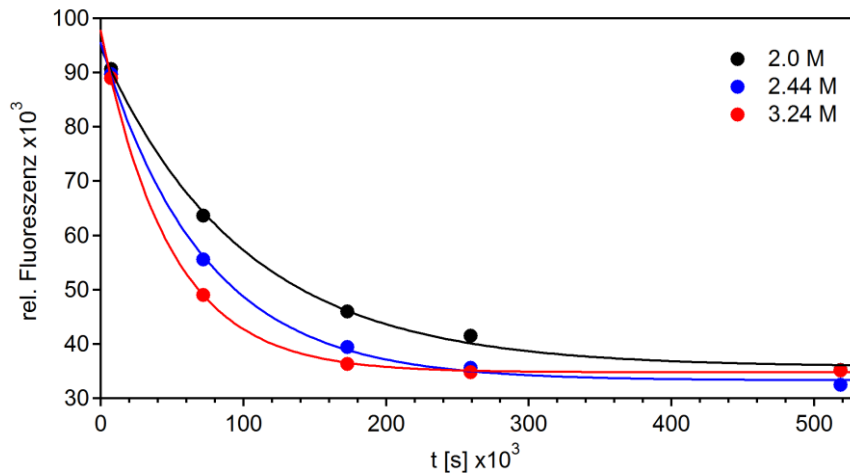


Abb. 3.19 Exemplarische Darstellung der Entfaltungskinetiken von InI1 bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen.

Die Kinetiken entstanden als Rekonstruktion aus Einzelmessungen. Die Punkte geben die Messdaten wieder, die Linien dagegen den monoexponentiellen Fit bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen (2.0 M GdmCl (●), 2.44 M GdmCl (●) und 3.24 M GdmCl (●)). Die Messungen erfolgten bei 20 °C im Standard-Puffer wechselnder GdmCl-Konzentrationen. Die Proteinkonzentration betrug 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

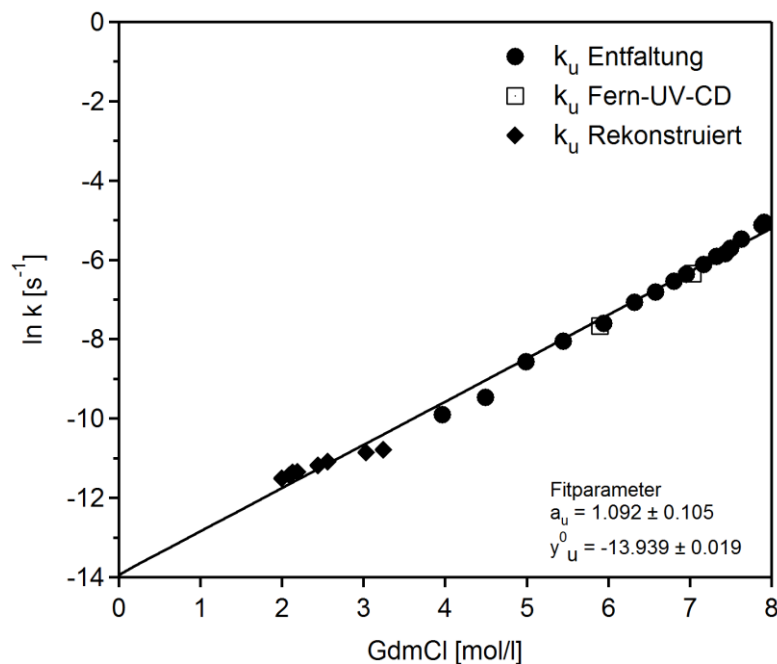


Abb. 3.20 Entfaltungsraten als Funktion der GdmCl-Konzentration. Dargestellt sind die apparenten Relaxationsraten k_u aus dem Rekonstruktionsexperiment (◆), den fluoreszenzdetektierten Messungen (●) und den CD-Messungen im fernen UV-Bereich (□). Die durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer linearen Anpassung, deren Parameter ebenfalls abgebildet sind, wie auch die mit dem Fit ausgegebenen Fehler. Die Messungen wurden bei 20 °C im Standardpuffer wechselnder GdmCl-Konzentrationen durchgeführt. Die fluoreszenzdetektierten Entfaltungsraten wurden aus einer Dreifachbestimmung gewonnen. Die somit bestimmten Standardabweichungen sind zu klein, um dargestellt zu werden (kleiner als die Symbole). Der maximale Fehler von $\ln k_u$ beträgt ± 0.07 , der durchschnittliche dagegen ± 0.03 .

Basierend auf den Fitparametern lässt sich die Geschwindigkeitskonstante am Übergangsmittelpunkt berechnen. Der Übergangsmittelpunkt liegt laut Gleichgewichtsübergang bei 1.78 ± 0.03 M GdmCl (Kap. 3.3.1.1). Die Extrapolation der Denaturierungsraten ergibt eine Halbwertszeit τ_u von 1.6×10^5 s für die Entfaltungsreaktion bei 1.78 M GdmCl. Dies entspricht 1.9 Tagen und erklärt die lange Inkubationszeit der Übergänge bis zum Erreichen des Gleichgewichts.

Die Fluoreszenz beschreibt hauptsächlich die Umgebung der Tryptophane (W65 und W472), im Wesentlichen also die Tertiärstruktur von InJ an dessen N- und C-Terminus. Das Fern-UV CD-Signal liefert dagegen Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins. Signalgebend hierfür sind hauptsächlich die β -faltblatthaltigen Domänen (LRR-Motiv und IR-Domäne). Die Übereinstimmung der Fluoreszenz- und CD-basierten Daten deutet darauf hin, dass die Änderung der Tertiärstruktur als auch der Sekundärstruktur gleichzeitig erfolgt. Demnach verläuft die Entfaltung von InJ in einem kooperativen Prozess.

3.3.2.2 pH-Abhängigkeit der Entfaltung

Auf der Suche nach den Standardparametern zur Durchführung der kinetischen und thermodynamischen Experimente gab es deutliche Hinweise auf den starken Einfluss des pH-Wertes auf die Entfaltungsreaktion. Um mögliche Konsequenzen für das experimentelle *set-up* abzuschätzen, wurden die Entfaltungsraten in dem relevanten pH-Bereich untersucht.

Alle aufgenommenen Entfaltungskinetiken (6 M GdmCl) sind einphasig und konnten monoexponentiell angepasst werden. Die apparenten Entfaltungsraten wurden logarithmiert und gegen den verwendeten pH aufgetragen (Abb. 3.21). Die schnellste Entfaltung wurde bei pH 5.0 beobachtet. Die niedrigsten Geschwindigkeitskonstanten sind in dem pH-Bereich vom 6.5 bis 7.5 zu finden. Der Unterschied zwischen der Entfaltungsreaktion bei pH 5.0 und dem niedrigsten Wert bei pH 7.0 beträgt ca. 0.7 Einheiten. Die Halbwertszeiten ($\tau = 1/k$) variieren damit für die Entfaltungsreaktion zwischen 20 und 37 min.

Die titrierbaren Gruppen in diesem pH-Bereich sind Asp (pK_a 3.7), Glu (pK_a 4.3), His (pK_a 6.0) und Lys (pK_a 9.7) (Nelson *et al.*, 2008). Der individuelle pK_a -Wert der Aminosäuren ist allerdings stark von deren Mikroumgebung abhängig. Die am wahrscheinlichsten in Frage kommende Aminosäure ist Histidin, dessen Protonierungszustand die Stabilität des Proteins beeinflusst. Das Stabilitätsoptimum ist bei dem pH mit den niedrigsten Geschwindigkeitskonstanten (pH 7.0) zu finden.

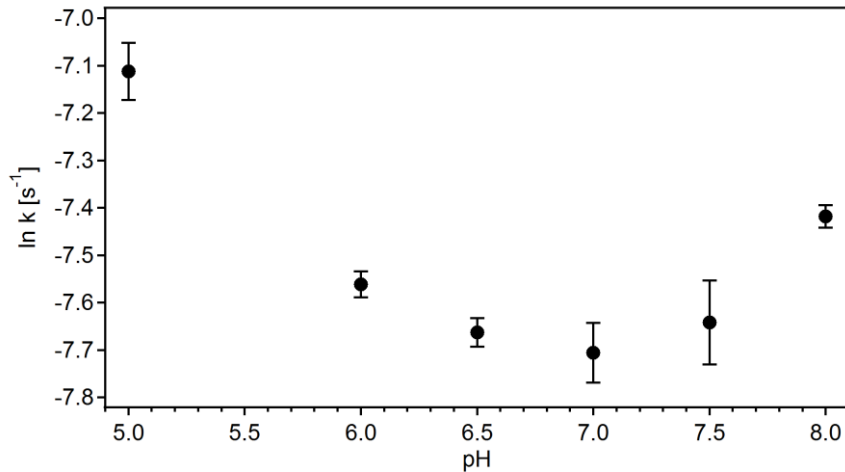


Abb. 3.21 Entfaltungsreaktion in 6 M GdmCl in unterschiedlichen Puffersystemen. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen aus einer Dreifachbestimmung. Der durchschnittliche Fehler von $\ln k$ lag bei ± 0.05 , der maximale bei ± 0.09 . Salz- und Additivkonzentrationen waren in allen Fällen gleich: 100 mM NaCl, 1 mM TCEP. Die Konzentration der Puffersubstanz betrug jeweils 50 mM (Acetat, pH 5; Natriumphosphat, pH 6 bis 7.5; Tris, pH 8). Die Proteinkonzentration lag bei $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und die Temperatur bei 20°C .

Die Dissertation von Marion Becker (Becker, 2009) beschreibt umfassend die Schwierigkeiten bei der pH-Einstellung von denaturierungsmittelhaltigen Puffern. Die fehlerbehaftete Messung des pH-Wertes bei hohen GdmCl-Konzentrationen ist demnach ein schwerwiegendes Problem. Die Abhängigkeit des pH-Wertes von der Aktivität des GdmCl-Salzes in Lösung führt zu pH-Unsicherheiten (Acevedo *et al.*, 2002). Aus diesen Gründen hat sich ein stark standardisiertes Vorgehen bei der Herstellung denaturierungsmittelhaltiger Puffer bewährt (Kap. 2.2.3.6). Auf dieser Basis wurden Puffer verschiedenster GdmCl-Konzentrationen einheitlich durch das Kombinieren von Nativpuffer und Denaturierungspuffer (8 M GdmCl) hergestellt. Dennoch bleibt festzuhalten, dass die Faltung sensitiv auf pH-Änderungen reagiert und dies eine potentielle Fehlerquelle darstellt.

3.3.2.3 Die schnelle Renaturierungsreaktion

Renaturierungsreaktionen werden im Allgemeinen initiiert, indem vollständig entfaltetes Protein aus denaturierenden Bedingungen möglichst schnell in native Bedingungen überführt wird. Experimentell wird dies dadurch gewährleistet, dass Protein aus hohen GdmCl-Konzentrationen in Puffer mit niedrigen GdmCl-Konzentrationen verdünnt wird.

Der Versuch, die Renaturierungsreaktion durch manuelles Mischen (1:100 Verdünnung) zu starten, führte zu unerwarteten Ergebnissen. Unabhängig von der Endkonzentration des GdmCl in den Ansätzen wurde nach einer Totzeit von 4-6 s die Signalintensität sowie das Spektrum des nativen Proteins beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in CD-Experimenten beobachtet, wobei die Totzeit wegen der experimentellen Anordnung sich in diesem Fall auf ca. 20 s erhöhte. Aufgrund

dieser schnellen Signaländerung wurden die nachfolgenden Renaturierungsmessungen mittels einer *stopped-flow*-Apparatur durchgeführt. Somit wurde die Mischzeit und damit auch die Totzeit auf ca. 2 ms reduziert. Bei dieser Methode wurde InI ($180 \mu\text{g ml}^{-1}$) aus 2.5 M GdmCl in die jeweiligen Renaturierungspuffer verdünnt (1:6) (Kap. 2.2.3.4).

Durch die *stopped-flow*-Technik konnte der schnelle Fluoreszenzanstieg während der Renaturierungsreaktion aufgelöst werden. Allerdings konnte die Reaktion erst ab einer GdmCl-Konzentration von 0.5 M detektiert werden. Bei geringeren Konzentrationen fand der Fluoreszenzanstieg innerhalb der Totzeit der *stopped-flow*-Anlage (2 ms) statt.

Bei Konzentrationen zwischen 0.5 und 0.8 M GdmCl ließ sich eine monophasische Reaktion beobachten (Abb. 3.22 A). Die Faltungsrate ($k_{f \text{ fast } 1}$) sowie die Amplitude ($A 1$) konnten daher mittels der monoexponentiellen Anpassung erhalten werden.

Bei Konzentrationen über 0.8 M wurde eine zweite Phase ($k_{f \text{ fast } 2}$, $A 2$) nachgewiesen, die besonders deutlich wird, wenn die Kinetik lediglich monoexponentiell angepasst wird (Abb. 3.22 B). Die systematische Abweichung der Residuen von der Nulllinie verdeutlicht die Unzulänglichkeit des monoexponentiellen Fits. Die biexponentielle Regression beschreibt die Messergebnisse hingegen optimal (Abb. 3.22 C). Die Amplitude ($A 2$) der zweiten, langsameren Faltungsphase nimmt mit steigender GdmCl-Konzentration immer weiter zu, während die Amplitude der schnellen Phase ($A 1$) proportional dazu abnimmt (Abb. 3.23 B). Ab einer GdmCl-Konzentration von etwa 1.5 M GdmCl konnte eine dritte Phase beobachtet werden ($k_{f \text{ fast } 3}$, $A 3$) (Abb. 3.22 D, E). Es konnte jedoch bei keiner GdmCl-Konzentration die Gesamtamplitude der Reaktion aufgelöst werden (siehe unten). Die mittels *stopped-flow* erhaltenen Faltungsraten hängen linear von der GdmCl-Konzentration ab (Abb. 3.23 A).

Das Auftreten mehrerer Phasen bei kinetischen Experimenten deutet auf komplexe Faltungsprozesse hin. Mögliche Erklärungen für multiple Phasen bieten transient-auftretende, kinetische Faltungsintermediate, oder auch parallele Faltungswege. Wendet man seine Aufmerksamkeit den Amplituden der Faltungsreaktion zu, so wird deutlich, dass die Amplituden der schnellen Faltungsphasen sich reziprok zueinander verhalten (Abb. 3.23 B). Die Amplitude der schnellen Phase ($A 1$) nimmt mit steigender GdmCl-Konzentration ab. Die Amplitude der zweitschnellsten Phase ($A 2$) gewinnt dagegen stetig an Signal. Ordnet man den Phasen mögliche Intermediate zu, so wird das erstauftretende Intermediat durch höhere GdmCl-Konzentrationen zunehmend destabilisiert. Im Gegensatz dazu wird das kinetisch nachfolgende Intermediat bei höheren GdmCl-Konzentrationen stabilisiert. Auch Proteine, die im thermodynamischen Gleichgewicht als Zweizustandsfalter auftreten, können transiente Intermediate aufweisen.

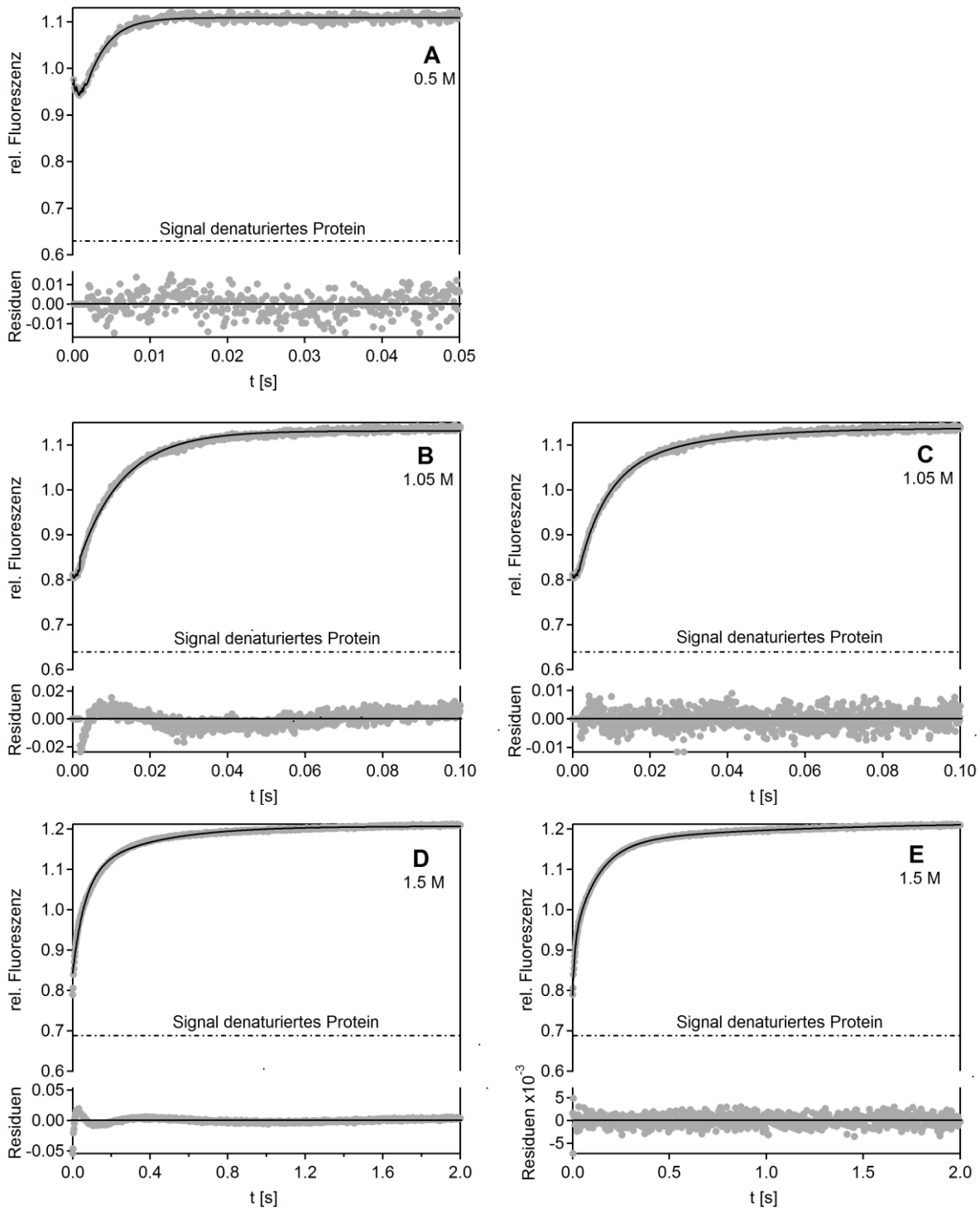


Abb. 3.22 Faltungskinetiken von InI_J. Fluoreszenzänderung während der Rückfaltung initiiert in der *stopped-flow*-Apparatur. **(A)** stellt die Faltungsreaktion $k_{f\ fast}$ bei 0.5 M GdmCl dar. Die Linie resultiert aus der monoexponentiellen Regression ($k_{f\ fast1} = 360\ \text{s}^{-1}$). **(B)** und **(C)** stellen die Faltungsreaktion bei 1.05 M GdmCl dar. **(B)** wurde monoexponentiell gefittet, **(C)** dagegen biexponentiell ($k_{f\ fast1} = 146\ \text{s}^{-1}$; $k_{f\ fast2} = 42\ \text{s}^{-1}$). **(D)** und **(E)** entstammen einer Faltungsreaktion bei 1.5 M GdmCl. In **(D)** ist der biexponentielle Fit und in **(E)** der triexponentielle Fit ($k_{f\ fast1} = 90\ \text{s}^{-1}$; $k_{f\ fast2} = 8.2\ \text{s}^{-1}$; $k_{f\ fast3} = 0.93\ \text{s}^{-1}$) dargestellt. Die ersten 2 ms wurden vom Fit ausgeschlossen. Im unteren Teil der Darstellungen sind die Residuen der jeweiligen Regressionen abgebildet. Die Messungen erfolgten bei 20 °C und im Standardpuffer unterschiedlicher GdmCl-Konzentration. Die Proteinkonzentration betrug 30 $\mu\text{g}\ \text{ml}^{-1}$. Die Kinetiken wurden als Mittelung aus 8-10 Einzelmessungen erhalten.

