

**Die parallele β -Helix der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*:
Stabilität, Faltungsmechanismus und Faltungsmutanten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

vorgelegt von
Monika Walter

Potsdam
Juli 2002

Zusammenfassung

Die Pektat-Lyase gehören zu einer Proteinfamilie, die meistens von pflanzenpathogenen Mikroorganismen sekretiert werden. Die Enzyme katalysieren den Abbau von Polygalakturonsäure, einem Hauptbestandteil in pflanzlichen Mittellamellen und Primärzellwänden. Der Abbau der α -1,4-verbrückten Galakturonsäurereste erfolgt durch eine β -Eliminierungsreaktion, dabei entsteht ein Produkt mit einer ungesättigten C4-C5 Bindung am nicht reduzierenden Ende, das durch spektroskopische Messungen beobachtet werden kann. Für die enzymatische Reaktion der Pektat-Lyase ist Calcium nötig und das pH-Optimum der Reaktion liegt bei pH 8.5. Alle bis jetzt bekannten Strukturen der Pektat- und Pektin-Lyase haben das gleiche Strukturmotiv – eine rechtsgängige parallele β -Helix. Die Struktur der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) ist im Komplex mit Calcium gelöst worden (Pickersgill *et al.*, 1994). BsPel ist ein monomeres Protein mit einer ungefähren Molekularmasse von 43 kDa, das keine Disulfidbrücken enthält. Dies erlaubte sowohl eine effiziente rekombinante Expression des Wildtypproteins, als auch von destabilisierten Mutanten im Cytoplasma von *E. coli*. Parallele β -Helices sind relativ große, jedoch verhältnismäßig einfach aufgebaute Proteine. Um detailliertere Informationen über die kritischen Schritte bei der *in vitro*-Faltung von parallelen β -Helices zu erhalten, sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, den Faltungsmechanismus dieses Proteins näher zu charakterisieren. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, welche Wechselwirkungen für die Stabilität dieses Proteins einerseits und für die Stabilität von essentiellen Faltungsintermediaten andererseits besonders wichtig sind.

Rückfaltung von BsPel, ausgehend vom guanidiniumchlorid-denaturierten Zustand, war bei kleinen Proteinkonzentrationen und niedrigen Temperaturen vollständig möglich. GdmCl-induzierte Faltungsübergänge waren aber nicht reversibel und zeigten eine apparente Hysterese. Kinetische Messungen des Fluoreszenz- und CD-Signals im fernen UV ergaben eine extreme Denaturierungsmittelabhängigkeit der Rückfaltungsrate im Bereich des Übergangsmittelpunktes. Der extreme Abfall der Rückfaltungsraten mit steigender Denaturierungsmittelkonzentration kann als kooperative Entfaltung eines essentiellen Faltungsintermediats verstanden werden. Dieses Faltungsintermediat ist temperaturlabil und kann durch den Zusatz Glycerin im Renaturierungspuffer stabilisiert werden, wobei sich die Hysterese verringert, jedoch nicht vollständig aufgehoben wird. Durch reverse Doppelsprungexperimente konnten zwei transiente Faltungsintermediate nachgewiesen werden, die auf zwei parallelen Faltungswegen liegen und beide zum nativen Zustand weiterreagieren können. Fluoreszenzemissionsspektren der beiden Intermediate zeigten, daß beide schon nativähnliche Struktur aufweisen. Kinetische Daten von Prolin-Doppelsprungexperimenten zeigten, daß Prolinisomerisierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Reaktivierung des denaturierten Enzyms darstellt. Desweiteren konnte durch Prolin-Doppelsprungexperimenten an Mutanten mit Substitutionen im Prolinrest 281 gezeigt werden, daß die langsame Renaturierung von

Zusammenfassung

BsPel nicht durch die Isomerisierung der einzigen *cis*-Peptidbindung an Prolin 281 verursacht wird, sondern durch die Isomerisierung mehrerer *trans*-Proline. Die beiden beobachteten transienten Faltungsintermediate sind somit wahrscheinlich zwei Populationen von Faltungsintermediaten mit nicht-nativen X-Pro-Peptidbindungen, wobei sich die Populationen durch mindestens eine nicht-native X-Pro-Peptidbindung unterscheiden.

Der Austausch des Prolinrestes 281 gegen verschiedene Aminosäuren (Ala, Ile, Leu, Phe, Gly) führte zu einer starken Destabilisierung des nativen Proteins und daneben auch zu einer Reduktion in der Aktivität, da die Mutationsstelle in der Nähe der putativen Substratbindetasche liegt. Die Rückfaltungskinetiken der Prolinmutanten war bei 10°C annähernd gleich zum Wildtyp und die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der Faltung waren durch die Mutation nicht verändert. Die durch die Mutation verursachte drastische Destabilisierung des nativen Zustands führte zu einem reversiblen Entfaltungsgleichgewicht bei pH 7 und 10°C. GdmCl-induzierte Faltungsübergänge der Mutante P281A zeigten bei Messungen der Tryptophanfluoreszenzemission und der Aktivität einen kooperativen Phasenübergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 1.1 M GdmCl. Durch die Übereinstimmung der Faltungsübergänge bei beiden Messparametern konnten die Faltungsübergänge nach dem Zwei-Zustandsmodell ausgewertet werden. Dabei wurde eine freie Sabilisierungsenthalpie der Faltung für die Mutante von -64.2 ± 0.4 kJ/mol und eine Kooperativität des Übergangs von -58.2 ± 0.3 kJ mol⁻¹ M⁻¹ bestimmt.

BsPel enthält, wie die meisten monomeren rechtsgängigen parallelen β -Helix-Proteine, einen internen Stapel wasserstoffverbrückter Asparagin-Seitenketten. Die Mehrheit der erzeugten Mutanten mit Substitutionen im Zentrum der Asn-Leiter (N271X) waren als enzymatisch aktives Protein zugänglich. Die Auswirkung der Mutation auf die Stabilität und Rückfaltung wurde an den Proteinen BsPel-N271T und BsPel-N271A näher analysiert. Dabei führte die Unterbrechung des Asparaginstapels im Inneren der β -Helix zu keiner drastischen Destabilisierung des nativen Proteins. Allerdings führten diese Mutationen zu einem temperatur-sensitiven Faltungsphänotyp und die Hysterese im Denaturierungsübergang wurde verstärkt. Offenbar wird durch die Unterbrechung des Asparaginstapel ein essentielles, thermolabiles Faltungsintermediat destabilisiert. Der Asparaginstapel wird somit bei der Faltung sehr früh ausgebildet und ist wahrscheinlich schon im Übergangszustand vorhanden.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-phosphat
bp	Basenpaare
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
BsPel	Pektat Lyase aus <i>Bacillus subtilis</i>
rek BsPel	rekombinant exprimierte BsPel aus <i>E. coli</i>
sek BsPel	sekretierte BsPel aus <i>Bacillus subtilis</i>
Cm	Cloramphenicol
CD	Circulardichroismus
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
⊖	Eliptizität
[⊖]	molare Eliptizität
GalpA	Galakturonsäurerest
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I	Intermediat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
k _{app}	apparente Geschwindigkeitskonstante
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
LB Medium	Luria-Bertani Medium
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N	natives Protein
NaP	Natriumphosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride

Abkürzungen

Pel	Pektat-Lyase
pfu	plaque forming units
PGA	Polygalakturonsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
ssDNA	Einzelstrang DNA
τ	Relaxationszeit ($=1/k$)
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tsf	temperatur sensitiv bezüglich der Faltung
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	entfaltetes Protein
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett(es)
(v/v)	Volumenanteile
(v/w)	Gewichtsanteile
X#Y	Austausch der AminosäureX# nach Y und entsprechende Mutante

Für Aminosäuren wurde entweder die Drei-Buchstaben oder die Ein-Buchstaben Standardabkürzungen verwendet.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Pektat- und Pektinlyasen.....	1
1.1.1 Vorkommen	1
1.1.2 Strukturmotiv: parallele β -Helix.....	2
1.1.3 Enzymatischer Mechanismus der β -Eliminierung	4
1.1.4 Vergleich der Substratbindetasche zwischen PeIC und BsPel	7
1.2 Strukturvorhersage von rechtsgängigen parallelen β -Helixproteinen	8
1.3 Faltung von Proteinen	9
1.4 Aufgabenstellung.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Chemikalien	12
2.1.2 Standards und Kits	12
2.1.3 Enzyme, Antikörper und Proteine.....	13
2.1.4 Medien, Antibiotika und Puffer.....	13
2.1.5 Sonstiges Material	14
2.1.6 Geräte	14
2.1.7 Organismen	15
2.1.8 Plasmide, Oligodesoxynukleotide.....	16
2.2 Molekularbiologische Versuche	18
2.2.1 Kultivierung und Erhaltung von Bakterien	18
2.2.2 Reinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....	18

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	18
2.2.4	Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA	18
2.2.5	Ortsgerichtete Mutagenese.....	19
2.2.6	Sequenzierung von Plasmid-DNA	20
2.2.7	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	20
2.2.8	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	20
2.3	Proteinchemische Methoden	20
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine	20
2.3.1.1	Anzucht und Induktion der Bakterien	20
2.3.1.2	Zellaufschluß.....	21
2.3.1.3	Proteinreinigung.....	21
2.3.1.3.1	Normaler Maßstab.....	21
2.3.1.3.2	Kleiner Maßstab - "batch-Verfahren".....	22
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.3.3	Densitometrische Auswertung von Polyacrylamidgelen.....	22
2.3.4	Proteinfärbung	23
2.3.4.1	Coomassie-Färbung.....	23
2.3.4.2	Silberfärbung.....	23
2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	23
2.3.5.1	Spektroskopische Bestimmung.....	23
2.3.5.2	Bestimmung nach Bradford.....	23
2.3.6	Massenspektrometrie.....	23
2.3.7	Proteinsequenzierung	24
2.3.8	Westernblot.....	24
2.3.9	Analytische Gelfiltration	24
2.3.10	Bestimmung der Pektat-Lyase Aktivität	24
2.3.10.1	Reaktivierungskinetiken von BsPel.....	25
2.3.11	Fluoreszenzspektroskopie	25
2.3.11.1	Fluoreszenzspektren.....	25
2.3.11.2	Fluoreszenzkinetiken.....	25

2.3.11.3 <i>stopped-flow</i> -Experimente.....	25
2.3.12 CD-Spektroskopie.....	26
2.3.12.1 CD-Spektren.....	26
2.3.12.2 Fern-UV-CD-Kinetiken.....	26
2.3.13 Gleichgewichtsentfaltung und –rückfaltung von BsPel.....	27
2.3.14 pH-Gleichgewichtsübergang	27
2.3.15 Sprungexperimente zur Charakterisierung der schnellen und langsamen Schritte der Faltung.....	28
2.3.15.1 Bestimmung der nativen Spezies.....	28
2.3.15.2 Bestimmung von Intermediaten.....	29
2.3.15.3 Datenanalyse zur Bestimmung der app. Geschwindigkeitskonstanten bei der Entstehung von I und N.....	30
2.3.15.4 Bestimmung der langsam faltenden Spezies.....	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Reinigung der rekombinanten Pektat-Lyase von <i>Bacillus subtilis</i> (BsPel).....	32
3.2 Biophysikalische Charakterisierung der rekombinanten BsPel im Vergleich zur sekretierten BsPel	33
3.3 <i>In-vitro</i> Faltung und thermodynamische Stabilität von BsPel.....	36
3.3.1 Einfluß der Proteinkonzentration auf die Renaturierungseffizienz	36
3.3.2 Guanidinium-induzierte Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge.....	37
3.3.3 Entfaltungs- und Faltungskinetiken von BsPel	39
3.3.4 Einfluß der Temperatur.....	44
3.3.5 Einfluß von Glycerin.....	45
3.3.6 Einfluß des pH-Wertes	49
3.3.7 Einfluß des Denaturierungsmittels.....	51
3.3.8 Bedeutung der Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerisierung für die Renaturierung von BsPel.....	54
3.3.9 reverse Doppelsprungexperimente zur Unterscheidung zwischen der nativen Spezies und den Intermediaten bei der Rückfaltung von BsPel	56
3.4 Substitution des <i>cis</i> -Prolins von BsPel.....	61
3.4.1 Klonierung und Reinigung	62

Inhaltsverzeichnis

3.4.2	Expressionsausbeute und spezifische Aktivität.....	62
3.4.3	Spektroskopische Charakterisierung der Prolinmutanten	63
3.4.4	<i>In vitro</i> Faltung und thermodynamische Stabilität der Prolin-Mutanten.....	65
3.4.4.1	Entfaltungs- und Faltungskinetiken der Prolin-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	65
3.4.4.2	Rückfaltungs- und Entfaltungsübergänge der Prolin-Mutanten.....	67
3.4.4.3	Bedeutung der Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerisierung für die Renaturierung der Prolin-Mutante P281A.....	68
3.4.4.4	Reverse Doppelsprungexperimente zur Unterscheidung der nativen Spezies und der Intermediate bei der Rückfaltung der Prolin-Mutante P281A.....	69
3.5	Mutationen in der Asparagin-Leiter von BsPel	71
3.5.1	Klonierung.....	72
3.5.2	Expressionsausbeute und spezifische Aktivität.....	72
3.5.3	Spektroskopische Charakterisierung der Asparaginmutanten N271T und N271A	75
3.5.4	<i>In vitro</i> Faltung und thermodynamische Stabilität der Asparaginmutanten N271T und N271A	76
3.5.4.1	Temperatursensitive Faltungsmutanten.....	76
3.5.4.2	Kinetiken der Entfaltung und Rückfaltung der Asparagin-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	78
4	Zusammenfassende Diskussion.....	81
5	Literaturverzeichnis	89
	Anhang.....	101

1 Einleitung

1.1 Pektat- und Pektinlyasen

1.1.1 Vorkommen

Pektat- und Pektin-Lyasen (EC 4.2.2.9 und EC 4.2.2.10) sind Proteine aus pflanzenpathogenen Bakterien wie z.B. *Erwinien*, *Bacillen*, *Pseudomonaden*, *Clostridien* und aus Pilzen (Romboutts & Pilnik, 1980), die den Abbau von Pektin und Pektat in den Mittellamellen und Zellwänden höherer Pflanzen verursachen (Barras *et al.*, 1994; Collmer & Keen, 1986; Kotoujansky, 1987). Pektin ist die methylierte Form von Pektat und besitzt keine Nettoladung. Der Abbau der Polygalakturonsäurekomponenten der Pflanzenzellwand erfolgt durch eine β -Eliminierung, dabei wird die α -glykosidische Bindung zwischen dem O-1 und C-4 Atom gespalten und es entsteht ein Produkt mit einer ungesättigten C4-C5 Bindung am nicht reduzierenden Ende (Albertsheim *et al.*, 1958). Die von pflanzenpathogenen Bakterien bzw. Pilzen sekretierten Pektat-Lyasen unterscheiden sich von den Pektin-Lyasen dadurch, daß sie Pektin nur abbauen, wenn es zuerst durch Pektinmethylesterasen demethyliert wurde. Für die enzymatische Reaktion der Pektat-Lyasen ist Calcium nötig und das pH-Optimum der Reaktion liegt bei ca. 8.5.

Die Pektat- und Pektin-Lyasen gehören zu einer Protein-Überfamilie (*superfamily*), die auch Pflanzenpollenproteine enthält (Taniguchi *et al.*, 1995; Turcich *et al.*, 1993; Wing *et al.*, 1990). Ein multiples Sequenz-Alignment der Proteine der Überfamilie, basierend auf einer strukturellen Überlagerung der Proteine aus der Pektat-Lyase Familie, ergab eine Aminosäuresequenzidentität von 14 – 20% zwischen den bakteriellen Pektat-Lyasen und den Pektin-Lyasen aus Pilzen (Henrissat *et al.*, 1995). Die dreidimensionale Struktur von 7 Mitgliedern aus der Protein-Überfamilie ist bis jetzt gelöst worden, darunter ist die Pektat-Lyase C aus *Erwinia chrysanthemi* (Yoder & Jurnak, 1995b; Yoder *et al.*, 1993a), Pektat-Lyase E aus *Erwinia chrysanthemi* (Lietzke *et al.*, 1994), Pektat-Lyase A aus *Erwinia chrysanthemi*, Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* (Pickersgill *et al.*, 1994), Pektin-Lyase A aus *Aspergillus niger* (Mayans *et al.*, 1997), Pektin-Lyase B aus *Aspergillus niger* (Vitali *et al.*, 1998) und die alkalische Pektat-Lyase aus dem *Bacillus sp.* Stamm KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001). Alle Proteine haben das gleiche Strukturmotiv, eine rechtsgängige parallele β -Helix, bei der die β -Faltblattstränge in einer großen rechtsgängigen Windung gefaltet sind. Die Enzymstrukturen unterscheiden sich dabei in der Größe und Konformation der *loops*. Es wird angenommen, daß die strukturellen Unterschiede in den *loop*-Regionen für die Unterschiede in den enzymatischen Eigenschaften der Enzyme verantwortlich sind.

1.1.2 Strukturmotiv: parallele β -Helix

1993 wurde mit der Strukturaufklärung der Pektat-Lyase aus *Erwinia chrysanthemi* (Yoder *et al.*, 1993b) der Begriff "parallele β -Helix" für das neue Strukturmotiv eingeführt. Mittlerweile sind eine Vielzahl von Strukturen mit dem gleichen Strukturmotiv beschrieben worden (Jenkins & Pickersgill, 2001). Neben den rechtsgängigen parallelen β -Helices wurden auch mehrere linksgängige parallele β -Helices aufgeklärt, die jedoch ein separates Strukturmotiv darstellen (Jenkins & Pickersgill, 2001). Bei den rechtsgängigen β -Helices besteht jede Windung aus einem bis vier β -Strangsegmenten, die durch *turns* unterschiedlicher Länge verbunden sind.

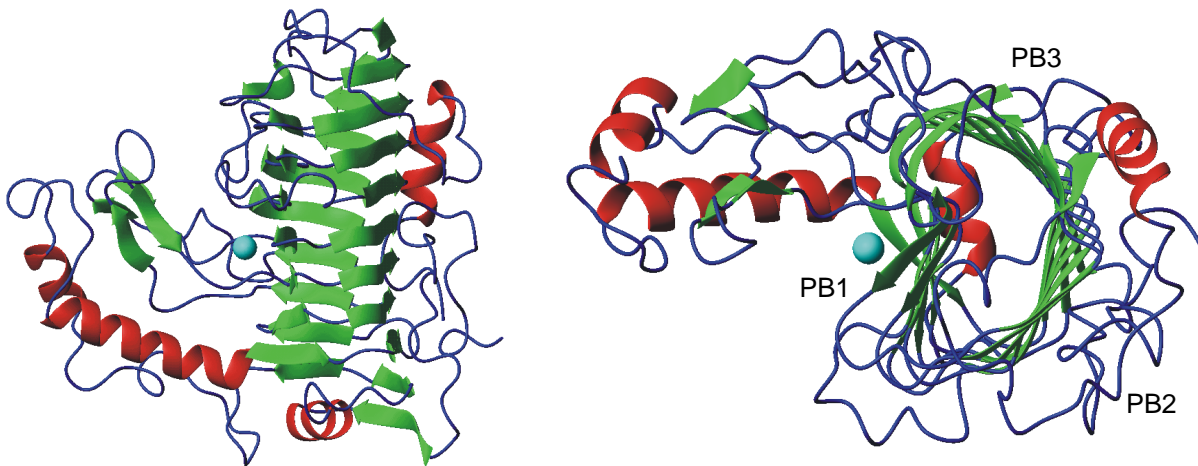


Abb. 1.1:

Schematische Abbildung der Struktur von BsPel: grüne Pfeile repräsentieren β -Faltblattstränge, rote Bänder α -Helices, in cyan ist das gebundene Calciumion dargestellt. **Links:** Längsansicht, N-Terminus befindet sich rechts unten; **Rechts:** Queransicht vom C-terminalen Ende der β -Helix. Die Abbildungen wurden mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Die in der Pektin- und Pektat-Lyase Familie vorkommenden Strukturen sind rechtsgängige parallele β -Helices mit 3 β -Strangsegmenten pro Windung. Der Aufstieg (*rise*) pro Windung beträgt 4.86 Å (Yoder & Jurnak, 1995a). Jede Windung kann mehrfach wiederholt. Die Nomenklatur zur Beschreibung der einzelnen Strukturelemente der parallelen β -Helices wurde von Yoder (Yoder *et al.*, 1993c) eingeführt. Dabei werden die 3 β -Strang-Sgmente mit PB1, PB2 und PB3 und die den β -Strang-Segmenten jeweils folgenden *turns* mit T1, T2 und T3 bezeichnet. Zwei der β -Strang-Segmente (PB1 und PB2) bilden ein antiparalleles β -Sandwich, das dritte β -Strang-Segment (PB3) liegt etwa rechtwinklig dazu. Dadurch entsteht ein L-förmiger Querschnitt durch die parallele β -Helix (siehe Abbildung 1.1 rechts).

Ein auffallendes Merkmal von allen Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen ist das Vorkommen von Interaktionen zwischen gestapelten Seitenkettenresten im Inneren der β -Helix. Man unterscheidet dabei 3 verschiedene Arten von Stapeln. Zum einen kommt es zu Seitenketteninteraktionen zwischen aliphatischen Resten. Dabei handelt es sich vorwiegend um Valin- und Isoleucin- und zu einem niederen Prozentsatz auch um Alanin- und Leucinreste (Yoder *et al.*, 1993c). Ausgedehnte aliphatische Stapel kommen vorwiegend im Interface zwischen den β -Strängen PB1 und PB2 vor. Ein weiterer ungewöhnlicher Seitenkettenstapel in Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen ist Anordnung von aromatischen Seitenkettenresten im Inneren der parallelen β -Helix. Dabei sind die aromatischen Reste in einer ähnlichen Art zueinander angeordnet, wie dies für die Basenpaaranordnung in doppelsträngiger DNA beschrieben ist (Hunter *et al.*, 1991). Die aromatischen Reste sind dabei parallel zueinander angeordnet und die Distanz der aromatischen Ringe zueinander beträgt ca. 3.4 Å. Durch die Verdrillung der parallelen β -Helix sind die aromatischen Rest etwas versetzt angeordnet, so daß eine optimale Orientierung der π -Orbitale gewährleistet wird. Ein aromatischer Stapel kommt in den Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen vorwiegend im Inneren der parallelen β -Helix in dem β -Strang PB3 vor und besteht in der Struktur der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) aus 5 aromatischen Resten (Pickersgill *et al.*, 1994). Eine dritte Art von Stapeln, die in Pektat- und Pektin-Lyase Strukturen vorkommen, sind Stapel aus polaren Aminosäureresten im Inneren der parallelen β -Helix. Ein Stapel aus Serinresten in *Turn* 1 konnte bis jetzt nur in den Strukturen von PelC und PelE aus *Erwinia chrysanthemi* gefunden werden. Alle Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen weisen aber eine Asparaginleiter in *Turn* 2 auf. Dabei sind die Asparaginreste im Inneren der parallelen β -Helix so zueinander orientiert, daß die maximale Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Asparaginresten ausgebildet werden kann (Yoder *et al.*, 1993b). In der Struktur von BsPel besteht die Asn-Leiter aus 4 Asparaginresten und ist flankiert von einem Cystein- und Isoleucin-Rest (Pickersgill *et al.*, 1994). Der *Turn* 2, der die Asparagin-Leiter enthält, ist in allen Pektat- und Pektin-Lyase Strukturen relativ kurz und sehr regulär in der Konformation (Yoder *et al.*, 1993c). Er besteht meistens aus 2 Resten mit durchschnittlichen ϕ - und ψ -Winkeln von 54.4° und 40.9° für den ersten Rest und -105.2° und 154.8° für den zweiten Rest (Yoder & Jurnak, 1995a). Abgeleitet von der Nomenklatur für β -Turns nach Wilmot und Thornton (Wilmot & Thornton, 1990) wurde für diese Art von *Turn* der Begriff "gestörter $\gamma\beta_E$ -turn" eingeführt. Dabei ist in der Regel der erste Rest in einer α_L -Konformation und die Carbonylgruppe ist lösungsmittel exponiert. Der zweite Restes befindet sich in β -Konformation und ist vorwiegend ein Asparaginrest (bildet die Asparaginleiter). Die alkalische Pektat-Lyase aus dem *Bacillus sp.* Stamm KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001) bildet eine Ausnahme, bei ihr ist der erste Rest ein Asparagin und somit wird ein Asparaginstapel gebildet, der nach außen gerichtet ist. Durch die ungewöhnliche Konformation der beiden Reste in *Turn* 2 ist der Abstand zwischen den $\alpha_{C_{i-1}}$ - und $\alpha_{C_{i+2}}$ -Atomen 2 Å größer als in normalen $\gamma\beta_E$ -turns und verursacht somit einen Knick von 90-120° zwischen den beiden β -Strangsegmenten PB2 und PB3 (Yoder & Jurnak, 1995a).

Mit Ausnahme der alkalischen Pektat-Lyase aus dem *Bacillus sp.* Stamm KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001) sind bei allen bis jetzt bekannten Pektat- und Pektin-Lyase Strukturen die NH₂- und COOH-terminalen

Enden der parallelen β -Helix durch die Ausbildung von *loops* oder Sekundärstrukturelementen geschützt, so daß das hydrophobe Innere nicht lösungsmittelzugänglich ist. Das NH_2 -terminale Ende der β -Helix wird durch eine α -Helix geschützt, die quer zur Achse der parallelen β -Helix verläuft (siehe Abbildung 1.1). Der NH_2 -terminale Anfang der Aminosäurekette liegt bei allen Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen quer gegen PB2 gepackt vor. Der Schutz vor Lösungsmittelzugänglichkeit der COOH-terminalen Seite der parallelen β -Helix variiert in den Pektat- und Pektinlyasestrukturen und wird durch verschiedene *loops* und β -Strangkombinationen gebildet. Das COOH-terminale Ende der Aminosäurekette bildet eine strukturell konservierte amphipathische α -Helix, die gegen den *turn* T2 gepackt vorliegt.

Die größten strukturellen Unterschiede zwischen den Pektat- und Pektin-Lyasestrukturen sind in den *turns* T1 und T3 zu finden. Manche dieser *loops* in T3 sind bei BsPel so lang, daß sie separate strukturelle Regionen bilden (siehe Abbildung 1.1). Zwischen diesen *loop*-Regionen (T1 und T3) und dem β -Strang-Segment PB1 der parallelen β -Helix befindet sich eine tiefe und langgestreckte Grube, in der sich die Substratbindetasche der Enzyme befindet. Polygalakturonsäure (PGA) ist als *in vitro* Substrat für Pektat-Lyasen bekannt. Es wird angenommen, daß die Unterschiede in diesen Regionen für die Enzyme eine unterschiedliche Substratspezifität *in vivo* bewirken.

1.1.3 Enzymatischer Mechanismus der β -Eliminierung

Pektat-Lyasen katalysieren die Spaltung von Pektat, dem demethylierten Produkt von Pektin, das eine Hauptkomponente in den Mittellamellen und Primärzellwänden höherer Pflanzen ist (Carpita & Gibeaut, 1993). Das Pektatrückgrat ist aus D-Galakturonsäureeinheiten (GalpA) aufgebaut, die durch eine α -(1 \rightarrow 4)-glykosidische Bindung verknüpft sind. In unregelmäßigen Abständen (etwa alle 200 GalpA-Reste (Thibault *et al.*, 1993)) ist die Sequenz der Galakturonsäurereste der Hauptkette durch α -(1 \rightarrow 2)-L-Rhamnosereste unterbrochen (McNaught, 1997). Zweiwertige Ionen, vor allem Ca^{2+} , können Polygalakturonsäuremoleküle quervernetzen (Carpita & Gibeaut, 1993).

Alle Proteine der Pektat-Lyase-Überfamilie funktionieren nach dem gleichen enzymatischen Mechanismus bei der Spaltung von Polygalakturonsäure. Jedoch konnte die Rolle einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum für die Katalyse erst kürzlich durch die Strukturaufklärung eines Komplexes aus einer Aktivitätsmutante von Pektat-Lyase C aus *Erwinia chrysanthemi* und einem Oligosaccharid (Pentagalakturonsäure) näher analysiert werden (Herron *et al.*, 2000; Scavetta *et al.*, 1999). Das Enzym spaltet PGA in einem β -Eliminierungs-Mechanismus, dabei wird vor allem eine dehydratisierte Trigalakturonsäure, mit einer 4,5-ungesättigten Carbonbindung im Galakturonsäurerest am nichtreduzierenden Ende, als Endprodukt erzeugt (Preston *et al.*, 1992). Calcium ist nötig für die Enzymaktivität aller Pektat-Lyasen. Der Mechanismus der β -Eliminierung wurde zuerst für Pektin-Lyasen von Albertsheim (Albertsheim *et al.*, 1958) beschrieben. Die Reaktion kann in drei Prozesse unterteilt werden: Neutralisation der Carboxylgruppe, die benachbart zur glykosidischen Bindung steht; Abstraktion eines Protons vom C5-Atom der Saccharideinheit (dabei entsteht eine Enolat-Anion-Zwischenstufe) und Transfer eines Protons auf das Sauerstoffatom in der

glykosidischen Bindung (siehe Abbildung 1.2). Mehrere reaktive Gruppen, die entweder im Enzym selbst enthalten oder als Cofaktoren an der Reaktion beteiligt sind, sind Voraussetzung für den postulierten Mechanismus. Zur Abstraktion des Protons von C5 ist ein basischer Rest notwendig. Das negativ geladene Zwischenprodukt muß durch einen positiven Rest stabilisiert werden und eine Säuregruppe ist beim Transfer des Protons auf das glykosidische Sauerstoffatom beteiligt (Herron *et al.*, 2000). Durch Mutagenesestudien (Kita *et al.*, 1996) und Sequenzvergleich von PelC mit anderen Vertretern aus der Pektat-Lyase Überfamilie (Henrissat *et al.*, 1995) konnten möglicherweise an der Reaktion beteiligte Aminosäurereste in der Sequenz von PelC bestimmt werden, aber erst durch die Strukturaufklärung des Komplexes konnte das aktive Zentrum und die Substratbindetasche genau identifiziert werden.

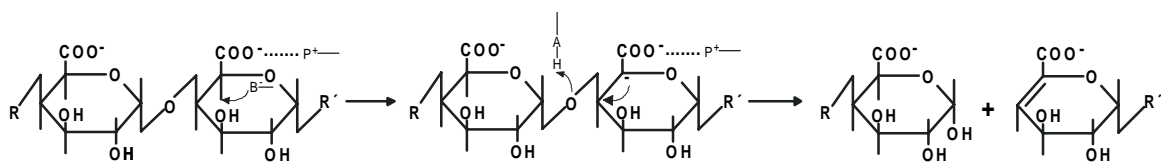


Abb. 1.2:

Schematisches Diagramm einer Spaltung von α -1,4-Polygalakturonsäure durch einen β -Eliminierungs-Mechanismus. P^+ steht für eine Gruppe mit einer positiven Ladung, B^- für eine generelle Base, AH für eine Säure und R bzw. R' für weitere Galakturonsäurereste.

Abbildung 1.3 A zeigt eine schematische Darstellung des Komplexes von PelC mit dem Oligosaccharid. Vier der fünf Galakturonsäure-Einheiten des Substrats konnten in der Röntgenstrukturanalyse auf atomarer Ebene aufgelöst werden. Dabei zeigte sich, daß bei der Bindung des Substrats 4 Ca^{2+} -Ionen beteiligt sind. Alle Ca^{2+} -Ionen verbrücken saure Aminosäurereste des Proteins und jeweils eine Säuregruppe der Galakturonsäureeinheit des Oligosaccharides. Die Ca^{2+} -Oligosaccharid Interaktion unterscheidet sich dabei grundlegend von dem anfänglich postulierten "eggbox"-Modell für die PGA- Ca^{2+} -Struktur. In dem Modell wurde angenommen, daß Ca^{2+} -Ionen die Galakturonsäureeinheiten von zwei benachbarten antiparallelen PGA-Molekülen in Pflanzenzellwänden quervernetzen (Carpita & Gibeaut, 1993). Auch die Konformation, die für das TetraGalpA-Fragment gefunden wird, unterscheidet sich von den Pektatkonformationen die ursprünglich beschrieben worden sind (Morris *et al.*, 1982; Powell *et al.*, 1982; Walkinshaw & Arnott, 1981a; Walkinshaw & Arnott, 1981b). Es war für verdünnte Ca^{2+} -PGA-Lösungen eine 2_1 -helikale Struktur und für konzentrierte Ca^{2+} -PGA-Lösungen eine 3_1 -helikale Struktur angenommen worden. Im Komplex wurde aber für das TetraGalpA-Fragment eine Konformation gefunden, die eine Mischung aus 2_1 -Helices und 3_1 -Helices darstellt.

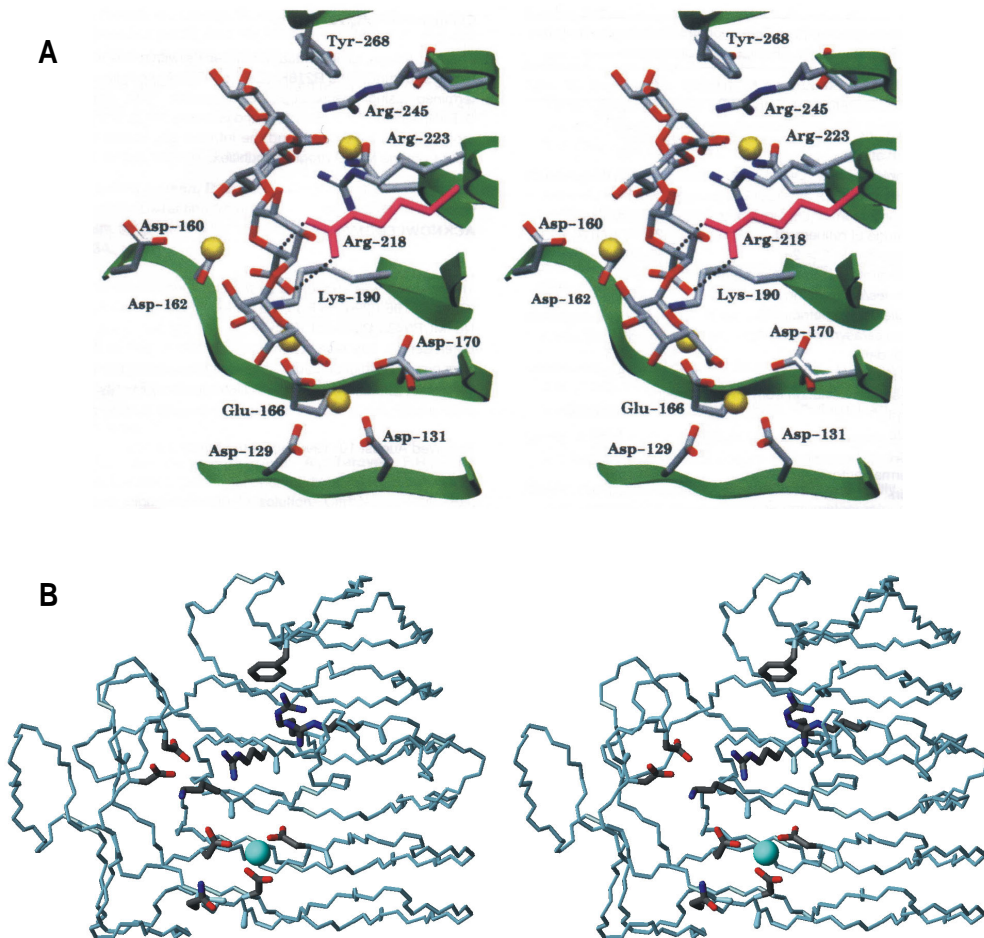


Abb. 1.3: Vergleich der Substratbindetasche von PelC und BsPel

A: Stereodiagramm des $(Ca^{2+})_4$ -TetraGalpA Substrats überlagert mit der Struktur der Wildtyp Pektat-Lyase C aus *Erwinia chrysanthemi* nach Scavetta (Scavetta et al., 1999). Das C^α -Rückgrat von PelC ist als grünes Band dargestellt; Calciumionen als gelbe Kugel. Die an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren sind hervorgehoben. Die Galakturonsäureeinheiten entsprechen von oben nach unten GalpA1-GalpA4, das reduzierende Ende des Oligosaccharides befindet sich an GalpA1.

B: Stereodiagramm der Substratbindetasche von BsPel, die der in A abgebildeten Region von PelC entspricht. Das C^α -Rückgrat ist hellblau dargestellt; das Calcium Ion ist als cyan-farbende Kugel dargestellt. Die bei der Substratbindung beteiligten entsprechenden Aminosäuren von BsPel sind: Phe339(BsPel)/Tyr268(PelC), Arg282(BsPel)/Arg245(PelC), Arg284(BsPel)/Arg223(PelC), Arg279(BsPel)/Arg218(PelC), Lys247(BsPel)/Lys190(PelC), Asp170(BsPel)/Asp160(PelC), Asp173(BsPel)/Asp162(PelC), Asp223(BsPel)/Glu166(PelC), Asp227(BsPel)/Asp170(PelC), Gln182(BsPel)/Asp129(PelC), Asp184(BsPel)/Asp131(PelC). Die Abbildung 1.3.B wurde mit dem Program MOLMOL erstellt (Koradi et al., 1996).

Dadurch, daß für die Kristallisation des Protein-Oligosaccharid-Komplexes eine katalytisch inaktive PelC Mutante (R118K) verwendet wurde, kann der Komplex als ein Michaelis-Komplex im Reaktionsweg aufgefasst werden. Des Weiteren wurde für PelC bei der Spaltung von PGA vorwiegend ein trimeres ungesättigtes Endprodukt gefunden (Preston *et al.*, 1992), deshalb befindet sich die zu spaltende glykosidische Bindung mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen dem dritten und

vierten Galakturonsäurerestes. Außerdem sind an der Bindung des dritten und vierten Galakturonsäurerestes nur Aminosäurereste beteiligt, die nötig für die Aktivität von PelC und hoch konserviert in der Pektat-Lyase-Familie sind. Allen invarianten und konservierten Aminosäurereste der Substratbindetasche konnte eine Rolle in der Katalyse und/oder in der Bindung der Galakturonsäureeinheiten zugeordnet werden. Die dritte Galakturonsäureeinheit des Pentaoligosaccharides (GalpA3), die der zu spaltenden glykosidischen Bindung benachbart ist, bildete dabei die meisten Interaktionen mit dem Protein aus. Eine interessante Rolle bei der Spaltung von PGA kommt dem konservierten Rest Arg-218 zu. Dieser Rest agiert als generelle Base und initiiert die Protonabstraktion vom C-5 Atom in der Galakturonsäureeinheit 3, die der zu spaltenden glykosidischen Bindung benachbart ist. Solch eine Rolle für einen Argininrest ist bei den bis jetzt bekannten enzymatischen Reaktionen noch nie beobachtet worden, ist aber konsistent mit dem hohen pH-Optimum für die katalytische Reaktion *in vitro*. Wie schon von Gerlt und Grassman (Gerlt & Gassman, 1992) vorgeschlagen wurde, neutralisieren positive Ladungen in Form von Ca^{2+} -Ionen und dem konservierten Lys-190 Rest die Säuregruppe der Galakturonsäureeinheit und stabilisieren das Enolat-Intermediat. Durch diese positiven Ladungen wird der pK_a -Wert des Protons am C-5 Atom der Galakturonsäure zu einem gewissen Grad reduziert und dem pK_a -Wert des Argininrestes angenähert.

Obwohl man durch die Struktur des Protein-Oligosaccharid-Komplexes viele Details der enzymatischen Reaktion und auch der Natur der Protein-Saccharid-Interaktion aufgezeigt werden konnten, konnte trotzdem die für den Transfer des Protons zur glykosidischen Bindung verantwortliche Gruppe nicht identifiziert werden.

1.1.4 Vergleich der Substratbindetasche zwischen PelC und BsPel

Das aktive Zentrum wird bei den Pektat-Lyasestrukturen durch das β -Strang-Segment PB1 und Teile des *turns* T3 definiert (Scavetta *et al.*, 1999). Durch Überlagerung der Strukturen von PelC und BsPel konnten die für die Bindung des Substrats wichtigen Aminosäuren bei BsPel identifiziert werden. Dabei zeigte sich eine ähnliche räumliche Anordnung der für die Bindung des Substrats und für die Aktivität wichtigen Aminosäuren (siehe Abbildung 1.3 B). Ein Sequenzvergleich der beiden Proteine nach Henrissat ist im Anhang angegeben (Henrissat *et al.*, 1995).

Ein struktureller Unterschied zwischen den beiden Pektat-Lyasen bezüglich eines an der Saccharidbindung beteiligten Restes ergibt sich bei dem Argininrest 282 der BsPel Sequenz, der dem Argininrest 245 der PelC Sequenz entspricht. Obwohl die Argininreste in den beiden Enzymen nicht von derselben C^α -Rückgratposition kommen, können die Seitenkettenatome überlagert werden und somit ist eine Interaktion des Argininrestes 282 zum Substrat in ähnlicher Weise, wie für PelC beschrieben wurde, möglich. Die gleiche Ausrichtung des Argininrestes wird durch eine *cis*-Peptidyl-Prolylbindung der beiden vorangehenden Reste 280-281 gewährleistet. Dieser Prolinrest in *cis*-Konformation ist in allen bekannten Pektat- und Pektinlyasestrukturen, mit Ausnahme der alkalische Pektat-Lyase aus dem *Bacillus sp.* Stamm KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001), konserviert. Der gleiche strukturelle Unterschied zur Substratbindetasche von PelC wurde auch für die Strukturen von PelE und PelA aus *Erwinia chrysanthemi* beschrieben (Thomas *et al.*, 2002). Daneben wurde in der

Struktur des Komplexes zwischen PelC und dem Pektatfragment eine gestapelte Interaktion des Tyrosinrestes 268 der PelC-Sequenz mit einer Galakturonsäureringstruktur identifiziert. In der Struktur von BsPel konnte in der Nähe dieser Region ein Phenylalaninrest 339 gefunden werden, wobei sich die beiden Seitenkettenreste nicht vollständig überlagern lassen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch für die Strukturen von PelE und PelA aus *Erwinia chrysanthemi* gemacht (Thomas *et al.*, 2002). Die Orientierung der restlichen an der Bindung des Substrats beteiligten Reste ist in der BsPel-Struktur sehr ähnlich wie in der Struktur von PelC. Dabei entspricht das in der Struktur von BsPel gefundene Ca^{2+} -Ion einem der an der Bindung des Substrats beteiligten Ca^{2+} -Ionen in der Struktur von PelC.

1.2 Strukturvorhersage von rechtsgängigen parallelen β -Helixproteinen

Von Jenkins (Jenkins *et al.*, 1998) wurde postuliert, daß alle Proteine, die als Strukturmotiv eine rechtsgängigen β -Helix besitzen, zu einer einzigen Proteinüberfamilie zusammengefaßt werden können und einen gemeinsamen Vorfahren besitzen. Die Entstehung der verschiedenen β -Helixproteine hätte eventuell durch eine Duplikation eines Genabschnitts, das für genau eine Windung in der β -Helix kodiert, stattfinden können. Allerdings gestaltet sich die systematische Sequenzanalyse und die dementsprechende Identifikation homologer Strukturen auf Sequenzbasis aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von kompletten Windungen und der Variabilität in den *turn*-Regionen sehr schwierig. Durch die sehr geringe Sequenzidentität der Proteine, die eine rechtsgängigen parallelen β -Helix als Strukturmotiv besitzen, untereinander können somit herkömmliche Sequenzalignementprogramme, wie zum Beispiel PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), nicht zur Anwendung kommen. Es mußten somit Sequenz-Alignmentmethoden entwickelt werden, die das β -Helixfaltungsmotiv durch die Anwendung von struktureller Information erkennen.

Aufgrund der strukturellen Konservierung der Region in *Turn 2* der rechtsgängigen parallelen β -Helix wurde von Heffron (Heffron *et al.*, 1998) eine Methode zur Erkennung von β -Helices entwickelt, die als Grundlage ein sequenz-basiertes Profil einer Pektat-Lyase als Vorlage nutzte. Es wurden mit Hilfe dieser Methoden vorwiegend Proteine mit potentielle β -Helixstruktur vorhergesagt, die zur Familie der Pektat- und Pektin-Lyasen gehören. Daneben wurde auch für mehrere Proteinsequenzen mit einem *leucine-rich-repeat* (LRR) Sequenzmotiv eine rechtsgängigen parallele β -Helixstruktur postuliert. Unter diesen LRR-Proteinen befanden sich auch zwei Oberflächenproteine (Internalin A und B) aus *Listeria monocytogenes*, einem humanpathogenen Mikroorganismus. Im Falle des Internalin B wurde die vorhergesagte β -Helixstruktur jedoch nicht bestätigt. Die Struktur des Internalin B besteht aus einer Immunglobulinähnlichen Domäne am C-Terminus und einer N-terminalen Domäne mit einem solenoiden Faltungsmotiv, dabei wird jeweils eine Windung aus einem β -Strang und einer dazu antiparallel verlaufenden 3_{10} -Helix gebildet (Schubert *et al.*, 2001).

