

# **Faltung des $\alpha$ -Amylaseinhibitors Tendamistat**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich Chemie  
der Johann Wolfgang Goethe Universität  
in Frankfurt am Main**

**von  
Hüseyin Hayrullah Aygün  
aus Istanbul**

**Frankfurt am Main (2001)  
(DF1)**

*„Was dir nur Augen sind in diesen Tagen,  
In künftigen Nächten sind es Dir nur Sterne“*

*Friedrich Rückert, Kindertotenlieder*

*gewidmet meinem verstorbenen Vater Hamdullah Ayyün*

---

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels in der Zeit von 1995 bis 1999 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Joachim W. Engels möchte ich an aller erster Stelle für die fachliche Unterstützung sowie die hilfreichen Diskussionen danken.

Weiterhin gehört mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Kiefhaber an der Universität Basel/Schweiz. Ohne die ausgezeichnete Unterstützung sowie die zahlreichen technischen Möglichkeiten an der Universität Basel wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. Sylvia Wojczewski für die umfangreiche Unterstützung im Labor und bei der kritischen Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit danken.

Auch danke ich Herrn Holger Steinlechner für die Hilfestellungen im Labor sowie seine Unterstützung im Umgang mit Rechnersystemen und „korrupten“ Software-Programmen.

Außerdem danke ich herzlich:

- Herrn Guenther Pappenberger für die angenehme und freundschaftliche Zeit in Basel sowie die nächtelangen Messungen und Diskussionen zum Thema Tendamistat.
- Frau Beate Conrady für ihre Hilfe bei der CE-Analytik und der HPLC.
- Herrn R. Schmidt für seine Hilfe bei technischen Problemen.
- Herrn Dr. M. Kircher für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.
- Frau Hannelore Brill und Frau Ilona Bries für die Massenspektren.

Weiterhin sei an dieser Stelle auf die zahlreichen anderen Mitglieder des Arbeitskreises in Dankbarkeit verwiesen, die großen Anteil an dem angenehmen Arbeitsklima gehabt haben.

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>2. THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. Streptomyceten</b> .....	<b>8</b>
2.1.1. Expression.....	10
2.1.2. Expression in <i>Streptomyces lividans</i> .....	11
2.1.3. Expressionsvektor pAX5a.....	13
<b>2.2. Tendamistat</b> .....	<b>14</b>
2.2.1. Struktur.....	14
2.2.2. Homologie.....	16
2.2.3. Faltung.....	18
2.2.4. Anwendung des Tendamistats.....	22
<b>2.3. Faltung</b> .....	<b>23</b>
2.3.1. Allgemein.....	23
2.3.2. Faltung von $\beta$ -Faltblattstrukturen.....	33
2.3.3. Hydrophobe Oberflächenstrukturen (SEHC).....	36
2.3.4. Prolinisomerisierung.....	38
2.3.4.1. Einleitung.....	38
2.3.4.2. Nachweismöglichkeiten für die Prolinisomerisierung.....	42
2.3.4.3. Kinetik der Prolinisomerisierung.....	44
2.3.5. Übergangszustände in der Proteinfaltung.....	46
2.3.5.1. Die $\Phi$ -Wert Analyse.....	47
2.3.5.2. Der Brønsted-Plot.....	49
2.3.5.3. Die m-Wert Analyse.....	52
2.3.6. Zeitaufgelöste Techniken.....	57
<b>2.4. Spektroskopie</b> .....	<b>60</b>
2.4.1. CD-Spektroskopie.....	60
2.4.2. Fluoreszenzspektroskopie.....	64
<b>3. AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>67</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1. Aufbau und Charakterisierung der Prolinmutanten</b> .....	<b>69</b>
4.1.1. PCR-Mutagenese.....	69
4.1.1.1. USE-Mutagenese.....	70
4.1.1.2. Mutagenese nach Nelson und Long (Nelson, 1989).....	74
4.1.1.3. Konstruktion der Oligonukleotide und Einführung der Prolinmutationen.....	78
4.1.2. Klonierung der Prolinfreien Mutante P7AP9AP50A.....	82
4.1.3. Expression.....	83
4.1.3.1. Umklonierung in den Expressionsvektor pAX5a.....	83
4.1.3.2. Transformation in <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	84
4.1.3.3. $\alpha$ -Amylase Plattentest.....	84
4.1.3.4. Expression der Mutanten in Schüttelkulturen.....	85
4.1.4. Reinigung der Tendamistat Mutanten.....	88
4.1.4.1. Charakterisierung der exprimierten Mutanten.....	88

4.1.4.2.	Bestimmung der optimalen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration .....	90
4.1.4.3.	Präparative Aufreinigung der P7AP9AP50A-Variante über RP-HPLC .....	91
4.1.5.	Neue Aufreinigungsstrategie .....	94
4.1.5.1.	Optimierung der Gelfiltration .....	94
4.1.5.2.	Präparative Aufreinigung der Mutante P7AP9AP50A .....	96
4.1.5.3.	Expression und Reinigung nach Kultivierung in Produktionsmedium .....	99
4.1.5.4.	Präparative Aufreinigung der Mutanten P7AP9A und P50A .....	101
4.1.6.	Analytik .....	103
4.1.6.1.	HPLC Analytik .....	103
4.1.6.2.	CE Analytik .....	106
4.1.7.	Spektroskopie .....	108
4.1.7.1.	UV-Spektroskopie .....	108
4.1.7.2.	Fluoreszenzspektroskopie .....	112
4.1.7.3.	CD-Spektroskopie .....	116
4.1.8.	Thermisch induzierte Entfaltung .....	119
4.1.9.	Guanidiniumhydrochlorid induzierte Entfaltung .....	126
4.1.10.	Methanol induzierte Entfaltung .....	131
4.1.11.	Rück- und Entfaltung .....	137
4.1.12.	Nachweis von $U_x$ („U-Test“) .....	144
4.1.13.	Nachweis der Bildung von N („N-Test“) .....	151
4.1.14.	Trypsin Spaltungstest .....	156
<b>4.2.</b>	<b>Aufbau und Charakterisierung weiterer Mutanten .....</b>	<b>161</b>
4.2.1.	PCR-Mutagenese .....	161
4.2.1.1.	Konstruktion der Oligonukleotide und Einführung der Mutationen .....	161
4.2.2.	Klonierung, Expression und Aufreinigung .....	164
4.2.2.1.	Umklonierung in den Expressionsvektor pAX5a .....	164
4.2.2.2.	Transformation in <i>Streptomyces lividans</i> TK24 .....	165
4.2.2.3.	Der $\alpha$ -Amylase Plattentest .....	165
4.2.2.4.	Expression in 50ml Schüttelkulturen .....	166
4.2.2.5.	Präparative Expression .....	167
4.2.3.	Analytik .....	171
4.2.3.1.	PAGE Analytik .....	171
4.2.3.2.	Inhibitionstest .....	172
4.2.3.3.	CE Analytik .....	174
4.2.4.	Spektroskopie .....	177
4.2.4.1.	UV Spektroskopie .....	177
4.2.4.2.	Fluoreszenzspektroskopie .....	179
4.2.4.3.	CD-Spektroskopie .....	181
4.2.5.	Thermisch induzierte Entfaltung .....	184
4.2.6.	Guanidiniumhydrochlorid induzierte Entfaltung .....	187
4.2.7.	chevron plot .....	192
4.2.7.1.	Kinetik .....	192
4.2.7.2.	Auswertung .....	197
4.2.7.3.	Die m-Wert Analyse .....	202
4.2.7.4.	Die $\Phi$ -Wert Analyse .....	204
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>208</b>
5.1.	Klonierung und Expression neuer Tendamistat Varianten .....	208
5.1.1.	Mutagenese .....	208
5.1.2.	Aufreinigung und Analytik .....	210
5.2.	Methanol induzierter Entfaltung des Tendamistats .....	213
5.3.	Theoretische Betrachtungen .....	216

5.3.1.	Topologie.....	216
5.3.2.	Leu → Ala14.....	217
5.3.3.	Asn → Ala25.....	218
5.3.4.	Thr → Ala32.....	219
5.3.5.	Val → Ala36 und Val → Ile36.....	220
5.3.6.	Leu → Ala44.....	221
5.3.7.	Ile → Met61.....	221
5.3.8.	Pro → Ala7,Ala9.....	222
5.3.9.	Pro → Ala50.....	223
<b>5.4.</b>	<b>Auswirkungen einzelner Mutationen auf die Stabilität des Tendamistats.....</b>	<b>224</b>
5.4.1.	Die Mutationen Leu → Ala14 und Asn → Ala25.....	224
5.4.2.	Die Mutationen Val → Ala36 und Val → Ile36.....	227
5.4.3.	Die Mutationen Leu → Ala44 und Ile → Met61.....	229
5.4.4.	Die Mutationen Pro → Ala7, Ala9 und Ala50.....	230
<b>5.5.</b>	<b>Faltung des <math>\alpha</math>-Amylase Inhibitors Tendamistat.....</b>	<b>232</b>
5.5.1.	Einfluß der Proline Pro7, Pro9 und Pro50.....	232
5.5.1.1.	Ursache für die langsame Phase im Tendamistat.....	232
5.5.1.2.	Ursache für die mittlere Phase im Tendamistat.....	234
5.5.2.	Einfluß des hydrophoben Oberflächenclusters.....	239
5.5.3.	Verhalten des $\beta$ -Hairpins.....	242
5.5.4.	Nukleations-Kondensations Modell.....	247
5.5.5.	Aktivierungsbarriere der Faltung.....	251
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>255</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>261</b>
<b>8.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>264</b>
8.1.	Geräteliste.....	264
8.2.	Laborchemikalien.....	265
8.3.	Enzyme.....	268
8.4.	Bakterienstämme.....	269
8.5.	Plasmide.....	269
8.6.	Molekulargewichtsmarker.....	270
8.7.	Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....	270
8.7.1.	Arbeiten mit <i>E.coli</i> .....	271
8.7.1.1.	Lösungen und Puffer.....	271
8.7.1.2.	Stammhaltung (backup).....	273
8.7.1.3.	Über-Nacht-Rollerkultur (ÜNR).....	273
8.7.1.4.	Kompetente Zellen I.....	273
8.7.1.5.	Kompetente Zellen II (Chung, 1993).....	274
8.7.1.6.	Transformation.....	274
8.7.1.7.	Plasmid-DNA Isolation I.....	275
8.7.1.8.	Plasmid-DNA Isolation II (Kovalenko et al., modifiziert).....	276
8.7.1.9.	Gradienten-DNA Präparationen.....	276

8.7.2.	Arbeiten mit <i>Streptomyces lividans</i> .....	278
8.7.2.1.	Lösungen und Puffer .....	278
8.7.2.2.	Plattenstammhaltung .....	280
8.7.2.3.	Animpfen von Schüttelkulturen.....	280
8.7.2.4.	Herstellung von Protoplasten ( <i>Streptomyces lividans</i> 66 TK24).....	281
8.7.2.5.	Transformation in <i>Streptomyces lividans</i> TK24.....	282
8.7.3.	Arbeiten mit DNA.....	282
8.7.3.1.	Lösungen und Puffer .....	282
8.7.3.2.	Analytik von dsDNA über Agarosegele.....	284
8.7.3.3.	Analytik von ssDNA über Polyacrylamidgele.....	285
8.7.3.4.	Quantifizierung von dsDNA über UV-Spektrophotometrie.....	285
8.7.3.5.	Quantifizierung dsDNA über Gelelektrophorese:.....	286
8.7.3.6.	Quantifizierung von ssDNA über UV-Spektrophotometrie .....	286
8.7.3.7.	Elektroelution .....	286
8.7.3.8.	Entfernung von Proteinen.....	287
8.7.3.9.	Ethanol-fällung .....	287
8.7.3.10.	Isolierung von DNA über DEAE-Membranen .....	288
8.7.3.11.	PEG Fällung (R.C.Mierendorf, 1987) .....	289
8.7.3.12.	Spermin-Präzipitation.....	290
8.7.3.13.	Dephosphorylierung mit CIP (New England Biolabs, 1994) .....	290
8.7.3.14.	Ligation (Maniatis, 1989).....	291
8.7.3.15.	Restriktion von DNA mittels Endonukleasen.....	292
8.7.3.16.	Sequenzierung .....	293
8.7.4.	Arbeiten mit Proteinen .....	294
8.7.4.1.	Puffer und Lösungen .....	294
8.7.4.2.	Aceton-Fällung.....	296
8.7.4.3.	Ammoniumsulfat-Fällung .....	296
8.7.4.4.	Plattentest (nach K.P.Koller, Hoechst AG, per. Mit.).....	297
8.7.4.5.	Miniaturisierung von Proteingelen .....	298
8.7.4.6.	Nativ-PAGE .....	298
8.7.4.7.	Proteinquantifizierung .....	300
8.7.4.8.	Tricine-SDS-Proteingelelektrophorese (Schägger & v. Jagow).....	301
8.7.4.9.	Silberfärbung von Proteingelen .....	303
8.7.5.	Aufreinigung von Proteinen.....	304
8.7.5.1.	Puffer und Lösungen .....	304
8.7.5.2.	Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) .....	304
<b>9.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>307</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>327</b>

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1. Streptomyceten

Die Gattung der *Streptomyces* wird der Ordnung *Actinomycetales* zugerechnet und bildet mit über 500 verschiedenen Arten davon die größte Untergruppe. Von ihrer Ökologie her rechnet man sie vorwiegend zu den Bodenbakterien, wobei jedoch auch einige marine Arten bekannt sind. Neutrale bis alkalische Erdböden sind bevorzugte Lebensräume der chemo-organotrophen Streptomyceten. Als obligate Aerobier sind sie dabei auf einen guten Sauerstoffdurchsatz im Boden angewiesen. Neben den gewöhnlichen Kohlenstoffquellen im Erdreich sind manche Arten in der Lage selbst Lignin und Tannin zu verwerten. Stark begünstigt wird ein solcher Stoffwechsel durch zahlreiche hydrolytische Enzyme, die helfen, ein breites Spektrum an Nährstoffen zu mobilisieren (Long, 1987; Viroille, 1988).

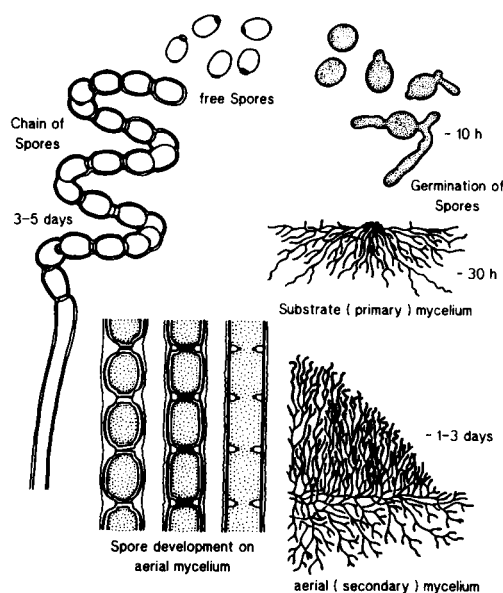


Abbildung 2-1 Entwicklungszyklus von Streptomyceten.

Der Lebenszyklus verläuft sehr differenziert unter Bildung charakteristischer Strukturen, die auf den ersten Blick an Pilze erinnern. Diesem pilzähnlichen Aussehen verdanken Streptomyceten ihren Gattungsnamen (griech. *streptos*-gedreht, *mykètes*-Pilz). Das Fehlen einer Kernmembran



und jeglicher Organellen im Zellinneren, sowie das Vorhandensein von 70S anstatt 80S Ribosomen, weist sie jedoch als niedere Protisten aus. Auf festen Nährböden beginnen Streptomyceten ihren Lebenszyklus mit der Auskeimung hitzesensibler Sporen (Germination), der nach etwa 18h die Bildung eines einfachen Substratmycels folgt. Sinkt der Wassergehalt des Bodens allmählich ab, wächst aus dem sich zurückentwickelnden Substratmycel ein Luftmycel heran. In einer abgeschlossenen Kultur kann dies bereits nach etwa 2 Tagen eintreten. Nach bis zu acht Tagen entwickeln sich an den Filamentspitzen zahlreiche Sporophoren heraus, von denen sich allmählich Konidiosporen abschnüren (Hopwood, 1986; Chater, 1984). Diese morphologische Veränderung geht häufig einher mit der Produktion von Sekundärmetaboliten. Sie ist leicht anhand der sich bildenden Zelltrennwände erkennbar, die in der vegetativen Wachstumsphase nicht vorhanden sind (polyzellulär). Ebenfalls kennzeichnend für viele Arten ist die häufig auftretende Pigmentierung, die sich außer im Substratmycel, hauptsächlich in Sporen und Sporophoren beobachten läßt.

Für die industrielle Nutzung sind vor allem nicht-essentielle Stoffwechselprodukte zahlreicher Streptomyceten von großer Bedeutung. Dazu zählen neben Farb- und Duftstoffen vor allem zahlreiche Antibiotika (Brock, 1994). Diese decken von den über 5000 dazugehörigen Substanzen etwa 65% ab und befinden sich zum Teil in der kommerziellen Anwendung. Der Nutzen einer Sekundärmetabolitproduktion ist nicht genau bekannt. Dahinter wird jedoch ein Selektionsvorteil, gegenüber artfremden Organismen vermutet.

Eine andere von Streptomyceten produzierte Metabolitklasse stellen die hydrolytischen Enzyme dar (z.B.  $\alpha$ -Amylasen,  $\beta$ -Galactosidasen,  $\beta$ -Lactamasen und zahlreiche Proteasen). Passend zu den Hydrolasen produzieren die gleichen Stämme zahlreiche Inhibitoren, zu denen auch der  $\alpha$ -Amylase Inhibitor Tendamistat (Koller, 1985) gehört.

Aus molekularbiologischer Sicht fällt mit 74% der hohe G/C-Gehalt (ordnungstypisch) der *Streptomyces* DNA auf. Ihr Genom ist etwa 2-3mal so groß wie das von *E.coli* (8Mb bei *S. coelicolor* und *S.lividans*) und überraschenderweise linear (Lin, 1993). An den beiden Enden (Telomere) verfügt das Genom über zahlreiche invertiert-repetitive Einheiten (25kb). Eine ähnliche Struktur (Invertrons) besitzen auch viele lineare Plasmide (z.B. SPC 1) aus *Streptomyces* (Hinnebusch, 1993). Anders als bei der Telomerase-vermittelten Replikation in Eukaryonten verläuft die Replikation in *Streptomyces* vermutlich nach dem "protein-primed" Mechanismus, bei dem ein einzelnes, proteinverknüpftes Nukleotid als „Startstelle“ fungiert.

Zur gentechnischen Nutzung von Streptomyceten tragen zahlreiche Klonierungssysteme bei

(Kieser, 1991). Die meisten für die Klonierung verwendeten Vektoren (Tabelle) leiten sich von dem “high-copy-number” Vektor pIJ101 (*Streptomyces lividans* ISP 5434) ab und tragen zusätzliche Resistenzmarker, die sich überwiegend aus Antibiotika produzierenden Streptomyceten (Hopwood, 1987) ableiten. Für Klonierungs- und Expressionsstudien verwendet man häufig den gut untersuchten Organismus *Streptomyces lividans* 66 (Hopwood, 1985), der neben einer günstigen Protoplastierbarkeit über keine Restriktionsbarriere bei der Transformation mit wirtsfremder DNA verfügt. Ein weiterer Vorteil betrifft die verminderte Proteasesekretion des Organismus. Dagegen wirkt sich die lange Generationsdauer (~ 2h) eher ungünstig auf die schnelle und kontaminationsfreie Produktion von extrazellulären Verbindungen aus.

<i>Vektor</i>	<i>Kopienzahl</i>	<i>Größe (kb)</i>	<i>Marker<sup>1)</sup></i>	<i>Replicon</i>	<i>Bemerkung</i>
pGM11	55	5.47	<i>neo, aacC1-dp</i>	PSG5	T-sensitiv
pIJ702	100	5.8	<i>tsr, mel</i>	pIJ101	-
pIJ860	100	10.3	<i>Tsr, amp, neo</i>	pIJ101, pBR322	Bifunktionell
pHJL302	1000	5.1	<i>Tsr, amp, -lac</i>	SPC2, pUC19	Bifunktionell
pIJ486/7	100	6.2	<i>tsr, neo</i>	pIJ101	-

1) *aacC1-dp*: promotorloses Gentamycin-Resistenz-Gen aus Tn1696; *amp*: Ampicillin-Resistenz-Gen aus pBR322; *-lac*: modifiziertes lacZ-Gen, Teil aus pUC19; *mel*: Melanin-Gen (Tyrosinase) aus *S. antibioticus* IMRU3720; *neo*: Neomycin- und Kanamycin-Resistenz-Gen aus Tn5; *tsr*: Thiostrepton-Resistenz-Gen aus *S. azureus* ATCC14921.

Tabelle 2-1 Einige in Streptomyceten gebräuchliche Vektoren.

Unabhängig davon stellt die genetische Instabilität ein wesentliches Problem im Umgang mit Streptomyceten dar. Solche Instabilitäten sind ebenfalls von vielen wirtseigenen Plasmiden bekannt. Dennoch konnten bereits zahlreiche Genexpressionen erfolgreich in Streptomyceten durchgeführt werden (Koller, 1989; Engels, 1992; Wojczewski, 1999). Der Hauptvorteil als Produktionsorganismus dürfte vor allem in der extrazellulären Sekretion des jeweiligen Proteins zu suchen sein. Aus großtechnischer Sicht wird so eine kontinuierliche Fermentation möglich.

### 2.1.1. Expression

Je nach Wirtsorganismus sind für eine Proteinexpression unterschiedliche Ansätze entwickelt worden (Rehm, 1993). Gemeinsam ist ihnen die Konstruktion einer synthetischen Expressionskassette, in die das zu exprimierende Gen über Restriktionsschnittstellen inkloniert

wird. Die sich in einem geeigneten Vektorsystem befindende Kassette enthält bereits sämtliche Funktionen zur Steuerung und Kontrolle der Transkription (Promotor, Operator und Terminator), sowie der Translation (ribosomale Bindungsstelle) und Translokation (Signalpeptid).

Bei der direkten Expression bedient man sich eines einfachen Kassettenaufbaues, bestehend aus induzierbarem oder konstitutivem Promotor, dem das zu exprimierende Gen nachgeschaltet ist. Nachteilig an dieser Methode ist zum einen die erhöhte Belastung des Wirtes und zum anderen eine durch Wirtsproteasen bedingte Instabilität des Proteins. Diese Nachteile lassen sich durch Aufbau eines Fusionsproteins teilweise lösen. Dabei werden die zu exprimierenden Proteine unmittelbar mit wirtseigenen Proteinen verknüpft. Genau wie bei der direkten Expression, müssen bei diesem Verfahren die Zellen nach Kultivierung aufgeschlossen werden, um das gewünschte Fusionsprotein isolieren zu können. Die Nachteile dieses Systems bestehen darin, daß ein chemischer oder enzymatischer Abspaltvorgang stets notwendig bleibt und häufig denaturierte Produkte erhalten werden.

Die aussichtsreichste Methode dürfte die Transport-Expression sein. Hierbei wird das Genfragment hinter eine sekretorische Funktion des Wirtes gestellt, die das Protein nach Translokation entweder ins Periplasma oder direkt ins Medium freigibt (Koller, 1989; Koller, 1991).

### **2.1.2. Expression in *Streptomyces lividans***

Die Bedeutung von Streptomyceten als Wirte für die Proteinexpression resultiert nicht zuletzt aus ihrem Zellwandaufbau. Als Gram-positive Bakterien verfügen Streptomyceten nicht über eine Außenmembran. Dadurch befindet sich der gesamte Translokationsapparat an der Zelloberfläche unterhalb des Mureinnetzes. Werden die zu exprimierenden Proteine mit der entsprechenden Signalsequenz ausgestattet, erfolgt die direkte Sekretion ins Kulturmedium (Engels, 1992). Zur Expression von Tendamistat stand eine in der Arbeitsgruppe Engels (Hoffmann, 1992) entwickelte Expressionskassette zur Verfügung. Diese Kassette (Abbildung 2-2) besteht aus einer stromaufwärts gelegenen Promotorsequenz sowie einer ribosomalen Bindungsstelle (RBS), der sich gleich die Signalsequenz mit dem entsprechenden Tendamistat Strukturgen anschließt. Stromabwärts des Strukturgens befindet sich im Shuttlevektor pAX5a eine zusätzliche Transkriptionsterminationssequenz (Pulido, 1987).

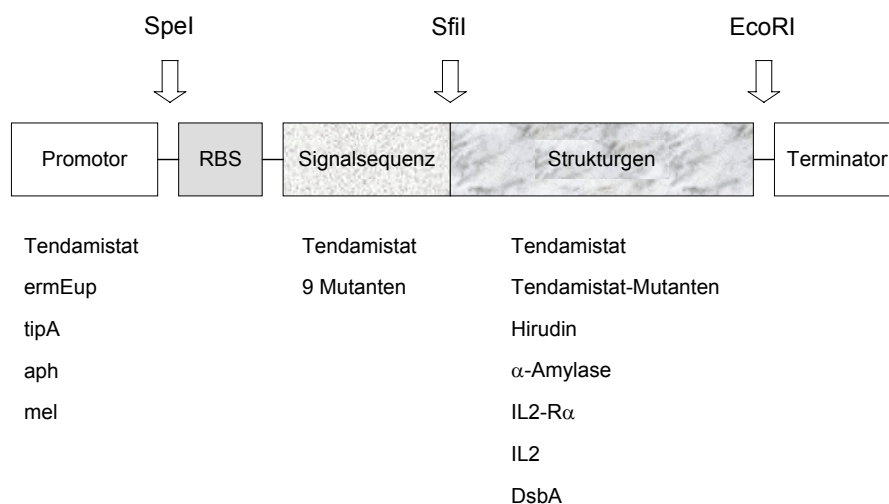


Abbildung 2-2 Kasette zur Expression homologer sowie heterologer Gene in *Streptomyces lividans*.

Die einzelnen Elemente dieser Kasette sind über Restriktionsschnittstellen so miteinander verbunden, daß sie leicht durch andere ersetzt werden können.

<i>Protein (homolog)</i>	<i>Vektor</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Literatur</i>
Tendamistat-Ladungsmutanten	pAX5a	<i>Streptomyces tendae</i>	(Aygün, 1995)
Tendamistat-Ladungsmutanten	pAX5a	<i>Streptomyces tendae</i>	(Gastman, pers. Mit.)
Tendamistat-Disulfidmutanten	pBC1	<i>Streptomyces tendae</i>	(Haas-Lauterbach, 1993)
Tendamistat-Disulfidmutanten	pBC1	<i>Streptomyces tendae</i>	(Scharf, 1992)
Tendamistat-Disulfidmutanten	pAX5a	<i>Streptomyces tendae</i>	(Steinlechner, pers. Mit.)
Tendamistat-Punktmutanten	pAX5a	<i>Streptomyces tendae</i>	(Aygün, diese Arbeit)
Tendamistat-Prolinmutanten	pAX5a	<i>Streptomyces tendae</i>	(Aygün, diese Arbeit)
$\alpha$ -Amylase	pAX5a	<i>Streptomyces limosus</i>	(Nußbaum, 1993)
PPase	pAX5a	<i>Streptomyces lividans</i>	(Wu, pers. Mit.)
<i>Protein (heterolog)</i>	<i>Vektor</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Literatur</i>
Hirudin	pAX5a	<i>Hirudo medicinalis</i>	(Wojczewski, 1999)
DsbA	pAX5a	<i>E. coli</i>	(Goren, pers. Mit.)

Tabelle 2-2 Erfolgreich exprimierte Gene in *Streptomyces lividans*.

Als Promotoren stehen neben dem Tendamistat Wildtyppromotor (Koller et al., 1984), auch die konstitutiven Promotoren *ermEup* (Bipp, 1985), *mel* (Bernan, 1991) und *aph* (Janssen, 1990) sowie der induzierbare Promotor *tipA* (Murakami, 1989) zur Verfügung. Als Signalsequenz dient

in den meisten Fällen die Tendamistat Wildtypsequenz (Koller, 1984). Darüberhinaus konnten von Faß (Faß, 1990; Faß, 1994) weitere Ladungsmutanten der Signalsequenz konstruiert werden, unter denen die A2 Signalpeptid-Variante gegenüber dem Wildtyp zu einer Verdopplung der Expression führt (Faß, 1996).

### 2.1.3. Expressionsvektor pAX5a

Der bifunktionale Vektor pAX5a (8067bp) setzt sich aus den beiden Vektoren pUC19 (Yanisch-Perron, 1985) sowie pIJ702 (Bernan, 1985) zusammen (Hoffman, 1992). Durch die beiden Replikationsursprünge (pBR322 sowie pIJ101) ist mit ihm ein vertikaler Gentransfer zwischen den Organismen *E. coli* und *Streptomyces lividans* möglich (Shuttlevektor). Der *ermEup*-Promotor zählt zu den konstitutiven Promotoren und stammt aus dem Organismus *Saccharopolyspora erythrea* (Bibb, 1985). Auf die Bausteine der Genkassette sei nachfolgend kurz eingegangen (vgl. Abbildung 2-3):

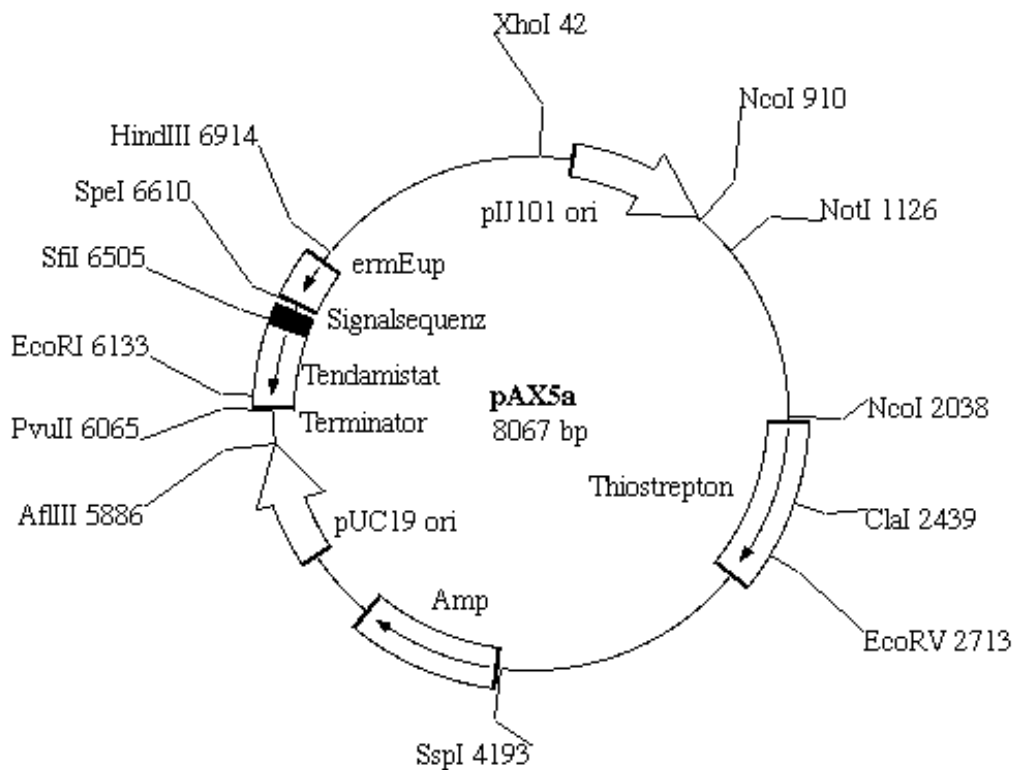


Abbildung 2-3 Der für die Expression in *S. lividans* verwendete Shuttlevektor pAX5a.

*ermEup* besteht aus zwei tandemartig angeordneten Einzelpromotoren (P1 und P2) und unterscheidet sich vom Ausgangspromotor *ermE* durch eine 3bp Deletion (up-Mutation) im -35 Bereich des ersten Promotors (Bibb, 1986). Bei Expressionsstudien zeigen Konstruktionen, die diesen Promotor tragen besonders hohe Expressionsausbeuten (Hoffmann, 1993). An diesen Promotor schließt sich das Tendamistat Gen bestehend aus ribosomaler Bindungsstelle, Signalsequenz und Strukturgen an. Es stammt aus einer chromosomal amplifizierte Sequenz in *Streptomyces tendae* 4158 (Aschauer, 1981; Vértesy, 1984) und enthält eine für die Sekretion des Tendamistats notwendige Signalsequenz aus 30 Aminosäuren. Das Signalpeptid läßt sich in drei Domänen (Faß, 1994) unterteilen, von denen jede eine unterschiedliche Funktion besitzt (Faß, 1994; Vigal, 1991). Am Ende der Kasette befindet sich der *aph* Transkriptionsterminator aus *S. fradiae* (Pulido, 1987). In seiner Sequenz enthält dieser Terminator einen G/C-reichen selbstkomplementären Abschnitt, der nach Transkription zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur führen soll.

## 2.2. Tendamistat

### 2.2.1. Struktur

Tendamistat (Abbildung 2-4) ist ein aus 74 Aminosäuren bestehender  $\alpha$ -Amylase Inhibitor ( $K_i < 10^{-12}$ ), der von Aschauer (Aschauer, 1981) aus Kulturüberständen von *Streptomyces tendae* 4158 isoliert werden konnte. Das 7956Da große Protein verfügt über eine hohe thermische Stabilität ( $T_m > 80^\circ\text{C}$ ) und enthält zahlreiche saure Aminosäuren ( $\text{p}K_i = 4.35$ ).

Kurze Umkehrschleifen sowie zwei  $\beta$ -Faltblätter charakterisieren die Sekundärstruktur (Tabelle 2-3) des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. Innerhalb der Tertiärstruktur (Pflugrath, 1986; Qiwen, 1987; Kline, 1986a; Kline, 1986b) sind diese zu einem  $\beta$ -barrel (+1+3-1-1+3) zusammengelagert, das aus zwei dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (I: 12-17, 20-27, 52-58; II: 30-37, 41-49, 67-73) aufgebaut wird.

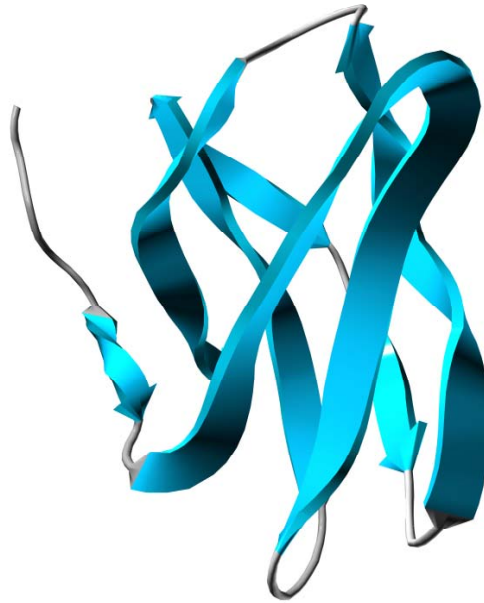


Abbildung 2-4 Grafische Darstellung des Tendamistats nach der Struktur von Pflugrath (Pflugrath, 1986).

<i>Faltblätter</i>						
Strang	Start	Ende	Faltblatt	Reste	Außen	Sequenz
1	12	16	I	5	Ja	VTLYQ
2	21	25	I	5	Nein	SQADN
3	31	37	II	7	Nein	VTVKVVY
4	42	48	II	7	Ja	EGLCYAV
5	53	57	I	5	Ja	ITTVG
6	67	72	II	6	Ja	ARYLAR
<i>Turn</i>						
Turn	Start	Ende	Typ	Reste		Sequenz
1	1	4	IV	4	-	DTTV
2	9	12	I	4	-	PSCV
3	10	13	VIII	4	-	SCVT
4	17	20	IV	4	-	SWRY
5	37	40	I	4	-	YEDD
6	49	52	II	4	-	APGQ
7	62	65	IV	4	-	GSHG

Tabelle 2-3 Sekundärstrukturbereiche des Tendamistats.

Vier sequentiell miteinander verbundene Cysteine (11/27 und 45/73) fixieren zwei unterschiedlich große Schleifen, von denen die kleinere (12-27) in ihrer Turn-Region die

charakteristische Bindungsstelle des Tendamistats (Trp<sup>18</sup>-Arg<sup>19</sup>-Tyr<sup>20</sup>) an die  $\alpha$ -Amylase enthält (Wiegand, 1995). Tendamistat gehört damit zu den seltenen Proteinen, bei denen das hydrophobe Tryptophan Lösungsmittelzugänglich vorliegt. Eine Topographie des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors ist in Abbildung 2-5 dargestellt.

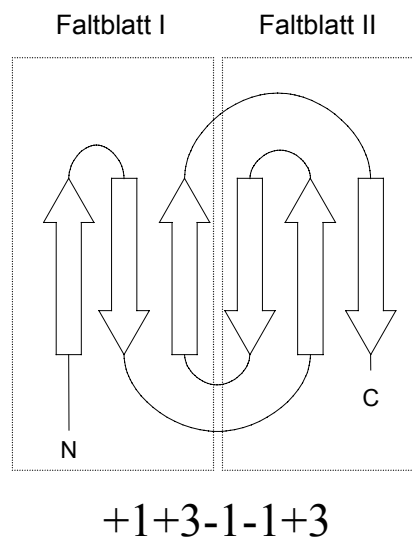


Abbildung 2-5 Topologie der Tendamistatstruktur.

Mit Hilfe kalorimetrischer Untersuchungen an Tendamistat Mutanten (Renner, 1992; Vogl, 1995) konnte der Einfluß beider Disulfidbrücken auf die Stabilität der Struktur näher bestimmt werden. Je nach Wahl der Substituenten an den beiden Brückenpositionen fallen die Beiträge zur freien Stabilisierungsenthalpie unterschiedlich aus. Die Mutante C45AC73A führte beispielsweise zu einer Nettodestabilisierung des Proteins, die durch eine Zunahme der Konformationsentropie im entfalteten Zustand hervorgerufen wird. Demgegenüber enthalten die Mutanten C11A/C27X in Abhängigkeit vom Substituenten X entropische als auch enthalpische Destabilisierungsbeiträge.

### 2.2.2. Homologie

Neben Tendamistat (HOE-467) gibt es eine große Zahl weiterer  $\alpha$ -Amylase Inhibitoren. Hierzu gehören die sequenzhomologen Proteine Haim II (Murao, 1980), Paim I (Murao, 1983), Z-2685 (Oeding, 1979), AI-3688 (Vértesy), AI-409 (Katsuyama, 1992) und T-76 (Sumitani, 1993).





könnte es sich dabei um Aminosäuren handeln, die bei der Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors eine wichtige Rolle spielen.

### 2.2.3. Faltung

Bei der oxidativen Rückfaltung des Tendamistats nach vollständiger Denaturierung in 6M GdmCl (pH2.0) können drei kinetische Phasen fluoreszenzspektroskopisch ( $E_X = 276\text{nm}$  und  $E_M > 320\text{nm}$ ) bestimmt werden (Schönbrunner, 1997a). Die schnellste Reaktion ( $\tau_3$ ), mit einer Halbwertszeit von 10 msec ( $\text{H}_2\text{O}$ ) bestimmt dabei mit etwa 80% die Faltung des Proteins in den Nativzustand (Hauptfaltungsweg). Die langsamste der drei Phasen ( $\tau_1 = 12.5\text{sec}$ ) wird verursacht durch eine *cis/trans* Isomerisierung um mindestens eine der drei *trans* Xaa-Pro Bindungen im nativen Molekül. Daß es sich dabei tatsächlich um eine Prolinisomerisierung handelt, konnte über die Bestimmung der Aktivierungsenergie (83.7 kJ/mol) und durch Katalyse mit PPIase belegt werden. Die mittlere Phase ( $\tau_2 = 450\text{msec}$ ) läßt sich jedoch unter katalytischen Bedingungen nicht beschleunigen.

<i>Bedingungen</i>	$k_1 (s^{-1})$	$A_1$	$k_2 (s^{-1})$	$A_2$	$k_3 (s^{-1})$	$A_3$
1M GdmCl	0.08	0.06	3.6	0.1	18.5	0.83
1M GdmCl, 3.3 $\mu$ M PPIase	-	-	2.2	0.11	16.1	0.89
2M GdmCl	0.08	0.06	0.85	0.1	2.9	0.84
2M GdmCl, <i>interrupted refolding</i>	0.12	0.2	-	-	3.3	0.80

Tabelle 2-5 Kinetische Daten der Tendamistat Rückfaltung (Schönbrunner, 1997a).  $A_i$  bedeutet die relative Amplitude der Phase i ( $A_i = A_{\text{obs}} / A_{\Sigma}$ ).

Eine Erklärungsmöglichkeit für die mittlere Phase könnte in der Akkumulation eines Intermediates bestehen, welches sich unter Rückfaltungsbedingungen entweder aus  $U_S$  oder  $U_F$  ( $U_S$  kennzeichnet die langsam faltende und  $U_F$  entsprechend die schnell faltende Spezies) bildet. Diese Fragestellung konnte unter Anwendung spezieller Meßtechniken (*interrupted refolding*) näher untersucht werden. Solche Messungen erlauben die selektive Bestimmung jener Rückfaltungsphasen, die zur Bildung nativer Moleküle führen. Im Tendamistat sind es zwei der drei Phasen ( $\tau_1$  und  $\tau_3$ ), über die der native Zustand N erreicht werden kann. Aus den zahlreichen

Experimenten konnte ein Schema für die Faltung des Tendamistats abgeleitet werden, das die Prolinisomerisierung entfalteter Moleküle mit einschließt (Abbildung 2-6). In diesem Schema werden vier Zustände (Vier-Zustands-Modell) durch ebensoviele Gleichgewichtsbeziehungen miteinander verbunden. Nach dem Modell führen zwei *parallele* Faltungswege zum nativen Zustand N. Der Hauptfaltungsweg geht dabei von der schnell faltenden Spezies  $U_F$  aus, bei dem alle Bindungen ihren nativen *trans* Isomerisierungszustand beibehalten. Dieser Faltungsweg ist reversibel und entspricht dem Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung. Der Nebenfaltungsweg entsteht durch die schnelle Akkumulation eines nativ-ähnlichen Intermediates, bei dem mindestens eine der drei Xaa-Pro Bindungen einen nicht-nativen Isomerisierungszustand aufweist. Die Isomerisierung der betroffenen Bindung ( $I \rightarrow N$ ) entspricht der langsamen Faltungsphase ( $U_S \rightarrow U_F$ ) und ist daher nicht als solche detektierbar.

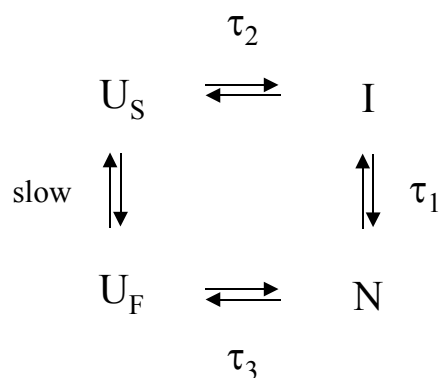


Abbildung 2-6 Faltungsmodell des Tendamistats (Schönbrunner, 1997a).

Bei der Faltung zahlreicher Proteine kommt es vor Erreichen des Übergangszustands zur Bildung kompakter Strukturanordnungen, die eine Reaktion darstellen auf die sprunghafte Veränderung der Ausgangsbedingungen (Eaton, 1996; Eaton, 1997). Manche Meßtechniken erlauben die Auflösung solcher ultraschnellen Prozesse, die sich nah an der intramolekularen Diffusionsgrenze ( $1 \mu\text{s}$ ) von Molekülen befinden (Hagen, 1996; Nölting, 1999). Bei langsameren Meßtechniken macht sich ein solches Verhalten, durch das Fehlen von Amplitude, relativ zu Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen bemerkbar (Kiefhaber, 1995). Beim Tendamistat entspricht die bei der Faltung gemessene Amplitude vollständig der aus Gleichgewichtsmessungen bekannten Amplitude. Daher kann die frühe Bildung von Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen, die zu einer

Abnahme des Amplitudensignals führen würden, vor Erreichen des Übergangszustands ausgeschlossen werden. Vielmehr scheint beim  $\alpha$ -Amylase Inhibitor der Aufbau nativer Strukturelemente eng mit dem Kollabieren der Proteinkette (*chain collapse*) gekoppelt zu sein (Thirumalai, 1995; Jacob, 1997). Diese Annahme wird zusätzlich gestützt durch Messung in Gegenwart des hydrophoben Fluorophors 1-Anilinonaphthalen-8-sulphonsäure (ANS). Durch die Bindung von ANS an hydrophobe Oberflächen nimmt die Eigenfluoreszenz des Farbstoffs deutlich zu (Jones, 1994).

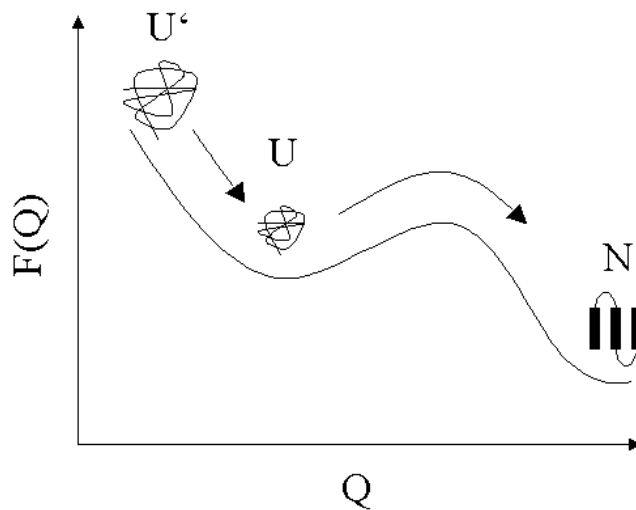


Abbildung 2-7 Faltung eines Zwei-Zustands-Proteins (Eaton, 1996). Aufgetragen ist die freie Energie ( $F(Q)$ ) als Funktion der Zustandskoordinaten  $Q$  (Reaktionskoordinate).  $Q$  ist dabei ein Maß für die sich zunehmend ausbildenden nativen Kontakte beim Übergang von  $U'$  nach  $N$ . Der Übergang von  $U'$  nach  $U$  beschreibt eine Reaktion des Proteins auf ein verändertes Lösungsmittelumfeld. Die gegenüber  $U'$  kompaktere Struktur von  $U$  ( $Q(U) > Q(U')$ ) ist dabei stark variabel. Sie reicht von einer *random coil* Anordnung ohne definierte Kontakte bis hin zu Zuständen, die als *molten globule* bezeichnet werden.

Mit fortschreitender Entwicklung der nativen Struktur kommt es jedoch zum Ausschluß von ANS und damit zu einer Abnahme seiner Eigenfluoreszenz. Tendamistat zeigt bei diesen Messungen keine Veränderung der ANS-Fluoreszenz. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierte Zwischenzustände, bei der Faltung des Tendamistats keine Rolle spielen (Schönbrunner, 1997a). Untersuchungen über den Einfluß beider Disulfidbrücken auf die Faltung des Tendamistats wurden 1997 von Schönbrunner durchgeführt (Schönbrunner, 1997b). Dabei konnte gezeigt werden, daß nach dem Entfernen nur einer

Disulfidbrücke keine nennenswerte Veränderung des Faltungsmechanismus stattfindet (vgl. oben). Diese Aussage stützt sich vor allem auf das lineare Verhalten der GdmCl-abhängigen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_f \equiv k_3$  und  $k_u \equiv k_{-3}$ ) sowie die gute Übereinstimmung der daraus abgeleiteten Größen  $\Delta G_{f-u}^\circ$  und  $m_{f-u}$  mit den entsprechenden Größen aus den Gleichgewichtsmessungen  $\Delta G_{eq}^\circ$  und  $m_{eq}$ .

<i>Protein</i>	$\Delta G_f^{0\#}$ [kJ/mol]	$M_f$ [kJ/molM]	$\Delta G_u^{0\#}$ [kJ/mol]	$M_u$ [kJ/molM]	$\Delta G_{f-u}^{0\#}$ [kJ/mol]	$m_{f-u}$ [kJ/molM]	$\Delta G_{eq}^0$ [kJ/mol]	$m_{eq}$ [kJ/molM]
Wildtyp	62.55	-3.47	97.74	1.88	-34.64	5.36	-34.02	5.31
C11A/C27S	67.95	-6.9	77.36	0.92	-8.87	7.83	-9.58	7.49
C45A/C73A	71.13	-4.48	84.6	2.68	-12.93	7.15	-12.97	7.11

Tabelle 2-6 Daten für die Faltung der Disulfidmutanten C11A/C27A sowie C45A/C73A (Schönbrunner, 1997b).  $\Delta G_{f-u}^{0\#}$  ergibt sich aus  $\Delta G_f^{0\#} - \Delta G_u^{0\#}$  und entsprechend  $m_{f-u}$  aus  $m_f - m_u$ . Die Gleichgewichtsdaten ( $\Delta G_{eq}^0$  und  $m_{eq}$ ) stammen aus der Veränderung des Circular dichroismus (CD) in Abhängigkeit von der GdmCl-Konzentration.

Die beobachtete Destabilisierung der untersuchten Mutanten C11AC27S und C45AC73A ( $\Delta G_{eq}^\circ$ ) ist dabei im wesentlichen auf eine beschleunigte Entfaltungskinetik zurückzuführen. Aus den kinetischen Daten läßt sich die relative Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit (*relative degree of exposure*) über die Gleichung  $\alpha_\Delta = \Delta m_{f(\text{Wildtyp-Mutante})} / \Delta m_{eq(\text{Wildtyp-Mutante})}$  ableiten. Relativ zum entfalteten Protein, verliert die C45AC73A Mutante etwa 55% ( $\alpha_{U\#} = 0.55$ ) ihrer Lösungsmittelzugänglichkeit beim Erreichen des Übergangszustands. Bei der C11AC27S Mutanten beträgt diese Änderung über 100% ( $\alpha_{U\#} = 1.39$ ). Dieser Unterschied verdeutlicht die Bedeutung des Bereichs zwischen C11 und C27 für die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. Beim Erreichen des Übergangszustands ist die Struktur des  $\beta$ -Hairpins nahezu vollständig ausgebildet. Daß der  $\alpha_\Delta$ -Wert größer sein kann als 1 (Wildtyp) liegt vermutlich daran, daß durch das Entfernen der Disulfidbrücke C11/C27 zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den  $\beta$ -Strängen aufgebaut werden müssen, die beim Tendamtat Wildtyp nicht vorhanden sind. Die Strukturbildung um die Position 45/73 ist hingegen im Übergangszustand nur teilweise abgeschlossen und vervollständigt sich erst nach Erreichen des Übergangszustands. Diese Aussage vernachlässigt jedoch, daß die sterisch anspruchsvolle Verbrückung 45/73 über den

mittleren  $\beta$ -Strang im zweiten  $\beta$ -Faltblatt verläuft (vgl. Abbildung 2-5). Aus diesem Grund können nur indirekte Aussagen über das zweite Faltblatt gemacht werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung lokaler Wechselwirkungen bei der Faltung von  $\beta$ -Faltblatt Proteinen. Benachbarte Stränge, die über eine kurze Umkehrschleife miteinander verbunden sind, spielen dabei offensichtlich eine entscheidende Rolle. Im Falle des Tendamistats ist eine weitere Besonderheit zu berücksichtigen. Aus der Literatur ist bekannt, daß der Bereich zwischen Val12 und Gly26 in der Lage ist, eine nativ-ähnliche Struktur in wässriger Umgebung auszubilden (Blanco, 1991; Blanco, 1993). Bei der Faltung des Tendamistats könnte eine solche Struktur als „Startpunkt“ die Faltung des restlichen Proteins initiieren und dadurch falsche Kontakte verhindern helfen (Searle, 1995). Ob  $\beta$ -Hairpins generell als Nukleationskeime für die Faltung von  $\beta$ -Faltblattproteinen in Frage kommen, läßt sich anhand der bisherigen Daten nicht entscheiden.

#### **2.2.4. Anwendung des Tendamistats**

##### *(i) $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor*

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine Stoffwechselkrankheit, die meist auf einen Insulin-Mangel oder die vermehrte Produktion antagonistisch wirkender Hormone (z.B. Somatostatin) zurückzuführen ist. Neben einer eingeschränkten Nahrungsmittelaufnahme besteht die wichtigste Behandlungsmethode in der peroralen Verabreichung von Insulin. Neben dieser direkten Behandlungsform von Diabetes mellitus wurde Ende der 60er Jahre eine weitere Behandlungsmöglichkeit entwickelt, bei der die für den Blutzuckerspiegel mitverantwortliche Pankreas  $\alpha$ -Amylase spezifisch gehemmt und so die Aufnahme von Kohlenhydraten in den Blutkreislauf verhindert werden kann. Dieser theoretische Ansatz mündete schließlich in der Entdeckung therapeutisch wirksamer  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitoren aus Mikroorganismen.

Die in den 70er Jahren erfolgreich abgeschlossenen *screening* Projekte führten zu verschiedenen Stoffklassen von Inhibitoren mit unterschiedlicher Spezifität gegenüber  $\alpha$ -Glukosidasen. Neben Aminosukern, wie dem Nojirimycin, konnten komplexe Oligosaccharide, wie die Acarbose 2 und Peptide, wie das Tendamistat, gefunden werden (Vértesy, 1980). Die hohe Stabilität dieser Verbindungen gegenüber hydrolytisch wirksamen Enzymen war ein weiterer wichtiger Vorteil

für die orale Applizierbarkeit des  $\alpha$ -Amylase-Inhibitors. Anfang der 80er Jahre fanden die ersten klinischen Studien hierzu statt. Diese wurden jedoch wegen unerwünschter Nebenwirkungen (Diarrhoe und immunogene Wirkung) abgebrochen (Meyer, 1983a; Meyer, 1983b; Meyer, 1984).

### *(ii) Tendamistat als Stützgerüst für die Präsentation von Peptidbibliotheken*

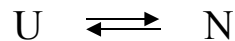
Von McConnell und Hoess (McConnell, 1995) setzen Tendamistat in einem ganz anderen Anwendungsgebiet ein. Eingebaut in das Hüllprotein des filamentösen Phagen M13 wurde der Inhibitor richtig gefaltet expremiert und auf der Oberfläche präsentiert. Die Struktur des Tendamistats verfügt über zwei variable Bereiche (I: AS 38-40 und II: AS 60-65), in die durch PCR-gestützte Mutagenese randomisierte Tri- bzw. Hexapeptide eingebracht wurden. An der Phagenoberfläche werden diese Peptidbibliotheken als entsprechende Turn- (WT: AS 37-40; Turn I Typ) bzw. Loopstrukturen (WT: AS 60-65) ausgerichtet und stehen damit direkt für eine Peptid-/Proteinwechselwirkung zur Verfügung. Tendamistat dient dabei als eine Art Stützgerüst (*scaffold*) für die eingebrachten Peptide. Durch die konformationelle Versteifung ließen sich Peptidsequenzen nach mehreren Selektionszyklen anreichern, die im Gegensatz zu dem natürlichen Liganden (Endothelin) über eine vollkommen andere Aminosäuresequenz verfügten.

## **2.3. Faltung**

### **2.3.1. Allgemein**

Die zentrale Bedeutung von Proteinen rührt von ihrer vielfältigen biologischen Funktionen. Diese Vielfalt ist eng verknüpft mit ihrer dreidimensionalen Struktur. Der Übergang von einer ungeordneten (naszierenden) Polypeptidkette zum nativen, biologisch aktiven Molekül wird auch als „Proteinfaltung“ bezeichnet. Im Gegensatz zum genetischen Code ist der Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz und der dreidimensionalen Struktur von Proteinen („Code der Proteinfaltung“) noch weitgehend unbekannt. Fest steht, daß Proteine spontan und ohne zusätzliche katalytische Faktoren ihre endgültige Struktur annehmen können. Zu dieser Aussage kam Christian B. Anfinsen (Anfinsen, 1961; Anfinsen, 1973) als erster in seinen Experimenten. Er konnte zeigen, daß sich die Faltung von Proteinen durch einfache Rekonstitutionsexperimente *in vitro* nachahmen ließ (Anfinsen, 1961; Anfinsen, 1973). Hieraus konnte der Schluß gezogen

werden, daß der Nativzustand eines Proteins thermodynamisch stabil und strukturell eindeutig definiert sein muß. Die Denaturierung und Renaturierung kleinerer Proteine läßt sich danach vollständig durch ein reversibles Gleichgewicht beschreiben, bei dem thermodynamisch gesehen nur zwei Zustände (Zwei-Zustands-Modell) existieren können. Der Phasenübergang zwischen beiden Zuständen erfolgt unter Gleichgewichtsbedingungen kooperativ und daher ohne signifikante Akkumulation intermediärer Zustände:



Zum Erreichen der nativen Struktur benötigen Proteine nur Bruchteile von Sekunden bis Minuten (Schmid, 1992; Fersht, 1995a; Fersht, 1995b; Eaton, 1996). Würde es sich bei der Faltung um einen stochastischen Vorgang handeln, bei dem nur ein einziger stabiler Zustand (Nativzustand: N) zugänglich ist (thermodynamische Hypothese), müßte die Faltungsdauer mit der Länge des Proteins ins Astronomische wachsen (Levinthal, 1968). Jede weitere Aminosäure bedeutet neue Freiheitsgrade für die Proteinkette und erhöht damit die Zahl der Konformationen, die bis zum Erreichen von N durchsucht werden müssen.

Ein Weg, die Zahl möglicher Konformationen drastisch zu reduzieren, besteht durch Einbeziehung „kinetischer Kontrollmechanismen“ in den Faltungsprozeß. Den vorher als „thermodynamisch stabil“ definierten Nativzustand müßte man hiernach als „kinetisch am schnellsten zugänglichen Zustand mit minimaler Energie“ betrachten. Eine Verkürzung der Faltungsdauer ließe sich konsequenterweise durch einen kinetisch festgelegten Faltungsweg über definierte Intermediate erreichen (Kim, 1982). Diese Annahme löste eine intensive Suche nach sogenannten Faltungsintermediaten aus:



Experimentell konnten solche Intermediate (I) bei einigen Proteinen tatsächlich nachgewiesen werden (Kim, 1982; Elove, 1988; Kim, 1990; Udgaonkar, 1990; Radford, 1992; Jennings, 1993; Chamberlaine, 1997). Die strukturell am besten charakterisierten Intermediate ließen sich auch in einer äquivalenten Struktur, unter besonderen Gleichgewichtsbedingungen - niedriger pH-Wert (A-Zustand) und hohe Salzkonzentrationen - erhalten (*molten globules*). Beipielhaft hierfür sind die beiden gut untersuchten Proteine Apomyoglobin (Jennings, 1993) und RNase H



(Chamberlaine, 1997). Bei beiden Intermediaten liegt bereits ein hoher Anteil an Sekundärstrukturelementen vor. Spezifische Seitenkettenkontakte, wie sie besonders im Inneren des Proteins vorkommen, sind so gut wie nicht vorhanden oder durch Lösungsmittelmoleküle ersetzt. Solche Intermediate werden häufig auch als *späte* Intermediate bezeichnet, da ihre Bildung sich innerhalb der spektroskopisch zugänglichen Zeiten - zwischen wenigen Millisekunden bis Sekunden - abspielt. Manche Proteine reagieren jedoch bereits vor der eigentlichen Detektion (*burst phase*) auf ein verändertes Lösungsumfeld durch die Bildung sogenannter *transienter* Intermediate (*burst phase intermediates*). Ihre Existenz konnte früher lediglich durch Vergleich der Signalamplituden bei kinetischen Messungen gegenüber Gleichgewichtsmessungen abgeleitet werden. Mittlerweile existieren jedoch unterschiedliche Meßtechniken, die es erlauben, Prozesse im Submillisekundenbereich aufzulösen (Shastry, 1998; Nölting, 1999). Verursacht wird die Entstehung transienter Intermediate über hydrophobe Wechselwirkungen, die einen Strukturkollaps induzieren und dadurch die Bildung nativer Sekundärstrukturen ermöglichen (Eaton, 1997; Shastry, 1998). Manche Arbeiten führen jedoch die beobachtete Bildung von Sekundärstrukturen auf eine Verschiebung innerhalb der entfalteten Molekülpopulation, als Reaktion auf ein verändertes Lösungsumfeld zurück (Jennings, 1998; Qi, 1998).

Diese Beobachtungen stützen sogenannte „hierarchische Faltungsmodelle“, die von einer sequentiellen Faltung des Proteins ausgehen. Ihnen ist gemeinsam, daß sie die Bildung erster Strukturen auf entropisch begünstigte Nahwechselwirkungen zurückführen (*nearest neighbour interactions*), die nach Konsolidierung durch weitere Tertiärwechselwirkungen ergänzt werden können (Jaenicke, 1984). Intermediate als makroskopisch detektierbare Strukturen entsprechen dabei den diskreten Organisationsebenen faltender Proteine. Je nach Mechanismus können diese „hierarchischen“ Modelle in zwei Gruppen unterteilt werden. In die eine Gruppe gehören die sogenannten *framework* Modelle, bei denen stabile Sekundärstrukturen (z.B.  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Hairpins ) vor Tertiärstrukturen aufgebaut werden (Ptitsyn, 1973; Wetlaufer, 1973; Karplus, 1976). In die andere Gruppe gehört das *hydrophobic collapse* Modell von de Gennes (de Gennes, 1985), bei dem durch unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen ein kompakter Cluster entsteht, der sich anschließend durch Bildung von Sekundärstrukturen weiter umorganisieren kann. Die Attraktivität solcher Modelle liegt auf der Hand: der komplexe Faltungsvorgang wird bei ihnen auf die Bildung einzelner Substrukturen (*framework*) oder Cluster (*hydrophobic cluster*) reduziert. Wenn die Faltung eines Proteins hierarchische Entwicklungsstadien durchläuft,

müßte es möglich sein, native Strukturen als „Vorstufen“ in Proteinfragmenten wiederzufinden. Dies gelang auch bei zahlreichen Peptiden (Brown, 1971; Blum, 1978) und ermöglichte dadurch eine experimentelle Bestätigung hierarchischer Faltungsmodelle.

Experimentelle und theoretische Arbeiten stellten jedoch die Bedeutung von Intermediaten für die Faltung zunehmend in Frage (Baldwin, 1994; Schindler, 1995; Thirumalai, 1995). Eine einfache Betrachtung zeigt, warum Intermediate, anstatt durch Einschränkung des Konformationsraumes die Faltung zu beschleunigen, diese durch Erhöhung der Aktivierungsbarriere eher verlangsamen können (Sosnick, 1994; Fersht, 1995).

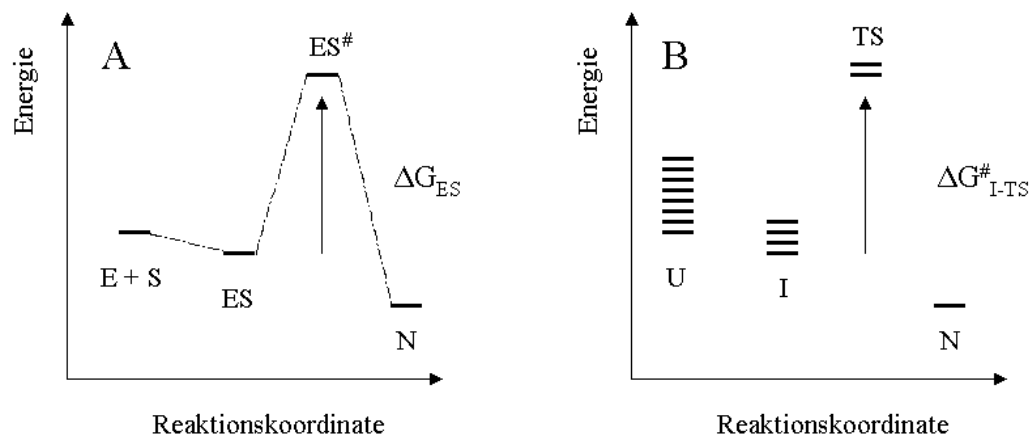


Abbildung 2-8 A) Der Einfluß eines gegenüber dem freien Substrat stabilisierten Enzym-Substrat Komplexes auf die Produktbildung. Dadurch daß ES gegenüber E und S stabilisiert ist, erhöht sich die Aktivierungsbarriere für die Enzymkatalyse B) Der Einfluß eines gegenüber dem entfalteten Protein stabilisierten Faltungsintermediates auf die Bildungsgeschwindigkeit von N (Fersht, 1995a).

Aus der Enzymkatalyse ist nämlich bekannt, daß ein im Vergleich zum ungebundenen Enzym stabilisierter Enzym-Substrat Komplex zu einer Erhöhung der Aktivierungsbarriere  $\Delta G_{ES}$  führt. Genau wie hier würde auch ein gegenüber dem entfalteten Zustand (U) stabilisiertes Intermediat (I) zu einer Erhöhung der Aktivierungsbarriere  $\Delta G_{I-TS}^{\#}$  führen und damit die Geschwindigkeit der Proteinfaltung verlangsamen. Eine Ausnahme bilden destabilisierte Intermediate, die energetisch gesehen unterhalb des Übergangszustands liegen und dadurch in der Faltungskinetik nicht auftreten können. Hinzu kommt, daß viele kleinere Proteine (um 100 Aminosäuren), ohne die Akkumulation von Intermediaten, in extrem kurzer Zeit (wenige  $\mu$ s bis ms) den Nativzustand erreichen können. Für solche Proteine existieren thermodynamisch gesehen nur zwei Zustände

(Zwei-Zustands-Modell), die kinetisch auch als einzige unter allen Bedingungen beobachtet werden können. Die Geschwindigkeit mancher Faltungsreaktionen kann dabei Größenordnungen erreichen, die man mit den etablierten Techniken (z.B. *stopped-flow*) nicht auflösen kann. Ein solches Beispiel ist das extrem schnell faltende Protein CspB (*cold-shock protein* aus *Bacillus caldolyticus*), das mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 0.5\text{ms}$  den Nativzustand erreicht (Perl, 1998). Der Zweifel an der Bedeutung von Intermediaten wurde noch verstärkt, als es gelang (1) schnellere Faltungswege (*fast-track*) zu identifizieren, die ohne die Akkumulation von Intermediaten auskommen und (2) durch Veränderung der Faltungsbedingungen die Bildung von Intermediaten zu umgehen. Lange Zeit hatte man beispielweise angenommen, daß die Faltung von Lysozym durch drei Zustände beschrieben werden kann, die sequentiell miteinander verknüpft sind ( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß parallel zum Hauptfaltungsweg (86%) ein deutlich schnellerer Nebenfaltungsweg (14%) existiert, der direkt von U nach N führt und ohne die Akkumulation von Intermediaten auskommt (Kiefhaber, 1995). Ein weiteres Beispiel ist Cytochrom C. Untersuchungen von Sosnick (Sosnick, 1994) haben gezeigt, daß sich der Faltungsweg von Cytochrom C bei niedrigen pH-Werten (pH5) verändert. Ein Intermediat, daß durch falsche Ligation eines Restes (Colòn, 1997) an das Eisenporphyrinsystem bei pH7 akkumuliert, verschwindet nahezu vollständig unter sauren Bedingungen. Dieser Effekt läßt sich auch durch Zusatz von Imidazol, das durch kompetitive Blockierung die falsche Ligation unterdrückt, erreichen (Chan, 1997; Shastry, 1998). Auch beim Ubiquitin (F45W) verändert sich das sequentielle Faltungsschema ( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ). Nach Unterschreiten einer bestimmten GdmCl Konzentration (1M GdmCl) kommt es durch Stabilisierung eines Intermediates zu einer Verlangsamung der Rückfaltungskinetiken (Khorasanizadeh, 1993). Dieser auch als „*rollover*“ bekannte Effekt verschwindet jedoch völlig, wenn die Faltungsexperimente bei niedrigeren Temperaturen (8°C anstatt 25°C) durchgeführt werden ( $U \rightleftharpoons N$ ). Geht man davon aus, daß hydrophobe Wechselwirkungen wesentlich zur Stabilisierung des Intermediates beitragen, läßt sich dieses Verhalten in Einklang mit der Temperaturabhängigkeit solcher Wechselwirkungen in wässrigen Systemen verstehen (Creighton, 1993; Khorasanizadeh, 1993). Diese Beispiele belegen, daß die produktive Faltung zahlreicher Proteine ohne die Bildung von Intermediaten auskommt. Darüberhinaus gelingt es häufig, durch eine Destabilisierung von Intermediaten die Faltungsreaktion zu beschleunigen (Weissman, 1991; Kiefhaber, 1992; Khorasanizadeh, 1993). Die Frage bleibt daher offen, ob Intermediate für die Faltung überhaupt von Bedeutung sind oder vielmehr durch bestimmte

kinetische Barrieren (*kinetic blocks*) entstehen. Solche Barrieren können beispielsweise durch unterschiedliche Isomerisierungszustände der Imidbindung (Xaa-Pro) im entfalten Protein aufgebaut werden. Auch der Einfluß unterschiedlicher Verknotungsmuster (*chain knotting*) auf die Rückfaltung von Proteinen mit überlappenden Disulfidbrücken (C1/C3 und C2/C4) wird als mögliche Ursache von Barrieren diskutiert (Nall, 1978; Kiefhaber, 1995). Wird die Rückfaltung eines Proteins an die oxidative Verknüpfung zuvor reduzierter Disulfidbrücken gekoppelt, können zahlreiche Intermediate durch falsche oder unvollständige Disulfidkombinationen entstehen (Creighton, 1978; Creighton, 1990; Creighton, 1995). Ein anderes Beispiel wurde bereits diskutiert, nämlich die falsche Ligation einer Aminosäure an das kovalent gebundene Eisenporphyrinsystem des Cytochrom C. Solche Barrieren müssen jedoch nicht zwingend zu einer Akkumulation von Intermediaten führen. In vielen Proteinen (z.B. Barstar, Cytochrom C oder RNase A) sind sie die Ursache für die Entstehung paralleler Faltungswege (Roder, 1994; Nölting, 1999). Die Vorstellung, daß Intermediate für eine schnelle und effiziente Faltung zwingend notwendig sind, erscheint bei vielen Proteinen mehr als fragwürdig. Wie bereits oben dargelegt, basieren viele Modelle auf der Annahme, das eine rein statistische Suche nach der nativen Struktur nicht möglich sein kann (Levinthal-Paradoxon). Als Energieschema betrachtet, entspricht das Levinthal-Paradoxon einem Energieprofil, das nur aus isoenergetischen Zuständen besteht. Der Nativzustand hat als einziger Punkt eine von allen anderen Punkten verschiedene Energie (Abbildung 2-9).

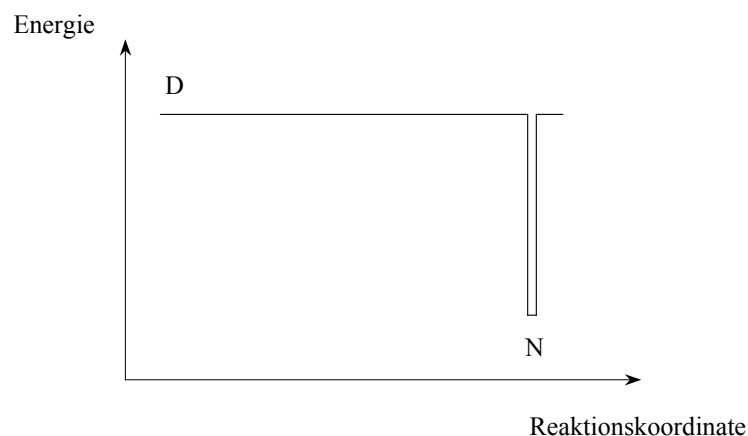
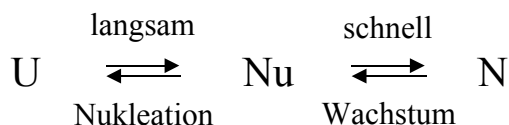


Abbildung 2-9 Faltung als stochastische Suche nach dem thermodynamisch stabilsten Zustand N.

Auf einer auf einer „planaren“ Energiehyperfläche entspricht die Faltung einer unkoordinierten Suche, die durch das zufällige Erreichen der nativen Konformation sprunghaft beendet wird. Der von Levinthal vorgeschlagene Faltungsweg würde auf ein solches Profil übertragen einer Art „Tunnel“ entsprechen, der den entfalteten Zustand U direkt mit dem Nativzustand N verbindet. Eine solche Verbindung, die kinetisch auch als sequentielle Reaktionsabfolge verstanden werden kann, verläuft über Zustände, die sowohl strukturell als auch energetisch eng miteinander zusammenhängen ( $U \rightleftharpoons I_1 \rightleftharpoons \dots \rightleftharpoons I_x \rightleftharpoons N$ ). Da jedoch entfaltete Moleküle alle Bereiche einer solchen Hyperfläche besetzen können, taucht ein neues Problem auf. Aus entropischen Gründen erreicht nur eine verhältnismäßig kleine Population überhaupt den „richtigen“ Faltungsweg (Dill, 1997).

Die schnelle Faltung von Proteinen in Abwesenheit detektierbarer Intermediate läßt sich durch ein kooperatives Faltungsmodell darstellen, dessen Elementarschritt auch als *Nukleation* bezeichnet wird. Ursprünglich bedeutet Nukleation (Wetlaufer, 1973) die zufällige Bildung stabiler Sekundärstrukturen, die als molekulare Template (*nucleation sites*) die Faltung benachbarter Abschnitte begünstigen (*growth*).



Wie bei der Helix-Knäuel Umwandlung (Ebert, 1992) kann aus klassischer Sicht die Bildung von Templaten nur durch lokale Wechselwirkungen induziert werden. In die sich anschließende Wachstumsreaktion können auch Intermediate involviert sein. Diese akkumulieren jedoch nicht, da ihre Umwandlungsraten deutlich höher liegen als die Bildungsgeschwindigkeit des Nukleationszentrums. Das klassische Nukleationsmodell mußte jedoch erweitert werden (*nucleation-condensation*), als es gelang, die ersten Übergangszustände von Zwei-Zustands Proteinen zu charakterisieren (Fersht, 1993; Itzhaki, 1995; Lopez-Hernandez, 1996; Viguera, 1996; Burton, 1997). Maßgeblich beteiligt waren hierbei Verfahren ( $\Phi$ -Wert Analyse), die den Einfluß spezifischer Mutationen - auf Kinetik ( $k_f$  und  $k_u$ ) und Stabilität ( $K_{eq}$ ) - mit strukturellen Aussagen in Verbindung bringen konnten. CI2 (*chymotrypsin inhibitor 2*) war das erste Protein, dessen Übergangszustand mit Hilfe solcher Verfahren untersucht wurde (Jackson, 1991). Qualitativ betrachtet entspricht der Übergangszustand von CI2 einer expandierten Form des

nativen Proteins. Wie im klassischen Nukleationsmodell postuliert, ist tatsächlich ein Teil der Sekundärstruktur als diffuser Nukleationskern ( $\alpha$ -Helix) im Übergangszustand vorhanden. Dieser ist jedoch weniger kompakt, aber dafür weiter ausgedehnt als nach dem klassischen Modell vorhergesagt. Diese Ausdehnung schließt zusätzlich Bereiche des Proteins mit ein, die in der Sequenz weit von der  $\alpha$ -Helix entfernt liegen. Interessanterweise nimmt die Strukturbildung mit zunehmendem Abstand (radial) vom Nukleationskern ab (*global collapse*). Daher verhält sich der Übergangszustand in seiner Gesamtheit wie ein gleichzeitig kollabierendes System, das sich um den Nukleationskern verdichtend zusammenzieht (*condensation*). Eine weitere Besonderheit sind spezifische Wechselwirkungen (*long-range*), die nur in Zusammenhang mit einer definierten Tertiärstruktur die  $\alpha$ -Helix stabilisieren. Die Strukturbildung im Protein vollzieht sich demnach gleichzeitig mit der Konsolidierung des Nukleationskerns beim Erreichen des Übergangszustands (Itzhaki, 1995; Matthews, 1995; Fersht, 1997).

Interessanterweise existiert zwischen der Proteinfaltung durch Nukleation und der Tröpfchenbildung unterkühlter Gase eine wichtige Parallelität (Pande, 1998).

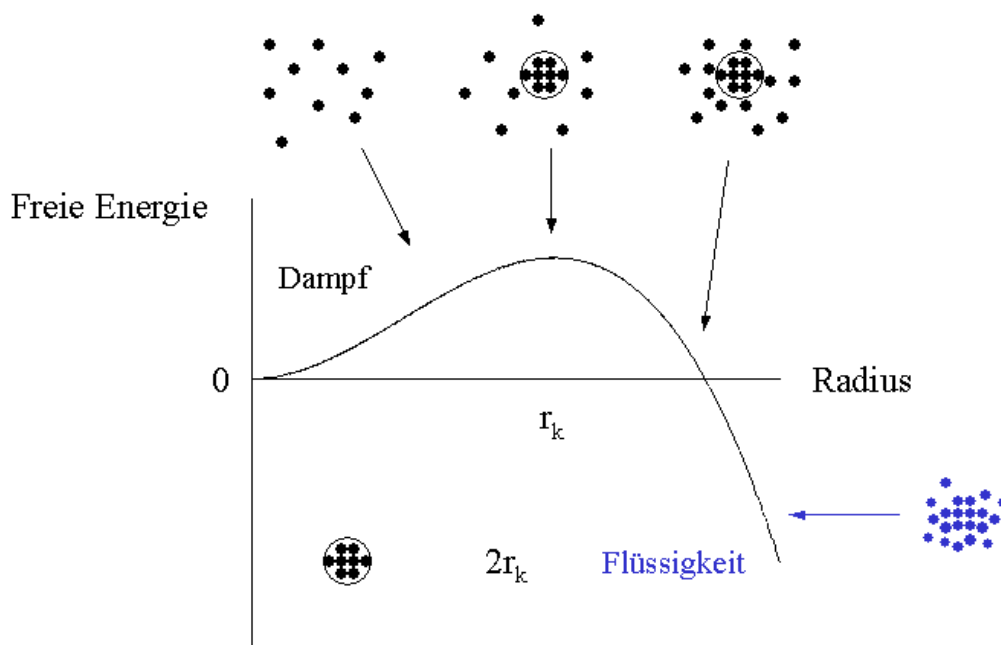


Abbildung 2-10 Nukleation als Ursache für den Übergang eines Gases in den thermodynamisch stabileren Zustand (Flüssigkeit). Nach der klassischen Nukleationstheorie (Pound, 1972; Pande, 1998) ist der kritische Radius für die Tröpfchenbildung direkt proportional zu der Oberflächenspannung der Flüssigkeit ( $r_k \sim \sigma$ ) und umgekehrt proportional zum Partialdruck des unterkühlten Dampfes ( $r_k \sim 1 / \ln[p]$ ).

In beiden Fällen ist der spontane Übergang in den thermodynamisch stabileren Zustand (natives Molekül bzw. Flüssigkeit) mit einem dramatischen Entropieeinbruch des gesamten Systems verbunden (vgl. Abbildung 2-10). Wird ein Gas unter seine Kondensationstemperatur gebracht („unterkühlte“ Gase), erfolgt solange keine Tröpfchenbildung, bis der Radius des entstehenden Tropfens eine bestimmte Größe ( $r_k$ ) erreicht hat (Kortüm, 1981). Thermische Fluktuationen sorgen dafür, daß Wassermoleküle immer wieder neu zusammenkommen können, um einen Tropfen zu bilden, der jedoch wieder zerfällt, da die Oberflächenspannung des entstehenden Tropfens einen zusätzlichen Kapillardruck (*Young-Laplacesches Gesetz*) verursacht. Dieser zusätzliche Kapillardruck ist um so größer, je kleiner der Radius des entstehenden Tropfens ausfällt. Der „Übergangszustand“ dieses Systems wird erreicht, wenn der Tropfen eine solche Größe erreicht hat (*critical nucleus*) – etwa 80 Wassermoleküle bei 275.2°K - ,daß innere Kräfte ihn gegenüber dem Kapillardruck stabilisieren können. Solche „Kondensationskeime“ lösen einen Wachstumsprozess (*growth*) aus, der angetrieben wird durch die explosionsartige Vergrößerung des Tröpfchenradius. Dieser Vorgang setzt sich solange fort, bis irgendwann der thermodynamisch stabilere kondensierte Zustand erreicht ist. Essentiell für die Faltung von Proteinen ist, daß nur lokale Energiebarrieren überwunden werden müssen, um den Übergangszustand – bei unterkühlten Gasen entspricht das der Bildung eines Flüssigkeitstropfens mit dem kritischen Radius  $r_k$  – zu erreichen. Eine zeitaufwendige Suche nach der nativen Struktur entfällt hierdurch. Trotz dieser weitreichenden Analogie, existiert zwischen beiden Nukleationsmechanismen ein entscheidender Unterschied. Die Tröpfchenbildung entsteht durch *nicht-spezifische* Nukleation und wird einzig durch den Radius des Flüssigkeitstropfens bestimmt. In Proteinen handelt es sich vor allem um *spezifische* Kontakte, die aber unterschiedlich verteilt sein können und dadurch verschiedene Übergangszustände zulassen (Abkevich, 1994; Pande, 1998).

Zahlreiche theoretische Arbeiten stützen den Nukleationsmechanismus (Abkevich, 1994; Thirumalai, 1994; Bryngelson; 1995; Wolynes, 1995; Wolynes, 1996; Thirumalai, 1996; ) und stellen die Bedeutung von Intermediaten für die Faltung ebenfalls in Frage. Intermediate entstehen hiernach durch nicht-native Wechselwirkungen innerhalb kompakter Strukturen, die durch eine hohe Energiebarriere den thermodynamisch stabileren Nativzustand nicht mehr erreichen können. Dieses Verhalten läßt sich sehr anschaulich anhand sogenannter „Faltungstrichter“ (*folding funnel*) darstellen (Abbildung 2-11). „Faltung“ entspricht in einem solchen Faltungstrichter einer Abwärtsbewegung, bis der tiefste Punkt der Trichteroberfläche, als

thermodynamisch stabilster Zustand (N), vom Protein erreicht wird. Die Reaktionskoordinate als multidimensionaler Parameter wird in der Darstellung durch eine eindimensionale Koordinate (Q) ersetzt. Q beschreibt die auf 1 normierte Anzahl nativer Kontakte innerhalb einer Konformation  $X_i$  relativ zu N ( $Q = 1$ ). Die Breite eines solchen Faltungstrichters ist ein Maß für die Konformationsentropie innerhalb von  $X_i$ . Entsprechend der Größe von Q durchläuft das Molekül unterschiedliche Entwicklungsstadien. Ein unspezifischer Kollaps leitet den Übergang in einen solchen Faltungstrichter ein. Die Proteinkette durchläuft anschließend einen weiten Bereich, zu dem auch das *molten globule* Band gehört. Konformationsumwandlungen innerhalb dieses Bandes, sind aufgrund der Flexibilität und dem Fehlen hoher Aktivierungsbarrieren leicht möglich. Die dafür verantwortliche Beschaffenheit der Trichteroberfläche – wenige Energieminima und breite Öffnungen - bezeichnet man auch als „weich“ (*smooth*). Der Übergangsbereich (*transition state region*) wird erreicht, wenn etwa 60% aller nativen Kontakte aufgebaut sind. Die Bildung unspezifischer Wechselwirkungen wird jedoch erschwert, da die Konformationsentropie hierdurch überproportional ansteigen würde.

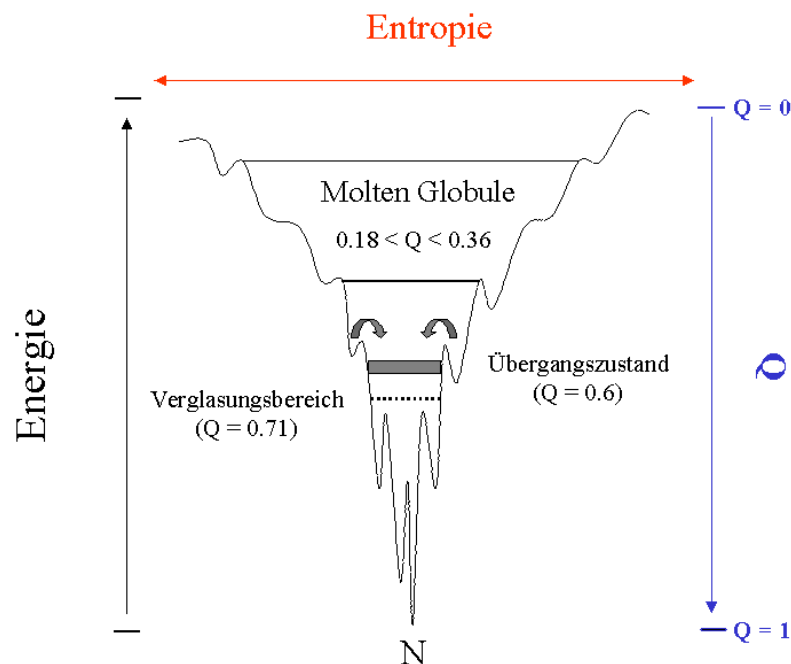


Abbildung 2-11 Schematische Darstellung eines Faltungstrichters mit den Koordinatenachsen freie Energie und Entropie (Onuchi, 1995). Q ist dabei ein Maß für die Zahl nativer Kontakte ( $Q = [\text{Zahl der nativen Kontakte im Zustand } i] / [\text{Kontakte im Zustand } N]$ ), die sich während der Faltung ausbilden können.



In manchen Simulationen kann durch Nukleation diese Barriere überwunden werden (Abkevich, 1994; Sali, 1994). Lokale Wechselwirkungen (*nearest neighbour interactions*) haben dabei den Vorteil, daß sie weite Bereiche der Proteinkette flexibel lassen und dadurch zu einem minimalen Entropieverlust führen. Dies ist eine der Ursachen, warum Nukleation häufig mit der Bildung von Sekundärstrukturen (z.B.  $\alpha$ -Helices) zusammenhängt. Die große Zahl „ähnlicher“ Konformationen, die sich im Übergangsbereich finden lassen, entspricht den unterschiedlichen „Faltungswegen“ einzelner Moleküle (Trajektorien). Bilden sich weitere produktive Kontakte aus ( $Q = 0.71$ ), durchläuft das Molekül den sogenannten „Verglasungsbereich“ (*glass transition*). Dieser ist gekennzeichnet durch das Auftreten besonders zahlreicher Energieminima mit schmalen Öffnungen (*rough*). Die Suche nach stabileren Konformationsanordnungen wird in diesem Stadium der Faltung zu einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Dies hat zur Folge, daß durch „falsche“ Nukleation entstandene Strukturen nicht schnell genug aufgelöst werden können und so als diskrete Faltungsintermediate akkumulieren. Die Umwandlung solcher metastabilen Zustände in den Nativzustand läßt sich bei kinetischen Messungen als langsame Phasenumwandlungsreaktion detektieren (Onuchi, 1995; Thirumalai, 1995).

### 2.3.2. Faltung von $\beta$ -Faltblattstrukturen.

$\beta$ -Faltblätter gehören neben  $\alpha$ -Helices zu den wichtigsten Sekundärstrukturelementen. Die Untersuchung von  $\alpha$ -Helices hat den Vorteil, daß monomere Modellpeptide (Kim, 1990) existieren, die unter Versuchsbedingungen eine stabile Konformation ausbilden können. Die Charakterisierung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen wird vor allem durch zwei Eigenschaften erschwert: (1)  $\beta$ -Faltblätter zeigen eine erhöhte Tendenz zur Aggregation (Osterman, 1985; Dyson, 1991) und (2) sie bilden häufig eine instabile Konformation aus (Blanco, 1991; Blanco, 1993). Eine  $\beta$ -Haarnadelschleife ( $\beta$ -Hairpin) ist die einfachste Form eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes. Es wird über eine Umkehrschleife (*turn*), an die sich flankierend zwei gegenläufige  $\beta$ -Stränge mit definierten Wasserstoffbrücken anschließen aufgebaut. In den letzten Jahren gelang die strukturelle und dynamische Charakterisierung solcher Strukturen mit Hilfe spezieller Modellpeptide (Blanco, 1994; Muñoz, 1997; Blanco, 1998; Muñoz, 1998). Aus der N-terminalen Sequenz des Ubiquitins konnte beispielsweise ein Peptid abgeleitet werden, daß in Wasser zu 80% als  $\beta$ -Hairpin vorliegt (Searle, 1995). Die ersten Experimente zur Faltung von  $\beta$ -Hairpin

Strukturen wurden an dem C-terminalen Fragment des GB1 Proteins (41-56) durchgeführt (Muñoz, 1997). Die nach Temperatursprung induzierte Rückfaltung dieses Peptides zeigt eine Halbwertszeit von  $t_{1/2} = 6\mu\text{s}$  (Raumtemperatur). Im Vergleich zu  $\alpha$ -Helices (z.B. poly-Ala) liegt die Bildungsrate solcher Strukturen damit deutlich niedriger (ca. 1/30). Wie aus Berechnungen hervorgeht, ist diese Verlangsamung auf eine höhere Aktivierungsbarriere zurückzuführen (Muñoz, 1997; Muñoz, 1998). Diese entsteht durch die Fixierung zweier Bindungen zum Aufbau einer Wasserstoffbrücke zwischen beiden Strängen. Bei einer  $\alpha$ -Helix ist es nach Aufbau der ersten Schleife hingegen nur eine Bindung die pro Wasserstoffbrücke fixiert werden muß. Hydrophobe Seitenketten an bestimmten Positionen außerhalb der Umkehrschleife unterstützen den schnellen Strukturaufbau, indem sie durch zusätzliche Wechselwirkungen den Übergangszustand stabilisieren helfen.

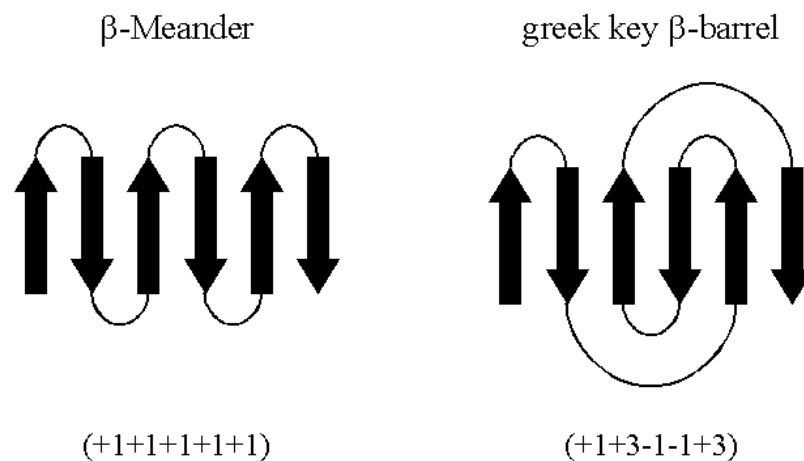


Abbildung 2-12 Vergleich unterschiedlicher Topologien einer  $\beta$ -Faltblattstruktur (Richardson, 1981).

$\beta$ -Hairpins gehören zu den potentiellen Nukleationsstellen beim Aufbau komplexer Faltblattstrukturen. Faltung, begünstigt durch schnelle Nukleation solcher Strukturen, reicht aus, um die Bildung einer  $\beta$ -Meander Topologie  $(+1+1+1+1+1)$  mechanistisch zu erklären (Abbildung 2-12). Bei greek key  $\beta$ -barrel Proteinen, die zusätzlich über nicht-sequentiell gepaarte  $\beta$ -Stränge verfügen  $(+1+3-1-1+3)$ , ist dies nicht ohne weiteres möglich (Richardson, 1981; Hutchinson, 1993). Nach dem Nukleationsmodell von Hazes und Hol (Hazes, 1992) initiieren bestimmte Abschnitte einer Proteinsequenz die Bildung eines lose strukturierten Faltungskerns.

Ausschlaggebend hierfür sind hydrophobe, durch eine  $\gamma$ -Umkehrschleife miteinander verbundene Aminosäuresegmente. Anders als bei der Bildung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen liegen die beiden Abschnitte im gefalteten Protein auf gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblättern. Die Etablierung eines Nukleationskerns mit Hilfe der Segmente B und C (Abbildung 2-13) stellt nach dem Modell von Hazes und Hol den primären, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Dabei dürfte auch der Aufbau einer solchen  $\gamma$ -Umkehrschleife von entscheidender Bedeutung sein. Wie Arbeiten von Hemmingsen (Hemmingsen, 1994) zeigen, befinden sich bestimmte, hochkonservierte Aminosäuren (Tyr und Asn) innerhalb einer solchen Umkehrschleife (*tyrosin corner*). Durch Wasserstoffbrücken fixieren die Seitenketten dieser Aminosäuren beide  $\beta$ -Stränge miteinander und unterstützen dadurch den Aufbau des Nukleationskerns. Ist dieser Nukleationskern erst einmal stabilisiert, erfolgt die Anlagerung der benachbarten Segmente A und D. Durch diesen „Wachstumsprozeß“ können sich die ersten Faltblattstrukturen ausbilden und stabilisieren.

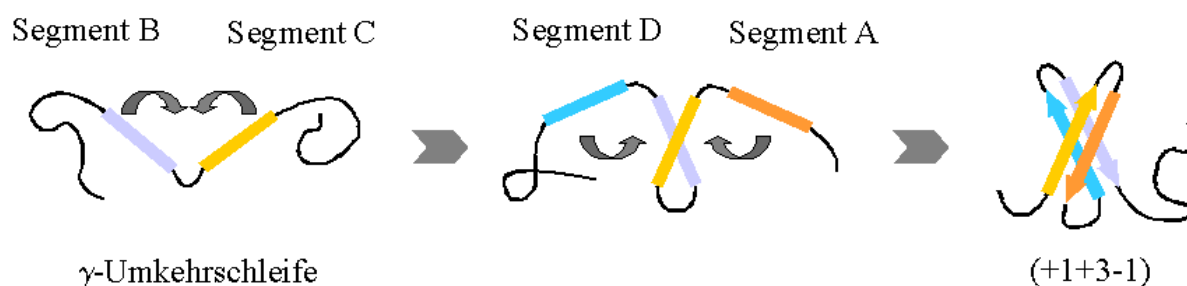


Abbildung 2-13 Faltung eines greek key  $\beta$ -barrel Proteins nach Hazes und Hol (Hazes, 1992).

Von Dill wurde ein ähnliches Modell vorgeschlagen, das auch als *hydrophobic zipper* Modell bezeichnet wird (Dill, 1993). In diesem Modell (Abbildung 2-14) sind es vor allem sequentiell benachbarte hydrophobe Aminosäurepaare, die durch Anlagerung für kurze Zeit eine instabile Schlaufenstruktur ausbilden können (a und a'). Dieser Kontakt schränkt die Flexibilität der Aminosäurekette ein und begünstigt die hydrophobe Wechselwirkung zusätzlicher, sequentiell entfernter, topologisch jedoch benachbarter Aminosäurepaare (b und b'). Dadurch wird ein kooperativer Wachstumsprozess in Gang gesetzt, der bis zur Konsolidierung eines  $\beta$ -Hairpins fortschreitet. Der Aufbau von  $\alpha$ -Helices läßt sich ebenfalls nach diesem *zipper* Mechanismus erklären, nur das hier die Seitenketten jeder dritten Aminosäure miteinander in Wechselwirkung

treten müssen (amphipatische Helix). Im Gegensatz zum  $\beta$ -Hairpin, läßt sich nach Dill die Faltung einer  $\alpha$ -Helix an jeder hydrophoben Aminosäure innerhalb der  $\alpha$ -Helix induzieren um anschließend bidirektional zu prozessieren.

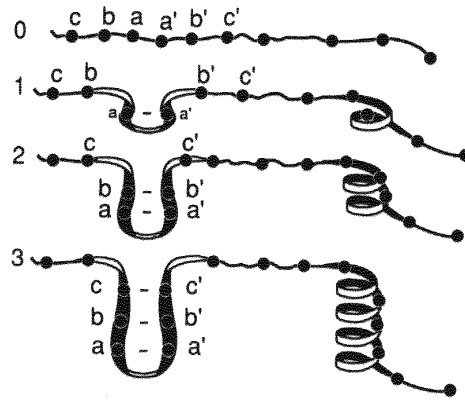


Abbildung 2-14 *hydrophobic zipper* Modell nach Dill (Dill, 1993). Das Bild beschreibt den Aufbau eines  $\beta$ -Hairpins (links) bzw. einer amphipatischen  $\alpha$ -Helix (rechts) durch kooperative Anlagerung hydrophober Aminosäuren (●).

### 2.3.3. Hydrophobe Oberflächenstrukturen (SEHC)

Die Faltung eines Proteins ist ein Selbstorganisationsprozess, bei dem die Information der amphipatisch aufgebauten Proteinkette als räumliche Struktur umgesetzt wird. Begünstigt durch den hydrophoben Effekt gelangt die Mehrzahl nichtpolarer Seitenketten in das Innere der sich formierenden Proteinstruktur. Polare und geladene Aminosäuren bilden die Oberfläche des Proteins, wo sie am effektivsten Wasserstoffbrücken mit dem wässrigen Medium eingehen können.

Untersuchungen über die innere Dynamik von Proteinen belegen die kompakte Organisation des Proteinkerns. Anders sind die Verhältnisse auf der Proteinoberfläche. Die „Mobilität“ einzelner Abschnitte führt hier dazu, daß sich der Nativzustand aus zahlreichen gleichenergetischen Nebenzuständen zusammensetzt. Unabhängig davon findet man auf der Oberfläche von Proteinen Strukturen, die weder funktionale noch assoziative Bedeutung haben und dennoch hochgradig rigide aufgebaut sind. Solche Anordnungen werden auch als kleine hydrophobe

Oberflächencluster (*small exterior hydrophobic cluster*) bezeichnet (Tisi, 1995). Zahlreiche Röntgenstrukturdaten zeigen, daß es sich bei den hydrophoben Clustern um Strukturen mit einem hohen Nahordnungsgrad handelt (Tisi, 1995). Ihrem Aufbau liegt dabei immer das gleiche, zentrosymmetrische Prinzip zugrunde: eine zentrale hydrophobe Aminosäure, um die sich 5-6 polare Aminosäuren gruppieren. Eine Besonderheit der peripheren Aminosäuren besteht in ihrer amphipathischen Bauweise (z.B. Glu und Lys). Hierdurch werden diese Aminosäuren in die Lage versetzt, sowohl hydrophobe (z.B.  $-\text{CH}_2-$ ) als auch hydrophile Wechselwirkungen (z.B.  $-\text{NH}_3^+$ ) einzugehen. Wie Berechnungen an einem Plastocyanin zeigen, vermag dieser „Schutzgürtel“ die Wasserzugänglichkeit einer exponierten Valin-Seitenkette (Val40) auf 7% zu reduzieren. Weitaus wichtiger ist der Einfluß von SEHCs auf die Stabilität von Proteinen. Burg gelang die Expression einer Protease (T63F), die gegenüber dem Wildtypprotein einen neu generierten hydrophoben Oberflächencluster enthielt (Burg, 1994). Die dadurch entstandenen Wechselwirkungen stabilisierten die Protease gegenüber thermischer Denaturierung um  $+ 6,2^\circ\text{C}$  ( $\Delta\Delta T_m$ ). Solche hydrophoben Cluster existieren auf zahlreichen Proteinoberflächen (Tabelle 2-7).

<i>Protein</i>	<i>Hydrophober Cluster</i>	<i>Struktur-Referenz</i>
Plastocyanin	Val40,Val28	(Guss, 1983)
Azurin	Val47	(Baker, 1987)
Pseudoazurin	Ile45	(Adman, 1989)
Tendamistat	Val36	(Pflugrath, 1986)
Transferritin	Phe33	(Blake, 1978)
$\beta_2$ -Microglobulin	Phe22	(Bjorkman, 1987)
ColE1 rop Protein-Dimer	Leu9	(Banner, 1987)

Tabelle 2-7 Hydrophobe Oberflächencluster bei Proteinen (Tisi, 1995).

Untersuchungen über das Auftreten bei  $\beta$ -barrel Proteinen belegen die Tendenz von hydrophoben Oberflächenclustern, bestimmte, topologisch relevante Positionen des  $\beta$ -Faltblatts einzunehmen. Hierzu gehören insbesondere Bereiche, die zentral innerhalb der  $\beta$ -Faltblattstruktur liegen und sich zwischen beiden  $\beta$ -Faltblättern befinden. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß derartige Cluster eine entscheidende Rolle in der Verankerung bestimmter  $\beta$ -Stränge zu einem  $\beta$ -Faltblatt spielen. Auch Tendamistat besitzt als *greek key*  $\beta$ -barrel Protein einen hydrophoben Cluster (Abbildung 2-15). Das Zentrum bildet ein Valinrest an Position 36 (V36). Umgeben wird

V36 von 6 Aminosäuren (K34, D40, E42, R68, Y69 und A71), die auf allen drei Strängen (III, IV und VI) des zweiten  $\beta$ -Faltblatts sich befinden. Die Rigidität der Clusterstruktur um V36 sollte die konformationelle Flexibilität dieses Bereichs stark einschränken. Tatsächlich verweist eine Protektionszahl von 10000 ( $k_{\text{exp}} / k_{\text{obs}}$ ) in H-D Austauschexperimenten (50°C, pH3.0) auf die besondere Stabilität dieses Strukturbereichs (Qiwen, 1987).

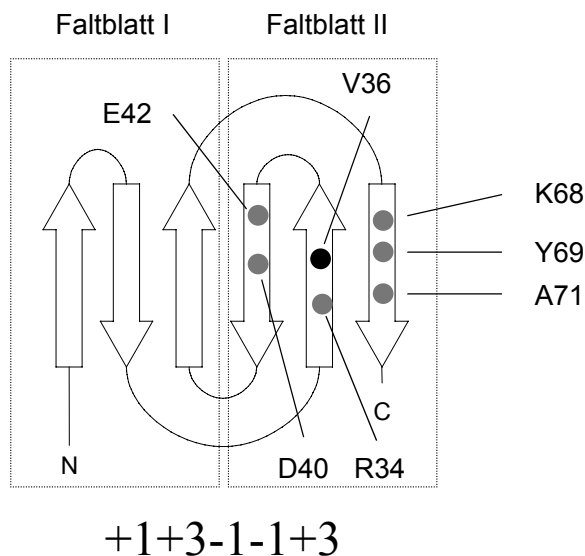


Abbildung 2-15 Hydrophober Oberflächencluster des Tendamistats (Tisi, 1995).

Inwiefern hydrophobe Oberflächencluster bei der Faltung von  $\beta$ -barrel Proteinen eine Rolle spielen, wurde in der Literatur bisher nicht untersucht.

## 2.3.4. Prolinisomerisierung

### 2.3.4.1. Einleitung

Unter Bedingungen, die den denaturierten Zustand eines Proteins stabilisieren, erfolgen Übergänge zumeist mit monoexponentieller Entfaltungskinetik (Creighton, 1993). Solche Entfaltungsübergänge lassen sich durch einen einzigen Übergangszustand (TS) wiedergeben. Multiexponentielle Kinetiken treten immer dann auf, wenn mehrere Nativzustände (N und N') unter den Ausgangsbedingungen nebeneinander vorliegen (Kiefhaber, 1995). Verhältnismäßig

komplizierte, mehrphasige Kinetiken werden dagegen bei der Rückfaltung von Proteinen beobachtet. Sie sind häufig darauf zurückzuführen, daß entweder der entfaltete Zustand eines Proteins uneinheitlich (heterogen) aufgebaut ist (Brandts, 1975; Lin, 1978; Nall, 1978; Tsong, 1979) oder unter Rückfaltungsbedingungen zusätzliche Zustände stabilisiert werden, die produktiv oder nicht-produktiv die Faltung eines Proteins beeinflussen (Miranker, 1996; Kiefhaber, 1995). Bei zahlreichen Proteinen konnten *cis/trans* Isomerisierungen um Xaa-Pro Bindungen als Ursache für die Heterogenität des entfalteten Zustands bestimmt werden (Brandts, 1975; Kim, 1982; Kiefhaber, 1990; Ikura, 1997).

Die meisten Aminosäuren innerhalb einer Proteinkette sind durch Amid Bindungen miteinander verknüpft. Solche Amid Bindungen weisen zwei Isomerisierungszustände auf, die als *cis* bzw. *trans* Form bezeichnet werden. Beide Zustände lassen sich durch eine 180° Drehung um die CO-NH Achse ineinander überführen (Abbildung 2-16).

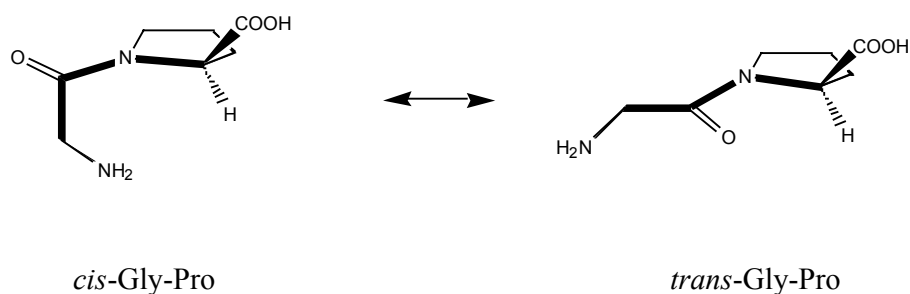


Abbildung 2-16 *cis/trans* Isomerie am Beispiel eines Dipeptids.

In unstrukturierten Polypeptiden ist die *trans* Konformation gegenüber der *cis* Konformation stark bevorzugt (1:100-1000). In Kristallstrukturen von Proteinen sind *cis* Bindungen nur selten anzutreffen (z.B. in RNase A, RNase T1 und Thioredoxin). Insgesamt weisen etwa 6% aller Polypeptidbindungen eine *cis* Konformation auf (Stewart, 1990). Besonders häufig werden sie zwischen Aminosäurepaaren beobachtet, die an zweiter Position die Aminosäure Prolin enthalten (Xaa-Pro). Innerhalb der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren nimmt das Prolin eine Sonderrolle ein. Mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 5.1% (McCaldon, 1988) gehört das Prolin nicht gerade zu den seltenen Aminosäuren (z.B. Cystein mit 1.7% und Tryptophan mit 1.3%). Nach Einbau in eine Aminosäuresequenz kommt es zwischen dem Prolin und der N-Terminal gelegenen Aminosäure zur Ausbildung einer N-alkylierten Peptidbindung. In Peptiden

zeigen solche Imid-Bindungen wegen sterisch ähnlicher Einflüsse in beiden Konformationszuständen eine deutlich geringere Bevorzugung der *trans* gegenüber der *cis* Konformation. Das *cis/trans* Gleichgewicht liegt in unstrukturierten Peptiden bei ungefähr 30% *cis* gegenüber 70% *trans* (Brandts, 1995). Der höchste Gehalt an *cis*-Konformeren wird dabei in Peptiden beobachtet, die an der Xaa-Position Aminosäuren mit aromatischer Seitenkette enthalten (>20%). In nativen Proteinen liegen etwa 5% aller Xaa-Pro Imidbindungen in der *cis* Konformation vor.

<i>Peptide</i>	$\Delta G^\ddagger$ [kJ/mol]	$\Delta H^\ddagger$ [kJ/mol]
Gly-Pro	83.6	83.6
Ala-Pro	87.78	79
Val-Pro	88.62	78.6
His-Pro	90.29	79
Gly-Gly-Pro-Ala	80.26	81.51
N,N-Dimethylacetamid	80.67	79.84

Tabelle 2-8 Daten über die Prolyl-*cis/trans* Isomerisierung von Peptiden (Stein, 1993).

Bedingt durch eine hohe Aktivierungsbarriere ( $\Delta G^\ddagger \sim 90\text{kJ/mol}$ ) erfolgt die Isomerisierung um Xaa-Pro Bindungen verhältnismäßig langsam (Kiefhaber, 1995; Nall, 1994). Die durchschnittlichen Isomerisierungszeiten liegen bei entfalteten Proteinen zwischen 10s und 100s (25°C). Bei der Faltung von Proteinen und Peptiden katalysieren Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerasen (PPIasen) spezifisch (-Xaa-Yaa-Pro-) die Isomerisierungsreaktion um Xaa-Pro Bindungen (Fischer, 1984; Fischer, 1994). Häufig jedoch sind diese Enzyme unwirksam, da zahlreiche Proteine unter Rückfaltungsbedingungen kompakte Zustände einnehmen, in denen Xaa-Pro Bindungen für das Enzym nicht mehr zugänglich vorliegen (Nall, 1994). Dies erklärt auch, warum die katalytische Effizienz ( $k_{\text{CAT}}/K_m$ ) von PPIasen bei der Faltung von Proteinen nahezu um den Faktor 1000 unterhalb der von Modellpeptiden liegt. Die Bedeutung der ubiquitär vorkommenden PPIasen reicht jedoch weiter (Schmid, 1995). Neben ihrer katalytischen Funktion in Zellen (Matouschek, 1995) kommen PPIasen wichtige Aufgaben innerhalb der Signaltransduktion (Fischer, 1994) und vermutlich der Oligomerisierung (Bergdoll, 1997) von Proteinen zu. Neuerdings gelang es auch, Antikörper mit Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* Isomerase



Aktivität zu gewinnen und erfolgreich bei der Rückfaltung von Ribonuklease T1 einzusetzen (Ma, 1998).

Die Rückfaltungsreaktion zahlreicher Proteine, die in ihrer nativen Struktur eine oder mehrere *cis* Imidbindungen enthalten, wird sehr häufig von langsamen Phasen dominiert. 1973 konnte zum ersten mal gezeigt werden (Garel, 1973), daß Ribonuklease A (RNase A) im entfalteten Zustand aus mindestens zwei Molekülpopulationen besteht, die bei der Rückfaltung eine schnelle (*fast-folding species*) sowie eine langsame Faltungsphase (*slow-folding species*) verursachen (Abbildung 2-17). Zwei Jahre später wurde von Brandts und Halvorson die „Prolin-Hypothese“ als Erklärungsvorschlag eingeführt (Brandts, 1975). Ihre Hypothese basiert auf der Vorstellung, daß durch die Entfaltung von Proteinen konformationelle Einschränkungen aufgehoben werden, die im nativen Protein den Isomerisierungszustand der Xaa-Pro Bindung festlegen.

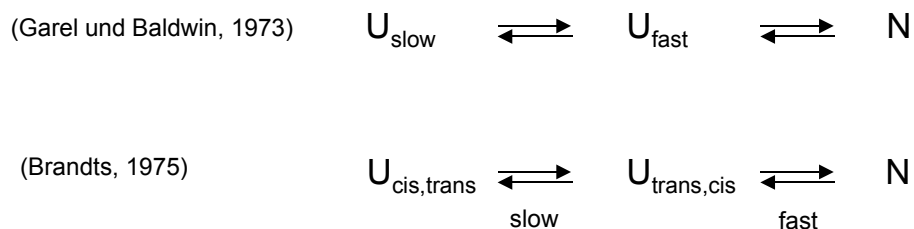


Abbildung 2-17 Erster Hinweis auf uneinheitliche Entfaltungszustände an RNase A (Garel, 1973) und die „Prolin-Hypothese“ als Erklärungsvorschlag (Brandts, 1975).

Hierdurch können andere Konformationen um die Imidbindung equilibrieren, die dann bei der Rückfaltungsreaktion zu einer langsamen Faltungsphase führen ( $U_S$ ). Moleküle, die im entfalteten Zustand die native Konformation an allen Imidbindungen aufweisen, sind für die schnelle Rückfaltungsphase des Proteins verantwortlich ( $U_F$ ). Dabei spielt es keine Rolle, ob im Ausgangszustand *cis* Xaa-Pro oder *trans* Xaa-Pro Bindungen vorgelegen haben. Durch die energetische Bevorzugung der *trans* Xaa-Pro Bindung weisen besonders Proteine mit einer *cis* Xaa-Pro Bindung sehr langsame Rückfaltungsphasen auf (Kiefhaber, 1990). Neben langsamen Rückfaltungsphasen können nicht-native Isomerisierungszustände auch zu einer Akkumulation von Intermediaten (I) auf Neben- oder Hauptfaltungswegen führen (Schmid, 1978). Der Übergang eines solchen Intermediats in den nativen Zustand (N) verläuft dabei erst nach

Isomerisierung um die nicht-native Xaa-Pro Bindung. Als langsame Phasen sind solche Übergänge (I  $\rightarrow$  N) nicht unmittelbar von der *cis/trans* Isomerisierung entfalteter Moleküle zu unterscheiden ( $U_S \rightarrow U_F$ ). Unter nativen Bedingungen außerhalb des Übergangsbereichs deutet häufig eine dritte, mittlere Rückfaltungsphase auf die Anwesenheit eines solchen Intermediats hin (Utiyama, 1986). In bestimmten Fällen können auch intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb des nativ strukturierten Intermediats zu einer Katalyse der Xaa-Pro Isomerisierung führen (Texter, 1992).

Auch Amidbindungen können in die *cis* Konformation nach Entfaltung übergehen. Geht man dabei von einer Wahrscheinlichkeit für nicht-Prolin Bindungen von 0.5% aus, bedeutet das bei einem Protein mit 100 Aminosäuren (99 Peptidbindungen) einen durchschnittlichen *cis* Gehalt von etwa 39% (Lin, 1978). In Faltungsexperimenten konnten diese Isomerisierungen bisher nicht als Ursache für eine Heterogenität im entfalteten Zustand identifiziert werden. Im Falle der Ribonuklease T1 gelang es, eine solche Heterogenität auf nicht-Prolin Bindungen zu „übertragen“ (Odefey, 1995). Bei der Entfaltung von Ribonuklease T1 kommt es zu einer Isomerisierung der *cis* Tyr<sup>38</sup>-Pro<sup>39</sup> Bindung. Diese *cis*  $\rightarrow$  *trans* Isomerisierung nach Entfaltung des Proteins wurde in der P39A Mutante auf die Isomerisierung der nicht-Prolin *cis* Tyr<sup>38</sup>-Ala<sup>39</sup> Bindung übertragen. Hieraus konnte für die Entfaltungsreaktion unter denaturierenden Bedingungen (6M GdmCl pH1.6, 25°C) eine Geschwindigkeitskonstante von  $1.36 \text{ s}^{-1}$  ( $\Delta G^\ddagger \sim 107 \text{ kJ/mol}$ ) bzw. bei der Rückfaltungsreaktion unter nativen Bedingungen (1M GdmCl pH4.6, 25°C) von  $0.002 \text{ s}^{-1}$  erhalten werden.

#### 2.3.4.2. Nachweismöglichkeiten für die Prolinisomerisierung

Für den Nachweis, daß es sich bei einer langsamen Faltungsphase um eine Prolinisomerisierung handelt, sind in der Literatur unterschiedliche Verfahren beschrieben worden. Ein solches Verfahren basiert beispielsweise auf der Spezifität der Serin-Protease Trypsin (Lin, 1979; Lin 1983). Die Spaltung der Aminosäuresequenz (Arg/Lys)-Pro erfolgt bei einer sterisch zugänglichen Imidbindung erst dann, wenn sie sich in der *trans* Konformation befindet. Läßt man in einem Ansatz in Gegenwart einer hohen Trypsin Konzentration das Protein rückfalten, kann man einen biphasischen Verlauf bei der Fragmentbildung beobachten. Sind entsprechend des Gleichgewichtszustands sämtliche *trans* (Arg/Lys)-Pro Bindungen hydrolysiert, erfolgt *nach* Isomerisierung zeitabhängig die Hydrolyse der *cis* (Arg/Lys)-Pro Bindungen. Eine andere

Nachweismöglichkeit über Enzyme besteht darin, die langsame Phase durch Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen zu katalysieren. Solche Experimente konnten *in vitro* bereits erfolgreich zur Identifizierung von langsamen, prolinabhängigen Phasen eingesetzt werden (Lang, 1987; Veeraraghavan, 1997; Kiefhaber, 1997). Sind mehrere Proline in einer Aminosäuresequenz enthalten, kann anhand solcher Experimente nicht entschieden werden, welches der Proline für die langsame Faltungsphase verantwortlich ist. Die Identifizierung *falscher* Imidbindungen gelingt häufig mit Hilfe von Mutagenese Experimenten (Kelley, 1987; Hurle, 1991; Ikura, 1997; Tan, 1997). Ersetzt man beispielweise das Prolin in der Sequenz Xaa-Pro durch Xaa-Ala, wird die Übergangswahrscheinlichkeit von *trans* Xaa-Ala nach *cis* Xaa-Ala entsprechend herabgesetzt. Sollte also ein bestimmtes Prolin nach Denaturierung zur Bildung einer langsam faltenden Spezies ( $U_S$ ) führen, wäre infolge einer solchen Substitution die Akkumulation von  $U_S$  aufgehoben. Anders verhält es sich bei Proteinen, die im nativen Zustand eine oder mehrere *cis* Xaa-Pro Bindungen aufweisen. Hier können nach Substitution (Yaa) besonders langsame Phasen durch den kinetisch ungünstigen Übergang *trans* Xaa-Yaa  $\rightarrow$  *cis* Xaa-Yaa entstehen (Odefey, 1995).

Anhand sogenannter „Doppelsprung“ Experimente (Abbildung 2-18) gelingt häufig ein direkter Nachweis des Gleichgewichts  $U_F \rightleftharpoons U_S$  (Brandts, 1975; Schmid, 1986). In einem solchen „U-Test“ geht man von nativem Protein aus und induziert durch einen Entfaltungssprung (1. Sprung) den Übergang von N nach  $U_F$ . Nach unterschiedlich langer Inkubation, bei dem  $U_F$  langsam in  $U_S$  übergeht (Abbildung 2-19), erfolgt durch erneute Verdünnung der Proteinlösung ein Rückfaltungssprung (2. Sprung).



Abbildung 2-18 Aufbau eines „Doppelsprung“ Experiments („U-Test“) zum Nachweis der *slow-folding-species*  $U_S$ .

Dieser induziert die Rückfaltung von U nach N, wobei die Bedingungen so gewählt werden müssen, daß die Akkumulation von Rückfaltungsintermediaten nicht in Erscheinung treten kann.

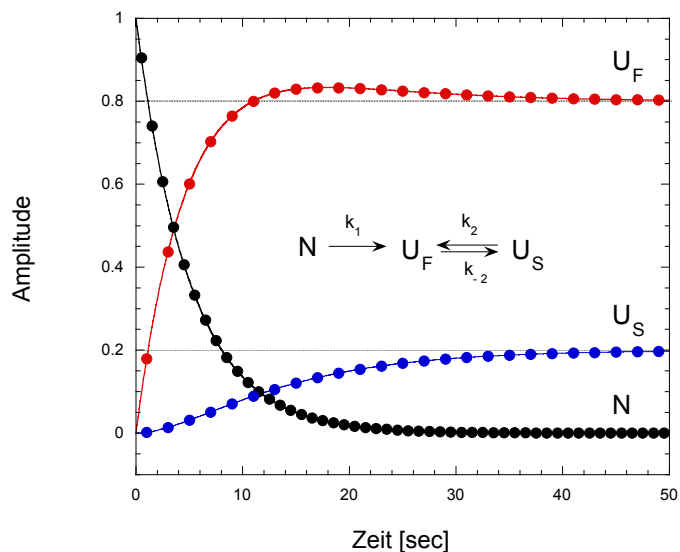


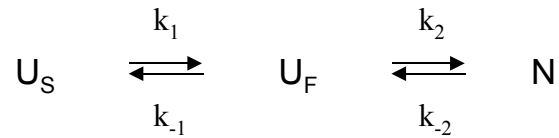
Abbildung 2-19 Vergleich der sich entwickelnden Amplituden von  $U_F$  und  $U_S$  nach einem Entfaltungssprung von N nach U (Anhang B). Die Geschwindigkeitskonstanten lauten:  $k_1 = 0.2$ ,  $k_2 = 0.02$ ,  $k_{-2} = 0.08$  mit  $U_F(\infty) = 0.8$ ,  $U_S(\infty) = 0.2$  und  $N(0) = 1$ . Mit diesen Randbedingungen wird  $A(U_F)_{\max}$  nach etwa 19 sec erreicht. Deutlich ist ein sigmoidaler Verlauf der Amplitude von  $U_S$  zu erkennen.

Die unter Rückfaltungsbedingungen gemessene Amplitude der langsamen Phase ist ein direktes Maß für den zeitabhängigen Übergang von  $U_F$  nach  $U_S$ . Nach sehr kurzer Inkubation werden es im Wesentlichen die schnell faltenden Moleküle ( $U_F$ ) sein, die 100% zur gemessenen Signalamplitude beitragen. Nach  $t$  Sekunden beobachtet man zusätzlich dazu eine langsame Rückfaltungsphase, die an Amplitude gewinnt und irgendwann in einen Sättigungsbereich übergeht. Diese Amplitudenzunahme entspricht dem Übergang von  $U_F$  nach  $U_S$ . Nach langer Inkubation stellt sich zwischen den beiden entfalteten Zuständen ein Gleichgewicht ein und man beobachtete das gleiche Amplitudenverhältnis wie bei direkten Rückfaltungsexperimenten.