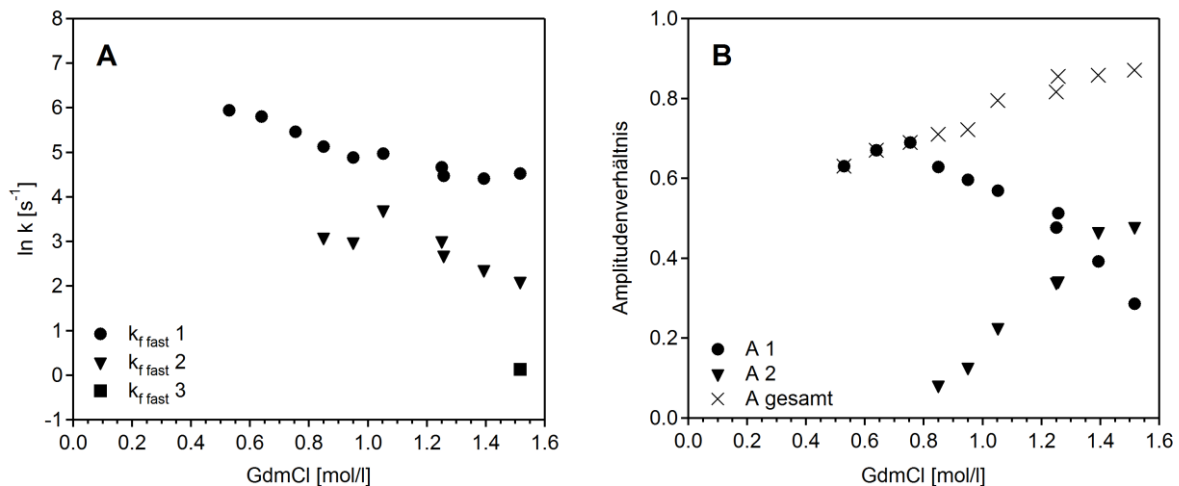


Abb. 3.23 GdmCl-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten ($k_{f\ fast}$) und Amplituden der Faltung. (A) Dargestellt ist der natürliche Logarithmus der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der schnellsten $k_{f\ fast\ 1}$ (●) und der beiden langsameren Faltungsphasen $k_{f\ fast\ 2}$ (▼) und $k_{f\ fast\ 3}$ (■) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Darstellung zeigt nur einen Ausschnitt des Chevronplots. **(B)** Relative Amplituden der beiden schnelleren Faltungsphasen A 1 (●), A 2 (▼) und die Summe aller Amplituden (×) abgebildet in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C und im Standardpuffer wechselnder GdmCl-Konzentrationen. Die Proteinkonzentration betrug 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Die beobachtbare relative Amplitude beträgt nicht wie theoretisch zu erwarten wäre 100 % (Abb. 3.23 B). Die Faltung bei 0.5 M GdmCl wird durch 63 % der Amplitude beschrieben. Mit steigender GdmCl-Konzentration nimmt die beobachtbare Gesamtamplitude ebenfalls zu. Dabei werden maximal 87 % der Gesamtamplitude erreicht. Höchstwahrscheinlich kommt die Totzeitamplitude durch die schnellen Kinetiken zustande, die am Rande des Messfensters der *stopped-flow*-Apparatur stattfinden. Die apparente Geschwindigkeitskonstante $k_{f\ fast\ 1}$ bei einer GdmCl-Konzentration von 0.5 M beträgt 380 s^{-1} (Halbwertszeit: 2.6 ms). Da die Totzeit der *stopped-flow* Experimente bei ca. 2 ms liegt, erscheint diese Vermutung plausibel. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine weitere schnellere Reaktion mit geringer Signalamplitude nicht aufgelöst wird.

Ein weiterer Grund für mehrphasige Faltungskinetiken könnte das Vorkommen von konkurrierenden Aggregationsreaktionen sein (Silow & Oliveberg, 1997). Da die Aggregationsreaktion stark von der initialen Proteinkonzentration abhängt, kann dieser Umstand zur Ursachenforschung genutzt werden (Kiefhaber *et al.*, 1991). Liegt außer einer Faltungsreaktion auch Aggregation vor, wird bei Erhöhung der Proteinkonzentration die mit der Aggregation assoziierte Rate erhöht. Die Geschwindigkeit der Faltung bleibt dagegen unbeeinflusst. Zur Überprüfung von Aggregationseinflüssen wurde die Proteinkonzentration zwischen 5 und 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ variiert (Abb. 3.24). Die GdmCl-Konzentration wurde auf 1.1 M festgelegt. Bei dieser GdmCl-Konzentration ist die Kinetik gut messbar, aber ein beträchtlicher Teil der Gesamtamplitude (20 %) ist noch nicht aufgelöst. Bei der relativ geringen

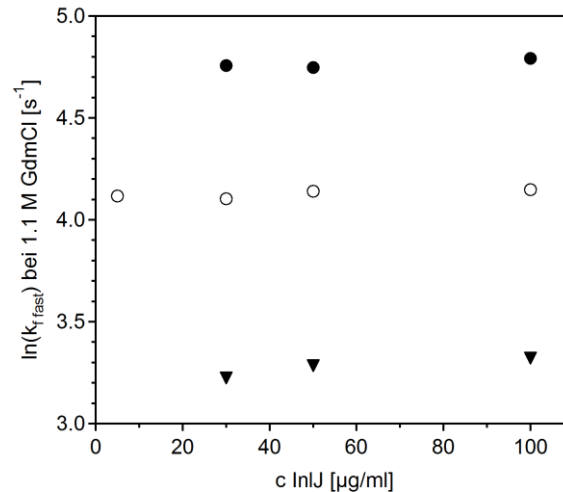


Abb. 3.24 Logarithmierte Faltungsraten in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Monoexponentiell (○) und biexponentiell angepasste Raten ($k_{f,fast1}$ (●), $k_{f,fast2}$ (▼)). Alle Messungen erfolgten bei 20 °C, im Standardpuffer bei 1.1 M GdmCl.

Proteinkonzentration von $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ konnte aufgrund des schwachen Signals mit starker Streuung der Messwerte keine verlässliche biexponentielle Anpassung vorgenommen werden. Bei Proteinkonzentrationen über $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ erlaubte das S/R-Verhältnis eine Auflösung in mehrere Phasen. Dabei wurden zweiphasige Kinetiken registriert, deren Raten ungeachtet der Proteinkonzentration konstant blieben. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden zusätzlich alle Rohdaten monoexponentiell angepasst und ebenfalls in der Abb. 3.24 dargestellt. Hier konnte ebenso keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration beobachtet werden. Damit lässt sich ausschließen, dass Aggregationsprozesse für die mehrphasigen Kinetiken in den *stopped-flow* Experimenten verantwortlich sind.

3.3.2.4 Die Renaturierungsreaktion im Doppelsprungexperiment

Die bisher dargelegten Faltungsuntersuchungen zeigen auf, dass sich Faltungs- ($k_{f,fast}$) (Abb. 3.23 A) und Entfaltungsraten (k_u) (Abb. 3.20) im Übergangsmittelpunkt um mehrere Größenordnungen unterscheiden. Dabei sollten nach $k_{app} = k_f + k_u$ die apparenten Geschwindigkeitskonstanten im Übergangsmittelpunkt übereinstimmen.

Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung im Übergangsmittelpunkt (1.78 M GdmCl) wurde durch Extrapolation ermittelt und beträgt ca. $k_u = 6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Somit ist diese im Chevronplot bei ca. $\ln k_u = -12$ zu finden (Abb. 3.20). Die mittels *stopped-flow* erhaltenen Faltungsraten bei 1.78 M GdmCl liegen nach dem Logarithmieren aber im positiven Wertebereich, bei ca. $\ln k = 6$ bis $\ln k = 0$ (Abb. 3.23 A). Die langsamste Faltungsphase wäre demnach am Übergangsmittelpunkt bei einer Rate von ca. 1 s^{-1} zu finden. Damit liegen die schnellen Faltungsraten mindestens 6 Größen-

ordnungen von der Entfaltungsrates im Übergang ($k_u = 6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) entfernt. Daher kann angenommen werden, dass die detektierten Fluoreszenzsignale nicht von der Bildung des vollständig nativen Proteins herrühren. Es ist wahrscheinlicher, dass die Fluoreszenzänderung durch die Bildung eines metastabilen Intermediats verursacht wird (Matouschek & Fersht, 1991). Um ausschließlich die Bildung von nativem Protein und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zu beobachten, kann man sich mit dem so genannten inversen Doppelsprungexperiment ($D \rightarrow N \rightarrow D$) behelfen (Kap. 2.2.3.5) (Cook *et al.*, 1979; Schmid, 1983, 1986). Im englischen Sprachgebrauch wird diese Experimentanordnung als *interrupted refolding experiment* bezeichnet. Bei dem inversen Doppelsprungexperiment wird die hohe Energiebarriere zwischen dem nativen Protein und den Intermediaten ausgenutzt. Es wird davon ausgegangen, dass die bei der Rückfaltung entstehenden Intermediate gegenüber dem vollständig gefalteten Zustand deutlich destabilisiert sind.

Als Ausgangsbedingung für dieses Experiment wird das Protein zunächst vollständig entfaltet. Im nächsten Schritt wird das entfaltete Protein unter renaturierende Bedingungen gesetzt. Anschließend wird die Renaturierungsreaktion nach einem variablen Zeitintervall durch erneute Denaturierung gestoppt. Demzufolge enthält die Proteinlösung, je nach Dauer des Rückfaltungsschrittes, natives Protein sowie intermediäre Zustände. Während der Denaturierung ist anhand der apparenten Geschwindigkeitsraten erkennbar, ob lediglich natives Protein oder auch Faltungsintermediate entstanden. Dabei entfalten letztere aufgrund ihrer Instabilität schneller als das native Protein. Die Denaturierungsbedingungen wurden allerdings auf 2.6 M GdmSCN eingestellt, um die Entstehung von nativem Protein optimal zu verfolgen. Durch mildere Denaturierungsbedingungen ließen sich unter Umständen auch leicht stabilisierte, intermediäre Zustände beobachten.

Zunächst wurde in einem Kontrollexperiment die direkte Entfaltung von nativem InI in 2.6 M GdmSCN beobachtet. Die Abklingkurve konnte vollständig durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 3.25 B). Die Amplitude zeigt dabei die maximal mögliche Signaländerung. Nachfolgend wurde ein Aliquot der vollständig entfalteten Probe in Puffer mit GdmCl-Konzentrationen zwischen 1.4 M und 1.7 M überführt. Nach dem Rückfaltungsschritt entsprach die Rate der Entfaltung bei 2.6 M GdmSCN vollständig der im Kontrollexperiment beobachteten Rate und blieb unabhängig von der Renaturierungszeit (Abb. 3.25). Damit ist eindeutig belegt, dass bei der Renaturierung vollständig natives InI gebildet wird. Durch die Auswertung der erreichten Amplitude kann auf die Menge des nativen Proteins zum Zeitpunkt des zweiten Sprungs geschlossen werden (Abb. 3.26).

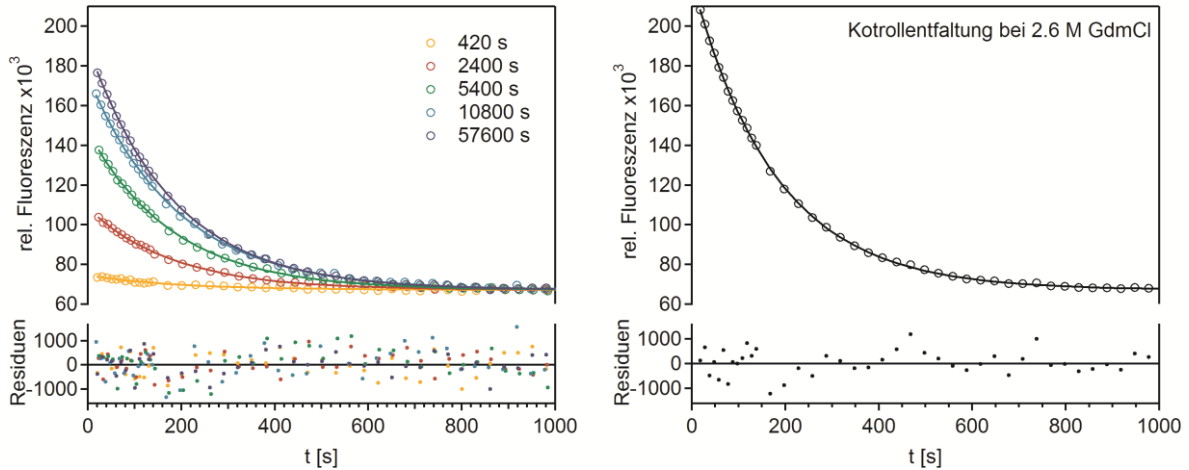


Abb. 3.25 Exemplarische Darstellung der Denaturierungsreaktionen im Doppelsprung nach unterschiedlich langer Renaturierungszeit (A) und die Darstellung der Kontrollkinetik in 2.6 M GdmCl (B). (A) Die Renaturierung erfolgte bei 1.66 M GdmCl. Es wurden ausgewählte Denaturierungskinetiken als offene Symbole (o) dargestellt. Die Kinetiken werden der Renaturierungsdauer entsprechend farblich unterschieden. Die aus dem monoexponentiellen Fit resultierenden Regressionen sind als Linien abgebildet. Im unteren Teil der Darstellungen sind die Residuen der jeweiligen Regressionen abgebildet. Die Denaturierungskinetiken wurden dem Endwert der Kontrollkinetik entsprechend normiert. (B) Das Kontrollexperiment wurde mit nativem InI durchgeführt im Standardpuffer mit 2.6 M GdmSCN. Die Fluoreszenzmessungen wurden erhalten durch Anregung bei 280 nm und Emission bei 330 nm.

Die Entstehung von nativem Protein in Abhängigkeit von der Rückfaltungszeit konnte durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Abb. 3.26). Der monoexponentielle Verlauf blieb bei allen untersuchten GdmCl-Konzentrationen erhalten. Der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Faltung von nativem InI konnte somit identifiziert werden. Die dadurch erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden in die Konstruktion des Chevronplots im Kapitel 3.3.2.5 mit einbezogen.

Die Gesamtamplitude ließ sich durch die zusammengesetzten Kinetiken nicht immer auflösen. Dies könnte ein Hinweis auf konkurrierende Reaktionen sein. Allerdings stand die Endamplitude der Renaturierung weder im Zusammenhang mit der GdmCl-Konzentration im Renaturierungsansatz noch mit der Inkubationslänge oder der Verweildauer im denaturierten Zustand. Um das Aggregationspotential zu minimieren, wurden die Experimente nur mit frisch aufgetautem Protein durchgeführt und innerhalb von einem Tag abgeschlossen.

Die manuelle Durchführung der Doppelsprungexperimente war nur in einem engen GdmCl-Konzentrationsbereich zwischen 1.4 M und 1.7 M möglich. Darin spiegelt sich die sehr starke Abhängigkeit der Faltungsraten von der GdmCl-Konzentration wider (Abb. 3.27). Um den Verlauf der Faltungsreaktion bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen zu bestimmen, müssten weitere Doppelsprungexperimente mit Hilfe der *sequential-mixing stopped-flow* Apparatur durchgeführt werden.

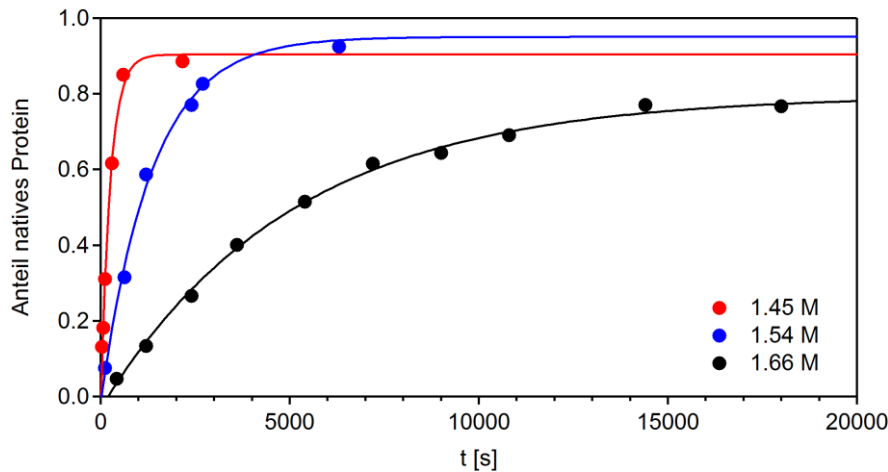


Abb. 3.26 Ergebnisse der Doppelsprungexperimente zur Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der InJ-Faltung. Die Punkte markieren die zum jeweiligen Renaturierungszeitpunkt gemessenen Amplituden und die Linien die monoexponentielle Regression bei 1.45 M GdmCl (●), 1.54 M GdmCl (●) und 1.66 M GdmCl (●). Alle Messungen erfolgten bei 20 °C im Standardpuffer mit unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen.

Um die signifikante langsame Faltungsreaktion eingehend zu untersuchen, ist das Verhalten bei den GdmCl-Konzentrationen unterhalb von 1.4 M wichtig. Möglich und wahrscheinlich ist es, dass die produktive Faltung ($k_{f\ slow}$) in der Chevronauftragung bei niedrigen GdmCl-Konzentrationen eine bogenförmige Krümmung aufweist (*kinetic rollover*) und somit unterhalb der schnellen Faltungsphasen ($k_{f\ fast}$) bleibt. Unter nativen Bedingungen kommt es oft zu einer Verlangsamung der Faltungsgeschwindigkeiten. Man nimmt an, dass die Abweichung von der Linearität durch komplexe Faltungsmechanismen zustande kommt. In den meisten Fällen wird die Krümmung auf transiente Bildung von metastabilen Intermediaten zurückgeführt (Brockwell & Radford, 2007). Nach (Oliveberg, 1998) kann die Krümmung außerdem auf transiente Aggregation oder auf ein sogenanntes Hammond-Verhalten hindeuten. Letzteres wird durch das Denaturierungsmittel induziert und entspricht einer Bewegung des geschwindigkeitslimitierenden Übergangszustands auf der Reaktionskoordinate entlang einer breiten Aktivierungsbarriere.

3.3.2.5 Kinetische Analyse des Faltungsverhaltens von InI (Chevronplot)

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung k_f sowie der Entfaltung k_u wurden in einem sogenannten Chevronplot zusammengestellt (Abb. 3.27). Die Geschwindigkeitskonstanten hängen linear von der Denaturanzkonzentration $[D]$ ab [Gl. 1.2], [Gl. 1.3]. Dies ermöglicht die Bestimmung der Kooperativität m und der Geschwindigkeitskonstanten in Abwesenheit von Denaturierungsmittel k^{H_2O} .

$$\ln k_f = k_f^{H_2O} + m_f \cdot [D] \quad [\text{Gl. 1.2}]$$

$$\ln k_u = k_u^{H_2O} + m_u \cdot [D] \quad [\text{Gl. 1.3}]$$

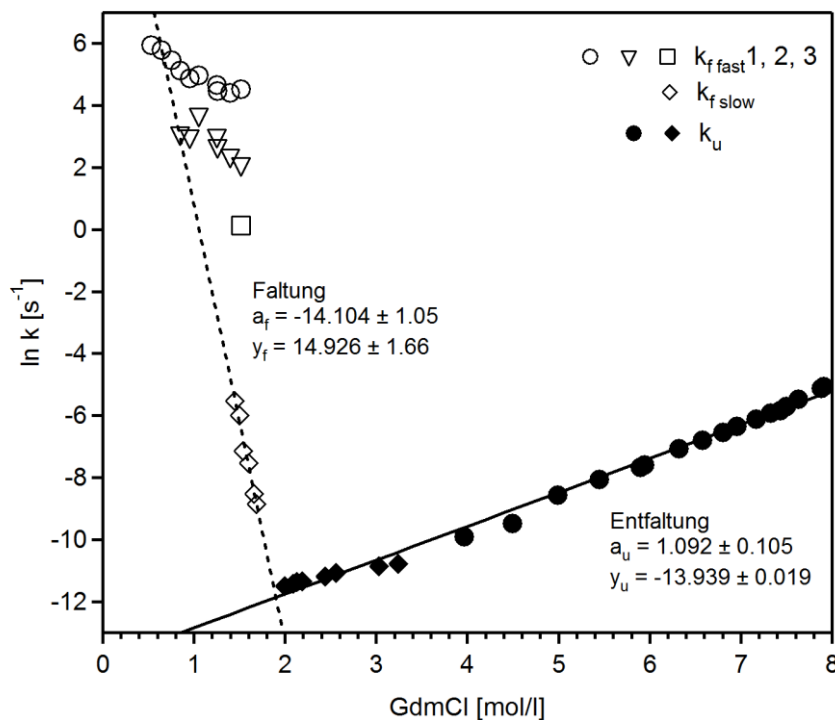


Abb. 3.27 Faltungs- und Entfaltungskinetiken von InI in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die schnellen Geschwindigkeitskonstanten der Faltung ($k_{f,fast} 1, 2, 3$ (○), (▽) (□)) wurden mit Hilfe der *stopped-flow*-Technik bestimmt (Kap. 3.3.2.3). Die langsame Rate der Faltung ($k_{f,slow}$ (◇)) wurde durch die inverse Doppelsprungtechnik ermittelt (Kap. 3.3.2.4). Die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung wurden in Einzelexperimenten (●) und aus zusammengesetzten Experimenten (◆) bestimmt (Kap. 3.3.2.1). Die unterbrochene Linie gibt die Regression über die per Doppelsprung erhaltenen Relaxationsraten wieder. Die durchgezogene Linie ergibt sich aus der linearen Regression aller Relaxationsraten der Entfaltung. Die Regression erfolgte nach $y = y_f + a_f[D]$ bzw. $y = y_u + a_u[D]$, wobei y_f , y_u den Ordinatenabschnitt und a den Anstieg angibt. Aus y_f ergibt sich $k_u = \exp(y_f)$. Aus a_u ergibt sich $m_u = RT a_u$. Die durch die Regressionen erhaltenen Parameter und Fehlergrenzen sind ebenfalls abgebildet.

InIJ weist ein komplexes Faltungsverhalten auf. Die langsame Faltungsphase $k_{f\ slow}$ sowie die Raten der Entfaltung k_u zeigen eine eindeutig lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration, wobei die der Faltung (m_f) extrem steil ist. Die schnelleren Phasen der Faltung $k_{f\ fast}$ zeigen im Gegensatz dazu eine flachere lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die aus dem Fit resultierenden m -Werte und die Geschwindigkeitskonstanten sind in der Tab. 3.2 dargestellt.