Ein weiteres Computerprogramm für die Vorhersage potentieller rechtsgängiger paralleler β -Helixstruktur für Proteinsequenzen ist das Programm BETAWRAP (Bradley *et al.*, 2001), das erst kürzlich beschrieben worden ist. Dabei wird eine Aminosäuresequenz durch eine dynamische Analyse auf gestapelte β -Faltblattstrukturelemente hin untersucht. Mit Hilfe dieses Algorithmus wurde in einer Proteinsequenzdatenbank mit 600 000 verschiedenen Proteinen ca. 2500 Proteine identifiziert, die eventuell eine rechtsgängige parallele β -Helixstruktur besitzen könnten. Allerdings sind bei näherer Betrachtung dieser Proteinsequenzen auch viele Proteine mit einer LRR-Sequenz als Falschpositive gefunden worden. In der Liste von 200 Proteine mit sehr wahrscheinlicher β -Helixstruktur befanden sich relativ viele Proteinsequenzen für Toxine, Adhäsine und Allergene aus Bakterien und Pilzen, die eine Rolle in humanen Infektionskrankheiten spielen. In Proteinsequenzen aus höheren Eukaryoten wurde das Strukturmotiv nur sehr selten postuliert.

Letztendlich kann aber nur die Röntgenstrukturanalyse zeigen, ob sich die vorhergesagten Strukturen für diese Proteine bestätigen lassen.

1.3 Faltung von Proteinen

Durch die Genomprojekte ist heutzutage eine Vielzahl an Genen auf DNA-Ebene bekannt. Der genetische Code bestimmt aber nur die lineare Aminosäuresequenz der Polypeptidkette, die sogenannte Primärsequenz. Diese bestimmt wiederum die spontane Faltung der Polypeptidkette in die dreidimensionale Struktur (Anfinsen, 1973; Creighton, 1990). Diese sogenannte "zweite Hälfte des genetischen Codes" (Goldberg, 1985), die die Proteinfaltung verschlüsselt, konnte bis heute noch nicht geklärt werden.

Der native Zustand von Proteinen ist nur marginal stabiler als der ungefaltete, trotzdem können Proteine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ausgehend von einem völlig denaturierten Zustand ihre native Struktur, meistens innerhalb weniger Sekunden oder Minuten, einnehmen (Jaenicke, 1996). Eine so schnelle Reaktion schließt aus, daß die Faltung ein stochastischer Prozeß ist. Es müssen folglich bestimmte Faltungswege zu Erlangung der nativen Proteinstruktur vorliegen (Levinthal, 1968).

Basierend auf dem oben erwähnten Paradoxon wird diskutiert, ob Faltung unter thermodynamischer oder unter kinetischer Kontrolle steht. Faltet ein Protein nun zu einem nativen Zustand, der das globale Minimum in der freien Energie darstellt, oder zu dem Zustand, der kinetisch am schnellsten gebildet wird? Für viele kleine Proteine konnte der Nachweis einer thermodynamischen Kontrolle erbracht werden. Dabei existiert der ungefaltete und native Zustand in einem thermodynamischen Gleichgewicht innerhalb des Entfaltungsübergangs und der native Zustand wird dabei unabhängig von extrinsischen Faktoren gebildet und ist identisch mit dem nativen Zustand unter physiologischen Bedingungen (Schmid, 1998). Andererseits könnte die kinetische Kontrolle einen wichtigen Beitrag dazu leisten, daß der native Zustand in kurzer Zeit erreicht wird. Beide Aspekte spielen in der Evolution der Faltungsmechanismen wohl eine Rolle und die Faltungsmechanismen haben sich

wahrscheinlich dahingehend entwickelt, einen Zustand minimaler Energie auf dem schnellsten Weg zu erreichen (Schmid, 1998).

Kleine Proteine falten häufig sehr schnell ohne Ausbildung von Intermediaten. Sofern bei schnell faltenden Proteinen Intermediate beobachtet werden, nimmt man an, daß diese beschleunigend wirken, indem sie die Anzahl der möglichen ungefalteten Konformationen stark einschränken (Kim & Baldwin, 1990). Dagegen ist die Faltung von größeren Proteinen oftmals sehr langsam, obwohl auch auf dem Faltungsweg dieser Proteine teilweise gefaltete Intermediatformen populiert sind. Dies führte zu der Annahme, daß Intermediate sich nicht nur produktiv auf die Faltung auswirken, sondern diese auch verzögern können, indem sie sogenannte kinetische Fallen bilden (Baldwin, 1996; Creighton, 1994; Creighton *et al.*, 1996). Von einigen langsamen Reaktionen im entfalteten Protein ist bekannt, daß sie anfängliche Fehlfaltung hervorrufen. Beispiele dafür sind die *cis-trans*-Isomerisierung der Prolyl-Peptidbindungen und die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken.

Um den Faltungsmechanismus eines Proteins letztendlich zu verstehen, ist es notwendig, eine kinetische Studie des Proteins zu erstellen, um dadurch ein Reaktionsschema der Entfaltung und Rückfaltung angeben zu können. Dabei sollten die kinetisch detektierten Intermediate und deren Übergangszustände hinsichtlich ihrer Struktur, Stabilität und Position im Faltungsweg charakterisiert werden. Das Ganze gestaltet sich aber in der Praxis sehr schwierig, da Intermediate während der Rückfaltung nur transient für eine kurze Zeit gebildet werden. Nur Intermediate, denen sich eine langsame Faltungsteilreaktion anschließt können akkumuliert und somit auch näher untersucht werden. Weiterhin kompliziert sich der Faltungsweg durch die heterogene Konformation des entfalteten Zustands, dadurch sind multiple parallele Rückfaltungswege möglich, die auch zusätzlich untereinander verbunden sein können (Schmid, 1998).

1.4 Aufgabenstellung

Parallele β -Helices sind relativ große Proteine, haben aber eine verhältnismäßig einfache und hochgeordnete Topologie. Die Faltung und Stabilität reiner paralleler Faltblattstrukturen sind bis jetzt jedoch wenig untersucht. Am Anfang dieser Arbeit gab es nur *in vivo*- und *in vitro*-Faltungsstudien eines trimeren Tailspikeproteins, das in seiner mittleren Domäne eine parallele β -Helix besitzt (Goldenberg & Creighton, 1994; Seckler, 1998; Seckler *et al.*, 1989), und die Ergebnisse einer anfänglichen Charakterisierung des Faltungsweges der monomeren Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* in der von Henrike Munderloh angefertigte Diplomarbeit (Munderloh, 1995).

Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) ist im Gegensatz zu fast allen anderen monomeren, rechtsgängigen parallelen β -Helices nicht disulfidverbrückt. Dies erlaubte die rekombinante cytoplasmatische Expression des Proteins. Daneben kann bei Rückfaltungsstudien von einem weitgehend randomisierten Zustand des denaturierten Proteins ausgegangen werden. Um detaillierte Informationen über die kritischen Schritte bei der *in vitro*-Faltung von BsPel zu erhalten, sollte

versucht werden, den Faltungsmechanismus des Proteins zu charakterisieren. Dabei sollte vor allem die Frage geklärt werden, welche Rolle Faltungsintermediate am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt sowie den ausbeutevermindernden Nebenreaktionen der Faltung zukommt.

In einem zweiten Teil sollte durch eine Mutagenesestudie am einzigen *cis*-Prolin (Rest 281) von BsPel der Beitrag der *cis-trans*-Isomerisierung an der langsamen Renaturierung geklärt werden. Außerdem sollte in einer weiteren Mutagenesestudie die Bedeutung des Asparaginstapels auf die Stabilität und Faltung des Proteins untersucht werden. Dazu wurde einer der mittleren Reste im Asparaginstapel zufällig gegen andere Aminosäuren ausgetauscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose (ultra pure)	Biozym, Hameln
Ammoniumperoxydisulfat	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-chlor-3-indoyl-phosphat	GERBU, Gaiberg
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto Yeast extract	Difco, Detroit (USA)
Dithioerythritol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/ml Lösung)	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd, 25% (v/v) in Wasser	Serva, Heidelberg
Guanidiniumchlorid (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
Harnstoff (ultra pure)	ICN Biomedicals, Ohio (USA)
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Pefabloc SC	Roche, Mannheim
Polygalacturonsäure (85-90%)	Sigma, St. Louis (USA)
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel30	Roth, Karlsruhe
Serva Blau R250	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tween20	Calbiochem, San Diego (USA)

Alle nicht eigens aufgeführte Chemikalien waren von Merk, Darmstadt oder von Sigma, St. Luis (USA) und hatten den Reinheitsgrade p.a.. Zur Herstellung von Puffern und sonstigen Lösungen wurde entweder quarzbidestilliertes Wasser oder Millipore-gereinigtes Wasser (Reinstwasser) verwendet.

2.1.2 Standards und Kits

Combithek Eichproteine II für Chromatographie MG 18-300kDa	Boehringer, Mannheim
DNA-Längenstandard λ /BstEII	New England Biolabs, Schwalbach
MutaGene™ in vitro Mutagenese Kit	BioRad Laboratories, Richmond (USA)
Protein-Molekularmassen-Marker (low Range und High Range)	Sigma, St. Louis (USA)
QIAprep spin (Miniprep Kit 50)	Quiagen, Hildesheim

2.1.3 Enzyme, Antikörper und Proteine

Anti-Mause-IgG aus Ziege	Sigma, St. Luis (USA)
konjugiert mit alkalischer Phosphatase	
polyklonales Anti-BsPel Serum aus	von der Arbeitsgruppe Prof. Micheel
Maus (Balb/c Auszuchtmaus)	(Universität Potsdam)
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	New England Biolabs, Schwalbach
	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
RNaseA, DNase frei	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

Sekretierte Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* wurde freundlicherweise von W. Nasser zur Verfügung gestellt. Polyklonale Antikörper gegen BsPel (Anti-BsPel) aus Maus wurden freundlicherweise in der Gruppe von Prof. Micheel hergestellt.

2.1.4 Medien, Antibiotika und Puffer

LB-Medium:	10 g/l	Bacto Trypton
	5 g/l	Bacto Yeast Extract
	5 g/l	NaCl
	(1.5% (w/v) Bacto Agar für Kulturplatten)	
	mit 1N NaOH auf pH 7.5 einstellen und autoklavieren	

Antibiotika Stammlösungen:

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in <i>aqua bidest</i>
Chloramphenicol (Cm)	30 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol
Tetracyclin (Tet)	12.5 mg/ml in 70% (v/v) Ethanol
Kanamycin (Kan)	10 mg/ml in <i>aqua bidest</i>

Die Stammlösungen wurden sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Sie wurden dem Medium im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris/Acetate pH 8.0
	1 mM	EDTA
TE-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
	1 mM	EDTA
Aktivitätstestpuffer:	100 mM	Tris/HCl pH 8.5
	0.25 mM	CaCl ₂
	0.1% (w/v)	Polygalacturonsäure (PGA)

PGA-Stammlösung:	2% (w/v) PGA in <i>aqua bidest</i>
	mit 1N NaOH den pH auf 7.0 titrieren, aliquotieren und bei -20°C lagern

Nativpuffer: 20 mM Natriumphosphat pH 7.0
Zusatz bei Faltungskinetiken:
(2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween 20)
sterilfiltriert und entgast

Denaturierungspuffer: 20 mM Natriumphosphat pH 7.0
8M Guanidiniumchlorid
Zusatz bei Faltungskinetiken
(2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween 20)
sterilfiltriert und entgast

2.1.5 Sonstiges Material

Centricon 30, Mikrokonzentrat	Amicon, Witten
Dialyseschläuche Spectra/Por (Ausschlußvolumen 12-14000 Da)	Spectrum, Houston (USA)
Filterpapier 3MM Chr	Whatman, Maidstone (USA)
Microcon 30	Amicon, Witten
Phenyl-Sepharose CL4B	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Kunststoff-Fluoreszenz-Makroküvetten	Semadeni, Ostermündigen (Schweiz)
Quarzglas-Suprasil-Küvetten	Hellma, Müllheim
Q-Sepharose fast flow	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
SP-Sepharose fast flow	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Sterilfilter (0.2 µm)	Renner, Darmstadt
Superdex 75 prep grade	Pharmacia, Uppsala (Schweden)
Ultrafiltrationsmembran YM30	Amicon, Witten

2.1.6 Geräte

Absorptionsspektrometer:	UV-120-02 (Shimadzu) Cary 50 Probe (Varian)
Blotting System:	Fast Blot B33 (Biometra)
Chromatographieeinheiten:	Uvicord SII, Pumpe P-1 und P-500, RediFrac und GradiFrac, Highload-System (Pharmacia)
Densitometer:	Elscript 400AT (Hirschmann)
Elektrophoreseeinheiten:	Mighty Small II SE250 (Hoefer) Agagel Mini (Biometra)
Fluoreszenzspektrometer:	Spex Fluoromax TM (Instruments S.A.) Spex Fluoromax-2 ^R (Instruments S.A.)
Geldokumentationssystem:	GelDoc2000 (Biorad)
HPLC:	Äkta Purifier (Pharmacia)
Spektropolarimeter:	J-715 (Jasco)
Stopped-flow-Gerät:	SX-18MV Stopped-Flow Reaction Analyser (Applied Photophysics)
Spannungsquellen:	Bio 105, PP4000 (Biometra)

Zentrifugen:	MR22i (Jouan), RC-28S (Sorvall), RC-26Plus (Sorvall), Centrifuge 5415C (Eppendorf), Biofuge pico (Heraeus)
sonstige Geräte:	
pH-Meter:	pH 597 (WTW)
Kryostaten:	F1 und F3 digital (Haake)
Waagen:	Feinwaage 434 (Kern) Analysenwaage BP 121 (Sartorius)
French Press:	French Pressure Cell Press (SLM Aminco Instr. INC)
Refraktometer:	Zeiss Optron
Bakterienkulturschüttler:	Innova 2300 Platform Shaker (New Brunswick Scientific)
Brutschränke:	WB 540K (Mytron)
Heizblock:	BT100 (Kleinfeld Labortechnik)

2.1.7 Organismen

Phagen:

M13K07 Helper Phage Biorad, (Vieira, 1987)

Escherichia coli Stämme:

E. coli CJ236 Biorad, (Kunkel, 1987)
F' *cat* (=pCJ105; M13^SCm^r)/*dut ung1*
thi-1 relA1 spoT1 mcrA

E. coli XL1Blue Stratagene, (Bullock, 1987)
recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17
supE44 relA1 lac[F' proAB lac^fZΔM15
Tn10 (Tet^r)]^c

E. coli BL21 (DE3) Novagene,
(Dubendorff, 1991a; Dubendorff, 1991b)
F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm* (DE3)

2.1.8 Plasmide, Oligodesoxynukleotide

Plasmide:

Als Vorarbeit wurde von Henrike Munderloh das Gen, kodierend für BsPel, ohne natürliche Signalsequenz, aus einer genomischen DNA von *Bacillus subtilis* (wurde freundlicherweise von Prof. Schumann/ Universität Bayreuth zur Verfügung gestellt) per PCR isoliert. Dazu wurden die Primer BsPel1 und BsPel2 verwendet. Das Gen wurde mittels der Nde I und Hind III Restriktionsendonukleasestellen in den Vektor pFimC/T7T kloniert (wurde freundlicherweise von R. Glockshuber zur Verfügung gestellt (Hermanns *et al.*, 2000)) und steht unter der Kontrolle des T7 Promotors/lac Operators. Bei der Klonierung wurde das FimC-Gen durch die für BsPel codierende Sequenz ersetzt. Das resultierende Expressions-Plasmid ist in Abb. 2.1 dargestellt und wurde in der weiteren Arbeit zu pT7-Bspel abgekürzt.

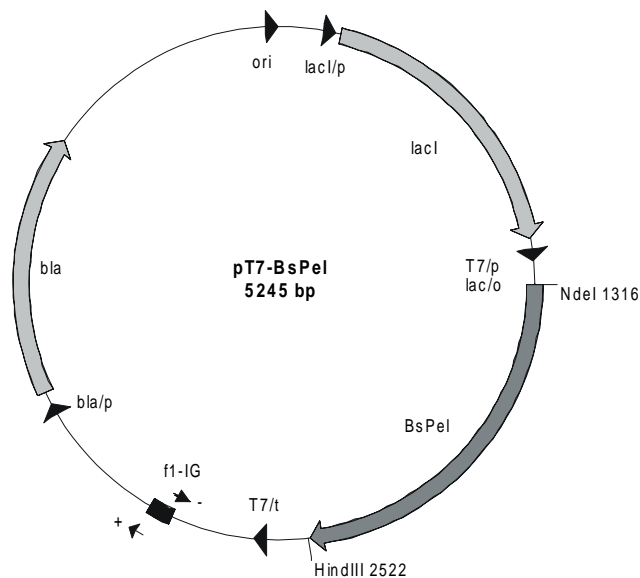


Abb. 2.1: Expressionsplasmid pT7-BsPel in maßstabsgetreuer Darstellung

lacI/p	: Promotorregion des lacI-Gens
lacI	: Gen des lac-Repressors
lac/o	: lac-Operatorregion
T7/p	: Promotorregion der T7 Polymerase
BsPel	: Gen der Pektat-Lyase aus <i>Bacillus subtilis</i>
T7/t	: Terminatorregion der T7 Polymerase
f1-IG	: F1-Phagenreplikationsursprung
bla/p	: Promotorregion der β -Lactamase
bla	: Gen der β -Lactamase
ori	: Plasmid-Replikationsursprung (ColE1)

2.2 Molekularbiologische Versuche

Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur mit sterilisierten Lösungen und Gefäßen, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt.

2.2.1 Kultivierung und Erhaltung von Bakterien, (Sambrook, 1989)

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in LB-Medium bei 37°C, dem bei Bedarf das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde. Zur längerfristigen Lagerung der *E. coli*-Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurden 2.3 ml einer stationären Übernachtskultur mit 700 µl 87% (v/v) Glycerin versetzt, 2h bei 4°C inkubiert und anschließend bei - 80°C gelagert.

2.2.2 Reinigung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Für Sequenzreaktionen wurde die Plasmid DNA mit Hilfe des Quiagen-MiniSpin Kits der Firma Quiagen, Düsseldorf nach genauer Anleitung des Herstellers gewonnen. Die Ausbeute an Plasmid DNA aus 3 ml Kulturen betrug ca. 3-20 µg.

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

Zur der Herstellung transformationskompetenter Zellen wurde das Puffersystem nach Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet, die Anzucht der Bakterien erfolgte nach Kiaoren (Kiaoren *et al.*, 1994).

2.2.4 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Um Mutationen in das BsPel-Gen einzuführen, wurde das Verfahren der ortsgerichteten Mutagenese nach Kunkel (Kunkel, 1987) verwendet. Die dazu erforderliche uracilhaltige Einzelstrang-DNA (ssDNA) wurde nach Infektion des betreffenden plasmidtragenden *E. coli* Stamms Cj236 durch den Helferphagen M13K07 (Vieira, 1987) aus der Phagenpräparation isoliert. Für alle Mutageneseexperimente wurde das Plasmid PT7-BsPel (siehe 2.1.8.) verwendet. Dieses Expressionsplasmid trägt neben dem Gen für BsPel auch die für die Bildung der ssDNA benötigten intergenischen Region des Phagen f1 (Beck & Zink, 1981). Die Präparation der ssDNA erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Vieira und Messing (Vieira, 1987):

Eine stationäre Übernachtskultur von *E. coli* CJ236 (transformiert mit dem gewünschten Plasmid) wurde 1:100 verdünnt in 20 ml LB_{Amp/Cm}-Medium, das 1% (w/v) Glucose enthält. Die Vermehrung der Zellen erfolgte bei 37°C bis zu einer Zelldichte von OD₅₅₀=0.25. Anschließend wurden die Zellen mit 2•10¹⁰ pfu („plaque forming units“) des Helferphagen M13K07 infiziert und für eine Stunde weiter bei 37°C inkubiert. Danach wurde mit 1 ml dieser Kultur 20 ml LB_{Amp/Cm/Kan}-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Bakterien (Sorvall SS34, 10000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit 10 µl RNase-Lösung (10 mg/ml RNase A) versetzt und 30 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung der Phagen wurde dem Überstand 6 ml PEG-Lösung (2.5 M NaCl, 20% (w/v) PEG6000) zugesetzt und eine Stunde auf Eis unter leichtem Schwenken stehen gelassen. Die Phagenpartikel wurden durch Zentrifugation (Sorvall SS34, 12000 rpm, 30 min, 4°C) geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen. Das Phagenpellet wurde in 200 µl Hochsalzpuffer (300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl pH 8.0) resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde die Phagensuspension nochmals bei 4°C, 14000 rpm 10min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phagenpartikel wurden durch Phenolextraktion aufgeschlossen. Dazu wurde der Überstand nacheinander im Volumenverhältnis von 1:1 zweimal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur Steigerung der Ausbeute an ssDNA wurde nach dem ersten Extraktionsschritt die organische Phase mit 200 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) nachextrahiert. Anschließend wurde zur Fällung der ssDNA 1/10 Volumen 3.5 M Natriumacetat und 2.5 Volumen Ethanol (absolut) zugegeben und 20 min bei 4°C und 14 000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 25 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm. Eine OD₂₆₀-Einheit entspricht etwa 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Die Ausbeute an ssDNA lag bei ca. 40 µg.

2.2.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese von Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Kunkel und McClary (Kunkel, 1987; McClary *et al.*, 1989) durchgeführt. Dabei wird ein synthetisches Oligonukleotid, das für die gewünschte Mutation codiert, an einzelsträngige, uracilhaltige DNA hybridisiert, anschließend in einem *in vitro* Syntheseschritt der Gegenstrang aufgefüllt. Die Heteroduplex-DNA aus uracilhaltigen Wildtypstrang und uracilfreiem, mutierten Strang wird in einen dut⁺, ung⁺ *E. coli*-Stamm XI1Blue transformiert. Durch Entfernung der Uracilreste aus dem parentalen Strang durch die Uracil-N-Glycosylase wird dieser geschädigt und die Mutante erhält einen Selektionsvorteil in der ersten Replikationsrunde.

Für die Reaktion wurden die Oligodesoxynukleotide phosphoryliert. Dazu wurden 200 pmol des Mutagenese-Oligodesoxynukleotids zu 10 µl 3 x Kinase-Mix (300mM Tris/HCl pH 8.0, 30 mM MgCl₂, 60 mM DTT, 3 mM ATP) sowie 4.5 Units T4-Polynukleotidkinase gegeben und auf 30 µl mit *aqua bideest* aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37°C wurde die Kinase hitzeinaktiviert (10 min, 65°C). Durch Zugabe von 70 µl *aqua bideest* wurde die Oligodesoxynukleotidkonzentration auf 2 pmol/µl eingestellt.

2 pmol des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids wurden mit 0.2 pmol der nach 2.2.4. präparierten ssDNA hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 10 µl 20 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, pH 7.4. Der Ansatz wurde zuerst 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend für 15 min bei einer spezifischen Hybridisierungstemperatur (siehe 2.1.7.) inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt.

Material und Methoden

Zur *in vitro*-Replikation wurde zu dem Ansatz 1 µl 10 x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, pH 7.9, 10 mM ATP, 5mM dNTPs jeweils), 1 µl T4-DNA-Polymerase (3 Units) und 1 µl T4-DNA-Ligase (6 Units) pipettiert. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei Raumtemperatur und 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Mutageneseansatz mit TE-Puffer auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert. Zur Transformation in *E. coli* XI1Blue wurden 10 µl eingesetzt.

2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der ortsgerichteten Mutagenese wurde die Umgebung der Mutationsstelle sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte als Auftragssequenzierung am Klinikum der Universität Regensburg im Labor von Prof. Wolf.

2.2.7 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 10 µl mit ca. 1 µg Plasmid-DNA, 1-2 units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, 1 µl 10 x Reaktionspuffer und, falls vom Hersteller angegeben, 0.1 µl einer BSA-Lösung (10 mg/ml) durchgeführt. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

2.2.8 Analytische Agarose-Gelelektrophorese, (Sambrook, 1989)

Die Proben wurden mit 1/10 ihres Volumens an Auftragspuffer (50 % (v/v) Glycerin, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die analytische Auftrennung der doppelsträngigen DNA erfolgte in Agarosegelen, die zwischen 1 und 1.5 % (w/v) Agarose enthielten. Die Gele enthielten 1/10000 Volumen an Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml), als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei Gelen in der Größe von 6.5 x 9 cm Größe bei 80 Volt, bei Gelen von 10 x 10 cm Größe bei 100 Volt konstanter Spannung.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine

2.3.1.1 Anzucht und Induktion der Bakterien

Die Anzucht der Zellen für die Produktion von Wildtyp Pektat-Lyase erfolgte bei 30°C, für die Produktion von Punktmutanten wurde 25°C als Temperatur verwendet.

Zur Reinigung von rekombinanter Pektat-Lyase sowie der Punktmutanten wurden Kulturen zwischen 2 - 10 l angesetzt. Dazu wurden je 1 l LB_{Amp}-Medium in Zweiliter-Schikanekolben mit einer stationären

Übernachtskultur des entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) im Verhältnis 1:50 angeimpft und bei der entsprechenden Temperatur bis zu einer $OD_{550} = 0.8 - 1.0$ geschüttelt und anschließend durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM die Proteinsynthese induziert. Nach Übernachtsinkubation bei gleichen Bedingungen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (Sorvall GS3, 5000 rpm, 10 min). Das Zellpellet wurde in ca. 30 ml Aufschlußpuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5) resuspendiert und direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.3.1.2 Zellaufschluß

Der Zellaufschluß wurde auf Eis durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch French-Press Aufschluß. Der Aufschluß erfolgte zweimal in einer 45 ml French-Press Zelle bei maximal 18000 psi. Anschließend wurde das Homogenisat zur Trennung der löslichen und unlöslichen Zellbestandteile zentrifugiert (Sorvall SS34, 18000 rpm, 30 min 4°C).

2.3.1.3 Proteinreinigung

2.3.1.3.1 Normaler Maßstab

Die Reinigung der Wildtyp-Pektat-Lyase und der Punktmutanten erfolgte auf die gleiche Weise. Alle Chromatographieschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Reinigungsverlauf wurde jeweils durch SDS-PAGE kontrolliert. Bei der Reinigung der Punktmutanten wurde dem löslichen Anteil des *E. coli* Zellextrakts ein Proteaseinhibitor (Pefabloc SC) in der Konzentration 0.1 bis 1 mg/ml zugefügt.

Nach Ernte und French-Press Aufschluß wurde das Pektat-Lyase-Protein aus dem löslichen Anteil des Zellextraktes gereinigt. Dazu wurde der French-Press Überstand zweimal gegen 5 l Aufschlußpuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5) dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend auf eine „Tandemsäule“, bei der eine Q-Sepharose (Anionenaustauscher) und eine SP-Sepharose (Kationenaustauscher) hintereinandergeschaltet sind, aufgetragen (Säulenvolumina jeweils 50 ml, Flußrate 1 ml/min). Durch den basischen isoelektrischen Punkt von Pektat-Lyase (ca. 9.6) wird gewährleistet, daß das Protein bei pH 8.5 nicht an den Anionenaustauscher bindet, sondern nur an den Kationenaustauscher, im Gegensatz zu den meisten *E. coli*-Proteinen, die einen isoelektrischen Punkt im neutralen Bereich besitzen. Nach intensivem Waschen beider Säulen mit Aufschlußpuffer (ca. 5 Säulenvolumina) wurde die Q-Sepharosesäule aus dem Flußschema genommen. Das Protein wurde von der SP-Sepharose mit einem linearen Gradienten von 0 - 500 mM NaCl eluiert (10 Säulenvolumina). Die Pektat-Lyase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit einer 4 M Ammoniumsulfat-Lösung auf 1.5 M Ammoniumsulfat eingestellt und auf eine Phenylsepharose-Säule (Säulenvolumen 50 ml, Flußrate 0.5 ml/min) aufgetragen. Die Elution erfolgte in einem linear absteigenden Gradienten von 1.5 M – 0 M Ammoniumsulfat in Aufschlußpuffer. Als Gradientenvolumen wurde das zehnfache Säulenvolumen verwendet.

Die Bspel enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und gegen Nativpuffer (20 mM Na-Phosphat, pH 7.0) dialysiert. Das gereinigte Protein wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.3.1.3.2 Kleiner Maßstab - „batch-Verfahren“

Um den Expressionsgrad der Punktmutanten bestimmen zu können, wurde der Anteil an Pektat-Lyase aus einem Expressionstest bestimmt. Dazu wurde nach Dialyse des French-Press Überstandes gegen Aufschlußpuffer (20 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.5) der Gesamtproteingehalt des Dialysats mittels Bradfordtest (siehe 2.3.5.2.) ermittelt. Das Dialysat aller Mutanten wurde dann auf eine einheitliche Proteinkonzentration (1 mg/ml) verdünnt. Davon wurde 1 ml mit 1 ml Q-Sepharose-material, äquilibriert mit Aufschlußpuffer, in einem Reaktionsgefäß gemischt und für ca. 5 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Q-Sepharosematerial abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand mit 1 ml SP-Sepharosematerial gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 min bei 4°C wurde der Ionenaustauscher abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm, 4°C), der Überstand abgenommen und verworfen. Das SP-Sepharosematerial wurde anschließend mit 1 ml Aufschlußpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte durch Zugabe von 0.5 ml Salzlösung (0.5 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, pH 8.5). Nach erneutem Mischen und Abzentrifugation (1 min, 13000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Auftrennung der enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE (siehe 2.3.2.) erfolgte dann die Bestimmung der Menge an Pektat-Lyase densitometrisch (siehe 2.3.3.)

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach King & Laemmli (King & Laemmli, 1971). Die Gele hatten eine Größe von 20 x 20 x 0.15 cm für Expressionstests und 10 x 8 x 0.075 cm (Midget) ansonsten. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel war jeweils 12.5 % (w/v), die Elektrophorese erfolgte bei 250 V (große Gele) oder 120 V (kleine Gele) konstanter Spannung. Als Laufpuffer wurde das Puffersystem nach Fling & Gregerson (Fling & Gregerson, 1986) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag mit je einem fünftel Volumen 10 %iger (w/v) SDS-Lösung und Auftragspuffer (325 mM Tris/HCl pH 6.8, 500 mg/ml Glycerin, 0.5 mg/ml Bromphenolblau, 10 mM DTE) versetzt und zur Denaturierung 1 Minute auf 95°C erhitzt.

2.3.3 Densitometrische Auswertung von Polyacrylamidgelen

Die Quantifizierung Coomassie-gefärbter Banden in SDS-Polyacrylamidgelen wurde an einem Hirschmann Elscript 400 AT Densitometer durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 546 nm und mit vorgeschalteter Schlitzeblende von 2 x 0.2 mm. Der Scanabstand betrug 0.502 mm in X- bzw. 0.047 mm in Y-Richtung. Die Auswertung erfolgte mit der von Hirschmann stammenden Software.

2.3.4 Proteinfärbung

2.3.4.1 Coomassie-Färbung

Die Coomassiefärbung wurde nach einer modifizierten Methode nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971) durchgeführt. Dazu wurde die Gele zunächst 10 Minuten in einer Mischung aus 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig und 0.1% (w/v) Serva Blau R250 vorinkubiert. Die weitere Färbung erfolgte entsprechend den Angaben in Fairbanks *et. al.* (1971) (Fairbanks *et al.*, 1971). Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei etwa 0.2 – 0.5 µg Protein/mm² Gel.

2.3.4.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernik (1985). Mit dieser Färbemethode lassen sich etwa 0.05 – 0.1 ng Protein/mm² Gel nachweisen.

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.3.5.1 Spektroskopische Bestimmung

Die Proteinkonzentration wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt. Der Extinktionskoeffizient bei 280nm wurde von Henrike Munderloh in der Diplomarbeit zu 1.75 ml•mg⁻¹•cm⁻¹ bestimmt nach der Methode nach Pace (Pace *et al.*, 1995) .

2.3.5.2 Bestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zellextrakten wurde die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Die Methode beruht auf der Bindung von Protein an den Farbstoff Coomassie-Brillant-Blue G250. Die Bildung des Komplexes kann durch Absorptionsmessung bei 595 nm gemessen werden.

Die Farbstofflösung (50 mg Coomassie-Brillant-Blue G 250, 50 ml Ethanol absolut, 50 ml konz. Phosphorsäure, 175 ml *aqua bidest*) wurde vor Gebrauch filtriert und mit *aqua bidest* im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Für die Erstellung der Eichkurven wurde gereinigte Pektat-Lyase verwendet.

Es wurden jeweils 100 µl Proteinslösung zu 900 µl Färbelösung pipettiert und nach 10 min Inkubationszeit (im Dunkeln) die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Absorptionsmessungen waren im Bereich von 1 – 10 µg Protein linear.

2.3.6 Massenspektrometrie

Die Molekülmasse von Pektat-Lyase wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Dies erfolgte als Auftragsarbeit bei Dr. Sophie Haebel, Interdisziplinäres Zentrum für Biopolymere an der Universität Potsdam. Die Messung wurde an einem Reflex II Bruker Massenspektrometer durchgeführt.

2.3.7 Proteinsequenzierung

Die korrekte Sequenz des N-Terminus der rekombinaten Pektat-Lyase wurde durch Sequenzierung nachgewiesen. Sie erfolgte nach dem Edman-Verfahren (Edman & Henschen, 1975) und wurde als Auftragsarbeit in der Gruppe von Dr. Deuzmann an der Universität Regensburg durchgeführt.

2.3.8 Westernblot

Die Bestimmung der Proteinmenge an Pektat-Lyase der Mutantexpression im *E. coli*-Rohextrakt, erfolgte als immunologische Detektion. Dazu wurde ein polyklonales Anti-BsPel Antiserum aus der Maus verwendet, das freundlicherweise Prof. Micheel bereitgestellt hat. Als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Mause-IgG aus Ziege konjugiert mit alkalischer Phosphatase von der Firma Sigma, verwendet.

Die SDS-PAGE wurde wie unter 2.3.2. beschrieben durchgeführt. Bei dem anschließenden Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran bei einer konstanten Stromstärke von 1.8 mA/cm^2 wurde nach der Methode von Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984) vorgegangen. Die Immunspezifische Färbung erfolgte nach dem Verfahren von Blake (Blake *et al.*, 1984). Beide Antikörperlösungen wurden 1:1000 verdünnt mit PBS-Tween-Puffer (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20) eingesetzt.

Die Auswertung der Westernblots erfolgte densitometrisch (siehe 2.3.3.) mit Hilfe des Reflektionsmodus.

2.3.9 Analytische Gelfiltration

Hochauflösende Gelfiltrationschromatographie wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Chromatographiesäule wurde eine Superdex 200-HR 10/30 (analytical grade) von der Firma Pharmacia verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Eichprotein-Kit der Firma Boehringer (siehe 2.1.2.). Die Flußrate betrug 0.5 ml/min, als Puffer wurde 20 mM Natriumphosphat pH 7, 200 mM NaCl verwendet. Von jedem Eichprotein wurden 50 µl einer Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml aufgetragen.

2.3.10 Bestimmung der Pektat-Lyase Aktivität

Um die Aktivität von Pektat-Lyase online zu verfolgen kann die Entstehung einer ungesättigte C4-C5 Bindung am nichtreduzierenden Ende bei der Spaltung von Polygalakturonsäure (PGA) spektrophotometrisch verfolgt werden (Moran *et al.*, 1968).

Beim BsPel-Aktivitätstest (Nasser *et al.*, 1990) wird die Änderung der Extinktion bei $\lambda = 235 \text{ nm}$ und 42°C verfolgt. Als Aktivitätstestpuffer wurde 100 mM Tris/HCl pH 8.5, 0.25 mM CaCl_2 , 0.1% (v/v) PGA verwendet.

Die Aktivität von BsPel ist entweder als $\Delta\text{OD}/\text{min}$ oder als spezifische Aktivität angegeben. 5.2 OD/min entsprechen dabei der Bildung von 1 µmol ungesättigten Produkt/min (Moran *et al.*, 1968), das einer

Einheit der BsPel Aktivität (1 Unit) entspricht. Spezifische Aktivität wird als μmol von ungesättigten Produkt pro min und pro mg Protein angegeben.

2.3.10.1 Reaktivierungskinetiken von BsPel

Da unter Aktivitätstestbedingungen keine Reaktivierung von BsPel möglich war, wurden Reaktivierungsexperimente in einem separaten Reaktionsgefäß in Nativpuffer (20 mM Natriumphosphat pH 7, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20) und bei der jeweiligen Temperatur durchgeführt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden davon Aliquots entnommen und direkt in den Aktivitätstest pipettiert und die Aktivität bestimmt.

2.3.11 Fluoreszenzspektroskopie, (Schmid, 1997)

Alle Fluoreszenzmessungen wurden an einem Spex-FluoroMax-Spektrofluorometer mit thermostatisierten Küvettenhalter durchgeführt. Alle verwendeten Puffer waren filtriert (0.2 μm Porenfilter) und entgast. Für die Aufnahme von Spektren wurden Quarzküvetten (Firma Hellma) und für die Aufnahme von Kinetiken fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvetten (Firma Semadeni) verwendet. Um Anlagerung von Proteinmaterial an die Küvettengefäßwände zu reduzieren wurde dem jeweiligen Puffer bei Kinetiken 0.1% (v/v) Tween 20 und 2 mM DTE zugesetzt.

2.3.11.1 Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden bei 10°C bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissionwellenlängenbereich von 290-460 nm aufgezeichnet, dabei wurde alle 0.5 nm mit 0.5 s Integrationszeit gemessen. Die spektralen Spaltbreiten für Anregung und Emission lagen bei 2.1 bzw. 4.2 nm. Alle Fluoreszenzspektren wurden gegen die jeweilige Pufferfluoreszenz korrigiert.

2.3.11.2 Fluoreszenzkinetiken

Zur Messung von De- und Renaturierungskinetiken wurde die Proteinlösung unter Rühren direkt 1:100 in eine Fluoreszenzküvette verdünnt. Die Proteinkonzentration war 5 $\mu\text{g/ml}$, wenn nicht anders angegeben. De- und Renaturierung wurde wie unter 2.3.13. beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 328 nm. die spektralen Spaltbreiten lagen bei 2.1 nm (Anregung) bzw. 4.2 nm (Emission). Die genauen Bedingungen (Temperatur, Puffer) sind bei den jeweiligen Abbildungen angegeben.

2.3.11.3 *stopped-flow*-Experimente

Die *stopped-flow*-Experimente wurden an einem Applied Photophysics SX18.MV System durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm, die Emissionsdetektion erfolgte mit Hilfe eines cut off Filters bei 320 nm, mit einer spektralen Spaltbreiten von 4 nm für die Anregung. Die Meßtemperatur war 10°C.

Es wurden Doppelmischexperimente (siehe 2.3.15) durchgeführt. Dabei wurde in einer ersten Verdünnung 1 Teil denaturiertes Protein mit 5 Teilen Nativpuffer (20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) gemischt und in einem 115 µl aging loop für eine bestimmte Zeit gelassen. In der zweiten Verdünnung wurde dann nach bestimmten Verzögerungszeiten mit Denaturierungspuffer (entweder 1.3M GdmCl oder 6M GdmCl in Nativpuffer) im Verhältnis 5:1 gemischt und in die Meßzelle injiziert (Beim ersten Mischen war die Proteinendkonzentration 60 µg/ml, beim zweiten 10 µg/ml). Für jede Verzögerungszeit wurden 3-4 Kinetiken von 50 s aufgezeichnet und gemittelt. Die Kinetiken wurden mit einer mono- bzw. biexponentiellen Gleichung beschrieben. Dabei wurden die Datenpunkte, die während der Totzeit (2 ms) aufgenommen wurden, für die Analyse vernachlässigt.

2.3.12 CD-Spektroskopie, (Schmid, 1997)

Alle Messungen wurden an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter bei einer Meßtemperatur von 10°C durchgeführt. Die verwendeten Puffer waren filtriert (0.2 µm Porenfilter) und entgast. Die Proteinlösung wurde vor jeder Messung 10 min zentrifugiert (MR22i (Jouan), 20 000 rpm, 4°C). Als Küvetten wurden Quarzküvetten der Firma Hellma verwendet. Dem Meßpuffer wurde bei Kinetiken 0.1 % (v/v) Tween 20 und 2 mM DTE zugesetzt.

2.3.12.1 CD-Spektren

Es wurden Fern-UV-Spektren im Bereich von 185-250 nm und Nah-UV-Spektren im Bereich von 250-450 nm aufgenommen. Der Meßpunktabstand betrug 0.5 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min, die Bandbreite war 1 nm. Es wurde jeweils über 20 Spektren gemittelt. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert. Die genauen Angaben von Proteinkonzentration und Schichtdicken befinden sich bei der jeweiligen Abbildung.

Für den Vergleich von Spektren wurden die Meßwerte in $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet, die wie folgt definiert ist.

$$[\Theta]_{MRW} = \Theta \cdot M_r / c \cdot d \cdot N \quad (\text{Schmid, 1997}) \quad (\text{II})$$

Dabei wird üblicherweise Θ (Eliptizität) in deg (Winkelgrad), M_r (Molekulare Proteinmasse) in g/dmol, c (Konzentration des Proteins) in g/cm³, d (Schichtdicke) in cm angegeben. N ist die Anzahl der Aminosäuren des Proteins.

2.3.12.2 Fern-UV-CD-Kinetiken

Zur Messung von De- und Renaturierungskinetiken wurde die Proteinlösung unter Rühren direkt 1:40 in eine Quarzküvette mit Nativpuffer (20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) verdünnt. Die Proteinendkonzentration betrug 20 µg/ml. De- und Renaturierung wurde wie unter 2.3.13. beschrieben durchgeführt. Die Fern-UV-CD-Messung erfolgte bei 220 nm mit einer Bandbreite von 1 nm.

2.3.13 Gleichgewichtsentfaltung und –rückfaltung von BsPel

Denaturierung von BsPel und den Punktmutanten erfolgte entweder bei 4M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat pH7 über Nacht und 10°C oder durch Ansäuerung (Zugabe von 1/20 Volumen 1 M HCl und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min).

Für die Denaturierungs- bzw. Renaturierungsübergänge wurden Stammlösungen von nativen bzw. vollständig denaturiertem Protein unter Rühren in verschiedene De- bzw. Renaturierungspuffer verdünnt (mindestens 1:40), die jeweils eine bestimmte Denaturierungsmittelkonzentration enthielten. Die genauen Bedingungen sind jeweils bei den Abbildungen angegeben. Nach Inkubation von mindestens einem Tag bei der jeweiligen Temperatur wurden von den Proben entweder die Aktivität bestimmt, indem ein Aliquot des jeweiligen Ansatzes direkt in den Aktivitätstest pipettiert wurde, oder sie wurden spektroskopisch analysiert (siehe 2.3.11.2. und 2.3.12.2).

Für die genaue Bestimmung der Konzentration des Denaturierungsmittels wurde der Brechungsindex in den De- und Renaturierungsansätzen überprüft.

$$[\text{GdmCl}] = 57.147 \cdot (\Delta N) + 38.68 \cdot (\Delta N)^2 - 91.6 \cdot (\Delta N)^3 \quad (\text{Pace, 1986}) \quad (\text{III})$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117.66 \cdot (\Delta N) + 29.753 \cdot (\Delta N)^2 + 185.56 \cdot (\Delta N)^3 \quad (\text{Pace, 1986}) \quad (\text{IV})$$

$$[\text{GdmSCN}] = 40.4 \cdot (\Delta N) \quad (\text{Takase et al., 1974}) \quad (\text{V})$$

(ΔN): Differenz der Brechungsindizes von Puffer mit und ohne Denaturierungsmittel

Bei den Harnstoffübergängen der Prolin-Punktmutanten wurden die Meßdaten mit einer nicht-linearen Regression nach der Gleichung (VI) ausgewertet (Zweizustandsmodell) (Santoro und Bolen, 1988).

$$S = u_1 \cdot c_D + U_0 + \frac{f_1 \cdot c_D + F_0 - u_1 \cdot c_D - U_0}{\exp\left(\frac{-\Delta G^0 + m \cdot c_D}{R \cdot T}\right) + 1} \quad (\text{VI})$$

- S: gemessenes Signal
- f1: Steigung der Vorübergangs-Basisgeraden
- F₀: Signal der nativen Spezies
- u1: Steigung der Nachübergangs-Basisgeraden
- U₀: Signal der entfalteten Spezies
- c_D: Denaturierungsmittelkonzentration
- ΔG^0 : freie Stabilisierungsenergie in Abwesenheit von Denaturierungsmittel
- m: Abhängigkeit von ΔG von der Denaturierungsmittelkonzentration; Kooperativität

2.3.14 pH-Gleichgewichtsübergang

Für die Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge wurden Stammlösungen von nativen bzw. vollständig denaturiertem Protein (entweder durch Ansäuerung oder durch GdmCl) direkt in fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvetten (Firma Semadeni) mit den jeweiligen Puffern der pH-Werte 2-10 verdünnt (1:100) und bei 10°C inkubiert. Die Proteinkonzentration in den Ansätzen betrug jeweils

5 µg/ml. Der verwendete Puffer war wie folgt zusammengesetzt: 150 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM Citrat, 10 mM Borat, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 2-10.

