

„Struktur, Funktion und Dynamik
von Na^+ / H^+ Antiportern:
Eine infrarotspektroskopische Studie“

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

von

Enela Džafić

aus Prijedor (Bosnien und Herzegowina)

Frankfurt am Main 2008

(D 30)

vom Fachbereich der Physik der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. H. Rischke

Gutachter: Prof. Dr. W. Mäntele

Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation: 15. 10. 2008

PUBLIKATIONEN

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

E. Džafić, O. Klein, E. Screpanti, C. Hunte, W. Mäntele: „Flexibility and Dynamics of NhaA Na⁺/H⁺-Antiporter of *Escherichia coli* Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy”, *zur Veröffentlichung eingereicht*

E. Džafić, O. Klein, P. Goswami, W. Kühlbrandt, W. Mäntele: „pH- and Temperature-Induced Secondary Structure Changes of MjNhaP1 Na⁺/H⁺-Antiporter of *Methanococcus jannaschii*. Investigated by Infrared Spectroscopy”, *Manuskript in Vorbereitung*

E. Džafić, O. Klein, E. Screpanti, C. Hunte, P. Goswami, W. Kühlbrandt, W. Mäntele: „Structural Changes during Activation of Na⁺/H⁺ Antiporters, NhaA from *Escherichia coli* and MjNhaP1 from *Methanococcus jannaschii*, An Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy Study”, *Manuskript in Vorbereitung*

W. Mäntele, O. Klein, **E. Agić** (2004): „Infrarot-Bioanalytik – Probenformen von Proteinen“, *Laborpraxis, Nr. 5, S. 34-36*

KONFERENZBEITRÄGE UND POSTERPRÄSENTATIONEN

E. Džafić, O. Klein, E. Screpanti, C. Hunte, P. Goswami, Ö. Yildiz, W. Mäntele (2007): „Structural study of Na⁺/H⁺ antiporters, NhaA from *Escherichia coli* and MjNhaP1 from *Methanococcus jannaschii*, using infrared and circular dichroism spectroscopy“, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Bobigny, France

E. Džafić, O. Klein, W. Mäntele (2007): „Structural properties, activation mechanisms and transport processes in Na⁺/H⁺ Antiporters NhaA and MjNhaP1”, SFB Membrane Transport - From Molecular Mechanisms to Dynamic Assemblies

E. Agić, O. Klein, E. Screpanti, C. Hunte, W. Mäntele (2006): „Temperature and pH-Induced Conformational Changes of NhaA Na⁺/H⁺-Antiporter of *E. coli*: An FTIR Spectroscopy Study”, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik, Mainz, Germany

E. Agić, O. Klein, W. Mäntele (2006): „Secondary structure, pH-dependent activation and protein accessibility of the Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) from *E. coli*”, SFB 472 Molekulare Bioenergetik

E. Agić, O. Klein, W. Mäntele (2006): „Temperature and pH-Induced Conformational Changes of NhaA Na⁺/H⁺-Antiporter of *E. coli*: An FTIR Spectroscopy Study”, SFB 472 Molekulare Bioenergetik

E. Agić, O. Klein, E. Screpanti, C. Hunte, W. Mäntele (2005): Structural and Functional Investigation of NhaA Na⁺/H⁺-antiporter of *E. coli*: An Attenuated Total Reflection (ATR) - FTIR Spectroscopy Study, 12th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules, Aschaffenburg, Deutschland

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	GRUNDLAGEN.....	3
2.1	MEMBRANPROTEINE - STRUKTUR UND FUNKTION	3
2.1.1	Struktur der Proteine	3
2.1.2	Integrale Membranproteine	6
2.1.3	Der Transport durch die Membran	6
2.1.4	Natrium/Protonen Antiporter.....	8
2.1.5	NhaA Na ⁺ /H ⁺ Antiporter aus <i>Escherichia coli</i>	9
2.1.6	MjNhaP1 Na ⁺ /H ⁺ Antiporter aus <i>Methanococcus jannaschii</i>	11
2.2	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN ZUR STRUKTURANALYSE VON PROTEINEN	13
2.2.1	Infrarotspektroskopie von Proteinen.....	13
2.2.2	FTIR-Spektrometer	17
2.2.3	Proben-Techniken.....	20
2.2.4	Transmission	21
2.2.5	Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)	21
2.2.6	CD-Spektroskopie der Proteine.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	26
3.1	ATR-PERFUSIONSZELLE	26
3.1.1	Totzeitbestimmung.....	28
3.1.2	Einfluss des Ultraschalls auf das Gleichgewicht der Proteinprobe.....	30
3.1.3	Verschiedene Ultraschallintensitäten	31
3.1.4	Verschiedene Perfusionsraten	32
3.2	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE MIT FTIR-SPEKTROSKOPIE	34
3.2.1	Die Amid I Bande im IR-Spektrum des Proteins.....	34
3.2.2	Analyse der Amid I Bande.....	38
3.2.3	Probenpräparation.....	41

3.3	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE MIT CD-SPEKTROSKOPIE.....	42
3.3.1	Das CD-Spektrum eines Proteins.....	42
3.3.2	Analyse des CD-Spektrums	43
3.3.3	Probenpräparation.....	44
3.4	UNTERSUCHUNGEN DER THERMISCHEN STABILITÄT.....	45
3.4.1	Design des Temperatur-Exkursion Experiments	46
3.5	FLEXIBILITÄTSUNTERSUCHUNGEN MIT HILFE DES $^1\text{H}/^2\text{H}$ -AUSTAUSCHES	47
3.5.1	Design des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Experiments	49
3.5.2	Die Korrektur der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Spektren.....	50
3.5.3	Analyse der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Spektren	52
3.6	DIFFERENZSPEKTREN	53
3.6.1	Design des Experiments zur Aufnahme von Differenzspektren	54
3.7	PROTEINPROBEN	55
3.7.1	NhaA und Mutante G338S aus <i>E. coli</i>	56
3.7.2	MjNhaP1 und Mutante R347A aus <i>M. jannaschii</i>	57
IV.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	59
	TEIL I: NHAA	
4.1	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE.....	59
4.1.1	Analyse mittels FTIR-Spektroskopie	59
4.1.2	Sekundärstrukturanalyse bei verschiedenen Deuterierungszeiten.....	65
4.1.3	Analyse mittels CD-Spektroskopie	69
4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR THERMISCHEN STABILITÄT	73
4.2.1	Vergleich des inaktiven und des aktiven Zustands	74
4.2.2	Vergleich Wildtyp / Mutante G338S	79
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR DYNAMIK UND FLEXIBILITÄT DES PROTEINS	80
4.3.1	$^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von NhaA im inaktiven und aktiven Zustand	82
4.3.2	Vergleich Wildtyp / Mutante G338S	83
4.3.3	$^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von WT NhaA mit 100 mM NaCl.....	84
4.3.4	Verteilung der Geschwindigkeitskonstanten im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch.....	87
4.4	DIFFERENZSPEKTREN	93
4.4.1	pH-induzierte Sekundärstrukturänderungen von NhaA.....	93

4.4.2	pH-Titration.....	97
4.4.3	Aktiver /inaktiver Zustand von NhaA – Differenzspektren im D ₂ O-Puffer.....	100
4.4.4	pD-induzierte Sekundärstrukturänderung.....	106
4.4.5	Mutante G338S – Differenzspektren in D ₂ O-Puffer.....	110
4.4.6	Ionen induzierte Konformationsänderungen.....	115
4.4.7	Inhibitor-induzierte Sekundärstrukturänderung.....	121

TEIL II: MjNHAP1

4.5	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE.....	125
4.5.1	Analyse des Wildtyps in Detergenz mit FTIR-Spektroskopie.....	125
4.5.2	Analyse des Wildtyps in Detergenz mit CD-Spektroskopie.....	129
4.5.3	FTIR-Sekundärstrukturanalyse von verschiedenen MjNhaP1 Proben.....	131
4.6	UNTERSUCHUNG ZUR THERMISCHEN STABILITÄT.....	135
4.6.1	Vergleich des inaktiven und aktiven Zustands.....	135
4.6.2	Vergleich Wildtyp / R347A Mutante.....	137
4.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR DYNAMIK UND FLEXIBILITÄT DES PROTEINS.....	140
4.7.1	¹ H/ ² H Austausch von MjNhaP1 WT im inaktiven und aktiven Zustand.....	140
4.7.2	Vergleich Wildtyp / R347A Mutante / Wildtyp 2D-Kristalle.....	141
4.8	DIFFERENZSPEKTREN.....	144
4.8.1	pH-induzierte Sekundärstrukturänderung von MjNhaP1 WT 2D-Kristallen.....	144
4.8.2	pH-induzierte Sekundärstrukturänderung von in Detergenz solubilisierten MjNhaP1 WT.....	148
4.8.3	Vergleich Wildtyp / R347A Mutante.....	150

TEIL III: NHAA UND MjNHAP1

4.9	ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH ZWISCHEN NHAA UND MjNHAP1.....	144
4.9.1	FTIR- und CD-Sekundärstrukturanalyse (s. Kapitel 4.1.1; 4.1.3; 4.5.1; 4.5.2).....	152
4.9.2	Thermische Stabilität (s. Kapitel 4.2.1 und 4.6.1).....	155
4.9.3	Dynamik und Flexibilität (s. Kapitel 4.3.1 und 4.7.1).....	157
4.9.4	pH-induzierte Sekundärstrukturänderung (s. Kapitel 4.4.1 und 4.8.2).....	158
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	160
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	163

I. EINLEITUNG

Integrale Membranproteine bilden die Brücke zwischen dem Innen- und Außenraum einer Zelle und sind von entscheidender Bedeutung für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Eine ihrer wichtigsten Funktionen ist die Regelung und Organisation des Transports von verschiedenen Substanzen durch die Membran einer Zelle. Weit verbreitete Membranproteine, die bei der Regulation des pH-Werts und der Konzentration der Natriumionen eine primäre Rolle spielen, sind Natrium/Protonen Antiporter.

Na^+/H^+ Antiporter regulieren die für die Zelle überlebenswichtigen Faktoren, wie den pH-Wert, die Na^+ -Konzentration und das Zellvolumen. Sie benutzen die Energie, die im Natrium-Konzentrationsgradienten gespeichert ist, um einen sekundär aktiven Auswärts- bzw. Einwärtstransport von Protonen zu betreiben. Um die Konzentration von Protonen und Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle zu detektieren, müssen Na^+/H^+ Antiporter mit pH-Sensoren ausgestattet sein. Diese Sensoren können dann Konformationsänderungen erzeugen. Durch diese Strukturänderungen wird der Transport von Ionen ermöglicht und somit die Aktivität des Proteins induziert.

Diese Aktivität des Proteins kann aber auch die Ursache für schwerwiegende Folgen sein. So kommt es bei Herzoperationen durch die Übersäuerung des Zytoplasmas im Herzmuskel zur Aktivierung des menschlichen Na^+/H^+ Antiporters NHE1 und damit zum gekoppelten Fluss der Protonen **aus** und Natrium Ionen **in** die Zelle. Diese erhöhte Natriumkonzentration in der Zelle steigert wiederum die intrazelluläre Konzentration von Kalziumionen, die dann eine Gefährdung des Patienten verursacht. Die schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen für den Patienten können verhindert werden, indem die Aktivität des Proteins mit Hilfe von Inhibitoren blockiert wird. Um die Signalübertragung und den damit verbundenen Transportmechanismus dieser wichtigen und weitverbreiteten Antiporter verstehen zu können, ist es von großem Interesse, die Regulation ihrer Aktivität in verschiedenen Organismen zu erforschen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei bakterielle Antiporter, NhaA aus *E. coli* und MjNhaP1 aus *M. jannaschii*, untersucht. Sie unterscheiden sich in der pH-Abhängigkeit des Transports von Protonen und Natriumionen. NhaA wird durch pH-Werte im alkalischen Bereich (\sim pH 8) aktiviert, während MjNhaP1 bei pH 6 aktiv und bei pH 8 inaktiv ist. Die pH- oder Natrium-induzierte Aktivierung des Proteins geht dabei wahrscheinlich mit einer Konformationsänderung einher. Dabei stellen sich die Fragen über die Konformationsänderungen, die beim Übergang vom inaktiven zum aktiven Zustand durch die Änderung des pH-Werts erfolgen und diejenigen, die durch die Bindung von Natrium oder ein Inhibitormolekül verursacht werden.