Die kinetischen Parameter $k_f^{H_2O}$, m_f , $k_u^{H_2O}$ und m_u lassen sich verwenden, um die Gleichgewichtsparameter $\Delta G_N^{H_2O}$, m -Wert und $[D]_{0.5}$ indirekt zu bestimmen und diese den Ergebnissen aus den Gleichgewichtsexperimenten gegenüberzustellen. Ein solcher Vergleich der kinetisch und thermodynamisch erhaltenen Parameter ist eine relativ einfache Möglichkeit, um festzustellen, ob das Zweizustandsmodell berechtigterweise Anwendung findet (Jackson & Fersht, 1991). Unter der Voraussetzung, dass die beobachteten kinetischen Phasen die produktiven Faltungs- und Entfaltungsprozesse erfassen, gilt [Gl. 3.1]. Bei Vorliegen eines simplen Faltungsmechanismus mit zwei Zuständen N und U, beschreibt der m -Wert der Faltung (m_f) die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ΔASA) zwischen dem denaturierten Zustand und dem Übergangszustand. Analog dazu wird ΔASA zwischen dem Übergangszustand und dem nativen Zustand durch m_u beschrieben. Die Summe aus beiden sollte demnach bei Gültigkeit des Zweizustandsmodells den m -Wert des Gleichgewichtsexperiments ergeben [Gl. 3.1]. In komplizierteren Fällen kann der Gleichgewichts- m -Wert erst durch die Summe aller kinetischen m -Werte reproduziert werden.

Tab. 3.2 Kinetisch sowie thermodynamisch erhaltene Parameter der InIJ-Faltung

	Kinetische Parameter	Thermodynamische Parameter
$\ln(k_f^{H_2O})$	14.93 ± 1.05	–
m_f	-34.4 ± 2.6	–
$\ln(k_u^{H_2O})$	-13.94 ± 0.105	–
m_u	2.66 ± 0.26	–
$\Delta G_N^{H_2O}$	-70.3 ± 3.4	-86.7 ± 21.5
m	37.0 ± 2.6	48.7 ± 11.8
$[D]_{0.5}$	1.90 ± 0.17	1.78 ± 0.03

Parameter die durch kinetische Experimente bzw. Gleichgewichtsexperimente (Kap. 3.3.1.1) bestimmt wurden. Alle m -Werte sind in $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ angegeben, die freie Enthalpie der Faltung $\Delta G_N^{H_2O}$ ist in kJ mol^{-1} angegeben, der Übergangsmittelpunkt $[D]_{0.5}$ in M und die Geschwindigkeitskonstanten k in s^{-1} . Hier und in nachfolgenden Abschnitten ist von $k_{f\ slow}$ die Rede, wenn k_f erwähnt wird. Die kinetischen m -Werte m_f und m_u wurden durch $m = a RT$ erhalten. Die Fehler der kinetisch bestimmten Größen beruhen auf den Regressionsergebnissen bzw. sind durch Fehlerfortpflanzung erhalten worden.

Für das InI-System wurde ein m -Wert für die Faltung m_f von $-34.4 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und für die Entfaltung m_u von $2.66 \pm 0.26 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ermittelt. Die Summe beider ergibt den kinetischen m -Wert von $37.1 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Der m -Wert bestimmt aus dem Gleichgewichtsexperiment beträgt $48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Der Übergangsmittelpunkt $[D]_{0.5}$ und die Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O}$ können unter Verwendung von [Gl. 3.2] bzw. [Gl. 3.3] berechnet werden (Itzhaki *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1993a). Die Parameter sind in der Tab. 3.2 aufgeführt und stimmen innerhalb der angegebenen Messfehler mit den thermodynamisch erhaltenen Daten überein. Daher scheint die Anwendung des Zweizustandsmodells berechtigt zu sein. Die Ergebnisse zur Faltungsreaktion von InI sind stärker fehlerbehaftet als die der Entfaltungsreaktion, was auf die starke Abhängigkeit der Faltungsraten von der GdmCl-Konzentration zurückzuführen ist.

$$m = m_u + |m_f| \quad [\text{Gl. 3.1}]$$

$$[D]_{0.5} = \ln(k_f/k_u)/(a_u - a_f) \quad [\text{Gl. 3.2}]$$

$$\Delta G_N^{H_2O} = -RT \ln(k_f/k_u) \quad [\text{Gl. 3.3}]$$

Die hohe Kooperativität resultiert fast ausschließlich aus dem hohen m -Wert der Faltung. Der Chevronplot verdeutlicht, dass die hohe Stabilität des Proteins durch eine Kombination aus schneller Faltung und langsamer Entfaltung zustande kommt. Die Extrapolation des Faltungsastes zu 0 M GdmCl ergibt ein $\ln k_f^{H_2O}$ von 14.93 ± 1.05 und eine Faltungsgeschwindigkeit $k_f^{H_2O}$ von $3.036 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Die Rate der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $k_u^{H_2O}$ beträgt $8.84 \times 10^{-7} \pm 0.17 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ oder $\ln k_u^{H_2O}$ von -13.94 ± 0.105 . Dies ergibt eine Halbwertszeit τ_u von $1.1 \times 10^6 \text{ s}$ oder 13 Tagen. Diese Strategie der kinetischen Stabilisierung ist bereits oft bei hyperthermophilen Proteinen beobachtet worden (Dams & Jaenicke, 1999; Perl *et al.*, 1998; Sterner & Liebl, 2001).

Eine relativ einfache Möglichkeit, die Lage des Übergangszustands auf der Reaktionskoordinate einzuschätzen, stellt der Tanford-Wert (β_T) dar (Kap. 1.1.2). Der Tanford-Wert beschreibt den Grad der Kompaktheit des Übergangszustands im Vergleich zum denaturierten Zustand. Die Abhängigkeit der Faltungs- und Entfaltungsraten (k_f und k_u) von der Denaturierungsmittelkonzentration stellt einen Bezug zur Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ΔASA) dar, analog zum Gleichgewichts- m -Wert. Bestimmt wird die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands mittels [Gl. 1.7].

Der Tanford-Wert (β_7) beträgt für InI wt 0.93. Damit besitzt der Übergangszustand von InI nahezu die strukturelle Kompaktheit des nativen Zustandes, und die größte Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche hat bereits auf dem Weg zum Übergangszustand stattgefunden. Vergleichende Studien haben gezeigt, dass für globuläre Proteine Werte zwischen 0.6 und 0.9 üblich sind (Jackson, 1998). InI ist zwar an dem oberen Ende der üblichen Tanford-Werte angesiedelt, stellt damit aber keine Ausnahme dar.

Die hier erbrachten Ergebnisse legen nahe, dass die schnellen Faltungsphasen aufgrund eines schnellen Arrangements der Proteinkette zustande kommen. Es lässt sich mutmaßen, dass das beobachtete, nativähnliche Fluoreszenzsignal eine nativähnliche Konformation, zumindest in der Umgebung des Fluorophors, anzeigt. Erst eine langsame Umstrukturierungsreaktion führt dann zum nativen InI. Die Fluoreszenzspektroskopie ist scheinbar zur Detektion der langsamen Faltungsphase ungeeignet, da die größte Strukturänderung bereits erfolgt ist.

3.4 Faltung und thermodynamische Stabilität der InIJ-Varianten

Um die funktionelle, strukturelle und faltungsspezifische Bedeutung der Cysteinleiter von InIJ beurteilen zu können, wurde eine Alanin-Mutationsstudie (*alanine scan*) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem störenden Einfluss einer Mutation auf die vorhandene Seitenketten-Interaktion im Protein. Die Proteinvariante kann dann thermodynamisch sowie kinetisch charakterisiert werden und gibt so Aufschluss über den Stabilisierungsbeitrag der jeweiligen Aminosäure zur Proteinfaltung. Hierzu wurde jedes der Cysteine in der geordneten Leiter (13 Cysteine) gegen Alanin ausgetauscht (Abb. 3.28). Zusätzlich wurde eine Variante hergestellt, die in der Mitte der durchgängigen Leiter statt Cystein (C206) ein Serin besitzt. Somit wurde eine umfangreiche Cystein-Alanin-Variantenbibliothek erzeugt und untersucht. Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der Substitution auf die Stabilität und die Faltung des Proteins zusammengefasst.

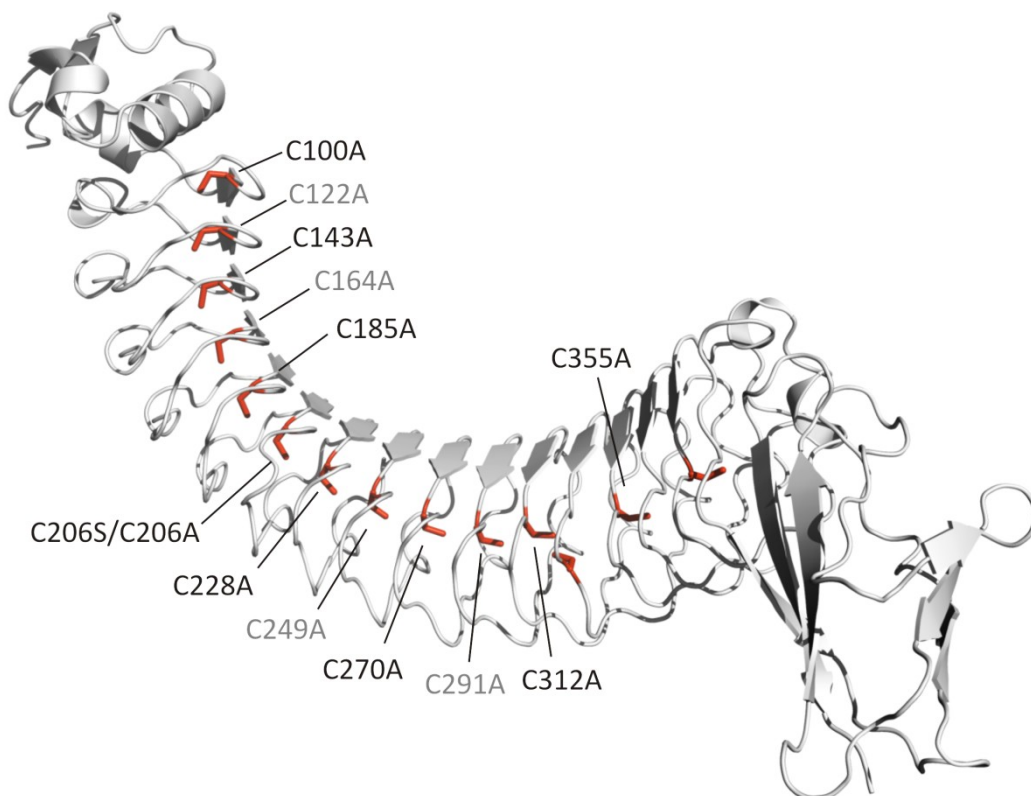


Abb. 3.28 Übersicht über die hergestellten und thermodynamisch charakterisierten InIJ-Varianten. Alle Cysteine in der Kristallstruktur von InIJ sind rot markiert. Die durch Substitution ersetzten Cysteine sind beschriftet.

3.4.1 GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergänge der Cystein-Alanin-Varianten

Um die Ergebnisse der Mutationsanalyse interpretieren zu können, muss gewährleistet sein, dass die eingeführte Aminosäuresubstitution leicht destabilisierend wirkt. Dies wurde durch Gleichgewichtsexperimente sichergestellt. Denn auch vergleichsweise geringfügige Aminosäuresubstitutionen können weitgreifende Effekte haben, die die Dateninterpretation deutlich erschweren (Fersht *et al.*, 1987). Eine drastische Mutation kann zur Änderung der nativen Struktur, aber auch des denaturierten Zustandes führen (Kap. 3.4.1). Die Mutation sollte daher gezielt Interaktionen entfernen, ohne neue Wechselwirkungen zu erzeugen. Ebenso sollte darauf geachtet werden, sterische Störungen zu vermeiden.

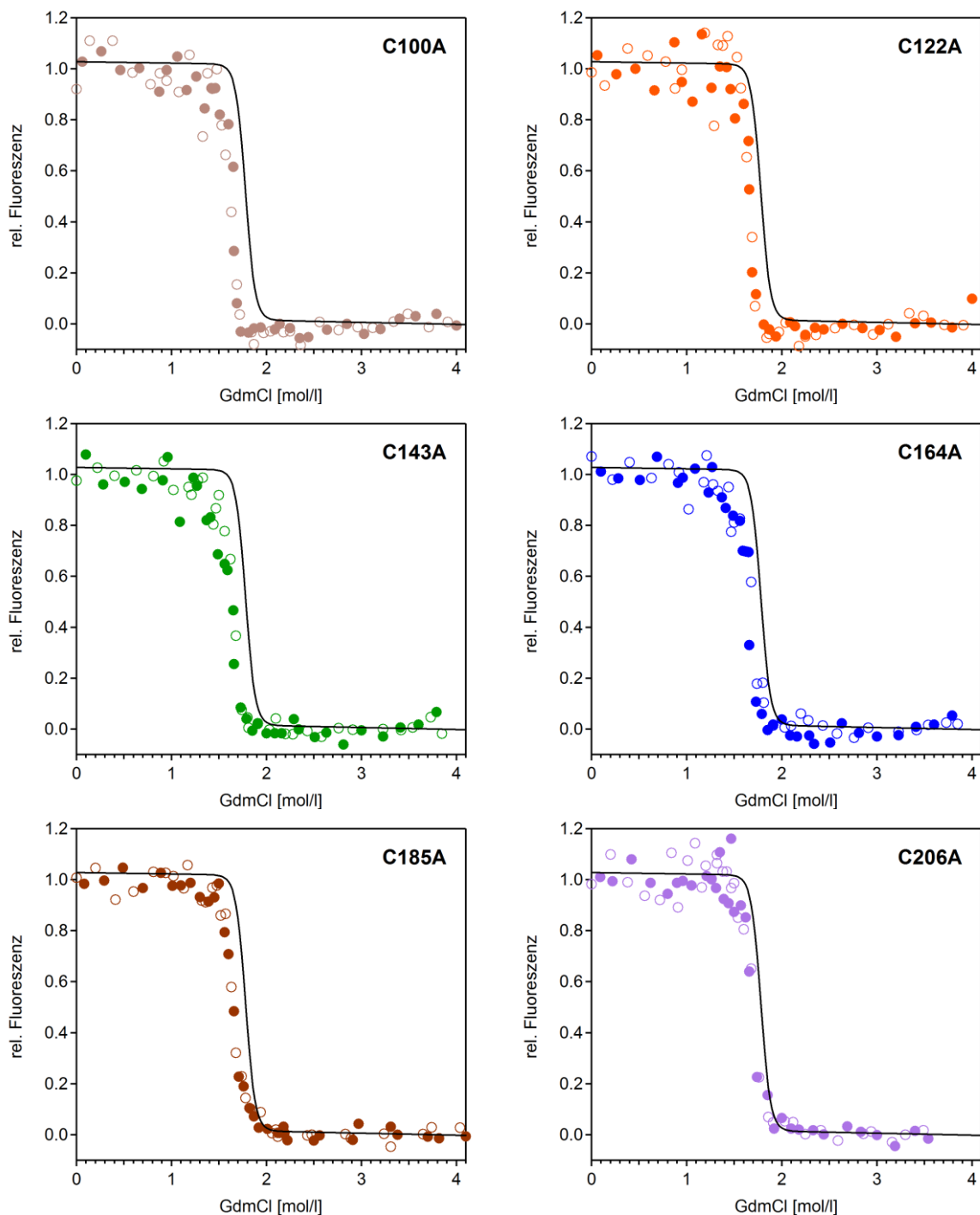
Die stabilitätsbestimmenden thermodynamischen Parameter wurden analog zu InI wt durch Analyse von chemisch-induzierten Gleichgewichtsübergängen bestimmt (Kap. 3.3.1.1). Die Detektion der Gleichgewichtsübergänge erfolgte ebenfalls mittels Fluoreszenz. Aus Übersichtlichkeitsgründen wurde auf eine gemeinsame Darstellung der Gleichgewichtsübergänge aller Varianten verzichtet, sondern stets nur das Ergebnis für eine InI-Variante (geschlossene Kreise) *versus* dem Wildtyp (Regression als durchgezogene Linie) abgebildet (Abb. 3.29; Abb. 3.30).

Fast alle erzeugten Varianten zeigen einen Übergangsmittelpunkt, der im Vergleich zum Wildtyp zu geringeren GdmCl-Konzentrationen verschoben ist (Tab. 3.3). Dies ist offensichtlich auf eine Destabilisierung der Varianten zurückzuführen. Die Stabilitätsänderung der Proteinmutante gegenüber dem Wildtyp wird üblicherweise als $\Delta\Delta G_N$ angegeben und kann auf verschiedene Arten ermittelt werden. Die gängigste Art besteht darin, direkt mit den ermittelten m -Werten zu arbeiten und $\Delta\Delta G_N$ bei 0 M Denaturierungsmittel anzugeben [Gl. 3.4]. Dabei wird die freie Stabilisierungsenthalpie des Wildtyps ($\Delta G_N^{H_2O}$) und die freie Stabilisierungsenthalpie der Mutante ($\Delta G_N^{H_2O}$) verwendet. Allerdings ist diese Vorgehensweise am stärksten fehlerbehaftet (Matouschek & Fersht, 1991; Pace, 1986), da auch kleine Fehler im m -Wert größere Abweichungen durch die Extrapolation zu 0 M GdmCl ergeben können. Wiederholte Messungen an InI wt zeigten eine Streuung des m -Wertes von $\pm 20\%$ (Kap. 3.3.2.5).

$$\Delta\Delta G_N^{H_2O} = \Delta G_N^{H_2O} - \Delta G_N^{H_2O} \quad [\text{Gl. 3.4}]$$

Die Bestimmung des Übergangsmittelpunktes $[D]_{0.5}$ ist dagegen auf ± 0.03 M genau möglich, da $[D]_{0.5}$ nicht empfindlich auf Basislinienfehler reagiert. Aus diesem Grunde, und um die Vergleichbarkeit zum Wildtyp zu gewährleisten, wurden die m -Werte bei der Auswertung der Übergänge fixiert. Da sich durch die eingeführten Mutationen die Hydrophobizität und damit ΔASA

nur geringfügig ändern, sollten auch die m -Werte der InJ-Varianten nicht signifikant variieren. Normalerweise bleiben m -Werte unverändert. Kommt es dennoch zu Änderungen des m -Wertes, könnten mehrere Gründe dafür vorliegen: i) eine Änderung der nativen Proteinstruktur; ii) strukturelle Änderungen im denaturierten Zustand und damit ein Hinweis auf Reststrukturierung im denaturierten Zustand; oder iii) es handelt sich nicht um einen Zweizustandsprozess, und stabile Intermediate sind existent (Matouschek & Fersht, 1991). Ebenso wurden zur Auswertung die Steigungen der Vor- und Nachübergangsbasislinien fixiert.



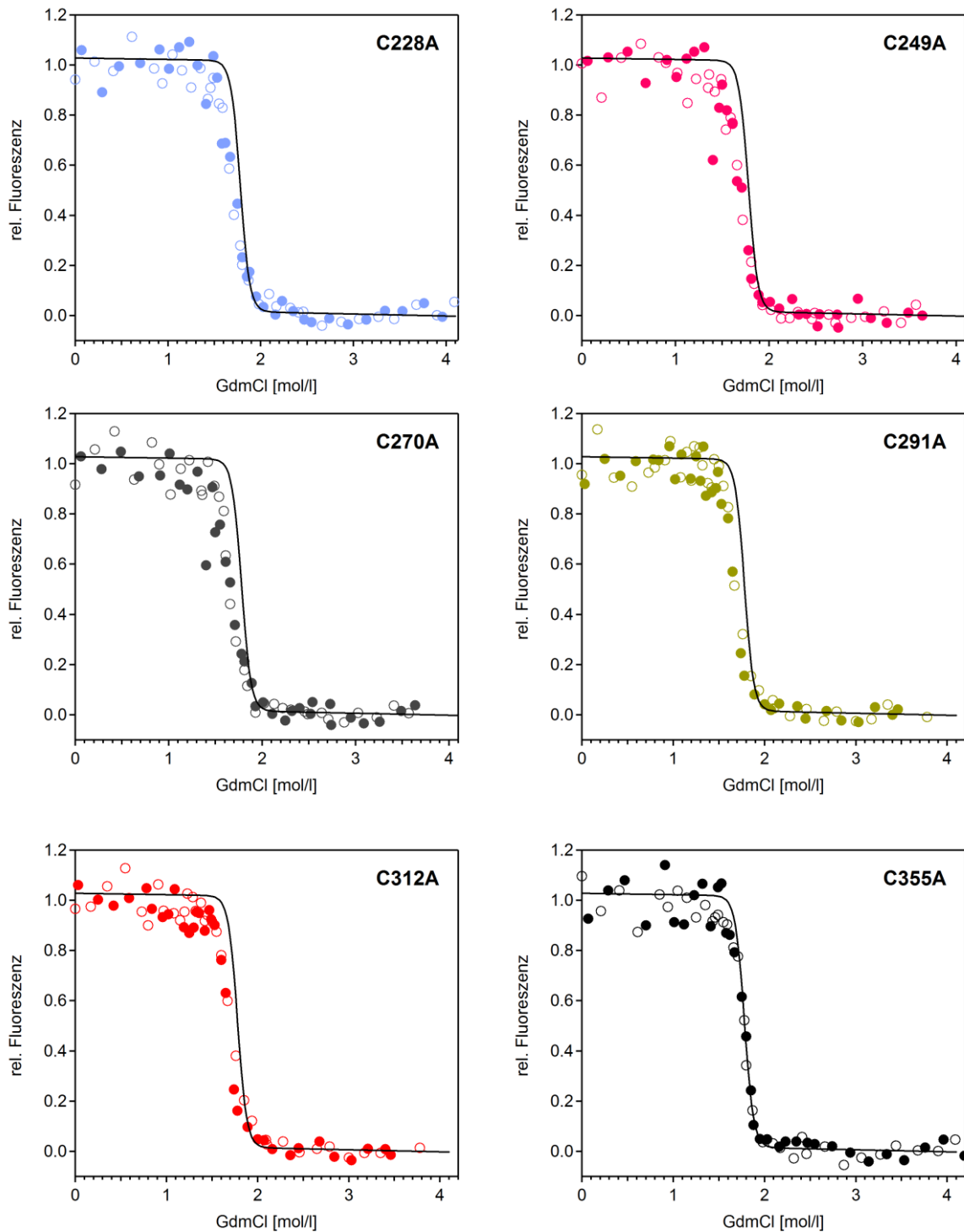


Abb. 3.29 Gleichgewichtsübergänge der InJ-Varianten C100A, C122A, C143A, C164A, C185A, C206A C228A, C249A, C270A, C291A, C312A und C355A. Dargestellt sind jeweils der Denaturierungsübergang (○) und der Renaturierungsübergang (●) der Variante, sowie die Regression des Wildtypproteins InJ (—). Alle Gleichgewichtspuren wurden im Standardpuffer bei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen vorbereitet und nach 7 d Inkubationszeit bei 20 °C vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Emissionswellenlänge 330 nm und die Proteinkonzentration 10 µg ml⁻¹. Die Normierung erfolgte über die durchschnittliche Signalintensität der vollständig denaturierten Proben (2.5 - 4 M GdmCl).