2.3.15 Sprungexperimente zur Charakterisierung der schnellen und langsamen Schritte der Faltung

Die Faltungsexperimente beinhalten 2-3 Sprünge zwischen verschiedenen Guanidiniumchlorid-Konzentrationen. Dabei wurden sowohl Experimente mit manuellem Mischen als auch stopped-flow-Experimente (siehe 2.3.11.3) durchgeführt. Alle Experimente wurden, falls nicht anders angegeben, bei 10°C durchgeführt.

2.3.15.1 Bestimmung der nativen Spezies

In Mischungen von nativen Molekülen und möglichen Faltungsintermediaten, die durch verschieden lange Renaturierungszeiten von vollständig denaturiertem Protein erzeugt werden, wird davon ausgegangen, daß eventuell vorhandene Intermediate eine bedeutend geringere Stabilität aufweisen als natives Protein. Das bedeutet: Bei einer Überführung in stark denaturierende Bedingungen (6M GdmCl) kann nur die Entfaltung der nativen Proteinmoleküle verfolgt werden, da Intermediate in der Totzeit denaturieren. Die Auftragung der Amplitude der Denaturierungskinetiken gegen die Renaturierungszeit beschreibt somit die Entstehung der nativen Spezies.

Manuelles Mischen

10 µl vollständig denaturiertes Protein (1.25 mg/ml BsPel in 6M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, pH 7) wurde unter Rühren direkt in eine mit 1000 µl Renaturierungspuffer (0 M - 0.9 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7) gefüllte und auf 10°C vortemperierte fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvette (Firma Semadeni) verdünnt. Nach definierten Zeiten der Renaturierung wurde die Denaturierung der nativen Proteinmoleküle eingeleitet durch Zugabe von 1800 µl auf 10°C vortemperierten Denaturierungspuffer (8 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7) und die Denaturierungskinetiken im Fluoreszenz-Spektrometer verfolgt (siehe 2.3.11.2). Nach der ersten Verdünnung betrug die Proteinkonzentration 12.5 µg/ml, bei der zweiten 4.5 µg/ml. Die GdmCl-Konzentration betrug bei den Denaturierungskinetiken ca. 5 M.

Stopped-flow Mischen

Die stopped-flow-Experimente wurden wie unter 2.3.11.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine Pektat-Lyase Lösung in stark denaturierenden Bedingungen (1.44 mg/ml BsPel in 6 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Nativpuffer (20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7) 1:4 verdünnt zu einer Proteinkonzentration von 360 µg/ml und einer GdmCl-Konzentration von 1.5 M. Bei diesen Bedingungen ist noch keine Renaturierung von BsPel möglich.

In der ersten Verdünnung wurden 40 µl dieser Proteinlösung mit 200 µl Nativpuffer verdünnt (60µg/ml BsPel, 0.26M GdmCl). Nach verschiedenen Zeitpunkten der Renaturierung wurden dann in

der zweiten Verdünnung 60 µl des Renaturierungsansatzes mit 300 µl Denaturierungspuffer (8.1 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) verdünnt (10 µg/ml BsPel, 6.7 M GdmCl).

2.3.15.2 Bestimmung von Intermediaten

Bei Überführung in leicht denaturierende Bedingungen (1.3M GdmCl) nach verschiedenen langen Renaturierungszeiten wird nur die Entfaltung eventueller Faltungsintermediate beobachtet, da native Proteinmoleküle bei dieser Guanidiniumchloridkonzentration stabil sind. Dabei beschreibt die Amplitude der Denaturierungskinetiken, gegen die Renaturierungszeit aufgetragen, das Entstehen und Verschwinden der möglichen Intermediate. Der Endwert der Kinetiken, gegen die Renaturierungszeit aufgetragen, beschreibt in diesem speziellen Fall auch die Entstehung des nativen Proteins, da Denaturierungs- und Renaturierungsübergang von Pektat-Lyase eine Hysterese aufweist (siehe 3.3.2).

Manuelles Mischen

25 µl vollständig denaturiertes Protein (0.5 mg/ml BsPel in 6M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, pH 7) wurde unter Rühren direkt in eine mit 1750 µl Renaturierungspuffer (0 M - 0.9 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) gefüllte und auf 10°C vortemperierte fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvette (Firma Semadeni) verdünnt. Nach definierten Zeiten wurde die Denaturierung der eventuellen Faltungsintermediate eingeleitet durch Zugabe von 750 µl auf 10°C vortemperierten Denaturierungspuffer (3.6 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7), und die Denaturierungskinetiken im Fluoreszenzspektrometer verfolgt (siehe 2.3.11.2). Bei der ersten Verdünnung betrug die Proteinkonzentration 8 µg/ml, bei der zweiten 5 µg/ml. Die Guanidiniumchloridkonzentration betrug bei den Denaturierungskinetiken ca. 1.3 M.

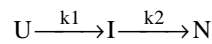
Stopped flow Mischen

Die stopped flow Experimente wurden wie unter 2.3.11.3 und 2.3.15.1 beschrieben durchgeführt.

In der ersten Verdünnung wurden 40 µl der denaturierten Proteinlösung (360 µg/ml BsPel, 1.5 M GdmCl) mit 200 µl Nativpuffer verdünnt (60µg/ml BsPel, 0.26M GdmCl). Nach verschiedenen Zeitpunkten der Renaturierung wurden dann in der zweiten Verdünnung 60 µl des Renaturierungsansatzes mit 300 µl Denaturierungspuffer (1.5 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) verdünnt. Die Proteinendkonzentration bei den Denaturierungskinetiken betrug 10 µg/ml bei einer Guanidiniumchloridkonzentration von 1.3 M.

2.3.15.3 Datenanalyse zur Bestimmung der app. Geschwindigkeitskonstanten bei der Entstehung von I und N

Die aus 2.3.15.2 ermittelten Endwerte und Amplituden aus den Denaturierungskinetiken wurden gegen die Renaturierungszeit aufgetragen. Diese Ergebnisse wurden nach dem vereinfachten Faltungsmodell beschrieben:



Das resultierende Differentialgleichungssystem wurde nach den Gleichungen VII-XIV gelöst und die Ergebnisse der Doppelsprungexperimente global mit Hilfe der im Programm Scientist (Micromath) implementierten Algorithmen beschrieben.

$$N(t) = \left[\frac{1}{k_2 - k_1} \cdot \left(k_1 \cdot e^{-k_2 \cdot t} - k_2 \cdot e^{-k_1 \cdot t} \right) + 1 \right] \cdot U_0 \quad (\text{VII})$$

$$I(t) = \frac{k_1 \cdot U_0}{k_2 - k_1} \cdot \left(k_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} - e^{-k_2 \cdot t} \right) \quad (\text{VIII})$$

$$U(t) = U_0 \cdot e^{-k_1 \cdot t} \quad (\text{IX})$$

$$F(N) = N(t) \cdot f_N \quad (\text{X})$$

$$F(I) = I(t) \cdot f_I \quad (\text{XI})$$

$$F(U) = U_0 \cdot f_U \quad (\text{XII})$$

$$F1(t) = N(t) \cdot f_N + U_0 \cdot f_U + I(t) \cdot f_I \quad (\text{XIII})$$

$$F2(t) = I(t) \cdot f_I \quad (\text{XIV})$$

Dabei ist U : ungefaltetes Protein, I: Intermediat, N: nativ gefaltetes Protein, k_1 : app. Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von I aus U, k_2 : app. Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von N aus I, U_0 : Proteinendkonzentration der Doppelsprungexperimente, $F(N)$: Fluoreszenz des nativen Proteins, $F(I)$: Fluoreszenz des Intermediats, $F(U)$: Fluoreszenz des entfalteten Proteins, f_N : Fluoreszenzfaktor für N, f_I : Fluoreszenzfaktor für I, f_U : Fluoreszenzfaktor für U. t : Verzögerungszeit, $F1(t)$: Der Endwert der Denaturierungskinetiken der Doppelsprungexperimente nach 1.3.15.2 gegen die Renaturierungszeit aufgetragen und $F2(t)$: Die Amplituden der Denaturierungskinetiken der Doppelsprungexperimente nach 1.3.15.2 gegen die Renaturierungszeit aufgetragen.

2.3.15.4 Bestimmung der langsam faltenden Spezies

Die langsame Faltung monomerer Proteine wird häufig durch die geschwindigkeitsbestimmende Isomerisierung von Peptidbindungen verursacht. Besondere Bedeutung kommt dabei der Peptidyl-Prolyl-Bindung zu. Diese kommt im nativen Protein entweder in der *cis*- oder *trans*-Konformation vor.

Im entfalteten Zustand stellt sich jedoch ein Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen ein, wobei der Anteil an *cis*-Bindungen, je nach Ladungsverteilung und Aminosäurezusammensetzung in der unmittelbaren Umgebung der Bindung, 10 – 40 % beträgt (Cheng & Bovey, 1977). Damit ein Protein seine native Struktur wieder einnehmen kann, müssen Peptidyl-Prolyl-Bindungen, die in der jeweils falschen Konformation vorliegen, erst isomerisieren, was die Geschwindigkeit der Faltung stark vermindern kann (Nall, 1994). Pektat Lyase aus *Bacillus subtilis* besitzt 14 Proline, wobei Prolin 281 in der nativen Struktur in der *cis*-Konformation vorliegt.

Um den Verlauf der Bildung der langsam faltenden Spezies zu beobachten, wurde die Rückfaltung nach verschiedenen Entfaltungszeiten initiiert. Dafür wurde natives Protein in Bedingungen (7.2 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) überführt, unter denen es innerhalb der Totzeit des Mischens spektroskopisch nachweislich denaturiert. Nach verschiedenen Denaturierungszeiten wurde durch 50-fache Verdünnung in Nativpuffer (0.3 M GdmCl, 20 mM Natriumphosphat, 2 mM DTE, 0.1 % (v/v) Tween 20, pH 7) die Renaturierung bei 10°C eingeleitet. Bei der Renaturierung lag eine Restkonzentration an GdmCl von 0.4 M vor. Die Denaturierung fand in einem Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 10°C statt, die Proteinkonzentration betrug 0.4 mg/ml BsPel. Die Renaturierung wurde eingeleitet, indem denaturierte Proteinlösung unter Rühren direkt 1:50 in eine fluoreszenzgeeignete Kunststoffküvette (Firma Semadeni) mit Nativpuffer verdünnt wurde. Die Proteinendkonzentration war 8 µg/ml. Die Renaturierungskinetiken wurden wie unter 2.3.11.2. beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung wurden die relative Amplituden der langsamen Renaturierungsphase gegen die Verzögerungszeit aufgetragen und mittels einer mono-exponentiellen Gleichung beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung der rekombinanten Pektat-Lyase von *Bacillus subtilis* (BsPel)

Für die Expression der Pektat-Lyase wurden Bakterien des Stammes BL21(DE3) mit dem Plasmid pT7-BsPel transformiert (siehe 2.1.7). Durch Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Proteinsynthese induziert. Als Expressionstemperatur wurde 30°C gewählt. Eine Analyse per French-Press-Aufschluß und SDS-PAGE konnte nicht verwendet werden, um lösliche, nativ gefaltete Pektat-Lyase im Zellaufschluß zu detektieren, da im gleichen Größenbereich auch ein Gen, das für ein *E. coli* eigenes Protein codiert, stark überexprimiert wird. Durch Westernblot-Analyse konnte aber gezeigt werden, daß der Hauptanteil bei der Expression des BsPel-Gens in der löslichen Fraktion vorliegt (siehe Abb. 3.1).

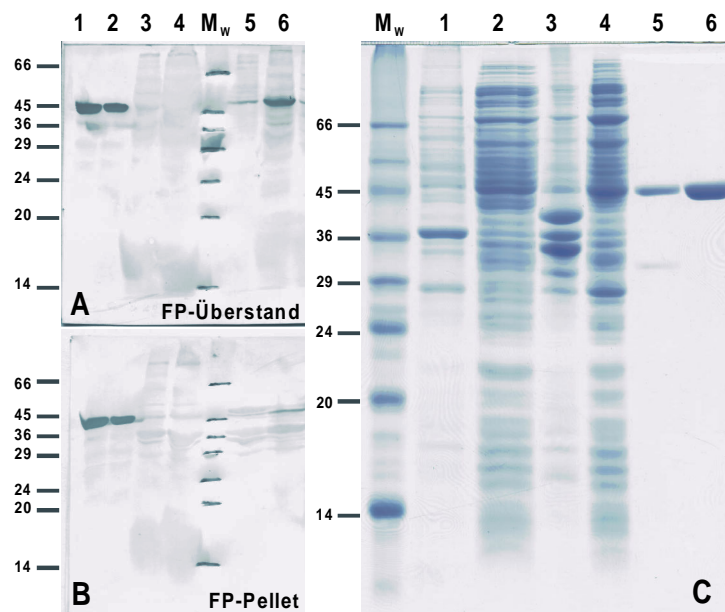


Abb. 3.1:

A/B: Westernblotanalyse von **A:** löslichem Anteil, **B:** unlöslichem Anteil aus *Escherichia coli* Zellextrakt. Spur (1,2): gereinigte BsPel (1) 125 ng, (2) 62.5 ng; Spur (3,4): BL21-DE3 mit pet11a-Test auf Kreuzreaktion des BsPel Antikörpers; Spur (5): BL21-DE3 mit BsPel-Expressionsplasmid ohne Zugabe von IPTG; Spur (6): BL21-DE3 mit BsPel-Expressionsplasmid mit Zugabe von IPTG; Die Gesamtproteinmenge der Spuren (3-6) betrug 3.3 µg; Spur (4): 33 µg; M_w : Molekulargewichtsmarker in kDa

C: Reinigung von BsPel aus *E. coli*. 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. Spur (1): French-Press-Pellet (ohne IPTG); Spur (2): French-Press-Überstand (ohne IPTG); Spur (3): French-Press Pellet (mit IPTG); Spur (4): French-Press Überstand (mit IPTG); Spur (5): Eluat SP-Sepharose; Spur (6): gereinigtes Protein nach Phenylsepharose

Die Reinigung des rekombinant exprimierten Proteins (rek. BsPel) erfolgte in Anlehnung an eine von Nasser für das sekretierte Protein (sek. BsPel) erarbeitete Vorschrift (Nasser *et al.*, 1990). Sie macht sich den hohen isoelektrischen Punkt ($pI = 9.6$) des Proteins zu nutze. BsPel wurde aus der löslichen Fraktion des Zellextraktes durch das Hintereinanderschalten eines Anionen- und Kationenaustauschers bei basischen pH, und anschließender hydrophober Chromatographie aufgereinigt. Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug ca. 50 mg pro 5 l Bakterienkultur. N-terminale Proteinsequenzierung der rekombinanten BsPel ergab, daß das N-terminale Formylmethionin durch die in *E. coli* vorhandene Aminopeptidase M abgespalten wurde.

3.2 Biophysikalische Charakterisierung der rekombinanten BsPel im Vergleich zur sekretierten BsPel

Die sekretierte Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* wurde bereits in einer früheren Arbeit von Henrike Munderloh (Munderloh, 1995) bezüglich ihrer spektroskopischen Eigenschaften, Stabilität und Faltung anfänglich charakterisiert. Deshalb sollte die Authentizität der rekombinanten, in *E. coli* hergestellten, Pektat-Lyase nachgewiesen werden.

SDS-Page Analyse von gereinigter rek. BsPel und sek. BsPel resultierte in beiden Fällen in einer einzelnen homogenen Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kDa. Das genaue Molekulargewicht wurde mittels Massenspektroskopie (MALDI-TOF) bestimmt und ergab für rek. BsPel ein Molekulargewicht von 43407 g/mol und für sek. BsPel 43398 g/mol. Beide Ergebnisse stimmen gut mit der, von der Aminosäuresequenz abgeleiteten, theoretischen Molekulargewicht von 43397 g/mol überein.

Neben dem gleichen Molekulargewicht konnte auch die spezifische Aktivität für beide Proteine als nahezu gleich bestimmt werden (rek. BsPel: 1900 U/mg, sek. BsPel: 1600 U/mg). Der veröffentlichte Wert der spezifischen Aktivität für sek. BsPel von 960 U/mg (Nasser *et al.*, 1990) ist wesentlich niedriger als der hier bestimmte. Gründe dafür können Differenzen in Pufferbedingungen oder ungenau bestimmte Proteinkonzentrationen sein. Ein weiterer denkbarer Grund für die Abweichung wäre auch eine unterschiedliche Qualität des Substrats.

Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie wurden als Methoden verwendet, um etwaige Konformationsunterschiede von rek. und sek. BsPel zu untersuchen. Sowohl Spektren als auch Kinetiken waren für beide Proteine identisch (Abb.: 3.2).

Fluoreszenz von Proteinen reflektiert die Umgebung der aromatischen Aminosäuren und somit die Tertiärstruktur eines Proteins (Schmid, 1997). BsPel enthält 7 Tryptophan-, 25 Tyrosin- und 8 Phenylalanin-Reste. Bei einer Anregung von 280 nm zeigen beide Proteine im nativen Zustand ein Emissionsmaximum bei 334 nm (Abb.: 3.2A). Dieses wird bei Denaturierung nach 353 nm verschoben, dem Emissionsmaximum von lösungsmittel-exponiertem Tryptophan. Die Schulter bei

Ergebnisse

ca. 304 nm ist kennzeichnend für den Verlust an Energietransfer von Tyrosin zu Tryptophanresten. Die Fluoreszenzintensität liegt im nativen Protein ca. 50% höher als im denaturierten Zustand. Dies läßt auf nicht lösungsmittelzugängliche Tryptophane im nativen Zustand schließen. Um einen Vergleich der Stabilität zwischen rek. BsPel und sek. BsPel angeben zu können, wurden Fluoreszenz-De- und Renaturierungskinetiken gemessen (Abb.: 3.2 B). Die Fluoreszenzabnahme während Guanidinium-induzierter Entfaltung bei 10°C kann durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden und ist sehr ähnlich für rek. BsPel und sek. BsPel ($k\{\text{rek. BsPel}\} = 7.6 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ / $k\{\text{sek. BsPel}\} = 8.0 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Rückfaltung von sowohl sek. BsPel und rek. BsPel bei 10°C war bei kleiner Proteinkonzentration möglich und kann mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden. Auch die Rückfaltungsreaktionen waren für rek. BsPel und sek. BsPel sehr ähnlich ($k_1\{\text{rek. BsPel}\} = 8.6 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; $k_2\{\text{rek. BsPel}\} = 1.2 \cdot 10^{-2} \pm 0.03 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ / $k_1\{\text{sek. BsPel}\} = 8.1 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$; $k_2\{\text{sek. BsPel}\} = 1.3 \cdot 10^{-2} \pm 0.03 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Neben Fluoreszenzspektroskopie können lokale Änderungen in der Umgebung der aromatischen Reste auch mit CD-Spektroskopie im nahen UV gemessen werden. Dabei ist das Nah-UV CD-Spektrum ein hochsensitives Kriterium für den Nativzustand und kann als "fingerprint" für das korrekt gefaltete Protein benutzt werden (Schmid, 1997). Die Nah-UV CD-Spektren für rek. BsPel und sek. BsPel waren in ihrer Form und Amplitude sehr ähnlich (Abb.: 3.2 D). Die Maxima lagen dabei bei 256 nm bzw. 293 nm und das Minimum bei 278 nm. Das Nah-UV CD-Spektrum für rek. BsPel hatte als Amplitudenwerte in den Maxima -35 bzw. +30 deg cm² dmol⁻¹, im Vergleich dazu hatte das Spektrum für sek. BsPel sehr ähnliche Werte in den Maxima von -25 bzw. +15 deg cm² dmol⁻¹. Auch die Amplitudenwerte im Minimum des Nah-UV CD-Spektrums waren sehr ähnlich für rek. BsPel (-140 deg cm² dmol⁻¹) und sek. BsPel (-130 deg cm² dmol⁻¹). Die sehr ähnlichen Nah-UV CD-Spektren der beiden Proteine ist ein Anzeichen für gleiche native Struktur von rek. und sek. BsPel.

CD-Spektren im fernen UV werden für die Abschätzung des Sekundärstrukturgehaltes von Proteinen benutzt. BsPel, eine rechtsgängige parallele β -Helix, besitzt 12.5% α -helikalen und 27% β -Faltblatt-Sekundärstrukturgehalt. Die Spektren von sowohl rek. BsPel als auch sek. BsPel haben ein Minimum bei ca. 218 nm, einen Nulldurchgang bei ca. 199 nm und ein Maximum bei ca. 191 nm (Abb.: 3.2 C). Das Minimum bei ca. 218 nm ist typisch für β -Struktur (Woody, 1985). Die Form der Spektren ist vergleichbar mit den Spektren von PelC und PelE, zwei anderen Pektat-Lyasen aus *Erwinia chrysanthemi* mit ähnlicher Struktur (Lietzke *et al.*, 1994; Yoder *et al.*, 1993). Allerdings ist der Nulldurchgang und das Maximum verschoben; PelC und PelE haben ein Maximum bei ca. 197 nm und einen Nulldurchgang bei ca. 208 nm (Sieber *et al.*, 1995). Die Amplitude des Minimums von BsPel ($\sim -11500 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) ist vergleichbar mit den Werten, die für PelC ($\sim -10500 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) und PelE ($\sim -9500 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) veröffentlicht sind; die Amplitude des Maximums von BsPel ($\sim 10500 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) ist ähnlich zum Wert von PelC ($\sim 13000 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$), im Gegensatz dazu hat PelE nur einen Amplitudenwert im Maximum von $\sim 5500 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$. Obwohl BsPel und PelE sowohl strukturell als auch in der Sequenz (34% Sequenzidentität (Jenkins *et al.*, 1998)) sich

sehr ähnlich sind, ist der Unterschied zwischen den Fern-UV CD-Spektren zwischen BsPel und PelE größer als zwischen BsPel und PelC.

Zusammenfassend konnte sowohl spektroskopisch, als auch in der Stabilität, kein Unterschied zwischen rek. BsPel und sek. BsPel gefunden werden. Somit kann davon ausgegangen werden, daß beide Proteine biochemisch identisch sind. Alle weiteren Untersuchungen im Verlauf der Arbeit wurden nur noch an rek. BsPel durchgeführt.

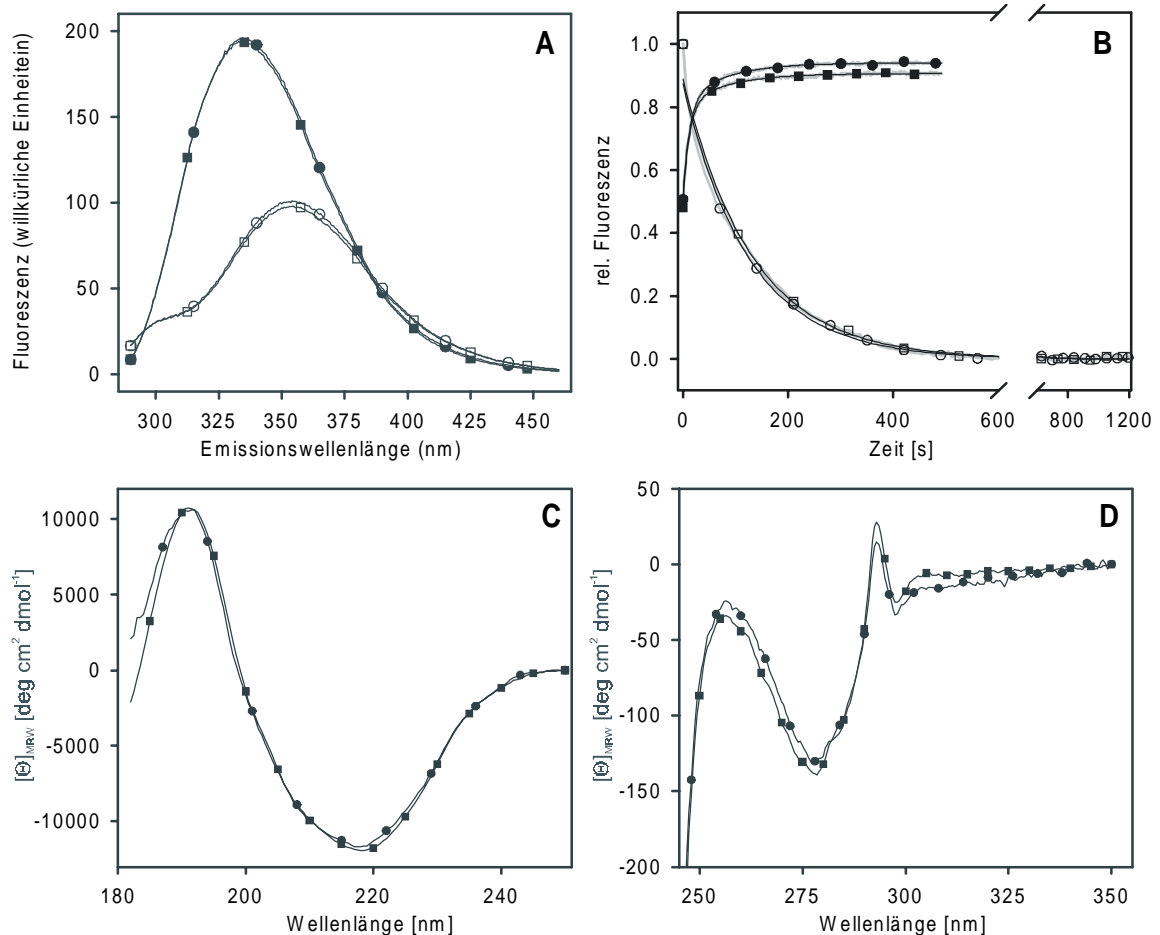


Abb. 3.2:

A: Fluoreszenzemissionsspektren bei 10°C von rek. BsPel (■) und sek. BsPel (●) in 20 mM NaP, pH 7 und in 6M GdmCl, 20 mM NaP, pH 7 (leere Symbole); Proteinkonzentrationen: 5 µg/ml, Anregungswellenlänge: 280 nm, spektrale Bandbreiten für Anregung: 2.1 nm und Emission: 4.2 nm.

B: Fluoreszenzkinetiken von rek. BsPel (■) und sek. BsPel (●) bei 10°C; Denaturierung (leere Symbole) bei 5.3 M GdmCl, 20 mM NaP, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7; Renaturierung (ausgefüllte Symbole) bei 0.1 M GdmCl, 20 mM NaP, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7, Proteinkonzentration: jeweils 5 µg/ml, Anregung: 280 nm, Emission: 328 nm, spektrale Bandbreiten wie unter **A**; die grauen Linien sind die eigentlichen Meßdaten, die Symbole entsprechen einzelnen Meßdaten im Intervall von ca. 1 Minute und sollen nur die einzelnen Bedingungen besser verdeutlichen; die durchgezogenen schwarzen Linien entsprechen einem exponentiellen Fit der Daten.

C: Fern-UV CD-Spektren von rek. BsPel (■) und sek. BsPel (●) bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; Proteinkonzentration: 0.5 mg/ml, Schichtdicke 0.1 bzw. 1 mm, spektrale Bandbreite 1 nm.

D: Nah-UV CD-Spektren von rek. BsPel (■) und sek. BsPel (●) bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; Proteinkonzentration: 0.5 mg/ml, Schichtdicke 4 mm, spektrale Bandbreite 1 nm.

3.3 *In-vitro* Faltung und thermodynamische Stabilität von BsPel

Faltung und Stabilität reiner paralleler β -Helix Strukturen ist bisher wenig untersucht. BsPel, ein monomeres Protein ohne Disulfidbrücken, sollte als Modellprotein dienen, um die *in-vitro*-Faltung von parallelen β -Helices zu untersuchen.

Denaturierung von BsPel erfolgte, falls nicht anders angegeben, in Puffer mit > 4M GdmCl über Nacht bei 4°C. Unter diesen Bedingungen waren mit spektroskopischen Methoden keine Tertiär- oder Sekundärstruktur mehr nachweisbar. Die Rückfaltung wurde durch schnelle 100-fache Verdünnung mit Nativpuffer initiiert. Um die Ablagerung von Faltungsintermediaten an die Gefäßwände während der Renaturierung zu verhindern, wurde die Renaturierung immer in Gegenwart von 0.1% (v/v) Tween20 durchgeführt.

3.3.1 Einfluß der Proteinkonzentration auf die Renaturierungseffizienz

Die Faltungsausbeute *in vitro* und *in vivo* wird vorwiegend von zwei Parametern beeinflusst: von der Proteinkonzentration des denaturierten Proteins und der temperaturabhängigen Stabilität von Faltungsintermediaten. Die Abhängigkeit der Rückfaltungsausbeute von der Proteinkonzentration kann durch eine Konkurrenzreaktion zwischen einer unimolekularen Faltungsreaktion und einer bimolekularen Aggregationsreaktion beschrieben werden (Kiefhaber *et al.*, 1991).

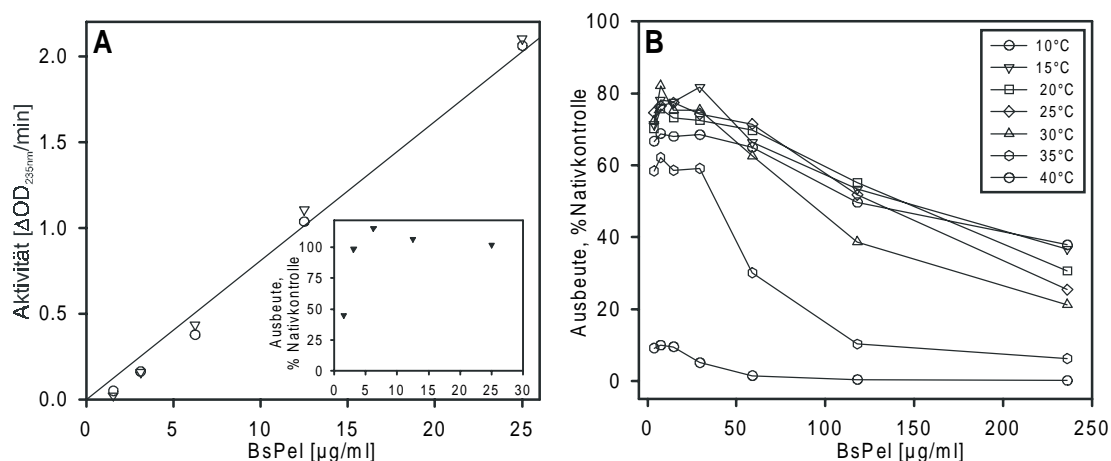


Abb. 3.3:

Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Proteinkonzentration. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Der Puffer war 20 mM NaP, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7. **A:** Auftragung der BsPel-Aktivität gegen die Proteinkonzentration (vor Verdünnung in den Aktivitätstest); (○) Nativkontrolle in 0.1 M GdmCl-Puffer bei 10°C (▽) Renaturierungsansatz in 0.1 M GdmCl-Puffer bei 10°C; sowohl Nativkontrolle als auch Renaturierungsansatz wurden für mindestens 1h bei der jeweiligen Temperatur inkubiert; Insert: % Ausbeute (berechnet zur Nativkontrolle), Achsenbeschriftung der x-Achse des Inserts entspricht der x-Achse unter A; **B:** Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Proteinkonzentration und der Renaturierungstemperatur.

Rückfaltung von Pektat-Lyase zum nativen Zustand war bei Proteinkonzentrationen $\leq 25 \mu\text{g/ml}$ und mittleren Temperaturen ($10\text{-}25^\circ\text{C}$) vollständig möglich. Bei 10-fach höherer Proteinkonzentration renaturierten nur noch weniger als 40% des Proteins, dabei zeigte die Renaturierungsausbeute keine Temperaturabhängigkeit in dem Bereich zwischen 10°C und 30°C (Abb. 3.3). Die in Abbildung 3.3 B sichtbare Abweichung von 100% Renaturierungsausbeute bei kleiner Proteinkonzentration ist wahrscheinlich durch Proteinkonzentrationsfehler verursacht, da die Verdünnung des Proteins durch eine serielle 1:1 Mischung erfolgte.

3.3.2 Guanidinium induzierte Denaturierungs- und Renaturierungsübergänge

Die guanidiniuminduzierte Entfaltung bzw. Rückfaltung von BsPel konnte als Änderung in der enzymatischen Aktivität, in der Fluoreszenzemission oder im Circular dichroismus beobachtet werden (Abb. 3.4). Die Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge von BsPel waren nicht reversibel und wiesen eine, im experimentell zugänglichen Rahmen, apparente Hysterese auf. Auch die thermische Denaturierung von BsPel war aufgrund von Aggregation irreversibel. Der Übergangsmittelpunkt der thermischen Denaturierung lag für BsPel bei ca. 63°C bei einer Aufheizrate von 0.5°C pro Minute (Daten nicht gezeigt).

Die Renaturierung nach Verdünnung aus GdmCl war nach einem Tag abgeschlossen und der Mittelpunkt des Renaturierungsübergangs lag bei ca. 1 M GdmCl, wobei die Änderung in der Fluoreszenzemission mit der in der Aktivität übereinstimmte (Abb. 3.4 A). Die Renaturierungsübergänge waren im Bereich von $5 - 20 \mu\text{g/ml}$ unabhängig von der Proteinkonzentration (Abb. 3.4 B). Mittels Circular dichroismus konnten keine Rückfaltungsübergänge von BsPel gemessen werden, da im reversiblen Bereich der BsPel Rückfaltung ($\leq 25 \text{ mg/ml}$) das Signal-zu-Rausch Verhältnis zu klein war.

Die guanidiniuminduzierte Denaturierung von BsPel war bei mittleren GdmCl-Konzentrationen extrem langsam, und eine Gleichgewichtseinstellung war nach Wochen noch nicht erfolgt. Der Mittelpunkt des Denaturierungsübergangs lag nach 1 Tag bei ca. 3 M GdmCl, nach 1 Woche bei ca. 2.5 M GdmCl und nach ca. 40 Tagen bei 1.5 M GdmCl. Der Verlauf des Entfaltungsübergangs war identisch bei Messungen in der Fluoreszenzemission oder im Circular dichroismus (Abb. 3.4).

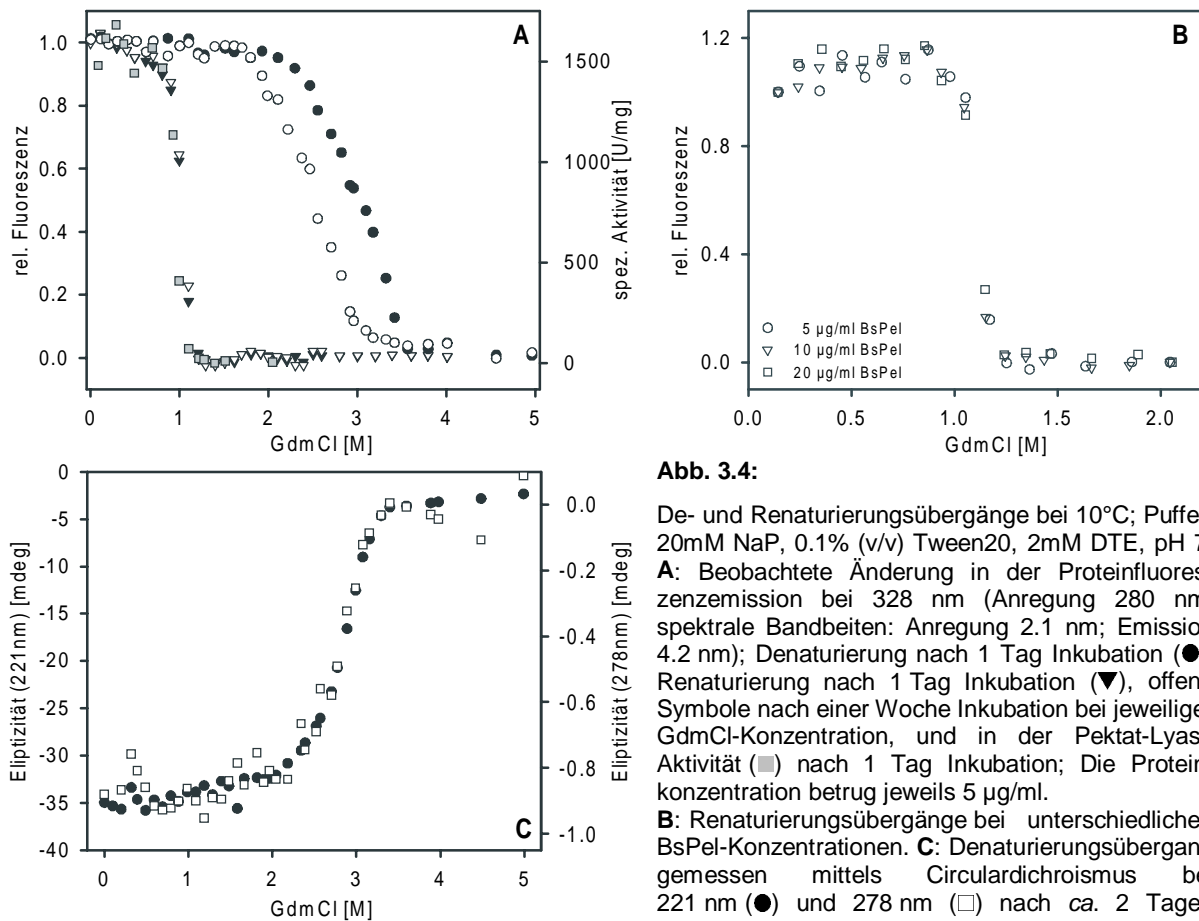


Abb. 3.4:

De- und Renaturierungsübergänge bei 10°C; Puffer: 20mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2mM DTE, pH 7; **A:** Beobachtete Änderung in der Proteinfluoreszenzemission bei 328 nm (Anregung 280 nm, spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm; Emission 4.2 nm); Denaturierung nach 1 Tag Inkubation (●), Renaturierung nach 1 Tag Inkubation (▼), offene Symbole nach einer Woche Inkubation bei jeweiliger GdmCl-Konzentration, und in der Pektat-Lyase Aktivität (■) nach 1 Tag Inkubation; Die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 µg/ml. **B:** Renaturierungsübergänge bei unterschiedlichen BsPel-Konzentrationen. **C:** Denaturierungsübergang gemessen mittels Circular dichroismus bei 221 nm (●) und 278 nm (□) nach ca. 2 Tagen Inkubation bei jeweiliger GdmCl-Konzentration. (Proteinkonzentration: 80 µg/ml; spektrale Bandbreite: 1 nm, Schichtdicke 4 mm bzw. 1 cm)

Ein Grund für die beobachtete Hysterese könnte eine zur Renaturierung konkurrierende Fehlfaltung bzw. Aggregation sein (Jaenicke & Rudolph, 1986). Deshalb wurde der guanidiniuminduzierte Faltungsübergang bei mehreren Proteinkonzentrationen (5, 10, 20 µg/ml BsPel) gemessen. Dabei konnte aber keine Verschiebung des Mittelpunktes im Rückfaltungsübergang in diesem Proteinkonzentrationsbereich beobachtet werden (Abb. 3.4 B). Auch Messungen in der Fluoreszenzemission und des Nah-UV-Circulardichroismus konnten das Vorhandensein solch einer "kinetischen Falle" nicht bestätigen. Bei Renaturierungsproben von BsPel in der Nachübergangsbasislinie des Rückfaltungsübergangs (1.6 M GdmCl) konnte keine Verschiebung des Maximums in der Fluoreszenzemission beobachtet werden (Abb. 3.5 A). Das Maximum lag auch nach mehreren Tagen Inkubation bei 353 nm, dem Emissionsmaximum von lösungsmittel-exponiertem Tryptophan. Der Verlust an Fluoreszenzintensität ist wahrscheinlich auf Adsorption von Protein an die Gefäßwände zurückzuführen. Renaturierungskinetiken nach 0.1 M GdmCl- bzw. 0.4 M GdmCl-Restkonzentration, gemessen als Änderung der Fluoreszenzemission bzw. des Fern-UV CD-Signals zeigten zudem keine Änderung in den apparenten Geschwindigkeitskonstanten, bzw. Renaturierungsamplituden egal ob die Renaturierung initiiert wurde durch Verdünnung aus dem vollständig denaturierten Zustand (in 6 M GdmCl) oder durch Verdünnung von "Renaturierungsansätzen" in 1.2 - 1.6 M GdmCl-Puffer (für

mindestens 1 Tag bei 10°C inkubiert) nach 0.1 M bzw. 0.4 M GdmCl-Puffer. (Daten nicht gezeigt). Auch Circular dichroismusspektren im Fern-UV konnten keinen Unterschied zwischen vollständig denaturiertem Protein und Renaturierungsansätzen in 1.2 - 1.5 M GdmCl-Puffer aufzeigen, bei 1.1 M Guanidinium ist Renaturierung noch teilweise möglich und das Spektrum liegt erwartungsgemäß zwischen nativem und denaturiertem Protein (Abb. 3.5 B).

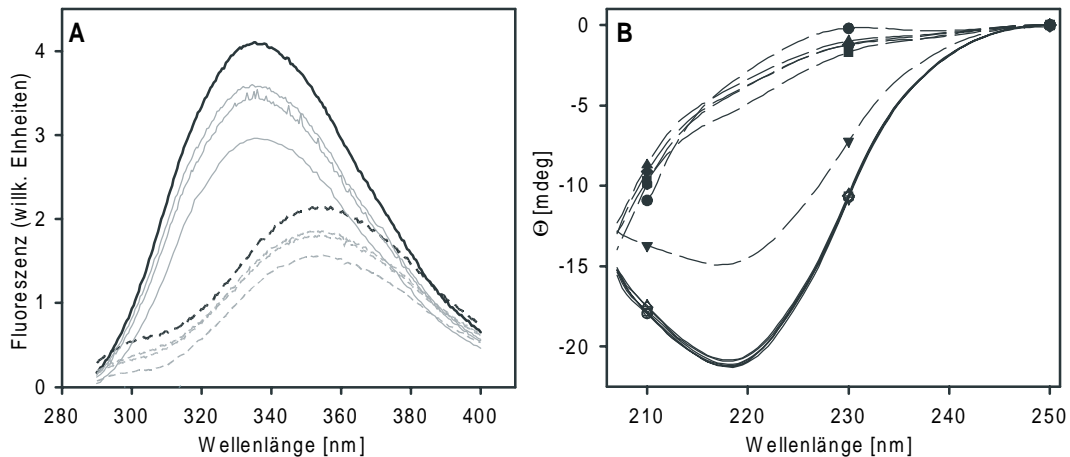


Abb. 3.5:

Fluoreszenz- bzw Fern-UV-CD-Spektren im Bereich der Nachübergangsbasislinie des Renaturierungsübergangs und der Vorübergangsbasislinie des Denaturierungsübergangs bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7. **A:** Fluoreszenzemissionsspektren von BsPel bei einer Konzentration von 5 µg/ml (Anregung: 280 nm, spektrale Bandbreiten für Anregung 2.1 nm; für Emission 4.2 nm); graue durchgezogene Linie: natives Protein verdünnt (1:100) in 1.6 M GdmCl-Puffer, gemessen nach 2 h, 1 Tag und 6 Tagen Inkubation bei 10°C ; graue gestrichelte Linie: vollständig denaturiertes Protein verdünnt (1:100) in 1.6 M GdmCl-Puffer, gemessen nach 2 h, 1 Tag und 6 Tagen Inkubation , Schwarze Linien: Nativkontrolle in 0 M GdmCl-Puffer und Denaturierungskontrolle in 4 M GdmCl-Puffer. **B:** Fern-UV-CD-Spektren von BsPel bei einer Konzentration von 200 µg/ml (spektrale Bandbreite 1 nm, Schichtdicke: 1 mm); durchgezogene Linie: natives Protein verdünnt (1:25) in 0 M GdmCl-Puffer (○), 1.1 M GdmCl (▽), 1.2 M GdmCl (□), 1.3 M GdmCl (◇), 1.4 M GdmCl (△) und 1.5 M GdmCl (◊); gestrichelte Linie: vollständig denaturiertes Protein verdünnt (1:25) in 4 M GdmCl-Puffer (●), 1.1 M GdmCl (▼), 1.2 M GdmCl (■), 1.3 M GdmCl (◆), 1.4 M GdmCl (▲) und 1.5 M GdmCl (◆); alle Proben wurden vor der Messung für 1 Tag bei 10°C und der jeweiligen GdmCl-Konzentration inkubiert

3.3.3 Entfaltungs- und Faltungskinetiken von BsPel

Erste kinetische Untersuchungen an BsPel wurden schon in der Arbeit von Henrike Munderloh (Munderloh, 1995) beschrieben. In dieser Arbeit wurden weitere kinetische Experimente unter Messung der Fluoreszenzemission und des Circular dichroismus durchgeführt, um mögliche Faltungsintermediate näher zu charakterisieren.