Um die strukturellen Änderungen und die Details der molekularen Mechanismen, die den Aktivierungsprozess dieser Antiporter begleiten, zu charakterisieren, wird die Fourier Transform Infrarot (FTIR)-Spektroskopie benutzt. Zusätzliche Informationen zur Sekundärstruktur liefert außerdem Analyse von spektralen Daten der UV-Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie.

Zur Untersuchung der Struktureigenschaften werden zunächst die mit FTIR- und CD-Spektroskopie aufgenommenen Proteinspektren analysiert. Dabei werden die ersten möglichen strukturellen Unterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins detektiert.

Die FTIR-Spektroskopie ist eine weit verbreitete Methode, um die temperaturinduzierte Faltung und Entfaltung eines Proteins zu untersuchen. Mit Hilfe einer temperierbaren IR Zelle wird die thermisch induzierte Denaturierung der Proteine für den inaktiven und den aktiven Zustand verfolgt. Dabei können die strukturellen Änderungen und die Reorganisation des Proteins während des Entfaltungsprozesses für die beiden Zustände („aktiv“ bzw. „inaktiv“) untersucht werden.

Die Untersuchung der Proteindynamik und Flexibilität des Proteins wird durch die Messung der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Reaktion möglich. Als Folge des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches beobachtet man Änderungen im Infrarotspektrum des Proteins. Die Interpretation von Kinetik und Ausmaß dieser Änderungen ergibt Informationen über Flexibilität, Dynamik und Lösungsmittelzugänglichkeit des Proteins. Damit ist es möglich, Einblicke in die Tertiärstruktur und die Topologie des Proteins mit der Aktivierung bzw. mit der Inaktivierung zu bekommen.

Durch ein Infrarotspektrum können die Eigenschaften über die Bindung eines Wirkstoffmoleküls, die dadurch verursachten Konformationsänderungen und die Effekte der Bindung auf spezifische Aminosäuren untersucht werden. Auch eine Änderung der Umgebung, wie z.B. eine Änderung des pH-Werts eines Puffers, verursacht eine Sekundärstrukturänderung des Proteins, die infrarotspektroskopisch verfolgt werden kann. Um die eindeutigen molekularen Signaturen erhalten zu können, müssen die reaktionsinduzierten Differenzspektren aufgenommen werden. Dieses wird mit Hilfe einer Mikro-Perfusionszelle für die IR-Spektroskopie in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) möglich. Sie erlaubt es, eine Proteinreaktion *in situ* zu induzieren und die das Protein umgebende Lösung zu variieren. Damit können die durch die pH-Aktivierung induzierten Konformationsänderungen des Proteins charakterisiert werden. Im Übrigen kann der Einfluss verschiedener Wirkstoff(-ionen)moleküle (Natrium, Lithium, Kalium, Inhibitor) auf die Struktur der Na^+/H^+ Antiporter untersucht werden.

II. GRUNDLAGEN

TEIL I: PROTEINE

2.1 Membranproteine - Struktur und Funktion

Eine Membran stellt eine Trennschicht zwischen dem Inneren einer Zelle und ihrer Umgebung dar. Sie bietet nicht nur passiven Schutz für das Zellinnere durch die Lipiddoppelschicht, sondern ist auch aktiv durch Membranproteine für die Erhaltung von bestimmten Bedingungen im Zellinneren verantwortlich.

Die Membranproteine sind entweder an der Oberfläche einer Membran verankert (periphere Proteine) oder in sie eingelagert (integrale Proteine). Ihre Aufgaben sind vielfältig. Sie bilden die Brücke zwischen dem Innen- und Außenraum einer Zelle und sind damit unter anderem für den gezielten Stofftransport sowie Informationsaustausch verantwortlich. Von allen Proteinen, die in den verschiedenen Organismen vertreten sind, haben die Membranproteine einen Anteil von 30 %. Viele Erbkrankheiten entstehen durch die eingeschränkte Funktion der Membranproteine. Die Wirksamkeit der 60 % aller Medikamente ist von der Interaktion mit den Membranproteinen abhängig. Deshalb ist das Verständnis ihrer Struktur und Funktion von großer Bedeutung.

2.1.1 Struktur der Proteine

Proteine sind Polypeptidketten, welche aus dem gleichen Satz von 20 Aminosäuren zusammengesetzt und über kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind.

Jede Aminosäure hat sowohl eine Carboxylgruppe (-COOH) als auch eine Aminogruppe (-NH₂); der Unterschied liegt im Rest, der auch als Seitenkette bezeichnet wird. Durch die Seitenkette werden die chemischen und die physikalischen Eigenschaften einer Aminosäure bestimmt. Je nachdem ob die Seitenkette polar oder unpolar ist, werden die Aminosäuren in hydrophile (polare) und hydrophobe (apolare) Gruppen geteilt. Die Tendenz der Aminosäuren zur Abgabe bzw.

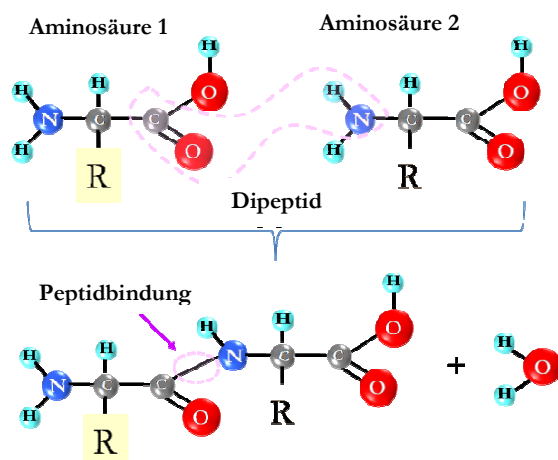


Abbildung 1: Bildung einer Peptidbindung

Aufnahme der Protonen führt zur Aufteilung in saure und basische Gruppen. Die aliphatische

Gruppe hat eine reine Kohlenstoff-Seitenkette, wobei bei der aromatischen Gruppe die Seitenkette durch einen Ring charakterisiert wird. Die Verknüpfung vieler Aminosäuren durch die Peptidbindung (Abbildung 1) bildet dann eine Polypeptidkette. Dabei unterscheidet man zwischen dem Polypeptid-Rückgrat, welches aus sich wiederholenden Untereinheiten (Peptid- oder Amid-Gruppen) besteht, und den Polypeptid-Seitenketten, die die Resten der einzelnen Aminosäuren bezeichnen.

Durch die Aminosäuresequenz ist die erste Ebene der Proteinstruktur, die **Primärstruktur** (Abbildung 2), definiert. Die kleinsten Änderungen in der Primärstruktur können zu den Konformationsänderungen führen. Mit einer geänderten Konformation kann die Funktion des Proteins beeinträchtigt werden. So hat der Austausch einer einzigen Aminosäure bei G338S, NhaA Mutante, das in dieser Arbeit auch untersucht wurde, zum kompletten Funktionsverlust des Proteins geführt.

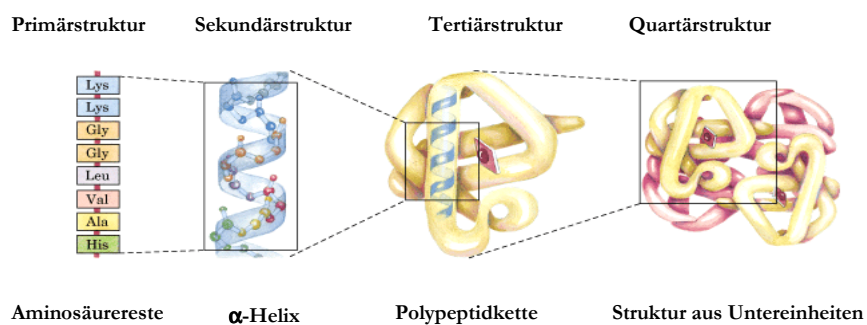


Abbildung 2: Strukturebenen von Proteinen nach [2]

Die **Sekundärstruktur** (Abbildung 2) stellt die Faltung von bestimmten Abschnitten der Polypeptidkette dar. Das wird hauptsächlich durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den CO- und NH-Gruppen des Rückgrats gewährleistet. Dadurch können sich verschiedene Elemente der Sekundärstruktur, wie α -Helix und β -Faltblatt, ausbilden.

α -Helix stellt eine Art der Spirale dar, die ca. 3,6 Aminosäuren pro Windung hat. Sie entsteht durch die Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen der C=O-Gruppe einer Aminosäure an der Position (n) und NH-Gruppe einer Aminosäure an der Position (n+4) derselben Polypeptidkette. Die Polypeptidkette bildet den inneren Teil der Spirale und die Seitenketten befinden sich außen. Der Anteil an α -Helix ist bei Proteinen verschieden. So weisen manche Proteine einen Anteil an α -Helix von 100 % auf, bei den anderen ist wiederum gar keine α -Helix als Sekundärstrukturelement vorhanden.

β -Faltblatt hat eine plattenförmige Struktur. Im Gegensatz zu α -Helix werden hier die Wasserstoffbrücken zwischen CO-Gruppe und NH-Gruppe verschiedener Polypeptidstränge

ausgebildet. Ist die Richtung der benachbarten Stränge in einem β -Faltblatt gleich, so spricht man von einem parallelen β -Faltblatt, ist sie umgekehrt, von einem antiparallelem β -Faltblatt.

Die in dieser Arbeit benutzte Schwingungsspektroskopie liefert Informationen über die Sekundärstruktur der Proteine.

Die räumliche Anordnung aller Sekundärstrukturelemente ist die **Tertiärstruktur** (Abbildung 2). Dabei führen die Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten verschiedener Aminosäuren zur Stabilisierung der Proteinstruktur. Dabei kann man zwischen den kovalenten Bindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen, hydrophoben Bindungen und den Van-der-Waals Wechselwirkungen unterscheiden.

Die **kovalenten Bindungen** sind die stärksten Bindungen in der Proteinstruktur. Sie sind für die Bindung der Atome einer Aminosäure und für die Peptidbindung verantwortlich. Zusätzlich hat Cystein als einzige Aminosäure die Möglichkeit zur Ausbildung von kovalenten Bindungen, den sogenannten Disulfidbrücken. Diese werden zwischen den Seitenketten zweier Cystein Aminosäuren ($--CH_2-S-S$) ausgebildet.

Zur Gruppe der **elektrostatischen Wechselwirkungen** gehören Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen. Die Ausbildung dieser Bindungen wird durch die Partialladungen der Atome möglich. Aufgrund der verschiedenen Elektronegativitäten der Atome, die an einer kovalenten Bindung beteiligt sind, entsteht eine asymmetrische Verteilung der Elektronenwolke, was zu einer Partialladung der Atome führt.

- Die Wasserstoffbrückenbindungen entstehen durch die Wechselwirkung der polaren Seitenketten. Die Wasserstoffatome, die z.B. an ein Kohlenstoff, Sauerstoff oder Stickstoff kovalent gebunden sind, haben oft eine hohe positive Partialladung. Diese können mit einem Protonenakzeptor, einem Atom mit einer stark negativen Partialladung, die Wasserstoffbrücken ausbilden, wenn sie zueinander gerichtet sind.
- Die Ionenbindungen (Salzbrücken) werden zwischen den positiv und negativ geladenen Seitenketten der verschiedenen Aminosäuren ausgebildet.

Die **hydrophobe Wechselwirkung** ist die wichtigste Kraft, die die Proteinfaltung steuert. Dabei werden die unpolaren Seitenketten aneinander gelagert, so dass der Energieverlust, der bei dem Eindringen der Aminosäuren in die H_2O -Lösung entsteht, minimiert wird. Durch diesen Effekt wird eine hydrophobe Region innerhalb Proteins ausgebildet, wo die meisten Aminosäuren von den Wechselwirkungen mit Wassermolekülen geschützt sind.

Die **Van-der-Waals Wechselwirkung** ist unabhängig von der Art der beteiligten Atome oder Moleküle. Sie wird in der hydrophoben Region des Proteins ausgebildet, um die unpolaren Aminosäuren zusammenzuhalten.