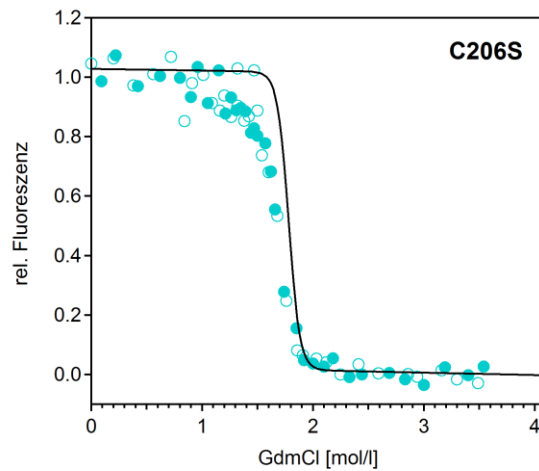


Abb. 3.30 Gleichgewichtsübergang der InIJ-Variante C206S. Dargestellt sind jeweils der Denaturierungsübergang (○) und der Renaturierungsübergang (●) der Variante, sowie die Regression des Wildtypproteins InIJ (—). Die Bedingungen siehe Abb. 3.29.

Tab. 3.3 Die Differenz der Denaturierungsmittelpunkte $\Delta[D]_{0.5}$ sowie der Stabilisierungsenthalpien $\Delta\Delta G_N^{[D]_{0.5}}$ von InIJ-Varianten gegenüber InIJ wt

Konstrukt	$\Delta[D]_{0.5}$ (mol l ⁻¹)	$\Delta\Delta G_N^{[D]_{0.5}}$ (kJ mol ⁻¹)
InIJ wt	-	-
C100A	0.11	5.2
C122A	0.09	4.2
C143A	0.13	6.5
C164A	0.10	4.9
C185A	0.13	6.3
C206A	0.06	2.9
C206S	0.07	3.6
C228A	0.09	4.5
C249A	0.11	5.2
C270A	0.14	6.6
C291A	0.09	4.4
C312A	0.07	3.6
C355A	0.02	0.9

$\Delta\Delta G_N^{[D]_{0.5}}$ ist nach [Gl. 3.5] mit dem m -Wert von $49 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ berechnet worden. Damit ergibt sich für $\Delta\Delta G_N^{[D]_{0.5}}$ ein Messfehler von $\pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

Der Grad der Destabilisierung lässt sich durch die Änderung der Übergangsmittelpunkte nach [Gl. 3.5] abschätzen. Bei einer Verschiebung des Übergangsmittelpunktes $[D]_{0.5}$ um 0.1 M Einheiten und einem m -Wert von $48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ändert sich ΔG_N um $4.9 \pm 1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Die Angabe von

$\Delta\Delta G_N^{[D]0.5}$ hat den Vorteil relativ gering fehlerbehaftet zu sein, da jegliche Extrapolation entfällt (Itzhaki *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1993b).

$$\Delta\Delta G_N^{[D]0.5} = m \cdot \Delta[D]_{0.5} \quad [\text{Gl. 3.5}]$$

Die bestimmten Änderungen der Übergangsmittelpunkte $\Delta[D]_{0.5}$ sowie die nach [Gl. 3.5] berechneten Änderungen der freien Stabilisierungsenthalpie $\Delta\Delta G_N^{[D]0.5}$ sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Fast alle erzeugten Varianten zeigen eine verringerte Gesamtstabilität. Die destabilisierenden Mutationen erstrecken sich über die *repeats* 1 bis 11. Die Variante C355A (*repeat* 13) ist als einzige von den hergestellten InJ-Varianten nicht destabilisiert. Der Übergang dieser Variante entspricht exakt dem Übergang des Wildtypproteins (Abb. 3.29). Der C-terminal gelegene *repeat* 13 scheint der Substitution gegenüber toleranter zu sein.

3.4.2 Einfluss der Cysteinleiter auf das Faltungsverhalten

Die kinetische Charakterisierung stellt eine Möglichkeit dar, Erkenntnisse über den Übergangszustand der Faltungsreaktion zu gewinnen (Kap. 3.3.2.5). Der Vergleich von Faltungs- und Entfaltungskinetiken von Wildtypprotein und InJ-Varianten eröffnet einen Einblick in die Interaktionsverhältnisse des Übergangszustandes. Die Entfaltung von InJ wt wurde hinreichend genau bestimmt, da in einem breiten Denaturierungsmittelkonzentrationsbereich vermessen wurde (Kap. 3.3.2.5, Abb. 3.27). Die Anzahl der hergestellten Varianten (13) ließ es allerdings nicht zu, für jede Variante eine vollständige kinetische Charakterisierung durchzuführen. Somit mussten sinnvolle Kompromisse gefunden werden. Der Verlauf des Entfaltungsgastes im Chevronplot wurde daher durch Messungen bei nur zwei unterschiedlichen GdmCl-Konzentrationen (6 M, 7 M) abgeschätzt. Auf diese Weise konnte die Entfaltungscharakteristik aller InJ-Varianten zumindest qualitativ bestimmt werden (Abb. 3.31, Abb. 3.32, Abb. 3.33).

Die Denaturierungskinetiken der Alaninvarianten verhielten sich analog zu der Entfaltungskinetik des Wildtypproteins (Kap. 3.3.2.1). Die Anpassung erfolgte ebenfalls durch eine monophasische Exponentialfunktion. Vergleichende Darstellungen der logarithmierten Entfaltungsraten sind in Abb. 3.31, Abb. 3.32 sowie in Abb. 3.33 zu finden. Wie es bereits für die Gleichgewichtsexperimente gehandhabt wurde (Kap. 3.4.1), sind auch hier nur die Ergebnisse für eine InJ-Variante (geschlossene Kreise) *versus* dem Wildtyp (Regression als durchgezogene Linie) abgebildet.

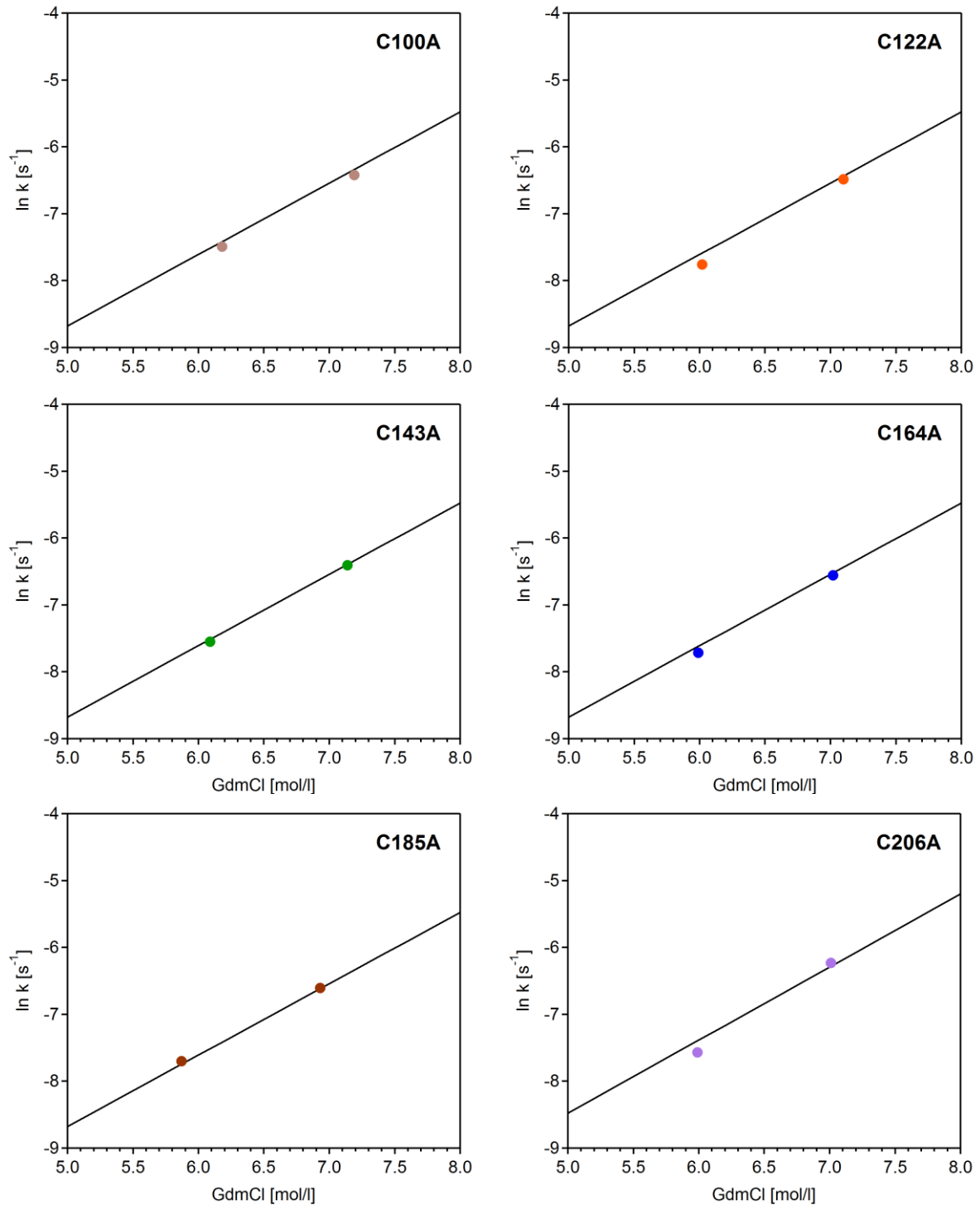


Abb. 3.31 Entfaltungskinetiken der InI-Varianten. Dargestellt sind die Entfaltungsraten der InI-Varianten bei 6 M (k_u^{6M}) und 7 M GdmCl (k_u^{7M}) (●), sowie zur Veranschaulichung die Regression der Entfaltung des Wildtypproteins InI (—). Die abgebildeten Entfaltungsraten der Varianten resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Der maximale Fehler von $\ln k_u$ lag bei ± 0.04 , der durchschnittliche Fehler bei ± 0.015 . Alle Messungen erfolgten bei 20 °C, im Standardpuffer bei 6 M und 7 M GdmCl. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Emissionswellenlänge 330 nm und die Proteinkonzentration $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

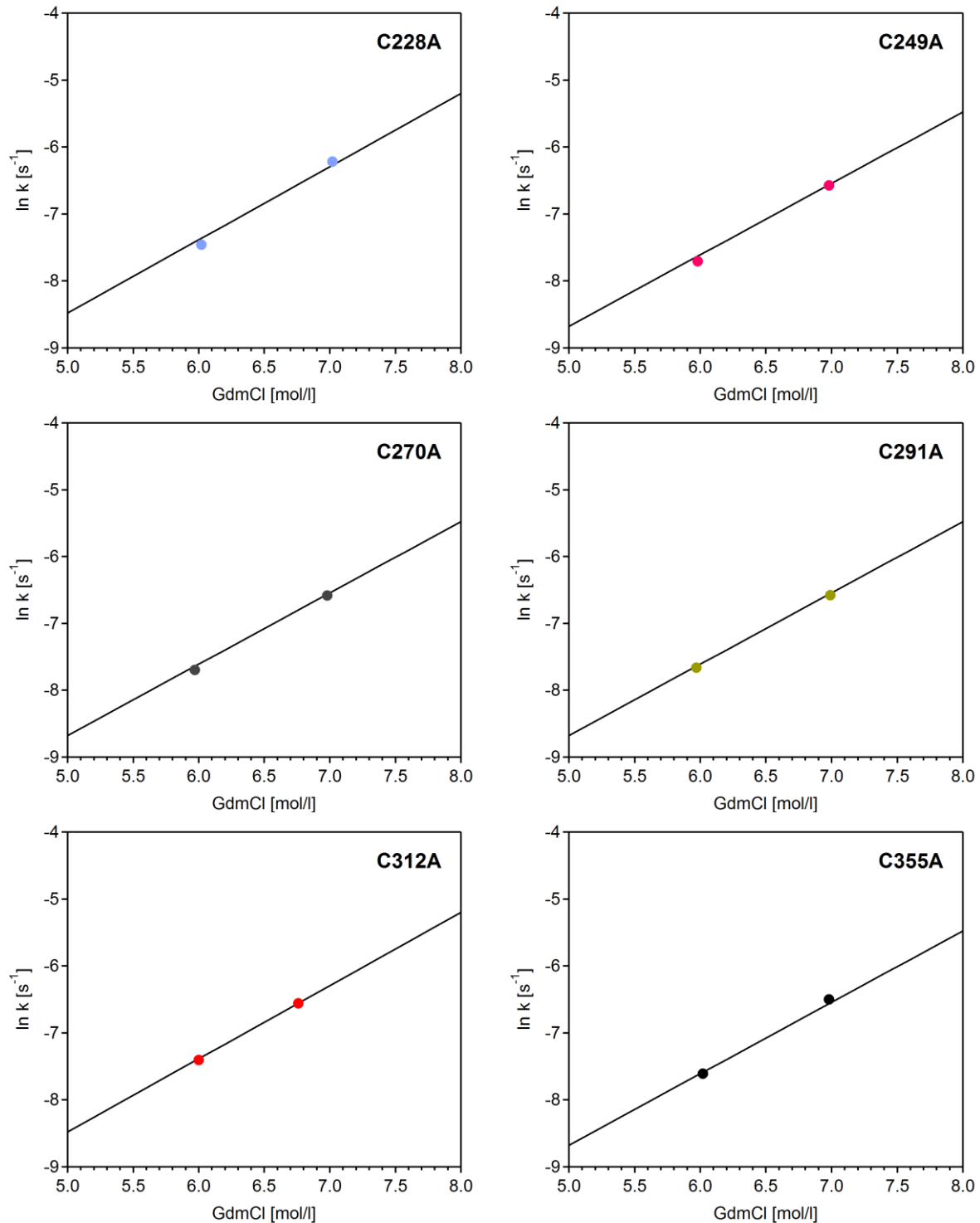


Abb. 3.32 Entfaltungskinetiken der InIJ-Varianten. Dargestellt sind die Entfaltungsraten der InIJ-Varianten bei 6 M (k_u^{6M}) und 7 M GdmCl (k_u^{7M}) (•), sowie die Regression der Entfaltung des Wildtypproteins InIJ (—). Weitere Erläuterungen sowie Bedingungen siehe Abb. 3.31.

Die lineare Extrapolation durch lediglich zwei Punkte ist nicht zulässig. Aber auch bei besserer Datenlage wäre die Extrapolation zu 0 M GdmCl stark fehlerbehaftet. Aus diesem Grunde wurden lediglich die Differenzen der logarithmierten Entfaltungsraten zwischen InIJ-Varianten und Wildtypprotein bei 6 M ($\ln k_u^{6M}$) und 7 M GdmCl ($\ln k_u^{7M}$) angegeben (Tab. 3.4). Keine der

untersuchten Alanin-Varianten zeigte signifikante Veränderungen hinsichtlich des Entfaltungsverhaltens. Einige der Differenzen liegen zwar außerhalb der ermittelten Fehlergrenze von ± 0.03 , die Verteilung der Differenzen bezogen auf die Proteinsequenz lässt jedoch keinen eindeutigen Trend erkennen.

Desweiteren wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Agnes (Tymieniecki, 2010) die InIJ-Variante C206A umfassend kinetisch untersucht. Auch in diesem Fall zeigt die Entfaltung nur geringe Abweichungen gegenüber InIJ wt (Abb. 3.34). Eine mögliche Erklärung für die Abweichungen könnte die starke pH-Abhängigkeit des Proteins liefern (Kap. 3.3.2.2).

Tab. 3.4 Differenzen der Entfaltungsraten zwischen InIJ-Varianten und Wildtypprotein. Aus den Standardabweichungen der Entfaltungskinetiken des Wildtyps und der Variante ergab sich durch Fehlerfortpflanzung ein durchschnittlicher Fehler von ± 0.03 . Die grau hinterlegten Felder markieren die innerhalb der Fehlerangabe liegenden Werte.

Konstrukt	$\ln(k_{u\text{ mut}}/k_{u\text{ wt}})$	
	6 M GdmCl	7 M GdmCl
C100A	0.074	0.082
C122A	0.168	0.048
C143A	0.037	0.012
C164A	0.095	0.035
C185A	0.048	0.012
C206A	-0.170	0.053
C228A	-0.092	0.054
C249A	-0.075	-0.007
C270A	-0.051	-0.019
C291A	-0.018	-0.020
C312A	-0.016	-0.001
C355A	-0.021	0.067

Die Serin-Variante C206S zeigt dagegen ein auffällig verändertes Entfaltungsverhalten (Abb. 3.33). Die Entfaltungskinetik bei 7 M GdmCl verläuft biexponentiell, wobei die langsamere Rate der Entfaltungsrates des Wildtypproteins entspricht. Zusätzlich ist eine schnellere Phase zu beobachten. Die Entfaltung bei 6 M GdmCl konnte monoexponentiell angepasst und verläuft schneller als die von InIJ wt. Durch die Substitution von C206 mit der polaren Aminosäure Serin wird vermutlich die kooperative Einheit beeinträchtigt. Bei der Interpretation dieses Ergebnisses ist jedoch, wie bereits in Kapitel 3.4.1 dargelegt wurde, Vorsicht geboten. Die eingeführte Mutation soll das Protein nur leicht destabilisieren, jedoch nicht zu einer Strukturänderung oder zusätzlichen Interaktionen führen.

Häufig sind die Effekte solcher gravierenden Mutationen schwer zu interpretieren. Aufgrund der regelmäßigen Struktur von InJ wäre eine solche Analyse aber eher möglich als in unregelmäßigen *repeat*-Proteinen oder gar globulären Proteinen. Daher wäre eine umfangreiche Charakterisierung dieser InJ-Variante sinnvoll.

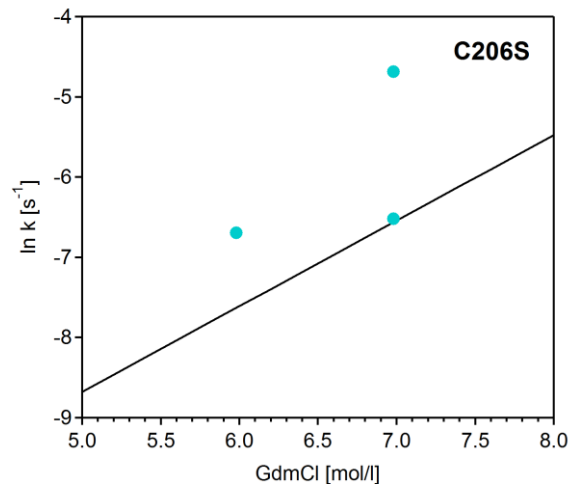


Abb. 3.33 Entfaltungsraten der C206S-Variante. Dargestellt sind die Entfaltungsraten der InJ-Variante bei 6 M (k_u^{6M}) und 7 M GdmCl (k_u^{7M}) (●), sowie die Regression der Entfaltung des Wildtypproteins InJ (—). Weitere Erläuterungen sowie Bedingungen siehe Abb. 3.31.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die marginalen Änderungen der Entfaltungscharakteristik nicht die beobachteten Veränderungen in der Stabilität der InJ-Varianten erklären. Um die Frage nach der Destabilisierung zu beantworten, muss daher die Faltung näher untersucht werden.

Faltung

Wie in Kap. 3.3.2.4 gezeigt werden konnte, beschreibt die langsame Faltungsphase k_{fslow} den geschwindigkeitsbestimmenden und produktiven Faltungsschritt von InJ wt. Die starke Abhängigkeit der Faltung von der Denaturierungsmittelkonzentration resultiert in einem Tanford Wert β_T von 0.93. Dies deutet darauf hin, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands größtenteils dem nativen Zustand entspricht. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die Einführung von Mutationen hauptsächlich den Übergangszustand destabilisiert und damit die langsame Faltungsphase beeinflusst und nicht die schnellen Faltungsphasen. Diese Vermutung wird durch die im Rahmen der Bachelorarbeit von (Tymieniecki, 2010) gewonnenen Ergebnisse unterstützt. Die schnellen Faltungsphasen k_{fast} sowie die Entfaltung k_u weisen keine signifikanten Veränderungen zum Wildtypprotein auf (Abb. 3.34). Lediglich die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten, inversen Doppelsprungexperimente brachten Unterschiede im Faltungsverhalten der Variante C206A zu Tage.