Denaturierung:

Denaturierung von BsPel wurde bei verschiedenen GdmCl-Konzentrationen (3 – 6 M) in Nativpuffer bei 10°C durchgeführt. Dabei erfolgte die globale Entfaltung von BsPel im Bereich von Minuten bis

Ergebnisse

Stunden. Die Denaturierung konnte mittels einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Die daraus ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb. 3.6 C dargestellt. Die Amplituden der Entfaltungskinetiken entsprachen dabei der erwarteten Amplitude zwischen Nativ- und Denaturierungssignal. Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung war annähernd gleich (siehe Abb. 3.6 C) für Messungen in der Änderung der Fluoreszenzemission und des CD-Signals im fernen UV, und zeigte eine lineare Abhängigkeit von der Denaturierungsmittelkonzentration. Die Ergebnisse aus den Denaturierungskinetiken weisen darauf hin, daß es unter diesen Bedingungen zu keiner Anhäufung von einem teilweise gefalteten Zustand kommt und daß der Verlust an Tertiärstruktur simultan mit dem Verlust an Sekundärstruktur erfolgt.

Renaturierung:

Rückfaltung von BsPel vom vollständig entfalteten Zustand (6 M GdmCl) ist sehr komplex und Rückfaltungskinetiken müssen mit mindestens zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden (Abb. 3.6 A/B). Dabei entsteht in einem ersten Schritt ($\tau = 12$ s, 0.1 M GdmCl) ca. 80% des Fluoreszenzsignals bzw. Fern-UV CD-Signals und in einem zweiten Schritt ($\tau = 110$ s, 0.1 M GdmCl) die restlichen 20% Amplitude (Abb. 3.6 D). Die Rückfaltungskinetiken sind im Bereich 5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ BsPel nicht konzentrationsabhängig und erfolgen mit 100% Ausbeute.

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die Renaturierung sind gleich für Messungen in der Änderung der Fluoreszenzemission und des Fern-UV CD-Signals. Dies deutet darauf hin, daß die Entstehung der Sekundärstruktur gleichzeitig mit der Tertiärstruktur eintritt. Abb. 3.6 C zeigt die Guanidiniumabhängigkeit der apparenten Rückfaltungskonstanten. Diese weist sowohl bei der schnellen, als auch bei der langsamen Faltungsrates bei niedrigerer GdmCl-Konzentration (< 0.1 M) einen Knick auf. Die Abweichung der Linearität der k_{app} in der langsamen Renaturierungsphase läßt sich dadurch erklären, dass teilweise gefaltete Strukturen (Intermediate) während der Rückfaltung akkumulieren (Creighton, 1994; Ikai & Tanford, 1973; Tanford *et al.*, 1973). Bei mittleren Guanidiniumkonzentrationen (> 0.9 M,) kommt es zu einer drastischen Verlangsamung der Rückfaltung. Bei diesen Guanidiniumkonzentrationen kommt es möglicherweise zu einer Destabilisierung eines Faltungsintermediates. Rückfaltungskinetiken in diesem Bereich können monoexponentiell beschrieben werden, da die Amplitude der schnellen Renaturierungsphase sich gegen 0 annähert (Abb. 3.6 C/D). Vergleiche der Endwerte aus Fluoreszenzrenaturierungskinetiken entsprachen dabei proportional dem Renaturierungsübergang (Daten nicht gezeigt).

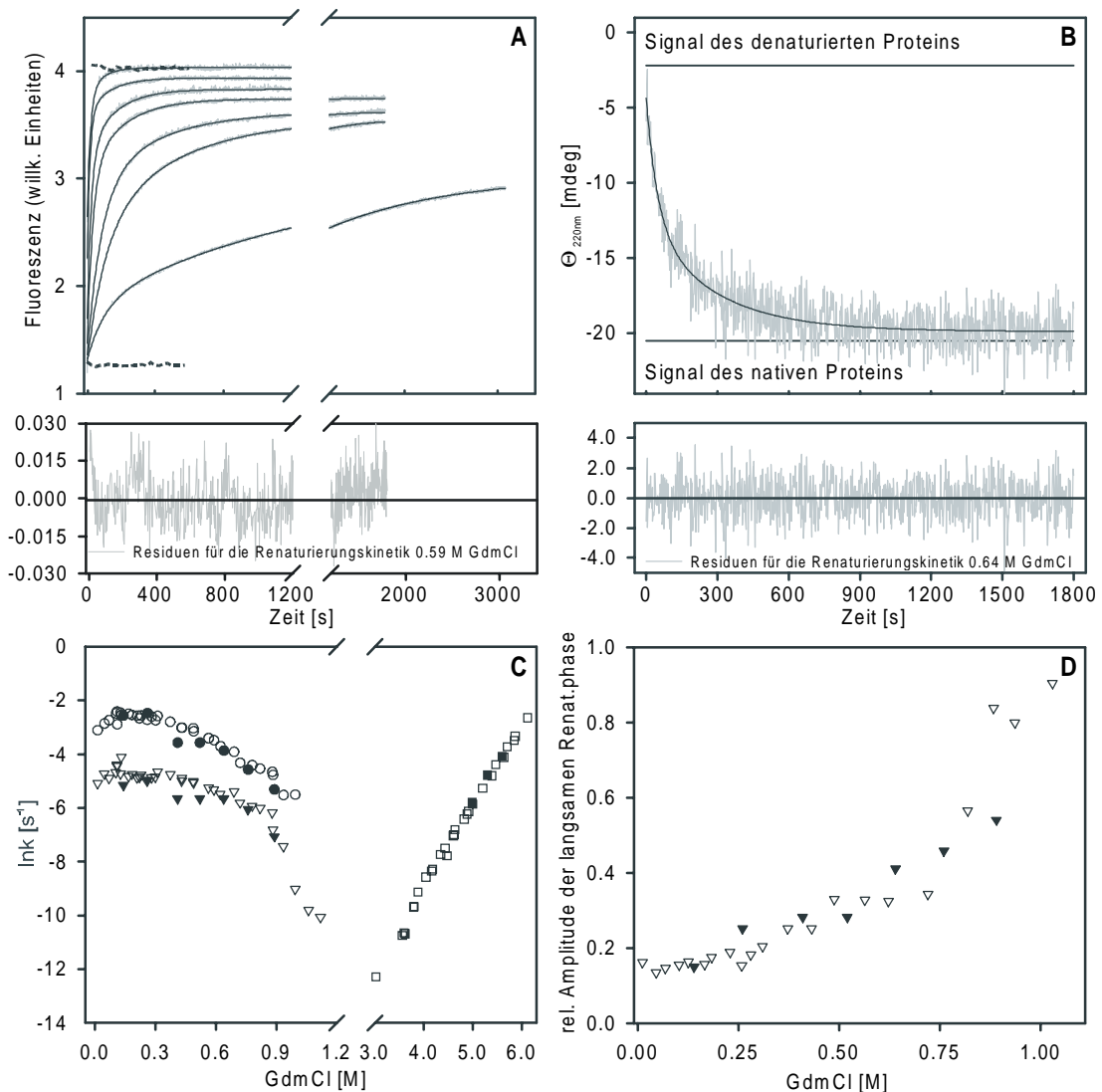


Abb. 3.6:

Faltungskinetiken von BsPel: vollständig entfaltete BsPel (in 4 M GdmCl-Puffer) wurde verdünnt in Nativpuffer (20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7) bei 10°C. **A:** Rückfaltungskinetiken von BsPel (5 µg/ml) bei verschiedenen GdmCl-Restkonzentrationen (0.11 M, 0.3 M, 0.49 M, 0.59 M, 0.78 M, 0.88 M und 0.98 M GdmCl). Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm in fluoreszenzgeeigneten Plastikküvetten gemessen (Anregungswellenlänge: 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm und Emission 4.2 nm); gestrichelte Linien repräsentieren die Nativkontrolle (native BsPel in Nativpuffer verdünnt) und die Denaturierungskontrolle (vollständig entfaltete BsPel verdünnt in 4 M GdmCl-Puffer). Die Linien stellen eine Regression mit einer biexponentiellen Funktion der Faltungskinetiken dar; Darunter: Residuen der Regression für die Rückfaltungskinetik bei 0.59 M GdmCl Restkonzentration. **B:** Rückfaltungskinetiken von BsPel (20 µg/ml) bei einer GdmCl-Restkonzentrationen von 0.64 M; Die Änderung des Circular dichroismus wurde bei 220 nm in Quarzglas Küvetten gemessen (spektrale Bandbreite: 1 nm, Schichtdicke: 1 cm); Die Linie repräsentiert die Regression mit einer biexponentiellen Funktion ($k_1: 2.087 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $k_2: 3.552 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Darunter: Residuen der Regression für die Rückfaltungskinetik bei 0.64 M GdmCl-Restkonzentration; **C:** Vergleich der aus Fluoreszenz- (leere Symbole) und Circular dichroismus- (gefüllte Symbole) Messungen resultierende apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (\square) und Rückfaltung (k_1 : \circ ; k_2 : ∇), **D:** Vergleich der relativen Amplitude der langsamen Rückfaltungskinetiken aus Fluoreszenz- (∇) und Circular dichroismus- (\blacktriangledown) Messungen.

Ergebnisse

Mit konventionellen spektroskopischen Methoden ist die Bestimmung der maximal erwarteten Signaländerung zwischen nativem und denaturierten Zustand sehr schwer abzuschätzen, da das Signal des ungefalteten Proteins bei hoher GdmCl-Konzentrationen extrapoliert werden muß zu Rückfaltungsbedingungen. Somit können schnelle Reaktionen mit kleinen Amplituden, die während der Totzeit des Mischens stattfinden, nicht detektiert werden. Um schnelle Faltungsreaktionen zu untersuchen, wurden deshalb stopped-flow-Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die erste Phase der Renaturierung aus zwei schnellen Renaturierungsphasen besteht ($\tau_1 = 7$ s, $\tau_2 = 20$ s), das Amplitudenverhältnis dieser beiden Phasen zueinander war 2/3 zu 1/3 (Abb. 3.7). Eine Totzeitamplitude konnte jedoch auch bei dieser Versuchsanordnung, möglicherweise wegen der zu ungenauen Endsignale nicht bestimmt werden. Die langsame Renaturierungsphase konnte durch die stopped-flow-Messungen nicht aufgelöst werden, da das Meßsignal bei den Kinetiken unter stopped-flow-Bedingungen ab einer Meßzeit von 200 s abnahm, da es sich bei der stopped-flow-Meßzelle um ein offenes System handelt.

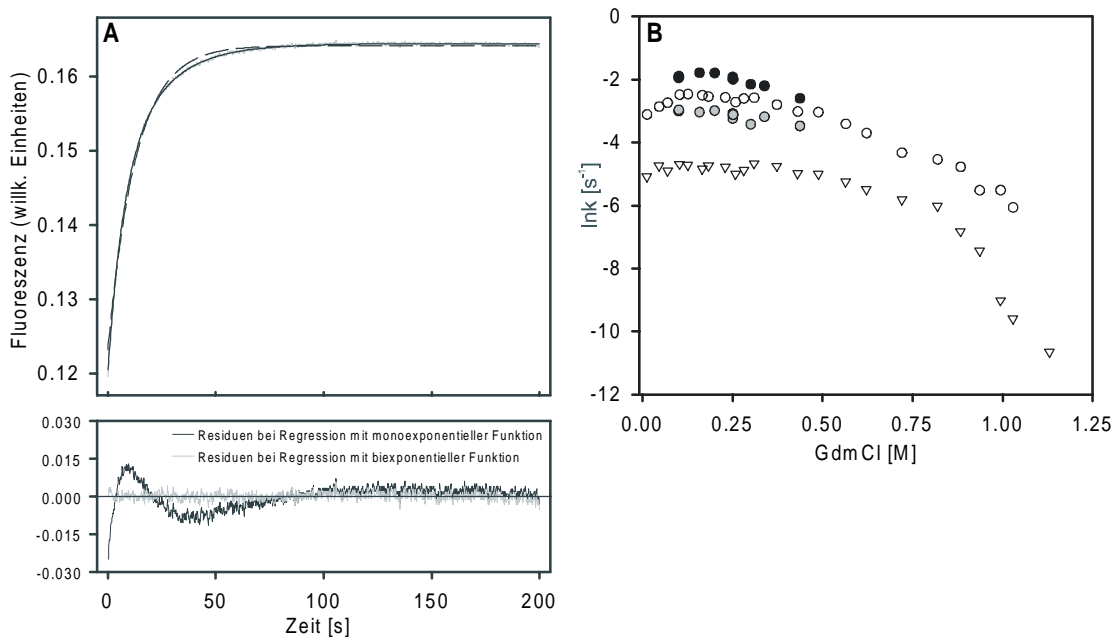


Abb. 3.7:

A: Stopped-flow-Messung der ersten 200 Sekunden einer Rückfaltungskinetik von 10 $\mu\text{g/ml}$ BsPel in 0.1 M GdmCl, 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH7 bei 10°C; Messung der Änderung in der Tryptophanfluoreszenzemission > 320 nm nach Anregung bei 280 nm (spektrale Bandbreiten: 4 nm, für Anregung und Emission), (- - -) Regression nach monoexponentieller Funktion, (—) Regression nach biexponentieller Funktion; Darunter: zu den einzelnen Regressionen dazugehörige Residuen; **B:** Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung bei manueller Mischmethode (offene Symbole, siehe Abb. 3.6) und stopped-flow-Messungen (schwarze und graue Kreise).

Reaktivierung:

Es sollte untersucht werden, welche der spektroskopisch sichtbaren Renaturierungsphasen zu enzymatisch aktivem Protein führt. Da Reaktivierung im Aktivitätstest nicht möglich war (Munderloh, 1995), wurden aus einem Renaturierungsansatz in Nativpuffer bei 10°C nach verschiedenen Zeiten der Renaturierung Aliquots entnommen und direkt in den Aktivitätstest pipettiert. Abbildung 3.8 A zeigt exemplarisch eine Reaktivierungskinetik bei 0.9 M GdmCl-Restkonzentration. Diese kann mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden und die apparente Geschwindigkeitskonstante entsprach dabei der langsamen Renaturierungsphase, die in Fluoreszenz- bzw. Fern-UV Circular dichroismmessungen beobachtet wurde (Abb. 3.8 B). Durch die Streuung der Daten konnte eine mögliche Totzeitamplitude nicht bestimmt werden.

Genauere Aussagen eines möglichen parallelen Faltungsweges oder möglicher *On-Pathway* Intermediate wurden durch Doppelmischexperimente (siehe 3.3.8 bzw. 3.3.9) untersucht.

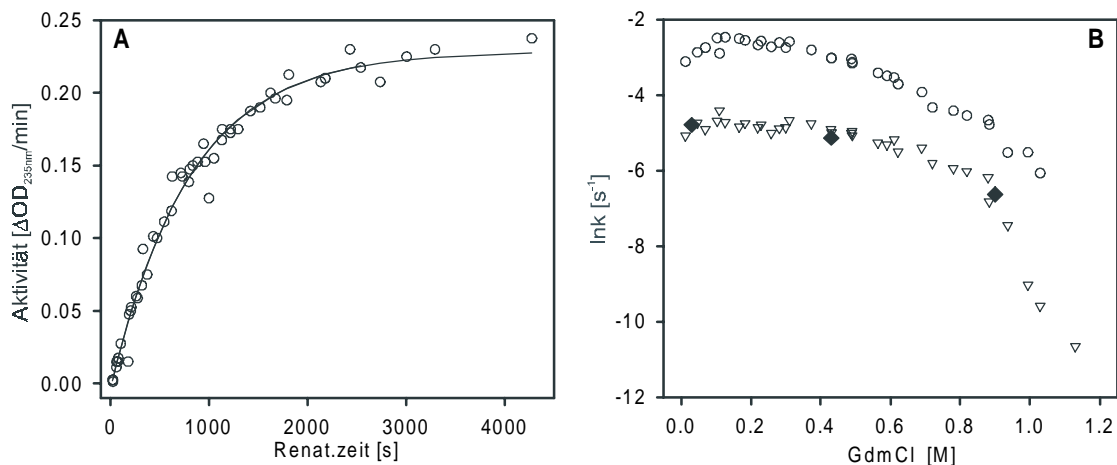


Abb. 3.8: Reaktivierung von BsPel bei 10°C in 20mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7

A: Reaktivierungskinetik von 5 $\mu g/ml$ BsPel bei 10°C und 0.9 M GdmCl-Restkonzentration; Nach bestimmten Zeiten der Renaturierung wurden Aliquots direkt in den Aktivitätstest pipettiert und die Änderung in der Absorption bei 235 nm pro Minute bestimmt. **B:** Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung resultierend aus Fluoreszenzmessungen (k_1 : \circ ; k_2 : ∇ ; siehe Abb. 3.6 A) und von Reaktivierungsexperimenten (\blacklozenge).

Vergleich der Denaturierungskinetiken mit Denaturierungsübergängen:

Da Denaturierungskinetiken nur bei relativ hohen GdmCl-Konzentrationen (3 – 6 M) gemessen werden konnten, sollten Relaxationszeiten der Denaturierung bei kleineren GdmCl-Konzentrationen aus Denaturierungsübergängen abgeschätzt werden, um auszuschließen, daß bei kleineren GdmCl-Konzentrationen ein anderer geschwindigkeitsbestimmender Schritt (z.B. Kopplung der Entfaltung mit Prolinisomerisierung (Kiefhaber, 1995) vorliegt, der zu einer Verlangsamung der Denaturierung führen würde und somit zu der in den Übergängen beobachteten starken Hysterese. Da Denaturierungs-

Ergebnisse

übergänge während der ganzen Beobachtungszeit nicht im Gleichgewicht waren, kann man die Änderung der Fluoreszenz im Übergangsbereich des Denaturierungsübergangs bei einer bestimmten GdmCl-Konzentration gegen die Inkubationszeit als Denaturierungskinetik auffassen und apparente Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bestimmen. Abb. 3.9 zeigt einen Vergleich der so bestimmten k_{app} mit den k_{app} aus Fluoreszenzkinetiken. Dabei zeigt sich eine lineare Abhängigkeit im gesamten Meßfenster von allen k_{app} der Denaturierung von der GdmCl-Konzentration. Eine hypothetische Einstellung des Gleichgewichts würde nach ca. >100 Tagen erfolgen, wenn man die Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierungskinetiken linear zum Übergangsmittelpunkt extrapoliert.

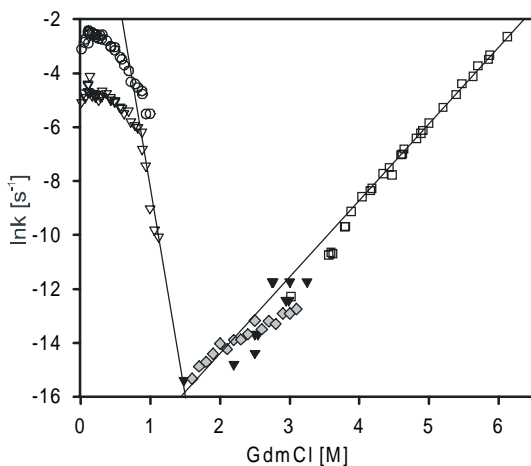


Abb. 3.9:

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten aus Fluoreszenzmessungen (offene Symbole, siehe Abb. 3.6) und der Geschwindigkeitskonstanten ermittelt aus Denaturierungsübergängen (siehe 3.3.2); (▼) Inkubationszeit des Denaturierungsübergangs (= $t_{1/2}$) bei der GdmCl-Konzentration des Übergangsmittelpunktes; (◆) alle Denaturierungsübergänge wurden normiert zwischen 1 (vollständig gefaltet) und 0 (vollständig entfaltet), bei einer bestimmten GdmCl-Konzentration wurden die Fluoreszenzwerte gegen die jeweilige Inkubationszeit aufgetragen und die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung mittels einer Regression nach einer monoexponentiellen Funktion ermittelt; Die Linien stellen eine Extrapolation der Geschwindigkeitskonstanten der Re- und Denaturierung in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration dar und ergeben eine hypothetische Gleichgewichtseinstellung von > 100 Tagen bei 10°C.

3.3.4 Einfluß der Temperatur

Um den Einfluß der Temperatur auf mögliche Faltungsintermediate zu untersuchen, wurden Fluoreszenz-Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken bei 25°C gemessen. Die Entfaltung war bei 5 M GdmCl um einen Faktor von 10 beschleunigt. Die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung zeigte auch bei 25°C eine lineare Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration. Die Renaturierung war mindestens biphasisch und bei niederen GdmCl-Konzentrationen ungefähr gleich schnell wie bei 10°C. Bei der Auftragung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und langsamen Renaturierungsphase gegen die GdmCl-Konzentration (Abb. 3.10) lässt sich bei kleiner GdmCl-Konzentration (<0.3 M) ein ausgeprägter "Knick" in beiden Phasen beobachten, der auf transient akkumulierende Intermediate in der Rückfaltung schließen lässt. Die GdmCl Abhängigkeit von beiden Rückfaltungsphasen ist bei mittleren GdmCl-Konzentrationen (0.3 M – 0.7 M) stärker als bei 10°C. Ab einer GdmCl-Konzentration von 0.7 M (Übergangsmittelpunkt des Renaturierungsübergangs bei 25°C) ist die Rückfaltung drastisch verlangsamt und die Fluoreszenzkinetiken lassen sich durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben. Falls diese drastische Verlangsamung der Renaturierung durch die Destabilisierung eines Faltungsintermediates auf dem Renaturierungswegs

verursacht wird, könnte man dieses Intermediat als temperatursensitiv bezeichnen, da die Destabilisierung bei 25°C bei kleinerer GdmCl-Konzentration als bei 10°C verläuft.

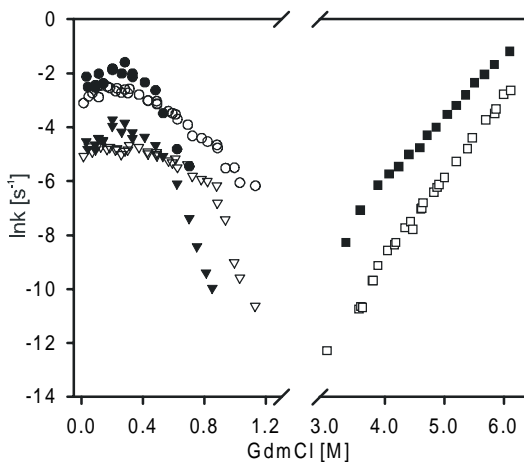


Abb. 3.10:

GdmCl Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten in der BsPel Entfaltung (\square) bzw. Rückfaltung (k_1 : \circ ; k_2 : ∇) bei 10°C (leere Symbole) und 25°C (gefüllte Symbole) und einer Proteinkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$. Datenpunkte resultieren aus Fluoreszenzkinetikmessungen (siehe Abb. 3.6 A)

3.3.5 Einfluß von Glycerin

Bevorzugte Interaktionen zwischen Proteinen und gemischten Lösungsmittelsystemen führt entweder zur Hydratation oder Solvatation eines Makromoleküls (Lee *et al.*, 1979; Timasheff, 1993). Organische Lösungsmittel, deren Dielektrizitätskonstante und Polarisierbarkeit von der von Wasser abweicht, können die Dissoziationskonstante von ionisierbaren Seitenketten, und somit als Konsequenz auch die Stabilität eines Makromoleküls, verändern. Andererseits werden nicht alle Teile eines Proteins zu gleichen Teilen stabilisiert, was dazu führen kann, daß verschiedene Populationen von Moleküle auf kinetisch unterscheidbare Wege rückfalten können (Radford *et al.*, 1992; Teale & Benjamin, 1976).

Der stabilisierende Effekt von Glycerin auf Faltungsintermediate wurde schon in mehreren Systemen gezeigt (Gorovits *et al.*, 1998; Jaspard, 2000; Schumann *et al.*, 1993). In dieser Arbeit sollte der Einfluß von Glycerin auf die Rückfaltungskinetik von BsPel untersucht werden. Um auszuschließen das der Zusatz von Glycerin im Lösungsmittel sich auf die Struktur von BsPel im nativen oder denaturierten Zustand auswirkt, wurden als erstes Fern-UV und Nah-UV CD-Spektren von BsPel mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Glycerin aufgenommen (Abb. 3.11). Es ließen sich keine Unterschiede in den Spektren von nativer BsPel in Puffer $\pm 10\%$ (v/v) Glycerin feststellen. Somit kann davon ausgegangen werden, daß der native Zustand von BsPel in beiden Bedingungen identisch ist. Ein Vergleich von Spektren in 6M GdmCl-Puffer mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Glycerin zeigte, daß bei dieser GdmCl-Konzentration BsPel unter beiden Bedingungen vollständig denaturiert vorliegt.

Die Auswirkung von verschiedenen Konzentrationen an Glycerin auf die Rückfaltung wurde mittels Reaktivierungsexperimenten untersucht. Dazu wurde vollständig entfaltete BsPel in einem 0.9 M GdmCl-Puffer und verschiedenen Glycerinkonzentrationen (0 – 60% (v/v) Glycerin) bei 10°C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten die Aktivität bestimmt. Abbildung 3.12 A zeigt exemplarisch die Reaktivierungskinetiken bei 0, 10 und 20 % (v/v) Glycerin. Die unterschiedlichen Endwerte der Reaktionen sind darauf zurückzuführen, daß die Renaturierung bei 0.9 M GdmCl-Konzentration ohne

Ergebnisse

Glycerinzusatz bei 10°C im Übergangsbereich des Renaturierungsübergangs liegt. Die Reaktivierungskinetiken konnten mit einer Exponentialfunktion beschrieben werden. Die Abbildung 3.12 B zeigt die Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Reaktivierung von der Glycerinkonzentration. Die Reaktivierung ist bei Glycerinkonzentrationen zwischen 15 und 40 % (v/v) um einen Faktor von ca. 4 - 5 beschleunigt gegenüber der Reaktivierung ohne Glycerin. Bei höheren Glycerinkonzentrationen kommt es wahrscheinlich wegen der hohen Viskosität der Lösungen zu einer Verlangsamung der Reaktion.

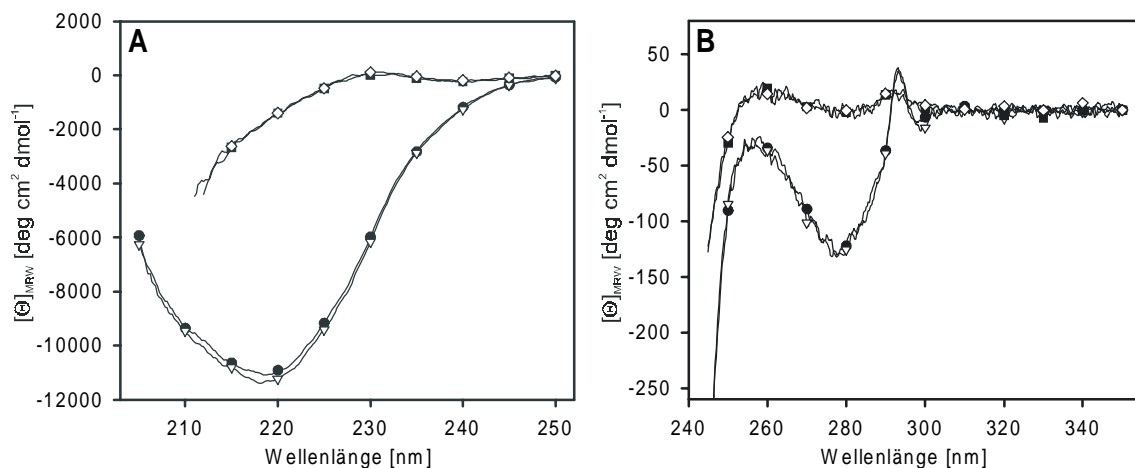


Abb. 3.11: UV-CD-Spektren von BsPel bei 10°C mit und ohne Zusatz von 10% (v/v) Glycerin

A: Fern-UV CD-Spektren von nativer BsPel: (●) in 20 mM NaP, pH 7; (▽) in 20 mM NaP, 10% (v/v) Glycerin, pH 7 und denaturierter BsPel: (■) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, pH 7; (◇) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, 10% (v/v) Glycerin, pH 7; $c = 0.5$ mg/ml, $d = 1$ mm, spektrale Bandbreite: 1 nm; **B:** Nah-UV CD-Spektren von nativer BsPel: (●) in 20 mM NaP, pH 7; (▽) in 20 mM NaP, 10% (v/v) Glycerin, pH 7 und denaturierter BsPel: (■) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, pH 7; (◇) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, 10% (v/v) Glycerin, pH 7; $c = 0.5$ mg/ml, $d = 4$ mm, spektrale Bandbreite: 1 nm.

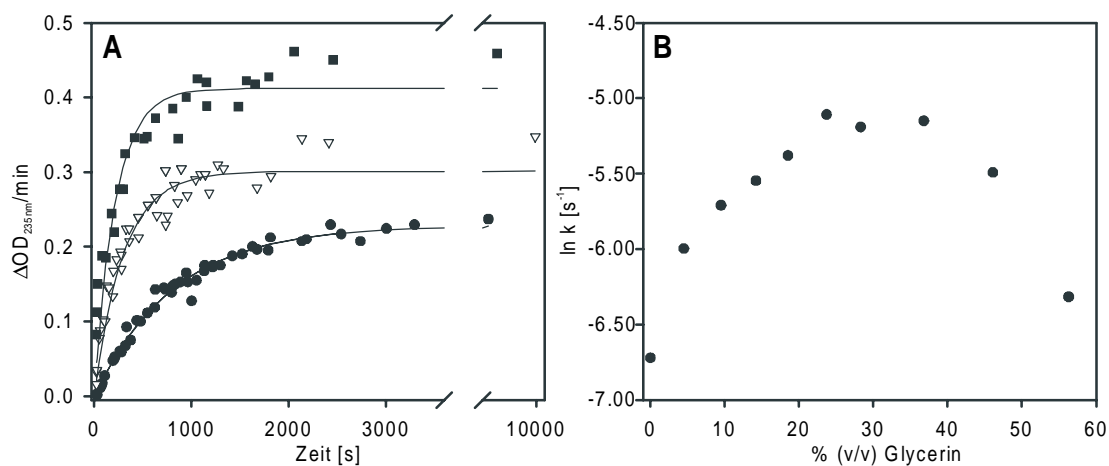


Abb. 3.12: Reaktivierung von BsPel bei 10°C in 20mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7 und verschiedenen Glycerinkonzentrationen. **A:** Vergleich der Reaktivierungskinetiken von 5 µg/ml BsPel bei 0.9 M GdmCl-Restkonzentration und 0 % (v/v) Glycerin (●), 10 % (v/v) Glycerin (▽) und 20 % (v/v) Glycerin (■); Nach bestimmten Zeiten der Renaturierung wurden Aliquots direkt in den Aktivitätstest pipettiert und die Änderung in der Absorption bei 235 nm pro Minute bestimmt; (—) Regression nach einer monexponentiellen Funktion; **B:** Glycerinabhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktivierung resultierend aus Reaktivierungsexperimenten bei 0.9 M GdmCl.

Der mögliche unterschiedliche Einfluß von Glycerin auf Faltungsintermediate und den nativen Zustand wurde anhand von Fluoreszenzmessungen untersucht. Alle Messungen wurden bei einer Glycerinkonzentration von 20% (v/v) durchgeführt, da bei dieser Konzentration ein positiver Effekt der Reaktivierung bei 0.9 M GdmCl messbar war, aber die Viskositätszunahme noch Mischungen bei Kinetikmessungen mit konventioneller Magnetrührtechnik zuließ.

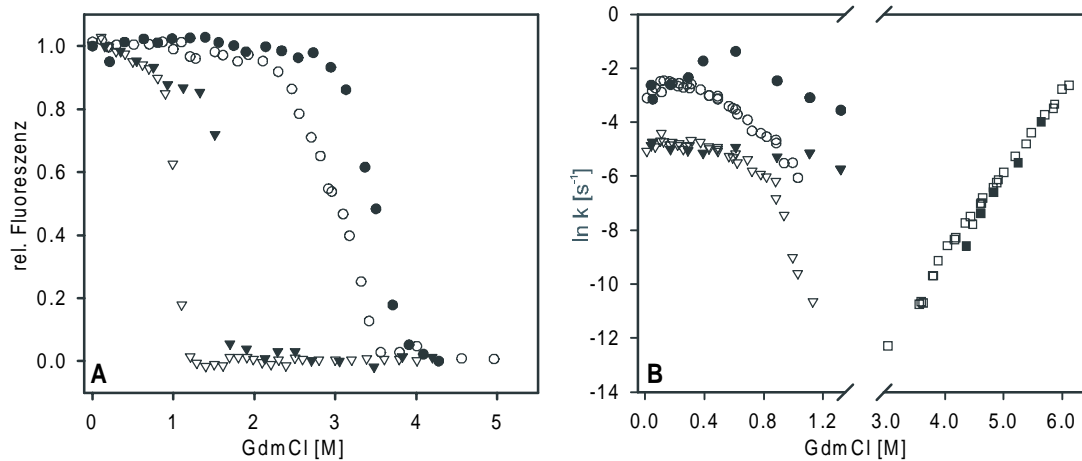


Abb. 3.13:

A: Guanidiniuminduzierte De- und Renaturierungsübergänge bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2mM DTE, pH 7 ± 20 % (v/v) Glycerin; Beobachtete Änderung in der Proteinfluoreszenzemission bei 328 nm (Anregung bei 280 nm, spektrale Bandbreite für Anregung 2.1 nm, für Emission 4.2 nm), Denaturierung (○) / Renaturierung (▽) jeweils nach ca. 1 Tag Inkubation; leere Symbole: Messungen in Nativpuffer, ausgefüllte Symbole: Messungen in Nativpuffer + 20 % (v/v) Glycerin; **B:** GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten in der BsPel Entfaltung (□) bzw. Rückfaltung (k₁: ○; k₂: ▽) bei 10°C; in Nativpuffer (leere Symbole) und in Nativpuffer + 20 % (v/v) Glycerin (ausgefüllte Symbole); Proteinkonzentration: 5 µg/ml. Datenpunkte resultieren aus Fluoreszenzmessungen (siehe Abb. 3.6 A)

Die Abbildung 3.13 A zeigt einen Vergleich der GdmCl-induzierten Entfaltung bzw. Rückfaltung bei 10°C von BsPel mit und ohne Zusatz von 20% (v/v) Glycerin. Die Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge von BsPel waren auch in Anwesenheit von 20% (v/v) Glycerin nicht reversibel und zeigten eine apparente Hysterese auf, die aber zu höheren GdmCl-Konzentrationen verschoben war. Der Mittelpunkt des Renaturierungsübergangs verschob sich dabei von 1 M GdmCl (ohne Glycerin) zu 1.6 M GdmCl (+ 20% (v/v) Glycerin). Der Mittelpunkt des Denaturierungsübergangs ohne Glycerin lag nach 1 Tag bei ca. 3 M GdmCl und mit 20 % (v/v) Glycerin bei ca. 3.5 M GdmCl. Da der Denaturierungsübergang nach einem Tag noch nicht im Gleichgewicht lag und somit schlecht vergleichbar ist, wurden auch Kinetikmessungen durchgeführt. Abbildung 3.13 B zeigt die GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bzw. Rückfaltung von BsPel bei 10°C mit und ohne Zusatz von 20 % (v/v) Glycerin. Die Entfaltung von BsPel ist in Anwesenheit von 20 % (v/v) Glycerin um einen Faktor von ca. 1.3 verlangsamt. Glycerin wirkt sich somit stabilisierend auf den nativen Zustand von BsPel aus oder auch destabilisierend auf den Übergangszustand. Die Rückfaltung von BsPel in Anwesenheit von 20% (v/v) Glycerin ist bei kleinen GdmCl-Konzentrationen vergleichbar mit der Renaturierung von BsPel ohne Glycerin. Bei mittleren

Ergebnisse

GdmCl-Konzentrationen ist die Renaturierung mit 20 % (v/v) Glycerin aber in beiden Renaturierungsphasen stark beschleunigt und die drastischen Verlangsamung der Rückfaltung tritt erst bei höheren Guanidiniumkonzentrationen auf. Glycerin bewirkt dabei möglicherweise die Stabilisierung eines essentiellen Faltungsintermediates.

Die irreversible Aggregationsreaktion bei der Rückfaltung von BsPel bei hoher Proteinkonzentration bzw. hoher Temperatur konnte durch Glycerin beeinflusst werden. Abbildung 3.14 zeigt die Renaturierungsausbeute in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und Temperatur mit und ohne Zusatz von 20% (v/v) Glycerin. Andere Messungen (siehe 3.3.1) zeigten, daß bei kleiner Proteinkonzentration die Renaturierungsausbeute bei ca. 100 % liegen. Die Abweichung davon könnte entweder durch Konzentrationsfehler oder durch nicht optimale Mischungsverhältnisse bei der Renaturierung zustande kommen.

In Anwesenheit von Glycerin ist vollständige Renaturierung bis 60 µg/ml BsPel möglich (ohne Glycerin nur bis ca. 25 µg/ml) und eine optimale Renaturierungsausbeute ist in Anwesenheit von Glycerin auch noch bei 40°C möglich. Bei 10°C kann die niedere Faltungsausbeute bei Glycerin gegenüber den höheren Temperaturen durch die erhöhte Viskosität erklärt werden.

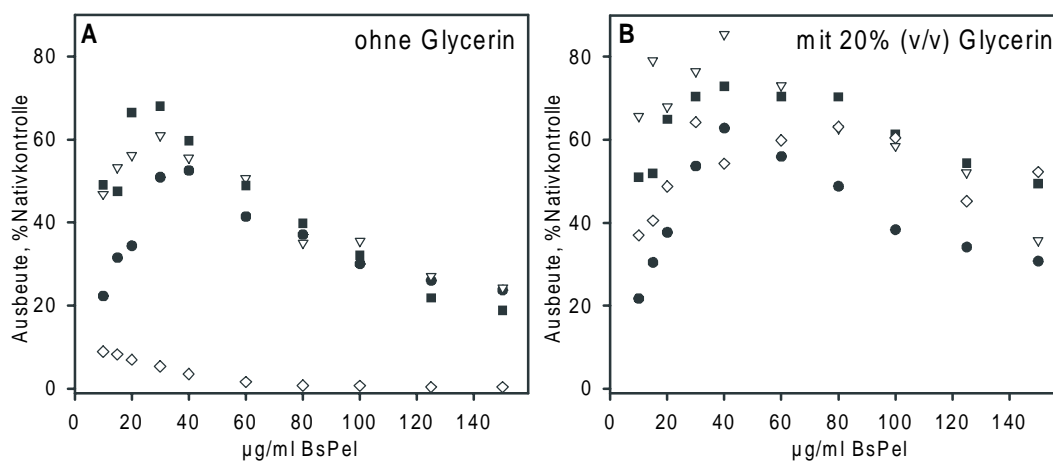


Abb. 3.14:

Abhängigkeit der Renaturierungsausbeute von der Proteinkonzentration und der Temperatur. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar. Die Pufferbedingungen waren 20 mM NaP, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween20, pH 7, ± 20% (v/v) Glycerin. Ausbeuten berechneten sich als Quotient aus Aktivität des Renaturierungsansatzes und Aktivität der Nativkontrolle. Sowohl Renaturierungsansatz als auch Nativkontrolle inkubierten für mindestens 1h bei der jeweiligen Temperatur, anschließend wurden Aliquots direkt in den Aktivitätstest pipettiert. **A:** Renaturierungsausbeute in 0.1 M GdmCl-Puffer bei 10°C (●), 20°C (▽), 30°C (■) und 40°C (◇); **B:** Renaturierungsausbeute in 0.1 M GdmCl-Puffer + 20% (v/v) Glycerin bei 10°C (●), 20°C (▽), 30°C (■) und 40°C (◇).

3.3.6 Einfluß des pH-Wertes

Säuredenaturierung ist eine häufig genutzte Methode, um Denaturierung bzw. Renaturierung bei hoher Proteinkonzentrationen durchzuführen, da nur eine Verdünnung von 1:10 erforderlich ist. Es wurde aber auch gezeigt, daß ein weiterer Zusatz an Säure zum säuredenaturierten Zustand von Proteinen einen signifikanten Anteil an Sekundärstruktur induzieren kann (Goto *et al.*, 1990a). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit dem Zusatz von neutralen Salzen erhalten (Goto *et al.*, 1990b). Dies wurde interpretiert als die Bildung eines *molten-globule*, das durch die Bindung von Anionen stabilisiert wird (Fink *et al.*, 1994; Goto & Fink, 1989).

Durch Säure denaturierte BsPel in 50 mM HCl zeigt sowohl im Nah-UV- als auch im Fern-UV-CD-Signal noch Reststruktur, unterscheidet sich aber von nativen und GdmCl-denaturierten Enzym (Abb. 3.15). Der säureinduzierte Intermediatzustand von BsPel kann somit nicht als *molten-globule* bezeichnet werden, da dieser keine Tertiärstruktur aufweisen sollte und somit auch kein ausgeprägtes Nah-UV-CD-Signal. Das Nah-UV-CD-Signal des säureinduzierten Zustandes ist invers zum nativen Zustand von BsPel. Dies könnte dadurch verursacht werden, daß die Tertiärstruktur im säureinduzierten Intermediat nicht nativähnlich ist und die aromatischen Seitenketten in einer nichtnativen Konformation im Intermediat vorliegen. Ein ähnliches durch Säure und Salz induziertes inverses Nah-UV CD-Signal wird bei Pektat-Lyase C aus *Erwinia chrysanthemi* beobachtet (Kamen & Woody, 2001).

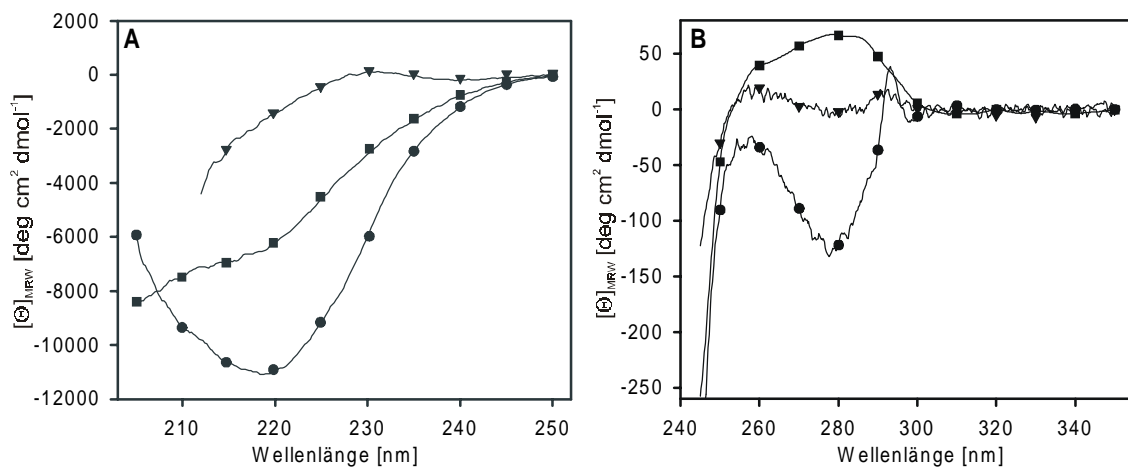


Abb. 3.15: UV-CD-Spektren von BsPel bei 10°C

A: Fern-UV-CD-Spektren von nativer BsPel: (●) in 20 mM NaP, pH 7; und denaturierter BsPel: (▼) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, pH 7; (■) in 50 mM HCl; $c = 0.5$ mg/ml, $d = 1$ mm, spektrale Bandbreite: 1 nm
B: Nah-UV-CD-Spektren von nativer BsPel: (●) in 20 mM NaP, pH 7; und denaturierter BsPel: (▼) in 6 M GdmCl, 20 mM NaP, pH 7; (■) in 50 mM HCl; $c = 0.5$ mg/ml, $d = 4$ mm, spektrale Bandbreite: 1 nm

Inwieweit der pH-Wert den Verlauf der Entfaltung bzw. Rückfaltung von BsPel beeinflusst, wurde anhand von Fluoreszenzemissions- und Aktivitätsmessungen untersucht. Dazu wurde native BsPel oder säure- bzw. GdmCl-denaturierte BsPel in Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten aber ähnlicher Ionenstärke verdünnt und nach einer Inkubation von einem Tag bei 10°C die Aktivität bzw.