Die **Quartärstruktur** (Abbildung 2) stellt die Gesamtstruktur des Proteins dar. Diese ist durch die Zusammenlagerung seiner Polypeptide gegeben und wird durch die nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten.

2.1.2 Integrale Membranproteine

Wie am Anfang schon erwähnt, gibt es zwei Möglichkeiten der peripheren und integralen Wechselwirkung eines Proteins mit der Membran. Die wässrige Region außerhalb, ionische Region an der Oberfläche und die ölige Region im Inneren der Membran schaffen eine inhomogene Umgebung für das integrale Membranprotein und sind die Ursache für seine einzigartigen strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Seine Struktur setzt sich zusammen aus der transmembranen Domäne, die die Lipiddoppelschicht durchzieht und der Domäne, die sich in die wässrige Umgebung von beiden Seiten der Membran ausdehnt. Dieses führt dazu, dass es in der hydrophoben Umgebung der Lipiddoppelschicht für die Atome des Peptidrückgrats energetisch günstiger ist, sich in Form von α -Helix oder β -Faltblatt zu falten. Außerdem wird die Struktur des Proteins durch die Ordnung der Seitenketten in Abhängigkeit von der dielektrischen Eigenschaft der Lipide beeinflusst. Der letzte entscheidende Faktor für die Struktur eines integralen Membranproteins ist durch die Lipid-Lipid-Wechselwirkung gegeben. Um die van-der-Waals-Kräfte zu maximieren, reihen sich die Lipide aneinander an und es wird diese Proteinstruktur bevorzugt, die diese Wechselwirkung am wenigsten stört.

2.1.3 Der Transport durch die Membran

Eine der wichtigsten Funktionen eines integralen Membranproteins ist die Regelung des überlebenswichtigen Transports von verschiedenen Substanzen zwischen dem Innen- und Außenraum einer Zelle durch die Membran. Lipid-unlösliche Stoffe und polare Verbindungen, wie Zucker, anorganische Ionen und biologisch wirksame Substanzen können die Membran nicht durch den einfachen Diffusionsmechanismus passieren, sondern werden mit Hilfe von Membranproteinen oder Carriermoleküls passiv oder aktiv transportiert.

Bei dem **passiven Transport**, (Abbildung 3) einer erleichterten Diffusion, werden die polaren Verbindungen und Ionen ohne Zufuhr von Energie in Richtung eines Konzentrations- oder Potentialgefälles mit Hilfe der Transporter durch die Membran befördert.

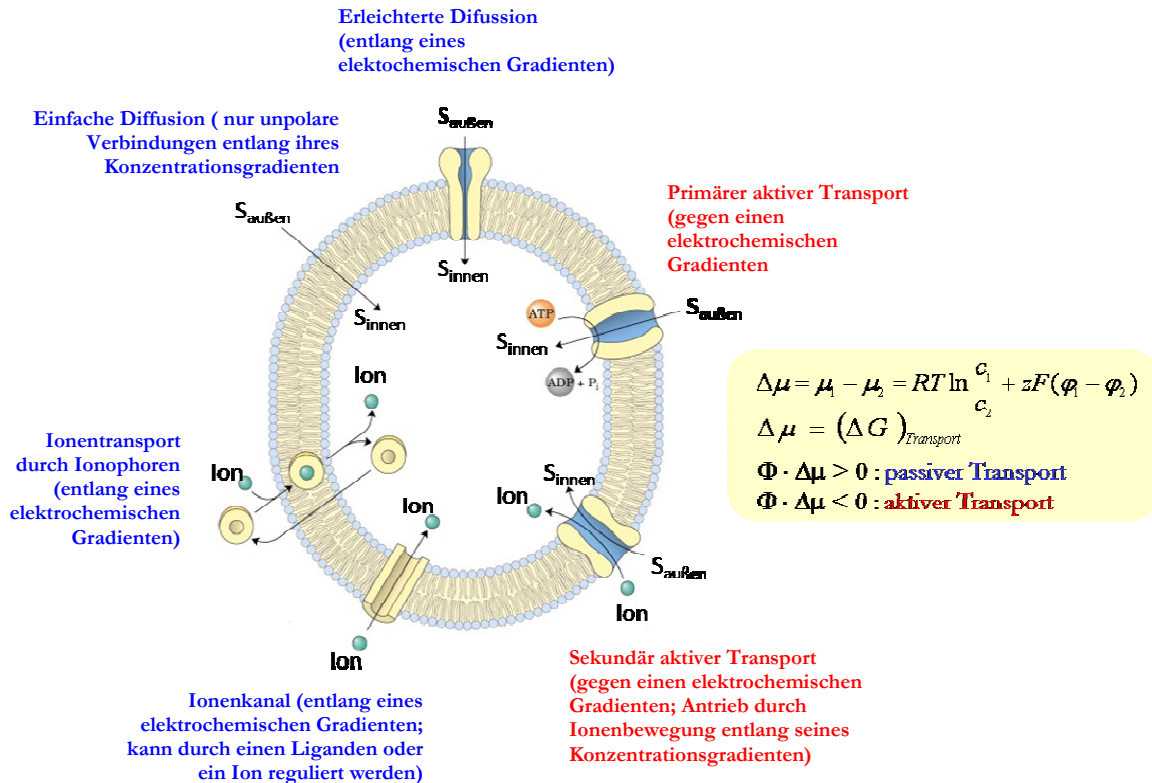


Abbildung 3: Transport durch eine Membran (G: Gibbs-Energie; μ : elektrochemische Potential; R: Gaskonstante; T: Temperatur; c: Aktivität zu transportierenden Substanz oder Konzentration bei verdünnter Lösung; z: die Ladung eines Ions; F: Faraday-Konstante; φ : elektrisches Potential; Φ : Fluss) nach [2,3]

Im Gegensatz dazu wird bei dem **aktiven Transport** (Abbildung 3) entgegen dem Gefälle des elektrochemischen Potentials μ unter Energieverbrauch transportiert. Dieser Prozess kann nur durch die Kopplung mit einem zweiten energieliefernden Prozess stattfinden. Damit der primär aktive Transport spontan ablaufen kann, muss die Gibbs-Energie (Freie Enthalpie) ΔG im gesamten System abnehmen. Dieses wird mit Hilfe von „primären“ Energiequellen, ATP-Hydrolyse, Licht oder Redoxenergie, erreicht. Bei einem sekundär aktiven Transport wird zum Transport einer Substanz A entgegen einem Potentialgefälle die benötigte Gibbs-Energie aus dem gekoppelten Prozess, welcher eine Substanz B von großem auf kleines elektrochemisches Potential transportiert, gewonnen. Dabei kann als Energiequelle für den sekundär aktiven Transport der Gradient des elektrochemischen Potentials von Na^+ und H^+ Ionen dienen, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Die möglichen Transportsysteme sind in Form eines Kanals oder eines Carriers. Ein Kanal ist von beiden Seiten der Membran offen und wird durch verschiedene Arten der Signale, wie Bindung eines Liganden oder Änderung des Membranpotentials gesteuert.

Dagegen arbeitet ein Carrier sehr spezifisch, mit einer oder zwei Bindungsstellen. Es wird zwischen Uniporter, Symporter und Antiporter unterschieden. Ein Uniporter transportiert ein Molekül auf die andere Seite der Membran, während der Symporter in die gleiche und Antiporter, wie der in dieser Arbeit untersuchte Na^+/H^+ Antiporter, in die entgegengesetzte Richtung zwei Ionen oder Moleküle in einem gekoppelten Prozess transportiert.

2.1.4 Natrium/Protonen Antiporter

Natriumionen und Protonen sind sehr verbreitete Ionen in einem Organismus. Ihre Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle sind verschieden, was zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials über der Membran führt. Die Ionen sind aber ständig bestrebt, diesen Konzentrationsunterschied auszugleichen, deshalb bedarf es eines aktiven Transports, um dem entgegenzuwirken. Eine konstante intrazelluläre Konzentration dieser Ionen und auch der Konzentrationsunterschied zwischen dem intra- und extrazellulären Raum sind für die Zelle überlebenswichtig. So führt eine Vergrößerung oder Verkleinerung der Natriumkonzentration über einen Grenzwert zur Veränderung des Zellvolumens, das zur Schädigung der Gehirnfunktion und damit zur Epilepsie, Bewusstseinsstörung, Koma führt. Auch der Protonenstrom über der Membran muss streng kontrolliert werden, da eine Erhaltung des Optimums beim zellulären pH-Wert für die Funktion und Stabilität der Zelle entscheidend ist. Eine maximale Entfaltung der katalytischen Aktivität der Enzyme, sowie die Funktion und die Struktur der Makromoleküle, sind nur bei einem pH-Optimum innerhalb der Zelle gegeben. Bei den meisten Bakterien liegt dieses pH-Optimum im neutralen Bereich, obwohl der Lebensraum dieser Bakterien und damit der extrazelluläre Raum stark im pH-Wert variieren kann. So gibt es Bakterien, die in einer extrem sauren Umgebung, zwischen pH 0 und 2, oder in einer extrem alkalischen Umgebung pH 11,5 leben. Um aber die Aktivität und Stabilität der Zelle und damit ihrer Bestandteile bei einem optimalen pH-Wert zu gewährleisten, hat sowohl die eukaryotische als auch prokaryotische Zelle einen pH Regulationsmechanismus entwickelt, um durch den Stoffwechsel und die Umgebung induzierte Änderungen des intrazellulären pH Werts auszugleichen.

Die Proteine, die im Regulationsmechanismus des pH Werts und der Konzentration der Natrium Ionen eine primäre Rolle spielen, sind die Natrium/Protonen Antiporter. Sie sind in allen lebenden Zellen mit nur einer bekannten Ausnahme, dem Bakterium *Clostridium feravidus*, vorhanden. Sie benutzen die Energie, die im Natrium-Konzentrationsgradienten gespeichert ist, um einen sekundär aktiven Auswärtstransport von Protonen und umgekehrt, zu betreiben. Damit

leisten sie einen bedeutenden Beitrag in der Erhaltung eines optimalen pH-Werts und einer konstanten Natriumkonzentration innerhalb der Zelle. Das Natrium oder Protonen Gradient kann als treibende Kraft für viele Transportsysteme benutzt werden.

Um die Konzentration der Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle detektieren zu können, müssen Na^+/H^+ Antiporter mit Sensoren ausgestattet sein. Diese Sensoren führen dann zu einer Konformationsänderung und damit zur maximalen Entfaltung der Aktivität des Proteins, die es erlaubt, den Transport dieser Ionen durchzuführen. Diese Aktivität des Proteins kann aber auch die Ursache für schwerwiegende Folgen sein. So kommt es bei Herzoperationen durch die Übersäuerung des Zytoplasmas des Herzmuskels zur Aktivierung des menschlichen Na^+/H^+ Antiporters NHE1 und damit zum gekoppelten Fluss der Protonen **aus** und Natrium Ionen **in** die Zelle. Diese erhöhte Natriumkonzentration in der Zelle erhöht wiederum die intrazelluläre Konzentration von Calcium Ionen, die dann eine Gefährdung des Patienten verursacht. Die schwerwiegenden Folgen für den Patienten können verhindert werden, indem seine Aktivität mit Hilfe von Inhibitoren blockiert wird. Um die Signalübertragung und damit verbundenen Transportmechanismus dieser wichtigen und weitverbreiteten Antiporter verstehen zu können, ist es von großem Interesse die Regulation ihrer Aktivität in verschiedenen Organismen zu erforschen. In dieser Arbeit wurden zwei dieser Antiporter aus zwei verschiedenen Bakterien *Escherichia coli* und *Methanococcus jannaschii* mit Hilfe der Schwingungsspektroskopie untersucht.

2.1.5 NhaA Na^+/H^+ Antiporter aus *Escherichia coli*

NhaA ist der Na^+/H^+ Antiporter aus dem Bakterium *Escherichia coli*. Dieses Bakterium hat noch einen anderen Antiporter NhaB, der auch Natrium- und Lithium-Ionen gegen Protonen austauscht. Im Gegensatz zu NhaB ist NhaA für das Überleben bei extremen Bedingungen, z.B. bei hohen Natrium und Lithium Konzentrationen sowie für das Wachstum bei alkalischem pH Wert in der Gegenwart von Natrium für das Bakterium unersetzlich [4].