### 2.3.4.3. Kinetik der Prolinisomerisierung

Das Drei-Zustands-Modell (DZM) ist die einfachste Darstellung für die komplexen Zusammenhänge, die bei der Isomerisierung um eine Imidbindung auftreten können (Utiyama,

1986). Insgesamt beschreiben vier mikroskopische Geschwindigkeitskonstanten ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  und  $k_{-2}$ ) vollständig die Übergänge zwischen den einzelnen Zuständen im DZM:



Durch die hohe Energiebarriere (etwa 90kJ/mol) zwischen  $U_F$  und  $U_S$  lassen sich die beiden Phasenübergänge ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ) zeitlich gut voneinander trennen. Spektroskopisch gesehen beobachtet man bei Rückfaltungsmessungen ein zweiphasiges Meßsignals. Nimmt man an, daß die erste Phase deutlich schneller ist als die zweite Phase ( $\tau_1 \gg \tau_2$ ), vereinfachen sich die analytisch gewonnenen Ausdrücke zu (Hagerman, 1976):

$$\begin{aligned} (1 / \tau_1) &= k_1 + k_{-1} / (1 + K_2) & (\tau_1 \gg \tau_2) \\ (1 / \tau_2) &= k_2 + k_{-2} & (\tau_1 \gg \tau_2) \end{aligned}$$

Für die beiden Gleichgewichtskonstanten in dem System gilt:

$$\begin{aligned} K_1 &= U_F / U_S = k_1 / k_{-1} \\ K_2 &= N / U_F = k_2 / k_{-2} \end{aligned}$$

Unter Bedingungen, die N gegenüber  $U_F$  und  $U_S$  stark begünstigen (vollständige Rückfaltung), ergeben sich für beide Phasen folgende Beziehungen:

$$\begin{aligned} (1 / \tau_1) &= k_1 & (K_2 \gg 1) \\ (1 / \tau_2) &= k_2 & (K_2 \gg 1) \end{aligned}$$

Hierdurch lassen sich direkt die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  aus Rückfaltungsmessungen unter stark nativen Bedingungen ableiten. Die dabei gemessenen Amplituden ( $A_1$  und  $A_2$ ) der exponentiellen Verläufe entsprechen im Verhältnis  $A_2/A_1$  der Gleichgewichtskonstanten  $K_1$ .

Unter Bedingungen, die entsprechend den entfalteten Zustand gegenüber N stark begünstigen ( $K_2 \cong 0$ ), ergeben sich folgende Beziehungen zu den mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten:

$$(1 / \tau_1) = k_1 + k_{-1} \quad (K_2 \cong 0)$$

$$(1 / \tau_2) = k_{-2} \quad (K_2 \cong 0)$$

Unter Entfaltungsbedingungen läßt sich aus der Hauptphase die mikroskopische Geschwindigkeitskonstante  $k_{-2}$  direkt ableiten. Häufig kann jedoch der Übergang von  $U_F$  nach  $U_S$  spektroskopisch nicht erfaßt werden. Die gesamte Amplitudenänderung erfolgt demnach in der schnellen Entfaltungsphase.  $k_{-1}$  läßt sich aber auch über die bereits oben beschriebene „Doppelsprung“ Technik ableiten. Beläßt man  $U_F$  nach Entfaltung von N, beginnt sich allmählich  $U_S$  mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  zu bilden. Nach bestimmten Zeiten kann diese Reaktion durch Rückfaltung ( $K_2 \gg 1$ ) abgebrochen werden. Da unter Rückfaltungsbedingungen beide Phasen ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ )  $k_1$  bzw.  $k_2$  entsprechen, kann die sich verstärkende Amplitude ( $A_1(t)$ ) der langsamen Rückfaltungsphase unmittelbar  $k_{-1}$  zugeordnet werden.

### 2.3.5. Übergangszustände in der Proteinfaltung

Bei der Proteinfaltung kommt dem Übergangszustand (TS) eine besondere Rolle zu. Ist die freie Energiebarriere zwischen dem entfalteten Zustand D und dem Übergangszustand TS ausreichend hoch, hängt die Geschwindigkeit für die Bildung von N direkt mit der „Konzentration“ von TS zusammen. Eine Proteinkonformation im Übergangszustand erfüllt damit als eine Art „angeregtes Intermediat“ die minimalsten Anforderungen zum Erreichen des Nativzustands N:



Die Theorie des Übergangszustands läßt sich auf die Faltung von Proteinen nicht unmittelbar übertragen. Die Umwandlung eines Schwingungsfreiheitsgrades in einen Translationsfreiheitsgrad, wie sie nach der klassischen Eyring Theorie bei chemischen Reaktionen im Übergangszustand stattfindet, ergibt für Proteine keinen Sinn, da Bindungen bei der Faltung weder aufgehoben noch geknüpft werden. Dennoch läßt sich eine vergleichbare Beziehung auch für Proteine ableiten. Bei schwachen Wechselwirkungen kann nämlich die Boltzmann-Gleichung

verwendet werden, um die Verteilung zwischen zwei Zuständen ( $D \rightleftharpoons TS$ ) wiederzugeben (Fersht, 1999).

$$k_f = k_0 \exp(-\Delta G_{D-TS} / RT)$$

$k_0$  ist dabei ein Vorfaktor, der durch das Produkt zweier Größen beschrieben werden kann: die Vibrationsfrequenz  $\nu$  (Häufigkeit mit der Moleküle den Übergangszustand passieren) und der Transmissionsfaktor  $\kappa$ . Für die Abschätzung von Energiebarrieren setzt man  $\nu = k_B T / h$  und  $\kappa = 1$ . Der Ausdruck vereinfacht sich weiter, wenn man nur relative Änderungen der Meßgröße  $k_f$  berücksichtigt. Von  $k_f$  abweichende Werte können beispielsweise durch „stille“ Mutagenese ( $k'_f$ ) am Protein erhalten werden ( $\nu$  und  $\kappa$  dürfen sich hierbei selbstverständlich nicht ändern). Die Differenz der freien Aktivierungsenergie  $\Delta\Delta G_{D-TS}(\text{Wildtyp-Mutante})$  läßt sich demnach durch das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten bestimmen:

$$RT \ln(k_f / k'_f) = -\Delta\Delta G_{D-TS}(\text{Wildtyp} - \text{Mutante})$$

#### 2.3.5.1. Die $\Phi$ -Wert Analyse.

Die  $\Phi$ -Wert Analyse ist eine Methode mit der die Struktur von Übergangszuständen indirekt abgeleitet werden kann. Das Verfahren basiert auf dem Störungsprinzip (Abbildung 2-20). Hierbei wird durch Mutation die Stabilität des Wildtypproteins verändert. Das Ausmaß einer solchen „Störung“ bezogen auf den denaturierten Zustand D, läßt sich durch die freie Energie  $\Delta\Delta G^0_{N-D}(\text{Wildtyp-Mutante})$  wiedergeben. Wird dieser Störungsbeitrag in Relation zu der Aktivierungsenergie  $\Delta\Delta G_{D-TS}(\text{Wildtyp-Mutante})$  gesetzt, ergibt sich der sogenannte  $\Phi_f$ -Wert. Ein solcher Wert, der in der Regel zwischen 0 und 1 liegt, beschreibt den Einfluß bestimmter Mutation auf den Übergangszustand (TS). Bei Mutationen, die die Stabilität unverändert lassen ( $\Delta\Delta G^0_{N-D}(\text{Wildtyp}) = \Delta\Delta G^0_{N-D}(\text{Mutante})$ ), kann  $\Phi_f$  definitionsgemäß nicht abgeleitet werden. Ein  $\Phi_f$ -Wert von 0 bedeutet, daß die Mutation im denaturierten Zustand des Proteins (D) zu der gleichen Störung wie im Übergangszustand (TS) führt (Abbildung 2-21). Ein  $\Phi_f$ -Wert von 1 bedeutet hingegen, daß die Mutation im nativen Zustand die gleiche Störung wie im Übergangszustand verursacht. Vereinfacht kann man sagen, daß bei einem Wert von Null der

Bereich um die Mutation unstrukturiert (D), hingegen bei einem Wert von 1 strukturiert (N) vorliegt.

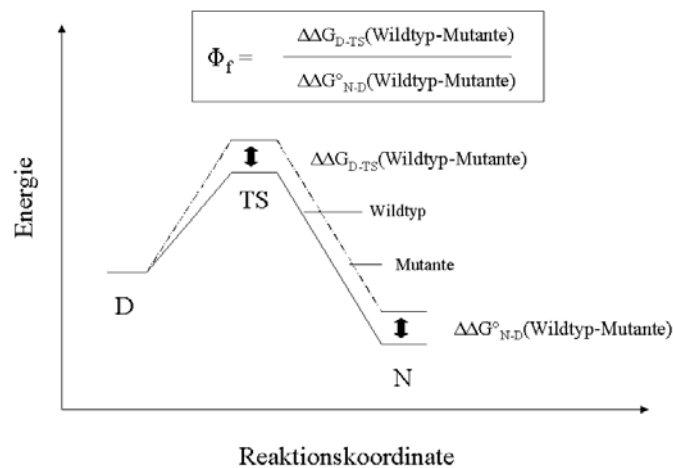


Abbildung 2-20 Energiestufendiagramm zur Berechnung von  $\Phi_f$ . Es wurde dabei angenommen, daß sich die denaturierten Zustände (D) nicht voneinander unterscheiden (Nölting, 1999).

Entsprechend dem  $\Phi_f$ -Wert läßt sich auch für die Entfaltung ein  $\Phi$ -Wert ableiten ( $\Phi_u$ ). Führen beide Reaktionen über den *gleichen* Übergangszustand, beträgt die Summe der beiden „komplementären“  $\Phi$ -Werte 1 ( $\Phi_f + \Phi_u$ ). Eine besondere Situation tritt ein, wenn für den Übergangszustand nicht-native Kontakte eine Rolle spielen (Fersht, 1992). Dieser Extremfall kann über einen  $\Phi$ -Wert Vergleich zwischen Doppelmutanten ( $X_{1,2}$ ) und Einzelmutanten ( $X_1$  und  $X_2$ ) untersucht werden (*double-mutant cycles*). Bei Mutationen, die zu einer Verschiebung des Übergangszustands führen, können einzelne  $\Phi$ -Werte nicht mehr sinnvoll miteinander verglichen werden. Durchlaufen beispielsweise zwei parallele Faltungswege zwei unterschiedliche Übergangszustände (TS1 und TS2), kann eine Mutation auf beide Zustände ganz unterschiedliche Auswirkungen haben (z.B.  $\Phi_{f,TS1} = 0$  und  $\Phi_{f,TS2} = 1$ ). Der resultierende  $\Phi_f$ -Wert liegt in einem solchen Fall immer zwischen 0 und 1. Möglicherweise resultiert das entstandene Problem auch aus der begrifflichen Unklarheit „Übergangszustand“ bei der Faltung von Proteinen. Statistisch gesehen handelt es sich nämlich um eine Verteilung von Zuständen mit durchaus unterschiedlichen Energien.



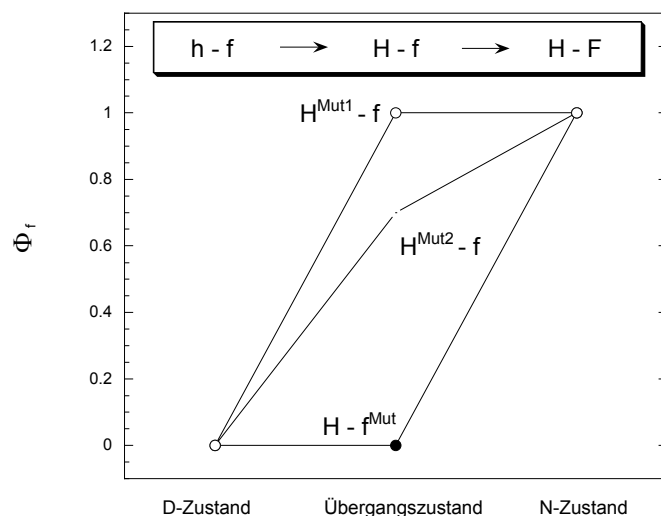


Abbildung 2-21 Grafische Darstellung der  $\Phi$ -Werte für die Faltung eines Proteins (Fersht, 1992). Das Modellprotein besteht aus einer Helix (H) und einem Faltblatt (F), die beide im denaturierten Zustand vollständig entfaltet sind (h bzw. f). Im Übergangszustand (H – f) bildet sich die Helix wie in der nativen Struktur (H – F) vollständig aus. Mutationen, die in einem solchen Bereich eingebracht werden ( $H^{Mut1} - f$ ), führen zu  $\Phi_f$ -Werten um 1. Mutationen im Faltblatt hingegen, führen zu  $\Phi_f$ -Werten um 0 ( $H - f^{Mut}$ ). Manche Mutationen im helikalen Bereich sind im Übergangszustand nicht voll ausgebildet ( $H^{Mut2} - f$ ).

Da nur schwache Wechselwirkungen solche „Zustände“ definieren, können selbst kleinere Energiebeiträge leicht zu Veränderungen innerhalb der Übergangszustandspopulation führen.

### 2.3.5.2. Der Brønsted-Plot.

Der Brønsted-Plot ist eine grafische Abbildung der Brønsted-Gleichung, einer linearen Beziehung zwischen dem Geschwindigkeitsausdruck  $\log k$  und der Lage des Gleichgewichts, definiert durch  $\log K$ :

$$\log k = const. + \beta \log K$$

Wertepaare für diese Gleichung können erhalten werden, indem man entweder die Reaktanden modifiziert oder die Konzentration eines Reaktanden verändert (z.B. in der Säure/Base Katalyse). Die Steigung  $\beta$  in der oberen Gleichung wird auch als Brønsted-Koeffizient bezeichnet. Der

Brønsted-Koeffizient kann, genau wie der  $\Phi$ -Wert, Beträge zwischen 0 und 1 einnehmen. Bei einem  $\beta$ -Wert von 0 entspricht die Struktur des Übergangszustands der Eduktseite (Abbildung 2-22). Ein  $\beta$ -Wert von 1 bedeutet hingegen, daß die Struktur des Übergangszustands der Produktseite entspricht.  $\beta$ -Werte über 1 sind ebenfalls möglich ( $\log K \sim 0$  und  $\log k \neq 0$ ).

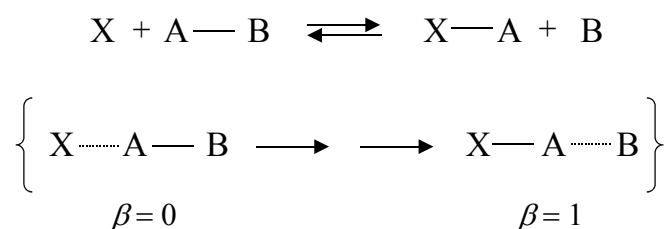


Abbildung 2-22 Einfache chemische Reaktion zwischen X und AB zur Veranschaulichung der Brønsted-Gleichung.

Die Brønsted-Gleichung konnte bereits erfolgreich auf Enzym-katalysierte Reaktionen angewandt werden (Fersht, 1987). Um sie für die Proteinfaltung zu nutzen, muß sie jedoch erweitert werden. Hierzu verwendet man einen zweiten Ausdruck, der als Referenz alle gemessenen Wertepaare ( $\log k_f'$  bzw.  $\log K_{eq}'$ ) auf ein „Referenzprotein“ ( $\log k_f$  bzw.  $\log K_{eq}$ ) bezieht:

$$\log(k_f / k_f') = (const. - const.') + \beta \log(K_{eq} / K_{eq}')$$

Daraus ergibt eine Brønsted-Konstante, die unabhängig ist vom Nullwert ( $const. - const.'$ ):

$$\beta = \frac{\Delta \log(k_f / k_f')}{\Delta \log(K_{eq} / K_{eq}')}$$

Eine äquivalente Darstellung dieser Gleichungen lautet:

$$\beta = \frac{\Delta(\Delta\Delta G_{D-TS})}{\Delta(\Delta\Delta G_{eq})}$$

Hier steht  $\Delta\Delta G_{D-TS}$  für die Änderung der freien Aktivierungsenergie und  $\Delta\Delta G_{eq}$  für die Änderung der freien Energie unter Gleichgewichtsbedingungen. Beide Ausdrücke lassen sich für analytische Zwecke als Koordinaten in einem Brønsted-Plot einsetzen. Sollte der Übergangszustand einen ähnlichen Aufbau besitzen wie N, wäre dies an einer Steigung nahe  $\beta = 1$  erkennbar. Bei Proteinen, wie beispielsweise dem Chymotrypsin Inhibitor 2 (CI2), konnte ein linearer Zusammenhang über weite Bereiche ( $\Delta = 21\text{kJ/mol}$ ) hinweg erhalten werden (Fersht, 1994). Interessanterweise war der lineare Zusammenhang unabhängig davon, wohin die einzelnen Mutationen im CI2 gesetzt wurden. Proteine, die über parallele Faltungswege den Nativzustand erreichen, können in besonderen Fällen auch über einen Brønsted-Plot identifiziert werden (Fersht, 1994; Fersht, 1999).

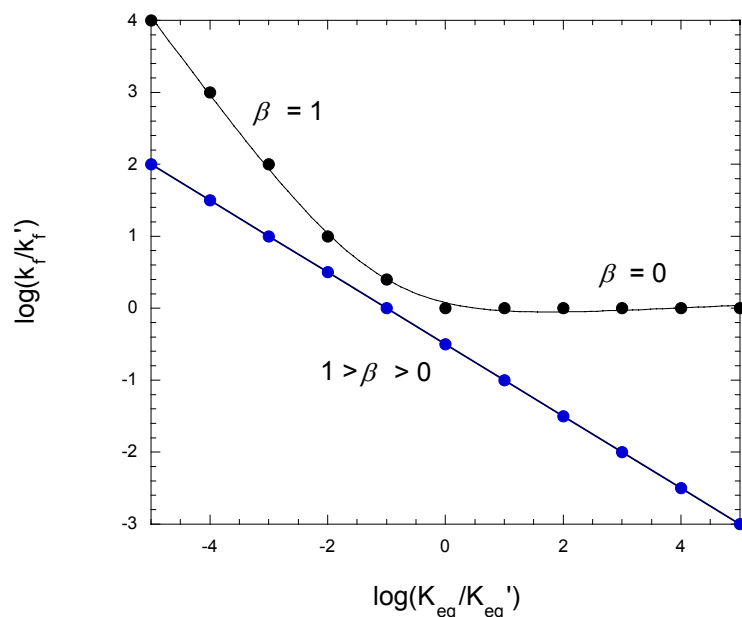


Abbildung 2-23 Brønsted-Plot zweier Proteine, die entweder über einen (●) oder über zwei (●) Übergangszustände N erreichen. Bei ● sind zusätzlich die beiden Extremfälle  $\beta = 1$  und  $\beta = 0$  abgebildet. Anstatt paralleler Faltungswege werden in der Literatur für „abknickende“ Verläufe auch andere Möglichkeiten diskutiert (Fersht, 1994).

Die resultierende Geschwindigkeitskonstante  $k_f$  setzt sich in einem solchen Fall aus den mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  (Weg 1) und  $k_2$  (Weg 2) additiv zusammen. Eine Mutation, die insbesondere den Faltungsweg 1 beeinflusst, aber auf Faltungsweg 2 ohne Auswirkungen bleibt, bewirkt eine Veränderung von  $k_1$  um den Faktor  $\exp(-\Delta\Delta G_{D-TS}/RT)$ . Da  $k_2$  per Definition unverändert bleibt, ändert sich in einem solchen Fall der  $\beta$ -Wert, je nach Lage der Mutation (Fersht, 1994). Ähnlich wie bei der  $\Phi$ -Wert Analyse muß man jedoch auch hier festhalten, daß Übergangszustände, die sich durch Mutationen verschieben lassen, ebenfalls zu einer Veränderung der Steigung führen und somit nicht von parallelen Faltungswegen unterschieden werden können.

### 2.3.5.3. Die m-Wert Analyse.

Schon lange ist bekannt, daß sich die Löslichkeit einzelner Aminosäuren durch Zusätze wie GdmCl oder Harnstoff erhöhen läßt (Nozaki, 1963; Nozaki, 1970). Auch die Löslichkeit von Proteinen verhält sich ähnlich. Die damit verbundene Solubilisierung führt jedoch häufig zu einer Zerstörung der Proteinstruktur (Denaturierung). Dieser Übergang läßt sich nach einem Modell von Charles Tanford (Tanford, 1970) auch quantitativ ableiten. Berücksichtigt man die freie Überführungsenergie einzelner Aminosäuren oder Peptide, so ergibt sich nach Tanford ein linearer Zusammenhang zu der Stabilität des Proteins (Pace, 1986).

$$\Delta G_D = \Delta G_D^0 + \sum_i \alpha_i n_i \delta g_{tr,i}$$

$\delta g_{tr,i}$  beschreibt hierbei die freie Überführungsenergie der einzelnen Aminosäuren aus Wasser in eine andere Umgebung und  $n_i$  die Anzahl der Aminosäuren des Typs  $i$ . Dem Wert  $\alpha_i$  kommt in dieser Gleichung eine besondere Rolle zu.  $\alpha$  beschreibt die Änderung der durchschnittlichen Lösungsmittelzugänglichkeit der Aminosäure  $i$  beim Entfalten des Proteins. Die Konstante  $\Delta G_D^0$  entspricht der Stabilität des Proteins ( $\Delta G_D$ ) unter zusatzfreien Bedingungen. Nach dem Tanford-Modell ist also die Denaturierung auf eine verbesserte Löslichkeit der einzelnen Aminosäuren in Gegenwart von GdmCl oder Harnstoff zurückzuführen. Dieses Modell macht aber keine Aussagen darüber, was die Ursachen hierfür sein könnten. Nach John Schellmann (Schellmann, 1987) resultiert dieser Löslichkeitsanstieg aus einer spezifischen und selektiven Bindung von

Liganden (GdmCl oder Harnstoff) an unterschiedliche Bereiche des Proteins (Seitenketten und Peptidrückgrat). Die Denaturierung ist also nach diesem Modell eine Folge der höheren „Bindungskapazität“ entfalteter Proteine. In der Praxis verwendet man eine andere, empirisch-abgeleitete Gleichung, um die Stabilität von Proteinen zu bestimmen (*lineare Extrapolationsmethode*). Vergleicht man beide Ausdrücke miteinander, so erhält man für  $m_{N-D}$ :

$$\Delta G_{eq} = \Delta G_{eq}(H_2O) + m_{eq} [Denaturierungsmittel]$$

$$m_{eq} = \sum_i \alpha_i n_i \delta g_{mtr,i}$$

$\delta g_{mtr,i}$  beschreibt in dieser Gleichung die freie molare Überführungsenergie der einzelnen Aminosäuren von Wasser in einer 1 molaren Denaturierungslösung (Fersht, 1999). In dieser Beziehung definiert  $m_{eq}$  eine Steigung, die in Zusammenhang mit der Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit infolge Denaturierung steht. Ist die Struktur des untersuchten Proteins bekannt, läßt sich  $m_{N-D}$  theoretisch vorhersagen und mit experimentellen Daten vergleichen. Abweichungen beider Werte ( $m_{eq,theo.} > m_{eq,exp.}$ ) sind häufig eine Folge der unvollständigen Denaturierung eines Proteins (Tanford, 1970).

Auch für die beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_f$  und  $k_u$  existiert eine lineare Konzentrationsabhängigkeit vom Denaturierungsmittel. Die in dieser Gleichung vorkommenden Konstanten  $k_f(H_2O)$  und  $k_u(H_2O)$  definieren die Geschwindigkeit der jeweiligen Reaktion in Wasser.

$$\ln k_f = \ln k_f(H_2O) + m_f' [Denaturierungsmittel]$$

$$\ln k_u = \ln k_u(H_2O) + m_u' [Denaturierungsmittel]$$

Anhand der Gleichung  $k_{obs} = k_f + k_u$  lassen sich beide Ausdrücke zusammenfassen:

$$\ln k_{obs} = \ln \left( k_f(H_2O) \exp^{-m_f' [Denaturierungsmittel]} + k_u(H_2O) \exp^{-m_u' [Denaturierungsmittel]} \right)$$

Trägt man den natürlichen Logarithmus von  $k_{obs}$  gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel auf, erhält man ein sogenanntes „V-Schemata“ (*chevron plot*), das durch die zuvor definierte Gleichung beschrieben werden kann. Aus einem solchen *chevron plot* lassen sich sämtliche kinetischen Größen für die Faltung von Zwei-Zustands-Proteinen ableiten. Zahlreiche Proteine weisen jedoch gerade in den beiden Extrembereichen [Denaturierungsmittel]  $\gg$  [Denaturierungsmittel] $_{1/2}$  und [Denaturierungsmittel]  $\ll$  [Denaturierungsmittel] $_{1/2}$  Abweichungen von der Linearität (Abbildung 2-24) auf. In der Literatur werden unterschiedliche Ursachen für ein solches *rollover* Verhalten diskutiert. Intermediate, die sich unter nativen Bedingungen auf Faltungswegen (*on-pathway*) stabilisieren können, spielen vor allem im Bereich [Denaturierungsmittel]  $\ll$  [Denaturierungsmittel] $_{1/2}$  eine wichtige Rolle (Baldwin, 1996; Wildegger, 1997). Im Gegensatz dazu, werden im Bereich [Denaturierungsmittel]  $\gg$  [Denaturierungsmittel] $_{1/2}$  häufig Veränderungen (*transitionstate movement*) innerhalb der Übergangszustandspopulationen für dieses Verhalten verantwortlich gemacht.

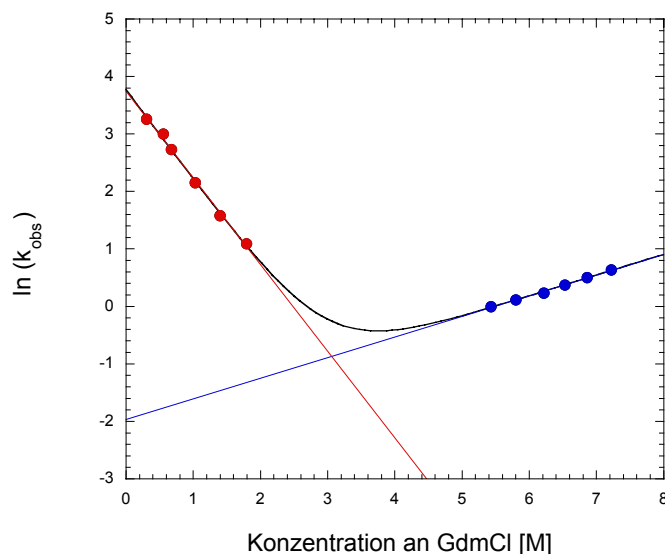


Abbildung 2-24 Darstellung eines „V-Schema’s“. Die schwarze Linie entspricht einer Anpassung der experimentellen Werte  $\bullet$  und  $\bullet$  an die Funktion  $\ln k_{obs} = \ln (k_f + k_u)$ . Die rote und die blaue Linie sind lineare Extrapolationen der Meßwerte  $\bullet$  über die Funktion  $\ln k_f = \ln k_f(\text{H}_2\text{O}) + m_f \cdot [\text{Denaturierungsmittel}]$  bzw.  $\bullet$  über die Funktion  $\ln k_u = \ln k_u(\text{H}_2\text{O}) + m_u \cdot [\text{Denaturierungsmittel}]$ .

Mit Hilfe der beiden Steigungen  $m_f'$  und  $m_u'$ , die beide Achsensteigungen im *chevron plot* definieren, kann man nun die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands berechnen. Hierzu werden zunächst die kinetisch definierten Größen  $k_f$ ,  $k_u$ ,  $m_f'$  und  $m_u'$  über die Eyring Gleichung (Eyring, 1935)

$$k = \frac{\kappa k_b T}{h} \exp(-\Delta G^{0\#} / RT)$$

in die Größen  $\Delta G_f^{0\#}$ ,  $\Delta G_u^{0\#}$ ,  $m_f$  und  $m_u$  umgewandelt.  $\kappa$  ist der sogenannte Transmissionsfaktor, der eine obere Grenze von 1 annehmen kann. In erster Näherung wird der vorexponentielle Faktor als Konstante angesehen, die sich durch Mutationen oder GdmCl nicht verändert. Aus diesem Grund werden  $\Delta G_f^{0\#}$  bzw.  $\Delta G_u^{0\#}$  auch häufig als *apparente* freie Aktivierungsenergie der Faltung bzw. Entfaltung bezeichnet. Die über die Eyring Gleichung erhaltenen Größen  $\Delta G_f^{0\#}$ ,  $\Delta G_u^{0\#}$ ,  $m_f$  und  $m_u$  stehen mit den aus Gleichgewichtsmessungen abgeleiteten Werten in einer einfachen Beziehung:

$$\Delta G_{eq}^0 = \Delta G_f^{0\#} - \Delta G_u^{0\#}$$

$$m_{eq} = m_f - m_u$$

Zur Berechnung der Zugänglichkeit definiert man aus den Steigungswerten eine neue Größe:

$$\alpha = \frac{m_f}{m_{eq}} = 1 + \frac{m_u}{m_{eq}} = \frac{\sum_i \alpha_{\#i} n_i \delta g_{tr,i}}{\sum_i \alpha_i n_i \delta g_{tr,i}}$$

Die erstmals von Tanford (Tanford, 1970) eingeführte dimensionslose Größe  $\alpha$  kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Entspricht die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands dem denaturierten Zustand D eines Proteins, so beträgt der  $\alpha$ -Wert 0 ( $\alpha_{\#i} = 0$ ). Entspricht die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands hingegen dem nativen Protein, beträgt der

$\alpha$ -Wert 1 ( $\alpha_{\#i} = \alpha_i$ ). Für zahlreiche Übergangszustände (TS) findet man  $\alpha$ -Werte zwischen 0 und 1.

<i>Protein</i>	<i>Klasse</i>	<i>Aminosäuren</i>	$\Delta G^\circ(H_2O)$ [kJ/mol]	$\alpha$	<i>Literatur</i>
$\lambda$ -Repressor	$\alpha$ -Helical	80	- 12.55 <sup>a)</sup>	0.39	(Huang, 1995)
Cytochrom C	$\alpha$ -Helical	104	- 28.89 <sup>b)</sup>	0.47	(Chen, 1997)
CspB	$\beta$ -barrel	67	- 12.55 <sup>c)</sup>	0.85	(Schindler, 1995)
CspA	$\beta$ -barrel	69	- 12.55 <sup>c)</sup>	0.94	(Reid, 1998)
Src	$\beta$ -barrel	64	- 17.15 <sup>d)</sup>	0.69	(Grantcharova, 1997)
CI2	$\alpha/\beta$ -Protein	64	- 29.28 <sup>c)</sup>	0.61	(Jackson, 1991)
U1A	$\alpha/\beta$ -Protein	102	- 38.91 <sup>c)</sup>	0.55	(Silow, 1997)

<sup>a)</sup> Messung bei 37°C; <sup>b)</sup> Messung bei 20°C; <sup>c)</sup> Messung bei 25°C und <sup>d)</sup> Messung bei 22°C

Tabelle 2-9 Vergleich der Lösungsmittelzugänglichkeit unterschiedlicher Übergangszustände anhand des  $\alpha$ -Wertes (Fersht, 1999).

$\alpha$ -Werte werden häufig auch als Reaktionskoordinate in Energieschema verwendet (Tanford, 1970). Manchmal können sich die Übergangszustände von Proteinen auch bei besonders hohen Konzentrationen an Denaturierungsmitteln verschieben. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn es sich um sehr breite und „flache“ Übergänge mit wenig ausgeprägten Minima handelt. Zur Veranschaulichung könnte ein solcher Übergang durch eine Breite  $\Delta\alpha$  definiert werden (Abbildung 2-25). Erhöht man die Konzentration an Denaturierungsmittel werden besonders solche Strukturen stabilisiert, die sich durch kleinere  $\alpha$ -Werte auszeichnen. Übergangszustände mit größeren  $\alpha$ -Werten werden durch die Erhöhung genau wie N ( $\alpha = 1$ ) destabilisiert. Dieser Effekt führt zu einer Verschiebung des Übergangszustands auf der Reaktionskoordinate um  $\Delta\alpha$ . Diese Verschiebung verursacht eine Erhöhung der Aktivierungsbarriere und eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante  $k_u$ . In einem V-Schema macht sich dieser Einfluß durch ein Abknicken (*rollover*) des Entfaltungssastes bei hohen GdmCl-Konzentrationen bemerkbar. Solche strukturellen Verschiebungen werden für das Verhalten der beiden Proteine CI2 (Oliveberg, 1998) und U1A (Silow, 1997) bei hohen GdmCl-Konzentrationen verantwortlich gemacht.



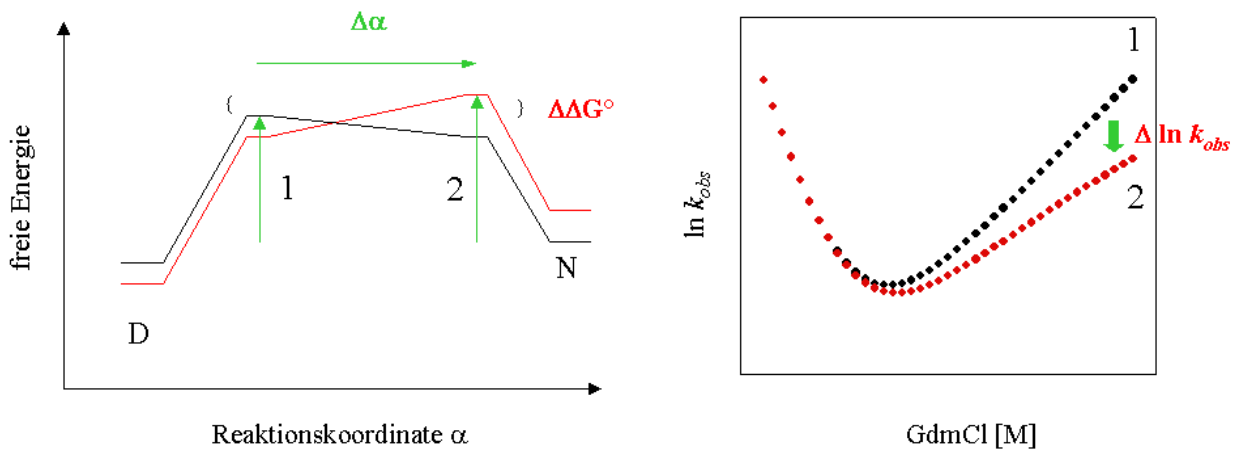
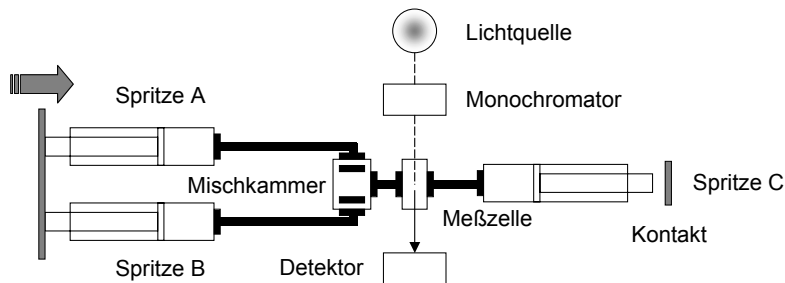


Abbildung 2-25 Verschiebung des Übergangszustands durch Einfluß von GdmCl. Links ist das Energieschema einer solchen Verschiebung (1 nach 2) dargestellt, rechts der passende *chevron plot* (● nach ●) dazu. Die Verlangsamung der Entfaltungsreaktion um  $\Delta \ln k_{obs}$  ( $k_f \ll k_u$ ) entspricht dabei einer Erhöhung der Aktivierungsbarriere um  $\Delta\Delta G^\circ$ .

In diesem Zusammenhang wird ein neuer Faltungsmechanismus diskutiert (*high-energy channeling*), bei dem die Suche nach nativen Kontakten innerhalb angeregter, isoenergetischer Zustände verläuft. Ein solcher Mechanismus hätte für die Geschwindigkeit der Proteinfaltung den Vorteil, daß durch Destabilisierung von Intermediaten keine Akkumulation stattfinden kann (Fersht, 1995).

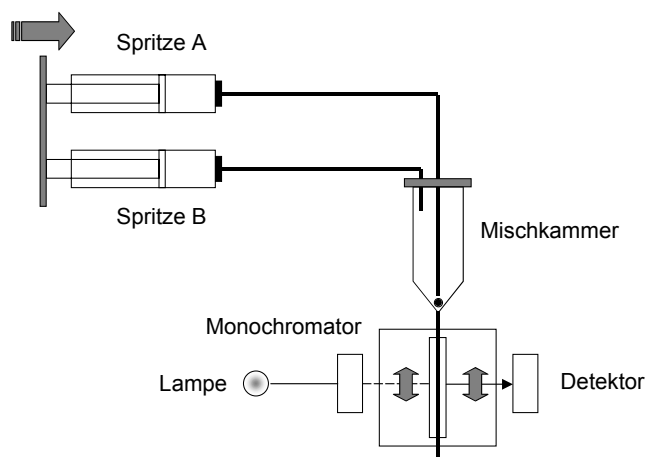
### 2.3.6. Zeitaufgelöste Techniken

Innerhalb einer Zelle schließt sich die Proteinfaltung der Translation an. Dieser Vorgang wird *in vitro* durch die schnelle Überführung des entfalteten Proteins in native Bedingungen erreicht. Der Rückfaltungsprozeß kann durch unterschiedliche Techniken induziert und spektroskopisch verfolgt werden. Bei der am meisten verbreiteten Mischtechnik wird das zunächst in denaturierenden Puffern entfaltete Protein mit einem Rückfaltungspuffer verdünnt. Für diesen Verdünnungsvorgang kommen heutzutage bevorzugt *stopped-flow* Mischkammersysteme zum Einsatz (Plaxco, 1996):



Hierbei werden die in zwei Kolben (Spritze A und B) befindlichen Lösungen nach Start in einer Kammer turbulent vermischt ( $>0.1\text{ms}$ ) und anschließend direkt durch einen Meßzellenkopf geleitet. Nach Durchsatz eines bestimmten Reaktionsvolumens wird in einem Auffangkolben über Druckkontakt das eigentliche Startsignal für die Messung ausgelöst. Die Messung erfolgt daher möglichst schockfrei bei unterbrochenem Fluß (*stopped-flow*). Die hierdurch erreichbaren Totzeiten liegen je nach Gerät im Bereich zwischen  $1\text{ms}$  bis  $5\text{ms}$ . Für die Faltung der meisten Proteine bedeutet dies eine hinreichend gute Zeitauflösung. Manchmal werden jedoch kinetische Phasen (*burst-phase*) unter diesen Bedingungen nur unvollständig erfaßt, was sich durch das Fehlen von Amplitudensignalen gegenüber den Referenzamplituden (Gleichgewichtsmessungen) bemerkbar macht.

Deutlich bessere Zeitaufösungen zeigen heutzutage moderne, kontinuierlich arbeitende Mischkammersysteme (*continuous-flow*). Ein wesentlicher Nachteil dieser Meßtechnik lag bisher in dem hohen Proteinbedarf. Durch die Miniaturisierung dieser Mischsysteme auf Kapillardurchmesser ( $200\mu\text{m}$ ) und hohe Flußraten ( $10\text{-}100\text{ms}^{-1}$ ) bei kürzeren Weglängen entlang der Flußzelle ( $0.25\text{mm}$ ) können mittlerweile selbst kleine Proteinmengen ( $1\text{mg}$ ) ausreichend gut vermessen werden (Shastry, 1998). Die Mischung beider Reaktionslösungen wird innerhalb einer konisch zulaufenden Mischkammer von einer versetzt angebrachten Platinkugel ( $\text{Ø} = 200\mu\text{m}$ ) übernommen. Das bei traditionellen Mischkammersystemen vorhandene Totvolumen entfällt. Bei konstanten Flußraten können mit Hilfe solcher Kapillarmischer Totzeiten von bis zu  $10\mu\text{s}$  erreicht werden:



Neben diesen auf Mischung basierenden Techniken gibt es auch Möglichkeiten unter konstanten Lösungsmittelbedingungen zu arbeiten. Durch lichtinduzierten Elektronentransfer gelang es beispielsweise, durch Oxidation entfaltetes Cytochrom C rückzufalten (Pascher, 1996). Die bei photochemischer Reduktion erzielten Totzeiten liegen unterhalb  $1\mu\text{s}$ . Eine andere Möglichkeit, die Rückfaltung von Proteinen extrem schnell zu induzieren, liegt in der Aufheizung (*T-jump*) der Probe (Nölting, 1995; Ballew, 1996).

<i>Method</i>	<i>Intervall</i>	<i>Auflösung</i>
Mischung	$10\mu\text{s}-\infty$	Atomar <sup>1)</sup>
LASER <i>T-jump</i>	1ns-100ms	Aminosäure spezifisch <sup>2)</sup>
Ladungsinduzierter <i>T-jump</i>	100ns-10s	Aminosäure spezifisch <sup>2)</sup>
Elektronentransfer	$1\mu\text{s}-1\text{ms}$	Aminosäure spezifisch <sup>2)</sup>
Drucksprung	$60\mu\text{s}-1\text{s}$	Aminosäure spezifisch <sup>2)</sup>
NMR-Linienverbreiterung	$100\mu\text{s}-100\text{ms}$	Atomar

<sup>1)</sup> In Verbindung mit H-D Austausch und NMR; <sup>2)</sup> Durch ortsspezifische Mutagenese (*Protein engineering*).

Tabelle 2-10 Auflösung unterschiedlicher Techniken zur Untersuchung von Faltungskinetiken.

Bei Proteinen zeigt die Temperaturabhängigkeit der freien Enthalpie  $\Delta G(T)$  einen glockenförmigen Verlauf. Entsprechend gibt es bei manchen Proteinen die Möglichkeit, neben der wärmeinduzierten auch eine kälteinduzierte Denaturierung durchzuführen. Eine solche Lösung kann mit Hilfe einer Kondensatorentladung aufgeheizt werden, wobei die Rückfaltung

des entfalten Proteins augenblicklich einsetzt. Je nach eingesetzter Technik entstehen Totzeiten zwischen 20ns (Ballew, 1996) bis 10 $\mu$ s (Nölting, 1995). Diese Zeitauflösung reicht aus, um Elementarprozesse der Proteinfaltung spektroskopisch verfolgen zu können.

## 2.4. Spektroskopie

### 2.4.1. CD-Spektroskopie

Die optische Rotationsdispersion (ORD) und der Circular dichroismus (CD) sind spezielle Arten der Absorptionsspektroskopie im UV/VIS-Bereich (Woody, 1995). Grundlage beider Methoden ist die Wechselwirkung linear polarisierten Lichts mit optisch aktiven Verbindungen, die geeignete Chromophore enthalten. Wird eine linear polarisierte Lichtwelle bei der Wechselwirkung mit dem Chromophor wellenlängenabhängig in ihrer Polarisationsrichtung gedreht, spricht man von optischer Rotationsdispersion. Werden die beiden circular polarisierten Komponenten der linear polarisierten Lichtwelle beim Durchgang durch die Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge unterschiedlich stark absorbiert, spricht man vom Circular dichroismus.

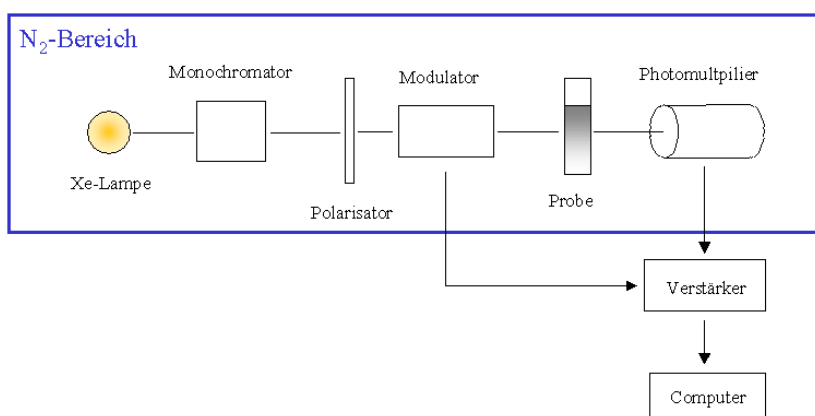


Abbildung 2-26 Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers.

Ausschlaggebend für die optische Rotationsdispersion ist die Tatsache, daß sich die Lichtgeschwindigkeit ( $c$ ) links- bzw. rechtspolarisierten Lichts in einer optisch aktiven Substanz voneinander unterscheidet ( $c_L \neq c_R$ ). Die hervorgerufene Phasenverzögerung bewirkt beim

Wiederaustritt aus der Probe die Drehung der Polarisationssebene. Beim Circulardichroismus wird gleichzeitig eine der beiden Komponenten an der Probe unterschiedlich absorbiert ( $A_L \neq A_R$ ). Am Ende ergänzen sich beide Komponenten zu elliptisch polarisiertem Licht. Bei der Aufnahme eines CD-Spektrums wird abwechselnd die Absorption links bzw. rechts circular polarisierten Lichts in Abhängigkeit von der Frequenz gemessen. Die Erzeugung des dafür benötigten linear polarisierten Lichts erfolgt mit Hilfe eines Polarisators (*Nicol'sches Prisma*). Das linear polarisierte Licht trifft anschließend auf einen photoelastischen Modulator (Phasenschieber), der abwechselnd (kHz) die Phasenlage beider Komponenten um  $\pm \lambda/4$  gegeneinander verschiebt und so links- bzw. rechts circularpolarisiertes Licht erzeugt. Über einen Photomultiplier wird das Transmissionslicht (I) detektiert und anschließend aufgezeichnet. Das CD-Signal ergibt sich als Differenzsignal der Absorption ( $\Delta A = A_L - A_R$ ) nach Lambert-Beer (vgl. Methoden). Der gesamte optische Bereich im CD-Spektrometer wird während der Messung mit Stickstoff durchspült, um die Lampe zu kühlen (800W Xe-Lampe) und entstandenes Ozon zu beseitigen, das ansonsten die Spiegeloptik zerstören würde.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die Konformation von Proteinen statisch (Gleichgewicht) und dynamisch (Kinetik) näher untersucht werden (Shirley, 1995).

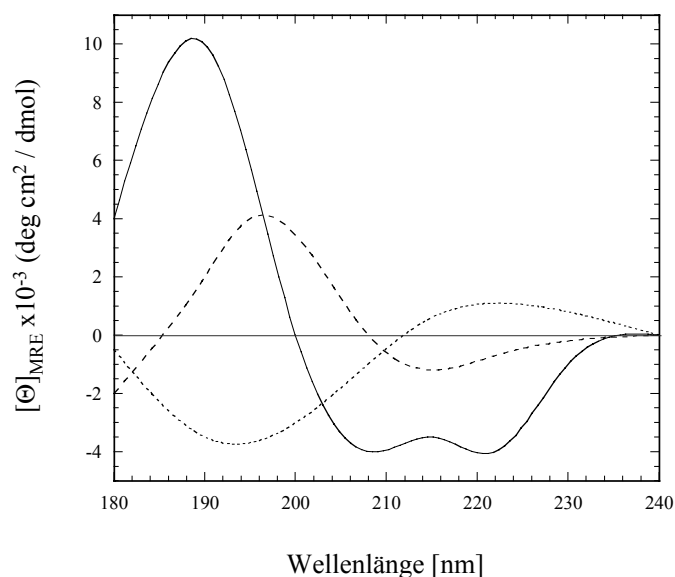


Abbildung 2-27 CD-Spektren des poly-(L-Lysins) in  $\alpha$ -Helix (durchgehend),  $\beta$ -Faltblatt (gestrichelt) und Zufalls-Knäuel (gepunktet) Konformation (Creighton, 1993).

Als Chromophore kommen dabei insbesondere die Peptid-Bindungen des Proteinrückgrats sowie die Seitenketten der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in Frage. Alle Sekundärstrukturen unterscheiden sich durch ihre charakteristischen Bandenprofile im fern-UV Bereich (250nm-180nm) des CD-Spektrums. Die in diesem Bereich am deutlichsten auftretende  $\alpha$ -Helix weist zwei Minima (208nm und 222nm) mit vergleichbarer Intensität sowie eine stärker-positive Bande nahe 190nm auf.  $\beta$ -Faltblatt Strukturen haben gegenüber  $\alpha$ -Helices schwächer ausgeprägte Absorptionen.

<i>Sekundärstruktur</i>	<i>Absorption</i> <sup>1)</sup>
$\alpha$ -Helix	208nm (-), 222nm (-) und 190nm (+)
$\beta$ -Faltblatt	217nm (-), 180nm (-) und 195nm (+)
$\beta$ -Turn (Klasse B)	220nm-230nm (-) und 200nm-210nm (+)
$\beta$ -Turn (Klasse C)	208nm (-), 222nm (-) und 190nm (+)
<i>Random coil</i>	200nm (-) und 220nm (+/-)

<sup>1)</sup> Die Vorzeichen in Klammern charakterisieren den Cotton-Effekt, der sich aus der Wellenlängenabhängigkeit der Absorption ergibt.

Tabelle 2-11 Charakteristische Absorptionsbereiche von Sekundärstrukturelementen in der CD-Spektroskopie (Creighton, 1993).

Im Bereich um 217nm und 180nm befinden sich zwei ähnlich starke negative Banden, die eine dominant-positive Bande bei 195nm flankieren. Anders als bei den  $\alpha$ -Helices ist das CD-Spektrum eines  $\beta$ -Faltblatts wenig einheitlich. Dieser Sachverhalt ist zum Teil darauf zurückzuführen, daß  $\beta$ -Faltblätter sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein können (parallel/antiparallel sowie inter-/intramolekular) und selten linearen Verlauf zeigen.  $\beta$ -Turn Strukturen lassen sich ebenfalls in kleinen Peptiden gut zuordnen (Brahms, 1980), liegen jedoch im CD-Spektrum zumeist unterhalb der  $\beta$ -Faltblatt (Klasse B) bzw.  $\alpha$ -Helix (Klasse C) Banden. Ungeordnete Strukturen (*random coil*) zeigen sich im CD-Spektrum durch eine ausgeprägte negative Bande bei etwa 200nm. Die CD-Spektren von Proteinen können von den oben dargestellten poly-(L-Lysin) Spektren erheblich abweichen. Sind aufgrund der Röntgenstrukturanalyse die Sekundärstrukturanteile von Proteinen bekannt, lassen sich nach Vergleich unterschiedlicher Proteine sekundärstrukturspezifische CD-Spektren unter nativen Bedingungen ableiten (Chen, 1972).

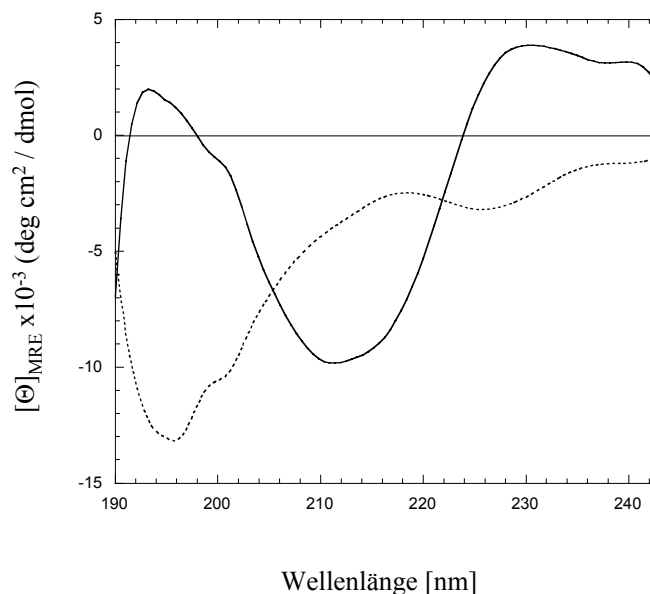


Abbildung 2-28 Abgebildet sind die aus 5 unterschiedlichen Proteinen über die Gleichung  $X(\lambda) = f_{\alpha}X_{\alpha} + f_{\beta}X_{\beta} + f_rX_r$  herausgerechneten  $\beta$ -Faltblatt (durchgezogen) bzw. *random-coil* Anteile (gestrichelt) nach Chen (Chen, 1972). Wie man deutlich erkennen kann unterscheiden sich die *random coil* CD-Anteile bei Proteinen von Aminosäurepolymeren.

$\beta$ -Falblattstrukturen zeigen demnach in Proteinen eine positive Elliptizitätsbande bei 230nm, die bis auf 212nm kontinuierlich abnimmt. Die positive Bande um 195nm ist hier deutlich schwächer ausgeprägt als in poly-(L-Lysin). poly-(L-Lysin) weist darüberhinaus in der *random-coil* Konformation eine positive Elliptizitätsbande um 220nm auf. Der *random-coil* Anteil von nativen Proteine enthält hingegen um 220nm eine negative Absorptionsschulter, an die sich eine negative Absorptionsbande um 195nm anschließt (Chen, 1972).

Durch die Möglichkeit Sekundärstrukturen (fern-UV) sowie die lokale Umgebung einzelner Chromophore (nah-UV) nachzuweisen, wird auch in der Proteinfaltung vermehrt auf die CD-Spektroskopie zurückgegriffen. 1976 gelang Kuwajima als erster der direkte Nachweis eines Intermediats beim  $\alpha$ -Lactalbumin, das später als „*molten globule*“ bezeichnet wurde (Ptitsyn, 1987). Nach Erniedrigung des pH-Wertes auf 2.0 konnte beim  $\alpha$ -Lactalbumin das Verschwinden der nah-UV Signale (charakteristisch für Chromophore im Inneren des Proteins) beobachtet werden, wohingegen die fern-UV Banden (Sekundärstrukturen) nahezu konstant blieben. Auf

Grundlage dieser Daten ließ sich ein Modell ableiten (Dolgikh, 1985), bei dem zwar die Sekundärstrukturen dem Nativzustand des Proteins entsprechen, stabile Seitenkettenkontakte jedoch so gut wie nicht ausgebildet werden (zerschmolzen: *molten*).

## 2.4.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie gehört zu den am meisten verwendeten Nachweisverfahren zur Untersuchung von Konformationsumwandlungen bei Proteinen (Eftink, 1994; Eftink, 1997).

<i>Aminosäure</i>	<i>Absorption</i>		<i>Fluoreszenz</i>	
	$\lambda_{\text{MAX}}$	$\epsilon$	$\lambda_{\text{MAX}}$	$\Phi_{\text{F}}^{1)}$
Tryptophan	280nm	5600 [l/mol•cm]	348nm	0.2
Tyrosin	274nm	1400 [l/mol•cm]	303nm	0.14
Phenylalanin	257nm	200 [l/mol•cm]	282nm	0.04

<sup>1)</sup> $\Phi_{\text{F}}$  ist die Quantenausbeute, definiert über  $\Phi_{\text{F}} = (\text{Anzahl emittierter Photonen})/(\text{Anzahl absorbiertes Photonen})$ .

Tabelle 2-12 Charakteristische Absorptions- und Emissionsbanden in der Fluoreszenzspektroskopie.

Im Gegensatz zu anderen Techniken werden für die Fluoreszenzmessungen sehr geringe Proteinkonzentrationen benötigt (<1 $\mu$ M). Hierdurch reduzieren sich konzentrationsbedingte Nebenreaktionen (Aggregation), die kinetische Messungen zusätzlich komplizieren. Die am häufigsten verwendeten Fluorophore sind das *intrinsische* Tryptophan und Tyrosin. Tryptophan weist wegen seines hohen Extinktionskoeffizienten (280nm:  $5.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gegenüber Tyrosin (274nm:  $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) eine etwa fünfmal so hohe Fluoreszenz auf. In Proteinen können Tryptophan-Reste selektiv bei Wellenlängen oberhalb von 295nm angeregt werden. Durch Resonanzkopplung mit räumlich benachbarten Tyrosinen erfolgt die Fluoreszenzemission aber auch bei Wellenlängen deutlich unterhalb der Hauptabsorptionsbande (280nm). Dieser Energietransfer kann dabei sowohl strahlungslos als auch durch Reabsorption erfolgen. Von den drei Chromophoren eignet sich das Tryptophan als „natürlicher“ Marker besonders gut. Neben den physikalischen Eigenschaften trägt auch seine relative Häufigkeit von 1.3% einiges dazu bei (McCaldon, 1988). Dadurch gelingt es häufig, die beobachteten Fluoreszenzänderungen spezifisch mit räumlichen Veränderungen des Chromophors in Verbindung zu bringen.



*Extrinsische* Fluorophore, wie beispielsweise das Fluoreszein, lassen sich ebenfalls durch kovalente Verknüpfung an freie Cysteine oder Lysine am Protein anbringen. Auch die Verwendung fluoreszierender, nicht-kovalent gebundener Farbstoffe ist verbreitet. Der häufig in der Proteinfaltung verwendete hydrophobe Farbstoff ANS (8-Anilino-1-naphthalensulphonsäure) gehört beispielsweise dazu. Durch die Bindung von ANS an exponierte hydrophobe Oberflächen steigt die Eigenfluoreszenz des Farbstoffs merklich an (Goto, 1979). Diese Eigenschaft wird dazu benutzt, um die Bildung hydrophober Wechselwirkungen (Seitenkettenkontakte) im Inneren von Proteinen besser verfolgen zu können. Bei der Rückfaltung von Proteinen kommt es daher häufig zum sprunghaften Anstieg der ANS-Fluoreszenz, die jedoch nach allmählicher Konsolidierung der nativen Struktur wieder verschwindet (Semisotnov, 1987).

Das Emissionsmaximum, die Quantenausbeute und die Halbwertszeit des emittierten Lichts sind stark von der lokalen Umgebung des angeregten Fluorophors abhängig (Abbildung 2-29). Die daraus resultierenden Veränderungen im Spektrum betreffen sowohl die Lage als auch die Intensität der beobachteten Emissionsbanden. In der Regel kommt es bei der Entfaltung von Proteinen zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums ( $\lambda_{MAX}$ ) von 308nm-350nm (nativ) auf 345nm-360nm (entfaltet).

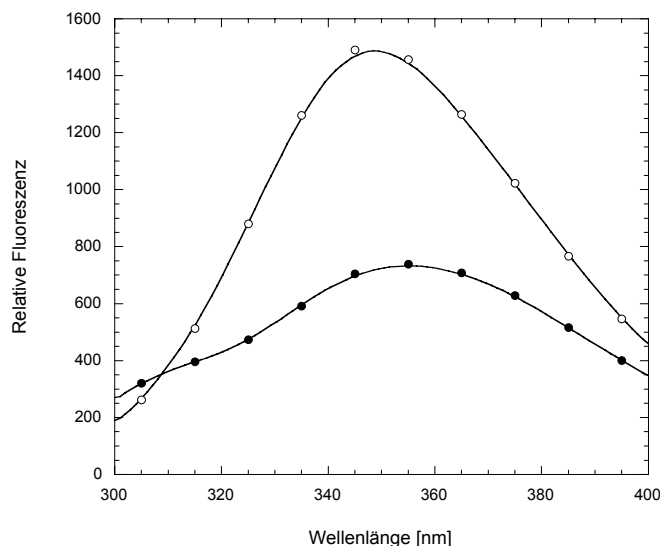


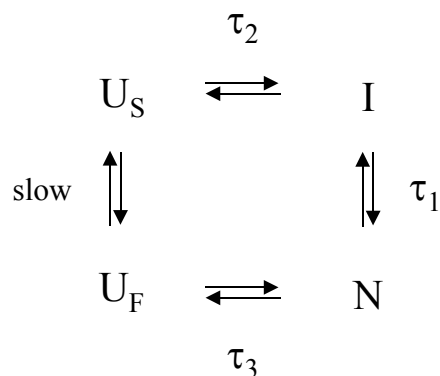
Abbildung 2-29 Dargestellt ist die Emission von Tendamistat (0.033mg/ml) im nativen (○) sowie entfaltetem (●) Zustand in 8M Guanidinium-Hydrochlorid (100mM Cacodylatpuffer pH7.0). Dabei kommt es deutlich zu einer Intensitätsabnahme infolge der Entfaltung des Proteins. Ebenfalls verschiebt sich das Emissionsmaximum von 348nm (nativ) auf 355nm (denaturiert).

---

Zusätzlich dazu verringert sich die Intensität der Tryptophan-Fluoreszenz bei thermischer Denaturierung, da vermehrt Kollisionen mit Lösungsmittelmolekülen stattfinden (Quenching). Bei isothermer Denaturierung, hervorgerufen durch den Zusatz chaotroper Salze (GdmCl, Harnstoff), läßt sich die Veränderung der Intensität dagegen nur schwer vorhersagen. Eine weitere Meßgröße in der Fluoreszenzspektroskopie stellt die optische Polarisation dar (Holtzhauer, 1996). Aus der Analyse der Fluoreszenz-Polarisation können Aussagen über die Orientierung und die Bewegung (Rotationsdiffusion) eines Fluorophors abgeleitet werden. Die Messung intramolekularer Abstände läßt sich ebenfalls mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie durchführen. Befindet sich in der Nähe eines Fluorophors ein geeigneter Akzeptor, kann Energie auf diesen übertragen werden (Förster-Transfer). Dieser Transfer setzt dabei eine Überlagerung von Donoremmission und Akzeptorabsorption voraus. Die Energieübertragung, z.B. auf einen zweiten Fluorophor, kann über eine Entfernung von maximal 8nm-10nm erfolgen und nimmt mit der sechsten Potenz der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor ab. Allen Messungen ist gemeinsam, daß sie Informationen über die Umgebung des Fluorophors vermitteln und dadurch räumliche Verhältnisse im Protein aufklären (Tertiärstruktur) helfen.

### 3. Aufgabenstellung

Die bisherigen Untersuchungen am Tendamistat (Haas-Lauterbach, 1993; Scharf, 1994) bezogen sich vornehmlich auf die Faltung des Wildtypproteins (Schönbrunner, 1997a; Schönbrunner, 1997b) sowie den Einfluß der beiden Disulfidbrücken auf die Stabilität und die Struktur des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors (Renner, 1992; Vogel, 1995; Balbach, 1998). Bereits aus den ersten kinetischen Experimenten ging hervor, daß mindestens eines der drei Proline nach Entfaltung des Proteins an einer Prolinomerisierung beteiligt sein muß (Schönbrunner, 1997a). Die dadurch hervorgerufene Heterogenität entfalteter Moleküle ( $U_F$ : schnell rückfaltende und  $U_S$ : langsam rückfaltende Spezies) führt unter nativen Bedingungen zu einer dreiphasigen Rückfaltungskinetik. Überträgt man diese und weitere Ergebnisse in ein Gleichgewichtsschema, läßt sich die Faltung des Tendamistats als Vier-Zustands-Modell wiedergeben:



Der Hauptfaltungsweg von Tendamistat wird bestimmt von Molekülen, die im entfalteten Zustand des Proteins *trans* Xaa-Pro Bindungen aufweisen ( $U_F \rightarrow N$ ). Etwa 20% aller Moleküle gelangen über einen Nebenfaltungsweg ( $U_S \rightarrow I$ ) zu einem Intermediat (I) und können erst nach entsprechender Isomerisierung (*cis* Xaa-Pro  $\rightarrow$  *trans* Xaa-Pro) in den nativen Zustand (N) übergehen. Für weitere Untersuchungen war es daher wichtig herauszufinden, welche der drei vorhandenen Proline (P7, P9 oder P50) für den Nebenfaltungsweg verantwortlich ist. Im *ersten Teil* dieser Arbeit sollten daher unterschiedliche Prolinmutanten durch Mutagenese aufgebaut und kinetisch charakterisiert werden. Hiezu war die Etablierung eines neuen Mutageneseverfahrens von besonderer Wichtigkeit.

Im *zweiten Teil* dieser Arbeit sollten durch gezielte Mutagenese bestimmte Bereiche des Tendamistat verändert und die Auswirkungen einer solchen Veränderung auf Faltung und Stabilität untersucht werden. Wie in der Einleitung thematisch beschrieben, sollten diese Mutanten dazu genutzt werden, um Aussagen über den Aufbau und die Lage des Übergangszustands abzuleiten. Manche einzuführenden Mutationen sollten sich auch auf besondere Teilaspekte der  $\beta$ -barrel Struktur von Tendamistat konzentrieren. Hierzu gehört im Besonderen der Einfluß hydrophober Oberflächenclustern (*small exterior hydrophobic cluster*) und Asparagin-Umkehrschleifen (*asparagin corner*) auf Stabilität und Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors:

- Anhand zahlreicher Strukturdaten konnte bereits gezeigt werden, daß es sich bei hydrophoben Oberflächenclustern allgemein um kompakte Einheiten mit einem hohen Nahordnungsgrad handelt (Tisi, 1995). Ihrem Aufbau liegt dabei immer das gleiche, zentrosymmetrische Prinzip zugrunde: Eine zentrale hydrophobe Aminosäure wird von 5 bis 6 amphipatisch aufgebauten Aminosäuren umgeben. Auch beim Tendamistat existiert ein solcher Cluster um die Position 36. Ein gezielter Austausch von Valin 36 gegen andere Aminosäuren sollte den Einfluß und die Rolle solcher Elemente innerhalb des Tendamistats bestimmen helfen.
- Wie Arbeiten von Hemmingsen (Hemmingsen, 1994) zeigen konnten, befinden sich bestimmte, hochkonservierte Aminosäuren (Tyr und Asn) innerhalb besonderer Umkehrschleifen in  $\beta$ -barrel Proteinen (*tyrosin corner*). Auch Tendamistat besitzt eine solche Umkehrschleife, die an Position 25 ein hoch konserviertes Asparagin enthält (*asparagine corner*). Durch unterschiedliche Experimente galt es herauszufinden, welchen Einfluß ein solcher Austausch auf die Stabilität und die Faltung des Tendamistats ausübt.

Im *dritten Teil* der Arbeit sollten diese und weitere Tendamistat Mutanten dazu genutzt werden, um beispielsweise über die Methode der  $\Phi$ -Wert Analyse eine Aussage über den strukturellen Aufbau des Übergangszustands abzuleiten. Letztendlich sollte eine solche Untersuchungen dazu beitragen festzustellen, nach welchem Faltungsmodell (z.B. Nukleations-Kondensationsmodell) Tendamistat in der Lage ist seine native Konformation auszubilden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Aufbau und Charakterisierung der Prolinmutanten.

#### 4.1.1. PCR-Mutagenese

Über das Primer Mutagenese-Verfahren von Higuchi (Higuchi, 1988) konnten bereits zahlreiche Positionen im Tendamistat gezielt verändert werden (Aygün, 1995).

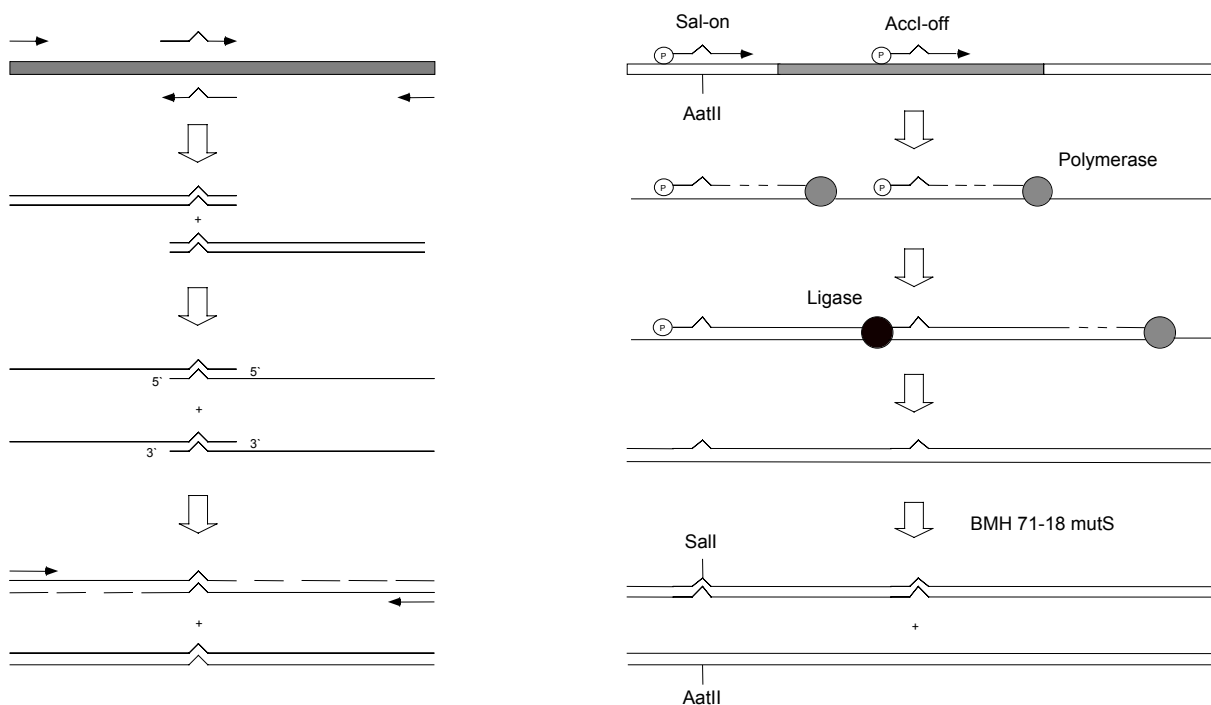


Abbildung 4-1 Links: Mutagenese Verfahren nach Higuchi (Higuchi, 1988); Rechts: Mutagenese Verfahren nach Deng (Deng, 1992). Eine kurze Beschreibung der beiden Verfahren läßt sich im Text und in der angegebenen Literatur finden.

Gegenüber dem älteren Verfahren von Kramer (Kramer, 1984) zeichnet sich die PCR-Methode durch eine größere Zeitersparnis, da die Mutationen ohne Subklonierung in M13 aufgebaut werden können. Gemeinsam ist beiden Verfahren die Verwendung synthetischer Oligonukleotide zur Einführung der Mutation über eine Heteroduplex-DNA. Der Ablauf einer PCR-vermittelten Mutagenese kann nach dem Higuchi-Verfahren in drei Stufen (Abb.) unterteilt werden. Stufe 1

läuft wie zwei getrennte Standard-PCR Amplifikationen (primäre PCR) ab. Verwendet werden dabei insgesamt vier Oligonukleotide, von denen zwei die Randbereiche des zu verändernden Abschnittes flankieren. Sollen neue Restriktionsschnittstellen erzeugt werden, können die Außenprimer nicht-komplementäre Sequenzen an ihren 5'-Enden tragen, die nach der PCR als terminale Schnittstellen zur Verfügung stehen. Die eigentliche Mutation wird über zwei, im Genabschnitt bindende Primer, eingeführt. Ihre Länge sollte dafür mindestens 20bp betragen und die zu erzielende Mutation in der Mitte enthalten. Beide mutagene Primer setzt man getrennt mit den jeweiligen Außenprimern (3'-Außenprimer mit 5'-Mutationsprimer und umgekehrt) ein.

Die gereinigten Hauptamplifikate werden in der zweiten Stufe im Verhältniss 1:1 zusammengebracht und denaturiert. Schnelles Abkühlen des Gemisches liefert zwei neue, an den mutagenen Primern sich anlagernde Annealing-Produkte (Reannealing), von denen eines verkürzte 5'-Enden und das andere dementsprechende 3'-Enden besitzt. Nach Zusatz der Taq-DNA Polymerase kann lediglich das Produkt mit den 3'-Enden aufgefüllt werden. Diesen Vorgang läßt man weitere 2-3 PCR-Zyklen durchlaufen, um genügend Templat bereitzustellen. Die am Ende erfolgende Zugabe der Außenprimer führt zu einer kompletten Reamplifikation (sekundäre PCR) des vollständig mutierten Genes (Stufe 3).

Dieses Verfahren weist jedoch verschiedene Nachteile auf, die weitere Arbeiten berücksichtigt werden mußten. Neben der umständlichen Isolierung der Teilamplifikate, waren es vor allem die unspezifischen Mutationen, die einer Anwendung im Wege standen. Innerhalb der 893 sequenzierten Basen wurden insgesamt 6 Mutationen ermittelt, was bei 57 Zyklen einer mittleren Mutationsrate von  $2.35 \times 10^{-4}$  entspricht.

#### 4.1.1.1. USE-Mutagenese

Die USE-Mutagenese (*unique site elimination*) ist ebenfalls eine Strategie zur Einführung von Punktmutationen in Gene, die sich innerhalb von Plasmiden befinden (Deng, 1992; Ray, 1992; Wong, 1995). Das Verfahren nutzt dabei zwei 5' phosphorylierte Primer, die simultan auf ein vorher thermisch denaturiertes Plasmid hybridisiert werden. Einer der beiden Primer ist dabei so gewählt, daß er durch 1-2 Punktmutationen eine singuläre Schnittstelle im Plasmid gegen eine andere singuläre Schnittstelle ersetzt. Welche Schnittstellen dabei in Plasmiden verwendet werden können, ist in der Originalarbeit von Deng (Deng, 1992) beschrieben. Über den zweiten Primer wird die einzuführende Mutation in das Gen eingebracht. Beide Primer dienen nach

Hybridisierung als Startsequenz für die enzymatische Vervollständigung des zweiten Stranges, das am Ende durch eine Ligase kovalent geschlossen wird. Das dadurch entstandene Heteroduplex-Plasmid wird enzymatisch verdaut und anschließend in *E. coli* BMH71-18 mutS Zellen (Zell, 1987) transformiert. Nach Isolierung der plasmidischen DNA werden erneut sämtliche Plasmide enzymatisch linearisiert, deren Schnittstelle nicht durch den Mutationsprimer verändert werden konnten. Dieser Restriktionsansatz wird erneut in *E. coli* Zellen transformiert und nach Vereinzeln der Klone sequenziert.

<i>Mutagenese Primer</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
Sall-on	GTGCCACCTGTCGACTAAGAAACC
AccI-off	CGTGAAGGTCGCCTACGAGGACGACAC

Tabelle 4-1 Bei der USE-Mutagenese verwendete Primer (Wong, 1995).

Dieses Verfahren wurde nach Modifizierung (Wong, 1995) eingesetzt, um zunächst eine Testmutation (AccI-off) in das Tendamistat Gen einzuführen. 100pmol Primer (15µl) wurden zunächst mit 2µl 10xKinasierungspuffer (NEB, 1996) und 2µl 1mM ATP versetzt und 5min auf 75°C erhitzt. Nach kurzem Abschrecken auf Eis wurde 1µl T4-Polynukleotid Kinase zugesetzt und der gesamte Kinasierungsansatz 2 Stunden bei 37°C belassen. Die Deaktivierung des Enzyms erfolgte im Anschluß daran durch kurzes Erhitzen auf 69°C. Entsprechend dieser Vorschrift wurde die Kinasierung der beiden Primer AccI-off und Sall-on durchgeführt (Tabelle 4-1). Für die anschließende Hybridisierung wurde in einem verschraubbaren Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf-Cap) 100ng pT136 (Abbildung 4-2) mit jeweils 25pmol der beiden Primer 5min auf 100°C in Hybridisierungspuffer (20mM Tris-Acetat, 20mM Mg(OAc)<sub>2</sub> und 100mM KOAc pH7.5) erhitzt und auf 0°C abgeschreckt. Anschließend erfolgte eine Temperierung der Mischung für 30min auf 25°C. 20µl dieses Hybridisierungsansatzes wurden anschließend auf Eis mit 1µl dNTP-Mix (6mM/dNTP), 4µl 10xTaq Ligase Puffer (NEB, 1996), 4µl 10xVent-Polymerase Puffer, 3.5µl Vent-Polymerase, 0.5µl Taq-Ligase und 7µl dest. Wasser versetzt und 1 Stunde bei 55°C belassen.

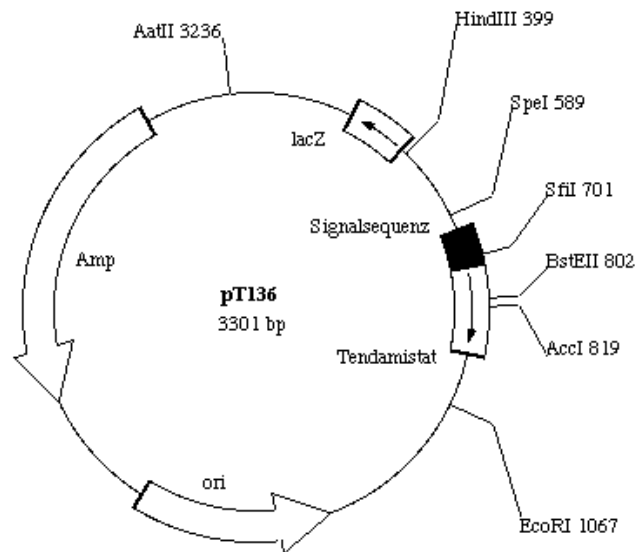


Abbildung 4-2 Der Klonierungs- und Sequenzierungsvektor pT136.

Der vollständige Ansatz wurde zur Abtrennung nicht-mutagenisierter Plasmide 3 Stunden mit 10U AatII bei 37°C in Restriktionspuffer (NEB, 1996) behandelt und anschließend in kompetente BMH71-18 mutS Zellen transformiert. Nach 18 Stunden Inkubation in S.O.C. Medium (Ampicillin) konnte aus dieser Kultur Plasmid isoliert werden, daß danach vollständig mit 20U AatII über 4 Stunden bei 37°C verdaut wurde. Der gesamte Restriktionsansatz wurde anschließend in kompetente DH5α Zellen transformiert und auf LB-Platten (Ampicillin) ausplattiert (Mutageneseplatte). Als zusätzliche Kontrolle dienten zwei Transformationsansätze mit (10ng) und ohne Plasmid pT136. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte von 10 untersuchten Klonen kein einziger positiver Klone erhalten werden. Sowohl die AccI als auch die AatII Schnittstelle war in sämtlichen Plasmiden wie beim Wildtyp vorhanden. Hätte einer der beiden Primer an das Plasmid hybridisieren und verlängert werden können, wäre die entsprechende Schnittstelle nicht mehr vorhanden bzw. beim Sall-on Primer durch Sall ersetzt gewesen. Auffallend war, daß auf der Mutageneseplatte nur sehr wenige Klone ausgezählt werden konnten (20 Klone). Die Transformation in kompetente BMH71-18 mutS wurde erneut, diesmal mit geschlossenem Plasmid wiederholt. Im Gegensatz zu kompetenten DH5α Zellen waren auf dieser Transformationsplatte nur etwa 12 Klone zu finden. Das entsprach einer um etwa den Faktor 100-200 schlechteren Transformationsrate der Zellen. Um die BMH71-18 mutS Zellen in kompetente Zellen umzuwandeln, wurde die klassische CaCl<sub>2</sub>-Methode verwendet (Faß, 1994). Alternativ dazu wurde ein anderes Verfahren zur Herstellung kompetenter *E. coli*



Zellen eingesetzt. Dazu wurde 5ml LB-Medium (ohne Ampicillin) mit einem BMH71-18 mutS Glycerin Back-up angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 500µl aus dieser gut gewachsenen Kultur wurden dazu benutzt 50ml auf 37°C vortemperiertes LB-Medium im Schüttler anzuimpfen. Die Kontrolle des Zellwachstums erfolgte anschließend in regelmäßigen Abständen am Spektrometer, bis die Zelldichte einen Wert von  $OD_{600} = 0.3$  bis 0.4 erreicht hatte. Danach wurden die Zellen in SS-34 Röhrchen bei 1000rpm pelletiert und in 5ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. Nach weiteren 15 Minuten auf Eis konnten die kompetenten BMH71-18 mutS Zellen dazu benutzt werden um eine Testtransformation mit pT136 durchzuführen. Diesmal fiel die Transformationsausbeute deutlich besser aus, war jedoch gegenüber DH5α Zellen, die als Referenz mit der gleichen Methode hergestellt wurden, erneut schlechter. Die modifizierte USE-Mutagenese wurde erneut mit den beiden Primern AccI-off und SalI-on an pT136 wiederholt. Nach entsprechender Aufarbeitung des Mutageneseansatzes und Restriktionsverdau mit AatII wurde die Transformation diesmal in frisch hergestellten, kompetenten BMH71-18 mutS Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden 18 Stunden in 3ml S.O.C.-Medium (Ampicillin) angezogen und vollständig für eine Plasmid Präparation eingesetzt. Die isolierte DNA wurde erneut mit AatII verdaut und anschließend in DH5α transformiert. Diesmal konnten 253 Klone auf der Transformationsplatte ausgezählt werden. 10 davon wurden über Nacht in LB-Medium kultiviert. Nach Mini-Präparation wurde die entsprechende DNA zunächst mit HindIII und anschließend mit SalI bzw. AatII verdaut (Abbildung 4-3).

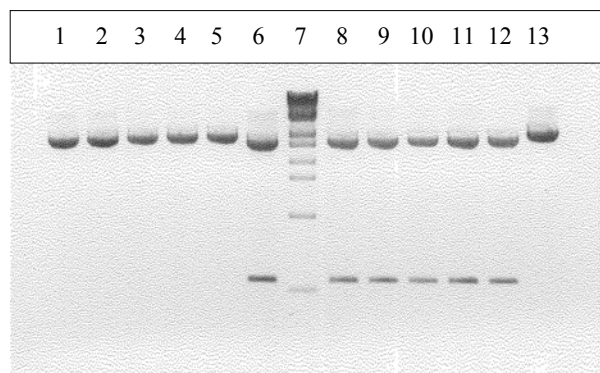


Abbildung 4-3 Kontrollverdau isolierter Klone mit AatII (Lane1-6) und SalI (Lane8-13). In Lane 6 und Lane 13 wurde als Kontrolle das Plasmid pT136 verwendet. In Lane 7 wurde als Kontrolle ein  $\lambda$ -DNA/BstEII Marker mit aufgetragen.

In sämtlichen Klonen konnte die neu eingeführte Sall Schnittstelle (466bp) eindeutig identifiziert werden, die AatII Schnittstelle war hingegen nicht mehr vorhanden. Im Vergleich dazu war in allen untersuchten Klonen eine AccI Schnittstelle genau wie im Ausgangsplasmid pT136 vorhanden. Die gleichzeitige Hybridisierung beider Primer scheint also bei dieser Mutagenesestrategie eine besondere Schwierigkeit darzustellen. Weitere Experimente mit diesem Verfahren wurden daher abgebrochen.

#### 4.1.1.2. Mutagenese nach Nelson und Long (Nelson, 1989)

Das 1989 von Nelson und Long veröffentlichte Verfahren (Nelson, 1989; Zhao,1993) zur Einführung von Mutationen erfolgt über zwei getrennt ablaufende PCR-Reaktionen. Bei der ersten PCR-Reaktion wird die Mutation über einen mutagenen Primer eingeführt. Dieser amplifiziert mit einem zweiten, gegenläufigen Primer ein Fragment, daß am Ende einen zusätzlichen kurzen Genabschnitt enthält, der im Wildtypgen jedoch nicht vorkommt.

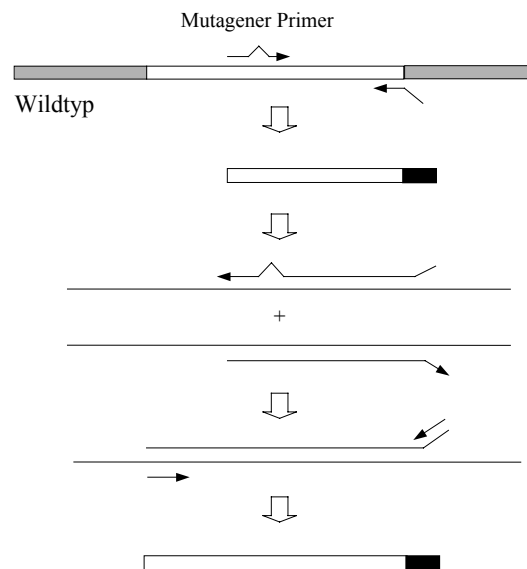


Abbildung 4-4 Schema der PCR Mutagenese nach Nelson und Long (Nelson, 1989).

Dieses mutagenisierte Fragment wird isoliert und erneut mit dem Wildtypgen innerhalb einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. Nachdem der fehlende Endabschnitt des mutagenisierten Fragments aufgefüllt wurde, werden zwei weitere Primer in hohem Überschuss zugegeben. Ein terminaler Primer ist dabei so konstruiert, daß er genau an die äußere Sequenz hybridisieren

kann, die durch den nicht-mutagenen Außenprimer bei der ersten PCR eingeführt wurde. Dieser zweite Amplifikationsschritt liefert ausschließlich mutagenisierte Fragmente, da das Wildtypgen nicht den Bindungsabschnitt des zweiten Primers enthält. Nach der Originalvorschrift von Nelson und Long wird die Taq-Polymerase für beide Amplifikationsschritte verwendet. Durch das Fehlen einer 3' → 5' Exonuklease Aktivität war daher nicht auszuschließen, daß zusätzliche Mutationen innerhalb beider PCR-Reaktionen akkumulieren könnten. Daher wurde zunächst für beide Reaktionen Vent-Polymerase eingesetzt. Die Wahl des zweiten, stromabwärtsgelegenen Primers (Tabelle 4-2) erfolgte nach ausgiebigen Untersuchungen der Plasmidsequenz anhand des PCR-Testprogramms Amplify 1.2β (University of Wisconsin).

<i>Mutagenese Primer</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
Nout3	CCATTGCGTAGGTTTCACACAGGAAACAGC
Nout3Mut	CCATTGCGTAGGTTTCAC
Nout5	AACGCCAGGGTTTTCCAG
AccI-off	CGTGAAGGTCGCCTACGAGGACGACAC

Tabelle 4-2 Verwendete Primer für das modifizierte Mutageneseprotokoll nach Nelson und Long (Nelson, 1989).

In einem Reaktionsansatz wurden 27.25µl dest. Wasser, 2.5µl Formamid, 5µl 10xVent-Polymerasepuffer (NEB, 1996), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 2.5µl AccI-off Primer (10µM), 2.5µl Nout3 Primer (10µM) und 2µl pT136 (10ng/µl) zugegeben und gut vermischt. Nach 5 Minuten Vordenaturierung bei 98°C wurde die Mischung auf Eis abgeschreckt und mit 0.25µl Vent Polymerase versetzt.

<i>Stufen der ersten PCR</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Vordenaturierung	98°C	5 Minuten
Denaturierung	94°C	30 Sekunden
Annealing	55°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Nachlauf	72°C	7 Minuten
<b>Zykluszahl: 25</b>		

Tabelle 4-3 Bedingungen für die erste PCR-Reaktion.

Kurz bevor der erste Temperierungszyklus die Hybridisierungstemperatur von 55°C erreicht hatte, wurde der Reaktionsansatz in den Thermocycler überführt. Nach 25 Zyklen und einer finalen Proben temperierung bei 72°C (7 Minuten), konnte der gesamte Reaktionsansatz gelelektrophoretisch untersucht (2% Agarose, 1xTBE Puffer) und weiter aufgereinigt werden. Die Isolierung der sauber erhaltenen Hauptbande bei 308bp erfolgte über eine frisch aktivierte DEAE-Membran. Das isolierte Fragment wurde anschließend durch Extraktion aufgereinigt, gefällt und erneut quantifiziert. Mit diesem Fragment und dem Ausgangsplasmid pT136 konnte schließlich die zweite PCR-Reaktion durchgeführt werden.

<i>Stufen der zweiten PCR</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Vordenaturierung	98°C	5 Minuten
Temperierung I	RT	15 Minuten
Temperierung II	50°C	2 Minuten
Denaturierung	94°C	30 Sekunden
Annealing	55°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Nachlauf	72°C	7 Minuten
<b>Zyklenzahl: 25</b>		

Tabelle 4-4 Bedingungen für die zweite PCR-Reaktion.

Hierzu wurden 18.25µl dest. Wasser, 2.5µl Formamid, 4µl 10xVent-Polymerasepuffer (NEB, 1996), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5µl isoliertes Fragment (10ng/µl) und 2µl Plasmid (10ng/µl) zusammengegeben und bei 98°C für 5 Minuten vordenaturiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Eis abgeschreckt und mit 0.25µl Vent Polymerase versetzt. Die Stranghybridisierung erfolgte durch Temperieren bei Raumtemperatur (15 Minuten) und bei 50°C (2 Minuten). Danach mußte der Ansatz erneut auf Eis gehalten werden, um 10µl Primer-Mix (4.5µl 10µM Nout5, 4.5µl 10µM Nout3mut und 1µl 10xVent-Polymerasepuffer) zugeben zu können. Der PCR-Ansatz wurde anschließend direkt beim Denaturierungsschritt im ersten Amplifikationszyklus in den Thermocycler eingeführt und für weitere 25 Zyklen darin belassen. Nach einer finalen Proben temperierung bei 72°C (7 Minuten) wurde der Reaktionsansatz elektrophoretisch untersucht (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer) und das entsprechende Hauptamplifikat bei 766bp isoliert. Das isolierte Genfragment wurde anschließend extrahiert, gefällt

und nacheinander mit SpeI und EcoRI verdaut. Die Aufreinigung des Restriktionsansatzes erfolgte im Anschluß erneut gelelektrophoretisch (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer). Die Ligation des isolierten Fragments konnte anschließend über T4-DNA Ligase mit einem ebenfalls über SpeI und EcoRI geöffneten pT136-Vektor durchgeführt werden. Dieser Ligationsansatz wurde in DH5 $\alpha$  Zellen transformiert und untersucht. Als Kontrolle diente dabei eine Ligation ohne Fragment. Auf der Transformationsplatte konnten etwa 195 und auf der Kontrollplatte 7 Klone nach 18 Stunden Inkubation bei 37°C ausgezählt werden. 20 willkürlich ausgesuchte Klone wurden über Nacht in 3ml LB-Medium (Ampicillin) angezogen und nach Mini-Präparation der Plasmid-DNA weiter untersucht. Durch Restriktionsverdau mit AccI und Hind III wurde untersucht, ob die entsprechende Restriktionsschnittstelle (AccI) durch den mutagenen Primer (AccI-off) entfernt werden konnte. Leider war in allen Plasmiden die AccI Schnittstelle genau wie im Wildtypplasmid weiter enthalten (421bp).

Dieses Verfahren wurde nun weiter optimiert. Auffallend war bei der zweiten PCR-Reaktion ein deutlicher Hintergrund um das Hauptamplifikat bei 766bp, das sich auch nach Erhöhung der Annealing-Temperatur auf 60°C nicht mehr deutlich verringern ließ. Eine Verbesserung konnte erst durch Einsatz singular vorgeschnittenen Plasmids (NdeI) erhalten werden. Doch ließ sich trotz dieser Verbesserungen die AccI Schnittstelle durch den AccI-off Primer nicht entfernen. Um den Einfluß der 3'  $\rightarrow$  5' Exonuklease Aktivität auszuschließen wurde die zweite PCR mit Taq Polymerase anstatt mit Vent Polymerase durchgeführt. Hierzu wurden 18 $\mu$ l dest. Wasser, 2.5 $\mu$ l DMSO, 4 $\mu$ l 10xTaq Polymerasepuffer (Perkin Elmer, 1996), 8 $\mu$ l dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5 $\mu$ l isoliertes Fragment (10ng/ $\mu$ l) und 2 $\mu$ l NdeI geschnittenes pT136 (10ng/ $\mu$ l) zusammengegeben und bei 98°C für 5 Minuten vordenaturiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf Eis abgeschreckt und mit 0.5 $\mu$ l Taq-Polymerase versetzt. Die Stranghybridisierung erfolgte genau wie zuvor durch Temperierung der Reaktionsmischung bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. Danach mußte der Ansatz erneut auf Eis gestellt werden, um 10 $\mu$ l Primer-Mix (4.5 $\mu$ l 10 $\mu$ M Nout5, 4.5 $\mu$ l 10 $\mu$ M Nout3mut und 1 $\mu$ l 10xTaq Polymerasepuffer) zugeben zu können. Beim ersten Denaturierungsschritt wurde der Ansatz für weitere 25 Zyklen wieder in den Thermocycler zurückgestellt. Am Ende der PCR wurde der Reaktionsansatz gelelektrophoretisch untersucht (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer) und aufgearbeitet. Etwa 50 $\mu$ l dieser Lösung wurden mit 10 $\mu$ l 3M KOAc Lösung (pH5.0) und mit 150 $\mu$ l abs. Ethanol versetzt und auf Eis für weitere 10 Minuten belassen.

<i>Stufen der zweiten PCR</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Vordenaturierung	98°C	5 Minuten
Temperierung I	RT	15 Minuten
Temperierung II	50°C	2 Minuten
Denaturierung	92°C	30 Sekunden
Annealing	55°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Nachlauf	72°C	7 Minuten
<b>Zykluszahl: 25</b>		

Tabelle 4-5 Bedingungen für die zweite optimierte PCR-Reaktion.

Das mit 70% Ethanol gewaschene und anschließend getrocknete Pellet wurde in 20µl dest. Wasser aufgenommen und mit SpeI und EcoRI gleichzeitig verdaut. Im Anschluß daran erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der beiden Fragmente (2% Agarose, 1xTBE Puffer). Das größere Fragment mit 479bp wurde anschließend über eine DEAE-Membran aus dem Gel isoliert, aufgearbeitet und erneut quantifiziert. Für die Ligation wurde etwa 50ng isoliertes Fragment mit 10ng pT136 eingesetzt. Nach Transformation und Inkubation konnten etwa 67 Klone ausgezählt werden, von denen 20 weiter untersucht wurden. Nach Kontrollverdau mit AccI und HindIII zeigte kein einziger Klon ein Fragment von 421bp Länge. 6 Klone wurden willkürlich ausgewählt und für eine Sequenzierung vorbereitet. Die Sequenz aller 6 Klone zeigte eindeutig die über den Primer AccI-off eingeführte Mutation im Tendamistat Gen. Es wurden lediglich zwei Zusatzmutationen 2 gefunden.

#### 4.1.1.3. Konstruktion der Oligonukleotide und Einführung der Prolinmutationen

Prolin wird auf DNA-Ebene durch vier verschiedene Tripletkombinationen kodiert. Die Auswahl der richtigen Kombination richtet sich nach der auszutauschenden Aminosäure und der kleinst möglichen Anzahl an Substitutionen die vorgenommen werden müssen, um das Prolin-Codon in ein entsprechendes Codon umzuwandeln. Aus der Betrachtung homologer Proteine wurde Alanin, das in HaimII oder in Z-2685 an entsprechenden Stellen anstatt Prolin vorkommt, ausgewählt. Für die Position 50 konnte aufgrund von Homologiebetrachtungen heraus keine entsprechende Aminosäure abgeleitet werden. Da es sich um einen Turn Bereich innerhalb der räumlichen Struktur des Proteins handelt, wurde aus sterischen Gründen an dieser Position

ebenfalls die Aminosäure Alanin ausgewählt. Die Aminosäure Glycin kam als Substituent für Prolin nicht in Frage, weil bereits an Position 51 ein Glycin enthalten ist, was zu einer starken Flexibilität der Sequenz AGGQ führen könnte. Zusätzlich dazu legen Untersuchungen an der Dihydrofolat-Reduktase (Jennings, 1993; Odefey, 1995) die Vermutung nahe, daß sich die Komplexität innerhalb der Rückfaltungskinetiken dieses Proteins aus der nicht-prolinschen *cis/trans*-Isomerisierung um die Sequenz Gly<sup>98</sup>-Gly<sup>99</sup> ergeben könnte. Eine solche Sequenz würde daher auch am Tendamistat zu Heterogenitäten bei der Rückfaltung des Proteins führen können.

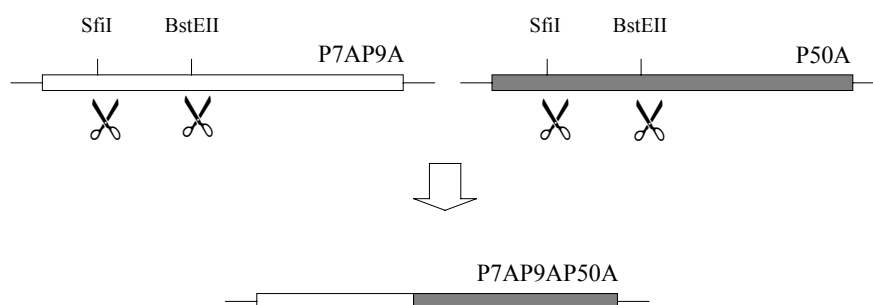


Abbildung 4-5 Schema zum Aufbau der Dreifachmutante P7AP9AP50A aus den Teilmutanten P7AP9A und P50A.

Insgesamt gibt es drei Proline im Tendamistat (P7,P9 und P50), die durch zwei Primer substituiert werden können (P7AP9A und P50A). Nach Isolierung und Sequenzierung der entsprechenden Plasmide lassen sich die einzelnen Mutationen durch Austausch eines Genabschnitts miteinander so kombinieren, daß die vollständig prolinfreie Mutante daraus resultiert (P7AP9AP50A). Die beiden Primer wurden entsprechend ihrer Funktion als P7AP9A und P50A bezeichnet. Nach Synthese, Aufreinigung (RP-HPLC) und Quantifizierung wurden diese beiden Primer parallel in dem oben bereits etablierten Mutageneseverfahren eingesetzt. In zwei Reaktionsansätzen wurden 27.25µl dest. Wasser, 2.5µl Formamid, 5µl 10xVent Polymerasepuffer (NEB, 1996), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 2.5µl P7AP9A bzw. P50A Primer (10µM), 2.5µl Nout3 Primer (10µM) und 2µl pT136 (10ng/µl) zugegeben und gut vermischt.

<i>Mutagenese Primer</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
Nout3	CCATTGCGTAGGTTTCACACAGGAAACAGC
P7AP9A	CGTCTCCGAGGCCGAGCCTCCTGCGTGAC
P50A	CGCCGTCGCAGCGGGCCAGATCACC

Tabelle 4-6 Verwendete Primer zur Einführung der drei Prolin/Alanin Substitutionen in das Tendamistat Gen.

Nach Vordenaturierung beider Ansätze bei 98°C (5 Minuten) wurden die Mischungen auf Eis abgeschreckt und mit 0.25µl Vent-Polymerase versetzt. Kurz bevor der erste Temperierungszyklus die Hybridisierungstemperatur von 58°C erreicht hatte, wurden beide Reaktionsansätze in den Thermocycler überführt.

<i>Stufen der ersten PCR</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Vordenaturierung	98°C	5 Minuten
Denaturierung	94°C	30 Sekunden
Annealing	58°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Nachlauf	72°C	7 Minuten
<b>Zyklenzahl: 25</b>		

Tabelle 4-7 Bedingungen für die erste PCR-Reaktion mit den beiden Primern P7AP9A und P50A.

Nach 25 Zyklen und einer, nach Ablauf des Programms stattfindenden Proben temperierung bei 72°C (7 Minuten) wurden die gesamten Reaktionsansätze gelelektrophoretisch analysiert (2% Agarose, 1xTBE Puffer) werden. Beide Amplifikate zeigten die gewünschte Größe (P7AP9A/Nout3: 395bp und P50A/Nout3: 266bp). Ein stärkerer Hintergrund war in beiden Reaktionen nicht zu erkennen. Ebenso konnte die Bildung von Primer-Dimer Paaren in beiden Amplifikationsansätzen nicht beobachtet werden. Um mehr Fragment für die nachfolgenden Klonierungen zu erhalten, wurde die soeben beschriebene PCR mit den jeweiligen Primerpaaren P7AP9A/Nout3 und P50A/Nout3 in jeweils 2x50µl Ansätzen wiederholt.



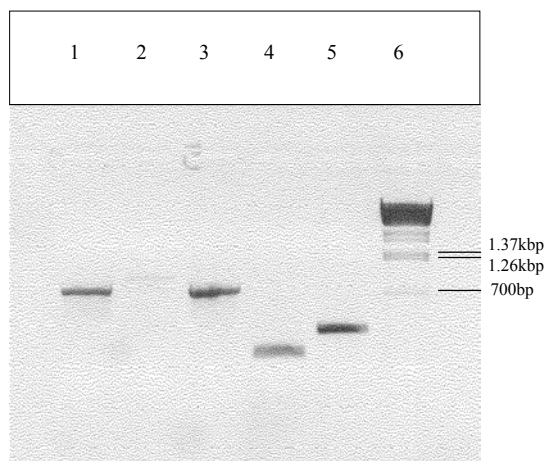


Abbildung 4-6 Mutagene PCR. Lane 1: Nout5/Nout3; Lane 2: Nout5/Nout3Mut; Lane 3: Isoliertes Nout5/Nout3 Fragment, amplifiziert mit Nout5/Nout3Mut; Lane 4: Nout3/P50A; Lane 5: Nout3/P7AP9A und Lane 6: Marker  $\lambda$ -DNA/BstEII.

Beide Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2% Agarose, 1xTBE Puffer) und isoliert. Nach Aufreinigung und Quantifizierung der erhaltenen Fragmente erfolgte die zweite PCR zur Vervollständigung beider Teilsequenzen. Hierzu wurde in zwei Ansätzen jeweils 18 $\mu$ l dest. Wasser, 2.5 $\mu$ l DMSO, 4 $\mu$ l 10xTaq Polymerasepuffer (Perkin Elmer, 1996), 8 $\mu$ l dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5 $\mu$ l isoliertes Fragment (10ng/ $\mu$ l) und 2 $\mu$ l NdeI geschnittenes pT136 (10ng/ $\mu$ l) zusammengegeben und bei 98°C für 5 Minuten vordenaturiert (vgl. Tabelle 4-8).

<i>Stufen der zweiten PCR</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Vordenaturierung	98°C	5 Minuten
Temperierung I	RT	15 Minuten
Temperierung II	50°C	2 Minuten
Denaturierung	92°C	30 Sekunden
Annealing	55°C	30 Sekunden
Extension	72°C	1 Minute
Nachlauf	72°C	7 Minuten
<b>Zykluszahl: 25</b>		

Tabelle 4-8 Bedingungen für die zweite PCR-Reaktion zur Einführung der Mutationen P7AP9A und P50A.

Anschließend wurden beide Reaktionsmischungen schnell auf Eis abgeschreckt und mit 0.5µl Taq-Polymerase versetzt. Die Stranghybridisierung erfolgte genau wie oben beschrieben durch Temperieren der beiden Ansätze bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. Die Ansätze wurden anschließend auf Eis gestellt und in jeden 10µl Primer-Mix (4.5µl 10µM Nout5, 4.5µl 10µM Nout3mut und 1µl 10xTaq Polymerasepuffer) hinzupipettiert. Beim ersten Denaturierungsschritt wurden beide Ansätze für weitere 25 Zyklen wieder in den Thermocycler zurückgestellt. Am Ende der PCR wurden die Reaktionsansätze gelelektrophoretisch untersucht (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer) und ohne vorherige Isolierung der Amplifikate aufgearbeitet. Beide Fragmente wurden gefällt, quantifiziert und parallel mit 20U SpeI und 10U EcoRI für 4 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente über Gelelektrophorese (2% Agarose, 1xTBE Puffer). Beide Fragmente (479bp) wurden über DEAE-Membranen aus dem Agarosegel isoliert und durch Extraktion weiter aufgearbeitet. 50ng beider Fragmente wurden zu jeweils 10ng eines entsprechend geöffneten Plasmids zugegeben und über Nacht bei 16°C ligiert. Jeweils 5µl beider Ligationsansätze wurde in DH5α Zellen transformiert. Von der Transformationsplatte wurden je 20 Klone auf eine Stammhaltungsplatte aufgestrichen und die ersten 6 Klone über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) inkubiert. Nach Isolierung der plasmidischen DNA wurden alle Klone parallel mit HindIII und EcoRI verdaut und über Gelelektrophorese analysiert. Bei allen Klonen war genau wie beim Wildtyp eine Bande bei 669bp zu erkennen. Von der Stammhaltungsplatte wurden jeweils 6 Kulturen der Klone SHAP7AP9A;1-6 und SHAP50A;1-6 angeimpft und daraus nach dem Verfahren von Kovalenko (Kovalenko, 1994) Plasmide isoliert. Nach Dialyse der entsprechenden Plasmidpräparationen gegen dest. Wasser wurden die erhaltenen Plasmide sequenziert. In sämtlichen Plasmiden konnten die Mutationen eindeutig nachgewiesen werden. In drei der 12 sequenzierten Plasmide konnten zusätzliche Punktmutationen identifiziert werden. Jeweils Klon 1 (SHAP7AP9A;1 und SHAP50A;1) auf beiden Stammhaltungsplatten wurde für alle weiteren Experimente verwendet.

#### **4.1.2. Klonierung der Prolinfreien Mutante P7AP9AP50A**

Der Klon SHAP7AP9A;1 wurde über Nacht in 5ml LB-Medium (Ampicillin) angezogen um präparative Mengen an plasmidischer DNA isolieren zu können. Die Analytik des erhaltenen Produktes erfolgte nach enzymatischem Verdau (HindIII) durch Gelelektrophorese (1% Agarose, 1xTBE Puffer). Etwa 10µg Plasmid wurden mit SfiI/BstEII verdaut und das dabei freigesetzte

102bp Fragment über DEAE-Membranen isoliert. Der Klon SHAP50A;1 wurde ebenfalls über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) angezogen. Im Anschluß an die Isolierung der plasmidischen DNA erfolgte auch hier ein sequentieller Verdau mit SfiI und BstEII. Für die Ligation wurden 20ng des geöffneten pSHAP50A;1 Plasmids und 100ng Fragment (102bp) sowie 200U T4-DNA Ligase verwendet. Von der Transformationsplatte wurde eine unabhängige Stammhaltungsplatte mit 20 willkürlich ausgewählten Klonen angelegt (SHAP7AP9AP50A;1-20). Die ersten 5 Klone dienten zur Kontrolle der Ligation und wurden daher in LB-Medium (Ampicillin) über Nacht hochgezogen. In allen isolierten Plasmiden konnte nach einem Parallelverdau mit EcoRI und HindIII die entsprechende Fragmentbande bei 669bp nachgewiesen werden. Die hierbei untersuchten Klone wurden für die anschließende Sequenzierung erneut über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) kultiviert, um Plasmide über das Verfahren von Kovalenko (Kovalenko, 1994) isolieren zu können. Alle Klone erwiesen sich nach der Sequenzierung als positiv. Von den fünf Klonen wurde der Klon SHAP7AP9AP50A;1 für alle weiteren Klonierungen verwendet.

### **4.1.3. Expression**

#### **4.1.3.1. Umklonierung in den Expressionsvektor pAX5a**

Der bifunktionale Shuttlevektor pAX5a (8067bp) setzt sich größtenteils aus den beiden Vektoren pUC19 bzw. pIJ702 zusammen (Hoffman, 1992). Aufgrund seiner beiden Replikationsursprünge (pBR322 sowie pIJ101) ist ein vertikaler Gentransfer zwischen den Organismen *E. coli* und *Streptomyces lividans* möglich, was den Klonierungsaufwand beträchtlich reduziert. Das zu klonierende Gen wird über die singulären Schnittstellen SpeI und EcoRI in den Shuttlevektor eingebracht und steht stromaufwärts unter der Kontrolle des konstitutiven *ermEup* Promotors. Auch die Expression der Prolinmutanten sollte mit Hilfe von pAX5a durchgeführt werden. Auf die Verwendung einer verbesserten Signalsequenz (+2 Ladungsmutante) wurde hier verzichtet (Faß, 1994). Die Plasmide pSHAP7AP9A;1, pSHAP50A;1 und pSHAP7AP9AP50A;1 wurden enzymatisch über SpeI/EcoRI geöffnet um die unterschiedlichen Strukturgene (479bp) isolieren zu können. Der entsprechende Verdau erfolgte ebenfalls mit dem Shuttlevektor pAX5a. Nach Aufarbeitung der entsprechenden DNA wurde die Konzentration der Fragmente bzw. des linearisierten Vektors über Gelelektrophorese (1.5% Agarose, 1xTBE Puffer) bestimmt. Für die Ligation wurde 10ng Vektor mit 20ng der entsprechenden Fragmente zusammengegeben und

über Nacht bei 16°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag konnten jeweils 5µl Ligationsansatz in DH5α transformiert werden. Von den zumeist gut bewachsenen LB-Platten (Ampicillin) wurden jeweils 20 Klone auf Stammhaltungsplatten überimpft und die ersten fünf Klone über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) hochgezogen. Nach Mini-Präparation der DNA und anschließendem Kontrollverdau mit EcoRI/HindIII konnte in allen Proben die Fragmentbande bei 782bp beobachtet werden. Für die weiteren Experimente wurden die Plasmide pHAP7AP9A;1, pHAP50A;1 und pHAP7AP9AP50A;1 der entsprechenden Klone verwendet.

#### 4.1.3.2. Transformation in *Streptomyces lividans* TK24

Je 200µl Protoplastensuspension wurden unter fließendem Wasser aufgetaut und auf Eis zu je 50µl portioniert. In jede Protoplastensuspension wurde anschließend etwa 0.5µg der entsprechenden Plasmidpräparation und darauf etwa 200µl T-Puffer hinzupipettiert. Danach erfolgte die schonende Ausplattierung der kompletten Transformationsansätze auf vorgetrocknete R2YE-Platten. Nach bereits einem Tag konnten die drei Transformationsplatten mit 1ml Thiostrepton-Lösung (50µg/ml) überschichtet werden. Nach weiteren 3 Tagen erfolgte die Überimpfung einzelner Klone auf NL701-Platten (Thiostrepton) zur Überprüfung der sekretierten Inhibitormenge anhand des α-Amylase Plattentestes.

#### 4.1.3.3. α-Amylase Plattentest

Der α-Amylase Plattentest ist ein einfaches Nachweisverfahren zur qualitativen Bestimmung Tendamistat-produzierender Stämmen. Chemisch beruht er auf der Eigenschaft des Iod, sich in Stärke einzulagern. Dieser Vorgang läßt sich optisch als dunkel-violette Farbe des Iod/Stärke Komplexes nachweisen. Kolonien die keinen α-Amylase Inhibitor exprimieren, bleiben farblos, wohingegen exprimierende Stämme sich leicht durch eine dunkelblaue Inhibitionszone erkennen lassen.

Zur Durchführung beimpft man nach Rastervorlage parallel NL701-Platten (Thiostrepton) mit den zu untersuchenden *S. lividans* Klonen und beläßt diese anschließend bei 27-28°C im Brutschrank. Von jeder Transformationsplatte wurden etwa 10 Klone auf NL701-Platten übertragen und etwa 3 Tage inkubiert. Nachdem die Koloniedurchmesser 2-3mm erreicht hatten, wurden sämtliche Platten mit 1.5ml frischer Pankreatinlösung (2.5%) überschichtet.

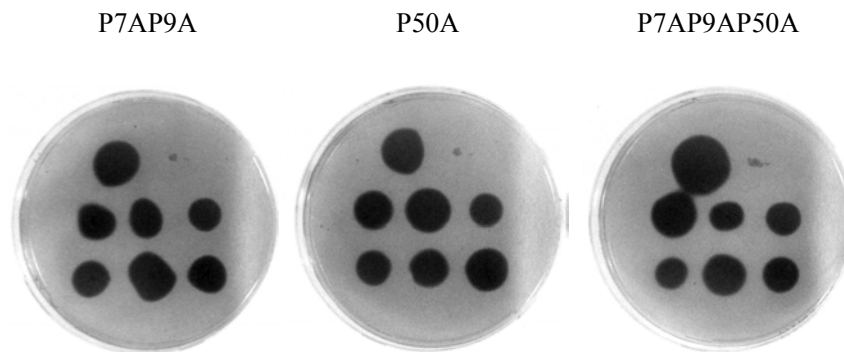


Abbildung 4-7  $\alpha$ -Amylase Plattentest. Der erste Klon links oben auf jeder Platte entspricht dem Wildtyp. Der Klon rechts oben wurde aus einer Kontrolltransformation mit dem Vektor pAX05a erhalten, der kein Tendamistat exprimiert. Bei allen Platten wurde eine 2% Pankreatinlösung verwendet.

Bei dem  $\alpha$ -Amylase Plattentest gilt, daß bei besonders hohen Konzentrationen an Pankreatin, die Hemmhofgrößen bei gleicher Expressionsmenge der Zellen dementsprechend klein ausfallen und umgekehrt. Pankreatin dient bei diesem Plattentest als  $\alpha$ -Amylase Lieferant. Nach etwa 30min Inkubation bei Raumtemperatur wurden sämtliche Platten mit einer auf 50°C temperierten Stärke/Agarose-Lösung überschichtet und weitere 1.5 Stunden bei 28°C inkubiert. Die fertigen Platten wurden im Anschluß daran mit 2.5ml Jod/Kaliumjodid-Löung angefärbt und fotografiert. Sämtliche *S. lividans* Klone zeigten einen deutlich sichtbaren, bräunlich-violetten Hemmhof, dessen Durchmesser bei den mit dem Plasmid pHAP7AP9AP50A;1 transformierten Streptomyceten kleiner ausfiel.

#### 4.1.3.4. Expression der Mutanten in Schüttelkulturen

Für eine Expressionsuntersuchung werden Schüttelkulturen benötigt, die bis zu 7 Tage bei 28°C inkubiert werden. Aus verschiedenen Vorversuchen hat sich das direkte Animpfen der Nährlösung mit kleinen, gut bewachsenen Agargelstücken von frischen Transformationsplatten am besten bewährt. Nach mehrwöchiger Lagerung der Platten traten häufig signifikante Expressionseinbrüche in Schüttelkulturen auf. Für die Kultivierung von *S. lividans* in

Flüssigmedien hat sich in der Praxis besonders das Minimalmedium und das Produktionsmedium bewährt.

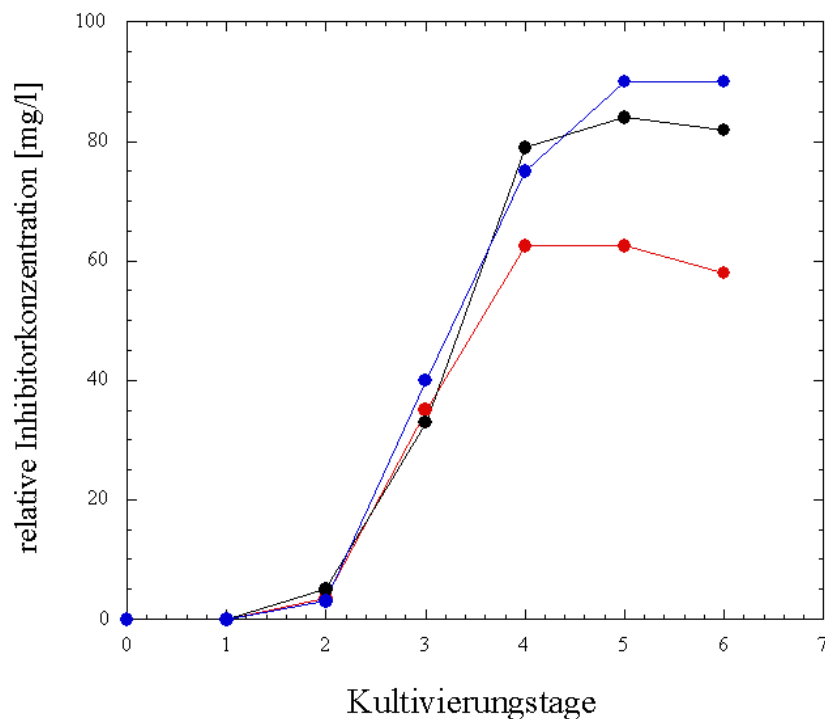


Abbildung 4-8 Expression der Tendamistat Mutanten P7AP9A (●), P50A (●) und P7AP9AP50A (●) in MM-Medium. Im Einschub ist die verwendete Tendamistat Eichreihe abgebildet.

Nach erneuter Transformation der Expressionsplasmide pHAP7AP9A;1, pHAP50A;1 und pHAP7AP9AP50A;1 wurden die R2YE-Platten nach 20 Stunden Inkubationsdauer mit 1ml Thiostrepton (50µg/ml) überschichtet und bis zur beginnenden Sporulation weitere 5 Tage bei 28°C belassen. In einem 300ml Erlenmeyerkolben mit Spiralfeder wurden jeweils 50ml MM-Medium mit Thiostrepton (5µg/ml) vorgelegt und unter sterilen Bedingungen mit ca. 1cm<sup>2</sup> gut bewachsener Rasenfläche von der Transformationsplatte beimpft. Die Probenentnahme (1ml) erfolgte dabei täglich bis zum 6. Tag. Eine Quantifizierung der exprimierten Proteinmenge erfolgte mit Hilfe eines Aktivitätstests. Der Aktivitätstest basiert auf der enzymatischen Freisetzung eines p-Nitrophenolanions ( $E_{\text{abs.}} = 405\text{nm}$ ), das als Vorstufe in Form eines farblosen 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-maltoheptosids vorliegt. Der erste Schritt bei der Umsetzung dieses Substrats erfolgt über  $\alpha$ -Amylase, die sich entsprechend der Konzentration des Inhibitors irreversibel hemmen läßt. Vor der eigentlichen Quantifizierung der Proben mußten zunächst

Eichungen mit Hilfe einer Tendamistat Verdünnungsreihe durchgeführt werden (Abbildung 4-8). Für die Messungen wurden jeweils 100µl Kulturüberstand verwendet und mit DNSS Puffer unterschiedlich stark verdünnt (bis 1:250).

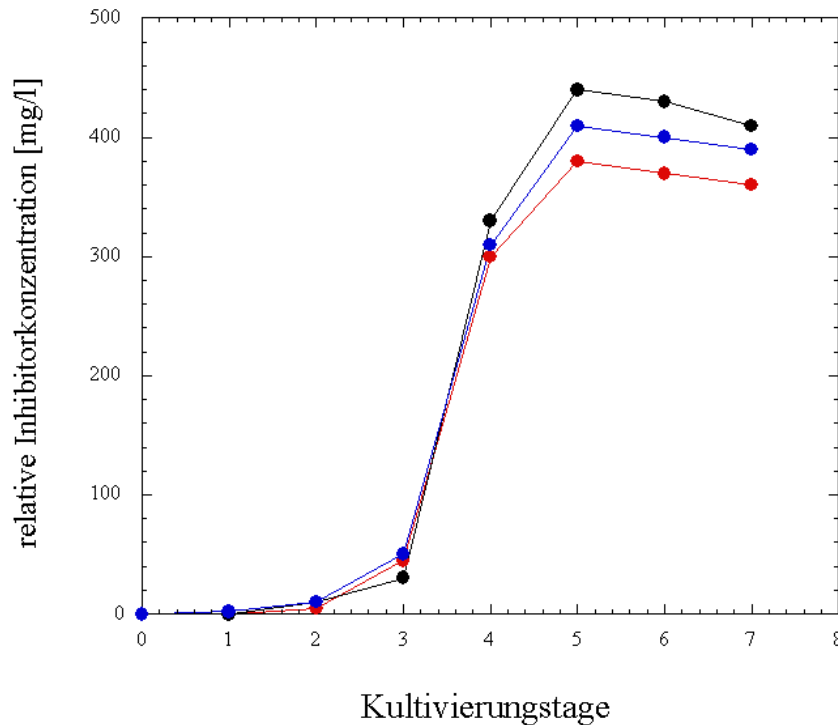


Abbildung 4-9 Expression der Tendamistat Mutanten P7AP9A (●), P50A (●) und P7AP9AP50A (●) in Produktionsmedium. Im Einschub ist die verwendete Tendamistat Eichreihe abgebildet.

Wie die berechneten Konzentrationen zeigen, liegt die exprimierte Proteinmenge zwischen 60mg/l (P7AP9AP50A) und 90mg/l (P50A). Das prolinfreie Tendamistat zeigt gegenüber den Mutanten P7AP9A und P50A eine geringfügig erniedrigte Expression. Entsprechende Kultivierungen konnten auch in Produktionsmedium (Abbildung 4-9) durchgeführt werden. Im Vergleich zu den vorher durchgeführten Untersuchungen wurden in allen Ansätzen wesentlich höhere Konzentrationen an sekretiertem Inhibitor nachgewiesen. Die durchschnittlich exprimierten Proteinmengen lagen für alle Mutanten um 390mg/l. Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten konnten im Produktionsmedium ebenfalls nachgewiesen werden. Die Mutante P7AP9AP50A zeigte auch hier die niedrigste Expressionshöhe.