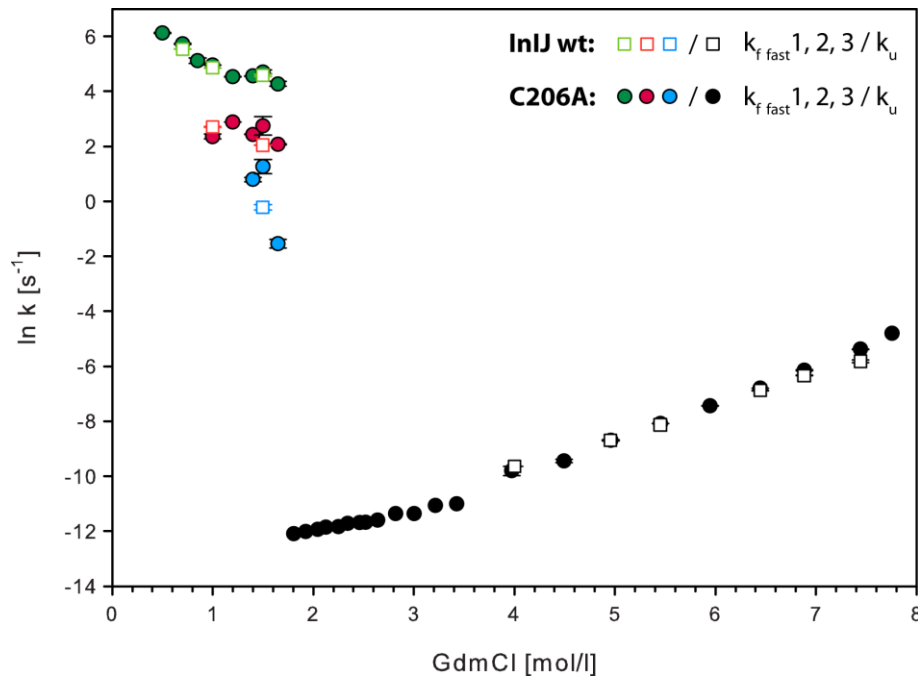


Abb. 3.34 Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung $k_{f\ fast}$ und der Entfaltung k_u des InIJ-Wildtypproteins und der C206A-Variante. Die Durchführung sowie die Messbedingungen entsprechen den in Abb. 3.27 angegebenen. Bearbeitet nach (Tymieniecki, 2010).

Die Faltung der InIJ-Varianten wurde ausschließlich per Doppelsprungexperiment untersucht. Für die Durchführung der manuell angesetzten Doppelsprungexperimente kam erneut nur ein enger Denaturierungsmittelbereich zwischen 1.4 und 1.7 M GdmCl in Frage (Kap. 3.3.2.4). Die Faltung wurde daher ausschließlich bei einer Denaturierungsmittelkonzentration (1.5 M GdmCl) bestimmt. Bei 9 von 13 InIJ-Varianten wurde das Faltungsverhalten auf diese Weise untersucht (Abb. 3.35).

Die Geschwindigkeitskonstante der Faltung (k_f) basiert nach der *transition state theory* auf der Enthalpiedifferenz ΔG_{TS-U} zwischen dem entfalteten Zustand (U) und dem Übergangszustand (TS) (Kap. 1.1.2). ΔG_{TS-U} wird auch definiert als Aktivierungsenergie der Faltung. Durch die kinetischen Daten lassen sich die Aktivierungsenergien des Wildtypproteins ΔG_{TS-U} und der Variante $\Delta G_{TS-U}'$ vergleichen (Guydosh & Fersht, 2008; Itzhaki *et al.*, 1995), wobei die Differenz in den Aktivierungsenergien als $\Delta\Delta G_{TS-U}$ angegeben wird [Gl. 3.6]. Aus den experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstanten der Faltung lässt sich die Differenz der Aktivierungsenergie $\Delta\Delta G_{TS-U}$ entsprechend der Theorie des Übergangszustandes berechnen [Gl. 3.7].

$$\Delta\Delta G_{TS-U} = \Delta G_{TS-U} - \Delta G_{TS-U}' \quad [\text{Gl. 3.6}]$$

$$\Delta\Delta G_{TS-U} = RT \ln(k_{f\ mut}/k_{f\ wt}) \quad [\text{Gl. 3.7}]$$

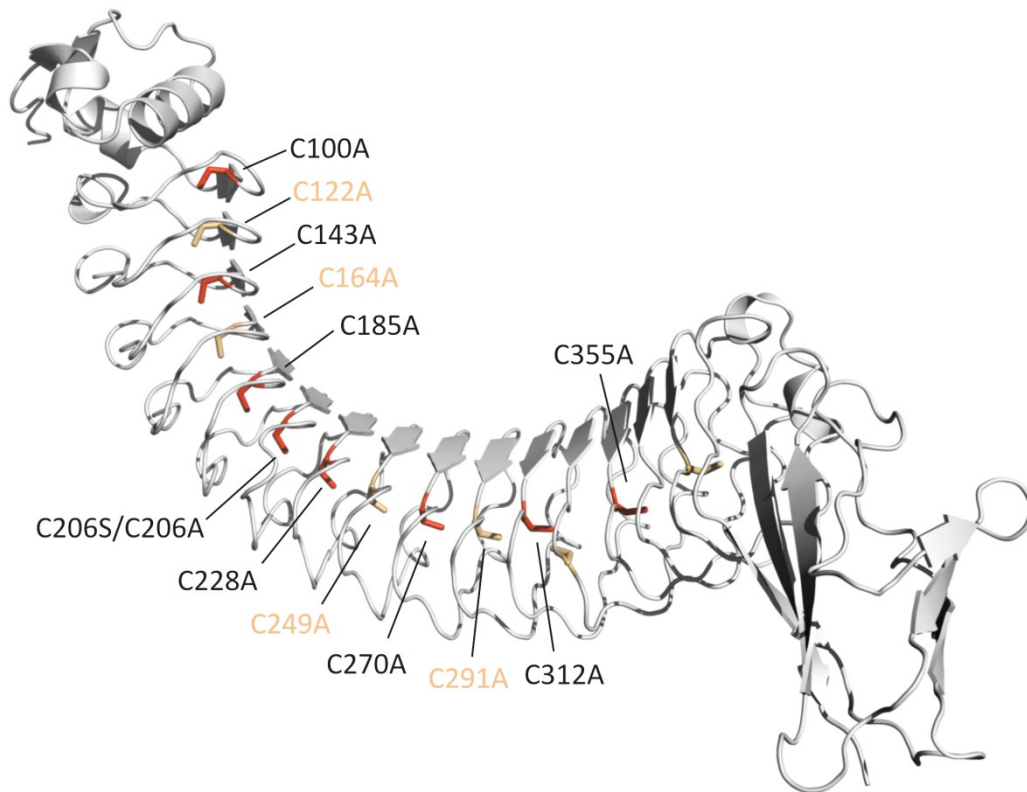


Abb. 3.35 Übersicht über die hergestellten und unter dem Faltungsaspekt untersuchten InIJ-Varianten. Die von den Faltungsexperimenten ausgeschlossenen Varianten sind in orange dargestellt.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten erfolgte analog zur Vorgehensweise beim Wildtypprotein (Kap. 3.3.2.4). Die Ergebnisse aus den Doppelsprungexperimenten sind in Tab. 3.5 aufgeführt. Bei der Analyse der ermittelten Faltungsraten und der damit verbundenen Messfehler muss die starke Abhängigkeit der Faltung von der GdmCl-Konzentration berücksichtigt werden. Die Messgenauigkeit der refraktometrischen Messung mittels Abbe-Refraktometer lässt sich durch die Messungenauigkeit der bestimmten GdmCl-Konzentration umrechnen. Letztere liegt bei ± 0.02 M GdmCl und ergibt damit einen Fehler für $\ln k_f$ von ± 0.28 . Damit liegen die Unterschiede der gemessenen Faltungsraten zwischen Wildtyp und den Varianten C100A, C122A und C335A innerhalb der Messungenauigkeit (Tab. 3.5). Im Gegensatz dazu liegen die Differenzen der Faltungsraten zwischen Wildtypprotein und den Varianten C185A, C206A, C206S, C228A, C270A und C312A außerhalb der angegebenen Fehlergrenzen und können infolgedessen als signifikant eingestuft werden. Die Abb. 3.36 stellt die Ergebnisse der Faltungsuntersuchung dar. Es ergibt sich ein konsistentes Bild. Die Substitution der zentralen Cysteine beeinflusst die Faltung von InIJ deutlich stärker als es die terminalen Mutationen vermögen. Am auffälligsten ist dieser Effekt bei der zentralen Variante C228A zu beobachten.

Tab. 3.5 Geschwindigkeitskonstanten der Faltung der InJ-Varianten bei 1.5 M GdmCl ($k_f^{1.5M}$), die Differenzen zwischen Wildtyp und Variante sowie die sich daraus ergebende Änderung der Stabilisierungsenthalpie. Basierend auf der Messungenauigkeit bei der Bestimmung der GdmCl-Konzentration beträgt die Fehlergrenze von $\ln k_f \pm 0.28$.

Konstrukt	$\ln k_f^{1.5M}$	$\ln (k_f^{1.5M mut}/k_f^{1.5M wt})$	$\Delta\Delta G_{TS-U}^{[D]1.5M}$ (kJ mol ⁻¹)
InJ wt	-6.23	-	-
C100A	-5.96	0.27	0.61
C143A	-6.38	-0.15	-0.35
C185A	-7.52	-1.29	-2.93
C206A	-7.74	-1.51	-3.44
C206S	-7.83	-1.60	-3.63
C228A	-8.18	-1.95	-4.44
C270A	-8.02	-1.79	-4.07
C312A	-7.90	-1.67	-3.80
C355A	-6.09	0.14	0.32

Die maximale Destabilisierung des Übergangszustands wird an der Variante C228A beobachtet mit einem $\Delta\Delta G_{TS-U}$ von -4.44 kJ mol⁻¹ (Tab. 3.5). Die Aktivierungsenergien der Varianten C185A, C206A, C206S, C270A und C312A werden um -2.93 , -3.44 , -3.63 , -4.07 beziehungsweise -3.8 kJ mol⁻¹ erniedrigt. Der Effekt der terminalen Mutationen ist dagegen vernachlässigbar. Der auf der Messungenauigkeit der GdmCl-Konzentration (± 0.02 M) basierende Fehler ergibt sich zu ± 0.63 kJ mol⁻¹.

Durch die thermodynamische und kinetische Untersuchung der Varianten lassen sich detaillierte Informationen über den Übergangszustand mittels ϕ -Wert-Analyse erhalten. Vereinfacht ausgedrückt entspricht der ϕ -Wert dem Verhältnis der Destabilisierung des Übergangszustandes und der Destabilisierung des Gesamtproteins [Gl. 1.5] (Kap. 1.1.2).

$$\phi_f = \frac{\Delta\Delta G_{TS-U}}{\Delta\Delta G_N^0} \quad [\text{Gl. 1.5}]$$

Demzufolge ist der Übergangszustand an der substituierten Position nativ strukturiert, wenn der Übergangszustand durch die Substitution um den gleichen Beitrag wie das gesamte Protein destabilisiert wird. Bleibt der Übergangszustand unbeeinflusst, so verhält sich dieser wie der denaturierte Zustand. Beispielsweise ergibt sich für die Varianten C228A und C100A ein ϕ -Wert von 1.0 beziehungsweise von 0.1. Daraus folgt, dass der *repeat 7* (C228A) in dem Übergangszustand bereits nativ strukturiert vorliegt. Der als Gegenbeispiel angegebene *repeat 1* (C100A) ist dagegen im Übergangszustand noch undefiniert.

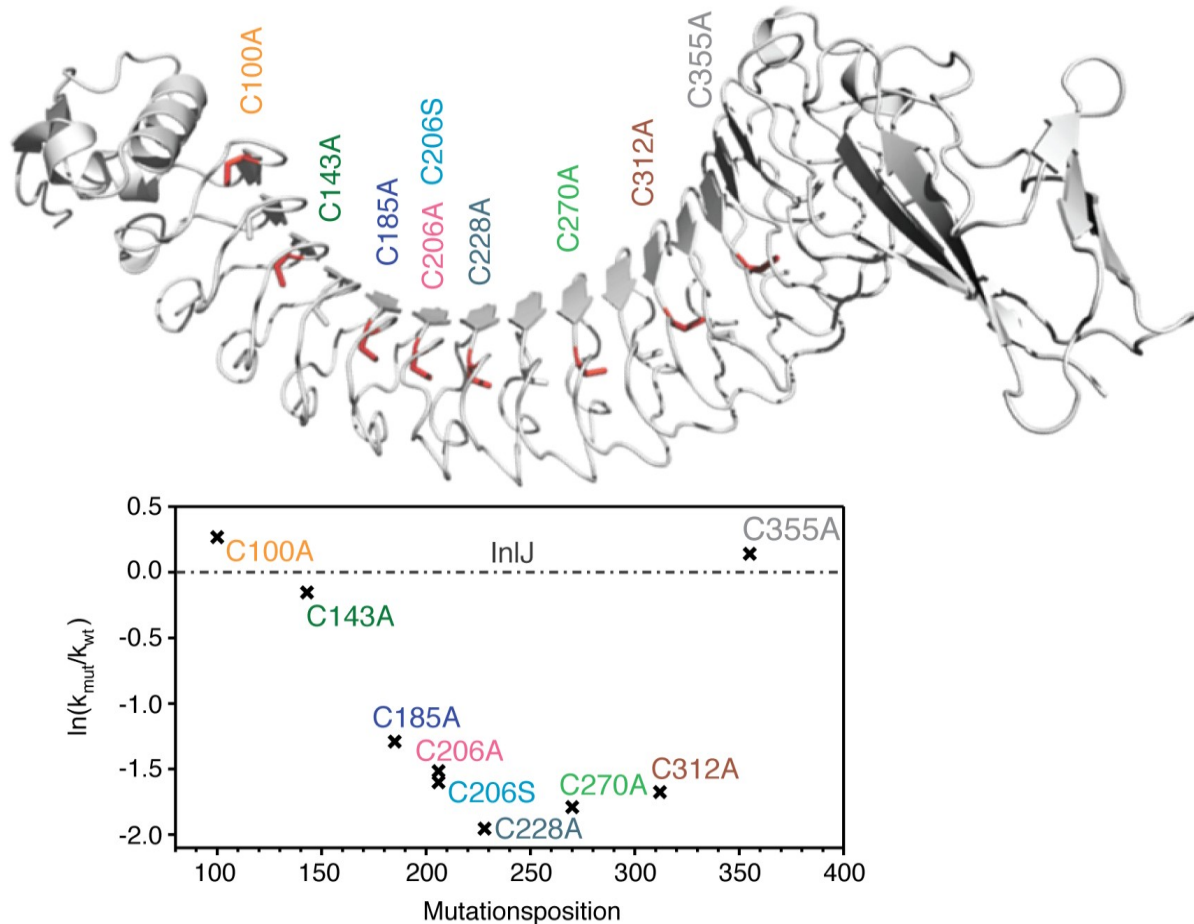


Abb. 3.36 Unterschiede in den Faltungsraten zwischen InIJ wt und dessen Varianten (bei 1.5 M GdmCl). Die gestrichelte Linie markiert den Nullwert, der die Referenz (InIJ) darstellt. Der auf der Messungsgenauigkeit der GdmCl-Konzentration (± 0.02 M) basierende Fehler beträgt ± 0.63 kJ mol⁻¹. Oberhalb ist die InIJ-Struktur abgebildet, sowie die durch Doppelsprungexperiment charakterisierten Varianten. Die Farbkodierung ist in beiden Abbildungen gleich.

Genauso wie die Faltungsreaktion mit dem ϕ -Wert assoziiert ist (ϕ_f), so beschreibt ϕ_u entsprechend den Entfaltungsprozess. In einem idealen Zweizustandssystem gilt: $\phi_f + \phi_u = 1$. Damit zeigen die InIJ-Varianten C100A und C143A einen Widerspruch auf, da die freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O}$ durch die Mutation zwar erniedrigt ist, aber weder die Faltungs- noch die Entfaltungsreaktion eine signifikante Änderung aufweisen (Tab. 3.4, Tab. 3.5). An dieser Stelle sind weiterführende Studien notwendig, um den offensichtlichen Widerspruch zu klären.

Da die hier durchgeführte Analyse auf der Destabilisierung der InIJ-Varianten beruht, könnte es letztendlich sein, dass die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität fehlerhaft ist. Die Aggregationsanfälligkeit der destabilisierten Varianten ist nicht untersucht worden. Der destabilisierende Effekt kann sich auch auf die Aggregationsanfälligkeit ausgewirkt und somit die Gleichgewichtsexperimente beeinflusst haben. Demnach würde das zugrundegelegte Zweizustandsmodell nicht mehr gelten.

Den Ergebnissen der Mutationsanalyse entsprechend, besäße InI einen halbgefalteten Übergangszustand. Dies wäre allerdings nicht übereinstimmend mit dem ermittelten Tanford-Wert von 0.93, der einen fast vollständig nativstrukturierten Übergangszustand impliziert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass zwar eine fast native Kompaktierung vorliegt, native Interaktionen allerdings noch nicht vollständig ausgebildet wurden.

4 Zusammenfassende Diskussion

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Faltung und Stabilität von InIJ umfassend kinetisch und thermodynamisch charakterisiert. Mit Hilfe der Mutationsstudie wurden Hinweise auf die Strukturierung des Übergangszustandes erhalten. Als Grundlage dieser Charakterisierung musste das Proteinkonstrukt zunächst optimiert werden, um eine ausreichende, rekombinante Herstellung zu gewährleisten. Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse nochmals dargelegt und in einen größeren Kontext gebracht werden.

4.1 Thermodynamischer und kinetischer Charakter der Faltungsreaktion von InIJ

Der GdmCl-induzierte Gleichgewichtsübergang von InIJ zeigt einen hochkooperativen Übergang, der mit einem Zweizustandsmodell ($N \leftrightarrow D$) beschreibbar ist. Die N- sowie die C-terminale Domäne werden spektroskopisch durch die Tryptophane W65 und W472 repräsentiert und verhalten sich im Gleichgewichtsexperiment kongruent. Nach den hier erhaltenen Erkenntnissen erstreckt sich die kooperative Einheit des InIJ über die α -helikale *capping*-Domäne, das LRR-Motiv und die IR-Domäne. Der kontinuierliche hydrophobe Kern, der sich über das gesamte Protein erstreckt, sowie das intensive Wasserstoffbrücken-Netzwerk des Peptidrückgrats scheinen die verbindenden und Kooperativität-vermittelnden Elemente hierbei zu sein (Schubert *et al.*, 2001). Die experimentell bestimmte Kooperativität ($m = 48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1}$) entspricht der nach (Myers *et al.*, 1995) berechneten ($m_T = 44.3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Myers *et al.* (1995) konnte für kleine, globuläre Proteine zeigen, dass die experimentell bestimmte Kooperativität und die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (ΔASA), und damit auch die Proteingröße, miteinander korrelieren. Damit entspricht die

Kooperativität von InJ der theoretisch zu erwartenden für ein Protein dieses Molekulargewichts (50.8 kDa). Allerdings wird bei Proteinen dieser Größenordnung selten ein kooperativer Gleichgewichtsübergang beobachtet.

Große *repeat*-Proteine zeigen oft einen Bruch in der Kooperativität. Die Faltung der größten untersuchten *repeat*-Proteine Tom70 (65.9 kDa) (Beddoe *et al.*, 2004), Pertactin (55 kDa) (Junker *et al.*, 2006) und D34 (46 kDa) (Werbeck & Itzhaki, 2007) kann nur mit dem Drei-Zustands-Modell beschrieben werden. Für die bisher untersuchten *repeat*-Proteine mit kleinerem Molekulargewicht ist das Vorhandensein von kooperativem Verhalten nicht ungewöhnlich. Viele *repeat*-Proteine zeigen einen hochkooperativen Gleichgewichtsübergang: Myothropin (ca. 13 kDa) (Lowe & Itzhaki, 2007a; Mosavi *et al.*, 2002), p19 (ca. 18 kDa) (Zeeb *et al.*, 2002), der *Notch*-Rezeptor (Zweifel & Barrick, 2001) sowie YopM (ca. 44 kDa) (Kloss & Barrick, 2008). Bemerkenswerterweise sind die einzigen großen *repeat*-Proteine, die nach dem Zweizustandsmodell falten, LRR-Proteine z.B. YopM (44 kDa). Ebenso kann die Gleichgewichtsentfaltung der großen Internaline InIA (ca. 51 kDa) (Lengefeld, 2003) und InJ (50.8 kDa) mit dem Zweizustandsmodell beschrieben werden (siehe Parametervergleich Tab. 3.2).

Dies lässt die von den globulären Proteinen stark abweichende Topologie nicht unbedingt vermuten. Der modulare Aufbau legt die Vermutung nahe, dass die individuellen Wiederholungseinheiten gleichzeitig eigenständige Faltungseinheiten (*foldon*) ausbilden können. Die in Bezug auf Faltung am besten charakterisierten *repeat*-Proteinsysteme stellen Ankyrin- (Ank) und Tetratricopeptid-*repeat*-Proteine (TRP) dar. Beide gehören zu den α -helikalen solenoiden Proteinen. Die Analyse der unterschiedlich langen Konstrukte der *Notch*-Ankyrin-Domäne demonstrierte den additiven Charakter der *repeat*-Faltung (Mello & Barrick, 2004). Mit Hilfe des eindimensionalen Ising-Modells (lineares Modell aus der statistischen Mechanik) können die stabilisierenden Beiträge der Wiederholungseinheiten von denen der Interaktionsflächen zwischen ihnen separiert werden. Dabei wird die Faltung der individuellen *repeats* betrachtet, die durch den Faltungszustand der benachbarten Einheiten beeinflusst wird. Um solchen Proteinfaltungsfragen nachzugehen, und inspiriert von der Eindimensionalität der *repeat*-Proteine, wurden artifizielle Systeme entworfen. Einige Studien, die mit TRP- und Ank-*repeat* basierten Designproteinen durchgeführt wurden, sind konsistent mit dem Ising-Modell. Meistens ist aber sowohl das Zweizustandsmodell als auch das 1D-Ising-Modell anwendbar, um die kooperativ erscheinenden Übergänge zu beschreiben (Kajander *et al.*, 2005; Wetzel *et al.*, 2008).