Ergebnisse

Fluoreszenzemission bestimmt (Abb. 3.16). Native BsPel ist stabil zwischen pH 5 und 11. Im Bereich von pH 3–4 ist die Proteinfluoreszenz zu ungefähr 30 % reduziert und das Fluoreszenz-emissionsmaximum nach 334 nm verschoben (bei pH 7 in diesen Pufferbedingungen: $\lambda_{\max} = 336$ nm). In diesem Bereich konnte Aktivität nachgewiesen werden, was zu der Vermutung führt, daß das entstehende Entfaltungsintermediat im Aktivitätstest, der bei pH 8.5 durchgeführt wurde, renaturieren konnte. Unterhalb von pH 3 kommt es zu einer weiteren Reduktion der Fluoreszenzemission (ca. 60 %) und zu einer Verschiebung von λ_{\max} nach 346 nm. Das Fluoreszenzemissionsspektrum von BsPel bei pH 2 unterscheidet sich jedoch grundlegend von dem Spektrum der GdmCl-denaturierter BsPel (λ_{\max} bei 353 nm). Im Fluoreszenzspektrum des säuredenaturierten Proteins fehlte das zusätzliche Emissionsmaximum bei 305 nm. Dieses Emissionsmaximum wird bei Proteinspektren des vollständig denaturierten Zustandes verursacht durch die Entkopplung der Tyrosin- von der Tryptophanfluoreszenz. Es konnte somit Resttertiärstruktur bei pH 2 vermutet werden. Aktivität war im Bereich unterhalb pH 2.5 nicht nachweisbar.

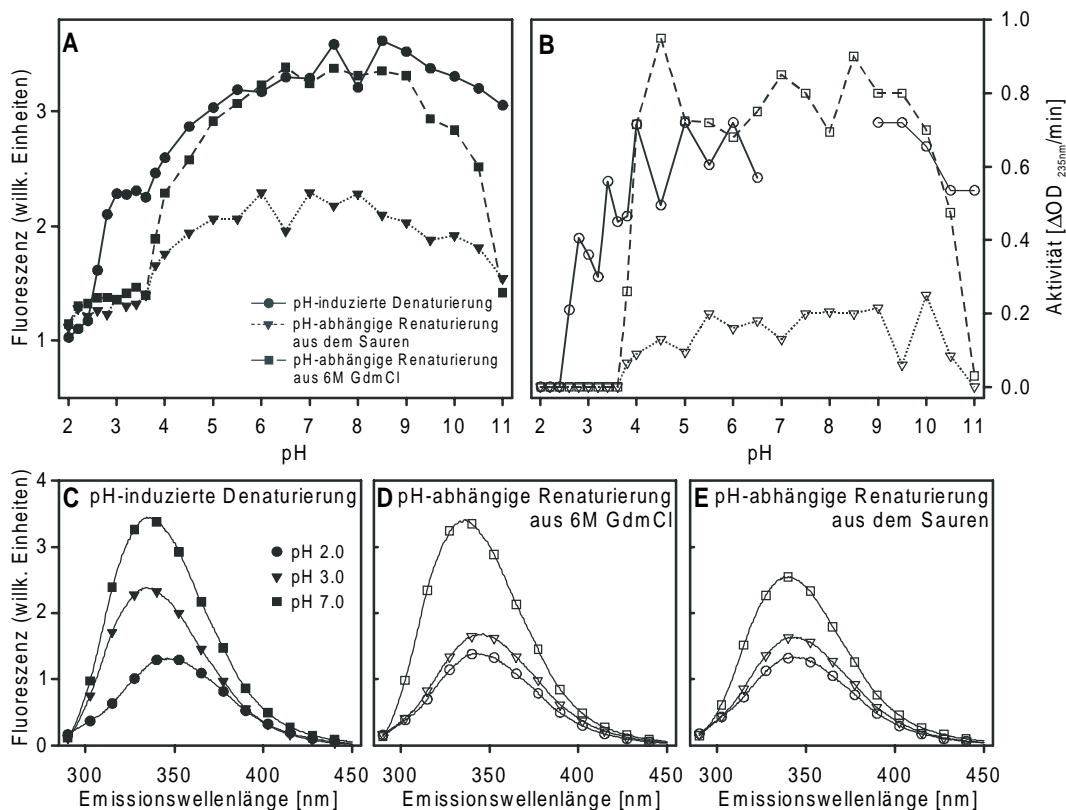


Abb. 3.16:

Stabilität von BsPel bei 10°C gegenüber verschiedenen pH Werten, die Pufferbedingungen waren 150 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM Citrat, 10 mM Borat, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 2-11; Die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 µg/ml **A:** Beobachtete Änderung in der Proteinfluoreszenzemission bei 328 nm (Anregungswellenlänge: 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm, Emission 4.2 nm); pH-induzierte Denaturierung nach 1 Tag Inkubation (●), pH-abhängige Renaturierung aus dem säuredenaturierten Zustand (in 50 mM HCl) nach 1 Tag Inkubation (▼), pH-abhängige Renaturierung aus dem GdmCl-denaturiertem Zustand (in pH 7) **B:** Aktivitätsmessungen der gleichen Proben wie unter 3.16 A beschrieben; Verwendung der Symbole analog zu 3.16 A. **C/D/E:** Fluoreszenzemissionsspektren bei pH 2.0, 3.0 und 7.0, Proben wie unter 3.16 A beschrieben.

Renaturierung von GdmCl-denaturierten BsPel war im Bereich von pH 4.5 – 9.5 vollständig möglich. Fluoreszenzemissionspektren der Renaturierungsproben im Bereich von pH 2 - 3 unterschieden sich nicht grundlegend voneinander und zeigten ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 346 nm, das dem der pH-induzierten Denaturierung von pH 2 entsprach.

Die Renaturierung aus dem säuredenaturierten Zustand (in 50 mM HCl) war nur zu 30% reversibel, verursacht vermutlich durch eine erhöhte Aggregationsanfälligkeit eines teilentfalteten Intermediates. Das Fluoreszenzemissionsmaximum der renaturierten BsPel aus dem säuredenaturierten Zustand bei pH 7 lag bei 340 nm (native BsPel bei pH 7; $\lambda_{\max} = 336$ nm) und lies auf das Vorhandensein von Aggregaten schließen. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf Säuredenaturierung bei BsPel verzichtet.

3.3.7 Einfluß des Denaturierungsmittels

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die bei Entfaltungs- und Rückfaltungsübergängen von BsPel auftretende apparente Hystere durch die extrem langsame Denaturierung bei mittleren GdmCl-Konzentrationen verursacht wird, wurden Entfaltungsübergänge mit Guanidiniumthiocyanat als Denaturierungsmittel gemessen. GdmSCN ist ein sehr stark solubilisierendes Denaturierungsmittel (Gordon, 1972; Nozaki & Tanford, 1970), und die Denaturierung von BsPel in GdmSCN sollte gegenüber der Denaturierung in GdmCl beschleunigt sein.

Die Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge von BsPel, gemessen als Änderung in der Fluoreszenzemission, waren auch mit GdmSCN nicht reversibel. Im Unterschied zu GdmCl als Denaturierungsmittel zeigte die GdmSCN-induzierte Renaturierung nach 1 Tag einen zweiphasigen Verlauf mit einem ersten Übergangsmittelpunkt von ca. 0.45 M GdmSCN und einem ausgeprägten Plateau zwischen 0.6 M und 0.9 M (Abbildung 3.17). Der erste Übergangsmittelpunkt der Renaturierung blieb auch bei weiterer Inkubation der Proben bei 0.45 M GdmSCN. Bei den Renaturierungsproben im Bereich des Plateaus kam es aber zu einer Aggregationsreaktion. Die auftretenden Aggregate waren nicht löslich und somit nahm die Fluoreszenz gegen 0 ab, nach erneutem Aufrühren der Proben konnte Fluoreszenz in diesen Proben in der Größenordnung des denaturierten Signals gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Bei GdmSCN-induzierter Denaturierung lag der Mittelpunkt des Übergangs nach 1 Tag bei ca. 0.85 M GdmSCN, nach 3 Tage bei ca. 0.75 M GdmSCN, nach 5 Tagen bei ca. 0.7 M GdmSCN und nach 14 Tagen bei ca. 0.6 M GdmCl. Nach 14 Tagen trat auch in Denaturierungsübergang im Bereich von ca. 0.7 M – 1 M GdmSCN eine vermehrte Aggregationsreaktion auf. Die Abnahme des Fluoreszenzsignals im Bereich der Vorübergangsbasislinien wird möglicherweise durch Ablagerung des nativen Proteins bzw. von Faltungsintermediaten an die Gefäßwände verursacht.

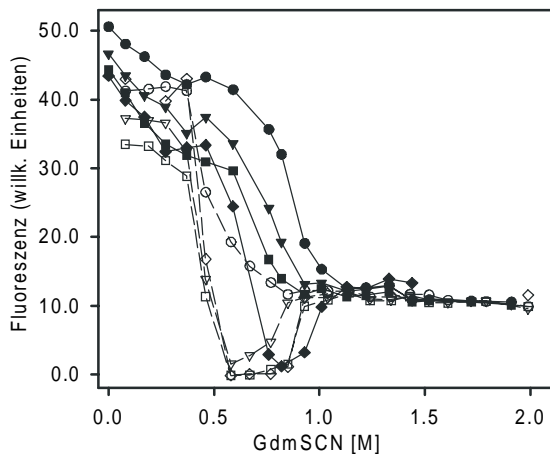


Abb. 3.17:

GdmSCN-induzierte De- und Renaturierungsübergänge bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7; Proteinfluoreszenzemission wurde bei 328 nm detektiert (Anregung: 280 nm, spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm; Emission 4.2 nm); die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 µg/ml; ausgefüllte Symbole: Denaturierung nach 1 Tag (●), nach 3 Tagen (▼), nach 5 Tagen (■) und nach 14 Tagen (◆), leere Symbole: Renaturierung nach 1 Tag (○), nach 3 Tagen (▽), nach 5 Tagen (□) und nach 6 Tagen (◇); Die Proben wurden in fluoreszenzgeeigneten Plastikkuvetten inkubiert.

Das Vorhandensein der Plateauregion liefert einen Hinweis auf die Existenz eines oder mehrerer Gleichgewichtsintermediate, die bei mittleren GdmSCN-Konzentrationen zu Aggregation neigen. Ein direkter Zusammenhang zwischen Auftreten von Faltungs- bzw. Entfaltungsintermediaten und einsetzender Aggregation ist bereits für eine Reihe von Modellproteinen nachgewiesen worden (Cleland & Wang, 1990; DeFelippis *et al.*, 1993; Georgiou *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1997). Um die Aggregation von BsPel, die bei mittleren GdmSCN-Konzentrationen auftritt, näher zu charakterisieren wurden Kinetikmessungen durchgeführt (Abbildung 3.18 und 3.19). Denaturierung von BsPel in GdmSCN konnte mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden und die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung zeigte eine lineare Abhängigkeit von der GdmSCN-Konzentration. Renaturierungskinetiken in GdmSCN von BsPel waren mindestens zweiphasig ($\tau_1 = 17$ s, $\tau_2 = 130$ s bei 0.05 M GdmSCN) und die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung und die Amplitudenverteilung bei den Renaturierungskinetiken war vergleichbar mit den Rückfaltungskinetiken in GdmCl als Denaturierungsmittel. Bei einer GdmSCN-Konzentration von 0.46 M kam es zu einer drastischen Verlangsamung der Rückfaltung. Bei dieser GdmSCN-Konzentrationen ist auch ab einem Zeitbereich von ca. 2 Stunden ein Abnahme der Fluoreszenz beobachtbar, die auf Aggregation zurückzuführen ist.

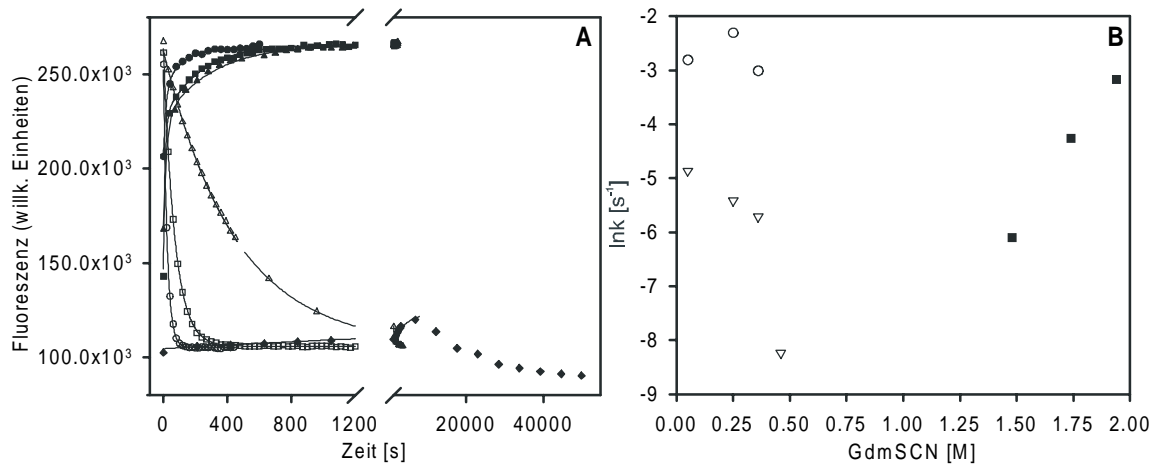


Abb. 3.18:

A: Ent- bzw. Rückfaltungskinetiken bei 10°C von BsPel (5 $\mu\text{g/ml}$) in 20 mM NaP, 0.1 % (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7 und verschiedenen GdmSCN-Restkonzentrationen (Renaturierung: 0.1 M GdmSCN (●), 0.25 M GdmSCN (■), 0.35 M GdmSCN (▲) und 0.46 M GdmSCN (◆), Denaturierung: 1.9 M GdmSCN (○), 1.75 M GdmSCN (□) und 1.48 M GdmSCN (△)). Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm in fluoreszenzgeeigneten Plastikküvetten gemessen (Anregung: 280 nm, spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm und Emission 4.2 nm); Die Linien stellen Regressionen der Meßkurven dar; Denaturierung: Regression mit monoexponentieller Funktion, Renaturierung: Regression mit biexponentieller Funktion außer bei der Renaturierung bei 0.46 M GdmSCN-Restkonzentration (monoexponentielle Regression der Daten bis 8000 s); **B:** Vergleich der aus Fluoreszenzmessungen resultierenden apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (■) und Rückfaltung (k_1 : ○; k_2 : ▽).

Abbildung 3.19 zeigt zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren während einer Renaturierungskinetik von 5 $\mu\text{g/ml}$ BsPel in 0.4 M bzw. 0.52 M GdmSCN. Dabei zeigt sich, daß es bei der Kinetik bei einer GdmSCN-Konzentration von 0.4 M in der ersten halben Stunde zu einem Fluoreszenzanstieg und einer Verschiebung von λ_{max} nach 334 nm (nach 15 Sekunden, $\lambda_{\text{max}} = 349$ nm) kommt. Anschließend nimmt die Fluoreszenz sehr langsam linear ab, λ_{max} bleibt dabei aber konstant bei 334 nm. Gründe für die Fluoreszenzabnahme in diesem Bereich könnte eine vermehrte Aggregationsanfälligkeit eines Faltungsintermediates sein. Bei der Renaturierungskinetik bei einer GdmSCN-Konzentration von 0.5 M GdmSCN ist ein zweiphasiger Prozeß der Aggregation erkennbar (Abbildung 3.19 B/C). Während der ersten 5 Stunden ist nur eine Abnahme in der Fluoreszenz beobachtbar, λ_{max} bleibt dabei aber konstant bei 349 nm, anschließend kommt es zu einer weiteren Abnahme, aber auch zu einer Verschiebung von λ_{max} nach 336 nm. Es kann bei der Renaturierungskinetik bei 0.5 M GdmSCN nicht ausgeschlossen werden, daß auch der denaturierte Zustand von BsPel bei mittleren GdmSCN-Konzentrationen nicht löslich ist, oder daß ein langlebiges Faltungsintermediat auftritt, das dem denaturiertem Zustand ähnlich ist.

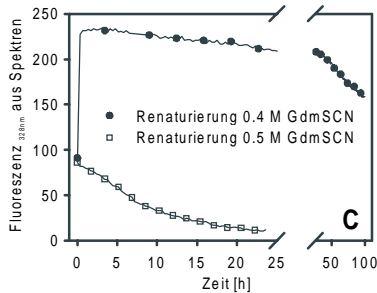
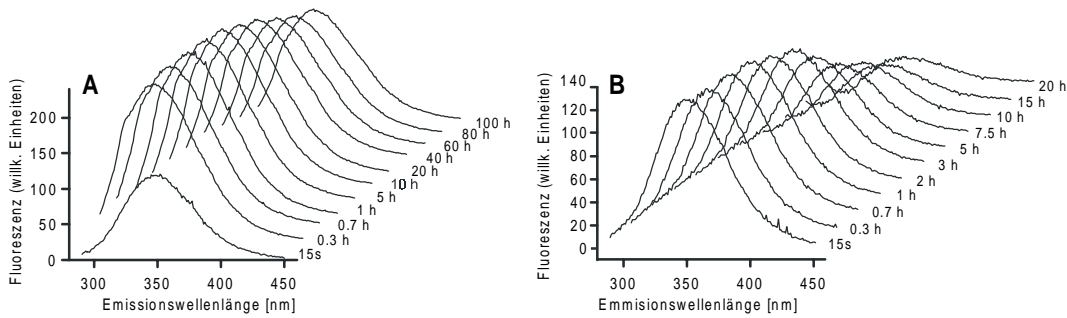


Abb. 3.19:

Zeitaufgelöste Fluoreszenzemissionsspektren einer Renaturierungskinetik bei 0.4 M (A) bzw. 0.52 M GdmSCN (B) bei 10°C; Die Proteinkonzentration betrug 5 µg/ml; Pufferbedingungen waren 20 mM NaP, 0.1 % (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH 7; Anregungswellenlänge: 280 nm, spektrale Bandbreiten für Anregung: 2.1 nm und Emission 4.2 nm; Die Fluoreszenzmessungen wurden in fluoreszenzgeeigneten Plastikkuvetten durchgeführt. C: Fluoreszenzwert bei 328 nm aus den zeitaufgelösten Fluoreszenzemissionsspektren (A/B) gegen die Zeit aufgetragen

3.3.8 Bedeutung der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierung für die Renaturierung von BsPel

Die langsame Faltung monomerer Proteine wird oft durch die geschwindigkeitsbestimmende Isomerisierung von Prolinresten verursacht. Die Peptidyl-Prolyl-Bindung liegt im nativen Protein entweder in der *cis*- oder *trans*-Konformation vor, im entfalteten Zustand des Protein stellt sich jedoch ein Gleichgewicht zwischen beiden Konformationen ein. Dabei variiert der Anteil der *cis*-Bindung je nach Ladungsverteilung und Aminosäurezusammensetzung in der unmittelbaren Umgebung der Bindung zwischen 10 – 40% (Cheng & Bovey, 1977).

BsPel besitzt 14 Proline, wobei der Prolinrest 281 in der nativen Struktur in *cis*-Konformation vorliegt. Um den Zusammenhang zwischen Prolinisomerisierung und der langsamen Renaturierungsphase zu untersuchen, wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt (Brandts *et al.*, 1975; Schmid, 1986). Dazu wurde BsPel für verschieden lange Zeiten unter stark denaturierenden Bedingungen (7.6 M GdmCl, vollständige Denaturierung von BsPel innerhalb von ca. 10 Sekunden) entfaltet und anschließend verdünnt zu Renaturierungsbedingungen (0.4 M GdmCl). Falls die langsame Renaturierungsphase durch eine langsame Gleichgewichtseinstellung zwischen *cis-trans*-Konformationen in der entfalteten Proteinkette verursacht wird, dann sollte die Menge der Moleküle, die langsam falten, mit längerer Denaturierungszeit zunehmen. Das bedeutet, nach kurzer Denaturierungszeit sollten alle Prolinreste noch in nativer Konformation vorliegen und bei anschließender Renaturierung sollte die Amplitude der langsamen Phase verschwindend klein sein. Bei längerer Denaturierungszeit kann sich das Gleichgewicht zwischen *cis*- oder *trans*-Konformation einstellen und somit sollte die Amplitude der langsamen Renaturierung mit der Denaturierungszeit ansteigen.

Abbildung 3.20 A zeigt die Zunahme der relativen Amplitude der langsamen Renaturierungsphase aus Fluoreszenzkinetikmessungen als Funktion der Entfaltungszeit (0.5 – 72 min). Die Relaxationszeit der Entstehung der langsam faltenden Spezies beträgt 240 s und ist konsistent mit dem Wert, der für Prolinisomerisierung erwartet wird (Brandts et al., 1975). Alle Renaturierungskinetiken, auch nach kurzer Denaturierungszeit, mußten mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden, und die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der schnellen und langsamen Renaturierungsphasen waren gleich für kurze oder lange Denaturierungszeiten. Bei einer Relaxationszeit der Entstehung der langsam faltenden Spezies von 240 s muß aber berücksichtigt werden, daß bei der kürzesten Denaturierungszeit von 30 Sekunden schon ca. 15% langsam faltende Spezies vorliegen.

Inwieweit Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen die langsame Renaturierungsphase beschleunigen können, wurde am Beispiel von humanen Cyclophilin A untersucht. Dabei wurde vollständig denaturierte BsPel in Nativpuffer verdünnt, der eine äquimolare Konzentration an Cyclophilin A enthielt. Dabei konnte die apparente Geschwindigkeitskonstante der langsamen Renaturierungsphase aber nur um einen Faktor von ca. 1.5 beschleunigt werden (Daten nicht gezeigt). Gründe dafür könnten sein, daß die Prolinisomerisierung nicht beschränkt ist auf den denaturierten Zustand des Proteins, sondern auch in Rückfaltungsintermediaten eine Rolle spielt, und dort nicht mehr zugänglich ist für Cyclophilin A. Dafür spricht auch die Denaturierungsmittelabhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Renaturierungsphase und deren zugehörigen Amplitude.

Die Renaturierungsgeschwindigkeit vom entfalteten Zustand, bei dem alle Proline in der richtigen Konformation vorliegen, wurde durch Reaktivierungsexperimente nach kurzer Denaturierung bestimmt. Die Denaturierung von BsPel wurde für 30 Sekunden bei 10°C und einer GdmCl-Konzentration von 7.6 M durchgeführt. Bei Kontrollkinetiken unter gleichen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, daß der Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur in der manuellen Mischzeit erfolgt. Unter Berücksichtigung, daß nach 30 Sekunden Denaturierungszeit schon ca. 15% langsam faltende Spezies vorliegen, ist die Reaktivierung (bei 0.43 M GdmCl) von dem denaturierten Zustand mit richtigen Peptidyl-Prolyl-Bindungskonformationen mit einer Relaxationszeit von ca. 20 Sekunden möglich. Die Reaktivierung nach langer Denaturierungszeit war ungefähr um den Faktor 8 langsamer. Wieviel Prozent der schnell faltenden Spezies im denaturierten Zustand von BsPel vorliegen, konnte durch Reaktivierungsexperimente nur auf ca. 5 - 30% grob abgeschätzt werden (= relative Totzeitamplitude der Reaktivierung nach langer Denaturierungszeit), da die Daten der Reaktivierung zu sehr streuten. Eine genauere Bestimmung konnte jedoch mittels reverser Doppelsprungexperimente (siehe 3.3.9) durchgeführt werden.

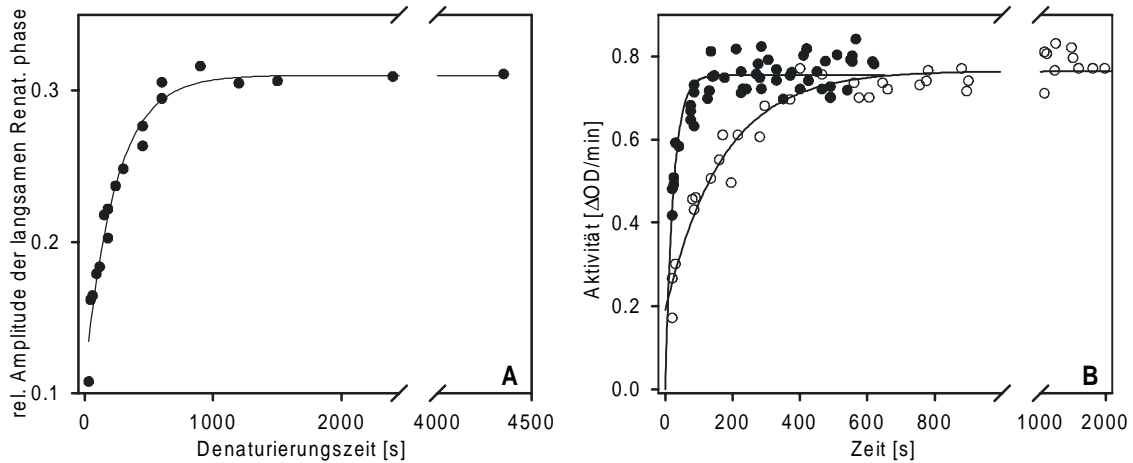


Abb. 3.20:

A: Entstehung der langsam faltenden Spezies durch Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierung bei 10°C. Pufferbedingungen waren 20 mM NaP, 0.1 % (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH 7. Dazu wurde das Protein für verschieden lange Zeiten bei 7.22 M GdmCl entfaltet und anschließend in Nativpuffer zu einer 0.41 M GdmCl-Restkonzentration und einer Proteinkonzentration von 8 µg/ml rückverdünnt. Die jeweiligen Rückfaltungskinetiken wurden als Änderung der Fluoreszenzemission bei 328 nm detektiert. Die relative Amplitude der langsamen Renaturierungsphase zur Gesamtamplitude wurde gegen die Denaturierungszeit aufgetragen und mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben ($\tau = 240$ s) **B:** Reaktivierungsexperiment bei 0.43 M GdmCl-Konzentration nach kurzzeitiger Denaturierung ● (40 sek bei 7.6 M GdmCl und 10°C) bzw. langzeitiger Denaturierung ○ (>1 h bei 7.6 M GdmCl und 10°C). Nach bestimmten Zeiten der Renaturierung wurden Aliquots entnommen und direkt in den Aktivitätstest pipettiert. Die Pufferbedingungen waren 20 mM NaP, 0.1 % (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH 7. Die Proteinkonzentration im Renaturierungsansatz betrug 10 µg/ml. Die Linien stellen Regressionen nach monoexponentiellen Funktionen dar; τ (kurz denaturiert) = 24 s, τ (lang denaturiert) = 165 s.

3.3.9 Reverse Doppelsprungexperimente zur Unterscheidung zwischen der nativen Spezies und den Intermediaten bei der Rückfaltung von BsPel

Zur Unterscheidung, ob die bei den Fluoreszenzkinetikmessungen beobachteten schnellen Renaturierungsphasen auf *on-pathway* Faltungsintermediate (sequentieller Faltungsweg) zurückzuführen sind oder ob ein rein paralleler Faltungsweg bei der Rückfaltung von BsPel vorliegt, wurden reverse Doppelsprungexperimente durchgeführt (Kiefhaber, 1995; Schmid, 1983; Schmid, 1986). Bei diesem Experiment wird in einem ersten Mischungsschritt Rückfaltung initiiert und für eine bestimmte Zeit bei diesen Renaturierungsbedingungen gewartet, um mögliche Intermediate zu populieren. Anschließend wird in einem zweiten Mischungsschritt das Protein in leicht denaturierende Bedingungen transferiert (1.3 M GdmCl), bei denen die Entfaltung der eventuell populierte Intermediate verfolgt werden kann. Die Amplitude der Entfaltungskinetiken bei der jeweiligen Renaturierungszeit entspricht dabei der Menge an Intermediat. Da bei diesen leicht denaturierenden Bedingungen native BsPel stabil ist, kann keine Entfaltung von nativen Molekülen beobachtet werden. Das hat zur Folge, daß die Zunahme des Endwerts der Denaturierungskinetiken mit längerer Renaturierungszeit indirekt ein Maß für die entstandenen nativen Moleküle ist, da gleichzeitig, verursacht durch die auftretende apparente Hysterese bei den De- und Renaturierungsübergängen

von BsPel, keine Renaturierung vom vollständig denaturierten Zustand bei einer GdmCl-Konzentration von 1.3 M stattfinden kann.

Für eine direkte Messung der nativen Moleküle kann im dem zweiten Mischungsschritt auch in stark denaturierende Bedingungen gesprungen werden. Da der native Zustand eines Proteins durch eine hohe energetische Barriere von teilgefalteten Intermediaten separiert ist, ist dementsprechend die Entfaltungskinetik der nativen Moleküle langsamer als die der Intermediate (Segawa & Sugihara, 1984). Die Amplitude der langsamen Entfaltungskinetik bei der jeweiligen Renaturierungszeit entspricht dabei der Menge an nativen Molekülen.

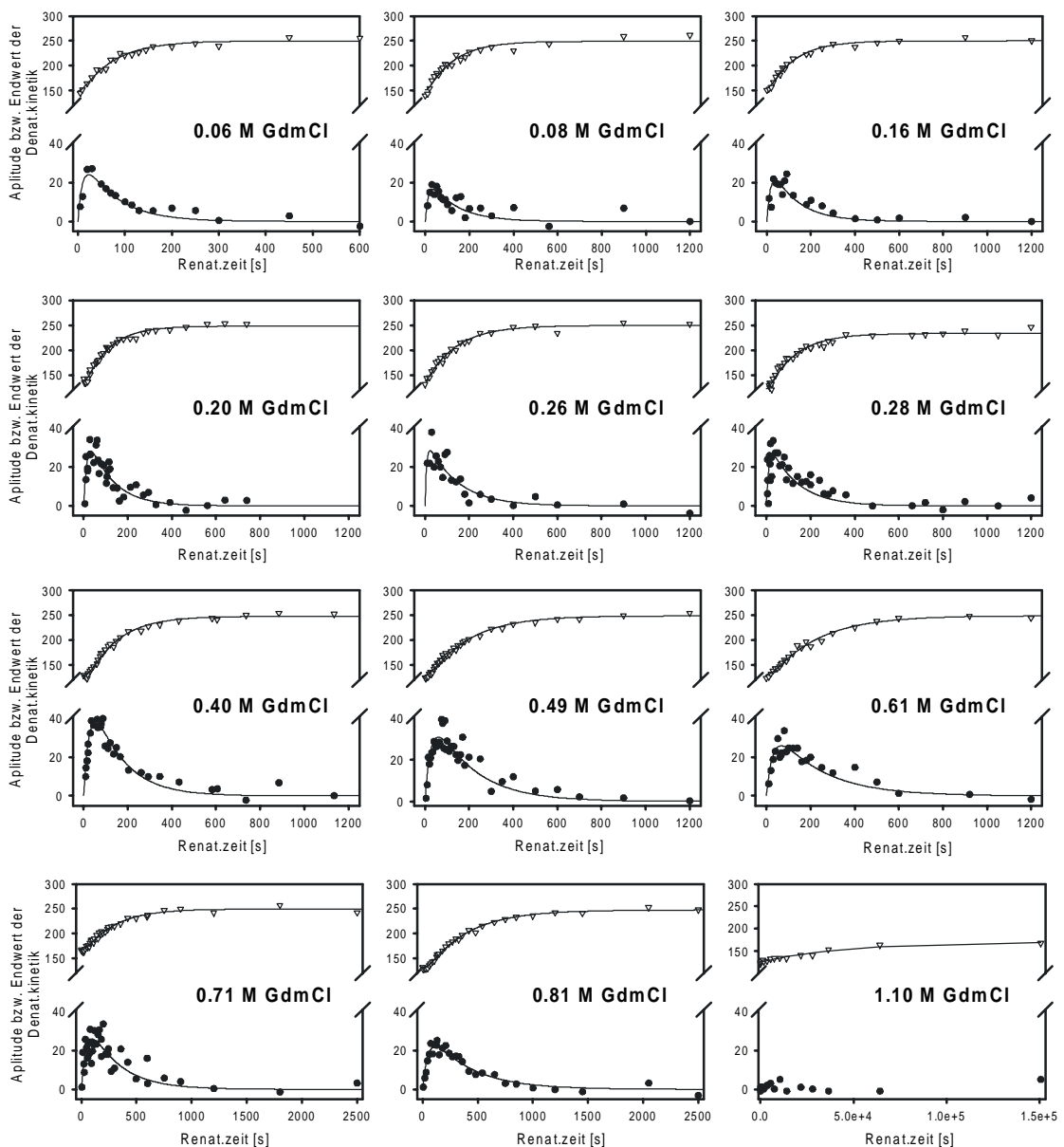


Abb. 3.21: vorhergehende Seite

reverse Doppelsprungexperimente zur Bestimmung der nativen Spezies und Faltungsintermediate; Pufferbedingungen: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH 7. Vollständig entfaltetes Protein (0.5 mg/ml BsPel, 6 M GdmCl) wurde in Nativpuffer bei 10°C in fluoreszenzgeeigneten Plastikkuvetten manuell verdünnt (8 µg/ml BsPel, 0.1–1.1 M GdmCl) und für verschieden lange Zeiten bei den jeweiligen Renaturierungsbedingungen (GdmCl-Konzentration in der jeweiligen Abbildung angegeben) inkubiert, anschließend wurde in der zweiten Verdünnung (5 µg/ml BsPel, 1.3 M GdmCl) zu leicht denaturierenden Bedingungen gesprungen und die Fluoreszenzemissionsänderung bei 328 nm verfolgt (Anregung 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm, Emission 4.2 nm). Da bei 1.3 M GdmCl das native Protein stabil ist und nur eventuelle Faltungsintermediate denaturieren, entspricht somit die Amplitude der Entfaltungskinetiken (●) der Menge an Intermediat und der Endwert der Entfaltungskinetiken (▽) der Menge an nativem Protein zu der jeweiligen Renaturierungszeit. Die Linien stellen eine nicht lineare Regression der Daten nach dem Faltungsmodell $U \rightarrow I \rightarrow N$ dar (siehe 2.1.15.3).

Abbildung 3.21 zeigt die Ergebnisse solcher reversen Doppelsprungexperimente. Dabei wurde im ersten Schritt die Renaturierung bei den in den Abbildungen angegebenen GdmCl-Konzentrationen initiiert und im zweiten zu leicht denaturierenden Bedingungen (1.3 M GdmCl) gesprungen und die Entfaltungskinetiken der Intermediate als Änderung in der Tryptophanfluoreszenz verfolgt. Man konnte bei den Renaturierungsbedingungen zwischen 0.1 M und 0.9 M GdmCl ein Intermediat populieren, das bei 10°C und einer GdmCl-Konzentration von 1.3 M mit einer Halbwertszeit von ca. 6 s denaturierte. Bei der Entstehung der nativen Moleküle konnte eine "lag-Phase" beobachtet werden, und die Halbwertszeit der Entstehung des nativen Zustands entsprach dabei ungefähr der Halbwertszeit der Abnahme der Moleküle im Intermediatzustand. Es lag somit nahe, daß der native Zustand zumindestens teilweise über ein *on-pathway* Intermediat gebildet wird. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten aus der Beschreibung der Daten nach dem Faltungsmodell $U \rightarrow I \rightarrow N$ entsprachen dabei den apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung aus Fluoreszenzkinetikmessungen (Abbildung 3.22). Bei einer GdmCl-Konzentration von 1.1 M bei der Renaturierung (Übergangsbereich des Renaturierungsübergangs) konnte kein Intermediat populiert werden und die Entstehung der nativen BsPel verlief sehr langsam. Bei dieser Renaturierungsbedingung ist wahrscheinlich der teilgefaltete Intermediatzustand nicht mehr stabil und die Entfaltung von I ist schneller als die Bildung von N über I.

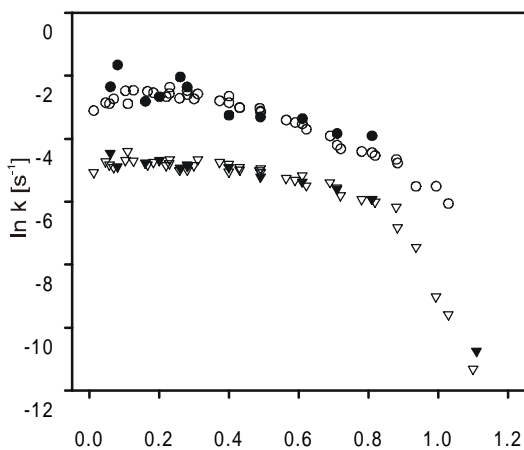


Abb. 3.22:

Vergleich der aus Fluoreszenzmessungen (siehe 3.3.3) resultierende apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Rückfaltung (k_1 : ○; k_2 : ▽) und den aus Doppelsprungexperimenten (siehe Abbildung 3.21) resultierenden Daten nach dem Faltungsmodell $U \rightarrow I \rightarrow N$;

- (●) Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $U \rightarrow I$;
- (▼) Geschwindigkeitskonstante der Reaktion $I \rightarrow N$.

Da die Entfaltungskinetiken des Intermediatzustands bei 1.3 M GdmCl mit einer Halbwertszeit von 6 s relativ schnell für manuelle Mischbedingungen waren, wurde ein reverses Doppelsprungexperiment bei einer Renaturierungsbedingung (0.26 M GdmCl) auch unter *stopped-flow* Mischungsbedingungen durchgeführt (Abbildung 3.23). Dabei zeigte sich, daß die Entfaltungskinetiken bei 1.3 M GdmCl mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden mußten. Dies bedeutet, daß bei der Renaturierung zwei verschieden stabile Intermediatzustände auftreten. Intermediat 1 (Halbwertszeit der Entfaltung bei 1.3 M GdmCl: ca. 3 s) entsteht mit einer Relaxationszeit von ca. 16 s und verschwindet mit τ von ca. 300 s, $\tau_{\text{Entstehung}}$ von Intermediat 2 (Halbwertszeit der Entfaltung bei 1.3 M GdmCl: ca. 18 s) beträgt ca. 7 s und τ_{Abnahme} von Intermediat 2 ca. 100 s. Da die Geschwindigkeitskonstante der Abnahme des schnellen Intermediates (I 2) nicht mit der Geschwindigkeitskonstante der Zunahme des langsameren Intermediates (I 1) übereinstimmte, muß es sich bei den Intermediaten um parallele Faltungswege handeln. Die Geschwindigkeitskonstanten der Bildung der beiden Intermediate stimmte ungefähr mit den beiden schnellen apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Renaturierung, gemessen als Änderung in der Fluoreszenzemission unter *stopped-flow* Bedingungen (siehe 3.3.3), überein. Das Amplitudenverhältnis war aber bei den Fluoreszenzkinetikmessungen 2/3 zu 1/3 von der sehr schnellen Phase zur mittleren Phase; in dem reversen Doppelsprungexperiment ist die Amplitude des schnellen Intermediates nur ungefähr 30% des langsameren Intermediats. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante bei der Bildung des nativen Zustandes wurden bei gleichen Renaturierungsbedingungen (0.26 M GdmCl) auch ein reverses Doppelsprungexperiment durchgeführt, bei der beim zweiten Mischungsschritt in stark denaturierende Bedingungen (6.8 M GdmCl) gesprungen wurde (Abbildung 3.23). Dabei entfalteten die Intermediatzustände in der Totzeit des Mischens und die apparente Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung der nativen Moleküle stimmte mit den aus Fluoreszenzkinetikmessungen überein. Ungefähr 7% der nativen Moleküle waren schon in der Totzeit von 0.1 s gebildet (entspricht der schnell faltenden Spezies des entfalteten Zustands mit richtiger Peptidyl-Prolyl-Konformation). Die Bildung von nativen Molekülen aus dem entfalteten Zustand mit richtiger Peptidyl-Prolyl-Konformation war somit deutlich schneller als durch Reaktivierungsexperimente nach kurzer Denaturierungszeit bestimmt worden war. Die Bildung der restlichen nativen Moleküle verlief über eine "lag-Phase" und hatte eine Relaxationszeit von ca. 160 s. Diese Relaxationszeit lag im ungefähren Mittel der beiden Relaxationszeiten bei der Abnahme der Intermediate. Somit führen wahrscheinlich beide Intermediate zum nativen Zustand. Da sich die Raten der Abnahme der Intermediate aber nur um einen Faktor von 3 unterscheiden, konnte bei der Bildung von N diese beiden Phasen nicht unterschieden werden.

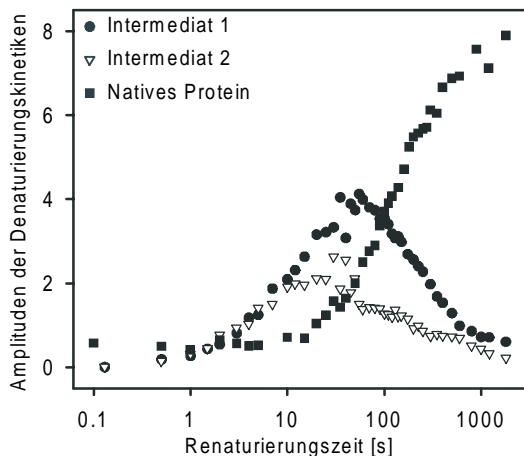


Abb. 3.23:

reverse Doppelsprungexperimente bei 10°C und *stopped-flow* Mischungsbedingungen; Puffer: 20 mM NaP, 2 mM DTE, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7; Messung der Änderung in der Fluoreszenzemission > 320 nm (Anregung: 280 nm; spektrale Bandbreiten für Anregung und Emission: 4 nm).

Bestimmung der nativen Spezies:

vollständig denaturiertes Protein (360 µg/ml BsPel, 1.5 M GdmCl) wurde 1:6 verdünnt (60 µg/ml BsPel, 0.26 M GdmCl), nach verschieden langer Renaturierungszeit wurde eine zweite Verdünnung (10 µg/ml BsPel, 6.8 M GdmCl) durchgeführt und die Entfaltungskinetiken als Änderung der Fluoreszenzemission gemessen; (■) Amplituden der Entfaltungskinetiken bei der jeweiligen Renaturierungszeit.

Bestimmung der Faltungsintermediate:

vollständig denaturiertes Protein (360 µg/ml BsPel, 1.5 M GdmCl) wurde 1:6 verdünnt (60 µg/ml BsPel, 0.26 M GdmCl); nach verschieden langen Zeiten wurde eine zweite Verdünnung bei 10 µg/ml BsPel und 1.3 M GdmCl durchgeführt, (●,▽) Amplituden der Entfaltungskinetiken.

Zur näheren spektroskopischen Charakterisierung der Intermediatzustände wurden zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren während einer Renaturierungskinetik von 5 µg/ml BsPel bei 0.4 M GdmCl und 10°C aufgenommen. Mittels der aus reversen Doppelsprungexperimenten unter gleichen Renaturierungsbedingungen bestimmten Konstanten (mit dem vereinfachten Faltungsmodell mit nur einem Intermediat) wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum des Intermediatzustand zurückgerechnet (Daten nicht gezeigt). Das berechnete Fluoreszenzemissionsspektrum des Intermediatzustandes hat ein Maximum bei ca. 342 nm (natives Protein: 334 nm) und eine fast identische Fluoreszenzintensität mit dem nativen Zustand. Diese Ergebnisse lassen auf nativähnliche Strukturen in den Intermediatzuständen schließen.

3.4 Substitution des *cis*-Prolins von BsPel

Um nachzuprüfen, ob die Isomerisierung der einzigen *cis*-Peptidbindung vor Prolin 281 bei der Rückfaltung von BsPel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wurde eine Mutationsstudie durchgeführt. Prolin 281 liegt in einer zentralen Windung der parallelen β -Helix von BsPel unmittelbar vor Beginn des Faltblattstrangs PB1. Dieser Rest liegt im Inneren der parallelen β -Helix in einer stark hydrophoben Umgebung (siehe Abbildung 3.24). Durch die *cis*-Peptidyl-Prolylbindung an dieser Stelle werden zwei Argininreste zur putativen Zuckerbindungsstelle hin ausgerichtet. Dieser Prolinrest ist in der extrazellulären Pektat-Lyase-Superfamilie stark konserviert (Henrissat *et al.*, 1995), und liegt bei allen bis jetzt aufgeklärten Strukturen dieser Proteinfamilie in *cis*-Konformation vor (Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*, Pektat-Lyase A, C und E aus *Erwinia chrysanthemi* und Pektin-Lyase A und B aus *Aspergillus niger*) (Lietzke *et al.*, 1994; Mayans *et al.*, 1997; Pickersgill *et al.*, 1994; Vitali *et al.*, 1998; Yoder & Jurnak, 1995; Yoder *et al.*, 1993). Die einzige Ausnahme davon ist die alkalische Pektat-Lyase aus *Bacillus sp.* KSM-P15 (Akita *et al.*, 2001), die aber in der Protein-Überfamilie der Pektat- und Pektinlyasen ein Vertreter einer gesonderten Proteinfamilie darstellt.