#### 4.1.4. Reinigung der Tendamistat Mutanten

##### 4.1.4.1. Charakterisierung der expremierten Mutanten

Für eine weitere Untersuchung der expremierten Proteine wurden die Plasmide pHAP7AP9A;1, pHAP50A;1 und pHAP7AP9AP50A;1 in *S. lividans* Protoplasten transformiert und 24h bei 28°C inkubiert. Nach Überschichten der Transformationsplatten konnte nach dem 5. Tag ein gut bewachsener Zellrasen erhalten werden, von dem jeweils ein 1cm<sup>2</sup> großes Agarstück in 50ml Minimalmedium überführt wurde. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte bis zum 5. Tag. Die Zellmasse wurde anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Die erhaltenen Überstände wurden bei Raumtemperatur auf pH7.0 eingestellt (verd. NH<sub>3</sub>-Lösung), durch Papierfilter filtriert und mit dest. Wasser auf 50ml aufgefüllt. Die Fällung der Proteine aus den einzelnen Überständen erfolgte anschließend parallel in der Kälte (4°C) mit 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sättigungskonzentration). Nach dem letzten (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Zusatz wurden die Fällungsansätze weitere 2h in der Kälte gerührt und anschließend in GSA-Becher überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 10000rpm erhielt man Proteinsedimente, die sich vollständig in 8ml 40mM Tris-HCl und 10mM EDTA (pH8.0) resuspendieren ließen. Die noch salzhaltigen Lösungen mußten vor der eigentlichen Reinigung durch Dialyse entsalzt werden (Centriplus, 3000MW). Über Nacht wurden die resuspendierten Fällungsprodukte mit 8000rpm (SS34-Rotor) in der Filtrationseinheit zentrifugiert, erneut mit 8ml Puffer (40mM Tris-HCl, 10mM EDTA pH8.0) aufgefüllt und ein weiteres mal zentrifugiert. Etwa 1.5ml dialysiertes Rohprodukt konnte am Ende für jede Mutante isoliert werden. Anschließend wurden Aktivitätsbestimmungen der Filtrationsrückstände sowie der Filtrate durchgeführt. 80% der zuvor eingesetzten Aktivität konnte nach Filtration zurückerhalten werden.

Die aufkonzentrierten und dialysierten Filtrate wurden anschließend durch Celluloseacetatfilter (0.2µm) filtriert und à 500µl portioniert (P7AP9A: 7mg/ml; P50A: 6mg/ml und P7AP9AP50A: 4.8mg/ml). 100µl P7AP9AP50A Mutante (0.48mg) wurden auf eine semipräparative 10mm x 250mm Synchro-Pak RP C8 Säule (7µm, 300Å) nach equilibrieren mit Puffer A (dest. Wasser, 0.1% TFA) aufgetragen und mit Puffer B (Acetonitril, 0.1% TFA) eluiert (Flußgeschwindigkeit 3ml/min: 1min 0%B → 15%B, 45min 15%B → 70%B, 10min 100%B). Bei 22.3min eluierte eine Hauptfraktion, die aufgefangen und unter Vakuum bei Raumtemperatur evaporiert wurde. Der schwach gelbliche Rückstand ließ sich in 500µl dest. Wasser leicht lösen. Eine Massenspektrometrie



(MALDI-MS, Matrix *trans*-3,5 Dimethoxy-4-Hydroxyzimtsäure) dieser Probe erbrachte eine Molekularmasse von 7880.53Da, was mit der berechneten Molekularmasse von 7878Da gut übereinstimmt (Abbildung 4-10).

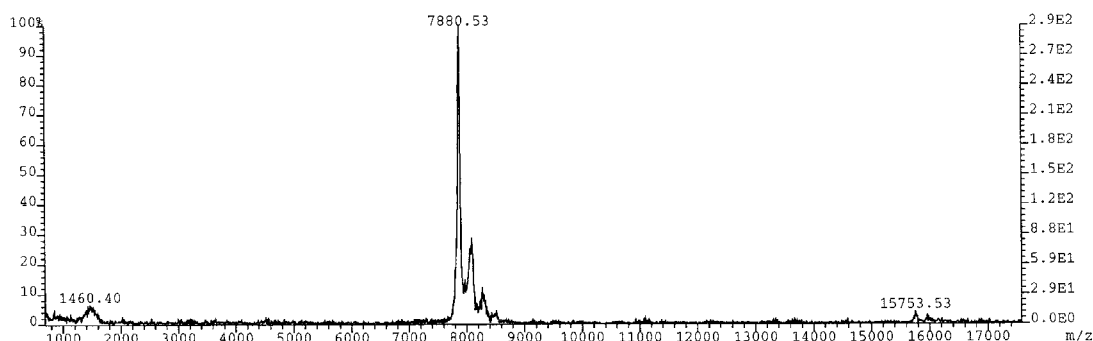


Abbildung 4-10 MALDI-MS der Mutante P7AP9AP50A (SMO [1,3], ToF-Spec Linear LDI-, Laser Energy 50%, 55%, Source 27kV, Supp. Mass: 500Da, Matrix: *trans*-3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyzimtsäure). Die berechnete Masse beträgt 7878Da.

Entsprechende Trennläufe konnten auch mit den Rohprodukten der Mutanten P7AP9A und P50A sowie dem Wildtyp (Referenz) durchgeführt werden. Die gemessenen Retentionszeiten sämtlicher Tendamistat Mutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp geringe Abweichungen. Am deutlichsten sind diese Unterschiede bei der prolinfreien Variante ausgeprägt ( $\Delta R_{(WT-P7AP9AP50A)} = 1.3\text{min}$ ). Die über MALDI-MS ermittelten Molekularmassen fallen bei den Mutanten P7AP9A und P50A im Vergleich zu den berechneten Molekularmassen deutlich niedriger aus. Das gleiche Verhalten zeigt auch die Molekularmasse des Wildtyps (Tabelle 4-9).

<i>Protein</i>	<i>Menge</i>	<i>Retentionszeit</i> <sup>1)</sup>	<i>Molekulargewicht</i> <sup>2)</sup>	<i>Molekulargewicht</i> <sup>3)</sup>
Wildtyp	0.5mg	21.5min	7949Da	7957Da
P7AP9A	0.7mg	22min	7899Da	7904Da
P50A	0.6mg	21.5min	7920Da	7930Da
P7AP9AP50A	0.48mg	22.8min	7881Da	7878Da

<sup>1)</sup> semipräparative 10mm x 250mm Synchro-Pak RP C8 Säule (7 $\mu$ m, 300Å), Gradient: 1min 0%B → 15%B, 45min 15%B → 70%B, 10min 100%B, Flußgeschwindigkeit: 3ml/min, <sup>2)</sup> gemessen, <sup>3)</sup> berechnet.

Tabelle 4-9 Charakterisierung der Proteine, die über RP-HPLC aufgereinigt werden konnten.

#### 4.1.4.2. Bestimmung der optimalen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration

Zur Aufkonzentrierung der Kulturüberstände wird eine Fällung mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durchgeführt. Diese schonende Präzipitationstechnik kann jedoch auch dazu genutzt werden, um das gewünschte Protein durch eine fraktionierte Fällung von Nebenprodukten (Vorfällung) abzutrennen. Hierzu müssen entsprechende Fällungsreihen mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  durchgeführt werden. Zu diesem Versuch wurden erneut Protoplasten frisch mit den Plasmiden pHAP7AP9A;1 und pHAP7AP9AP50A;1 transformiert. Nach 6 Tagen wurde jeweils 50ml Minimalmedium (Thiostrepton) mit einem  $1\text{cm}^2$  großen Agarstück angeimpft und im Schüttler bei  $28^\circ\text{C}$  (300rpm) bis zum 5 Tag belassen.

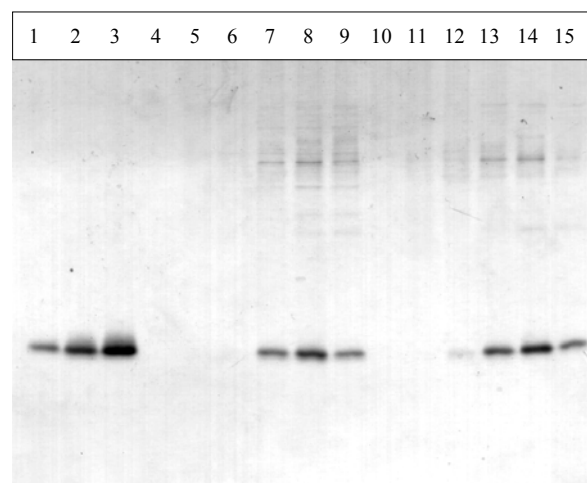


Abbildung 4-11 Fraktionierte Fällung von Kulturüberständen. Spur1:  $2\mu\text{g}$  Wildtyp; Spur2:  $4\mu\text{g}$  Wildtyp; Spur3:  $6\mu\text{g}$  Wildtyp; Spur4-8: 20-60% P7AP9AP50A; Spur9:  $100\mu\text{l}$  Kulturüberstand P7AP9AP50A; Spur10-14: 20-60% P7AP9A; Spur15:  $100\mu\text{l}$  Kulturüberstand P7AP9A.

Eine längere Inkubation ist meist nicht zu empfehlen, da die einsetzende Lyse der Zellen mit der Zeit einen zu starken Hintergrund von freigesetzten Proteinen verursacht. In der Kälte ( $4^\circ\text{C}$ ) wurden jeweils  $5 \times 2\text{ml}$  Kulturüberstand (P7AP9A und P7AP9AP50A) mit unterschiedlichen Menge  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt, sodaß sich am Ende Sättigungskonzentrationen von 20% bis 60% ausbilden konnten. Um ein vorzeitiges Ausfallen der Proteine durch ungelöstes  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zu

vermeiden, mußten alle Ansätze gerührt werden. Nach weiteren 2h wurden die Fällungsansätze in Zentrifugationsröhrchen (4ml) überführt und 10min in der Kälte bei 12000rpm zentrifugiert. Sämtliche Präzipitate ließen sich anschließend in 200µl 40mM Tris-HCl, 10mM EDTA (pH8.0) vollständig resuspendieren. Jeweils 40µl dialysierter Fällungsansatz wurden im Vakuum bis zur Trockene eingengt und anschließend in 20µl Probenpuffer gelöst. Nach Denaturierung konnten anschließend die Proben über SDS-PAGE (Schägger/Jagow) analysiert werden (Abbildung 4-11). Als Kontrolle dienten unterschiedliche Konzentrationen an Tendamistat Wildtyp (2µg, 4µg und 6µg) sowie 100µl des ursprünglichen Kulturüberstands. Die ersten deutlichen Fällungsprodukte konnten entweder bei 50% (P7AP9AP50A) oder 40% Sättigung (P7AP9A) beobachtet werden. Die Fällung war aber in beiden Fällen bei einer Sättigungskonzentration von 60% abgeschlossen. Die Abtrennung von Nebenprodukte erfolgt bei Konzentrationen niedriger als 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nur ungenügend.

#### 4.1.4.3. Präparative Aufreinigung der P7AP9AP50A-Variante über RP-HPLC

Für eine präparative Proteinexpression der Mutanten P7AP9AP50A wurde das Plasmid pHAP7AP9AP50A;1 in *S. lividans* frisch transformiert. Nachdem sich ein gut bewachsener Zellrasen auf den R2YE-Platten ausgebildet hatte, wurde 5x50ml Minimalmedium (Thiostrepton) mit zwei etwa 1cm<sup>2</sup> großen Agarstücken beimpft und 6 Tage bei 27°C inkubiert (300rpm). Eine Kontaminationskontrolle fand parallel zur Inkubation ebenfalls statt. Der nach Zentrifugation erhaltene Kulturüberstand wurde bei Raumtemperatur auf pH7.0 eingestellt (verd.  $\text{NH}_3$ -Lösung), erneut filtriert und mit dest. Wasser auf 250ml aufgefüllt. Entsprechend der oben durchgeführten Testreihen, wurden die nicht erwünschten Nebenprodukte zunächst durch eine Vorfraktionierung mit 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Sättigungskonzentration) abgetrennt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 10000rpm wurde der Kulturüberstand vorsichtig dekantiert und vereinigt. Um das in Lösung befindliche Protein präzipitieren zu können, wurde die Sättigungskonzentration anschließend von 40% auf 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4°C) erhöht. Die Fällung von Protein ließ sich bei diesem Schritt durch eine deutliche Trübung des Überstands optisch verfolgen. Der vollständige Fällungsansatz wurde erneut in GSA-Becher überführt und 60min bei 10000rpm in der Kälte (4°C) zentrifugiert. Nach Dekantieren des Kulturüberstands wurde das zurückgebliebene Sediment kurze Zeit bei Raumtemperatur getrocknet und in insgesamt 20ml 40mM Tris-HCl, 10mM EDTA (pH8.0) resuspendiert. Das Proteinkonzentrat wurde daraufhin in Dialyseschlauchmembranen

(MWCO3000) überführt und über Nacht bei 4°C gegen 10mM Phosphatpuffer, 0.1mM EDTA (pH6.8) dialysiert.

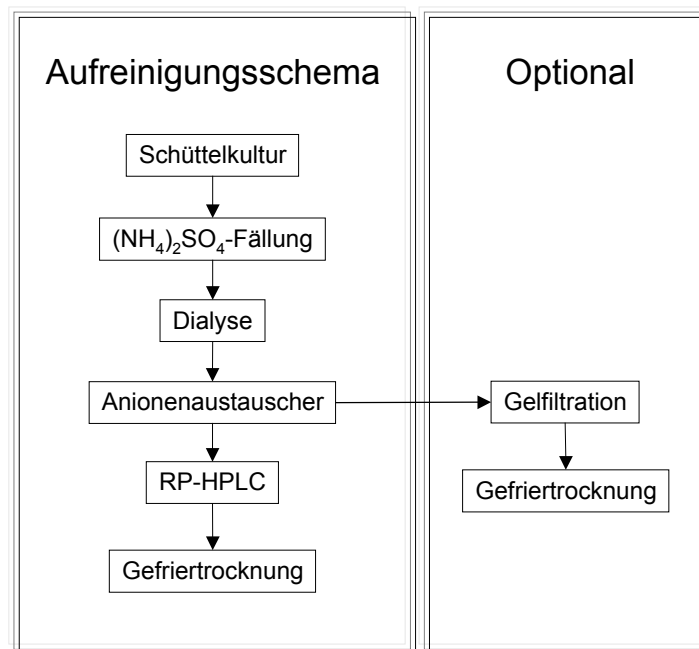


Abbildung 4-12 Das bisherige Aufreinigungsschema von Tendamistat nach Scharf (Scharf, 1992).

In einigen Fällen ließ sich bei diesem Schritt eine erneute Präzipitation innerhalb der Dialysemembrane beobachten. In solchen Fällen wurden die Proben durch Zentrifugation vom Sediment befreit und anschließend wie gewohnt weiterverwendet. Vor der Auftragung des Rohproduktes auf den Anionenaustauscher wurde das Dialysat (30ml) mit 7.5ml 250mM Pyridin-HCl, 25% Betain (pH6.0) umgepuffert. Bei dem verwendeten Anionenaustauscher (2.6cm x 12cm) handelte es sich um DEAE-Sepharose *fast flow* (Pharmacia). Dieses Material wurde vor Benutzung mit jeweils einem Säulenvolumen (CV) 0.1N NaOH und 0.1N HCl gereinigt und anschließend solange mit Puffer A (50mM Pyridin-HCl, 5% Betain pH6.0) äquilibriert, bis der entsprechende pH-Wert (pH6.0) am Ende der Säule gemessen werden konnte. Das Aufziehen des Dialysats auf die Säule erfolgte über eine externe Peristaltikpumpe (2ml/min), wobei der Säulendurchbruch separat aufgefangen und analysiert wurde.

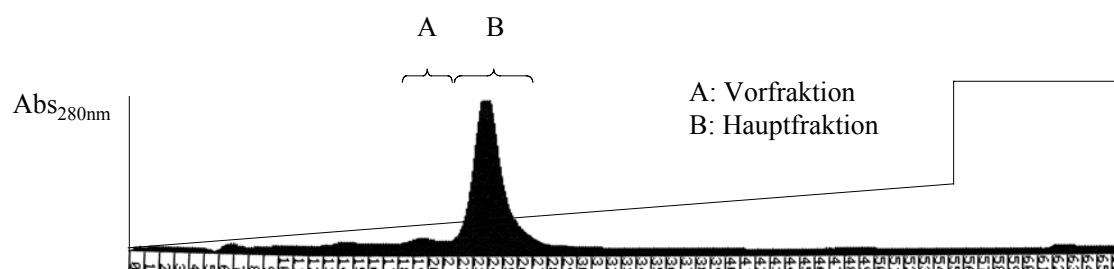


Abbildung 4-13 Anionenaustauscherlauf über DEAE-Sepharose *fast-flow*.

Nach Umlegen des Zulaufs wurde das Gradientenprogramm gestartet (Fluß: 2.5ml/min; Gradient: 0% → 35% Puffer B in 550ml), die Fraktionsgröße des Sammlers betrug 10ml. Die Hauptbande eluierte zwischen 220-280ml (Abbildung 4-13). Geringe Mengen der Fraktionen 14-32 wurden nach dem Lauf 1:500 verdünnt und auf Aktivität untersucht. Die Hauptaktivität ließ sich eindeutig im Bereich der Hauptbande (Fraktionen 18-32) finden. Bei dem Vorbande (Fraktionen 18-22) handelt es sich vermutlich um N-Terminal verkürztes Tendamistat (Scharf, 1992), das vollständig verworfen wurde. Die Fraktionen 23-30 wurden anschließend vereinigt.

Für die anschließende RP-HPLC wurde eine von Scharf eingeführte präparative Vydac RP C18 Säule (2.5cm x 25cm) verwendet (Scharf, 1992). Die Proteinlösung mußte vor Auftragung durch 0.2µm Celluloseacetatfilter filtriert werden. Nach ausreichender Äquilibration der Säule mit dest. Wasser (0.1% TFA), wurde die vollständige Proteinlösung (80ml) über den seitlichen Pumpenansaugstutzen auf die Säule aufgetragen und nach schließen des Ventils das entsprechende Gradientenprogramm gestartet. Bei einer Flußrate von 30ml/min wurden für 10 Minuten zunächst Verunreinigungen mit 15% Acetonitril (0.1%TFA) von der Säule eluiert (Abbildung 4-14). Der Durchbruchpeak wurde aufgefangen und auf Aktivität untersucht. Nach dem Vorlauf wurde ein linearer Gradient über 45 Minuten bis zu einer Endkonzentration von 75% Acetonitril (0.1%TFA) gestartet. Die Detektion erfolgte bei 280nm. Scharfe Trennbanden konnten jedoch bei diesem Lauf nicht erhalten werden. Die aufgefangenen Fraktionen zeigten zwar allesamt eine Inhibitoraktivität, konnten aber über ESI-MS nicht eindeutig der Mutante P7AP9AP50A zugeordnet werden. Wie bei der Mutante C11AC27A ist offensichtlich das hier verwendete präparative Säulenmaterial von Vydac nicht dazu geeignet die P7AP9AP50A

Variante sauber aufzutrennen. Weitere Untersuchungen mit den aufgefundenen Fraktionen (5-8) wurden nicht vorgenommen. Entsprechende Trennläufe mit den Mutanten P7AP9A sowie P50A wurden ebenfalls nicht weiter durchgeführt.

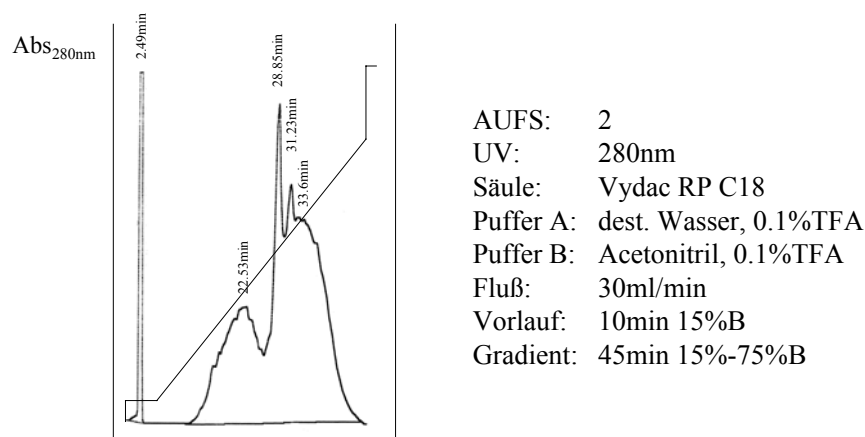


Abbildung 4-14 Aufreinigung der Mutante P7AP9AP50A über RP-HPLC.

## 4.1.5. Neue Aufreinigungsstrategie

### 4.1.5.1. Optimierung der Gelfiltration

Bereits Scharf (Scharf, 1992) konnte die Gelfiltrationschromatographie für die erfolgreiche Feinreinigung unterschiedlicher Mutanten einsetzen. Die Gelfiltrationschromatographie weist unterschiedliche Vor- und Nachteile auf. Zu den Nachteilen gehört neben der reduzierten Flußgeschwindigkeit ein im Vergleich zum Säulenvolumen niedrig ausfallendes Probenvolumen (unter 2%). Vorteilhaft dagegen ist insbesondere die Möglichkeit unter nativen Bedingungen möglichst schonend arbeiten zu können. Trennung und Pufferaustausch lassen sich außerdem mit der Gelfiltrationschromatographie gleichzeitig durchzuführen.

Vergleicht man Kulturüberstandsproben auf einem denaturierenden Gelsystem (SDS-PAGE), so fällt auf, daß sich im Bereich unterhalb von 8kDa kaum weitere Proteine finden lassen. Oberhalb der Tendamatatbande befindet sich zumeist eine bei etwa 11kDa laufende charakteristische Proteinbande. Weitere Banden sind erst im höhermolekularen Bereichen zu beobachten. Daher wurde versucht, die Gelfiltration als einen primären Reinigungs- und Umpufferungsschritt

standardmäßig für die Isolierung von Tendamistat zu etablieren. Scharf konnte bereits gute Erfahrungen mit dem Sephadex G50/50 Material zur Feinreinigung (Polishing) von Tendamistat vorweisen (Scharf, 1992). Um bei höheren Flußraten arbeiten zu können, mußte ein druckstabiles Chromatographiematerial mit ähnlichen Trenneigenschaften wie Sephadex für die Chromatographie gefunden werden. Aus Kostengründen fiel die Entscheidung auf Sephacryl S-100HR (Pharmacia). Testläufe mit Copolymeren auf Methacrylat-Basis (z.B. TosoHaas HW-40F) konnten bei Tendamistat mit mäßigem Erfolg durchgeführt werden.

Vor dessen Einsatz wurde engastes Sephacryl S-100HR (300ml) in eine Leersäule (2.5cm x 60cm) unter Fluß (5ml/min) gepackt (vgl. Pharmacia Handbuch 1996: Gelfiltration) und mit 600ml 20mM Bis-Tris pH6.0 äquilibriert (2ml/min).

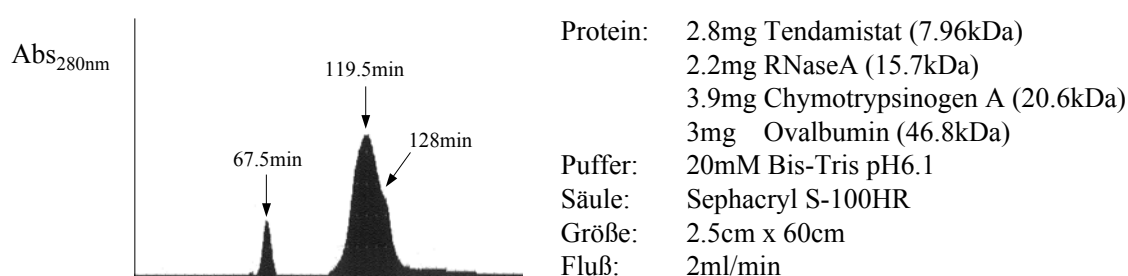


Abbildung 4-15 Etablierung der Gelfiltration zur Reinigung labiler Tendamistat Mutanten. Bei dem Testlauf wurde eine Proteinmischung, bestehend aus Ovalbumin,  $\alpha$ -Chymotrypsinogen, RNase A und Tendamistat auf die Säule aufgetragen. Ovalbumin eluiert unter diesen Bedingungen bei 67.5ml, RNase A und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen bei 119.5ml und Tendamistat bei 128ml von der Säule.

Zur Untersuchung der Trenneigenschaften des Säulenmaterials wurde eine Testlösung, bestehend aus Tendamistat (2.8mg/ml), RNase A (2.2mg/ml),  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A (3.9mg/ml) und Ovalbumin (3mg/ml) hergestellt und durch manuelle Injektion (1ml) auf die Säule aufgetragen (Abbildung 4-15). Die Flußrate betrug bei diesem Testlauf 2ml/min. Nach etwa 400ml (1CV) konnte kein weiteres Signal mehr auf der Säule detektiert werden (UV-1: 280nm). Ovalbumin (46.8kDa) eluierte unter diesen Bedingungen nach 67.5ml, RNase A (15.7kDa) und  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (20.6kDa) bei etwa 119.5ml von der Säule. Tendamistat (7.96kDa) eluierte hingegen, als Schulter der beiden zuvor beschriebenen Proteine, bei etwa 128ml von der Säule.

Für die angestrebte Applikation ließ sich damit die Tauglichkeit der Sephacryl S-100HR Säule (2.5cm x 60cm) zur Abtrennung höhermolekularer Verunreinigungen demonstrieren.

#### 4.1.5.2. Präparative Aufreinigung der Mutante P7AP9AP50A

Für eine präparative Proteinexpression der Mutanten P7AP9AP50A wurde das Plasmid pHAP7AP9AP50A;1 in *S. lividans* transformiert und 5 Tage bei 28°C belassen. Nachdem sich ein gut bewachsener Zellrasen auf den Transformationsplatten ausgebildet hatte, wurden 5x50ml Produktionsmedium beimpft. Am 6. Tag wurde die Inkubation unterbrochen und die Zellmasse durch Zentrifugation (4°C) bei 6000rpm in abgetrennt. Der anschließend durchgeführte Aktivitätstest erbrachte eine exprimierte Proteinmenge von 75mg im Kulturüberstand (220ml). Ohne eine Vorfraktionierung erfolgte die Präzipitation bei einer Sättigungskonzentration von 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach dem letzten Salzzusatz wurden die Fällungsansätze weitere 2h in der Kälte (4°C) gerührt und anschließend in GSA-Becher überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 10000rpm erhielt man in beiden Bechern deutliche Proteinsedimente, die sich vollständig in 10ml 40mM Tris-HCl und 10mM EDTA (pH8.0) resuspendieren ließen.

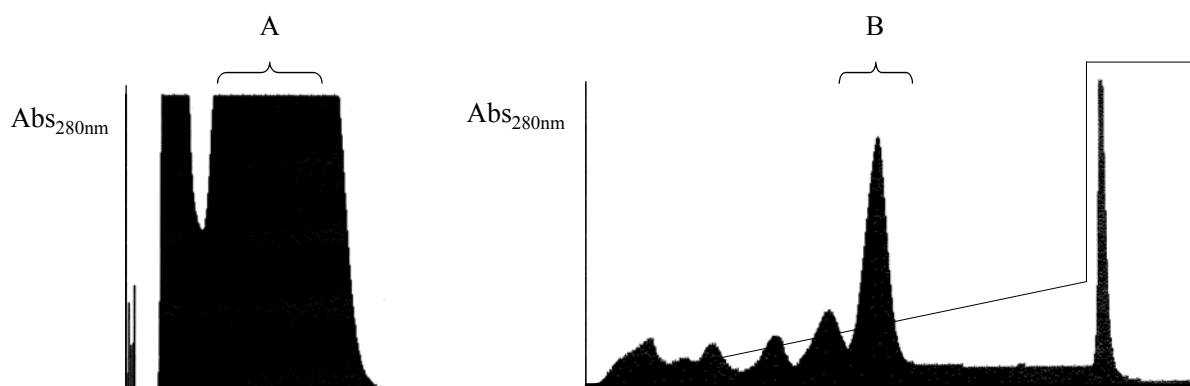


Abbildung 4-16 Reinigung der Mutante P7AP9AP50A über Sephacryl S-100HR (links) und DEAE-Sephacryl *fast-flow* (rechts). Die Hauptfraktion A (Fraktionen 8 bis 12) wurde vereinigt und direkt auf den Ionenaustauscher gegeben. Das gewünschte Produkt befand sich anschließend in den Fraktionen 22-26 (Hauptfraktion B). Diese wurden vereinigt und durch Ultrafiltration weiter aufkonzentriert. Die Absorption wurde jeweils bei 280nm bestimmt.



Die salzhaltigen Proben wurden vereint und durch erneute Zentrifugation bei 10000rpm (SS34) von unlöslichen Begleitstoffen befreit. Die erhaltene Lösung mußte vor der Gelfiltration nochmals durch 0.2µm Celluloseacetat Filter filtriert werden. Die Sephacryl S-100HR Säule wurde vor dem Lauf mit 2 Säulenvolumen 0.1N NaOH sowie 1 Säulenvolumen dest. Wasser gespült und bis zum Erreichen von pH6.0 mit Laufpuffer (20mM Bis-Tris pH6.0) äquilibriert. Danach wurde das Rohprodukt (20ml) direkt über die Peristaltikpumpe auf die Gelfiltrationssäule aufgebracht. Um eine möglichst gute Auftrennung erreichen zu können, wurde bei diesem Lauf die Flußgeschwindigkeit von ursprünglich 2ml/min auf 0.5ml/min reduziert (Abbildung 4-16). Die Fraktionierung erfolgte alle 10ml. Nach etwa 30ml war die Vorfraktion von der Säule eluiert, ihr folgte ab 80ml eine breite Elutionsbande mit wenigen Maxima bis 200ml. Jeweils 50µl der Fraktionen 4 bis 16 innerhalb dieser Bande wurden mit Aceton auf Eis gefällt, getrocknet und nach Denaturierung in Probenpuffer auf ein SDS-Gel (Schägger/Jagow) aufgetragen. Eindeutig ließ sich auf dem Gel nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 die Tendamistatbande innerhalb der Fraktionen 8 bis 12 nachweisen (Verdünnungsfaktor: 2.5). Bis auf geringe Mengen in Fraktion 8 konnte in den Fraktionen 9-12 die 11kDa Bande oberhalb der Tendamistat-Mutante nicht nachgewiesen werden.

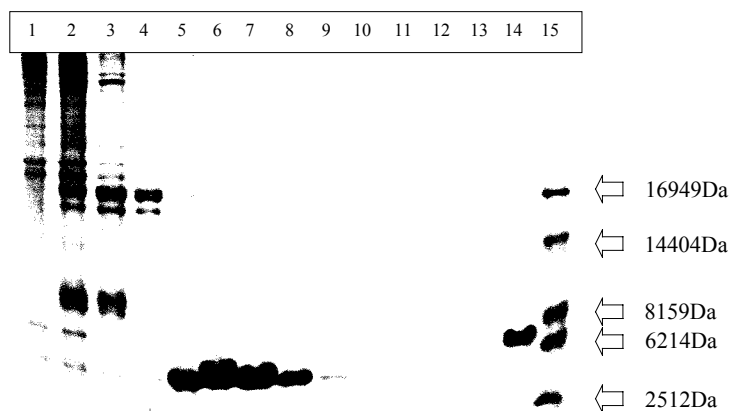


Abbildung 4-17 SDS-PAGE Analytik der Fraktionen 4 bis 16 (Spur1 bis Spur13) aus der Gelfiltration über Sephacryl S-100HR. Die Proben (50µl Fraktion) wurden durch Aceton-Fällung entsalzt. Auf Spur14 ist als Referenz 5µg Tendamistat aufgetragen, auf Spur15 der Molekulargewichtsmarker. Die Fraktionen 8 bis 12 wurden vereint und über Ionenaustauscher weiter aufgereinigt.

Die Fraktionen 8 bis 12 wurden vereinigt und für die anschließende Ionenaustauschchromatographie bereitgestellt. Die DEAE-Sepharose (2.5cm x 12cm) mußte erneut vor dem eigentlichen Chromatographielauf mit 0.1N NaOH sowie 0.1N HCl gereinigt und mit Puffer A (20mM Bis-Tris pH6.0) bis zum Erreichen des gewünschten pH-Werts äquilibriert werden. Das Aufziehen der Proteinlösung auf die Säule erfolgte über die externe Peristaltikpumpe (2ml/min). Bei der Auftragung der Proteinlösung konnte diesmal ein eindeutiger Säulendurchbruch nicht beobachtet werden konnte. Nach Umlegen des Zulaufs wurde das Gradientenprogramm gestartet (Fluß: 2.5ml/min; Gradient: 0% → 35% Puffer B in 550ml), die Fraktionsgröße des Sammlers betrug 10ml. Die Hauptbande eluierte zwischen 210-260ml (Fraktionen 21-26). Die Fraktionen 22-26 (50ml) wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon, YM3 Membrane) weiter aufkonzentriert. Nachdem nur noch wenige ml der Proteinlösung übriggeblieben waren, wurde der Filtrationsrückstand mit 40ml dest. Wasser aufgefüllt und erneut filtriert.

Komponente A: 7879.1Da

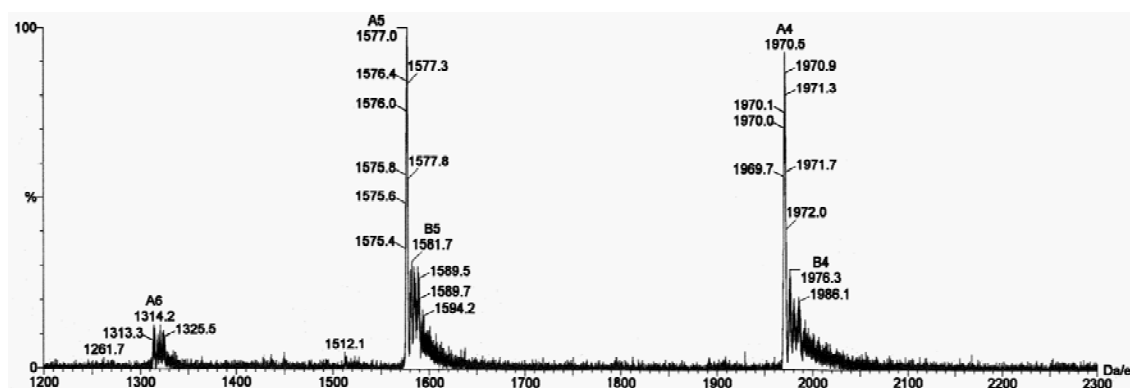


Abbildung 4-18 ESI-MS der aufgereinigten Mutante P7AP9AP50A.

Am Ende konnten aus ursprünglich 75mg P7AP9AP50A etwa 50mg Reinprodukt zurückerhalten werden, was einer Wiederfindungsrate von 66% entspricht. Eine ESI-MS Analytik (Abbildung 4-18) erbrachte eine Molekularmasse von 7879.1Da, was mit der berechneten Masse von 7878Da gut übereinstimmt. Die nach dieser Aufreinigungsmethode erhaltenen Ausbeuten und Volumina sind in der unten aufgeführten Tabelle nochmals zusammengefaßt:

	<i>Kultivierung</i>	<i>Fällung</i>	<i>Gelfiltration</i>	<i>Ionenaustauscher</i>	<i>Ultrafiltration</i>
<b>Volumen</b>	<b>250ml</b>	<b>20ml</b>	<b>50ml</b>	<b>50ml</b>	<b>5ml</b>
P7AP9AP50A	75mg	-	69mg	55mg	50mg

---

ESI-MS: 7879.1Da                      Berechnete Molekularmasse: 7878Da

Tabelle 4-10 Die bei der Aufreinigung von P7AP9AP50A erhaltenen Ausbeuten und Volumina nach präparativer Kultivierung in 250ml Produktionsmedium.

#### 4.1.5.3. Expression und Reinigung nach Kultivierung in Produktionsmedium.

Neben Minimalmedium kamen zur Kultivierung von *S. lividans* auch andere Medium zum Einsatz. Besonders der Einsatz von TSB-Medium erbrachte eine deutliche Steigerung der exprimierten Proteinmengen auf durchschnittlich 550mg/l. Solch hohe Expressionsmengen wurden vor allem in kleineren Kultivierungsvolumina erhalten (50ml Medium in 300ml Kolben). In der Regel fiel die Expressionsausbeute mit steigendem Volumen (100ml in 300ml Kolben). Durchschnittlich wurden hier Ausbeuten in TSB-Medium um 250mg/l erhalten. Dieser Zusammenhang zwischen Expressionshöhe und Kultivierungsvolumen konnte unabhängig vom verwendeten Medium und der jeweiligen Kultivierungstemperatur (25-29°C) erhalten werden. Der Einsatz einer Vorkultur (20-50ml) zum Animpfen der Hauptkultur (0.5-1l) war ebenfalls mit deutlichen Expressionsverlusten verbunden. Die besten Expressionsausbeuten wurden stets mit kleineren Kulturvolumina (bis maximal 300ml) erhalten. Die Expression in TSB- bzw. YEME-Medium lieferte zwar mehr von dem gewünschten Protein, doch ließen sich viele Proteine oder Medienbestandteile nur unzureichend bei der Gelfiltration vom Hauptprodukt abtrennen (SDS-PAGE). Die nach dem Anionenaustauscher erhaltenen Fraktionen waren häufig schwach gelblich angefärbt. Durch die anschließende Ultrafiltration oder einer erneuten Fällung mit Ammoniumsulfat konnte diese Verunreinigung nicht beseitigt werden. Wahrscheinlich handelt es sich bei den Verunreinigungen um Medienbestandteile peptidischen Ursprungs, die über hydrophobe Wechselwirkungen an Teile des Tendamistats adsorbieren. Daher mußte für diese Kultivierungsmedien (TSB- und YEME-Medium) eine neue Aufreinigungsstrategie entwickelt bzw. die etablierte Strategie modifiziert werden.

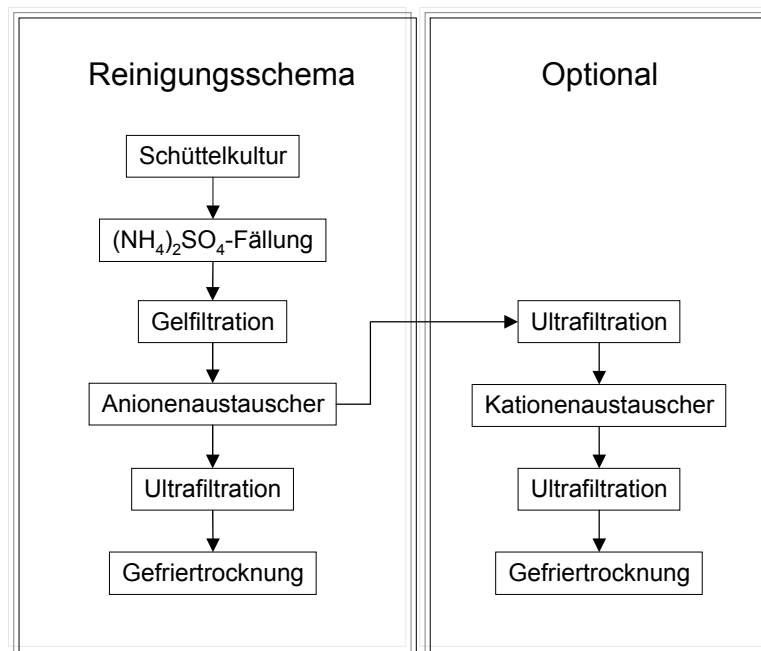


Abbildung 4-19 Neues Reinigungsschema, optional ist ein weiterer Aufreinigungsweg dargestellt, der bei Kultivierung in TSB- und vor allem YEME-Medium verwendet wurde.

Als besonders geeignet erwies sich die Kationenaustauschchromatographie über S-Sepharose *fast-flow* (Pharmacia). Die zuvor über den Anionenaustauscher erhaltenen Fraktionen wurden vereint und durch Ultrafiltration entsalzt (Amicon, YM3). Dabei erfolgte gleichzeitig die Umpufferung auf 20mM Citratpuffer pH2.5 (Puffer A). Diese Probe wurde durch manuelle Injektion in den Super-Loop (Pharmacia) eingebracht und über Ventilschaltung auf die zuvor gereinigte und auf pH2.5 equilibrierte Säule (1.6cm x 12cm) aufgetragen. Anschließend wurde die Probe mit einem linear ansteigenden NaCl-Gradienten (Puffer B: 20mM Citratpuffer pH2.5, 1M NaCl) von der Säule eluiert (Fluß: 1ml/min; Gradient: 0% → 70% Puffer B in 160ml). Sämtliche Tendamisat Varianten eluierten unter diesen Bedingungen bei etwa 40% Puffer B von der Säule. Die nach dem Kationenaustauscher erhaltenen Fraktionen wurden vereint und erneut durch Ultrafiltration (Amicon, YM3) aufkonzentriert.

#### 4.1.5.4. Präparative Aufreinigung der Mutanten P7AP9A und P50A

Für eine präparative Proteinexpression der Mutanten P7AP9A und P50A wurden die Plasmide pHAP7AP9A;1 und pHAP50A;1 in *Streptomyces lividans* Protoplasten transformiert und nach überschichten der Kulturplatten mit Thiostrepton-Lösung (50µg/ml) weitere 6 Tage bei 28°C inkubiert. Nachdem sich ein gut bewachsener Zellrasen auf den R2YE-Platten ausgebildet hatte, wurden jeweils 5x50ml Produktionsmedium mit mehreren Agargelstücken von der Transformationsplatte angeimpft und 6 Tage im Schüttler (300rpm) bei 28°C belassen. Am 6. Tag wurden die Schüttelkulturen herausgenommen und in der Kälte zentrifugiert. Der anschließend durchgeführte Aktivitätstest erbrachte eine exprimierte Proteinmenge von 75mg für die P7AP9A und 79mg für die P50A Mutante in den beiden Kulturüberständen. Der pH-Wert beider Lösungen wurde auf pH7.0 eingestellt. Ohne eine Vorfraktionierung erfolgte die Präzipitation beider Proteine bei einer (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sättigungskonzentration von 80%. Nach dem letzten Salzzusatz wurden die Fällungsansätze weitere 2h in der Kälte (4°C) gerührt und anschließend in GSA-Becher überführt. Nach Zentrifugation bei 4°C erhielt man deutliche Proteinsedimente, die sich in 10ml 40mM Tris-HCl, 10mM EDTA (pH8.0) nur unvollständig resuspendieren ließen. Deswegen wurden sämtliche Zentrifugenbechern mit einem kleinen Rührkern ausgestattet und über Nacht bei 4°C gerührt. Ein Großteil des vorher unvollständig gelösten Proteinpellets ging daraufhin in Lösung. Die salzhaltigen Proben durch Zentrifugation von unlöslichen Begleitstoffen und Partikeln befreit und über 0.2µm Filter filtriert. Die Sephacryl S-100HR Säule wurde vor dem Lauf gereinigt und mit Laufpuffer (20mM Bis-Tris pH6.0) äquilibriert. Das zuvor filtrierte Rohprodukt wurde anschließend über die Peristaltikpumpe auf die Säule aufgebracht und der Chromatographielauf gestartet. Die Fraktionierung erfolgte alle 10ml. Nach etwa 30ml war die Vorfraktion in beiden Fällen von der Säule eluiert, ihr folgte ab 80ml eine breite Elutionsbande. Jeweils die Fraktionen 8 bis 12 wurden vereinigt und für die anschließende Anionenaustauschchromatographie bereitgestellt. Ein Aktivitätstest erbrachte für die P50A bzw. P7AP9A Mutante eine Konzentration von 1.4mg/ml bzw. 1.38mg/ml Protein. Beide Produkte mußten anschließend über den Anionenaustauscher weiter gereinigt werden. Nach Reinigung und Äquilibrierung der DEAE-Sepharose (2.5cm x 12cm) wurde die Proteinlösung auf die Säule aufgezogen. Nach Umlegen des Zulaufs wurde das Gradientenprogramm gestartet (Fluß: 2.5ml/min; Gradient: 0% → 35% Puffer B in 550ml), die

Fraktionierungsgröße des Sammlers betrug 10ml. Der Hauptpeak eluierte zwischen 210-260ml (Fraktionen 21-26). Die Fraktionen 22-26 (50ml) wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon, YM3 Membrane) weiter aufkonzentriert.

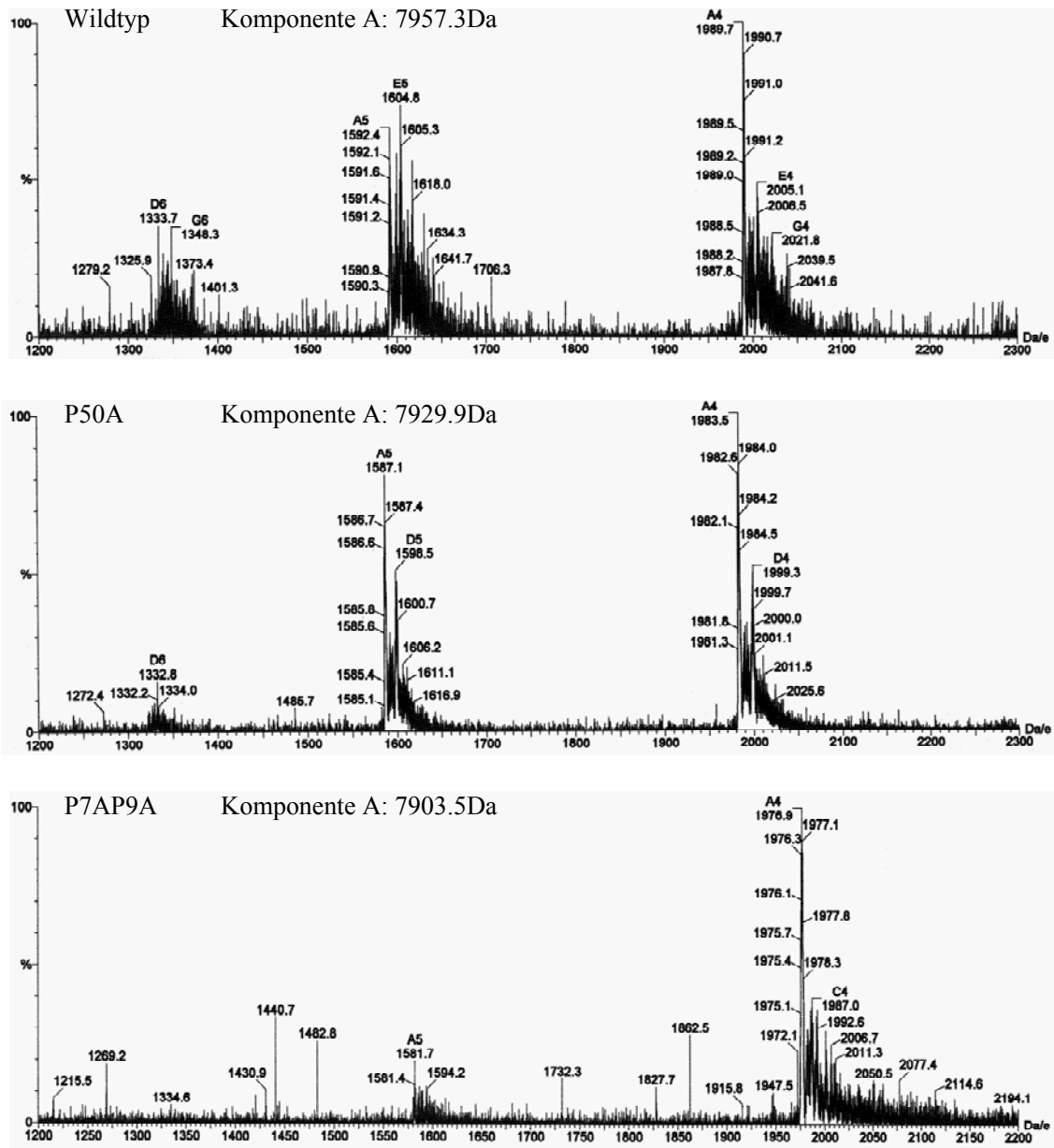


Abbildung 4-20 Abgebildet sind die Massenspektren (ESI-MS) der Mutanten P50A und P7AP9A, wie sie nach der neuen Aufreinigungsstrategie erhalten wurden. Als Referenz ist oben das Wildtypspektrum dargestellt.

Nachdem nur noch wenige ml der Proteinlösung übriggeblieben waren, wurde der Filtrationsrückstand mit 40ml dest. Wasser aufgefüllt und erneut dialysiert. Am Ende konnten etwa 61mg P50A und 58mg P7AP9A als Reinprodukt erhalten werden. Von beiden Proteinen wurden Proben in 0.1%TFA zur Bestimmung der Molekularmasse abgegeben. Die über ESI-MS gemessenen Werte von 7929.9Da bzw. 7903.5Da stimmen gut mit den berechneten Massen von 7930Da für die P50A Mutante bzw. 7904Da für die P7AP9A Mutante überein. Alle erhaltenen Daten zur Aufreinigung sind in der Tabelle 4-11 nochmals zusammengefaßt.

	<i>Kultivierung</i>	<i>Fällung</i>	<i>Gelfiltration</i>	<i>Ionenaustauscher</i>	<i>Ultrafiltration</i>
<b>Volumen</b>	<b>250ml</b>	<b>20ml</b>	<b>50ml</b>	<b>50ml</b>	<b>5ml</b>
P50A	79mg	-	70mg	64mg	61mg
P7AP9A	75mg	-	69mg	60mg	58mg

<b>P50A</b>	<b>P7AP9A</b>
ESI-MS: 7929.9Da	ESI-MS: 7903.5
Berechnet: 7930Da	Berechnet 7904Da

Tabelle 4-11 Die erhaltenen Ausbeuten und Volumina der Mutanten P50A und P7AP9A nach präparativer Kultivierung in 250ml Produktionmedium. Die über ESI-MS erhaltenen Molekularmassen stimmen jeweils sehr gut mit den berechneten Werten überein.

#### 4.1.6. Analytik

##### 4.1.6.1. HPLC Analytik

Bevor die isolierten Tendamistat Mutanten für weitere Untersuchungen verwendet werden konnten, wurden entsprechende Analytiken durchgeführt. Bereits im oberen Abschnitt konnte gezeigt werden, daß die berechneten Molekularmassen einzelner Mutanten mit den gemessenen Molekularmassen (ESI-MS), innerhalb eines zugelassenen Fehlers von 0.01% - 0.1% (Priß, persönliche Mitteilung), übereinstimmen.

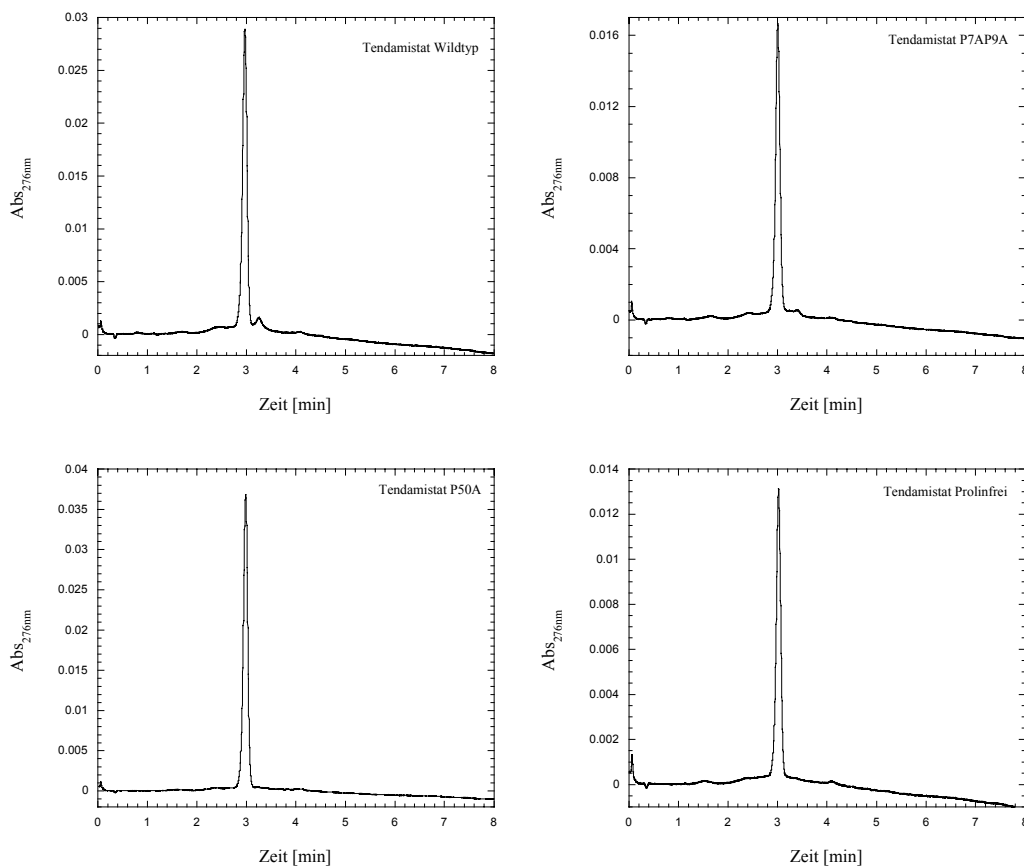


Abbildung 4-21 Dargestellt sind die Analytiken der einzelnen Tendamistat Mutanten. Die verwendete Fließgeschwindigkeit betrug 4ml/min (Material: Source 15Q, Pharmacia; Säule: 4.6mm x 150mm; Puffer A: 20mM Bis-Tris pH6.1; Puffer B: 20mM Bis-Tris 1M NaCl pH6.1; Vorlauf: 10CV; Gradient: 0% → 100% Puffer B in 20CV; Spülen: Puffer B 5CV). Detektiert wurde die Absorption bei 276nm.

Neben der Massenbestimmung sollten auch HPLC Analytiken mit den expremierten Proteinen durchgeführt werden. Auf die Schwierigkeiten, die in Zusammenhang mit dem verwendeten Säulenmaterial entstehen können, wurde bereits oben eingegangen. Für das weitere Vorgehen war daher die Etablierung einer möglichst „schonenden“ und schnellen Analysemethode von besonderer Wichtigkeit. Um eine Bandenverbreiterung durch hydrophobe Wechselwirkungen auszuschließen, wurde versucht mit Hilfe eines Ionenaustauschers die Analytiken durchzuführen (Abbildung 4-21). Gute Ergebnisse konnten mit dem Source15Q Material (Pharmacia) erhalten werden (4.6mm x 150mm). Dieses Trägermaterial besteht zwar aus hydrophobem, stark quervernetztem Polystyrol, zeigt jedoch beim Einsatz mit Tendamistat oder P7AP9AP50A keine negativen Auswirkungen auf die Laufeigenschaften beider Proteine.



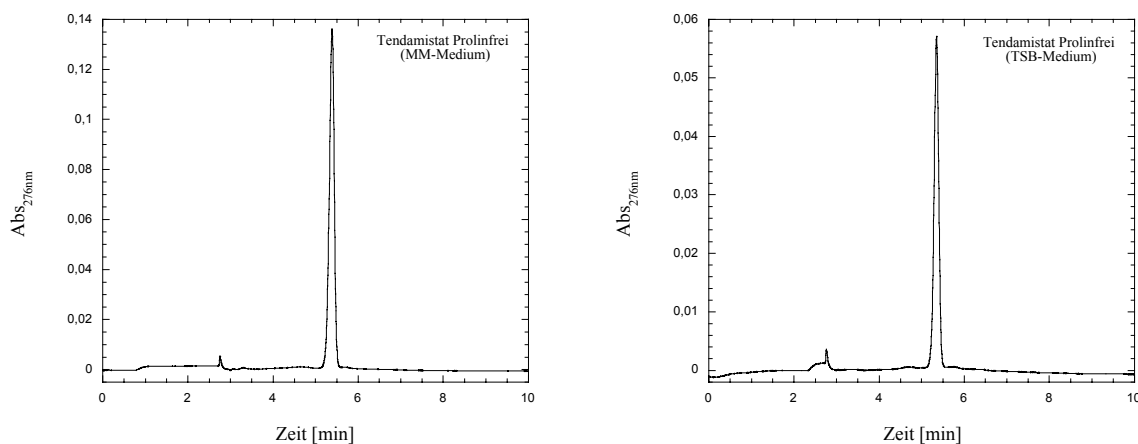


Abbildung 4-22 Dargestellt sind Analytiken der Mutante P7AP9AP50A, die aus unterschiedlichen Kulturmedien (Minimalmedium: links und TSB-Medium: rechts) isoliert werden konnten (Puffer A: 20mM Bis-Tris pH6.1; Puffer B: 20mM Bis-Tris 1M NaCl pH6.1; Fluß: 4ml/min; Vorlauf: 10CV; Gradient: 0% → 50% Puffer B in 30CV; Spülen: Puffer B 5CV). Detektiert wurde die Absorption bei 276nm.

Mit diesem Säulematerial konnten sämtliche, nach Expression in Produktionsmedium erhaltenen Proteine analysiert werden. Ohne die erhaltenen Proben weiter zu verdünnen, wurden jeweils 50µl nach ausreichender Äquilibration (10 Säulenvolumen) auf die Säule aufgetragen. Die Konzentrationen der eingesetzten Proteine waren: Wildtyp 8mg/ml; P7AP9A 4.5mg/ml; P50A 9.2mg/ml und P7AP9AP50A 4mg/ml. Als Laufpuffer hatte sich besonders Bis-Tris pH6.1 (Puffer A: 20mM Bis-Tris pH6.1; Puffer B: 20mM Bis-Tris, 1M NaCl pH6.1) bewährt. Der als Referenz eingesetzte Tendamiostat Wildtyp wurde von M. Scharf (Conrady, persönliche Mitteilung) zusätzlich über präparative RP-HPLC (Vydac RP C18) aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Bei der Analytik fiel auf, daß sämtliche Tendamiostat Mutanten als scharfe Banden bei 3min von der Säule eluierten. Der Wildtyp enthält bei 3.25min eine zusätzliche Bande, die bei den Mutanten nicht beobachtet werden konnte. Diese Methode wurde auch eingesetzt, um die Reinheit der Proben aus unterschiedlichen Kultivierungsmedien zu untersuchen. Dabei wurde prolinfreies Tendamiostat (P7AP9AP50A) verwendet, das nach dem modifizierten Aufreinigungsverfahren aus Minimalmedium (MM-Medium) bzw. TSB-Medium (Vollmedium) isoliert werden konnte (Abbildung 4-22). Eine durch die Verwendung von Vollmedium bedingte Verunreinigung der Probe läßt sich demnach nicht feststellen. Die hierbei verwendete Tendamiostat Mutante wurde, wie bereits oben dargelegt, über S-Sepharose *fast-flow*

(Kationenaustauscher) zusätzlich aufgereinigt. Da ein wesentlich flacherer Gradient bei dieser Analytik verwendet wurde, eluieren beide Proteine bei 5.4min.

#### 4.1.6.2. CE Analytik

Neben der Ionenaustauschchromatographie sollte die Kapillarelektrophorese (CE) verwendet werden, um die Qualität der isolierten Proteine genauer analysieren zu können. Für die Kapillarelektrophorese wurde ein Beckman P/ACE 2000 System eingesetzt. Die dabei verwendeten Kapillaren (Beckmann) wurden selbst auf die entsprechende Länge verkürzt und nach dem Einbrennen des Detektionsfensters in die Kapillarkassette eingelegt.

<i>Laufpuffer</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>	<i>Hauptbande</i>	<i>Differenz</i>
<b><i>0.1M Tricine pH 8.0</i></b>			
P7AP9A	3.35 min	4.81 min	1.46 min
P50A	3.37 min	4.97 min	1.6 min
P7AP9AP50A	3.33 min	4.81 min	1.48 min
Wildtyp	3.30 min	4.78 min	1.48 min
<b><i>20mM CAPS/NaOH pH 11</i></b>			
P7AP9A	2.57 min	3.95 min	1.38 min
P50A	2.64 min	4.06 min	1.42 min
P7AP9AP50A	2.65 min	4.01 min	1.36 min
Wildtyp	2.65 min	4.06 min	1.41 min
<b><i>10mM Tricine/HCl pH 8.1, 40mM KCl</i></b>			
P7AP9A	2.69 min	3.51 min	0.82 min
P50A	2.42 min	3.16 min	0.74 min
P7AP9AP50A	2.46 min	3.26 min	0.8 min
Wildtyp	2.22 min	2.99 min	0.77 min
<b><i>5mM Tricine/HCl pH 8.1, 20mM KCl</i></b>			
P7AP9A	2.42 min	3.23 min	0.81 min
P50A	2.62 min	3.48 min	0.86 min
P7AP9AP50A	2.40 min	3.26 min	0.86 min
Wildtyp	2.66 min	3.52 min	0.86 min
<b><i>10mM Tricine/HCl pH 8.0, 0mM KCl</i></b>			
P7AP9A	2.47 min	3.16 min	0.69 min
P50A	2.48 min	3.16 min	0.68 min
P7AP9AP50A	2.49 min	3.19 min	0.7 min
Wildtyp	2.51 min	3.19 min	0.68 min

Tabelle 4-12 Retentionszeiten der Tendamistat Mutanten in der Kapillarelektrophorese. Dimethylsulfoxid wurde in den einzelnen Läufen als interne Referenz verwendet. Die Detektion erfolgte bei 214nm.

Die Länge der ungefüllten Kapillare ( $\varnothing = 50\mu\text{m}$ ) betrug, bei einer effektiven Trennstrecke von 50cm, 57cm. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 214nm. Vor dem ersten Lauf mußte die neue Kapillare ausgiebig mit 0.1N NaOH und dest. Wasser konditioniert werden (45min). Um Laufunterschiede zwischen den einzelnen Mutanten besser bestimmen zu können, wurden zunächst verschiedene Laufpuffersysteme untersucht. Beim Wechsel der unterschiedlichen Puffersysteme erfolgte stets ein Reinigungsschritt der Kapillare mit dest. Wasser (10min). Besonders gute Ergebnisse konnten für das Tendamistat mit den Tricine Puffersystemen (pH8.0-8.1) erhalten werden. Ohne Zusatz eines Elektrolyten (z.B. KCl) erwies sich 10mM Tricine pH8.0 als der ideale Laufpuffer, bei dem scharfe Proteinbanden nach relativ kurzen Laufzeiten ( $\varnothing = 3.2\text{min}$ ) erhalten werden konnten. Der Stromfluß blieb über die gesamte Dauer des Elektrophoreselaufs konstant, eine Eigenschaft die mit dem bisherigen Puffersystem (10mM Phosphat pH7.0) nicht erreicht werden konnte. Zum Ausgleich von Retensionsschwankungen innerhalb einzelner Läufe wurde ein *interner* Standard eingeführt. Von den vielen Verbindungen, die hierzu untersucht wurden, hatte sich insbesondere das Dimethylsulfoxid (DMSO) als Standard bewährt (Tabelle 4-12). Hochreines DMSO (Aldrich) wurde jeder Probe vor dem Lauf im Verhältnis von 1:5000 (0.02%) beigemischt. Um Stromschwankungen, die bei Laufpuffern mit geringer Ionenleitfähigkeit auftreten können, zu vermeiden, hatten sämtliche Proben getrennte Laufpuffergefäße (Kathoden- und Anodenpuffer).

In Abbildung 4-23 sind die CE-Analytiken der einzelnen Proteine als Chromatogram abgebildet. Ähnlich wie in der Ionenaustauschchromatographie zeigen sämtliche Proteine einen Reinheitsgrad von über 90%. 92% konnte für den Tendamistat Wildtyp ermittelt werden, der bei etwa 3.28min eine geringfügige Verunreinigung ( $\uparrow$ ) aufweist. Der verwendete Wildtyp Standard wurde unabhängig von dieser Arbeit nach RP-HPLC Aufreinigung (Vydac C18) einer, dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Engels von der Hoechst AG zur Verfügung gestellten, kristallinen Reinfraction erhalten (Conrady, *persönliche Mitteilung*). Die beiden Mutanten P50A und P7AP9AP50A haben je einen Reinheitsgrad von etwa 96%. Die Mutante P7AP9A besitzt zwar bei 3.25min ebenfalls eine kleine Verunreinigung ( $\uparrow$ ), enthält dennoch einen Reinheitsgrad von etwa 93%. Die Laufunterschiede zwischen den einzelnen Mutanten sind in den gezeigten Analytiken (10mM Tricine pH8.0) nicht sehr deutlich ausgeprägt. Größere Laufunterschiede konnten in 10mM Tricine, 40mM KCl pH8.1 erhalten werden. Zur Kalibrierung hat sich der interne Standard (DMSO) als sehr nützlich herausgestellt.

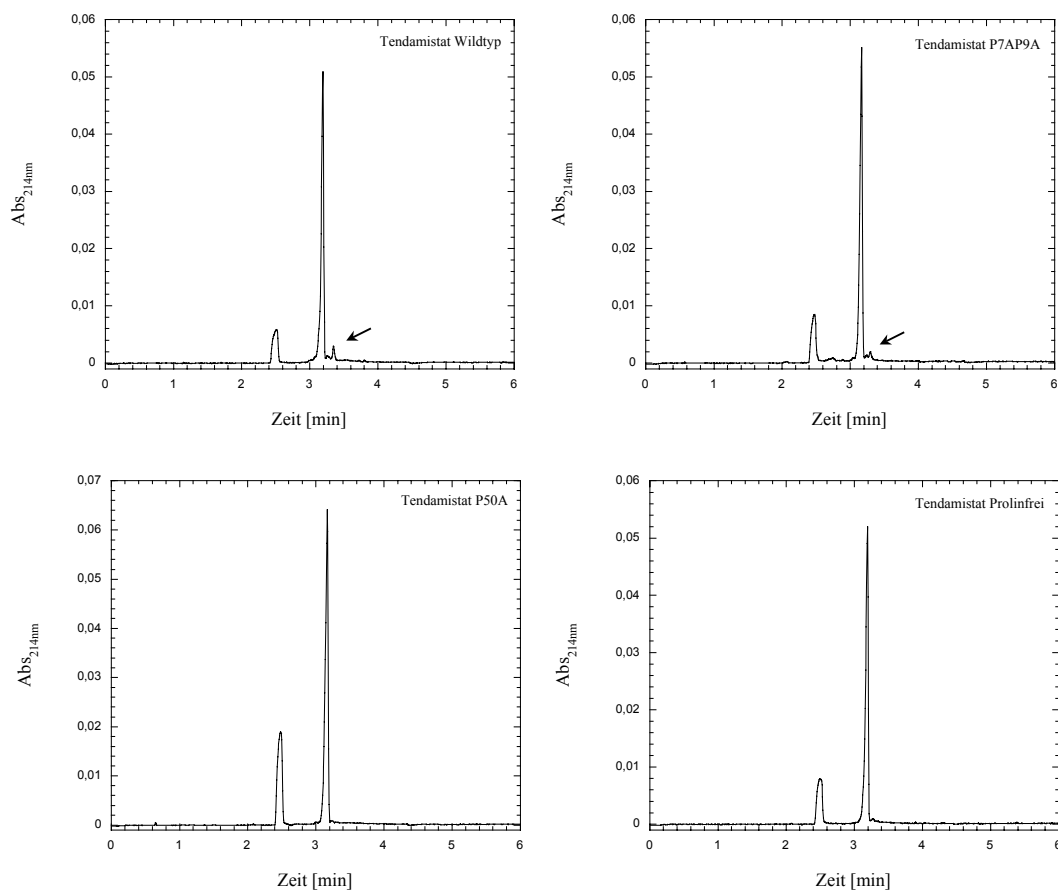


Abbildung 4-23 Kapillarelektrophorese der einzelnen Mutanten. Als Laufpuffer diente 10mM Tricin pH8.0. Bei Tendamistat Wildtyp sowie bei der Mutanten P7AP9A kann eine kleinere Bande bei 3.28min (Wildtyp) bzw. 3.25min (P7AP9A) detektiert werden (↑). Der Lauf wurde bei 20°C und einer Spannung von 20kV durchgeführt.

## 4.1.7. Spektroskopie

### 4.1.7.1. UV-Spektroskopie

Die zuvor aufgereinigten und charakterisierten Mutanten sollten als nächstes über UV-Spektroskopie analysiert werden. Dazu wurden die zuvor portionierten und schockgefrorenen Proteinlösungen zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Jeweils 20µl dieser Lösung wurden entnommen und auf 500µl mit dest. Wasser verdünnt. Mit diesen Proben konnte anschließend über den spezifischen Absorptionskoeffizienten ( $A_{276\text{nm}}^{1\%} = 16.1$ ) die Proteinkonzentration bestimmt werden. Da durch die unterschiedlichen Substitutionen (Pro → Ala) keine

Veränderungen der internen Chromophore (Trp, Tyr, Phe und Cys) stattgefunden hatte, konnte der Absorptionskoeffizient des Wildtyps direkt übernommen werden. Entsprechend der Konzentration wurden die Proteinlösungen anschließend mit 200mM Cacodylatpuffer pH7.0 und dest. Wasser auf 0.31mg/ml ( $A_{276\text{nm}} = 0.5$ ) verdünnt. Vor der eigentlichen Messung wurden sämtliche Proben durch 0.2 $\mu\text{m}$  Celluloseacetefilter direkt in die Meßküvette (1ml Schlitzküvette, 1cm) filtriert.

Neben der Möglichkeit, Proteine thermisch zu entfalten, lassen sich Proteine auch „kalt“ durch chaotrope Zusätze wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff denaturieren. Im Vergleich zu Guanidiniumhydrochlorid ist Harnstoff ein „milderes“ Denaturierungsmittel. Wie durch denaturierende Harnstoffgele gezeigt werden konnte, reichen Konzentrationen bis zu 9M Harnstoff nicht aus (25°C), um neben dem Wildtyp die hergestellten Prolinmutanten bei pH7.0 zu entfalten. Deshalb wurde für alle weiteren Messungen Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) als Denaturierungsmittel eingesetzt. Die Qualität des verwendeten Denaturierungsmittels ist dabei entscheidend. Die besten Resultate, bei niedrigstem Hintergrund konnten mit dem GdmCl der Firma ICN erhalten werden. Für die Messung der UV-Absorptionsspektren wurde zunächst eine gesättigte Stammlösung GdmCl in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 angesetzt und über Nacht gerührt. Am darauffolgenden Tag wurde der pH-Wert dieser Lösung erneut vermessen und nachtitriert. Danach konnte die Lösung durch Nylonfilter (0.2 $\mu\text{m}$ ) filtriert und die eigentliche Konzentration über den Brechungsindex (25°C) bestimmt werden. Diese Art der Bestimmung ist notwendig, da sich aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von GdmCl stets eine unbekannte Menge Wasser im Feststoff befindet. Für die Herstellung von denaturierten Proteinlösungen wurden entsprechende Mengen an Stammlösung 1:1 mit 200mM Cacodylatpuffer pH7.0 versetzt und auf 100 $\mu\text{l}$  mit 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 aufgefüllt. Zu diesen Lösungen wurde 900 $\mu\text{l}$  frisch hergestellte Denaturierungslösung (8.2M GdmCl) zugegeben, das Ganze gut vermischt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Außer durch Zusatz chaotroper Reagenzien sollten die Tendamiostat Mutanten zusätzlich thermisch entfaltet und charakterisiert werden. Hierzu wurden zunächst Verdünnungen der einzelnen Stammlösungen 1:1 mit 200mM Cacodylatpuffer pH7.0 hergestellt. Um die Messungen durch Luftblasenbildung nicht zu beeinträchtigen, wurde jede Lösung vor der eigentlichen Messung im Exiccator entgast (Wasserstrahlvakuum). Sämtliche Messungen erfolgten an einem Carry 1 UV-VIS Spektralphotometer, ausgestattet mit einer Peltier-Kühleinheit.

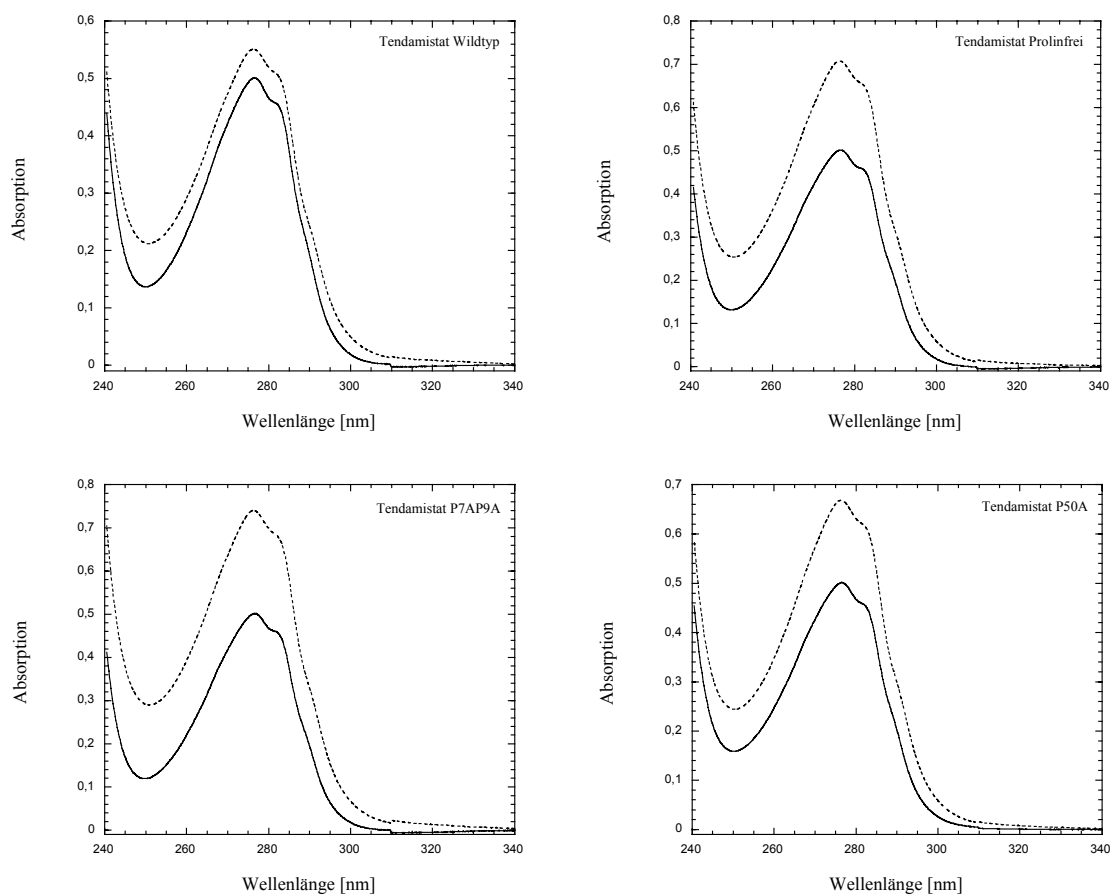


Abbildung 4-24 UV-Spektren der einzelnen Tendamistat Mutanten in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (—) bzw. 7.38M GdmCl, 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (·····). Die Proteinkonzentration beträgt in sämtlichen Proben 0.31mg/ml ( $A_{276\text{nm}} = 0.5$ , dest. Wasser).

Der eingestellte Bereich reichte dabei von 240nm bis 340nm. Bei einer Geschwindigkeit von 107nm/min betrug die spektrale Auflösung 0.17nm (Schlitzweite 1nm). Vor der eigentlichen Messung erfolgte stets eine Temperierung der jeweiligen Proben auf 25°C (30min). Für jede Probe wurden insgesamt 5 Durchläufe aufgenommen und daraus der Mittelwert berechnet (Abbildung 4-24). Wie aus den Spektren zu entnehmen ist, weisen die einzelnen Nativzustände (—) ähnliche Absorptionsprofile über den gesamten Wellenlängenbereich auf. Dominiert wird das Spektrum um 276nm (WT: 276.2nm; P7AP9A/P50A: 276.6nm (Prolinfrei); P7AP9A: 276.6nm und P50A: 276.6nm) von einem charakteristischen Absorptionsmaximum, das bei etwa 281nm (WT: 281.2nm; Prolinfrei: 281.3nm; P7AP9A: 281.3nm und P50A: 281.7nm) in eine Absorptionsschulter übergeht. Mit steigender Wellenlänge geht dieses Nebenmaximum bei etwa

289nm in eine schwache Absorptionsschulter über (WT: 289.2nm; Prolinfrei: 288.5nm; P7AP9A: 290.3nm und P50A: 288.5nm).

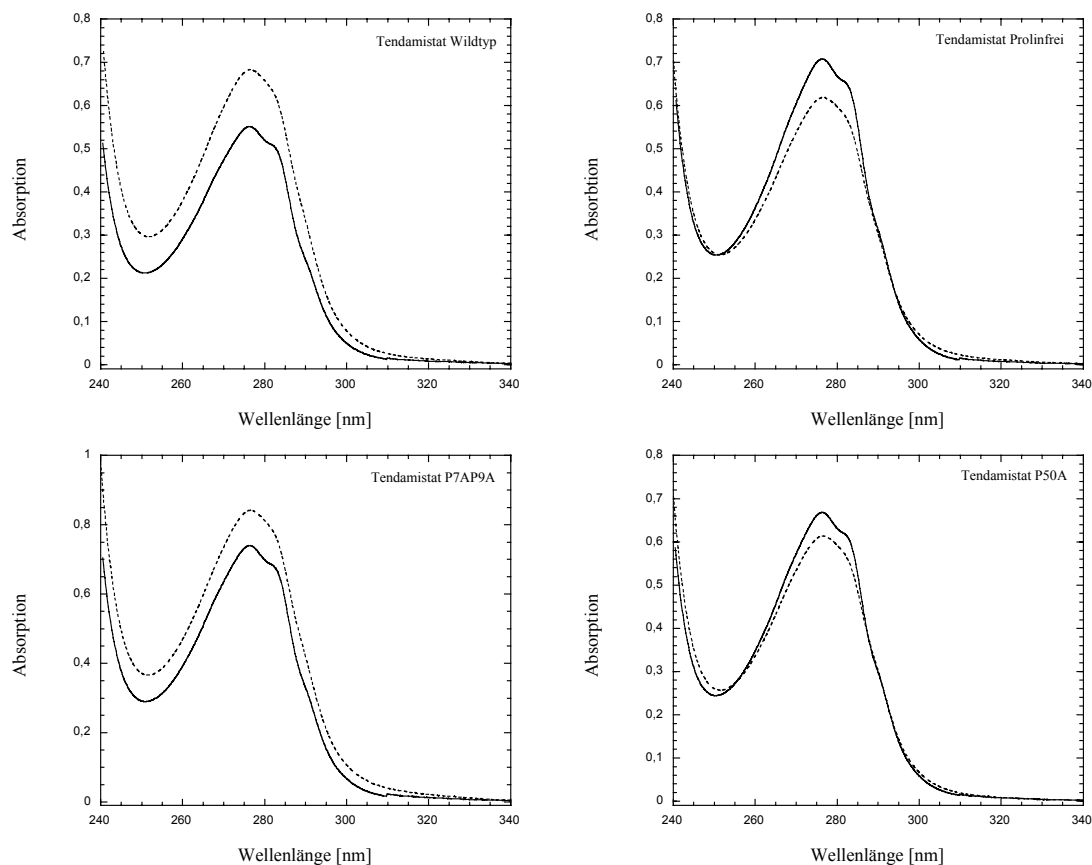


Abbildung 4-25 Vergleich der thermisch (·····) und kalt (—) denaturierten Proteine. Die Proteinkonzentration beträgt in sämtlichen Proben 0.31mg/ml ( $A_{276\text{nm}} = 0.5$ ).

Unterhalb von 276nm zeigen sämtliche Spektren ein Minimum bei 250nm (WT: 249.9; Prolinfrei: 250.1nm; P7AP9A: 249.9nm und P50A: 250.2nm) auf. Entfaltet man die Proteine mit Hilfe von Guanidiniumhydrochlorid (·····) kann im gesamten Wellenlängenbereich ein Anstieg der Absorption beobachtet werden (Hyperchromie). Beim Wildtyp ist dieser Anstieg weniger deutlich ausgeprägt als bei den anderen drei Mutanten. Am deutlichsten lässt er sich bei der P7AP9A Mutante beobachten. Die Wellenlängen der Absorptionmaxima bzw. -minima verschieben sich infolge der Denaturierung nur unwesentlich. Erneut zeigt die P7AP9A Mutante die stärksten Veränderungen. Durch die Entfaltung verschiebt sich das relative Absorptionsminimum von 249.9nm nach 251nm (Bathochromie). Entfaltet man die Proteine

thermisch (95°C) anstatt mit GdmCl, kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Absorption über den gesamten Wellenlängenbereich (Hyperchromie). Die Absorption des Wildtyps sowie der Mutante P7AP9A nehmen, anders als bei der GdmCl induzierten Entfaltung, stärker an Intensität zu (Hyperchromie). Auffallend bei 95°C ist ferner, daß Einzelheiten, wie der Übergang in die Nebenabsorption bei 281nm fast vollständig verschwinden und in die Hauptabsorption übergehen (.....). Vergleicht man die Absorptionsspektren des Tendamistat Wildtyps sowie der Mutante P7AP9A mit den Spektren der Mutanten P7AP9AP50A (Prolinfrei) sowie P7AP9A, fällt eine weitere Besonderheit auf: Die thermische Denaturierung führt bei ersteren zu einer deutlich höheren Absorption. Diese Verhältnisse kehren sich bei kalter Denaturierung (—) für die Mutanten P7AP9AP50A sowie P50A um.

#### 4.1.7.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie gehört zu den am meisten eingesetzten Nachweisverfahren für die Detektion von Konformationsumwandlungen. Im Gegensatz zu der UV/VIS Spektroskopie werden bei Fluoreszenzmessungen nur sehr geringe Proteinkonzentrationen (0.005-0.05mg/ml) benötigt. Für Tendamistat wurde eine Proteinkonzentration von 0.033mg/ml gewählt (4.1µM). Sämtliche Fluoreszenzmessungen am Tendamistat sowie den Mutanten erfolgten in einem Hitachi F-4500 Spektralfluorimeter. Nach dem Einschalten des Photometers wurde die Lampe mindestens 30min vorgeheizt. Von jedem Emissionsspektrum wurden mindestens 5 Einzelmessungen akkumuliert und abgespeichert. Die Meßgeschwindigkeit betrug 240nm/min. Angeregt wurde in den meisten Fällen bei 276nm, wobei der aufgezeichnete Wellenlängenbereich von 300nm bis 400nm reichte. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Chromophoren zu verhindern, wurde der Einstrahlschlitz auf eine Weite von 2.5nm herunter- und der Emissionsschlitz auf 20nm heraufgesetzt (PMV700). Alle verwendeten Proben mußten vor dem Einsatz durch 0.2µm Celluloseacetatfilter filtriert oder bei 13000rpm zentrifugiert werden. Zum Einsatz kam eine abgeblendete Quarzküvette mit einer Lichtweglänge von 1cm. Das Fluoreszenzspektrum (Abbildung 4-26) des nativen Proteins weist bei 276nm eine breite Emissionsbande um 348nm auf (100mM Cacodylatpuffer pH7.0). Dieser Wert entspricht dem Emissionsmaximum eines solvatisierten Tryptophans ( $\lambda_{\max} = 348\text{nm}$ ), das sich an Position 18 im Tendamistat befindet.



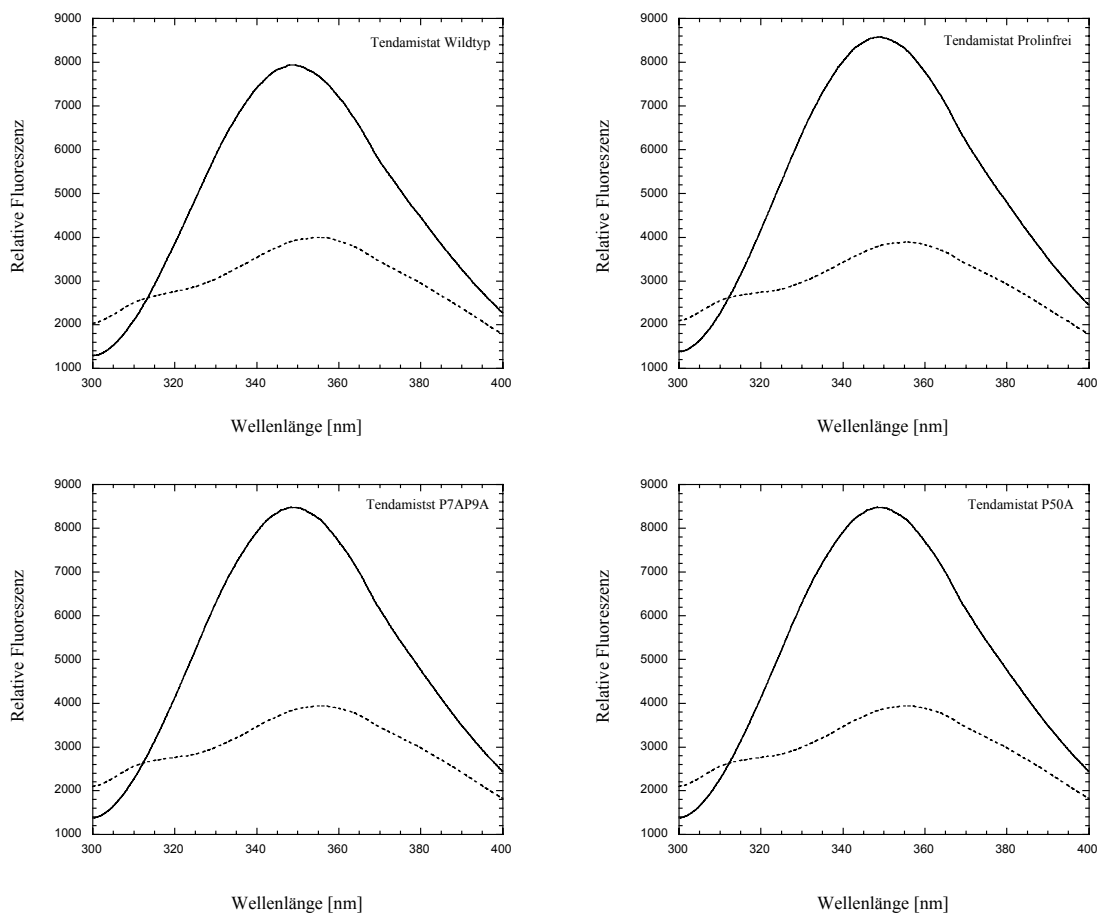


Abbildung 4-26 Fluoreszenzemissionsspektren von Tendamistat sowie den Mutanten P7AP9A (Prolinfrei), P7AP9A und P50A. Eingestrahlt wurde bei 276nm. Die Proteinkonzentration betrug 0.033mg/ml. Gezeigt sind die Fluoreszenzemissionen der nativen (—) sowie denaturierten (•••••) Proteine. Für die Messungen wurde ein Cacodylatpuffersystem verwendet (nativ: 100mM Natriumcacodylat pH7.0 und denaturiert: 100mM Natriumcacodylat pH7.0, 8.15M GdmCl).

Nahezu deckungsgleiche Emissionsprofile ließen sich auch bei den einzelnen Prolinmutanten beobachten (Prolinfrei: 348.5nm; P7AP9A: 348nm und P50A: 348.3nm). Tendamistat besitzt 6 Tyrosine, die ebenfalls bei 276nm angeregt werden, aber zu keiner charakteristischen Emissionsbande um 303nm führen. Denaturiert man das Tendamistat mit 8.15M GdmCl (100mM Cacodylatpuffer pH7.0), nimmt die Intensität der Hauptemissionsbande deutlich ab (WT:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 1.98$ ; Prolinfrei:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.2$ ; P7AP9A:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.14$  und P50A:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.14$ ).

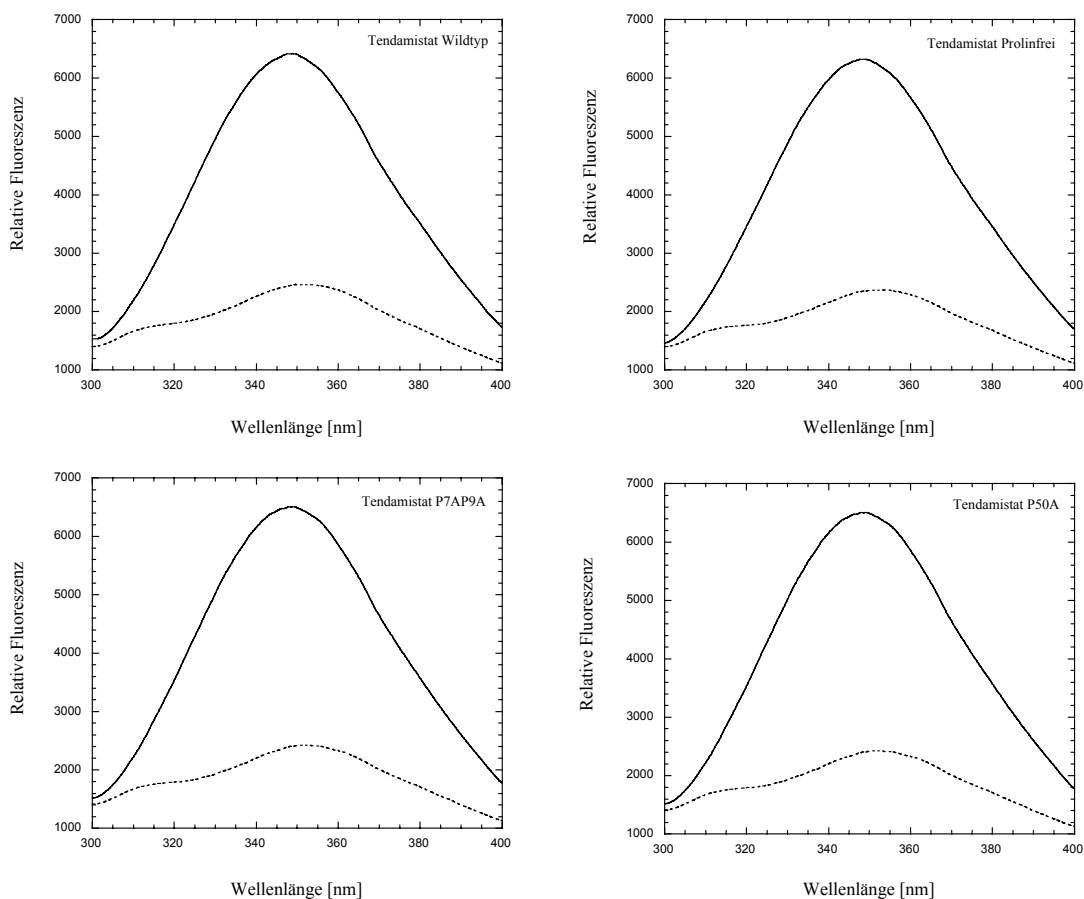


Abbildung 4-27 Fluoreszenzemissionsspektren von Tendamistat sowie den Mutanten P7AP9AP50A (Prolinfrei), P7AP9A und P50A. Eingestrahlt wurde bei 276nm. Die Proteinkonzentration betrug 0.033mg/ml. Gezeigt sind die Fluoreszenzemissionen der nativen (—) sowie denaturierten (.....) Proteine. Für die Messungen wurde ein Glycinpuffersystem verwendet (nativ: 10mM Glycin pH2.0 und denaturiert: 10mM Glycin pH2.0, 6M GdmCl).

Darüberhinaus kommt es nach Entfaltung durch weitere Solvation zu einer charakteristischen Rotverschiebung des Emissionsmaximums von 348nm auf 354.8nm (Prolinfrei: 355.5nm; P7AP9A: 355.5nm und P50A: 355.5nm). Anders als im nativen Protein läßt sich beim entfalten Tendamistat um 315nm eine deutliche Emissionsschulter (Prolinfrei: 316.5nm; P7AP9A: 315.5nm und P50A: 315.5nm) beobachten, die vermutlich durch exponierte Tyrosinreste verursacht wird. Wahrscheinlich wird durch die Entfaltung eine wirksame Kopplung zwischen den Tyrosinen und dem Tryptophanrest verhindert. Messungen bei pH2.0 (10mM Glycin pH2.0, 6M GdmCl) führen zu ähnlichen Emissionsspektren wie bei pH7.0. Im Bereich um 310nm kommt

es bei pH7.0 zu einer Überschneidung der Emissionskurven (— und ····), die sich bei pH2.0 nicht mehr beobachten läßt. Sämtliche Fluoreszenzintensitäten fallen bei pH2.0 gegenüber pH7.0 niedriger aus, wohingegen die Intensitätsverhältnisse deutlich ansteigen (WT:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.6$ ; Prolinfrei:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.66$ ; P7AP9A:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.67$  und P50A:  $E_m^{\text{nativ}}/E_m^{\text{denaturiert}} = 2.68$ ).

Erniedrigt man den pH-Wert der Lösung weiter, bleibt die native Konformation sämtlicher Tendamistat Varianten bis zu pH1.0 erhalten (Abbildung 4-28).

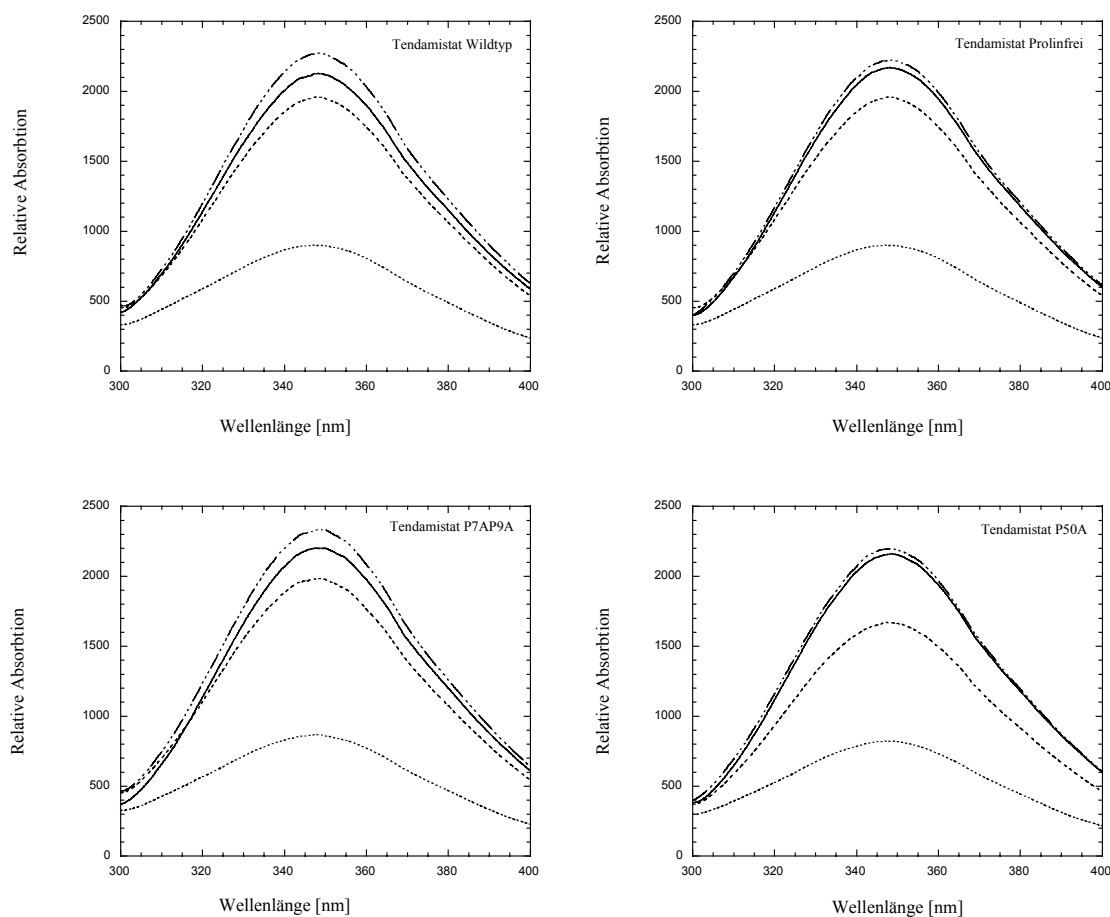


Abbildung 4-28 Fluoreszenzemissionsspektren des Tendamistats sowie der Mutanten P7AP9AP50A (Prolinfrei), P7AP9A und P50A bei einer Anregungswellenlänge von 276nm. Die Proteinkonzentration betrug 0.01mg/ml. Gezeigt sind die Fluoreszenzemissionen bei pH4 (—), pH2.9 (---), pH2 (-·-·-) und pH1 (···). Die einzelnen Messungen wurden in 50mM Natriumacetat (pH4), 50mM Natriumcitrat (pH2.9), 10mM Glycin (pH2) und 0.1N HCl (pH1) durchgeführt.

Die Intensität der erhaltenen Fluoreszenzsignale nimmt zwar deutlich ab, doch resultiert dieser Effekt (Hypochromie) nicht durch eine Entfaltung der nativen Proteinstruktur (WT:  $E_m^{pH4.0}/E_m^{pH1} = 2.35$ ; Prolinfrei:  $E_m^{pH4.0}/E_m^{pH1} = 2.41$ ; P7AP9A:  $E_m^{pH4.0}/E_m^{pH1} = 2.54$  und P50A:  $E_m^{pH4.0}/E_m^{pH1} = 2.63$ ). Hierfür sprechen unterschiedliche Faktoren. Im Gegensatz zu der GdmCl-induzierten Denaturierung bei pH2.0 (Rotverschiebung) kommt es bei pH1.0 (0.1N HCl) zu einer Blauverschiebung der Emissionsmaxima um 1.1-1.3nm. Sowohl bei 8.15M GdmCl pH7.0 als auch bei 6M GdmCl pH2.0 zeigt das Emissionsspektrum um 315nm eine deutliche Tyrosinschulter, die bei pH1.0 nicht beobachtet werden kann. Auffallend ist ferner, daß die Fluoreszenzintensitäten beim Übergang von pH4 auf pH2.9 in allen Proteinen deutlich ansteigen und erst bei pH2.0 unterhalb der Ausgangswerte liegen.

#### 4.1.7.3. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde verwendet um die Konformation der erhaltenen Prolin Mutanten näher zu charakterisieren. Da es sich bei den Substitutionen um einzelne Aminosäuren handelt, die, bis auf Prolin 50 (Typ II Turn), nicht innerhalb von Sekundärstrukturen liegen, war von einem insgesamt geringen Einfluß auf die Konformation des Wildtyps auszugehen. Die CD-Spektren wurden an einem JASCO J-710 Polarimeter aufgenommen. Vor jeder Messung wurde das Gerät 30min mit Stickstoff (3l/min) gespült und danach eingeschaltet. Die Warmlaufzeit der Lampe vor der ersten Messung betrug weitere 30min. Für die Temperierung sorgte eine digitale RTE-100 Thermostatisiereinheit der Firma NESLAB. Sämtliche Messungen wurden bei 20°C durchgeführt. Bei den Messungen im nah-UV (250nm-300nm) Bereich kamen rechteckige Küvetten der Firma HELLMMA (10mm) mit schwarzen Seitenblenden zum Einsatz. Für die Messungen im fern-UV (250nm-180nm) Bereich wurden zylindrische Küvetten der Firma HELLMMA (0.1mm, 0.5mm) sowie STARNA (1mm) eingesetzt. Um Probleme durch die Adsorption von Proteinen an das Quarzglas zu vermeiden, wurden die Küvetten über Nacht stets mit konz. HCl gereinigt. Nach jeder Messung wurden die Küvetten 2x mit dest. Wasser und anschließend mit Methanol (Merck, *UV transparent*) gespült und an der Luft getrocknet.

Tendamistat besaß das charakteristische CD-Spektrum, das bereits in unterschiedlichen Arbeiten (Scharf, 1992; Kallasch, 1992) erhalten werden konnte. Dabei wird das CD-Spektrum dominiert von einer positiven Absorptionsbande bei 230.4nm (P7AP9AP50A: 229.6nm; P7AP9A: 229.8nm und P50A: 230nm) die bei 214nm (P7AP9AP50A: 212.1nm; P7AP9A: 211.2nm und P50A:

215.9nm) in eine negative Absorptionsband bis etwa 192.3nm übergeht (P7AP9AP50A: 190.7nm; P7AP9A: 192.8nm und P50A: 191.6nm).

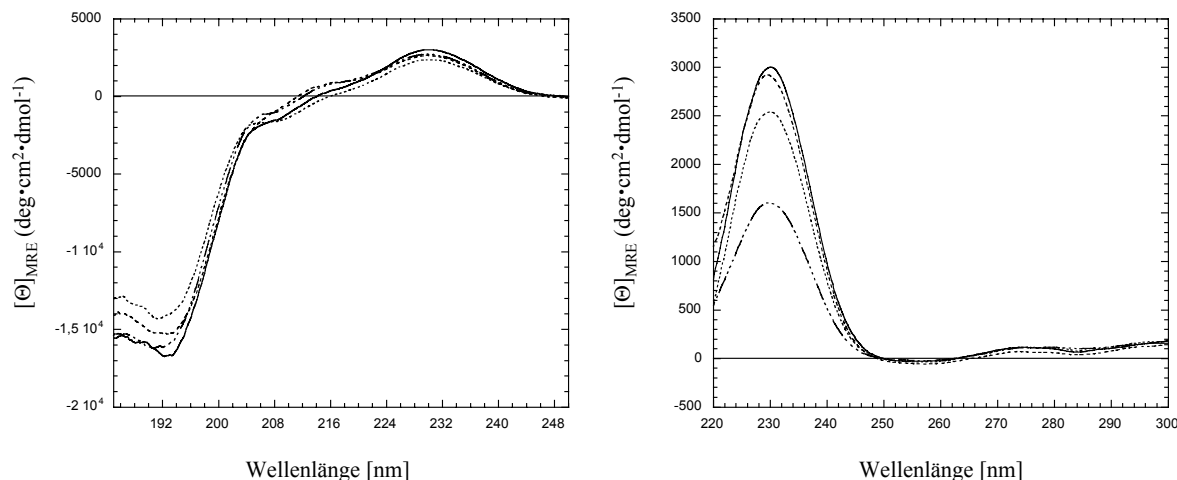


Abbildung 4-29 CD-Spektren des Wildtyps (—) sowie der Mutanten P7AP9A (----), P50A (···) und P7AP9AP50A (— · — ·) im fern-UV (links) und nah-UV (rechts) Bereich. Verwendet wurde 10mM Phosphatpuffer pH7.0 (fern-UV) und 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (nah-UV) bei 20°C. Die Bedingungen für die fern-UV (nah-UV) Spektren waren: Küvette 0.5mm (10mm), Konzentration 0.33mg/ml (0.1mg/ml), Bandbreite 1nm (1nm), Response 4sec (4sec), Auflösung 0.2nm (0.2nm), Geschwindigkeit 5nm/min (20nm/min), Akkumulation 10 (5) und Empfindlichkeit 50mdeg (50mdeg). Die HT Spannung lag im angezeigten Bereich unterhalb von 600mV.

Im Bereich um 200nm weisen  $\beta$ -Faltblattstrukturen normalerweise positive Absorptionsbanden auf. Durch die stark-negative Bande um 200nm ist das CD-Profil von Tendamistat einschließlich seiner Prolinmutanten eher mit der *random coil* Anordnung von poly-(L-Lysin) als mit einem  $\beta$ -Faltblattprotein vergleichbar. Das Minimum um 190nm weist höchstens auf einen hohen Anteil an Turn Strukturen hin, was durch den kompakten Aufbau als  $\beta$ -barrel Protein mit den zahlreichen Umkehrschleifen auch bestätigt wird. Die positive Bande um 230nm läßt sich durch die Spektren kurzer Peptide mit Turn Struktur nicht richtig wiedergeben. Vielmehr dominiert im Bereich oberhalb von 215nm eine breite positive Bande, die wiederum typisch ist für *random coil* Anordnungen von Peptiden und Proteinen. Nach Untersuchungen von Brahm (Brahm, 1980) sind es vor allem die Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin und Cystein, die in diesem Bereich

das CD-Spektrum bestimmen können. Im nah-UV Bereich besitzt Tendamistat keine charakteristischen Elliptizität.

Die Spektren der Mutanten P7AP9A, P50A und P7AP9AP50A (Prolinfrei) sind nahezu deckungsgleich mit dem Wildtyp bis auf den Wellenlängenbereich um 195nm (Abbildung 4-30). Deutliche Abweichungen in der Bandenintensität treten erst um 192nm auf. Signifikanter ist der Unterschied zwischen den einzelnen Varianten bei der positiven Absorptionsbande um 230nm. Bis auf die Mutante P7AP9A weisen die Mutanten P50A und vor allem P7AP9AP50A eine in diesem Bereich gegenüber dem Wildtyp deutlich abgeschwächte Absorption auf.

Auch die Sekundärstruktur denaturierter Proteine wurde über CD-Spektroskopie untersucht. Hierbei konzentrierten sich die Messungen vor allem auf das prolinfreie Tendamistat. Vergleicht man die Spektren nativer und denaturierter Proteine untereinander, kann man beobachten, daß die Differenzabsorptionen letzterer nach den Nulldurchgängen ( $A_L = A_R$ ) kontinuierlich abnehmen.

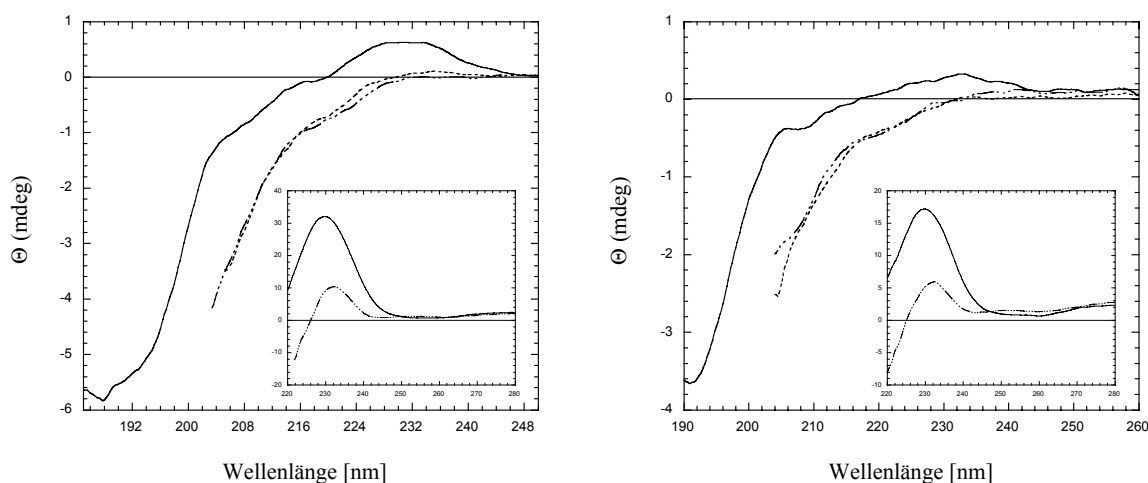


Abbildung 4-30 CD-Spektren des Wildtyps (links) sowie der Mutante P7AP9AP50A (rechts) im fern-UV und nah-UV (klein) Bereich. Für die fern-UV Messungen wurden folgende Pufferlösungen verwendet: 10mM Phosphatpuffer pH7.0 (—), 10mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 (---) und 100mM Cacodylatpuffer 8M GdmCl pH7.0 (----). Für die nah-UV Messungen wurden folgende Pufferlösungen verwendet: 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (—) und 100mM Cacodylatpuffer 8M GdmCl pH7.0 (---). Die Bedingungen für die fern-UV (nah-UV) Spektren waren: Küvette 0.1mm (10mm), Konzentration 2mg/ml (0.1mg/ml), Bandbreite 1nm (1nm), Response 4sec (4sec), Auflösung 0.2nm (0.2nm), Geschwindigkeit 5nm/min (20nm/min), Akkumulation 10 (5) und Empfindlichkeit 50mdeg (50mdeg). Die HT Spannung lag im angezeigten Bereich unterhalb von 600mV.

Sowohl die Nulldurchgänge als auch die Absorptionsmaxima verschieben sich bei beiden Proteinen nach Denaturierung in den längerwelligen Bereich. Die bereits unter nativen Bedingungen beobachtete Absorptionsschulter bei 208nm (Wildtyp) bzw. 206.9nm (Prolinfrei) verschiebt sich ebenfalls in den längerwelligen Anregungsbereich. Gleichzeitig nimmt die Intensität der Hauptmaxima deutlich ab, verschwindet jedoch nicht vollständig, sondern bleibt bei etwa 232nm als positive Bande erhalten. Beim Wildtyp lassen sich zwischen den beiden Puffersystemen 6M GdmCl pH2.0 und 8M GdmCl pH8.0 unterhalb von 216nm keine Unterschiede feststellen. Oberhalb von 216nm unterscheiden sich beide Absorptionsprofile geringfügig. Diese Divergenz tritt beim prolinfreien Tendamistat nicht in Erscheinung. Vergleicht man die CD-Spektren der denaturierten Proteine im nah-UV Bereich miteinander, läßt sich der bereits in den nativen Proteinen vorgefundene Intensitätsunterschied auch nach Verlust der Sekundärstruktur wiederfinden. Dies deutet auf einen unmittelbaren Einfluß der Substitutionen auf die chromophore Umgebung hin.

#### **4.1.8. Thermisch induzierte Entfaltung**

Neben der Stabilität gegenüber GdmCl, wurde das thermische Verhalten der einzelnen Mutanten untersucht. Zur Detektion der thermisch induzierten Übergänge kam die UV- und vor allem die CD-Spektroskopie zum Einsatz. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den bereits „kalt“ durchgeführten Entfaltungen zu gewährleisten, wurden sämtliche Messungen in 100mM Natriumcacodylatpuffer pH7.0 durchgeführt. Um eine Entgasung der Proteinlösung während der Meßvorgangs zu unterbinden, mußten die Proben zuvor sorgfältig im Wasserstrahlvakuum entgast werden. Bei der Messung des Circular dichroismus betrug die Proteinkonzentration 0.1mg/ml. Gemessen wurde dabei an einem Jasco J-710 Spektralpolarimeter in einer speziellen, von außen mit Flüssigkeit temperierbaren 1mm Rundküvette (Jasco). Für die Absorptionsmessungen kamen an einem Cary1 UV-VIS Spektralphotometer eine abgeblendete Rechteckküvette zum Einsatz. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug hier 0.5mg/ml. Nach jeder Messung wurde die Küvette mehrmals mit dest. Wasser und reinem Methanol ausgespült und über Druckluft getrocknet. Bei hartnäckigen Adsorptionen (Leermessung) kam eine Behandlung über Nacht mit konz. HCl zum Einsatz.

Zur Ermittlung der Übergangstemperatur  $T_m$  sowie der Enthalpie  $\Delta H_m$  wurde eine Ausgleichsfunktion an die Datenwerte angepaßt:

$$n(T) = \frac{(n_N^{\circ} + m_N [T]) + (n_U^{\circ} + m_U [T]) \exp^{-(\Delta G(T)/RT)}}{1 + \exp^{-(\Delta G(T)/RT)}}$$

Die frei Enthalpie  $\Delta G(T)$  in Abhängigkeit von der Temperatur  $T$  kann auch in einer allgemeineren Form dargestellt und in die Funktion eingesetzt werden (Schellman, 1987):

$$\Delta G(T) = \Delta H_m (1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T / T_m)]$$

$\Delta H_m$  beschreibt in dieser Funktion die Enthalpie (Übergangsenthalpie) bei der Temperatur  $T_m$  und  $\Delta C_p$  die bei der Entfaltung freigesetzte molare Wärmekapazität. Die endgültige Form der Funktion enthält somit 7 freie Parameter, die in der Praxis häufig zu instabilen Regressionen führen (Nölting, 1999). Deutlich bessere Resultate konnten nach Abzug der beiden Basislinien  $n_N$  und  $n_U$  erhalten werden. Basierend auf dem Zwei-Zustands Modell wurde hierzu zunächst eine etwas allgemeinere Ausgleichsfunktion eingesetzt:

$$n(T) = \frac{(n_N^{\circ} + m_N [T]) + (n_U^{\circ} + m_U [T]) \exp^{-a(T-b)}}{1 + \exp^{-a(T-b)}}$$

Die nach Regression erhaltenen Größen  $n_N^{\circ}$ ,  $m_N$ ,  $n_U^{\circ}$  und  $m_U$  wurden von den gemessenen Datenwerten  $n(T)$  subtrahiert, wodurch eine auf 1 normierte Funktion erhalten werden konnte. Da für sämtliche sigmoidalen Übergangskurven das Zwei-Zustandsmodell zugrunde lag, entspricht die erhaltene Funktion dem fraktionellen Anteil an nativem Protein  $F(N)$ . Entsprechend gilt für den fraktionellen Anteil  $F(U)$  die Beziehung:  $F(U) = 1 - F(N)$ . An die dadurch erhaltenen Datenwerte kann nun eine von der ursprünglichen Ausgleichsfunktion  $n(T)$  abgeleitete Funktion  $n'(T)$  angepaßt werden:

$$n'(T) = \frac{1}{1 + \exp^{-(\Delta H_m (1-T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T / T_m)]) / RT}}$$



Diese Funktion enthält nur noch drei Variablen ( $\Delta H_m$ ,  $T_m$  und  $\Delta C_p$ ), die sich aus den Meßpunkten hinreichend genau berechnen lassen. Die  $\Delta C_p$  Werte waren bei den durchgeführten Regressionen stets mit Fehlern in der Größenordnung von 20-30% (Wildtyp) behaftet und wurden daher nicht in die nachfolgenden Betrachtungen einbezogen.

Zunächst wurden die thermisch induzierten Übergänge (Abbildung 4-31) anhand der Elliptizität bei 230nm (CD) bzw. 282nm (UV-VIS) untersucht. Für beide Meßsysteme wurde ein Temperaturgradient von 45°C/h gefahren.

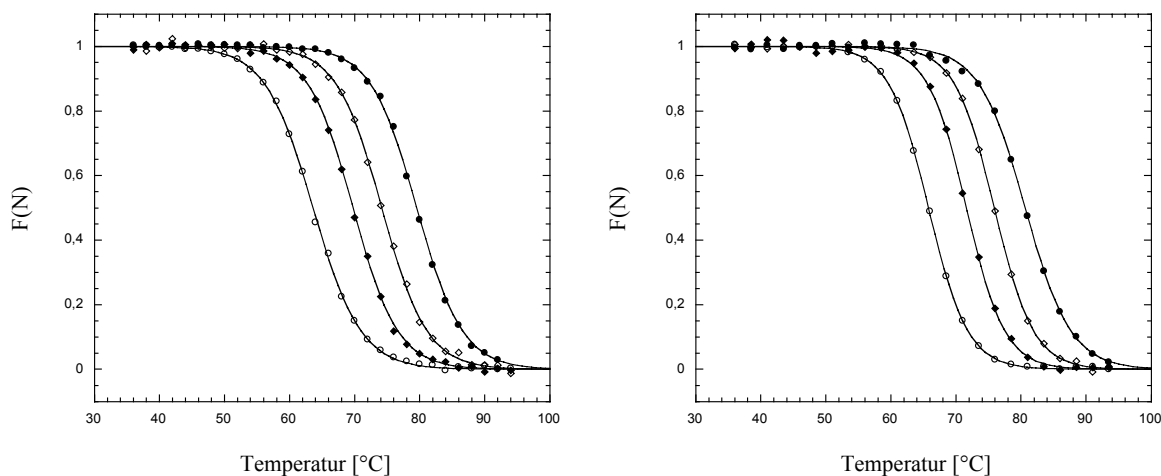


Abbildung 4-31 Die nach Abzug der Basislinien erhaltenen Rohdaten aus den CD (links) bzw. UV/VIS (rechts) Messungen. Gezeigt ist der Wildtyp (●) sowie die Mutanten Prolinfrei (○), P50A (◇) und P7AP9A (◆). Folgende Bedingungen wurden bei den Messungen verwendet: 100mM Natriumcacodylatpuffer pH7.0; Temperaturgradient 45°C/h; Responszeit 8sec; Bandbreite 2nm (CD) bzw. 1nm (UV-VIS) und Auflösung 0.2°C.

Langsamere Temperaturgradienten erbrachten nahezu identische Übergangskurven, wodurch thermische Ungleichgewichte hinsichtlich der Küvettenhermostatisierung ausgeschlossen werden konnten. Dabei fiel auf, daß die Übergangskurven bei den UV-VIS Spektren sämtlicher Proteine deutliche Basislinienneigungen aufwiesen. Die Messung der Übergangskurven am CD-Polarimeter blieb hingegen sowohl im Nieder- als auch im Hochtemperaturbereich an den Basislinien nahezu ohne Steigung und untereinander kongruent. Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse, fällt auf, daß die Stabilität mit zunehmendem Substitutionsgrad stetig abnimmt (Tabelle 4-13). Die Substitution eines Prolins bei der P50A Mutante führt im Vergleich zum Wildtyp zu keinem nennenswerten Einbruch des Enthalpiebetrags  $\Delta H_m$ . Bei der Doppelmutante

kommt es hingegen zu einer geringfügigen Absenkung, die sich bis zur Dreifachmutante weiter fortsetzt. Dieser Effekt verhält sich jedoch nicht additiv ( $\Delta H_{\text{Wildtyp}} - \Delta \Delta H_{\text{P50A}} - \Delta \Delta H_{\text{P7AP9A}} = 278.8$  kJ/mol). Bis auf geringfügige Abweichungen zeigen die über UV/VIS ermittelten Übergangstemperaturen  $T_m$  eine gute Übereinstimmung mit den CD Daten. Mit Ausnahme des Wildtyps treten jedoch große Abweichungen bei den einzelnen Enthalpiewerten auf. Sämtliche über UV-VIS abgeleiteten  $\Delta H_m$  Werte lagen dabei deutlich höher als die über CD berechneten Enthalpien.

	$T_m$ [°K]	$\Delta H_m^{1)}$ [kJ/mol]		$T_m$ [°K]	$\Delta H_m^{1)}$ [kJ/mol]
<b>CD (230nm)</b>			<b>CD (230nm)</b>		
Wildtyp	352.7	294.07	P7AP9A	342.91	283.88
P7AP9AP50A	336.76	256.61	P50A	347.33	289
<b>UV (282nm)</b>			<b>UV (282nm)</b>		
Wildtyp	353.81	296.23	P7AP9A	344.7	334.9
P7AP9AP50A	338.92	315.53	P50A	349.04	334.9

<sup>1)</sup> der  $\Delta H_m$  Wert ist hier positiv definiert (Schellman, 1987).

Tabelle 4-13 Die über CD und UV-VIS erhaltenen Daten aus den Übergangskurven. Die  $\Delta C_p$  Werte sind in dieser Tabelle nicht dargestellt.

Als nächstes wurde die Stabilität des Wildtyps sowie des prolinfreien Tendamistats in Abhängigkeit vom pH Wert untersucht (Abbildung 4-32). Tendamistat liegt durch seinen niedrigen isoelektrischen Punkt von 4.35 bei pH7.0 als negativ geladenes Protein vor. Daher war es anzunehmen, daß bei sehr niedrigen pH Werten - unterhalb von pH4.35 - eine Destabilisierung der Struktur durch die Protonierung einzelner Seitenketten auftritt. Da die eingeführten Substitutionen (Pro → Ala) zu keiner Veränderung des Ladungsgleichgewichtes (Asp, Glu, Arg, Lys und His) führen, war davon auszugehen, daß ähnliche pI Werte auch im prolinfreien Tendamistat vorliegen. Wegen der besseren Basislinienstabilität wurden die Übergangskurven anhand ihrer Elliptizitätsänderung  $\Theta$  ermittelt. Leider ließen sich die Übergangskurven des Tendamistat Wildtyps unterhalb von pH7.0 für eine rechnerische Auswertung nicht einsetzen, da durch die hohen Übergangstemperaturen (um 85°C) die Basislinien bis 95°C nicht erreicht werden konnten.

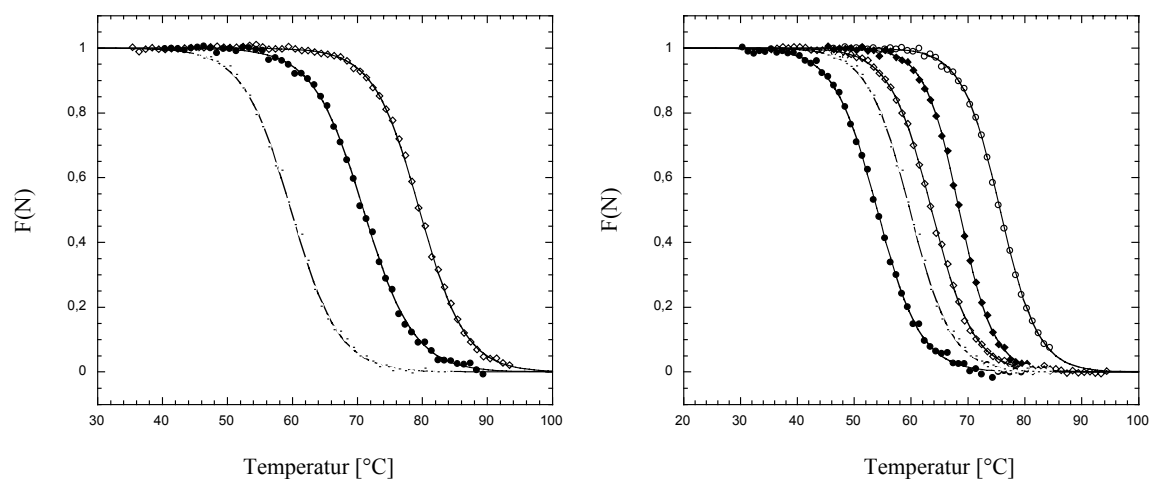


Abbildung 4-32 pH Abhängigkeit der Übergangstemperaturen von Tendamistat Wildtyp (links) sowie der prolinfreien Mutante (rechts). Folgende Bedingungen wurden bei den Messungen verwendet: pH2.0 30mM Citratpuffer (●); pH5.0 50mM Acetatpuffer (○); pH6.0 30mM Citratpuffer (◆); pH7.0 100mM Cacodylatpuffer (◇); pH8.0 50mM Boratpuffer (⊙); Temperaturgradient 45°C/h; Responzeit 8sec; Bandbreite 2nm und Auflösung 0.2°C.