NhaA transportiert Protonen und Natriumionen (Lithiumionen) in einem stöchiometrischen Verhältnis 1:2 und ist damit ein elektrogener Antiporter, da das Membranpotential dadurch geändert wird. Für ein Proton werden zwei Natriumionen aus der Zelle, oder in der umgekehrter Richtung, transportiert. Das Protein besteht aus 388 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 42kDa und seine Aktivität ist sehr stark vom pH-Wert beeinflusst [5]. Es wird durch alkalische pH-Werte aktiviert mit einer maximalen Aktivität bei pH 8,5 und ist bei pH Werten < 6,5 vollständig inaktiv. Die Ionentransportrate nimmt von pH 7 zu pH 8 um drei Größenordnungen

zu. Nach über 20 Jahre Forschung, gelang es erst vor kurzem, die Struktur von 3D NhaA Kristallen (Abbildung 4a und b) bei einer Auflösung von 3,45 Å zu bestimmen [6].

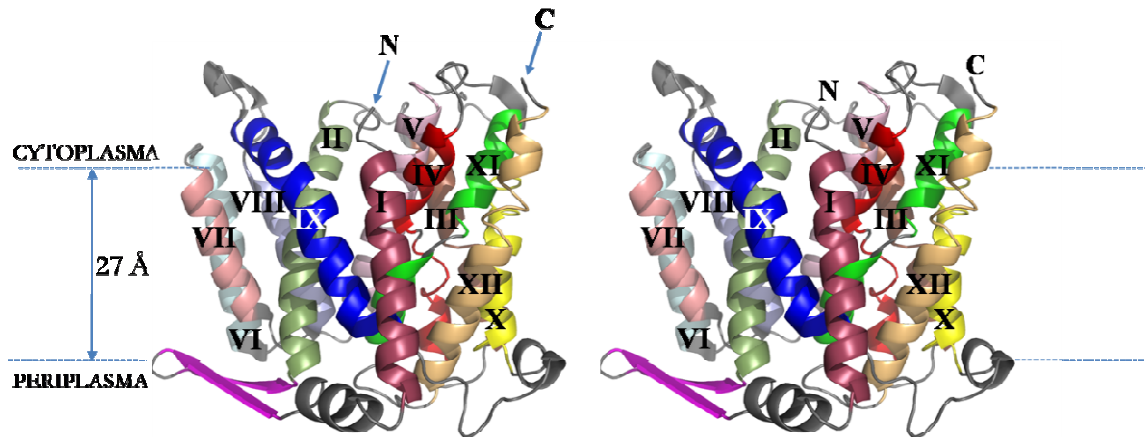


Abbildung 4a: 3D-Struktur von NhaA als Dimer nach [6]

Das Strukturmodell wurde aus der inaktiven Konformation bei pH 4 gewonnen und beinhaltet die Aminosäuren 9 bis 384. Wie schon aus dem Topologiemodell [7] und aus der EM Studien mit 2D-Kristallen [8,9] gesehen und mit der 3D Kristallstruktur bestätigt worden ist, ist das Protein in 12 Membran durchspannenden Segmenten angeordnet. Diese transmembranen Segmente TMS bestehen hauptsächlich aus α -Helices, die miteinander durch hydrophile Schleifen verbunden sind. Die längste Schleife zwischen TMS I und II setzt sich aus einer kurzen Helix und einem darauffolgendem antiparallelen β -Faltblatt zusammen. Das einzigartige Merkmal des Proteins liegt in seiner Faltung. Die TMS IV und XI (Abbildung 4b) bilden zwei Trichter, welche zur zyttoplasmatischen und zur periplasmatischen Seite der Membran geöffnet sind. Jeder dieser Trichter wird durch zwei kurze Helices, die miteinander durch ein Peptid verbunden sind, geformt. Die beiden Trichter sind negativ geladen und ihre Enden, die durch Peptide gebildet sind, weisen zueinander, bilden aber keine Pore. Es wird vermutet, dass dieser Bereich mit seinen kurzen

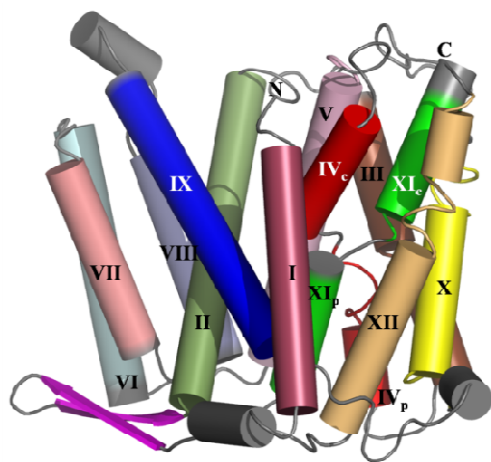


Abbildung 4b: NhaA als Monomer. TMS in Farbe, Helices und negativ geladenem Bezug die nicht TMS in grau, β -Faltblatt in pink.

Hauptrolle in der Bindung des Substrats und beim Transportmechanismus spielt. Das vorgeschlagene Transportmodell [6] beinhaltet den pH-Sensor. Dieser sendet, durch die Detektion des alkalischen pH-Bereiches, ein Signal aus. Das führt zu einer Konformationsänderung der gekrümmten Helix IX, welche dann eine Änderung

der Orientierung der Helices des TMSe IV und XI verursacht. Dieser Trichter öffnet dann die Bindungsstelle des Natriums zur zytoplasmatischen oder periplasmatischen Seite der Membran.

Für die **pH-Regulation** des Proteins ist der pH-Sensor verantwortlich, der auf die Protonierungsänderungen der Aminosäureresten des N-Terminus und der Peptidschleife zwischen Helix VIII und IX reagiert [10,11].

Es ist bekannt, dass viele Transporter und Kanäle in der Membran als Oligomere vorliegen [12], dennoch ist es nicht genau bekannt, wie diese Struktur und die Funktion des Proteins miteinander korrelieren. Die Ergebnisse verschiedener Studien zeigen, dass NhaA in der Membran als **Dimer** vorliegt [13-15]. Der Hauptkontakt zwischen NhaA Monomeren stellt die β -Faltblatt Struktur (vom Prolin 45 zum Asparagin 58) dar, die sich aus zwei β -Hairpins, die durch 4-Stränge des β -Faltblatts gebildet werden, zusammensetzt. Diese Struktur ist unerlässlich für die Formierung des Dimers, wie mit Hilfe der Mutante nachgewiesen wurde [16]. Für die Herstellung dieser Mutante wurde der Hauptkontakt zwischen den Monomeren, die β -Hairpins (NhaA / Δ (Pro⁴⁵-Asn⁵⁸), entfernt. Diese Mutante zeigte außerdem, dass das Protein als Monomer ähnlich dem Dimer funktioniert und erst bei extremen Umgebungsbedingungen (0,1M LiCl oder 0,7M NaCl bei pH 8,5) das Protein in der Funktion des Dimers wirkungsvoller ist.

2.1.6 MjNhaP1 Na⁺/H⁺ Antiporter aus *Methanococcus jannaschii*

Im Gegensatz zu NhaA, das aus dem *E. coli* Bakterium kommt, ist der Ursprung des MjNhaP1 in der hyperthermophilen Archaeon *Methanococcus jannaschii* [17]. Die Archaeen repräsentieren, neben den Bakterien und den Eukaryoten, einen der Bereiche der zellulären Lebewesen, und haben mehr molekularbiologische Gemeinsamkeiten mit den Eukaryoten als mit den Bakterien. So ist die Sequenz von MjNhaP1 dem humanen Antiporter, NHE1, ähnlicher als dem bakteriellen Antiporter NhaA [18]. Auch seine pH-abhängige Aktivität wird ähnlich wie die Aktivität des humanen Antiporters reguliert. Es ist aktiv im pH-Bereich zwischen 6,0 und 6,5 und wird durch pH Werte größer als 7 und kleiner als 6 deaktiviert [17,19]. Die natürliche Umgebung des *M. jannaschii* ist das Meer mit einem pH-Bereich von 4,0 bis 6,5 [19]. MjNhaP1 besteht aus 12 oder 13 die Membran durchspannenden Segmenten und hat 426 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von 46 kDa. Der Ionentransport durch MjNhaP1 ist nicht wie bei NhaA ein elektrogener sondern wie bei NHE1 ein elektroneutraler Prozess [AG Kühlbrandt, Diskussion]. Die Daten von 2D-Kristallen, aufgenommen mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie bei einer Auflösung von 8 Å, zeigen die räumliche Anordnung der TMS von MjNhaP1 und eine Konformationsänderung zwischen pH 4 und pH 8 [19]. Dabei wird angenommen, dass das

Protein in 3 verschiedenen Zuständen abhängig vom pH-Wert vorkommt. Demnach befindet sich das Protein in der Konformation des inaktiven Zustands bei pH 4. Eine Erhöhung des pH-Werts auf pH 6 verursacht eine Aktivierung des Proteins, was mit einer Konformationsänderung einhergeht. Danach würde eine weitere Erhöhung des pH-Werts zu keiner Konformationsänderung, aber zu einer Blockierung des Proteins führen.

TEIL II: FTIR- UND CD-SPEKTROSKOPIE

2.2 Spektroskopische Methoden zur Strukturanalyse von Proteinen

Das Verständnis der Funktion der Proteine und ihrer wichtigen Rolle in der biologischen Membran beginnt mit dem Verständnis ihrer Struktur. Eine Methode zur Aufklärung der Proteinstruktur ist die **Röntgenstrukturanalyse**. Auch wenn sie in der Lage ist die Struktur auf atomarer Skala aufzulösen, stellt sie immer noch eine Ausnahme in der Aufklärung der Struktur der Membranproteine dar. Der Grund liegt in der schwierigen Herstellung der dafür benötigten hoch qualitativen 3D Membranprotein-Kristalle. Allerdings muss die Kristallstruktur des Proteins nicht der Struktur des Proteins in der Lösung entsprechen. Sind keine Kristalle verfügbar, liefert die Kernresonanzspektroskopie, **NMR**, alternativ zur Röntgenstrukturanalyse, Informationen über die Struktur mit atomarer Auflösung, allerdings ist diese meistens auf Proteine mit kleinerer Molekularmasse begrenzt.

Das Protein muss in vielen Fällen die Konformation zwischen verschiedenen Zuständen ändern, um seine Funktion in der Membran gewährleisten zu können. Um die komplexen Vorgänge des molekularen Mechanismus verstehen zu können, müssen die drei Faktoren wie die Struktur, die Dynamik und die Umgebung eines Proteins berücksichtigt werden. Diese können aus einer Konformation der Röntgenstruktur nicht unbedingt abgeleitet werden. Deswegen werden andere Techniken gebraucht, die Informationen über diese drei Faktoren geben, aber auch als ergänzende Methoden zur der 3D Kristallstruktur dienen können.

Die **Infrarotspektroskopie** ist eine empfindliche Methode, die in der Lage ist, einen wertvollen Beitrag zur Bestimmung der Konformation und Dynamik der Membranproteine zu leisten. In dieser Arbeit wurde außerdem die **Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie** als ergänzende Methode zur IR-Spektroskopie für die Sekundärstrukturanalyse benutzt.

2.2.1 Infrarotspektroskopie von Proteinen

Die Infrarotspektroskopie [20] beruht genauso wie die Ramanspektroskopie auf den Schwingungsübergängen von Molekülen. Im Gegensatz zur Ramanspektroskopie, bei der durch den unelastischen Stoß der elektromagnetischen Strahlung mit dem Molekül die

Schwingungsübergänge induziert werden, werden diese bei der Infrarotspektroskopie durch die Absorption der infraroten Strahlung angeregt.

Die Bewegungsformen eines Moleküls setzen sich zusammen aus Schwingungen, Rotationen und Translationen. Damit hat ein N -atomiges Molekül $3N$ Freiheitsgrade. Zieht man je 3 Freiheitsgrade für Translation und Rotation ab, so gibt es für die Schwingungsmöglichkeiten eines nichtlinearen Moleküls $3N-6$ Freiheitsgrade. Für ein lineares Molekül, das nur 2 unterscheidbare Rotationsachsen hat, ist die Anzahl der Schwingungsfreiheitsgrade $3N-5$. Ein Protein mit tausenden von Atomen hat tausende von Schwingungsfreiheitsmoden, die **Normalschwingungen**.