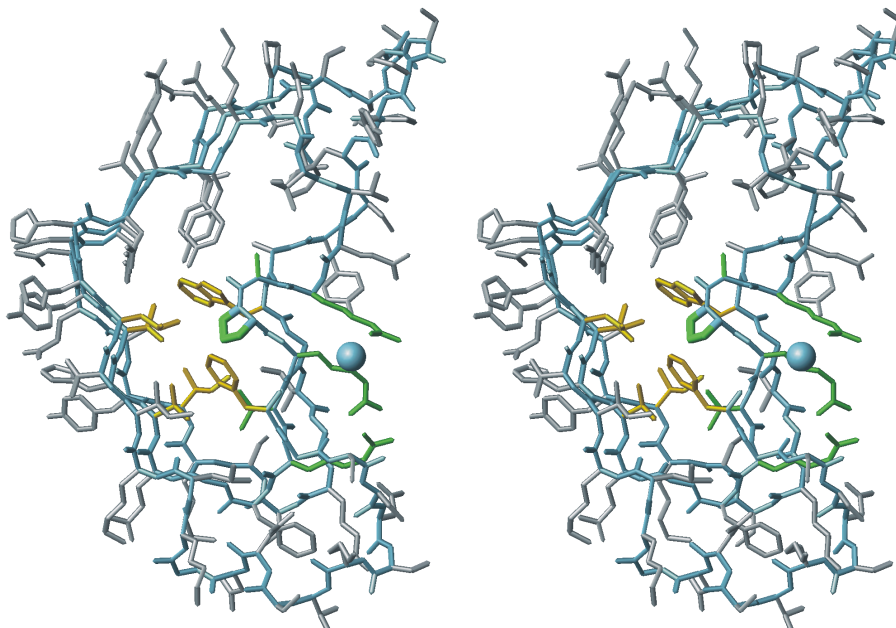


Abb. 3.24:

Stereodarstellung des Querschnitts durch einen Teil der β -Helix Region von BsPel (Reste 251-330). Das C^α -Rückgrat ist hellblau dargestellt; in grün sind die Reste 279(R), 280(A), 281(P), 282(R), 283(V), 284(R) dargestellt, die die *cis*-Peptidyl-Prolylbindung enthalten; in gelb sind die Reste dargestellt, die zum Prolinrest 281 einen Abstand von ≤ 5 Å besitzen [310(W), 268(L), 290(V), 288(V), 318(I), 251(F)]; in Cyan: Calcium-Ion (Kugelmodell) an der putativen Zuckerbindungsstelle. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

3.4.1 Klonierung und Reinigung

Die Zufallsmutagenese am Rest 281 wurde durch eine ortsgerichtete Mutagenese mit einem degenerierten Primer (siehe 2.1.8) durchgeführt. Durch die Mutation wurde eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle (*Ava* II) in das Expressionsplasmid PT7-BsPel an der Stelle 2166 eingeführt. Falschpositive Mutanten, die keine Aminosäure-Mutation an der Stelle 281 einführen, konnten durch einen zweiten Restriktionsverdau mit dem Enzym *Nar*I ausgeschlossen werden. Die Erkennungssequenz der *Nar*I-Restriktionsendonuklease überschneidet sich dabei mit den ersten beiden Basen für das Codon für Prolin (CCX). Die durch Zufallsmutagenese entstandene Aminosäure an der Stelle 281 von BsPel wurde durch Sequenzierung nachgewiesen. Es wurden 14 positive Klone sequenziert, dabei wurde bei einem Klon eine Leserasterverschiebung festgestellt. Die anderen kodierten für 8 verschiedene Mutationen (P281A, P281I, P281L, P281Y, P281F, P281G, P281S, Δ 280/281), dabei war der Austausch P281A 2x, der Austausch P281L 3x und der Austausch P281F 3x vorhanden. Bei den mehrmals vorhandenen Mutationen wurden jeweils die ausgewählt, deren DNA-Codon häufig in stark exprimierten Genen in *E. coli* vorkommt (Winnacker, 1984). Die DNA-Sequenz an der Mutationsstelle der einzelnen Mutanten ist im Anhang angegeben. Die Deletionsmutante Δ 280/281, in der das Hexanukleotid des Wildtyps fehlte, entstand entweder durch eine Verunreinigung im degenerierten Mutageneseprimer mit falscher Sequenz oder durch Sekundärstrukturbildung der Plasmid-DNA bei der Replikation. Sechs der Prolin-Mutanten wurden im Laufe dieser Arbeit näher charakterisiert.

Die Expression und die Aufreinigung der Prolinmutanten erfolgte nach dem gleichen Schema wie für den Wildtyp (siehe 3.1). Jedoch wurde als Expressionstemperatur 25°C gewählt, um die Ausbeute an eventuell destabilisierten Mutanten zu erhöhen.

3.4.2 Expressionsausbeute und spezifische Aktivität

Die Ausbeute an gereinigtem Protein unterschied sich bei den Prolinmutanten nur geringfügig von der des Wildtyps und lag bei ca. 1-7 mg pro Liter *E. coli* Kultur (Wildtyp. ca. 5-10 mg/L, siehe 3.1). Die genauen Ausbeuten der einzelnen Mutanten sind in der Tabelle 3.1 dargestellt.

Da die Mutationsstelle in der Nähe der putativen Zuckerbindungstelle lag und somit in der Nähe des aktiven Zentrums, wurde vermutet, daß die Mutation an dieser Stelle eine große Auswirkung auf die Aktivität hat. Durch Sequenzvergleich der Pektat- und Pektin-Lyasen war bekannt, daß Prolin an dieser Stelle konserviert und bei den bis jetzt bekannten Strukturen in *cis*-Konformation vorliegt. Somit wurde vermutet, daß auch die Peptidbindung zwischen den Resten 280-281 in den Mutanten in *cis*-Konformation ist. Dies konnte im Experiment jedoch nicht nachgewiesen werden, da alle Kristallisationsversuche mit Prolinmutantenprotein ebenso wie Kontrollversuche mit dem Wildtypprotein zu keiner Kristallisation führten.

Der Prolinrest 281 liegt im Wildtypprotein im Inneren der parallelen β -Helix in einer dicht gepackten hydrophoben Umgebung (Abbildung 3.24). Die Ergebnisse von (Eriksson *et al.*, 1992; Kellis *et al.*, 1989; Kellis *et al.*, 1988; Shortle *et al.*, 1990) zeigten, daß bei der Entfernung einer Methyl- bzw.

Methylengruppe von Aminosäuren aus dem Inneren von Proteinen durch Mutation mit einem durchschnittlichen Stabilitätsverlust von 4 - 6 kJ/mol gerechnet werden muß. Der Aktivitätsverlust der einzelnen Prolinmutanten (siehe Tabelle 3.1) folgte der erwarteten Destabilisierung. Alanin (67 \AA^3) ist Prolin (90 \AA^3) im Seitenkettenvolumen am ähnlichsten, und der Austausch von Prolin nach Alanin hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu verringert der Austausch nach Glycin das Seitenkettenvolumen an dieser Stelle und es entsteht ein Hohlraum, der durch Umlagerungen des Protein in der Umgebung kompensiert werden könnte. Die Aktivität der Glycinmutante betrug noch 60% im Vergleich zum Wildtyp. Einführung großer Seitenketten (Leucin (124 \AA^3), Isoleucin (124 \AA^3) und Phenylalanin (135 \AA^3)) anstelle von Prolin führte wahrscheinlich zu massiven Umlagerungen im Protein, und die Aktivität der Mutanten war dementsprechend gering. Bei der Deletionsmutante $\Delta 280/281$ war keine Aktivität mehr meßbar. Vermutlich sind hier die an der Aktivität beteiligten Reste Arg(279), Arg(282) und Arg(284) im Protein der Mutante nicht mehr richtig zur Zuckerbindungsstelle hin positioniert.

Mutante	Expressionsausbeute in mg pro Liter <i>E. coli</i> Kultur	Aktivität in % Wildtypaktivität
P281A	4.1	100
P281I	2.1	10
P281L	0.9	6
P281F	1.4	1.5
P281G	1.9	60
$\Delta 280/281$	7.0	nicht detektierbar

Tabelle 3.1: Expressionsausbeuten und Aktivität der einzelnen Prolinmutanten (BsPel-P281X)

3.4.3 Spektroskopische Charakterisierung der Prolinmutanten

Die Prolinmutanten wurden bezüglich ihrer spektroskopischen Signale (Absorption, Fluoreszenz, Fern-UV-CD und Nah-UV-CD) mit dem Wildtyp verglichen (Abbildung 3.25). Die Absorptionsspektren der Mutanten unterschieden sich nicht wesentlich von dem des Wildtyps und das Maximum lag bei allen Mutanten bei 279 nm. Die erhöhte Absorption einzelner Mutanten bei ca. 250 nm ist auf Lichtstreuung der Proben durch Anwesenheit von Aggregaten in der Proteinlösung zurückzuführen. Für alle Mutanten wurde mit dem Extinktionskoeffizient des Wildtyps ($1.75 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) gerechnet.

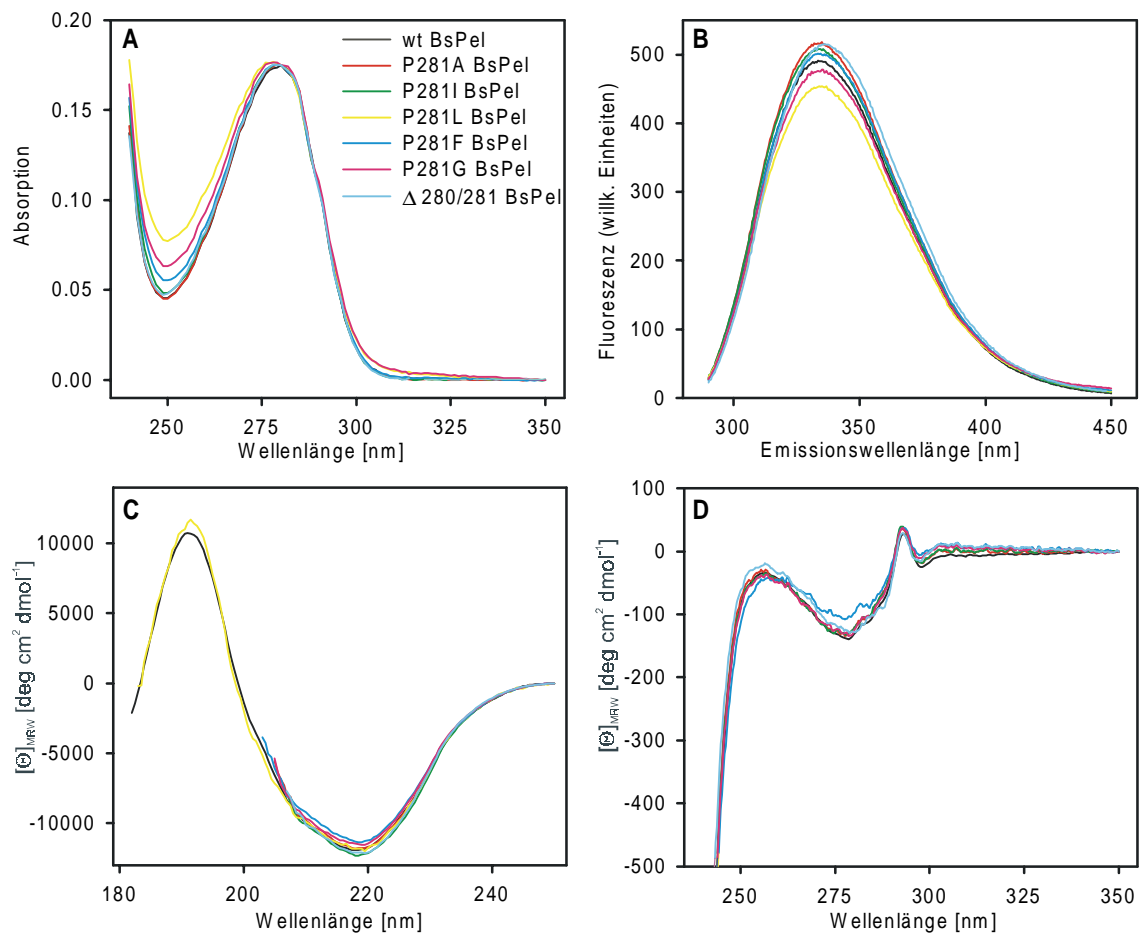


Abb. 3.25: Vergleich Wildtyp-BsPel — Prolinmutanten P281X

A: Absorptionsspektren von wt-BsPel und den Prolinmutanten in 20 mM NaP, pH 7 und Raumtemperatur; Proteinkonzentrationen: 100 µg/ml, Spektrale Bandbreite: 1 nm.
B: Fluoreszenzemissionsspektren bei 10°C von wt-BsPel und den einzelnen Prolinmutanten (Farbcode siehe Abb. 3.25 A); Pufferbedingungen: 20 mM NaP, pH 7; Proteinkonzentrationen: 5 µg/ml, Anregungswellenlänge: 280 nm, spektrale Bandbreiten für Anregung: 2.1 nm und Emission 4.2 nm.
C: Fern-UV CD-Spektren von wt-BsPel und den Prolinmutanten bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; c = 0.5 mg/ml (außer bei P281L: 0.1 mg/ml), d = 0.1 mm bzw. 1mm, spektrale Bandbreite: 1 nm; (Farbcode siehe Abb. 3.25 A).
D: Nah-UV CD-Spektren von wt-BsPel und den Prolinmutanten bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; c = 0.5 mg/ml, d = 4 mm, spektrale Bandbreite: 1 nm; (Farbcode siehe Abb. 3.25 A).

Die Fluoreszenzemissionsspektren der Prolinmutanten (außer bei der Deletionsmutante) waren vergleichbar in Form des Spektrums und der Lage des Maximums (bei 334 nm) mit dem des Wildtyps. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß sich die Proteinstruktur der Prolinmutanten nicht wesentlich von der des Wildtypproteins unterschied. Das Maximum des Fluoreszenzemissionsspektrums der Deletionsmutante (Δ280/281) war dagegen zu höheren Wellenlängen verschoben (336 nm), was auf eine veränderte Tertiärstruktur oder das Vorliegen von Aggregaten in der Proteinlösung schließen ließ.

Neben der Fluoreszenzspektroskopie können lokale Änderungen in der Umgebung der aromatischen Reste auch mit CD-Spektroskopie im nahen UV gemessen werden. Dabei zeigte sich, daß die

Spektren der Prolinmutanten außer bei der P281F-Mutante sehr ähnlich in Form und Lage der Maxima bzw. Minima waren. Der Unterschied in dem Spektrum der Phenylalaninmutante kann nicht dadurch erklärt werden, daß diese Mutante einen zusätzlichen aromatischen Rest besitzt, da Phenylalanin in diesem UV-Bereich nicht absorbiert. Wahrscheinlich ist durch die Einführung des Phenylalaninrestes im Inneren der β -Helix eine starke strukturelle Umordnung im Proteins erfolgt, die zu einer veränderten Tertiärstruktur führte.

Das CD-Signal im fernen UV ist ein Maß für die Sekundärstruktur eines Proteins. Für alle P281X-Mutanten ergaben sich im Rahmen des Meßfehlers identische Spektren. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die Einführung der Prolinmutation zu keinen gravierenden Änderungen in der Sekundärstruktur des Proteins führte.

3.4.4 *In vitro* Faltung und thermodynamische Stabilität der Prolin-Mutanten

3.4.4.1 Entfaltungs- und Faltungskinetiken der Prolin-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Alle Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken der Prolinmutanten wurden als Änderung in der Fluoreszenz bei 10°C und einer Proteinkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Dabei zeigte sich, daß eine Verdünnung des "nativen Proteins" der Deletionsmutante ($\Delta 280/281$) in Nativpuffer zu einem Anstieg in der Fluoreszenz führte. Dies ist wahrscheinlich auf niedermolekulare Aggregate in der Proteinstammlösung zurückzuführen, die sich bei Verdünnung in Puffer wieder lösten. Da somit Renaturierungskinetiken der Deletionsmutante nur sehr schwer interpretierbar waren, wurde auf eine weitere Untersuchung dieser Mutante verzichtet.

Die Denaturierung der Mutanten war gegenüber dem Wildtyp stark beschleunigt und die GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung war für die einzelnen Mutanten sehr unterschiedlich. P281A erwies sich als die stabilste Mutante mit einer Relaxationszeit der Entfaltung bei 4 M GdmCl von ca. 140 s (τ wt-BsPel bei 4 M GdmCl: ca. 1.5 h). Die P281G-Mutante hatte bei dieser GdmCl-Konzentration eine Relaxationszeit der Entfaltung von ca. 13 s. Die Denaturierung der P281L-, P281I- und P281F-Mutante konnte nur bis zu einer GdmCl-Konzentration von ca. 2 M zeitlich aufgelöst werden. Dabei war die Stabilität der P281L- und P281I-Mutante im experimentellen Fehler gleich. In Abbildung 3.26 ist die GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung dargestellt. Dabei fällt auf, daß bei den Mutanten P281G, P281L, P281I und P281F kein linearer Zusammenhang zwischen apparter Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung und des Denaturierungsmittels besteht, sondern die Rate der Entfaltung zu niederen GdmCl-Konzentrationen stark verlangsamt ist. Teilweise konnten bei diesen Bedingungen auch die Kinetiken der Entfaltung nicht mehr durch eine einfache monoexponentielle Funktion beschrieben werden (Daten nicht gezeigt). Solche "gekrümmten" Entfaltungszweige können zum einen erklärt werden durch eine Kopplung der Entfaltung mit Prolinisomerisierung (Kiefhaber *et al.*, 1992; Kiefhaber & Schmid, 1992). Zum anderen wurden aber

Ergebnisse

solche gekrümmten Chevronplots auch für das humane Spliceosom-Protein U1A veröffentlicht. Die Faltung von U1A kann nach dem Zweizustandsmodell beschrieben werden, und die Krümmung im Chevronplot wurde als Abhängigkeit des Übergangszustands der Faltung bzw. Entfaltung vom Denaturierungsmittel interpretiert (Nagai *et al.*, 1990; Otzen *et al.*, 1999; Silow & Oliveberg, 1997).

Die Renaturierung der Prolinmutanten war gegenüber dem Wildtyp nicht vereinfacht und mußte mit mindestens zwei Exponentialfunktionen beschrieben werden. Dabei war die erste Phase der Rückfaltung der Mutanten bei 10°C annähernd gleich schnell wie die des Wildtyps und die zweite Phase ca. um einen Faktor von 1.5 – 2 verlangsamt. Die GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstante der Faltung war ähnlich zum Wildtyp und lag zwischen den einzelnen Mutanten im Fehlerbereich. Bei mittleren GdmCl-Konzentrationen (ca. 1 M GdmCl) kam es auch bei der Rückfaltung der Prolinmutanten zu einer drastischen Verlangsamung der Kinetik und die Kinetiken konnten in diesem Bereich mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Die Abhängigkeit der Renaturierungsamplitude der langsamen Faltungskinetik von der GdmCl-Konzentration ist für die P281A-Mutante in Abbildung 3.27 gezeigt und ist innerhalb des experimentellen Fehlers identisch mit dem Wildtyp. Es kann also angenommen werden, daß die Faltung der Prolinmutanten unter den gegebenen Bedingungen wie die des Wildtyps verläuft und die geschwindigkeits-bestimmenden Schritte der Faltung durch die Mutation nicht verändert sind.

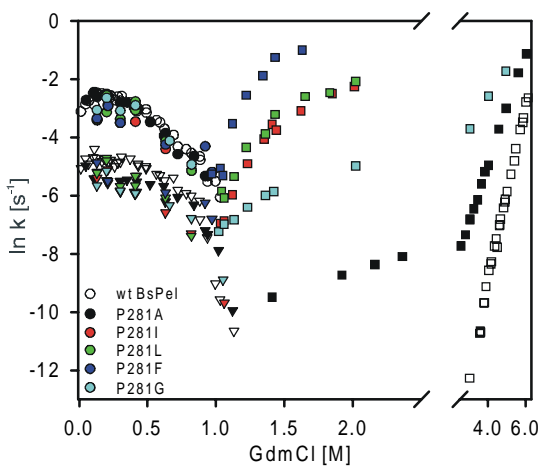


Abb. 3.26: Chevron Plot: Prolinmutanten versus wt-BsPel

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (k_1 : ○) und Rückfaltung (k_2 : ▽) zwischen wt-BsPel und den Prolinmutanten (Farbcode ist in der Abbildung angegeben); Die Datenpunkte resultieren aus Fluoreszenzkinetikmessungen bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7; Proteinkonzentration: 5 µg/ml; Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm in fluoreszenzgeeigneten Plastikkuvetten gemessen (spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm und Emission 4.2 nm).

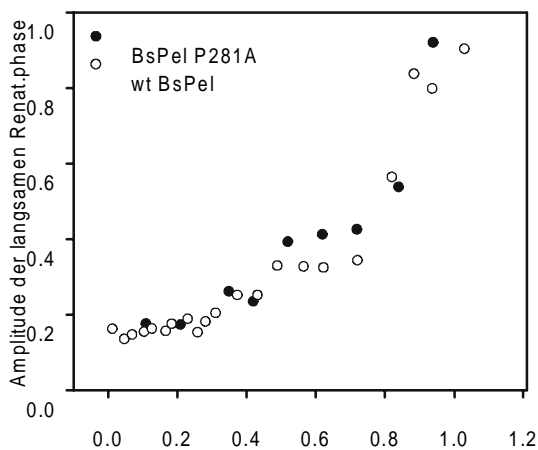


Abb. 3.27:

Vergleich der relativen Amplitude der langsamen Rückfaltungskinetiken resultierend aus Fluoreszenzkinetikmessungen (siehe Abbildung 3.26) bei 10°C zwischen wt-BsPel und P281A-Mutante.

3.4.4.2 Rückfaltungs- und Entfaltungsübergänge der Prolin-Mutanten

GdmCl-induzierte Faltungsübergänge der einzelnen Prolinmutanten zeigten bei Messungen der Tryptophanfluoreszenz bei 10°C einen kooperativen und reversiblen Phasenübergang. Dabei konnten keine Stabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Prolinmutanten gefunden werden, und die Übergangsmittelpunkte bei den Mutanten lagen alle bei ca. 1.1 M GdmCl, dem Übergangsmittelpunkt des GdmCl-induzierten Renaturierungsübergangs des Wildtyps. Um eventuelle kleine Stabilitätsunterschiede zwischen den Mutanten zu bestimmen, wurden Faltungsübergänge mit Harnstoff als Denaturierungsmittel gemessen. Die destabilisierende Wirkung von Harnstoff ist geringer als bei GdmCl und somit sollten kleine Stabilitätsunterschiede zwischen den einzelnen Mutanten besser aufgelöst sein. Wildtypprotein läßt sich in Harnstoff jedoch nicht denaturieren, deshalb wurden die einzelnen Denaturierungsansätze in jeweils 4 M GdmCl über Nacht bei 10°C inkubiert und anschließend für den Renaturierungsübergang in die jeweiligen Harnstoffpuffer 1:50 verdünnt. Analog war für den Denaturierungsübergang in den jeweiligen Harnstoffpuffern 0.08 M GdmCl enthalten. In Abbildung 3.28 A sind die normierten Gleichgewichtsübergänge der Ent- und Rückfaltung der Prolinmutanten abgebildet. Die Übergangsmittelpunkte der Harnstoffübergänge der einzelnen Prolinmutanten waren nicht sehr unterschiedlich und entsprachen dabei nicht den Erwartungen aus den Ergebnissen der Denaturierungskinetiken in GdmCl. In Tabelle 3.2 sind die Harnstoffkonzentrationen beim Übergangsmittelpunkt der einzelnen Mutanten angegeben.

	[Harnstoff] _{1/2} [M]
BsPel-P281A	2.65
BsPel-P281I	2.52
BsPel-P281L	2.48
BsPel-P281F	2.35
BsPel-P281G	2.43
Wildtyp-BsPel (Renaturierungsübergang)	2.65

Tabelle 3.2:

Übergangsmittelpunkte der Harnstoff-induzierten Faltungsübergänge der BsPel-P281X-Mutanten

Inwieweit die Gleichgewichtsfaltungsübergänge der Prolinmutanten dem Zweizustandsmodell entsprachen, wurde anhand der Mutante P281A geprüft. Beim Zweizustandsmodell gilt, daß im Gleichgewicht nur gefaltetes oder ungefaltetes Protein vorliegen darf und keine Population teilgefalteter Intermediate (Cantor & Schimmel, 1980). Somit sollte bei Faltungsübergängen, die mit verschiedenen Techniken gemessen wurden, der aus dem jeweiligen Signal berechneten Anteil an

Ergebnisse

entfaltetem Protein unabhängig von dem Beobachtungsparameter sein (Brandts, 1969). Die Abbildung 3.28 B zeigt GdmCl-induzierte Faltungsübergänge von P281A, gemessen zum einen in der Tryptophanfluoreszenzemission und zum anderen in der Aktivität. Es zeigte sich, daß die Faltungsübergänge bei beiden Meßparametern übereinstimmen und einen kooperativen Phasenübergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 1.1 M GdmCl zeigten. Bei der Beschreibung der Fluoreszenzdaten nach dem Zweizustandsmodell ergab sich eine freie Stabilisierungsenthalpie in Nativpuffer von -64.2 ± 0.43 kJ/mol und eine Kooperativität des Übergangs von -58.2 ± 0.34 kJ mol⁻¹ M⁻¹. Die Ergebnisse waren mit denen aus dem Aktivitätsübergang innerhalb des experimentellen Fehlers gleich ($\Delta G_{(\text{Nativpuffer})} = -63.3 \pm 0.70$ kJ/mol, $m = -58.5 \pm 0.64$ kJ mol⁻¹ M⁻¹).

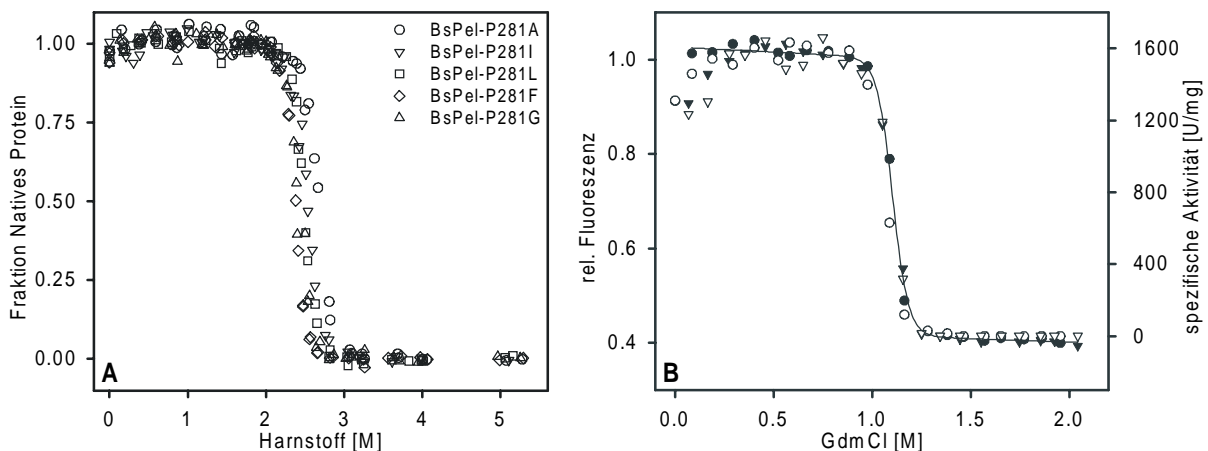


Abb. 3.28:

A: Harnstoffinduzierte De- und Renaturierungsübergänge der einzelnen Prolinmutanten bei 10°C; Pufferbedingungen: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7; in allen Proben war 0.1 M GdmCl enthalten. Die Daten entsprechen Fluoreszenzmessungen bei 328 nm (Anregung 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm; Emission 4.2 nm), die normiert wurden zwischen 1 (vollständig gefaltet) und 0 (vollständig entfaltet). Die Datenpunkte wurden nach 1 bzw. 3 Tagen Inkubation bei 10°C aufgenommen. **B:** GdmCl-induzierte De- (●) und Renaturierungsübergänge (▼) von P281A bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7; (●,▼): Beobachtete Änderung in der Proteinfluoreszenzemission bei 328 nm (Anregung 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2,1 nm; Emission 4.2 nm); (○,▽) Beobachtete Änderung in der Pektat-Lyase Aktivität; Die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 µg/ml, die Messungen erfolgten nach 3 Tagen Inkubation der Proben bei 10°C; (—) Regression der Fluoreszenzdaten nach dem Zweizustandsmodell, dabei wurden die Renaturierungsproben der ersten zwei GdmCl-Konzentrationen für die Regression ausgeschlossen.

3.4.4.3 Bedeutung der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierung für die Renaturierung der Prolin-Mutante P281A

Es wurde für einige Proteine in der Literatur beschrieben, daß nach Austausch eines konservierten *cis*-Prolins im Wildtypproteins gegen einen anderen Rest, die aminoterminal diesem Rest benachbarte Bindung eine *cis*-Konformation einnehmen kann (Herzberg, 1991; Mayr *et al.*, 1994; Pappenberger *et al.*, 2001; Strynadka *et al.*, 1992). Dabei zeigten die Ergebnisse von Ribonuklease T1- und β -Lactamase-Faltungsstudien, daß die *trans* \rightarrow *cis* Isomerisierung der Nicht-Prolyl-Peptidbindung relativ langsam (Relaxationszeit von mehreren 100 Sekunden bei 25°C) verläuft und der

geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung bei diesen Proteinen ist (Odefey *et al.*, 1995; Vanhove *et al.*, 1998a; Vanhove *et al.*, 1998b; Vanhove *et al.*, 1995; Vanhove *et al.*, 1996; Wheeler *et al.*, 1998). Dagegen ist die *cis* → *trans* Isomerisierung für Nicht-Prolyl-Peptidbindungen gegenüber der von Peptidyl-Prolyl-Peptidbindungen stark beschleunigt (ca. um einen Faktor von 50 bis 100). Deshalb sollte anhand von Doppelsprungexperimenten die Entstehung der langsam faltenden Spezies der P281A-Mutante bestimmt werden.

Abbildung 3.29 zeigt die Zunahme der relativen Amplitude der langsamen Renaturierungsphase als Funktion der Entfaltungszeit (0.5 – 60 min) der P281A-Mutante. Die Daten resultieren aus Fluoreszenzkinetikmessungen. Dabei entsteht die langsam faltende Spezies bei der P281A-Entfaltung mit einer Relaxationszeit von ca. 224 s. Dieser Wert stimmt überein mit dem Wert, der für den Wildtyp ($\tau = 240$ s) bestimmt wurde. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Isomerisierung der *cis*-Prolyl-Peptidbindung an der Stelle 280-281 im BsPel-Protein nicht allein verantwortlich sein kann für die langsame Renaturierung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei BsPel konnte bei PelC aus *Erwinia chrysanthemi* die Isomerisierung des *cis*-Prolins (220), daß an gleicher Stelle in der Struktur vorkommt, als einer der beiden geschwindigkeitsbestimmenden Schritte der PelC-Faltung bestimmt werden (Kamen & Woody, 2002a; Kamen & Woody, 2002b).

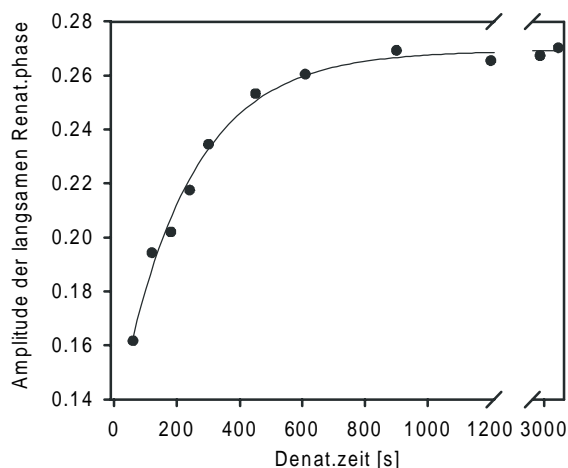


Abb. 3.29:

Entstehung der langsam faltenden Spezies bei der Entfaltung der P281A-Mutante bei 10°C. Pufferbedingungen: 20 mM NaP, 0.1 % (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH7. Dazu wurde P281A-BsPel für verschieden lange Zeiten entfaltet bei 6.9 M GdmCl und anschließend rückverdünnt in Nativpuffer (0.43 M GdmCl, 8 µg/ml Protein). Die jeweiligen Rückfaltungskinetiken wurden als Änderung der Fluoreszenzemission bei 328 nm detektiert (spektrale Bandbreiten siehe Abb. 3.26). Die relative Amplitude der langsamen Renaturierungsphase wurde gegen die Denaturierungszeit aufgetragen und mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben ($\tau = 224$ s)

3.4.4.4 Reverse Doppelsprungexperimente zur Unterscheidung der nativen Spezies und der Intermediate bei der Rückfaltung der Prolin-Mutante P281A

Durch reverse Doppelsprungexperimente konnte nachgewiesen werden, daß die langsame Renaturierungsphase bei der Rückfaltung der Prolinmutante P281A, genauso wie beim Wildtyp-Protein, durch die Umwandlung eines transienten *on-pathway* Intermediates zur nativen Spezies verursacht wird (Abbildung 3.30). Dazu wurde in einem ersten Mischschritt die Renaturierung von BsPel-P281A bei 10°C und einer GdmCl-Konzentration von 0.21 M initiiert und für eine bestimmte Zeit bei dieser Bedingung gewartet. Anschließend wurde in einem zweiten Mischschritt zu leicht

Ergebnisse

denaturierenden Bedingungen gewechselt und die Entfaltung der eventuell populierte Intermediate in der Änderung der Fluoreszenzemission verfolgt. Dabei entstand mit einer Relaxationszeit von ca. 15 s ein Intermediat, das mit der gleichen Relaxationszeit verschwindet, wie der native Zustand entsteht ($\tau = 116$ s). Die Relaxationszeiten entsprachen dabei den beiden Phasen der Fluoreszenzkinetik von P281A-BsPel unter den gleichen Renaturierungsbedingungen. Dadurch, daß das reverse Doppelsprungexperiment bei der Prolinmutante nur unter manuellen Mischbedingungen durchgeführt wurde, konnte die Entstehung von zwei unabhängigen parallelen Intermediaten bei der Rückfaltung nicht aufgelöst werden.

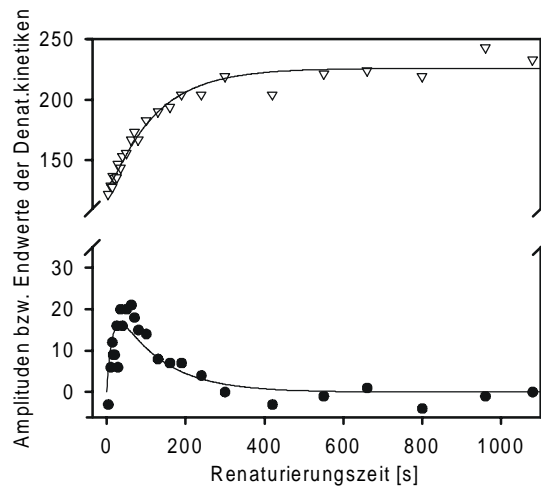


Abb. 3.30:

reverse Doppelsprungexperimente zur Bestimmung des Faltungsintermediats und der nativen Spezies bei der Rückfaltung von P281A-BsPel; Pufferbedingungen: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween 20, 2 mM DTE, pH 7. Vollständig entfaltetes Protein (0.5 mg/ml P281A, 4 M GdmCl) wurde in Nativpuffer bei 10°C in fluoreszenzgeeigneten Plastikkuvetten manuell verdünnt (8 µg/ml BsPel, 0.2 M GdmCl) und für verschiedene lange Zeiten bei der Renaturierungsbedingungen inkubiert, anschließend wurde in der zweiten Verdünnung (5 µg/ml P281A, 1.35 M GdmCl) zu leicht denaturierenden Bedingungen gesprungen und die Fluoreszenzemissionsänderung bei 328 nm verfolgt (Anregung 280 nm, spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm; Emission 4.2 nm). Dabei entspricht die Amplitude der Entfaltungskinetiken (●) der Menge an Intermediat und der Endwert der Entfaltungskinetiken (▽) der Menge an nativem Protein zu der jeweiligen Renaturierungszeit. Die Linien stellen eine nicht lineare Regression der Daten nach dem Faltungsmodell $U \rightarrow I \rightarrow N$ dar (siehe 2.1.15.3).

3.5 Mutationen in der Asparagin-Leiter von BsPel

Eine auffallende Eigenschaft in den bis jetzt bekannten Strukturen von parallelen β -Helices ist das Vorkommen "gestapelter" Interaktionen von Aminosäureresten im Inneren der β -Helix (Abbildung 3.31 A). Ein Asparaginstapel wurde bis jetzt nur in Pektat- und Pektin-Lyasen gefunden. Die Asn-Leiter liegt in der β -Helix in Turn 2 zwischen den Faltblattsträngen PB2 und PB3. Die Aspariginreste sind so zueinander gestapelt, daß eine maximale Anzahl von Wasserstoffbrücken ausgebildet werden kann (Yoder et al., 1993c). Eine Mutationsstudie in PelC zeigte, daß ein Austausch eines Asparaginrestes im Stapel keine Expression von löslichen Protein ergab (Kita et al., 1996). Die Ausbildung eines Asn-Stapels in Pektat- und Pektin-Lyasen könnte somit einen wichtigen Beitrag zur Stabilität dieser Proteine leisten und wurde auch als möglicher Faltungsnukleus diskutiert. In dieser Arbeit sollte diese Theorie anhand einer Mutationsstudie an BsPel untersucht werden. BsPel besitzt einen Asparaginstapel mit 4 Asn-Resten (N240, N271, N293, N323). Der mittlere Asn-Rest (271) wurde für die Mutationsstudie ausgewählt und gegen verschiedene Aminosäurereste ausgetauscht.

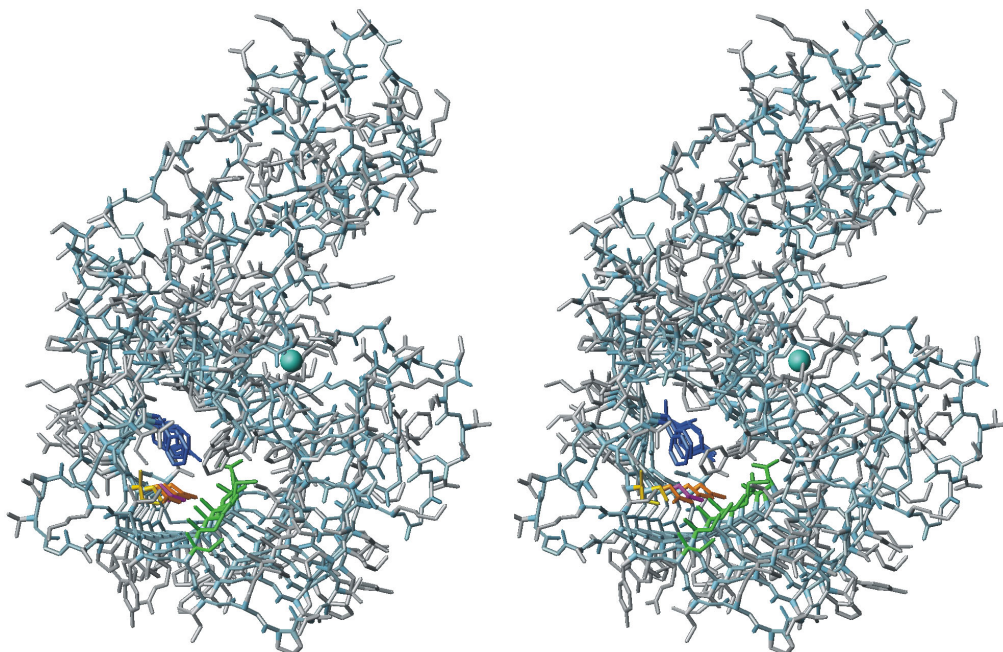


Abb. 3.31 A:

Stereodarstellung des Querschnitts durch BsPel. Das C $^{\alpha}$ -Rückgrat ist hellblau dargestellt; in cyan: Calcium Ion; in grün: aliphatischer Stapel [56(I), 131(I), 154(I), 196(I), 237(M), 268(L), 290(V), 320(A), 347(L)]; in blau: aromatischer Stapel [159(F), 201(F), 242(Y), 273(Y), 295(Y), 325(I)]; in gelb / orange: Asparagin-Leiter [157(I), 199(C), 240(N), 271(N), 293(N), 323(N)]; Die Mutationsstelle (N271X) ist in magenta dargestellt. Die Reste in den Stapeln sind von oben nach unten angegeben.

3.5.1 Klonierung

Die Zufallsmutagenese am Rest 271 wurde durch eine ortsgerichtete Mutagenese mit einem degenerierten Primer (siehe 2.1.8) durchgeführt. Der Primer enthielt als Codon für die Mutagenesestelle BNN, das bedeutete, an erster Stelle des Codons konnten alle Basen außer Adenin vorkommen, an zweiter und dritter Stelle waren alle 4 Basen möglich. Durch diese Codonauswahl war gewährleistet, daß kein Codon für Asparagin, aber auch kein Codon für Lysin, Methionin, Isoleucin und Threonin möglich war. Da Threonin aber zu Asparagin sehr ähnlich in Polarität und Seitenkettenvolumen ist, wurde dieser Austausch durch eine zweite ortsgerichtete Mutagenese mit einem Primer speziell für den Austausch Asparagin zu Threonin gewährleistet. Durch die Mutagenese wurde in beiden Fällen eine Restriktionsschnittstelle (*Rsa* I) im Expressionsplasmid PT7-BsPel an der Stelle 2137 zerstört. Durch Sequenzierung des Plasmides wurden die durch Mutagenese entstandenen Aminosäuren an der Stelle 271 in BsPel bestimmt. Es wurden 21 positive Klone sequenziert, dabei wurde bei einem Klon eine Leserasterverschiebung festgestellt. Die anderen kodierten für 8 verschiedene Mutationen (N271R, N271T, N271A, N271L, N271P, N271D, N271E, N271G), dabei war der Austausch N271P 6x, der Austausch N271T 4x, der Austausch N271L 4x und der Austausch N271A 2x vorhanden. Bei den mehrmals vorhandenen Mutationen wurden jeweils die ausgewählt, deren DNA-Codon häufig in stark exprimierten Genen in *E. coli* vorkommt (Winnacker, 1984). Die Codon-Information der einzelnen Mutanten ist im Anhang angegeben. Der Austausch N271T hätte eigentlich mit dem so gewählten degenerierten Primer nicht vorkommen dürfen. Wahrscheinlich war der Mutageneseprimer verunreinigt mit einem Primer der an der Mutationstelle nicht nur das Codon BNN, sondern auch NNN zuließ.

Die Expression und Aufreinigung der Asparaginmutanten erfolgte nach gleicher Weise wie für den Wildtyp (siehe 3.1). Es wurde als Expressionstemperatur jedoch 25°C gewählt, um eine Faltung instabiler Mutanten zu gewährleisten.

3.5.2 Expressionsausbeute und spezifische Aktivität

Abbildung 3.32 A/B zeigt eine Westernblotanalyse der Expression der Asparaginmutanten. Dabei zeigte sich, daß die Produktion von löslichem Protein bei allen Mutanten gegenüber dem Wildtyp sehr reduziert war (5 - 30% Wildtypproteinmenge). Dabei entsprechen die geringsten detektierbaren Proteinausbeuten ungefähr der Nachweisgrenze des Tests. Der Expressionsgrad der einzelnen Mutanten unterschied sich dabei nicht. Vielmehr kam es auf Proteinebene bei den Mutanten vermehrt zur Aggregation und Proteindegradation, was eine Erhöhung der Asparaginmutantenproteine in der Pelletfraktion des Zelllysats zur Folge hatte. Daneben traten auch in allen Pelletfraktionen der Asparaginmutantenzelllysate zwei spezifische Abbauprodukte mit einer Molekulargewicht von ca. 35 bzw. 30 kDa auf. Eine densitometrische Auswertung des Westernblots erlaubte eine ungefähre Angabe der Expressionsausbeuten bei den einzelnen Mutanten.

Die Ausbeute an löslichem Protein bei den einzelnen Mutanten entsprach dabei den physikalischen Eigenschaften der eingeführten Aminosäurereste. Threonin, als polarer Rest und einem Seitenkettenvolumen ähnlich wie Asparagin, hatte die höchste Ausbeute von ca. 30% der

Wildtypproteinmenge. Eine Einführung von geladenen Resten (Arginin und Aspartat), oder von sterisch starren Resten wie Prolin an der Stelle des Asparagins wirkte sich stark negativ auf die Ausbeute aus (< 5% der Wildtypproteinmenge). Eine Ausnahme davon machte der Austausch von Asparagin nach Glutamat, mit einer ähnlich hohen Ausbeute an löslichem Protein wie bei dem Austausch zu Threonin. Der Grund dafür konnte daran liegen, daß Glutamat eine Methylengruppen mehr als Asparagin besitzt und die negative Ladung von Glutamat mehr im Inneren der β -Helix zu liegen kommt und nicht zwischen den polaren Gruppen der benachbarten Asparaginreste. Im Inneren der β -Helix wurden zwischen den Tyrosinresten 242, 273 und 295 des aromatischen Stapels zwei Wassermoleküle (Nr. 421 und Nr. 433) in der Kristallstruktur aufgelöst. Diese befinden sich im Abstand von ca. 6 Å von der Mutationsstelle und kompensieren eventuell die negative Ladung von dem Glutamatrest (siehe Strukturdetailstudie in der Abbildung 3.31 B). Die Einführung großer hydrophober Reste (N271L) oder der Austausch der Seitenkette gegen eine Aminosäure mit relativ geringen Seitenkettenvolumen (N271A und N271G) hatte einen ähnlich destabilisierenden Effekt auf das Protein und die Ausbeute an löslichem Protein reduzierte sich bei diesen Mutanten zu ungefähr 10 % der Wildtypproteinmenge.