Die Gültigkeit des Zweizustandsmodells kann sehr zuverlässig durch den Vergleich zwischen ΔH_{cal} (kalorimetrisch gemessene Enthalpie) und ΔH_{VH} (van't Hoff-Enthalpie) validiert werden. Untersuchungen mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) an TRP-Designproteinen (2 bis 20

repeats) zeigten, dass die Thermogramme der DSC-Messungen von dem Zweizustandsmodell abweichen (Cortajarena & Regan, 2011). Dieser Effekt wurde mit steigender *repeat*-Anzahl immer deutlicher. Die Anpassung der Ergebnisse für Proteine ab drei Wiederholungseinheiten gelang nur mittels des Ising-Modells. Der Vergleich zeigte kleinere Werte für ΔH_{VH} als für ΔH_{cal} , was auf das Vorhandensein von Intermediaten hindeutet. Auch die Systeme InIB und InIA wurden diesbezüglich untersucht. Die Studien an der Internalindomäne von InIB mittels DSC zeigten eine Übereinstimmung der beiden Größen und damit eine klare Gültigkeit des Zweizustandsmodells (Freiberg, 2004). Die Messungen von InIA waren zwar aggregationsbehaftet aber dennoch auswertbar. Der Wert für ΔH_{VH} entsprach in etwa einem Drittel des für ΔH_{cal} bestimmten Wertes. Damit wurde eindeutig gezeigt, dass der kooperativ erscheinende thermische Übergang von InIA mehr als zwei Zustände repräsentiert (Lengefeld, 2003). Derartige kalorimetrische Messungen waren bei InIJ aufgrund der ausgeprägten Aggregationsneigung leider nicht durchführbar. Allerdings konnte durch den Vergleich von thermodynamischen und kinetischen Parametern der InIJ-Faltung (Tab. 3.2) die Gültigkeit des Zweizustands-Mechanismus bestätigt werden. Der m -Wert des Gleichgewichtsübergangs beträgt $48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ gegenüber einem kinetischen m -Wert von $37.1 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$, der sich aus der Summe der m -Werte der Faltung und Entfaltung ($m_f = -34.4 \pm 2.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $m_u = 2.66 \pm 0.26 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$) ergibt. Der Übergangsmittelpunkt $[D]_{0.5}$ und die daraus errechnete Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O}$ betragen für das Gleichgewichtsexperiment $1.78 \pm 0.03 \text{ mol l}^{-1}$ bzw. $-86.7 \pm 21.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ sowie für die kinetischen Studien $1.90 \pm 0.17 \text{ mol l}^{-1}$ bzw. $-70.3 \pm 3.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. In Anbetracht der Unsicherheiten bei der Stabilitätsbestimmung, erscheint die Übereinstimmung der Werte aus den Gleichgewichtsexperimenten und den kinetischen Untersuchungen hinreichend um das Zweizustandsmodell als gesichert anzunehmen.

Aus diesen und zuvor publizierten Resultaten erwächst die Frage, was mechanistisch determiniert, ob ein *repeat*-Protein im Gleichgewicht nur in zwei oder mehreren Zuständen vorliegt. Sollte es die von (Kloss *et al.*, 2008) vorgeschlagene obere Molekulargewichtsgrenze für kooperative Faltung geben, muss zudem geklärt werden, weshalb Internaline bzw. LRR-Proteine allem Anschein nach eine andere Kooperativitätsgrenze aufweisen als α -helikale *repeat*-Proteine.

Durch die Experimente der Gruppe um Doug Barrick mit dem *Notch*-Ankyrin Protein konnte der instabile Charakter eines einzeln betrachteten *repeats* erfasst werden (Mello & Barrick, 2004). Der stabilisierende Beitrag ist maßgeblich auf die *interrepeat*-Interaktionen zurückzuführen. Durch die Kombination von extrem ungünstigen *intrarepeat*-Beiträgen und höchst stabilisierenden *interrepeat*-Interaktionen kann das Zweizustandsmodell zutreffen (Aksel *et al.*, 2011). Das zutreffende Faltungsmodell ist sogar modulierbar durch eine Änderung der Umgebungsbedingungen oder durch die Änderung der Stabilitäten der individuellen *repeats* durch Mutationen (Phillips *et al.*, 2012a). Die

konkurrierenden Beiträge der intrinsischen Stabilität der Wiederholungseinheit und der *interrepeat*-Interaktionen bestimmen offenbar, ob die Proteinfaltung als Zwei- oder Mehrzustandssystem beschreibbar ist. Damit besitzen die Interaktionen zwischen den *repeats* eine tragende Rolle für die Kooperativität. Die Oberflächenänderung bei der Entfaltung von *repeat*-Proteinen addiert sich aus der Kontaktfläche zwischen den *repeats* und aus der verborgenen Fläche innerhalb des *repeats*. Bei den helikalen *repeat*-Proteinen (z.B. Ank, TRP) beträgt die verborgene Fläche zwischen den Einheiten ca. 1580 \AA^2 und die innerhalb des *repeats* ca. 1830 \AA^2 . Für β -Strang-haltige *repeat*-Proteine (LRR) ist das Verhältnis dieser Oberflächen stark verändert. Die Berührungsfläche zwischen den individuellen Einheiten ist ähnlich groß (ca. 1650 \AA^2), aber die innerhalb der Wiederholungseinheit verborgene Fläche dagegen wesentlich kleiner (ca. 600 \AA^2) (Kloss *et al.*, 2008). Somit spielt, für LRR-Proteine wie InI, die Kopplung zwischen den *repeats* eine noch größere Rolle. Es wäre denkbar, dass durch eine optimale *interrepeat*-Kopplung ein ideales thermodynamisches Zweizustandsverhalten erreicht werden kann. Dies kann mit Hilfe von artifiziellen LRR-Proteinen untersucht werden, die beispielsweise auf der Konsensussequenz von InI basieren.

Mit der hohen Kooperativität des InI (460 AS) ($m = 48.7 \pm 11.8 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$) geht eine hohe thermodynamische Stabilität einher ($\Delta G_N^{H_2O} = -86.7 \pm 21.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). Andere große *repeat*-Proteine weisen selten vergleichbar hohe Werte auf. Ein Beispiel ist die lösliche β -Helix-Domäne (BHX) (443 AS) des P22 *Tailspike*-Proteins ($\Delta G_N^{H_2O} = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$) (Becker, 2009; Miller *et al.*, 1998). Für YopM (400 AS) konnte eine Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O}$ von -21 bis -56 kJ mol^{-1} , je nach Salzkonzentration, ermittelt werden (Kloss & Barrick, 2008). Mit steigender *repeat*-Anzahl nehmen die Kooperativität und auch die freie Enthalpie der Stabilisierung zu. Diese Tendenz wurde bereits an dem natürlich vorkommenden Ankyrin-*repeat*-Protein *Notch*-Rezeptor gezeigt (Zweifel & Barrick, 2001). Durch Designproteine mit idealisierten Konsensussequenzen wurde dieser Zusammenhang bestätigt (Main *et al.*, 2005a; Wetzel *et al.*, 2008). Amidprotonenaustausch-Experimente zeigen, dass mit der steigenden Anzahl der *repeats* der Schutz vor Austausch zunimmt (Main *et al.*, 2005b). Durch die verbesserte Molekülpackung werden die angrenzenden *repeats* geschützt. Dieser Effekt scheint bei Internalinen im Vergleich zu anderen natürlich vorkommenden *repeat*-Proteinen stärker ausgeprägt zu sein. Übereinstimmend damit zeigt der Vergleich der thermodynamischen Parameter von InI mit denen von InB und InA, dass die hohe Stabilisierung auf der hohen *repeat*-Anzahl beruht. Für InB (7 *repeats*) beträgt die freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O} = -36.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die Kooperativität $m = 40.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (20 °C, pH 7.5) (Freiberg, 2004). Für InA (15 *repeats*) beträgt die freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G_N^{H_2O} = -100 \text{ kJ mol}^{-1}$ und die Kooperativität $m = 60 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (20 °C, pH 7) (Lengefeld, 2003).

Die kinetische Charakterisierung von InJ zeigt, dass die hohe Stabilität auf der Kombination von schneller Faltung und langsamer Entfaltung basiert. Die schnellste im Doppelsprungexperiment gemessene Rate beträgt 0.004 s^{-1} (1.45 M GdmCl). Eine Extrapolation der Regression zu 0 M GdmCl ergibt eine Faltungsgeschwindigkeit $k_f^{H_2O}$ von $3.036 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ ($\ln k_f^{H_2O} = 14.93 \pm 1.05$). Die Rate der Entfaltung in Abwesenheit des Denaturierungsmittels $k_u^{H_2O}$ beträgt $8.84 \times 10^{-7} \pm 0.17 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ($\ln k_u^{H_2O} = -13.94 \pm 0.105$). Ähnliche Verhältnisse sind bereits bei hyperthermophilen Proteinen beobachtet worden z.B. ORF56 (Zeeb *et al.*, 2004), aber auch bei Studien mit artifiziellen *repeat*-Proteinen. In diesen Fällen wurde gezeigt, dass die Stabilitätserhöhung auf einer Abnahme der Entfaltungsrates basiert (Main *et al.*, 2005b; Wetzel *et al.*, 2008). Die Faltungsrates blieb dabei weitestgehend unbeeinflusst. Im Vergleich sind die Ankyrin-Design-Proteine bei gleicher *repeat*-Anzahl deutlich stabiler als die TRP-basierten Proteine und weisen dabei noch niedrigere Entfaltungsrates auf.

Der Faltungsprozess von InJ wird durch mehrere Phasen beschrieben (siehe Abb. 3.27). Ein solches Verhalten konnte bereits oft bei der Faltung von *repeat*-Proteinen beobachtet werden, z.B. für YopM (400 AS) (Kloss & Barrick, 2008). Dabei stehen kinetische Intermediate nicht im Widerspruch zum Zweizustandsmodell, solange es sich nicht um signifikant populierte, thermodynamisch-stabile Zustände handelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Peptidyl-Prolyl-Isomerisierungsreaktionen eine Rolle bei der Faltung von InJ spielen (Schmid *et al.*, 1986). InJ besitzt 14 Proline, die heterogen über das Protein verteilt sind. Im nativen Zustand liegen alle 14 Proline in der *trans*-Konfiguration vor (Bublitz *et al.*, 2008). Die Geschwindigkeit der Isomerisierungsreaktion beträgt gewöhnlich $0.01\text{-}0.1 \text{ s}^{-1}$ (Brandts *et al.*, 1975). In diesem Bereich wurden zwar keine Faltungsgeschwindigkeiten fluoreszenzspektroskopisch detektiert, möglich ist aber, dass sich die mit der Isomerisierung verbundene konformationelle Änderung nicht in dem Fluoreszenzsignal widerspiegelt, ähnlich wie es für die Bildung des nativen Proteins beobachtet wurde. Der langsamste und damit geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung konnte lediglich unter Anwendung des inversen Doppelsprung-Experiments aufgelöst werden.

Die kinetischen Studien zeigen auf, dass die hohe Kooperativität von InJ fast ausschließlich aus dem hohen *m*-Wert der Faltung resultiert. Der Tanford-Wert von 0.93 legt nahe, dass der Übergangszustand größtenteils die Kompaktheit des nativen Zustands besitzt. Im Gegensatz dazu liegt der Tanford-Wert von InB bei 0.4 (Courtemanche & Barrick, 2008). Die Änderung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von InB findet demnach zu ähnlichen Teilen vor und nach dem Erreichen des Übergangszustands statt. InJ dagegen erreicht durch den nativähnlichen Übergangszustand eine optimale Abschirmung der hydrophoben Oberflächen.

Letzten Endes handelt es sich bei InJ um ein bemerkenswert stabiles Protein mit schneller Faltung und langsamer Entfaltung. Dies sind essentielle Attribute für ein extrazelluläres Protein. Die Halbwertszeit der Entfaltungsreaktion in Abwesenheit von Denaturierungsmittel beträgt 13 Tage. Damit übersteigt die Halbwertszeit dieses Proteins bemerkenswerterweise die Lebensspanne von *L. monocytogenes* von 5-22 h (je nach Stamm) (Smulders & Collins, 2005). Auf diese Weise gelingt es *Listeria*, das Invasionsprotein vor Entfaltung und damit drohender Oxidation sowie Aggregation zu schützen.

4.2 Faltung und Entfaltung der InJ-Varianten – Mutationsanalyse und die Rolle der Cysteine

Mit Hilfe der Cysteinsubstitutionen konnte die Stabilität und Faltung von InJ näher untersucht werden. Fast alle erzeugten InJ-Varianten wurden durch die Mutationen destabilisiert. Die durchschnittliche Destabilisierung durch die Substitutionen in den *repeats* 1 bis 11 beträgt 4.8 kJ mol^{-1} . Eine Ausnahme bildet dabei die C355A-Variante. Das hierbei substituierte Cystein befindet sich nicht in dem hoch regulären Arrangement der Cysteinleiter. Der durchgängige Cysteinestapel umfasst die *repeats* 1-11. C355 befindet sich jedoch im C-terminalen *repeat* 13. Einerseits kann die Destabilisierung auf der Störung der Interaktionen zwischen den übereinander angeordneten Cysteinen beruhen, andererseits können die Erzeugung einer Kavität und die dadurch verminderten nativen van-der-Waals-Interaktionen dafür verantwortlich sein. Aufgrund der terminalen Lokalisation des *repeats* 13 und der damit einhergehenden höheren Flexibilität, sind beide Möglichkeiten offen. Studien identifizierten einen stabilisierenden Beitrag von $4\text{-}6 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Einlagerung von $-\text{CH}_2$ -Gruppen in das Innere von globulären Proteinen (Loladze *et al.*, 2002; Pace, 1992; Pace *et al.*, 2011). Die Volumenänderung bei Substitutionen von Isoleucin zu Valin (äquivalent zu $-\text{CH}_2$ -Deletion) beträgt -25.8 \AA^3 nach (Harpaz *et al.*, 1994). Für die Substitution von Cystein zu Alanin beträgt die Volumenänderung -13.4 \AA^3 . Die Cystein-zu-Alanin-Mutation verursacht also eine kleinere Volumenänderung bei vergleichbarer Destabilisierung ($-\text{CH}_2$ versus $-\text{SH}$). Fraglich bleibt, ob dies auf der Interaktion der Cysteine untereinander beruht oder auf der Rigidität der InJ-Struktur. Denn die Windungslänge von 21 Aminosäuren bietet sterisch kaum Spielraum zur Kompensation der erzeugten Kavität. Eine Möglichkeit dies aufzuklären, besteht in einer weiteren Mutationsstudie, in der die Leucine im Inneren zu Valinen substituiert werden. Beruht der destabilisierende Effekt lediglich auf einer Kavitätserzeugung, müsste dieser weitaus stärker zu beobachten sein. Anderenfalls wird umso mehr die Bedeutung der Cysteine für die Stabilität konkretisiert.

Die hier präsentierten Ergebnisse unterstreichen nochmals die Bedeutung der hydrophoben Packung im Proteininneren und die Relevanz jeden einzelnen Restes. Ebenso von Belang ist die hohe

Regelmäßigkeit der InJ-Wiederholungseinheit, denn der destabilisierende Effekt ist gleichbleibend entlang des Proteins (Tab. 3.3).

Weiterhin wurden durch die Mutationsstudie Hinweise auf die Beschaffenheit des Übergangszustands von InJ erhalten. Mit Hilfe der Mutationsanalyse lässt sich feststellen, in welchem Ausmaß, die von der Mutation betroffene Wechselwirkung, bereits ausgebildet ist. Auf diese Weise konnten Informationen über die Strukturierung der einzelnen Windungen im Übergangszustand erhalten werden. Von der Destabilisierung betroffen sind die *repeats* 5, 6, 7, 9 und 11, wobei für die *repeats* 8 und 10 keine Faltungsdaten vorliegen (Abb. 4.1). Die Substitutionen in den *repeats* 1, 3 und 13 zeigten keine Auswirkungen auf die Faltung. Aber auch die Entfaltung der Varianten C100A (*repeat* 1) und C143A (*repeat* 3) zeigte keine Veränderung, obwohl die Gesamtstabilität im Gegensatz zu der C355A-Variante (*repeat* 13) vermindert vorlag. Die Strukturierung des Übergangszustandes scheint nicht von der Regelmäßigkeit der Cysteinleiter abhängig zu sein, denn die stärkste Beeinträchtigung der Faltung zeigte die Variante C228A, in der sich die Mutation im zentralen *repeat* 7 befindet. Die Analyse deutet auf einen bereits im Übergang strukturierten Bereich in der zentralen Region der LRR-Domäne von InJ und damit auf einen zentralen Faltungsnukleus hin.

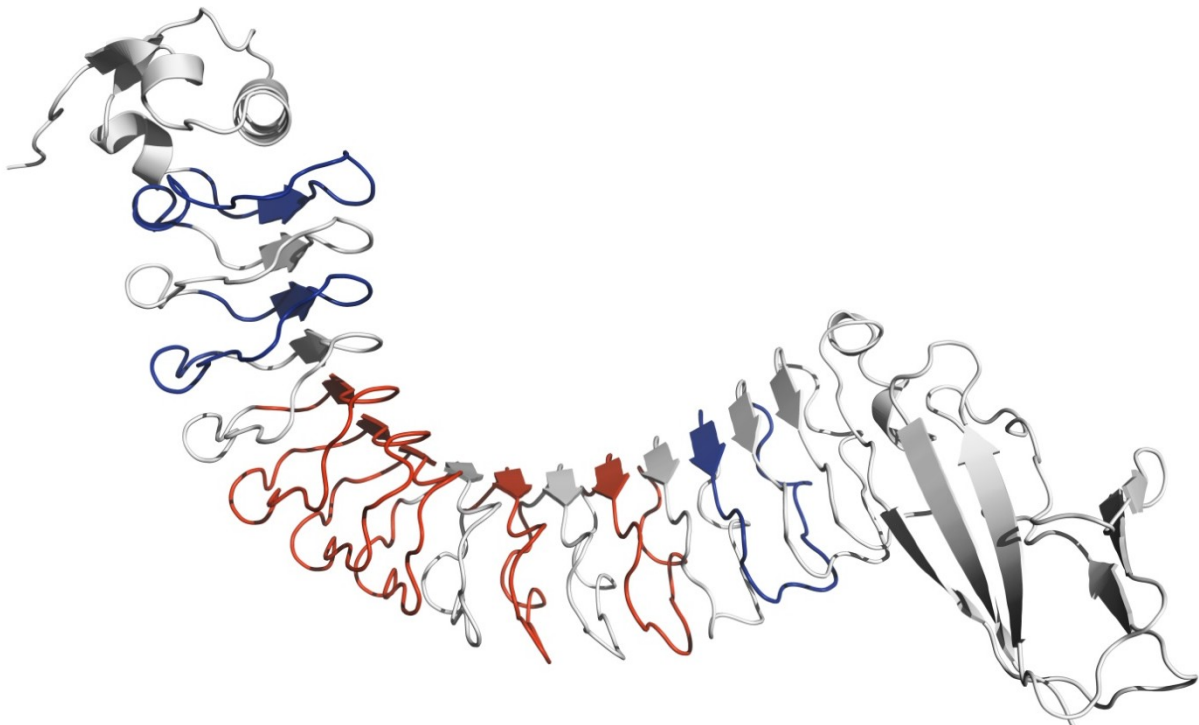


Abb. 4.1 Die Ergebnisse der Mutationsanalyse auf struktureller Ebene. Dargestellt ist die Röntgenkristallstruktur von InJ (3BZ5; Bublitz *et al.*, 2008). Die rot-gefärbten Segmente beinhalten die faltungssensitiven Substitutionen. Die blau-gefärbten Wiederholungseinheiten zeigen durch die Substitution keine Änderung im Faltungsverhalten. Für nicht-gefärbte Segmente liegen keine Faltungsdaten vor.

Den Ergebnissen der Mutationsanalyse entsprechend, besäße InJ einen halbgefalteten Übergangszustand. Dies wäre allerdings nicht übereinstimmend mit dem ermittelten Tanford-Wert von 0.93, der einen fast vollständig nativstrukturierten Übergangszustand impliziert. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass zwar eine fast native Kompaktierung vorliegt, native Interaktionen allerdings noch nicht vollständig ausgebildet wurden.

Es wurden bereits Faltungswege mehrerer *repeat*-Proteine, u.a. des Internalin InLB, mit Hilfe der ϕ -Wert-Analyse untersucht. Durch die umfangreiche Anwendung der ϕ -Wert-Analyse wurde gezeigt, dass der Faltungsnukleus von InLB N-terminal lokalisiert ist (Courtemanche & Barrick, 2008). Hierbei muss erwähnt werden, dass sich diese Ergebnisse auf ein Konstrukt ohne C-terminale IR-Domäne beziehen. Für ebendiese Domäne wurde allerdings ein hoher stabilisierender Beitrag demonstriert (Freiberg *et al.*, 2004). Daher ist es denkbar, dass die Ergebnisse nicht für die vollständige Internalindomäne (*capping*-Domäne, LRR-Motiv, IR-Domäne) gelten und somit nicht mit der hier durchgeführten Analyse vergleichbar sind.