Damit eine **Absorption von IR-Strahlung** stattfinden kann, ist es nicht ausreichend, dass die Frequenz des eingestrahnten Lichtes mit der Eigenfrequenz der Schwingung übereinstimmt. Eine Normalschwingung ist nur durch die IR-Strahlung anregbar, falls sich das elektrische Dipolmoment mit der Kernbewegung ändert. Es ist nicht erforderlich, dass von Anfang an ein Dipolmoment vorliegt, wie z.B. beim Wassermolekül, sondern es muss sich während der Schwingungsanregung ändern, wie z.B. beim Kohlendioxid der Fall ist. Somit sind alle Schwingungen von H_2O IR-aktiv, während bei CO_2 die symmetrische Streckschwingung nicht IR-aktiv ist (s. Abbildung 5).

Es gibt verschiedene **Schwingungsformen**, die Streckschwingung (Valenzschwingung) ν und Biegeschwingung (Deformationsschwingung) δ . Bei der Streckschwingung wird der Atomabstand zwischen den miteinander verbundenen Atomen geändert. Dagegen führt eine Veränderung der Valenzwinkel bei gleichem Atomabstand zu einer Biegeschwingung. Die verschiedenen Arten diesen beiden Schwingungsformen sind für das Wasser- und das Kohlendioxid-Molekül in Abbildung 5 dargestellt.

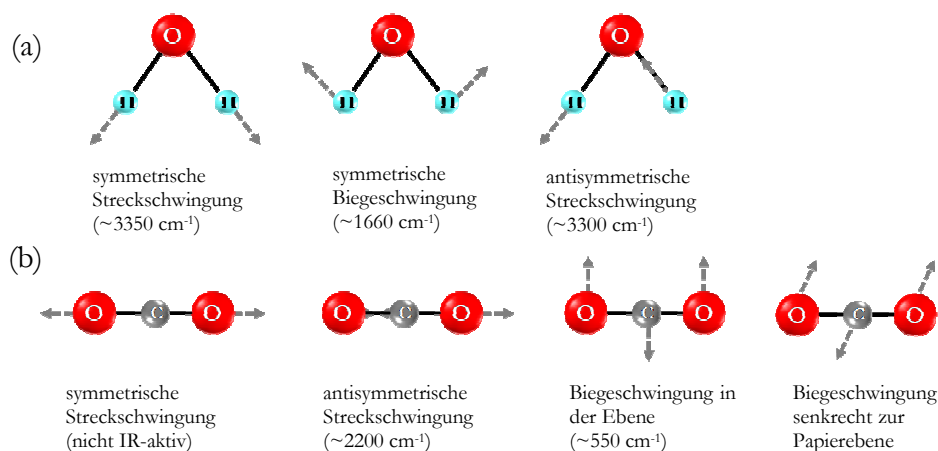


Abbildung 5: Normalschwingungen des Wassermoleküls und des Kohlendioxids nach [20]

Ein intensives **IR-Signal der Proteine** wird durch die Bindungen der Peptidgruppe (Amidgruppe), die das Grundgerüst des Polypeptids bilden, hervorgerufen (Abbildung 6) [21-25].

Auch die Schwingungen der benachbarten Peptidgruppen im Proteinrückgrat beeinflussen sich gegenseitig, so dass das Proteinrückgrat als die Reihe schwach gekoppelter Oszillatoren dargestellt werden kann.

Die Absorption und die **Schwingungsfrequenz**¹ im IR-Spektrum hängen von der Stärke und Polarität der Bindung, sowie von der Masse der

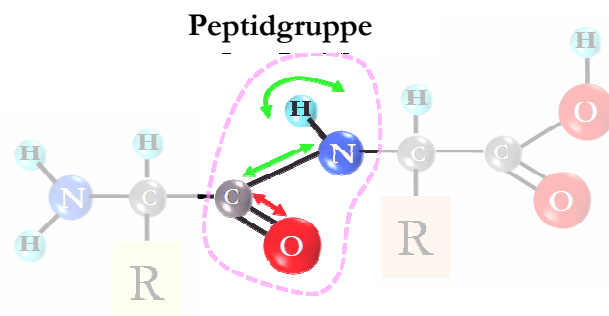


Abbildung 6: IR-Schwingungen der Peptidgruppe. Durch die Peptidbindungen verursachen Banden im IR-Spektrum: Amid I (\leftrightarrow) und Amid II (\leftrightarrow)

Schwingungsatome ab. Je größer die Masse der schwingenden Atome oder Moleküle, desto langsamer wird die Schwingung. Dieser Effekt ermöglicht es mit Hilfe des $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausches (s. Kapitel 3.5) die Funktionsweise eines Proteins zu untersuchen. Im Gegensatz zum Effekt der Masse hat eine steigende Elektronendichte der Bindung eine Zunahme der Schwingungsfrequenz zur Folge. Jede Änderung in der Umgebung der Peptidbindung wird auch die Änderung der Absorption und der Schwingungsfrequenzen zur Folge haben. Dieses ermöglicht den Einblick in die Sekundärstruktur und Strukturänderung eines Proteins in verschiedensten Umgebungen und macht die Infrarotspektroskopie zu einer wichtigen Methode in der Proteinforschung.

Die für die Strukturaufklärung der Proteine besonders wichtigen Absorptionsbanden des Proteins, die **Amidbanden** (s. auch Kapitel 3.2) liegen im mittleren Infrarot Wellenlängenbereich von $2,5 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ oder in der Infrarotspektroskopie üblich benutzten Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 200 cm^{-1} . Das IR-Spektrum des Proteins, das als Absorption in der Abhängigkeit von der Wellenzahl dargestellt wird, weist neun typische Schwingungsmoden der Peptidgruppe des Rückgrats, Amid A, Amid B und Amid I-VII, mit abnehmender Frequenz, auf (Tabelle 1).

¹Um die Schwingungen im Molekül anschaulich darstellen zu können, wird das einfache Modell des zwei-atomigen Oszillators benutzt. Die Schwingungsfrequenz des zwei-atomigen Oszillators ist gegeben durch $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$, wobei k die Kraftkonstante

zwischen zwei Atomen, und $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ die reduzierte Masse darstellt. Damit wird die Schwingungsfrequenz sowohl durch die

Kraftkonstante als auch durch die Masse der schwingenden Atome beeinflusst. Diese wird durch eine größere Kraftkonstante, d.h. eine stärkere Bindung zwischen zwei Atomen, erhöht und durch eine größere Masse der schwingenden Atome erniedrigt.

Symmetrie	Bezeichnung	Wellenzahl / cm^{-1}	Zusammensetzung
in der Ebene der Peptidbindung	Amid A	~3300	NH_s (100 %)
	Amid B	~3100	NH_s (100 %)
	Amid I	~1650	CO_s (~80 %). CN_s , CCN_d
	Amid II	~1550	NH_{ib} (~60 %), CN_s (~40 %)
	Amid III	~1300	CN_s (~40 %), NH_{ib} (~30 %), CC_s (~30 %)
aus der Ebene der Peptidbindung	Amid V	~725	NH_{ob} , CN_t
	Amid IV	~625	CO_b (~40 %), CC_s (~30 %), CNC_d
	Amid VI	~600	CO_{ob} , CN_t
	Amid VII	~200	NH_{ob} , CN_t , CO_{ob}

Tabelle 1: Schwingungsmoden der Peptidgruppe (s: Streckschwingung; d: Deformationsschwingung; t: Torsionsschwingung; ib: *in-plane*-Biegeschwingung; ob: *out-of-plane*-Biegeschwingung) nach [20]

In der **Amid I** Region von 1700 bis 1600 cm^{-1} dominieren die Normalschwingungsmoden der gleichen sich wiederholenden Einheiten eines Proteins. Sie wird hauptsächlich durch die C=O Streckschwingung, mit einem kleinen Anteil an der C-N-Streckschwingung sowie N-H-Biegeschwingung, des Proteinrückgrats verursacht. Die Frequenz der Amid I Bande wird durch die Änderung der Wasserstoffbrückenbindung zur C=O Gruppe, beeinflusst. Dabei wird die Schwingungsfrequenz durch eine starke H-Brücke zur C=O Gruppe, die den Doppelbindungscharakter schwächt, gesenkt. Im Gegensatz dazu beobachtet man eine Zunahme der Frequenz bei einer starken Doppelbindung, die aus einer schwachen H-Brücke zur C=O Gruppe resultiert. Da die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Sekundärstrukturen ausgebildet werden, macht dieses die Amid I Bande zur der informativsten Bande zur Sekundärstrukturanalyse (s. Kapitel 3.2.1).

Die **Amid II** Bande setzt sich aus der N-H Biegeschwingung und C-N-Streckschwingungen zusammen. Wegen des hohen Anteils an der N-H Biegeschwingung ist diese Bande empfindlich gegenüber $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch. Dieser Effekt ermöglicht die Untersuchung der Flexibilität des Proteins und wird ausführlicher im Kapitel 3.5 beschrieben.

2.2.2 FTIR-Spektrometer

Seit 1937 waren dispersive Spektrometer für die IR-Spektroskopie verfügbar. Diese wurden aber in den 80`er Jahren mit der Entwicklung leistungsfähiger Computer durch die Fourier-Transformations-Infrarot(FTIR)-Spektrometer verdrängt.

Die Hauptkomponente des FTIR-Spektrometers ist ein **Interferometer** meistens vom Michelson-Typ (Abbildung 7a)

[26]. Die von der Lichtquelle emittierte Strahlung fällt auf den Strahlteiler, welcher idealerweise den Strahl in zwei gleich intensive Teilstrahlen aufspaltet.

Der erste Teilstrahl wird reflektiert und trifft nach einer Strecke L auf einen fest montierten Spiegel S1, an dem er wieder reflektiert wird und anschließend, nachdem er eine Gesamtstrecke von $2L$ zurückgelegt hat, auf dem Strahlteiler landet. Der zweite Teilstrahl geht durch den Strahlteiler hindurch und verläuft im Prinzip wie der reflektierte Strahl. Der Unterschied besteht darin, dass der Strahl nicht auf einen fest montierten, sondern

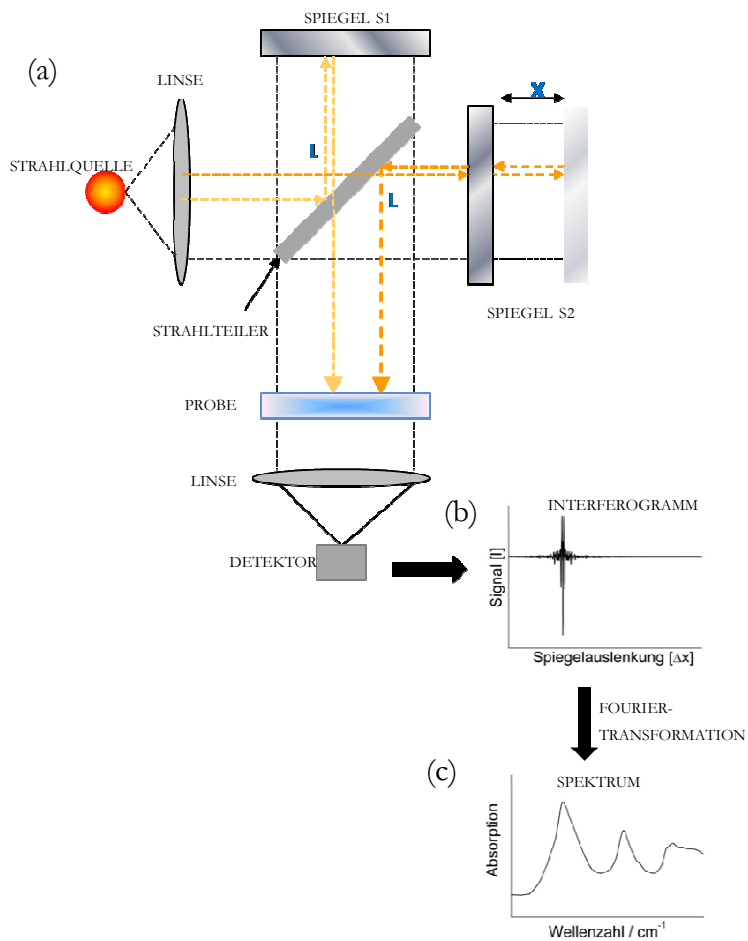


Abbildung 7: (a) Schematische Darstellung des Michelson-Interferometers ; (b) Interferogramm ; (c) IR-Spektrum.

auf einen um die Strecke x beweglichen Spiegel S2 fällt. Die Gesamtstrecke, die der Strahl dann zurückgelegt hat, wenn er auf dem Strahlteiler mit dem reflektierten Strahl interferiert, beträgt $2(L+x)$.