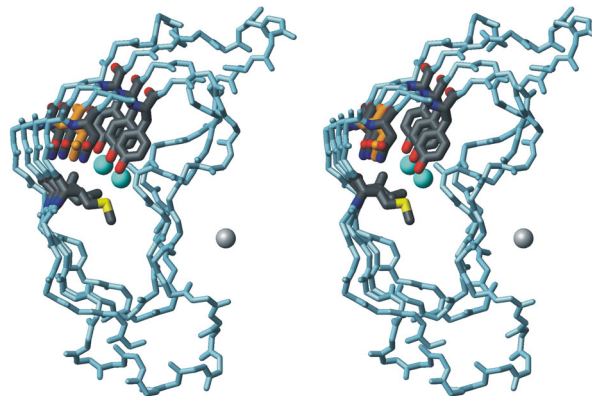


Abb. 3.31 B:

Stereodarstellung einer Detailansicht eines Querschnittes durch BsPel (Reste: 230-330) Das C $^{\alpha}$ -Rückgrat ist hellblau dargestellt; in cyan: Wassermoleküle 421 bzw. 433 Ion und in grau: Calciumion an der putativen Zuckerbindestelle. Die Reste des Asparaginstapels (N240, N271, N293, N323), des Aromatischen Stapels (Y242, Y273, Y295) und des aliphatischen Stapels (M237, L268, V290) sind hervorgehoben dargestellt. Die Mutationsstelle N271 ist in orange.

Da im Rohextrakt die Aktivität der einzelnen Mutanten nicht bestimmbar war, erfolgte eine teilweise Aufreinigung und Anreicherung der Proteinmenge der einzelnen Mutanten im "batch"-Verfahren. Dazu wurde der dialysierte Überstand des Zelllysats der Asn-Mutanten auf die gleiche Gesamteproteinkonzentration eingestellt und anschließend mit dem gleichen Volumen an Q-Sepharosematerial (Anionenaustauscher) in einem Puffer bei pH 8.5 versetzt. Durch den hohen Isoelektrischen Punkt von BsPel bindet das Protein bei pH 8.5 nicht an den Anionenaustauscher, im Gegensatz zu den meisten *E. coli* Proteinen, die einen Isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 5 - 7

Ergebnisse

haben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min wurde das Q-Sepharosematerial abzentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen an SP-Sepharose (Kationenaustauscher) versetzt. Nach einmaligem Waschen des Ionenaustauschers erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einer 0.5 M NaCl-Lösung. Aliquots des Eluats wurde anschließend durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die durch dieses Verfahren gewonnenen Proteinlösungen der Asparaginmutanten zeigten nach Coomassiefärbung der Gele nur noch eine Verunreinigung mit einer Molekularmasse von ca. 30 kDa. Durch densitometrischer Auswertung der Gele zeigte sich ungefähr das gleiche Expressionsmuster der Asparaginmutanten, wie schon durch Westernblotanalyse bestimmt worden war (siehe Abbildung 3.32). Bei den Mutanten N271R und N271P war die Ausbeute an gereinigtem Protein unter der Nachweisgrenze. Die spezifische Aktivität der einzelnen aufgereinigten Asparaginmutanten wurde bestimmt und war bei allen in einem ähnlichen Größenverhältnis wie die Aktivität des Wildtypproteins (ca. 90%) (Daten nicht gezeigt).

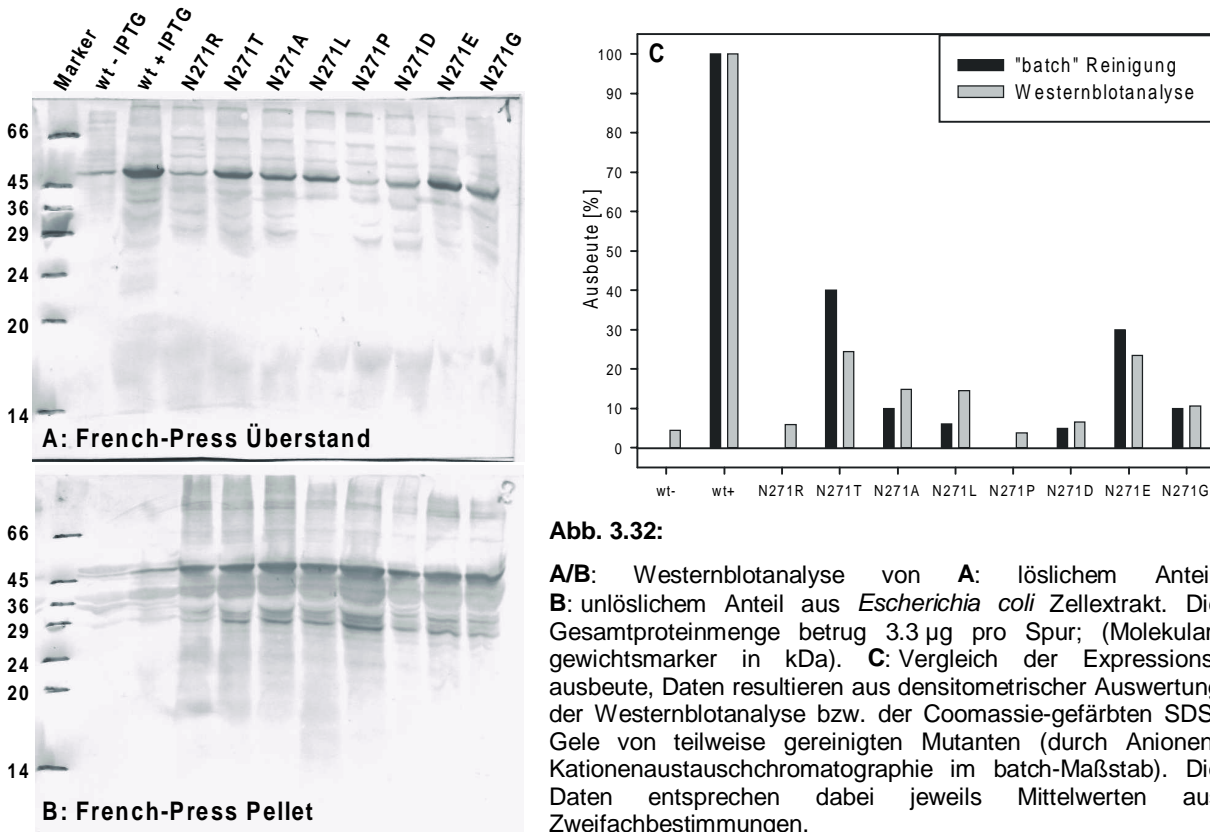


Abb. 3.32:

A/B: Westernblotanalyse von **A:** löslichem Anteil, **B:** unlöslichem Anteil aus *Escherichia coli* Zellextrakt. Die Gesamtproteinmenge betrug 3.3 µg pro Spur; (Molekulargewichtsmarker in kDa). **C:** Vergleich der Expressionsausbeute, Daten resultieren aus densitometrischer Auswertung der Westernblotanalyse bzw. der Coomassie-gefärbten SDS-Gele von teilweise gereinigten Mutanten (durch Anionen-Kationenaustauschchromatographie im batch-Maßstab). Die Daten entsprechen dabei jeweils Mittelwerten aus Zweifachbestimmungen.

3.5.3 Spektroskopische Charakterisierung der Asparaginmutanten N271T und N271A

Die Mutanten BsPel-N271T und -N271A wurden als Beispielproteine ausgewählt, um die Stabilität dieser Proteine im Vergleich mit dem Wildtypprotein zu untersuchen. Threonin, ein polarer Rest, ist zum einen ähnlich zu Asparagin im Gegensatz zu Alanin, einem aliphatischen Rest, und kann außerdem eine der beiden Wasserstoffbrücken zu einem benachbarten Asparaginrest ausbilden.

Um eventuelle kleine Konformationsunterschiede in Sekundär- bzw. Tertiärstruktur in den Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein aufzuzeigen, wurden Absorptions-, Fluoreszenzemissions- und CD-Spektren gemessen (Abbildung 3.33). Die Bestimmung der genauen Proteinkonzentration in Lösung erfolgte durch Absorptionsspektroskopie, dabei wurde für die Asparaginmutanten der gleiche Extinktionskoeffizient wie für das Wildtypprotein ($1.75 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) verwendet.

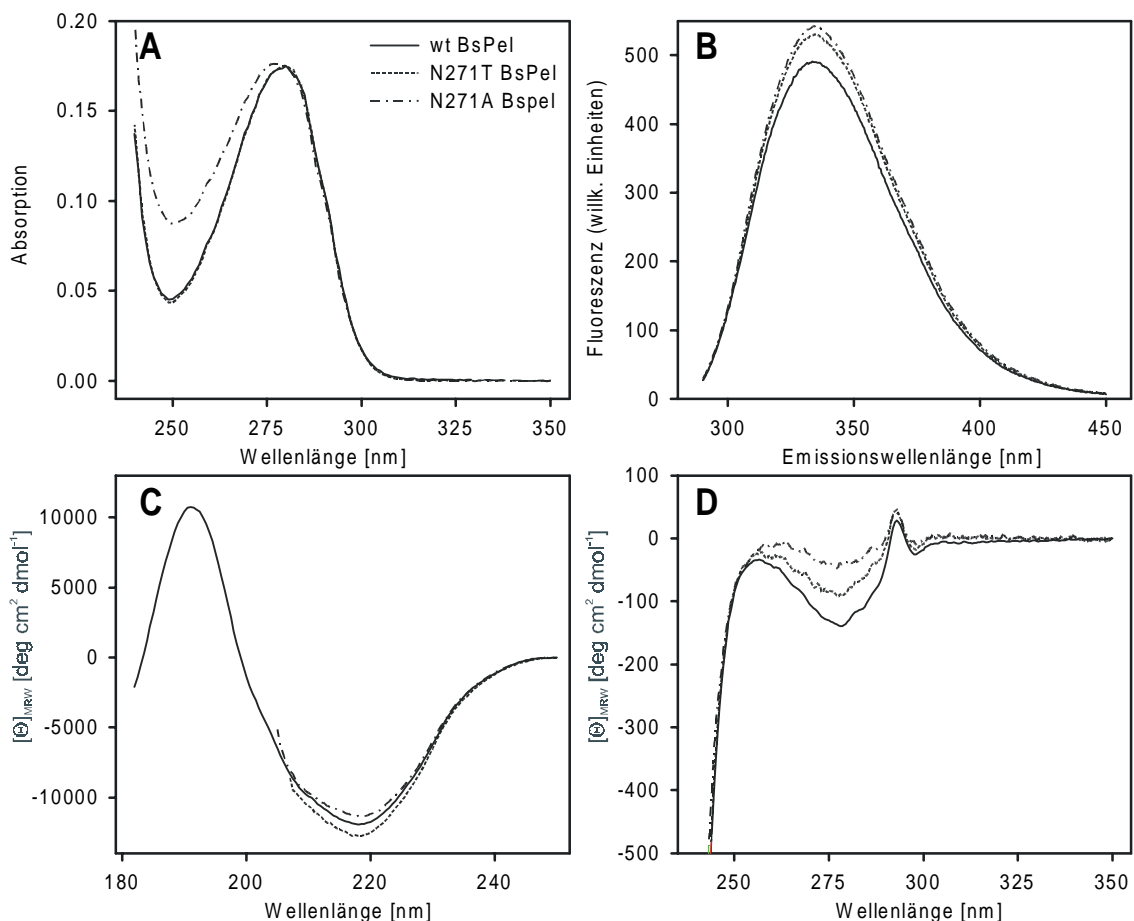


Abb. 3.33: Vergleich zw. Wildtyp-BsPel (—) und den Asparaginmutanten N271T(- - -) bzw. N271A (- · - · -)

A: Absorptionsspektren in 20 mM NaP, pH 7 und Raumtemperatur; Proteinkonzentrationen: 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Spektrale Bandbreite: 1 nm; Spektrum von N271A wurde korrigiert für die Lichtstreuung **B:** Fluoreszenzemissionsspektren bei 10°C; Puffer: 20 mM NaP, pH 7; (Proteinkonzentration: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Anregungswellenlänge: 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm, Emission 4.2 nm) **C:** CD-Spektren im fernen UV bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; $c = 0.2 \text{ mg}/\text{ml}$, $d = 0.1 \text{ mm}$ bzw. 1mm, spektrale Bandbreite: 1 nm. **D:** CD-Spektren im nahen UV bei 10°C in 20 mM NaP, pH 7; $c = 0.2 \text{ mg}/\text{ml}$, $d = 4 \text{ mm}$, spektrale Bandbreite: 1 nm.

Das Absorptionsspektrum der Mutante BsPel N271T unterschied sich im experimentellen Fehler nicht von dem des Wildtyps. Im Gegensatz dazu war das Spektrum der N271A-Mutante im Maximum zu kleineren Wellenlängen verschoben und zeigte, verursacht durch Lichtstreuung eine erhöhte Absorption bei 250 nm. Dies lies auf einen signifikanten Anteil von Aggregaten in der Proteinlösung von N271A schließen.

Sowohl die Spektren der Asparaginmutanten in der Fluoreszenzemission als auch im Circulardichroismus im fernen UV zeigten nur kleine Unterschiede zu denen des Wildtypproteins. Die CD-Spektren im nahen UV waren in der Form ähnlich, wiesen aber starke Unterschiede in der Amplitude des Minimums bei 278 nm auf. Die Amplitude des Minimums des Nah-UV CD-Spektrums beträgt beim Wildtypprotein $ca. -140 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ und ist bei den Mutanten stark reduziert ($ca. -90 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ für N271T bzw. $ca. -50 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ für N271A). Die Amplitude des Maximums (bei 293 nm) des Nah-UV CD-Spektrums ist im Gegensatz dazu bei den Mutanten in einer vergleichbaren Größe wie für das Wildtypprotein. Somit kann die Abnahme der Amplitude im Minimum des CD-Spektrums im nahen UV nicht nur durch einen Anteil aggregierten Proteins erklärt werden, da Aggregate in der Proteinlösung auch zu einer Veränderung der Amplitude im Maximum führen müssten. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß die Asparaginmutanten N271R bzw. N271A in Sekundärstruktur dem Wildtypprotein sehr ähnlich sind aber in der Tertiärstruktur leicht verändert vorliegen, trotzdem haben beide Mutanten eine zum Wildtypprotein vergleichbare spezifische Aktivität ($ca. 90\%$ des Wildtypproteins).

3.5.4 *In vitro* Faltung und thermodynamische Stabilität der Asparaginmutanten N271T und N271A

3.5.4.1 Temperatursensitive Faltungsmutanten

Der Begriff temperatursensitive Faltungsmutante (*tsf*) wurde zum ersten Mal für Punktmutanten im Tailspikeprotein des Phagen P22 verwendet. Das Tailspikeprotein ist eine trimere Endorhamnosidase, das die Bindung des Phagen mit seiner Wirtszelle vermittelt. In der Struktur des Tailspikeproteins besteht die mittlere Domäne aus einer parallelen β -Helix (Steinbacher *et al.*, 1997). Für die *tsf*-Mutanten im Tailspikeprotein wurde beschrieben, daß die Faltungseffizienz bei höherer Temperatur bei den Mutanten stark beeinträchtigt ist, aber das Protein im nativen Zustand keinen Unterschied in Stabilität und Funktion zum Wildtypprotein aufweist (Goldenberg & King, 1981; Haase-Pettingell & King, 1997; Smith *et al.*, 1980). Dadurch wurde für die *tsf*-Mutanten ursprünglich postuliert, daß die Mutationsstelle in Bereichen des Polypeptids liegt, die für die korrekte Ausbildung von Strukturen in frühen Faltungsintermediaten wichtig seien, denen aber in der endgültig gefalteten, nativen Struktur kein Einfluß auf Funktion und Stabilität des Proteins mehr zukommt (Sturtevant *et al.*, 1989; Yu & King, 1984; Yu & King, 1988). Diese *Foldon-Hypothese* konnte mittlerweile widerlegt werden, indem bei den *tsf*-Mutanten bei *in-vitro* Faltungsstudien eine destabilisierende Auswirkung auf das native

Protein gezeigt werden konnte (Danner & Seckler, 1993; Miller *et al.*, 1998a; Miller *et al.*, 1998b; Schuler & Seckler, 1998).

Da bei einer Expression bei 25°C die Ausbeute an nativem, gefaltetem Protein bei den Asparaginmutanten sehr gering war und der Hauptanteil an expremiertem Protein in der unlöslichen Zellfraktion vorlag, wurde vermutet, daß die Faltungseffizienz der Asparaginmutanten ähnlich wie bei dem Tailspikeprotein stark temperaturabhängig sei. Dies wurde durch Reaktivierungsexperimente überprüft. Dabei wurde vollständig denaturiertes Protein (4 M GdmCl) 1:50 in Nativpuffer pH 7 bei verschiedenen Temperaturen (10 – 40°C, 5 µg/ml Proteinkonzentration) verdünnt und nach ca. 1 h Inkubation bei der jeweiligen Temperatur die Aktivität in den Renaturierungsproben bestimmt. Als Kontrolle wurde die Stabilität des nativen Proteins bei der jeweiligen Temperatur bestimmt, dazu wurde analog natives Protein in Nativpuffer verdünnt, der 0.1 M GdmCl enthielt, und die Aktivität nach 1 h Inkubation bestimmt. Da der cytoplasmatische pH-Wert bei *E. coli* mit ungefähr pH 7.6 angegeben ist (Booth, 1985), wurden die Reaktivierungsexperimente auch in Nativpuffer pH 7.5 durchgeführt, um eventuelle pH-Abhängigkeiten festzustellen. Die Ergebnisse der Reaktivierungsexperimente sind in Abbildung 3.34 dargestellt. Natives Protein der Mutanten war genauso wie Wildtypprotein bei beiden pH Werten im gesamten Temperaturbereich zwischen 10 und 40°C stabil. Reaktivierung der Mutanten bei niederen Temperaturen (10 – 25°C) war vollständig möglich, die temperaturabhängigkeit der Renaturierung der Mutanten unterschied sich aber von der des Wildtypproteins. Wildtypprotein konnte bei pH 7 und 35°C vollständig renaturieren, im Gegensatz zu den Mutanten, die bei 35°C und pH 7 nur noch eine Reaktivierungsausbeute von < 50% zeigten. Der Effekt war bei pH 7.5 ungefähr zu 5°C niedrigerer Temperatur verschoben. Es zeigten sich bei den Reaktivierungen der beiden Asparaginmutanten aber keine Unterschiede zueinander in der Temperaturabhängigkeit und somit konnten mit diesen Ergebnissen die unterschiedlichen Expressionausbeuten an löslichem Protein der beiden Mutanten (40% für N271T und 10% für N271A) nicht erklärt werden.

Durch Fluoreszenzkinetikmessungen der Mutanten bei 10°C und 25°C und beiden pH-Werten sollte dieser Aspekt genauer geklärt werden.

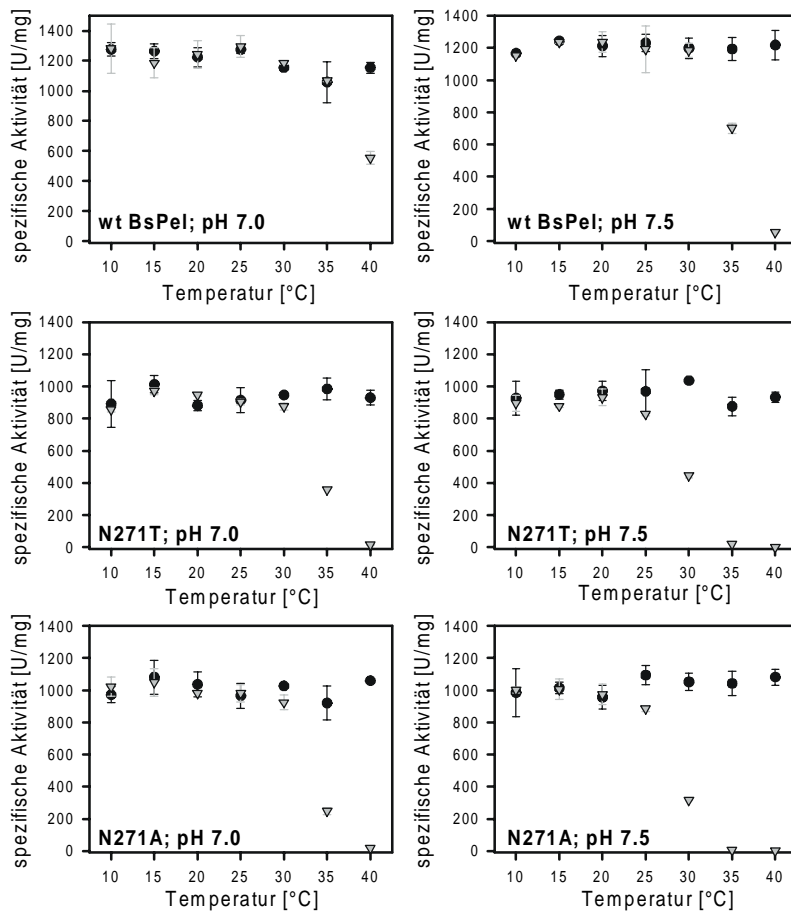


Abb. 3.34: Temperaturabhängigkeit der Renaturierungseffizienz

Die Reaktivierungseffizienz bei 0.1 M GdmCl von Wildtyp-BsPel und N271T- bzw. N271A-Mutante wurde bei verschiedenen Temperaturen und bei pH 7 bzw. pH 7.5 gemessen. Die Proteinkonzentration im Reaktivierungsansatz betrug jeweils 8 µg/ml, davon wurden Aliquots entnommen und direkt in den Aktivitätstest pipettiert. Die Datenpunkte stellen Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung dar, Die Fehlerbalken entsprechen dabei der Standardabweichung. Die Pufferbedingungen waren: 20 mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7 bzw. pH7.5. Schwarze Kreise stehen für die Nativkontrolle (in 0.1 M GdmCl), graue Dreiecke für den Renaturierungsansatz; sowohl die Nativkontrolle als auch die Renaturierungsansätze wurden für mindestens 1 h bei der jeweiligen Bedingung inkubiert, bevor die Aktivität bestimmt wurde.

3.5.4.2 Kinetiken der Entfaltung und Rückfaltung der Asparaginmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Alle Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken der Asparaginmutanten wurden als Änderung in der Tryptophanfluoreszenzemission bei 10 bzw. 25°C und einer Proteinkonzentration von 5 µg/ml gemessen. Die Denaturierung der beiden Asparaginmutanten konnte sowohl bei 10°C als auch bei 25°C durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Denaturierung der beiden Mutanten waren im Rahmen des

experimentellen Fehlers gleich groß und um ca. einen Faktor 2 beschleunigt relativ zur Denaturierung des Wildtypproteins (Abbildung 3.35).

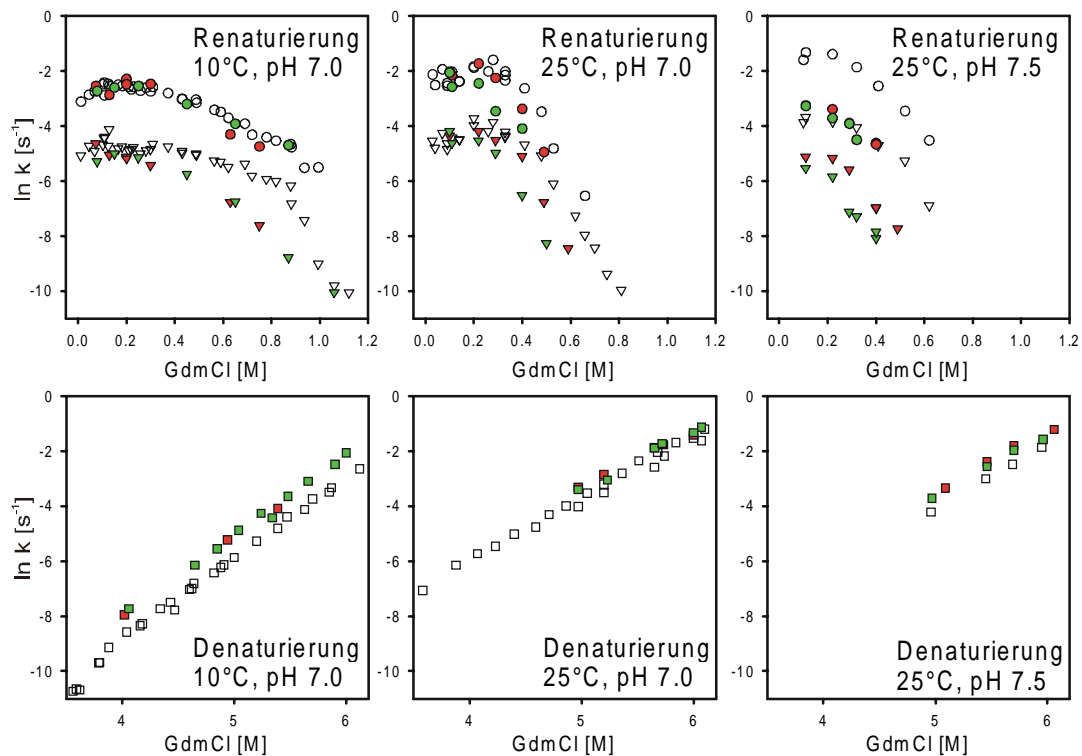


Abb. 3.35:

Vergleich der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung (\square) und Rückfaltung (k_1 : \circ ; k_2 : ∇) zwischen wt-BsPel (offenen Symbole) und den Asparaginmutanten [N271T (rote Symbole), N271A (grüne Symbole)]; Die Datenpunkte resultieren aus Fluoreszenzkinetikmessungen bei 10 bzw. 25°C; Puffer: 20mM NaP, 0.1% (v/v) Tween20, 2 mM DTE, pH 7 bzw. pH 7.5; Die Proteinkonzentration betrug jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$; Die Änderung der Fluoreszenz wurde bei einer Emissionswellenlänge von 328 nm in fluoreszenzgeeigneten Plastikküvetten gemessen (Anregung bei 280 nm; spektrale Bandbreiten: Anregung 2.1 nm und Emission 4.2 nm).

Renaturierungskinetiken der Asparaginmutanten bei 10°C bzw. 25°C und pH 7 waren bei niedriger GdmCl-Konzentration ähnlich zu der Renaturierung des Wildtypproteins und konnten mit einer biexponentiellen Funktion beschrieben werden. Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der beiden Rückfaltungsphasen für beide Asparaginmutanten waren dabei im experimentellen Fehler gleich und die langsame Phase der Rückfaltung der Mutanten war um etwa 1.5 x langsamer als bei der Faltung des Wildtyps. Dabei erfolgte der drastische Rückgang der Rückfaltungsraten bereits bei geringeren GdmCl-Konzentrationen als beim Wildtypprotein. Das Amplitudenverhältnis der beiden Renaturierungsphasen war ähnlich wie für das Wildtypprotein und die zweite Phase entsprach der Reaktivierung (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse

Die Renaturierung der Asparaginmutanten bei 25°C und pH 7.5 war drastisch verlangsamt gegenüber dem Wildtypprotein und es zeigten sich auch Unterschiede zwischen den beiden Mutanten. Die Rate der schnellen Renaturierungsphase war bei kleinen GdmCl-Konzentrationen ungefähr gleich groß für beide Mutanten und um ca. 5 x langsamer als für das Wildtypprotein. Die Rate der langsamen Phase war bei der N271T-Mutante ca. 4 x langsamer und für die N271A-Mutante ca. 6 x langsamer als die entsprechende Renaturierungsphase des Wildtypproteins. Die drastische Verlangsamung der Renaturierung bei mittleren GdmCl-Konzentrationen erfolgte bei den Asn-Mutanten bei wesentlich geringeren Denaturierungsmittelkonzentrationen und war für die N271A-Mutante noch ausgeprägter (Renaturierung war nur bis 0.4 M GdmCl möglich).

Somit lassen sich mit den Ergebnissen der Kinetikmessungen bei 25°C und pH 7.5 die niedrigere Proteinausbeute bei der Expression der N271A- gegenüber der N271T-Mutante erklären, da der cytoplasmatische pH von *E. coli* annähernd bei pH 7.6 liegt.

4 Zusammenfassende Diskussion

Durch die steigende Anzahl von Proteinstrukturen, die das β -Helix-Motiv aufweisen, gibt es ein wachsendes Interesse an den generellen Prinzipien, die die Faltung, Stabilität und Funktion dieses neuen Faltungsmotivs bestimmen. Die Struktur der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* (BsPel) ist im Komplex mit einem Calciumion gelöst worden (Pickersgill *et al.*, 1994) und besitzt als Strukturmotiv eine rechtsgängige parallele β -Helix. BsPel ist ein monomeres Protein mit einer ungefähren Molekularmasse von 43 kDa, das keine Disulfidbrücken enthält. Dies erlaubte sowohl eine effiziente rekombinante Expression des Wildtypproteins als auch von destabilisierten Mutanten im Cytoplasma von *E. coli*.

Reversibilität der *in vitro*-Ent- und Rückfaltung

Reaktivierung durch Verdünnung von in GdmCl denaturierter BsPel ist bei mittleren Temperaturen (10-30°C) und bei Proteinkonzentrationen unter 25 $\mu\text{g/ml}$ (ca. 500 nM) vollständig möglich. Die Renaturierungsausbeute vermindert sich mit steigender Proteinkonzentration und beträgt oberhalb von 5 μM nur noch weniger als 40%. Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen Renaturierungsausbeute und Proteinkonzentration ist charakteristisch für Faltungsreaktionen, die unmittelbar mit einer irreversiblen Aggregation von noch-nicht nativem Protein konkurrieren (Kiefhaber *et al.*, 1991) und wurde auch beispielsweise für Laktatdehydrogenase oder für Luziferase aus *Photinus pyralis* beobachtet (Herbst *et al.*, 1998; Zettlmeissl *et al.*, 1979).

Denaturierungsmittelinduzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*, gemessen als Änderung in der Aktivität bzw. Fluoreszenzemission, weisen im experimentellen zeitlichen Rahmen eine deutliche Hysterese auf. Die Renaturierung von BsPel nach Verdünnung aus GdmCl ist nach einem Tag abgeschlossen und zeigt im Bereich von 5 – 20 $\mu\text{g/ml}$ keine Proteinkonzentrationsabhängigkeit. Der Renaturierungsübergang bei 10°C zeigt einen kooperativen Verlauf und der Übergangsmittelpunkt liegt bei ca. 1 M GdmCl. Im Bereich des Renaturierungsübergangs konnten keine Gleichgewichtsintermediate spektroskopisch nachgewiesen werden. Die GdmCl-induzierte Denaturierung von Bspel bei 10°C ist bei niedrigen Denaturierungsmittelkonzentrationen extrem langsam und eine Einstellung des Gleichgewichts erfolgt selbst nach einer Inkubationszeit von Monaten nicht. Die Kinetiken der Entfaltung von BsPel, gemessen durch Fluoreszenz- oder CD-Spektroskopie, lassen sich mit einer monoexponentiellen Funktion beschreiben und die Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung von der Denaturierungsmittelkonzentration ist linear innerhalb des Meßfensters (6 – 1.5 M GdmCl). Die extrapolierte Halbwertszeit der Denaturierung bei der GdmCl-Konzentration des Übergangsmittelpunktes der Renaturierung würde demnach 100 Tage betragen. Es kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß in der Nähe des Übergangsmittelpunktes der Renaturierung

ein zweiter geschwindigkeitsbestimmender Schritt für die Denaturierung von BsPel vorliegt, der zur Verlangsamung der Denaturierung führt und somit zu der in den Übergängen beobachteten starken Hysterese beiträgt. Durch Erhöhung der Temperatur kann die Denaturierung beschleunigt werden, aber der Übergangsmittelpunkt der Renaturierung verschiebt sich gleichzeitig zu niedrigeren GdmCl-Konzentrationen. Dadurch wird die Hysterese nur zu kleineren Denaturierungsmittelkonzentrationen verschoben. Durch den Zusatz von 20% (v/v) Glycerin kann die bestehende Hysterese in der Ent- und Rückfaltung von BsPel vermindert werden. Zusätzlich verringert der Zusatz von 20% (v/v) Glycerin auch die irreversible Aggregationsreaktion bei der Rückfaltung von BsPel bei hoher Proteinkonzentration bzw. Temperatur. Dieses Verhalten konnte auch bei der Rückfaltung von Kreatinkinase (Dimer) und dem Tailspikeprotein (Trimer) aus P22 gezeigt werden. Bei der Rückfaltung dieser Proteine wird ein monomeres temperaturlabiles Intermediat auf dem Faltungsweg postuliert, das im Gleichgewicht mit einer Zwischenform steht, die anfällig für Aggregation und Fehlfaltung ist. Durch den Zusatz von Glycerin wird dieses monomere Intermediat stabilisiert und die Bildung des *off-pathway* Intermediates verhindert (Zhu *et al.*, 2001a; Zhu *et al.*, 2001b, Rajesh Mishra, nicht publizierte Daten). Die Hysterese bei der Rückfaltung und Entfaltung von BsPel wird sehr wahrscheinlich sowohl durch die kinetische Stabilität der nativen BsPel bei hohen Denaturierungsmittelkonzentrationen als auch durch die Destabilisierung essentieller Faltungsintermediate bei niedrigen Denaturierungsmittelkonzentrationen verursacht. Für viele kleinen Proteine konnte gezeigt werden, daß sich in einer chaotrophen Lösung der native Zustand im Gleichgewicht mit dem entfalteten Zustand befindet und die kinetischen Barrieren zwischen den beiden Zuständen (Dill, 1993) relativ gering sind. Dabei ist die Position des Faltungsgleichgewichts unabhängig von den Anfangsparametern und wird nur durch die relativen Energien des gefalteten und ungefalteten Zustands bestimmt. Andererseits kann auf eine Barriere zwischen den einzelnen Zuständen geschlossen werden, wenn die Quartär- bzw. Tertiärstruktur bei einer bestimmten Denaturierungsmittelkonzentration davon abhängig ist, von welchen Anfangsbedingungen diese Denaturierungsmittelkonzentration erreicht wurde. Dieses Verhalten konnte für verschiedene Proteine gezeigt werden (Baker & Agard, 1994; Baker *et al.*, 1992; Eder *et al.*, 1993; Jaenicke, 1995; Lai *et al.*, 1997). Zum Beispiel konnte bei Transthyretin, einem tetrameren humanen Plasmaprotein, kürzlich nachgewiesen werden, daß die bei GdmCl-induzierten Ent- und Rückfaltungsübergängen auftretende Hysterese verursacht wird durch eine Anionenbindung des nativen Tetramers, das dadurch stabilisiert wird. Eine Konsequenz der Stabilisierung des Tetramers ist die beobachtete Hysterese in der Faltung, da die hohe GdmCl-Konzentration, die für die Entfaltung des durch Anionenbindung stabilisierten Tetramers benötigt wird, keine Rückfaltung der ungefalteten Monomere zulässt. (Hammarstrom *et al.*, 2001). Faltungsübergänge von Transthyretin mit einem nichtionischen Denaturierungsmittel wie z.B. Harnstoff zeigten dagegen einen reversiblen und kooperativen Verlauf. Es kann bei der Entfaltung von BsPel nicht ausgeschlossen werden, daß eine hohe Salzkonzentration zu einer Stabilisierung des nativen Zustands führt. Da aber BsPel in 10 M Harnstoff und Raumtemperatur stabil ist, müßten erst geeignete Experimente entworfen werden, um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen.

Kinetisches Modell für die Faltung von BsPel

Kinetische Rückfaltungsexperimente unter Messung der Fluoreszenzemission und des Circular dichroismus im fernen UV, ausgehend vom chaotropen denaturierten Zustand gemäß CD-Signal, weisen bei streng nativen Bedingungen sowohl schnelle als auch langsame Phasen auf. Die bestimmten apparenten Geschwindigkeitskonstanten aus Fluoreszenz- und Circular dichroismusmessungen sind dabei identisch im Rahmen der Messgenauigkeit. Durch *stopped-flow*-Messungen der Änderung der Fluoreszenz können zwei schnelle Rückfaltungsphasen mit einer Relaxationzeit von ca. 7 bzw. 20 s aufgelöst werden. Die Amplituden dieser beiden Phasen entsprechen dabei etwa 55 bzw. 25% der Gesamtamplitude. Die langsame Phase der Rückfaltung mit einer Relaxationzeit von ca. 110 s und einer Amplitude von 20% entspricht dabei der Reaktivierung. Langsame Phasen bei der Proteinfaltung werden oft durch eine heterogene Population der entfalteten Moleküle verursacht. In vielen Fällen verursacht *cis-trans* Isomerisierung von Xaa-Pro-Peptidbindungen langsame Rückfaltungsreaktionen (Brandts *et al.*, 1975; Kiefhaber *et al.*, 1990a; Kiefhaber *et al.*, 1990b; Schmid & Baldwin, 1978). Xaa-Pro-Peptidbindungen liegen in Lösung typischerweise als Gemisch aus *cis*- und *trans*-Isomeren vor, wobei der Anteil an *cis*-Bindungen etwa 10 – 40% beträgt (Cheng & Bovey, 1977). Erst im strukturellen Umfeld eines gefalteten Proteins wird eine der beiden Konformationen präferentiell stabilisiert. Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerisierung erfolgt jedoch verhältnismäßig langsam (ca. 10 – 100 s bei 25°C). Falls die Intermediatbildung bei der Rückfaltung schneller als die *cis-trans*-Prolinomerisierung stattfindet, können dadurch "kinetisch gefangene" Intermediate erzeugt werden, die erst nach der langsamen Isomerisierungsreaktion zum nativen Zustand weiterreagieren können. Ein gut untersuchtes Beispiel für einen derartigen Effekt eines Intermediates bei der Rückfaltung liefert RNase T1 (Kiefhaber *et al.*, 1992).

In der Sequenz der Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* finden sich 14 Prolinreste. Dabei liegt die Bindung zwischen dem Alaninrest 280 und dem Prolinrest 281 im nativen Protein in *cis*-Konformation vor. Um den Zusammenhang zwischen kinetischer Komplexität in der BsPel-Rückfaltung und der heterogenen Population von Molekülen im entfalteten Zustand nachzuweisen, wurden Doppelsprungexperimente durchgeführt. Falls der langsame Renaturierungsweg durch eine langsame Gleichgewichtseinstellung in der entfalteten Aminosäurekette produziert wird, dann sollte die Menge an langsam faltenden Molekülen mit zunehmender Zeit nach vollständiger Denaturierung zunehmen. Bei den Doppelsprungexperimenten an BsPel zeigt sich, daß die langsam faltende Spezies bei der Denaturierung mit einer Relaxationzeit von ca. 240 s gebildet wird. Im Gleichgewichtszustand der schnell und langsam faltenden Spezies im entfalteten Zustand sind ca. 10% der Moleküle in der Lage schnell zu falten mit einer relativen Relaxationszeit von 10 – 20 s. Die Reaktion von der langsam faltenden Spezies im entfalteten Zustand zur schnell faltenden muß bedingt durch die Gleichgewichtseinstellung mindestens 10x langsamer verlaufen als die Gegenreaktion. Die Gegenwart von Prolinomerasen führte zu keiner signifikanten Beschleunigung des Rückfaltungsprozesses. Der Grund dafür könnte sein, daß die Prolinomerisierung nicht auf den denaturierten Zustand beschränkt ist, sondern auch in einem Rückfaltungsintermediat eine geschwindigkeitsbestimmende Rolle für die Rückfaltung spielt. Da ein solches Faltungsintermediat eventuell schon nativähnliche Tertiärstruktur

ausgebildet hat, könnte der für die langsame Faltung verursachende Prolinrest in einer hydrophoben begrabenen Umgebung liegen, der für die Prolinisomerase unzugänglich ist. Einen ähnlichen Zusammenhang konnte für den Prolinrest-39 in der RNaseT1 nachgewiesen werden (Mucke & Schmid, 1992). Ein potentieller Kandidat für einen solchen Prolinrest, der für die langsame Renaturierung verantwortlich ist, stellt der Rest Pro-281 von BsPel dar. Dieser Rest ist in der nativen Struktur in *cis*-Konformation und liegt im Inneren der parallelen β -Helix am Anfang des β -Strangs PB1. Dieser Prolinrest ist in der Pektat-Lyase-Überfamilie stark konserviert (Henrissat *et al.*, 1995) und die *cis*-Peptidyl-Prolylbindung an dieser Stelle ist dafür verantwortlich, daß zwei enzymatisch wichtige Argininreste zur Substratbindetasche ausgerichtet werden. In einer Faltungsstudie an Pektat-Lyase C (PelC) aus *Erwinia chrysanthemi* wurde gezeigt, daß die Isomerisierung der *cis*-Peptidyl-Prolylbindung an dieser Stelle die langsamste Renaturierungsphase in PelC verursacht (Kamen & Woody, 2002a; Kamen & Woody, 2002b). Pel C besitzt im Vergleich zu BsPel 12 Prolinreste, die alle, bis auf den zu Prolin281 homologen Rest, in *trans*-Konformation vorliegen. Die Faltungsübergänge von PelC zeigen einen reversiblen Verlauf und die Rückfaltung verläuft bei stringenten nativen Bedingungen durch vier kinetisch unterscheidbare Phasen, wobei die zwei langsamen Faltungsphasen ($\tau_3 = 21$ s bzw. $\tau_4 = 46$ s bei 25°C) von PelC durch Prolinisomerisierung verursacht werden. Eine Mutationsstudie an PelC, bei der alle Prolinreste einzeln gegen Alanin ausgetauscht wurden, zeigt, daß beim Austausch des Prolinrestes, der in der nativen Struktur in *cis*-Konformation vorliegt, die langsame 46 s Rückfaltungsphase eliminiert werden kann. Die 21s-Phase konnte keiner Isomerisierungsrate an einem speziellen Prolinrest in PelC zugeordnet werden und resultiert wahrscheinlich daraus, daß ein Ensemble von Prolinresten von einem nicht-nativen *cis*-Isomer zu einem nativen *trans*-Isomer umgewandelt werden müssen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Prolinrest-281 von BsPel gegen verschiedene Aminosäuren (Ala, Ile, Leu, Phe, Gly) ausgetauscht. Die Mutationen dieses Prolins verändern dabei die Faltungskinetik nicht. Da es sich bei dem Prolin281 um einen konservierten Rest in der Pektat-Lyase Überfamilie handelt, wäre eine Nicht-Prolyl-*cis*-Peptidbindung an dieser Stelle im nativen Protein von BsPel denkbar. Ergebnisse von Ribonuklease T1- und β -Lactamase-Faltungsstudien zeigen, daß die *trans* \rightarrow *cis*-Isomerisierung einer Nicht-Prolyl-Peptidbindung relativ langsam verläuft (Relaxationszeit von mehreren 100 s bei 25°C) und den geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Faltung darstellen kann (Odefey *et al.*, 1995; Vanhove *et al.*, 1998; Vanhove *et al.*, 1995; Vanhove *et al.*, 1996; Wheeler *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu ist die *cis* \rightarrow *trans*-Isomerisierung einer Nicht-Prolyl-Peptidbindung um einen Faktor von 50-100 gegenüber der Prolyl-Peptidbindung beschleunigt. In Doppelsprungexperimenten an der P281A-Mutante konnte jedoch keine im Vergleich zum Wildtyp beschleunigte Bildung langsam faltender Moleküle beobachtet werden. Dewegen kann angenommen werden, daß die langsame Renaturierung bei BsPel durch Isomerisierung mehrerer *trans*-Proline verursacht wird, ähnlich der 21 s Phase von PelC, und nicht durch die Isomerisierung der *cis*-Peptidbindung an Prolin 281.