Im Gegensatz dazu konnten die Messungen bei der prolinfreien Variante sowohl bei pH5.0 als auch bei pH6.0 erfolgreich durchgeführt werden. Wegen möglicher Aggregation im Bereich des isoelektrischen Punktes wurden Messungen um pH4.0 ebenfalls nicht durchgeführt. Beim prolinfreien Tendamistat ist deutlich eine Stabilisierung des Proteins nach Erniedrigung des pH Wertes zu erkennen (Tabelle 4-14).

	<i>pH2.0</i>	<i>pH5.0</i>	<i>pH6.0</i>	<i>pH7.0</i>	<i>pH8.0</i>
<b>Wildtyp</b>					
$T_m$	343.16 °K	-	-	352.7 °K	347.63 °K
$\Delta H_m^{1)}$	252.41 kJ/mol	-	-	294.07 kJ/mol	276.98 kJ/mol
<b>Prolinfrei</b>					
$T_m$	326.78 °K	347.7 °K	341.37 °K	336.76 °K	332.19 °K
$\Delta H_m^{1)}$	228.6 kJ/mol	316.42 kJ/mol	322.45 kJ/mol	256.61 kJ/mol	236.43 kJ/mol

<sup>1)</sup> der  $\Delta H_m$  Wert ist hier positiv definiert (Schellman, 1987).

Tabelle 4-14 pH Abhängigkeit der Übergangstemperatur ( $T_m$ ) sowie der Enthalpie ( $\Delta H_m$ ) bei Tendamistat Wildtyp und dem prolinfreien Tendamistat.

Dieser Effekt ist die Folge eines drastischen Anstiegs der Enthalpie  $\Delta H_m$ . Unterhalb des isoelektrischen Punktes (Wildtyp: pH4.35) kehrt sich der stabilisierende Einfluß wieder um. Die Enthalpie bei pH2.0 (228.6 kJ/mol) fällt dabei deutlich unter 256 kJ/mol (pH7.0). Oberhalb von pH7.0 kommt es ebenfalls zu einer Destabilisierung beider Proteine. Die dabei auftretenden Enthalpieverluste sind in beiden Fällen miteinander vergleichbar und liegen in der Größenordnung von 20kJ/mol. Für diesen Effekt ist wahrscheinlich eine Deprotonierung der Imidazol Funktion verantwortlich (His64 und His66). Freies Histidin besitzt einen  $pK_a$  Wert von 7.0 ( $\text{HisH}^+ \rightleftharpoons \text{His}$ ). Oberhalb von pH7.0 könnte es daher zu einer Zerstörung von Wasserstoff- bzw. Salzbrücken gekommen sein.

Als nächstes wurde die thermische Stabilität von Tendamistat in Gegenwart unterschiedlicher GdmCl-Konzentrationen untersucht (Abbildung 4-33). Wie zu erwarten geht aus diesen Messungen eindeutig hervor, daß höhere GdmCl Konzentrationen zu einer Erniedrigung der Übergangstemperatur  $T_m$  führen. Die erhaltenen  $T_m$  Werte sind dabei linear von der Konzentration des zugesetzten Denaturierungsmittels abhängig.

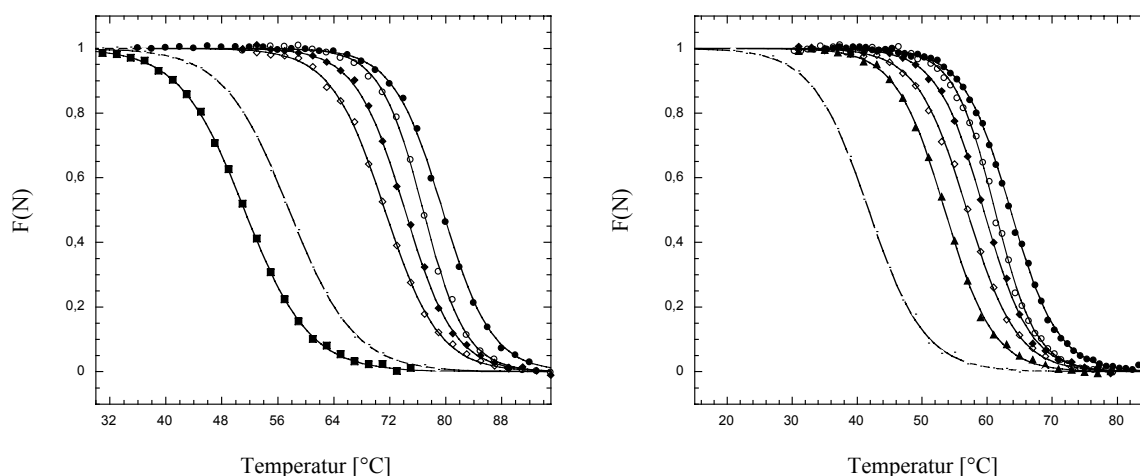


Abbildung 4-33 Thermisch induzierte Entfaltung des Tendamistat Wildtyps (links) sowie der Mutanten P7AP9AP50A in Gegenwart unterschiedlicher GdmCl Konzentrationen. Dargestellt sind die auf 1 normierten Übergangskurven bei den Konzentrationen: 0M (●); 0.415M (○); 0.826M (◆); 1.24M (◇); 1.66M (▲); 3.08M (◎) und 3.96M (■) GdmCl.

Diese Abhängigkeit liefert für die beiden untersuchten Proteine (Wildtyp und P7AP9AP50A), trotz großer Unterschiede in ihrer Stabilität, ähnliche Steigungswerte (WT:  $\partial T_m / \partial M = -7.18$

[Kmol<sup>-1</sup>] sowie P7AP9AP50A:  $\partial T_m/\partial M = -7.2$  [Kmol<sup>-1</sup>]). Dieser Einfluß ist damit unabhängig von der eingeführten Pro → Ala Substitution im Tendamistat. Wie erwartet, ändern sich die berechneten  $\Delta H_m$  Werte unter dem Einfluß von GdmCl ebenfalls (Tabelle 4-15). Parallel zur Abnahme der Übergangstemperatur  $T_m$  kommt es mit steigender Konzentration an GdmCl zu einer Erniedrigung der Enthalpie  $\Delta H_m$ . Die dabei auftretenden Schwankungen sind im Vergleich zur Übergangstemperatur stärker ausgeprägt. Eine entsprechende Regression der Enthalpiewerte, die darüberhinaus einen Betrag für die molare Wärmekapazität  $\Delta C_p$  nach:

$$\frac{\partial \Delta H_m}{\partial T_m} \cong \Delta C_p$$

erbracht hätte, konnte daher nicht durchgeführt werden. In beiden untersuchten Proteinen fällt jedoch eine weitere Besonderheit im Enthalpieverlauf auf. Betrachtet man nämlich die  $\Delta H_m$  Werte beider Proteine in Gegenwart von 0.45M GdmCl, kann man einen Anstieg der Enthalpie von etwa 38 kJ/mol beobachten (WT: 38.14 kJ/mol und P7AP9AP50A: 37.45 kJ/mol). Bei einer Konzentration von 0.63M GdmCl ist dieser Effekt ebenfalls detektierbar.

	<i>Tendamistat Wildtyp</i>		<i>Tendamistat prolinfrei</i>	
	$T_m$ [°K]	$\Delta H_m$ <sup>1)</sup> [kJ/mol]	$T_m$ [°K]	$\Delta H_m$ <sup>1)</sup> [kJ/mol]
GdmCl [M]				
0	352.7	294.07	336.76	256.61
0.42	349.94	332.21	334.38	294.06
0.63	348.28	327.64	333.32	273.06
0.83	347.32	284.16	332.65	256.61
1.04	345.41	288.41	331.36	254.59
1.24	344.47	256.08	330.06	235.3
1.46	343.35	273.53	328.12	242.91
1.66	-	-	326.64	235.38
2.24	-	-	321.45	204.6
3.08	330.77	195.45	314.91	191.46

<sup>1)</sup> Der  $\Delta H_m$  Wert ist hier positiv definiert (Schellmann, 1982).

Tabelle 4-15 Ergebnisse der thermisch induzierten Entfaltungsmessungen in Gegenwart unterschiedlicher GdmCl Konzentrationen.

Diese Beobachtungen entsprechen den Ergebnissen aus der Fluoreszenzspektroskopie. Hier

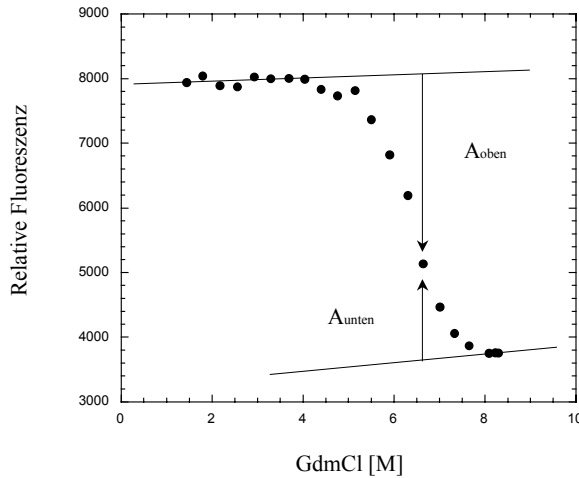
konnten Übergangskurven im Konzentrationsbereich unterhalb von 1M GdmCl nicht verwendet werden, da ein ungewöhnlicher Anstieg der Fluoreszenz die Regression der nativen Basislinie erschwert hatte. Dieser Effekt wird zwar im CD nicht beobachtet, führt jedoch bei der Berechnung der Enthalpiebeiträge ebenfalls zu einer sprunghaften Erhöhung dieser.

#### 4.1.9. Guanidiniumhydrochlorid induzierte Entfaltung

Die Stabilität von Proteinen läßt sich durch GdmCl oder Harnstoff induzierte Entfaltung erhalten. Nach einer einfachen Gleichung existiert ein linearer Zusammenhang zwischen der freien Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{\text{GdmCl},T}$  eines Proteins in Lösung und der Konzentration des darin befindlichen Denaturierungs-mittels D:

$$\Delta G^{\circ}_{\text{GdmCl},T} = \Delta G^{\circ}_{0,T} + m [D]$$

m ist in dieser Gleichung ein Maß für die Abhängigkeit der freien Enthalpie von der Konzentration D (Steigung) und kann Werte zwischen 4 und 12 kJ/molM annehmen. Die eigentlich wichtige Größe stellt der Achsenabschnitt  $\Delta G^{\circ}_{0,T}$  dar. Dieser kennzeichnet die Stabilität eines Proteins im vorgegebenen Puffersystem unter denaturierungsmittel-freien Bedingungen.  $\Delta G^{\circ}_{0,T}$  läßt sich nach Auftragung der über die Gleichgewichtskonstante K berechneten freien Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{\text{GdmCl},T}$  gegen die Konzentration D durch lineare Extrapolation ( $D \rightarrow 0$ ) erhalten. Bei einem Zwei-Zustands Übergang läßt sich die Gleichgewichtskonstante K und damit die Verteilung zwischen N und U sehr einfach über den Verteilungskoeffizienten  $\alpha$  grafisch bestimmen. Hierzu werden zunächst zwei Geraden in die Meßwerte bei hohen (denaturiert) bzw. niedrigen (nativ) Denaturierungsmittelkonzentrationen hineingelegt. Von diesen beiden Geraden lassen sich entsprechende Lote an die jeweiligen Meßpunkte führen. Die dabei gemessenen Abstände  $A_{\text{unten}}$  sowie  $A_{\text{oben}}$  sind Grundlage zur Berechnung von  $\alpha$ . Der Verteilungskoeffizient wiederum steht in reziprokem Verhältnis zur Gleichgewichtskonstante K (Abbildung 4-34). Manuelle Berechnungen dieser Art haben den Vorteil, daß Gewichtungen hinsichtlich der unterschiedlichen Zahl von Meßpunkten sehr gut eingeschätzt und bei der Berechnung berücksichtigt werden können.



$$\alpha = \frac{A_{\text{oben}}}{A_{\text{unten}} + A_{\text{oben}}}$$

$$K = \frac{N}{U} = \frac{1 - \alpha}{\alpha}$$

$$\Delta G_{\text{GdmCl}}^{\circ} = -RT \ln(K)$$

$$\Delta G_{\text{GdmCl}}^{\circ} = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^{\circ} + m [\text{GdmCl}]$$

Abbildung 4-34 Grafische Berechnung der freien Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{0,T}$  über die beiden Abstände  $A_{\text{oben}}$  und  $A_{\text{unten}}$ .

$\alpha$  existiert streng genommen für das gesamte Denaturierungsfenster, läßt sich aber aus rechnerischen Gründen nur aus den Übergangsmesspunkten hinreichend genau ableiten (manuelle Berechnung).

Eine andere Möglichkeit, die freie Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{0,T}$  abzuleiten, besteht darin, direkt an die Meßwerte eine parametrisierte Funktion anzugleichen. Die offenen Parameter werden dabei so gewählt, daß Größen wie die Steigung und die freie Enthalpie direkt als Ergebnis erhalten werden können (Santoro, 1988). Die hierzu verwendete Funktion  $n(D)$  läßt sich auf Grundlage des Zwei-Zustands Modells aus den spektralen Größen  $n_N$ ,  $n_U$  sowie  $n$  analytisch abgeleitet. Diese Meßgrößen stehen dabei mit der Gleichgewichtskonstante  $K$  in einem einfachen Verhältnis:

$$K = \frac{1 - \alpha}{\alpha} = \frac{n - n_U}{n_N - n}$$

$n$  kennzeichnet dabei das beobachtete Gesamtsignal,  $n_N$  die Signalamplitude für das native und  $n_U$  für das denaturierte Protein. Durch den Zusammenhang zwischen der freien Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{\text{GdmCl},T}$  und der Gleichgewichtskonstanten  $K$  läßt sich eine Gleichung ableiten (Santoro, 1988), die berücksichtigt, daß die einzelnen Signalamplituden  $n_N$  und  $n_U$  *linear* mit der GdmCl

Konzentration variieren können:

$$n(T) = \frac{(n_N^o + m_N [T]) + (n_U^o + m_U [T]) \exp^{-(\Delta G_{0,T}^o + m_G [D])RT}}{1 + \exp^{-(\Delta G_{0,T}^o + m_G [D])RT}}$$

Diese Ausgangsgleichung diente als Grundlage für die Regression der erhaltenen Meßdaten.

Die Konformationumwandlung nach Erhöhung der GdmCl Konzentration wurde fluoreszenzspektroskopisch an einem Hitachi F-4500 Spektralfluorimeter bei 25°C gemessen. Die Akkumulation der Daten erfolgte im photometrischen Status über einen Zeitraum von 20sec. Die Anregungswellenlänge betrug in allen Messungen 276nm, wobei das emittierte Licht bei 340nm detektiert wurde. Für sämtliche Meßreihen wurde eine Proteinkonzentration von 0.033mg/ml verwendet (4.1µM). Die unterschiedlichen GdmCl Konzentration ließen sich durch Mischen zweier Lösungen, die bereits das Protein in der Endkonzentration (0.033mg/ml) enthielten, aufbauen.

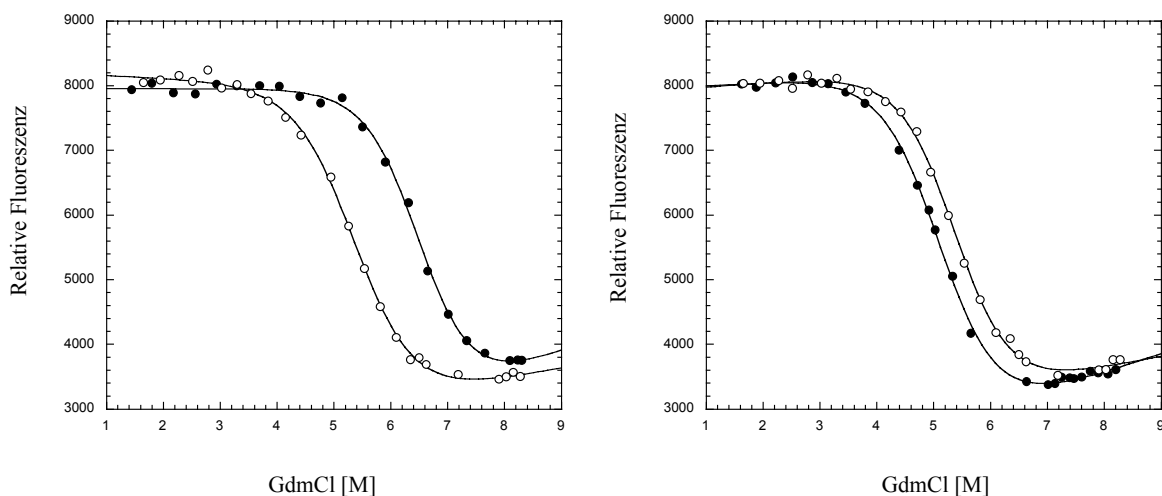


Abbildung 4-35 Grafische Auftragung der Fluoreszenzdaten nach GdmCl induzierter Entfaltung. Links aufgetragen ist der Tendamistat Wildtyp (●) und die P7AP9A Mutante (○). Rechts aufgetragen ist die P7AP9AP50A (●) und die P50A Mutante (○).

Die GdmCl Konzentration konnte vor der Messung über den Brechungsindex genau bestimmt



werden (Lösung A: 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0M GdmCl und Lösung B: 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 8.25M GdmCl). Zum Einstellen des Gleichgewichts wurden sämtliche Lösungen mindestens 1 Stunde bei 25°C inkubiert.

Bei den Messungen zeigten Verdünnungen aller Mutanten einschließlich des Wildtyps im Bereich um 1M GdmCl einen ungewöhnlichen Anstieg der Fluoreszenz (Abbildung 4-35). Dieser Fluoreszenzanstieg ist womöglich auf die Bindung von Chloridionen nahe fluorophorer Gruppen, wie dem exponierten Tryptophan 18, zurückzuführen (Kiefhaber, persönliche Mitteilung). Daher konnten alle Messungen erst ab einer GdmCl Konzentration von 1.5M aufgenommen werden.

Die Meßwerte wurden anschließend grafisch aufgetragen und zunächst manuell ausgewertet. Hierzu mußten zunächst die Basislinien an den linearen Verlauf der sigmoiden Kurve angepaßt werden. Verwendet wurden die Meßpunkte in den beiden Konzentrationsbereichen 1-2M bzw. 7-8M GdmCl. Von den neuen Basislinien ( $n_N$  und  $n_U$ ) konnten im Übergangsbereich die Abstände ( $A_{\text{oben}}$  und  $A_{\text{unten}}$ ) der einzelnen Meßpunkte bestimmt und über die oben angegebene Gleichung in den entsprechenden  $\alpha$ -Wert und damit in die Gleichgewichtskonstante  $K$  umgerechnet werden. Die Daten für die freie Enthalpie  $\Delta G^{\circ}_{\text{GdmCl},T}$  wurden anschließend als Funktion der GdmCl Konzentration aufgetragen (Schellman Plot) und rechnerisch mit Hilfe einer linearen Anpassungsfunktion gegen 0M GdmCl extrapoliert (Abbildung 4-36).

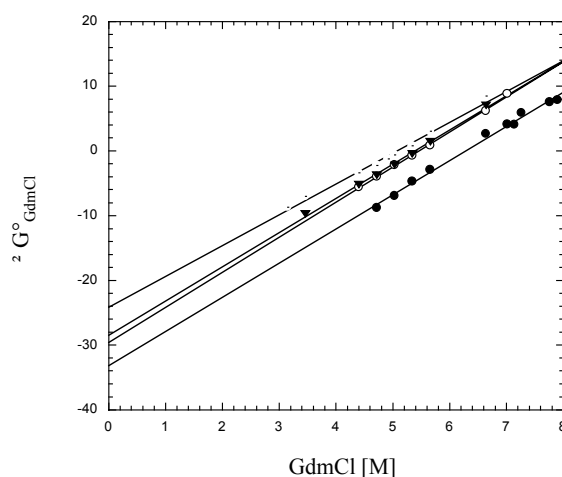


Abbildung 4-36 Schellman Plot nach manueller Auswertung der Fluoreszenz Rohdaten von Tendamistat Wildtyp (●) sowie den Mutanten P7AP9A P50A (◐), P7AP9A (○) und P50A (▼). Die abgebildeten Datenpunkte wurden aus den Meßdaten der einzelnen Proteine im Übergangsbereich abgeleitet.

Bei diesen Extrapolationen werden lediglich die Datenpunkte aus dem Übergangsbereich der einzelnen Proteine berücksichtigt. Berechnete Werte außerhalb dieses Bereichs sind in der Regel mit zu starken Fehlern behaftet. Deshalb fehlen Datenpunkte bei niedrigen GdmCl Konzentrationen.

Um die manuelle Auswertungsmethode besser vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Funktion  $n(D)$ , mit den variablen Parametern  $m$  und  $\Delta G^{\circ}_{0,T}$  an die Meßdaten rechnerisch angepaßt. Die Regression erfolgte mit Hilfe der Software Kaleidagraph (Abelbeck Software, Version 3.0.5). Die Daten aus beiden Methoden sind in der folgenden Tabelle zusammengetragen:

	<i>Tendamistat</i>	<i>P7AP9A</i>	<i>P50A</i>	<i>P7AP9AP50A</i>
<b>Manuell</b>				
GdmCl <sub>1/2</sub>	6.28 M	5.36 M	5.45 M	5.06 M
$\Delta G_{25^{\circ}\text{C}}(\text{H}_2\text{O})$	- 33.2 kJ/mol	- 28.5 kJ/mol	- 29.6 kJ/mol	- 24.12 kJ/mol
m-Wert	5.29 kJ/molM	5.3 kJ/molM	5.4 kJ/molM	4.76 kJ/molM
<b>Analytisch</b>				
GdmCl <sub>1/2</sub>	6.53 ± 0.1 M	5.4 ± 0.05 M	5.37 ± 0.04 M	5.14 ± 0.03 M
$\Delta G_{25^{\circ}\text{C}}(\text{H}_2\text{O})$	- 34.46 ± 3.15 kJ/mol	- 25.43 ± 2.14 kJ/mol	- 28 ± 1.83 kJ/mol	- 24.82 ± 1.38 kJ/mol
m-Wert	5.28 ± 0.54 kJ/molM	4.72 ± 0.41 kJ/molM	5.2 ± 0.35 kJ/molM	4.83 ± 0.27 kJ/molM

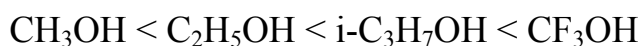
Tabelle 4-16 Manuelle und analytische Auswertung der Fluoreszenzdaten für den Tendamista Wildtyp sowie die Mutanten P7AP9A, P50A und P7AP9AP50A.

Aus den Daten geht hervor, daß der Tendamista Wildtyp die größte Stabilität von allen aufgebauten Varianten besitzt. Mit steigender Zahl an Pro → Ala Substitutionen nimmt die Stabilität der aufgebauten Mutanten rapide ab. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den theoretischen Annahmen, die man für eine solche Substitution erwarten würde. Prolin führt aufgrund seine zyklische Seitenkettenstruktur zu einer konformativen Versteifung des Peptidrückgrats. Alanin hingegen erhöht diese Flexibilität und stabilisiert dadurch N und vor allem U entropisch. Beide Meßmethoden spiegeln dies wieder. Eine Ausnahme stellt die Doppelmutante P7AP9A dar. Die über den Schellman Plot ermittelte Stabilität (-28.5 kJ/mol) dieser Variante ist wie zu erwarten deutlich höher als bei dem prolinfreien Tendamista (-24.12 kJ/mol). Die Stabilität der Einzelmutante P50A (-29.6kJ/mol) hingegen ist von vergleichbarer

Größenordnung. Unabhängig von entropischen Faktoren der Pro → Ala Substitution scheinen daher zusätzliche Einflußgrößen auf die Proteinstruktur eine wichtige Rolle zu spielen. Die berechneten Steigungswerte zwischen dem Wildtyp (5.29 kJ/molM) und P7AP9A (5.3 kJ/molM) sowie P50A (5.4 kJ/molM) sind dagegen von vergleichbarer Größe. Ganz anders verhält sich in dieser Kategorie das prolinfreie Tendamistat (4.76 kJ/mol). Eine solche Veränderung des Steigungswertes, der auch als  $m^-$  Effekt bezeichnet wird, deutet auf eine verbesserte Solvation von N bzw. U hin. Da dieser Effekt jedoch nicht in den Teilmutanten P7AP9A sowie P50A auftritt, würden diese Ergebnisse auf zusätzliche Wechselwirkungen zwischen den Substituenten hindeuten. Die analytisch ermittelten Daten stellen diese Behauptung jedoch in Frage. P7AP9A (-25.43 kJ/mol) besitzt hiernach lediglich eine Stabilität in der Größenordnung von P7AP9AP50A (-24.82 kJ/mol). Die Steigungswerte zwischen dem prolinfreien Tendamistat (4.83 kJ/molM) und der P7AP9A Variante (4.72 kJ/molM) sind nahezu identisch. Diese Ähnlichkeit spricht dafür, daß der beobachtete  $m^-$  Effekt durch die Substitution an Position 7 und 9 verursacht wird.

#### 4.1.10. Methanol induzierte Entfaltung

Die Fähigkeit von Trifluorethanol (TFE)  $\alpha$ -helikale Konformationen in Peptiden und Proteinen zu induzieren, ist in der Literatur bereits hinreichend beschrieben worden (Lehrman, 1990; Shiraki, 1995). Zahlreiche Polymere als auch Proteine nehmen unter dem Einfluß von Alkoholen eine veränderte Konformation in Lösung ein. Dabei nimmt mit zunehmender Kettenlänge des eingesetzten Alkohols (Hydrophobizität), die Tendenz zur  $\alpha$ -Helixbildung zu (Ebert, 1993):



Der Einfluß von Trifluorethanol auf die Konformation von Peptiden oder Proteinen beruht im Wesentlichen auf zwei Aspekten: a) die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Seitenketten werden durch TFE reduziert und b) die Wasserstoffbrücken im Allgemeinen verstärkt (Shiraki, 1995). Bedingt durch beide Effekte verstärkt TFE die lokalen Wechselwirkungen zwischen den benachbarten Aminosäuren. Methanol (MeOH) besitzt als Additiv ähnliche Eigenschaften wie TFE. Im Vergleich zu TFE werden jedoch die Übergänge in  $\alpha$ -helikale Anordnungen erst in wesentlich höheren Konzentrationen induziert (Shiraki, 1995).

Tendamistat läßt sich ab einer Konzentration von 5M TFE in eine Konformation mit  $\alpha$ -helikalem Anteil überführen, die im CD-Spektrum zwei distinkte Minima bei 208nm und 222nm aufweist (Schönbrunner, 1996). Charakteristisch für den kooperativ verlaufenden Übergang ist die Absorption bei 203nm, die sich während des Übergangs nicht verändert (isodichroischer Punkt). Entsprechende Untersuchungen am Tendamistat wurden auch mit MeOH bei pH2.0 durchgeführt. Neben dem Wildtyp kam auch das prolinfreie Tendamistat zum Einsatz.

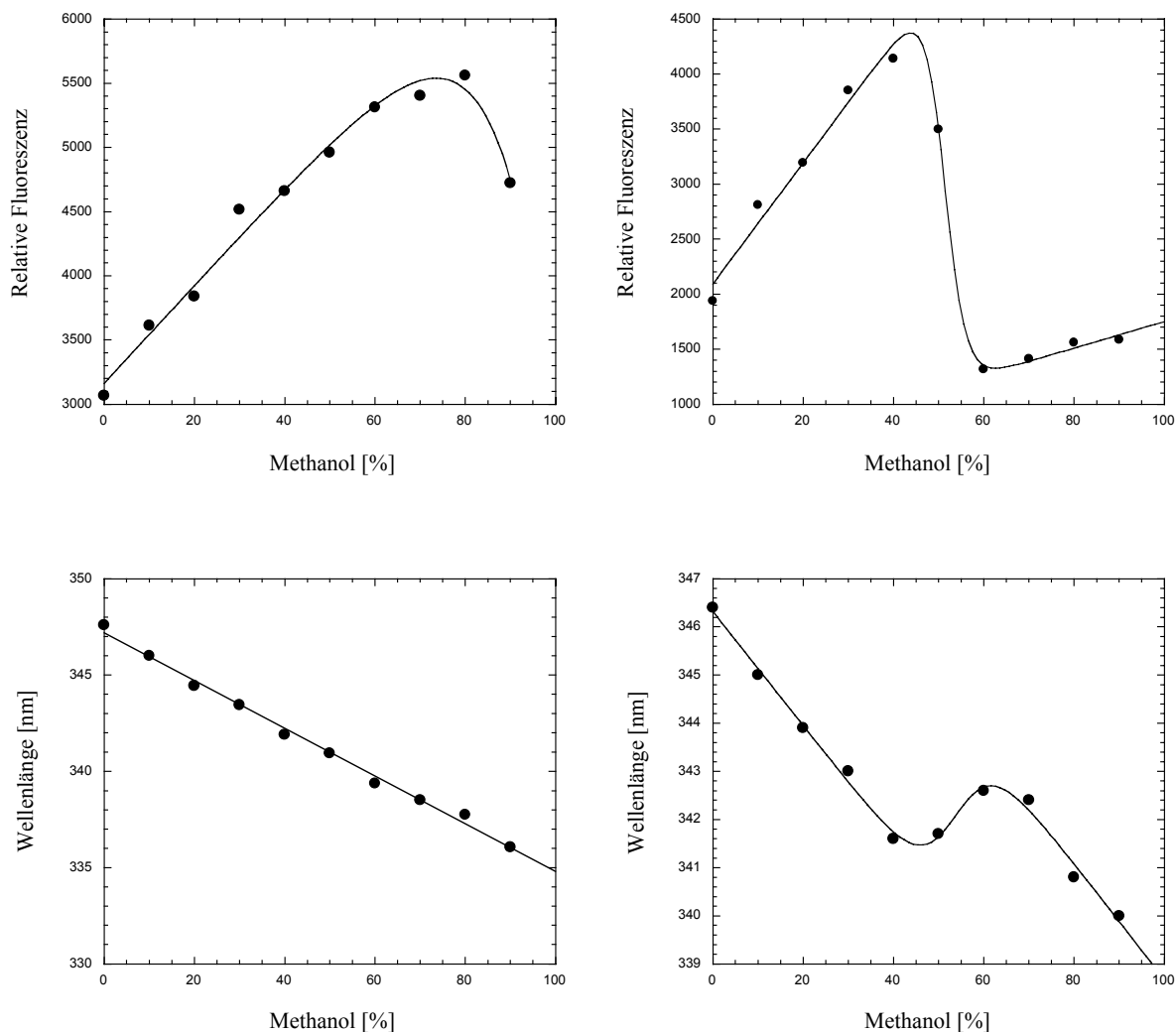


Abbildung 4-37 Methanol induzierte Entfaltung von Tendamistat Wildtyp (links, oben und unten) und der P7AP9AP50A Mutante (rechts, oben und unten) bei pH2.0. In den oberen beiden Bildern ist die Veränderung der Fluoreszenzintensitäten bei 340nm aufgezeigt, in den unteren beiden Bildern hingegen das Verhalten des Emissionsmaximums. Zur Einstellung des pH-Werts wurde konz. TFA eingesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 0.015mg/ml.

Zunächst wurden die durch MeOH induzierten Konformationsumwandlung anhand der Emission bei 340nm untersucht (Abbildung 4-37).

In beiden Proteinen kam es dabei zu einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz nach sukzessiver Erhöhung der MeOH Konzentration. Bei dem prolinfreien Tendamistat nahm die Intensität der Emission bei etwa 40% MeOH wieder ab, bis sie anfang erneut nach etwa 60% anzusteigen.

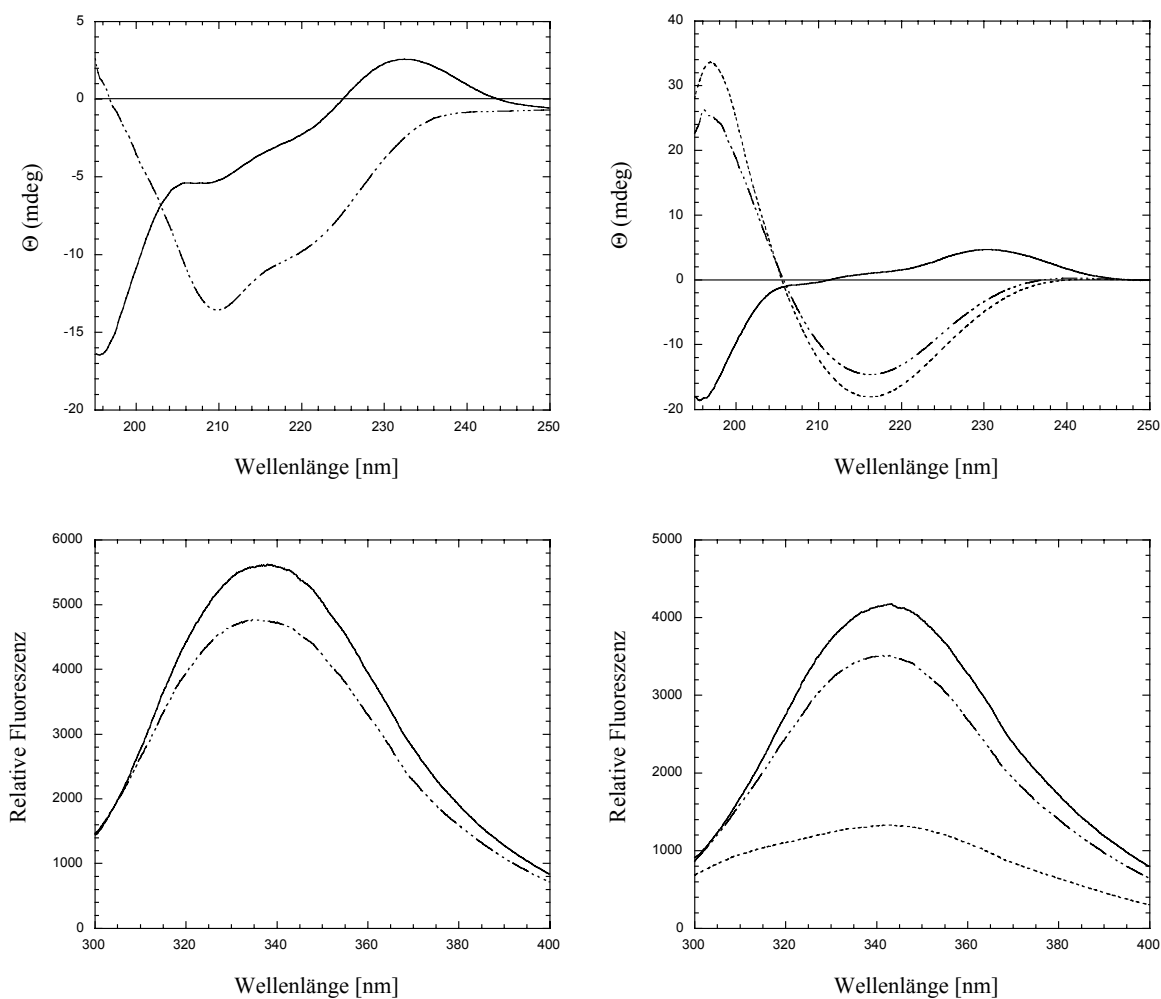


Abbildung 4-38 CD-Spektren und Fluoreszenzspektren des Tendamistat Wildtyps (links, oben und unten), sowie der Mutante P7AP9AP50A (rechts, oben und unten). Für den Wildtyp sind die Konzentrationen 80% (—) und 90% (---) bzw. für die prolinfreie Mutante die Konzentrationen 40% (—), 50% (---) und 60% (----) aufgetragen. Die Proteinkonzentration betrug für die CD Messungen 0.295mg/ml und für die Fluoreszenzmessungen 0.015mg/ml.

An sämtliche Datenpunkte ließ sich eine sigmoidalen Ausgleichsfunktion (Zwei-Zustands Übergang) anpassen (Santoro, 1988). Diese Ausgleichsfunktion erbrachte einen Übergangswert bei 54% MeOH. Bei dem Wildtyp erfolgte der Übergang erst bei deutlich höheren Konzentrationen. Da die Basislinie des zweiten Zustands oberhalb von 90% MeOH nicht genau definiert werden kann, ließ sich in diesem Fall keine Ausgleichsfunktion sinnvoll einsetzen. In beiden Proteinen kam es neben einer Intensitätsveränderung bei 340nm auch zu einer hypsochromen Verschiebung des Emissionsmaximums. Das prolinfreie Tendamistat zeigte auch in diesem Fall einen deutlichen Übergang, der mit einer bathochromen Verschiebung verbunden war und nach Regression einen Übergangswert von 52% MeOH lieferte. Die Veränderung der maximalen Emissionswellenlänge blieb bei dem Wildtyp bis zu 90% MeOH erstaunlich linear (0% MeOH; 347.5nm → 90% MeOH; 333.3nm). Die durch Methanol induzierten Konformationsänderungen wurden als nächstes mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 4-38). In beiden Fällen lagen die verwendeten Methanol Konzentrationen im Übergangsbereich der Fluoreszenzspektren (WT: 80% und 90%; Prolinfrei: 40%, 50% und 60% MeOH). Erhöht man die Konzentration von 80% auf 90% MeOH zeigt das Wildtypspektrum eindeutig eine Veränderung seines Verlaufs. Die Absorption ( $\Delta A = A_L - A_R$ ) bei 203nm bleibt jedoch bei beiden Methanol Konzentrationen erhalten (*isodichroischer* Punkt). Bei 80% MeOH besitzt das Wildtypspektrum nach wie vor einen positiven Absorptionsbereich zwischen 225nm und 243nm, der unter physiologischen Bedingungen ebenfalls vorhanden ist. Erhöht man die MeOH Konzentration auf 90%, verschwindet dieser Bereich vollständig. Stattdessen entwickelt sich eine sehr breite Absorptionsbande im negativen Bereich ( $A_L < A_R$ ), die an Intensität bis 209.8nm stetig zunimmt. Entfernt man sich von dieser Wellenlänge in kürzere Wellenlängenbereiche, kommt es zu einem Anstieg der Amplitude  $\Delta A$ , die bei 197nm in eine positive Absorptionsbande übergeht. Tendamistat besitzt, wie bei allen helikal angeordneten Proteinen üblich, eine zweite Absorptionsschulter bei 218.2nm. Beide für eine  $\alpha$ -Helix charakteristischen Doppelbanden (209.8nm und 218.2nm) kündigen sich bereits in 80% MeOH, durch zwei schwache Absorptionsschultern bei 207.6nm und 217.6nm an. In beiden Doppelbanden liegen bei 80% bzw. 90% Methanol ähnliche Intensitätsverhältnisse zwischen den Einzelabsorptionen vor ( $\Delta A_{209.8nm}/\Delta A_{218.2nm} \sim \Delta A_{207.6nm}/\Delta A_{217.6nm}$ ). Betrachtet man die Fluoreszenzspektren beider Konformationen (80% und 90%), kann außer einer geringfügigen Verschiebung der Emissionsmaxima (80% MeOH; 335.4nm → 90% MeOH; 333.3nm) und einer Erniedrigung der Fluoreszenzintensität keine weitere Veränderung beobachtet werden. Auch

beim prolinfreien Tendamistat induziert die Erhöhung der MeOH Konzentration von 40% auf 50% eine Konformationsumwandlung. Das bei 50% MeOH (pH2.0) beobachtete CD-Spektrum weist jedoch gegenüber dem Wildtypspektrum bei 90% MeOH einen vollkommen anderen Verlauf auf (Abbildung 4-38). Beispielsweise befindet ein einziges Absorptionsmaximum ( $A_L < A_R$ ) im negativen Bereich um 216.2nm, die für eine  $\alpha$ -Helix charakteristische Doppelbande ist im prolinfreien Tendamistat nicht zu beobachten. Im Wellenlängenbereich unterhalb von 216.2nm nimmt die Absorptionsdifferenz bis 207nm kontinuierlich ab, um anschließend bei 196.1nm ein weiteres Maximum zu erreichen. Eine weitere Erhöhung der MeOH Konzentration auf 60% verändert nicht den relativen Verlauf des CD-Spektrums, einschließlich der Lage einzelner Maxima sondern steigert vielmehr, wie das bei einer Konzentrationserhöhung der Fall ist, die Intensität der Absorptionsbanden bei 196.1nm und 216.2nm. Insgesamt ähnelt der spektrale Verlauf oberhalb von 50% MeOH eher an ein  $\beta$ -Faltblatt als an eine  $\alpha$ -Helix. Ungeachtet der konformativen Änderungen bleibt der Absorptionsbereich um 204.5nm in allen Konzentrationen grob erhalten. Für einen isodichroischen Punkt scheint dieser Bereich jedoch sehr breit zu sein, so daß beim Übergang von 40% auf 50% MeOH eine Abweichung vom idealen Zwei-Zustands Modell aufgetreten sein könnte. Betrachtet man die Fluoreszenzspektren beider Konformationen, kann lediglich eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Eine Verschiebung der Emissionsmaxima, wie am Beispiel des Tendamistat Wildtyps beobachtet, findet nicht statt. Erhöht sich die Konzentration auf 60% MeOH, kommt es zu einer deutlichen Veränderung des Emissionsspektrums. Neben einer bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums (50% MeOH; 341.7nm  $\rightarrow$  60% MeOH; 342.6nm) kommt es zu einem starken Einbruch der Gesamtfluoreszenz. Auffallend ist, daß sich sehr deutlich bei 315.5nm eine Emissionsschulter bemerkbar macht, die ansonsten nur in GdmCl denaturierten Proteinen zu finden ist. Wie bereits anhand der Gleichgewichtsentfaltungen gezeigt werden konnte, ist die Stabilität des prolinfreien Tendamistats (24.82kJ/mol) deutlich niedriger als beim Tendamistat Wildtyp (34.46kJ/mol). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß der  $\alpha$ -helikale Zustand womöglich unter stärker denaturierenden Bedingungen in eine anderen Konformation übergeht. Um dies zu untersuchen, wurden Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten und temperaturinduzierte Entfaltungen in 90% MeOH durchgeführt (Abbildung 4-39). Interessanterweise zeigen sämtliche Spektren angefangen von pH3.3 bis pH2.0 einen kontinuierlichen Übergang in die  $\alpha$ -helikale Konformation. Darüberhinaus weisen diese Spektren bei 203nm einen isodichroischen Punkt auf, der bei einer weiteren Erniedrigung des

pH-Werts verloren geht. Überhaupt ändert sich das Absorptionsverhalten bei pH1.5 gegenüber pH2.0 signifikant. Ähnlich wie beim prolinfreien Tendamistat tritt bei pH1.5 ein negatives Absorptionsmaximum ( $A_L < A_R$ ) um 216nm auf. Das zweite Absorptionsmaximum wird vom Wildtyp um 198.6nm erreicht ( $A_L > A_R$ ).

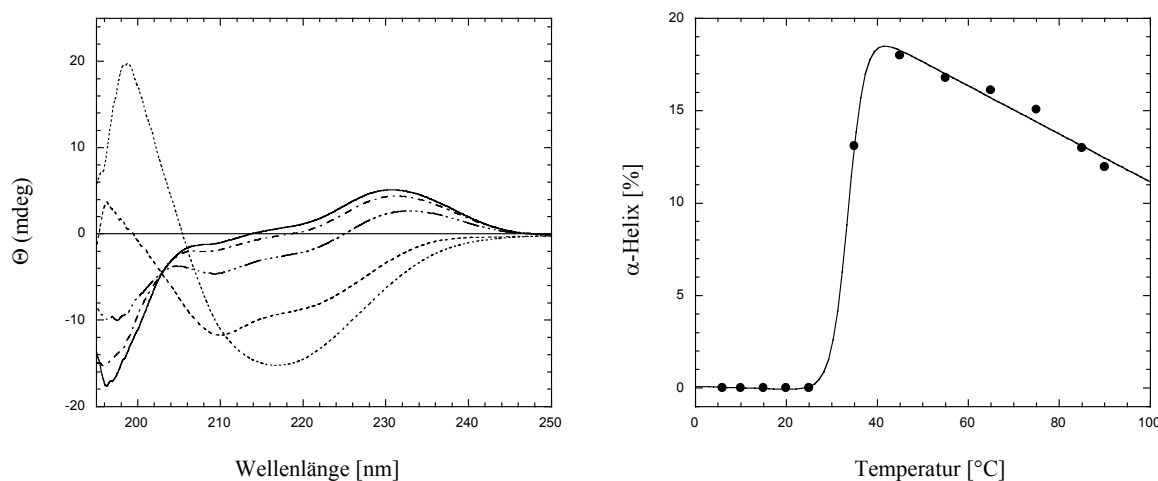


Abbildung 4-39 pH (links) und Temperatur (rechts) induzierte Konformationsänderung des Wildtypproteins in 90% Methanol. Die Messungen wurden alle mit einer Proteinkonzentration von 0.295mg/ml durchgeführt. Links: pH3.3 (—), pH3 (— · —), pH2.5 (— · · —), pH2.0 (— · · · —) und pH1.5 (— · · · ·) sowie rechts: pH2.2. Die Bestimmung der Helikalitätszunahme erfolgte nach Chen (Chen, 1972).

Vergleicht man die Signalintensität der Spektren bei pH1.5 und pH2.0 miteinander, fällt eine weitere Besonderheit auf: Obwohl für  $\alpha$ -helikale Strukturen, die aus einem  $\beta$ -Faltblatt hervorgehen und die gleiche Aminosäuresequenz besitzen, höhere Signalamplituden (Faktor  $\sim 2$ ) an den Absorptionsmaxima gefunden werden (Brahms, 1980), scheint dies beim Tendamistat nicht der Fall zu sein. Diese Versuche können zeigen, daß es unter stärker denaturierenden Bedingungen (pH1.5) gelingt den  $\alpha$ -helikalen Zustand des Tendamistats, der offensichtlich noch einen beträchtlichen  $\beta$ -Faltblattanteil besitzen muß, in eine  $\beta$ -Faltblattanordnung umzuwandeln. Als nächstes wurde der Versuch unternommen, diese Umwandlung durch eine Temperaturerhöhung auszulösen. Für eine Abschätzung der dabei induzierten Helikalität im Tendamistat wurde die mittlere-molare Elliptizität pro Aminosäure  $[\Theta]_{MRE}$  bei 222nm ermittelt und über die Formel von Chen (Chen, 1972) in den Helikalitätsanteil  $f_H$  umgerechnet.



$$[\Theta]_{MRE}^{222\text{ nm}} = -30.300 f_H - 2.340$$

Der Grenzwert von 2.340 konnte bei diesen Messungen erst ab einer Temperatur von 35°C überschritten (pH2.2) werden. Erhöht man die Temperatur weiter, kommt es, anders als erwartet, nicht zu einer Konformationsumwandlung:  $\alpha$ -Helix  $\rightarrow$   $\beta$ -Faltblatt. Vielmehr sinkt der Helikalitätsanteil nahezu linear bis auf 12% (90°C) ab. Der isodichroische Punkt bei 204.5nm wird im Unterschied zu pH1.5 durch die Temperaturerhöhung nicht verschoben (nicht abgebildet). Sollte es bei einer höheren Temperaturen tatsächlich zu einer solchen Umwandlung kommen, hätte man zumindest einen Anstieg der negativen Elliptizität bei 222nm erwarten können.

#### 4.1.11. Rück- und Entfaltung

Nach vollständiger Denaturierung in 6M GdmCl (pH2.0) können bei der oxidativen Rückfaltung des Tendamistats fluoreszenzspektroskopisch drei kinetische Phasen ( $E_X = 276\text{nm}$  und  $E_M > 320\text{nm}$ ) nachgewiesen werden (Schönbrunner, 1997a). Die schnellste Reaktion ( $\tau_3$ ) mit einer Halbwertszeit von 10msec ( $\text{H}_2\text{O}$ ) bestimmt dabei mit etwa 80% die Faltung des Proteins in den Nativzustand (Hauptfaltungsweg). Die langsamste der drei Phasen ( $\tau_1 = 12.5\text{sec}$ ) wird durch eine *cis/trans*-Isomerisierung um mindestens eine der drei *trans* Xaa-Pro Bindungen (P7, P9 und P50) verursacht. Daß es sich dabei tatsächlich um eine Prolinisomerisierung handelt, konnte über die Bestimmung der Aktivierungsenergie (83.7 kJ/mol) und durch enzymatische Katalyse der langsamsten Faltungsphase mit Hilfe von PPIase bereits gezeigt werden (vgl. Kapitel 2.2.3). In einer prolinfreien Variante des Tendamistats sollte bei der Rückfaltung nur eine kinetische Phase zu beobachten sein. Um dies zu überprüfen, wurden mit den drei aufgebauten Prolinvarianten P7AP9A, P50A und P7AP9AP50A Rück- bzw. Entfaltungsmessungen an einer Stopped-flow (Applied Photophysics SM-17 MV) vorgenommen.

Für die Rückfaltungsmessungen wurden die Proteine zunächst in 10mM Glycin pH2.0 6M GdmCl denaturiert und am Wasserstrahlvakuum ausreichend entgast. Die Proteinkonzentration im Entfaltungspuffer betrug 0.33mg/ml. Nach Filtration über 0.2 $\mu\text{m}$  Filter wurde die zu untersuchende Proteinlösung in die thermostatisierte Glasspritze (25°C) der Mischkammer

überführt. Die Vorbereitung des Rückfaltungspuffers (110mM Cacodylatpuffer pH7.0) erfolgte entsprechend. Die beiden Spritzenvolumina wurden so gewählt, daß nach Mischung eine 1:11 (1 Teil Proteinlösung sowie 10 Teile Rückfaltungspuffer) Verdünnung der Proteinlösung vorlag. Die nach Mischung vorliegende Proteinkonzentration betrug also 0.03mg/ml. Die Detektion des rückfaltenden Proteins erfolgte anhand seiner Fluoreszenzemission ( $E_X = 276\text{nm}$  und  $E_M > 320\text{nm}$ ). Für jede Untersuchung wurden mindestens 10 Einzelmessungen durchgeführt und anschließend gemittelt. Messungen mit einer Dauer länger 10sec fanden dabei ohne Druckausgleich statt. Die Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse erfolgte über die Software KaleidaGraph (Abelbeck Software) anhand der allgemeinen Gleichung für unimolekulare Reaktionen (Shirley, 1995):

$$B_t - B_\infty = \sum_{i=1}^n A_i \exp^{-\lambda_i t}$$

$A_i$  steht in dieser Gleichung für die Amplitude und  $\lambda_i$  ( $\text{sec}^{-1}$ ) für die apparente Geschwindigkeitskonstante der Faltungsphase  $i$ . Die Regression anhand der Software erfolgte gegen eine Fehlergrenze von 0. Teilweise kam es nach längeren Meßzeiten zu einem stetigen Abfall der Signalamplitude. Dieser Effekt führte in der Anpassung zu Fehlern und wurde daher mit einer linearen Erweiterung des obigen Ausdrucks ( $m1 + m2t$ ) ausgeglichen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte zunächst über eine einphasige Ausgleichsfunktion ( $n = 1$ ), die grob die Ausgangswerte für die mehrphasige Ausgleichsfunktion ( $n = 2, 3$  und  $4$ ) lieferte. Zum besseren Vergleich wurden die Messungen auch mit dem Wildtyp durchgeführt (Abbildung 4-40). Aus den erhaltenen Regressionsanalysen geht hervor, daß die Varianten P50A und P7AP9AP50A mit einer zweiphasigen Kinetik und der Wildtyp sowie die Mutante P7AP9A mit einer dreiphasigen Kinetik zurückfalten. Die durch eine Prolinisomerisierung hervorgerufene dritte Phase läßt sich damit eindeutig auf eine Isomerisierungsreaktion an Prolin 50 zurückführen. Dieser Sachverhalt läßt sich auch auf Abbildung 4-40 deutlich erkennen. Bei den Mutanten P50A bzw. P7AP9AP50A wird nahezu 100% der Signalamplitude bereits nach 1s, beim Tendamistat Wildtyp sowie der P7AP9A Mutanten erst nach mehr als 30s erreicht. Bei der angegebenen Darstellung wurde die Zeitachse logarithmisch gewählt um die Isomerisierungsreaktion besser veranschaulichen zu können. Bei den Mutanten mit P50 Substitution fällt eine weitere Besonderheit auf.

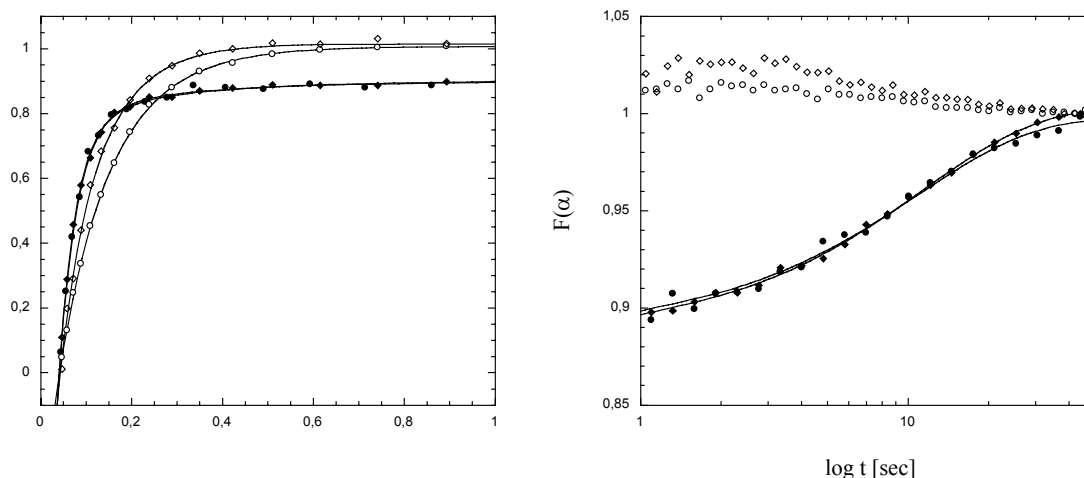


Abbildung 4-40 Kinetik der Rückfaltungsreaktion des Tendamistat Wildtyps (●) sowie der Mutanten P7AP9A (◆), P50A (◇) und P7AP9AP50A (○) mit einer Auflösung von bis zu 1s (links) bzw. 50s (rechts). Um die langsame Phase zu verdeutlichen, wurde die Zeitachse in der rechten Darstellung logarithmisch ausgewählt. Die verwendeten Bedingungen waren: Proteinkonzentration 0.03mg/ml; Rückfaltungsbedingung 100mM Cacodylatpuffer 0.54M GdmCl pH7.0; PMV 400V; V-offset 0.3;  $E_X = 276\text{nm}$ ;  $E_M > 320\text{nm}$ ; Anzahl der Messungen 10; Auflösung 1000 Punkte; Temperatur 25°C; Slit  $E_M$  2nm und Slit  $E_X$  16nm. Die Ordinatenwerte wurden entsprechend der Gleichung  $F(\alpha) = (F - Ft = 0)/(Ft = (- Ft = 0))$  auf 1 normalisiert.

Entgegen den Erwartungen kommt es bei diesen Varianten nicht zu einem Wegfall der mittleren kinetischen Faltungsphase  $k_2$ , die nach den bisherigen Erkenntnissen als Folge der Prolinomerisierung entsteht und die Reaktion von  $U_{\text{cis}}$  nach I beschreibt (Schönbrunner, 1997). Durch die Substitution an Position 50 erfahren die Mutanten P50A und P7AP9AP50A eine starke Verlangsamung bei der Rückfaltungsreaktion (Tabelle 4-17). Die Doppelmutation in P7AP9A führt hingegen nicht zu einem so drastischen Einbruch der Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  ( $24.38\text{s}^{-1}$ ). Bis auf die P50A Mutante, macht die Hauptphase etwa 90% der Gesamtamplitude in der Rückfaltungsreaktion aus. Daß der Amplitudenwert im Fall der P50A Mutante auf deutlich unter 90% fällt, ist wahrscheinlich auf eine Kopplung mit der mittleren Phase  $k_2$  zurückzuführen, die infolge dessen an Amplitude zunimmt (Shirley, 1995). Dieser Effekt tritt immer dann auf, wenn die Geschwindigkeitskonstanten zweier Phasen sich angleichen ( $k_1: 13.93\text{s}^{-1}$  und  $k_2: 5.09\text{s}^{-1}$ ). Die mittlere Phase  $k_2$  ist in sämtlichen Mutanten vorhanden und wird daher von den eingeführten Mutationen nicht beeinflusst. Die Gesamtamplitude beträgt hier durchschnittlich 5%. Die Isomerisierungsreaktion um die Ala<sup>49</sup>-Pro<sup>50</sup> Bindung bestimmt bei der Rückfaltung des

Tendamistat Wildtyps sowie der P7AP9A Mutante die dritte kinetische Faltungsphase (k3 und A3).

	<i>Tendamistat</i>	<i>P7AP9A</i>	<i>P50A</i>	<i>P7AP9AP50A</i>
<b>Phase 1<sup>a)</sup></b>				
k1	29.46 ± 0.28 s <sup>-1</sup>	24.38 ± 0.19 s <sup>-1</sup>	13.93 ± 0.28 s <sup>-1</sup>	9.08 ± 0.07 s <sup>-1</sup>
A1	90.40 ± 0.93 %	89.70 ± 0.46 %	85.61 ± 1.87 %	95.09 ± 0.72 %
ΔΔG <sup>#</sup>	-	0.47 ± 0.04 kJ/mol	1.86 ± 0.07 kJ/mol	2.92 ± 0.04 kJ/mol
<b>Phase 2<sup>a)</sup></b>				
k2	3.37 ± 0.15 s <sup>-1</sup>	4.38 ± 0.242 s <sup>-1</sup>	5.09 ± 0.38 s <sup>-1</sup>	2.73 ± 0.3 s <sup>-1</sup>
A2	5.05 ± 0.16 %	4.44 ± 0.26 %	14.40 ± 2.21 %	4.91 ± 0.8 %
<b>Phase 3<sup>a)</sup></b>				
k3	0.0976 ± 0.0023 s <sup>-1</sup>	0.0881 ± 0.0015 s <sup>-1</sup>	-	-
A3	4.55 ± 0.04 %	5.87 ± 0.03 %	-	-

a) 100mM Cacodylatpuffer 0.54M GdmCl pH7.0

Tabelle 4-17 Die bei den Rückfaltungsexperimenten erhaltenen Daten. Die Amplituden der einzelnen Phasen sind in der Tabelle mit A und die Geschwindigkeitskonstanten mit k bezeichnet.

Wie bereits gezeigt werden konnte, läßt sich diese Phase bei der Rückfaltung in Gegenwart von PPIase katalysieren (Schönbrunner, 1997). Verwendet man die k1 Werte des Wildtyps als Referenz, läßt sich über eine einfache Gleichung die relative Aktivierungsenergie ΔΔG<sup>#</sup> der einzelnen Mutanten ableiten (Nölting, 1999):

$$\ln\left(k_{Mutante} / k_{Wildtyp}\right) = -\Delta\Delta G^{\#} / RT$$

Diese Daten verdeutlichen, daß der Austausch an Position 50 zu einer starken Erhöhung der Aktivierungsbarriere ΔΔG<sup>#</sup> um 1.86 kJ/mol (P50A) bzw. 2.92 kJ/mol (P7AP9AP50A) führt. Wegen der Einheitlichkeit des nativen Zustands resultiert dieser Effekt vermutlich durch eine entropische Stabilisierung des entfaltenen Zustands gegenüber dem Wildtyp.

Zusätzlich zu den Messungen an der Stopped-flow wurden auch manuelle Mischungsexperimente an einem Fluoreszenzphotometer (Aminco) durchgeführt. Da in solchen Experimenten schnelle Faltungsreaktionen nicht detektiert werden können (< 4s), läßt sich hier „selektiv“ die langsame Isomerisierungsreaktion untersuchen.

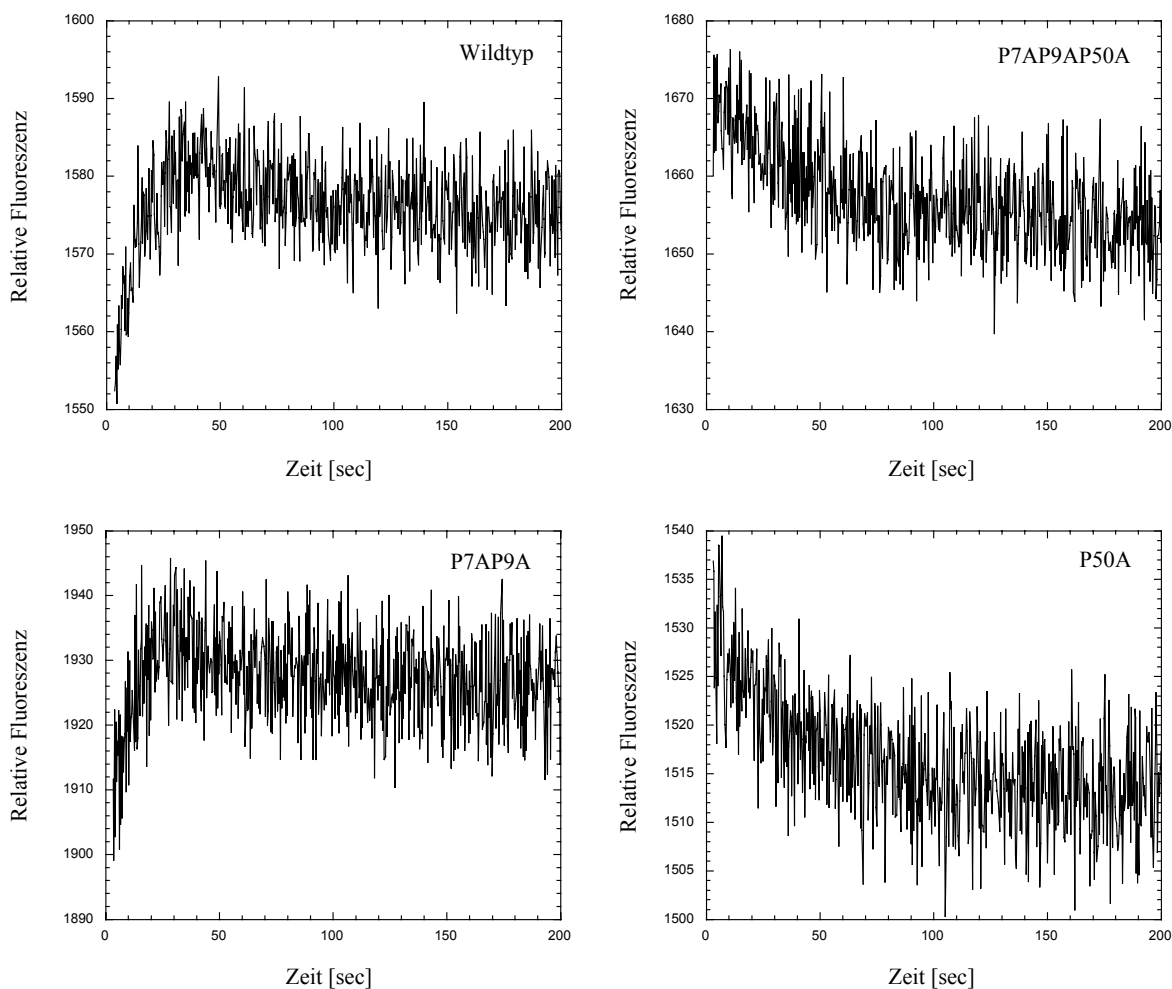


Abbildung 4-41 Detektion der langsamen Isomerisierungsreaktion durch manuelle Mischung. Die dabei verwendeten Rückfaltungsbedingungen entsprechen den oben aufgeführten Angaben. Die Mischung erfolgte im Photometer anhand eines eingebauten Magnetrührers nach Zusatz der denaturierten Proteinlösung. Die verwendete Schichtdicke betrug 1cm.

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten sind in Abbildung 4-41 dargestellt und in Tabelle 4-18 aufgeführt. Bei der verwendeten Ausgleichsfunktion wurde ein zusätzlicher Beitrag berücksichtigt, der das Abklingen der Fluoreszenzamplituden wiedergibt. Dieser Effekt ist vermutlich auf eine inhomogene Mischung innerhalb der Küvette zurückzuführen. Die langsame Reaktion, sichtbar durch den Fluoreszenzanstieg zwischen 0 - 40s, ist lediglich beim Wildtyp sowie der Mutanten P7AP9A vorhanden, fehlt jedoch bei den beiden P50 Mutanten.

Damit bestätigen diese Messungen die bereits oben erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Prolinisomerisierung um die Ala<sup>49</sup>-Pro<sup>50</sup> Bindung. Die abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten stimmen dabei gut mit den über Stopped-flow erhaltenen Daten überein.

	<i>Tendamistat</i>	<i>P7AP9A</i>	<i>P50A</i>	<i>P7AP9AP50A</i>
<b>Phase 3<sup>a)</sup></b>				
K3	$0.107 \pm 0.011 \text{ s}^{-1}$	$0.089 \pm 0.0056 \text{ s}^{-1}$	-	-

a) 100mM Cacodylatpuffer 0.54M GdmCl pH7.0

Tabelle 4-18 Die bei den manuellen Rückfaltungsexperimenten erhaltenen Daten für die langsame Isomerisierungs-phase k3.

Neben der Rückfaltung wurde auch die Entfaltung der einzelnen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Die einzelnen Proteine wurden zu diesem Zweck in 10mM Cacodylatpuffer pH7.0 (0.33mg/ml) aufgenommen und durch schnelle Mischung in 110mM Glycinpuffer 7.05M GdmCl pH2.0 überführt.

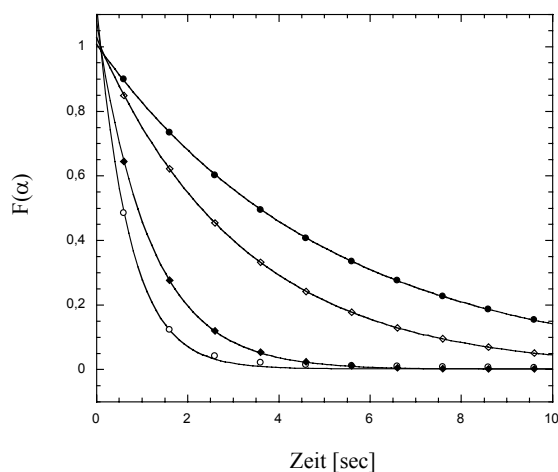


Abbildung 4-42 Kinetik der Entfaltungsreaktion des Tendamistat Wildtyps (●) sowie der Mutanten P7AP9A (◆), P50A (◇) und P7AP9AP50A (○) mit einer Auflösung von 10s. Die verwendeten Bedingungen waren: Proteinkonzentration 0.03mg/ml; Rückfaltungspuffer 100mM Glycinpuffer 6.4M GdmCl pH2.0; PMV 400V; V-offset 0.3;  $E_X = 276\text{nm}$ ;  $E_M > 320\text{nm}$ ; Anzahl der Messungen 10; Auflösung 1000 Punkte; Temperatur 25°C; Slit  $E_M$  16nm und Slit  $E_X$  2nm. Die Ordinatenwerte wurden entsprechend der Gleichung  $F(\alpha) = (F - F_{t=0}) / (F_{t=\infty} - F_{t=0})$  auf 1 normalisiert.

Genau wie im Falle der Rückfaltungsreaktion, ließ sich die gesamte Entfaltungsreaktion anhand der abnehmenden Fluoreszenz oberhalb von 320nm ( $E_X = 276\text{nm}$ ) mitverfolgen. Sämtliche Mutationen führten zu einer Beschleunigung der Hauptentfaltungsphase  $k_1$ . In Abbild 4-42 ist dieses Verhalten durch das schnellere Abklingen der normierten Fluoreszenzamplituden  $F(\alpha)$  im Vergleich zum Wildtyp (●) deutlich erkennbar. Die beiden Mutanten P50A und P7AP9AP50A ließen sich durch eine monoexponentielle Ausgleichsfunktion hinreichend gut angleichen. Für die Entfaltungsreaktion des Wildtyps sowie der P7AP9A Mutante bedurfte es hingegen einer biexponentiellen Ausgleichsfunktion. Betrachtet man die Hauptphase  $k_1$ , fällt auf, daß der Austausch an Position 50 nicht zu einer starken Beschleunigung der Entfaltungsreaktion geführt hat. Dem gegenüber beschleunigen die Substitutionen an Position 7 und 9 (P7AP9A und P7AP9AP50A) die Entfaltungsreaktion des Tendamistats um das 4 bis 8 fache. Vergleicht man die Amplitudenverläufe der beiden Mutanten P7AP9A und P50A, fällt eine weitere Besonderheit auf (Tabelle 4-19).

	<i>Tendamistat</i>	<i>P7AP9A</i>	<i>P50A</i>	<i>P7AP9AP50A</i>
<b>Phase 1<sup>a)</sup></b>				
k1	$0.20 \pm 0.002 \text{ s}^{-1}$	$0.84 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$	$0.31 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$	$1.50 \pm 0.003 \text{ s}^{-1}$
A1	$98.5 \pm 0.25 \%$	$97 \pm 0.18 \%$	100 %	100 %
$\Delta\Delta G^\#$	-	$-3.56 \pm 0.1 \text{ kJ/mol}$	$-1.07 \pm 0.15 \text{ kJ/mol}$	$-5 \pm 0.21 \text{ kJ/mol}$
<b>Phase 2<sup>a)</sup></b>				
k2	$1.71 \pm 0.26 \text{ s}^{-1}$	$2.71 \pm 0.018 \text{ s}^{-1}$	-	-
A2	$1.5 \pm 0.21 \%$	$3 \pm 0.16 \%$	-	-

a) 100mM Glycinpuffer 6.4M GdmCl pH2.0

Tabelle 4-19 Die bei den Entfaltungsexperimenten erhaltenen Daten. Die Amplituden der einzelnen Phasen sind in der Tabelle mit A und die Geschwindigkeitskonstanten mit k bezeichnet.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den Rückfaltungsmessungen, so wäre zu erwarten gewesen, daß entsprechend den dortigen Verhältnissen, die Entfaltung der P50A Mutante schneller erfolgen müßte als bei der P7AP9A Mutante. Stattdessen entfaltet die P7AP9A Mutante unter gleichen Endbedingungen nahezu 3mal so schnell wie die P50A Mutante. Da sich die Proteine unter Ent- bzw. Rückfaltungsbedingungen in unterschiedlichen Ausgangszuständen befinden, scheinen spezifische Einflüsse an den unterschiedlichen Positionen ebenfalls eine wichtige Rolle

zu spielen. Die aus den Geschwindigkeitskonstanten berechneten Aktivierungsenergien bestätigen dieses Ergebnis. Gegenüber dem Wildtyp kommt es bei Entfaltung der P7AP9A Mutante zu einer Absenkung der Aktivierungsbarriere um 3.56 kJ/mol. Bei der P50A Mutanten beträgt dieser Verlust hingegen nur etwa 1.07 kJ/mol.

#### 4.1.12. Nachweis von $U_x$ („U-Test“)

Das ursprünglich aufgestellte Faltungsmodell des Tendamistats ging von vier Zuständen ( $U_{\text{trans}}$ ,  $U_{\text{cis}}$ , I und N) aus, die untereinander durch vier Gleichgewichtsbeziehungen verknüpft sind (Abbildung 4-43). Zwei Zustände ( $U_{\text{cis}}$  und I) ergaben sich nach diesem Modell aus einer Isomerisierungsreaktion um mindestens eine der drei Proline im entfalteten Zustand. Diese Isomerisierungsreaktion führte in der Kinetik der Rückfaltungsreaktion zu drei Phasen, von denen die mittlere Phase mit einer Halbwertszeit von 205ms ( $\tau_2 = 296\text{ms}$ ), der Reaktion von  $U_{\text{cis}}$  nach I zugeordnet werden konnte. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Reaktion von  $U_{\text{trans}}$  nach  $U_{\text{cis}}$  mit der Isomerisierung um Prolin 50 verknüpft. Der Austausch von Prolin gegen Alanin an dieser Position führte zum Verschwinden der langsamen Phase von  $U_{\text{trans}}$  nach  $U_{\text{cis}}$ . Dieser Effekt konnte eindeutig bei den Prolinmutanten P50A sowie P7AP9AP50A nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise blieb die mittlere Phase des Tendamistats trotz Substitution an Position 50 bei der Rückfaltung erhalten.

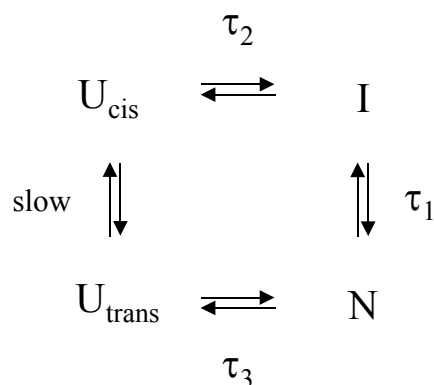
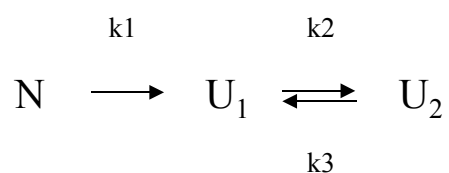


Abbildung 4-43 Bisheriges Faltungsschema des Tendamistats. Der Bereich im Kasten sollte nach Substitution an Position 50 in der Rückfaltungskinetik nicht mehr auftreten.



Um zu untersuchen ob die mittlere Phase  $\tau_2$  aus einem weiteren Zustand  $U_2$  innerhalb der entfalteten Molekülpopulation resultiert, wurde ein sogenannter Doppelsprung-Test durchgeführt („U-Test“). In einem solchen „U-Test“ geht man von nativ gefaltetem Protein aus und induziert durch einen Entfaltungssprung (*1. Sprung*) den Übergang von N nach  $U_1$ .

Nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer, bei der  $U_1$  langsam in den Zustand  $U_2$  isomerisieren kann, erfolgt durch erneute Verdünnung der Proteinlösung ein Rückfaltungssprung (*2. Sprung*). Dieser unterbricht die Isomerisierungsreaktion und induziert damit den Übergang von  $U_{1,2}$  nach N. Die unter Rückfaltungsbedingungen gemessene Amplitude der langsameren Phase (A2) ist ein direktes Maß für den zeitabhängigen Übergang von  $U_1$  nach  $U_2$ . Nach sehr kurzer Inkubationsdauer werden es im Wesentlichen die schnell rückfaltenden Moleküle  $U_1$  sein, die 100% zur beobachteten Signalamplitude beitragen. Nach einer Verzögerung von t Sekunden (*delay time*) beobachtet man zusätzlich zu der Hauptphase eine langsamere Rückfaltungsphase, die an Amplitude zunimmt und irgendwann in einen Sättigungsbereich übergeht. Diese zeitabhängige Amplitudenzunahme entspricht dem Übergang von  $U_1$  nach  $U_2$ . Nach langer Inkubationsdauer stellt sich zwischen den beiden entfalteten Zuständen ein Gleichgewicht ein. In einem solchen Fall entsprechen die detektierten Amplituden denjenigen Werten, die man auch bei direkten Rückfaltungsexperimenten ( $t = \infty$ ) beobachtet. Die nach einer Inkubationsdauer von t Sekunden erhaltene Amplitude der langsameren Rückfaltungsreaktion, läßt sich durch folgende Gleichung wiedergeben (Schmid, 1986):



$$[U_2]_t = [U_2]_{\infty} \left\{ 1 - \left( k_{\text{apparent}} \exp^{-k_1 t} - k_1 \exp^{-k_{\text{apparent}} t} \right) \left( k_{\text{apparent}} - k_1 \right)^{-1} \right\}$$

Diese Gleichung beschreibt die irreversible Entfaltungsreaktion von N nach  $U_1$ . Von  $U_1$  erfolgt anschließend der sequentielle Übergang zu  $U_2$ . Da jedoch die nach dem 2. Sprung gemessenen *apparente* Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{apparent}}$  der Summe aus  $k_2$  bzw.  $k_3$  entspricht, lassen sich über die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  ( $K_{\text{eq}} = k_2/k_3$ ) beide Geschwindigkeitskonstanten einzeln berechnen. Unter Bedingungen, bei denen die Geschwindigkeitskonstante der

Entfaltungsreaktion ( $N \rightarrow U_1$ ) der anschließenden Isomerisierungsreaktion ( $U_1 \rightleftharpoons U_2$ ) nahe kommt, beobachtet man ein sogenanntes *lag* im Amplitudenverlauf der langsameren Phase (*lag* Phase) - die Bildung von  $U_2$  ist dabei an das Vorhandensein von  $U_1$  geknüpft. Das Ausmaß einer solchen *lag* Phase hängt zum einen von dem Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bzw.  $k_{\text{apparent}}$  und zum anderen von der Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  ab.

	<i>P7AP9AP50A</i> <sup>a)</sup>	<i>P7AP9AP50A</i> <sup>b)</sup>	<i>P7AP9AP50A</i> <sup>c)</sup>
	Rückfaltung		Entfaltung
<b>Phase 1</b>			
$k_{\text{schnell}}$	$6.18 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$	$9.08 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$	$4.69 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$
$A_{\text{schnell}}$	$90.14 \pm 1.18 \%$	$95.09 \pm 0.72 \%$	100%
<b>Phase 2</b>			
$k_{\text{langsam}}$	$2.84 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$	$2.73 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$	-
$A_{\text{langsam}}$	$9.86 \pm 1.28 \%$	$4.91 \pm 0.8 \%$	-

a) 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.83M GdmCl 1.4% TFA; b) 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.54M GdmCl; c) 50mM Glycinpuffer pH2.0, 5M GdmCl 8.33% TFA.

Tabelle 4-20 Die unter den neuen Rückfaltungsbedingungen (100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.83M GdmCl 1.4% TFA) erhaltenen Kinetiken des prolinfreien Tendamistats. Die Amplituden der einzelnen Phasen sind in der Tabelle mit A und die Geschwindigkeitskonstanten mit k bezeichnet. Die unterschiedlichen Phasen werden hier mit *schnell* bzw. *langsam* gekennzeichnet.

Die Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte im „U-Test“ wird durch zwei Umpufferungsreaktionen induziert, die innerhalb des SM-17 MV (Applied Photophysics) Mischkopfes nacheinander durchgeführt werden können (*double-jump technique*). Vor dem eigentlichen „U-Test“ wurden zunächst Rückfaltungsexperimente unter Endpufferbedingungen durchgeführt ( $U_{1,2} \rightarrow N$ ). Das prolinfreie Tendamistat wurde dazu in 50mM Glycinpuffer pH2.0 5M GdmCl und 8.33% TFA entfaltet und nach 1:6 Mischung in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, wieder rückgefaltet. Die Konzentration des prolinfreien Tendamistats betrug im Ausgangspuffer 0.18mg/ml. Unter diesen Bedingungen konnte nach biexponentieller Regression für die Hauptphase eine Geschwindigkeitskonstante von  $6.18 \text{ s}^{-1}$  ermittelt werden (Tabelle 4-20).

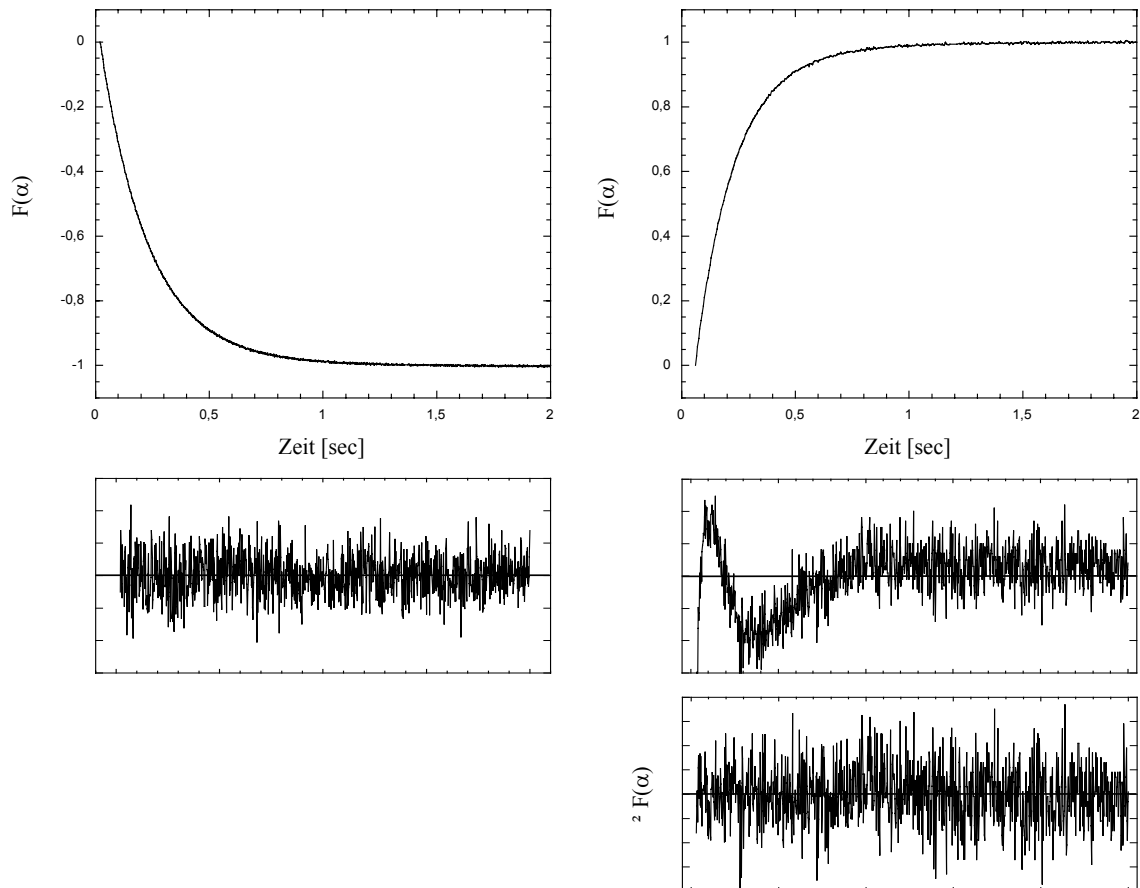


Abbildung 4-44 Entfaltungs- (links) und Rückfaltungsreaktion (rechts) des prolinfreien Tendamistats. Im unteren Bereich sind die Differenzamplituden  $\Delta F(\alpha)$  abgebildet (vgl. Text). In der ersten Zeile sind die Amplituden aus der monoexponentiellen, in der zweiten Zeile entsprechend aus der biexponentiellen Regression dargestellt. Die Bedingungen waren: Proteinkonzentration 0.2mg/ml; Entfaltungsbedingungen 50mM Glycinpuffer pH2.0, 5M GdmCl 8.33% TFA (links); Rückfaltungsbedingung 100mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.83M GdmCl 1.4% TFA (recht); PMV 400V; V-offset 0.3;  $E_X = 276\text{nm}$ ;  $E_M > 320\text{nm}$ ; Anzahl der Messungen 10; Auflösung 1000 Punkte; Temperatur 25°C; Slit  $E_M$  2nm und Slit  $E_X$  16nm. Die Ordinatenwerte wurden entsprechend der Gleichung  $F(\alpha) = (F - F_{t=0}) / (F_{t=\infty} - F_{t=0})$  auf 1 normalisiert.

Die langsamere Phase hingegen erbrachte eine Geschwindigkeitskonstante von  $2.84 \text{ s}^{-1}$ . Vergleicht man die neu erhaltenen Ergebnisse mit den alten Rückfaltungsdaten, fällt auf, daß veränderte Pufferbedingungen, wie beispielsweise einer höheren GdmCl Konzentration, eine Einflußnahme auf die schnellere Reaktionsphase (Phase 1) ausüben. Die langsamere Phase (Phase 2) zeigt hingegen kaum signifikante Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung. Aber auch die Amplituden der beiden Faltungsphasen verändern sich unter den jeweiligen

Reaktionsbedingungen. Beispielsweise kommt es zu einer Verschiebung der langsameren Rückfaltungsamplitude von 4.9% auf 9.9%. Dieser Effekt dürfte vermutlich auf die Kopplung der beiden Phasen unter den neuen Rückfaltungsbedingungen zurückzuführen sein. Hierfür sprechen auch die beiden Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  bzw.  $k_{\text{apparent}}$ , die unter den neuen Rückfaltungsbedingungen näher beieinander liegen. Um zu verdeutlichen, daß tatsächlich bei der Rückfaltungsreaktion des prolinfreien Tendamistats (P7AP9AP50A) zwei Phasen ( $k_{\text{schnell}}$  bzw.  $k_{\text{langsam}}$ ) nach längerer Inkubationsdauer in Erscheinung treten, sind in Abbild 4-44 die Differenzamplituden  $\Delta F(\alpha)$  dargestellt ( $\Delta F(\alpha) = F(\alpha)_{\text{berechnet}} - F(\alpha)_{\text{gemessen}}$ ). Wie man erkennen kann, ist eine monoexponentielle Ausgleichsfunktion nicht in der Lage, die erhaltenen Meßwerte im gesamten Zeitfenster richtig wiederzugeben. Erst nach biexponentiellem Ausgleich reduzieren sich die Abweichungen auf Schwankungen um den Nullwert.

Für den eigentlichen „U-Test“ wurde eine 1.08mg/ml Proteinlösung (Stammlösung) in 10mM Cacodylatpuffer pH7.0 angesetzt und entgast. Die Entfaltungsreaktion erfolgte anschließend durch eine 1:6 Verdünnung der nativen Proteinlösung im Denaturierungspuffer (60mM Glycin pH1.9 6M GdmCl 10% TFA). Die dabei erreichte Proteinkonzentration betrug 0.18mg/ml. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten wurde dieser Ansatz erneut mit Renaturierungspuffer (120mM Cacodylatpuffer pH7.1) 1:6 verdünnt und dadurch die Isomerisierungsreaktion unterbrochen. Der dabei aufgezeichnete Fluoreszenzverlauf stand nach rechnerischer Korrektur (Endpunktschwankung) für die computergestützte Berechnung der Amplituden zur Verfügung. Um Abweichungen der Amplitudenwerte zu minimieren, wurde in sämtlichen Regressionen die langsamere Faltungsphase auf  $k_{\text{langsam}} = 3$  konstant gehalten. Diese Herangehensweise ist zulässig, da es sich in sämtlichen Versuchen um die gleichen Endpufferbedingungen handelt. In Abbild 4-45 ist ein Vergleich der erhaltenen Differenzamplituden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten dargestellt. Hält man beispielsweise die Reaktion 27ms lang unter Entfaltungsbedingungen, so kann innerhalb der Rückfaltungsreaktion lediglich eine Gesamtphase detektiert werden. Dabei handelt es sich um die schnelle Faltungsphase mit einer Geschwindigkeitskonstanten von  $5.9 \text{ s}^{-1}$  ( $k_{\text{langsam}} = 3$ ). Erst ab 38ms beginnt sich eine langsamere, zweite Phase abzuzeichnen, die an Amplitude zunimmt und nach einer Inkubationszeit von etwa 3 Sekunden in einen Sättigungsbereich übergeht. Damit können diese Daten belegen, daß die zweite Rückfaltungsphase und damit der entfaltete Zustand  $U_2$  erst *nach* Akkumulation von  $U_1$  entstehen kann. Da sich die Geschwindigkeitskonstanten beider Phasen ähneln, war eine bessere Trennung unter den gegebenen Bedingungen nicht mehr möglich gewesen.

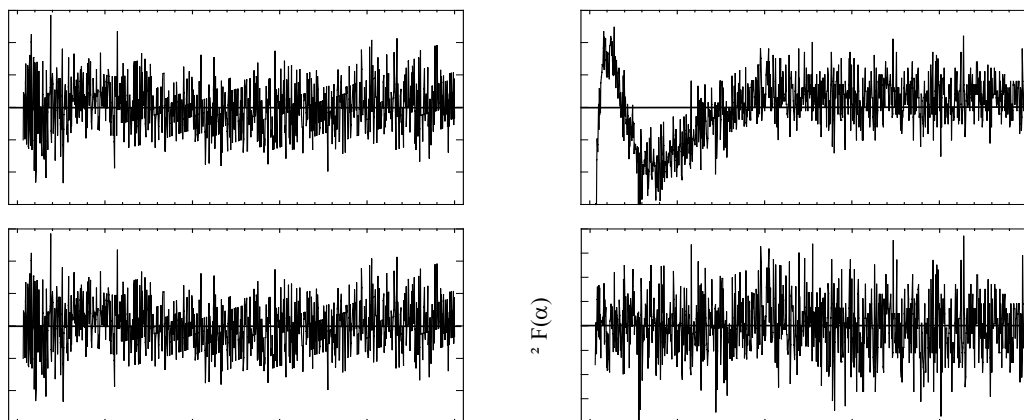


Abbildung 4-45 Differenzamplituden nach Verwendung einer monoexponentiellen (oben) bzw. biexponentiellen (unten) Ausgleichsfunktion für eine Inkubationsdauer von 27ms (links) sowie 5s (rechts). Die Abweichung vom Nullwert nach 5s Inkubationszeit (oben rechts) belegt, daß eine weitere Rückfaltungshase entstanden sein muß.

Als nächstes wurde versucht, die Amplitudenwerte (Amplitude) der beiden Phasen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer  $t$  (*delay time*) mit Hilfe der oben angegebenen Funktion anzugleichen (Abbildung 4-46). Da aus der biexponentiellen Regression die zeitabhängigen Amplituden beider Phasen getrennt erhalten werden konnten, war es möglich, die langsamere Phase unabhängig von der Hauptphase zu untersuchen. Bedingt durch die niedrige Zahl der Datenpunkte sowie die starke Streuung bei sehr kurzen Inkubationszeiten (max. 4.9% der Gesamtamplitude) gelang dieser Versuch jedoch nicht. Die Geschwindigkeitskonstante der schnellen Reaktion  $k_1$ , die in dem Ausdruck für  $[U_2]_t$  ebenfalls vorkommt, entsprach nicht dem bei direkter Entfaltung erhaltenen Wert. Vielmehr konnten die beiden Amplitudenverläufe ausreichend gut über eine biexponentielle (schnelle Phase) bzw. monoexponentielle (langsame Phase) Ausgleichsfunktion angenähert werden. Die sich daraus ableitenden Daten sind in Tabelle 4-21 dargestellt. Für die schnelle Entfaltungsphase erbrachte die exponentielle Anpassung eine Geschwindigkeitskonstante von  $5.5 \text{ s}^{-1}$ . Dieser Wert entspricht von der Größenordnung her der Geschwindigkeitskonstante, die man bei der direkten Rückfaltungsreaktion des prolinfreien Tendamistats erhält ( $4.7 \text{ s}^{-1}$ ).

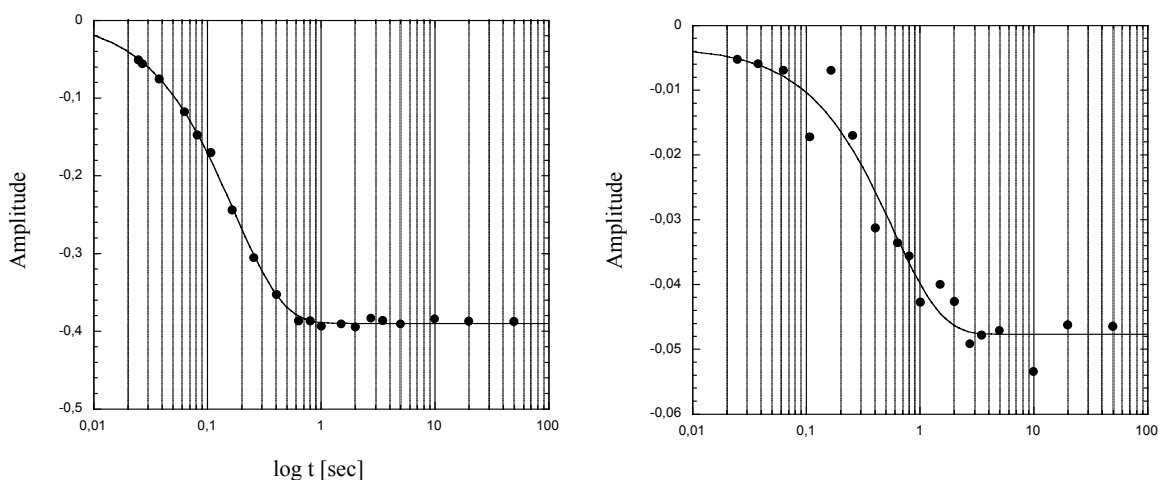


Abbildung 4-46 Die Amplitudenverläufe der schnellen (links) sowie der langsameren (rechts) Phase, die nach Entfaltung der Mutante P7AP9AP50A entstehen. Für die Ordinate wurden die bei der Rückfaltung erhaltenen Amplituden um die jeweilige Endpunktschwankung korrigiert.

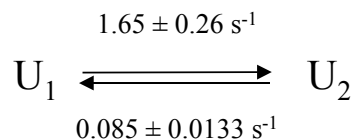
Für die langsamere Phase im „U-Test“ erhält man hingegen eine apparente Geschwindigkeitskonstante von  $1.74\text{s}^{-1}$  ( $k_{\text{apparent}}$ ).

	<i>Einzelmessungen</i>		<i>U-Test</i>	
	Rückfaltung	Entfaltung	schnelle Phase	langsame Phase
<b>Phase 1</b>				
$k_{\text{schnell}}$	$6.18 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$	$4.69 \pm 0.03 \text{ s}^{-1}$	$5.50 \pm 0.25 \text{ s}^{-1}$	-
$A_{\text{schnell}}$	$90.14 \pm 1.18 \%$	100%	$104.40 \pm 3.38\%$	-
<b>Phase 2</b>				
$k_{\text{langsam}}$	$2.84 \pm 0.12 \text{ s}^{-1}$	-	$0.87 \pm 0.82 \text{ s}^{-1}$	$1.74 \pm 0.27 \text{ s}^{-1}$
$A_{\text{langsam}}$	$9.86 \pm 1.28 \%$	-	$4.40 \pm 3.47\%$	$9.90 \pm 0.32 \%$

Tabelle 4-21 Die beim „U-Test“ erhaltenen Ergebnisse im Vergleich zu den aus direkten Faltungsexperimenten erhalten Daten.

Durch die Isomerisierungsreaktion entspricht  $k_{\text{apparent}}$  der Summe von  $k_2$  und  $k_3$ . Für eine Berechnung von  $k_2$  bzw.  $k_3$  läßt sich die Gleichgewichtskonstante  $K_{\text{eq}}$  heranziehen.  $K_{\text{eq}}$  kann

wiederum aus dem Amplitudenverhältnis der Rückfaltungsreaktion abgeleitet werden. Verknüpft man mit Hilfe dieses Ausdrucks  $k_2$  und  $k_3$ , so erhält man für  $k_2$   $0.085 \text{ s}^{-1}$  bzw. für  $k_3$   $1.654 \text{ s}^{-1}$ :



Der Ausdruck für  $k_3$  entspricht dabei nicht ganz dem Wert von  $2.73 \text{ s}^{-1}$ , der aus den direkten Rückfaltungsmessungen in 100mM Cacodylatpuffer 0.54M GdmCl pH7.0 abgeleitet werden kann.

#### 4.1.13. Nachweis der Bildung von N („N-Test“).

Untersuchungen, die zum Nachweis von multipel entfalteten Zuständen bei der Mutante P7AP9AP50A (prolinfreies Tendamistat) durchgeführt wurden, hatten gezeigt, daß es nach Denaturierung des Proteins zu einer weiteren Gleichgewichtsreaktion kommt, die etwa 5% der Moleküle in den Zustand  $U_2$  überführt ( $U_1 \rightleftharpoons U_2$ ). Dieser Übergang verhält sich nach dem abgeleiteten Drei-Zustands-Modell ähnlich wie eine Prolinisomerisierung, nur daß es durch die Abwesenheit von Prolinen nicht um eine prolinabhängige Reaktion handeln kann.



Um zu untersuchen, ob die zweite Phase tatsächlich zur Bildung nativer Moleküle beiträgt, wurde ein sogenanntes *interrupted refolding* Experiment durchgeführt. Dieses Doppelsprung Experiment ist in der Lage, die Bildung nativer Moleküle (N) während der Rückfaltung des Proteins spezifisch nachzuweisen (Schmid, 1983; Kiefhaber, 1995). Dabei initiiert man zunächst die Rückfaltung eines vorher denaturierten Proteins unter Bedingungen, die den nativen Zustand stabilisieren ( $U \rightarrow N$ ). Nach unterschiedlich langer Wartezeit (*delay time*) wird diese Reaktion durch einen Entfaltungspuls unterbrochen ( $N \rightarrow U$ ). Dieser führt erneut zur vollständigen Denaturierung bereits rückgefalteter Moleküle. Die dabei gemessene Amplitude ist ein direktes Maß für die Bildung nativer Moleküle bei der Rückfaltung von Tendamistat. Solche Messungen

wurden bereits in Zusammenhang mit dem Nachweis von Intermediaten beim Tendamistat durchgeführt (Schönbrunner, 1997a).

Sollte das anfangs gezeigte Schema seine Gültigkeit besitzen, würde es bei der Rückfaltung von Tendamistat zu einem zweiphasigen Amplitudenanstieg kommen. Die Hauptphase entspräche dabei dem Übergang von  $U_1$  nach N. Parallel zu dieser Reaktion würde auch die Umwandlung von  $U_2$  nach N über  $U_1$  zu dem beobachteten Amplitudenanstieg beitragen. Da es sich hierbei um höchstens 5% der beobachteten Gesamtamplitude handeln könnte, war vor dem Experiment nicht ganz sicher, ob ein solcher Übergang überhaupt detektiert werden würde.

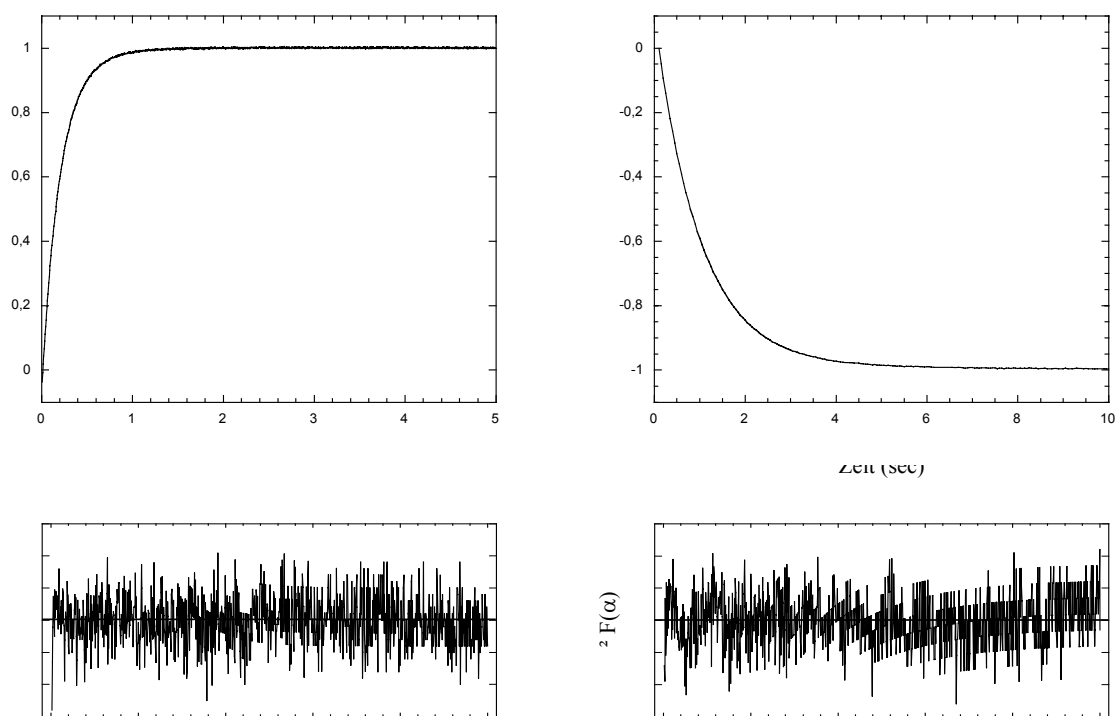


Abbildung 4-47 Rückfaltungs- (links) und Entfaltungsreaktion (rechts) des prolinfreien Tendamistats. Im unteren Bereich sind die Differenzamplituden  $\Delta F(\alpha)$  nach biexponentieller Regression dargestellt. Die Bedingungen waren im einzelnen: Proteinkonzentration 0.18mg/ml; Rückfaltungsbedingung 50mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.75M GdmCl; Entfaltungsbedingungen 83.3mM Glycinpuffer pH2.0, 6M GdmCl; PMV 400V; V-offset 0.3;  $E_X = 276\text{nm}$ ;  $E_M > 320\text{nm}$ ; Anzahl der Messungen 10; Auflösung 1000 Punkte; Temperatur 25°C; Slit  $E_M$  2nm und Slit  $E_X$  16nm. Die Ordinatenwerte wurden entsprechend der Gleichung  $F(\alpha) = (F - F_{t=0}) / (F_{t=\infty} - F_{t=0})$  auf 1 normiert.

Wie im U-Test (Kapitel 4.1.11) bereits diskutiert, sollten zunächst direkte Rück- bzw. Entfaltungsmessungen eine Aussage über die Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionen unter



den jeweiligen Endbedingungen liefern (Abbildung 4-47). Zunächst wurde das prolinfreie Tendamistat (0.18mg/ml) in Gegenwart von 10mM Glycin 4.5M GdmCl pH2.0 entfaltet, unter Wasserstrahlvakuum entgast und im Mischkopf vor der ersten Messung 10min bei 25°C inkubiert. Diese Vorgehensweise wurde bei allen *stopped flow* Experimenten beibehalten, um die Proteinlösungen und Puffer thermisch auf 25°C zu equilibrieren. Nach einer 1:6 Mischung mit 60mM Cacodylatpuffer pH7.25 wurde die Rückfaltungsreaktion des Proteins induziert (50mM Cacodylatpuffer 0.75M GdmCl pH7.0). Um Schwankungen innerhalb der Einzelmessung auszugleichen, wurde das Rückfaltungsexperiment 10mal wiederholt. Für die dabei beobachtete Fluoreszenzänderung - arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen - konnte eine Geschwindigkeitskonstante von  $5.4 \text{ s}^{-1}$  (schnelle Phase) bzw.  $2.8 \text{ s}^{-1}$  (langsame Phase) ermittelt werden. Genau wie im Falle des U-Tests, beobachtet man auch hier, daß sich durch Erhöhung der GdmCl Konzentration von 0.54M auf 0.75M die Hauptphase der Rückfaltungsreaktion weiter verlangsamt ( $9.08 \text{ s}^{-1}$  auf  $5.4 \text{ s}^{-1}$ ), wohingegen die langsamere Phase nahezu konstant bleibt. Durch die Verlangsamung der schnelleren Rückfaltungsphase kommt es zu einer Kopplung beider Phasen, wodurch die Amplitude der Hauptphase zugunsten der Nebenphase deutlich abnimmt. Als nächstes wurde die Entfaltungreaktion des prolinfreien Tendamistats entsprechend den Bedingungen des zweiten Sprungs durchgeführt. Dazu wurde das Protein in 10mM Cacodylatpuffer 0.75M GdmCl pH7.0 gelöst und in Gegenwart von 83.3mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 wieder entfaltet. Die Anpassung an den gemittelten Fluoreszenzverlauf aus 10 Einzelmessungen erfolgte diesmal mit Hilfe einer für diese Reaktion eher unüblichen biexponentiellen Ausgleichsfunktion (2 Phasen). Der dabei auftretenden zweiten Entfaltungsphase dürfte jedoch keine kinetische Bedeutung beizumessen sein, da ihre Amplitude im Bereich um 1% liegt. Die Hauptphase zeigte unter den angegebenen Entfaltungsbedingungen eine Halbwertszeit von 693ms ( $k_{\text{langsam}} = 1 \text{ s}^{-1}$ ).

Als nächstes wurde das Doppelsprung Experiment (*interrupted refolding*) durchgeführt (Abbildung 4-48). Bereits mit den zuvor beschriebenen Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß auf Grund der schlechten Phasentrennung während der Rückfaltung (1 Sprung) mit Schwierigkeiten in der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse zu rechnen ist.

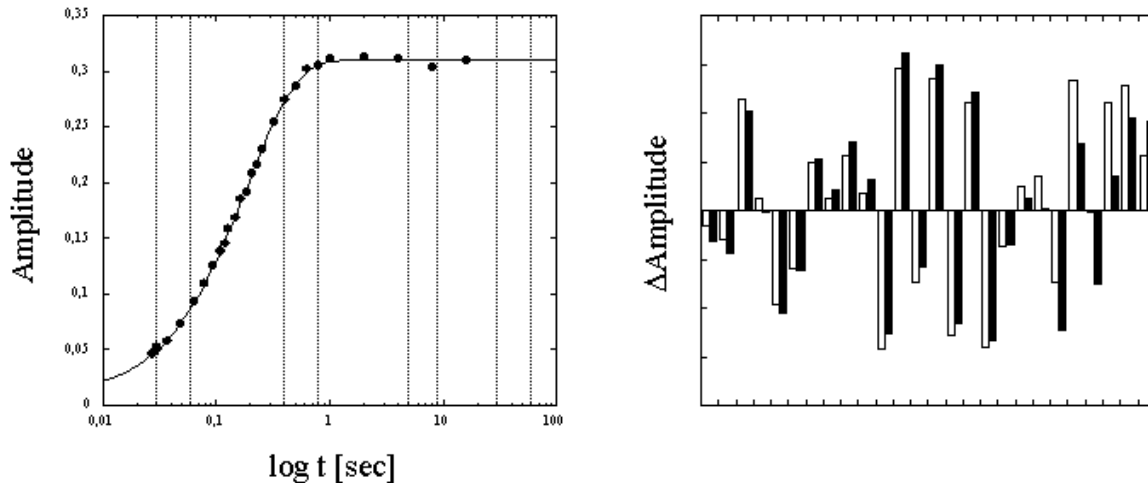


Abbildung 4-48 Rückfaltung des Tendamistats in 50mM Cacodylatpuffer pH7.0, 0.75M GdmCl. Aufgezeigt ist der Amplitudenverlauf im *interrupted refolding* Experiment (links). Der nach Entfaltung beobachtete Amplitudenanstieg entspricht der Bildung nativer Moleküle (N) unter den gegebenen Bedingungen. Rechts sind die relativen Abweichungen der Amplitude nach monoexponentieller (heller Balken) bzw. biexponentieller (dunkler Balken) Regression dargestellt. Die Rückfaltungsbedingungen waren: 50mM Cacodylatpuffer 0.75M GdmCl pH7.0. Die Entfaltungsbedingungen nach Inkubation: 83.3mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0.

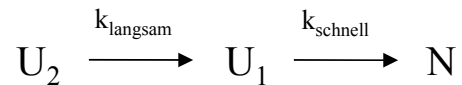
Für das Experiment mußte das zu untersuchende Protein zunächst in 10mM Glycinpuffer 4.5M GdmCl pH2.0 entfaltet und auf 25°C vorinkubiert werden. Anschließend wurde durch 1:6 Mischung mit 60mM Cacodylatpuffer pH7.25 (Endbedingung: 50mM Cacodylatpuffer 0.75M GdmCl pH7.0) die Rückfaltung des Proteins innerhalb einer Inkubationsschleife im SM-17 MV induziert (1 Sprung). Die Proteinkonzentration betrug in der Ausgangslösung 1.08mg/ml, nach dem 1 Sprung entsprechend 0.18mg/ml. Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten wurde die Rückfaltungsreaktion durch einen Entfaltungspuls (100mM Glycinpuffer 7.05M GdmCl pH1.95) unterbrochen und das dabei auftretende Fluoreszenzsignal aufgezeichnet. Die Entfaltungsreaktion erfolgte in Gegenwart von 83.3mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0. Die kürzest mögliche Inkubationszeit im Experiment betrug 27.5ms. Je nach Abweichung mußten pro Amplitudenwert zwischen 5 und 10 Einzelmessungen durchgeführt werden. Vor Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurden die gemittelten Fluoreszenzsignale zunächst um die jeweiligen Endpunktschwankungen korrigiert.

	<i>Einzelmessungen</i>		<i>„interrupted refolding“ Experiment</i>	
	Rückfaltung <sup>1)</sup>	Entfaltung <sup>2)</sup>	monoexponentiell <sup>3)</sup>	Biexponentiell <sup>3)</sup> , k <sub>2</sub> = 2.8 s <sup>-1</sup>
<b>Phase 1</b>				
k <sub>schnell</sub>	5.4 ± 0.038 s <sup>-1</sup>	1 ± 0 s <sup>-1</sup>	5.13 ± 0.05 s <sup>-1</sup>	5.28 ± 0.22 s <sup>-1</sup>
A <sub>schnell</sub>	84.9 ± 1.43 %	98.8 ± 0.03 %	100 %	95 ± 6.26 %
<b>Phase 2</b>				
k <sub>langsam</sub>	2.8 ± 0.08 s <sup>-1</sup>	0.12 ± 0.002 s <sup>-1</sup>	-	2.8 s <sup>-1</sup>
A <sub>langsam</sub>	15.1 ± 1.46 %	1.2 ± 0.022 %	-	5 ± 6.71 %
Chisq	0.0001468	0.0000255	0.00007155	0.00007

1) 50mM Cacodylatpuffer 0.75M GdmCl pH7.0; 2) 83.3mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 und 3) entspricht 1).

Tabelle 4-22 Die im *interrupted refolding* Experiment erhaltenen Ergebnisse nach monoexponentieller bzw. biexponentieller Regression. „Chisq“ gibt die Abweichungen der einzelnen Meßpunkte von der angelegten Ausgleichfunktion an.

Die nach biexponentieller Anpassung erhaltenen Amplitudenwerte konnten anschließend in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer  $t$  (*delay time*) mit Hilfe unterschiedlicher Ausgleichsfunktionen angeglichen werden. Wie bereits oben vorweggenommen, führte eine biexponentielle Ausgleichsfunktion nicht eindeutig zur Bestimmung der langsameren Rückfaltungsphase im Experiment. Vielmehr ließ sich der aufgetragene Amplitudenverlauf mit Hilfe einer monoexponentiellen Ausgleichsfunktion ausreichend gut annähern. Die biexponentielle Anpassung lieferte für die schnelle Hauptphase eine Geschwindigkeitskonstante von 5.1 s<sup>-1</sup>, ein Wert der relativ gut dem Ergebnis aus den direkten Rückfaltungsexperimenten entspricht (5.4 s<sup>-1</sup>). Nach diesen Ergebnissen trägt also die langsamere Rückfaltungsphase *nicht* zur Bildung nativer Moleküle bei. Um das Ergebnis genauer zu überprüfen, wurde auch eine biexponentielle Funktion eingesetzt, in der die Geschwindigkeitskonstante der langsameren Phase während der Regression *konstant* auf 2.8 s<sup>-1</sup> festgehalten wurde. Diese Funktion führte zu einer ähnlich guten Anpassung an die Meßdaten wie die monoexponentielle Ausgleichsfunktion. Für die Hauptphase konnte damit eine Geschwindigkeitskonstante von 5.28 s<sup>-1</sup> erhalten werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß anhand der Meßdaten sowie der verwendeten Meßbedingungen eine Differenzierung zwischen unterschiedlichen Ausgleichsfunktionen und damit verschiedenen kinetischen Phasen nicht eindeutig möglich ist.



Da jedoch die Anpassung mit konstantem  $k_{\text{langsam}}$  Wert niedrigere Abweichungen im Bereich der beiden Halbwertszeiten von  $k_{\text{schnell}}$  (131ms) und  $k_{\text{langsam}}$  (248ms) aufweist, ist davon auszugehen, daß tatsächlich die zweite Phase zur Bildung nativer Moleküle beiträgt. Eine *lag* Phase im Amplitudenanstieg der schnellen Reaktion läßt sich ebenfalls in den Experimenten nicht beobachten (Abbildung 4-48). Mit diesem Ergebniss sowie der guten Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten (direkten Rückfaltungsmessung vs. N-Test), scheinen genau wie beim Wildtypprotein keine stabilen Intermediate auf dem Hauptfaltungsweg von  $U_1$  nach N zu existieren. Das oben bereits postulierte Drei-Zustands-Modell wird also durch die erhaltenen Ergebnisse im Experiment bestätigt.

#### 4.1.14. Trypsin Spaltungstest

Die unterschiedlichen Rückfaltungsgeschwindigkeiten der einzelnen Prolinmutanten erlauben es, die Zugänglichkeit einzelner Positionen anhand eines einfachen Hydrolyseexperimentes zu untersuchen. Tendamiostat verfügt innerhalb seiner Sequenz über drei Arginine an Position 19, 68 und 72 sowie über ein Lysin an Position 34 (Tabelle 4-23). Diese Positionen sind potentielle Erkennungsstellen der Serinprotease Trypsin, die C-Terminal zu den genannten Stellen eine Hydrolyse der Peptidbindung durchführen kann. Diese Protease zeigt darüberhinaus eine Spaltungspräferenz gegenüber bestimmten, sequentiell benachbarten Aminosäuren (Arg/Lys- $X_{n+1}$ ). So werden beispielsweise Argininreste Lysinresten gegenüber um den Faktor 1.8 bis 2.0 bevorzugt (Kallasch, 1992). Andererseits werden C-Terminal zu der Spaltstelle angeordnete ( $X_n$ - $X_{n+1}$ ), aromatische Reste polaren und vor allem sauren Aminosäuren gegenüber deutlich bevorzugt. Aber auch sterische Einflüsse innerhalb der Rückgratkonformation sowie die Zugänglichkeit einzelner Raumbereiche haben einen Einfluß auf die Hydrolyse. Bereits Lin *et al.* konnten diesen Effekt in Zusammenhang mit der *Prolinisomerisierung* in RNase A erfolgreich umsetzen (Lin, 1983; Lin, 1984). Ihre Methode, die auch isomerspezifische Proteolyse genannt wird (ISP), basiert auf der Beobachtung, daß die Bindung zwischen  $X_n$  und  $X_{n+1}$  (Tyr<sup>92</sup>) nur dann

von Trypsin hydrolysiert werden kann, wenn das Prolin an Position  $X_{n+2}$  (Pro<sup>93</sup>) *trans*-ständig angeordnet ist.

Fragment	Reste	Sequenz	Masse	Ladung
T1	1-19	DTTVSEPA PSCVTLYQSWR	2140.36 Da	-1
T2	20-34	YSQADNGCAETVTVK	1585.71 Da	-1
T3	35-68	VVYEDDTEGLCYAVAPGQITVGDGYIGSHGHAR	3551.85 Da	-4
T4	69-72	YLAR	521.62 Da	+1
T5	73-74	CL	234.32 Da	0

Tabelle 4-23 Fragmente die nach dem vollständigen Verdau des Tendamistats mit Trypsin entstehen können (ohne Disulfidbrücken).

Tendamistat wird in Gegenwart von Trypsin selbst bei hohen Proteasekonzentrationen nicht hydrolysiert (Vértesy, 1984). Diese Proteaseresistenz war bisher insbesondere auf die intakten Disulfidbrücken zurückzuführen, die dem Protein eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen verleihen (Kallasch, 1992; Scharf, 1992). Entfernt oder blockiert man die Disulfidbrücken im Molekül, zeigt sich, wie erwartet, das tryptische Fragmentmuster (Kallasch, 1992).

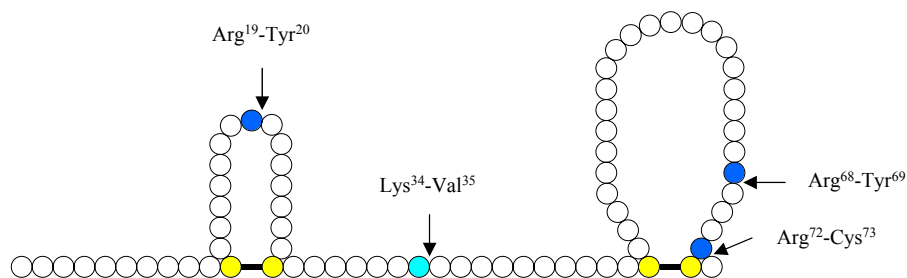


Abbildung 4-49 Spaltstellen für das Trypsin innerhalb des Tendamistats.

Durch die Bevorzugung von Arginin gegenüber Lysin sowie aromatischer Aminosäuren an C-terminalen Positionen sollte vor allem Arginin 19 eines der ersten Angriffspunkte im Tendamistat Molekül sein (Abbildung 4-49). Einen ähnlichen Aufbau besitzt auch der Sequenzabschnitt um Arginin 68 (Arg<sup>68</sup>-Tyr<sup>69</sup>-Leu<sup>70</sup>). Daher sollte dieser Bereich ebenfalls zu den bevorzugten Zielen

der Protease gehören. Lysin 34 (Lys<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup>-Val<sup>36</sup>) sowie Arginin 72 (Arg<sup>72</sup>-Cys<sup>73</sup>-Leu<sup>74</sup>) zählen, bedingt durch das Lysin sowie dem Fehlen eines aromatischen Restes an Position X<sub>n+1</sub>, zu den sekundären Angriffszielen der Protease, wobei sterische Einflüsse in den bisherigen Betrachtungen unberücksichtigt bleiben.

In den durchgeführten Spaltungsexperimenten wurde untersucht, ob die einzelnen Mutationen einen Einfluß auf die Proteasestabilität des Moleküls ausüben. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob bei der Rückfaltungsreaktion bestimmte Spaltstellen von der Trypsin Erkennung ausgenommen bleiben. Mit einer Konzentration von 0.1mg/ml wurden die drei Prolinmutanten einschließlich des Wildtyps in jeweils 10mM Glycinpuffer pH2.0 (nativ) bzw. 10mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 (denaturiert) gelöst und für 1 Stunde bei 25°C inkubiert. 5µl dieser Lösungen wurden anschließend in jeweils 95µl 50mM Tris-HCl pH8.0, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5M Harnstoff, 0.1mg/ml Trypsin (5000 U/ml) überführt (1:20 Verünnung) und 1min bei 25°C inkubiert. Die Proteolyseansätze wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit 10µl 1% SDS versetzt und für 2min auf 100°C erhitzt. Danach wurde der Ansatz sofort auf Eis überführt, mit 500µl eiskaltem Aceton präzipitiert und durch eine Methanol/Chlorofom Extraktion entsalzt. Speziell beim Entfernen von GdmCl erwies sich dieses Vorgehen als vorteilhaft. Die getrockneten Pellets wurden in 10µl dest. Wasser aufgenommen und 5µl über SDS-PAGE analysiert (Abbildung 4-50).

Bis auf den Wildtyp konnten für alle Prolinmutanten eindeutige Proteolysemuster auf dem Gel nachgewiesen werden. Vor allem die bei etwa 3.5kDa laufende Bande, das nach der Tabelle dem Trypsinfragment T3 (3551Da) zugeordnet wurde, konnte für die Mutanten P7AP9A sowie P7AP9AP50A eindeutig bestimmt werden. Die Mutante P50A zeigte bei etwa 5.7kDa eine Bande, die dem großen Fragment T2-T5 entspricht (5821Da). Ein ähnliches Fragment ist auch beim prolinfreien Tendamistat zu erkennen. Bei dieser Mutante geht jedoch das entsprechende Fragment im nativen Ansatz (Lane 8) in ein kleineres Fragment von 4,9kDa über, das wahrscheinlich dem Spaltprodukt T2-T3 entspricht (5119Da). Trotz der 5.7kDa Bande weist die P50A Mutante im Bereich um 3.5kDa kein Fragment auf. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß der Abspaltung von T3 (3551Da) die Spaltung zwischen Arg<sup>19</sup>-Tyr<sup>20</sup> vorrausgeht. Vergleicht man ferner den Einfluß der Rückfaltung auf die Proteolyse, läßt sich erkennen, daß in allen Mutanten die Fragmentierung bei den nativen Ansätzen deutlich weiter entwickelt ist als in den Rückfaltungsansätzen.