Die Spiegelposition wird durch ein Hilfsinterferogramm mit monochromatischem Licht eines He-Ne-Lasers kontrolliert. Um eine konstruktive Interferenz am Interferometerausgang zu erhalten, muss die Wegdifferenz $2x$ der beiden Teilstrahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge sein. Für $x=0$ interferieren alle Frequenzen konstruktiv und man bekommt die

maximale Intensität. Bei anderen Spiegelpositionen erhält man für manche Wellenlängen destruktive, für andere konstruktive Interferenz, was zu einer Abnahme des Detektorsignals führt.

Der rekombinierte Strahl durchquert die Probe und trifft schließlich auf den Detektor. Der Detektor misst die auftreffende Strahlungsintensität I in Abhängigkeit von der Auslenkung des beweglichen Spiegels x . Das Ergebnis nennt man Interferogramm $I(x)$, Abbildung 7b, und ist definiert als:

$$I(x) = \int_{-\infty}^{\infty} I(\nu) \cos(2\pi x \nu) d\nu \quad (1.1)$$

Dabei stellt I : die Strahlungsintensität, x : die Auslenkung des beweglichen Spiegels und $I(\nu)$: die Intensität der monochromatischen Spektrallinie bei der Wellenzahl ν ($\nu=1/\lambda$).

Mit Hilfe der Fouriertransformation erhält man aus dem Interferogramm das Spektrum (Abbildung 7c):

$$I(\nu) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cos(2\pi x \nu) dx \quad (1.2)$$

Ein auf diese Weise berechnetes Spektrum kann praktisch nicht erhalten werden. Der Grund dafür liegt bei den diskret aufgenommenen $I(x)$ Werten und den endlichen Interferogrammweg. Deswegen sind mehrere Schritte nötig, wie Apodisation, Fouriertransformation, Zerofilling und Phasenkorrektur, um in der Praxis ein Spektrum zu erhalten.

- Das gemessene Interferogramm wird an den Enden abrupt abgebrochen, da die Auslenkung der Spiegel begrenzt ist. Daraus folgt eine instrumentelle Linienform (ILF) $\text{sinc} = \sin x / x$ mit vielen Nebenextrema (auch „Füße“ genannt). Deshalb wird die Amplitude dieser Seitenbanden durch die **Apodisation** verringert, indem das Interferogramm mit einer geeigneten Funktion (Rechteck-, Triangular-, Trapez-, Happ-Genzel- oder Blackmann-Harris-Funktion) multipliziert wird. Die Apodisationsfunktion wird an dem Punkt, bei dem die größte Intensität am Detektor gemessen wird ($x = 0$) auf „eins“ gesetzt, bei $x = L$ wird sie auf „null“ gesetzt.
- Das Interferogramm liegt in der digitalisierten Form vor. Das bedeutet, dass eine diskrete Version der **Fouriertransformation** (DFT) (s. auch Kapitel 3.2.2) angewendet werden muss. Dazu wird ein Fast Fourier Transform Algorithmus benutzt, meistens ein Cooley-Tukey-Algorithmus (Herres W., Gronholz J. (1984)) der den sonst hohen Rechenaufwand der DFT deutlich reduziert. Die Digitalisierung des IR-Interferogramms wird i.d.R. an

den Nulldurchgängen des sinusförmigen Laser-Interferogramms realisiert. Die Wellenlänge des typischer Weise benutzten HeNe-Lasers ist 632,8 nm ($1/15798$ cm) und ein Nulldurchgang ist jeweils bei $\lambda/2$ zu finden, was zur Folge hat, dass ein minimales Abtastintervall $1/31596$ cm beträgt. Aus dem Nyquist Theorem

$$\bar{\nu}_{\max} \leq \frac{1}{2\Delta x} \quad (1.3)$$

ergibt sich eine maximale Wellenzahl von 15798 cm^{-1} (entsprechend sichtbarem Licht bei 632,8 nm).

- Um eine Verbesserung der digitalen Auflösung zu erzielen, wird sogenanntes Zerofilling durchgeführt. Dabei wird die Zahl der Interferogrammpunkte zur Spektrenberechnung vergrößert, indem das Interferogramm durch Anfügen von Nullen erweitert wird. Dies führt zu einer Glättung des berechneten Spektrums. Die angehängten Nullen enthalten keine Informationen und damit haben sie keinen Einfluss auf die Auflösung des Spektrums. Durch die DFT eines gemessenen Interferogramms erhält man ein komplexes Spektrum. Durch die **Phasenkorrektur** wird aus dem komplexen Spektrum das reelle Spektrum berechnet.
- Durch die Anwendung der vorherigen Schritte bekommt man das Einkanalspektrum. Um ein **Absorptionsspektrum** (A) der zu untersuchenden Probe zu erhalten, werden die Einkanalspektren der Probe (I) und der Referenz (z.B. Puffer) (I_0) wie folgt berechnet:

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (1.4)$$

Ein FTIR-Spektrometer hat wesentliche Vorteile bei der Wellenzahlgenauigkeit, bei der höheren Empfindlichkeit und bei der Zeitersparnis gegenüber dispersiven Spektrometern.

- **CONNES-Vorteil** (Wellenzahlgenauigkeit): Durch die Benutzung des He-Ne-Lasers zur Bestimmung der Position des beweglichen Spiegels wird eine hohe Messgenauigkeit der optischen Wegdifferenz Δx erzielt. Bei der Berechnung des Spektrums ist der Abstand zwischen zwei Spektrenpunkten $\Delta \nu$ umgekehrt proportional zu Δx . Dies führt zu einer sehr präzisen Wellenzahlkalibrierung des FT-IR-Spektrometers (in der Größenordnung von $< 0,01$ cm^{-1}).
- Die FTIR-Spektroskopie nutzt bei der Bestrahlung der Probe immer den gesamten Spektralbereich. Der Einsatz von Spaltenblenden, wie bei dispersiven Spektrometern, ist nicht nötig. Dadurch wird ein höherer Strahlleistungsdurchgang gewährleistet. Dieses ist als **JAQUINOT-Vorteil** bekannt.

- Die Zeitersparnis, der **MULTIPLEX (FELLGET-) Vorteil**, wird dadurch erzielt, dass das gesamte Spektrum der infraroten Strahlungsquelle verwendet wird, was dazu führt, dass alle Wellenlängen die Probe gleichzeitig erreichen. Dieses bietet einen erheblichen Zeitvorteil gegenüber den dispersiven Spektrometern, bei denen einzelne Spektralelemente schrittweise abgetastet werden.

2.2.3 Proben-Techniken

Das Absorptionsspektrum einer homogenen Probe ist anhängig von der Konzentration der Probe, c [mol/l], und der Schichtdicke der Zelle, d [cm]. Der molare Extinktionskoeffizient, ϵ [mol⁻¹cm⁻¹], das von der Wellenlänge abhängig ist, ist für eine Probe charakteristisch. Nach dem **Lambert-Beer'schen Gesetz** ergibt sich das Absorptionsspektrum einer Probe zu

$$A(\lambda) \equiv -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1.5)$$

wobei I_0 , die Intensität der Strahlung vor der Probe und I die Intensität der Strahlung nach dem Durchgang durch die Probe darstellt. Dabei hat man die Möglichkeit die Transmission oder die Technik der abgeschwächten Totalreflexion zu benutzen (Abbildung 8), um die Absorptionsspektren aufzunehmen. Diese werden in den nächsten Kapiteln vorgestellt.

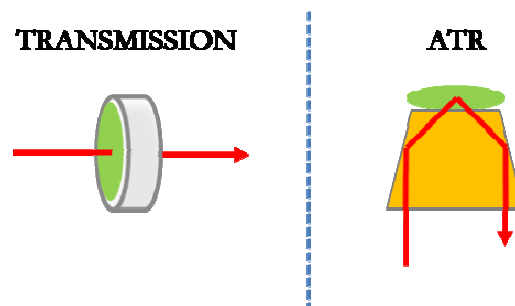


Abbildung 8: Vergleich von Transmission und abgeschwächten Totalreflexion (Pfeile zeigen in die Richtung der IR-Strahlung durch die Probe zum Detektor)

2.2.4 Transmission

Bei der Transmissionsmessung befindet sich die Probe zwischen zwei Fenstern, welche aus einem für die Infrarotstrahlung durchlässigen Material, wie Ca_2F , ZnSe und BaF_2 , hergestellt sind (Abbildung 8). Die Schichtdicke der Transmissionsküvette wird entweder durch einen Abstandsring variabler Dicke, der zwischen zwei flache Fenster gelegt wird, oder durch ein vertieftes und ein flaches Fenster definiert. Der größte Nachteil der Infrarotspektroskopie in der Messung der Proteinlösung liegt in der starken Absorption der H-O-H Biegeschwingung des Wassers bei $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ in der Amid I Region. Eine große Wasserkonzentration von 55 M und kleine Proteinkonzentration im mM oder μM Bereich haben zu Folge, dass die Transmissionsmessung der Proteine entweder in Küvetten mit kleiner Schichtdicke ($<10 \mu\text{m}$) oder in Deuteriumoxid ($^2\text{H}_2\text{O}$ oder D_2O) Puffer durchgeführt werden muss. Der Vorteil in der Benutzung des D_2O -Puffers liegt daran, dass im Gegensatz zu H_2O die D-O-D Biegeschwingung nicht die Amid I Bande überlagert. Diese absorbiert aufgrund der größeren Masse bei etwa 1210 cm^{-1} . In dieser Arbeit wurden die Experimente in der Transmission sowohl in H_2O als auch in D_2O durchgeführt, um die Stabilität des Proteins bei verschiedenen Temperaturen zu untersuchen. Diese Experimente werden näher im Kapitel 3.4 beschrieben.

2.2.5 Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)

Im Gegensatz zur Transmissionsmessung, wo der IR-Strahl durch die Probe geführt wird, basiert die Technik der abgeschwächten Totalreflexion auf der Ausbreitung des Infrarotstrahls durch ein internes Reflexionselement mit hohem Brechungsindex, das im Kontakt mit der Probe steht [23,27-30]. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich die Umgebung des Proteins zu variieren und so ihre Konformation z.B. als Funktion des pH-Werts zu untersuchen (s. dazu Kapitel 3.1).

Der Lichtstrahl tritt in ein, für die infrarote Strahlung durchsichtiges, **internes Reflexionselement** (IRE) (Abbildung 9) mit hohem Brechungsindex n_1 ein. Liegt der Einfallswinkel der infraroten Strahlung oberhalb eines Grenzwinkels $\theta_g = \sin^{-1}(n_2/n_1)$, so wird diese an der Grenzfläche von einem optisch dichteren Medium, IRE, n_1 , ins optisch dünnere Medium, der Proteinlösung, n_2 , totalreflektiert. In Folge dessen wird der Strahl, bevor es den IRE verlässt, mehrmals innerhalb diesen totalreflektiert. Nach den Maxwell'schen Gleichungen bilden sich durch Überlagerung der einfallenden und reflektierten elektromagnetischen Welle, stehenden Wellen (Gl. 1.6) aus,

$$E = 2 \cdot \cos\left(\frac{2\pi \cdot z}{\lambda_e} + \phi\right) \tag{1.6}$$

welche innerhalb des IRE, Abbildung 9a, senkrecht zu total reflektierende Oberfläche, in Richtung z, verlaufen. Dabei ist $\lambda_e = \lambda_1 / \cos\theta$, über $\lambda_1 = \lambda / n_1$ und θ , dem Einfallswinkel des Strahls, definiert, und ϕ entspricht der Phase der Welle.