Durch reverse Doppelsprungexperimente konnte der zeitliche Verlauf der Bildung von Intermediaten und des nativen Moleküls näher aufgezeigt werden. Die Experimente bei *stopped-flow* Bedingungen zeigen, daß bei streng nativen Bedingungen der Renaturierung (0.4 M GdmCl), bei anschließender

Denaturierung in stark denaturierenden Bedingungen schon nach 100 ms der Renaturierungszeit eine Denaturierungsamplitude meßbar war, die ca. 7% der Gesamtamplitude entsprach. Die Amplitude dieser Denaturierungskinetiken ist ein indirektes Maß für native Moleküle zu dem Zeitpunkt der Renaturierung. Dies würde aber bedeuten, daß maximal 10% der Moleküle in einer sehr schnellen Reaktion (innerhalb von 100 ms) zum nativen Zustand reagieren können. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu den einfachen Doppelsprungexperimenten. Hier wurde die Bildung des nativen Zustandes im schnelleren Reaktionsweg mit einer Relaxationszeit von 10-20 s bestimmt. Ein Grund für die Abweichung könnte die hohe Proteinkonzentration von 60 µg/ml bei der Renaturierung sein, die bei der reversen Doppelsprungexperimenten unter *stopped-flow* Bedingungen benötigt wird. Bei dieser Proteinkonzentration ist Renaturierung nicht mehr vollständig möglich und es kommt zu Aggregation. Die beobachtete Denaturierungsamplitude könnte somit auch eine Denaturierung von Aggregaten darstellen.

Der Hauptanteil (ca. 90%) der entfalteten BsPel-Moleküle erreicht den nativen Zustand über einen langsameren Faltungsweg. Die Bildung des nativen Zustands wurde ursprünglich mittels Reaktivierungsexperimenten bestimmt und die Zeitkonstanten stimmten mit den Ergebnissen aus den reversen Doppelsprungexperimenten überein. Auf dem langsamen Faltungsweg von BsPel konnten zwei teilweise strukturierte Zustände charakterisiert werden. Die Relaxationszeiten der Bildung dieser Intermediatzustände beträgt 7s bzw. 17 s und die Weiterreaktion der Intermediate geschah mit Relaxationzeiten von 100 bzw. 300 s. Diese Ergebnisse implizieren, daß die beiden Intermediate auf zwei parallelen Faltungswegen liegen müssen. Da die Bildung der nativen Moleküle beim langsamen Faltungsweg über eine lag-Phase verläuft, kann wohl angenommen werden, daß beide Intermediate *on-pathway* Intermediate darstellen und zur Bildung des nativen Zustands führen. Die Relaxationzeit der Bildung der nativen Moleküle liegt dabei im Mittel der Relaxationszeiten der Weiterreaktion der beiden Intermediatzustände. Da sich diese Relaxationszeiten nur um einen Faktor von 3 unterscheiden und die Fluoreszenzeigenschaften der Intermediatzustände zueinander sehr ähnlich sind (Amplitude- I_1 :Amplitude- $I_2 = 2/3 : 1/3$), konnten diese beiden Phasen bei der Bildung der nativen Moleküle nicht unterschieden werden. Die Fluoreszenzspektren der beiden Intermediate zeigen schon eine nativähnliche Struktur. Dies wird durch die Beobachtung an den Asparagin-Leiter-Mutanten bestätigt (siehe unten). Allerdings müssen bei der Umwandlung der Intermediatzustände zum nativen Zustand auch Sekundärstrukturelemente beteiligt sein, denn die langsame Renaturierungsphase war als zeitlich gleiche Änderung nicht nur in der Tryptophanfluoreszenz sondern auch als Circular dichroismussignal im fernen UV messbar.

Bei mittleren GdmCl-Konzentrationen (ab ca. 1M GdmCl) können die Rückfaltungskinetiken durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Dieses Verhalten konnte auch für die Rückfaltung der Pektat-Lyase C aus *Erwinia chrysanthemi* beschrieben werden und kann dadurch erklärt werden, daß unter diesen extremen Rückfaltungsbedingungen alle an der Faltung beteiligten *on-pathway* Intermediate stark destabilisiert sind und nicht länger detektierbar sind. Unter diesen Bedingungen sind die Intermediatformen nur noch in geringer Konzentration anwesend und stehen in einem schnellen Gleichgewicht mit dem entfalteten Zustand. Die Abweichungen der Faltung von

Zusammenfassende Diskussion

BsPel bei steigender Temperatur von dem Arrheniusverhalten lassen sich mit diesem Modell erklären (Danner & Seckler, 1993). Die apparente Geschwindigkeitskonstante (k_{app}) der Bildung des nativen Zustandes ($I \rightarrow N$) ergibt sich danach aus der intrinsischen Geschwindigkeitskonstante für diese Reaktion (k_f) und der Lage des Gleichgewichts als $k_{app} = k_f \cdot K_{eq} / (K_{eq} + 1)$, falls die Gleichgewichtseinstellung gegenüber dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Faltung schnell verläuft. Wird die obengenannte Gleichung unter der Verwendung der Gleichung $\Delta G_{stab} = -RT \ln K$ umgeformt, so ergibt sich für $k_{app} = k_f \cdot 1 / (1 + \exp(\Delta G_{stab} / RT))$. Man sieht daran direkt, daß die beobachteten apparenten Geschwindigkeiten langsam werden, wenn die Stabilität des Intermediates z.B. bei hoher GdmCl-Konzentration oder hoher Temperatur klein ist, während annähernd intrinsische Raten gemessen werden, wenn eine Stabilisierung des Intermediatzustandes vorliegt, zum Beispiel durch den Zusatz von Glycerin im Faltungsansatzes.

In der Abbildung 4.1 ist ein Modell für die Faltung von BsPel dargestellt, das die kinetischen Daten aus den verschiedenen Experimenten zusammenfasst. Allerdings muß dieses Modell als Minimalmodell angesehen werden, da es die Faltung dieses großen Proteins nur unvollständig beschreibt.

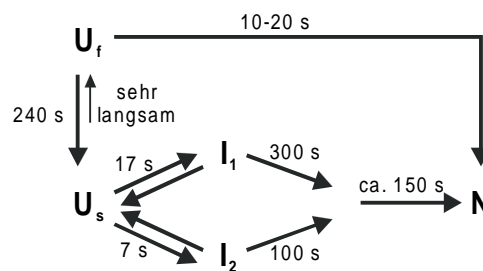


Abb. 4.1: vereinfachtes Modell der Faltung von BsPel bei 10°C und 0.4 M GdmCl-Restkonzentration

U_f und U_s : schnell und langsam renaturierende, entfaltete Moleküle

I_1 und I_2 : Populationen von Faltungsintermediaten mit mindestens einer nicht-nativen X-Pro-Peptidbindung

N : nativer Zustand

Reversible Faltungsübergänge der Prolin281X-Mutanten

BsPel enthält eine *cis*-Peptidbindung vor Pro281. Mutanten, die diesen Prolinrest gegen verschiedene Aminosäure (Ala, Ile, Leu, Phe, Gly) ausgetauscht hatten, zeigen eine unveränderte Faltungskinetik im Vergleich zum Wildtypprotein. Der native Zustand der Mutanten ist aber im Vergleich zum Wildtyp drastisch destabilisiert. Dies führte zu einem reversiblen Entfaltungsgleichgewicht der Prolinmutanten und erlaubte eine Bestimmung der freien Stabilisierungsenthalpie. Es konnten keine Unterschiede in der Stabilisierungsenthalpien der einzelnen Prolinmutanten untereinander festgestellt werden, trotz der unterschiedlichen GdmCl-Abhängigkeit der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung bei den einzelnen Mutanten. Die GdmCl-induzierten Faltungsübergänge der P281A-Mutante zeigen bei Messungen der Tryptophanfluoreszenz bzw. der Aktivität einen kooperativen

Phasenübergang mit einem Übergangsmittelpunkt bei 1.1 M GdmCl. Eine Regression der Faltungsübergänge nach dem Zwei-Zustands-Modell (Santoro & Bolen, 1988) ergibt eine freie Stabilisierungsenthalpie der Entfaltung von 64.2 ± 0.4 kJ/mol und eine Kooperativität des Übergangs von 58.2 ± 0.3 kJ mol⁻¹ M⁻¹. Der Wert der Kooperativität gibt die Abhängigkeit der freien Stabilisierungsenthalpie vom Denaturierungsmittel an und korreliert mit dem Δ ASA-Wert des Proteins (Unterschied der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des gefalteten Zustands und des entfalteten Zustands) (Greene & Pace, 1974; Schellman, 1978; Schellman, 1987). Nach der linearen Korrelation [$m = 859 + 0.22 \cdot (\Delta$ ASA) kcal mol⁻¹ M⁻¹] nach Myers 1995, ergäbe sich ein vorhergesagter m-Wert von 10.84 kcal mol⁻¹ M⁻¹ (45.35 kJ mol⁻¹ M⁻¹). Dabei wurde Δ ASA von BsPel mit dem Program Naccess bestimmt, das die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des nativen Zustands nach dem Algorithmus nach (Lee & Richards, 1971) bestimmt und die lösungsmittelzugängliche Oberfläche des denaturierten Zustands als Summe der relativen lösungsmittelzugänglichen Oberfläche jedes Restes nach dem Tripeptidmodell Ala-X-Ala berechnet (Hubbard *et al.*, 1991). Der experimentell bestimmte m-Wert für die P281A-BsPel-Mutante ist also noch größer als der erwartete m-Wert. Dieses Verhalten wurde auch schon für PelC beobachtet, eine Pektat-Lyase aus *Erwinia chrysanthemi* mit ähnlicher Struktur und Größe (Kamen *et al.*, 2000). GdmCl-induzierte Faltungsübergänge von PelC konnten nach dem Zweizustandsmodell beschrieben werden und hatten einen Übergangsmittelpunkt bei 0.99 M GdmCl (pH 7 und 25°C). Die Werte für $\Delta G^{\circ}_{H_2O}$ (51.0 kJ/mol) und m (51.5 kJ mol⁻¹ M⁻¹) für PelC haben dabei in eine ähnliche Größenordnung, wie sie für BsPel-P281A bestimmt wurden, obwohl im Fall von PelC die Lösungsmittelzugänglichkeit des denaturierten Zustandes durch die beiden Disulfidbrücken eingeschränkt wird. Die lineare Korrelation nach Myers muß aber auch kritisch hinsichtlich der Auswahl der Proteine für diese Korrelation gesehen werden. Für die oben beschriebene lineare Korrelation zwischen m und Δ ASA wurden 45 verschiedene Proteine verwendet, wobei nur zwei davon größer als 300 Aminosäurereste waren.

Temperatur-sensitive-Faltungsmutanten durch Mutagenese des zentralen Restes in der Asparaginleiter

BsPel enthält, wie die meisten monomeren rechtsgängigen parallelen β -Helix-Proteine, einen internen Stapel wasserstoffverbrückter Asparagin-Seitenketten. Die Mehrheit der erzeugten Mutanten mit Substitutionen im Zentrum der Asn-Leiter (N271X) sind als enzymatisch aktives Protein zugänglich. Die Auswirkung der Mutation auf die Stabilität und Rückfaltung wurde an den Proteinen BsPel-N271T und BsPel-N271A näher analysiert. Dabei führt die Unterbrechung des Asparaginstapels im Inneren der β -Helix zu keiner drastischen Destabilisierung des nativen Proteins. Allerdings führen diese Mutationen zu einem temperatur-sensitiven Faltungsphänotyp, und die Hysterese im Denaturierungsübergang wird verstärkt. Offenbar wird durch die Unterbrechung des Asparaginstapels ein essentielles, thermolabiles Faltungsintermediat destabilisiert. Dieses Faltungsintermediat, das in einer frühen Phase der Rückfaltung gebildet wird, hat vermutlich nativähnliche Struktur und einen ausgebildeten Asparaginstapel. Da die Entfaltungskinetik des nativen Zustands nicht sehr verändert ist, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die Asparagin-Leiter schon im

Übergangszustand bei der Bildung des Intermediates vorhanden ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die *tsf*-Mutanten im Tailspikeprotein gemacht (Danner & Seckler, 1993). Durch die *tsf*-Mutationen wird bei der Faltung von Tailspike die Stabilität eines frühen monomeren, thermolabilen Intermediates mit nativähnlicher Struktur an der Verzweigungstelle zwischen produktiver Faltung und Aggregation beeinflusst.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro*-Faltung GdmCl-denaturierter Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis* eingehend charakterisiert. Dabei scheint die Destabilisierung essentieller Faltungsintermediate die Ursache für die extrem langsame Faltung der β -Helix bei mittleren Denaturierungskonzentrationen zu sein. Es bleibt aber die Frage, welche strukturellen Teile des Cores der β -Helix in diesen essentiellen Faltungsintermediate schon gebildet sind. Mit Hilfe von H/D-Austausch und anschließender Peptidanalyse durch Massenspektrometrie könnten die Strukturen dieser Intermediate weiter analysiert werden.

Da die P281X-Mutanten reversibel faltende Varianten von BsPel darstellen, die sich zusätzlich in ihrem Faltungsweg nicht von dem Wildtypprotein unterscheiden, könnten die Auswirkungen von *tsf*-Mutationen auf die Stabilität der β -Helix genauer untersucht werden. Daneben könnte der schnelle Rückfaltungsweg von BsPel durch *stopped-flow* Messungen anhand der P281L-Mutante näher analysiert werden. Durch die starke Destabilisierung des nativen Zustandes ist P281L schon bei mittleren GdmCl-Konzentrationen vollständig denaturiert. Dadurch sind Renaturierungsexperimente in *stopped-flow*-Apparaturen mit ihrer gerätespezifischen Verdünnung von lediglich 1:6 möglich.

5 Literaturverzeichnis

- Akita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Ito, S. & Yamane, T. (2001). The first structure of pectate lyase belonging to polysaccharide lyase family 3. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**(Pt 12), 1786-92.
- Albertsheim, P., Neukom, H. & Stutz, E. (1958). Pectic substances and pectic enzymes. *Adv. Enzymol.* **20**, 341-382.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**(17), 3389-402.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**(96), 223-30.
- Baker, D. & Agard, D. A. (1994). Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* **33**(24), 7505-9.
- Baker, D., Sohl, J. L. & Agard, D. A. (1992). A protein-folding reaction under kinetic control. *Nature* **356**(6366), 263-5.
- Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Fold Des* **1**(1), R1-8.
- Barras, F., van Gijsegem, F. & Chatterjee, A. K. (1994). Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 201-234.
- Beck, E. & Zink, B. (1981). Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages fl and fd. *Gene* **16**(1-3), 35-58.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**(1), 175-9.
- Bolton, E. T. & McCarthy, B. J. (1962). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**, 1390.
- Booth, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* **49**(4), 359-78.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bradley, P., Cowen, L., Menke, M., King, J., Berger, B. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**(26), 14819-14824

- Brandts, J. F. (1969). . In *Structure and Stability of Biological Macromolecules* (Timasheff, S. N. & Fasman, G. D., eds.), pp. 213-290, New York.
- Brandts, J. F., Halvorson, H. R. & Brennan, M. (1975). Consideration of the Possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**(22), 4953-63.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Cantor, C. R. & Schimmel, P. R. (1980). The behaviour of biological macromolecules. In *Biophysical Chemistry* 3 edit. (Freeman, ed.), pp. 849ff. Cal, San Francisco.
- Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants - Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3**, 1-30.
- Cheng, H. N. & Bovey, F. A. (1977). Cis-trans equilibrium and kinetic studies of acetyl-L-proline and glycyl-L-proline. *Biopolymers* **16**(7), 1465-72.
- Cleland, J. L. & Wang, D. I. (1990). Refolding and aggregation of bovine carbonic anhydrase B: quasi-elastic light scattering analysis. *Biochemistry* **29**(50), 11072-8.
- Collmer, A. & Keen, N. T. (1986). The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 383-409.
- Creighton, T. E. (1990). Protein folding. *Biochem J* **270**(1), 1-16.
- Creighton, T. E. (1994). The energetic ups and downs of protein folding. *Nat Struct Biol* **1**(3), 135-8.
- Creighton, T. E., Darby, N. J. & Kemmink, J. (1996). The roles of partly folded intermediates in protein folding. *Faseb J* **10**(1), 110-8. Danner, M. & Seckler, R. (1993). Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. *Protein Sci* **2**(11), 1869-81.
- Danner, M. & Seckler, R. (1993). Mechanism of phage P22 tailspike protein folding mutations. *Protein Sci* **2**(11), 1869-81.
- Dill, K. A. (1993). Folding Proteins: Finding a needle in a haystack. *Curr Opin Struct Biol* **3**, 99-103. DeFelippis, M. R., Alter, L. A., Pekar, A. H., Havel, H. A. & Brems, D. N. (1993). Evidence for a self-associating equilibrium intermediate during folding of human growth hormone. *Biochemistry* **32**(6), 1555-62.
- Dubendorff, J. W. S., F. W. (1991a). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with the lac repressor. *J. Mol. Biol.* **219**, 45-59.
- Dubendorff, J. W. S., F. W. (1991b). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J. Mol. Biol.* **219**, 61-68.

- Eder, J., Rheinhecker, M. & Fersht, A. R. (1993). Folding of subtilisin BPN': characterization of a folding intermediate. *Biochemistry* **32**(1), 18-26.
- Edman, P. & Henschen, A. (1975). Sequence determination. In *Protein Sequence Determination* 2nd edit. (Needleman, S. B., ed.), pp. 232-279. Springer Verlag, Berlin.
- Eriksson, A. E., Baase, W. A., Zhang, X. J., Heinz, D. W., Blaber, M., Baldwin, E. P. & Matthews, B. W. (1992). Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect. *Science* **255**(5041), 178-83.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**(13), 2606-17.
- Fink, A. L., Calciano, L. J., Goto, Y., Kurotsu, T. & Palleros, D. R. (1994). Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. *Biochemistry* **33**(41), 12504-11.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**(1), 83-8.
- Fuchs, A., Seider, C., Seckler, R. (1991). In vitro folding pathway of phage P22 tailspike protein. *Biochemistry* **30**(26), 6598-604.
- Georgiou, G., Valax, P., Ostermeier, M. & Horowitz, P. M. (1994). Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in Escherichia coli. *Protein Sci* **3**(11), 1953-60.
- Gerlt, J. A. & Gassman, P. G. (1992). Understanding enzyme-catalyzed protein-abstraction from carbon acids: Details of stepwise mechanism for β -elimination reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5928-5934.
- Goldberg, M. E. (1985). The second translation of the genetic message: protein folding and assembly. *Trends Biochem Sci*, 388-91.
- Goldenberg, D. P. & King, J. (1981). Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit of the bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30 degrees C. *J Mol Biol* **145**(4), 633-51.
- Goldenberg, D. P., Creighton, T.E. (1994). Phage tailspike protein. A fishy tale of protein folding. *Curr Biol* **4**(11), 1026-9.
- Gordon, J. A. (1972). Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins. *Biochemistry* **11**(10), 1862-70.
- Gorovits, B. M., McGee, W. A. & Horowitz, P. M. (1998). Rhodanese folding is controlled by the partitioning of its folding intermediates. *Biochim Biophys Acta* **1382**(1), 120-8.
- Goto, Y., Calciano, L. J. & Fink, A. L. (1990a). Acid-induced folding of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2), 573-7.

- Goto, Y. & Fink, A. L. (1989). Conformational states of beta-lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* **28**(3), 945-52.
- Goto, Y., Takahashi, N. & Fink, A. L. (1990b). Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**(14), 3480-8.
- Greene, R. F., Jr. & Pace, C. N. (1974). Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin. *J Biol Chem* **249**(17), 5388-93.
- Haase-Pettingell, C. & King, J. (1997). Prevalence of temperature sensitive folding mutations in the parallel beta coil domain of the phage P22 tailspike endorhamnosidase. *J Mol Biol* **267**(1), 88-102.
- Hammarstrom, P., Jiang, X., Deechongkit, S. & Kelly, J. W. (2001). Anion shielding of electrostatic repulsions in transthyretin modulates stability and amyloidosis: insight into the chaotrope unfolding dichotomy. *Biochemistry* **40**(38), 11453-9.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**(4), 557-80.
- Heffron, S., Moe, G. R., Sieber, V., Mengaud, J., Cossart, P., Vitali, J. & Journak, F. (1998). Sequence profile of the parallel beta helix in the pectate lyase superfamily. *J Struct Biol* **122**(1-2), 223-35.
- Henrissat, B., Heffron, S. E., Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Journak, F. (1995). Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. *Plant Physiol* **107**(3), 963-76.
- Herbst, R., Gast, K. & Seckler, R. (1998). Folding of firefly (*Photinus pyralis*) luciferase: aggregation and reactivation of unfolding intermediates. *Biochemistry* **37**(18), 6586-97.
- Hermanns, U., Sebbel, P., Eggli, V. & Glockshuber, R. (2000). Characterization of FimC, a periplasmic assembly factor for biogenesis of type 1 pili in escherichia coli. *Biochemistry* **39**(38), 11564-70.
- Herron, S. R., Benen, J. A., Scavetta, R. D., Visser, J. & Journak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16), 8762-9.
- Herzberg, O. (1991). Refined crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.0 A resolution. *J Mol Biol* **217**(4), 701-19.
- Hubbard, S. J., Campbell, S. F. & Thornton, J. M. (1991). Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J Mol Biol* **220**(2), 507-30.
- Hunter, C. A., Singh, J. & Thornton, J. M. (1991). Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. *J Mol Biol* **218**(4), 837-46.

- Ikai, A. & Tanford, C. (1973). Kinetics of unfolding and refolding of proteins. I. Mathematical analysis. *J. Mol. Biol.* **73**, 145-163.
- Jaenicke, R. & Rudolph, R. (1986). Refolding and association of oligomeric proteins. *Methods Enzymol* **131**, 218-50.
- Jaenicke, R. (1995). Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **348**(1323), 97-105.
- Jaenicke, R. (1996). Protein folding and association: In vitro studies for self-organisation and targeting in cell. In *Current topics in cellular regulation*. (Stadtman, E. R., Chock, P. B., ed.), Academic Press, New York.
- Jaspard, E. (2000). Role of protein-solvent interactions in refolding: effects of cosolvent additives on the renaturation of porcine pancreatic elastase at various pHs. *Arch Biochem Biophys* **375**(2), 220-8.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R. (1998). Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J Struct Biol* **122**(1-2), 236-46.
- Jenkins, J. & Pickersgill, R. (2001). The architecture of parallel beta-helices and related folds. *Prog Biophys Mol Biol* **77**(2), 111-75.
- Kabsch, W., Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**(12), 2577-637.
- Kamen, D. E., Griko, Y. & Woody, R. W. (2000). The stability, structural organization, and denaturation of pectate lyase C, a parallel beta-helix protein. *Biochemistry* **39**(51), 15932-43.
- Kamen, D. E. & Woody, R. W. (2001). A partially folded intermediate conformation is induced in pectate lyase C by the addition of 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS). *Protein Sci* **10**(10), 2123-30.
- Kamen, D. E. & Woody, R. W. (2002a). Folding kinetics of the protein pectate lyase C reveal fast-forming intermediates and slow proline isomerization. *Biochemistry* **41**(14), 4713-23.
- Kamen, D. E. & Woody, R. W. (2002b). Identification of proline residues responsible for the slow folding kinetics in pectate lyase C by mutagenesis. *Biochemistry* **41**(14), 4724-32.
- Kellis, J. T., Jr., Nyberg, K. & Fersht, A. R. (1989). Energetics of complementary side-chain packing in a protein hydrophobic core. *Biochemistry* **28**(11), 4914-22.
- Kellis, J. T., Jr., Nyberg, K., Sali, D. & Fersht, A. R. (1988). Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Nature* **333**(6175), 784-6.
- Kelly, J. W., Colon, W., Lai, Z., Lashuel, H. A., McCulloch, J., McCutchen, S. L., Miroy, G. J. & Peterson, S. A. (1997). Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. *Adv Protein Chem* **50**, 161-81.

- Kiaoren, T., Yasuhiko, N., Hai-Ou, L., Mingdi, Z., Hui, G., Akiko, F., Osamu, S., Tomohiko, O. & Kazushige, Y. (1994). The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acid Research* **22**, 2857-2858.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990a). Folding of ribonuclease T1. 1. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry* **29**(12), 3053-61.
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1990b). Folding of ribonuclease T1. 2. Kinetic models for the folding and unfolding reactions. *Biochemistry* **29**(12), 3061-70.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H. H. & Buchner, J. (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* **9**(9), 825-9.
- Kiefhaber, T., Grunert, H. P., Hahn, U. & Schmid, F. X. (1992). Folding of RNase T1 is decelerated by a specific tertiary contact in a folding intermediate. *Proteins* **12**(2), 171-9.
- Kiefhaber, T., Kohler, H. H. & Schmid, F. X. (1992a). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. I. Theoretical models. *J Mol Biol* **224**(1), 217-29.
- Kiefhaber, T. & Schmid, F. X. (1992b). Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1. *J Mol Biol* **224**(1), 231-40.
- Kiefhaber, T. (1995). Protein Folding Kinetics. In *Protein Stability and Folding* (Shirley, B. A., ed.), Vol. 40, pp. 313-341. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Kim, P. S. & Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu Rev Biochem* **59**, 631-60.
- King, J. & Laemmli, U. K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* **62**(3), 465-77.
- Kita, N., Boyd, C. M., Garrett, M. R., Journak, F. & Keen, N. T. (1996). Differential effect of site-directed mutations in pelC on pectate lyase activity, plant tissue maceration, and elicitor activity. *J Biol Chem* **271**(43), 26529-35.
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* **14**(1), 51-5, 29-32.
- Kotoujansky, A. (1987). Molecular genetics of soft rot *Erwinias*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 405-430.
- Kunkel, T. A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymology* **154**, 267-382.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**(3-4), 203-9.

- Lai, Z., McCulloch, J., Lashuel, H. A., Kelly, J. W. (1997). Guanidine hydrochloride-induced denaturation and refolding of transthyretin exhibits a marked hysteresis: equilibria with high kinetic barriers. *Biochemistry* **36**(33), 10230-239.
- Lee, B. & Richards, F. M. (1971). The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J Mol Biol* **55**(3), 379-400.
- Lee, J. C., Gekko, K. & Timasheff, S. N. (1979). The calculation of partial specific volumes of proteins. In *Methods Enzymol* (Hirs, C. H. W. & Timasheff, S. N., eds.), Vol. 61, pp. 26-49. Academic Press, New York.
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways of folding. *J Chim Phys* **65**, 44-45.
- Lietzke, S. E., Yoder, M. D., Keen, N. T. & Journak, F. (1994). The Three-Dimensional Structure of Pectate Lyase E, a Plant Virulence Factor from *Erwinia chrysanthemi*. *Plant Physiol.* **106**, 849-862.
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R. & Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* **5**(5), 677-89.
- Mayr, L. M., Willbold, D., Rosch, P. & Schmid, F. X. (1994). Generation of a non-prolyl cis peptide bond in ribonuclease T1. *J Mol Biol* **240**(4), 288-93.
- McClary, J. A., Witney, F. & Geisselsoder, J. (1989). Efficient site-directed in vitro mutagenesis using phagemid vectors. *Biotechniques* **7**(3), 282-9.
- McNaught, A. D. (1997). Nomenclature of carbohydrates (recommendations 1996). *Adv Carbohydr Chem Biochem* **52**, 43-177.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998a). Phage P22 tailspike protein: removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability. *Protein Sci* **7**(10), 2223-32.
- Miller, S., Schuler, B. & Seckler, R. (1998b). A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike protein with native structure: the isolated beta-helix domain. *Biochemistry* **37**(25), 9160-8.
- Moran, F., Nasuno, S. & Starr, M. P. (1968). Extracellular and intracellular polyglacturonic acid transeliminases of *Erwinia carotovora*. *Arch Biochem Biophys* **123**(2), 298-306.
- Morris, E. R., Powell, D. A., Gidley, M. J. & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *J Mol Biol* **155**(4), 507-16.
- Mucke, M. & Schmid, F. X. (1992). Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. *Biochemistry* **31**(34), 7848-54.

- Munderloh, H. (1995). Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*- Charakterisierung und erste Analyse des Faltungsweges. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* **4**(10), 2138-48.
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. H., Li, J. & Evans, P. R. (1990). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**(6301), 515-20.
- Nall, B. T. (1994). Proline isomerisation as a rate-limiting step. In *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H., ed.), pp. 80-103. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK.
- Nasser, W., Chalet, F. & Robert-Baudouy, J. (1990). Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie* **72**(9), 689-95.
- Nozaki, Y. & Tanford, C. (1970). The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions. *J Biol Chem* **245**(7), 1648-52.
- Odefey, C., Mayr, L. M. & Schmid, F. X. (1995). Non-prolyl cis-trans peptide bond isomerization as a rate-determining step in protein unfolding and refolding. *J Mol Biol* **245**(1), 69-78.
- Otzen, D. E., Kristensen, O., Proctor, M. & Oliveberg, M. (1999). Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots. *Biochemistry* **38**(20), 6499-511.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* **131**, 266-80.
- Pace, C. N., Schmid, F. X. (1997). How to determine the molecular absorbance coefficient of a protein. In *Protein Structure, A Practical Approach* 2 nd edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 261-297. University Press, New York, Oxford.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* **4**(11), 2411-23.
- Pappenberger, G., Aygun, H., Engels, J. W., Reimer, U., Fischer, G. & Kiefhaber, T. (2001). Nonprolyl cis peptide bonds in unfolded proteins cause complex folding kinetics. *Nat Struct Biol* **8**(5), 452-8.
- Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. & Robert-Baudouy, J. (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nat Struct Biol* **1**(10), 717-23.
- Powell, D. A., Morris, E. R., Gidley, M. J. & Rees, D. A. (1982). Conformations and interactions of pectins. II. Influences of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *J Mol Biol* **155**(4), 517-31.

- Preston, J. F., 3rd, Rice, J. D., Ingram, L. O. & Keen, N. T. (1992). Differential depolymerization mechanisms of pectate lyases secreted by *Erwinia chrysanthemi* EC16. *J Bacteriol* **174**(6), 2039-42.
- Radford, S. E., Dobson, C. M. & Evans, P. A. (1992). The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways [see comments]. *Nature* **358**(6384), 302-7.
- Romboutts, F. M. & Pilnik, W. (1980). Pectic Enzymes. In *Economic Microbiology: Microbial Enzymes and Bioconversions* (Rose, A. H., ed.), Vol. 5, pp. 227-282. Academic Press, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. Auflage edit, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by a linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
- Scavetta, R. D., Herron, S. R., Hotchkiss, A. T., Kita, N., Keen, N. T., Benen, J. A., Kester, H. C., Visser, J. & Jurnak, F. (1999). Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *Plant Cell* **11**(6), 1081-92.
- Schellman, J. A. (1978). Solvent denaturation. *Biopolymers* **17**, 1305-22.
- Schellman, J. A. (1987). Selective binding and solvent denaturation. *Biopolymers* **26**(4), 549-59.
- Schmid, F. X. & Baldwin, R. L. (1978). Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10), 4764-8.
- Schmid, F. X. (1983). Mechanism of folding of ribonuclease A. Slow refolding is a sequential reaction via structural intermediates. *Biochemistry* **22**(20), 4690-6.
- Schmid, F. X. (1986). Fast-folding and slow-folding forms of unfolded proteins. *Methods Enzymol* **131**, 70-82.
- Schmid, F. X. (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In *Protein Structure, A Practical Approach* 2nd edit. (Creighton, T. E., ed.), pp. 261-297. University Press, New York, Oxford.
- Schmid, F. X. (1998). *Protein Folding*. Protein: A Comprehensive Treatise, 2.
- Schubert, W. D., Gobel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E. & Heinz, D. W. (2001). Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J Mol Biol* **312**(4), 783-94.
- Schuler, B. & Seckler, R. (1998). P22 tailspike folding mutants revisited: effects on the thermodynamic stability of the isolated beta-helix domain. *J Mol Biol* **281**(2), 227-34.

- Schumann, J., Mollering, H. & Jaenicke, R. (1993). Intrinsic stability and extrinsic stabilization of creatinase from *Pseudomonas putida*. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**(7), 427-34.
- Seckler, R. (1998). Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *J Struct Biol* **122**(1-2), 216-22
- Seckler, R., Fuchs, A., King, J., Jaenicke, R. (1989). Reconstitution of the thermostable trimeric phage P22 tailspike protein from denatured chains *in vitro*. *J Biol Chem* **264**(20), 11750-3
- Segawa, S. & Sugihara, M. (1984). Characterization of the transition state of lysozyme unfolding. I. Effect of protein-solvent interactions on the transition state. *Biopolymers* **23**(11 Pt 2), 2473-88.
- Sieber, V., Jurnak, F., Moe, G. R. (1995). Circular dichroism of the parallel beta helical proteins pectate lyase C and E. *Proteins* **23**(1), 32-7.
- Shortle, D., Stites, W. E. & Meeker, A. K. (1990). Contributions of the large hydrophobic amino acids to the stability of staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **29**(35), 8033-41. Sieber, V., Jurnak, F. & Moe, G. R. (1995). Circular dichroism of the parallel beta helical proteins pectate lyase C and E. *Proteins* **23**(1), 32-7.
- Silow, M. & Oliveberg, M. (1997). High-energy channeling in protein folding. *Biochemistry* **36**(25), 7633-7.
- Smith, D. H., Berget, P. B. & King, J. (1980). Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail-spike protein. I. Fine-structure mapping. *Genetics* **96**(2), 331-52.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, N., Weintraub, A., Seckler, R. & Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. *J Mol Biol* **267**(4), 865-80.
- Strynadka, N. C., Adachi, H., Jensen, S. E., Johns, K., Sielecki, A., Betzel, C., Sutoh, K. & James, M. N. (1992). Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in beta-lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* **359**(6397), 700-5.
- Sturtevant, J. M., Yu, M. H., Haase-Pettingell, C. & King, J. (1989). Thermostability of temperature-sensitive folding mutants of the P22 tailspike protein. *J Biol Chem* **264**(18), 10693-8.
- Takase, K., Nitta, K. & Sugai, S. (1974). Thermodynamics of the unfolding of alpha-lactalbumin by guanidine thiocyanate. *Biochim Biophys Acta* **371**(2), 352-9.
- Tanford, C., Aune, K. C. & Ikai, A. (1973). Kinetics of unfolding and refolding of Proteins. III. Results for Lysozyme. *J. Mol. Biol.* **73**, 185-197.
- Taniguchi, Y., Ono, A., Sawatani, M., Nanba, M., Kohno, K., Usui, M., Kurimoto, M. & Matuhasi, T. (1995). Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* **50**(1), 90-3.

- Teale, J. M. & Benjamin, D. C. (1976). Antibody as an immunological probe for studying the refolding of bovine serum albumin. II. Evidence for the independent refolding of the domains of the molecule. *J Biol Chem* **251**(15), 4609-15.
- Thibault, J. F., Renard, C. M. G. C., Axelos, M. A. V., Roger, P. & Crepeau, M.-J. (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **238**, 271-286.
- Thomas, L. M., Doan, C. N., Oliver, R. L. & Yoder, M. D. (2002). Structure of pectate lyase A: comparison to other isoforms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**(Pt 6 Pt 2), 1008-15.
- Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 67-97.
- Turcich, M. P., Hamilton, D. A. & Mascarenhas, J. P. (1993). Isolation and characterization of pollen-specific maize genes with sequence homology to ragweed allergens and pectate lyases. *Plant Mol Biol* **23**(5), 1061-5.
- Vanhove, M., Lejeune, A., Guillaume, G., Virden, R., Pain, R. H., Schmid, F. X. & Frere, J. M. (1998a). A collapsed intermediate with nonnative packing of hydrophobic residues in the folding of TEM-1 beta-lactamase. *Biochemistry* **37**(7), 1941-50.
- Vanhove, M., Lejeune, A. & Pain, R. H. (1998b). Beta-lactamases as models for protein-folding studies. *Cell Mol Life Sci* **54**(4), 372-7.
- Vanhove, M., Raquet, X. & Frere, J. M. (1995). Investigation of the folding pathway of the TEM-1 beta-lactamase. *Proteins* **22**(2), 110-8.
- Vanhove, M., Raquet, X., Palzkill, T., Pain, R. H. & Frere, J. M. (1996). The rate-limiting step in the folding of the cis-Pro167Thr mutant of TEM-1 beta-lactamase is the trans to cis isomerization of a non-proline peptide bond. *Proteins* **25**(1), 104-11.
- Vieira, J. a. M., J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **153**, 3-11.
- Vitali, J., Schick, B., Kester, H. C., Visser, J. & Journak, F. (1998). The three-dimensional structure of aspergillus niger pectin lyase B at 1.7-A resolution. *Plant Physiol* **116**(1), 69-80.
- Walkinshaw, M. D. & Arnott, S. (1981a). Conformation and interactions of pectins. I. X-ray diffraction analyses of sodium pectate in neutral and acidified forms. *J Mol Biol* **153**(4), 1055-73.
- Walkinshaw, M. D. & Arnott, S. (1981b). Conformations and interactions of pectins. II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *J Mol Biol* **153**(4), 1075-85.
- Wheeler, K. A., Hawkins, A. R., Pain, R. & Virden, R. (1998). The slow step of folding of Staphylococcus aureus PC1 beta-lactamase involves the collapse of a surface loop rate limited by the trans to cis isomerization of a non-proline peptide bond. *Proteins* **33**(4), 550-7.

- Wilmot, C. M. & Thornton, J. M. (1990). Beta-turns and their distortions: a proposed new nomenclature. *Protein Eng* **3**(6), 479-93.
- Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M. & McCormick, S. (1990). Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol Biol* **14**(1), 17-28.
- Winnacker, E. L. (1984). *Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie*. I edit, Verlag Chemie, Weinheim.
- Woody, R. W. (1985). Circular dichroism of peptides. In *The Peptides*, Vol. 7, pp. 15-114. Academic Press.
- Woody, R. W. (1985). Circular dichroism of peptides. In *The Peptides*, pp. 15-114. Academic Press, New York.
- Yoder, M. D. & Jurnak, F. (1995a). Protein motifs. 3. The parallel beta helix and other coiled folds. *Faseb J* **9**(5), 335-42.
- Yoder, M. D. & Jurnak, F. (1995b). The Refined Three-Dimensional Structure of Pectate Lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Angstrom Resolution. *Plant Physiol* **107**, 349 - 64.
- Yoder, M. D., Keen, N. T. & Jurnak, F. (1993). New domain motif: the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science* **260**(5113), 1503-7.
- Yoder, M. D., Lietzke, S. E. & Jurnak, F. (1993). Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure* **1**(4), 241-51.
- Yu, M. H. & King, J. (1984). Single amino acid substitutions influencing the folding pathway of the phage P22 tail spike endorhamnosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(21), 6584-8.
- Yu, M. H. & King, J. (1988). Surface amino acids as sites of temperature-sensitive folding mutations in the P22 tailspike protein. *J Biol Chem* **263**(3), 1424-31.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. & Jaenicke, R. (1979). Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry* **18**(25), 5567-71.
- Zhu, L., Fan, Y. X., Perrett, S. & Zhou, J. M. (2001a). Relationship between kinetic and equilibrium folding intermediates of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **285**(4), 857-62.
- Zhu, L., Fan, Y. X. & Zhou, J. M. (2001b). Identification of equilibrium and kinetic intermediates involved in folding of urea-denatured creatine kinase. *Biochim Biophys Acta* **1544**(1-2), 320-32.

Anhang

1. Sequenz Vergleich PelC - BsPel nach Henrissat *et al.*, 1995.

Sekundärstrukturelemente wurden kalkuliert nach einer Methode von Kabsch *et al.*, 1983.

```

PelC 1      -----SSS -- TTTTTT E----EEEESSHHHHHHHHHTTBTTS B TT S----S
ATDT-----GGYAA--TAGGNVTGAV-----SKTATSMQDIVNIIDAARLDANGKKVKGGA-----Y
BsPel 1     ---ADLGHQTLGSNDGWGAYSTGTGGSK--ASSNVYTVSNRNQLVSAHG-----KETTNT
----- GGG  TTTGGGTTT  TTTT--TTGGEEEE SHHHHHHHH----- TT S

```

```

PelC 51     EEEEE  HHHHHHHHTGGGTTTS  E-----
PLVITYTGNEDSLINAAAANICGQWSKDPGR-----
BsPel 53    PKIYYIKGT-----IDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLKYLKAYDPSTWGKKEPS
EEEE SE-----EESSB TT  B  HHHH  TT  HHHHHHTTTTTT SS

```

```

PelC 82     -----EEEE S-- EEEEE TT - BS-SEEEES BSEEEES EES S TTT---
-----VEIKEFTK--GITIIGANGS-SAN-FGIWIKKSSDVVQNMRIYLPGGAK---
BsPel 104   GTQEEARARSQKNQKARVMVDI-----PANTTIVGSGTNAKVVGGNFQI-KSDNVIIRNIEFQ-DAYD--YFP
SHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEE-----SSEEEEE TT  EES EEEE- SBSEEEES EEE- B --SS

```

```

PelC 129    -----T  SEEEES BSEEEES EEE S  TTTGGG -----SS SEE
-----DGMIRVDDSPNVVDHNELFANHECDGTPDNDT-----TFESAVD
BsPel 168   QWDPTDGSSGNWNSQYDNITINGGTHIWDHCTFND-----GSRPDSTSPKYGRKYQHHDGQTD
EEETTSSSS EEE  SEEEES BSEEEES EEE -----TTTGGG  EETTEE  B SEE

```

```

PelC 171    EESS EEEES EESBSB  EESSSS  ----- EEEES EESB B S  EESSEEEES EEE
IKGASNTVTVSYNYIHGKVKVLDGSSSDTG-----RNITYHHNYNDVNARLPLQRGGLVHAYNNLYTN
BsPel 228   ASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDS---KTSDDGKLIKTLHHNRYKNIVQRAQPRVRFQGVHVNYYEG
EETT BSEEEES EESBSB  EE  TT---TGGGTT  EEEES EESB B SSEESS EEEES EEE

```

```

PelC 237    B-----SS SEEEETT EEEES EEESEESSEE SSSS  -----EEEEES S  S
I-----TGSGLNVRQNGQALIENNWFKAINPVTSRYDGKNFG-----TWVLKGNNTK
BsPel 298   -STSSSYPFYAWGIGKSKIYAQNVIDV-----PGLSAAKTISVFGGTALYDSGTL--
- TT SSS  SEEE TT EEEES EEEE-----TTTTGGGEEE TT  B EES EE--

```

```

PelC 286    THHHHHHTEE  SS EE TT  ----- S  -  S  HHHH-----H
PADFSTYSITWTADTKPYVNADSWTS-----TGTF-PTVAYNYSVSAQCV-----K
BsPel 353   -----NGTQINASAANGLSSSVGW-TPSL-----HGSIDASANVK
-----TTEE  HHHHTT BS  S  -  S-----HHHHT

```

```

PelC 332    HHGGTSSSSSTT  GGG
DKLPYAGVGKLNLATLTSTACK
BsPel 387   SNVINQAGAGKLN-----
HHHHHH STTS -----

```

G	: 3_{10} -Helix	T	: Turn durch H-Brücken gebunden
H	: Helix	S	: bend (Knick)
B	: Rest in isolierter β -Brücke	.	: Abstandsmarkierung von 10 AS
E	: ausgedehntes beta-Faltblatt		
█	: Asn-Stapel		
P	: cis-Prolin		

2. DNA-Codon-Information der Prolin-Mutanten (P281X) und der Asparagin-Mutanten (N271X)

Pro281X-Mutanten:

DNA-Codon	Aminosäureaustausch	Laborcode
GCG	Pro281Ala	P1
ATA	Pro281Ile	P3
CTT	Pro281Leu	P6
TAT	Pro281Tyr	P10
TTT	Pro281Phe	P11
GGG	Pro281Gly	P15
-	Δ 280/281	PA
AGT	Pro281Ser	PK

Asn271X-Mutanten:

DNA-Codon	Aminosäureaustausch	Laborcode
CGG	Asn271Arg	N3
ACC	Asn271Thr	N4
GCC	Asn271Ala	N9
CTC	Asn271Leu	N14
CCT	Asn271Pro	N18
GAT	Asn271Asp	NB
GAA	Asn271Glu	NC
GGC	Asn271Gly	NL

Danksagung

Allen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren oder sie erst ermöglicht haben, will ich an dieser Stelle nicht zu danken versäumen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Robert Seckler bedanke ich mich für die Aufnahme in seine Gruppe und die ausgezeichnete Betreuung, sowie für zahlreiche Anregungen und Ratschläge, ohne die die Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen wäre. Herzlichen Dank auch für die erbrachten "Ersten Hilfeleistungen" bei allen Computer- oder Geräteproblemen und für alles, was ich im Laufe mehrerer Jahre von ihm gelernt habe.

Herrn Prof. Rainer Jaenicke danke ich für die freundliche Aufnahme an seinen Lehrstuhl in der Regensburger Zeit dieser Doktorarbeit und für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit.

Herrn Prof. Micheel danke ich für die gute Zusammenarbeit zwischen den Gruppen und für das großzügige Überlassen zweier Mäuse, samt Antikörper.

Ganz herzlich möchte ich mich natürlich auch bei meinen ganzen "Laborgenossen" in Regensburg und Potsdam bedanken, für eine gute und unterhaltsame Atmosphäre im Labor, die ein angenehmes Arbeiten ermöglichte.

Hier an letzter Stelle, aber von oberster Priorität ist mein herzlicher Dank an meine Eltern, die mich moralisch, finanziell und vor allem geduldig unterstützt haben.