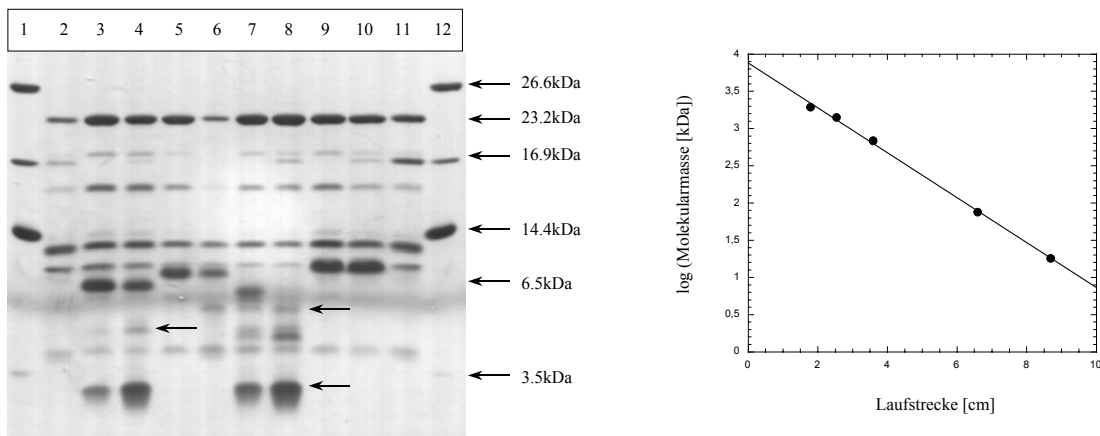
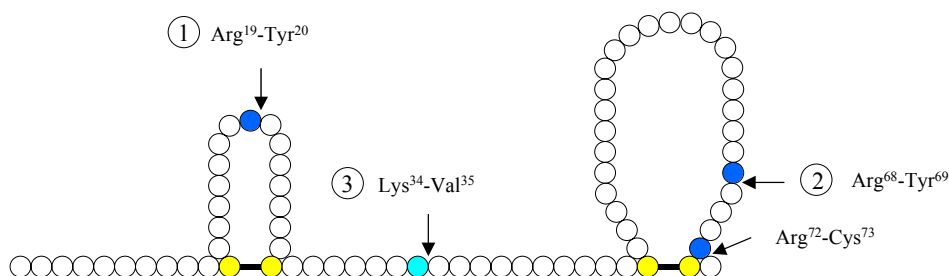


Abbildung 4-50 Dargestellt ist der tryptische Verdau von Tendamistat (Lane 9 bzw. 10) sowie der Mutanten P7AP9A (Lane 3 bzw. 4), P50A (Lane 5 bzw. 6) und P7AP9AP50A (Lane 7 bzw. 8). In Lane 3,5,7 bzw. 9 sind die rückgefalteten und in Lane 4,6,8 bzw. 10 die nativen Proben aufgetragen. Als Kontrolle befindet sich in Lane 2 bzw. 11 das eingesetzte Trypsin und in Lane 1 bzw. 12 der Marker. Verwendet wurde ein Tricine Gelsystem (AA: 16.5%). Auf dem rechten Bild ist die Eichkurve für das SDS-Gel abgebildet.

Sehr deutlich wird dieser Sachverhalt anhand des prolinfreien Tendamistats sichtbar. Die Rückfaltung verzögert demnach lediglich die Proteolyse der entsprechenden Proteine. Ob dieser Effekt auf eine Inhibierung durch GdmCl (0.3M) im Rückfaltungsansatz zurückzuführen ist, konnte nicht weiter überprüft werden. Auf grund der erhaltenen Ergebnisse läßt sich also eine Fragmentierungsabfolge festlegen, die den obigen Voraussagen entspricht und unten dargestellt ist:



Mit den restlichen Spaltungsansätzen wurde außerdem untersucht, ob sich die native Struktur des Moleküls, speziell nach Spaltung zwischen Lys<sup>34</sup>-Val<sup>35</sup> wieder richtig rekonstituieren läßt. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe der nativen Gelelektrophorese durchgeführt.

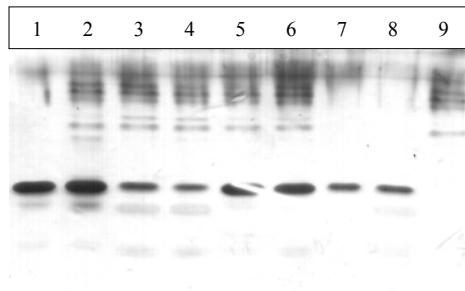


Abbildung 4-51 Dargestellt ist der tryptische Verdau des Tendamistats (Lane 1 bzw. 2) sowie der Mutanten P7AP9A (Lane 7 bzw. 8), P50A (Lane 5 bzw. 6) und P7AP9AP50A (Lane 3 bzw. 4) unter nativen Laufbedingungen (AA: 14%). In Lane 1,3,5 bzw. 7 sind die rückgefalteten und in Lane 2,4,6 bzw. 8 die nativen Proben aufgetragen. Als Kontrolle befindet sich in Lane 9 das verwendete Trypsin.

Wie man in Abbild 4-51 sehen kann, kommt es in allen Fällen zum vollständigen Aufbau der Nativstruktur, speziell bei den hochgradig fragmentierten Proteinen P7AP9A sowie P7AP9AP50A. Da der Gellauf unter nicht-reduzierenden Bedingungen stattfand, ist davon auszugehen, daß sämtliche Disulfide im Molekül intakt vorlagen. Sollte das Fragment T4 durch Trypsin freigesetzt worden sein (vgl. Netto Ladung), würde es daher zu einer Verschiebung der Laufeigenschaften der Proteine im Nativgel kommen. Da eine solche Verschiebung nicht zu beobachten ist, kann man davon ausgehen, daß nach Spaltung zwischen Arg<sup>68</sup>-Tyr<sup>69</sup> die Bindung Arg<sup>72</sup>-Cys<sup>73</sup> weiterhin intakt vorliegt.



## 4.2. Aufbau und Charakterisierung weiterer Mutanten

Im zweiten Teil der Arbeit sollten durch gerichtete Mutagenese Punktmutationen in das Tendamistat eingeführt werden, um Aussagen über den Aufbau und die Lage des Übergangszustands bei der Faltung des Tendamistats zu erhalten. Manche einzuführenden Mutationen beziehen sich auch auf besondere Teilaspekte der  $\beta$ -barrel Struktur. Hierzu gehört insbesondere der Einfluß des sogenannten hydrophoben Oberflächenclusters (*small exterior hydrophobic cluster*) an Position 36 und der Asparagin-Umkehrschleife (*asparagine corner*) an Position 25 auf Stabilität und Faltung des Tendamistats.

### 4.2.1. PCR-Mutagenese

#### 4.2.1.1. Konstruktion der Oligonukleotide und Einführung der Mutationen

Die Auswahl der richtigen Kombination richtet sich nach der auszutauschenden Aminosäure und der kleinst möglichen Anzahl an Substitutionen, die vorgenommen werden müssen, um die entsprechende Aminosäure umzuwandeln. Als zweites Auswahlkriterium wurden die Mutationen innerhalb der Primersequenzen so gewählt, daß entsprechend der Codon-Usage von *Streptomyces* die häufigsten Triplet-Kombinationen nach Austausch der entsprechenden Aminosäure vorlagen. Entsprechend der Aufgabenstellung lassen sich die eingeführten Mutationen in drei Gruppen unterteilen:

- Zur Untersuchung des hydrophoben Clusters (*small exterior hydrophobic cluster*) an Position 36 wurden insgesamt vier Mutationen vorgenommen. Zwei Mutationen betreffen dabei die entsprechende Position und überführen das Valin 36 in Alanin (V36A) bzw. Isoleucin (V36I). Zwei weitere Mutationen betreffen den amphipathischen Gürtel um diese Position und führen zum Austausch von Threonin 32 gegen bzw. Leucin 44 jeweils gegen Alanin.
- Zur Untersuchung der *asparagine-corner* wird anstatt Asparagin ein Alanin an Position 25 eingeführt. Diese Substitution sollte gleichzeitig zu einer Veränderung der Stabilität des

Moleküls führen, da Alanin nicht mehr in der Lage ist, über die Seitenkette Wasserstoffbrücken auszubilden.

- In die dritte Gruppe gehören Punktmutationen, die zum einen innerhalb des Haipins zwischen C11 und C27 (L14) bzw. der ungeordneten Schleife zwischen G59 und H66 (I61) liegen. Für die erste Position wurde eine Substitution gegen Alanin ausgewählt (L14A). Für die zweite Position wurde ein, ansonsten im Tendamistat nicht vorhandenes Methionin, in die Sequenz eingeführt (I61M). Diese Substitution sollte es ermöglichen, durch die räumliche Nähe zu W18 einen zusätzlichen Einfluß auf die Tryptophanfluoreszenz, in Abhängigkeit von der Entfernung beider Seitenketten auszuüben.

Die daraus sich ableitenden Mutationsprimer sind in der unteren Tabelle aufgeführt:

<i>Mutationsprimer</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Besonderheiten</i>
L14A	5' CCTGCGTGACGGCCTACCAGAGCTGGC 3'	-
N25A	5' CACAGGCCGACGCCGGCTGTGCCGAGAC 3'	-
T32A	5' CGAGACGGTGGCCGTGAAGGTCGTC 3'	BstEII-off
V36A	5' CGTGAAGGTCGCCTACGAGGACGACAC 3'	AccI-off
V36I	5' CGTGAAGGTCATCTACGAGGACGAC 3'	AccI-off
L44A	5' CACCGAAGGCGCGTGCTACGCCGTCG 3'	StuI-off
I61M	5' CGACGGCTACATGGGCTCGCACGGCCAC 3'	-

Nach Aufreinigung (RP-HPLC) und Quantifizierung wurden sämtliche Primer parallel in dem bereits zuvor etablierten Mutageneseverfahren eingesetzt. In insgesamt sieben Reaktionsansätzen wurden 27.25µl dest. Wasser, 2.5µl Formamid, 5µl 10xVent Polymerasepuffer (NEB, 1996), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 2.5µl Mutationsprimer (10µM), 2.5µl Nout3 Primer (10µM) und 2µl pT136 (10ng/µl) zugegeben und vermischt. Nach 5 Minuten Vordenaturierung beider Ansätze bei 98°C wurden die Mischungen auf Eis abgeschreckt und mit 0.25µl Vent Polymerase versetzt. Kurz bevor der erste Temperierungszyklus die Annealingtemperatur von 58°C erreicht hatte, wurden beide Reaktionsansätze in den Thermocycler überführt. Die Reaktionszyklen für die erste PCR-Reaktion entsprachen dabei den bereits im Abschnitt 4.1.1.3 aufgeführten Bedingungen. Nach 25 Zyklen und einer finalen Probenentemperatur bei 72°C (7 Minuten), wurden die gesamten Reaktionsansätze gelelektrophoretisch untersucht (2% Agarose, 1xTBE

Puffer). Alle Amplifikate zeigten die gewünschten Fragmentgrößen (L14A/Nout3: 374bp; N25A/Nout3: 341bp; T32A/Nout3: 319; V36A/Nout3: 307bp; V36I/Nout3: 307bp; L44A/Nout3: 283bp und I61M/Nout3: 232bp). Alle Amplifikate wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2% Agarose, 1xTBE Puffer) und mit Hilfe von DEAE-Membranen isoliert. Nach Aufreinigung und Quantifizierung der zurückgewonnenen Fragmente erfolgte die zweite PCR zur Vervollständigung der Teilsequenzen. Hierzu wurde in zwei Ansätzen jeweils 18µl dest. Wasser, 2.5µl DMSO, 4µl 10xTaq Polymerasepuffer (Perkin Elmer, 1996), 8µl dNTP-Mix (1.25mM/dNTP), 5µl isoliertes Fragment (10ng/µl) und 2µl NdeI geschnittenes Plasmid (10ng/µl) zusammengegeben und bei 98°C für 5 Minuten vordenaturiert. Anschließend wurden nacheinander alle Reaktionsmischungen auf Eis abgeschreckt und mit 0.5µl Taq Polymerase versetzt. Die Stranghybridisierung erfolgte genau wie in Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben durch Temperierung sämtlicher Ansätze bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (RT und 50°C). Die Ansätze wurden anschließend auf Eis gestellt und mit 10µl Primer-Mix (4.5µl 10µM Nout5, 4.5µl 10µM Nout3mut und 1µl 10xTaq Polymerasepuffer) versetzt und über 25 Zyklen im Thermocycler amplifiziert. Für die kleineren Fragmente unterhalb von 300bp konnten deutlich bessere Amplifikate mit Extensionszeiten von 45sec gegenüber 1min erhalten werden. Am Ende der PCR wurden jeweils 5µl Reaktionsansatz entnommen und über ein Agarosegel untersucht (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer). Durch den geringen Hintergrund wurden sämtliche Reaktionsansätze ohne Isolierung der entsprechenden Amplifikate durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol weiter aufgearbeitet, mit 3M KOAc / abs. Ethanol gefällt, anschließend über ein Agarosegel quantifiziert (1.2% Agarose, 1xTBE Puffer) und schließlich mit 20U SpeI und 10U EcoRI für 4 Stunden bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung (2% Agarose, 1xTBE Puffer) und Isolierung (DEAE-Membranen) der erhaltenen Fragmente. Zu 50ng der erhaltenen Produkte wurde jeweils 10ng pT136 Vektor zugegeben und über Nacht bei 16°C mit 200U T4-DNA Ligase inkubiert. Jeweils 5µl beider Ligationsansätze wurden am darauffolgenden Tag in DH5α Zellen transformiert. Von den Transformationsplatten wurden je 10 Klone parallel auf eine Stammhaltungsplatte aufgestrichen und die ersten 5 Klone über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) hochgezogen. Nach Isolierung der plasmidischen DNA wurden jeweils 10µl Plasmidpräparation mit HindIII und EcoRI verdaut und über Gelelektrophorese analysiert. Bei allen Klonen war genau wie beim Wildtyp eine Bande bei 669bp zu erkennen. Zusätzlich dazu wurden die Klone pSHT32A (BstEII-off), pSHV36A (AccI-off), pSHV36I (AccI-off) sowie pSHL44A (StuI-off) über die, bei der Mutagenese entfernten

Restriktionsschnittstellen charakterisiert (vgl. weiter oben). Von den Stammhaltungsplatten wurden erneut über Nacht jeweils 2 positive Klone in LB-Medium (Ampicillin) überführt und am darauffolgenden Tag aus jeweils 2ml Kultur die entsprechenden Plasmide isoliert. Nach Dialyse wurden die erhaltenen Plasmide sequenziert. Aus Sicherheitsgründen wurde bei den Mutanten L14A, N25A und I61M (vgl. Besonderheiten) zusätzlich der Gegenstrang mitsequenziert. In sämtlichen Plasmiden konnten die eingeführte Mutationen eindeutig nachgewiesen werden. Die Plasmidisolationen der Klone 1 auf den jeweiligen Stammhaltungsplatten wurden für alle weiteren Experimente verwendet .

## **4.2.2. Klonierung, Expression und Aufreinigung**

### **4.2.2.1. Umklonierung in den Expressionsvektor pAX5a**

Die Plasmide pSHAL14A;1, pSHAN25A;1, pSHAT32A;1, pSHAV36A;1, pSHAV36I;1, pSHAL44A;1 und pSHAI61M;1 wurden enzymatisch geöffnet um die unterschiedlichen Strukturgene zu isolieren. 20µg jedes Plasmids wurden mit 40U SpeI sowie 10U EcoRI vermischt und für 5h bei 37°C inkubiert. Der vollständige Restriktionsansatz mußte anschließend präparativ über Gelelektrophorese (1.2% Agarose, 1xTBE) aufgereinigt werden. Die Isolierung sämtlicher 479bp Fragmente erfolgte anschließend über DEAE-Membranen. Nach Aufarbeitung der DNA wurde die Konzentration der Fragmente bzw. des zuvor linearisierten pAX5a Vektors erneut über Gelelektrophorese (1.5% Agarose, 1xTBE Puffer) bestimmt. Für die Ligation wurde 10ng Vektor mit 20ng der entsprechenden Fragmente zusammengegeben. Die Inkubation der sieben Ligationsansätze erfolgte in Gegenwart von 200U T4-DNA Ligase über Nacht bei 16°C. Am darauffolgenden Tag wurden jeweils 5µl Ligationsansatz in DH5α transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von allen Transformationsansätzen wurden jeweils 10 Klone auf Stammhaltungsplatten überimpft und die ersten fünf Klone über Nacht in LB-Medium (Ampicillin) hochgezogen. Nach DNA Mini-Präparation und anschließendem Kontrollverdau mit EcoRI/HindIII, konnte in allen Präparationen die Fragmentbande bei 782bp beobachtet werden. Für die weiteren Experimente wurden die Plasmide der entsprechenden Klone pHAL14A;1, pHAN25A;1, pHAT32A;1, pHAV36A;1, pHAV36I;1, pHAL44A;1 und pHAI61M;1 verwendet.

#### 4.2.2.2. Transformation in *Streptomyces lividans* TK24

Je 200µl Protoplastensuspension wurden unter fließendem Wasser aufgetaut und auf Eis zu je 50µl portioniert. In jede Protoplastensuspension wurde anschließend etwa 0.5µg der entsprechenden Plasmid-Präparation transformiert. Nach bereits einem Tag konnten die Transformationsplatten mit 1ml Thiostrepton-Lösung (50µg/ml) überschichtet und weitere 3 Tagen bei 28°C inkubiert werden. Danach wurden pro Transformationsplatte jeweils 10 Klone auf R2YE-Stammhaltungsplatten (Thiostrepton) überimpft und bis zur angehenden Sporulation weitere 5 Tage bei 28°C inkubiert. Mit Ausnahme der L14A und N25A Platte war in der Entwicklung der einzelnen Mutanten kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die genannten Platten wiesen einen Wachstumsrückstand von 1-2 Tagen gegenüber den Klonen T32A, V36A, V36I, L44A und I61M auf.

#### 4.2.2.3. Der $\alpha$ -Amylase Plattentest

Nach einer Rastervorlage wurden jeweils 10 Klone pro Mutante von den frisch angelegten Stammhaltungsplatten auf NL701-Platten (Thiostrepton) überimpft und mehrere Tage bei 27-28°C inkubiert. Nachdem die Klone 2-3 Millimeter Durchmesser erreicht hatten (3 Tage), wurden die Platten mit 1.5ml Pankreatinlösung (2.0%) versetzt und etwa 30min auf Raumtemperatur belassen. Sämtliche Platten wurden anschließend mit einer, auf 50°C temperierten Stärke/Agarose-Lösung überschichtet und für weitere 90min bei 28°C inkubiert. Zum Nachweis des sekretierten Inhibitors wurden alle Platten im Anschluß daran mit 2.5ml einer Jod/Kaliumjodid-Lösung überschichtet und untersucht. Der bräunlich-violette Hemmhof konnte bei allen Mutanten nachgewiesen werden. Dennoch ergaben sich zwischen den einzelnen Mutanten deutliche Unterschiede. Die Mutanten L14A und N25A zeigten hier wiederum den kleinsten Hemmhof, gefolgt von der V36A Mutante. Für die Mutanten T32A, V36I, L44A und I61M konnte kein signifikanter Unterschied im Hemmhofdurchmesser zum Wildtyp Standard festgestellt werden. Möglicherweise ist dieser Unterschied auf die zu erwartende Instabilität der beiden Mutanten L14A und N25A unter Expression- bzw. Analysebedingungen zurückzuführen.

#### 4.2.2.4. Expression in 50ml Schüttelkulturen

Nach Transformation der Expressionsplasmide pHAL14A;1, pHAN25A;1, pHAT32A;1, pHAV36A;1, pHAV36I;1, pHAL44A;1 und pHAI61M;1 in *Streptomyces lividans* TK24 wurden die R2YE-Platten nach 20 Stunden mit 1ml Thiostrepton (50µg/ml) überschichtet und bis zur beginnenden Sporulation weitere 5-6 Tage bei 28°C belassen. In einem 300ml Erlenmeyerkolben mit Spiralfeder wurden jeweils 50ml MM-Medium mit Thiostrepton (5µg/ml) vorgelegt und unter sterilen Bedingungen mit ca. 1cm<sup>2</sup> Rasenfläche direkt von der Transformationsplatte beimpft. Die Probenentnahme (1ml) erfolgte ab dem zweiten Tag täglich bis zum 5 Kulturtag. Eine Quantifizierung der exprimierten Proteinmenge über den α-Amylase Aktivitätstest erfolgte bei diesen Mutanten jedoch nicht. 100µl der einzelnen Überstände wurde anschließend mit Aceton gefällt, in 20µl Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE untersucht (Abbildung 4-52).

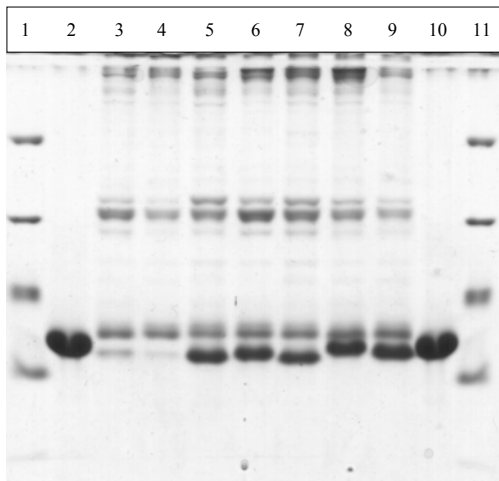


Abbildung 4-52 SDS-PAGE der Kulturüberstände. Aufgetragen wurde jeweils 100µl Aceton gefällter Kulturüberstand (MM-Medium) der Mutanten L14A (Lane 3), N25A (Lane 4), T32A (Lane 5), V36A (Lane 6), V36I (Lane 7), L44A (Lane 8) und I61M (Lane 9) nach dem 5. Inkubationstag. Der Molekulargewichtsmarker (26.6kDa, 16.9kDa, 14.4kDa, 6.5kDa und 3.5kDa) befindet sich in Lane 1 und 11. Als Referenz wurde zusätzlich 5µg Tendamistat Wildtyp in Lane 2 und 10 augetragen.

#### 4.2.2.5. Präparative Expression

Für eine präparative Proteinexpression der Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A und I61M wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in *S. lividans* transformiert und nach überschichten der Kulturplatten mit 2ml Thiostrepton-Lösung (50µg/ml) 4 bzw. 5 Tage (5 Tage bei L14A und N25A) bei 28°C belassen. Nachdem sich ein gut bewachsener Zellrasen auf den rötlich-blauen R2YE-Platten ausgebildet hatte, wurden für die T32A, V36A, V36I, L44A sowie I61M Mutante 3x75ml und für die L14A sowie N25A Mutante 5x75ml Minimalmedium (Thiostrepton) in 300ml Erlenmeyerkolben beimpft und bei 27°C im Schüttler inkubiert. Am 6 Tag wurde die Inkubation abgebrochen und die Zellmasse durch Zentrifugation (4°C) bei 6000rpm abgetrennt. Die erhaltenen Kulturüberstände mußten anschließend mit verd. Ammoniak auf pH7.0 eingestellt werden. Ohne Vorfraktionierung erfolgte anschließend die Präzipitation der Proteine bei einer Sättigungskonzentration von 80% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach dem letzten Salzzusatz wurden sämtliche Fällungsansätze weitere 2h bei 4°C gerührt und anschließend in GSA-Becher überführt. Die Zentrifugation bei 4°C und 10000rpm (45min) erbrachte bei allen Ansätzen ein deutliches Proteinpellet, das anschließend in 15ml 40mM Tris-HCl und 10mM EDTA (pH8.0) gut resuspendiert werden konnte. Die salzhaltigen Proben wurden durch erneute Zentrifugation von unlöslichen Begleitstoffen befreit und über 0.45µm Celluloseacetatfilter filtriert. Die Sephacryl S-100HR Säule wurde vor jedem Lauf mit 2 Säulenvolumen 0.1N NaOH sowie 1 Säulenvolumen dest. Wasser gespült (4ml/min) und bis zum Erreichen von pH6.0 mit Laufpuffer (20mM Bis-Tris pH6.0) equilibriert. Nach Aufziehen der jeweiligen Probe, wurde der Chromatographielauf über 2 Säulenvolumen mit einer Flußgeschwindigkeit von 1.5ml/min durchgeführt. Anhand der Elutionsprofile konnte zwischen den einzelnen Mutanten kein wesentlicher unterschied beobachtet werden. Die Hauptaktivität eluierte jeweils nach etwa 80ml von der Säule. Die Fraktionen 8 bis 12 (Fraktionsvolumen 10ml) wurden jeweils vereinigt und für die anschließende Ionenaustauschchromatographie bereitgestellt. Auf die zuvor gereinigte und mit Puffer A (20mM Bis-Tris pH6.0) equilibrierte DEAE-Säule wurde das Rohprodukt (jeweils Fraktionen 8 bis 12) aufgezogen und der Chromatographielauf gestartet (Fluß: 2.5ml/min; Puffer B: Puffer A + 1M NaCl; Gradient: 0% → 35% Puffer B in 550ml). Die Fraktionsgröße des Sammlers betrug in allen Fällen 10ml. Unabhängig von der jeweils aufgetragenen Mutante befand sich die Hauptaktivität stets in den Fraktionen 22-26. Diese wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon, YM1 Membrane) aufkonzentriert. Nachdem

nur noch wenige ml der Proteinlösung übriggeblieben waren, wurde der viskose Rückstand mit 40ml dest. Wasser aufgefüllt und erneut dialysiert. Für eine längerfristige Lagerung wurde das Proteinkonzentrat zu je 500µl portioniert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In Tabelle 4-24 sind die Ergebnisse aus der präparativen Kultivierung in Minimalmedium nochmals zusammengefaßt. Die Mengenbestimmung vor der Ultrafiltration erfolgte über Aktivitätstest bzw. danach über die UV-Absorbtion bei 276nm.

	Kultivierung	Fällung	Gelfiltration	Ionenaustauscher	Ultrafiltration
<b>Volumen</b>	<b>225ml</b>	<b>15ml</b>	<b>50ml</b>	<b>50ml</b>	<b>5ml</b>
T32A	32mg	-	-	17mg	16mg
V36A	45mg	-	-	20mg	17.7mg
V36I	38mg	-	-	15mg	12.3mg
L44A	34mg	-	-	16mg	15.2mg
I61M	55mg	-	-	21mg	20.6mg
<b>Volumen</b>	<b>375ml</b>	<b>15ml</b>	<b>50ml</b>	<b>50ml</b>	<b>5ml</b>
L14A	30mg	-	-	15mg	14.4mg
N25A	35mg	-	-	16mg	15.3mg
	<b>M<sub>gemessen</sub> (ESI-MS)</b>	<b>M<sub>gemessen</sub> (MALDI-MS)</b>		<b>M<sub>berechnet</sub></b>	
L14A	7915.8Da	7916.19Da		7914.7Da	
N25A	7914.9Da	7914.44Da		7913.7Da	
T32A	7926.8Da	7927.94Da		7926.7Da	
V36A	7929Da	7927.9Da		7928.7Da	
V36I	7969.9Da	7969.22Da		7970.7Da	
L44A	7914.4Da	7915.65Da		7914.7Da	
I61M	7973.9Da	7974.8Da		7974.7Da	

Tabelle 4-24 Ausbeuten nach Kultivierung (Minimalmedium) und präparativer Aufreinigung der Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A und I61M. Die MALDI-MS Daten konnten erst nach interner Kalibrierung durch Insulin (5734.5Da) hinreichend genau bestimmt werden (persönliche Mitteilung, Brill).

Von allen aufgereinigten Mutanten wurden Proben in 0.1%TFA zur Bestimmung der Molekularmasse abgegeben.



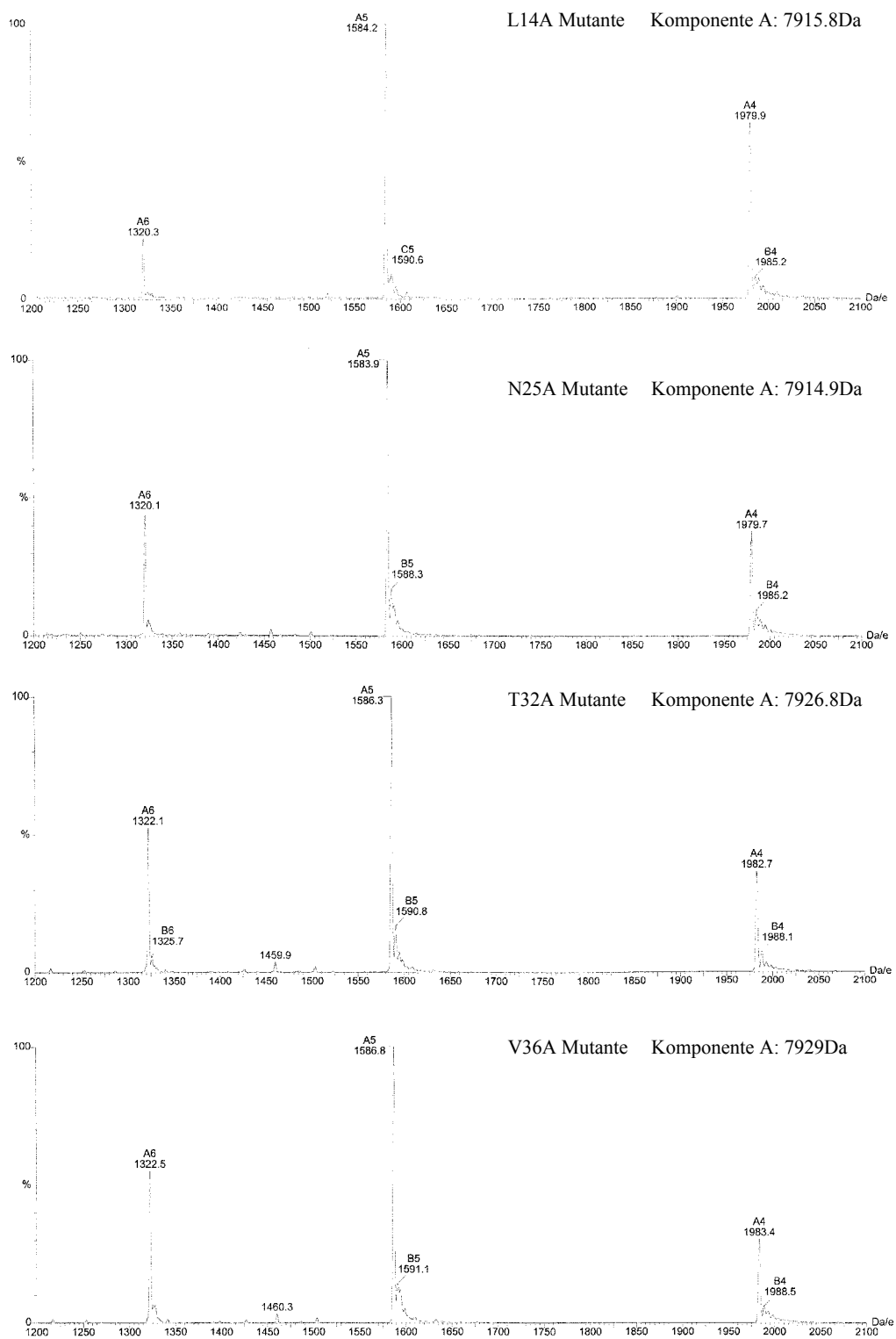


Abbildung 4-53 ESI-MS Spektren der Mutanten L14A, N25A, T32A und V36A.

Im Gegensatz dazu traten bei den MALDI-TOF Massen zunächst große Abweichungen (5-150Da) von der berechneten Molekularmasse auf. Die Verwendung unterschiedlicher Matrixsubstanzen im MALDI brachte keine deutlichen Verbesserungen mit sich.

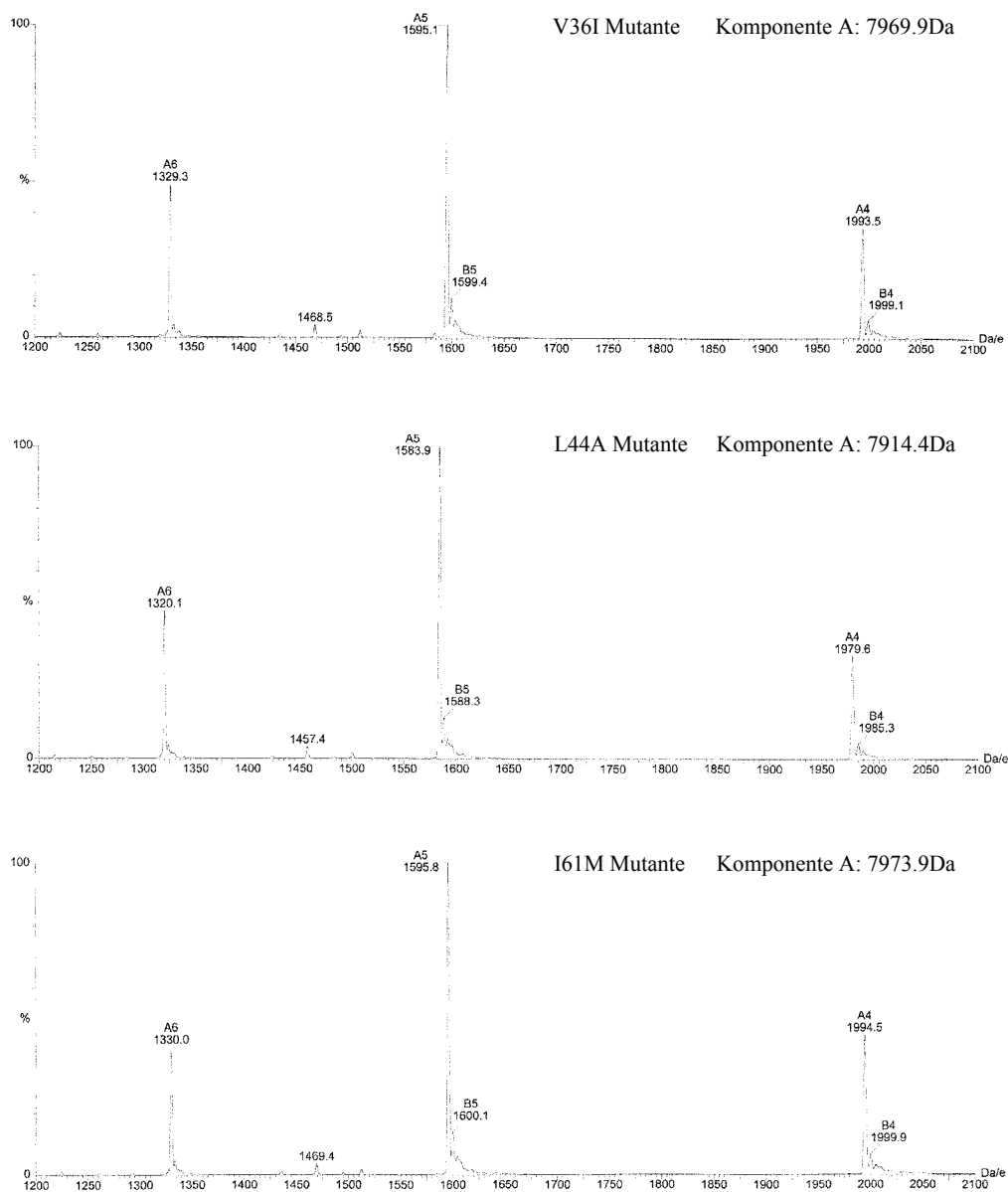


Abbildung 4-54 ESI-MS Spektren der Mutanten V36I, L44AA und I61M.

Erst nach interner Kalibrierung mit Insulin (5734.5Da) konnten die Fehlerabweichungen ausreichend minimiert werden. Alle gemessenen Molekularmassen sind in Tabelle 4-24 zusammengestellt und als ESI-MS Spektren in Abbild 4-53 sowie 4-54 wiedergegeben.

### **4.2.3. Analytik**

#### **4.2.3.1. PAGE Analytik**

Von allen hergestellten Proteinstammlösungen wurden je 5 $\mu$ l entnommen und im Vakuum lyophilisiert. Die trockenen Proteinpellets wurden anschließend in 20 $\mu$ l 1x Probenpuffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.001% Bromphenolblau und 25% Glycerin) aufgenommen und auf zwei unterschiedliche Gelsysteme aufgetragen. Bei Gelsystem A handelte es sich um ein 15% Nativgel (vgl. Material und Methoden Teil), zur Untersuchung der Proteinlaufeigenschaften. Sollte es, wie bei der C11AC27A Mutante beobachtet (Scharf, 1992), bei den neu aufgebauten Proteinen zur Aggregation kommen, ließen sich solche Strukturen relativ leicht anhand höhermolekularer Zusatzbanden nachweisen. Da sich solche Zusatzbanden aus unterschiedlich vielen Untereinheiten aufbauen lassen, kann ihre Molekularität durch Ermittlung der Laufstrecke rechnerisch bestimmt werden. Darüberhinaus ist es über Nativgele möglich strukturelle Informationen von Proteinen zu analysieren. Würden beispielsweise die eingebrachten Mutationen zu einer signifikanten Deformation - Änderung des Hydratationsvolumens - oder gar zu einer Zerstörung der Struktur führen, wären solche Effekte ebenfalls durch ein verändertes Laufverhalten der Hauptbande zu erkennen. Wie man in Abbild 4-55 erkennen kann, laufen nahezu alle Mutanten auf dem Gel auf gleicher Laufhöhe. Höhermolekulare Aggregate der einzelnen Mutanten, berechnet und durch Pfeile angedeutet (Abbildung 4-55), konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Daher läßt sich ihre Bildung unter den im Gelsystem vorhandenen Bedingungen ebenfalls für alle Mutanten ausschließen. Bei Gelsystem B werden die Proteine unter nicht-reduktiven aber denaturierenden Bedingungen untersucht. Als Denaturierungsmittel wurde 8M Harnstoff eingesetzt. Bei labilen Mutanten kommt es zu einer Entfaltung der Proteinstruktur was sich durch einen Laufunterschied (Verzögerung) relativ leicht nachweisen läßt.

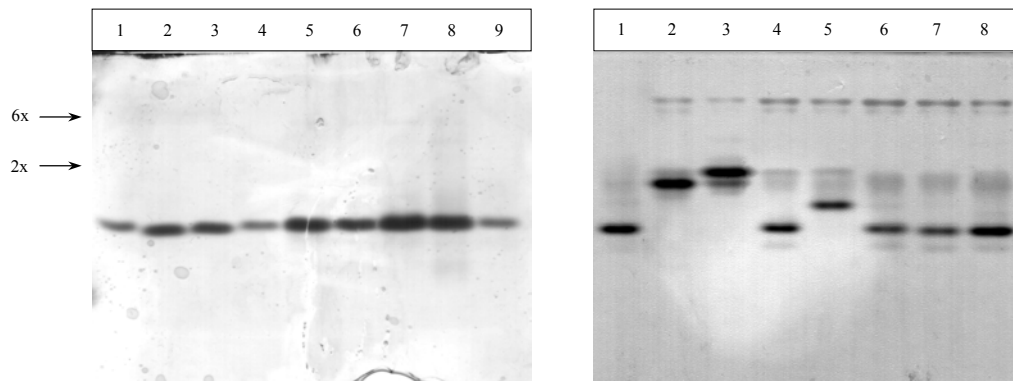


Abbildung 4-55 Nativgel (links) bzw. denaturierendes Harnstoffgel (rechts). Aufgetragen sind die Mutanten L14A (Lane 2), N25A (Lane 3), T32A (Lane 4), V36A (Lane 5), V36I (Lane 6), L44A (Lane 7) und I61M (Lane 8) sowie der Tendamista Wildtyp (Lane 1 und 9). Die Pfeile am linken Rand kennzeichnen die berechnete Laufhöhe von Aggregaten.

Wie man in Abbild 4-55 (rechts) erkennen kann, trifft ein solcher Fall für die Mutanten L14A, N25A und V36A zu. Innerhalb dieser drei Proteine kommt es besonders bei der N25A Mutante zu einer deutlichen Laufverzögerung auf dem Gel. Die restlichen Tendamista Mutanten verhalten sich in Gegenwart von 8M Harnstoff einheitlich und entsprechen von ihrem Laufverhalten dem Wildtyp.

#### 4.2.3.2. Inhibitionstest

Ob die neu eingeführten Mutationen einen Einfluß auf die Bindung von  $\alpha$ -Amylase ausüben, wurde in einem weiteren Ansatz untersucht. Dazu wurde in einem Überschuß jeweils 5 $\mu$ g Inhibitor mit 2.5 $\mu$ g  $\alpha$ -Amylase ( $\approx$  56kDa) in 50mM MES Puffer pH6.0 bei 37°C kurz inkubiert. Nach Zusatz von 2x Probenpuffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 0.01% Bromphenolblau und 50% Glycerin) wurden die Proben auf ein Nativgel (12% AA) aufgetragen. Als Kontrolle diente freie  $\alpha$ -Amylase, die unter den gleichen Bedingungen behandelt wurde (Abbildung 4-56). Nach dem Lauf wurde das Gel in 12% TCA fixiert, kurz mit dest. Wasser ausgespült und anschließend mit Coomassie gefärbt. Deutlich ist auf dem Gel eine Verschiebung der  $\alpha$ -Amylase Bande zu

erkennen, die auf Grund der Bindung an das Tendamistat ein schnelleres Laufverhalten unter den Elektrophoresebedingungen zeigt.

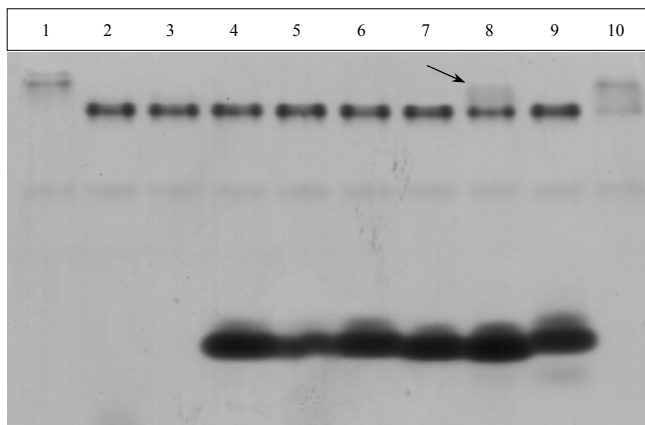


Abbildung 4-56 Nativgel zur Untersuchung des Enzym-Inhibitor Komplexes der Mutanten L14A (Lane 2), N25A (Lane 3), T32A (Lane 4), V36A (Lane 5), V36I (Lane 6), L44A (Lane 7) und I61M (Lane 8). In Lane 1 und 10 befindet sich die eingesetzte  $\alpha$ -Amylase (2.5 $\mu$ g). Der Wildtyp wurde in Lane 9 mit aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet den Bereich des I61M/ $\alpha$ -Amylase Komplexes.

Dieser Effekt ist trotz gesteigener Molekularmasse des Enzym-Inhibitor Komplexes auf eine höhere Gesamtladung zurückzuführen. Leider konnten bei die im Überschuß eingesetzten und am Komplex unbeteiligten Proteinbanden der Mutanten L14A bzw. N25A nicht angefärbt werden. Wie man jedoch anhand der zuvor gezeigten Gele (vgl. Abbild 4-55) erkennen kann, stellt dies kein prinzipielles Problem dar, sondern ist vermutlich auf die schlechte Anfärbbarkeit (Coomassie B250) dieser beiden Varianten zurückzuführen. Daß beide Mutanten dennoch an die  $\alpha$ -Amylase gebunden haben müssen, läßt sich durch die eingetretene Laufverschiebung des Komplexes gegenüber der freien  $\alpha$ -Amylase eindeutig belegen. Betrachtet man die entstandenen Komplexe genauer, läßt sich ein weiterer Effekt gut beobachten. Bei der I61M Mutante kommt es trotz Überschusses nicht zu einer irreversiblen Inhibierung der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase (Wildtyp:  $2 \times 10^{-10}$ M). Oberhalb der Komplexbande kann eindeutig freies Enzym nachgewiesen werden, daß in etwa der gleichen Höhe läuft wie die freie  $\alpha$ -Amylase. Da der durch die Mutation betroffene Bereich ebenfalls für die Bindung an die  $\alpha$ -Amylase verantwortlich ist, resultiert

dieser Effekt vermutlich durch: 1) eine starke hydrophobe Wechselwirkung mit dem räumlich benachbarten Tryptophan, dessen Zugänglichkeit für die  $\alpha$ -Amylase dadurch verändert sein kann und 2) eine Veränderung der Oberfläche des vierten Bindungssegmentes (Asp<sup>58</sup>-Gly<sup>59</sup>-Tyr<sup>60</sup>-Ile<sup>61</sup>-Gly<sup>62</sup>) an die  $\alpha$ -Amylase. Letzteres würde bedeuten, daß auch andere Raumbereiche wesentlich zur Konstitution des Enzym/Inhibitor Komplexes beitragen (Wiegand, 1995), worauf Untersuchungen an zyklischen Peptidmimetika bereits hingewiesen haben (Matter, 1995). Die Substitution an Position 44 (L44A) führt hingegen nicht zu einem bindungsreduzierenden Effekt und das, obwohl dieser Raumbereich als Segment 2 (Leu<sup>44</sup>-Cys<sup>45</sup>-Tyr<sup>46</sup>) ebenfalls an der  $\alpha$ -Amylase Bindung beteiligt ist (Wiegand, 1995).

#### 4.2.3.3. CE Analytik

Bevor die neuen Tendamistat Mutanten für weitere Untersuchungen eingesetzt werden konnten, mußten unterschiedliche Analytiken durchgeführt werden. Bereits im oberen Abschnitt konnte die gute Übereinstimmung der berechneten Molekularmassen mit den erhaltenen Ergebnissen aus ESI-MS sowie MALDI-MS gezeigt werden. Neben der Massenbestimmung sollten auch analytische Läufe über die Kapillarelektrophorese durchgeführt werden, um besser die Reinheit der erhaltenen Proteinproben zu charakterisieren. Wie bereits bei den Prolinmutanten beschrieben, wurde für die Kapillarelektrophorese (CE) ein Beckman P/ACE 2000 System eingesetzt.

<i>Protein/Mutante</i>	<i>Hauptbande</i>	<i>Differenz zu EOF</i>	<i>Reinheit</i>
<b>0.1M Tricine pH 8.0</b>			
L14A	6.80 min	1.74 min	95%
N25A	6.70 min	1.69 min	90.5%
T32A	6.69 min	1.72 min	91%
V36A	6.64 min	1.69 min	90.5%
V36I	6.76 min	1.75 min	91.5%
L44A	6.71 min	1.74 min	90%
I61M	6.53 min	1.65 min	95.4%
TM-WT	7.74 min	2.07 min	92%

Tabelle 4-25 Retentionszeiten der Tendamistat Mutanten in der Kapillarelektrophorese. Anstatt Dimethylsulfoxid wurde als interne Kontrolle die Differenz zu dem elektroosmotischen Flußsignal in den einzelnen Läufen verwendet. Die Detektion erfolgte bei 214nm unter *nativen* Bedingungen in 100mM Tricine-HCl pH8.0.

Die Länge der ungefüllten Kapillare ( $\varnothing = 50\mu\text{m}$ ) betrug 67cm. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 214nm. Nach reinigen der Kapillare mit 0.1N NaOH und dest. Wasser wurden die einzelnen Läufe gestartet. Beim Wechsel der Proben erfolgte stets ein Reinigungsschritt der Kapillare mit dest. Wasser über Druck (10min). Um Stromschwankungen, die bei Laufpuffern mit geringer Ionenleitfähigkeit auftreten können, zu vermeiden, hatten sämtliche Proben erneut getrennte Laufpuffergefäße (Kathoden- und Anodenpuffer). Besonders gute Ergebnisse konnten wiederum mit dem Tricin Puffersystem (pH8.0-8.1) erhalten werden. Ohne Zusatz eines Elektrolyten erwies sich 100mM Tricinpuffer pH8.0 als der ideale Laufpuffer. Die erhaltenen Retentionszeiten sind in Tabelle 4-25 zusammengestellt.

Zum Ausgleich von Retensionsschwankungen zwischen einzelnen Läufe wurde diesmal kein *interner* Standard eingesetzt. Wie man deutlich anhand der Prolindaten erkennen kann, führen Substitutionen, die die Struktur und vor allem die Gesamtladung des Proteins beeinflussen, nicht zwangsläufig zu Laufunterschieden. Um dennoch die erhaltenen Daten miteinander vergleichen zu können, wurde das bei diesem Laufpuffer auftretende EOF Signal als Kontrolle verwendet. Außerdem sollten diese Daten lediglich eine Aussage über die Reinheit der isolierten Proteinproben ermöglichen. In Abbildung 4-57 sind die Analytiken der einzelnen Proteine, einschließlich einer Vergrößerung der entsprechenden Verunreinigungen (inlet), dargestellt. Sämtliche Proben zeigen nach Auswertung (P/ACE 2000 Software GOLD) einen Reinheitsgrad um 90%. 92% konnte wiederum für den Tendamistat Wildtyp bestimmt werden. Ähnlich dem Wildtyp zeigen auch alle Mutanten geringfügige Verunreinigungen nach der entsprechenden Hauptbande. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Rückstände aus dem Kulturüberstand und nicht um N-Terminal verkürzte Proteinvarianten. Der Wildtyp besitzt unter diesen Bedingungen gegenüber den einzelnen Mutanten ein geringfügig verlangsamtes Laufverhalten (0.98min – 1.21min). Da sich dieser Effekt jedoch nicht in den zuvor durchgeführten CE Analytiken (vgl. die Analytik der Prolinmutanten) beobachten ließ, ist davon auszugehen, daß es sich hierbei wahrscheinlich um eine Fehlmessung handelt, die unter nicht vollständig equilibrierten Kapillarbedingungen entstand. Dies wird auch durch die Laufzeiten der anderen Proteine bestätigt, die alle zwischen 6.53min und 6.76min liegen. Eine entsprechende Wiederholung des Laufs wurde zu diesem Zweck nicht durchgeführt.

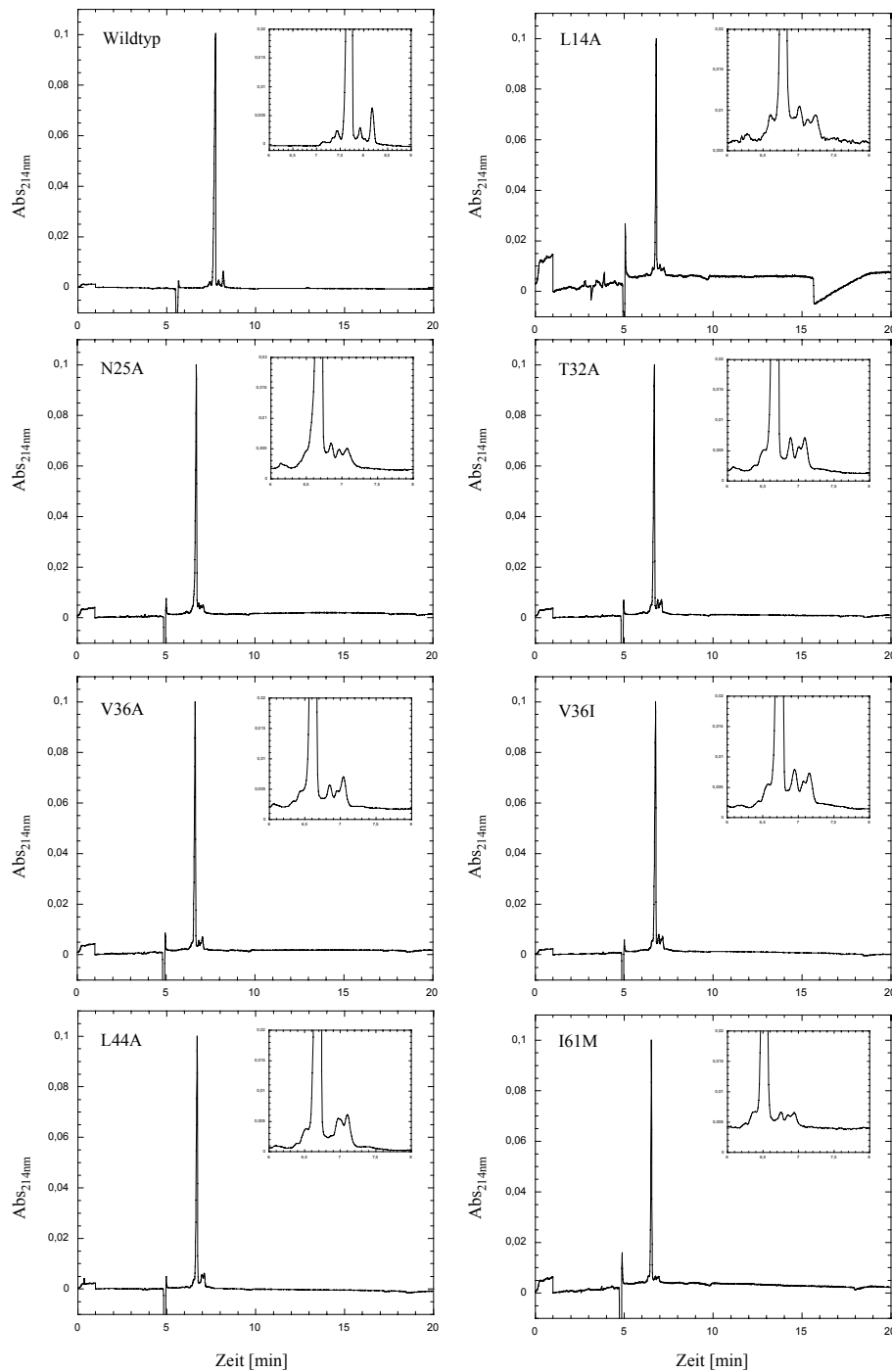


Abbildung 4-57 Kapillarelektrophorese der einzelnen Tendamistat Mutanten. Als Laufpuffer diente 100mM Tricin pH8.0. Aufgetragen wurde 5 $\mu$ g Protein in einem Injektionsvolumen von 2 $\mu$ l. Die Auftragung erfolgte unter Druck. Der Lauf fand bei 20°C und einer Spannung von 23kV statt. Die kleineren Bilder innerhalb der Chromatogramme (inlet) stellen den vergrößerten Ausschnitt am Sockel der Hauptbande dar.



## 4.2.4. Spektroskopie

### 4.2.4.1. UV Spektroskopie

Die gereinigten Mutanten wurden als nächstes über UV-Spektroskopie weiter charakterisiert (Abbildung 4-58). Dazu wurden die zuvor portionierten und schockgefrorenen Proteinlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut, jeweils 20µl dieser Lösungen entnommen und auf 500µl mit dest. Wasser verdünnt. Mit diesen Proben konnte anschließend bei 276nm die Konzentration bestimmt werden. Als Grundlage zur Berechnung der Konzentration diente der von Vértesy publizierte Absorptionskoeffizient des Wildtyps (Vértesy, 1983). Die Verwendung dieses Koeffizienten zur Berechnung der Konzentration von Tendamistat Mutanten ist insofern unproblematisch, als durch die unterschiedlichen Substitutionen keine Chromophore (Trp, Tyr und Cys) verändert werden. Die Proteinlösungen wurden anschließend mit 200mM Cacodylatpuffer pH7.0 auf eine Konzentration von 0.25mg/ml ( $OD_{276nm} = 0.4$ ) verdünnt und 30min bei 25°C inkubiert. Vor der eigentlichen Messung wurden sämtliche Proben durch 0.2µm Celluloseacetatfilter direkt in die Meßküvette (1ml Schlitzküvette, 1cm) überführt. Der Meßbereich reichte von 240nm bis 350nm.

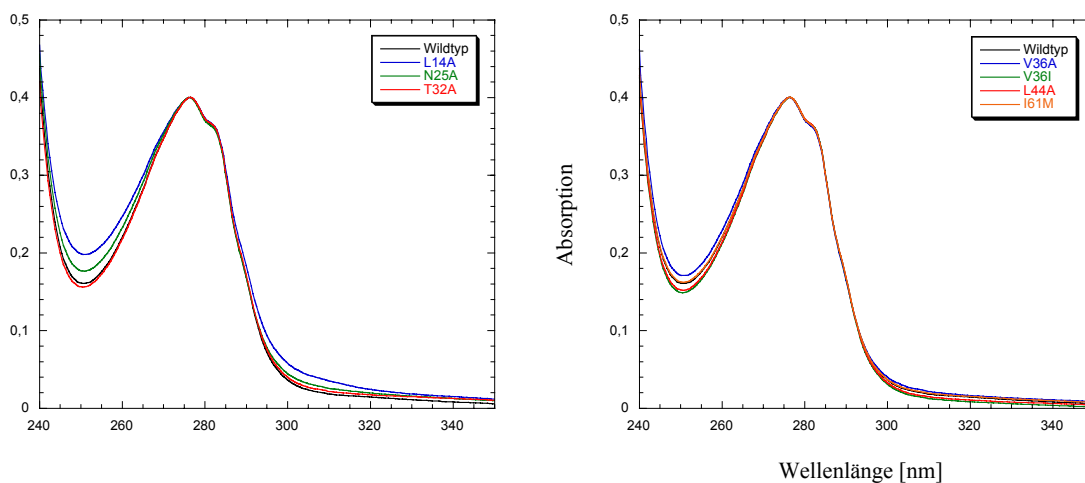


Abbildung 4-58 Absorptionsspektren der neuen Mutanten in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0. Bei allen Mutanten wurde eine Proteinkonzentration von 0.25mg/ml verwendet. Alle Spektren wurden insgesamt 5mal gemessen und überlagert.

Unterhalb von 276nm zeigen sämtliche Spektren unverändert ein Minimum bei etwa 250nm (WT: 249.9nm; L14A: 251nm; N25A: 250.7nm; T32A: 250.5nm; V36A: 250.8; V36I: 250.3nm; L44A: 250.7nm und I61M: 251nm), gefolgt von einem Maximum um 276nm (WT: 276nm; L14A: 276.3nm; N25A: 276nm; T32A: 276.3nm; V36A: 276.3nm; V36I: 276.5nm; L44A: 276.3nm und I61M: 276.3nm). Die Mutanten L14A und N25A weisen bei 250nm eine im Vergleich zu den anderen Proteinen erhöhte Absorption auf. Das Verhältnis zwischen der Absorption bei 250nm und 276nm wird häufig als Kriterium für die Qualität von aufgereinigten Proteinen herangezogen ( $A_{276nm} / A_{250nm}$ ). Danach kennzeichnen Proteine mit einem Quotienten größer 2 „saubere“ Proteinpräparationen. Obwohl die Mutanten L14A und N25A über relativ hohe Absorptionen bei 250nm verfügen, liegen ihre Quotienten oberhalb des angegebenen Grenzwertes (WT: 2.48; L14A: 2.04; N25A: 2.25; T32A: 2.56; V36A: 2.35; V36I: 2.69; L44A: 2.63 und I61M: 2.47). Ebenfalls taucht bei allen Mutanten die Tryptophanschulter bei etwa 281nm auf. Bei den Mutanten V36A und T32A ist diese Schulter jedoch etwas deutlicher ausgebildet (WT: 281.8nm; L14A: 281.5nm; N25A: 281.5nm; T32A: 281.5nm; V36A: 281.2nm; V36I: 281.5nm; L44A: 281.8nm und I61M: 281.5nm). Das Verhältnis zwischen maximaler Absorption bei 276nm und dieser Schulter liegt bei allen Proteinen um 1.1 ( $A_{276nm} / A_{281nm}$ ). Auch die Nebenschulter bei etwa 289nm ist in allen Proteinen anzutreffen. Die Mutante L14A weist darüberhinaus einen deutlichen Anstieg der UV Absorption bei 310nm auf. Dieser Anstieg könnte möglicherweise auf die Streuung von Licht in diesem Wellenlängenbereich zurückzuführen sein. Wenn man davon ausgeht, daß ein Protein in Lösung eine kugelförmige Gestalt einnimmt, sollte die Lichtstreuung bei Molekülen von der Größe des Tendamistats (8kDa) bei etwa  $268nm \pm 10nm$  in Erscheinung treten (Creighton, 1993). Um den Anteil dieses Effektes auf die beobachtete Absorption bei 280nm zu bestimmen, wurde die Gleichung:

$$\log OD_{280nm} = 2.5 \log OD_{320nm} - 1.5 \log OD_{350nm}$$

verwendet (Shirley, 1995). Danach würde ein solcher Effekt höchstens 18.7% zu der gemessenen Absorption bei 280nm beitragen. Da die sich die Molekularmasse aller Mutanten nur unwesentlich voneinander unterscheidet, müßte dieser Effekt bei allen Tendamistat Varianten zu beobachten sein, was nicht der Fall ist. Beim Wildtyp liegt dieser Wert beispielsweise bei 15.9%. Die Proteinaggregation ist vielleicht ein anderer Grund für die beobachtete Bande bei 310nm. In einem solchen Fall käme es insbesondere zu einem Anstieg der Absorption bei 350nm. Alle

Proteine zeigen jedoch bei 350nm sehr niedrige Absorptionswerte, so daß dieser Grund wahrscheinlich auch nicht in Frage kommt.

#### 4.2.4.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die UV Spektren sämtlicher Mutanten haben bis auf die L14A Mutante bei 250nm und 310nm eine relativ gute Übereinstimmung erbracht. Um den Einfluß der eingebrachten Mutationen auf die räumliche Umgebung der Chromophore Trp und Tyr im Tendamistat zu untersuchen, wurden Fluoreszenzmessungen im Bereich zwischen 300nm und 400nm durchgeführt. Bereits das Fluoreszenzspektrum des nativen Tendamistats deutet auf eine starke Dominanz der Tryptophanemission um 348nm hin. Obwohl im Bereich um 276nm auch Tyrosine angeregt werden, ist eine charakteristische Emissionsbande um 303nm nicht zu erkennen. Erst nach Denaturierung tritt bei 315nm eine Bande auf, die in etwa der Intensität der Tryptophanbande bei 354nm entspricht. Damit wird wahrscheinlich im nativen Molekül die Anregungsenergie von den Tyrosinen auf das Tryptophan durch Resonanzkopplung übertragen. Vergleicht man das Verhältnis von Tyrosinen zu Tryptophan (6:1), entspricht dieses Verhältnis in etwa dem Beitrag 5.5 (Holtzhauer, 1996) der freien Aminosäuren zur Fluoreszenz bei  $\lambda_{\max}$  (Tyrosin:  $\epsilon_{\max} \times \Phi_F = 200$  und Tryptophan:  $\epsilon_{\max} \times \Phi_F = 1100$ ).

Für die Messungen unter nativen Bedingungen wurden die Tendamistat Mutanten einschließlich des Wildtyps auf eine Proteinkonzentration von 0.033mg/ml in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 verdünnt (4.1 $\mu$ M). Zusätzlich dazu wurden sämtliche Proteine in 100mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 denaturiert (0.033mg/ml) und bis zum Einstellen des Gleichgewichts bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Messungen erfolgten an einem Hitachi F-4500 Spektralfluorimeter in abgeblendeten 100 $\mu$ l Mikroküvetten (HELLMA). Nach jeder Messung wurde die Küvette je 2x mit dest. Wasser bzw. abs. Methanol gespült und mit Druckluft getrocknet. Jede Tendamistat-Variante wurde mindestens 5x vermessen. Die Messgeschwindigkeit betrug dabei 240nm/min. Angeregt wurde im Absorptionsmaximum bei 276nm. Um die erhaltenen Spektren besser untereinander vergleichen zu können, ist der Ordinatenabschnitt prozentual bezogen auf die maximale Emission (Relative Fluoreszenz [%]) des jeweiligen Proteins angegeben (Abbildung 4-59). Bei allen hier nicht dargestellten Proteinen konnten in etwa die Emissionsmaxima und –minima des Wildtyps gefunden werden. Die relativen Fluoreszenzen der nativen Proteine (T32A, V36A, V36I und L44A) reduzieren sich

nach Denaturierung von 100% auf etwa 35-40% (276nm). Gleichzeitig gewinnt die Tyrosin Emission um 315nm nach Entfaltung deutlich an Intensität. Bei der L14A Mutante ist das Fluoreszenzmaximum unter nativen Bedingungen geringfügig in den längerwelligen Bereich verschoben (349.5nm).

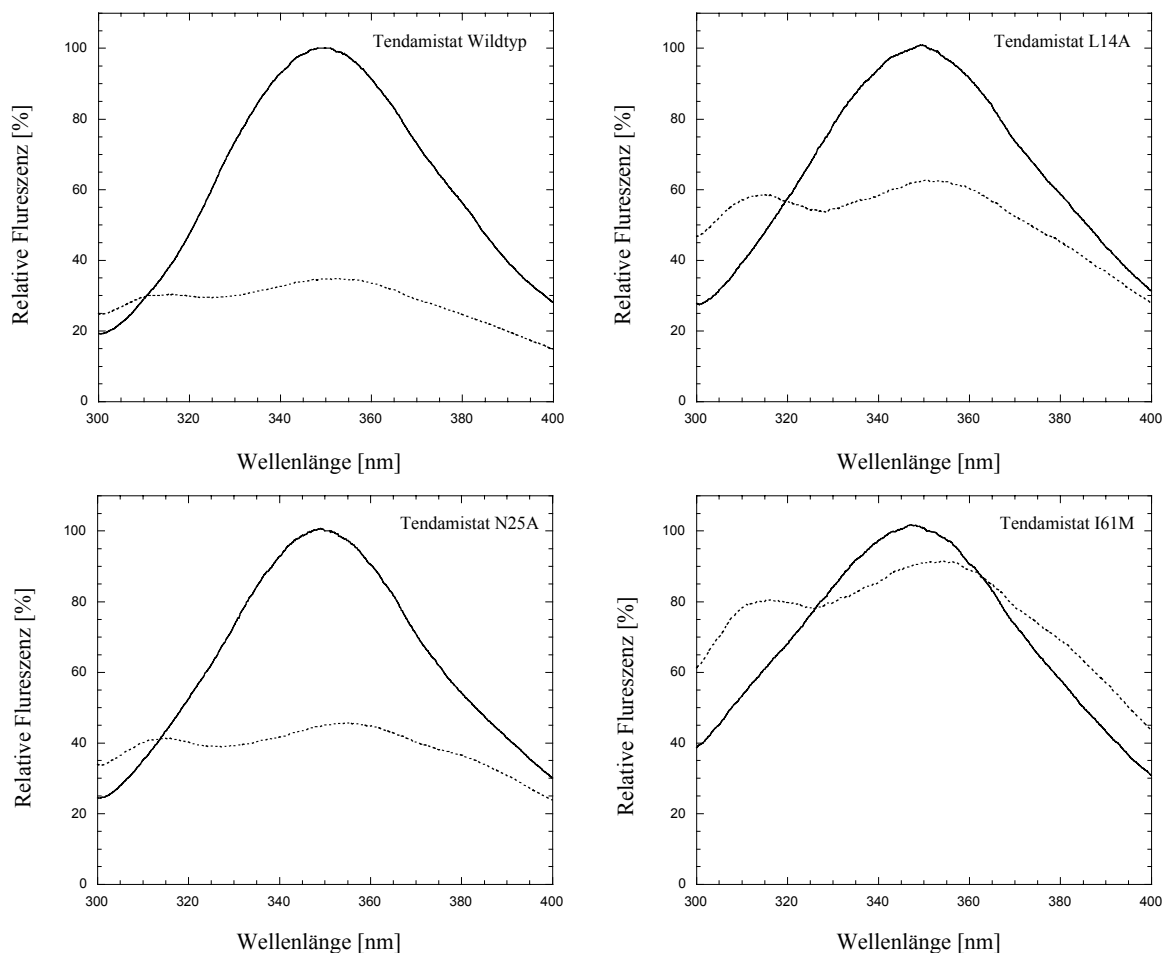


Abbildung 4-59 Fluoreszenzemissionsspektren des Tendamistat Wildtyps sowie der Mutanten L14A, N25A und I61M. Eingestrahlt wurde bei 276nm. Die Proteinkonzentration betrug 0.033mg/ml. Gezeigt sind die Emissionsspektren der Proteine in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (—) bzw. 100mM Glycinpuffer 6M GdmCl pH2.0 (.....).

Nach Denaturierung verschiebt sich die Tryptophanemission auf 352.5nm. Interessanterweise reduziert sich die Fluoreszenz nach Entfaltung auf 62.5% anstatt 35-40%. Diese verhältnismäßig geringe Fluoreszenzabnahme nach Denaturierung ist auf die um den Faktor 2 niedrigere Fluoreszenz des nativen Proteins bezogen auf den Wildtyp zurückzuführen. Dieser Effekt könnte

ein Hinweis darauf sein, daß durch den Austausch von Leucin gegen Alanin eine weitreichende Destabilisierung des Hairpins entstanden ist, der sich bis auf das Hauptchromophor überträgt. Dadurch könnte die Solvation und auch die Lage des Tryptophans relativ zum Tyrosin verändert worden sein. Auch die N25A Mutante zeigt nach Entfaltung genau wie die L14A Mutante eine geringfügig höhere Tryptophanfluoreszenz (45.3%). Zusätzlich dazu erscheint die, zwar bei allen untersuchten Proteinen vorhandene, bei der N25A Mutante jedoch wesentlich stärker hervortretende Emissionsschulter, bei 376.5nm. Bei der I61M Mutante ist deutlich der Einfluß des räumlich benachbarten Methionins (Position 61) zum Hauptfluorophor Tryptophan (Position 18) zu erkennen. Verglichen mit dem Wildtyp ist bei dieser Mutante die Fluoreszenz des nativen Zustands etwa um den Faktor 3 reduziert. Entfaltet man die I61M Mutante, kommt es lediglich zu einer unwesentlichen Abnahme der Tryptophanfluoreszenz auf 92% der Ausgangsfluoreszenz. Wie man deutlich anhand des nativen Spektrums erkennen kann, wird durch die räumliche Nähe des Methionins überwiegend die Tryptophanfluoreszenz reduziert. Da durch diese Reduktion die Tyrosinbande bei 315nm unter nativen Bedingungen nicht zu erkennen ist, kann man davon ausgehen, daß sämtliche Anregungsenergie der Tyrosine auf das Tryptophan übertragen werden. Dieser Vorgang setzt jedoch die native Struktur des Moleküls voraus. Die Deaktivierung des angeregten Tryptophans ist dabei von dem unmittelbaren Kontakt des Schwefelatoms im Methionin an das Indol abhängig (Steiner, 1969; Ballew, 1996). Methionin fungiert in diesem Fall als *scavenger* Molekül und abstrahiert vermutlich ein Elektron vom Chromophor. Der genau Mechanismus dieser Deaktivierung ist jedoch nicht bis alle Einzelheiten aufgeklärt. Außer Methionin sind vor allem Cysteine sowie protonierte Histidine ( $pK_s = 6.0$ ) in der Lage durch direkten Kontakt die Fluoreszenz des Tryptophans zu reduzieren (strahlungslose Desaktivierung).

#### 4.2.4.3. CD-Spektroskopie

Wie bei den Prolinmutanten erfolgte eine Charakterisierung der neuen Mutanten auch über CD-Spektroskopie. Da bis auf den Austausch an Position 61 sämtliche Substitutionen innerhalb von  $\beta$ -Strängen liegen, waren Effekte auf die Faltblattgeometrie nicht ganz auszuschließen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden alle CD-Spektren an einem JASCO J710 Spektralpolarimeter aufgenommen (Abbildung 4-60). Die Messungen wurden bei 20°C in 10mM Phosphatpuffer pH7.0 durchgeführt. Um gute Signal-/Rauschabstände im fern-UV Bereich

(250nm-180nm) zu erhalten, wurden spezielle Rundküvetten (1mm) mit planparallelen Quarzglasflächen der Firma STARNA eingesetzt. Die Proteinkonzentration betrug stets 0.1mg/ml. Nach jeder Messung wurden die Küvetten 2x mit dest. Wasser und anschließend 3x mit Methanol (Merck, UV transparent) ausgespült und an der Druckluft getrocknet.

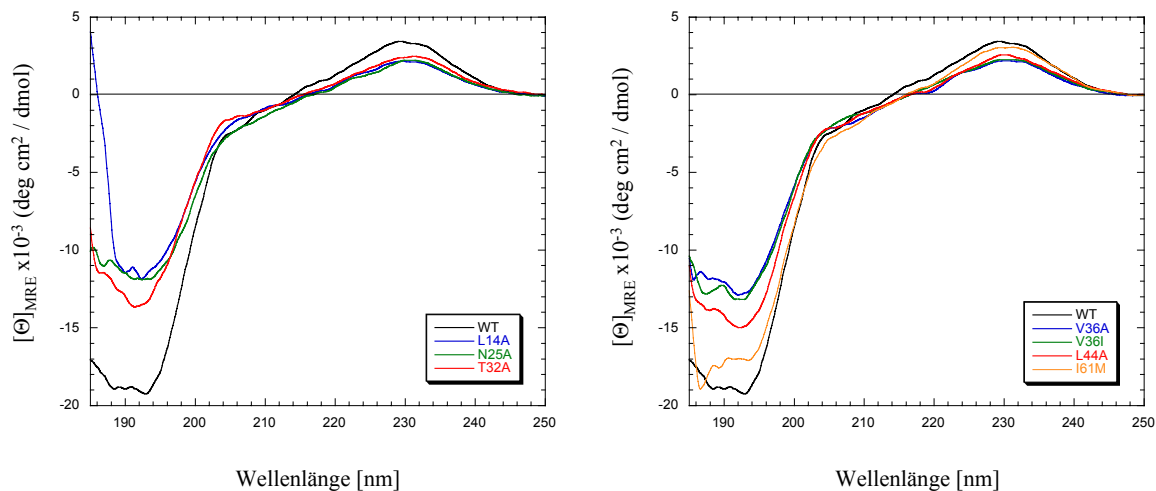


Abbildung 4-60 CD-Spektrum des Tendamistat Wildtyps sowie der Mutanten L14A, N25A und T32A (links) sowie V36A, V36I, L44A und I61M (rechts). Alle Messungen wurden in 10mM Phosphatpuffer pH7.0 bei einer Temperatur von 20°C durchgeführt, die Proteinkonzentration betrug 0.1mg/ml. Aufgetragen ist als Ordinate die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure ( $[\Theta]_{\text{MRE}}$ ). Die Einstellungen waren: Bandbreite 1nm, Response 4sec, Auflösung 0.2nm, Geschwindigkeit 5nm/min, Akkumulation 10 (5) und Empfindlichkeit 50mdeg (50mdeg).

Bis auf die I61M Mutante besitzen sämtliche Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich niedrigere Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRE}}$  (WT: 3200; L14A: 2156; N25A: 2202.4; T32A: 2400; V36A: 2170; V36I: 2244.3; L44A: 2557.3 und I61M: 3024) im Bereich der positiven Absorptionsbande (230nm). Der I61M Mutante schließen sich die Proteine T32A und L44A mit einer etwas geringeren Elliptizität  $[\Theta]_{\text{MRE}}$  bei 230nm an. Da durch die Analyse der prolindefizienten Proteine diese Absorptionsbande dem Hairpin I im Tendamistat zugeordnet werden konnte, führen die eingebrachten Mutationen offensichtlich zu einer stärkeren Verzerrung der Hairpstruktur. Nach dem Nulldurchgang ( $[\Theta]_{\text{MRE}} = 0$ ) bei 215nm unterscheiden sich die Elliptizitäten der einzelnen Proteine bis 200nm kaum voneinander. Bei  $\beta$ -Faltblattproteinen beinhaltet das CD-Spektrum in der Regel einen Übergang von einer stark-negativen in eine positive Elliptizitätsbande (212-

194nm). Dieser Übergang ist beim Tendamistat nicht vorhanden. Allenfalls der längerwellige Bereich oberhalb von 225nm erinnert an ein  $\beta$ -Faltblattprotein. Die in diesem Bereich gemessene Elliptizität wird jedoch im wesentlichen durch die *Seitenketten* der Aminosäuren Tyrosin bzw. Cystein und nicht durch die Amidbindung verursacht (Brahms, 1980).

Entfaltet man Tendamistat in Gegenwart von Denaturierungsmitteln, ist ein Übergang der positiven Elliptizitätsbande in eine negative Bande nicht vollständig zu beobachten. Ein kleiner Teil der Absorptionsbande verbleibt nach wie vor im positiven Elliptizitätsbereich. Bis auf diesen Absorptionsbereich (>228nm) entspricht der Verlauf dem von Chen über die Funktion (Chen, 1972):

$$X(\lambda) = f_{\alpha}X_{\alpha}(\lambda) + f_{\beta}X_{\beta}(\lambda) + f_R X_R(\lambda)$$

ermittelten CD-Spektrum eines Zufalls-Knäuels  $X_R(\lambda)$ .  $f$  beschreibt dabei den Anteil einer bestimmten Sekundärstruktur an  $X(\lambda)$  bei einer Wellenlänge von  $\lambda$ . Bei den hier untersuchten Mutanten sind außerdem kleine Unterschiede in der Deutlichkeit der Absorptionsschulter bei 205nm zu beobachten. Diese Schulter ist bei L14A und N25A im Vergleich zum Wildtyp weniger deutlich ausgeprägt. Bei der V36I Mutante ist sie hingegen geringfügig in der längerwelligen Bereich verschoben (WT: 205nm und V36I: 209.2nm). Genau wie im Absorptionsbereich von 215nm bis 240nm, treten auch beim negativen Elliptizitätsmaximum (195nm) große Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten auf. Die I61M Mutante weist wiederum als einzige der untersuchten Mutanten eine gute Übereinstimmung mit dem Elliptizitätsprofil des Wildtyps auf. Interessanterweise weicht das Spektrum der L14A Mutante (Abbildung 4-61) am stärksten im kürzerwelligen Bereich (205-185nm) ab. Man kann hier deutlich einen weiteren Nulldurchgang um 186nm beobachten. Das CD-Spektrum dieser Mutante entspricht dem geringfügig in den fern-UV Bereich verschoben Kurvenverlauf eines Zufalls-Knäuels (Chen, 1972). Danach hätte also die Alanin Substitution an Position 14 eine Destabilisierung des Hairpins zwischen C11 und C27 zur Folge. Eine weitere Besonderheit stellt die V36A Mutante dar. Vergleicht man, wie in Abbildung 4-61 dargestellt, den Wildtyp mit dieser Mutante, lassen sich deutlich zwei Elliptizitätsschultern im Verlauf beobachten (I: 218.6nm und II: 205.7nm). Von der Intensität liegt die Schulter bei 218.6nm fast auf der

Nullachse. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch beim Wildtyp bei pH3.3 induziert werden (vgl. Abbildung 4-39).

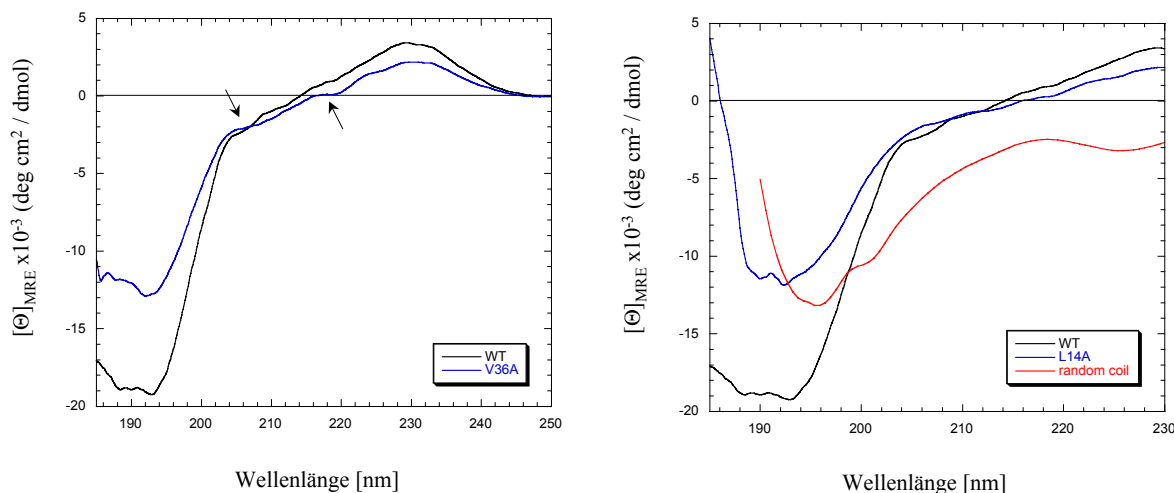


Abbildung 4-61 CD-Spektren des Wildtyps sowie der Mutanten V36A (links) und L14A (rechts). Die beiden Elliptizitätsschultern bei der V36A Mutante sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Zum Vergleich befindet auf dem rechten Bild die nach Chen (Chen, 1972) berechnete *random-coil* Anordnung (—).

In diesem Fall ließ sich der Übergang in die pH- bzw. lösungsmittelinduzierbare  $\alpha$ -helicale Konformation durch die Zunahme der Intensität dieser beiden Banden gut mitverfolgen. Die Substitution von Valin, einem starken Faltblattbildner ( $P_{\beta} = 1.7$ ), gegen Alanin, einem starken Helixbildner ( $P_{\alpha} = 1.42$ ), könnte damit ein Hinweis darauf sein, daß ein solcher Übergang mit einer Destabilisierung des dritten Stranges im Tendamistat zusammenhängt, der zudem den höchsten Anteil an hydrophoben Resten im Protein enthält.

#### 4.2.5. Thermisch induzierte Entfaltung

Neben der Stabilität gegenüber GdmCl wurde das thermische Verhalten der neuen Mutanten untersucht. Zur Detektion der thermisch induzierten Übergänge kam diesmal die CD-Spektroskopie zum Einsatz. Genau wie bei den Prolinmutanten beschrieben, wurden auch diesmal sämtliche Messungen in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 durchgeführt. Vor jeder



Messung wurden die Proben sorgfältig im Wasserstrahlvakuum entgast. Bei der Messung des Circular dichroismus betrug die Proteinkonzentration bei allen Mutanten 0.1mg/ml. Gemessen wurde erneut in einer speziellen, von außen mit Flüssigkeit temperierbaren 1mm Quarzküvette (Jasco). Nach jeder Messung wurde die Küvette mehrmals mit dest. Wasser und reinem Methanol ausgespült und an der Druckluft getrocknet.

Zur Ermittlung der Übergangstemperatur  $T_m$  sowie der Enthalpie  $\Delta H_m$  wurden die bereits bei den Prolinmutanten beschriebenen Funktionen eingesetzt. Die  $\Delta C_p$  Werte, die über die eingesetzte Funktion ebenfalls berechnet werden können, waren bei den durchgeführten Regressionen stets mit Fehlern in der Größenordnung von 20-30% (Wildtyp) behaftet und wurden daher nicht in die nachfolgenden Betrachtungen mit einbezogen.

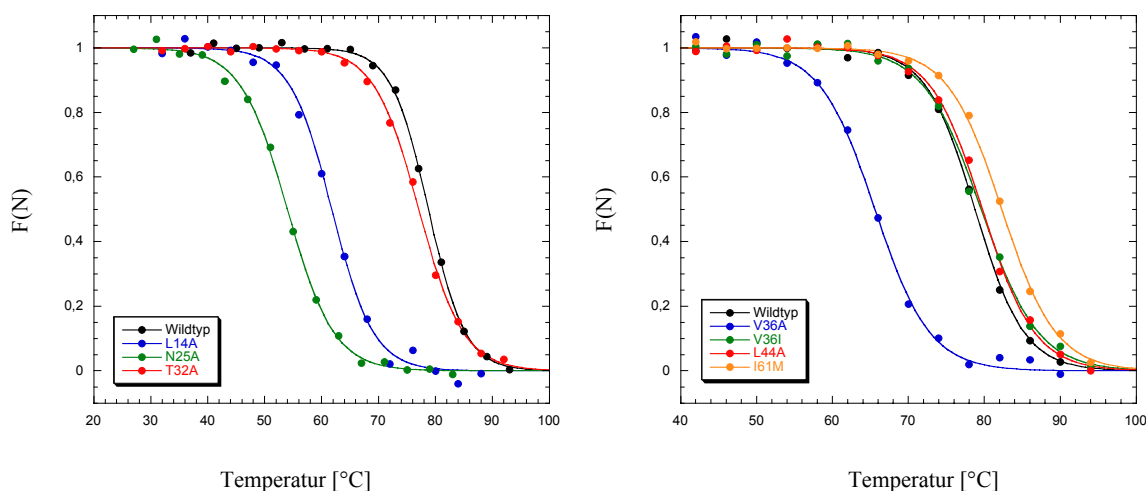


Abbildung 4-62 Die nach Abzug der Basislinien und Umrechnung in den nativen Anteil  $F(N)$  erhaltenen Daten aus den CD Messungen. Dargestellt ist  $F(N)$  in Abhängigkeit von der Temperatur. Zur besseren Vergleichbarkeit ist der Wildtyp in beiden Darstellungen mit aufgeführt. Aus Übersichtsgründen ist in den Darstellungen nur jeder 20<sup>te</sup> Datenpunkt abgebildet. Alle Messungen wurden in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 durchgeführt.

Zunächst wurden die thermisch induzierten Übergänge anhand der Elliptizität bei 230nm (CD) untersucht. Der eingesetzte Temperaturgradient betrug in allen Messungen 45°C/h. Um das thermische Gleichgewicht zwischen äußerer Küvettentemperatur und innerer Proben­temperatur zu überprüfen, wurden zusätzlich dazu langsamere Temperaturgradienten (40-30°C/min) verwendet. Diese Testmessungen erbrachten wiederum nahezu identische Übergangskurven.

Nach Auswertung der Ergebnisse können die Proteine in zwei Gruppen unterteilt werden (Tabelle 4-26). In die erste Gruppe gehören die Mutanten L14A, N25A, V36A und T32A, die im Vergleich zum Wildtyp deutlich instabiler sind. Am eindrucksvollsten ist dieser Effekt bei der N25A Mutante zu beobachten. Die Substitution des Asparagins gegen Alanin führt an Position 25 zu einer starken enthalpischen Destabilisierung des Tendamistats von etwa 76kJ/mol. Dieser drastische Einbruch ist wahrscheinlich auf den Verlust von intramolekularen Wassertstoffbrücken zurückzuführen, die über die Seitenkette des Asparagins ausgebildet werden. Überraschend ist auch die Destabilisierung des Tendamistats nach Substitution von Leucin gegen Alanin an Position 14. Hier kommt es ebenfalls zu einem Enthalpieeinbruch gegenüber dem Wildtyp von etwa 39kJ/mol. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die Seitenkette des Leucin 14 einen wichtigen Beitrag zur hydrophoben Stabilisierung des Hairpins zwischen C11 und C27 leistet.

	$T_m$ [°K]	$\Delta H_m^{1)}$ [kJ/mol]		$T_m$ [°K]	$\Delta H_m^{1)}$ [kJ/mol]
<b>CD (230nm)</b>			<b>CD (230nm)</b>		
Wildtyp	352.7	294.07	Wildtyp	352.7	294.07
L14A	334.95	255.23	V36A	338.74	264.36
N25A	327.14	218.17	V36I	352.74	274.85
T32A	350.24	260.5	L44A	352.92	302.27
			I61M	355.46	295.52

<sup>1)</sup> der  $\Delta H_m$  Wert ist hier positiv definiert (Schellman, 1987).

Tabelle 4-26 Thermischen Entfaltungsdaten der Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A und I61M, die über CD-Spektroskopie in 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 ermittelt wurden. Die  $\Delta C_p$  Werte sind in dieser Tabelle nicht dargestellt.

Die Substitution von Valin 36 gegen Alanin führt ebenfalls zu einer deutlichen Destabilisierung des Tendamistats. Valin 36 gehört dabei zu den an Position 36 wenig konservierten Aminosäuren innerhalb der Reihe homologer Proteine. Obwohl es sich auch in diesem Fall um eine nach außen exponierte Seitenkette handelt, trägt die Substitution zu einer enthalpischen Destabilisierung von etwa 29.7kJ/mol bei. Hierfür verantwortlich ist wahrscheinlich die starke, über hydrophobe Wechselwirkungen begünstigte, Clusterung der umliegenden Aminosäuren um das Valin. Dazu trägt auch das Threonin 32 bei, bei dessen Substitution eine enthalpische Destabilisierung von

33.6kJ/mol entsteht. Daß der Destabilisierungsbetrag hierbei nicht so hoch ausfällt, liegt zum Teil daran, daß diese Mutante eine günstigere Übergangsentropie (86J/molK) besitzt als der Wildtyp. In die zweite Gruppe gehören die Mutanten V36I, L44A und I61M, bei denen sich die thermische Stabilität gegenüber dem Wildtypprotein nur geringfügig ändert. Bei der V36I Mutante führt zwar der Aminosäureaustausch zu einer enthalpischen Destabilisierung von 19.2kJ/mol, dieser Betrag wird jedoch durch die Übergangsentropie kompensiert ( $\Delta\Delta S_m = \Delta S_m(\text{WT}) - \Delta S_m(\text{Mutante}) = 53\text{J/molK}$ ), so daß der  $T_m$ -Wert im Vergleich zum Wildtyp nahezu konstant bleibt. Der Austausch von Leucin gegen Alanin an Position 44 führt zu einer enthalpischen Stabilisierung des Proteins von 8.2kJ/mol. Begleitet wird dieser Effekt jedoch auch durch eine entropischen Destabilisierung der L44A Mutante von  $-23\text{J/molK}$ . Die I61M Mutante verfügt über eine um 2.8°C höhere Übergangstemperatur als der Wildtyp. Die damit verbundene höhere Stabilität dieser Variante ist im wesentlichen auf die Übergangsenthalpie zurückzuführen. Die Übergangsentropie bleibt gegenüber dem Wildtypprotein nahezu unverändert. Verantwortlich für den stabilisierenden Einfluß dieser Mutation dürften überwiegend Wechselwirkungen des Methionins mit hydrophoben Aminosäuren sein, die sich in räumlicher Nähe befinden.

#### 4.2.6. Guanidiniumhydrochlorid induzierte Entfaltung

Die GdmCl induzierte Denaturierung der Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A und M61I wurde sowohl über Fluoreszenz- als auch über CD-Spektroskopie untersucht. Die Temperatur betrug in allen Fällen 25°C. Die Fluoreszenzemission wurde an einem Hitachi F-4500 Fluorimeter gemessen. Wie zuvor betrug die Anregungswellenlänge 276nm. Gemessen wurde die Emission bei 340nm. Die Akkumulation der Daten erfolgte im photometrischen Status über einen Zeitraum von 20sec. Für sämtliche TendamiStat Verdünnungen wurde eine Konzentration von 0.033mg/ml verwendet (4.1µM). Die CD-Messungen erfolgten an einem JASCO J-710 Spektralpolarimeter. Die Proteinkonzentration betrug hier 0.1mg/ml. Gemessen wurde die Elliptizitätsänderung bei 230nm. Diese Wellenlänge erwies sich wegen der hohen UV-Absorption des GdmCl als vorteilhaft gegenüber kürzeren Wellenlängenbereichen. Die unterschiedlichen GdmCl Konzentration wurden durch Mischen zweier Lösungen, die bereits das Protein in der entsprechenden Endkonzentrationen enthielten, hergestellt. Die Konzentration der GdmCl Stammlösung wurde vor der Verwendung über den Brechungsindex genau bestimmt. Die

Messung der einzelnen Proben erfolgte stets nach einer Vorinkubationsdauer von 1 Stunde im Thermostaten.

Wie zuvor zeigten auch diesmal alle Proteine im Bereich um 1M GdmCl einen Anstieg der Fluoreszenzemission (Abbildung 4-63). Bis zu einer Konzentration von 0.2M GdmCl war dieser Effekt nicht zu beobachten. Veränderungen dieser Art konnten im CD nicht nachgewiesen werden, so daß es sich bei diesem Anstieg vermutlich um eine spezifische Wechselwirkung von Chlorid- bzw. GdmCl Ionen mit den zugänglichen Tendamistat-Chromophoren handeln könnte (vgl. Prolinmutanten). Eine Veränderung der asymmetrischen Umgebung der Chromophore C11 / C27 (Disulfid), die für die Absorption bei 230nm verantwortlich sind, kann daher ausgeschlossen werden. Damit dieser Anstieg bei der anschließenden Auswertung der Übergangskurven nicht zu einer falschen Anpassung der Funktion im Bereich der nativen Basislinie ( $n_N$ ) führt, wurden alle Fluoreszenzmessungen erst ab einer GdmCl Konzentration von 1.5M GdmCl aufgezeichnet.

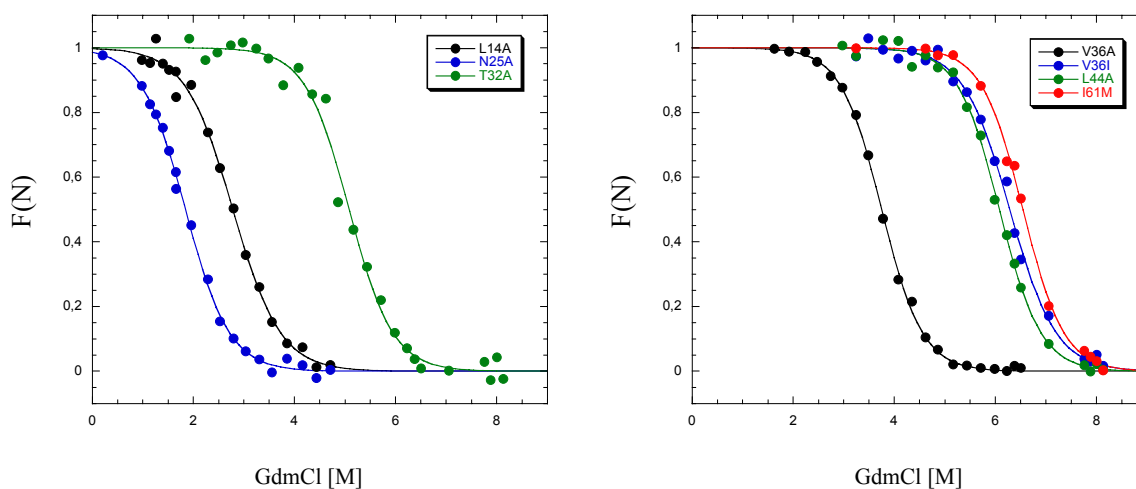


Abbildung 4-63 Grafische Auftragung der Fluoreszenzdaten nach GdmCl induzierter Entfaltung. Dargestellt ist der Anteil an nativem Protein  $F(N)$  in Abhängigkeit von der GdmCl Konzentration.

Die erhaltenen Meßdaten wurden anschließend über die Funktion von Santoro und Bolen (Santoro, 1988) in die entsprechenden Größen  $\Delta G^\circ$  sowie der  $m$ -Wert umgerechnet (Tabelle 4-27). Bei der I61M Mutante traten besondere Schwierigkeiten bei der Auswertung der Fluoreszenzdaten auf. Diese waren eindeutig auf die geringe Fluoreszenzdifferenz zwischen entfaltetem und nativem Molekül zurückzuführen. Daher wurden bei dieser Mutante die

entsprechenden Daten über fünf Meßreihen gemittelt. In der Regel waren für die restlichen Mutanten mindestens zwei Meßreihen erforderlich. Da die analytische Auswertung der Übergangskurven entsprechend der Anzahl an Meßpunkten zu einer unterschiedlichen Gewichtung der Basislinien führt, wurden zum Ausgleich bei den besonders stabilen Mutanten zusätzliche Meßpunkte im Bereich der entfalteten Basislinie gelegt ( $n_U$ ).

	$m_{eq}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G^{\circ}_{eq}$ [kJ/mol]		$m_{eq}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G^{\circ}_{eq}$ [kJ/mol]
<b>Fluoreszenz</b>			<b>Fluoreszenz</b>		
Wildtyp	5.28 ± 0.54	- 34.46 ± 3.15	Wildtyp	5.28 ± 0.54	- 34.46 ± 3.15
L14A	5.27 ± 1.96	- 14.7 ± 5.55	V36A	6.17 ± 0.47	- 23.11 ± 1.86
N25A	5.7 ± 0.86	- 10.51 ± 2.09	V36I	5.69 ± 1.21	- 35.67 ± 7.07
T32A	5.71 ± 1.19	- 29.0 ± 6.03	L44A	6.03 ± 0.83	- 36.64 ± 4.76
			I61M	6.18 ± 1.35	- 40.36 ± 8.06

Tabelle 4-27 Daten nach analytischer Auswertung der Meßwerte.

Aus der Auswertung geht hervor, daß die I61M Mutante mit  $-40.36\text{kJ/mol}$  die größte Stabilität von allen untersuchten Proteinen besitzt. Hieraus ergibt sich rechnerisch eine Stabilitätserhöhung infolge der Mutation von  $5.9\text{kJ/mol}$  gegenüber dem Wildtyp. Durch die Basislinienproblematik, befindet sich dieser Wert jedoch innerhalb der Fehlergrenze von  $8\text{kJ/mol}$ . Der m-Wert dieser Mutante ist gegenüber dem Wildtyp ebenfalls verändert. Ebenfalls stabiler als der Wildtyp sind die beiden Mutanten V36I ( $-35.67\text{kJ/mol}$ ) und L44A ( $-36.64\text{kJ/mol}$ ). Da sich die Meßfehler beider Proteine in der Größenordnung von  $5\text{kJ/mol}$  befinden, läßt sich auch hier ein exakter Vergleich mit dem Wildtypprotein nicht durchführen. Auch bei der V36I und der L44A Mutante sind die m-Werte gegenüber dem Wildtyp erhöht. Die T32A Mutante besitzt eine vom Wildtyp um  $5.5\text{kJ/mol}$  niedrigere freie Entfaltungsenthalpie. Zusätzlich dazu ist auch bei dieser Mutante der Steigungswerte um  $0.43\text{kJ/molM}$  höher als beim Wildtyp. Ähnlich wie bei den thermisch induzierten Übergängen sind auch bei der kalten Denaturierung die Mutanten L14A, N25A und V36A mit Abstand am labilsten. Extremes Beispiel wiederum ist hier die N25A Mutante. Auf Grund der eingeführten Asn  $\rightarrow$  Ala Substitution kommt es zu einem Stabilitätseinbruch von etwa  $24\text{kJ/mol}$ .

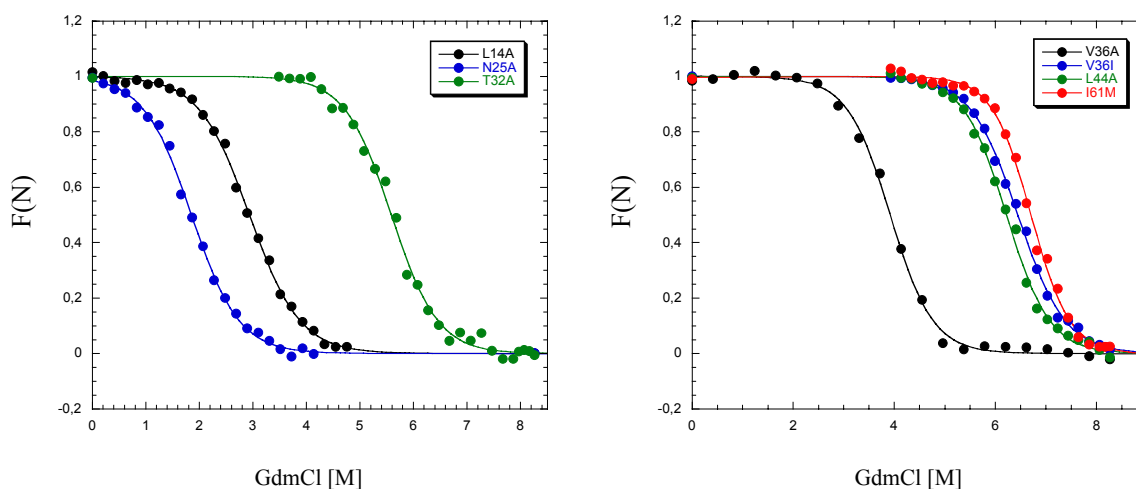


Abbildung 4-64 Grafische Auftragung der CD-Daten nach GdmCl induzierter Entfaltung. Dargestellt ist der Anteil an nativem Protein  $F(N)$  in Abhängigkeit von der GdmCl Konzentration.

Wie bereits zuvor dargelegt wurde, könnte dieser Beitrag auf den Verlust von intramolekularen Wasserstoffbrücken innerhalb der *asparagine corner* zurückzuführen sein. Bei der L14A Mutante beträgt die Differenz zum Wildtyp 19.7kJ/mol. Da die Seitenkette von Leucin 14 dem Lösungsmittel zugewandt vorliegt, kommen als mögliche Ursache für die Destabilisierung nur hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb des  $\beta$ -Hairpins in Frage.

	$m_{eq}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_{eq}^{\circ}$ [kJ/mol]		$m_{eq}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_{eq}^{\circ}$ [kJ/mol]
<b>CD (230nm)</b>			<b>CD (230nm)</b>		
Wildtyp <sup>1)</sup>	5.32 ± 0.08	- 34.04 ± 0.67	Wildtyp <sup>1)</sup>	5.32 ± 0.08	- 34.04 ± 0.67
L14A	5.17 ± 0.32	- 15.18 ± 1.02	V36A	5.74 ± 0.52	- 22.49 ± 2.09
N25A	5.47 ± 0.47	- 10.12 ± 1.24	V36I	5.69 ± 0.46	- 36.61 ± 2.70
T32A	5.25 ± 0.48	- 29.29 ± 2.53	L44A	5.67 ± 0.52	- 35.43 ± 2.95
			I61M	6 ± 0.25	- 40.82 ± 1.63

<sup>1)</sup>(Schönbrunner, 1997)

Tabelle 4-28 Daten nach analytischer Auswertung der GdmCl induzierten Entfaltungsexperimente. Die Übergangskurven wurden anhand der Veränderung der molaren Elliptizität bei 230nm bestimmt.

Der m-Wert dieser Mutante hingegen ändert sich gegenüber dem Wildtyp kaum. Auch die Stabilität der V36A Mutante ist mit  $-23.11\text{kJ/mol}$  deutlich niedriger als beim Wildtyp.

Die CD-Daten entsprechen größtenteils den Fluoreszenzdaten (Abbildung 4-64 und Tabelle 4-28). Auffallend war hier, daß die rechnerisch erhaltenen Fehler insgesamt geringer ausfielen als bei den Fluoreszenzmessungen. Abweichungen betrafen vor allem die Steigungswerte im Übergangsbereich (m). Geringe Unterschiede zu den über Fluoreszenzmessung erhaltenen Übergangskurven wurden für die Mutanten L14A und I61M erhalten.

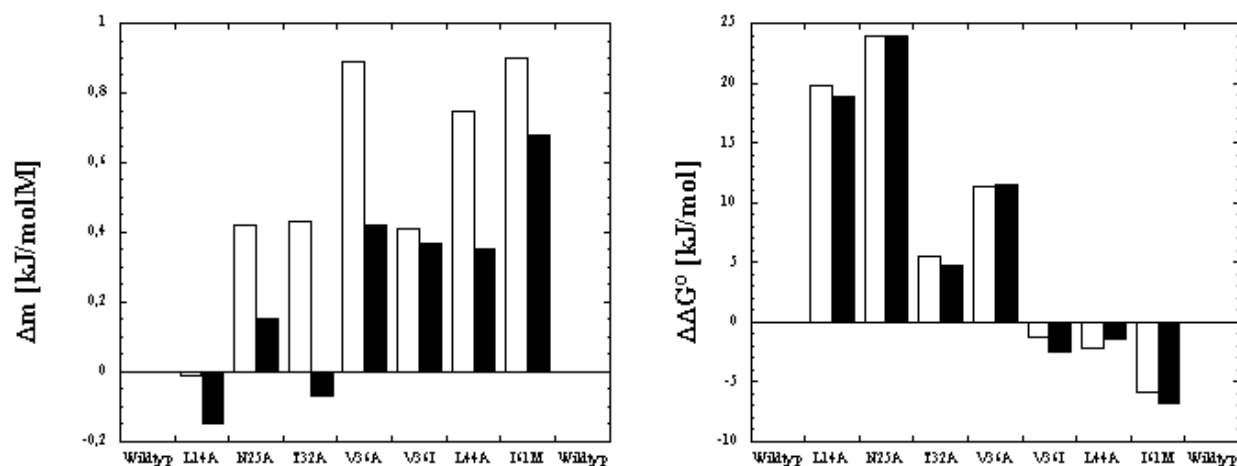


Abbildung 4-65 Differenz der m-Werte (links) sowie  $\Delta G^\circ$ -Werte (rechts) bezogen auf den Wildtyp nach rechnerischer Auswertung der Fluoreszenz- (□) bzw CD-Daten (■). Die Differenzen wurden als  $\Delta m = m(\text{Mutante}) - m(\text{Wildtyp})$  bzw.  $\Delta\Delta G^\circ = \Delta G^\circ(\text{Mutante}) - \Delta G^\circ(\text{Wildtyp})$  berechnet und abgebildet.

Bei der N25A Mutante ist der m-Wert deutlich höher als nach Auswertung der Fluoreszenzdaten. Der m-Wert bei der V36A Mutante liegt wiederum mit  $5.74\text{kJ/molM}$  deutlich niedriger als nach den Fluoreszenzdaten erhalten. Diese Differenz konnte bei der V36I Mutante, die ebenfalls eine Substitution an der Position 36 aufweist, nicht beobachtet werden. Bei der L44A Mutante ist es ebenfalls der m-Wert, der am deutlichsten zwischen den unterschiedlichen Detektionsmethoden abweicht. Zur Verdeutlichung der Unterschiede ist in Abbild 4-65 die Differenz der Steigungswerte ( $\Delta m$ ) und der freien Enthalpien ( $\Delta\Delta G^\circ$ ) bezogen auf den Tendamiostat Wildtyp als Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 4-65).

### 4.2.7. chevron plot

Als nächstes wurden Faltungsexperimente mit den einzelnen Mutanten durchgeführt. Ziel war es dabei, die Abhängigkeit der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten von der GdmCl Konzentration zu bestimmen. Wie im Kapitel 2.3.5 bereits beschrieben wurde, lassen sich mit Hilfe dieser Daten Aussagen über die Struktur des Übergangszustands sowie dessen Lösungsmittelzugänglichkeit ableiten.

#### 4.2.7.1. Kinetik

Für die Rückfaltungsmessungen wurden die TendamiStatmutanten in 10mM Glycin/HCl pH2.0 6M GdmCl denaturiert. Entsprechend wurden für die Entfaltungsmessungen die Proteine in 10mM Cacodylatpuffer pH7.0 gelöst. Die Proteinkonzentration betrug in beiden Ausgangspuffern 0.33mg/ml. Alle Stammlösungen und Verdünnungspuffer wurden vor der Benutzung im Wasserstrahlvakuum ausreichend lang entgast. Die unterschiedlichen Rück- bzw. Entfaltungspuffer wurde durch Mischen zweier Stammpufferlösungen zusammengestellt. Über den Brechungsindex konnte die genaue GdmCl Konzentration der einzelnen Verdünnungen vor der Messung kontrolliert werden. Die Auswahl der einzusetzenden Konzentrationen richtete sich nach der Stabilität  $\Delta G_{\text{eq}}(\text{H}_2\text{O})$  der einzelnen Mutanten. Diese waren durch die zuvor durchgeführten Messungen unter Gleichgewichtsbedingungen hinreichend bekannt. Alle Verdünnungen wurden so gewählt, daß außerhalb des Übergangsbereichs  $\Delta G_{\text{eq}}(\text{H}_2\text{O}) / m_{\text{eq}}$  mindestens 6 Meßpunkte erhalten werden konnten. Die Detektion der rück- bzw. entfaltenden Proteine erfolgte anhand der Fluoreszenzemission bei  $>320\text{nm}$  ( $E_{\text{x}} = 276\text{nm}$ ). Die nach Mischung vorliegende Proteinkonzentration betrug in allen Fällen 0.03mg/ml. Für jeden Meßpunkt wurden mindestens 5 Einzelmessungen durchgeführt und anschließend gemittelt. Messungen länger als 10sec fanden dabei ohne Druckausgleich statt. Die Auswertung der erhaltenen Meßergebnisse erfolgte über das Computerprogramm KaleidaGraph (Abelbeck Software) anhand der allgemeinen Gleichung (vgl. Abschnitt 4.1.11):

$$B_t - B_{\infty} = \sum_{i=1}^n A_i \exp^{-\lambda_i t}$$



Die Minimierung wurde dabei gegen eine Fehlergrenze von 0% durchgeführt. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe einer 3 phasigen Ausgleichsfunktion ( $n = 3$ ) mit insgesamt 7 Parametern. In Tabelle 4-29 sind die erhaltenen Daten aus der Rückfaltung bei unterschiedlichen GdmCl Konzentrationen zusammengestellt.

	$k_1 (s^{-1})$	$A_1 (\%)$	$k_2 (s^{-1})$	$A_2 (\%)$	$K_3 (s^{-1})$	$A_3 (\%)$
L14A <sup>2)</sup>	0.095 ± 0.003	5.7 ± 0.07	2.76 ± 0.16	5 ± 0.16	26.48 ± 0.09	89.3 ± 0.16
N25A <sup>2)</sup>	0.112 ± 0.001	8.59 ± 0.05	9.17 ± 0.22	36.24 ± 1.6	3.72 ± 0.05	55.17 ± 1.63
T32A <sup>2)</sup>	0.08 ± 0.001	4.8 ± 0.03	4.44 ± 0.13	9.7 ± 0.35	18.36 ± 0.09	85.5 ± 0.29
V36A <sup>2)</sup>	0.088 ± 0.001	7 ± 0.08	1.71 ± 0.09	16.8 ± 2.8	0.9 ± 0.012	76.2 ± 2.74
V36I <sup>2)</sup>	0.055 ± 0.001	4.8 ± 0.04	3 ± 0.13	4 ± 0.11	31.41 ± 0.11	91.2 ± 0.16
L44A <sup>2)</sup>	0.08 ± 0.002	3.5 ± 0.03	3.36 ± 0.11	4.2 ± 0.07	43.05 ± 0.14	92.3 ± 0.19
I61M <sup>2)</sup>	0.13 ± 0.03	1.3 ± 0.15	2.37 ± 0.35	3.5 ± 0.22	32 ± 0.272	95.2 ± 0.42
TM-WT <sup>1)</sup>	0.098 ± 0.0023	4.55 ± 0.04	3.37 ± 0.15	5.05 ± 0.16	29.46 ± 0.28	90.4 ± 0.93

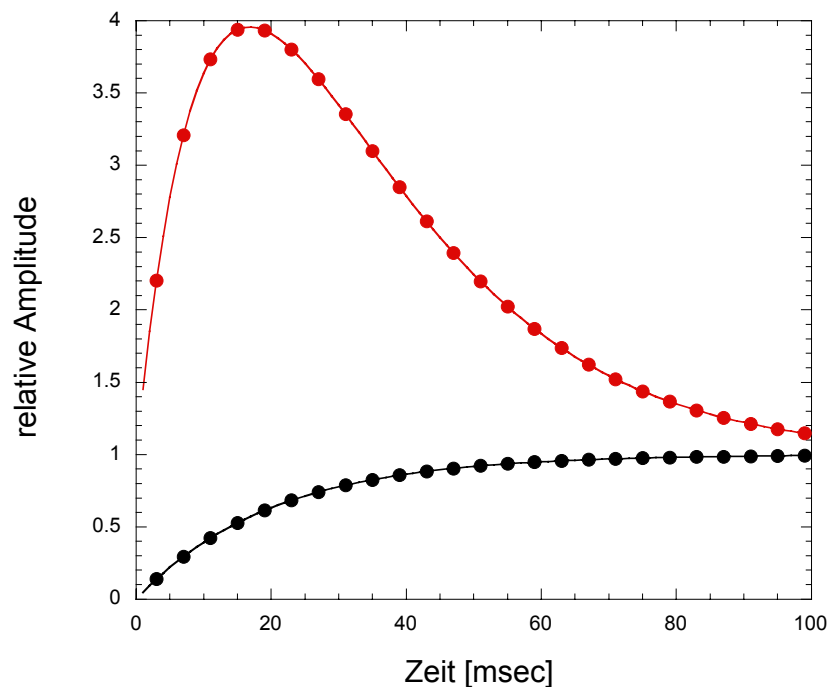
<sup>1)</sup> 100mM Cacodylatpuffer 0.56M GdmCl pH 7.0 (25°C); <sup>2)</sup> 100mM Cacodylatpuffer 0.3M GdmCl pH 7.0 (25°C)

Tabelle 4-29 Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden nach analytischer Auswertung der Rückfaltungsdaten.

Wie man erkennen kann, sind die Geschwindigkeitskonstanten der langsameren Isomerisierungsphase ( $k_1$ ) von der Mutation nicht betroffen. Bis auf die Mutante N25A und V36A verhält sich die mittlere Phase ( $k_2$ ) ähnlich. Bei den genannten Mutanten kommt es zu einer ungewöhnlichen Erniedrigung der Geschwindigkeitskonstante  $k_3$ . Diese korreliert in beiden Fällen mit einer Erniedrigung der jeweiligen Amplitudenwerte unter 80%. Durch die Ähnlichkeit der beiden Phasen  $k_3$  und  $k_2$ , sind wahrscheinlich Phasenkopplungen für diese Differenzen verantwortlich. Diese Aussage wird auch durch die beiden Amplitudenfehler gestützt, die hier ungewöhnlich hoch ausfallen. Bei der N25A sowie der V36A Mutante kommt es bei der Rückfaltung zu einem drastischen Einbruch der Geschwindigkeitskonstante. Dieser Effekt deutet auf eine Besonderheit der beiden Positionen 25 und 36 in Zusammenhang mit der Stabilisierung des Übergangszustands. Anders verhält sich beispielsweise die L14A Mutante. Obwohl nach den Gleichgewichtsdaten diese Mutante durch die Substitution stark destabilisiert wurde, scheint der Austausch von Leucin gegen Alanin nicht die Rückfaltung und damit den Übergangszustand (*transition state*: TS) zu betreffen.

Bei der I61M Mutante ließ sich ein diskontinuierlicher Verlauf der Fluoreszenzsignale nicht feststellen. Nach dem „mechanistischen“ Modell kann die Nativstruktur auf zwei

unterschiedlichen Wegen realisiert werden. Beim kooperativen Weg (A) erfolgt die Faltung und damit die Bildung von Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen simultan zum Kollabieren der Proteinkette, als Reaktion auf die veränderten Lösungsmittelbedingungen. Beim sukzessiven Weg (B) kommt es zur schnellen Bildung bestimmter, nativähnlicher Strukturen (z.B.  $\beta$ -Hairpin), die eine weitere Faltung der Proteinkette erst ermöglichen. Die Stabilität solcher Strukturen gegenüber dem Ausgangszustand bestimmt, ob Intermediate auf dem Faltungsweg beobachtet werden können (Fersht, 1999). Bei der I61M Mutante kommt es auf Grund der Nähe des Methionins zum Tryptophan 18 zu einem starken Einbruch der Fluoreszenz im nativen Molekül. Überträgt man diesen Effekt auf die beiden Faltungswege, erhält man für Weg A (●) einen kontinuierlichen Fluoreszenzanstieg bis zum Gleichgewichtswert:



Für den Weg B (●) hingegen erhält man einen raschen Fluoreszenzanstieg, der parallel zur Bildung des  $\beta$ -Hairpins (HP) verläuft und nach Fluoreszenzabfall wieder den Gleichgewichtswert erreicht. Die durchgeführten Messungen innerhalb der vom Meßsystem aufgezwungenen Totzeit (5-10msec) bestätigen das erste, kooperative Faltungsmodell (Weg A) beim Tendamistat. Nach analytischer Auswertung der Meßdaten, läßt sich im Bereich von 10-200msec kein diskontinuierlicher Fluoreszenzanstieg beobachten (Abbildung 4-66, links). Auch treten

Abweichungen nach Regression mit Hilfe einer monoexponentiellen Ausgleichsfunktion nicht in Erscheinung (Abbildung 4-66, rechts).

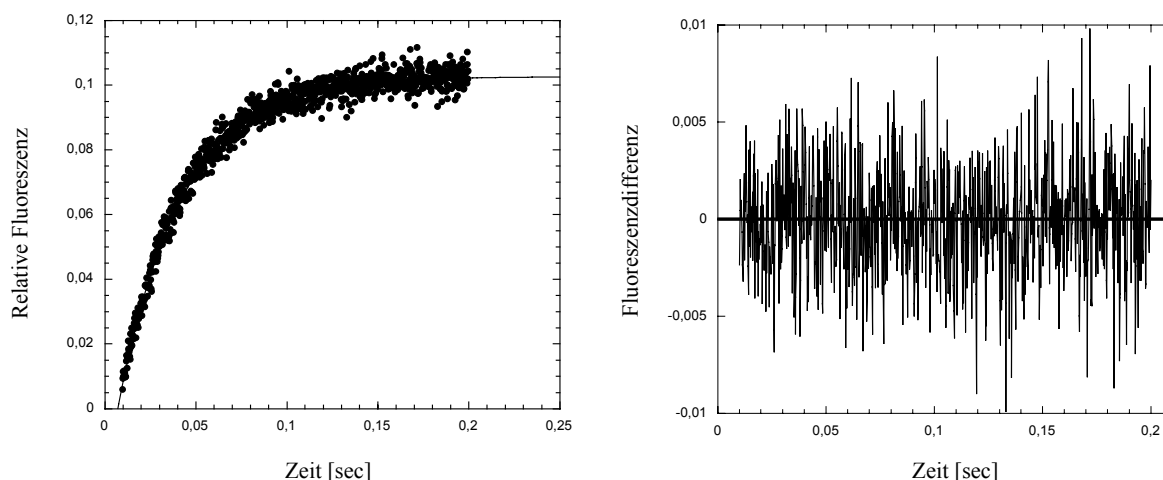


Abbildung 4-66 Rückfaltung der Mutante I61M (links) sowie die Abweichungen nach Regressionsanalyse (rechts). Die Regression wurde mit Hilfe einer monoexponentiellen Ausgleichsfunktion durchgeführt. Im betrachteten Zeitfenster gibt es keine Hinweise auf das Vorhandensein einer weiteren kinetischen Faltungsphase.

Bei der Entfaltung der Mutanten L14A und N25A ist unter denaturierenden Bedingungen eine starke Beschleunigung der Hauptphasenreaktion zu beobachten (Tabelle 4-30).

	<i>Bedingungen</i>	$k_1$ ( $s^{-1}$ )	$A_1$ (%)	$k_2$ ( $s^{-1}$ )	$A_2$ (%)
L14A	7.22M GdmCl <sup>2)</sup>	1.89 ± 0.003	94.6 ± 0.05	0.12 ± 0.003	5.4 ± 0.05
N25A	7.22M GdmCl <sup>2)</sup>	1.73 ± 0.002	98.1 ± 0.05	0.05 ± 0.02	1.9 ± 0.35
T32A	7.22M GdmCl <sup>2)</sup>	0.028 ± 0.0002	89.6 ± 0.86	0.08 ± 0.004	10.4 ± 0.9
V36A	7.47M GdmCl <sup>3)</sup>	0.1 ± -	91.2 ± 0.03	1.88 ± 0.02	8.8 ± 0.05
V36I	7.47M GdmCl <sup>3)</sup>	0.016 ± -	97.1 ± 0.04	0.24 ± 0.01	2.9 ± 0.04
L44A	7.47M GdmCl <sup>3)</sup>	0.017 ± -	98 ± 0.03	0.5 ± 0.02	2 ± 0.03
TM-WT	6.4 M GdmCl <sup>1)</sup>	0.19 ± 0.02	98.5 ± 0.25	1.71 ± 0.26	1.5 ± 0.21

<sup>1)</sup> 100mM Glycin/HCl-Puffer pH 2.0 (25°C); <sup>2)</sup> 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (25°C); <sup>3)</sup> 100mM Cacodylatpuffer pH7.0 (25°C)

Tabelle 4-30 Geschwindigkeitskonstanten ( $k_i$ ) und Amplituden ( $A_i$ ) bei der Entfaltung verschiedener Tendami-stammutanten.

Im Vergleich zur T32A Mutante, die unter gleichen Endbedingungen vermessen wurde, entfaltet die L14A Mutante fast 70mal so schnell. Da die Rückfaltungsreaktion der L14A Mutante durch die Substitution nur schwach beeinflusst wird, ist die unter Gleichgewichtsbedingungen zu beobachtende Instabilität ( $\Delta\Delta G^\circ = 18.9$  kJ/mol) im wesentlichen auf die beschleunigte Entfaltungsreaktion zurückzuführen. Bei der V36A Mutante ist dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt. Vergleicht man die Entfaltungskinetik der V36A mit der L44A Mutante, ist hier die Entfaltungsreaktion unter gleichen Endbedingungen immerhin um den Faktor 6 beschleunigt. Eine besondere Situation tritt wiederum bei der I61M Mutante auf. Bei niedrigen GdmCl Konzentrationen konnte hier die Entfaltungsreaktion sehr gut über eine biphasische Ausgleichsfunktion angenähert werden. Erhöht man hingegen die GdmCl Konzentration im Entfaltungspuffer weiter ( $> 7$  M GdmCl), lassen sich die erhaltenen Daten nur noch befriedigend über eine triphasische Ausgleichsfunktion anpassen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4-67 (rechts) als Differenzen der bi- bzw. triphasischen Ausgleichsfunktion zu den Meßdaten abgebildet.