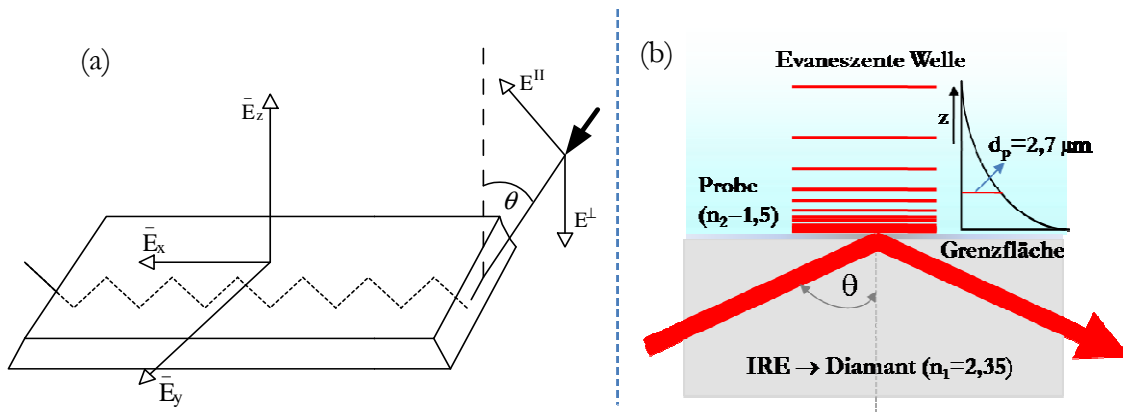


Abbildung 9: (a) Schematische Darstellung des internen Reflexionselements (IRE), der Komponenten des elektrischen Feldes und zweier möglicher Polarisationsrichtungen der einfallenden elektromagnetischen Welle nach [27]; (b) Querschnitt von Diamanten als IRE für eine Reflexion der Infrarotstrahlung und der exponentielles Abklingen der evaneszenten Welle in der Probe.

Die Amplitude des elektrischen Feldes der stehenden Welle wird beim Übergang zum optisch dünneren Medium exponentiell gedämpft (Abbildung 10):

$$E = E_0 \cdot e^{-\frac{z}{d_p}} \tag{1.7}$$

Eine solche Welle, Abbildung 9b, wird als **evaneszent** bezeichnet.

Ist das optisch dünnere Medium im entsprechenden Wellenlängenbereich absorbierend, so findet eine Intensitätsänderung des einfach bzw. mehrfach reflektierten Strahls in Abhängigkeit von der Wellenlänge statt. Der Strahl wird dann nicht mehr total reflektiert, sondern abgeschwächt. Diesen Vorgang nennt man dann entsprechend **abgeschwächte Totalreflexion** (ATR).

Die Eindringtiefe

$$d_p = \frac{\lambda_1}{2\pi(\sin^2 \theta - n_{21}^2)^{1/2}} \tag{1.8}$$

gibt an, bei welcher Tiefe die z-Komponente des elektrischen Feldes und damit auch die Intensität auf 1/e-ten Teil abgeklungen ist. Betrachtet man einen typischen ATR-Kristall, z.B. ZnSe mit einem Brechungsindex $n_2 = 2,43$ (bei $10,6 \mu\text{m}$), so ergibt sich mit einer Wellenlänge

von $5 \mu\text{m}$, einem Einfallswinkel $\theta = 45^\circ$ und einem Brechungsindex der Probe $n_1 = 1,5$, eine Eindringtiefe d_p von $2,3 \mu\text{m}$. Für einen in dieser Arbeit benutzten ATR-Kristall, den Diamanten mit $n_2 = 2,35$, beträgt die Eindringtiefe $2,7 \mu\text{m}$.

Die Wahl eines geeigneten Kristalls ist für die Absorption der IR-Strahlung durch die Probe von großer Bedeutung. Die Intensität der Absorption steht in direktem Zusammenhang mit dem Brechungsindex, dem Einfallswinkel θ und der Anzahl von Reflexionen N . Diese sind proportional zu der Länge l und umgekehrt proportional zu der Dicke d des Kristalls nach der Gleichung $N = \cot \theta (l/d)$. Der Diamant hat einen Durchmesser von 4 mm und eine Dicke von $0,25 \text{ mm}$ und steht nur von einer Seite mit der Probe im Kontakt. Daher wird die Anzahl der Reflexionen N in der oberen Gleichung durch 2 geteilt. Bei einem Einfallswinkel von ungefähr 45° würde damit die Anzahl der Reflexionen, welche die Probe erreichen, 9 betragen. Doch bei experimenteller Überprüfung wurde eine 7 -fache Reflexion gemessen.

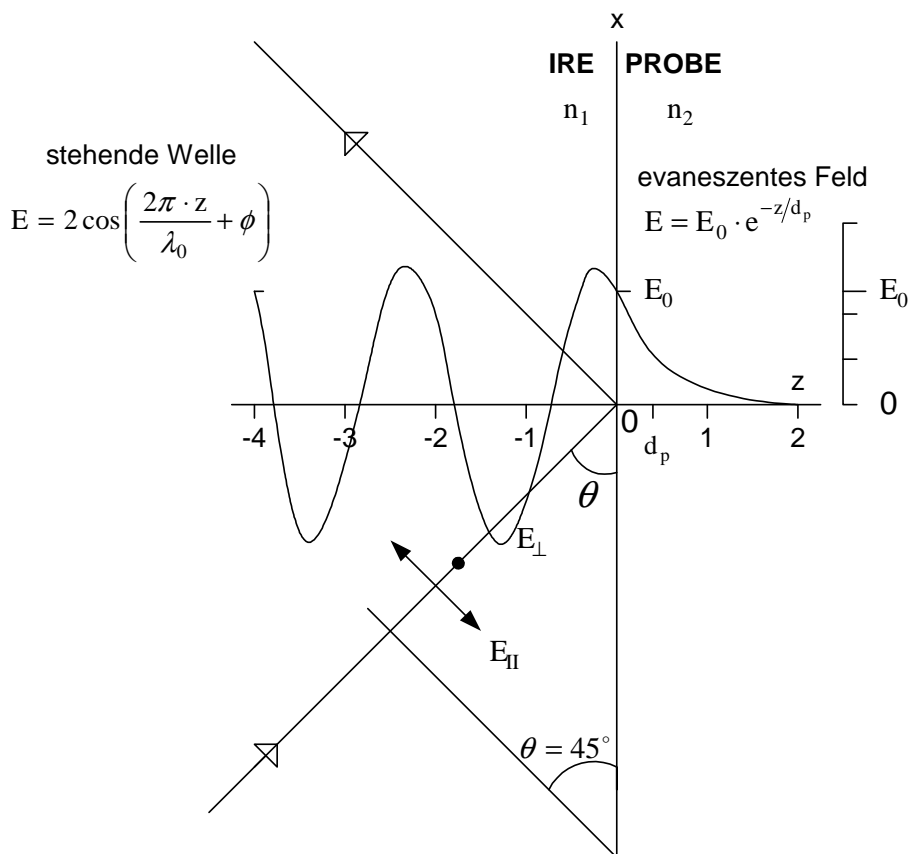


Abbildung 10: Seitenansicht des IRE mit den Details des elektrischen Feldes der elektromagnetischen Strahlung für eine Reflexion. Die stehende Welle existiert innerhalb des IRE's, wobei die evaneszente Welle außerhalb des IRE exponentiell gedämpft wird. Nach [27]

2.2.6 CD-Spektroskopie der Proteine

Die Zirkular-Dichroismus-(CD)-UV-Spektroskopie nutzt die unterschiedliche Absorption des zirkular polarisierten Lichtes mit unterschiedlichen Drehrichtungen der elektrischen und magnetischen Feldvektoren aus, um die Informationen über Sekundärstruktur der Proteine zu bekommen [31-34]. Der Zirkulardichroismus (CD) eines Moleküls ist als die Differenz zwischen den molaren Extinktionskoeffizienten für links und rechts zirkular polarisiertes Licht definiert. Damit ergibt sich nach Gl. (1.4) das CD Signal zu

$$A_L(\lambda) - A_R(\lambda) = \Delta A(\lambda) = [\epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)]cd = \Delta\epsilon(\lambda)cd \quad (1.8)$$

Statt des Unterschieds in der Absorption wird im CD-Spektrum meistens die **Elliptizität θ** in Grad in Abhängigkeit von der Wellenlänge angegeben. Die Elliptizität ist als $\theta = \arctan(b/a)$, wobei b und a die große bzw. kleine Hauptachse der Ellipse darstellen, definiert. Das Verhältnis zwischen der Elliptizität und ΔA ist gegeben durch $\theta = 32,98 \Delta A$.

Die meisten biologischen Moleküle, darunter auch Proteine, weisen eine strukturelle Asymmetrie auf, was eine notwendige Bedingung ist, um ein CD Signal des Moleküls zu beobachten. Die für die Struktur der Proteine charakteristischen Banden werden in der Fern-UV Region (175-250nm) beobachtet. Im Gegensatz zur Absorption der Infrarotstrahlung, die eine Schwingung der Peptidbindung hervorruft, werden bei der Absorption der UV Strahlung die **elektronischen Übergänge**² der Peptidbindung angeregt. In Abbildung 11 sind die elektronischen Übergänge, verursacht durch die Peptidbindung der α -Helix, dargestellt. Der energetisch am niedrigsten liegende $n \rightarrow \pi^*$ Übergang der Peptidbindung ist bei ca. 220 nm in einer schwachen breiten Bande im CD-Spektrum zu finden, dagegen kann ein stärkeres Signal, verursacht durch den $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergang, bei 190 nm beobachtet werden. Der letzte Übergang ruft außerdem eine negative Bande bei ca. 208 nm hervor. Die parallele bzw. senkrechte Richtung der Übergangsdipolmomente zur Helixachse induziert diese Aufspaltung der Helixbande im CD-

²Elektronische Übergänge können anhand der beteiligten Molekülorbitale unterschieden werden. Der Grundzustand wird durch die σ -, π - und n-Orbitale, mit zunehmender Energie, definiert. Die σ -Orbitale stellen die Einfachbindungen, die π -Orbitale die Mehrfachbindungen und n-Orbitale die freien Elektronenpaare eines Moleküls dar. Außer diesen bindenden sind auch die energetisch höher liegenden antibindenden σ^* -, π^* - Molekülorbitalen vorhanden, die durch eine Überlappung der Atomorbitale entstehen.

Spektrum. Die Struktur der α -Helix dominiert im CD-Spektrum der Proteine, dagegen sind die Signale für β -Faltblatt- und ungeordnete Struktur eher gering. Dadurch, dass die CD-Daten präzisere Informationen über den Gehalt an helikaler Struktur als IR Daten liefern, wurde die CD-Spektroskopie in dieser Arbeit als unterstützende Methode in der Sekundärstrukturanalyse von NhaA und MjNhaP1 benutzt.

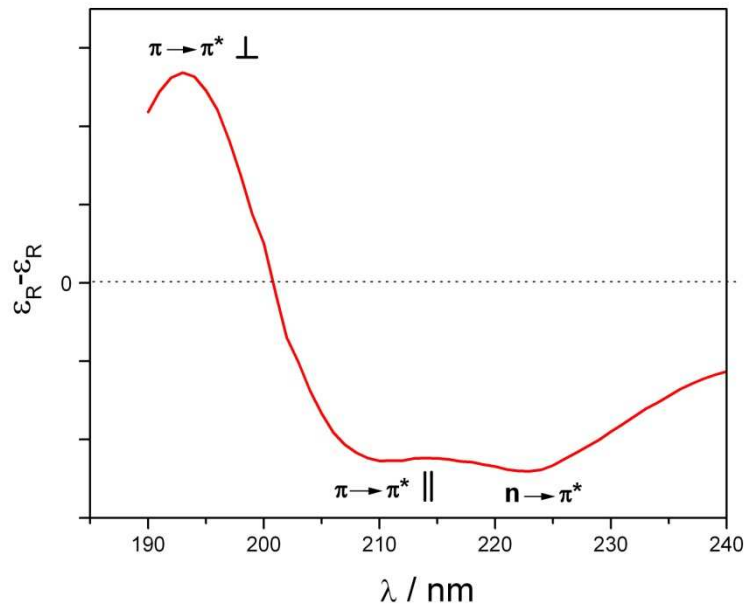


Abbildung 11: Die elektronische Übergänge der Peptidbindung einer α -Helix

Aufgrund der sehr geringen CD Signale (Elliptizität von ca. 10 mdeg; $\Delta A \sim 3 \cdot 10^{-4}$) ist die Anforderung an die Empfindlichkeit, vor allem an hohen Messlichtintensität, der CD Spektrometer hoch. Wie bei allen anderen Absorptionsspektroskopien besteht auch das CD Spektrometer aus einer Strahlquelle (starke UV-Lampe), einem Monochromator, um das Licht zu zerlegen, einer Probenkammer und dem Detektor. Zusätzlich kommt bei dem CD Spektrometer der Polarisator, der das dispergierte Licht linear polarisiert und ein elektrooptischer Modulator, der als Phasenschieber wirkt und die Erzeugung des links- und rechts-polarisierten Lichtes ermöglicht. Anschließend wird die Differenzintensität für links- und rechts-polarisiertes Licht durch einen lock-in Verstärker registriert und so das CD Signal ermittelt.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 ATR-Perfusionszelle

Ziel dieser Arbeit war unter anderem, die ATR Mikro-Perfusionszelle (Abbildung 12), die während meiner Diplomarbeit entwickelt wurde [35,36], weiter zu optimieren.