Für das einzige mittels Mutationsanalyse untersuchte β -Solenoidprotein P22TSP (BHX-Konstrukt) ist ebenfalls eine zentrale Positionierung des Faltungsnukleus festgestellt worden (Becker, 2009). Bei den restlichen mittels ϕ -Wert-Analyse untersuchten Proteinen, handelt es sich um α -helikale Ankyrin-*repeat*-Proteine. Beispielsweise ist die Faltung von p16 und Myotropin C-terminal getrieben (Lowe & Itzhaki, 2007b; Tang *et al.*, 2003). Das größte, bis jetzt untersuchte *repeat*-Protein ist D34 (426 AS). Es handelt sich hierbei um ein Fragment von AnkyrinR. Dieses Protein faltet vom C-Terminus aus zu einem stabilen Intermediat, das aus einem halbgefalteten Protein besteht (Werbeck *et al.*, 2008). Es ist aber auch ein zentraler Faltungsnukleus an der *Notch*-Ankyrin-Domäne beobachtet worden (Bradley & Barrick, 2006). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *repeat*-Proteine meist einen distinkten Faltungsweg verfolgen, über den sich keine allgemeine Aussage treffen lässt, da er höchst individuell zu sein scheint.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, umfassende Charakterisierung gewährt Einblicke in die grundlegenden Prinzipien der InJ-Faltung. Als Ursache für die beachtliche Stabilität von InJ wurde die sehr hohe Kooperativität der Faltung identifiziert. Auch wenn eine detaillierte Mutationsanalyse nicht möglich war, so hat die signifikante Veränderung der Faltungsgeschwindigkeit jedoch Hinweise auf das Vorliegen eines zentralen Faltungsnukleus gegeben. Die hier vorgestellten Erkenntnisse können als Grundlage für weitere Studien genutzt werden. Einen interessanten Aspekt bieten die widersprüchlichen Ergebnisse zu den InJ-Varianten C100A und C122A. In diesem Zusammenhang ist eine weitere Untersuchung der langsamen Faltungsphase bei geringen GdmCl-Konzentrationen (<1.4 M) durch inverse Doppelsprünge an der *sequential-mixing stopped-flow* Apparatur unumgänglich. Zudem können dadurch die Ergebnisse der Mutationsstudie validiert werden.

Substitutionen von Leucin durch Valin in der gesamten Internalindomäne einschließlich der N- und C-terminalen *capping*-Motive würden eine konsequente Ergänzung der Mutationsanalyse darstellen. Darüber hinaus könnte dadurch der destabilisierende Beitrag einer CH₂-Gruppe ermittelt werden, um die Destabilisierung durch das Entfernen der SH-Gruppe bewerten zu können. Die stabilisierenden Beiträge der *capping*-Motive sowie der einzelnen *repeats* könnten durch Studien an entsprechenden Deletionskonstrukten ermittelt werden.

Das Protein InIJ eignet sich aufgrund der hoch konservierten und repetitiven Wiederholungseinheit in besonderer Weise für Konsensus-*repeat*-Design. Es ließe sich so möglicherweise der von (Matsushima *et al.*, 2010) postulierte Vorfahre der LRR-Proteine erzeugen. Allerdings sollte die Konsensussequenz (21 AS) auf der cysteinfreien IRREKO@LRR-Sequenz (Kap. 1.2.1) basieren, um experimentelle Schwierigkeiten zu vermeiden und Aggregationsneigungen zu mindern.

Dem Design artifizierlicher *repeat*-Proteine kommt immer größere Bedeutung zu. Der Einsatz reicht von Biomaterialien zur Oberflächenbeschichtung bis hin zu medizinischen Anwendungen (Phillips *et al.*, 2012b; Zahnd *et al.*, 2010). Vorbilder hierfür finden sich in der Natur. Bemerkenswerterweise übernehmen die LRR-Proteine analog zu Antikörpern die erworbene Immunantwort bei der Gruppe der Kieferlosen (Pancer & Cooper, 2006). Die medizinische Anwendung von DARPINs als Therapeutika wurde bereits in klinischen Studien getestet (Tamaskovic *et al.*, 2012). Der Einsatz von Design-*repeat*-Proteinen als Therapeutika oder in der Diagnostik verspricht Vorteile gegenüber den monoklonalen Antikörpern, denn sie weisen eine erhöhte Stabilität und längere Bioverfügbarkeit auf. Ein nicht zu vernachlässigender Vorteil ist außerdem die einfachere und billigere Produktion. Dies unterstreicht die Relevanz von Faltungsstudien an *repeat*-Proteinen, insbesondere an den von der Forschung bisher vernachlässigten LRR-Proteinen.

Literaturverzeichnis

- Acevedo, O., Guzman-Casado, M., Garcia-Mira, M.M., Ibarra-Molero, B., and Sanchez-Ruiz, J.M. (2002). pH Corrections in Chemical Denaturant Solutions. *Anal. Biochem.* *306*, 158–161.
- Akita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ito, S., and Yamane, T. (2001). The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *57*, 1786–1792.
- Aksel, T., Majumdar, A., and Barrick, D. (2011). The contribution of entropy, enthalpy, and hydrophobic desolvation to cooperativity in repeat-protein folding. *Structure* *19*, 349–360.
- Anfinsen, C.B. (1973). Untersuchungen über die Ursachen der Faltung von Proteinketten (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem.* *85*, 1065–1074.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., and White, F.H. (1961). The Kinetics of Formation of Native Ribonuclease during Oxidation of the Reduced Polypeptide Chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *47*, 1309–1314.
- Bachmann, A., and Kiefhaber, T. (2001). Apparent two-state tandem repeat folding is a sequential process along a defined route. *J. Mol. Biol.* *306*, 375–386.
- Bailey, J.E. (1968). UV absorption characteristics of N-acetyl methyl esters of the aromatic amino acids, cystine, and N-acetylcysteine. *Handb. Biochem. Clevel. Ohio Chem. Rubber Co.* p B-18.
- Den Bakker, H.C., Cummings, C.A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R.H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M.R., and Wiedmann, M. (2010). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics* *11*, 688.
- Becker, M. (2009). Bedeutung eines hydrophoben Seitenkettenstapels für Stabilität, Faltung und Struktur des P22-Tailspikeproteins. Doktorarbeit, Universität Potsdam
- Beddoe, T., Bushell, S.R., Perugini, M.A., Lithgow, T., Mulhern, T.D., Bottomley, S.P., and Rossjohn, J. (2004). A Biophysical Analysis of the Tetratricopeptide Repeat-rich Mitochondrial Import Receptor, Tom70, Reveals an Elongated Monomer That Is Inherently Flexible, Unstable, and Unfolds via a Multistate Pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 46448–46454.
- Bella, J., Hindle, K.L., McEwan, P.A., and Lovell, S.C. (2008). The leucine-rich repeat structure. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 2307–2333.
- Bierne, H., and Cossart, P. (2002). InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J. Cell Sci.* *115*, 3357–3367.
- Bierne, H., and Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* Surface Proteins: from Genome Predictions to Function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *71*, 377–397.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Consortium, the E.L.G., Jansch, L., Portillo, F.G., Schneewind, O., *et al.* (2002). Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol. Microbiol.* *43*, 869–881.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* *9*, 1156–1166.
- Bradley, C.M., and Barrick, D. (2006). The Notch Ankyrin Domain Folds via a Discrete, Centralized Pathway. *Structure* *14*, 1303–1312.

- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and 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*, 4953–4963.
- Brockwell, D.J., and Radford, S.E. (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.* *17*, 30–37.
- Bruck, S., Personnic, N., Prevost, M.-C., Cossart, P., and Bierne, H. (2011). Regulated Shift from Helical to Polar Localization of *Listeria monocytogenes* Cell Wall-Anchored Proteins. *J. Bacteriol.* *193*, 4425–4437.
- Bryngelson, J.D., and Wolynes, P.G. (1987). Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 7524–7528.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D., and Wolynes, P.G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *21*, 167–195.
- Bublitz, M. (2007). Structural and Functional Analysis of Virulence-Associated Listerial Surface Proteins. Doktorarbeit, Technische Universität Braunschweig
- Bublitz, M., Holland, C., Sabet, C., Reichelt, J., Cossart, P., Heinz, D.W., Bierne, H., and Schubert, W.-D. (2008). Crystal Structure and Standardized Geometric Analysis of InIJ, a Listerial Virulence Factor and Leucine-Rich Repeat Protein with a Novel Cysteine Ladder. *J. Mol. Biol.* *378*, 87–96.
- Buchanan, S.G.S.C., and Gay, N.J. (1996). Structural and functional diversity in the leucine-rich repeat family of proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *65*, 1–44.
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., and Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* *10*, 238–245.
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., and Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* *2*, 379–394.
- Capasso, S., Mazzarella, L., Sorrentino, G., Balboni, G., and Kirby, A.J. (1996). Kinetics and mechanism of the cleavage of the peptide bond next to asparagine. *Peptides* *17*, 1075–1077.
- Capestany, C.A., Kuboniwa, M., Jung, I.-Y., Park, Y., Tribble, G.D., and Lamont, R.J. (2006). Role of the *Porphyromonas gingivalis* InIJ Protein in Homotypic and Heterotypic Biofilm Development. *Infect. Immun.* *74*, 3002–3005.
- Clarke, J., and Fersht, A.R. (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: Increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry* *32*, 4322–4329.
- Cook, K.H., Schmid, F.X., and Baldwin, R.L. (1979). Role of proline isomerization in folding of ribonuclease A at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *76*, 6157–6161.
- Cortajarena, A.L., and Regan, L. (2011). Calorimetric study of a series of designed repeat proteins: Modular structure and modular folding. *Protein Sci.* *20*, 336–340.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *108*, 19484–19491.
- Courtemanche, N., and Barrick, D. (2008). The Leucine-Rich Repeat Domain of Internalin B Folds along a Polarized N-Terminal Pathway. *Structure* *16*, 705–714.
- Dams, T., and Jaenicke, R. (1999). Stability and Folding of Dihydrofolate Reductase from the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* *38*, 9169–9178.

- Daniels, R., Mellroth, P., Bernsel, A., Neiers, F., Normark, S., von Heijne, G., and Henriques-Normark, B. (2010). Disulfide Bond Formation and Cysteine Exclusion in Gram-positive Bacteria. *J Biol Chem* 285, 3300–3309.
- Deniz, A.A., Laurence, T.A., Beligere, G.S., Dahan, M., Martin, A.B., Chemla, D.S., Dawson, P.E., Schultz, P.G., and Weiss, S. (2000). Single-molecule protein folding: Diffusion fluorescence resonance energy transfer studies of the denaturation of chymotrypsin inhibitor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5179–5184.
- Desvaux, M., and Hébraud, M. (2006). The protein secretion systems in *Listeria*: inside out bacterial virulence. *Fems Microbiol. Rev.* 30, 774–805.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Chambon, C., and Hébraud, M. (2010). Comprehensive Appraisal of the Extracellular Proteins from a Monoderm Bacterium: Theoretical and Empirical Exoproteomes of *Listeria monocytogenes* EGD-e by Secretomics. *J. Proteome Res.* 9, 5076–5092.
- Dhar, G., Faull, K.F., and Schneewind, O. (2000). Anchor Structure of Cell Wall Surface Proteins in *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* 39, 3725–3733.
- Dill, K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29, 7133–7155.
- Dill, K.A., and Chan, H.S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* 4, 10–19.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* 16, 251–261.
- Dunker, A.K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams R.M., Romero P., Oh J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.M., Hipps K.W., et al. (2001). Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* 19, 26–59.
- Dutton, R.J., Boyd, D., Berkmen, M., and Beckwith, J. (2008). Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11933–11938.
- EFSA (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. 6, 1–42.
- Ellman, G.L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 443–450.
- Enkhbayar, P., Kamiya, M., Osaki, M., Matsumoto, T., and Matsushima, N. (2004). Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 54, 394–403.
- Evdokimov, A.G., Anderson, D.E., Routzahn, K.M., and Waugh, D.S. (2001). Unusual molecular architecture of the *Yersinia pestis* cytotoxin YopM: a leucine-rich repeat protein with the shortest repeating unit. *J. Mol. Biol.* 312, 807–821.
- Eyring, H. (1935). The Activated Complex in Chemical Reactions. *J. Chem. Phys.* 3, 107–115.
- Fersht, A.R. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science* (NewYork: W H Freeman & Co).
- Fersht, A.R. (2000). Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: Contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1525–1529.

- Fersht, A.R., Leatherbarrow, R.J., and Wells, T.N.C. (1987). Structure-activity relationships in engineered proteins: analysis of use of binding energy by linear free energy relationships. *Biochemistry* 26, 6030–6038.
- Freiberg, A. (2004). Das "Leucine-Rich-Repeat" im Invasionsprotein Internalin B: Stabilität und Faltung eines Solenoidproteins" Doktorarbeit, Universität Potsdam
- Freiberg, A., Machner, M.P., Pfeil, W., Schubert, W.-D., Heinz, D.W., and Seckler, R. (2004). Folding and Stability of the Leucine-rich Repeat Domain of Internalin B from *Listeria monocytogenes*. *J. Mol. Biol.* 337, 453–461.
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouln, E., and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127–1141.
- Gast, K., Damaschun, G., Misselwitz, R., and Zirwer, D. (1992). Application of dynamic light scattering to studies of protein folding kinetics. *Eur. Biophys. J.* 21, 357–362.
- Gast, K., Damaschun, H., Eckert, K., Schulze-Forster, K., Maurer, H.R., Mueller-Frohne, M., Zirwer, D., Czarnecki, J., and Damaschun, G. (1995). Prothymosin .alpha.: A Biologically Active Protein with Random Coil Conformation. *Biochemistry* 34, 13211–13218.
- Gast, K., Nöppert, A., Müller-Frohne, M., Zirwer, D., and Damaschun, G. (1997). Stopped-flow dynamic light scattering as a method to monitor compaction during protein folding. *Eur. Biophys. J.* 25, 211–219.
- Geiger, T., and Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginy and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. *J. Biol. Chem.* 262, 785–794.
- Greenfield, N.J. (1996). Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* 235, 1–10.
- Guydosh, N.R., and Fersht, A.R. (2008). A Guide to Measuring and Interpreting Φ -values. *Protein Folding Handbook*, 445–453.
- Haber, E., and Anfinsen, C. (1962). Side-chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 237, 1839–1844.
- Hamill, S.J., Meekhof, A.E., and Clarke, J. (1998). The Effect of Boundary Selection on the Stability and Folding of the Third Fibronectin Type III Domain from Human Tenascin. *Biochemistry* 37, 8071–8079.
- Hammond, G.S. (1955). A Correlation of Reaction Rates. *J. Am. Chem. Soc.* 77, 334–338.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Harpaz, Y., Gerstein, M., and Chothia, C. (1994). Volume changes on protein folding. *Structure* 2, 641–649.
- Heaton, J. c., and Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review. *J. Appl. Microbiol.* 104, 613–626.
- Heukeshoven, J., and Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103–112.
- Hindle, K.L., Bella, J., and Lovell, S.C. (2009). Quantitative analysis and prediction of curvature in leucine-rich repeat proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 77, 342–358.

- Hof, H. (2001). *Listeria monocytogenes* : A Causative Agent of Gastroenteritis? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20, 369–373.
- Huang, G.S., and Oas, T.G. (1995). Structure and Stability of Monomeric λ . Repressor: NMR Evidence for Two-State Folding. *Biochemistry* 34, 3884–3892.
- Huber, R., and Bennett, W.S. (1983). Functional significance of flexibility in proteins. *Biopolymers* 22, 261–279.
- Ikai, A., Fish, W.W., and Tanford, C. (1973). Kinetics of unfolding and refolding of proteins , : II. Results for cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 73, 165–184.
- Ireton, K. (2007). Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 9, 1365–1375.
- Itzhaki, L.S., Otzen, D.E., and Fersht, A.R. (1995). The Structure of the Transition State for Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2 Analysed by Protein Engineering Methods: Evidence for a Nucleation-condensation Mechanism for Protein Folding. *J. Mol. Biol.* 254, 260–288.
- Jackson, S.E. (1998). How do small single-domain proteins fold? *Fold. Des.* 3, R81–R91.
- Jackson, S.E., and Fersht, A.R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition. *Biochemistry* 30, 10428–10435.
- Jackson, S.E., elMasry, N., and Fersht, A.R. (1993a). Structure of the hydrophobic core in the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2: A critical test of the protein engineering method of analysis. *Biochemistry* 32, 11270–11278.
- Jackson, S.E., Moracci, M., elMasry, N., Johnson, C.M., and Fersht, A.R. (1993b). Effect of cavity-creating mutations in the hydrophobic core of chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry* 32, 11259–11269.
- Jenkins, J., and Pickersgill, R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77, 111–175.
- Jonquière, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., and Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34, 902–914.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B., and Clark, P.L. (2006). Pertactin β -helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 4918–4923.
- Junttila, J., Hirn, J., Hill, P., and Nurmi, E. (1989). Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *J. Food. Prot.* 52, 158–161.
- Junttila, J.R., Niemelä, S. i., and Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *J. Appl. Microbiol.* 65, 321–327.
- Kajander, T., Cortajarena, A.L., Main, E.R.G., Mochrie, S.G.J., and Regan, L. (2005). A New Folding Paradigm for Repeat Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 10188–10190.
- Kajava, A.V. (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 277, 519–527.
- Kajava, A.V. (2012). Tandem repeats in proteins: From sequence to structure. *J. Struct. Biol.* 179, 279–288.

- Kajava, A.V., and Kobe, B. (2002). Assessment of the ability to model proteins with leucine-rich repeats in light of the latest structural information. *Protein Sci.* **11**, 1082–1090.
- Kajava, A.V., and Steven, A.C. (2006). β -Rolls, β -Helices, and Other β -Solenoid Proteins. *Advances in Protein Chemistry* **73**, 55–96.
- Kajava, A.V., Vassart, G., and Wodak, S.J. (1995). Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure* **3**, 867–877.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H., and Phillips, D.C. (1958). A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. *Nature* **181**, 662–666.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H., and Buchner, J. (1991). Protein Aggregation in vitro and in vivo: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation. *Nat. Biotech.* **9**, 825–829.
- King, J., and Laemmli, U.K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **62**, 465–477.
- Kloss, E., and Barrick, D. (2008). Thermodynamics, Kinetics, and Salt dependence of Folding of YopM, a Large Leucine-rich Repeat Protein. *J. Mol. Biol.* **383**, 1195–1209.
- Kloss, E., Courtemanche, N., and Barrick, D. (2008). Repeat-protein folding: New insights into origins of cooperativity, stability, and topology. *Arch. Biochem. Biophys.* **469**, 83–99.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415–421.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995). Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 409–416.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2000). When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 509–515.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 725–732.
- Kuster, F., and Seckler, R. (2008). Pea Seed Lectin Folds and Oligomerizes via an Intermediate Not Represented in the Structural Hierarchy. *Biochemistry* **47**, 2458–2465.
- Leffler, J.E. (1953). Parameters for the Description of Transition States. *Science* **117**, 340–341.
- Lengefeld, J. (2003). Stabilität, Faltung und Struktur von Internalin. Diplomarbeit. Universität Potsdam.
- Leopold, P.E., Montal, M., and Onuchic, J.N. (1992). Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8721–8725.
- Levinthal, C. (1968). Are There Pathways for Protein Folding? *J. Chim. Phys.* **65**, 44–45.
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. *Mossbauer Spectrosc. Biol. Syst.* **22–24**.
- Lindén, S., Bierne, H., Sabet, C., Png, C., Florin, T., McGuckin, M., and Cossart, P. (2008). *Listeria monocytogenes* internalins bind to the human intestinal mucin MUC2. *Arch. Microbiol.* **190**, 101–104.
- Loladze, V.V., Ermolenko, D.N., and Makhatadze, G.I. (2002). Thermodynamic Consequences of Burial of Polar and Non-polar Amino Acid Residues in the Protein Interior. *J. Mol. Biol.* **320**, 343–357.

- Lowe, A.R., and Itzhaki, L.S. (2007a). Biophysical Characterisation of the Small Ankyrin Repeat Protein Myotrophin. *J. Mol. Biol.* **365**, 1245–1255.
- Lowe, A.R., and Itzhaki, L.S. (2007b). Rational redesign of the folding pathway of a modular protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2679–2684.
- Lumry, R., Biltonen, R., and Brandts, J.F. (1966). Validity of the “two-state” hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* **4**, 917–944.
- Main, E.R., Jackson, S.E., and Regan, L. (2003). The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 482–489.
- Main, E.R., Lowe, A.R., Mochrie, S.G., Jackson, S.E., and Regan, L. (2005a). A recurring theme in protein engineering: the design, stability and folding of repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 464–471.
- Main, E.R.G., Stott, K., Jackson, S.E., and Regan, L. (2005b). Local and long-range stability in tandemly arrayed tetratricopeptide repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5721–5726.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Yeates, T.O., and Eisenberg, D. (1999). A census of protein repeats. *J. Mol. Biol.* **293**, 151–160.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., and Ghosh, P. (1999). Structure of the InIB Leucine-Rich Repeats, a Domain that Triggers Host Cell Invasion by the Bacterial Pathogen *L. monocytogenes*. *Mol. Cell* **4**, 1063–1072.
- Matouschek, A., and Fersht, A.R. (1991). Protein engineering in analysis of protein folding pathways and stability. *Methods in Enzymology* **202**, 82–112.
- Matouschek, A., Kellis, J.T., Serrano, L., Bycroft, M., and Fersht, A.R. (1990). Transient folding intermediates characterized by protein engineering. *Nature* **346**, 440–445.
- Matsushima, N., Yoshida, H., Kumaki, Y., Kamiya, M., Tanaka, T., Izumi, Y., and Kretsinger, R.H. (2008). Flexible Structures and Ligand Interactions of Tandem Repeats Consisting of Proline, Glycine, Asparagine, Serine, and/or Threonine Rich Oligopeptides in Proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 591–610.
- Matsushima, N., Miyashita, H., Mikami, T., and Kuroki, Y. (2010). A nested leucine rich repeat (LRR) domain: The precursor of LRRs is a ten or eleven residue motif. *BMC Microbiol.* **10**, 235.
- Matthews, C.R. (1987). Effect of point mutations of the folding of globular proteins. *Methods in Enzymology* **154**, 498–511.
- Maxwell, K.L., Wildes, D., Zarrine-Afsar, A., De Los Rios, M.A., Brown, A.G., Friel, C.T., Hedberg, L., Horng, J.-C., Bona, D., Miller, E.J., *et al.* (2005). Protein folding: Defining a “standard” set of experimental conditions and a preliminary kinetic data set of two-state proteins. *Protein Sci.* **14**, 602–616.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P., and Roberts, T.A. (1997). Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes* The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 221–232.
- Mello, C.C., and Barrick, D. (2004). An experimentally determined protein folding energy landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14102–14107.
- Meyer, C., Fredriksson-Ahomaa, M., Kleta, S., Ellerbroek, L., Thiel, S., and Märklbauer, E. (2012). Occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat poultry products available on the German market. *Food Res. Int.* **48**, 944–947.