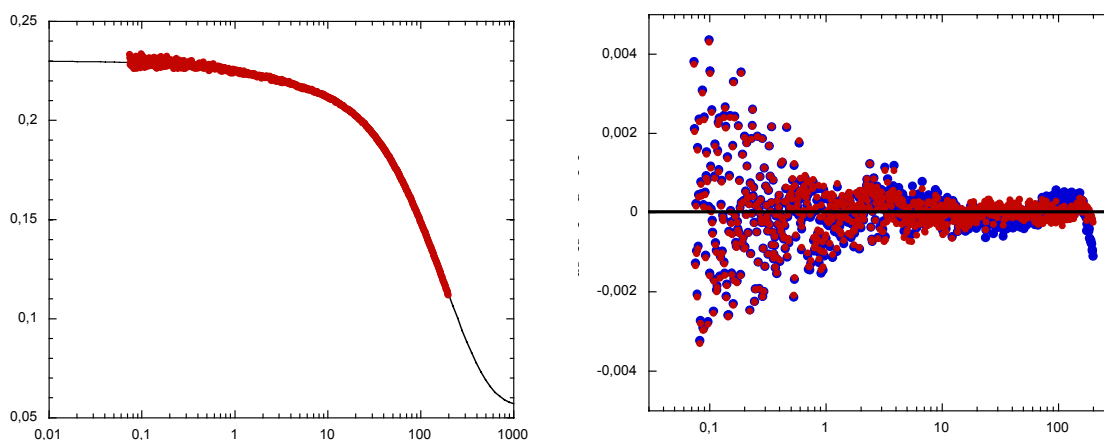


Abbildung 4-67 Entfaltungsreaktion der I61M Mutante (links). Auf der rechten Seite sind die Abweichungen der erhaltenen Meßpunkte von der biphasischen (rot) bzw. triphasischen (blau) Ausgleichsfunktion abgebildet ( $F_{\text{Differenz}} = F_{\text{Messung}} - F_{\text{Regression}}$ ). Um ein breiteres Zeitfenster darstellen zu können, wurde für die x-Achse eine logarithmische Zeiteinteilung ausgewählt.

Deutlich erkennbar ist dabei, daß die Abweichungen der biphasischen Ausgleichsfunktion vor allem den späteren Relaxationsbereich des Meßsignals betreffen. Wiederum läßt sich bei der Entfaltungsreaktion der I61M Mutante keine Diskontinuität im Abfallen des Fluoreszenzsignals nachweisen. In diesem Fall hätte es bei einer sukzessiven Entfaltungsreaktion zunächst zu einem schnellen Fluoreszenzanstieg kommen müssen. Ein solches Verhalten konnte nicht beobachtet werden. Daher ist auch bei der Entfaltungsreaktion ein vollständig kooperativer, einstufiger „*alles-oder-nichts*“ Entfaltungsmechanismus anzunehmen.

	$k_1 (s^{-1})$	$A_1 (\%)$	$K_2 (s^{-1})$	$A_2 (\%)$	$k_3 (s^{-1})$	$A_3 (\%)$
I61M <sup>3)</sup>	$0.006 \pm 0.002$	$92.9 \pm 0.7$	$0.72 \pm 0.05$	$4.1 \pm 0.18$	$0.079 \pm 0.014$	$3 \pm 0.27$

<sup>3)</sup> 100mM Cacodylatpuffer 7.47M GdmCl pH7.0 (25°C)

Tabelle 4-31 Geschwindigkeitskonstanten ( $k_i$ ) und Amplituden ( $A_i$ ) bei der Entfaltung.

In der Tabelle 4-31 sind die aus der Regression erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden für die I61M Mutante in Gegenwart von 7.47M GdmCl aufgeführt.

#### 4.2.7.2. Auswertung

Einen besseren Einblick in die Einzelheiten der jeweiligen Faltungsreaktionen erhält man, durch Auswertung kinetischer Daten, die in Abhängigkeit unterschiedlicher Denaturierungsmittelkonzentrationen vorliegen. Ein solcher Zusammenhang wird grafisch als V-Schemata oder *chevron plot* bezeichnet. Zur Auswertung der V-Schemata wurden die Rück- bzw. Entfaltungsmessungen in Gegenwart unterschiedlicher GdmCl Konzentrationen im Meßpuffer durchgeführt. Die Geschwindigkeitskonstanten ( $k_{obs}$ ) der jeweiligen Hauptphasenreaktion dienen als Grundlage für die Berechnung aller weiteren Größen. Eine Auftragung des natürlichen Logarithmus von  $k_{obs}$  gegen die eingesetzte GdmCl Konzentration (*chevron plot*) lieferte für alle Proteine ein V-förmiges Profil (vgl. Abbildung 4-68), das mit der Gleichung

$$\ln k_{obs} = \ln \left( k_f (H_2O) \exp^{-m_f' [Denaturierungsmittel]} + k_u (H_2O) \exp^{-m_u' [Denaturierungsmittel]} \right)$$

ausgewertet werden konnte. Diese Gleichung schließt sämtliche Datenpunkte in die Anpassung mit ein und erlaubt es daher die Kinetik auch auf schwer zugängliche GdmCl-Bereiche auszudehnen. Dies fällt besonders bei Mutanten auf, die durch ihre Stabilität selbst bei hohen GdmCl Konzentrationen ( $> 7\text{M GdmCl}$ ) sehr langsam entfalten. In solchen Fällen entfallen häufig zuverlässige Meßdaten im linearen Bereich des Entfaltungssastes (Abbildung 4-68, rechts). Daß die so erhaltenen Kinetiken dennoch gut mit den thermodynamisch abgeleiteten Stabilitätswerten korrelieren, läßt sich nach Umrechnung der Kinetiken über die Eyring Gleichung leicht überprüfen (vgl. Tabelle 4-34).

Auf Grund der Datenmenge – für jede Mutante wurden mindestens 12 Messungen durchgeführt – konnte ein signifikantes „Abknicken“ der Steigungsäste an den GdmCl Extremwertbereichen nicht beobachtet werden. Allenfalls die V36I Mutante könnte ein solches Verhalten bei niedrigen GdmCl Konzentrationen aufweisen. Dies zeigen Regressionsdaten, die mit Hilfe einer erweiterten Ausgleichsfunktion für den Faltungsast erhalten werden konnten:

$$\exp^{-m_f'[\text{Denaturierungsmittel}]} \mapsto \exp^{-\left(m_f'[\text{Denaturierungsmittel}] + m_f''[\text{Denaturierungsmittel}]^2\right)}$$

Allerdings reicht hier die Zahl der Meßpunkte nicht aus um die Stabilisierung eines Intermediats hinreichend genau anhand eines „roll-over“ Verhaltens festzulegen. Die berechneten Werte für  $k_f(\text{H}_2\text{O})$ ,  $k_u(\text{H}_2\text{O})$ ,  $m_f'$  und  $m_u'$  sind in Tabelle 4-32 aufgeführt.

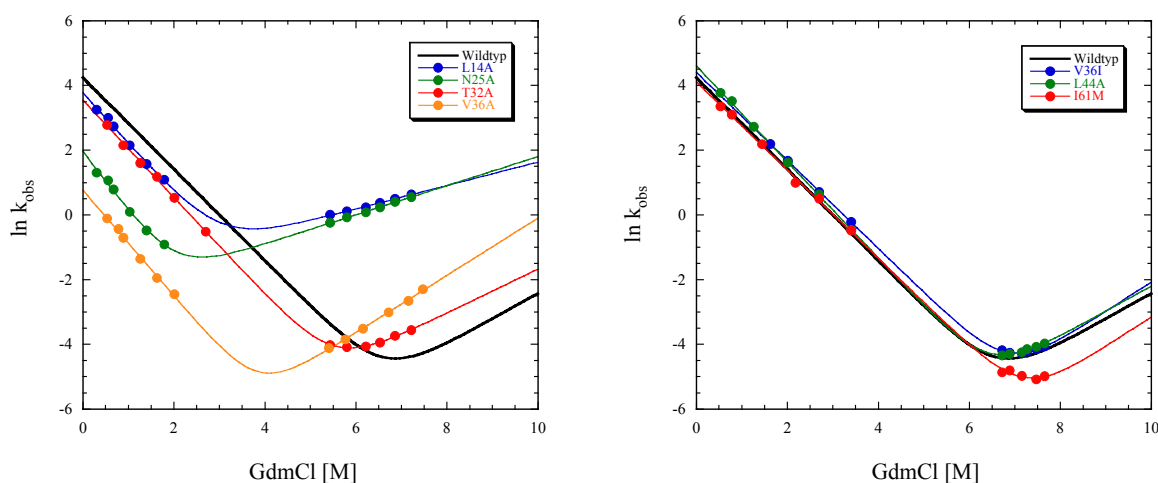


Abbildung 4-68 Rück- und Entfaltungskinetiken der einzelnen Mutanten in Gegenwart unterschiedlicher GdmCl Konzentrationen. In der Abbildung links sind die thermodynamisch labileren Mutanten (L14A, N25A, T32A und V36A) und in der Abbildung rechts die entsprechend stabileren Mutanten (V36I, L44A und I61M) abgebildet. Zum Vergleich ist in beiden Abbildungen der Tendamiostat Wildtyp (—) eingezeichnet.

Sie spiegeln im Grunde die bereits oben diskutierten Ergebnisse wieder. Durch die Extrapolation gegen H<sub>2</sub>O wird außerdem ein direkter Vergleich der Proteine unter additivfreien Bedingungen möglich.

	$k_f(H_2O)$ [s <sup>-1</sup> ]	$m_f'$ [M <sup>-1</sup> ]	$k_u(H_2O)$ [s <sup>-1</sup> ]	$m_u'$ [M <sup>-1</sup> ]
L14A	43.3	- 1.56	0.136	0.363
N25A	7.07	- 1.87	0.067	0.45
T32A	34.78	- 1.50	0.00021	0.68
V36A	2.15	- 1.64	0.00013	0.89
V36I	82.15	- 1.36	1.36 10 <sup>-5</sup>	0.91
L44A	123.94	- 1.53	6.6 10 <sup>-5</sup>	0.73
I61M	61.23	- 1.36	4.4 10 <sup>-6</sup>	0.918
TM-WT <sup>1)</sup>	69.61	- 1.41	3.4 10 <sup>-5</sup>	0.787

<sup>1)</sup> mit freundlicher Genehmigung von Guenter Pappenberger (Basel)

Tabelle 4-32 Geschwindigkeitskonstanten und Steigungswerte, die nach analytischer Auswertung der Faltungskinetiken über die Funktion  $\ln k_{obs} = f(GdmCl)$  erhalten werden konnten.

Auffallend sind auch hier wiederum die Proteine L14A, N25A und V36A. Beispielsweise kommt es bei der V36A Mutante zu einer Verlangsamung der Rückfaltung gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 33. Die Entfaltungskinetik dieser Mutante ist jedoch von der Substitution nicht so stark betroffen (Faktor 3.8). Ähnliches ergibt sich auch für die N25A Mutante. Eine umgekehrte Sachlage tritt im Fall der L14A Mutante in Erscheinung. Hier kommt es im Vergleich zum Wildtypprotein in Folge der Substitution auf eine unbedeutende Verlangsamung der Rückfaltungsreaktion. Die Entfaltungskinetik ist dagegen auf das 4000-fache vom Wildtypwert beschleunigt.

Auf Grundlage der Daten in Tabelle 4-32 konnten unter Zuhilfenahme der Eyring Gleichung (vgl. Kapitel 2.3.5) die freien Aktivierungsenergien  $\Delta G_f^{0\#}$  bzw.  $\Delta G_u^{0\#}$  sowie die m-Werte für die Rückfaltungs- bzw. Entfaltungsreaktion,  $m_f$  bzw.  $m_u$ , berechnet werden. Bei Zwei-Zustands Proteinen stehen die freien Aktivierungsenergien  $\Delta G_f^{0\#}$  bzw.  $\Delta G_u^{0\#}$  sowie die m-Werte  $m_f$  und  $m_u$

mit den Größen  $\Delta G_{eq}^0$  sowie  $m_{eq}$  aus den Gleichgewichtsmessungen in einem linearen Zusammenhang:

$$\Delta G_{eq}^0 = \Delta G_f^{0\#} - \Delta G_u^{0\#}$$

$$m_{eq} = m_f - m_u$$

Die sich aus diesen beiden Gleichungen ergebenden Wertepaare  $\Delta G_{eq}^0$  und  $m_{eq}$  sind in der Tabelle 4-33 aufgeführt.

	$\Delta G_f^{0\#}$ [kJ/mol]	$m_f$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_u^{0\#}$ [kJ/mol]	$m_u$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_{eq}^0$ <sup>1)</sup> [kJ/mol]	$m_{eq}$ <sup>2)</sup> [(kJ/mol)/M]
L14A	63.68	3.88	77.97	- 0.9	- 14.29	4.78
N25A	68.18	4.64	79.72	- 1.12	- 11.54	5.75
T32A	64.23	3.73	94.06	- 1.69	- 29.83	5.42
V36A	71.12	4.06	95.20	- 2.19	- 24.08	6.25
V36I	62.1	3.38	100.8	- 2.26	- 38.7	5.64
L44A	61.59	3.68	97.77	- 1.93	- 36.18	5.61
I61M	62.83	3.38	103.61	- 2.28	- 40.78	5.65
TM-WT	62.51	3.51	98.53	- 1.95	- 36.02	5.46

$$^1) \Delta G_{eq}^0 = \Delta G_f^{0\#} - \Delta G_u^{0\#}, \quad ^2) m_{eq} = m_f - m_u$$

Tabelle 4-33 Die nach der Eyring Gleichung berechneten freien Aktivierungsenergien ( $\Delta G_f^{0\#}$  und  $\Delta G_u^{0\#}$ ) und Steigungswerte ( $m_f$  und  $m_u$ ) der Tendamistatmutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Vorzeichenumkehr bei den Steigungswerten entspricht der Beziehung:  $m_{f,u} = - RT m_{f,u}^c$ .

Wie man in Tabelle 4-34 erkennen kann, erhält man bei den meisten Mutanten eine gute Übereinstimmung zwischen den aus kinetischen bzw. thermodynamischen Daten abgeleiteten Energie- und Steigungswerten. Damit bestätigen diese Messungen das bereits in der Literatur postulierte Zwei-Zustands Modell für den Hauptfaltungsweg des Tendamistats (Schönbrunner, 1997a) sowie der Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A und I61M. Dieses Zwei-Zustands Verhalten bildet die Grundlage für alle weiteren Auswert- und Analyseverfahren ( $\Phi$ -Wert,  $\alpha$ -Wert und m-Wert Analyse). Es zeigt aber zusätzlich, daß die Zahl der gewählten Meßpunkte ausreicht, um hinreichend genau die kinetischen mit den thermodynamischen Meßdaten abzugleichen.



	$\Delta G_{eq, kinetisch}^0$ [kJ/mol]	$m_{eq, kinetisch}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_{eq, CD}^0$ [kJ/mol]	$m_{eq, CD}$ [(kJ/mol)/M]	$\Delta G_{eq, Fluoreszenz}^0$ [kJ/mol]	$m_{eq, Fluoreszenz}$ [(kJ/mol)/M]
L14A	- 14.29	4.78	- 15.18	5.17	- 14.7	5.27
N25A	- 11.54	5.75	- 10.12	5.47	- 10.51	5.7
T32A	- 29.83	5.42	- 29.29	5.25	- 29.0	5.71
V36A	- 24.08	6.25	- 22.49	5.74	- 23.11	6.17
V36I	- 38.7	5.64	- 36.61	5.69	- 35.67	5.69
L44A	- 36.18	5.61	- 35.43	5.67	- 36.64	6.03
I61M	- 40.78	5.65	- 40.82	6.0	- 40.36	6.18
TM-WT	- 36.02	5.46	- 34.04	5.32	- 34.46	5.28

Tabelle 4-34 Vergleich zwischen den aus kinetischen Messungen abgeleiteten freien Aktivierungsenergien und m-Werten mit den aus CD- und Fluoreszenzmessungen erhaltenen Werten.

In Abbild 4-69 ist der lineare Zusammenhang zwischen  $\Delta G_{eq}^0$  und  $\Delta G_f^{0\#}$  bzw.  $\Delta G_u^{0\#}$  in einem Reaktionsdiagramm für Zwei-Zustands Proteine abgebildet.

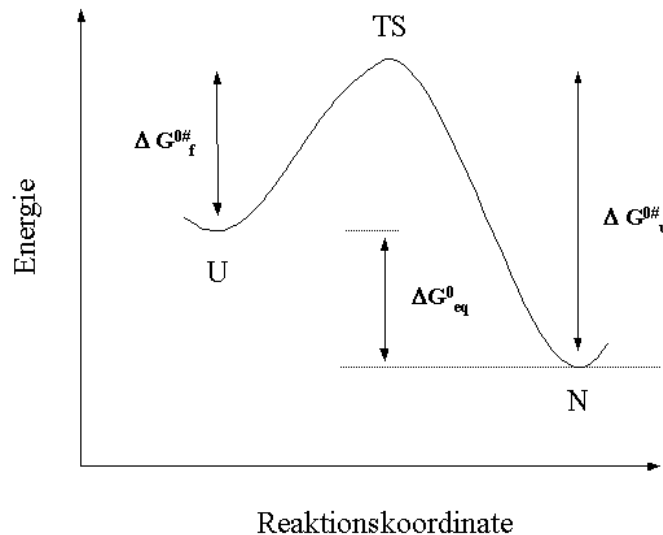


Abbildung 4-69 Schematisches Energiediagramm für die Faltung eines Proteins. Im Diagramm sind die aus dem V-Schema abgeleiteten und über die Eyring Gleichung berechneten Größen  $\Delta G_{eq}^0$  und  $\Delta G_f^{0\#}$  bzw.  $\Delta G_u^{0\#}$  dargestellt. Der Übergangszustand ist mit TS (*transition state*) gekennzeichnet. Als Reaktionskoordinate läßt sich hier ein beliebiger Parameter, wie beispielsweise die Tanford-Konstante  $\alpha$ , wählen, der die strukturelle Entwicklung des Proteins wiedergibt.

#### 4.2.7.3. Die m-Wert Analyse.

Mit Hilfe der Achsensteigungen  $m_f'$  und  $m_u'$  läßt sich die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands relativ zu den Ausgangszuständen U bzw. N berechnen. Dazu wurden die kinetisch definierten Steigungen  $m_f'$  und  $m_u'$  über die Eyring Gleichung (Eyring, 1935)

$$k = \frac{\kappa k_b T}{h} \exp(-\Delta G^{0\#} / RT)$$

in  $m_f$  und  $m_u$  umgerechnet.  $\kappa$  ist der sogenannte Transmissionsfaktor, der eine obere Grenze von 1 annehmen kann und hier als konstant angesehen wird (Fersht, 1999). Zur Berechnung der Zugänglichkeit definiert man aus den Steigungswerten eine neue Größe:

$$\alpha = \frac{m_f}{m_{eq}} = 1 + \frac{m_u}{m_{eq}}$$

$$m_{eq} = m_f - m_u$$

Die erstmals von Charles Tanford (Tanford, 1970) eingeführte Konstante  $\alpha$ , die auch als Tanford Konstante bezeichnet wird, kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Entspricht die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands dem denaturierten Zustand, so beträgt der  $\alpha$ -Wert 0. Gleicht sie dagegen dem nativen Protein, beträgt der  $\alpha$ -Wert 1. Für zahlreiche Übergangszustände (TS) findet man  $\alpha$ -Werte zwischen 0 und 1. Der  $\alpha$ -Wert wird häufig als Reaktionskoordinate in der Proteinfaltung verwendet, da er sich, anders als eine chemische Reaktionskoordinate auf keine definierte Trajektorie festlegt (Tanford, 1970; Müller, 1980). Das hat zur Konsequenz, daß unterschiedlich aufgebaute Anordnungen der Proteinkette „einen“ Übergangszustand ( $\alpha$ ) definieren können. Wie gezeigt werden konnte (vgl. Abbildung 4-68), verhalten sich die Steigungsäste für die Tendami-Mutanten in den GdmCl Extrembereichen linear. Daher ist es nicht erforderlich, den  $\alpha$ -Wert, wie das bei einer Verschiebung des Übergangszustands der Fall wäre, auf eine bestimmte GdmCl Konzentration zu beziehen (Matouschek, 1995; Otzen, 1999).

	$m_f$ [(kJ/mol)/M]	$m_u$ [(kJ/mol)/M]	$m_{eq}^{1)}$ [(kJ/mol)/M]	$\alpha$ -	$\Delta\alpha^{2)}$ -	$\Delta G_{eq, CD}^0$ [kJ/mol]
L14A	3.88	- 0.9	4.78	0.82	0.18	- 15.18
N25A	4.64	- 1.12	5.75	0.81	0.17	- 10.12
T32A	3.73	- 1.69	5.42	0.69	0.05	- 29.29
V36A	4.06	- 2.19	6.25	0.65	0.01	- 22.49
V36I	3.38	- 2.26	5.64	0.6	- 0.04	- 36.61
L44A	3.68	- 1.93	5.61	0.66	0.02	- 35.43
I61M	3.38	- 2.28	5.65	0.6	- 0.04	- 40.82
TM-WT	3.51	- 1.95	5.46	0.64	0	- 34.04

<sup>1)</sup>  $m_{eq} = m_f - m_u$ ; <sup>2)</sup>  $\Delta\alpha = \alpha_{Mutante} - \alpha_{Wildtyp}$ .

Tabelle 4-35 Die nach der Eyring Gleichung berechneten Steigungswerte und die daraus abgeleiteten Tanford Konstanten ( $\alpha$ ). Die Vorzeichenumkehr bei den Steigungswerten entspricht der Beziehung:  $m_{f,u} = - RT m_{r,u}$ .

Bei Betrachtung der berechneten Lösungsmittelzugänglichkeiten lassen sich die Mutanten in zwei Gruppen unterteilen (Tabelle 4-35). Die Mutanten T32A, V36A, V36I, L44A und I61M gehören zu der ersten Gruppe, in der sich die Lösungsmittelzugänglichkeiten durch die eingeführten Substitutionen gegenüber dem Wildtyp nur unmerklich verändern. Etwa 60% der in den entfalteten Proteinen zugänglichen Oberfläche ist beim Erreichen des Übergangszustands vom Lösungsmittel abgeschirmt. Abgesehen von der V36A Mutante gibt es eine weitere Gemeinsamkeit innerhalb dieser Gruppe. Bezogen auf den Wildtyp kommt es bei allen Mutanten infolge der Substitutionen zu keiner wesentlichen Veränderung der Proteinstabilität  $\Delta G_{eq}^0$ . Bei der V36A Mutante scheint bezüglich  $\alpha$  die destabilisierende Substitution die Lage des Übergangszustands nicht zu verändern. Daß es dennoch zu einer Verschiebung *innerhalb* des Übergangszustands gekommen sein muß, kann anhand der sehr hohen freien Aktivierungsenergie  $\Delta G_f^{0\#}$  von 71.12kJ/mol abgeleitet werden. In die zweite Gruppe von Proteinen gehören die beiden Mutanten L14A und N25A. In beiden Fällen kommt es auf Grund der Ala Substitution zu einer drastischen Verschiebung der Tanford Konstante ( $\alpha_{Wildtyp} \rightarrow \alpha_{Mutante}$ ) in Richtung Nativzustand (N). Beide Mutationen führen darüberhinaus zu einer starken Destabilisierung des Tendamisats. Dieses Verhalten entspricht damit dem Hammond Postulat (Abbildung 4-70), wonach eine Destabilisierung des Nativzustands ( $N \rightarrow N'$ ) eine Verschiebung des Übergangszustands in Richtung auf den Nativzustand nach sich zieht (Fersht, 1999). Im Fall der Mutanten L14A und

N25A nimmt auf Grund dieses Effekts die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands um bis zu 28% ab. Verschiebungen in einer solchen Größenordnung sind ebenfalls ein Beleg für sehr breite Aktivierungsbarrieren, da diese zu größeren  $\Delta\alpha$ -Werten innerhalb des Übergangszustands (TS  $\rightarrow$  TS') führen.

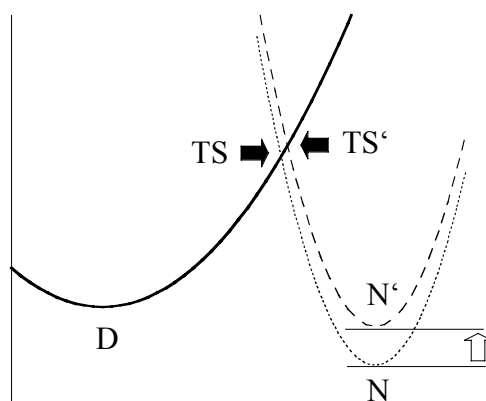


Abbildung 4-70 Abgebildet ist eine grafische Darstellung des Hammond Postulats. Bezogen auf den denaturierten Zustand (D) führt eine Destabilisierung des nativen Moleküls (N  $\rightarrow$  N') zu einer Verschiebung des Übergangszustands von TS nach TS'. TS' entspricht strukturell eher N' als D.

Auffallend ist darüberhinaus, daß sich beide Substitutionen innerhalb des  $\beta$ -Hairpin I befinden. Destabilisierende Mutationen im  $\beta$ -Hairpin können offensichtlich nur durch eine kompaktere Zusammenlagerung der restlichen Bereiche im Protein *ausgeglichen* bzw. *ersetzt* werden. Solche Auswirkungen von einzelnen Mutation auf die Lösungsmittelzugänglichkeit des gesamten Moleküls sind allerdings nur dann möglich, wenn kooperative Wechselwirkungen am Aufbau des Übergangszustands beteiligt sind (Creighton, 1995).

#### 4.2.7.4. Die $\Phi$ -Wert Analyse.

Die  $\Phi$ -Wert Analyse ist eine Methode um die Struktur von Übergangszuständen abzuleiten. Durch eine Mutation wird dabei die Stabilität des zu untersuchenden Proteins geringfügig verändert. Das Ausmaß einer solchen „Störung“ läßt sich durch  $\Delta\Delta G_{eq}^{\circ}$ (Wildtyp-Mutante)

wiedergeben. Wird diese Größe in Relation gesetzt zur Änderung der Aktivierungsenergie  $\Delta\Delta G_f^{0\#}$ (Wildtyp-Mutante) ergibt sich der  $\Phi$ -Wert:  $\Phi_f$ . Ein solcher Wert liegt für gewöhnlich zwischen 0 und 1. Ein  $\Phi_f$ -Wert von 0 bedeutet, daß die Mutation im denaturierten Zustand die gleiche Störung verursacht wie im Übergangszustand. Entsprechend bedeutet ein  $\Phi_f$ -Wert von 1, daß die Mutation im nativen Zustand zur gleichen Störung führt wie im Übergangszustand. Neben  $\Phi_f$  läßt sich auch für die Entfaltungsreaktion ein  $\Phi$ -Wert ableiten ( $\Phi_u$ ). Führen beide Reaktionen über den *gleichen* Übergangszustand, beträgt die Summe der beiden  $\Phi$ -Werte 1:

$$\Phi_f = \frac{\Delta\Delta G_f^{0\#}}{\Delta\Delta G_{eq}^0}; \Phi_u = -\frac{\Delta\Delta G_u^{0\#}}{\Delta\Delta G_{eq}^0}$$

$$\Phi_f + \Phi_u = \frac{\Delta\Delta G_f^{0\#}}{\Delta\Delta G_{eq}^0} - \frac{\Delta\Delta G_u^{0\#}}{\Delta\Delta G_{eq}^0} = 1$$

In der Regel verwendet man  $\Phi_f$  für die Analyse von Übergangszuständen (Fersht, 1999). Allerdings können bei Mutationen, die zu einer Veränderung des Übergangszustands führen, die einzelnen  $\Phi$ -Werte nicht mehr sinnvoll miteinander verglichen werden. Eine andere Fehlerquelle ergibt sich aus der Extrapolation der Entfaltungskinetiken ( $k_u$ ) gegen 0M GdmCl. Hier können minimale Abweichungen von der Linearität ( $m_u$ ) zu großen Fehlern bei der Bestimmung von  $\Delta G_u^{0\#}$ (H<sub>2</sub>O) führen. Problematisch dagegen beim  $\Phi_f$ -Wert ist die Messung unter stark nativen Bedingungen. Diese können unter Umständen eine Stabilisierung von Intermediaten begünstigen und damit zu dem bekannten „roll-over“ Verhalten des Rückfaltungsastes führen. Für die hier untersuchten Mutanten konnte jedoch ein solches Verhalten im V-Schema nicht beobachtet werden. Deshalb wurde zur  $\Phi$ -Wert Analyse die freie Aktivierungsenergie der Rückfaltung  $\Delta G_f^{0\#}$  verwendet. Diese konnten nach Extrapolation der Geschwindigkeitskonstanten gegen 0M GdmCl über die Eyring Gleichung erhalten werden. Als Grundlage für die freien Stabilisierungsbeiträge  $\Delta G_{eq}^0$  dienten Daten aus der GdmCl induzierten Entfaltung (CD). In Tabelle 4-36 sind die daraus berechneten  $\Phi_f$ -Werte aufgelistet. Die L14A Mutante zeigt einen  $\Phi_f$ -Wert nahe 0. Die Leu → Ala14 Substitution führt zwar zu einer starken Destabilisierung des Tendamiastats (19kJ/mol), die Aktivierungsenergie  $\Delta G_f^{0\#}$  ist jedoch von diesem Einfluß nicht betroffen.

	$\Delta G^{0\#}_f$	$\Delta\Delta G^{0\#}_f$	$\Delta G^{0\#}_u$	$\Delta\Delta G^{0\#}_u$	$\Delta G^0_{eq,CD}$	$\Delta\Delta G^0_{eq,CD}$	$\Phi_u$	$\Phi_f$
	[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]	[kJ/mol]		
L14A	63.68	- 1.17	77.97	20.56	- 15.18	- 18.86	1.09	<b>0.06</b>
N25A	68.18	- 5.67	79.72	18.81	- 10.12	- 23.92	0.79	<b>0.24</b>
T32A	64.23	- 1.72	94.06	4.47	- 29.29	- 4.75	0.94	<b>0.36</b>
V36A	71.12	- 8.61	95.20	3.33	- 22.49	- 11.55	0.29	<b>0.74</b>
V36I	62.1	0.41	100.8	- 2.27	- 36.61	2.57	0.88	<b>0.16</b>
L44A	61.59	0.92	97.77	0.76	- 35.43	1.39	-0.54	<b>0.66</b>
I61M	62.83	- 0.32	103.61	- 5.08	- 40.82	6.78	0.75	<b>-0.04</b>
TM-WT	62.51	-	98.53	-	- 34.04	-	-	-

Tabelle 4-36  $\Phi$ -Wert Analyse der Tendamistat Mutanten.

Die mit Leucin 14 verbundenen stabilisierenden Wechselwirkungen beginnen sich daher erst nach Erreichen des Übergangszustands bemerkbar zu machen (Fersht, 1999). Dieser Sachverhalt ist grafisch in Abbildung 4-71 dargestellt. Bei der N25A Mutante ( $\Phi_f = 0.24$ ) ergeben sich ähnliche Verhältnisse wie für die L14A Mutante. Auch in diesem Fall verursacht zwar die Asn  $\rightarrow$  Ala25 Substitution eine starke Destabilisierung des Proteins, doch überträgt sich dieser Effekt nur zum Teil auf die Aktivierungsenergie für die Faltungsreaktion  $\Delta G^{0\#}_f$ . Beide Mutationen liegen im  $\beta$ -Hairpins I auf sich gegenüberliegenden Strängen. Damit können diese Daten belegen, daß der  $\beta$ -Haipin I im Übergangszustand des Tendamistats noch nicht in seiner nativen Struktur vorliegt. Bei der Thr  $\rightarrow$  Ala32 Substitution wirkt sich die herbeigeführte Destabilisierung ebenfalls nicht auf den Übergangszustand aus. Daher werden die im Nativzustand vorhandenen destabilisierenden Wechselwirkungen erst nach Erreichen des Übergangszustands aufgebaut. Substitutionen an Position 36 zeigen einen komplizierteren Sachverhalt (Abbildung 4-71, rechtes Bild). Ersetzt man das ursprünglich vorhandene Valin 36 gegen Alanin, wirkt sich die Destabilisierung (11kJ/mol) zu 74% auch auf den Übergangszustand aus. Dieser Effekt läßt sich bereits aus der um fast 8.6kJ/mol niedrigeren Aktivierungsenergie  $\Delta G^{0\#}_f$  ableiten. Der Bereich um Valin 36 scheint daher im Übergangszustand eine nativ-ähnlich Struktur zu besitzen. Ersetzt man demgegenüber Alanin durch Isoleucin, reduziert sich der  $\Phi_f$ -Wert von 0.74 auf 0.16. Damit wäre der Bereich um Valin 36 im Übergangszustand nahezu vollständig unstrukturiert. Der Austausch von Alanin gegen Isoleucin bewirkt ganz offensichtlich eine substitutionsspezifische Veränderung im Übergangszustand.

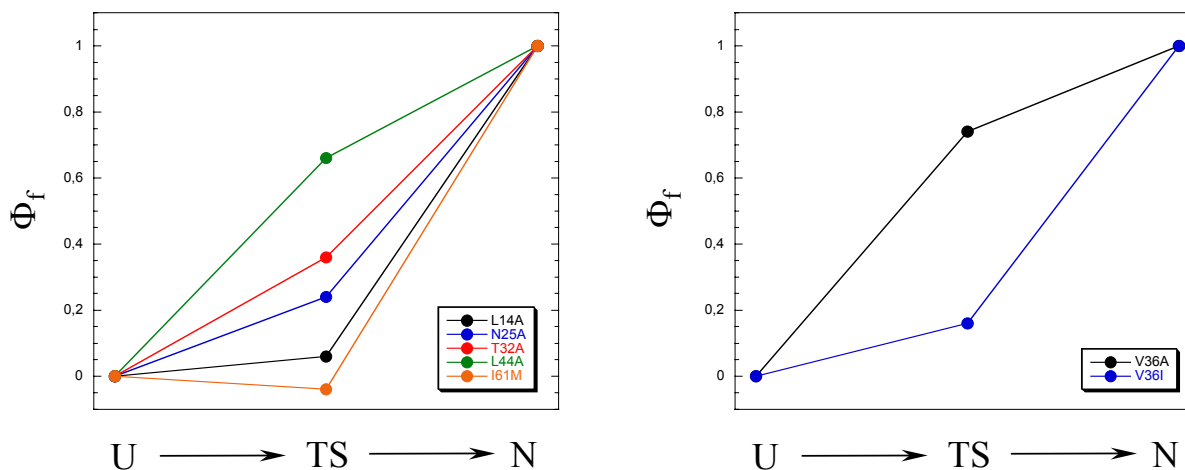


Abbildung 4-71 Grafische Darstellung der erhaltenen  $\Phi_T$ -Werte in einem Diagramm. Als Zwei-Zustands Protein existiert für das Tendamistat nur ein Übergangszustand (TS). Mutationen, die *nativ*-strukturierte Bereiche des Proteins im Übergangszustand betreffen, ergeben *hohe*  $\Phi_T$ -Werte. In Bereichen mit *niedrigen*  $\Phi_T$ -Werten liegen im Übergangszustand weitestgehend *nicht-native* Verhältnisse vor. Das Diagramm veranschaulicht somit den Prozess der Strukturbildung für jede ausgetauschte Aminosäure im Tendamistat (vgl. Abschnitt 2.3.5.1.).

Isoleucin verstärkt zwar gegenüber Valin die hydrophoben Wechselwirkungen im SEHC, verursacht jedoch auch ungünstige van der Waals Kontakte zu benachbarten Aminosäuren. Bei der L44A Mutante erhält man einen  $\Phi_T$ -Wert von 0.66. Danach sind die Kontakte um Position 44 - vor allem zu Tyrosin 46 - zum Teil bereits im Übergangszustand vorhanden. Bei dieser Interpretation sollte man jedoch unbedingt beachten, dass sich Leucin 44 in Nachbarschaft zu Cystein 45 befindet. Cystein 45 bildet mit Cystein 73 die zweite Disulfidbrücke im Tendamistat. Da sich die Rückfaltung unter oxidativen Bedingungen vollzieht, ist die Flexibilität um Leucin 44 bereits am Anfang eingeschränkt. Eine andere Situation tritt bei der I61M Mutante auf. Isoleucin 61 befindet sich in einem Sequenzabschnitt, dem keine definierte Sekundärstruktur zugeordnet werden kann. Wechselwirkungen, die unter nativen Bedingungen existieren, werden nach der  $\Phi$ -Wert Analyse im Übergangszustand nicht aufgebaut. Position 61 verhält sich danach entsprechend der Position 14. In Abbildung 4-71 sind die Ergebnisse aus der  $\Phi$ -Wert Analyse als Reaktionsdiagramm abgebildet. Die Lage des Übergangszustands wurde hierbei als konstant angesehen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Klonierung und Expression neuer Tendamistat Varianten

#### 5.1.1. Mutagenese

Die Mutagenese definierter Sequenzabschnitte leistet heutzutage einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung struktureller und funktionaler Beziehungen von Nukleinsäuren sowie Proteinen. Neben den zahlreichen „klassischen“ Mutageneseverfahren (Kramer; 1984; Kunkel, 1985; Sayers, 1991; Wells, 1985) basieren die derzeit am häufigsten verwendeten Mutageneseverfahren auf PCR (Mullis, 1987; Higuchi, 1988).

Bereits zuvor gelang es Haas-Lauterbach (Haas-Lauterbach; 1992) spezifische Positionen innerhalb des Tendamistat Gens nach dem Verfahren von Kramer (Kramer, 1984) zu mutagenisieren. Wegen der besonderen Schwierigkeiten die dabei auftraten, wurde in dieser Arbeit nach alternativen Verfahren gesucht, um die Mutagenese innerhalb des G/C reichen Tendamistat Gens (74%) schnell und vor allem effizient durchführen zu können. Ein auf mehrstufiger PCR basierendes Mutageneseverfahren konnte bereits zuvor von Aygün (Aygün, 1995) zur Einführung von Ladungsmutanten in das Tendamistat etabliert werden. Doch auch dieses Verfahren wies unterschiedliche Nachteile auf. Von den zahlreichen neueren Mutageneseverfahren wurde in dieser Arbeit zunächst die USE-Mutagenese (*unique site elimination*) als mögliche Alternative zur PCR gestützten Mutagenese untersucht (Deng, 1992; Ray, 1992; Wong, 1995). Dieses Verfahren nutzt dabei zwei 5' phosphorylierte Oligonukleotide, die gemeinsam an ein denaturiertes Plasmid hybridisieren und nach enzymatischer Komplementierung ein Heteroduplex Plasmid ergeben. Einer der beiden Primer ist dabei so gewählt, daß er durch Punktmutation eine neue, singuläre Schnittstelle in das Plasmid einführt, über die am Ende enzymatisch selektiert werden kann. Für die Verfielfältigung der so aufgebauten heteroduplex Plasmide wurden reparaturdefiziente BMH71-18 mutS Zellen (Zell, 1987) eingesetzt. Auch nach mehmaligen Versuchen gelang es mit diesem Verfahren nicht, Mutationen in das Tendamistat Gen einzuführen. Zwar konnte durch Optimierung erfolgreich über die neu entstandene Schnittstelle im Plasmid selektiert werden, doch wiesen die erhaltenen



Klone keine in das Tendamistat Gen eingebrachte Zweitmutation auf. Dies konnte einfach anhand einer Schnittstelleneliminierung im Zielgen (AccI-off Mutanten) gezeigt werden. Die gleichzeitige Hybridisierung beider Primer scheint also bei dieser Mutagenesestrategie einen Flaschenhals darzustellen. Eine weitere Schwierigkeit betraf die Herstellung transformationskompetenter BMH71-18 mutS Zellen. Weitere Experimente mit diesem Verfahren wurden daher abgebrochen. Als weitere Möglichkeit bot sich das PCR Mutageneseverfahren von Nelson und Long an (Nelson, 1989). In diesem Verfahren erfolgt die Einführung von Mutationen über zwei getrennt ablaufende PCR Reaktionen. Bei der ersten PCR-Reaktion wird die einzuführende Mutation einschließlich einer im Plasmid nicht vorhandenen Sequenz als Hauptamplifikat erhalten. Das Amplifikat kann anschließend nach Kompletierung des vorderen Genbereichs über die terminal vorhandene Zusatzsequenz spezifisch reamplifiziert werden und erbringt dadurch nahezu ausschließlich mutagenisierte Zielsequenzen. Um die Spezifität der zweiten PCR Reaktion weiter zu erhöhen, wurde für die Wahl der terminalen Zusatzsequenz das Computerprogramm Amplify 1.2 herangezogen. Sämtliche Amplifikationen wurden zunächst mit Hilfe der Vent Polymerase (NEB) unter Verwendung organischer Additive (Dutton, 1993; Landre, 1993) durchgeführt. In den so aufgebauten Plasmiden konnte jedoch die einzuführende Mutation zunächst nicht nachgewiesen werden. Da ausschließlich das primär erhaltene Amplifikat reamplifiziert werden kann, ist anzunehmen, daß durch die 3' → 5' Nukleaseaktivität der Vent Polymerase die endständige Mutation im Strukturgen eliminiert worden ist. Um das auszuschließen wurde daher die zweite Amplifikation mit Hilfe der 3' → 5' nukleasedefizienten Taq Polymerase bzw. Vent(exo<sup>-</sup>) Polymerase durchgeführt. Dieser Ansatz erwies sich als sehr erfolgreich. Von allen sequenzierten Plasmiden wiesen sämtliche die gewünschte Mutation und nur wenige unerlaubte Zusatzmutationen außerhalb der Primerregionen auf. Ein weiterer Vorteil, der sich besonders bei der Herstellung zahlreicher Mutationen bemerkbar macht, besteht darin, daß pro Mutation nur ein Primer benötigt wird. Insgesamt konnte mit Hilfe dieser Mutagenesetechnik die Klonierungsdauer auf durchschnittlich 2 bis 3 Tage reduziert werden.

Nach Isolation und Sequenzierung der erhaltenen Plasmide wurden die entsprechenden Strukturgene in die Expressionskassette des pAX5a Vektors umkloniert (Hoffmann, 1992; Faß, 1994). Alle aufgebauten Tendamistat Mutanten konnten mit Hilfe der darin enthaltenen Expressionskassette erfolgreich in *Streptomyces lividans* exprimiert werden. Dabei wiesen die unterschiedlichen Prolinmutanten (P7AP9A, P50A sowie P7AP9AP50A) kaum signifikante

Unterschiede hinsichtlich der Expressionshöhe auf. Lediglich bei den temperatursensitiven Mutanten L14A und N25A konnten deutliche Expressionsunterschiede zu den übrigen Varianten beobachtet werden. Inwiefern diese Reduktion mit der Translokationseffizienz (Faß, 1994) in Verbindung steht, wurde nicht weiter nachgegangen. Daß jedoch Faktoren wie die thermodynamische Stabilität eines Proteins die Expressionsausbeute beeinflussen können, zeigen Arbeiten von Kowalski über die heterologe Expression von Disulfidmutanten des BPTI in *S. cerevisiae* (Kowalski, 1997). Die in dieser Arbeit beobachteten Sekretionsausbeuten wiesen zwar keine Korrelation zu den *in vitro* Faltungsraten des Inhibitors wohl aber zu dessen thermodynamischer Stabilität ( $T_m$ ) auf. Da sie Sekretion in *S. cerevisiae* über das endoplasmatische Reticulum (ER) vermittelt wird und hier zahlreiche Katalysatoren sowie „Proofreading“ Mechanismen existieren, ist eine Übertragung der Ergebnisse auf *Streptomyces* wenig sinnvoll. Wichtig für die erfolgreiche Überexpression von Tendamistat war jedoch die Wahl des richtigen Kultivierungsmediums. Vollmedien führen zwar zu höheren Expressionsausbeuten des Zielproteins, haben jedoch den Nachteil, daß bestimmte Verunreinigungen, wie beispielsweise das 1.2kDa große  $\beta$ -Casein Fragment (Wojczewski, 1999), häufig nicht sauber vom Zielprotein abgetrennt werden können. Einen vernünftigen Kompromiss stellt daher der Einsatz von Produktionsmedium zur Expression in *Streptomyces lividans* dar. Gegenüber der Expression in Minimalmedium konnte damit eine deutliche Ausbeutesteigerung von 75mg/l auf 390mg/l erhalten werden.

### 5.1.2. Aufreinigung und Analytik

Für die physikalische Charakterisierung von Proteinen müssen hohe Anforderungen an die Reinheit des Proteins gestellt werden. Daher kommt der Aufreinigung von Proteinen eine entscheidende Bedeutung zu. In dem verwendeten Produktionssystem werden die Proteine ins Kulturmedium abgegeben und liegen dort gelöst und vollständig nativ vor. Einer der ersten Aufreinigungsschritte für extrazelluläre Proteine besteht in ihrer Aufkonzentrierung durch Präzipitation (Pohl, 1990). Eine andere Strategie, die auch im Zusammenhang mit Tendamistat Anwendung fand, ist die Verwendung von HP-20 (Diaion) zur hydrophoben Adsorption und Fraktionierung löslicher Bestandteile in Kulturüberständen (Vértesy, 1984). Für die Aufreinigung von Tendamistat Derivaten aus Kulturüberständen von *Streptomyces* hat sich insbesondere die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat durchgesetzt (Scharf, 1992). Dem Ammoniumsulfat

kommt bei diesem Aufkonzentrierungsschritt eine weitere Bedeutung zu. Nicht wenige Proteine verlieren bei hohen Salzkonzentrationen oder niedrigen pH-Werten infolge Aggregation und Denaturierung ihre ursprüngliche Aktivität. Durch den Aussalzeffekt stabilisiert Ammoniumsulfat die native Struktur von Proteinen (Pohl, 1990), was besonders bei labilen Tendamistat Varianten von Vorteil ist. Um die nach der Fällung vorhandene Salzfracht zu beseitigen, wurde über Nacht gegen Phosphatpuffer dialysiert. Anschließend wurde das entsalzte Produkt über Ionenaustauscher weiter aufgereinigt. Mit dieser Aufreinigungsstrategie gelang es häufig, in einem Schritt die gewünschten Tendamistat Derivate bereits in einer hohen Reinheiten zu erhalten. Nach dem Ionenaustauscher wurden die Proteine zumeist über RP-HPLC (Vydac C18, 300Å, 15-20µm) aufgereinigt und so von der Salzfracht und den Puffersubstanzen (Pyridin/HCl) befreit. Dieser Prozess stieß jedoch bereits bei Scharf auf erhebliche Schwierigkeiten besonders bei den labileren und teilweise sogar bei der vergleichsweise stabilen Disulfidmutante C45AC73A. Daß es dabei zu solchen Schwierigkeiten kommen konnte, liegt wahrscheinlich an dem besonderen Interaktionsprinzip bei der RP-HPLC. Um die Wechselwirkungen mit der hydrophoben Oberfläche der stationären Phase zu erhöhen, werden Additive wie Trifluoressigsäure (pH 2.0) in den Elutionspuffer zugesetzt. Diese binden an geladene Oberflächengruppen des Proteins und sorgen damit für eine effiziente Adsorption an die stationäre Phase. Eine Bindung von Proteinen an die stationäre Phase findet aber auch nach partieller Desolvatation des Proteins im Bereich hydrophober Reste statt (Scharf, 1992). Die Bindung ist damit ein entropisch begünstigter Vorgang, bei der das Protein denaturieren bzw. höhermolekulare Aggregate ausbilden kann. Labile Mutanten können also nach diesem Modell an der Oberfläche denaturieren und werden dadurch uneinheitlich vom Lösungsmittel eluiert. Als mögliche Alternative zur RP-HPLC bei labilen Mutanten wurde daher von Scharf die besonders schonende Gelfiltration (Sephadex G50-50) eingesetzt. Dieser Schritt setzt jedoch eine verlustreiche Aufkonzentrierung der Proteinlösung nach der Ionenaustauscher Chromatographie voraus. Die Gelfiltration verbindet unterschiedliche Vor- und Nachteile. Zu den Nachteilen gehören neben der reduzierten Flußgeschwindigkeit, ein im Vergleich zum Säulenvolumen niedriges Probenvolumen (unter 2% des Säulenvolumens). Vorteilhaft hingegen ist insbesondere die Möglichkeit, bei der Gelfiltration unter nativen Bedingungen arbeiten zu können. Um eine verlustarme Aufreinigung vor allem der labilen Tendamistat Mutanten zu ermöglichen, wurde daher in dieser Arbeit eine „orthogonale“ Aufreinigungsstrategie entwickelt. Bei dieser Strategie diente die Gelfiltration als ein primärer Aufreinigungs- und Umpufferungsschritt nach der

Ammoniumsulfatfällung. Dadurch gelang es bereits sehr früh, kleinere Proteine von der restlichen Proteinfracht im Kulturüberstand abzutrennen. Diese Trennmethode war dabei so effizient, daß die Vorfraktionierung über Ammoniumsulfat nicht mehr erforderlich war um Tendamistat effektiv von größeren Proteinen abzutrennen. Um auch bei höheren Flußraten die Aufreinigung durchführen zu können, wurde nach einer Alternative zu dem von Scharf eingesetzten Sephadex G50/50 Material gesucht. Testläufe mit Copolymeren auf Methacrylat-Basis (TosoHaas, BioRad) konnten bei Tendamistat nur mit mäßigem Erfolg durchgeführt werden. Aus Kostengründen fiel die Entscheidung schließlich auf Sephacryl S-100HR (Pharmacia). Die nach der Gelfiltration erhaltenen Fraktionen konnten anschließend direkt auf den Anionenaustauscher aufgetragen und aufgereinigt werden. Auch der bisher eingesetzte Laufpuffer wurde weiter optimiert. Anstatt mit 50mM Pyridin/HCl bei pH6.0 zu arbeiten wurde 20mM Bis-Tris/HCl Puffer (pH6.0) eingesetzt. Auf den Zusatz von Betain zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen und zur Verbesserung der Trennleistung wurde ebenfalls verzichtet. Auffallend war bei der Durchführung der Aufreinigung, daß sämtliche Tendamistat Mutanten einheitlich von der Säule eluierten. Am Ende der Aufreinigung wurden die positiven Fraktionen vereint und durch Ultrafiltration entsalzt bzw. aufkonzentriert. Die durchschnittlichen Ausbeuten an Reinprotein lagen nach dieser Aufreinigungsstrategie um 60%. Die Aktivität der erhaltenen Tendamistat Derivate konnte in allen Fällen durch Aktivitätstest demonstriert und als  $\alpha$ -Amylase/Inhibitor Komplex nachgewiesen werden. Als zusätzliche Analytik wurde die Reinheit der erhaltenen Proteine über die Kapillarelektrophorese (CE) sowie über ESI-MS bzw. MALDI-MS bestimmt. Besonders gute Trennergebnisse konnten für Tendamistat mit dem Tricin Puffersystem in der CE erhalten werden. Ohne Zusatz eines Elektrolyten erwies sich hierbei 10mM bzw. 0.1M Tricin/HCl (pH8.0) als der ideale Laufpuffer. Nach Auswertung der Chromatogramme erhält man für sämtliche Tendamistat Derivate einen durchschnittlichen Reinheitsgrad von über 93%. Selbst die doppelt über RP-HPLC aufgereinigte Tendamistat Referenzsubstanz weist unter den neuen Laufbedingungen „nur“ einen Reinheitsgrad von 92% auf. Für alle aufgereinigten Proteinderivate entsprachen die berechneten Massen den über ESI-MS bzw. MALDI-MS erhaltenen Molekulargewichten.

## 5.2. Methanol induzierter Entfaltung des Tendamistats

Die Struktur des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors Tendamistat ist gegenüber äußeren Einflußgrößen recht stabil. Diese Stabilität beruht im wesentlichen auf der kooperativen Natur stabilisierender Wechselwirkungen. In zahlreichen Beispielen konnte gezeigt werden, daß sich durch Zusatz bestimmter organischer Additive ein neuartiger Zustand induzieren läßt, der sich signifikant von dem Nativzustand (N) also auch von dem denaturierten Zustand (D) des Proteins unterscheidet (Lehrman, 1990; Ebert, 1993; Shiraki, 1995). Übergänge dieser Art lassen sich sehr einfach durch die charakteristische Veränderung der Elliptizität bei 208nm bzw. 222nm mitverfolgen. Am häufigsten konnten solche Zustände durch Zusatz von Trifluorethanol (TFE) induziert werden. Organische Zusätze wie TFE stabilisieren Wasserstoffbrücken und führen durch die hydrophobe  $\text{CF}_3$ - Gruppe zu einer Veränderung der Solvationseigenschaften des Wassers. Unmittelbar werden auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten beeinflusst. Methanol (MeOH) besitzt ähnliche, wenn auch schwächer ausgeprägte Eigenschaften als TFE (Ebert, 1993). Da die Stabilisierung von  $\beta$ -Strukturen mit der Wechselwirkung hydrophober Seitenketten verbunden ist, gelingt es häufig, durch solche Zusätze den  $\alpha$ -helikalen Anteil im Verhältnis zum  $\beta$ -Faltblatt Anteil zu erhöhen (Shiraki, 1995). In unterschiedlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß es erst unter dem Einfluß solcher Additive möglich ist, Übereinstimmungen zwischen dem gemessenen und rechnerisch abgeleiteten  $\alpha$ -Helix Anteil von Proteinen zu erhalten (Shiraki, 1995; Lehrman, 1990). Untersuchungen über die Struktur TFE-induzierter Zustände tragen jedoch auch zum Verständnis der Faltungsinitiation bei. Durch Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen versucht man stationär Bedingungen zu simulieren, wie sie für Proteine in der frühen Faltungsphase existieren, wo die Seitenketten im wesentlichen vom Lösungsmittel solvatisiert vorliegen (Buck, 1993).

Auch beim Tendamistat Wildtyp läßt sich durch TFE ein kooperativer Übergang induzieren, der im CD Spektrum mit dem Auftreten einer, für  $\alpha$ -helikale Proteine charakteristischen Doppelbande verbunden ist (Schönbrunner, 1996). Anhand dieser Bande läßt sich rechnerisch nach der Gleichung von Chen (Chen, 1972) ein  $\alpha$ -Helix Anteil von 23% ableiten. Die positive Absorptionsbande um 230nm ist im TFE induzierten Zustand des Tendamistats nicht mehr vorhanden. Diese Absorption tritt auch in dem vollständig reduzierten und carboxymethylierten

Tendamistat nicht mehr auf (Kallasch, 1992). Interessanterweise zeigt die von Blanco untersuchte und vom Tendamistat abgeleitete Peptidsequenz Tyr<sup>15</sup>-Gln<sup>16</sup>-Ser<sup>17</sup>-Trp<sup>18</sup>-Arg<sup>19</sup>-Tyr<sup>20</sup>-Ser<sup>21</sup>-Gln<sup>22</sup>-Ala<sup>23</sup> ebenfalls eine positive Absorptionsschulter um 230nm (Blanco, 1992). Da in diesem Peptid Disulfide als mögliche Chromophore fehlen, resultiert die Absorption durch eine stabilisierte Umkehrschleifenstruktur (Turn), ähnlich dem Hairpin I im Tendamistat. Damit läßt sich die Absorptionsbande um 230nm als empfindliches Maß für die Integrität der Turnstruktur zwischen Tyr<sup>16</sup> und Ala<sup>23</sup> festlegen. Auf dieser Grundlage weist das Fehlen dieser Bande im TFE induzierten Zustand auf eine Veränderung hin, die im Turnbereich des Hairpins I stattgefunden haben könnte. Der TFE induzierte Zustand unterscheidet sich darüberhinaus signifikant vom vollständig entfalteten Protein. Beide Zustände verbindet ein stetiger, thermisch induzierbarer Übergang (Schönbrunner, 1996). Auch Methanolzusätze sind in der Lage, die Nativstruktur des Inhibitors kooperativ zu entfalten. Dieser Übergang konnte anhand der Fluoreszenzemission eindeutig nachgewiesen werden. Anders als bei der GdmCl induzierten Entfaltung, kommt es nach Zusatz von Methanol zunächst zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Gleichzeitig verschiebt sich das Emissionsmaximum in den längerwelligen Bereich des Spektrums. Beide Effekte sind vermutlich einer veränderten Lösungsmittelpolarität zuzuschreiben. Der kooperative Übergang ist durch die sprunghafte Abnahme der Fluoreszenz gekennzeichnet. Dieser Signalabfall ist an eine bathochrome Verschiebung der Emissionswellenlänge geknüpft. Im Gegensatz zu GdmCl verläuft der Methanol induzierte Übergang in einem verhältnismäßig engen Übergangsfenster. Nach Tanford hängt der Steigungswert bei einem kooperativen Übergang mit der unterschiedlichen Solvation der beteiligten Zustände zusammen (Tanford, 1970). Dies ist ein zusätzlicher Hinweis darauf, daß es sich beim Methanol induzierten Zustand nicht um den denaturierten Zustand des Proteins handelt. Letzterer würde sich in einem wesentlich breiteren Übergangsbereich abspielen. Interessanterweise weist das beim prolinfreien Tendamistat erhaltene CD Spektrum unter gleichen Bedingungen einen vollkommen anderen Verlauf auf. Die für eine  $\alpha$ -Helix charakteristische Doppelbande bei 208nm bzw. 222nm ist beim prolinfreien Tendamistat nicht detektierbar. Ebenfalls fehlt die Absorptionsbande um 230nm. Der entstandene Verlauf kommt vielmehr einer  $\beta$ -Faltblattstruktur nahe, wie er sich in manchen Polypeptiden beobachten läßt (Greenfield, 1969). Erhöht man die Methanol Konzentration weiter, ändert sich das CD Spektrum nur unwesentlich, die  $\beta$ -Faltblattstruktur bleibt demnach also erhalten. Parallel dazu tritt im Fluoreszenzspektrum eine drastische Abnahme der Signalintensität auf. Dieser Signalabfall ist von dem Erscheinen einer Tyrosinschulter begleitet, wie sie auch nach kalter

Denaturierung mit chaotropen Zusätzen zu beobachten ist. Das Auftauchen dieser Schulter im Zusammenhang mit dem Fluoreszenzabfall, ist ein Hinweis auf die „Denaturierung“ des prolinfreien Tendamistats. Dabei ist diese Art von „Denaturierung“ ( $D_{MeOH}$ ) nicht zu vergleichen mit der durch GdmCl induzierten und die Proteinstruktur global betreffenden Denaturierung (D). Im nativen Protein wird ein Großteil der Anregungsenergie über die Tyrosine auf das Tryptophan übertragen. Daher besteht auch in diesem Fall die Möglichkeit, daß durch strukturelle Veränderungen im Bereich des Tryptophans (Hairpin I) die Übertragung der Anregungsenergie unterbrochen sein könnte. Hierfür würde im Wesentlichen das Erscheinen der Tyrosinschulter im Fluoreszenzspektrum sprechen. Interessanterweise unterscheiden sich die spektralen Profile in GdmCl bzw. Methanol signifikant voneinander. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß unter dem Einfluß von Methanol eine Umorganisation der ursprünglichen Faltblattstruktur, unter Beibehaltung der  $\beta$ -Faltblattanordnung stattgefunden hat. Beim Wildtyp kann die Tyrosinschulter selbst oberhalb von 90% Methanol nicht beobachtet werden. Das unterscheidet den „denaturierten“ ( $D_{MeOH}$ ) vom Methanol induzierten Zustand beim Wildtyp. Bei 40°C durchläuft der  $\alpha$ -Helix Anteil des Wildtyps einen Maximalwert von 18% (Chen, 1972). Der Versuch, durch Temperaturerhöhung eine „Denaturierung“ zu induzieren, schlug beim Wildtyp fehl. Selbst eine Erhöhung der Temperatur auf über 80°C konnte keine signifikante Veränderung des Bandenprofils bewirken. Ein solcher Übergang ließ sich jedoch tatsächlich durch Erniedrigung des pH Wertes erhalten ( $pH2 \rightarrow pH1.5$ ). Dieser Einfluß des pH-Wertes ist vermutlich mit der Destabilisierung des Proteins verbunden. Beim prolinfreien Tendamistat führen die drei Prolinmutationen zum gleichen Resultat, weshalb sich hier der TFE induzierte Zustand nicht stabilisieren läßt. Damit existieren für das Tendamistat in Gegenwart von Methanol insgesamt drei thermodynamisch zugängliche Zustände (N, I und  $D_{MeOH}$ ). Die Umwandlung von N nach I verläuft kooperativ und läßt sich sowohl durch Erhöhung der Methanol Konzentration als auch thermisch in Gegenwart von 90% Methanol induzieren. Das Vorhandensein eines isodichroischen Punktes um 203nm ist ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei der Umwandlung von N nach I um einen Zwei-Zustands Übergang handelt (Schönbrunner, 1996). Die Stabilität des partiell entfaltenen I reagiert empfindlich auf destabilisierende Mutationen oder die Erniedrigung des pH-Wertes. Dieser Einfluß geht soweit, daß im prolinfreien Tendamistat ein solcher Übergang nicht mehr detektiert werden kann. Vielmehr beobachtet man hier einen Übergang von N nach  $D_{MeOH}$ , der sich zwar über eine Zwei-Zustands Funktion annähern läßt, jedoch keinen isodichroischen Punkt um 203nm mehr liefert. Das Fehlen eines isodichroischen Punktes ist möglicherweise ein

Hinweis auf die Beteiligung eines dritten Zustands am Gleichgewicht zwischen N und  $D_{MeOH}$ . Daher schließt der Übergang im Falle des prolinfreien Tendamistats nicht die partielle Akkumulation von Intermediaten gemäß der Beziehung  $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons D_{MeOH}$  aus. Es spricht vieles dafür, daß es sich bei I um einen partiell entfalteten Zustand des Tendamistats handelt, bei dem die ursprüngliche Faltblattgeometrie erhalten bleibt (Schönbrunner, 1996). Das zeigt sich auch bei der Betrachtung des  $\alpha$ -helikalen Anteils von I (18%), der deutlich niedriger liegt als der  $\beta$ -Faltblattanteil unter nativen Bedingungen (69%). Ob I für das frühe Faltungsgeschehen des Tendamistats Relevanz besitzt, läßt sich an dieser Stelle nicht beantworten. Für manche Proteine scheint ein solcher Zusammenhang tatsächlich zu existieren. Beim Lysozym konnte beispielsweise in TFE ein Zustand stabilisiert werden, der strukturell große Ähnlichkeit zum kinetischen nachgewiesenen Faltungsintermediat aufweist (Buck, 1993). Dennoch konnte auch für das Lysozym gezeigt werden, daß der schnellere der beiden Faltungswege (*fast track folding*) ohne die Akkumulation von Intermediaten auskommt (Kiefhaber, 1995). Die Ungewißheit über die Bedeutung von I für die Faltung des Tendamistats rührt auch daher, daß sich  $D_{MeOH}$  signifikant von dem über GdmCl entfalteten Protein (D) unterscheidet. Der hohe  $\beta$ -Faltblattanteil in  $D_{MeOH}$  sorgt möglicherweise dafür, daß bei der Faltung der Proteinkette bestimmte Wechselwirkungen bereits vorhanden sind, die dadurch die Bildung der nativen Faltblattstruktur begünstigen könnten.

### 5.3. Theoretische Betrachtungen

#### 5.3.1. Topologie

Tendamistat gehört zu den kleinsten  $\beta$ -barrel Proteinen des Typus +1+3-1-1+3, die bisher charakterisiert werden konnten. 7 kurze Umkehrschleifen (I-VII) sowie 6  $\beta$ -Stränge (I-VI) bestimmen die Sekundärstruktur des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors. Zwei Hairpinstrukturen, die mit I und II bezeichnet werden, existieren im Protein. Relativ gut konnte bisher der Hairpin I von Blanco als synthetisch gewonnenes Fragment (V12-N26) in Lösung untersucht werden (Blanco, 1992). Innerhalb dieses Haipins befindet sich auch die unter homologen  $\alpha$ -Amylase Inhibitoren stark konservierte Sequenz Peptidsequenz Trp<sup>18</sup>-Arg<sup>19</sup>-Tyr<sup>20</sup>, die bereits von Matter als Hexapeptid zyklisiert und untersucht werden konnten (Matter, 1995). Der Einfluß der beiden Disulfidbrücken



auf die Stabilität (Renner, 1992; Vogl, 1995) und die Faltung (Schönbrunner, 1996; Schönbrunner, 1997a und 1997b) des Tendamistats standen bisher im Vordergrund der Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fragestellungen auf ganz unterschiedliche Aspekte der Struktur ausgeweitet und untersucht. Dabei wurde vor allem von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, durch Mutationen gezielt Wechselwirkungen im Protein zu verändern, um anschließend die Bedeutung dieser „molekularen Störung“ genauer untersuchen zu können.

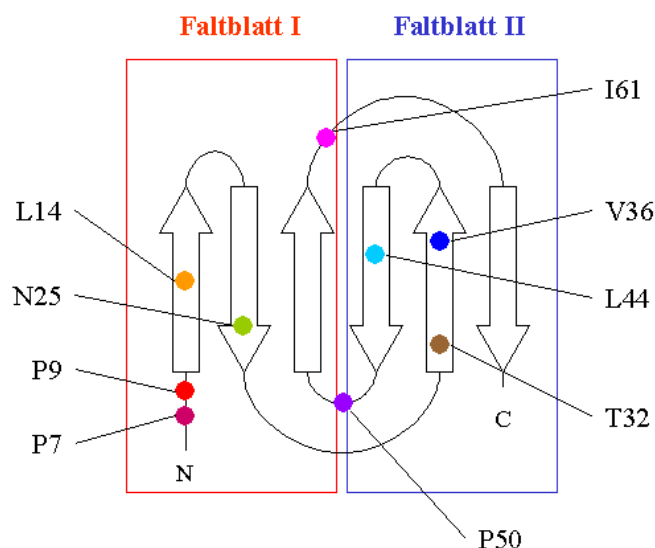


Abbildung 5-1 Topologische Lage der Mutationen im Tendamistat.

### 5.3.2. Leu → Ala14

Leucin 14 befindet sich auf Strang I im zentralen Bereich des Hairpin I. Dem ersten  $\beta$ -Strang kommt innerhalb der Tendamistat Struktur eine besondere Bedeutung zu. Durch den Aufbau eines  $\beta$ -barrels können die äußeren Stränge (I, IV, V und VI) beider Falblätter nicht über intramolekulare Wasserstoffbrücken miteinander assoziieren. Die CO und NH Gruppen des Peptidrückgrats liegen daher solvatisiert vor. Solche Wechselwirkungen tragen daher nicht zu einer Stabilisierung der  $\beta$ -barrel Struktur bei, da sie in beiden thermodynamisch stabilen Zuständen vorhanden sind. Dieser Effekt wird teilweise durch intensive Kontakte zwischen den Seitenketten der betroffenen Aminosäuren kompensiert. Bei Leucin 14 sind es Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Alanin 67 und vor allem zu dem unter homologen

Proteinen gut konservierten Leucin 70. Beide zuletzt genannten Aminosäuren befinden sich auf dem um Strang III herumgelagerten Strang VI. Daneben existieren hydrophobe Wechselwirkungen zu der Methylgruppe von Alanin 23, das sich gegenüberliegend auf dem Strang II befindet, sowie zu den Methylengruppen des Glutamin 16. Eine Konservierung von Leucin 14 innerhalb homologer Proteine liegt nicht vor. Bei einem Austausch von Leucin gegen Alanin gehen insgesamt drei  $-CH_2-$  Äquivalente verloren. Dadurch bleibt eine Oberflächenkavität von insgesamt  $74.5 \text{ \AA}^3$  auf dem Protein zurück. Solche Kavitäten führen durch den Wegfall wichtiger van der Waals Wechselwirkungen (Eriksson, 1992) zu einer Destabilisierung des Proteins um durchschnittlich  $13.6 \text{ kJ/mol}$ . Dieser Betrag gilt überwiegend für Aminosäuren im Inneren von Proteinen (Pace, 1995). Substitutionen auf der Oberfläche führen zu entsprechend niedrigeren Destabilisierungsbeträgen von  $9.6 \text{ kJ/mol}$  (Staphylokokken Nuklease).

### 5.3.3. Asn → Ala25

Asparagin 25 befindet sich auf dem zweiten  $\beta$ -Strang des Hairpins I. Seine Seitenkette ist in das Innere des Proteins gewandt. Dort wird es effektiv vom Lösungsmittel durch Prolin 50 abgeschirmt. Von der Innenseite des Tendamistats aus gesehen, gibt es van der Waals Wechselwirkungen zu den hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Valin 12 und vor allem Valin 31. Von der Seite betrachtet, befindet sich die Asparagin Seitenkette regelrecht eingelagert zwischen Valin 31 und Prolin 50. Die polare Amidgruppe bildet insgesamt vier Wasserstoffbrücken, zwei als Donor und zwei als Akzeptor, zu dem Proteinrückgrat aus. Die kürzeste davon beträgt nur  $2.65 \text{ \AA}$  und liegt zwischen dem Stickstoffatom der Seitenkette und der CO Gruppe von Valin 48. Vom gleichen Zentrum führt eine zweite Wasserstoffbrücke mit einer Länge von  $2.8 \text{ \AA}$  zu der CO Gruppe von Glutaminsäure 29. Die CO Gruppe der Asparagin Seitenkette bildet ebenfalls zwei Wasserstoffbrücken aus. Eine  $2.91 \text{ \AA}$  bzw.  $3.15 \text{ \AA}$  lange Wasserstoffbrücke führt in diesem Fall zu der NH Gruppe von Glycin 26 bzw. Cystein 27. Durch diese Wechselwirkungen stabilisiert Asparagin 25 eine der beiden Umkehrschleife, die den Übergang zwischen den Faltblättern I und II formieren. Wegen der speziellen Position, die Asparagin 25 innerhalb der Struktur und generell auch in anderen  $\beta$ -barrel Proteinen einnimmt, spricht man allgemein von einer *tyrosin* bzw. *asparagin corner* (Hemmingsen, 1994). Die strukturelle Bedeutung wird auch dadurch bestätigt, daß in allen homologen Proteinen, Asparagin an Position 25 hochkonserviert vorliegt. Wegen der polaren Amidfunktion ist die Seitenkette von

Alanin hydrophober als die Seitenkette des ursprünglich vorhandenen Asparagins. Daher würde durch einen Austausch im Inneren des Proteins ein Stabilitätsanstieg zu erwarten sein. Gleichzeitig hinterläßt die Asn  $\rightarrow$  Ala Substitution eine Kavität von  $37.4\text{\AA}^3$ , was sich bei abgeschirmten Seitenketten wiederum negativ auf die Stabilität auswirken kann (Pace, 1995). Die in der Literatur beobachteten  $\Delta G_{\text{eq}}$  Werte zeigen jedoch, daß solche Substitutionen in der Regel zu einer Destabilisierung des Proteins führen. Dieser Effekt steht im engen Zusammenhang mit dem Verlust von Wasserstoffbrücken im Protein. Durchschnittlich liegen solche  $\Delta G_{\text{eq}}$  Beiträge pro Wasserstoffbrücke bei  $4.6\text{kJ/mol}$  (Pace, 1995). Bei der SNase (Staphylokokken Nuklease), die ebenfalls ein vom Lösungsmittel abgeschirmtes Asparagin an Position 100 enthält, sind es immerhin  $9.6\text{kJ/mol}$  pro Wasserstoffbrücke, die durch die Substitution verloren gehen. Dabei sollte jedoch beachtet werden, daß die hinterlassene Kavität ausreicht, um bis zu drei Wassermoleküle aufnehmen zu können, die wiederum nicht abgesättigte Wasserstoffbrücken in der Nativstruktur kompensieren können. Daher handelt es sich bei den beobachteten Destabilisierungsbeiträgen um effektive Werte, die nicht unbedingt der „realen“ Zahl verlorengangener Wasserstoffbrücken entsprechen müssen.

#### 5.3.4. Thr $\rightarrow$ Ala<sub>32</sub>

Threonin 32 befindet sich am Anfang des dritten Stranges in einer lösungsmittelzugänglichen Position. Der dritte Strang enthält unter homologen Proteinen zahlreiche gut konservierte Aminosäuren. Threonin 32 gehört allerdings nicht dazu. Dennoch ist auffallend, daß als Alternative nur noch Serin, das ebenfalls eine OH Gruppe in der Seitenkette enthält, an Position 32 anzutreffen ist. Zu den konservierten Aminosäuren auf Strang III gehören vor allem hydrophobe Reste, die zusammen mit Aminosäuren von Strang I und II den hydrophoben Kernbereich des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors konstituieren (*hydrophobic core*). Etwa  $4\text{\AA}$  von Threonin 32 entfernt liegt auf Strang VI Cystein 73, das wegen der Disulfidbrücke mit Cystein 45 Strang III kreuzen muß. Außer zu Cystein 73 existieren hydrophobe Wechselwirkungen noch zu der Seitenkette von Valin 33. Da sich Threonin 32 an der Oberfläche des Proteins befindet, wird durch die Substitution keine entsprechende Kavität im Packungsverband hinterlassen ( $29.9\text{\AA}^3$ ). Vergleicht man die  $\beta$ -Faltblatt Stabilisierungsbeiträge beider Aminosäuren miteinander (Minor, 1994), erwartet man durch die Substitution eine Destabilisierung des Proteins von rund  $4.6\text{kJ/mol}$ . Threonin gehört damit neben Tyrosin zu den stärksten  $\beta$ -Faltblatt bzw.  $\beta$ -Hairpin

stabilisierenden Aminosäuren. Dies wird auch durch die relative Häufigkeit dieser Aminosäure innerhalb solcher Strukturen belegt (Gunasekaran, 1997).

### 5.3.5. Val → Ala36 und Val → Ile36

Valin 36 befindet sich am C-terminalen Ende des dritten Stranges, auf dem auch Threonin 32 liegt. Die hydrophobe Seitenkette von Valin 36 ist nach außen, zum Lösungsmittel hin orientiert. Dennoch sorgt ein Schutzgürtel von etwa 6 Aminosäuren für eine wirksame Abschirmung dieser Aminosäure. Verantwortlich dafür sind hydrophobe Wechselwirkungen der Seitenkette zu den Methylengruppen der zumeist amphiphatisch aufgebauten Aminosäuren um das Valin. Wie Berechnungen zeigen konnten, ist ein solcher Schutzgürtel in der Lage, die Wasserzugänglichkeit einer Valin Seitenkette im Plastocyanin auf 7% zu reduzieren (Tisi, 1995). Hydrophobe Clusterstrukturen dieser Art auf Proteinoberflächen tragen auch die Bezeichnung *small exterior hydrophobic clusters* (SEHCs). Wenn solche SEHCs wesentlich zur Stabilisierung von  $\beta$ -barrel Proteinen beitragen, sollte ihre Konservierung innerhalb homologer Proteine zu beobachten sein. Bei der Plastocyanin Familie, die von L. Tisi und P. Evans (Tisi, 1995) untersucht wurde, scheint dies beim exponierten Valin 40 tatsächlich der Fall zu sein. Beim Tendamistat liegt eine solche Konservierung an Position 36 jedoch nicht vor. Von allen homologen Proteinen besitzt einzig das Tendamistat an Position 36 eine hydrophobe Aminosäure. Den Schutzgürtel um das Valin konstituieren insgesamt 6 Aminosäuren. Van der Waals Kontakte existieren zwischen Valin 36 und Tyrosin 69. Andere wichtige Interaktionspartner sind die basischen Aminosäuren Arginin 68 und Lysin 34 sowie die sauren Aminosäuren Asparaginsäure 40 und Glutaminsäure 42. Etwas weiter entfernt befindet sich Alanin 71, daß von Strang VI ausgehend Valin 36 offensichtlich vom Lösungsmittel abschirmt. Ein Austausch von Valin gegen Alanin hinterläßt eine Kavität von  $49 \text{ \AA}^3$ , die damit auch die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Schutzgürtels wirksam reduziert. Legt man die Daten von Minor und Kim (Minor, 1994) für eine Vorraussage des Destabilisierungsbeitrages zugrunde, sollte eine solche Substitution unabhängig von dem SEHC zu einer Destabilisierung von  $3.42 \text{ kJ/mol}$  führen. Dieser Wert ist jedoch kontextabhängig zu beurteilen, da in dem von Minor und Kim verwendeten Modellprotein (Immunoglobulin Bindungsdomäne B1) andere Wechselwirkungen auf der Oberfläche existieren als im Tendamistat. Gegenüber Alanin führt ein Austausch durch Isoleucin zu einer Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche von  $25.8 \text{ \AA}^3$  und damit zu einer Intensivierung der van der Waals

Wechselwirkungen mit den benachbarten Seitenketten. Nach den Daten von Minor und Kim (Minor, 1994) ergibt sich daher ein Destabilisierungsbeitrag von 0.75kJ/mol für die Valin → Isoleucin Substitution. Interessant an dieser Stelle ist ein Vergleich zwischen Tendamistat und der SNase. Bei der SNase konnten insgesamt 9 innere Isoleucin Reste gegen Valin ausgetauscht werden (Matthews, 1993). Die dabei erhaltenen Destabilisierungsbeiträge liegen zwischen 2.1kJ/mol und 7.5kJ/mol und damit deutlich höher als nach den Daten von Minor und Kim berechnet.

### 5.3.6. Leu → Ala44

Leucin 44 befindet sich im mittleren Bereich des vierten  $\beta$ -Stranges in Nachbarschaft zu Cystein 45. Der vierte Strang belegt den äußeren, zum Lösungsmittel hin orientierten Bereich des zweiten  $\beta$ -Faltblatts. Vergleicht man Position 44 unter homologen Proteinen, so tritt, außer beim Tendamistat, stets die Aminosäure Prolin an dieser Stelle in Erscheinung. Die hydrophobe Seitenkette des Leucins entwickelt kaum bedeutende Wechselwirkungen zu benachbarten Aminosäuren. Einziger Interaktionspartner des Leucins ist das ebenfalls zum Lösungsmittel hin zugewandte Tyrosin 46 (4.7 Å), das sich auf dem gleichen Strang befindet. Bei einem Austausch von Leucin gegen Alanin bleibt ein Volumen von 74.5 Å<sup>3</sup> auf der Proteinoberfläche unausgefüllt zurück. In der Regel würden solche Kavitäten zu einem Wegfall wichtiger van der Waals Wechselwirkungen führen (Eriksson, 1992) und dadurch das Protein destabilisieren. Da in diesem Fall kaum Wechselwirkungen dieser Art vorhanden sind, dürfte ein Austausch von Leucin gegen Alanin das Protein um maximal 2.12kJ/mol destabilisieren (Minor, 1994). Bei der Bestimmung dieses Wertes wurde jedoch vorausgesetzt, daß sich die auszutauschende Aminosäure wie in der IG Bindungsdomäne B1 (Minor, 1994) in zentraler Position innerhalb eines  $\beta$ -Faltblattes befindet. Da dies bei Tendamistat nicht der Fall ist, kann man von einem wesentlich kleineren Destabilisierungsbeitrag ausgehen.

### 5.3.7. Ile → Met61

Isoleucin 61 befindet sich innerhalb einer ungeordneten Schleife am C-terminalen Ende von Strang V. Sequentiell benachbart zu Isoleucin 61 sind die beiden in allen homologen Proteinen hochkonservierten Aminosäuren Glycin 59 und Tyrosin 60, die auch an der Wechselwirkung des

Inhibitors mit der  $\alpha$ -Amylase beteiligt sind (Wiegand, 1995). Eine entsprechende Konservierung des Isoleucins läßt sich jedoch innerhalb der homologen Proteine nicht beobachten. Lediglich Paim I weist ein hydrophobes Leucin an Position 61 auf, die ansonsten in der Mehrzahl homologer Inhibitoren von der Aminosäure Glycin eingenommen wird. Im Sequenzabschnitt 58 bis 65 befinden sich im Tendamistat 4 Glycine, die dem entsprechenden Bereich eine besondere Flexibilität verleihen. In räumlicher Nähe zu Isoleucin 61 liegen weiterhin die beiden hydrophoben Aminosäuren Tryptophan 18 und Tyrosin 60. Wie sich eine Substitution von Isoleucin 61 auf die Stabilität des Tendamistats auswirkt, läßt sich in diesem Fall nur schwer voraussagen. Die durch den Austausch Isoleucin  $\rightarrow$  Methionin veränderte Gesamtoberfläche bleibt nahezu konstant. Betrachtet man die Transferenergien ( $\Delta G_{tr}$ ) der beiden Seitenketten in einem Cyclohexan/Wasser Gemisch, zeigt Methionin eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit als Isoleucin (Pace, 1995; Radzika, 1988). Daher sollte ein solcher Austausch zu einer Stabilisierung der erhaltenen I61M Mutante gegenüber dem Wildtyp führen. Zusätzlich dazu könnte von diesem Austausch auch die Bindung des Inhibitors an die  $\alpha$ -Amylase beeinflusst werden, da das räumliche Umfeld von Isoleucin 61 im Komplex zahlreiche Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht (Wiegand, 1995).

### 5.3.8. Pro $\rightarrow$ Ala7,Ala9

Die beiden Proline 7 und 9 befinden sich im N-terminalen Bereich des Tendamistats. Nach den NMR Strukturdaten (Kline, 1986a und 1986b) liegt zwischen Prolin 9 und Valin 12 ein Typ I Turn vor, der über zahlreiche Kontakte zu weiteren Aminosäuren stabilisiert wird. Diese Wechselwirkungen schließen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von Prolin 7 mit ein. Darunter fällt beispielsweise eine Wasserstoffbrücke zwischen der OH Funktion von Tyrosin 69 und der CO Gruppe von Serin 5 (2.68 Å). Die CO Gruppe von Prolin 7 ist durch eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette des Arginin 72 verbunden (2.77 Å). Beide Aminosäuren, Tyrosin 69 und Arginin 72, befinden sich auf dem sechsten Außenstrang im zweiten Faltblatt. Prolin 9 ist im Vergleich zu Prolin 7 an einer abgeschirmteneren Position lokalisiert. Verantwortlich hierfür ist die Typ I Turnstruktur zwischen Prolin 9 und Valin 12, die über eine Wasserstoffbrücke zwischen der CO Gruppe von Prolin 9 und der NH Funktion von Valin 12 stabilisiert wird (3.02 Å). Von der anderen Seite wird Prolin 9 durch die Guanidin Gruppe des Arginin 72 abgeschirmt. Zwischen Prolin 7 und Prolin 9 befindet sich Alanin 8. Alanin 8 gehört

zu einer der insgesamt 5 Aminosäuren, die einen losen, stark hydrophoben Cluster innerhalb der Tendamistat Struktur ausbilden. An diesem Cluster sind neben Valin 12 auch die im dritten Strang angeordneten Aminosäuren Valin 31 und Valin 33 sowie das sich auf dem sechsten Strang befindliche Leucin 70 beteiligt. Interessanterweise sind nahezu alle Aminosäuren, die an der Konstitution dieses Clusters beteiligt sind (A8, V12, V31, V33 und L70) innerhalb der homologen Proteine konserviert. Dazu gehören auch die Proline 7 und 9, die wahrscheinlich auf die Flexibilität von Alanin 8 einen starken Einfluß ausüben und damit diesen Cluster von einer Seite arretieren helfen. Der Austausch beider Proline gegen Alanin erhöht die Flexibilität des N-Terminus sowohl im entfalteten als auch im nativen Zustand des Proteins. Dies führt zu einer globalen Destabilisierung des Tendamistats. Zusätzlich dazu wird die hydrophobe Oberfläche des Pyrrolidin Ringsystems durch eine Methylgruppe ersetzt und dadurch verkleinert. Diese Effekte könnten jedoch wieder kompensiert werden, da über die beiden Substituenten zwei potentielle H-Brücken Donatoren im Molekül neu entstehen.

### 5.3.9. Pro → Ala50

Prolin 50 befindet sich im Tendamistat innerhalb eines Typ II Turns zwischen den Aminosäuren Alanin 49 und Glutamin 52. Diesem Typ II Turn (Abbildung 5-2) kommt strukturell eine wichtige Funktion im Aufbau der beiden Faltblätter zu. Genau wie im Falle der Asn → Ala25 Mutation beschrieben, werden nämlich über diese Umkehrschleife die beiden Faltblätter I und II schanierartig miteinander verbunden. Diese Funktionalität liegt vermutlich auch dem Aufbau der bisher bekannten, strukturell jedoch unzureichend charakterisierten homologen Proteine zugrunde. Daher gehört die Umkehrschleife um den Sequenzabschnitt Pro<sup>50</sup>-Gly<sup>51</sup> zu den hochkonservierten Regionen innerhalb der peptidischen Inhibitorenfamilie (vgl. Abschnitt 2.2.2). Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren existieren, bis auf Asparagin 25, das sich parallel oberhalb des Pyrrolidin Ringsystem im Inneren befindet und dem etwas weiter entfernten Threonin 30, ansonsten nicht. Alle Bereiche des Turns sind exponiert und dadurch vom Lösungsmittel erreichbar. Im Gegensatz zu Prolin 7 und 9 ist die CO Gruppe des Prolin 50 nicht über eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit dem Protein verbunden. Ein Austausch von Prolin 50 gegen Alanin hätte vor allem eine stark destabilisierende Wirkung auf die Umkehrschleife und damit auf die Stabilität der nativen Struktur zur Folge.

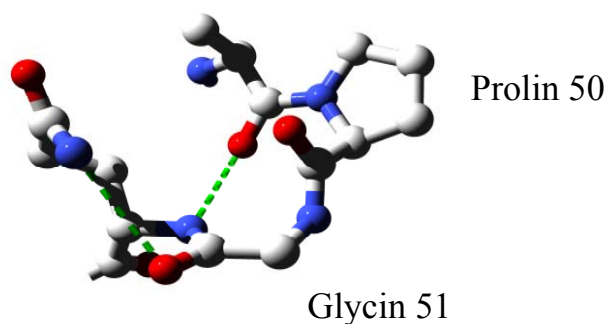


Abbildung 5-2 Aufbau des Typ II Turns zwischen Ala<sup>49</sup>-Gln<sup>52</sup> nach der Röntgenkristallstruktur von Pflugrath (Pflugrath, 1986). Die intramolekularen Wasserstoffbrücken sind in der Abbildung grün angedeutet.

Dieser Einfluß wird aber noch verstärkt, da durch den Wegfall des konformativ rigiden Pyrrolidin Ringsystems Flexibilität im entfalteten Zustand des Proteins aufgebaut wird. Beide Effekte addieren sich und wirken damit synergetisch destabilisierend auf  $\Delta G_{eq}$  ein. Der entropische Faktor sollte jedoch wegen der Doppelsubstitution bei der P7AP9A Mutante überwiegen, zumal sich Prolin 50 innerhalb einer durch Cys 45 und Cys 73 geschlossenen Schleifenstruktur im Protein befindet.

#### 5.4. Auswirkungen einzelner Mutationen auf die Stabilität des Tendamistats.

##### 5.4.1. Die Mutationen Leu → Ala14 und Asn → Ala25.

Der Austausch von Leu15 und Asn25 durch Alanin führt zu einer erheblichen Destabilisierung des Tendamistats. Dies läßt bereits anhand der CD- und Fluoreszenzspektren unter nativen Bedingungen zeigen. Am deutlichsten sind dabei die Abweichungen bei der L14A Mutante zu beobachten. Im fern-UV Bereich des CD-Spektrums kommt es bei 186nm zu einem Nulldurchgang, der sich beim Wildtyp sowie bei allen anderen Mutanten nicht wiederfindet. Ein Vergleich dieses Spektrums mit dem von Chen (Chen, 1972) extrapolierten *random coil* Spektrum zeigt eine gewisse Übereinstimmung im fern-UV Bereich. Jedoch liegen die beiden spektralen Profile um etwa 4nm gegeneinander verschoben vor. Da die Absorption im CD einen



empfindlichen Gradmesser für die Homogenität einer Sekundärstruktur darstellt, könnte eine solche Veränderung gegenüber dem Wildtyp auf eine graduelle Verzerrung des  $\beta$ -Hairpins hindeuten. Leider existieren von Blanco, der den Abschnitt zwischen Val<sup>12</sup> und Gly<sup>26</sup> in Lösung untersucht hat, keine zuverlässigen Daten über den fern-UV Bereich des  $\beta$ -Hairpins (Blanco, 1991). Dadurch entfällt die Möglichkeit Veränderungen innerhalb dieses Strukturelementes mit der L14A Mutante vergleichen zu können. Auch bei der N25A Mutante treten Veränderungen im fern-UV Bereich des CD Spektrums auf. Gegenüber dem Wildtyp kommt es hier zu einer Abnahme der molaren Elliptizität, die bei 190nm ein Maximum erreicht. Ein Nulldurchgang wie bei der L14A Mutante ist bei der N25A Mutante nicht zu beobachten. Auch bei den Fluoreszenzmessungen sind signifikante Unterschiede, vor allem bei der L14A Mutante, gegenüber dem Wildtyp zu erkennen. Das Fluoreszenzmaximum dieser Mutante ist unter nativen Bedingungen geringfügig in den längerwelligen Bereich verschoben. Außerdem kommt es unter denaturierenden Bedingungen zu einer Reduktion der Fluoreszenz auf lediglich 62.5% des ursprünglichen Wertes. Wie bereits dargelegt wurde, werden die Fluoreszenzeigenschaften des Tendamistats vom Hauptfluorophor Trp<sup>18</sup> bestimmt. Ein Großteil der Anregungsenergie bei 276nm wird von den Tyrosinen auf das Tryptophan übertragen. Daher ist unter nativen Bedingungen keine Tyrosinschulter bei 315nm zu erkennen. Kommt es infolge der Substitution zu einer Destabilisierung des  $\beta$ -Hairpins, würde sich das negativ auf die Tryptophanemission auswirken. Zwar läßt sich bei der L14A Mutante eine solche Tyrosinschulter unter nativen Bedingungen nicht beobachten, doch spricht der zu gering ausfallende Abfall der Fluoreszenz nach Denaturierung dafür, daß durch die Destabilisierung die Energieübertragungseigenschaften der Tyrosine auf das Tryptophan negativ beeinflußt werden. Unabhängig davon decken sich die Emissionsprofile beider Mutanten mit dem Wildtyp. Daher liegen die Strukturen der L14A und N25A Mutante gegenüber dem Wildtyp im Wesentlichen unverändert vor. Nicht zuletzt die Nativgeldaten über den  $\alpha$ -Amylase/Inhibitor Komplex können diesen Sachverhalt eindeutig belegen.

Aus den Gleichgewichtsmessungen geht klar hervor, daß beide Substitutionen signifikant die Stabilität des Tendamistats beeinflussen. Bei der L14A Mutante verschiebt sich der  $T_m$  Wert von 79.6°C (Wildtyp) auf 61.8°C. Die bei der Übergangstemperatur  $T_m$  erhaltene Enthalpie  $\Delta H_m$  liegt ebenfalls um 39kJ/mol unterhalb des Wildtyps. Diese Destabilisierung steht vermutlich im engen Zusammenhang mit van der Waals Wechselwirkungen zu den räumlich benachbarten Aminosäuren. Ausgehend von Leucin 14 befindet sich im  $\beta$ -Hairpin des Tendamistats Alanin 23

auf der gegenüberliegenden Seite. Diese Aminosäurekombination taucht relativ häufig in  $\beta$ -Hairpinstrukturen auf (Gunarsekaran, 1997). Die nach Substitution entstandene Kombination Alanin/Alanin ist zwar in der Statistik von Gunarsekaran (Gunarsekaran, 1997) ebenfalls vorhanden, doch im Vergleich zu Leucin/Alanin deutlich seltener vorzufinden. Nach den GdmCl induzierten Entfaltungsexperimenten führt die Leu  $\rightarrow$  Ala14 Substitution zu einem  $\Delta\Delta G_{eq}$  Einbruch von 18.9kJ/mol bei 25°C (CD). Dieser Betrag liegt deutlich höher als der durchschnittlich beobachtete Wert von 13.6kJ/mol (Pace, 1995). Interessanterweise führt die Leu  $\rightarrow$  Ala14 Mutation zu einer Destabilisierungserhöhung ( $\Delta\Delta G_{eq}$ ), die ansonsten nur bei hydrophoben Substitutionen anzutreffen ist. Dies unterstreicht den besonderen Beitrag von hydrophoben Wechselwirkungen zur Stabilisierung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen (Blanco, 1998; Sieber, 1996). Bei der N25A Mutante kommt es zu einer noch größeren Destabilisierung des Proteins, bei der sich die Übergangstemperatur von 79.6°C (Wiltyp) auf 54°C erniedrigt. Verantwortlich für diese Destabilisierung ist vor allem eine drastische Veränderung der Übergangsenthalpie  $\Delta H_m$ . Diese wird infolge der Substitution von 294.1kJ/mol auf 218.2kJ/mol erniedrigt. Entsprechendes spiegelt sich auch in der freien Stabilisierungsenthalpie  $\Delta G_{eq}$  wieder. Nach den Daten, die aus der GdmCl induzierten Entfaltung erhalten werden konnten, führt die Asn  $\rightarrow$  Ala25 Substitution zu einer Destabilisierung des Proteins um knapp 24kJ/mol bei 25°C (CD). Aus den Strukturdaten geht hervor, daß die Seitenkette von Asparagin 25 den Übergang von Strang II (Faltblatt I) zu Strang III (Faltblatt II) über vier Wasserstoffbrücken stabilisiert. Diese spezielle Struktur wird auch als *tyrosin* bzw. *asparagin corner* bezeichnet (Hemmingsen, 1994). Gehen durch die Substitution sämtliche Wasserstoffbrücken verloren (Asn  $\rightarrow$  Ala), entspricht das einer Destabilisierung des Proteins pro Wasserstoffbrücke von 6kJ/mol. Durchschnittlich liegen die Stabilisierungsbeiträge pro Wasserstoffbrücke um 4.6kJ/mol (Pace, 1995). In Modellsystemen wie Harnstoff oder  $\delta$ -Valerolacton konnten Energien von 6.3kJ/mol und mehr pro Wasserstoffbrücke erhalten werden (Alber, 1989). Andere Daten stammen aus der Untersuchung von Protein/Ligand Wechselwirkungen. Hier reichen die Energien von 2.1kJ/mol bis 7.5kJ/mol (Alber, 1989). Die durchgeführten Untersuchungen bestätigen damit die Annahme, daß der durch die Asn  $\rightarrow$  Ala25 Substitution bedingte Verlust von Wasserstoffbrücken im wesentlichen für die Destabilisierung des Proteins verantwortlich ist.

#### 5.4.2. Die Mutationen Val → Ala36 und Val → Ile36.

Bereits das CD-Spektrum der nativen V36A Mutante weist Unterschiede zum Wildtyp auf. Diese betreffen: a) den Bereich um 190nm bzw. 210nm und b) die positive Absorptionsbande um 230nm. Die Turn spezifische Absorptionsbande um 230nm (vgl. III) wird infolge der Mutation reduziert. Wie bei der L14A Mutante ist auch bei der V36A ein deutlicher Anstieg der molaren Elliptizität um 190nm zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu endet dieser Anstieg bis 185nm nicht als Nulldurchgang. Bei 218.6nm bzw. 205.7nm treten bei der V36A zwei schwache Absorptionsschultern auf. Eine solche Doppelschulter läßt sich unter sauren Bedingungen ebenfalls beim Wildtyp induzieren. Der stark mit sauren Aminosäuren besetzte Abschnitt 38-42 bildet zwei Salzbrücken zu den Aminosäuren Lys<sup>34</sup> und His<sup>64</sup> aus (Asp<sup>39</sup>/His<sup>64</sup>: 2.87Å und Glu<sup>42</sup>/Lys<sup>34</sup>: 2.83Å). Durch Protonierung der COO<sup>-</sup> Seitenketten bei niedrigen pH-Werten ließen sich die Salzbrücken entsprechend destabilisieren (pK<sub>a</sub><sup>Asp</sup>: 3.9-4.0 und pK<sub>a</sub><sup>Glu</sup>: 4.3-4.5). Strukturell gesehen könnte das zu spezifischen Veränderungen führen, die sich im CD-Spektrum des Wildtyps (pH3.3) als Doppelschulter bemerkbar machen würde. Dafür spricht auch die Lage der Doppelschulter im CD Spektrum. Diese taucht nämlich in einem Bereich auf, in dem für gewöhnlich Turn Strukturen charakteristische Absorptionen zeigen (Brahms, 1980). Auf dieser Grundlage ließe sich auch der Einfluß des Val → Ala36 Austauschs diskutieren. Danach hätte die aufgebaute Kavität strukturelle Auswirkungen auf den Abschnitt 38-42 und damit auf die Stabilität der beiden Salzbrücken Asp<sup>39</sup>/His<sup>64</sup> und Glu<sup>42</sup>/Lys<sup>34</sup>.

Nach den Entfaltungsdaten führt die Substitution zu einer Erniedrigung der Übergangstemperatur von 79.6°C (Wildtyp) auf 65.5°C. Ursache dieser Destabilisierung ist die Übergangsenthalpie, die von 294.1kJ/mol auf 264.4kJ/mol abnimmt. Unter isothermischen Bedingungen (GdmCl) beträgt die Destabilisierungsenergie  $\Delta\Delta G_{eq}$  der V36A Mutante gegenüber dem Wildtyp 11kJ/mol. Nach den Daten von Minor wäre jedoch eine Destabilisierungsenergie von 3.42kJ/mol zu erwarten gewesen (Minor, 1994). Ein Unterschied von knapp 7.6kJ/mol unterstreicht die Bedeutung hydrophober Oberflächencluster zur Stabilisierung von  $\beta$ -barrel Proteinen. Damit erreicht dieser Beitrag eine Größenordnungen, die ansonsten nur durch Austausch interner Reste mit hydrophoben Seitenketten erhalten werden kann.

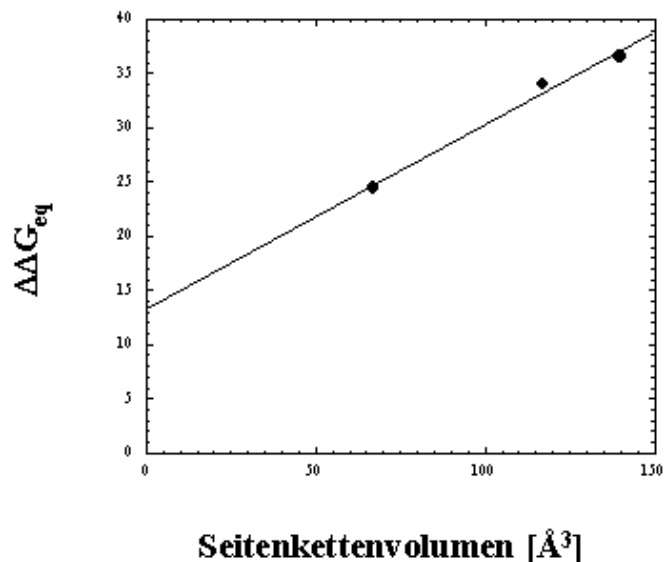


Abbildung 5-3 Veränderung der Stabilität des Tendamistats durch Substitutionen im *small exterior hydrophobic cluster* (SEHC). Die Seitenkettenvolumina entsprechen der Sequenz Gly-Xaa-Gly (Creighton, 1993). Die Regressionsgerade lautet:  $\Delta\Delta G_{eq} = 13.35 \text{ kJ/mol} + 0.17 \text{ kJ/mol}\text{\AA}^3 \times \text{Seitenkettenvolumen [}\text{\AA}^3\text{]}$ , Korrelationskoeffizient 0.994.

Physikalisch gesehen wird bei der V36I Mutante das Volumen der Seitenkette um  $25.8\text{\AA}^3$  erhöht (Pace, 1995). Vor allem Kontakte zu räumlich benachbarten Aminosäuren profitieren von dieser Vergrößerung. Durch den Austausch Val  $\rightarrow$  Ile36 nimmt die freie Stabilisierungsenergie von  $34.5 \text{ kJ/mol}$  auf  $36.6 \text{ kJ/mol}$  ( $\Delta\Delta G_{eq} = 2.1 \text{ kJ/mol}$ ) zu. Dieser Betrag liegt damit deutlich oberhalb des vorhergesagten Wertes von  $0.75 \text{ kJ/mol}$  (Minor, 1994). Die Übergangstemperatur wird interessanterweise von der Substitution nur unwesentlich verändert. Hingegen nimmt die Übergangsenthalpie von  $294.1 \text{ kJ/mol}$  auf  $274.9 \text{ kJ/mol}$  ab. Diese Abnahme könnte ein Hinweis darauf sein, daß mit einer Vergrößerung der Seitenkette an Position 36 auch destabilisierende Wechselwirkungen im Tendamistat aufgebaut werden. Indirekt könnte das jedoch auch auf strukturelle Veränderungen im Abschnitt 38-42 zurückzuführen sein. Berücksichtigt man die Veränderungen der zugänglichen Volumina Ala < Val < Ile (Creighton, 1993), läßt sich relativ zur Stabilisierungsenergie ein linearer Zusammenhang ableiten, der in Abbildung 5-3 dargestellt ist. Danach erhöht eine Vergrößerung des Seitenkettenvolumens im *small exterior hydrophobic cluster* (SEHC) die Stabilität des Tendamistats um  $170 \text{ J/mol}\text{\AA}^3$ . Diese Linearität beweist außerdem, daß der stabilisierende Einfluß der von solchen Oberflächenclustern ausgeht, im

wesentlichen auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen ist, wie sie ansonsten nur im hydrophoben Kernbereich des Proteins existieren.

### 5.4.3. Die Mutationen Leu → Ala44 und Ile → Met61.

Auch nach der Leu → Ala44 Substitution kommt es zu einer Veränderung des CD-Spektrums um 190nm bzw. um 230nm. Die eingebrachte Mutation führt zu einer geringfügigen Erhöhung der Übergangstemperatur von 79.6°C auf 79.8°C. Diese Stabilisierung resultiert aus einer etwas höheren Übergangsenthalpie  $\Delta H_m$  von 8.2kJ/mol. Bei der GdmCl induzierten Entfaltung konnte für die L44A Mutante eine freie Stabilisierungsenthalpie von -35.43kJ/mol berechnet werden. Dieser Betrag liegt 1.4kJ/mol oberhalb der Stabilität des Wildtypproteins. Im Vergleich zu Leucin übt Alanin einen destabilisierenden Einfluß auf die Stabilität von  $\beta$ -Hairpinstrukturen aus (Kim, 1993; Minor, 1994; Smith, 1995). Entgegen dieser Beobachtung kommt es beim Tendamistat infolge der Leu → Ala44 Substitution zu einer Stabilitätserhöhung im Proteins. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die günstigere Orientierung von Alanin am Rande des zweiten  $\beta$ -Faltblatts zurückzuführen. Die geringe Zahl hydrophober Wechselwirkungen begünstigt an Position 44 eine höhere Solvation. Alanin reduziert die von Wasser zugängliche hydrophobe Oberfläche und stabilisiert dadurch die native Struktur des Proteins.

Als einzige der untersuchten Mutanten verhält sich das CD Spektrum der I61M Mutante nahezu deckungsgleich mit dem Wildtypspektrum. Die wichtigste spektroskopische Veränderung betrifft jedoch das Fluoreszenzspektrum der I61M Mutante. Verglichen mit dem Wildtyp ist die Fluoreszenzemission unter nativen Bedingungen signifikant herabgesetzt. Für diesen Effekt ist vermutlich die durch Kontakt induzierte Übertragung von Elektronen auf das Methionin verantwortlich (Steiner, 1969). Methionin fungiert in diesem Fall gegenüber dem Tryptophan als Elektronenfänger (*scavenger*). Die Übergangstemperatur erhöht sich infolge des Austauschs von 79.6°C (Wildtyp) auf 82.3°C. Das entspricht einer Zunahme des  $T_m$  Wertes von 2.7°C. Der Enthalpiewert verändert sich im Vergleich zum Wildtyp nur unwesentlich. Bei der GdmCl induzierten Entfaltung konnte für die I61M Mutante eine freie Stabilisierungsenthalpie von -40.82kJ/mol bestimmt werden. Dieser Betrag liegt 6.8kJ/mol höher als beim Wildtyp. Für den stabilisierenden Einfluß der Ile → Met61 Mutation kommt eine Veränderung der Wasserzugänglichkeit nicht in Frage, da beide Aminosäuren über eine vergleichbare Gesamtoberfläche verfügen (Creighton, 1993). Große Unterschiede existieren hingegen für die

Transferenergien, die sich beispielsweise aus dem Verteilungskoeffizienten Cyclohexan/Wasser ableiten lassen (Pace, 1995; Radzika, 1988). Daher kann man den stabilisierenden Einfluß der Ile → Met61 Mutation auf eine verbesserte Löslichkeit der Methionin Seitenkette unter nativen Bedingungen zurückführen.

#### 5.4.4. Die Mutationen Pro → Ala7, Ala9 und Ala50.

Strukturell gesehen führen die Pro → Ala Mutationen zu keiner signifikanten Veränderung der Sekundärstruktur des Tendamistats. Bis auf die P7AP9A Mutante weisen beiden Prolin 50 Mutanten (P50A und P7AP9AP50A) eine abgeschwächte Elliptizität um 230nm auf. Interessanterweise konnten die Abnahmeverhältnisse auch bei der Untersuchung unter denaturierenden Bedingungen beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß selbst unter stark denaturierenden Bedingungen bestimmte Reststrukturen zwischen Tyr<sup>16</sup> und Ala<sup>23</sup> noch existieren. Erste Hinweise auf den Einfluß von Pro → Ala Mutationen auf die Stabilität des Tendamistats stammen aus Proteolyseexperimenten. Für alle Prolinmutanten konnten eindeutige Proteolysemuster in Gegenwart von Trypsin erhalten werden. Beim Wildtyp ließen sich hingegen solche Fragmentierungsmuster nicht nachweisen. Innerhalb der Prolin Mutanten herrschen dabei charakteristische, von der jeweiligen Substitution abhängige Unterschiede. Insbesondere die beiden Pro7/Pro9 Mutationen verursachen eine deutlich höhere Hydrolyseempfindlichkeit gegenüber Trypsin als die Prolin 50 Mutanten. Die durchgeführten Entfaltungsexperimente bestätigen diese Beobachtungen. Alle Mutationen führen zu einer Destabilisierung des Tendamistats. Bei der P50A Mutante kommt es infolge der Substitution zu einer Reduktion der Übergangstemperatur von 79.6°C auf 74.2°C. Bei dem prolinfreien Tendamistat beträgt die Übergangstemperatur nur noch 63.6°C, dazwischen befindet sich die P7AP9A Mutante mit 69.8°C. Trägt man die Zahl der vorhandenen Proline gegen die Übergangstemperaturen auf, ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Eine solch lineare Beziehung läßt sich bei der Übergangsenthalpie  $\Delta H_m$  nicht beobachten. Ursache hierfür ist der  $\Delta H_m$  Wert des prolinfreien Tendamistats, der mit 256.6kJ/mol deutlich niedriger ausfällt, als durch Addition der beiden Teilmutanten erhalten werden kann (278.8kJ/mol). Möglicherweise resultieren diese Unterschiede in zusätzlichen, beide Mutationen gleichzeitig betreffenden Wechselwirkungen, die sich isoliert in den beiden Teilmutanten nicht wiederfinden lassen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt man auch mit Hilfe der freien Stabilisierungsenergie  $\Delta G_{eq}$ .

Entfernt man Prolin 50 hat das eine Destabilisierung von 6kJ/mol zur Folge. Bei der P7AP9A Mutante erhöht sich dieser Betrag auf 8.6kJ/mol und beim prolinfreien Tendamistat auf 9.2kJ/mol. Wegen unterschiedlicher Einflußgrößen lassen sich die Auswirkungen einer Pro → Ala Substitution auf die Stabilität nur schwer vorhersagen (Tabelle 5-1).

Protein	Mutante	$\Delta\Delta G_{eq}^{\circ}$ <sup>1)</sup> [kJ/mol]	Bemerkungen
<b>Chymotrypsin Inhibitor 2</b>	Pro → Ala44	+ 8.9	pH6.3, GdmCl
	Pro → Ala44	+ 7.6	pH4.15, GdmCl
	Pro → Ala6	- 14.2	pH6.25, GdmCl
	Pro → Ala25	+ 5.1	pH6.25, GdmCl
	Pro → Ala33	+ 2.4	pH6.25, GdmCl
	Pro → Ala61	+ 14.6	pH6.25, GdmCl
<b>Cytochrom C aus Ratte</b>	Pro → Ala30	+ 22.5	pH7, Harnstoff
<b>λ-Repressor aus Phagen λ</b>	Pro → Ala78	+ 6.7	pH6.7, GdmCl
<b>Lysozym aus Phagen T4</b>	Pro → Ala37	0	pH7, Harnstoff
	Pro → Ala86	+ 1.6	pH5.7, Harnstoff
	Pro → Ala143	+ 4.1	pH5.7, Harnstoff
<b>Ribonuklease T1</b>	Pro → Ala39	+ 20.7	pH5.0, GdmCl
<b>Staphylokokken Nuklease</b>	Pro → Ala11	+ 1.7	pH7, GdmCl
	Pro → Ala31	+ 2.1	pH7, GdmCl
	Pro → Ala42	- 0.4	pH7, GdmCl
	Pro → Ala47	+ 2.5	pH7, GdmCl
	Pro → Ala56	+ 0.4	pH7, GdmCl
	Pro → Ala117	- 3.4	pH7, GdmCl
<b>Tryptophan Synthase aus E. coli</b>	Pro → Ala28	+ 10.4	pH7.0, GdmCl
	Pro → Ala132	+ 7.6	pH7.0, GdmCl

1)  $\Delta G_{eq}$ (Mutante – Wildtyp)

Tabelle 5-1 Zusammenstellung der thermodynamischen Auswirkungen einiger Pro → Ala Substitutionen auf die Stabilität von Proteinen (Pfeil, 1999).

Die beim Tendamistat erhaltenen  $\Delta G_{eq}$  Werte liegen jedoch im Bereich der bereits in anderen Proteinen beobachteten Destabilisierungsbeiträge. Interessanterweise erklären diese Ergebnisse nicht die in den Proteolyseexperimenten beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Positionen Prolin 7 und 9 bzw. Prolin 50. Richtig ist, daß die beiden Prolin 7 und Prolin 9 Mutanten (P7AP9A und P7AP9AP50A) geringfügig instabiler sind als die P50A Mutante. Dieser Unterschied ist aber so klein, daß er als Konsequenz nicht zu der beobachteten

Proteolysestabilität der P50A Mutante führen dürfte. Betrachtet man die abgeleitete Reihenfolge für die Proteolyse des Tendamistats, findet die Hydrolyse als erstes innerhalb der Sequenz Arg<sup>19</sup>-Tyr<sup>20</sup> statt. Eine Destabilisierung des  $\beta$ -Hairpins würde vermutlich auf die Lösungsmittelzugänglichkeit des Arginins einen positiven Einfluß ausüben. Diese Destabilisierung könnte durch die beiden Alanin Mutationen an Position 7 und 9 entstanden und auf den  $\beta$ -Hairpin übertragen worden sein. Die bisherigen Daten reichen jedoch nicht aus, die Destabilisierung des hydrophoben Clusters um Alanin 8 als mögliche Ursache für die Proteolyseinstabilität in Betracht zu ziehen.

## **5.5. Faltung des $\alpha$ -Amylase Inhibitors Tendamistat**

### **5.5.1. Einfluß der Proline Pro7, Pro9 und Pro50.**

#### **5.5.1.1. Ursache für die langsame Phase im Tendamistat.**

Bei der oxidativen Rückfaltung des Tendamistats können insgesamt drei kinetische Phasen beobachtet werden (Schönbrunner, 1997a). Die schnelle Phase entspricht der Faltung von Molekülen, bei denen sämtliche Proline in der nativen Xaa-Pro Konformation vorliegen. Dieser Hauptfaltungsweg, den 80% der Moleküle bei der Rückfaltung durchlaufen, verbindet parallel mit einem Nebenfaltungsweg den entfalteten mit dem nativen Zustand des Proteins. Ausschlaggebend für die Entstehung dieses Nebenfaltungsweges ist eine Heterogenität innerhalb der entfalteten Molekülpopulation. Diese wird hervorgerufen durch eine Isomerisierungsreaktion um mindestens eine der drei Xaa-Pro Imid Bindungen im Molekül. Daß eine Prolinisomerisierung für diese Heterogenität verantwortlich ist, läßt sich bereits aus der Geschwindigkeitskonstante ( $0.08s^{-1}$ ) sowie der Aktivierungsenergie (83.7kJ/mol) dieser Reaktion ableiten. Ein direkter Beweis hierfür stammt aus Rückfaltungsexperimenten, die in Gegenwart von PPIase (EC 5.2.1.8) durchgeführt werden konnten (Schönbrunner, 1997a). Bei der Faltung von Proteinen katalysieren PPIasen spezifisch die Isomerisierung von Xaa-Pro Bindungen und beschleunigen dadurch kinetisch limitierte Isomerisierungsreaktionen (Fischer, 1984; Kofron, 1991; Fischer, 1994). Wie erwartet kommt es auch beim Tendamistat zu einer Beschleunigung der langsamsten unter den drei kinetischen Phasen. Durch Einbeziehung spezieller Meßtechniken, die es erlauben spezifisch die Bildung nativer Moleküle während der



Rückfaltungsreaktion nachzuweisen (*interrupted refolding*), konnte ein kinetisches Faltungsmodell für das Tendamistat abgeleitet werden. Dieses Modell geht von vier Zuständen aus (Abbildung 5-4), die untereinander durch vier Gleichgewichtsbeziehungen verbunden sind. Zwei der vier Zustände ( $U_{cis}$  und I) ergeben sich nach diesem Modell durch Isomerisierung um mindestens eine der drei Xaa-Pro Bindungen. Über den Nebenfaltungsweg akkumuliert bei der Rückfaltung ein Intermediat, das, genau wie  $U_{cis}$ , eine nicht-native Xaa-Pro Bindung aufweist. Der Übergang von I nach N entspricht aus kinetischer Sicht dem Übergang von  $U_{cis}$  nach  $U_{trans}$ . Genau wie diese Reaktion wird offensichtlich auch der Übergang von I nach N durch Zusatz von PPIase katalysiert. Eine langsame Faltungsphase läßt sich daher in Gegenwart von PPIase nicht beobachten. Dieses Phänomen ist keinesfalls selbstverständlich, da häufig eine verminderte Zugänglichkeit der Xaa-Pro Bindung eine wirksame Katalyse durch PPIasen verhindert (Nall, 1994). Daß es überhaupt zu einer Akkumulation von I kommt, liegt an einer Überlagerung der strukturbildenden Reaktion, die unmittelbar zu N führt, mit der Isomerisierungsreaktion von *cis* Xaa-Pro zu *trans* Xaa-Pro (Nall, 1994).

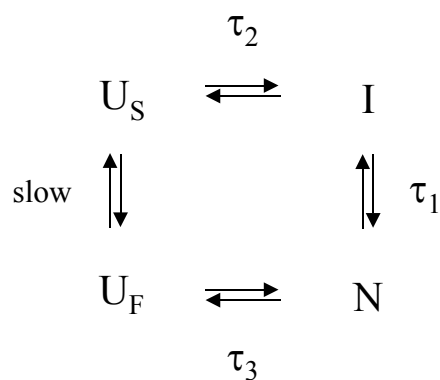


Abbildung 5-4 Bisheriges Faltungsschema des Tendamistats (Schönbrunner, 1997a).

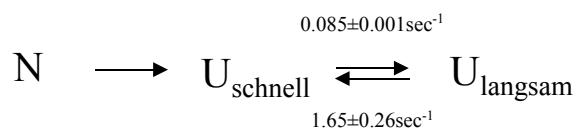
Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird die Heterogenität im entfalteten Zustand durch eine *trans* → *cis* Isomerisierung der Ala<sup>49</sup>-Pro<sup>50</sup> Bindung verursacht. Der Nachweis einer solchen Isomerisierung gelang auf rekombinantem Weg, durch gezielten Austausch der drei Proline im  $\alpha$ -Amylase Inhibitor. In allen drei Tendamistat Varianten wurde Prolin durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen führt die Doppelsubstitution in

der P7AP9A Mutante nicht zum Verschwinden der langsamen sowie der mittleren kinetischen Faltungsphase. Auch die Amplitudenwerte der drei Rückfaltungsphasen bleiben von der Doppelmutation nahezu unverändert. Bei der schnellen Rückfaltungsreaktion (Hauptphase) kommt es zu einer Verlangsamung, die sich auf eine entropische Stabilisierung von U zurückführen läßt. Zusätzlich dazu führt die Doppelmutation zu einer Destabilisierung des Nativzustands unter Entfaltungsbedingungen, wodurch die Aktivierungsbarriere gegenüber dem Wildtypprotein um 3.6kJ/mol abnimmt. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Destabilisierung des hydrophoben Clusters um Alanin 8 bzw. des  $\beta$ -Hairpins zurückzuführen. Letzteres ließ sich bereits aus den Proteolyseexperimenten indirekt ableiten. Ersetzt man dagegen, wie in den Mutanten P50A und P7AP9AP50A realisiert, Prolin 50 gegen Alanin, kommt es zum Verschwinden der langsamen Rückfaltungsphase. Danach hängt also das Gleichgewicht zwischen  $U_{cis}$  und  $U_{trans}$  mit der *cis/trans*-Isomerisierung um die Ala<sup>49</sup>-Pro<sup>50</sup> Bindung zusammen. Zum gleichen Ergebnis gelangt man auch über manuelle Mischungsexperimente, in denen „schnellere“ Phasen als die Prolinisomerisierung nicht mehr beobachtbar werden können. Interessanterweise bleibt in den Stopped-flow Experimenten die mittlere kinetische Phase vollständig erhalten. Nach dem Vier-Zustands Modell (Schönbrunner, 1997a) sollte es jedoch durch den Wegfall der *cis/trans*-Isomerisierung auch zum Verschwinden der mittleren kinetischen Phase kommen, die I mit  $U_{cis}$  verbindet. Die vorgelegten Daten können jedoch eindeutig die Existenz der mittleren Phase, selbst in Abwesenheit von Prolinen im Molekül, belegen. Das vorgestellte Vier-Zustands Modell ist daher für das Tendamistat in dieser Form (vgl. Abbildung 5-4) nicht länger haltbar. Möglicherweise erklärt dies auch die nicht-Katalysierbarkeit dieser Reaktion in Gegenwart von PPIase.