- Miller, S., Schuler, B., and Seckler, R. (1998). A Reversibly Unfolding Fragment of P22 Tailspike Protein with Native Structure: The Isolated β -Helix Domain. *Biochemistry* *37*, 9160–9168.
- Mirsky, A.E., and Pauling, L. (1936). On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *22*, 439–447.
- Mittermaier, A., and Kay, L.E. (2006). New Tools Provide New Insights in NMR Studies of Protein Dynamics. *Science* *312*, 224–228.
- Mosavi, L.K., Williams, S., and Peng, Z. (2002). Equilibrium Folding and Stability of Myotrophin: A Model Ankyrin Repeat Protein. *J. Mol. Biol.* *320*, 165–170.
- Myers, J.K., Pace, C.N., and Scholtz, J.M. (1995). Denaturant m-values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* *4*, 2138–2148.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1999). Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 174–229.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., and Cox, M.M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry* (W. H. Freeman).
- Niemann, H.H., Jäger, V., Butler, P.J.G., van den Heuvel, J., Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E., and Heinz, D.W. (2007). Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase Met in Complex with the *Listeria* Invasion Protein InlB. *Cell* *130*, 235–246.
- Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* *28*, 1166–1167.
- Oldfield, C.J., Cheng, Y., Cortese, M.S., Brown, C.J., Uversky, V.N., and Dunker, A.K. (2005). Comparing and Combining Predictors of Mostly Disordered Proteins. *Biochemistry* *44*, 1989–2000.
- Oliveberg, M. (1998). Alternative Explanations for “Multistate” Kinetics in Protein Folding: Transient Aggregation and Changing Transition-State Ensembles. *Accounts Chem. Res.* *31*, 765–772.
- Ooi, A., Hussain, S., Seyedarabi, A., and Pickersgill, R.W. (2006). Structure of internalin C from *Listeria monocytogenes*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *62*, 1287–1293.
- Pace, C.N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Enzyme Structure Part L* *131*, 266–280.
- Pace, C.N. (1992). Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. *J. Mol. Biol.* *226*, 29–35.
- Pace, C.N., and Schmid, F.X. (1997). How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. *Protein Structure: A Practical Approach*. 253–259.
- Pace, C.N., and Scholtz, J.M. (1997). Measuring the conformational stability of a protein. *Protein Structure: A Practical Approach*. 299–321.
- Pace, C.N., Fu, H., Fryar, K.L., Landua, J., Trevino, S.R., Shirley, B.A., Hendricks, M.M., Iimura, S., Gajiwala, K., Scholtz, J.M., *et al.* (2011). Contribution of Hydrophobic Interactions to Protein Stability. *J. Mol. Biol.* *408*, 514–528.
- Pancer, Z., and Cooper, M.D. (2006). The Evolution of Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 497–518.
- Parish, M.E., and Higgins, D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Prot.* *52*, 144–147.

- Pauling, L., and Corey, R.B. (1951). Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds Two New Pleated Sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 729–740.
- Pauling, L., Corey, R.B., and Branson, H.R. (1951). The Structure of Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 205–211.
- Pentecost, M., Kumaran, J., Ghosh, P., and Amieva, M.R. (2010). *Listeria monocytogenes* Internalin B Activates Junctional Endocytosis to Accelerate Intestinal Invasion. *PLOS Pathog.* 6, e1000900.
- Perl, D., Welker, C., Schindler, T., Schröder, K., Marahiel, M.A., Jaenicke, R., and Schmid, F.X. (1998). Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 5, 229–235.
- Petersen, M.T.N., Jonson, P.H., and Petersen, S.B. (1999). Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins. *Protein Eng.* 12, 535–548.
- Pfeil, W. (2001). *Protein Stability and Folding: A Collection of Thermodynamic Data* (Springer).
- Phillips, J.J., Javadi, Y., Millership, C., and Main, E.R.G. (2012a). Modulation of the multistate folding of designed TPR proteins through intrinsic and extrinsic factors. *Protein Sci.* 21, 327–338.
- Phillips, J.J., Millership, C., and Main, E.R.G. (2012b). Fibrous Nanostructures from the Self-Assembly of Designed Repeat Protein Modules. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 13132–13135.
- Du Plessis, D.J.F., Nouwen, N., and Driessen, A.J.M. (2011). The Sec translocase. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Biomembr.* 1808, 851–865.
- Pletneva, E.V., Gray, H.B., and Winkler, J.R. (2005). Snapshots of cytochrome c folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18397–18402.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3046–3048.
- Razvi, A., and Scholtz, J.M. (2006). Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* 15, 1569–1578.
- Riddles, P.W., Blakeley, R.L., and Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. *Methods in Enzymology* 91, 49–60.
- S. Yanari, and F. A. Bovey (1960). Interpretation of the Ultraviolet Spectral Changes of Proteins. *J. Biol. Chem.* 235, 2818–2826.
- Sabet, C., Lecuit, M., Cabanes, D., Cossart, P., and Bierne, H. (2005). LPXTG Protein InlJ, a Newly Identified Internalin Involved in *Listeria monocytogenes* Virulence. *Infect. Immun.* 73, 6912–6922.
- Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N., Lecuit, M., Dubrac, S., Poupel, O., Gouin, E., Nahori, M.-A., Cossart, P., and Bierne, H. (2008). The *Listeria monocytogenes* Virulence Factor InlJ Is Specifically Expressed In Vivo and Behaves as an Adhesin. *Infect. Immun.* 76, 1368–1378.
- Salinovich, O., and Montelaro, R.C. (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156, 341–347.
- Santoro, M.M., and Bolen, D.W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl .alpha.-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 27, 8063–8068.

- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* *166*, 368–379.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T.M. (2010). Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* *11*, 573.
- Schmid, F.X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* *22*, 4690–4696.
- Schmid, F.X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods in Enzymology* *131*, 70–82.
- Schmid, F.X., Grafl, R., Wrba, A., and Beintema, J.J. (1986). Role of proline peptide bond isomerization in unfolding and refolding of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *83*, 872–876.
- Schneewind, O., Model, P., and Fischetti, V.A. (1992). Sorting of protein a to the staphylococcal cell wall. *Cell* *70*, 267–281.
- Schubert, W.-D., and Heinz, D.W. (2003). Structural Aspects of Adhesion to and Invasion of Host Cells by the Human Pathogen *Listeria monocytogenes*. *ChemBioChem* *4*, 1285–1291.
- Schubert, W.-D., Göbel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E., and Heinz, D.W. (2001). Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J. Mol. Biol.* *312*, 783–794.
- Schubert, W.-D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., and Heinz, D.W. (2002). Structure of Internalin, a Major Invasion Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with Its Human Receptor E-Cadherin. *Cell* *111*, 825–836.
- Schuler, B., Lipman, E.A., and Eaton, W.A. (2002). Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nature* *419*, 743–747.
- Scott, P.G., McEwan, P.A., Dodd, C.M., Bergmann, E.M., Bishop, P.N., and Bella, J. (2004). Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 15633–15638.
- Silow, M., and Oliveberg, M. (1997). Transient aggregates in protein folding are easily mistaken for folding intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 6084–6086.
- Smulders, F.J.M., and Collins, J.D. (2005). Risk Management Strategies: Monitoring and Surveillance (Wageningen Academic Pub).
- Sternier, R. hard, and Liebl, W. (2001). Thermophilic Adaptation of Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *36*, 39–106.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* *41*, 207–234.
- Takase, K., Nitta, K., and Sugai, S. (1974). Thermodynamics of the unfolding of [alpha]-lactalbumin by guanidine thiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta Bba - Protein Struct.* *371*, 352–359.
- Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M., and Plückthun, A. (2012). Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): From Research to Therapy. *Methods in Enzymology* *503*, 101–134.
- Tanford, C. (1970). Protein denaturation. *Adv Protein Chem* *24*, 95.

- Tang, K.S., Fersht, A.R., and Itzhaki, L.S. (2003). Sequential Unfolding of Ankyrin Repeats in Tumor Suppressor p16. *Structure* 11, 67–73.
- Thomsen, M.C.F., and Nielsen, M. (2012). Seq2Logo: a method for construction and visualization of amino acid binding motifs and sequence profiles including sequence weighting, pseudo counts and two-sided representation of amino acid enrichment and depletion. *Nucleic Acids Res.* 1-7
- Tiffany, M.L., and Krimm, S. (1969). Circular dichroism of the “random” polypeptide chain. *Biopolymers* 8, 347–359.
- Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27, 527–533.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Tsai, H.-N., and Hodgson, D.A. (2003). Development of a Synthetic Minimal Medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6943–6945.
- Tymieniecki, A. (2010). Faltung und Stabilität der Mutante C206A des Internalin J. Bachelorarbeit. Universität Potsdam.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L. (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* 335, 694–699.
- Uversky, V.N., Gillespie, J.R., and Fink, A.L. (2000). Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 41, 415–427.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., and Whitman, W.B. (2009). *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Springer).
- Wales, T.E., and Engen, J.R. (2006). Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 158–170.
- Wang, Y., Johansson, J., and Griffiths, W.J. (2000). Characterisation of variant forms of prophenin: mechanistic aspects of the fragmentation of proline-rich peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2182–2202.
- Werbeck, N.D., and Itzhaki, L.S. (2007). Probing a moving target with a plastic unfolding intermediate of an ankyrin-repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7863–7868.
- Werbeck, N.D., Rowling, P.J.E., Chellamuthu, V.R., and Itzhaki, L.S. (2008). Shifting transition states in the unfolding of a large ankyrin repeat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 9982–9987.
- Wetlaufer, D.B. (1973). Nucleation, Rapid Folding, and Globular Intrachain Regions in Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 697–701.
- Wetzel, S.K., Settanni, G., Kenig, M., Binz, H.K., and Plückthun, A. (2008). Folding and Unfolding Mechanism of Highly Stable Full-Consensus Ankyrin Repeat Proteins. *J. Mol. Biol.* 376, 241–257.
- Whitmore, L., and Wallace, B.A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392–400.
- Woody, R.W. (2009). Circular Dichroism Spectrum of Peptides in the Poly(Pro)II Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 8234–8245.

- Wu, H. (1931). Studies on Denaturation of Proteins. XIII. A Theory of Denaturation. *Chin. J. Physiol.* **5**, 321–344.
- Wu, H. (1995). Studies on Denaturation of Proteins XIII. A Theory of Denaturation. *Advances in Protein Chemistry* **46**, 6–26.
- Yoder, M.D., and Jurnak, F. (1995). Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *FASEB J.* **9**, 335–342.
- Yoder, M.D., Lietzke, S.E., and Jurnak, F. (1993). Unusual structural features in the parallel β -helix in pectate lyases. *Structure* **1**, 241–251.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., Pasquale, C. de, Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H.K., Waibel, R., *et al.* (2010). Efficient Tumor Targeting with High-Affinity Designed Ankyrin Repeat Proteins: Effects of Affinity and Molecular Size. *Cancer Res.* **70**, 1595–1605.
- Zaidi, F.N., Nath, U., and Udgaonkar, J.B. (1997). Multiple intermediates and transition states during protein unfolding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **4**, 1016–1024.
- Zeeb, M., Rösner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T.A., and Balbach, J. (2002). Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19(INK4d). *J. Mol. Biol.* **315**, 447–457.
- Zeeb, M., Lipps, G., Lilie, H., and Balbach, J. (2004). Folding and Association of an Extremely Stable Dimeric Protein from *Sulfolobus islandicus*. *J. Mol. Biol.* **336**, 227–240.
- Zwanzig, R., Szabo, A., and Bagchi, B. (1992). Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 20–22.
- Zweifel, M.E., and Barrick, D. (2001). Studies of the Ankyrin Repeats of the *Drosophila melanogaster* Notch Receptor. 2. Solution Stability and Cooperativity of Unfolding. *Biochemistry* **40**, 14357–14367.

Anhang

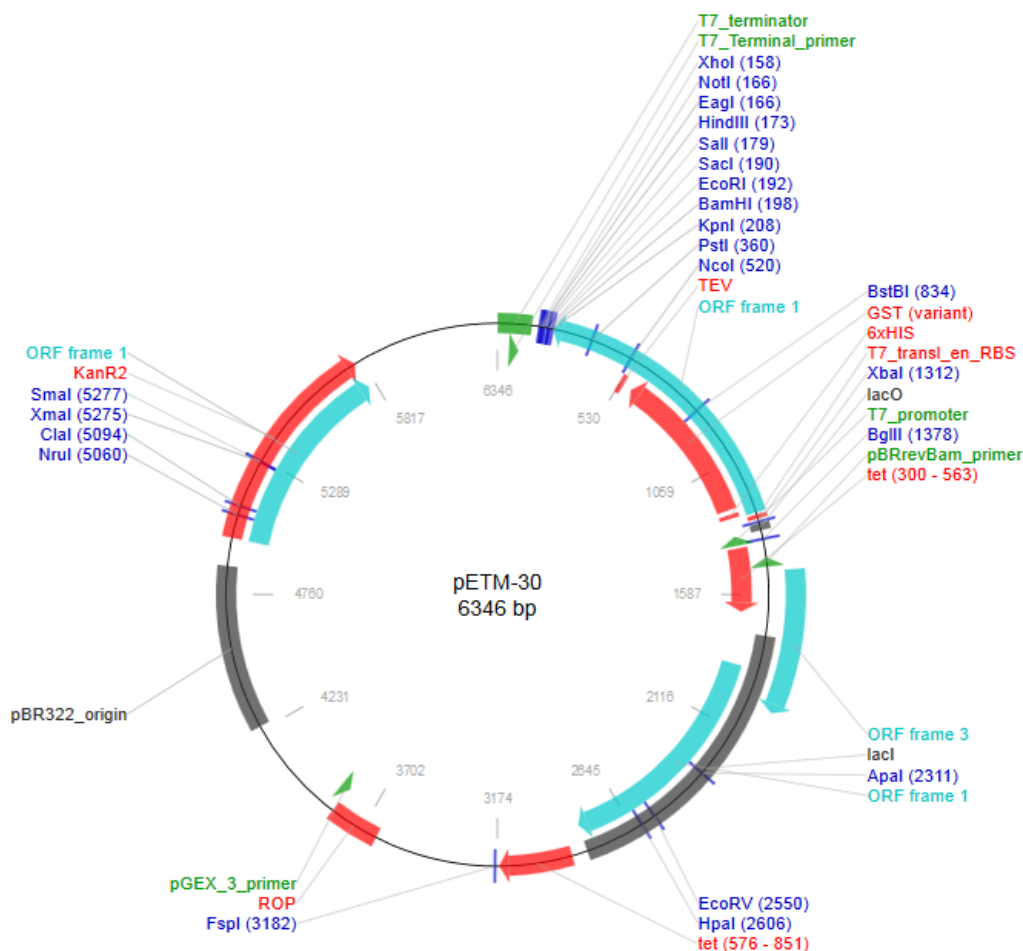


Abb. 4.2 Vektorkarte pETM30. Als Promoter fungiert das T7-Expressionssystem und als Selektionsmarker die Kanamycinresistenz. Das exprimierte Fusionsprotein beinhaltet N-terminal einen 6xHis-GST-tag getrennt durch eine TEV-Schnittstelle. Entworfen und hergestellt wurde das Plasmid von G. Stier (EMBL).

Aminosäuresequenz des InJ-Konstrukts nach Abspaltung des Tags:

```

1   GAMATLKAGQ TQSFNDWFPD DNFASEVAAA FEMQATDTIS EEQLATLTSL
51  DCHNSSITDM TGIEKLTGLT KLICTSNIT TLDLSQNTNL TYLACDSNKL
101 TNLDVTPGTK LTYLNCDTNK LTKLDVSQNP LLTYLNCARN TLTEIDVSHN
151 TQLTELDCHL NKKITKLDVT PQTQLTTLDC SFNKITELDV SQNKLLNRLN
201 CDTNNITKLD LNQNIQLTFL DCSSNKLTEI DVTPLTQLTY FDCSVNPLTE
251 LDVSTLSKLT TLHCIQTDLL EIDLTHNTQL IYFQAEGCRK IKELDVTHNT
301 QLYLLDCQAA GITELDLSQN PKLVYLYLNN TELTELDVSH NTKLKSLSCV
351 NAHIQDFSSV GKIPALNNNF EAEGQTITMP KETLTNNSLT IAVSPDLLDQ
401 FGNPMNIEPG DGGVYDQATN TITWENLSTD NPAVTYTFTS ENGAIVGTVT
450 TPFEAPQPIK*

```

Molekulargewicht: 50837 Da



Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Robert Seckler für die Überlassung dieses herausfordernden sowie spannenden Themas und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ich danke ebenfalls für die großartige Möglichkeit frei und selbstbestimmt zu arbeiten, für die Anregungen in fachlichen Gesprächen, aber auch das eine oder andere offene Ohr. Vor allem die Unterstützung während der Fertigstellung bedeutet mir viel.

Ich danke Prof. Dr. Dirk Heinz und Dr. Maike Bublitz (Molekulare Strukturbiologie, HZI Braunschweig) für die Bereitstellung des Konstrukts.

Bei Dr. habil. Jörg Fettke (Universität Potsdam) bedanke ich mich für die Einweisung in die MALDI-Massenspektrometrie und den freundschaftlichen Empfang im Haus 20.

Ganz besonders möchte ich Dr. Klaus Gast danken, für die Unterstützung bei den Lichtstreuemessungen, sowie für die unterhaltsamen Schraubestunden an etlichen Spektrometern, aber auch für das bereitwillige Korrekturlesen und die lieben, aufmunternden Worte.

Allen ehemaligen und aktuellen Anhängern des Vereins „Secklerei“ möchte ich sagen, dass es Spaß gemacht hat, euch alle kennen zu lernen und jeden mit seinen Besonderheiten und Eigenheiten schätzen zu lernen. Danke!

Besonderer Dank gilt meinen Zimmergenossen Nina, Christian, Verena und Igor. Vielen Dank Nina für deinen gesunden Realismus, vielen Dank Christian für deinen unermesslichen Optimismus, vielen Dank Verena für deine Lebensfreude und vielen Dank Igor für deinen besonderen Humor. Mein Lieblingskommentar von Igor in dem Mädchenbüro... „Mädels, ich verstehe nicht!“.

Loswerden möchte ich noch, dass ich mich immer über die Kommunikationsfreudigkeit, die Doro und Sabine an den Tag legen, gefreut habe, diese hat die Messzeit erheblich verkürzt. Ebenso habe ich gerne die Literaturtipps von Steffi angenommen und mit Sweta endlos diskutiert.

Ich danke auch allen ehemaligen und lange verschollenen Mitstreitern. Besonders erwähnen möchte ich Marion, die manche guten Tipps und liebe Worte für mich übrig hatte, Anait, die eine große Hilfe in Notfällen außerhalb der Kernarbeitszeiten war und Jan, mit dem es sich einfach gut zusammen schweigen ließ. Und Ben danke, dass du mich mit der *stopped-flow*-Apparatur vertraut gemacht hast. „Guck mal hier sind die Spritzen, hier die Druckflasche und hier macht es buff...“ Daaaanke, Ben, das hätte ich auch so rausgekriegt...

Für die freundliche Arbeitsatmosphäre geht der Dank an die Laborbewohner: Mandy, Simone, Jana aber auch Franziska und Anja. Es ließ sich immer gut arbeiten und einen netten Plausch an der Laborbank halten.

Mandy danke ich herzlichst für jede wortlos und wehrlos erfolgte Hilfe und für ihre Geduld, wenn es wieder mal hieß: „Jetzt werden wieder hunderte Küvetten zugeklebt!“. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Theresa bedanken für Ihre Lässigkeit aber auch Akribie während der Arbeit, die ich sehr zu schätzen gelernt habe. Für ihre Unterstützung danke ich Sabrina, auch wenn sie nur kurz da war, und Agnes.

Ich danke allen in meinem Umfeld, die mich unterstützt und mir, wenn ich mal wieder keine Zeit hatte, Verständnis entgegengebracht haben – Andy’s Eltern, meinen Eltern und vor allem meiner Omi. Zu allerletzt möchte ich mich bei meiner Mini-Familie bedanken. Bei Andy, der mich den Spaß im Leben nicht verlieren lässt und mich immer auffängt. Danke auch für das unermüdliche Korrekturlesen, in dem du jeden Fehler versucht hast auszuliegen (es ist dir nicht gelungen! Ar-ar-ar!). Andy, du weißt hoffentlich, dass das Alles ohne dich nicht möglich wäre! Natürlich muss ich auch Sammi danken, der mich mit seinem Lächeln bezaubert und dessen glänzende Augen einem die Welt zeigen, wie sie wirklich ist – voller Wunder. Da!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass allen anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Diese Arbeit wurde bislang weder einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt noch veröffentlicht.

Potsdam, den 20.06.2013

Natalie Baumgart