#### 5.5.1.2. Ursache für die mittlere Phase im Tendamistat.

Beim Tendamistat entsteht die mittlere Rückfaltungsphase nicht als Folge einer Prolinisomerisierung. Das konnten durch Experimente mit dem prolinfreien Tendamistat eindeutig gezeigt werden. Die Frage nach der Ursache für das Auftreten dieser Phase bleibt daher offen. Mutationen, die in unterschiedlichen Bereichen des Proteins eingebracht wurden, hatten keinen Einfluß auf das Vorhandensein der mittleren Faltungsphase. Verglichen mit der Hauptphase wird die mittlere Phase durch unterschiedliche Zusätze, wie GdmCl und Natriumsulfat (Pappenberger, 2000), nur wenig beeinflusst. Dieser Effekt spricht für eine isolierte,

von der Anordnung der Polypeptidkette unabhängige Reaktion. Desweiteren scheint eine Veränderung in den Solvatationseigenschaften von Wasser sowie die Beteiligung geladener Gegenionen (z.B.  $\text{SO}_4^{2-}$  oder  $\text{Cl}^-$ ) keinen Einfluß auf den Übergangszustand dieser Reaktion auszuüben. Nach diesen Kriterien verhält sich also die mittlere Faltungsphase wie bei einer *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion um eine Xaa-Pro Bindung (Stein, 1993; Brandts, 1975), mit dem Unterschied, daß Proline nicht die Ursache hierfür sein können. Hinzu kommt, daß die mittlere Phase ( $\sim 300\text{msec}$ ) gegenüber der Prolin-Isomerisierung um etwa den Faktor 34 ( $0.54\text{M GdmCl pH7.0}$ ) beschleunigt ist. Damit liegt dieser Wert deutlich oberhalb der Geschwindigkeit für Isomerisierungen von Xaa-Pro Bindungen in Proteinen und Peptiden ( $\sim 10\text{-}100\text{sec}$ ). Um zu untersuchen, ob die mittlere Rückfaltungsphase aus einer weiteren Heterogenität im entfalteten Zustand (U) resultiert, wurde mit dem prolinfreien Tendamistat ein Doppelsprung Experimente durchgeführt (Brandts, 1975; Schmid, 1986). In einem solchen Test geht man vom nativen Protein aus und induziert durch einen Entfaltungssprung den Übergang von N nach U. Nach unterschiedlich langer Inkubationsdauer, bei der sich nach und nach die Heterogenität von U herausbildet -  $U_{\text{schnell}}$  geht dabei in  $U_{\text{langsam}}$  über - erfolgt ein Rückfaltungssprung. Dieser unterbricht die Isomerisierung zwischen  $U_{\text{schnell}}$  und  $U_{\text{langsam}}$ . Sind die beiden Geschwindigkeitskonstanten gut voneinander getrennt, läßt sich direkt die Bildung von  $U_{\text{langsam}}$  mitverfolgen. Da sich beim Rückfaltungssprung der Übergang von  $U_{\text{langsam}}$  nach  $U_{\text{schnell}}$  spektroskopisch nicht nachweisen läßt, detektiert man diese Reaktion durch den zeitverschobenen Amplitudenanstieg des Hauptphasensignals. Aus diesen Messungen geht hervor, daß bei einer Inkubationsdauer von bis zu  $38\text{msec}$  lediglich  $U_{\text{schnell}}$  im Rückfaltungsansatz vorliegt. Verlängert man die Inkubationsdauer, tritt eine zweite Rückfaltungsphase in Erscheinung, die aus dem Übergang von  $U_{\text{schnell}}$  nach  $U_{\text{langsam}}$  resultiert. Die Geschwindigkeitskonstante dieser Reaktion entspricht  $1.65\text{sec}^{-1}$ . Für den Übergang von  $U_{\text{schnell}}$  nach  $U_{\text{langsam}}$  konnte eine Geschwindigkeitskonstante von  $0.085\text{sec}^{-1}$  ermittelt werden. Nach diesen Daten kommt es im entfalteten Tendamistat tatsächlich zu einer Prolin-unabhängigen Isomerisierungsreaktion:



Der N-Test bestätigt die erhaltenen Ergebnisse insofern, als daß beide Phasen für die produktive Faltung des Tendamistats verantwortlich sein müssen. Alle Daten deuten darauf, daß es sich bei

der mittleren Faltungsphase wahrscheinlich um eine *cis/trans*-Isomerisierung handelt, an der keine Proline beteiligt sind. Das Vorhandensein von *cis*-Bindungen im nativen Molekül läßt sich aufgrund der gut untersuchten Struktur des Inhibitors ebenfalls ausschließen (Pflugrath, 1986; Kline 1986a; Kline 1986b; Qiwen, 1987). Wäre eine solche Bindung tatsächlich im Molekül vorhanden, würde sie nach der Entfaltung zu einem nahezu vollständigen Übergang von  $U_{\text{schnell}}$  nach  $U_{\text{langsam}}$  führen. Bei der Rückfaltungsreaktion wäre daher der Übergang von  $U_{\text{langsam}}$  nach  $U_{\text{schnell}}$  geschwindigkeitsbestimmend, was jedoch nicht der Fall ist. Aus temperaturabhängigen Messungen konnte von Pappenberger (Pappenberger, 2001) die Aktivierungsenergie dieser Reaktion bestimmt werden. Sie beträgt 65kJ/mol und liegt damit deutlich niedriger als in der Regel bei Xaa-Pro Bindungen beobachtet wird (~90kJ/mol). Interessanterweise gelang es ihm durch Verwendung von Trifluorethanol (TFE) mit LiCl (0.8M LiCl) die Amplitude der mittleren Phase deutlich anzuheben (5% → 25%). TFE/LiCl hat die Eigenschaft, in Prolin-haltigen Peptiden den *cis*-Prolin Gehalt signifikant zu erhöhen (Kofron, 1991; Reimer, 1998). Die mittlere Rückfaltungsphase reagiert damit auf die veränderten Lösungsmittelbedingungen wie ein prolinhaltiges Peptid, mit dem Unterschied, daß im prolinfreien Tendamistat keine Proline existieren. Diese Untersuchungen zeigen damit eindeutig, daß die mittlere Rückfaltungsphase des Tendamistats auf eine Prolin-unabhängige *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion zurückzuführen ist. Theoretische Arbeiten weisen darauf hin, daß in Peptiden *cis* Amid Bindungen durch intrinsische Abstoßungseffekte nur sehr selten anzutreffen sind. Berechnungen von Ramachandran zum Verteilungsgleichgewicht zwischen den beiden Konformeren innerhalb des Dipeptides L-Ala-(*cis/trans*)-L-Ala ergaben einen Verteilungskoeffizienten von 0.1% *cis* gegenüber 99.9% *trans* (Ramachandran, 1976). Demgegenüber ließ sich für das Dipeptid L-Ala-(*cis/trans*)-L-Pro ein maximaler *cis* Anteil von 30% berechnen. Nimmt man 0.1% als Grundlage für eine Abschätzung des maximal möglichen *cis* Konformationsanteils im Tendamistat, so läßt sich für die vorhandenen 73 Amid Bindungen ein theoretischer Wert von 7% ( $1-0.999^{73}$ ) berechnen. Kinetisch konnte für die mittlere Phase eine durchschnittliche Amplitude von 5% bestimmt werden. Beide Werte stimmen gut überein und bestätigen die aufgestellte Hypothese über die Natur der mittleren Rückfaltungsphase.

Wegen der starken Bevorzugung von *trans* gegenüber *cis* Amid Bindungen, war es bisher nicht möglich, Bedingungen zu finden, unter denen die *cis* Konformation stabilisiert und dadurch untersucht werden konnte. Auf rekombinantem Weg gelang es Odefey (Odefey, 1995) ein *cis* Prolin in RNaseT1 durch Alanin auszutauschen. Damit wies die um etwa 20kJ/mol destabilisierte

Mutante P39A im Nativzustand eine *cis* Tyr<sup>38</sup>-Pro<sup>39</sup> Bindung auf. Entfaltet man den Wildtyp, ist der erste Schritt eine *cis* → *trans* Isomerisierung um die Tyr<sup>38</sup>-Pro<sup>39</sup> Bindung. Nach Austausch von Prolin gegen Alanin wird diese Reaktion um den Faktor 60 beschleunigt und beträgt damit 1.46sec<sup>-1</sup>. Darüberhinaus zeigt sich die Geschwindigkeitskonstante der nicht-Prolin Isomerisierungsreaktion nahezu unempfindlich gegenüber steigenden GdmCl-Konzentrationen (0.9-1.4sec<sup>-1</sup>). Drastischer wirkt sich jedoch der Einfluß dieser Mutation auf die Rückfaltungsreaktion des Proteins aus. Hier kommt es infolge der ungünstigeren *trans* → *cis* Isomerisierung zu einer Verlangsamung der Reaktion um den Faktor 1000. Ein Vergleich der *cis* → *trans* Daten zwischen Tendamistat und RNaseT1 zeigt eine gute Übereinstimmung der beiden Geschwindigkeitskonstanten. Möglicherweise entstehen die Abweichungen durch die in beiden Fällen unterschiedlichen Nativstrukturen. Daher ist eine Kopplung zwischen Isomerisierung auf der einen Seite und Strukturbildung auf der anderen nicht ganz ausgeschlossen. Das könnte auch der Grund dafür sein, warum für die *trans* → *cis* Isomerisierungsreaktion in der RNaseT1 deutlich langsamer verläuft (0.0021sec<sup>-1</sup>) als im Tendamistat (0.085sec<sup>-1</sup>). Auch bei der RNaseA gelang es ein *cis* Prolin gegen ein Alanin zu ersetzen (Dodge, 1996). In diesem Fall erhält man für die *cis* → *trans* Isomerisierungsreaktion eine Geschwindigkeitskonstante von 0.7sec<sup>-1</sup>. Auch dieser Wert kommt von seiner Größenordnung der Geschwindigkeitskonstante des prolinfreien Tendamistats recht nahe.

Li gelang es die *cis* → *trans* Isomerisierung von N-Methylacetamid bzw. dem Dipeptid Gly-Gly nach Anregung bei 206nm über Raman Resonanz nachzuweisen (Li, 1997). Bei Raumtemperatur konnte im Falle des N-Methylacetamids eine Geschwindigkeitskonstante von 2.3sec<sup>-1</sup> bzw. für das Dipeptid Gly-Gly von 14sec<sup>-1</sup> ermittelt werden. Eine andere Untersuchung hierzu stammt von Scherer *et al.* (Scherer, 1998). Sie verwendeten zum Nachweis und zur Quantifizierung des *cis* Anteils die durch Isomerisierung hervorgerufene Signalverschiebung von Seitenkettenprotonen im <sup>1</sup>H-NMR. Aus den ermittelten Werten geht hervor, daß die Isomerisierungsgeschwindigkeit sowohl von der Zusammensetzung als auch von der Länge der untersuchten Peptide abhängig ist (vgl. Tabelle 5-2). Beispielsweise ließ sich für die Sequenz L-Ala-L-Ala-L-Tyr-L-Ala-L-Ala ein *cis* Anteil von 0.14% und eine Geschwindigkeitskonstante von 2.38sec<sup>-1</sup> ableiten. Interessanterweise wurde eine Aktivierungsenergie von 64.6kJ/mol für diese Reaktion bestimmt, was mit dem Ergebnis von Pappenberger (65kJ/mol) nahezu übereinstimmt. Damit belegen auch diese Daten die oben aufgestellte Hypothese, daß es sich im Falle der mittleren Rückfaltungsphase um eine nicht-Prolin *cis* → *trans* Isomerisierung handelt.

<i>Name</i>	<i>Position</i>	$k_{cis \rightarrow trans}$	<i>Bemerkung</i>
Tendamistat	-	1.65 sec <sup>-1</sup>	diese Arbeit
RNaseT1	Tyr <sup>38</sup> -Ala <sup>39</sup>	1.46 sec <sup>-1</sup>	(Odefey, 1998)
RnaseA	Tyr <sup>92</sup> -Ala <sup>93</sup>	0.7 sec <sup>-1</sup>	(Dodge, 1996)
N-Methylacetamid	-	2.3 sec <sup>-1</sup>	(Li, 1997)
Gly-Gly	-	14 sec <sup>-1</sup>	(Li, 1997)
AY	-	0.57 sec <sup>-1</sup>	(Scherer, 1998)
AA Y	AY	0.29 sec <sup>-1</sup>	(Scherer, 1998)
AA YA	AY	1.61 sec <sup>-1</sup>	(Scherer, 1998)
AA YAA	AY	2.38 sec <sup>-1</sup>	(Scherer, 1998)

Tabelle 5-2 Geschwindigkeitskonstanten von *cis* → *trans* Isomerisierungsreaktionen, an denen keine Proline beteiligt sind.

Tendamistat ist damit das erste Protein, für das die Beteiligung von nicht-Prolin Isomerisierungen an der Faltung nachgewiesen werden konnte. Da die von Scherer (Scherer, 1998) abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten von sequenzabhängig sind, ist im Falle des Tendamisatats davon auszugehen, daß die Isomerisierung an einer spezifischen Stelle des Proteins stattfindet. Die bisherigen Daten lassen die Bestimmung dieser Position jedoch nicht zu.

Möglicherweise trägt auch der „Schleifenaufbau“ des Tendamisatats (Cys11-Cys27 sowie Cys45-Cys73) zur Entstehung der mittleren Phase bei. Alle Messungen an den Prolinmutanten wurden unter oxidativen Bedingungen, unter Beibehaltung der Disulfidbrücken, durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, daß die beiden, im Gleichgewicht miteinander stehenden Disulfid Konformere *syn*- und *anti*- zu einer Isomerisierungsreaktion in Proteinen führen können. Aus NMR Untersuchungen ist jedoch bekannt, daß eine solche Reaktion im Bereich zwischen 1-10ms stattfindet und somit als Ursache für die mittlere Rückfaltungsphase nicht in Frage kommen kann (Otting, 1993). Hier wäre es interessant, auch die bereits vorhandene Disulfidmutanten in die Betrachtungen mit einzubeziehen.

Am Ende bleibt noch die Frage offen, inwiefern solche Faltungsphasen *in vivo* Relevanz besitzen? Im Vergleich zu einer Xaa-Pro Isomerisierung ist eine nicht-Prolin Isomerisierung von *cis* nach *trans* stark beschleunigt und dürfte daher auch unter physiologischen Bedingungen nicht zur Akkumulation von Proteinen führen. Da die Translation mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden ist, gibt es möglicherweise neben den bekannten Katalysatoren (Isomerasen und Chaperone) auch unspezifische, die unabhängig von Prolinen Isomerisierungsreaktionen

katalysieren können. In bakteriellen Zellen konnte bereits ein sogenannter *trigger factor* als ribosomenassoziierte Prolyl Isomerase nachgewiesen werden (Callebaut, 1995; Stoller, 1995). Diese Prolyl Isomerase zeigt ein sehr breites Substratspektrum gegenüber Proteinen, die im wesentlichen für eine produktive Katalyse unstrukturiert sein müssen (Scholz, 1998). Darüberhinaus ist beim *trigger factor* die Bindung nicht an das Vorhandensein von Prolinen gebunden. Das zeigen Untersuchungen von Scholz (Scholz, 1998) mit carboxymethyliertem Tendamistat (RCM-Tendamistat) sowie der prolinfreien Variante (RCM-P7AP9AP50A). Beide Proteine werden ohne Affinitätsunterschied vom *trigger factor* gebunden. Möglicherweise beinhaltet daher diese Substraterkennung auch die Katalyse von nicht-Prolin *cis* Bindungen. Ob die mittlere Phase des Tendamistats sich tatsächlich über den *trigger factor* beschleunigen läßt, wurde bisher nicht untersucht werden.

### 5.5.2. Einfluß des hydrophoben Oberflächenclusters.

An der Oberfläche zahlreicher  $\beta$ -Proteine werden häufig kompakte Strukturen angetroffen, die aus einer zentralen, hydrophoben Aminosäure bestehen, um die sich weitere Aminosäuren herumlagern (Tisi, 1995). Solche Oberflächenstrukturen wurden von Tisi *et al.* als kleine hydrophobe Oberflächencluster bezeichnet (*small exterior hydrophobic cluster*, kurz SEHC). Der Struktur solcher SEHCs liegt immer das gleiche, zentrosymmetrische Aufbauprinzip zugrunde. Wie Berechnungen an Plastocyaninen zeigen konnten, vermag eine solche Bauweise, die Wasserzugänglichkeit der zentralen Aminosäure auf nahezu 7% zu reduzieren. Bereits Burg (Burg, 1994) konnte diesen Effekt gezielt benutzen, um durch Aufbau eines hydrophoben Oberflächenclusters die Stabilität einer bakteriellen Protease zu verbessern. Der Einfluß solcher Clusterstrukturen auf die Faltung von  $\beta$ -Faltblattproteinen wurde in der Literatur bisher nicht untersucht.

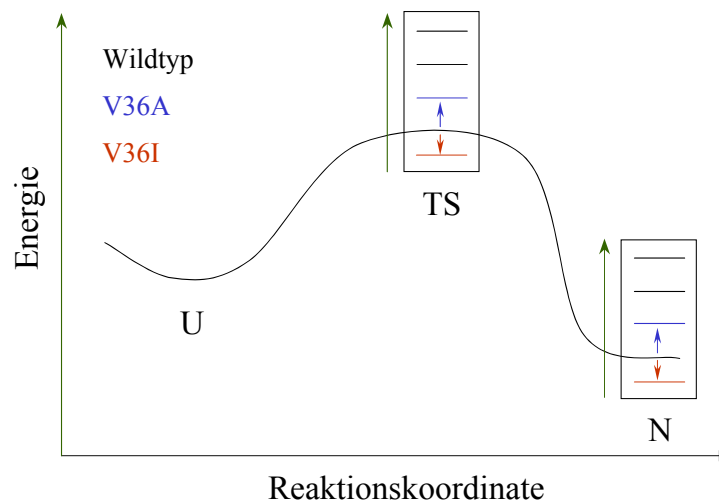
Auch Tendamistat besitzt auf seiner Oberfläche, angeordnet um das zentrale Valin 36, einen solchen Oberflächencluster (Tisi, 1995). Der positive Einfluß dieses Clusters auf die Stabilität des Tendamistats konnte bereits durch Gleichgewichtsmessungen (Wildtyp, V36A und V36I) gezeigt werden. Die dabei beobachteten Stabilisierungsbeiträge (V36:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -34.04\text{kJ/mol}$ ; V36A:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -22.49\text{kJ/mol}$ ; V36I:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -36.61\text{kJ/mol}$ ) korrelieren mit dem Seitenkettenvolumen der jeweils ausgetauschten Aminosäure. Daher sind es im wesentlichen hydrophobe und van der Waals Wechselwirkungen, die die Stabilität einer solchen

Clusterstruktur bestimmen. Aber auch auf die Faltungskinetik des Tendamistats haben Mutationen innerhalb des SEHC's einen entscheidenden Einfluß. Beispielsweise bewirkt der Austausch von Val gegen Ala eine deutliche Verlangsamung der Rückfaltungskinetik. Damit verbunden ist ein Anstieg der Aktivierungsenergie um 8.6kJ/mol. Dieser Wert entspricht rund 75% des gesamten Destabilisierungsbeitrags unter Gleichgewichtsbedingungen. Die Entfaltungsgeschwindigkeit ist von diesem Austausch nur wenig betroffen. Damit besitzt die V36A Mutante den höchsten  $\Phi$ -Wert von allen untersuchten Mutanten (0.74). Aus molekularer Sicht dürften somit zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Valin 36 und seinen benachbarten Aminosäuren im Übergangszustand vorhanden sein. Daher scheint der Aufbau des hydrophoben Oberflächenclusters eine wichtige Rolle in der Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors zu spielen. Valin 36 liegt jedoch innerhalb der Reihe homologer Proteine nicht konserviert vor. Eine Festlegung dieser Position als potentiell Nukleationszentrum scheint aus evolutiver Sicht nicht gerechtfertigt (Ptitsyn, 1998). Der nativ-ähnliche Aufbau des Übergangszustands um Val36 resultiert womöglich *auch* aus einer Beteiligung benachbarter, hoch-konservierter Aminosäuren (Val31, Val33 und Tyr37) an der Ausbildung einer hydrophoben Nukleationsstruktur. In einem solchen Fall wäre jedoch der  $\Phi$ -Wert unabhängig vom eingeführten Substituenten an Position 36. Bei Monte Carlo Simulationen auf einem 5 x 5 x 5 Gitter (125mer) konnten Dinner und Karplus zeigen (Dinner, 1999), daß für die schnelle Faltung eines 125mers (*fast track folding*) Wechselwirkungen an der Polymeroberfläche verantwortlich sind, die einen von zwei möglichen Übergangszuständen stabilisieren helfen. In ihren Simulationen wurden diese Oberflächenkontakte jedoch erst bedeutsam nachdem sich ein semi-kompakter, durch unspezifische Wechselwirkungen stabilisierter Zustand ausbilden konnte. Übertragen auf die Verhältnisse im Tendamistat könnte Valin 36 die Aufgabe übernehmen, durch Oberflächenkontakte die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors produktiv zu beeinflussen.

Anders liegen die Verhältnisse bei der V36I Mutante. Der  $\Phi$ -Wert dieser Mutante beträgt nur noch 0.16, was bedeuten würde, daß der Übergangszustand an Position 36 weitestgehend solvatisiert vorliegt. Dieses Resultat widerspricht damit dem bei der V36A Mutante erhaltenen Ergebnis. Die kinetische Charakterisierung von Mutanten, die an einer definierten Stelle des Proteins unterschiedliche Aminosäuren tragen, wird häufig zur genaueren Analyse von Übergangszuständen verwendet. Solche Feinstrukturanalysen konnten zum ersten mal an dem Protein Barnase durchgeführt werden (Serrano, 1992). Auch hier ließen sich für zahlreiche Substitutionen große Unterschiede zwischen einzelnen  $\Phi$ -Werten beobachten. Diese



Abweichungen korrelierten jedoch vor allem bei inneren Aminosäuren mit der Hydrophobizität der neu eingeführten Seitenkette (z.B.  $\Phi_{\text{Ala}} < \Phi_{\text{Val}}$ ). Auf das Tendamistat und damit auf die besonderen Verhältnisse im SEHC's übertragen, sollte daher ein Austausch von Valin gegen Isoleucin den  $\Phi$ -Wert weiter ansteigen lassen ( $\Phi_{\text{Val}} < \Phi_{\text{Ile}}$ ). Ein solches Verhalten scheint insofern begründet, da im wesentlichen hydrophobe Wechselwirkungen, ähnlich den Verhältnissen im Proteininneren, für die Stabilisierung des SEHC's von Bedeutung sind. Bei Tendamistat ist jedoch genau das Gegenteil der Fall. Möglicherweise läßt sich das unterschiedliche Verhalten beider Tendamistat Mutanten auf eine, durch die Mutation bedingte Veränderung innerhalb des Übergangszustands zurückzuführen. Die Tanford Konstanten beider Mutanten liegen jedoch im Bereich des Wildtypproteins, womit es nicht zu einer Verschiebung des Übergangszustands bezüglich der GdmCl Zugänglichkeit gekommen sein kann. Daher werden durch beide Mutationen vermutlich Gleichgewichte zwischen unterschiedlichen Übergangszustandsensembeln beeinflusst, in denen die Struktur um Position 36 jeweils einen anderen Aufbau zeigt. In ein Reaktionsdiagramm übertragen würde eine solche Verschiebung nicht in Richtung der Tanford Konstanten erfolgen, sondern die vertikale Lage des Übergangszustands (TS) betreffen:



Verschiebungen dieser Art können jedoch nur zwischen Ensembles stattfinden, die in ihrer Lösungsmittelzugänglichkeit keine Veränderungen aufweisen. Strukturell gesehen sind solche Bereiche des Proteins davon betroffen, die bereits im Übergangszustand desolvatisiert vorliegen.

Eine andere Erklärung für die strukturell unterschiedlichen Übergangszustände bei den Mutanten V36A und V36I könnte über die Annahme paralleler Faltungswege vorgenommen werden, die je nach Mutation unterschiedlich stark populiert sein können. Parallele Faltungswege treten bei der Faltung von Proteinen als Ursache unterschiedlicher Effekte in Erscheinung. Zum einen kann in Proteinen die über mehrere Faltungsdomänen verfügen eine Aufspaltung in voneinander unabhängige Faltungspfade erfolgen, in denen die jeweiligen Faltungsdomänen einen mehr oder weniger vollständigen Aufbau zeigen (Fersht, 1994). Der Nachweis paralleler Faltungspfade läßt sich über einen sogenannten Brønsted Plot durchführen. Bei dem kleinen Eindomänenprotein CI2 konnte im Brønsted-Plot ein linearer Zusammenhang über weite Stabilitätsbereiche hinweg erhalten werden ( $\beta = 0.38$ ,  $r = 0.80$ ). Interessanterweise war dieser Zusammenhang unabhängig von der Lage einzelner Substitutionen im Protein (Fersht, 1999). In Abbildung 5-7 ist ein solcher Plot für das Tendamistat abgebildet. Wie man deutlich erkennen kann, verhält sich die Brønsted Gerade ( $\Delta \ln k_f = \beta \Delta \ln K_{eq} + \Delta \ln k_f^\circ$ ) über weite Bereiche hinweg linear ( $\beta = 0.165$ ,  $r = 0.84$ ). Somit können parallele Faltungswege die unterschiedlich aufgebaute Übergangszustände beinhalten, für die Faltung des Tendamistats ausgeschlossen werden.

### 5.5.3. Verhalten des $\beta$ -Hairpins.

Für die Faltung von Proteinen, die ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehen, spielt die Bildung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen eine entscheidende Rolle. Anders als  $\alpha$ -Helices werden  $\beta$ -Faltblätter überwiegend durch nicht-lokale Wechselwirkungen - z.B. durch Wechselwirkung räumlich benachbarter Seitenketten - stabilisiert. Aus entropischen Gründen sind jedoch solche Wechselwirkungen ungeeignet um den Aufbau von  $\beta$ -Faltblättern einzuleiten. Anstatt die Wechselwirkung sequentiell entfernter Aminosäuren zu berücksichtigen, läßt sich die Bildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen auch durch die Faltung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen induzieren (Finkelstein, 1991). Diese Annahme ist auch die Grundlage des von Dill entwickelten *hydrophobic zipper* Modells (Dill, 1993). Nach diesem Modell sind es vor allem hydrophobe Wechselwirkungen zwischen benachbarten Sequenzabschnitten, die durch Bildung einer initialen  $\beta$ -Hairpinstruktur den Aufbau von  $\beta$ -Faltblättern einleiten können. Ein anderes Faltungsmodell (Hazes, 1992), das speziell für *greek key  $\beta$ -barrel* Strukturen entwickelt wurde, geht davon aus, daß zunächst eine hydrophobe Nukleationsstruktur entsteht, die erst anschließend durch Anlagerung weiterer Sequenzabschnitte die Bildung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen induziert (Hazes,

1992). Anders als im Modell von Dill sind bei Hazes benachbarte Sequenzabschnitte an der Nukleation beteiligt, die im nativen Protein nicht zu einem  $\beta$ -Hairpin gehören. Beiden Modellen ist die Bedeutung hydrophober Wechselwirkungen zum Aufbau (Hazes, 1992) bzw. zur Stabilisierung (Dill, 1993) von  $\beta$ -Faltblattstrukturen gemeinsam. In den letzten Jahren gelang es vermehrt Modellpeptide mit stabiler  $\beta$ -Hairpinstruktur zu synthetisieren (Muñoz, 1997; Blanco, 1998; Muñoz, 1998). Die Stabilität solcher Sekundärstrukturelemente impliziert die berechnete Frage, ob der Aufbau stabiler  $\beta$ -Hairpinstrukturen überhaupt die schnelle und effiziente Faltung von  $\beta$ -Faltblattproteinen ermöglichen kann (Finkelstein, 1991; Fersht, 1995a)? Im Extremfall kann eine zu deutliche Stabilisierung bestimmter Sekundärstrukturelemente auch zu einer Akkumulation produktiver Faltungsintermediate führen (Fersht, 1995a).

Geht man von dem denaturierten Zustand des Tendamistats aus, wird die native  $\beta$ -Faltblattstruktur ohne die Bildung kompakter, über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisierter Zwischenzustände erreicht (Schönbrunner, 1997a). Nach der Tanford Gleichung ist der Übergangszustand des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors zu 64% nativ-ähnlich aufgebaut. Dieser Wert entspricht auch der Lösungsmittelzugänglichkeit anderer Zwei-Zustands Proteine, die in Tabelle 5-3 aufgeführt sind (Fersht, 1999).

<i>Protein</i>	<i>Klasse</i>	<i>Aminosäuren</i>	$\Delta G^0(H_2O)$ [kJ/mol]	$\alpha$	<i>Literatur</i>
$\lambda$ -Repressor	$\alpha$ -Helical	80	- 12.55 <sup>a)</sup>	0.39	(Huang, 1995)
Cytochrom C	$\alpha$ -Helical	104	- 28.89 <sup>b)</sup>	0.47	(Chen, 1997)
CspB	$\beta$ -barrel	67	- 12.55 <sup>c)</sup>	0.85	(Schindler, 1995)
CspA	$\beta$ -barrel	69	- 12.55 <sup>c)</sup>	0.94	(Reid, 1998)
Src	$\beta$ -barrel	64	- 17.15 <sup>d)</sup>	0.69	(Grantcharova, 1997)
Tendamistat	$\beta$ -barrel	74	-34.04 <sup>c)</sup>	0.65	(Schönbrunner, 1997)
Cl2	$\alpha/\beta$ -Protein	64	- 29.28 <sup>c)</sup>	0.61	(Jackson, 1991)
U1A	$\alpha/\beta$ -Protein	102	- 38.91 <sup>c)</sup>	0.55	(Silow, 1997)

<sup>a)</sup> Messung bei 37°C; <sup>b)</sup> Messung bei 20°C; <sup>c)</sup> Messung bei 25°C und <sup>d)</sup> Messung bei 22°C

Tabelle 5-3 Vergleich der Lösungsmittelzugänglichkeit von Übergangszuständen anhand des  $\alpha$ -Wertes verschiedener Zwei-Zustands Proteine.

Dem  $\beta$ -Hairpin I im Tendamistat kommt bei der Stabilisierung der nativen Struktur eine besondere Bedeutung zu. Das konnte bereits durch die Untersuchung der beiden Disulfidmutanten C11AC27S und C45AC73A gezeigt werden (Vogl, 1995; Schönbrunner, 1997b). Die in dieser Arbeit eingebrachten Mutationen Leu  $\rightarrow$  Ala14 sowie Asn  $\rightarrow$  Ala25 führen

unter Gleichgewichtsbedingungen zu einer starken Destabilisierung des N-terminalen  $\beta$ -Hairpins (Wildtyp:  $\Delta G^\circ_{\text{eq}} = -34.04 \text{ kJ/mol}$ ; L14A:  $\Delta G^\circ_{\text{eq}} = -15.18 \text{ kJ/mol}$ ; N25A:  $\Delta G^\circ_{\text{eq}} = -10.12 \text{ kJ/mol}$ ). Diese Destabilisierung führt jedoch nicht zu einer signifikante Verlangsamung der Rückfaltungsreaktion. Daher wirken sich die, durch die Substitutionen neu eingebrachten Wechselwirkungen erst nach dem Übergangszustand auf das Protein aus. Wäre die Stabilisierung des  $\beta$ -Hairpins eine entscheidende Voraussetzung zum Erreichen des Übergangszustands, hätten beide destabilisierenden Mutationen zu einer deutlichen Verlangsamung der Rückfaltungsreaktion führen müssen. Nach der  $\Phi$ -Wert Analyse liegen die Seitenketten von Leucin 14 und Asparagin 25 im Übergangszustand solvatisiert vor. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt man auch bei der Untersuchung der C11AC27S Mutante (Schönbrunner, 1997b). Auch hier wirken sich die destabilisierenden Wechselwirkungen erst nach Erreichen des Übergangszustands auf das Protein aus ( $\Phi_{\text{C11AC27A}} = 0.22$ ). Daher liegt die Vermutung nahe, daß weite Teile des Tendamistats, einschließlich des N-terminalen  $\beta$ -Hairpins, im Übergangszustand noch unstrukturiert vorliegen. Hierfür spricht auch eine einfache Betrachtung der im Übergangszustand noch existierenden Wasserstoffbrücken an Position 25. Infolge der Asn  $\rightarrow$  Ala25 Substitution kommt es unter Gleichgewichtsbedingungen zu einer Destabilisierung des Proteins von 24 kJ/mol. Verteilt auf die vier Wasserstoffbrücken würde das einem durchschnittlichen Destabilisierungsbeitrag pro Wasserstoffbrücke von 6 kJ/mol entsprechen. Um etwa diesen Betrag nimmt auch die Aktivierungsenergie  $\Delta G^{\text{0}\#}_{\text{f}}$  (5.67 kJ/mol) für die Faltung der N25A Mutante zu, so daß insgesamt drei Donor-/Akzeptorstellen im Übergangszustand weiterhin solvatisiert vorliegen müssen. Damit scheint außerdem das Faltungsmodell von Hazes (Hazes, 1992), das eine Nukleation genau in diesem Bereich des Tendamistats voraussetzen würde, für die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors ebenfalls nicht in Frage zu kommen. Gegen die Annahme einer fest etablierten  $\beta$ -Hairpinstruktur, sprechen auch die Daten aus der  $\alpha$ -Wert Analyse.  $\alpha$ -Werte spiegeln die Veränderung der Lösungsmittelzugänglichkeit wieder und ermöglichen als Koordinate die Lage von Übergangszuständen im Reaktionsdiagramm festzulegen (Tanford, 1970). Beim Tendamistat entsprechen die durch Mutation bedingten Verschiebungen des Übergangszustands den Regeln des *Hammond Postulats*. Nach Hammond sind Spezies die längs einer Reaktionskoordinate eng aufeinander folgen und damit vergleichbare Energieinhalte besitzen, in ihrer Struktur miteinander

vergleichbar. Eine Destabilisierung des Proteins sollte demnach den Übergangszustand näher zum Nativzustand ( $\alpha = 1$ ) verschieben.

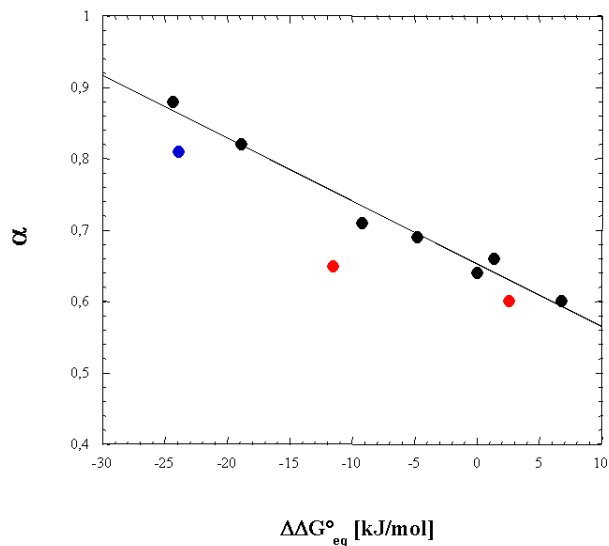


Abbildung 5-5 Hammond Plot des Tendamistats. Aufgetragen ist der Wildtyp sowie die Mutanten L14A, N25A (blau), T32A, V36A (rot), V36I (rot), L44A, I61M, P7AP9AP50A und C11AC27S. Für die lineare Extrapolation wurden die schwarzen Punkte eingesetzt. Der Hammond Effekt entspricht einer Verschiebung des Übergangszustands in Richtung auf den Nativzustand ( $\alpha = 1$ ) mit steigender Destabilisierung ( $\Delta\Delta G_{eq}^{\circ}$ ) des Proteins. Der lineare Fit ergibt sich über die Funktion  $y = mx + m_0$ . Die Steigung beträgt  $m = -8.8 \text{ (J/mol)}^{-1}$  und  $m_0 = 0.65$  ( $r = 0.99$ ).

Wie in Abbild 5-5 dargestellt, läßt sich dieser Effekt tatsächlich aus den Tanford Konstanten ableiten. Beispielsweise ändert sich der  $\Phi$ -Wert bei der L14A Mutante von 0.64 (Wildtyp) auf 0.84. Damit entspricht die Lösungsmittelzugänglichkeit der L14A Mutante im Übergangszustand zu 82% dem nativen Protein. Eine stets im Übergangszustand vorgebildete  $\beta$ -Hairpinstruktur hätte bei destabilisierenden Mutationen innerhalb des  $\beta$ -Hairpins zu Diskontinuitäten im Verlauf des *Hammond Plots* führen müssen. Auch bei der stärker destabilisierten Disulfidmutante C11AC27S läßt sich ein solcher Effekt nicht beobachten. Hier kommt es infolge der Doppelsubstitution zu einer Verschiebung der Tanford Konstante von 0.64 auf 0.88 (Schönbrunner, 1997b). Derartige Verschiebungen, induziert durch kleinste Veränderungen innerhalb des Moleküls, sind Hinweise auf eine breite Aktivierungsbarriere zwischen dem denaturierten und dem nativen Zustand des Proteins. Aus struktureller Sicht läßt sich ein solches

Verhalten durch zahlreiche, flexibel ineinander konvertierbare Konformationsanordnungen wiedergeben (Otzen, 1999; Fersht, 1999). Stabilisiert werden solche Anordnungen durch eine begrenzte Zahl von Kontakten, die sich entweder über die gesamte Proteinstruktur verteilen (*unspezifisch*), oder auf definierte Reste konzentrieren sein können (*spezifisch*). Mutationen führen demnach zu einer sensiblen Störung der beteiligten Gleichgewichte, womit eine Reorganisation, als Suche nach alternativen (*unspezifisch*) oder zusätzlichen (*spezifisch*) Kontakten, stattfinden kann.

Ein unmittelbarer Hinweis darauf, daß der  $\beta$ -Hairpin im Übergangszustand in einer nicht-nativen Konformation vorliegt, stammen aus Experimenten mit der I61M Mutante. Bei der I61M sind auf Grund der räumlichen Nähe des Tryptophans zum Methionin die Emissionseigenschaften des Hauptfluorophors stark reduziert (Steiner, 1961). Isoleucin 61 befindet sich innerhalb einer ungeordneten, die beiden Faltblätter miteinander verknüpfenden Schleife am C-terminalen Ende von Strang V. Ein bereits im Übergangszustand ausgebildeter  $\beta$ -Hairpin hätte einen sehr schnellen Fluoreszenzanstieg bei 340nm zur Folge, der jedoch im Zuge des Faltungsgeschehens zum Gleichgewichtswert abfallen würde. Wie die Messungen eindeutig zeigen konnten, kommt es bei der Rückfaltungsreaktion zu keinem diskontinuierlichen Verlauf der Fluoreszenzamplitude. Ein kontinuierlicher Anstieg zum Gleichgewichtswert legt daher den Schluß nahe, daß sich die Bildung der Proteinstruktur in einem Schritt als „alles-oder-nichts“ Reaktion vollzieht. Wichtig bei diesen Betrachtungen bleibt, daß dieser Löschungseffekt nicht von der Stabilisierung bestimmter Zustände abhängt, sondern lediglich von der durchschnittlichen Entfernung zwischen Tryptophan 18 und Methionin 61.

Nach den bisherigen Daten scheint das Erreichen des Übergangszustands beim Tendamistat nicht von stabilisierenden Wechselwirkungen innerhalb des  $\beta$ -Hairpins abzuhängen (Finkelstein, 1991; Carlsson, 1995). Dabei darf man jedoch nicht vergessen, daß durch die  $\Phi$ -Wert Betrachtung im wesentlichen Seitenkettenwechselwirkungen analysiert werden können. Das Verhalten des Proteinrückgrats läßt sich nicht unmittelbar über eine solche Methode ableiten. Daher besteht hier durchaus die Möglichkeit, daß im Übergangszustand intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den beiden  $\beta$ -Strängen im  $\beta$ -Hairpin I vorhanden sind. Eine solche Annahme würde jedoch Untersuchungen widersprechen, die einen wesentlichen Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zur Stabilisierung peptidischer  $\beta$ -Hairpinsstrukturen nachweisen konnten (Muñoz, 1997; Muñoz, 1998). Zur Klärung dieser Frage sollten weitere Mutationen in den  $\beta$ -

Hairpin des Tendamistats eingebracht und analysiert werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, durch H-D Austauschexperimente die Entwicklung von Wasserstoffbrücken während der Faltung mitzuverfolgen (Englander, 2000).

#### 5.5.4. Nukleations-Kondensations Modell.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten über die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors Tendamistat sind konsistent mit dem Nukleations-Kondensations Modell (Abkevich, 1994; Itzhaki, 1995; Fersht, 1995; Fersht, 1999). Analog der Tröpfchenbildung bei unterkühlten Gases, kommt es bei der Faltung von Tendamistat, nach dem Kollabieren der Proteinkette als Reaktion auf die veränderten Lösungsmittelbedingungen (Schönbrunner, 1997a), zur intramolekularen Suche nach sogenannter Nukleationsstellen (Pound, 1972; Pande, 1998). In beiden Fällen ist der Übergang in den thermodynamisch stabileren Zustand (Flüssigkeit bzw. natives Protein) mit einem dramatischen Entropieeinbruch verbunden. Der Übergangszustand wird nur dann erreicht, wenn sich eine kritische Anzahl stabilisierender, nicht-definierter Kontakte (*unspezifischer* Nukleationskern) ausbilden konnte. Die Faltung des Chymotrypsin Inhibitors 2 (CI2) erfolgt nach einem solchen Nukleations-Kondensations Modell (Fersht, 1993; Fersht, 1995; Itzhaki, 1995). Demgegenüber liegt der Faltung des gut charakterisierten Proteins Barnase ein anderes Faltungsmodell zugrunde (Fersht, 1992; Fersht, 1995; Fersht, 1999). Bei diesem Protein erfolgt die Konstitution der nativen Struktur in mehreren Stufen nach dem sogenannten *framework modell*. Zunächst kommt es zum Aufbau *kinetisch kompetenter Faltungseinheiten*, die auch als *foldons* (vgl. Abbild 5-6) bezeichnet werden (Panchenko, 1996; Panchenko, 1997). Im Gegensatz zu CI2 besteht jedoch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der *hierarchischen* Zusammenlagerung solcher *foldons* durch intramolekulare Diffusions- und Kollisionsprozesse (Karplus, 1976; Karplus, 1994).

Die Faltung von Proteinen nach dem einen oder anderen Faltungsmodell orientiert sich zum Teil an der Stabilität einzelner Sekundärstrukturelemente. Beispielsweise konnten bei CI2 native Strukturanteile in isoliert untersuchten Proteinfragmenten nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gelang es bei Barnase nativ-ähnliche Strukturen in bestimmten Proteinfragmenten nachzuweisen (Sancho, 1992).

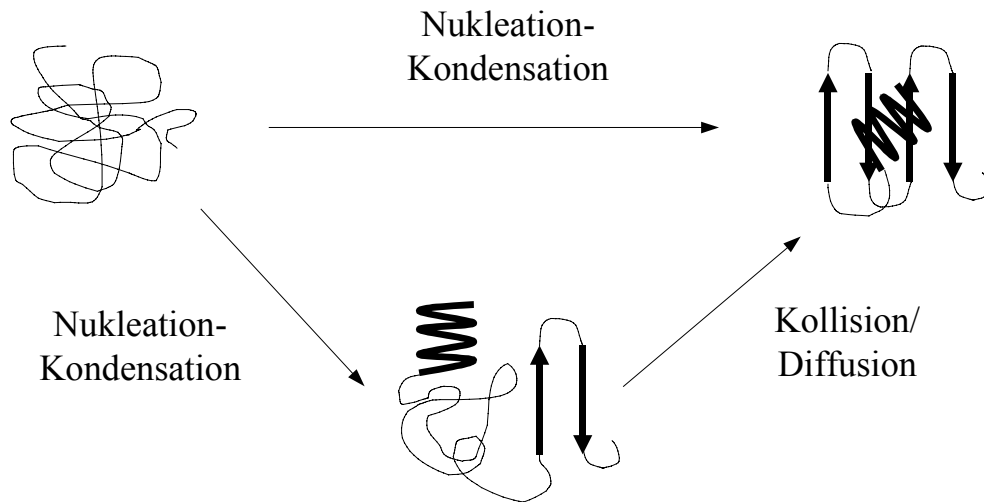


Abbildung 5-6 Allgemeines Faltungsschema nach dem Nukleations-Kondensations Modell (Fersht, 1995).

Die Zuordnung zu einem bestimmten Faltungsmodell läßt sich, mit gewissen Einschränkungen, über die  $\Phi$ -Wert Analyse vornehmen. Im Fall Barnase liegen die  $\Phi$ -Werte deutlich bei den beiden Extremwerten 1 und 0. Regionen mit  $\Phi$ -Werten um 0.5 bilden hier die Ausnahme.  $\Phi$ -Werte um 1 werden vor allem von der Faltblattregion und der N-terminalen  $\alpha$ -Helix erreicht (vgl. Abbild 5-6). Mutationen im hydrophoben Kernbereich des Protein weisen überwiegend niedrigere  $\Phi$ -Werte auf. Anders verhält sich CI2. Bis auf wenige Ausnahmen (Ser31, Glu33 und Glu34), zeigen die meisten Positionen des Proteins  $\Phi$ -Werte zwischen 0.2 und 0.5. Danach entspricht der Übergangszustand von CI2 einer expandierten Form des nativen Proteins, welches sich um einen zentralen Kernbereich (Nukleationskern) *kondensationsartig* zu formieren scheint. Der Nukleationskern besteht hier im Wesentlichen aus Aminosäuren, die sich im N-terminalen Bereich der  $\alpha$ -Helix befinden. Nach dem Nukleations-Kondensations Modell ist die genaue „Zusammensetzung“ des Nukleationskerns nicht definiert (*unspezifisch*). Durch Mutationen kann man den Aufbau solcher Nukleationskerne verändern. Dieser Effekt kann zu Verschiebungen innerhalb des Übergangszustands führen, wodurch Variationen in den  $\Phi$ - bzw.  $\alpha$ -Werten des Proteins entstehen.

Auch Tendamistat besitzt nach der  $\Phi$ -Wert Analyse kaum Bereiche, die im Übergangszustand nativ-ähnlich vorliegen ( $\Phi \ll 1$ ). Als einzige Ausnahme sind hier die Aminosäuren Val36 und Leu44 zu nennen. Val36 nimmt im dritten  $\beta$ -Strang die zentrale Position des hydrophoben



Oberflächenclusters (SEHC) ein. Daß an Position 36 eine nativ-ähnliche Struktur im Übergangszustand vorliegt, korreliert gut mit der hohen Protektionszahl in H-D Austauschexperimenten (Qiwen, 1987). Auch die Abweichungen bei der V36I Mutante, lassen sich in ein solches Modell gut integrieren, da die nötige Flexibilität zur strukturellen Reorganisation des Übergangszustands besteht (Fersht, 1999; Otzen, 1999). Leu44 befindet sich im seitlichen Bereich des zweiten  $\beta$ -Faltblatts und geht so gut wie keine Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren ein. Wie bereits zuvor diskutiert wurde, ist der hohe  $\Phi$ -Wert bei der L44A Mutante möglicherweise auf die Nachbarschaft von Cys45 zurückzuführen.

Blanco gelang es im ersten  $\beta$ -Hairpin I von Tendamistat nativ-ähnliche Strukturen über CD bzw. NMR nachzuweisen (Blanco, 1991). Daher besteht hier die berechtigte Annahme, daß der  $\beta$ -Hairpin, als autonom stabilisierte Einheit des Proteins, im Übergangszustand gut ausgebildet vorliegt. Nach der  $\Phi$ -Wert Analyse liegen jedoch beide Stränge des  $\beta$ -Hairpins im Übergangszustand nicht strukturiert vor (L14A und N25A).

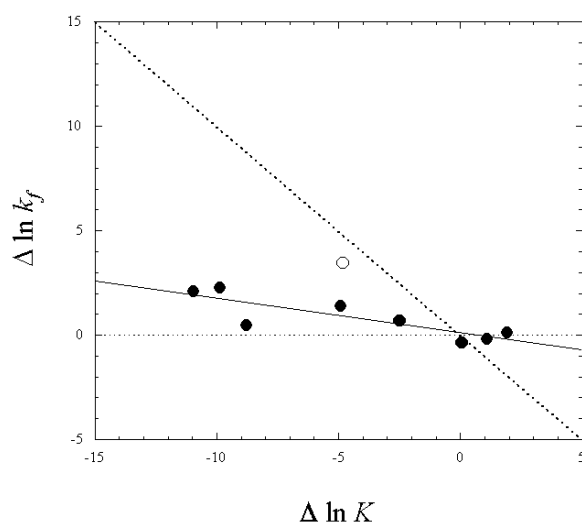


Abbildung 5-7 Brønsted Plot des Tendamistats. Aufgetragen sind die Mutanten L14A, N25A, T32A, V36A, V36I, L44A, I61M, P7AP9AP50A und C11AC27S. Eingezeichnet sind die beiden Brønsted Konstanten  $\beta = 1$  und  $0$  (gestrichelt). Die V36A Mutante wurde nicht zur Regression eingesetzt. Der lineare Fit ergibt sich über die Funktion  $\Delta \ln k_f = \beta \Delta \ln K_{\text{eq}} + \Delta \ln k_f^0$ . Die Brønsted Konstante  $\beta$  beträgt  $0.165$  ( $r = 0.84$ ).

Eine mögliche Erklärung, warum die  $\Phi$ -Werte der Mutanten L14A und N25A so niedrig ausfallen, könnte darin bestehen, daß durch einzelne Mutationen, die zum Aufbau lokaler

Energiebarrieren führen, unterschiedliche Übergangszustände populiert sein können. Daß Mutationen wie Leu → Ala14 oder Asn → Ala25 zu einer drastischen Änderung der Lösungsmittelzugänglichkeit führen, konnte bereits anhand der Tanford Konstanten demonstriert werden (vgl. Abbildung 5-5). Solche multiplen Übergangszustände können beispielsweise durch zwei, zueinander parallel verlaufende Faltungswege entstehen. Im Brønsted Plot, der eine grafische Korrelation zwischen Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten darstellt, konnte jedoch ein linearer Zusammenhang abgeleitet werden (Abbildung 5-7). Daher scheint die Faltung des Tendamistats nicht über parallele Faltungswege, die jeweils unterschiedliche Übergangszustände involvieren, stattzufinden. Führt man diese Betrachtungen weiter, bleibt am Ende nur noch die Möglichkeit, daß es sich um mindestens zwei „produktive“ Übergangszustände handelt, die auf dem Hauptfaltungsweg vorhanden sind und je nach Mutation unterschiedlich stark besetzt werden können. Diese These würde jedoch zumindest einen metastabilen Zwischenzustand (z.B. Intermediat) voraussetzen, der sich jedoch aus den bisherigen Daten nicht ableiten läßt.

Nach der  $\Phi$ -Wert Analyse findet der Aufbau des  $\beta$ -Hairpins erst nach dem Erreichen des Übergangszustands statt. Wie bereits oben diskutiert wurde, werden durch die  $\Phi$ -Wert Analyse im wesentlichen Seitenkettenkontakte von Proteinen angesprochen. Daher ist eine Strukturierung des  $\beta$ -Hairpins durch intramolekulare Wasserstoffbrücken nicht ganz auszuschließen. Dies kann jedoch nur durch Beteiligung weiterer Wechselwirkungen, vor allem von hydrophoben Seitenketten, erfolgen (Muñoz, 1997; Muñoz, 1998). Mit einer Brønsted Konstanten nahe dem 0 Wert ( $\beta = 0.165$ ), liegen jedoch im Übergangszustand des Tendamistats nur wenige solcher Seitenkettenkontakte vor (CI2:  $\beta = 0.36$  und Arc Repressor:  $\beta = 0.22$ ). Dennoch ist der Aufbau des Übergangszustands als *kompakt* anzusehen, was sich anhand der hohen Tanford Konstanten zeigen läßt.

Anhand der bisher untersuchten Mutanten läßt sich ein vorläufiges Faltungsmodell für das Tendamistat ableiten. Der erste Schritt bei der Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors besteht aus einem raschen, unspezifischen Kollabieren der Struktur, als Reaktion auf die veränderten Bedingungen. Wie Arbeiten von Schönbrunner zeigen, findet dabei nicht der Aufbau eines hydrophoben, ANS-bindenden Kernbereichs statt (Schönbrunner, 1997a). Daher liegen in diesem Faltungsabschnitt hydrophobe Seitenketten weiterhin solvatisiert vor. Der Übergangszustand wird erreicht, wenn sich eine kritische Zahl stabilisierender Kontakte konstituieren kann, die den drastischen Entropieeinbruch partiell kompensieren helfen. Solche Kontakte formieren den lose

strukturierten Nukleationskern. Ob sich dieser Nukleationskern unter Beteiligung des SEHC's bildet oder ob im wesentlichen Aminosäuren aus dem vom Lösungsmittel abgewandten Kernbereich des nativen Proteins zu seiner Konstitution beitragen (Ala8, Val12, Val31, V33 und Leu70), läßt sich anhand der bisherigen Daten nicht überprüfen. Computersimulationen an Modellproteinen konnten zeigen, daß Aminosäuren, die an der Konstitution von solchen Nukleationskernen beteiligt sind zu den am meisten konservierten Resten im Protein gehören (Abkevick, 1994; Shakhnovich, 1996). Valin 36 liegt jedoch innerhalb der homologen Proteine nicht konserviert vor. Daher dürfte Valin 36 am Aufbau des Nukleationskernes nur indirekt partizipieren. Auffallend ist weiterhin, daß sämtliche  $\Phi$ -Werte, bis auf Val36, deutlich unterhalb der Tanford Konstanten  $\alpha$  liegen. Dieser Sachverhalt ist konsistent mit der Beobachtung beim CI2, daß ein wesentlicher Teil der Seitenkettenkontakte erst nach Erreichen des Übergangszustands aufgebaut werden können (Itzhaki, 1995). Das schließt auch wichtige Wechselwirkungen innerhalb des  $\beta$ -Haipins mit ein. Die wesentlichen Veränderungen nach Erreichen des Übergangszustands betreffen daher intramolekulare Umlagerungsreaktionen innerhalb einer kompakten, spezifischer werdenden Nukleationsstruktur. Möglicherweise verlaufen diese Reaktionen in mehreren Stufen (sukzessive) mit jeweils unterschiedlichen Energiebarrieren.

#### 5.5.5. Aktivierungsbarriere der Faltung.

In 5 von 100 Mutanten des Chymotrypsin Inhibitors 2 (Oliveberg, 1998) bzw. dem Splicisomen Protein U1A (Otzen, 1999) konnten bei GdmCl-abhängigen Entfaltungsexperimenten Abweichungen von der Linearität im *chevron plot* gefunden werden. Diese zumeist quadratischen verlaufenden Abweichungen sind mit einer, von der aktuellen GdmCl Konzentration abhängigen Veränderung der Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands verbunden (Matouschek, 1995; Otzen, 1999). Ein solches Verhalten konnte aus energetischer Sicht mit einer breiten Aktivierungsbarriere für die Faltung in Einklang gebracht werden. Der Übergangszustand von CI2 oder U1A wird nach diesem Modell durch zahlreiche Ensemble definiert, die über unterschiedliche GdmCl Empfindlichkeiten, jedoch *ähnliche* Energieinhalte verfügen. Kommt es zu einer Erhöhung der GdmCl Konzentration, werden Anordnungen mit nativ-ähnlicher Konformation destabilisiert wohingegen sich solche, die eher dem denaturierten Zustand des Proteins entsprechen, weiter stabilisieren.

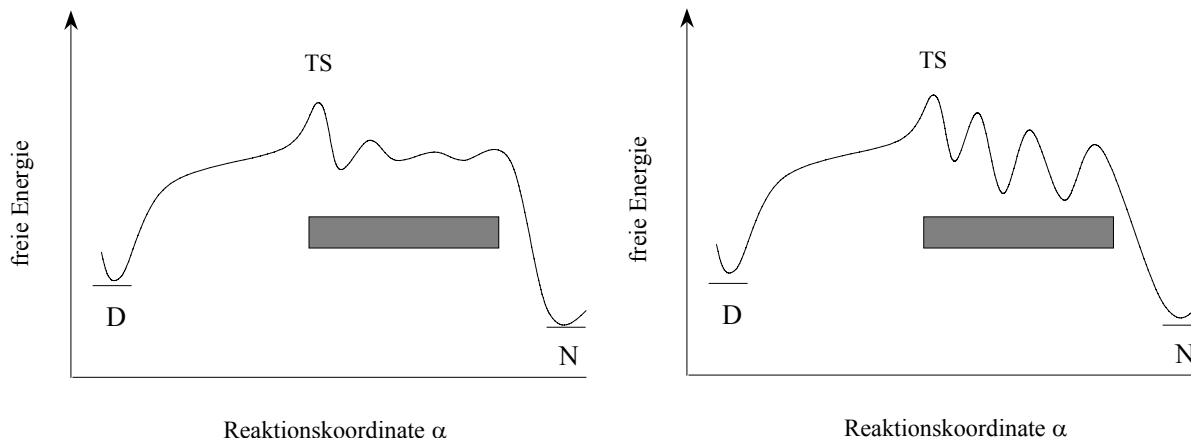


Abbildung 5-8 Reaktionsprofil von Proteinen die nach dem Nukleations-Kondensations Modell ihren nativen Zustand erreichen. Beim Profil *links* kann mit steigender Konzentration von GdmCl, der Übergangszustand (TS) *kontinuierlich* nach N verschoben werden (Balken). Dies entspricht dem Verhalten von U1A. Beim Profil *rechts* bleibt der Übergangszustand unempfindlich gegenüber GdmCl Veränderungen (z.B. Tendamistat). Hier können destabilisierende Mutationen zu einer Verschiebung von TS führen (Balken).

Im Reaktionsprofil kommt es dadurch zu einer Angleichung des Übergangszustands an den Nativzustand, was sich experimentell in einer kontinuierlichen Erhöhung der Tanford Konstanten ( $\alpha = f[\text{GdmCl}]$ ) äußert. Bei U1A erhöht sich beispielsweise die Konstante  $\alpha$  von 0.26 (0M GdmCl) auf 0.84 (8M GdmCl). Im Gegensatz zu CI2 und dem U1A Protein zeigen die *chevron plots* sämtlicher Tendamistat Mutanten nach den bisherigen Messungen keine Abweichungen von der Linearität bei höheren GdmCl Konzentration. Daher würde man bei Tendamistat eher von einer *diskreten* Energiebarriere ausgehen, die unter Einfluß steigender GdmCl Konzentrationen seine Lage beibehält. Dieses Bild ist jedoch nur bedingt als richtig anzusehen, weil diese Annahme eine feste Lage der Energiebarriere bezüglich der Reaktionskoordinate  $\alpha$  voraussetzten würde. Wie die erhaltenen Daten jedoch zeigen konnten, bleibt die Größe von  $\alpha$  bei zahlreichen Mutationen gegenüber den sich verändernden Entfaltungsbedingungen (GdmCl) invariabel. Veränderte  $\alpha$ -Werte treten hingegen immer dann in Erscheinung, wenn Mutationen die Proteinstruktur destabilisieren (z.B. L14A und N25A). Dadurch scheinen im Übergangszustand des Tendamistats zahlreiche diskrete Energiebarrieren vorhanden zu sein, die je nach Mutation weiter stabilisiert bzw. destabilisiert werden können (Abbild 5-8). Eine solche Vorstellung würde

jedoch auch die Existenz metastabiler Zwischenzustände implizieren, die aus experimenteller Sicht jedoch „unsichtbar“ bleiben, weil sie im Vergleich zu U und N nicht populiert werden können.

Bei dem S6 Protein, einem zu U1A strukturell homologen Protein, konnten durch *destabilisierende* Mutationen nicht-Linearitäten im *chevron plot* nachträglich induziert werden (Otzen, 1999). Weitere Untersuchungen am S6 Protein konnten zeigen, daß der Übergangszustand nur dann erreicht werden kann, wenn sich ein *spezifischer*, durch die Wechselwirkung definierter Seitenketten bestimmter Faltungskern zusammenlagert. Solche stabilen Faltungskerne führen im Energieprofil des Übergangszustands zu besonders tiefen Mulden (*“bumps“*), aus denen das Protein nur durch energetisch aufwendige Umlagerungen wieder herausfinden kann. Im Gegensatz dazu ist bei den 5 erhaltenen Varianten des Chymotrypsin Inhibitors (CI2) und dem U1A Protein wegen der *unspezifischen* Struktur des Faltungskernes das Energieprofil im Übergangszustands eher weich (*“smooth“*) aufgebaut. Ein solcher Aufbau ermöglicht es beiden Proteinen, beim Auftreten lokaler Energiebarrieren alternative Ensemble zu besetzen. Daher können hier geringe äußere Veränderungen (z.B. durch Variation der GdmCl Konzentration) leicht zu einer Verschiebung innerhalb von Ensembles mit unterschiedlicher Lösungsmittelzugänglichkeit führen. Im *chevron plot* entstehen dadurch Abweichungen von der Linearität des Entfaltungssastes. Bei Proteinen, die nach dem Nukleations-Kondensations Modell falten und über besser entwickelte „starre“ Faltungskerne verfügen, bleibt die Empfindlichkeit gegenüber GdmCl Veränderungen gering und damit der Entfaltungssast im *chevron plot* linear. Daß dennoch „flache“ Reaktionsprofile bei solchen Proteinen vorliegen müssen, läßt sich durch die Verschiebung der Tanford Konstante, hervorgerufen durch einzelne Punktmutationen, deutlich zeigen. Ähnlich wie bei den meisten Mutanten des Chymotrypsin Inhibitors (CI2) oder dem S6 Wildtyp Protein, ist beim Tendamistat die Lösungsmittelzugänglichkeit des Übergangszustands gegenüber GdmCl Veränderungen unempfindlich. Destabilisierende Mutationen existieren auch im Tendamistat (L14A, N25A, T32A und V36A), doch weisen die *chevron plots* dieser Varianten bis zu hohen GdmCl Konzentrationen keine Abweichungen von der Linearität auf. Daher läßt sich nach den bisherigen Daten für das Tendamistat ein *eher spezifisch* aufgebauter Faltungskern postulieren.

Dennoch kommt beim Tendamistat ein weiterer wichtiger Aspekt hinzu: Im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen verfügt Tendamistat über zwei intakte Disulfidbrücken, die die Flexibilität der Proteinkette deutlich herabsetzen. Dadurch können lokal Energiebarrieren

aufgebaut werden, die sich durch eine Destabilisierung des Proteins nicht mehr aufheben lassen (Otzen, 1999). Die Untersuchung disulfidfreier Tendamistatmutanten könnte hier einen weiteren Einblick in das Profil der Aktivierungsbarriere eröffnen.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat die Faltung von Tendamistat, einem aus 74 Aminosäuren bestehenden  $\alpha$ -Amylase Inhibitor, der von Aschauer (Aschauer, 1981) isoliert und homolog in *Streptomyces lividans* TK24 überexprimiert werden konnte zum Inhalt. Bei der oxidativen Rückfaltung des Tendamistats (vgl. Abbildung 6-1) konnten bisher drei kinetische Phasen ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und  $\tau_3$ ) identifiziert werden (Schönbrunner, 1997a). Die schnelle Phase ( $\tau_3$ ) entspricht der Faltung von Molekülen, bei denen sämtliche Proline in der nativen *trans* Xaa-Pro Konformation vorliegen. Dieser Hauptfaltungsweg wird von etwa 80% der Moleküle durchlaufen. Die anderen beiden Phasen, auch als mittlere ( $\tau_2$ ) bzw. langsame ( $\tau_1$ ) kinetische Phase bezeichnet, resultieren als Folge einer *cis/trans* Isomerisierung um eine der drei Xaa-Pro Bindungen im Tendamistat.

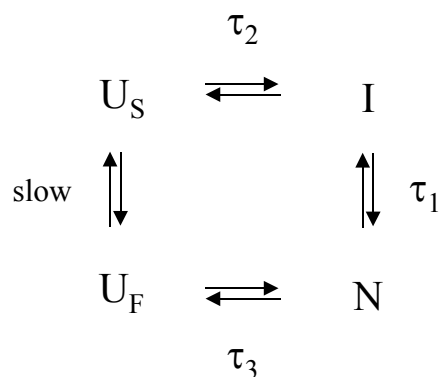


Abbildung 6-1 Bisheriges Schema der Tendamistatfaltung.  $U_S$  und  $U_F$  stellen dabei die schnell bzw. langsam rückfaltende Spezies dar. Bei der Rückfaltung von  $U_S$  nach N kommt es außerdem zur Akkumulation eines Intermediates (I), das nach Isomerisierung um mindestens eine der drei Xaa-Pro Bindungen ebenfalls in die stabilere Nativkonformation (N) übergehen kann.

Wie im *ersten Teil* dieser Arbeit gezeigt werden konnte, entsteht die prolinabhängige Isomerisierungsreaktion als Folge einer *trans*  $\rightarrow$  *cis* Umlagerung um die Ala<sup>49</sup>-Pro<sup>50</sup> Amidbindung. Der Nachweis einer solchen Isomerisierung gelang auf rekombinantem Weg, durch gezielten Austausch der drei Proline im Tendamistat gegen Alanin (Abbildung 6-2). Nach

den hier vorgestellten Ergebnissen führt die Doppelsubstitution in der P7AP9A Mutante nicht zum Verschwinden der langsamen ( $\tau_1$ ) sowie der mittleren ( $\tau_2$ ) Rückfaltungsphase.

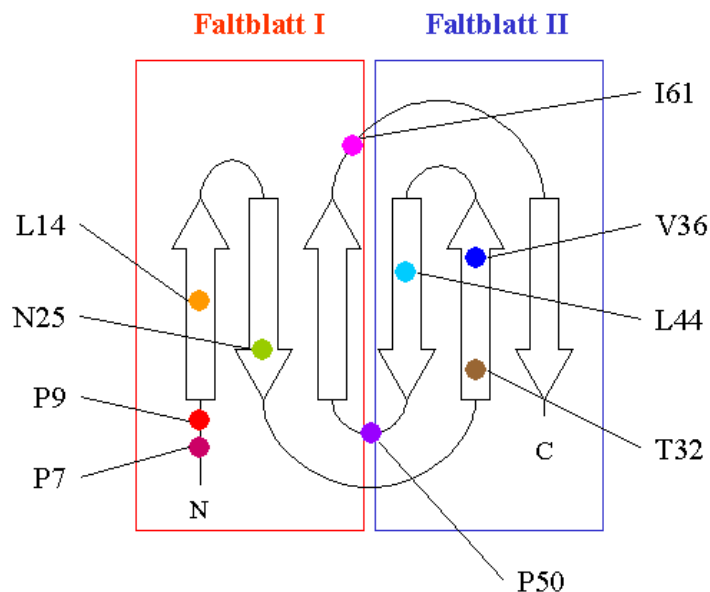


Abbildung 6-2 Topologische Darstellung der Tendamistatstruktur, einschließlich der Lage der in dieser Arbeit eingeführten Mutationen.

Ersetzt man dagegen Prolin 50 durch Alanin, wie das bei den Mutanten P50A bzw. P7AP9AP50A der Fall ist, läßt sich die langsame Rückfaltungsphase ( $\tau_1$ ) nicht länger beobachten. Interessanterweise bleibt die mittlere Rückfaltungsphase ( $\tau_2$ ) von diesem Austausch unbeeinflusst. Das konnte durch Experimente mit dem prolinfreien Tendamistat (P7AP9AP50A) eindeutig gezeigt werden. Ein Verschwinden der Isomerisierungsreaktion ( $U_F \rightleftharpoons U_S$ ) hätte aber nach dem ursprünglichen Faltungsmodell die Akkumulation von I auf dem Nebenfaltungsweg verhindern müssen. Da jedoch die Existenz der mittleren Faltungsphase ( $\tau_2$ ) unabhängig ist von dem Isomerisierungszustand der Proline im Molekül, ist das von Schönbrunner postulierte Vier-Zustandsmodell nicht länger haltbar.

Verglichen mit der Hauptphase wird die mittlere Phase von unterschiedlichen Pufferzusätzen nur wenig beeinflusst. Dieser Effekt spricht für eine isolierte, von der Anordnung der Polypeptidkette unabhängige Reaktion. Desweiteren scheint eine Veränderung in den Solvatationseigenschaften von Wasser keinen Einfluß auf den Übergangszustand und damit auf die Kinetik dieser Reaktion auszuüben. Nach diesen Kriterien verhält sich also die mittlere Rückfaltungsphase des



Tendamistats wie eine *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion, mit dem Unterschied, daß Proline nicht die Ursache für das Entstehen dieser Phase sein können. Um zu untersuchen, ob die mittlere Rückfaltungsphase aus einer weiteren Heterogenität im entfalteten Zustand (U) resultiert, wurde mit dem prolinfreien Tendamistat ein sogenanntes Doppelsprung Experiment durchgeführt. Solche Experimente, die besonders im Zusammenhang mit Prolinisomerisierungen durchgeführt werden, erlauben spezifisch die Entstehung von langsamen Phasen zu untersuchen. Aus den Messungen geht hervor, daß in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unterschiedlich viele Rückfaltungsphasen ( $U_{\text{all}} \rightleftharpoons U_{\text{Xaa-Yaa}}$ ) beim prolinfreien Tendamistat auftreten. Bei einer Inkubationsdauer von bis zu 38msec beobachtet man lediglich eine Rückfaltungsphase ( $U_{\text{all}} \rightarrow N_{\text{all}}$ ). Verlängert man die Inkubationsdauer, kann eine zweite Rückfaltungsphase beobachtet werden, die sich hinsichtlich der Kinetik deutlich von der Hauptphasenreaktion unterscheidet ( $U_{\text{Xaa-Yaa}} \rightarrow U_{\text{all}} \rightarrow N_{\text{all}}$ ). Nach diesen Ergebnissen kommt es im entfalteten Tendamistat zu einer Prolin-unabhängigen Isomerisierungsreaktion. Auf Grundlage dieser Ergebnisse läßt sich ein neues Faltungsmodell für das Tendamistat aufbauen (vgl. Abbildung 6-3), das ohne die Einbeziehung von Faltungsintermediaten auskommt.

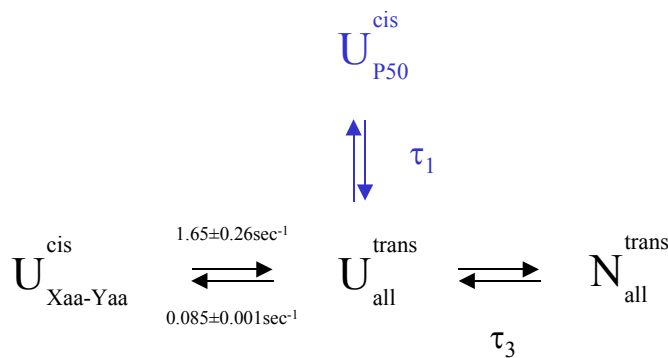


Abbildung 6-3 Nach den Ergebnissen dieser Arbeit erhaltenes Schema für die Tendamistatfaltung.  $U_{\text{all}}$  und  $U_{\text{P50}}$  stellen dabei die schnell bzw. langsam rückfaltende Spezies dar. Zusätzlich dazu kommt es infolge einer Prolin-unabhängigen Isomerisierungsreaktion zur Bildung von  $U_{\text{Xaa-Yaa}}$ . Diese Spezies verursacht die mittlere Rückfaltungsphase, die ursprünglich dem Übergang von  $U_{\text{langsam}}$  nach I zugeschrieben wurde (vgl. Abbildung 6-1).

Auf Grund vorhandener Strukturinformationen kann das Vorhandensein von *cis*-Bindungen im nativen Molekül als Ursache für eine solche Reaktion ausgeschlossen werden. Solche Bindungen

würden darüberhinaus zu stark verlangsamten und in ihrer Amplitude wesentlich deutlicher in Erscheinung tretenden Rückfaltungsphasen führen. Die aus den Experimenten abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten lassen vielmehr die Vermutung zu, daß es sich bei der mittleren Rückfaltungsphase um eine Prolin-unabhängige *cis/trans*-Isomerisierungsreaktion handelt. Diese Hypothese konnte auch durch Vergleich mit zahlreichen Literaturdaten und Experimenten gestützt werden. Nimmt man ferner 0.1% (Ramachandran, 1976) als die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer solchen *cis* Xaa-Yaa Peptidbindung (Xaa, Yaa  $\neq$  Pro) an, so läßt sich für die vorhandenen 73 Amidbindungen im Tendamistat ein maximal möglicher *cis* Anteil von 7% ( $1 - 0.999^{73}$ ) errechnen. Experimentell konnte für die mittlere Phase ein durchschnittlicher Wert (Amplitude) von 5% erhalten werden. Beide Werte stimmen gut überein und bestätigen die aufgestellte Hypothese über die Natur der mittleren Rückfaltungsphase. Tendamistat ist damit das erste Protein, für das die Beteiligung von nicht-Prolin Isomerisierungen an der Faltung nachgewiesen werden konnte.

Häufig werden auf der Oberfläche von  $\beta$ -Proteinen kompakte, zentrosymmetrisch angeordnete Strukturen vorgefunden, die man auch als hydrophobe Oberflächencluster bezeichnet (Tisi, 1995). Auch Tendamistat besitzt in der Mitte des zweiten  $\beta$ -Faltblatts um Position 36 einen solchen Oberflächencluster. Wie mit Hilfe von Substitutionsexperimenten im *zweiten Teil* dieser Arbeit gezeigt werden konnte, trägt dieser Oberflächencluster entscheidend zur Stabilisierung des Inhibitors bei. Die dabei gemessenen Stabilisierungsbeiträge unter Gleichgewichtsbedingungen stehen in linearem Verhältnis zum Seitenkettenvolumen der eingeführten Aminosäuren (Alanin  $\ll$  Valin  $\ll$  Isoleucin). Hierdurch konnte erstmals gezeigt werden, daß der stabilisierende Einfluß der von solchen Clustern ausgeübt wird, im Wesentlichen auf das Vorhandensein von hydrophoben Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Zusätzlich dazu haben Veränderungen im Inneren des Clusters einen deutlichen, von der jeweiligen Mutation abhängigen Einfluß auf die Höhe Aktivierungsbarriere. Beispielsweise wirken sich 74% des unter Gleichgewichtsbedingungen erhaltenen Destabilisierungsbetrages bei der V36A Mutante (8.6kJ/mol) als Erhöhung auf die Aktivierungsbarriere aus. Diese enge Korrelation zwischen freier Enthalpie ( $\Delta\Delta G_{N-D}^{\circ}$ ) auf der einen und Aktivierungsbarriere ( $\Delta\Delta G_{D-TS}$ ) auf der anderen Seite ( $\Phi$ -Wert Analyse) zeigt, daß bereits weite Teile des hydrophoben Oberflächenclusters im Übergangszustand in einer nativ-ähnlichen Struktur vorliegen. Analoge Experimente mit der V36I Mutante führten jedoch zu einem gegenteiligen Ergebnis. In diesem Fall wirken sich lediglich 16% des erhaltenen

Stabilisierungsbetrages als Erniedrigung auf die Aktivierungsbarriere aus. Anders als bei der V36A Mutante sollte somit bei der V36I Mutante der Bereich um die Mutation im Übergangszustand im wesentlichen ungeordnet vorliegen. Eine Möglichkeit, die sich widersprechenden Aussagen miteinander in Einklang zu bringen, besteht darin, parallele Faltungswege zu postulieren, die je nach Mutation unterschiedlich stark populiert sein können. Wie jedoch anhand des Brønsted-Plots gezeigt werden konnte, ist diese Möglichkeit beim Tendamistat nicht gegeben. Vielmehr sprechen die erhaltenen Ergebnisse für ein Modell, bei dem sich der Übergangszustand aus zahlreichen, energetisch voneinander abweichenden Anordnungen der Proteinkette zusammensetzt, die je nach Mutation unterschiedlich stark besetzt werden können. Auf Grundlage eines solchen Modells wird die faltungsinitiierende Bedeutung des hydrophoben Oberflächenclusters beim Tendamistat zugleich relativiert.

Für die Faltung von Proteinen, die ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblättern bestehen, spielt die Bildung von  $\beta$ -Hairpinstrukturen eine entscheidende Rolle (Finkelstein, 1991; Dill, 1993). Wie bereits von Schönbrunner gezeigt werden konnte, kommt dem  $\beta$ -Hairpin I im Tendamistat bei der Stabilisierung der  $\beta$ -barrel Struktur eine wichtige Funktion zu (Schönbrunner, 1997b). Auch die in dieser Arbeit untersuchten  $\beta$ -Hairpinmutanten L14A bzw. N25A führen zu einer drastischen Destabilisierung des Tendamistats (Wildtyp:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -34.04 \text{ kJ/mol}$ ; L14A:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -15.18 \text{ kJ/mol}$  und N25A:  $\Delta G^{\circ}_{eq} = -10.12 \text{ kJ/mol}$ ). In beiden Fällen sind es vor allem die Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltungreaktion, die infolge der Substitution signifikant ansteigen. Dadurch wirkt sich der destabilisierende Einfluß beider Substitutionen erst nach Erreichen des Übergangszustands auf die Proteinstruktur aus. Durch Vergleich der Aktivierungsenergien ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{D-TS}$ ) mit den freien Enthalpien ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) konnte die strukturelle Entwicklung des  $\beta$ -Hairpins im Übergangszustand an den beiden Positionen 14 bzw. 25 mitverfolgt werden ( $\Phi$ -Wert Analyse). Entgegen den Erwartungen zeigen diese Untersuchungen, daß beide Positionen im Übergangszustand noch weitestgehend solvatisiert vorliegen. Damit scheint die nativ-ähnliche Zusammenlagerung des  $\beta$ -Hairpins I erst nach Erreichen des Übergangszustands stattzufinden. Dies betrifft auch die hochkonservierte und zur Stabilisierung von  $\beta$ -barrel Strukturen typische Asparagin Umkehrschleife an Position 25 (*asparagin corner*). Gegen die Annahme einer fest etablierten  $\beta$ -Hairpinstruktur im Übergangszustand spricht auch die aus den Faltungskinetiken ableitbare Veränderung der Lösungsmittelzugänglichkeit  $\alpha$ . Unabhängig von der Lage einzelner Substitutionen (vgl. Abbildung 6-2) kommt es in Bezug auf

$\alpha$  stets zu einer lediglich von der Stabilität des Proteins ( $\Delta\Delta G^{\circ}_{eq}$ ) abhängigen Verschiebung des Übergangszustands. Mutationen im Bereich des  $\beta$ -Hairpins I bilden dabei keine Ausnahme. Definiert man die Größe  $\alpha$  als Reaktionskoordinate, entsprechen die dabei erhaltenen Veränderungen hinsichtlich der Lage des Übergangszustands dem *Hammond Postulat*. Solche Verschiebungen, induziert durch kleinste „Störungen“ im Molekül, weisen auf eine breite Aktivierungsbarriere zwischen dem denaturierten und dem nativen Zustand des Proteins hin. Strukturell läßt sich ein solcher Aufbau durch zahlreiche, ineinander umwandelbare Konformationsanordnungen wiedergeben (Otzen, 1999; Fersht, 1999). Rückfaltungsexperimente an der I61M Mutante ermöglichten darüberhinaus, die Entwicklung des  $\beta$ -Hairpins I direkt mitzuverfolgen. Eine bereits im Übergangszustand der Proteinfaltung fest etablierte Struktur hätte bei der I61M Mutante zu einem diskontinuierlichen Verlauf der Fluoreszenzamplitude führen müssen. Wie jedoch anhand der Messungen eindeutig gezeigt werden konnte, läßt sich ein solcher Verlauf im gesamten Zeitfenster nicht beobachten. Daher verläuft die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors über einen Mechanismus, bei dem sich die Strukturbildung in einzelnen Elementen (z.B.  $\beta$ -Hairpin I) simultan mit der Faltung des Proteins vollzieht.

Alle in dieser Arbeit vorgelegten Daten über die Faltung des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors sind konsistent mit dem Nukleations-Kondensations Modell (Abkevich, 1994; Itzhaki, 1995; Fersht; 1995; Fersht; 1999). Analog der Tröpfchenbildung bei unterkühlten Gasen kommt es nach dem kollabieren der Proteinkette als Reaktion auf die veränderten Lösungsmittelbedingungen zur intramolekularen Suche nach Nukleationsstellen (Pound, 1972; Pande, 1998). Der Übergangszustand wird erreicht, wenn sich eine kritische Zahl stabilisierender Kontakte (*unspezifische Nukleation*) ausbilden konnte. Ob an einem solchen Nukleationskern stets bestimmte Seitenketten beteiligt sind (*spezifische Nukleation*), bleibt an dieser Stelle noch offen. Zur Klärung dieser wichtigen Frage, sollten in Zukunft weitere Mutationen in das Protein eingeführt und deren Auswirkungen auf Kinetik und Stabilität untersucht werden.

## 7. Abkürzungen

$\alpha$	Tanford Konstante, Lösungsmittelzugänglichkeit
A	Signalamplitude
AA	Acrylamid
A. dem.	Demineralisiertes Wasser
A. dest.	Demineralisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
$\beta$	Brønsted Konstante
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BIS	N',N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder-)
°C	Grad-Celsius
CD	Circulardichroismus
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-propansulfonsäure
$\Delta$ CP	Änderung der Wärmekapazität pro Formelumsatz
CPG	Controlled pore glass
CI2	Chymotrypsin Inhibitor 2
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cis	Konformationszustand
Cys	Cystein
CV	Colum volume, Säulenvolumen
d	Tag
D	Denaturierter Zustand
Da	Dalton
deg	Degree, Grad
DC	Dünnschichtchromatographie
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Dimethyltrityl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Double-stranded DNA (doppelsträngige-)
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
eq	unter Gleichgewichtsbedingungen
ESI	Elektronen Spray Ionisierung
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FPLC	Fast Performance Liquid-Phase Chromatography
$\Delta G^\circ$	Freie Standard-Bildungsenthalpie pro Formelumsatz
$\Delta\Delta G^\circ$	Differentielle freie Standard-Bildungsenthalpie pro Formelumsatz
$\Delta G^\circ(\text{H}_2\text{O})$	Freie Standard-Bildungsenthalpie extrapoliert gegen $\text{H}_2\text{O}$ pro Formelumsatz

$\Delta G^{\circ\#}_f$	Freie Standard-Aktivierungsenthalpie der Faltung pro Formelumsatz
$\Delta G^{\circ\#}_u$	Freie Standard-Aktivierungsenthalpie der Entfaltung pro Formelumsatz
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
$\Delta H^\circ$	Standard Reaktionsenthalpie pro Formelumsatz
His	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
I	Intermediat
IEX	<i>Ion-exchange chromatography</i>
LiCl	Lithiumchlorid
Ile	Isoleucin
k	Geschwindigkeitskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
$^\circ\text{K}$	Grad-Kelvin
$\lambda$	Wellenlänge, zumeist in nm
$\lambda_i$	Apparente Geschwindigkeitskonstante der Phase i
Leu	Leucin
Lys	Lysin
$\Delta m$	Differentielle Steigung
$m_{eq}$	Steigung der Übergangskurve unter Gleichgewichtsbedingungen
$m_f$	Steigung des Rückfaltungssastes
$m_u$	Steigung des Entfaltungssastes
MALDI	<i>Matrix Associated Laser Desorption Ionisation</i>
MES	2-(Morpholino)-ethansulfonsäure
Met	Methionin
MeOH	Methanol
MOPS	3-(Morpholino)-propansulfonsäure
mdeg	<i>Millidegree</i> , Milligrad (1mdeg = $10^{-3}$ deg)
ms	Millisekunden
msec	Millisekunden
Mw	Molekulargewicht
N	Nativzustand
NaCl	Natriumchlorid
NBT	p-Nitrobluetetrazoliumsazl
Neo	Neomycin, Neomycinresistenzgen
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	Optische Dichte
ORI	<i>Origin of replication</i> , Replikationsstart
p.a.	<i>Pro analysis</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Phe	Phenylalanin
$\Phi$	Größe zur Charakterisierung von Übergangszuständen
[ $\Theta$ ]	Circularer Dichroismus in mdeg
[ $\Theta$ ] <sub>MRE</sub>	Mittlere Elliptizität pro Rest
Pro	Prolin
Pro.	Promotor
r	Radius
$r_k$	kritischer Radius
RBS	Ribosomale Bindungsstelle

RCM	<i>Reduced and carboxymethylated</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rotation per min.</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
$\Delta S^\circ$	Standard Reaktionsentopie pro Formelumsatz
<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEHC	<i>Small exterior hydrophobic cluster</i>
Ser	Serin
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> (einzelsträngige-)
SSeq	Signalsequenz
$T_m$	Übergangstemperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N',N',N',N'-Tetramethyldiamin
Term.	Terminator
TES	2-(Tris(hydroxymethyl)-methylamino)-ethansulfonsäure
TFE	Trifluorethanol
TOF	<i>Time of flight</i> , in Zusammenhang mit MALDI-TOF
trans	Konformationszustand
Tricine	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
TS	<i>Transition State</i> , Übergangszustand
TS <sub>1</sub>	<i>Transition State 1</i> , Übergangszustand 1
tsr	Thiostrepton
Tyr	Tyrosin
U	Entfalteter Zustand
U <sub>1</sub>	Entfalteter Zustand 1, thermodynamisch oder kinetisch charakterisierbar
U <sub>schnell</sub>	Zustand der für die schnelle Rückfaltung nach N verantwortlich ist
U <sub>langsam</sub>	Zustand der für die langsame Rückfaltung nach N verantwortlich ist
U1A	Splicisomen Protein
u	<i>Units</i> , Einheiten
ÜN	Über Nacht
ÜNR	Über-Nacht-Rollerkultur
upm	Umdrehungen pro Minute
Urea	Harnstoff
UV	Ultraviolett, ultravioletter Wellenlängenbereich
Val	Valin
VIS	<i>Visible</i> , sichtbarer Wellenlängenbereich
W	Watt
w/v	<i>Weigt per volume</i> , Masseneinheit pro Gewichtseinheit
Xaa	Abkürzung für beliebige Aminosäure

## 8. Material und Methoden

### 8.1. Geräteliste

Autoklaven	Fedegari FVB und FBS
Brutschränke	Heraeus Christ B5100E und B5090E
DNA-Synthesizer	Applied Biosystems 310, Perseptive Biosystems Expedite
ELISA-Reader	Titertek Biosystems
FPLC-System	Pharmacia
Geltrockner	Biotek Fischer
HPLC	Merck, Waters, Sykam
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Incubator/Shaker G25
Kapillarelektrophorese	Beckman, P/ACE 2000
Kühlzentrifugen	Sorvall RC-5B mit GSA, GS3 und SS-34-Rotor
Sofortbildkamera	Polaroid MP4 Land Camera
Spannungsgeber	Pharmacia ECPS 3000/150, Biotec Fisher, Pherostab
Speed Vac Concentrator	Bachofer Laboratoriumsgeräte
Fluoreszenzphotometer	Hitachi F-4500
CD-Spektralanalysator	Jasco J-710
Stopped-Flow	Applied Photophysics SX18MV
Spektralphotometer	Varian, Cary 118
Sterile Werkbank	Heraeus Lamin-Air
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge A mit Microtube Rotor
Trockensterilisator	Heraeus ST 6200
Ultraschallbad	Branson 32
Ultrazentrifuge	Beckman L8-70 M
UV-Lampe	CAMAG
UV-VIS Photometer	Cary1, VARIAN
Wasseraufbereitung	Millipore, Milli-Q mit Organex Kartusche



	Gesellschaft für Labortechnik
Western Blot-Apparatur	CTI GmbH
Elektrophorese-Apparaturen	Hoefer, Mighty-Small (10cm x 8cm)
Elektrophorese von Agarosegelen	BRL-Nachbau mit einem Elektrodenabstand von 34 cm, passend für Gelkammern mit einer Breite 15 cm und Länge bis zu 30 cm
Elektrophorese von PAA-Gelen	BRL-Nachbau, passend für Gießkassetten mit den Maßen 20 x 20 cm, Dicke je nach Spacer 0.08 cm oder 0.1 cm

## 8.2. Laborchemikalien

Acrylamid	Roth
Agar (Bacto-)	Difco
Agarose HE	Roth
Agarose NA	Pharmacia
Ammoniumsulfat, p.a.	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Fluka
Ampicillin	Fluka
8-Anilino-1-naphthalinsulphonat (ANS)	Fluka
DATP, dCTP, dGTP und dTTP (100 mM)	Pharmacia
(BCA)	Fluka
Beef Extract	Difco
Bis-Acrylamid	Roth
Bis-Tris	Fluka
Borsäure, p.a.	Fluka
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphat, BCIP	Sigma
Bromphenolblau	Serva
BSA, rein	Serva
Calciumchlorid-hexahydrat, Lebensmittelqualität	Merck
CAPS	Sigma

---

Casaminoacids	Difco
Caseinpepton	Sigma
Chloroform, p.a.	Merck
Chromozym TH	Boehringer
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Blue R)	Serva
DMF, p.a.	Aldrich
DMSO, 99 %	Janssen
DNSS-Reagenz	Merck
DTE, kristallin	Sigma
Eisen (III)-chlorid-hexahydrat, p.a.	Merck
Eisen (II)-sulfat-heptahydrat, p.a.	Serva
EDTA (di-Natriumsalz), p.a.	Serva
EDTA (tetra-Natriumsalz), rein	Serva
Ethanol, absolut	Merck
Ethidumbromid, für biologische Zwecke	Merck
32% Formaldehyd	Merck
Formamid	Serva
Glucose-monohydrat, für biologische Zwecke	Roth
Glycerin > 86 %	Roth
Glycin	Degussa
Guanidinium-Hydrochlorid (GdmCl)	ICN
Harnstoff, für biologische Zwecke	Merck
Histidin	Fluka
8-Hydroxychinolin, p.a.	Merck
Isoamylalkohol, p.a.	Merck
Jod, p.a.	Riedel-de-Haen
Kaliumacetat, p.a. (>99 %)	Fluka
Kaliumchlorid, p.a. (>99 %)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Di-Kaliumhydrogenphosphat, p.a. (>99 %)	Fluka
Kaliumjodid, reinst	Merck
Kalium-Natrium-Tartrat	Merck

---

Kaliumsulfat, zur Analyse	Merck
Kupfer (II)-sulfat-hexahydrat	Fluka
Kupfer (II)-chlorid-dihydrat, p.a.	Merck
Magnesiumchlorid-hexahydrat, reinst	Merck
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck
Malt Extract Broth	Difco
Mangan (II)-chlorid-dihydrat, p.a.	Merck
$\beta$ -Mecaptoethanol, p.a.	Merck
MES, p.a.	Merck
Methanol für die UV-Spektroskopie	Merck
Methanol, für die Chromatographie	Merck
Mineralöl, light white oil	Sigma
MOPS, p.a.	Sigma
Natriumacetat, >99.5 %	Merck
Natriumazid, reinst.	Merck
Natriumcacodylat	Fluka
Natriumcarbonat	Fluka
Natriumchlorid, p.a.	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, p.a.	Roth
Natriumhydroxid, p.a.	Roth
Natriumtetraborat-decahydrat, p.a.	Serva
Neomycin-trisulfat-trihydrat, >90 %	Fluka
PEG 8000	Fluka
PEG 6000	Serva
PEG 2000	Fluka
(Bacto-) Pepton	Difco
Phenol, p.a.	Merck
PMSF	Sigma
L-Prolin, für biologische Zwecke	Merck
D(+)-Saccharose, >99.5 %	Roth

SDS, 99 %, 2x krist.	Roth
Silbernitrat, reinst.	Merck
TCA, purum, >99 %	Fluka
TEMED, reinst.	Serva
TES	Sigma
Thiostrepton, 960 U/mg	E.R. Squibb&Sons
Tricine, p.a.	Serva
Trifluorethanol, p.a.	Fluka
Tris, p.a.	Serva
Tris. Research grade	Serva
Triton X-1000	Sigma
(Bacto-)Trypton	Difco
TSB	Difco
Xylencyanol FF, pract.	Serva
Yeast Extract	Difco
Zink (II)-chlorid, p.a.	Merck
Wasser (D <sub>2</sub> O)	
Wassser (H <sub>2</sub> O)	
-A.dem.	Demineralisiertes Wasser
-A.dest.	A.dem. über die MilliQ-Wasseraufreinigungsanlage

### 8.3. Enzyme

CIP (Calf Inestinal Phosphatase)	New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs
Ovalbumin, krist.	Pharmacia
$\alpha$ -Chymotrypsinogen	Pharmacia
Trypsin, sequencing grade	Sigma
Taq Polymerase	Perkin Elmer
Vent (exo <sup>-</sup> ) Polymerase	New England Biolabs
Vent Polymerase	New England Biolabs

Lysozym, aus Hühnereiweiß, krist.	Serva
Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs
RNase A aus Rinderpankreas	Boehringer

## 8.4. Bakterienstämme

### (i) *Escherichia coli* K12

BMH71-18 mutS (*thi*, *supE*,  $\Delta$ (*lac-proAB*), [*mutS:Tn10*][*F'*, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *lac*<sup>g</sup> $\Delta$ M15])

DH5 $\alpha$  (*sup E44*,  $\Delta$ *lac UI69*, ( $\phi$  80*dlac*  $\Delta$ (*lacZ*) M15, *hsdR17*(*r<sub>k</sub>m<sup>+</sup>*), *recA1*, *endA1*, *thi gyrA96*, *relA1*)

### (ii) *Streptomyces lividans* 66

TK24 (Hopwood, 1983), *str<sup>-b</sup>*

## 8.5. Plasmide

### (i) *E. coli*

**pT136**: pUC19-Derivat mit natürlichem Tendamistatgen und Signalsequenz; zusätzliche Spe I-Schnittstelle.

**pSHAP7AP9A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P7AP9A).

**pSHAP50A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P50A).

**pSHAP7AP9AP50A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P7AP9AP50A).

**pSHAL14A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (L14A).

**pSHAN25A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (N25A).

**pSHAT32A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (T32A).

**pSHAV36A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (V36A).

**pSHAV36I**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (V36I).

**pSHAL44A**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (L44A).

**pSHAI61M**: wie pT136, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (I61M).

### (ii) Shuttlevektoren *E. coli* und *S. lividans*

**pAX5a**: Derivat aus pUC19 und pIJ702; *ermEup* Promotor, Terminator, Tendamistatgen und Signalsequenz.

**pHAP7AP9A**: wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P7AP9A).

**pHAP50A**: wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P50A).

**pHAP7AP9AP50A**: wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (P7AP9AP50A).

**pHAL14A:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (L14A).

**pHAN25A:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (N25A).

**pHAT32A:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (T32A).

**pHAV36A:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (V36A).

**pHAV36I:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (V36I).

**pHAL44A:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (L44A).

**pHAI61M:** wie pAX5a, über SpeI und EcoRI einkloniertem Tendamistat-Derivat (I61M).

## 8.6. Molekulargewichtsmarker

### (i) DNA-Molekulargewichtsmarker

$\lambda$ -DNA/BstE II, Fragmentgrößen (kb): 8.45, 7.24, 6.36, 5.68, 4.82, 4.32, 3.67, 2.32, 1.93, 1.37, 1.26, 0.7, 0.22 und 0.12.

$\lambda$ -DNA/EcoR I/Hind III, Fragmentgrößen (kb): 21.23, 5.2, 4.97, 3.5, 2, 1.9, 1.58, 1.38, 0.95, 0.83 und 0.56.

pBluescript II KS+/Hae III, Fragmentgrößen (b): 602, 458, 434, 290, 267, 243, 174, 142, 102, 80, 79, 60, 18 und 11.

### (ii) Protein-Molekulargewichtsmarker

PMW-Marker (Sigma), Bandengröße (kDa): 17.2, 14.66, 10.8, 8.3, 6.4 und 2.5

LR-Marker (Promega), Bandengröße (kDa): 31, 20.4/19.7, 16.9, 14.4, 8.1, 6.2 und 2.5

LMW-Marker (Sigma), Bandengröße (kDa): 66, 45, 36, 29, 24, 20.1 und 14.2

LMW-Marker (BioRad), Bandengröße (kDa):

## 8.7. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Zur Vermeidung jeglicher Kontaminationen sollten alle Arbeitsmethoden, die mit Mikroorganismen zu tun haben, unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt werden. Sämtliche Gerätschaften, die in Berührung mit Kulturen stehen sollen, müssen bei 180°C für 2-5 Stunden sterilisiert werden. Alle verwendeten Medien behandelt man mit gespanntem Wasserdampf bei 121°C innerhalb von 30min in einem Autoklaven. Auch durch das Verwenden eines Membranfilters (0.2 $\mu$ m) kann eine Sterilisation erreicht werden.

Die Beseitigung sämtlicher, biologisch kontaminierter Abfallprodukte erfolgt ebenfalls durch Autoklavieren.

## 8.7.1. Arbeiten mit *E.coli*

### 8.7.1.1. Lösungen und Puffer

#### **Ammoniumacetat (10M)**

77.08g Ammoniumacetat werden über Nacht in 100ml dest. Wasser gelöst und durch Filtration sterilisiert.

#### **Ampicillin (25mg/ml)**

2.5g Ampicillin und 247.5mg NaOH werden auf 100ml mit A. dem. aufgefüllt. Nach dem Auflösen wird sterilfiltriert und auf 4ml aliquotiert. Die Lösung wird bei -20°C aufbewahrt. Für Flüssigmedium und Agarplatten stellt man auf eine Endkonzentration von 100µg/ml im Medium ein.

#### **CaCl<sub>2</sub> (70mM)**

15.34g CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O auf 1l A. dem. auffüllen und autoklavieren.

#### **EDTA (0.5M)**

196.1g wasserfreies EDTA werden in 900ml dest. Wasser gelöst und auf pH8.0 eingestellt. Die Lösung wird auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert.

#### **Glycerin Lösung (80%)**

80g Glycerin werden mit dest. Wasser auf 100ml aufgefüllt und autoklaviert.

#### **Kaliumacetat (5M)**

28.6ml konz. Essigsäure werden mit dest. Wasser auf 75ml aufgefüllt und auf Eis solange mit 4N KOH versetzt, bis pH4.7 erreicht wird.

#### **KOH (4N)**

224g festes KOH werden unter Kühlung in 1000ml dest. Wasser eingerührt.

#### **LB-Medium**

10g Bactotrypton, 5g Yeast Extract und 10g NaCl werden mit Leitungswasser auf etwa 800ml gefüllt, mit 10 Tropfen 10N NaOH auf pH 7.5 eingestellt und mit Leitungswasser auf 1l aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung ohne Antibiotikum bei RT, die Lösung mit Antibiotikum bei 4°C gelagert.

**LB-Platten**

siehe LB-Medium; zusätzlich gibt man 15g Bactoagar vor dem Autoklavieren hinzu. Bei Antibiotikazusatz temperiert man die Lösung auf 60°C, setzt das Antibiotikum hinzu, gießt die Platten und läßt selbige bei 37°C 1d trocknen. Die getrockneten Platten werden bei 4°C aufbewahrt.

**MgCl<sub>2</sub> (2M)**

40.6g MgCl<sub>2</sub>·x(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> werden in 100ml dest Wasser gelöst und steril filtriert.

**NaOH (2N)**

40g NaOH mit dest. Wasser auf 500ml auffüllen.

**Phenolstammlösung**

400g Phenol bei 68°C schmelzen und 400mg 8-Hydroxychinolin (0.1%) zugeben, dreimal mit 1M Tris-HCl (pH 8) und viermal mit 0.1M Tris-HCl (pH 8) jeweils mit gleichem Volumen extrahieren. Der pH-Wert der wäßrigen Phase sollte größer 7.6 sein. Die Gebrauchslösung wird bei 4°C gelagert.

**Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)**

Eine Lösung aus 24Vol Chloroform und 1Vol Isoamylalkohol wird 1:1 mit Phenolstammlösung gemischt. Die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt.

**RNase A-Stammlösung**

500mg RNase A werden in 50ml einer Lösung, die 10mM an Tris-HCl und 15mM an NaCl (pH 7.5; in A. dest.) ist, gelöst, 15min bei 100°C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt. Anschließend aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

**SDS (10%)**

25g SDS in 200ml A. dem. bei 68°C lösen und mit konz. HCl auf pH 7.2 einstellen. Anschließend auf 250ml auffüllen und bei RT lagern.

**SDS/NaOH (1%/0.2N)**

100ml 10%-ige SDS-Lösung und 100ml 2N NaOH werden auf 1l mit dest. Wasser aufgefüllt und bei RT gelagert.

**TE-Puffer 5/0.1**

5ml 1M Tris-HCl pH 8 und 0.2ml 0.5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. Aufgefüllt auf 1l, autoklaviert und bei RT deponiert.



**TE-Puffer 10/1**

10ml 1M Tris-HCl (pH 8) und 2ml 0.5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. Aufgefüllt auf 1l, autoklaviert und bei RT gelagert.

**Tris-Stammlösung (1M, pH8.0)**

121.1g Tris werden in ca. 800ml A. dem. gelöst und mit konz. HCl auf pH 8 eingestellt. Nach dem Auffüllen auf 1l wird die Lösung autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

**TSS-Puffer**

10g PEG8000 werden in 99ml LB-Medium gelöst und mit 1ml 2M MgCl<sub>2</sub> Lösung versetzt. Der pH-Wert dieser Lösung wird auf 6.5-6.8 eingestellt und steril filtriert. Vor Anwendung werden 19 Teile dieser Lösung mit einem Teil DMSO (p.a.) vermischt und eingesetzt.

**8.7.1.2. Stammhaltung (backup)**

Für die Stammhaltung verwendet man 750µl einer Rollerkultur in LB+Amp. Medium, die mit 250µl einer 80% (w/v) sterilen Glycerin-Lösung vermischt und bei -80°C tiefgefroren wird.

**8.7.1.3. Über-Nacht-Rollerkultur (ÜNR)**

Dazu wird 2-5ml LB+Amp . Medium in ein steriles Reagenzglas mit Kappe eingefüllt und mit dem anzuziehenden Klon unter sterilen Bedingungen beigeimpft. Als Impftechnik hat sich dabei am besten die Benutzung von vorsterilisierten Zahnstochern bewährt. Die so beigeimpfte Kultur wird im Rollinkubator über Nacht bei 37°C belassen.

**8.7.1.4. Kompetente Zellen I**

Bei der Herstellung von kompetenten Zellen zur DNA-Transformation geht man von einer 5ml LB ÜNK des zu verwendenden Stammes (z.B. MC 1061) aus und beigeimpft mit diesem frühzeitig 250ml desselbigen Mediums. Bis zum Anwachsen der Zellkultur auf 1.0 OD (logarithmische Wachstumsphase) verbleibt der Fernbachkolben im Schüttler bei 37°C und 250-300rpm. Die Messungen erfolgen zunächst stündlich, dann in immer kürzeren Intervallen bei einer Lichtwellenlänge von 600nm. Anschließend werden die Zellen in GSA-Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C, 6000rpm pelletiert. Der Zellkörper wird in der Kälte mit 100ml 70mM

CaCl<sub>2</sub> gut resuspendiert. Diese Suspension zentrifugiert man, wie schon oben beschrieben und beläßt, nach erneuter Aufnahme mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung das ganze etwa 30min auf Eis. Die so gewaschenen erneut pelletierten Zellen werden in 10ml kalter 70mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung, der man 1.46g Glycerin zugesetzt hat, aufgenommen und auf 200µl aliquotiert. Das Einfrieren erfolgt durch Schockgefrierung der Zellsuspension mit flüssigem Stickstoff.

Eine weitere Variante geht von einer 5ml ÜNRK aus und beimpft anschließend damit 500ml Nährmedium. Die Zellen läßt man bei diesem Verfahren bis zu einer optischen Dichte von 0.6 (550nm) hochwaschen, was 3-4 Stunden dauern kann und zentrifugiert anschließend in GSA-Bechern 15min bei 4°C und 4000rpm. Die nun folgenden Schritte sollten auf Eis ausgeführt werden. Der Zellkuchen wird vom Überstand befreit und sofort in 100ml eiskaltem TfbI Puffer aufgenommen. Nach gründlichem Resuspendieren zentrifugiert man erneut, verwirft den Überstand und nimmt das resuspendierte Pellet in 10ml eiskaltem TfbII Puffer auf. Genau wie oben beschrieben werden die kompetenten Zellen aliquotiert und bei -80°C schockgefroren.

#### **8.7.1.5. Kompetente Zellen II (Chung, 1993)**

Aus 5ml Über-Nacht-Rollerkultur werden mit 500µl 50ml LB-Medium angeimpft. Bei 37°C wird diese Kultur so lange geschüttelt (225rpm) bis die Zellen eine Dichte von OD<sub>600</sub> = 0.3-0.4 erreicht haben. Nach Abschrecken in Eiswasser wird die gesamte Lösung bei 1000g zentrifugiert (4°C) und das Pellet in 0.9% Natriumchlorid resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in 5ml eiskaltem TSS-Puffer aufgenommen und für weitere 15min auf Eis belassen. Die Portionierung der kompetenten Zellen erfolgt in zuvor kaltgestellten Eppendorf Cap's. Vor dem Einfrieren bei -80°C werden die abgefüllten Zellen in Ethanol/Stickstoff schockgefroren.

#### **8.7.1.6. Transformation**

Hierzu werden die eingefrorenen kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und anschließend auf ein Transformationsvolumen von 50µl aliquotiert. Steriles Arbeiten ist nicht erforderlich, allerdings sollte darauf geachtet werden, daß keine DNasen eingeschleppt werden. Zu den einzelnen Portionen gibt man 1-10µl des zu transformierenden Ligationsansatzes und beläßt das ganze, nach mehrmaligem Ansnippen, für 30min aus Eis. Anschließend folgt eine 4 minütige Hitzeschock-Behandlung bei 37°C. Dieser schließt sich unmittelbar eine 5 minütige

Abschreckphase auf Eis an. Innerhalb dieser sollte eine geringe Menge LB+Amp. auf 37°C temperiert werden. 150µl dieses Mediums werden zu den Zellen pipettiert, vermischt und für weitere 30min ins 37°C warme Wasserbad gestellt. Nach Ablauf dieser Zeit wird der fertige Transformationsansatz auf vorgetrocknete LB+Amp.-Platten (bis zur Trockene) aufplattiert. Je nach Zelltyp sollten sich spätestens nach 12 stündiger Inkubation Klone auf der Platte zeigen. Von diesen werden mindestens 20 auf Stammhaltungsplatten überimpft und durch Plasmidisolierung untersucht.

#### 8.7.1.7. Plasmid-DNA Isolation I

Dabei geht man von etwa 3ml einer ÜNR aus. Etwa 1.5ml einer solchen Kultur werden nach kurzem Schütteln in ein Eppendorf-Cap eingefüllt und zur Pelletierung der Zellen bei Raumtemperatur 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert und der verbleibende Zellkuchen zur Zellwandlyse 5min bei Raumtemperatur mit Lysozym-Lösung belassen. Wichtig bei diesem Schritt ist die gute Resuspendierung der Zellen durch mehrmaliges pipettieren. Anschließend erfolgt die alkalische Zellyse unter denaturierenden Bedingungen mit 200µl einer 1% SDS/0.2% NaOH-Lösung. Die Mischung wird gevortext und innerhalb von 10min auf Eis gestellt. Zur Beendigung des Vorgangs gibt man anschließend 150µl einer 3M KOAc-Lösung (pH 4.7) hinzu und zentrifugiert 5min von den ausgefallenen Zellbruchstücken bei 4°C und 13000rpm für ab.

Der erhaltene klare Überstand wird vorsichtig in ein neues Eppendorf-Cap überführt und zur Entfernung jeglicher Proteine mit 350µl PCI-Lösung gründlich gevortext. Zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert man anschließend 5min bei Raumtemperatur und hebt ohne die Interphasenreste zu verschleppen, 300µl wässrigen Überstandes in ein sauberes Eppendorf-Cap ab. Darauf erfolgt die Fällung der Plasmid-DNA mit 660µl abs. EtOH. Eine Fällung über 2h bei -20°C ist dabei vollkommen ausreichend. Die ausgeflockte DNA wird bei 4°C und 13000rpm innerhalb von 10min herunterzentrifugiert und mit 500µl 70% EtOH gewaschen. Nach erneuter Fällung, unter gleichen Bedingungen, wird die restliche Flüssigkeitsmenge abgezogen und das Pellet in der Speed-Vac getrocknet. Den Rückstand nimmt man in 53µl TE-Puffer auf, dem RNase zugesetzt wurde (100µg/ml). Durch eine anschließende 15 minütige Inkubation bei 37°C wird verschleppte DNA zerstört. Je 3µl der fertigen Plasmid-Isolationen werden zur

Quantifizierung mit einem möglichst gut darin schneidenden Enzym verdaut und auf einem Agarose-Gel analysiert.

#### **8.7.1.8. Plasmid-DNA Isolation II (Kovalenko et al., modifiziert)**

Dabei geht man von etwa 3ml einer ÜNR aus. Etwa 1.5ml einer solchen Kultur werden in ein Eppendorf-Cap überführt und 30sec bei 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdekantiert und verbleibende Flüssigkeitsreste mit einer Pipette abgezogen. Danach werden die Zellen vollständig in 200µl TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) resuspendiert. Anschließend gibt man zu den resuspendierten Zellen 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzu und vortext bis zur vollständigen Homogenität. Die Zellmasse wird danach zur Abtrennung nicht-löslicher Zellbestandteile 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Etwa 150µl des Überstands werden in ein sauberes Cap überführt und mit der gleichen Menge an frischer TNEM-Lösung (10mM Tris-HCl pH8.0, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 0.1M MgCl<sub>2</sub> und 0.1mg/ml RNaseA) versetzt. Diese Lösung inkubiert man etwa 10min bei 37°C und zentrifugiert im Anschluß daran 5min bei 13000rpm. Der Überstand wird vorsichtig in ein steriles Cap (300µl) überführt und mit 150µl 10M Ammoniumacetat-Lösung sowie 1.2ml abs. Ethanol auf Eis versetzt. Nach Zentrifugation (13000rpm, 5min) wird der Überstand erneut verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nach Abziehen der letzten Flüssigkeitsreste in 50µl sterilem dest. Wasser aufgenommen. Diese Präparationsvariante wurde besonders für die anschließende Sequenzierung erfolgreich verwendet. Für die Entsalzung der so hergestellten DNA wurden Dialyseplättchen (Millipore) verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß in den meisten Fällen für kurze Leseweiten bis zu 500bp keine solche Behandlung notwendig war.

#### **8.7.1.9. Gradienten-DNA Präparationen**

Von einer 5ml Vorkultur (z.B. in LB+Amp.) ausgehend, beimpft man 500ml desselbigen Flüssigmediums (Fernbach-Kolben). Die Zellkultur läßt man eine weitere Nacht bei 37°C und 250-300rpm im Schüttler hochwachsen. Am darauffolgenden Tag wird die Kultur in GSA-Becher überführt und 10min bei 4°C, 8000rpm zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes resuspendiert man das Pellet mit 25ml einer 10mM EDTA-Lösung (pH8). Anschließend erfolgt die alkalische Lyse mit 50ml 1% SDS/0.2% NaOH. Man schüttelt dabei bis

zu Klärung der Suspension und puffert mit 25ml 5M KOAc (pH 4.7) ab. Die Abtrennung von den Zellbruchstücken findet bei 4°C und 6000rpm innerhalb von 5min statt. Der klare Überstand wird anschließend über mehrlagige Verbandsmullbinden in sterile GSA-Becher überführt und mit 60ml Isopropylalkohol versetzt. Diesem Schritt folgt eine erneute 10 minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur (10000rpm). Danach dekantiert man den Überstand erneut ab und wäscht das sich am Boden befindende Pellet durch mehrmaliges Resuspendieren mit 10ml 70% EtOH. Durch nochmalige Zentrifugation gewinnt man letztendlich die vorgereinigte DNA.

Der Plasmidkuchen wird vorsichtig in 3ml 10mM EDTA (pH8.0) aufgenommen und in 15ml Falcon-Caps überführt. Man füllt anschließend das Volumen auf 4ml auf und setzt 4.5g CsCl hinzu. Nach weiterer Zugabe von 0.5ml 1% Ethidiumbromid, werden die Lösungen vermischt und ausflockende Reste durch kurzes Zentrifugieren bei 5000rpm im GSA-Rotor (Adapter) abgetrennt.

Die Ansätze werden danach mit einer Pasteur-Pipette in Quick-Seal-Zentrifugenbecher (VTi65) überführt. Zur besseren Abtrennung von groben Verunreinigungen läßt man dabei die Salzlösung durch eine zweite, mit Watte gestopfte Pasteur-Pipette hindurchlaufen. Die eingefüllten Proben werden peinlichst genau austariert (1mg), die Becher mit einer Al-Kappe zugeschweißt und anschließend einer Ultrazentrifugation bei 60000rpm und 20°C für 16h unterzogen. Die bis zu ihrem isopyknischen Punkt gewanderte Plasmid-DNA kann daraufhin unter UV-Kontrolle mit einer Injektionsnadel abgezogen und in saubere 15ml Falcon-Caps überführt werden.

Das interkalierte Ethidiumbromid läßt sich mit 10ml n-Butanol (ges. über NaCl) leicht herauslösen. Hierzu wird die wässrige Phase mit dem organischen Lösungsmittel solange extrahiert, bis keine weitere Färbung mehr zu erkennen ist. Der Extraktion schließt sich die DNA-Fällung an. Man versetzt dabei die Salzlösung mit dem gleichen Volumen dest. H<sub>2</sub>O und fällt durch Zusatz des 4fachen Volumens abs. EtOH (auf Raumtemperatur!) die plasmidische DNA. Die ausgefallene DNA wird 10min pelletiert (Raumtemperatur) und einem weiteren Waschschrift mit 3ml 70% EtOH unterzogen. Nach Lyophilisieren erhält man die durch Zentrifugation unter der oben beschriebenen Bedingung die plasmidische DNA. In 1ml sterilem dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen kann die Quantifizierung am Spektralphotometer bei 260nm vorgenommen werden.

## 8.7.2. Arbeiten mit *Streptomyces lividans*

### 8.7.2.1. Lösungen und Puffer

#### Ammoniumsulfat (20%)

20g Ammoniumsulfat werden in 100ml dest. Wasser eingerührt und durch Filtration sterilisiert.

#### CaCl<sub>2</sub> Lösung (3.86%)

7.26g CaCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O werden mit A. dest. auf 1l aufgefüllt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

#### Casaminoacid (10%)

100g Casaminoacids werden in 1000ml *Leitungswasser* eingerührt und autoklaviert.

#### Glucose (20%)

200g D-Glucose werden in 1000ml dest. Wasser eingerührt und autoklaviert.

#### Kaliumdihydrogen (0.5%)

1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werden mit dest. Wasser auf 200ml aufgefüllt und autoklaviert.

#### Lysozymlösung (0.1%, isotonisch)

0.1g Lysozym werden in 100ml 0.9% NaCl Lösung gelöst und durch Filtration sterilisiert.

#### Minimalmedium (MM-Medium)

50g Glukose werden in 710ml A. dem. gelöst und autoklaviert. Dazu werden jeweils sterile Lösungen an 20% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10ml), 10% Casaminoacids (200ml), 300mM Phosphatpuffer (pH6.9, 50ml), Spurenelementen (1ml) und 1M MgSO<sub>4</sub> (300µl) gegeben.

#### NL701-Plattenmedium

3g Saccharose, 15g Dextrin, 0.5g NaCl, 0.5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g MgSO<sub>4</sub>, 0.01g FeSO<sub>4</sub>, 5g Trypton Soja Broth, 1g Beef Extract, 2g Yeast Extract und 22g Bacto Agar werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren auf 60°C temperieren, das Resistenzgift hinzugeben, schütteln und die Platten gießen.

#### Phosphatpuffer (0.3M)

29.1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 18.36g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O werden mit dest. Wasser auf 1l aufgefüllt, auf pH6.9 eingestellt und autoklaviert.

**Produktionsmedium**

Das Produktionsmedium wird aus einzelnen, vorab sterilisierten Lösungen (Ausnahme: ZnSO<sub>4</sub> wird sterilfiltriert) zusammengesetzt. Für 1l Produktionsmedium werden folgende Lösungen benötigt: 400ml 5% Caseinpepton, 10ml 10% Ammoniumsulfat, 10ml 10% NaCl, 10ml 10% MgSO<sub>4</sub>, 100ml 3% Maltose, 410ml 2.4% Glycerin, 40ml 1M Phosphatpuffer pH6.8, 10ml 270mM CaCl<sub>2</sub> sowie 10ml 150mM ZnCl<sub>2</sub>.

**Prolinlösung (20%)**

20g Prolin auf 100ml auffüllen, sterilfiltrieren und bei 4°C lagern.

**Protoplastierungspuffer (P-Puffer)**

103g Saccharose werden mit 250mg K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 2.02g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O gemischt und mit A. dest. auf 800ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung gibt man 2ml Spurenelementlösung, 100.3ml 3.68%CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 10.3ml 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung und 100.3ml 5.73% TES-Puffer (pH 7.2). Nach dem Sterilfiltrieren lagert man die Lösung bei -20°C in 40ml-Portionen.

**R2YE-Plattenmedium**

103g Saccharose, 0.25g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10.12g MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, 10g Glukosemonohydrat, 0.1g Casaminoacids und 22g Bactoagar (besser 25g) werden in 800ml A. dem. gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren, die Lösung sollte noch heiß sein, gibt man 100ml eines 5.73% TES-Puffers (pH 7.2), 2ml Spurenelement-, 10ml 0.5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80ml 3.68% CaCl<sub>2</sub>, 15ml 20% L-Prolin, 50ml 10% Yeast Extrakt und 5ml 1N NaOH dazu. Bei Bedarf versetzt man mit einem Resistenzgift und schüttelt die Lösung. Danach werden die Platten gegossen.

**Saccharoselösung (10.3%)**

103g Saccharose werden in 1l dest. Wasser gelöst und autoklaviert.

**Spurenelementlösung**

Es werden 20mg ZnCl<sub>2</sub>, 100mg FeCl<sub>3</sub>x6H<sub>2</sub>O, 5mg CuCl<sub>2</sub>, 5mg MnCl<sub>2</sub>, 5mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>x10H<sub>2</sub>O und 5mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>x4H<sub>2</sub>O auf der Feinwaage eingewogen, mit A. dest. aufgefüllt auf 500ml und anschließend autoklaviert; die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt.

**TES-Puffer (5.73%)**

57.3g TES werden in ca. 800ml A. dest. gelöst und der pH auf 7.2 eingestellt. Anschließend wird mit A. dest. auf 1l aufgefüllt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**Thiostreptonstammlösung (5%)**

1g Thiostrepton werden in 20ml DMSO gelöst und aliquotiert. Die bei 4°C gelagerte Lösung friert ein und muß vor dem Gebrauch sorgfältig aufgetaut werden.

**Transformationspuffer (T-Puffer)**

12ml 10% Saccharoselösung, 1.09ml 5M CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 2.72ml Tris-Malat-Puffer, 100µl Spurenelementlösung, 500µl 2.5% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung, 37.5ml A. dest. und 18.137g PEG 6000 werden gemischt und sterilfiltriert. Die Lösung wird in 4ml-Portionen bei -20°C gelagert.

**TSB-Medium**

30g Tryptone Soja Broth werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert bei 4°C aufbewahrt.

**Yeast Extraktlösung (10%)**

50g Yeast Extrakt werden auf 500ml mit A. dem. aufgefüllt, autoklaviert und bei 4°C gelagert.

**YEME-Medium**

3g Difco Yeast Extract, 5g Difco Bacto Peptone, 3g Difco Malt Extract, 10g Glukose und 340g Saccharose werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und autoklaviert. Danach gibt man noch 2.5ml 2M MgCl<sub>2</sub>- und 25ml 20% Glycinlösung hinzu.

**8.7.2.2. Plattenstammhaltung**

Um Streptomyceten für kurze Zeit kultivieren zu können, empfehlen sich feste Nährböden, auf denen die einzelnen Kulturen gut wachsen und sporulieren können.

Für die Plattenstammhaltung nimmt man am besten R2YE-Platten mit der entsprechenden Supplementierung und Resistenz. Die Platten müssen dabei besonders trocken sein, um gut sporulierende Stämme zu erhalten. Die einzelnen Klone können dann von einer anderen Platte (z.B. Transformationsplatte) abgeimpft und auf die Stammhaltungsplatte übertragen werden. Ist dieser Vorgang beendet, inkubiert man bei 28°C für etwa eine Woche und lagert die Platten nach Abdichten mit Parafilm bei 4°C.

**8.7.2.3. Animpfen von Schüttelkulturen**

Für Expressionsstudien benötigt man Schüttelkulturen, die bis zu 10 Tage bei 28°C inkubiert werden.

Als Medium haben sich besonders das MM-Medium und das TSB-Medium bewährt. Ersteres erlaubt den Streptomyceten zwar nur ein langsames Wachstum, zeigt jedoch als positive



Eigenschaft bei Proteingelen nur einen geringen Hintergrund. Auch bei TSB wurde dieses in der Umgebung von 7,9 kDa (Tendamistat) gefunden.

In einen 300ml Erlenmeyerkolben mit Spiralfeder legt man etwa 50ml Medium+Resistenzgift (tsr  $\geq 5\mu\text{g/ml}$ , vgl. Hopwood, 1985) vor und beimpft anschließend unter sterilen Bedingungen mit ca. 1 cm<sup>2</sup> Rasenfläche aus der Stammhaltungsplatte. Die Probenentnahme erfolgt dabei täglich.

#### 8.7.2.4. Herstellung von Protoplasten (*Streptomyces lividans* 66 TK24)

Als Transformation bezeichnet man die freie Genübertragung von löslicher DNA auf ein Empfänger-Bakterium. Diese Fähigkeit ist zu einem beträchtlichen Teil von dem physiologischen Zustand der Zellkultur abhängig. In der mittleren exponentiellen Wachstumsphase erreicht sie deshalb einen maximalen Wert, der im weiteren Verlauf stark abfällt. Bei Streptomyceten nehmen Protoplasten in einem solchen Wachstumszustand DNA effizient auf. Da sich die Zeit bis zum Erreichen der obigen Phase schwer voraussagen läßt, nimmt man Zellkulturen die 42-48h alt sind. Eine andere Möglichkeit den Zeitpunkt zu bestimmen, liegt beim Beobachten der Morphologie des Mycels.

Die Herstellung von Protoplasten läßt sich in ihrem Gesamtablauf in vier Stufen unterteilen. In Stufe 1 werden zunächst die Zellkulturen aus einer Sporen-suspension entwickelt. Stufe 2 beginnt mit der Ernte der Zellkultur und endet mit ihrer Aufreinigung durch mehrmaliges Waschen. Wichtig dabei ist das Arbeiten auf Eis mit sterilen, tensidfreien Geräten. Die Protoplastierung mit Lysozym schließt sich als dritte Stufe an. In der letzten Arbeitsstufe werden die fertigen Protoplasten aliquotiert und eingefroren.

Man beimpft im Abstand von zwei Stunden 25ml YEME-Medium (YEME+MgCl<sub>2</sub>+Glycin) in vier 300ml Erlenmeyerkolben mit etwa  $3.4 \times 10^8$  Sporen einer Sporensuspension des plasmidfreien Stammes. Um ein besseres Wachstum zu gewährleisten, werden Erlenmeyerkolben verwendet, in denen sich zur Zerschlagung des Zellmycels Spiralfedern befinden. 48h nach der ersten Beimpfung werden die einzelnen Zellkulturen in SS-34 Röhrchen überführt und mit 10.3% Saccharose aufgefüllt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 4°C und 6000rpm dekantiert man den Überstand vorsichtig ab und resuspendiert das Pellet durch langsames auf- und abpipettieren in weiteren 15ml 10.3% Saccharoselösung. Anschließend werden die Zellen erneut pelletiert (4°C, 3500rpm und 10min), der Überstand abdekantiert und in Saccharoselösung aufgenommen. Der letzte Arbeitsschritt sollte bis zur Klärung des

abdekantierten Überstandes mindestens noch zweimal wiederholt werden. Die Protoplastierung des Zellmycels erfolgt in 4ml isotonischer 0.1% Lysozymlösung (L-Puffer) innerhalb von 75min bei 28°C und 300rpm im Schüttler. Ist sie abgeschlossen, setzt man je 10ml eiskalten P-Puffer hinzu und zentrifugiert für 10min bei 4°C und 3000rpm die Protoplasten herunter. Damit sämtlicher L-Puffer entfernt wird, wiederholt man den letzten Schritt und nimmt zum Schluß erneut in 3ml eiskaltem P-Puffer auf. Diese Suspension wird zu je 200µl in sterile Eppendorf-Caps portioniert und auf Eis gestellt. Um einen Kälteschock zu vermeiden, wird die gesamte Eismasse mit den darin befindlichen Caps in -80°C eingefroren. Zur Überprüfung der Kompetenz werden mit den 42-48h Protoplasten Probetransformationen vorgenommen und ausgewertet.

#### **8.7.2.5. Transformation in *Streptomyces lividans* TK24**

Je 200µl Protoplastensuspension werden unter fließendem Wasser aufgetaut und auf Eis zu je 50µl portioniert. Die folgende Prozedur sollte für jeden Ansatz im Einzelnen ausgeführt werden, da ein zu langes Arbeiten im T-Puffer zur Lyse der Protoplasten führen kann. In jeweils eine einzelne Protoplastensuspension pipettiert man kurz nacheinander 1µg DNA und 200µl eiskaltem T-Puffer hinzu. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wird das Ganze gut durchmischt und anschließend auf R2YE-Platten, die kein Resistenzgift enthalten, ausplattiert. Beim Ausplattieren empfiehlt sich die Benutzung einer abgeflachten Impföse, da die Verwendung eines Drigalski-Spatels die Protoplasten zu sehr in Mitleidenschaft ziehen würde. Die Inkubation der fertigen, luftgetrockneten Transformationsplatten erfolgt im 28°C Brutschrank, bis sich deutliche, weiße Nebel auf der Agaroberfläche zeigen. Im Allgemeinen kann nachdem weiße Nebel entstanden sind das Resistenzgift aufgetragen werden. Dazu entnimmt man 50µl Thiostrepton-Stammlösung, füllt auf 2ml mit dest. H<sub>2</sub>O auf und verteilt das Resistenzgift durch Umschwenken vollständig auf der Platte. Nach 2-3 Tagen zeigen sich einzelne Klone auf der Platte, von denen 20-40 auf R2YE+Thiostrepton Platten überimpft und erneut angezogen werden.

### **8.7.3. Arbeiten mit DNA**

#### **8.7.3.1. Lösungen und Puffer**

##### **Auftragspuffer für Agarosegele (5x)**

12g Saccharose und 4ml 0.5M EDTA werden mit 2.5x TBE-Puffer auf 20ml aufgefüllt, autoklaviert und mit je 50mg

Bromphenolblau und Xylenxanolo FF versetzt. Nach dem Aliquotieren wird die Gebrauchslösung bei 4°C und die Vorratslösungen bei -20°C gelagert.

#### **n-Butanol (equilibriert)**

n-Butanol wird mit dem halben Volumen an gesättigter, wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die obere Phase wird genutzt.

#### **Dialyseschläuche**

Ungefähr 1m Dialyseschlauch werden zweimal mit 10mM EDTA (pH8) und einmal mit A. dem. ca. 10min gekocht und anschließend bei 4°C gelagert.

#### **Ethidiumbromidstammlösung (10mg/ml)**

1g Ethidiumbromid auf 100ml mit A. dem. auffüllen und mehrere Stunden rühren. In einer dunklen Flasche bei 4°C aufbewahrt.

#### **EtOH (70% v/v)**

368ml EtOH (95%) werden mit A. dem. auf 500ml aufgefüllt.

#### **High-Salt-Buffer**

5ml 1M Tris-HCl Lösung, 1ml 0.5M EDTA und 50ml 5M NaCl werden mit dest. Wasser auf 250ml aufgefüllt und der pH nachträglich auf 8.0 eingestellt.

#### **Low-Salt-Buffer**

5ml 1M Tris-HCl Lösung, 1ml 0.5M EDTA und 5ml 5M NaCl werden mit dest. Wasser auf 250ml aufgefüllt und der pH nachträglich auf 8.0 eingestellt.

#### **NaCl (5M)**

146.1g NaCl auf 1l mit A. dem. auffüllen und autoklavieren.

#### **NaOH (2N)**

40g NaOH mit A. dem. auf 500ml auffüllen.

#### **PEG (13%)**

13g PEG werden auf 100ml mit A. dest. aufgefüllt.

#### **Sperminextraktionspuffer**

Hierzu werden 31.6ml abs.EtOH, 4ml 3M NaOAc pH5.2 und 0.2ml 2M MgCl<sub>2</sub> Lösung zusammengegeben und auf 50ml mit A.dest. aufgefüllt.

**Sperminlösung (100mM)**

1.74g Spermin werden dazu in 50ml A.dest. Gelöst und sterilfiltriert.

**TBE-Puffer (10x)**

121.1g Tris (research grade), 51.4g Borsäure und 3.7g Na<sub>4</sub>EDTA werden in A. dem. gelöst, auf 1l aufgefüllt und autoklaviert.

**TE-Puffer 5/0.1 (5mM Tris-HCl/0.1mM EDTA)**

5ml 1M Tris-HCl pH 8 und 0.2ml 0.5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. aufgefüllt auf 1l, autoklaviert und bei RT deponiert.

**TE-Puffer 10/1 (10mM Tris-HCl/1mM EDTA)**

10ml 1M Tris-HCl (pH 8) und 2ml 0.5M EDTA (pH 8) werden mit A. dem. aufgefüllt auf 1l, autoklaviert und bei RT gelagert.

**Tris-HCl Stammlösung (1M, pH8.0)**

121.1g Tris werden in ca. 800ml A. dem. gelöst und mit konz. HCl auf pH 8 eingestellt. Nach dem Auffüllen auf 1l wird die Lösung autoklaviert und bei RT aufbewahrt.

**8.7.3.2. Analytik von dsDNA über Agarosegele**

Über Agarosegelelektrophorese gelingt zumeist eine einfache Analytik von DNA. Dabei läßt sich eine grobe Abschätzung der Fragmentgröße bequem dadurch erreichen, daß man, ausgehend von einer mitgelaufenen Referenz, die Laufstrecke gegen den dekadischen Logarithmus der Basenpaare aufträgt und nach Regressionanalyse den zu bestimmenden Basenpaarwert zurückrechnet. Je nach Fragmentgröße sollte die Agarosekonzentration zwischen 1 und 2.3% gewählt werden. Als Laufpuffer dient 1xTBE, in der die Agarose aufgeschlämmt wird. Man bringt das Gemisch in der Mikrowelle zum Sieden und beläßt es dort, bis die Agarose vollständig in Lösung gegangen ist. Die heiße Agaroselösung wird mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.5µg/ml) versetzt und nach Umschwenken in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren ist das Gel fertig. Je nach Kamm sollte das Probenvolumen nicht größer als 20 bzw. 35µl betragen und sich im Agaroselaufpuffer befinden. Die eigentliche Elektrophorese dauert 1-2h und erfolgt bei 160-200V. Am Transilluminator kann man jederzeit die Auftrennung auf dem Gel betrachten und am Ende photographisch festhalten.

### 8.7.3.3. Analytik von ssDNA über Polyacrylamidgele

In 10ml einer 20% Acrylamidlösung, die 8M Harnstoff enthält, wird durch Zugabe von 10 $\mu$ l 10% APS-Lösung und 10 $\mu$ l TEMED die Polymerisation gestartet. Nach gründlicher Vermischung gießt man die Lösung zwischen 10x10cm große Glasplatten, führt den Probenkamm ein und läßt bis zur vollständigen Polymerisation bei Raumtemperatur stehen. Das fertige Gel wird in die Biometra-Apparatur (Biometra Twingel) eingespannt und nach Einfüllen des Laufpuffers (1xTBE) der Probenkamm vorsichtig entfernt. Zur Entfernung jeglicher Harnstoffreste aus den Probenaschen werden diese im Anschluß gründlich mit Laufpuffer gespült.

Die zu analysierenden Proben sollten 0.05OD<sub>260</sub> aufweisen und sich nach Lyophilisieren in 5 $\mu$ l Formamid befinden. Als Laufmarker dient eine Formamidlösung mit 0.1% Bromphenolblau und 0.1% Xylencyanol. Als schnell migrierender Farbstoff orientiert man sich am besten bei kurzen Strängen am Bromphenolblau. Bei langen Strängen dient Xylencyanol als Orientierungsfarbstoff.

Die eigentliche Elektrophorese dauert bei 180V 2h. Nach Ablauf wird der Laufpuffer abgegossen und das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst. Zur Entfernung des Harnstoffs legt man es anschließend in 40ml einer frisch hergestellten 25% TCA-Lösung ein und taumelt es für 10min darin. Die Entfernung der TCA-Lösung erfolgt zweimal für je 5min mit wenig dest. H<sub>2</sub>O. Hiernach schließt sich eine 20 minütige Behandlung mit frisch hergestellter 0.1% AgNO<sub>3</sub>-Lösung an. Das so markierte Gel wird gründlich mit dest. H<sub>2</sub>O abgespült und in eine ebenfalls frisch hergestellte Entwicklerlösung eingelegt (3.75g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 64 $\mu$ l 37% HCHO in 125ml H<sub>2</sub>O). Bis zur gewünschten Schwärzung der Banden beläßt man es darin und stoppt die Weiterverfärbung durch Überführen des Gels in eine 1% HOAc-Lösung. Die Aufbewahrung des Polyacrylamidgels erfolgt, nach Fixierung in 40% MeOH und 3% Glycerin, im getrockneten Zustand in Cellophanfolie.

### 8.7.3.4. Quantifizierung von dsDNA über UV-Spektrophotometrie

Die Messung erfolgt dabei in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260nm. 10 $\mu$ l der zu quantifizierenden DNA-Probe wird hierzu auf ein Volumen von 1000 $\mu$ l gebracht und am Zweistrahl-Photometer (Cary) vermessen. Als Referenz verwendet man das reine Lösungsmittel.

1 OD<sub>260</sub> entspricht dabei einer doppelsträngigen DNA-Menge von 50µg. Um auch eine Aussage über den Proteingehalt in der Probe zu erhalten, kann man zusätzlich eine Messung bei 280nm durchführen. Der Quotient beider Ergebnisse (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) sollte bei sauberen Proben über 1.8 liegen.

#### 8.7.3.5. Quantifizierung dsDNA über Gelelektrophorese:

Eine empirische Mengenabschätzung läßt sich über einfache Agarosegele leicht erhalten. Die zu untersuchende DNA-Probe wird in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein Gel aufgetragen und mit der bekannten DNA-Menge eines Markers verglichen.

#### 8.7.3.6. Quantifizierung von ssDNA über UV-Spektrophotometrie

Aus 1000µl der unaufgereinigten Oligodesoxyribonucleotid-Lösung entnimmt man 10µl und füllt diese in einer 10mm Quarzküvette auf 1000µl mit dest. H<sub>2</sub>O auf. Bei 260nm wird anschließend die Extinktion im UV-VIS Spektrometer der Firma Varian (Cary) ermittelt. Der erhaltene Extinktionswert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (100) ergibt die optische Dichte in OD<sub>260</sub> Einheiten. Um eine Korrelation zu der Gesamtmenge an ssDNA zu erhalten muß dieser Wert über eine Gleichung umgerechnet werden:

$$1nmol = \frac{100 \times 0.895 \times OD}{1.54 \times A_n + 1.17 \times G_n + 0.73 \times C_n + 0.88 \times T_n}$$

A<sub>n</sub>,G<sub>n</sub>,C<sub>n</sub> und T<sub>n</sub> geben dabei die Zahl der jeweiligen Basen Einzelstrang an. Der Faktor 0.895 ergibt sich aus der nicht-statistischen Anordnung der ssDNA bei 20°C (Stapeleffekt).

#### 8.7.3.7. Elektroelution

Die Elektroelution dient der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die auf einem geeigneten Agarosegel augetrennten Fragmente werden unter der UV-Lampe mittels Skalpell vorsichtig herausgeschnitten und unzerkleinert in einen einseitig verschlossenen Dialyseschlauch eingedrückt.

Der Dialyseschlauch wird mit 500µl 1xTBE aufgefüllt, mit einer weiteren Dialyseklemme blasenfrei verschlossen und in einer Elektrolyskammer für etwa 2h bei 180V elektrolysiert. Längere Zeiten ergeben sich bei besonders großen Fragmenten, in jedem Fall läßt sich das Ende der Elution daran erkennen, daß das Gelstück unter der UV-Lampe keine weitere Fluoreszenz mehr aufweist. Um an die Membran anhaftende Rest-DNA abzulösen wurde vor Entnahme des Laufpuffers die Stromrichtung für 5min umgepolt. Man pipettiert anschließend den Puffer in ein Eppendorf-Cap und fällt die DNA mit der 2.2fachen Menge abs. EtOH. Die ausgefallene DNA wird durch Zentrifugation bei 4°C und 13000rpm für 15min pelletiert und vom Überstand befreit. Dieser Fällung schließt sich eine Waschung mit 500µl 70% EtOH an. Erneute Zentrifugation, unter gleichen Bedingungen liefert nach Lyophilisieren an der Speed-Vac und Aufnehmen in 53µl TE 5/0.1-Puffer die fertige DNA. Um besonders reine Isolationen zu erhalten, sollte der ersten Fällung eine 1:1 PCI-Extraktion vorausgehen.

#### **8.7.3.8. Entfernung von Proteinen**

Die Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen gelingt gut über Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1). Dabei versetzt man die zu reinigende DNA-Probe mit der gleichen Menge Extraktionslösung und vortext bis zur vollständigen Emulgierung, was nicht kürzer als 30sec dauern sollte.

Zur besseren Phasentrennung wird die Emulsion anschließend bei Raum-temperatur und 13000rpm für einige Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird ohne die Interphase zu verschleppen vorsichtig abgenommen und in ein neues steriles Eppendorf-Cap überführt. Um sicher zu gehen, daß sämtliche Phenolreste entfernt wurden, lassen sich weitere Extraktionen mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) anschließen. Eine zusätzliche Ethanol-fällung sollte sich dieser Deproteinierung anschließen.

#### **8.7.3.9. Ethanol-fällung**

Die Fällung mit Ethanol empfiehlt sich zum einen als Reinigungsschritt und zum anderen als eine Möglichkeit DNA-Lösungen aufzukonzentrieren. Dazu versetzt man die Probe mit dem 0.1fachen Volumen NaOAc-Lösung (3M, pH4,7) und dem 2.2fachen Volumen abs. EtOH. Die Mischung wird gevortext und bei -20°C für die nächsten 20min belassen. Längere Zeiten

schlagen sich nicht unbedingt als höhere Ausbeute nieder. Die ausgeflockte DNA wird bei 4°C und 13000rpm pelletiert und zur Entsalzung ein weiteres mal mit 1ml 70% EtOH gewaschen. Eine geringe Salzkonzentration sollte sich dabei als schlecht sichtbares Pellet bemerkbar machen, da reine DNA in diesen Konzentrationen nicht sichtbar ist. Durch Zentrifugation wird die DNA erneut gefällt und in der Speed-Vac. bis zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in TE 5/0.1-Puffer aufgenommen und kann bei -20°C eingefroren werden.

Eine geringfügig veränderte Anleitung dient zur besseren Entfernung von kurzen ssDNA-Fragmenten. Hierbei erfolgt die Fällung der DNA in einer 2.5M NH<sub>4</sub>OAc-Lösung in Gegenwart von 50% EtOH. Dazu mischt man die zu fällende Probe mit 7.5M NH<sub>4</sub>OAc-Lösung und auf -20°C temperiertem abs. EtOH im Verhältniss 2:1:3. Die Lösung wird für 5min bei Raumtemperatur belassen und anschließend bei 13000rpm für 15min in der Kälte zentrifugiert. Das schwach sichtbare DNA-Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen gefällt. Wie oben wird die DNA an der Speed-Vac. einrotiert und in TE 5/0.1-Puffer aufgenommen.

#### **8.7.3.10. Isolierung von DNA über DEAE-Membranen**

Die Elektroelution aus Agarose-Gelstücken eignet sich besonders gut für die schnelle Isolierung großer DNA-Fragmente (>500bp) in vergleichsweise hoher Konzentration. Für die Isolierung besonders kleiner Fragmente (<500bp) wurde ein anderes Verfahren ausgewählt. Es basiert auf dem Prinzip, daß bei pH-Werten oberhalb von 4 DNA reversibel an schwache Anionenaustauscher bindet und bei genügend hoher Salzkonzentration wieder deadsorbiert werden kann. Verwendet werden bei diesem Verfahren Membranen mit schwacher Eigenadsorption für DNA und DEAE-Oberflächenfunktionalisierung (Schleicher und Schüll).

Vor der Anwendung dieser Membranen müssen die Oberflächen jedoch erst aktiviert werden. Hierzu legt man die kleinen und der Taschenbreite angepassten Membranstücke zunächst in 10mM EDTA-Lösung (pH8.0) für 5min ein. Mit einer Pinzette werden diese anschließend vorsichtig herausgenommen und weitere 5min in eine 0.5N NaOH überführt. Nach gründlichem Abspülen in dest. Wasser (Millipore) sind die Membranstücke fertig für die Anwendung und können bei Lagerung in dest. Wasser bei 4°C mehrere Wochen aufbewahrt werden.



Wie bei der Elektroelution läßt man zuvor die DNA entsprechend ihren Fragmentgrößen in einem Agarose-Gel auftrennen. Unter der UV-Lampe wird anschließend die gewünschte Bande identifiziert. Direkt unterhalb dieser Bande wird ein kleines Gelstück herausgeschnitten und zur Seite gelegt. Hier wird vorsichtig die zuvor aktivierte DEAE-Membrane mit einer Pinzette hochkant angepasst und mit dem zuvor herausgeschnittenen Gelstück an den unteren Rand der Bande angedrückt. Das so präparierte Gel wird in die Gelkammer zurückgelegt. Bei halber Spannung läßt man die gewünschte Bande auf die Membrane adsorbieren, wobei der Vorgang unter der UV-Lampe verfolgt werden sollte. Befindet sich dicht oberhalb des gewünschten Fragmentes ein weiteres Fragment, kann aus sicherheitsgründen dieser Bereich aus dem Gel herausgeschnitten oder ebenfalls mit einer DEAE-Membrane abgesichert werden. Die unter dem UV-Licht fluoreszierenden Membranen werden aus dem Gel herausgenommen und mit dest. Wasser abgespült. Danach zerkleinert man die Membrane und legt diese in 500µl Low-Salt-Buffer (LSB) bei Raumtemperatur für 5min ein. Dieser Puffer wird nach Kontrolle unter der UV-Lampe verworfen und gegen 200µl High-Salt-Buffer (HSB) ersetzt. Bei 65°C werden die Membranstücke 30min in diesem Puffer belassen. Dieser Vorgang wird im Anschluß für weitere 15min mit neuem HSB wiederholt. Die vereinigten HSB-Fractionen werden mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) versetzt und gründlich 1min gevortext. Nach Zentrifugation bei 13000rpm wird der Überstand vorsichtig abgezogen und mit 0.2V 3M Natriumacetat-Lösung (pH4.7) sowie 2.5V abs. Ethanol versetzt. Zur vollständigen Fällung wird diese Lösung auf Eis für 10min belassen. Das nach der Zentrifugation (13000rpm) entstandene Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und nach Abziehen der Reste in 50µl dest. Wasser resuspendiert.

#### **8.7.3.11. PEG Fällung (R.C.Mierendorf, 1987)**

Eine weitere Möglichkeit, Plasmide aus einer Miniisolation aufzureinigen, besteht in der Verwendung von Polyethylenglycol (PEG MW8000) als Fällungsmittel. Das zugegebene NaCl sorgt dabei für "ein-in-Lösung-bleiben" verschleppter RNA aus der Miniisolation. Durch seinen geringen Zeitaufwand dient dieses Reinigungsverfahren als eine interessante Alternative zur isopyknischen Fällung.

Etwa 50µl plasmidischer DNA (z.B. aus Miniisolationen) werden zuerst einer PCI-Extraktion unterzogen und anschließend über Ethanol-fällung isoliert. Die in der Speed-Vac. lyophilisierten

Proben löst man in 50µl dest. H<sub>2</sub>O auf und versetzt mit 12.5µl 4M NaCl-Lösung. Danach werden 62.5µl 13% PEG-Lösung hinzugegeben und durch auf- und abpipettieren gut vermischt. Diese Proben stellt man anschließend für 20min auf Eis und zentrifugiert die ausgefallene DNA in der Kälte bei 13000rpm für 10min. Um das zumeist unsichtbare Pellet nicht versehentlich zu verwerfen, sollten die Stellungen der Eppendorf-Caps in der Zentrifuge markiert werden. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 1ml 70% EtOH resuspendiert. Erneute Zentrifugation und Abheben des Überstandes erbringen nach Lyophilisieren an der Speed-Vac. die gereinigten DNA-Proben. Diese werden in 53µl dest. H<sub>2</sub>O oder TE 5/0.1 aufgenommen und anschließend quantifiziert.

#### **8.7.3.12. Spermin-Präzipitation**

Das biogene Amin Spermin dient dazu, die Qualität einer DNA-Isolation durch selektive Fällung von DNA weiter zu verbessern.

In die zu reinigenden Proben pipettiert man, im Verhältniss 9:1, 100mM Sperminlösung hinzu und läßt für 15min auf Eis stehen. Nach anschließender Zentrifugation (15min) bei 4°C und 13000rpm werden die Überstände vorsichtig mit einer Pipette abgehoben. Das meist klare Pellet ist nicht ohne weiteres auszumachen, deshalb empfiehlt es sich eine seitliche Markierung anzubringen, die es gestattet Auskunft über die Orientierung in der Zentrifuge zu machen. Die Entfernung des Spermin erfolgt durch Zugabe von 1ml Spermin-Extraktionspuffer. Danach werden die Proben gut gevortext, anzentrifugiert und erneut auf Eis gestellt. Nach einstündiger Inkubation wird die DNA pelletiert und anschließend mit 1ml 70% EtOH nachgewaschen. Zum Schluß lyophilisiert man noch die Rückstände und löst die verbliebene DNA in 20-50µl dest. H<sub>2</sub>O bzw. TE 5/0.1.

#### **8.7.3.13. Dephosphorylierung mit CIP (New England Biolabs, 1994)**

Bei der Calf Intestinal Phosphatase (CIP) handelt es um ein dimeres Glykoprotein zur Dephosphorylierung von 5'Phosphatgruppen an DNA- und RNA-Enden. In der Molekularbiologie läßt sich mit dieser Funktion die Religationswahrscheinlichkeit von Klonierungsvektoren deutlich verkleinern, da nur Inserts mit 5'Phosphatgruppen den Vektor

schließen können. Die so geschlossenen Vektoren enthalten stets versetzt geöffnete Stränge, die sich jedoch bei der anschließenden Transformation nicht negativ auswirken.

Die DNA-Ausgangskonzentration sollte bei dem Dephosphorylierungsansatz  $0.5\mu\text{g}/10\mu\text{l}$  betragen. Als Enzympuffer kann jedes der 10xEndonukleasepuffer (NEB) verwendet werden, ohne CIP zu beeinträchtigen. Pro pmol freier DNA-Enden werden anschließend 0.1U CIP (5'Überhang !) in den Ansatz zugegeben. Die Inkubation dauert etwa 60min und wird bei  $37^\circ\text{C}$  ausgeführt. Nach Ablauf wird die Reaktion durch gleichvolumigen Zusatz von 10mM EDTA gestoppt und bei  $65^\circ\text{C}$  innerhalb von 10min denaturiert. Bevor die DNA mit Ethanol gefällt werden kann, sollte auf alle Fälle eine PCI- Extraktion erfolgen. Die Analyse erfolgt am Einfachsten durch eine Probeligation.

#### 8.7.3.14. Ligation (Maniatis, 1989)

Alle Ligationen erfolgten mit der T4-DNA Ligase. Dieses speziell vom Coliphagen T4 produzierte Enzym ist im Gegensatz zur wirtseigenen Ligase in der Lage selbst 5' phosphorylierte glatte DNA-Enden miteinander zu verknüpfen. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Enzymen ist der Cofaktor. Bei T4-DNA Ligase dient dATP (im Gegensatz zu NAD) als Cofaktor.

Ein typischer  $20\mu\text{l}$  Ligationsansatz besteht aus dem 1xLigationspuffer, dATP, der T4-DNA Ligase ( $400\text{U}/\mu\text{l}$ ), dem geschnittenen Vektor und dem einzuklonierenden Fragment. Das Konzentrationsverhältnis zwischen Vektor und Fragment ist von entscheidender Bedeutung bei der Ligation. Im Allgemeinen wird ein Verhältnis von 1:4 gewählt, bei Linkern verschiebt es sich zu 1:20. Die Menge des geschnittenen Vektors schwankt dabei zwischen  $0.4\text{-}1.2\mu\text{g}$  (bei 3000bp entsprechen  $0.5\text{pmol}$  etwa  $1\mu\text{g}$ ). Von der Ligase ist bei einer 1:10 Verdünnung etwa  $1\mu\text{l}$  (40U) mehr als ausreichend für freie, kohäsive Enden. Bei einer glatten Ligation muß hingegen mindestens die 50fache Ligasekonzentration verwendet werden. In dem von New England Biolabs angebotenen 10xLigationspuffer ist bereits das Nukleotid in einer Konzentration von 10mM enthalten, so daß die benötigte Endkonzentration von 1mM immer auch gewährleistet wird. Den fertigen Ansatz inkubiert man mindestens 4h bei  $16^\circ\text{C}$ , am besten über Nacht und transformiert anschließend  $1\text{-}10\mu\text{l}$  davon in *E.coli*. Falls gewünscht kann die Ligase durch 10 minütige Hitzedesaktivierung bei  $65^\circ\text{C}$  vor der Transformation zerstört werden.

Für die Beurteilung des Ligationsergebnisses empfiehlt es sich, eine Testligation mitlaufen zu lassen, bei der ohne Fragment die Zahl der Religierer bestimmt werden kann.

#### 8.7.3.15. Restriktion von DNA mittels Endonukleasen

In der Molekularbiologie sind drei Typen von Restriktionsendonukleasen bekannt. Bei TypI und III handelt es sich um unspezifische Nukleasen mit integrierter Methylaseaktivität. Dabei führen TypI-Endonukleasen die Strangtrennung an Sequenzen herbei, die mindestens 1000bp von der eigentlichen Erkennungssequenz entfernt liegen. Bei TypIII-Endonukleasen liegt der Erkennungsbereich um 25bp von der Schnittstelle entfernt. Endonukleasen vom TypII enthalten separate Methylasen und spalten spezifisch DNA, entweder glatt oder überhängend, an einer meist palindromischen Erkennungssequenz. Für alle Versuche wurden TypII Nukleasen verwendet.

Dazu wird die zu verdauende DNA in dest. H<sub>2</sub>O bzw. TE 5/0.1-Puffer aufgenommen und mit einem enzymespezifischen 10xPuffer versetzt. Dabei sollten pro 1µg DNA und pro Schnittstelle etwa 2-3U Enzym verwendet werden. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 30min und 16h bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Nach erfolgter Inkubation kann der Verdau auf einem Agarosegel analysiert werden. Das Enzym läßt sich durch PCI-Extraktion entfernen.

Da die von den Herstellern verwendeten Enzyme etwa 50% Glycerin enthalten, ist beim Ansetzen des Verdau ferner darauf zu achten, daß nicht mehr als 1µl Enzym auf 10µl Ansatzvolumen anfallen. Dies ist besonders bei Enzymen, die STAR-Aktivitäten zeigen (z.B. EcoRI und HindIII) wichtig. Die Glycerinkonzentration sollte dabei so klein wie möglich und die Inkubationszeit so kurz wie möglich gehalten werden.

Manchmal war es möglich in dem gleichen Puffer mehrere Enzyme gleichzeitig verdauen zu lassen (z.B. HindIII und SpeI). Wo dies nicht möglich war, wurde immer der Restriktionspuffer mit dem niedrigeren Salzgehalt als erstes verwendet. Spezifische Puffer, wie z.B. für EcoRI (enthält Triton X-100), hatten dabei Priorität vor anderen Puffern. Bei zwei Enzymen mit unterschiedlicher Aktivität, sollte man sich gerade bei überspiralisierter DNA zunächst für das schlechter schneidende Enzym entscheiden (z.B. SpeI vor HindIII).

### 8.7.3.16. Sequenzierung

Die Sequenzierung der einzelnen Plasmide erfolgte nach der Methode von Sanger (Sanger, 1988). Sämtliche Bestandteile für das *Cycle Sequencing*, wie beispielsweise die Terminatoren und Enzyme, stammten dabei von der Firma Perkin Elmer (*ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*). Die für die Sequenzierung verwendeten Primer wurden alle an einem PerceptiveBiosystems *EXPEDITE Synthesizer* hergestellt und nach Abspaltung der Schutzgruppen über RP-HPLC aufgereinigt. Eine Nachfällung mit Natriumchlorid blieb dabei aus. Die zu sequenzierenden Plasmide wurden überwiegend nach der Präparationsmethode II isoliert und entsprechend den dortigen Angaben gegen dest. Wasser (Millipore) sorgfältig dialysiert. Die Primer-Konzentration wurde dabei auf 0.8pmol/μl eingestellt. Die Einstellung der Plasmid-Konzentration (200ng/μl) erfolgte nach Quantifizierung über analytische Agarose-Gelelektrophorese. Der Sequenzieransatz wurde anschließend auf Eis zusammengegeben:

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Terminator Ready Reaction Mix	8μl
Plasmid-DNA (200ng/μl)	2.5μl
Primer (0.8pmol/μl)	4μl
Wasser	5.5μl
Gesamtmenge	20μl

Nach vortexen und kurzer Anzentrifugation wurden etwa 50μl Mineralöl zu jeden Ansatz pipettiert. Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem Perkin Elmer *DNA Thermal Cycler*:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
Ramp	96°C	Min
Temperatur	96°C	30sec
Ramp	50°C	Min
Temperatur	50°C	15sec
Ramp	60°C	Min
Temperatur	60°C	4min
25 Zyklen		
Ramp	4°C	Min
Temperatur	4°C	-

Nach Beendigung des Cycle Sequencing wird der Reaktionsansatz nochmals kurz anzentrifugiert und das sich oberhalb der Reaktionslösung befindende Mineralöl vorsichtig abgezogen. Jeweils 20µl der Reaktionslösung werden in ein saubere Cap überführt und mit 2µl 3M Natriumacetat-Lösung (pH4.7) sowie 50µl abs. Ethanol versetzt. Zur Fällung beläßt man das Ganze etwa 10min auf Eis und zentrifugiert anschließend im Kühlraum 5min bei 13000rpm. Der Überstand wird vorsichtig mit der Pipette abgezogen und das zumeist schlecht sichtbare Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Man zentrifugiert nochmals kurz an und zieht erneut mit der Pipette den Überstand vorsichtig ab. Dieser Reinigungsschritt dient der Beseitigung nicht-eingebauter Farbstoff-Terminatoren sowie der Entfernung überschüssiger Primer und Pufferbestandteile. Das Pellet wird unter Vakuum kurz getrocknet und zur Sequenzierung abgegeben.

#### **8.7.4. Arbeiten mit Proteinen**

##### **8.7.4.1. Puffer und Lösungen**

###### **Acrylamidstammlösungen (Schägger & v. Jagow)**

I: 49.5%T/6%C: 465g Acrylamid/30g Bisacrylamid

II: 49.5%T/3%C: 480g Acrylamid/15g Bisacrylamid

Die eingewogenen Mengen werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt und unter Erwärmen gelöst. Die Lagerung erfolgt bei RT in einer dunklen Flasche.

###### **Acrylamidstammlösungen (30%/0.8%)**

60g Acrylamid werden mit 1.6g Bisacrylamid versetzt, auf 200ml mit A.dest. aufgefüllt und unter Vakuum sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

###### **Agarose-/Stärkelösung (0.8%/1%)**

5g Stärke und 4g Agarose werden in einer 1l-Blaukappenflasche eingewogen und mit 10mM Phosphatpuffer auf 500ml aufgefüllt. Anschließend kocht man die Lösung in der Mikrowelle auf und temperiert sie zur Benutzung auf 50°C.

###### **Anodenpuffer (10x, Schägger & v. Jagow)**

242.2g Tris werden in A. dem. gelöst und mit HCl auf pH 8.9 eingestellt. Anschließend wird die Lösung auf 1l aufgefüllt.

###### **APS-Lösung (10%)**

Hierzu wird 1g Ammoniumperoxodisulfat in 10ml A.dest. aufgelöst. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

**Coomassielösung (0.025%)**

125mg werden mit Essigsäure (10%) auf 500ml aufgefüllt.

**Gelpuffer (Nativgele)**

56.79g Glycin und 12g Tris werden auf 1l mit A. dest. aufgefüllt. Vor Gebrauch wird 1Teil Puffer mit 3Teilen A. dest. gemischt und eingesetzt.

**Gelpuffer (Schägger & v. Jagow)**

90.83g Tris und 0.75g SDS werden in A. dem. gelöst, mit HCl auf pH 8.45 eingestellt und auf 250ml aufgefüllt.

**Farbreagenz A (BCA-Nachweismethode)**

1g BCA, 2g Natriumcarbonat, 0.16g Natriumtetrat, 0.4g NaOH und 0.95g Natriumbicarbonat werden in 100ml A. dest. gelöst und auf pH11.25 eingestellt.

**Farbreagenz B (BCA-Nachweismethode)**

0.4g Kupfersulfat werden in 10ml A. dest. gelöst.

**Farbreagenz C (BCA-Nachweismethode)**

Farbreagenz C ergibt sich frisch aus 50Teilen Farbreagenz A und 1Teil Farbreagenz B. Die Haltbarkeit beträgt eine Woche.

**Fixierlösung für Proteingele**

500ml Methanol und 100ml Eisessig werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt.

**Kathodenpuffer (5x, Schägger & v. Jagow)**

60.55g Tris, 89.6g Tricin und 5g SDS werden mit A. dem. auf 1l aufgefüllt.

**KI/I<sub>2</sub>-Lösung**

300mg Kaliumiodid und 130mg I<sub>2</sub> mit A. dem. auf 100ml auffüllen und unter mehrstündigen Rühren lösen. Die Lösung bei 4°C im Dunkeln lagern.

**PEG 2000 Lösung (50%)**

500g PEG 2000 werden auf mit A.dest. auf 1l aufgefüllt und bis zur vollständigen Auflösung eingetührt.

**Phosphatpuffer (10mM)**

1.744g Dikaliumhydrogenphosphat werden in A. dem. gelöst, mit HCl auf pH 7.3 eingestellt, aufgefüllt auf 1l und autoklaviert.

**Sammelgelpuffer (Nativgele)**

30.3g Tris (0.5M) werden in 400ml A. dem. Gelöst und mit konz. HCl auf pH 6,8 eingestellt. Anschließend wird diese Lösung auf 500ml aufgefüllt und filtriert (0.45µm).

**Stärke/Agarose Lösung (1/0.8)**

1g lösliche Stärke wird mit 0.8g Agarose (für DNA Agarosegele) vermischt und auf 100ml aufgefüllt. In der Mikrowelle wird diese Lösung aufgeköcht und entsprechend im Wasserbad temperiert.

**Trenngelpuffer (Nativgele)**

60.6g Tris (1M) werden in 400ml A. dem. Gelöst und mit konz. HCl auf pH 8,8 eingestellt. Anschließend wird diese Lösung auf 500ml aufgefüllt und filtriert (0.45µm).

**8.7.4.2. Aceton-Fällung**

Die Aceton-Fällung wurde in dieser Arbeit eingesetzt um vor der SDS-Gelelektrophorese eine Vorreinigung und Aufkonzentrierung der Proteinproben durchzuführen. Hierzu werden die einzelnen Proben mit 5V eiskaltem Aceton versetzt und 10min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation erhält man ein Proteinpellet das sich entweder an der Luft oder in der Speed-Vac leicht trocknen läßt. Diese Methode eignet sich auch für eine partielle Fraktionierung der Proteinlösung.

**8.7.4.3. Ammoniumsulfat-Fällung**

Vor der präparativen Fällung wird zunächst im analytischen Maßstab untersucht, bei welcher Konzentration die Fällung des gewünschten Proteins vollständig erfolgt. Dazu wird eine 50ml Schüttelkultur auf 4 °C abgekühlt und in SS-34 Röhrchen bei 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und über 3µm Filter erneut filtriert. Anschließend werden entsprechende Volumina abgenommen und mit unterschiedlichen Mengen an Ammoniumsulfat (zwischen 10-90% Sättigung, 4°C) versetzt. Das Ammoniumsulfat wird dabei portionsweise zugegeben und am Ende mindestens eine Stunde gefällt. Nach erneuter Zentrifugation im Kalten (30min bei 10000rpm) wird der Überstand vorsichtig abdekantiert und das Pellet an der Luft kurz getrocknet. In dest. Wasser aufgenommen wird etwa 1/10 durch eine



Methanol/Chloroform-Fällung entsalzt. Die erhaltenen Proben können anschließend direkt auf ein Gel aufgetragen werden.

Für die präparative Fällung werden die Zellen zunächst vom Kulturüberstand durch Filtration über eine Porzellannutsche abgetrennt. Die erhaltene Kulturlösung wird in GSA-Becher aufgeteilt und bei 10000rpm für 45 min kalt zentrifugiert. Vorsichtig wird der Überstand abdekantiert und erneut über 3µm Filter unter Vakuum filtriert. Anschließend kann das durchsichtige Filtrat mit der nach obiger Methode ermittelten Ammoniumsulfatkonzentration in der Kälte portionsweise versetzt werden. Nach abgeschlossener Fällung wird die trübe Lösung auf GSA gleichmäßig verteilt und 45min bei 10000rpm kalt zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand abdekantiert und das Pellet durch abkippen der Zentrifugenbecher an der Luft kurz getrocknet. Das Pellet wird anschließend in Puffer (40mM Tris-HCl pH8, 10mM EDTA) über Nacht bei 4°C resuspendiert.

#### **8.7.4.4. Plattentest (nach K.P.Koller, Hoechst AG, per. Mit.)**

Der  $\alpha$ -Amylase Plattentest ist ein einfaches Nachweisverfahren zur qualitativen Bestimmung von Inhibitor produzierenden Stämmen. Chemisch beruht er auf der Eigenschaft des Iod sich in die zwischenmolekulare Hohlräume von Stärkeketten polymerartig einzulagern. Dieser Vorgang macht sich im Optischen durch eine deutliche Absorptionsverschiebung bemerkbar. Kolonien die keinen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor exprimieren, bleiben farblos, bei ihnen hat das Enzym Stärke langsam abgebaut, wohingegen exprimierende Stämme sich leicht durch eine dunkelblaue Inhibitionszone erkennen lassen. Die bei diesem Test benötigte  $\alpha$ -Amylase erhält man über Extraktion von Pankreatin mit  $\text{PO}_4^{3-}$  Puffer.

Zur Durchführung beimpft man nach Rastervorlage parallel NL701 Thiostrepton-Platten mit den zu untersuchenden Klonen und läßt diese anschließend bei 28°C wachsen. Dabei sollten die Koloniedurchmesser 3mm nicht überschreiten, was je nach Kultur 2-3d dauern kann. Haben die Klone die entsprechende Größe erreicht, werden sämtliche Platten aus dem Brutschrank genommen und auf der Laborbank mit 1.5ml der entsprechenden, immer frisch anzusetzenden Pankreatinlösung versetzt. Da sich die Expressionsmengen schwer voraussagen lassen, empfiehlt sich am Anfang jeder Testreihe eine grobe Abschätzung mit Konzentrationen zwischen 0.2-3% Pankreatin. Dabei gilt, daß bei hohen Konzentrationen die Hemmhofgrößen dementsprechend

klein ausfallen und umgekehrt. Um einheitliche Hemmhöfe zu erhalten, sollte die Pankreatinlösung durch langsames Umschwenken so homogen als möglich auf die Platte aufgetragen werden. Nach etwa 30min werden alle Platten mit einer auf 50°C temperierten Stärke/Agarose-Lösung (1/0.8) überschichtet und 1h 30min bei 28°C inkubiert. Da die Stärkelösung sehr schnell und ungleichmäßig fest wird, sollte man beim Arbeiten keine Zeit verlieren und sich eventuell mit vorgewärmten Glaspipetten behilflich sein. Die fertigen Platten können im Anschluß mit 2.5ml Jod/Kaliumjodid-Löung angefärbt werden. Die Färbung hält sich im Allgemeinen bis zu 10min.

#### **8.7.4.5. Miniaturisierung von Proteingelen**

Bei manchen Gelen reicht die Intensität zahlreicher Banden nicht aus um sie genügend sicher identifizieren zu können. Hier gibt es die Möglichkeit durch gleichmäßige Verkleinerung der Gele Banden stärker zu verdichten um sie so überhaupt erst sichtbar zu machen. Wiederholt man diesen Prozess mehrmals läßt sich als zusätzlicher Effekt die Hintergrundfärbung der Gele deutlich verringern.

Die nach der Elektrophorese fertig fixierten und gefärbten Gele (keine Silberfärbung!) werden zweimal kurz mit dest. Wasser abgespült und gründlich abtropfen gelassen. Danach wird das Gel in eine zuvor auf 70-75°C (Wasserbad) gebrachte 50%ige PEG 2000 Lösung eingelegt. Darin läßt man das Gel so lange taumeln bis die gewünschte Größe erreicht. Das fertige Gel läßt sich anschließend direkt auf Cellophan-Papier trocknen.

Wird dieses Verfahren für eine bessere Entfärbung der Gele benutzt, läßt sich das miniaturisierte Gel wieder nach Einlegen in dest. Wasser auf seine normale Größe bringen.

#### **8.7.4.6. Nativ-PAGE**

Die Analytik von nicht-denaturierten Proteinen über Nativ-PAGE hat gegenüber denaturierenden Analyseverfahren den Vorteil, daß weitere wichtige Aussagen über die Struktur von Proteinen erhalten werden können. Wie bereits in der Diplom-Arbeit gezeigt werden konnte (Hüseyin Aygün), lassen sich mit dieser Technik besonders gut Ladungsmutationen am Tendamistat nachweisen. Darüberhinaus bleiben unter nicht-denaturierenden Laufbedingungen

Komplexe, wie sie sich beispielsweise zwischen Tendamistat und der pankreatischen  $\alpha$ -Amylase ausbilden, erhalten und können durch die anschließende Färbung sichtbar gemacht werden.

Stabilitätsdaten zu einzelnen Proteinen können ebenfalls durch eine leichte Modifikation der Gelzusammensetzung erhalten werden. Setzt man nämlich dem nicht-denaturierenden Gelsystem unterschiedliche Harnstoffmengen zu, erhält man bei Mutanten mit niedriger Stabilität eine Gleichgewichtsverschiebung in Richtung des denaturierten Proteins. Damit verbunden ist eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit gegenüber einem denaturierungsunempfindlichen Proteinstandard.

Besonders gute Ergebnisse konnten mit diskontinuierlichen Puffersystemen erhalten werden. Da sich der Aufbau der Gelkassette nicht von der Vorschrift im Tricine-SDS-Teil unterscheidet sei an dieser Stelle darauf verwiesen. Für die Auftrennung von Tendamistat in Nativ-PAGE Gelsystemen haben sich folgende Polyacrylamid-Konzentrationen bewährt:

Lösungen	<i>Nativ-Gel</i>		<i>Harnstoff-Gel</i>	
	Trenngel	Sammelgel	Trenngel	Sammelgel
30% / 0.8%	15ml	1.25ml	15ml	1.25ml
Harnstoff (8M)	-	-	14.4g	-
Sammelgelpuffer	-	2.5ml	-	2.5ml
Trenngelpuffer	3.75ml	-	3.75ml	-
A. dem.	ad 30ml	10ml	ad 30ml	10ml
Endvolumen:	30ml	12.5ml	30ml	12.5ml
10% APS	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l

Das Trenngel wird als erstes zusammengestellt. Nach hinzupipettieren des Copolymerisationsstarters sollten die Lösungen in die Gelkassette eingefüllt werden. Das Trenngel nimmt etwa 3/4 des Füllvolumens in Anspruch. Um die Oberkante des Trenngels gerade ziehen zu können, wird noch etwas n-Butanol aufpipettiert. Die Polymerisation dauert etwa 45min. Ist sie beendet, gießt man das n-Butanol ab, wäscht mit dest. H<sub>2</sub>O gründlich nach und füllt mit dem frischen Sammelgel die Gelkassette auf. Der Probenkamm wird zum Schluß in die Kassette blasenfrei eingeführt und die entstandenen Randzonen mit Sammelgel erneut abgedichtet. Innerhalb der nächsten 20min sollte die Copolymerisation des Sammelgels abgeschlossen sein. Der fertigen Gelkassette entfernt man danach die Klammerungen sowie den unteren Bodenspacer. In den mit Laufpuffer aufgefüllten Anodenraum der Apparatur wird die Gelkassette, ohne Luftblasen einzulassen, schräg eingetaucht und an die Vorderseite der Kammer angeklammert. Zur

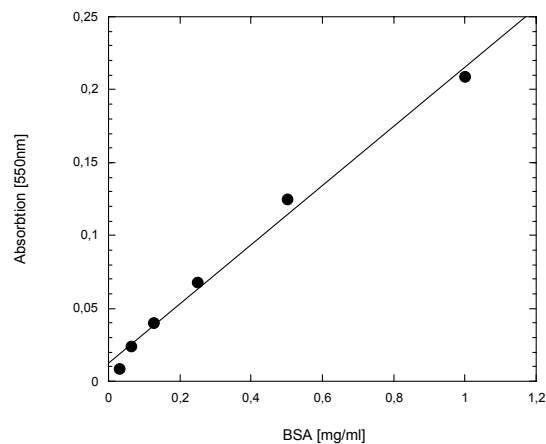
Sicherheit wird der obere Kathodenraum vor dem Einfüllen des Laufpuffers mit 1% Agarose abgedichtet. Nach Einfüllen des Laufpuffers in die obere Pufferkammer entfernt man den Probenkamm vorsichtig aus dem Sammelgel und säubert mit einem dünnen Spatel die Taschen. Nachdem max. 20µl der einzelnen Proben in die Taschen aufgetragen wurde, kann der Vorlauf des Gels gestartet werden. Dieser erfolgt bei 50V so lange, bis sich scharfe Banden ausgebildet haben. Anschließend stellt man die Spannung auf 95V und läßt über Nacht laufen.

Am nächsten Tag wird die Gelkassette aus der Kammer genommen und mit einem dünnen Spatel beide Glasplatten voneinander getrennt. Das Sammelgel wird anschließend entfernt, das Trenngel vorsichtig von der Plattenoberfläche mit beiden Händen abgezogen und in eine 12%ige TCA-Lösung eingelegt. Die Fixierung erfolgt bei großen Gelen für mindestens 1h auf dem Taumler. Danach wird das Gel mit dest. Wasser ausgespült und für mindestens 2h in die Färbelösung eingelegt. Danach gießt man die restliche Färbelösung zurück und entfärbt in kleinen Portionen mit 10% HOAc bis zum gewünschten Kontrast. Die Detektionsgrenze für Tendaminostat (7.9kDa) beträgt 100ng.

Falls es gewünscht wird, kann das Proteingel in Cellophanfolie eingeschweißt werden. Dazu legt man das Gel für mindestens 45min mit der Folie in 30% MeOH/10% Glycerin ein. Anschließend trocknet man das sich zwischen den Cellophanlagen befindliche Gel auf dem Geltrockner. Um einen Gelbruch zu vermeiden sollte die Heizung des Geltrockners ausgeschaltet bleiben.

#### **8.7.4.7. Proteinquantifizierung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem von Smith et al. entwickelten Verfahren, das alternativ auch als BCA-Verfahren (BCA: Bicinchonsäure) bezeichnet wird. Bei diesem Verfahren wird das im Reagenz A befindliche Cu(II) mit Hilfe von Proteinen zu Cu(I) reduziert. Bicinchonsäure ist ein hoch spezifisches chromogenes Komplexierungsreagenz für die Detektion der entstandenen Cu(I)-Ionen. Der purpurfarbene, stabile Komplex läßt sich anschließend bei 562nm im ELISA-Reader detektieren (vgl. Redinbaugh und Turley). Die gemessene Absorption verhält sich über weite Bereiche der Konzentration linear und ist, was störende Einflüsse (z.B. Detergenzien) anbelangt, deutlich toleranter als beispielsweise der Lowry-Test. Vor jeder Messung sollte das Reagenz A frisch angesetzt werden. Vor jeder Messung erfolgt eine Eichreihenbestimmung mit BSA-Standardlösung:



Da das Farbreagenz (Reagenz A) nur begrenzt haltbar ist, wird dieses, wie bereits oben erwähnt, frisch angesetzt. Dazu gibt man in 50 Teile Lösung A einen Teil Lösung B und mischt beide kurz bis sich eine schwach-grün gefärbte Lösung bildet. Das so hergestellte Reagenz A ist bis zu einer Woche bei Raumtemperatur haltbar und sollte spätestens nach dieser Zeit nicht weiter verwendet werden.

In die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte wird jeweils 10µl der zu vermessenden Probe vorgelegt. Bei zu hohen Proteinkonzentrationen empfiehlt es sich, die Proben mit Phosphatpuffer (100mM Kaliumphosphat, 1mM EDTA pH7.5) entsprechend zu verdünnen. Danach werden pro Kavität 200µl Reagenz A zugesetzt und das ganze vorsichtig mit einer Gummidichtung verschlossen. Die Inkubation der Platte erfolgt entweder bei Raumtemperatur Über-Nacht oder für 30min bei 60°C.

#### 8.7.4.8. Tricine-SDS-Proteingelelektrophorese (Schägger & v. Jagow)

Man kann den Ablauf der Elektrophorese in zwei Abschnitte unterteilen. Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Vorbereitung der Gießkassette und dem Fertigstellen des eigentlichen Polyacrylamidgels. Der zweite Abschnitt beinhaltet die Probenvorbereitung, die Elektrophorese und die anschließende Färbung des Gels mittels Coomassie.

Für die Gelkassette werden zwei Glasplatten, eine Rücken- und eine "Öhrchenplatte", benötigt. Diese Platten unterzieht man als erstes einer Oberflächenreinigung mit dest. H<sub>2</sub>O und anschließend abs.EtOH. Dann legt man auf die Rückenplatte, die ebenfalls gesäuberten

Teflonabstandhalter auf und verschließt mit der “Öhrchenplatte” die Gelkassette. Die Glasplatten arretiert man anschließend mit Metallklammern und dichtet die seitlichen Spalten, um ein Herauslaufen zu vermeiden, mit Agaroselösung ab. Bei der Auftrennung von Tendamistat haben sich als Polyacrylamidkonzentrationen in den einzelnen Gelphasen folgende Konzentrationen bewährt:

Lösungen	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
49.5% T/ 6% C	10ml	-	-
49.5% T/ 3% C	-	3.05ml	-
Gelpuffer	10ml	5ml	3.1ml
Glycerin (99%)	4g	-	-
A.dem.	ad 30ml	6.95ml	8.4ml
Endvolumen:	30ml	15ml	12.5ml
10% APS	100µl	50µl	100µl
TEMED	10µl	5µl	10µl

Das Trenngel und das Spacergel werden als erstes zusammengestellt. Nach hinzupipettieren des Copolymerisationsstarters sollten die Lösungen in die Gelkassette eingefüllt werden. Das Trenngel nimmt etwa 2/3 des Füllvolumens in Anspruch. Anschließend folgt das Einfüllen des Spacergels, was etwa 1/3 des Restvolumens ausmachen sollte. Durch den Glyceringehalt des Trenngels wird eine Vermischung der beiden “Phasen” erschwert. Um die Oberkante des Spacergels gerade ziehen zu können, wird noch etwas n-Butanol aufpipettiert. Die Polymerisation dauert etwa 45min. Ist sie beendet, gießt man das n-Butanol ab, wäscht mit dest. H<sub>2</sub>O gründlich nach und füllt mit dem frischen Sammelgel die Gelkassette auf. Der Probenkamm wird zum Schluß in die Kassette blasenfrei eingeführt und die entstandenen Randzonen mit Sammelgel erneut abgedichtet. Innerhalb der nächsten 45min sollte die Copolymerisation des Sammelgels abgeschlossen sein.

Für die Probenvorbereitung entnimmt man den Kulturüberständen etwa 20-40µl und rotiert sie bis fast zur Trockene an der Speed-Vac ein. Danach werden die Rückstände in 10µl dest. H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 2xPuffer versetzt. Als Referenzprobe dienen bei Coomassie-Färbung etwa 2µg HPLC gereinigtes Tendamistat. Da die Denaturierung des Tendamistats nicht immer vollständig abläuft, wird zu den einzelnen Proben weitere 2µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Die anschließende Hitzebehandlung dauert 2min, erfolgt bei 100°C und wird mit einem Kältesturz ins Eiswasser abgeschlossen. Der fertigen Gelkassette entnimmt man die Klammerungen und den Bodenspacer. Anschließend wird der untere Anodenraum der

Elektrophoreseapparatur mit Puffer aufgefüllt und darin die Gelkassette, ohne Luftblasen einzulassen, eingetaucht. Hat man dies erreicht, werden die beiden Glasplatten mit Klammern an die Vorderseite der Kammern eingespannt und der obere Kathodenraum mit 1% Agarose abgedichtet. Nach Einfüllen des Kathodenpuffers entfernt man den Probenkamm vorsichtig aus dem Sammelgel und säubert mit einem dünnen Spatel die Taschen. Nachdem max. 20µl der einzelnen Proben in die Taschen aufgetragen wurde, kann der Vorlauf des Gels gestartet werden. Dieser erfolgt bei 30V, bis zum Erreichen des Sammelgels. Anschließend stellt man die Spannung auf 110V ein und läßt über Nacht laufen. Am nächsten Tag sollte sich die untere Markerbande gerade aus dem Gel herausgeluirt haben, ist das noch nicht der Fall, läßt man bei 180V weiterlaufen. Die Platten werden anschließend vorsichtig voneinander getrennt und das Sammelgel von dem Spacergel befreit. Das restliche Gelstück wird in einer Fixierlösung aus 50% MeOH 30min getaumelt und anschließend in einer 0.025% Coomassie-Färbelösung für weitere 30min angefärbt. Danach gießt man die restliche Färbelösung zurück und entfärbt in kleinen Portionen mit 10% HOAc bis zum gewünschten Kontrast. Die Detektionsgrenze für Tendamistat (7.9 kDa) beträgt 100ng. Falls gewünscht wird, kann das Proteingel in Cellophanfolie eingeschweißt und so längere Zeit haltbar gemacht werden. Dazu legt man es für 10min mit der Folie in 30% MeOH/4% Glycerin ein, faltet zusammen und trocknet das Gel auf dem Gelrockner.

#### **8.7.4.9. Silberfärbung von Proteingelen**

Dieses Silberfärbungs-Verfahren eignet sich besonders gut für die Sichtbarmachung schwacher Banden bei besonders niedrigem Hintergrund.

Nativ-Gele werden vor der eigentlichen Prozedur in 12% TCA Lösung 30min vorbehandelt und anschließend zweimal gründlich mit dest. Wasser (Millipore) ausgespült. Die fertigen Gele behandelt man 3 mal 30min mit einer frisch angesetzten Fixier-Lösung (40% Ethanol und 10% Essigsäure). Um die Fixierrückstände zu entfernen wird das Gel anschließend in eine 20%ige Ethanol-Lösung für 10min überführt. Danach spült man weitere 10min in dest. Wasser aus und legt das Gel 1min in eine 0.03%ige Natriumthiosulfat-Lösung ein. Nach der Sensibilisierung wird zweimal gründlich jeweils 1min mit dest. Wasser ausgespült. Das sensibilisierte Gel wird anschließend für die Silberfärbung 20-60min mit frisch angesetzter Färbelösung (0.3% Silbernitrat und 250µl/l 37% Formaldehyd) behandelt. Erneut wird kurz mit dest. Wasser

ausgespült und dann das Gel in die ebenfalls immer frisch anzusetzende Entwicklerlösung (3% Kaliumcarbonat, 250 $\mu$ l/l 37% Formaldehyd und 10mg/l Natriumthiosulfat) überführt. Es empfiehlt sich, sobald die ersten Banden zu sehen sind die Entwicklerlösung auszutauschen um die Bildung der Hintergrundfärbung so niedrig als möglich zu halten. Haben die Banden ihre gewünschte Intensität erhalten, wird der Entwicklungsprozess abgebrochen. Hierzu legt man das kurz mit dest. Wasser ausgespülte Gel in eine Lösung bestehend aus 50g/l Tris, 20ml/l konz. Essigsäure und 0.1g/l EDTA (Termination) ein. Die Lagerung der silbergefärbten Gele erfolgt in dest. Wasser.

## **8.7.5.      Aufreinigung von Proteinen**

### **8.7.5.1. Puffer und Lösungen**

#### **Anionenaustauscher**

Puffer A:        20 mM Bis-Tris pH6.0: 4.2g Bis-Tris werden hierzu in 1l A.dest. aufgelöst, mit konz. HCl auf pH6.0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

Puffer B:        20 mM Bis-Tris, 1M NaCl pH6.0: 4.2g Bis-Tris, 58g NaCl werden hierzu in 1l A.dest. aufgelöst, mit konz. HCl auf pH6.0 gebracht und anschließend sterilfiltriert.

#### **Gelfiltration**

Puffer:         20mM Bis-Tris pH6.0: vgl. Anionenaustauscher.

#### **Kationenaustauscher**

Puffer A:        50mM Lactat pH3.3: 4.5g DL-Milchsäure werden hierzu in 1l A.dest. aufgelöst, mit konz. NaOH auf pH3.3 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

Puffer B:        50mM Lactat, 1M NaCl pH3.3: 4.5g DL-Milchsäure, 58g NaCl werden hierzu in 1l A.dest. aufgelöst, mit konz. NaOH auf pH3.3 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

### **8.7.5.2. Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)**

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte auf einer FPLC-Anlage der Firma Pharmacia bei 4°C. Die Anlage besteht aus einer externen Schauchpumpe zum Austragen großer Volumina, einem Controller (LCC-500 Plus), zwei Pumpen (P-500) für Gradientenläufe, einem Mischer mit Vorfilter, einem Motorventil (MV-7) mit Super-Loop (15ml), einem Einkanal UV Monitor (UV-



1) mit Durchflußzelle (HR-10), einem Zweikanalschreiber (REC-482) sowie einem Fraktionssammler (Redifrac).

Alle verwendeten Säulen wurden selbst an der FPLC-Anlage nach Herstellerangaben gepackt. Die Pufferlösungen wurden stets frisch angesetzt und über 0.2µm Filter. Vor jedem präparativen Trennungslauf mußte die Reinigung und Konditionierung der Ionenaustauscher-Säulen erfolgen. Dazu verwendet man nacheinander jeweils 1CV 1M NaCl, 1CV 0.2N NaOH und 1CV 0.1N HCl. Anschließend wurde mit Puffer A solange gewaschen bis sich am Ende der entsprechende pH-Wert eingestellt hatte. Die benutzten Gelfiltrationsmaterialien (Sephadex G und Sephacryl HR) konnten immer mit 2CV 0.2N NaOH gereinigt werden. Die Langzeit-Lagerung der Säulen erfolgte in 20% EtOH.

Die nach der Gelfiltration bereits umgepufferten Proteinfractionen (Puffer A) werden je nach Volumen entweder über die Schlauchpumpe oder über den Super-Loop auf die Ionenaustauscher Säulen aufgebracht. Dabei darf die Beladungskapazität nicht überschritten werden (DEAE-Sepharose fast flow, 2.6cmx10cm: 60-70mg; S-Sepharose fast flow, 1.6cmx10cm: 30mg). Anschließend wird der Gradientenlauf zusammen mit der Fraktionierung gestartet. Substanzen die unter den Pufferbedingungen nicht mehr an die Säule binden können, befinden sich in dem „Durchbruch“ und werden stets aufgefangen und untersucht. Bei dem Prinzip des Ionenaustauschers wird das Bindungsgleichgewicht zwischen Probe und Säulenmaterial allmählich durch das Ansteigen der Gegenionenkonzentration (Puffer B) verschoben. Vernachlässigt man weitere Einflußgrößen (hydrophobe Wechselwirkungen, Größe der Proteine ect.) erfolgt die Elution der einzelnen Proteine entsprechend ihrer Oberflächenladung. Nach dem Lauf müssen die aufgefangenen Fraktionen erneut untersucht werden.

Bei der Aufreinigung von Tendamistat-Mutanten hatte sich die Gelfiltration als Vorreinigungsschritt (Capture) bestens bewährt. Da sich über das verwendete Säulenmaterial (Sephadex S-100 HR, 2.6cmx60cm) die meisten Verunreinigungen gut abtrennen ließen, konnte die Gelfiltrationssäule relativ großzügig (30ml) mit Proteinlösung über die Schlauchpumpe beladen werden.

## Die FPLC-Aufreinigungsprotokolle für die Tendamistat-Mutanten:

## (i) Ionenaustauscher

<i>S Separose fast flow</i>			<i>DEAE Separose fast flow</i>		
0.0	CONC %B	0.0	0.0	CONC %B	0.0
0.0	ml/min	4.0	0.0	ml/min	4.0
0.0	cm/ml	0.05	0.0	cm/ml	0.05
0.0	Port.Set	3.1	0.0	Port.Set	3.1
0.0	Port.Set	6.1	0.0	Port.Set	6.1
0.0	Valve.Pos	1.1	0.0	Valve.Pos	1.1
0.0	Clear Data		0.0	Clear Data	
0.0	Monitor	1	0.0	Monitor	1
0.0	Integrate	1	0.0	Integrate	1
0.0	Level %	0.1	0.0	Level %	0.1
0.0	ml/mark	10	0.0	ml/mark	10
250.0	Conc %B	40	550.0	Conc %B	30
255.0	Conc %B	100	555.0	Conc %B	100
310.0	Conc %B	100	610.0	Conc %B	100
320.0	Conc %B	0.0	620.0	Conc %B	0.0
320.0	Port.Set	3.0	620.0	Port.Set	3.0
320.0	Port.Set	6.0	620.0	Port.Set	6.0
370.0	Port.Set	0.0	670.0	Port.Set	0.0
370.0	Integrate	0	670.0	Integrate	0
370.0	Prt Pk	1.2	670.0	Prt Pk	1.2
Puffer A: 50mM Lactat pH3.3			Puffer A: 20 mM Bis-Tris pH6.0		
Puffer B: 50mM Lactat, 1M NaCl pH3.3			Puffer B: 20 mM Bis-Tris, 1M NaCl pH6.0		

## (ii) Gelfiltration

<i>Sephacryl S-100 HR</i>		
0.0	CONC %B	0.0
0.0	ml/min	0.50
0.0	cm/ml	0.05
0.0	Valve.Pos	3.1
0.0	Clear Data	
0.0	Monitor	1
0.0	Integrate	1
0.0	Level %	0.0
0.0	ml/mark	10
200.0	Conc %B	0.0
200.0	Port.Set	3.0
200.0	Integrate	0
200.0	Prt Pk	1.2
Puffer A 20mM Bis-Tris pH6.0		

## 9. Literaturverzeichnis

- Abkevich, V I , Gutin, A M , Shakhnovich, E I „Specific nucleus as the transition state for protein folding: Evidence from the lattice model“  
Biochemistry, 33, 10026-10036 (1994)
- Agarwal, R K , Perl, A „PCR amplification of highly GC-rich DNA template after denaturation by NaOH“  
Nucl. Acids. Res., 21, 5283-5284 (1993)
- Adman, E T , Turley, S , Bramson, R , Petratos, K , Banner, K , Tsernoglou, D , Beppu, T , Watanabe, H „A 2Å structure of the blue copper protein from *Alcaligenes faecalis* S-6“  
J. Biol. Chem., 264, 87-99 (1989)
- Alber, T „Mutational effects on protein stability“  
Annu. Rev. Biochem., 58, 765-798 (1989)
- Allewell, N M , Oberoi, H „Electrostatic effects in protein folding, stability, and function“  
Methods Enzymol., 202, 3-19 (1991)
- Anfinsen, C B , Haber, E , Sela, M , White, F W „The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 1309-1314 (1961)
- Anfinsen, C B „Principles that govern the folding of protein chains“  
Science, 181, 223-230 (1973)
- Aschauer, H , Vértesy, L , Braunitzer, G „Die Sequenz des  $\alpha$ -Amylaseinhibitors Hoe-467 A aus *Streptomyces tendae*“  
Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem., 362, 465-467 (1981)
- Aygün, H „Darstellung neuer Faltungsmutanten des  $\alpha$ -Amylaseinhibitors Tendamistat mittels PCR“  
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1995)
- Baker, E N „Structure of azurin from *Alcaligenes denitrificans*“  
J. Mol. Biol., 203, 1071-1095 (1987)
- Balbach, J , Seip, S , Kessler, H , Scharf, M , Kashani-Poor, N , Engels, J W „Structure and dynamic properties of the single disulfide-deficient  $\alpha$ -amylase inhibitor [C45A/C73A] tendamistat: an NMR study“  
Proteins: Struct. Funct. Genet., 33, 285-294 (1998)
- Baldwin, R L „The nature of protein folding pathways: The classical versus the new view“  
J. of Biolmol. NMR, 5, 103-109 (1994)
- Baldwin, R L “On-pathway versus off-pathway folding intermediates”  
Folding & Design, 1, R1-R8 (1996)
- Ballew, R M , Sabeiko, J , Gruebele, M “Observation of distinct nanosecond and microsecond protein folding events”  
Nature Struct. Biol., 3, 923-926 (1996)
- Baltz, R H „Gene expression using streptomycetes“  
Curr. Opin. Biotech., 1, 12-20 (1990)

- Banner, D W , Kokkinidis, M , Tsernoglou, D „Structure of the Col E1 rop protein at 1.7Å resolution“  
J. Mol. Biol., 196, 657-675 (1987)
- Berdoll, M , Remy, M H , Cagnon, C , Masson, J M , Dumas, P „Proline-dependent oligomerization with arm exchange“  
Structure, 5, 391-401 (1997)
- Bernan, V , Filipula, D , Herber, W , Bibb, M , Katz, E „The nucleotide sequence of the thyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* and characterization of the gene product“  
Gene, 37, 101-110 (1985)
- Bipp, M , Janssen, G R , Ward, J M „Cloning and analysis of the promotor region of the erythromycin-resistance gene (ermE) of *Streptomyces erythraeus*“  
Gene, 38, 215-226 (1985)
- Bibb, M , Janssen, G R „Unusual features of transcription and translation of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing *Streptomyces*“  
5th Intern. Symp. on the Genetics of Industrial Microorganisms, 309-318 (1986)
- Bibb, M J , Wright, F „Codon usage in G+C-rich *Streptomyces* genome“  
Gene, 113, 55-65 (1992)
- Bjorkmann, P J , Saper, M A , Samraoui, B , Bennett, W S , Strominger, J L , Wiley, D C „Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2“  
Nature, 329, 506-512 (1987)
- Blake, C C , Geisow, M , Oatley, S , Rerat, B , Rerat, C „Structure of prealbumin secondary, tertiary refinement at 1.8Å“  
J. Mol. Biol., 121, 339-356 (1978)
- Blanco, F J , Jiménez, A , Rico, M , Santorro, J , Herranz, J , Nieto, J L „Tendamistat (12-26) fragment, NMR characterization of isolated  $\beta$ -turn folding intermediates“  
Eur. J. Biochem., 200, 345-351 (1991)
- Blanco, F J , Angeles-Jimenez, M , Herranz, H , Rico, M , Santorro, J , Nieto, J L „NMR evidence of a short peptide that folds into  $\beta$ -hairpin in aqueous solution“  
J. Am. Chem. Soc., 115, 5887-5888 (1993)
- Blanco, F J , Rivas, G , Serrano, L „A short linear peptide that folds into a nativ stable  $\beta$ -hairpin in aqueous solution“  
Nature Struct. Biol., 1, 584-590 (1994)
- Blanco, F J , Ramirez-Alvarado, M , Serrano, L „Formation and stability of  $\beta$ -hairpin structure in polypeptides“  
Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 107-111 (1998)
- Bloch, W „A biochemical perspective of polymerase chain reaction“  
Biochemistry, 30, 2735-2747 (1991)
- Blum, A D , Smallcombe, H , Baldwin, R L „Nuclear magnetic resonance evidence for a structural intermediate at an early stage in the refolding of ribonuclease A“  
J. Mol. Biol., 118, 305-316 (1978)
- Botstein, D , Shortle, D „Strategies and applications of *in vitro* mutagenesis“  
Science, 229,1193-1201 (1985)
- Brahms, S , Brahms, J „Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism“  
J. Mol. Biol., 138, 149-178 (1980)

- Branden, C , Tooze, J „Introduction to protein structure“  
Garland Publishing, Inc., 2<sup>nd</sup> Edition (1999)
- Brandts, J F , Halvorson, H R , Brennan, M „Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reaction is due to cis-trans isomerism of proline residues“  
Biochemistry, 14, 4953-4963 (1975)
- Brawner, M , Poste, G , Rosenberg, M , Westpheling, J „*Streptomyces*: a host for heterologous gene expression  
Curr. Opin. Biotech., 2, 674-684 (1991)
- Brock, T D , Madigan, M T , Martinko, J M , Parker, J „Biology of microorganisms“  
Prentice-Hall, Inc., 7 Edition (1994)
- Brown, J E , Klee, W A „Helix-coil transition of the isolated amino terminus of ribonuclease“  
Biochemistry, 10, 470-476 (1971)
- Bryngelson, J D , Onuchic, J N , Socci, N D , Wolynes, P G „Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: A synthesis“  
Proteins: Struct. Funct. Genet., 21, 167-195 (1995)
- Buck, M , Radford, S E , Dobson, C M „A partially folded state of hen egg white lysozyme in trifluoroethanol: structural characterization and implications for protein folding“  
Biochemistry, 32, 669-678 (1993)
- Burton, R E , Huang, G S , Daugherty, M A , Calderone, T L , Oas, T G “The energy landscape of a fast-folding protein mapped by Ala→Gly substitutions”  
Nat. Struct. Biol., 4, 305-310 (1997)
- Burg, van den B , Dijkstra, W , Vriend, G , Vinne van der B , Venema, G , Eijssink, V G H „Protein stabilization by hydrophobic interactions at the surface“  
Eur. J. Biochem., 220, 981-985 (1994)
- Chamberlain, A K , Marqusee, S “Touring the landscapes: partially folded proteins examined by hydrogen exchange”  
Current Biol., 5, 859-863 (1997)
- Chan, C K , Hu, Y , Takahashi, S , Rousseau, D L , Eaton, W A , Hofrichter, J “Submillisecond protein folding kinetics studied by ultrarapid mixing”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1779-1784 (1997)
- Chater, K F „Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*“  
Microbiol. Development (eds. Losick und Shapiro), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 89-116 (1984)
- Chater, K F „The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*“  
Bio/Technology, 8, 115-121 (1990)
- Chater, K F „Genetics of differentiation in *Streptomyces*“  
Rev. Microbiol., 47, 685-713 (1993)
- Chater, K F , Hopwood, D A , Kieser, T , Thompson, C J „Gene cloning in *Streptomyces*“  
Curr. Topics Microbiol. Immunol., 97, 69-95 (1992)
- Chen, Y-H , Yang, J T , Martinez, H M „Determination of the secondary structure of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion“  
Biochemistry, 11, 4120-4131 (1972)

- Chung, C T , Miller, R H „Preparation and storage of competent *Escherichia coli* cells“  
Methods Enzymol., 218, 621-627 (1993)
- Colon, W , Wakem, L P , Sherman, F , Roder, H „Identification of the predominant non-native histidine ligand in unfolded cytochrome C“  
Biochemistry, 36, 12535-12541 (1997)
- Creighton, T E „Experimental studies of protein folding and unfolding“  
Prog. Biophys. Molec. Biol., 33, 231-297 (1978)
- Creighton, T E „Protein folding“  
Biochem. J., 270, 1-16 (1990)
- Creighton, T E „Proteins, structure and molecular properties“  
W. H. Freeman and Company, 2<sup>nd</sup> ed. (1993)
- Creighton, T E „An unfolding story“  
Current Biol., 5, 353-356 (1995)
- de Gennes, P G „Kinetics of collapse for a flexible coil“  
J. Phys. Letters, 46, L639-L642 (1985)
- Deng, W P , Nickoloff, J A „Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site“  
Anal. Biochem., 200, 81-88 (1992)
- Dill, K A , Fiebig, K M , Chan, H S “Cooperativity in protein-folding kinetics”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1942-1946 (1993)
- Dill, K A , Chan, H S “From Levinthal to pathways to funnels”  
Nature Struct. Biol., 4, 10-19 (1997)
- Dinner, A R , Karplus, M „The thermodynamics and kinetics of protein folding: a lattice model analysis of multiple pathways with intermediates“  
J. Phys. Chem. B., 103, 7976-7994 (1999)
- Dinner, A R , Lazaridis, T , Karplus, M „Understanding  $\beta$ -Hairpin formation“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 9068-9073 (1999)
- Dobson, C M , Fersht, A R „Protein folding“  
Cambridge University Press, 1<sup>st</sup> published in Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B, volume 348, 1-119 (1995)
- Dolgikh, D , Abaturon, L , Bolotina, I , Brazhnikov, E , Bychkova, V , Gilmanshin, R , Lebedev, Y , Semisotnov, G , Tiktupulo, E , Ptitsyn, O B „“  
Eur. Biophys. J., 13, 109-121 (1985)
- Dutton, C M , Paynton, C , Sommer, S S „General method for amplifying regions of very high G+C content“  
Nucl. Acids Res., 21, 2953-2954 (1993)
- Dyson, H J , Wright, P E „Defining solution conformations of small linear peptides“  
Anna. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 20, 519-538 (1991)
- Dyson, H J , Wright, P E „Peptide conformation and protein folding“  
Curr. Opin. Struct. Biol., 3, 60-65 (1993)

- Eaton, W A , Muñoz, V , Thompson, P A , Chan, C K , Hofrichter, J “Submillisecond kinetics of protein folding”  
Curr. Opin. Struct. Biol., 7, 10-14 (1997)
- Eaton, W A , Thompson, P A , Chi-kin, C , Hagen, S J , Hofrichter, J „Fast events in protein folding“  
Structure, 10, 1133-1139 (1996)
- Ebert, G „Biopolymere“  
Teubner Verlag, Stuttgart (1993)
- Eftink, M R “The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins”  
Biophys. J., 66, 482-501 (1994)
- Eftink, M R “Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins”  
Methods Enzymol., 259, 487-512 (1995)
- Eftink, M R , Shastry, M C R “Fluorescence methods for studying kinetics of protein folding reactions”  
Methods Enzymol., 278, 258-286 (1997)
- Elove, G , Roder, H , Englander, S „Structural characterization of folding intermediates in cytochrom c by H-exchange labeling and proton NMR“  
Nature, 335, 700-704 (1988)
- Engels, J W , Glauder, J , Müllner, H , Tripiet, D , Uhlmann, E , Wetekam, W „Enzymatic amidation of recombinant (leu27) growth hormone releasing hormone-gly45“  
Protein Eng., 1, 195-199 (1987)
- Engels, J W , Koller, K-P „Gene expression and secretion of eucaryotic foreign proteins in *Streptomyces*“  
Transgenesis (ed. Murray J.A.H.) John Wiley&Cons, England 1992
- Engels, J W , Haas-Lauterbach, S , Scharf, M , Sprunkel, B , Neeb, M , Koller, K-P „High yield fermentation and purification of Tendamistat disulphide analogues secreted by *Streptomyces lividans*“  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 719-727 (1993)
- Englander, S W „Protein folding intermediates and pathways studies by hydrogen exchange“  
Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 29, 213-238 (2000)
- Eriksson, A E , Baase, W A , Zhang, X-J , Heinz, D W , Blaber, M , Baldwin, E P , Matthews, B W „Response of a protein structure to cavity-creating mutations and its relation to the hydrophobic effect“  
Science, 255, 178-183 (1992)
- Eyring, H „The activated complex in chemical reactions“  
J. Chem. Phys., 3, 107-115 (1935)
- Faß, S H „Proteinsekretion in *Streptomyces* am Beispiel des  $\alpha$ -Amylase Inhibitors Tendamistat“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Biologie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1994)
- Faß, S H , Engels, J W “Influence of specific signal peptide mutations on the expression and secretion of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat in *Streptomyces lividans*”  
J. Biol. Chem., 271, 15244-15252 (1996)
- Fersht, A R “Protein folding and stability: The pathway of folding of barnase”  
FEBS Lett., 325, 5-16 (1993)

- Fersht, A R , Itzhaki, L S , EIMasry, N F , Matthews, J M , Otzen, D E “Single versus parallel pathways of protein folding and fractional formation of structure in the transition state”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10426-10429 (1994)
- Fersht, A R „Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10869-10873 (1995a)
- Fersht, A R „Mapping the structure of transition states and intermediates in folding: delineation on pathways at high resolution“  
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 348, 11-15 (1995b)
- Fersht, A R „Characterizing transition states in protein folding“  
Curr. Opin. Struct. Biol., 5, 79-84 (1995c)
- Fersht, A R “Nucleation mechanisms in protein folding”  
Curr. Opin. Struct. Biol., 7, 3-9 (1997)
- Finkelstein, A V „Rate of beta-structure formation in polypeptides“  
Proteins: Struct. Funct. Genet., 9, 23-27 (1991)
- Fischer, G , Bang, H , Mech, C „Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden“  
Biomed. Biochim. Acta, 43,1101-1111 (1984)
- Fischer, G „Enzymkatalyse bei Konformerenumwandlungen“  
Nachr. Chem. Tech. Lab., 42, 987-995 (1994)
- Garel, J R , Baldwin, R L „Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease A yield native enzyme“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3347-3351 (1973)
- Garel, J R , Baldwin, R L „The heat-unfolded state of ribonuclease A is an equilibrium mixture of fast and slow refolding species“  
J. Mol. Biol., 94, 611-620 (1975)
- Garel, J R , Nall, B T , Baldwin, R L „Guanidine-unfolded state of ribonuclease A contains both fast and slow refolding species“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1853-1857 (1976)
- Goto, Y , Azuma, T , Hamaguchi, K “Refolding of the immunoglobulin light chain”  
J. Biochem., 85, 1427-1438 (1979)
- Grantcharova, V P , Baker, D “Folding dynamics of the src SH3 domain”  
Biochemistry, 36, 15685-15692 (1997)
- Greenfield, N , Fasman, G D “Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation”  
Biochemistry, 8, 4108-4116 (1969)
- Gunarsekaran, K , Ramakrishnan, C , Balaram, P “ $\beta$ -Haipins in proteins revisited: lessons for *de novo* design”  
Protein Eng., 10, 1131-1141 (1997)
- Guss, J M , Freemann, H C „Structure of oxidised plastocyanin at 1.6Å resolution“  
J. Mol. Biol., 169, 521-563 (1983)
- Gutin, A M , Abkevich, V I , Shakhnovich, E I „Is burst hydrophobic collapse necessary for protein folding?“  
Biochemistry, 34, 3066-3076 (1995)
- Haas-Lauterbach, S „Mutationen am Tendamistat und Sekretionsstudien der Tendamistat-Derivate“  
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1992)



- Hagen SJ, Hofrichter J, Szabo A, Eaton WA "Diffusion-limited contact formation in unfolded cytochrome C: Estimating the maximum rate of protein folding"  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11615-11617 (1996)
- Hagerman, P J , Baldwin, R L „A quantitative treatment of the kinetics of the folding transition of ribonuclease A“  
Biochemistry, 15, 1462-1473 (1976)
- Hamaguchi, K „The protein molecule“  
Japan Scientific Societies Press, Spinger Verlag (1992)
- Hazes, B , Hol, W G J „Comparison of the hemocyanin  $\beta$ -barrel with other greek key  $\beta$ -barrels: Possible importance of the „ $\beta$ -zipper“ in protein structure and folding Proteins“  
Struct.Funct. Genet., 12, 278-298 (1992)
- Hemmingsen, J M , Gernert, K M , Richardson, J S , Richardson, D C „The tyrosine corner: A feature of most greek key  $\beta$ -barrel proteins“  
Protein Science, 3, 1927-1937 (1994)
- Heringa, J , Argos, P „Side-chain clusters in protein structures and their role in protein folding“  
J. Mol. Biol., 220, 151-171 (1987)
- Hinnebusch, J , Tilly, K „Linear plasmids and chromosomes in bacteria“  
Mol. Microbiol., 10, 5, 917-922 (1993)
- Higuchi, R , Krummel, B , Saiki, R „A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions“  
Nucl. Acids Res., 16, 7351-7367 (1988)
- Hoffmann, H „Untersuchungen zur heterologen Genexpression in *Streptomyces lividans*“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1992)
- Holtzhauer, M „Methoden in der Proteinanalytik“  
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1996)
- Hopwood, D A , Bibb, M J , Chater, K F , Kieser, T , Bruton, C J , Kieser, H M , Lydiat, D J , Smith, C P , Ward, J M , Schrempf, H „Genetic manipulations of *Streptomyces* - A laboratory manuel“  
John Innes Foundation, Norwich (1985)
- Hopwood, D A , Bibb, M J , Chater, K F , Janssen, G R , Malpartida, F , Smith, C P „Regulation of gene expression in antibiotic-producing *Streptomyces*“  
Symp. Soc. Gen. Microbiol. 1986 (Cambridge Univ. Press)
- Hopwood, D A , Bibb M J , Chater, K F , Kieser T „Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*“  
Methods Enzymol. 153, 116-165 (1987)
- Huang, G S , Oas, T G „Structure and stability of monomeric lambda repressor: NMR evidence for two-state folding“  
Biochemistry, 34, 3884-3892 (1995a)
- Huang, G S , Oas, T G „Submillisecond folding of monomeric lambda repressor“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6878-6882 (1995b)
- Hurley, J H , Baase, W A , Mathews, B W „Design and structural analysis of alternative hydrophobic core packing arrangements in bacteriophage T4 lysozyme“  
J. Mol. Biol., 224, 1143-1159 (1991)

- Hutchinson, E G , Thornton, J M „The greek key motif: extraction, classification and analysis“  
Protein Eng., 6, 233-245 (1993)
- Ikura, T , Tsurupa, G P , Kuwajima, K „Kinetic folding and cis/trans prolyl isomerization of staphylococcal nuclease. A study by stopped-flow absorption, stopped-flow circular dichroism, and molecular dynamics simulations“  
Biochemistry, 36, 6529-6538 (1997)
- Innes, M A , Gelfand, D H , Sninsky, J J , White, T J „PCR protocols, a guide to methods and application“  
Academic Press, Inc. (1990)
- Itzhaki, L S , Otzen, D E , Fersht, A R “The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analyzed by protein engineering methods: Evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding”  
J. Mol. Biol., 254, 260-288 (1995)
- Jacob, M , Schindler, T , Balbach, J , Schmid, F X „Diffusion control in an elementary protein folding reaction“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 5622-5627 (1997)
- Jaenicke, R „Proteinfaltung und Proteinassoziation“  
Angew. Chem., 96, 385-402 (1984)
- Jaenicke, R „Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies“  
Biochemistry, 30, 3147-3160 (1991)
- Jaenicke, R , Garel, J-R „Faltung und Assoziation von Eiweißketten“  
Physik in unserer Zeit, 3, 88-100 (1986)
- Jennings, P , Wright, P „A molten globule intermediate formed early on the kinetic folding pathway of myoglobin“  
Science, 262, 892-896 (1993)
- Jennings, P „Speeding along the protein folding highway, are we reading the signs correctly“  
Nature Struct. Biol., 5, 846-848 (1998)
- Jones, B E , Jennings, P A , Pierre, R A , Matthews, C R „Development of nonpolar surfaces in the folding of *Escherichia coli* Dihydroxyfolate reductase detected by 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate binding“  
Biochemistry, 33, 15250-15258 (1994)
- Jones, D H , Sakamoto, K , Vorce, R L , Howard, B H „DNA mutagenesis and recombination“  
Nature, 344, 793-794 (1990)
- Kallasch, S „Untersuchungen zur Stabilität und zum Faltungsmechanismus des  $\alpha$ -Amylaseinhibitors Tendamistat aus *Streptomyces tendae*“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und vorklinischen Medizin der Universität Regensburg (1992)
- Karpeisky, M Y , Ilyin, V A „Analysis of non-polar regions in proteins“  
J. Mol. Biol., 224, 629-638 (1992)
- Karplus, M , Weaver, D C „Protein folding dynamics“  
Nature, 260, 404-406 (1976)
- Katsuyama, K , Iwata, N , Shimazu, A „Purification and primary structure of proteinous  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Streptomyces chartreusis*“  
Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1949-1954 (1992)

- Kelley, R F , Richards, F M „Replacement of proline 76 with alanine eliminates the slowest kinetic phase in thioredoxin folding“  
Biochemistry, 26, 6765-6774 (1987)
- Khorasanizadeh, S , Peters, I D , Butt, TR , Roder, H “Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin”  
Biochemistry, 32, 7054-7063 (1993)
- Kiefhaber, T , Quaas, R , Hahn, U , Schmid, F X „Folding of ribonuclease T1. I. Existence of multiple unfolded states created by proline isomerization“  
Biochemistry, 29, 3053-3061 (1990a)
- Kiefhaber, T , Quaas, R , Hahn, U , Schmid, F X „Folding of ribonuclease T1. II. Kinetic models for the folding and unfolding reactions“  
Biochemistry, 29, 3061-3070 (1990)
- Kiefhaber, T , Köhler, H H , Schmid, F X „Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization I. Theoretical models“  
J. Mol. Biol., 224, 217-230 (1992a)
- Kiefhaber, T , Schmid, F X „Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization II. Folding of ribonuclease A and ribonuclease T1“  
J. Mol. Biol., 224, 231-240 (1992b)
- Kiefhaber, T , Schmid, F X , Willert, K , Engelborghs, Y , Chaffotte, A „Structure of a rapidly formed intermediate in ribonuclease T1 folding“  
Protein Sci., 1, 1162-1172 (1992c)
- Kiefhaber T „Kinetic traps in lysozyme folding“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 9029-9033 (1995)
- Kieser, T , Hopwood, D A „Genetic manipulation of *Streptomyces*: Integrating vectors and gene replacement“  
Methods Enzymol., 204, 430-458 (1991)
- Kim, P S , Baldwin, R L „Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding“  
Annu.Rev.Biochem., 51, 489-559 (1982)
- Kim, P S , Baldwin, R L „Intermediates in the folding reactions of small proteins“  
Anna. Rev. Biochem., 59, 631-660 (1990)
- Kim, C A , Berg, J M „Thermodynamic  $\beta$ -sheet propensities measured using a zinc-finger host peptide“  
Nature, 362, 267-270 (1993)
- Kline, A D , Braun, W , Wüthrich, K „Studies by  $^1\text{H}$ -NMR and distance geometry of the solution conformation of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat“  
J. Mol. Biol., 189, 377-382 (1986a)
- Kline, A D , Wüthrich, K „Complete sequence-specific  $^1\text{H}$ -NMR assignments for the  $\alpha$ -amylase polypeptide inhibitor tendamistat from *Streptomyces tendae*“  
J. Mol. Biol., 192, 869-890 (1986b)
- Kofron, J L , Kuzmic, P , Kishore, V , Colon-Bonilla, E , Rich, D H „Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay“  
Biochemistry, 30, 6127-6134 (1991)

- Koller, K-P, Engels, J W, Uhlmann, E „Gene amplification and overproduction of the  $\alpha$ -amylase inhibitor (Hoe-467, tendamistat) in *Streptomyces tendae*“  
European Federation of Biotechnology 10-14. Sept. 1984, München. Proceedings of the Third European Congress on Biotechnology, Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim, 273-278 (1984)
- Koller, K-P, Ries, G, Sauber, K, Uhlmann, E, Wallmeier, H „The tendamistat expression-secretion system: synthesis of proinsulin fusion proteins with *Streptomyces lividans*“  
Genetics and Product Formation in Streptomyces. Ed.: Baumberg, S. *et al.*, Plenum Press, New York, 227-233 (1991)
- Koller, K-P, Ries, G, Sauber, K, Uhlmann, E, Wallmeier, H „Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendamistat and proinsulin“  
Bio/Technology, 7, 1055-1059 (1989a)
- Koller, K-P, Ries, G „Heterologous expression of the  $\alpha$ -amylase inhibitor gene cloned from an amplified genomic sequence of *Streptomyces tendae*“  
J. Bacteriol., 171, 4953-4957 (1989b)
- Koller, K-P „Over-production of a polypeptide  $\alpha$ -amylase inhibitor (tendamistat) in *Streptomyces tendae*: genetic and regulatory aspects“  
Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology (1985)
- Kortüm, G, Lachmann, H „Einführung in die chemische Thermodynamik“  
Verlag Chemie, 7. ergänzte Auflage, Weinheim 1981
- Kovalenko, S A, Tanaka, M, Ozawa, T „Simple methods for preparation of plasmid DNA yielding long and accurate sequence data“  
Nucl. Acids Res., 22, 5771-5772 (1994)
- Kowalski, J M, Parekh, R N, Wittrup, K D „Secretion efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* of bovine pancreatic trypsin inhibitor mutants lacking disulfide bonds is correlated with thermodynamic stability“  
Biochemistry, 37, 1246-1273 (1998)
- Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, H-W, Kramer, B, Pflugfelder, M, Fritz, H-J „The grapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction“  
Nucl. Acids. Res., 12, 9441-9456 (1984)
- Kunkel, T A „Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488-492 (1985)
- Kuwajima, K, Nitta, K, Yoneyama, M, Sugai, S „Three-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine hydrochloride“  
J. Mol. Biol., 106, 359-379 (1976)
- Landre, P A, Gelfand, D H, Watson, R M „The use of cosolvents to enhance amplification by the polymerase chain reaction“  
PCR Strategies, 1, 3-16 (1995)
- Lang, K, Schmid, F X, Fischer, G „Catalysis of protein folding by prolyl Isomerase“  
Nature, 329, 268-270 (1987)
- Lawyer, F C, Stoffel, S, Saiki, K, Myambo, K, Drummond, R, Gelfand, D H „Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*“  
J. Biol. Chem., 264, 6427-6437 (1989)
- Lehrman, S R, Tuls, J L, Lund, M „Peptide  $\alpha$ -helicity in aqueous trifluoroethanol: Correction with predicted  $\alpha$ -helicity and the secondary structure of the corresponding regions of bovine growth hormone“  
Biochemistry, 29, 5590-5596 (1990)

- Levinthal, C „How proteins fold graciously“  
1-22-24 Allerton House, Monticello, III., (1969)
- Lin, L N , Brandts, J F „Further evidence suggesting that the slow phase in protein unfolding and refolding is due to proline isomerisation: A kinetic study of carp parvalbumins“  
Biochemistry, 17, 4102-4110 (1978)
- Lin, L N , Brandts, J F „Evidence suggesting that some proteolytic enzymes may cleave only the trans form of the peptide bond“  
Biochemistry, 18, 43-47 (1979)
- Lin, L N , Brandts, J F „Determination of cis-trans proline isomerization by trypsin proteolysis. Application to a model pentapeptide and to oxidized ribonuclease A“  
Biochemistry, 22, 553-559 (1983)
- Lin, Y-S , Kieser, H M , Hopwood, D A , Chen, C W „The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear“  
Molecular Microbiology 10 (5), 923-933, 1993
- Liras, P , Asturias, J A „Regulation of gene expression in *Streptomyces*“  
Microbiologia Sem., 8, 49-62 (1992)
- Long, C M , Virolle, M-J , Chang, S Y , Chang, S , Bipp, M J „The  $\alpha$ -amylase gene of *Streptomyces limosus*: nucleotide sequences, expression motifs and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate  $\alpha$ -amylases“  
J. Bacteriol., 169, 5745-5754 (1987)
- Lopez-Hernandez, E , Cronet, P , Serrano, L , Muñoz, V „Folding kinetics of the Che Y mutants with enhanced native alpha-helix propensities“  
J. Mol. Biol., 266, 610-620 (1997)
- Ma, L , Hsieh-Wilson, L C , Schultz, P G „Antibody catalysis of peptidyl-prolyl cis-trans isomerization in the folding of RNase T1“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 7251-7256 (1998)
- Mason, S F „Molecular optical activity & the chiral discriminations“  
Cambridge University Press, 1<sup>st</sup> Edition (1982)
- Matthews, B W „Structural and genetic analysis of protein stability“  
Annu. Rev. Biochem., 62, 139-160 (1993)
- Matthews, J M , Fersht, A R „Exploring the energy surface of protein folding by structure-reactivity relationships and engineered proteins: Observation of Hammond behavior for the gross structure of the transition state and anti-Hammond behavior for structural elements for unfolding/folding of barnase“  
Biochemistry, 34, 6805-6814 (1995)
- Matouschek, A , Kellis, J T , Serrano, L , Bycroft, M , Fersht, A R „Transient folding intermediates characterized by protein engineering“  
Nature, 346, 440-445 (1990)
- Matouschek, A , Serrano, L , Fersht, A L „The folding of an enzyme: IV. Structure of an intermediate in the refolding of barnase analysed by a protein engineering procedure“  
J. Mol. Biol., 224, 819-835 (1992)
- Matouschek, A , Rospert, S , Schmid, K , Glick, B S , Schatz, G „Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6319-6323 (1995)

- Matter, H , Kessler, H „Structure, dynamics, and biological activities of 15 cyclic hexapeptide analogs of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat (HOE 467) in solution“  
J. Am. Chem. Soc., 117, 3347-3359 (1995)
- McCaldon, P , Argos, P „Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences“  
Proteins, 4, 99-122 (1988)
- McConnell, S J , Hoess, R H „Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries“  
J. Mol. Biol., 250, 460-470 (1995)
- Meyer, B H , Muller, F O , Grigoleit, H G , Clur, B K „Inhibition of starch absorption by tendamistat (an alpha-amylase inactivator)“  
S. Afr. Med. J., 64, 284-285 (1983a)
- Meyer, B H , Muller, F O , Clur, B K , Grigoleit, H G „Effects of tendamistat (an alpha-amylase inactivator) on starch metabolism“  
Br. J. Clin. Pharmacol., 16, 145-148 (1983b)
- Meyer, B H , Muller, F O , Kruger, J B , Grigoleit, H G „Inhibition of starch absorption by alpha-amylase inactivator given with food“  
Lancet, 1, 934 (1983c)
- Meyer, B H , Muller, F O , Kruger, J B , Clur, B K , Grigoleit, H G „Effects of tendamistate (an alpha-amylase inactivator), guar and placebo on starch metabolism“  
S. Afr. Med. J., 66, 222-223 (1984)
- Mierendorf, R C , Pfeffer, D „Direct sequencing of denatured plasmid DNA“  
Methods Enzymol., 152, 556-562 (1987)
- Minor, D L , Kim, P S „Measurement of the  $\beta$ -sheet-forming propensities of amino acids“  
Nature, 367, 660-663 (1994)
- Miranker, A , Robinson, C V , Radford, S E , Dobson, C M “Investigation of protein folding by mass spectrometry”  
FASEB J., 10, 93-101 (1996)
- Mirny, L A , Abkevich, V I , Shakhnovich, E I „Universality and diversity of the protein folding scenarios: A comprehensive analysis with the aid of a lattice model“  
Folding & Design, 1, 103-116 (1996)
- Müller, K „Reaktionswege auf mehrdimensionalen Energiehyperflächen“  
Angew. Chem., 92, 1-74 (1980)
- Mullis, K B , Faloona, F A „Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction“  
Methods Enzymol., 155, 335-350 (1987)
- Muñoz, V , Thompson, P A , Hofrichter, J , Eaton, W A „Folding dynamics and mechanism of  $\beta$ -hairpin formation“  
Nature, 390, 196-199 (1997)
- Muñoz, V , Henry, E R , Hofrichter, J , Eaton, W A “A statistical-mechanical model for  $\beta$ -hairpin kinetics”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5872-5879 (1998)
- Murakami, T , Holt, T G , Thompson, C J „Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*“  
J. Bacteriol., 171, 1459-1466 (1989)

- Murao, S , Oouchi, N , Goto, A , Arai, M „New proteinous  $\alpha$ -amylase inhibitor (Paim) from *Streptomyces corchorusii*“  
Agric. Biol. Chem., 47, 453-454 (1983)
- Murao, S , Goto, A , Matsui, Y , Ohyama, K „New proteinous inhibitor (Haim) of animal  $\alpha$ -amylase from *Streptomyces griseosporus* YM-25“  
Agric. Biol. Chem. 44, 1679-1681 (1980)
- Nall, B T , Garel, J R , Baldwin, R L „Test of the extended two-state model for the kinetic intermediates observed in the folding transition of ribonuclease A“  
J. Mol. Biol., 118, 317-330 (1978)
- Nall, B T „Proline isomerization as a rate-limiting step“  
IRL Press, Edited by R. H. Pain, 80-103 (1994)
- Nelson, R M , Long, G L “A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction”  
Anal. Biochem., 180, 147-151 (1989)
- Nölting, B , Golbik, R , Fersht, A R “Submillisecond events in protein folding”  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10668-10672 (1995)
- Nölting, B „Protein folding kinetics“  
Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1<sup>st</sup> Edition (1999)
- Nozaki, Y , Tanford, C „The solubility of amino acids, diglycine, and triglycine in aqueous guanidine hydrochloride solutions“  
J. Biol. Chem., 245, 1648-1652 (1970)
- Nußbaum, S „Untersuchungen zur heterologen Genexpression des Thrombin-Inhibitors Hirudin in *Streptomyces lividans* und zur Expression des  $\alpha$ -Amylase Gens aus *Streptomyces limosus* in *Streptomyces lividans*“  
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1993)
- O’Connell, J F , Scharf, M , Engels, J W , Wüthrich, K „The nuclear magnetic resonance solution structure of the mutant  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat (R19L) and comparison with wild type Tendamistat“  
Eur. J. of Biochemistry, 220, 763-770 (1994)
- Odefey, C , Mayr, L M , Schmid, F X „Non-prolyl cis-trans peptide bond isomerization as a rate-determining step in protein unfolding and refolding“  
J. Mol. Biol. 245, 69-78 (1995)
- Oeding, V , Neubauer, H , Vértesy, L , Weidenmüller, H L „ $\alpha$ -amylase inhibitor from Streptomycetes“  
Chem. Abstr., 90, 4438e (1979)
- Oliveberg, M , Tan, Y-J , Silow, M , Fersht, A R „The changing nature of the protein folding transition state: implications for the shape of the free-energy profile for folding“  
J. Mol. Biol., 277, 933-943 (1998)
- Onuchic, J N , Wolynes, P G , Luthey-Schulten, Z , Socci, N D „Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3626-3630 (1995)
- Osterman, D G , Kaiser, E T „Design and characterization of peptides with amphiphilic beta-strand structures“  
J. Cell Biochem., 29, 57-72 (1985)

- Otting, G , Liepinsh, E , Wüthrich, K „Disulfide bond isomerization in BPTI and BPTI(G36S): An NMR study of correlated mobility in proteins“  
Biochemistry, 32, 3571-3582 (1993)
- Otzen, D , Kristensen, O , Procter, M , Oliveberg, M „Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots“  
Biochemistry, 38, 6499-6511 (1999)
- Pääbo, S , Irwin, D M , Wilson, A C „DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification“  
J. Biol. Chem., 265, 4718-4721 (1990)
- Pace, C N „Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves“  
Methods Enzymol., 131, 266-280 (1986)
- Pace, C N „Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding“  
Methods Enzymol., 259, 538-554 (1995)
- Pain, R H „Mechanisms of protein folding“  
Oxford University Press (1994)
- Pande, V S , Grosberg, A Y , Tanaka, T , Rokhsar, D S „Pathways for protein folding: is a new view needed“  
Curr. Opin. Struct. Biol., 8, 68-79 (1998)
- Pappenberger, G „Characterization of the rate-limiting steps in tendamistat folding“  
Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel (2000)
- Pappenberger, G , Aygün, H , Engels, J W , Reimer, U , Fischer, G , Kiefhaber, T „Nonprolyl cis peptide bond in unfolded proteins cause complex folding kinetics“  
Nat. Struct. Biol., 8, 452-458 (2001)
- Pascher, T , Chesick, J P , Winkler, J R , Gray, H B “Protein folding triggered by electron transfer”  
Science, 271, 1558-1560 (1996)
- Payne, G F , DelaCruz, N , Coppella, S J „Improved production of heterologous protein from *Streptomyces lividans*“  
Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 395-400 (1990)
- Perl, D , Welker, C , Schindler, T , Schroder, K , Marahiel, M A , Jaenicke, R , Schmid, F X „Conservation of rapid two-state folding in mesophilic, thermophilic and hyperthermophilic cold shock proteins“  
Nat. Struct. Biol., 5, 229-235 (1998)
- Pfeil, W „Protein stability and folding, a collection of thermodynamic data“  
Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998
- Pflugrath, J W , Wiegand, W , Huber, R „Crystal structure determination, refinement and the molecular model of the  $\alpha$ -amylase inhibitor Hoe-467A“  
J. Mol. Biol., 189, 383-386 (1986)
- Plaxco, K W , Dobson, C M “Time-resolved biophysical methods in the study of protein folding”  
Curr. Opin. Struct. Biol., 6, 630-636 (1996)
- Pocta, D „Verwendung von Genmodulen von Aktinophagen in Streptomycceten-Klonierungsvektoren zur positiven Selektion und Transduktion“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Biologie der Universität München (1992)
- Pohl, T „Concentration of proteins and removal of solutes“  
Methods Enzymol., 182, 68-83 (1990)



- Pomp, D , Medrano, J F „Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction“  
Bio/Techniques, 10, 58-59 (1991)
- Pound, G M , Nishioka, K , Lothe, J „Theory of homogeneous nucleation from vapour“  
University Park Press, Physikal Chemistry, Ed. by M. Kerker, Vol. 7, 148-187 (1972)
- Ptitsyn, O B „Stage mechanism of the self-organization of protein molecules“  
Dokl. Acad. Nauk. SSR, 210, 1213-1215 (1973)
- Ptitsyn, O B „Protein folding and evolution: common folding nucleus in different subfamilies of *c*-type cytochromes?“  
J. Mol. Biol., 278, 655-666 (1998)
- Pulido, D , Jiménez, A „Optimization of gene expression in *S. lividans* by a transcription terminator“  
Nucl. Acids Res., 15, 4227-4270 (1987)
- Qi, P X , Sosnick, T R , Englander, S W „The burst phase in ribonuclease A. A folding and solvent dependence of the unfolded state“  
Nature Struct. Biol., 5, 882-884 (1998)
- Qiwen, W , Kline, A , Wüthrich, K „ Amide proton exchange in the  $\alpha$ -amylase polypeptide inhibitor tendamistat studies by two-dimensional  $^1\text{H}$ -nuclear magnetic resonance“  
Biochemistry, 26, 6488-6493 (1987)
- Radford, S , Dobson, C , Evans, P „The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways“  
Nature, 358, 302-307 (1992)
- Radzika, A , Pedersen, L , Wolfenden, R „Influences of solvent water on protein folding: free energies of solvation of cis and trans peptides are nearly identical“  
Biochemistry, 27, 4538-4541 (1988)
- Ray, A F , Nickoloff, J A „Site-specific mutagenesis of almost any plasmid using a PCR-based version of unique site elimination“  
BioTechniques, 13, 342-346 (1992)
- Ramachandran, G N , Mitra, A K „An explanation for the rare occurrence of cis peptide units in proteins and polypeptides“  
J. Mol. Biol., 107, 85-92 (1976)
- Rehm, H J , Reed, G , Pühler, A , Stadler, P „Genetic fundamentals and genetic engineering“  
Volume 2, VCH (1993)
- Reimer, U , Scherer, G , Drewello, M , Kruber, S , Schutkowski, M , Fischer, G „Side-chain effects on peptidyl-prolyl cis/trans isomerization“  
J. Mol. Biol., 279, 449-460 (1998)
- Renner, M , Hinz, H-J , Scharf, M , Engels, J W „Thermodynamics of unfolding of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat. Correlation between accessible surface area and heat capacity“  
J. Mol. Biol., 223, 769-779 (1992)
- Richardson, J S „The anatomy and taxonomy of protein structures“  
Adv. Protein Chem., 34, 168-339 (1981)
- Roder, H , Elöve, G A „Early stages of protein folding“  
IRL Press, Edited by R. H. Pain, 26-54 (1994)

- Saiki, R K , Gelfand, D H , Stoffel, S , Scharf, S J , Higuchi, R , Horn, G T , Mullis, K B , Erlich, H A „Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA Polymerase“  
*Science*, 239, 487-491 (1988)
- Sakar, G , Kapelner, S , Sommer, S „Formamid can dramatically improve the specificity of PCR“  
*Nucl. Acids Res.*, 18, 7465 (1990)
- Sali, A , Shakhnovich, E , Karplus, M „How does a protein fold?“  
*Nature*, 369, 248-251 (1994)
- Sambrook, J , Fritsch, E F , Maniatis, T „Molecular cloning: a laboratory manual“  
Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> Edition (1989)
- Sanger, F „Sequences, sequences, and sequences“  
*Annu. Rev. Biochem.*, 57, 1-28 (1988)
- Santoro, M M , Bolen, D W „Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants“  
*Biochemistry*, 27, 8063-8068 (1988)
- Sayers, J R , Eckstein, F „Phosphorothioat-based site-directed mutagenesis for single-stranded vectors“  
IRL Press, Oxford in *Directed Mutagenesis - A Practical Approach*, 49-69 (1991)
- Schägger, H , Jagow, G „Tricine-SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa“  
*Anal. Biochem.*, 166, 368-379 (1987)
- Scharf, M „Disulfid-analoge Tendamistat-Derivate: Darstellung, Aufreinigung und Charakterisierung“  
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften. Fachbereich Chemie der J. W. Goethe-Universität Frankfurt am Main (1992)
- Schellman, J A „The thermodynamic stability of proteins“  
*Ann. Rev. Biophys. Chem.*, 115-137 (1987)
- Scherer, G , Kramer, M L , Schutkowski, M , Reimer, U , Fischer, G „Barriers to rotation of secondary amide peptide bonds“  
*J. Am. Chem. Soc.*, 120, 5568-5574 (1998)
- Schindler, T , Herrler, M , Marahiel, M A , Schmid, F X „Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates“  
*Nature Struct. Biol.*, 2, 663-673 (1995)
- Schönbrunner, N , Wey, J , Engels, J W , Gerorg, H , Kiefhaber, T „Native-like  $\beta$ -structure in a trifluoroethanol-induced partially folded state of the all- $\beta$ -sheet protein tendamistat“  
*J. Mol. Biol.*, 260, 432-445 (1996)
- Schönbrunner, N , Koller, K-P , Kiefhaber, T „Folding of the disulfide-bonded  $\beta$ -sheet protein tendamistat: rapid two-state folding without hydrophobic collapse“  
*J. Mol. Biol.*, 268, 526-538 (1997a)
- Schönbrunner, N , Pappenberger, G , Scharf, M , Engels, J , Kiefhaber, T „Effect of preformed correct tertiary interactions on rapid two-state tendamistat folding: evidence for hairpins as initiation sites for  $\beta$ -sheet formation“  
*Biochemistry*, 36, 9057-9065 (1997b)
- Schmid, F X , Baldwin, R L „Acid catalysis of the formation of the slow-folding species of RNase A: evidence that the reaction is proline isomerization“  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4764-4768 (1978)

- Schmid, F X „Fast-folding and slow folding forms of unfolded proteins“  
Methods Enzymol., 131, 70-82 (1986)
- Schmid, F X „Kinetics of unfolding and refolding of single-domain proteins in protein folding“  
eds. Creighton T.E., W.H. Freeman and company, New York, 197-239 (1992)
- Schmid, F X „Prolyl isomerases join the fold“  
Current Biology, 5, 993-994 (1995)
- Schmitt-John, T „Transkriptionsstudien zur Tendamistat-Sekretions-Expression“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1991)
- Searl, M S , Williams, D H , Packman, L C „A short linear peptide derived from the N-terminal sequence of ubiquitin folds into a water-stable non-native  $\beta$ -hairpin“  
Nature Struct. Biol., 2, 999-1006 (1995)
- Semisotnov, G V , Rodionova, N A , Kutysenko, V P , Ebert, B , Blanck, J , Ptitsyn, O B „Sequential mechanism of refolding of carbonic anhydrase B“  
FEBS Lett., 224, 9-13 (1987)
- Shastry MCR, Roder H “Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale”  
Nature Struct. Biol., 5, 385-392 (1998)
- Shiraki, K , Nishikawa, K , Goto, Y „Trifluoroethanol-induced stabilization of the alpha-helical structure of beta-lactoglobulin: Implication for non-hierarchical protein folding“  
J. Mol. Biol., 245, 180-194 (1995)
- Shirley, B A „Protein stability and folding: theory and practice“  
Humana Press, Totowa, New Jersey, Methods in Molecular Biology, Volume 40 (1995)
- Sieber, V , Moe, G R „Interactions contributing to the formation of a  $\beta$ -hairpin like structure in a small peptide“  
Biochemistry, 35, 181-188 (1996)
- Silow, M , Oliveberg, M „High-energy channeling in protein folding“  
Biochemistry, 36, 7633-7637 (1997)
- Smith, C K , Regan, L „Guidelines for protein design: the energetics of  $\beta$ -sheet side chain interactions“  
Science, 270, 980-982 (1995)
- Smith, P K , Krohn, R I , Hermanson, G T , Mallia, A K , Gartner, F H , Provenzano, M D , Fujimoto, E K , Goeke, N M , Olson, B J , Klenk, D C „Measurement of protein using bicinchoninic acid“  
Anal. Biochem., 150, 76-85 (1985)
- Sosnick, T R , Mayne, L , Hiller, R , Englander, W „The barriers in protein folding“  
Nature Struct. Biol., 1, 149-156 (1994)
- Stein, R L „Mechanistic studies of enzymatic and nonenzymatic prolyl cis-trans isomerization“  
Advan. Protein Chem., 44, 1-24 (1993)
- Steiner, R F , Kirby, E P „The interaction of the ground and excited states of indole derivatives with electron scavengers“  
J. Phys. Chem., 73, 4130-4135 (1969)
- Steinlechner, H „Statistische Mutagenese am Tendamistat“  
Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1995)

- Stewart, D E , Sarkar, A , Wampler, J E „Occurrence and role of cis peptide bonds in protein structures“  
J. Mol. Biol., 214, 253-260 (1990)
- Strohl, W R „Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycetes promoters“  
Nucl. Acids Res., 20, 961-974 (1992)
- Sumitani, J , Kawaguchi, T , Hattori, N , Murao, S , Arai, M „Molecular cloning and expression of proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Streptomyces nitrosporeus* in *Escherichia coli*“  
Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1243-1248 (1993)
- Tan, Y-J , Oliveberg, M , Otzen, D E , Fersht, A R „The rate of isomerization of peptidyl-proline bonds as a probe for interactions in the physiological denatured state of chymotrypsin inhibitor 2“  
J. Mol. Biol., 269, 611-622 (1997)
- Tanford, C „Protein denaturation“  
Adv. Protein Chem., 23, 121-282 (1968)
- Tanford, C „Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation“  
Adv. Protein Chem., 24, 1-95 (1970)
- Texter, F L , Spencer, D B , Rosenstein, R , Matthews, C R „Intramolecular catalysis of a proline isomerization reaction in the folding of dihydrofolate reductase“  
Biochemistry, 31, 5687-5691 (1992)
- Thirumalai, D , Guo, Z „Nucleation mechanism for protein folding and theoretical predictions for hydrogen-exchange labeling experiments“  
Biopolymers, 35, 237-140 (1995)
- Thirumalai, D , Woodson, S A „Kinetics of folding of proteins and RNA“  
Acc. Chem. Res., 29, 433-439 (1996)
- Tindall, K R , Kunkel, T A „Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase“  
Biochemistry, 27, 6008-6013 (1988)
- Tisi, L C , Evans, P A „Conserved structural features on protein surfaces: small exterior hydrophobic clusters“  
J. Mol. Biol., 249, 251-258 (1995)
- Tsong, T Y , Baldwin, R L „Properties of the refolding and unfolding reactions of ribonuclease A“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 1809-1812 (1972)
- Udgaonkar, J B , Baldwin, R L „Early folding intermediate of ribonuclease A“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8197-8201 (1990)
- Utiyama, H , Baldwin, R L „Kinetic mechanisms of protein folding“  
Methods Enzymol., 131, 51-70 (1986)
- Veeraraghavan, S , Nall, B T , Fink, A L „Effect of prolyl isomerase on the folding reactions of staphylococcal nuclease“  
Biochemistry, 36, 15134-15139 (1997)
- Vértesy, L in P. Bechthold (eds.) „Regulators of intestinal absorption in obesity, diabetes and nutrition“  
Proceedings of satellite symposium n. 7, 3. International Congress on Obesity (October 13-15, 1980)
- Vértesy, L , Oeding, V , Bender, R , Zepf, K , Neseemann, G „Tendamistat (HOE 467), a tight-binding  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Streptomyces tendae* 4158“  
Eur. J. Biochem., 141, 505-512 (1984)

- Vértesy, L , Tripier, D „Isolation and structure elucidation of an  $\alpha$ -amylase inhibitor, AI-3688, from *Streptomyces aureofaciens*“  
FEBS Letters, 185, 187-189 (1985)
- Vigal, T , Gil, J A , Daza, A , Garcia Gonzales, M D , Villadas, P , Martin, J F „Effect of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the amy gene of *S. griseus* on synthesis and secretion of  $\alpha$ -amylase by *S. lividans*“  
Mol. Gen Genet., 231, 88-96 (1991)
- Viguera, A R , Martinez, J C , Filimonov, V V , Mateo, P L , Serrano, L „Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition“  
Biochemistry, 33, 2142-2150 (1994)
- Virolle, M-J , Long, M C , Chang, S , Bipp, M J „Cloning characterisation and regulation of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces venezuelae*“  
Gene, 74, 321-334 (1988)
- Vogl, T , Brengelmann, R , Hinz, H-J , Scharf, M , Lötzbeyer, M , Engels, J W „Mechanism of protein stabilization by disulfide bridges: calorimetric unfolding studies on disulfide-deficient mutants of the  $\alpha$ -amylase inhibitor tendamistat“  
J. Mol. Biol., 254, 481-496 (1995)
- Weissman, J S , Kim, P S „Reexamination of the folding of BPTI: predominance of native intermediates“  
Science, 253, 1386-1393 (1991)
- Wells, J A , Vasser, M , Powers, D B „Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites“  
Gene, 34, 315-323 (1985)
- Wetlaufer, B D „Nucleation, rapid folding and globular intrachain regions“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 697-701 (1973)
- Wiegand, G , Epp, O , Huber, R „The crystal structure of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase in complex with the microbial inhibitor tendamistat“  
J. Mol. Biol., 247, 99-110 (1995)
- Wildegger, G , Kiefhaber, T „Three-state model for lysozyme folding: triangular folding mechanism with an energetically trapped intermediate“  
J. Mol. Biol., 271, 1-11 (1997)
- Wojczewski, S „Heterologe Genexpression in *Streptomyces lividans*“  
Dissertationsarbeit im Fachbereich Chemie der J.W. Goethe Universität Frankfurt am Main (1999)
- Wolynes, P G , Onuchic, J N , Thirumalai, D „Navigating the folding routes“  
Science, 267, 1619-1620 (1995)
- Wolynes, P G „Symmetry and the energy landscapes of biomolecules“  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14249-14255 (1996)
- Wong, F , Komaromy, M „Site-directed mutagenesis using thermostable enzymes“  
BioTechniques, 18, 1034-1038 (1995)
- Woody, R W „Circular dichroism“  
Methods Enzymol., 246, 34-71 (1995)

- Wright, P E , Dyson, H J , Lerner, R A „Conformation of peptide fragments of protein in aqueous solution: Implications for initiation of protein folding“  
Biochemistry, 27, 7167-7175 (1988)
- Wüthrich, K , Qiwen, W , Kline, A D „Amide proton exchange in the  $\alpha$ -amylase polypeptide inhibitor tendamistat studied by two-dimensional  $^1\text{H-NMR}$ “  
Biochemistry, 26, 6488-6493 (1987)
- Wüthrich, K , O'Connell, J F , Bender, R , Engels, J W , Koller, K-P , Scharf, M „The nuclear-magnetic-resonance solution of the mutant  $\alpha$ -amylase inhibitor [R19L] tendamistat and comparison with the wild-type tendamistat“  
Eur. J. Biochem., 220, 763-770 (1994)
- Yang, A S , Hitz, B , Honig, B „Free energy determinants of secondary structure formation:  $\beta$ -turns and their role in protein folding“  
J. Mol. Biol., 259, 873-882 (1995)
- Yanisch-Perron, C , Vieira, J , Messing, J „Improved M13 phage cloning vektors and host strains: nucleotide sequence of M13mp18 and pUC19 vectors“  
Gene, 33, 103-119 (1985)
- Yao, J , Feher, B F , Espejo, M T , Reymond, P E , Wright, P E , Dyson, H J „Stabilization of a type VI turn in a family of linear peptides in water solution“  
J. Mol. Biol., 243, 736-753 (1994)
- Zakour, R A , Loeb, L A „Site-specific mutagenesis by error-directed DNA synthesis“  
Nature, 295, 708-710 (1982)
- Zell, R , Fritz, H J „DNA mismatch-pepair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues“  
EMBO J., 6, 1809-1815 (1987)
- Zhao, L-J , Zhang, Q X , Padmanabhan, R „Polymerase chain reaction-based point mutagenesis protocol“  
Methods Enzymol., 217, 218-227 (1993)

## 10. Anhang

DNA-Sequenz aus pT136. Natürliches Tendamistatgen mit SpeI Schnittstelle (500-1100).

```

                                SpeI
                                .
GTTGAACTCAGATCGGGGCACAGGCTCGGCCTATGACTTCAACTAGTTGACTGTCTCTCAGGAAGGTGAACCGCCATGCGC 80
CAACTTGAGTCTAGCCCGTGTCCGAGCCGGATACTGAAGTTGATCAACTGACAGAGAGTCCTTCCACTTGGCGGTACGCG

                                SfiI
                                .
GTACGGGCACTTCGACTTGCGGCGTGGTGGGTGCGGGCGCCGCACTCGCCCTGTCTCCCCTCGCGGCCGGCCGGCCTC 160
CATGCCCGTGAAGCTGAACGCCGCGACCACCCACGCCCGCGCGTGTAGCGGGACAGAGGGGAGCGCCGGCCGGCCGGAG

CGCCGACACGACCGTCTCCGAGCCCGCACCCCTCTGCGTGACGCTCTACCAGAGCTGGCGGTACTCACAGGCCGACAACG 240
GCGGCTGTGTGGCAGAGGCTCGGGCGTGGGAGGACGCACCTGCGAGATGGTCTCGACCGCCATGAGTGTCCGGCTGTTGC

                                BstEII      AccI      StuI
                                .          .          .
GCTGTGCCGAGACGGTGACCGTGAAGGTCGTCTACGAGGACGACACCGAAGGCCTGTGCTACGCCGTGCACCGGCCAG 320
CGACACGGCTCTGCCACTGGCACTTCCAGCAGATGCTCTGCTGTGGCTTCCGGACACGATGCGGCAGCGTGGCCCGGTC

ATCACCACCGTCGGCGACGGCTACATCGGCTCGCACGGCCACGCCCGCTACCTCGCTCGCTGCCTTTAGCCACAGCCGC 400
TAGTGGTGGCAGCCGCTGCCGATGTAGCCGAGCGTGCCGGTGCGGCGATGGAGCGAGCGACGGAAATCGGGTGTCCGGCG

                                SacII      AvaII
                                .          .
CTTCACGCGCGCTGTCTCTCGGCGTCCGGCGCAGCCCGCTCGTGGTCGGCGCGAGCGAGGTCCACCAGCGTTCGC 480
GAAGTGCGCCGCGACGAGGAGCCGCAAGGGCCCGCTCGGGCGCAGCACCGCCGGCTCGCTCCAGGTGGTTCGCAAGCG

                                SacI      EcoRI
                                .          .
AGCAGGCGGCCTCCACGTCCGCGCGGACGGCGAGCTCGAATTCGTAATCATGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTT 560
TCGTCGCCCGGAGGTGCAGGGCGCCTGCCGCTCGAGCTTAAGCATTAGTACAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAA

ATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCAT 600
TAGGCGAGTGTAAAGGTGTGTGTATGCTCGGCCTTCGTA

```