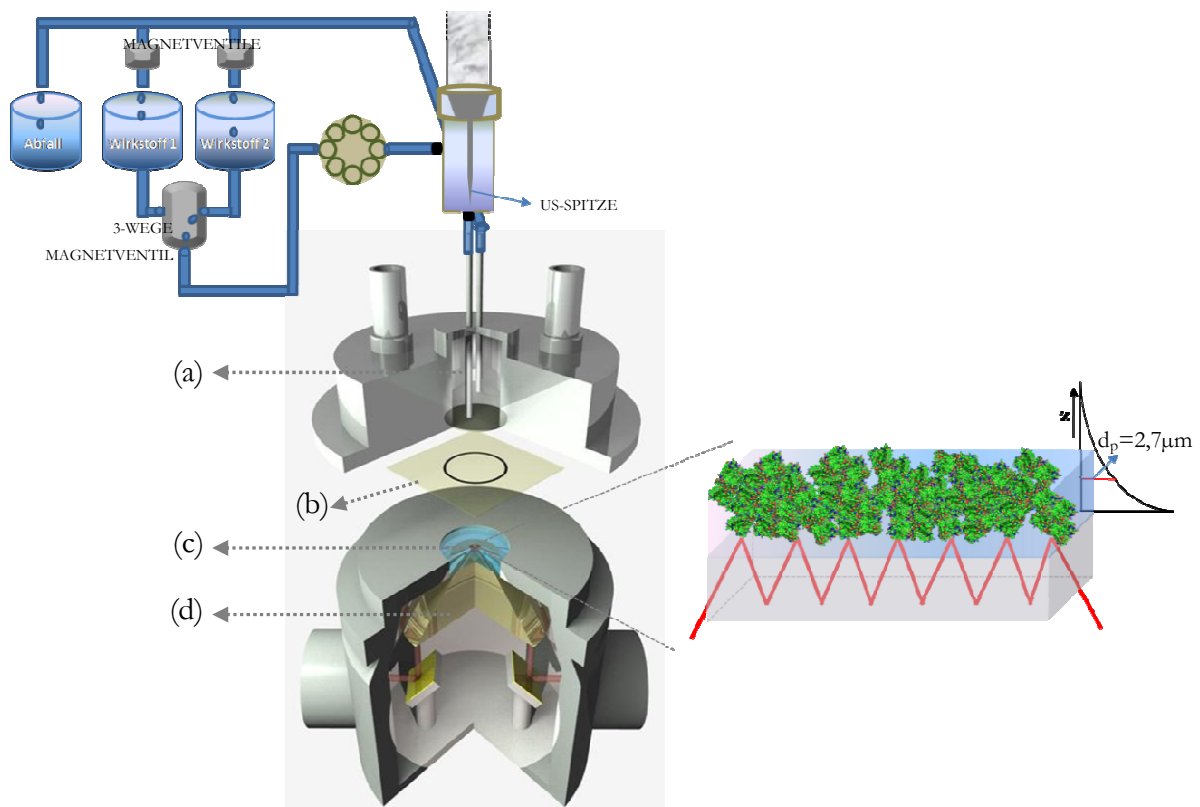


Abbildung 12: ATR-Perfusionszelle. (a) Kompartiment für die Perfusion der Wirkstoffmoleküle, (b) Dialysemembran mit Silikon O-Ring, (c) Kompartiment für das Proteintarget und (d) ZnSe-Prisma mit Diamanten als IRE für IR Strahl Führung

Für die selbstgebaute Perfusions Einheit wurde die ATR-Einheit, die einen Diamanten (Abbildung 12c) als internes Reflexionselement (s. Kapitel 2.2.5) hat, verwendet. Die Diamanten ATR-Einheit mit 7 Reflexionen (SensIR Technologies) benutzt die ZnSe-Optik (Abbildung 12d) um den IR Strahl in den Diamanten einzuleiten. Der Diamant mit einem Durchmesser von 4,3 mm steht von einer Seite mit der Proteinprobe im Kontakt. Die Perfusions Einheit (Abbildung 12a)

wird auf diese ATR-Einheit montiert und erlaubt somit die Perfusion der potentiellen Wirkstoffmoleküle über die Probe. Das gesamte System, die Perfusionszelle, ist durch eine Dialysemembran³ (Abbildung 12b) in zwei Kompartimente, für die Wirkstoffmoleküle und die Probe, unterteilt. Der Abstand der Dialysemembran von dem Diamanten wird mit Hilfe eines Silikon O-Rings gehalten und beträgt ca. 350 μm . Die Lösung des zu untersuchenden Proteins, das mit dem Diamanten im Kontakt steht, bildet zusammen mit diesem das erste Kompartiment der Perfusionszelle mit einem Volumen unter 5 μl (Abbildung 12c). Das zweite Kompartiment (Abbildung 12a) ist Bestandteil der Perfusionseinheit mit einem Volumen von 100 μl . Es wird durch eine 9 mm tiefe kreisförmige Bohrung im Inneren der Perfusionseinheit mit einem Durchmesser von 3,75 mm gebildet. Diese Kammer ermöglicht durch eine peristaltische Pumpe (Abbildung 12) (Spetec, Perimax 16 Antipuls Peristaltic Pump) regulierte Zufuhr und Abfuhr der Wirkstoffmoleküle bzw. des Puffers zu und von dem ersten Kompartiment. Ein wirksames Austauschen von verschiedenen Wirkstoffmolekülen ist durch das dicht über der Dialysemembran befindliche Abfuhr-Röhrchen (Abbildung 12a) gegeben. Die Pumpengeschwindigkeit ist regulierbar und die benutzen Schläuche haben einen Durchmesser von 1mm. Die konstante Temperatur der Perfusionseinheit wird durch das Wasserbad gewährleistet.

Die Optimierung der Perfusionszelle sollte einen schnelleren Austausch von Wirkstoffmolekülen (Verringerung der Totzeit), eine effizientere Stabilisierung des gesamten Systems (Verringerung der Konzentrationsschwankungen von der Proteinprobe), sowie eine Automatisierung der Apparatur bewirken.

Da hier die Mikrovolumina der Proteinprobe benutzt werden, ist es nicht möglich, die kleine Menge, um einen schnelleren Pufferaustausch zu erzielen, zu rühren. Eine bessere Durchmischung und schnellere Äquilibrierung (s. Kapitel 3.1.1) wurde durch den Einbau des Ultraschallkopfes (Guilin Woodpecker Medical Instrument) (Abbildung 12) bewirkt. Der Ultraschallkopf ist eine piezo-keramische Spitze und ist der Bestandteil des von Zahnärzten benutzten Ultraschall Zahnsteinentferners mit einer Frequenz von ca. 30 kHz. Es wird in einen separaten temperierbaren Behälter mit einem Volumen von 1ml eingeschraubt. Dieser ist von einer Seite mit der Zufuhr von Wirkstoffmolekülen durch die peristaltische Pumpe und von der anderen Seite mit der Perfusionseinheit durch einen ca. 5 cm langen Schlauch verbunden. Die Ausbreitung des Ultraschalls als Longitudinalwelle, die in das Perfusionssystem eingekoppelt ist,

³Die Dialysemembranen wurde aus Dialyseschläuchen (Spectra/Pore 6), welche mit verschiedenen Ausschlussgrenzen („Molecular Weight Cut Off“ – MWCO) kommerziell erhältlich ist, ausgeschnitten. Typische MWCO Werte liegen im Bereich von <1000 bis >100000 Da. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde ein MWCO von 25 kDa benutzt.

mit der Amplitude stark genug um die mikroskopische Rührung zu bewirken und schwach genug um das Protein intakt zu lassen, beschleunigt den Austauschprozess der Wirkstoffmoleküle im zweiten sowie die Homogenisierung der Proteinlösung im ersten Kompartiment der Perfusionszelle (s. Kapitel 3.1.2).

Das Einsetzen der Computer-gesteuerten 3-Wege-PTFE-Magnetventile (Novodirect) (Abbildung 12), die direkt mit der peristaltischen Pumpe verbunden sind, ermöglicht einen einfachen Wechsel zwischen verschiedenen benutzten Wirkstoffmolekülen bzw. Puffer. Dadurch wird außerdem das Entstehen der Luftblasen durch den manuellen Wechsel zwischen verschiedenen Lösungen verhindert und so ein entscheidender Beitrag zu der Stabilisierung des Systems (Konzentrationschwankungen der Proteinprobe) geleistet. Das Einsetzen von zwei weiteren 2-Wege-Magnetventilen ermöglicht einen sparsamen Umgang mit derjenigen Lösung (Wirkstoffmoleküle, Puffer), die für die Perfusion benutzt wird. Für die ganze Messprozedur wurde ein Makro für OPUS Software geschrieben und damit eine Automatisierung des Perfusionssystems ermöglicht. In den folgenden Kapiteln wird die Funktionsfähigkeit der Perfusionszelle vorgestellt.

3.1.1 Totzeitbestimmung

Eines der größten Ziele bei der Entwicklung der Perfusionszelle war es, die Totzeit d.h. die Zeitspanne zwischen dem Umschalten der Wirkstoffmoleküle am Systemeingang und deren Erreichen des Diamanten, so dass sie mit der dort befindlichen Proteinlösung in die Wechselwirkung treten können, zu reduzieren. Im Folgenden wird der Einfluss des Ultraschalls auf die Reduzierung dieser Totzeit überprüft.

Die Wirkstoffmoleküle werden mit der kleinsten Perfusionsrate von ca. 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ durch die Zelle befördert. Als Probe wurde Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl und 0,03 % DDM in H_2O und als Perfusionsflüssigkeit, die Wirkstoffmoleküle, derselbe Puffer in D_2O gewählt. Aufgrund der größeren Masse von Deuteriumoxid absorbiert die $\delta\text{D-O-D}$ bei 1208 cm^{-1} im Gegensatz zu $\delta\text{H-O-H}$ bei 1640 cm^{-1} . Hat man eine nicht reine D_2O -Lösung, sondern einen $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Gemischs, so beobachtet man im IR-Spektrum eine weitere Absorptionsbande, die durch die Biegeschwingung des $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Gemischs $\delta\text{H-O-D}$ bei 1453 cm^{-1} zustande kommt. Die drei verschiedenen Wellenzahlpositionen dieser Absorptionsbanden erlauben eine genaue Detektion der Wirkstoffmoleküle am Diamanten und damit die Totzeitbestimmung.

Es wurden zwei gleiche Versuche ohne (Abbildung 13a) und mit dem eingebauten Ultraschall (Abbildung 13b) durchgeführt. Unabhängig vom US, in beiden Fällen beginnt innerhalb von

wenigen Minuten eine Zunahme der D₂O Moleküle (▲) und gleichzeitig eine Abnahme der H₂O Moleküle (■) am Diamanten. Die H-O-D Bande (●) erreicht den maximalen Wert nach etwa 14 Minuten und mit dem eingebauten US wird dieser Wert nach nur 6 Minuten erreicht.

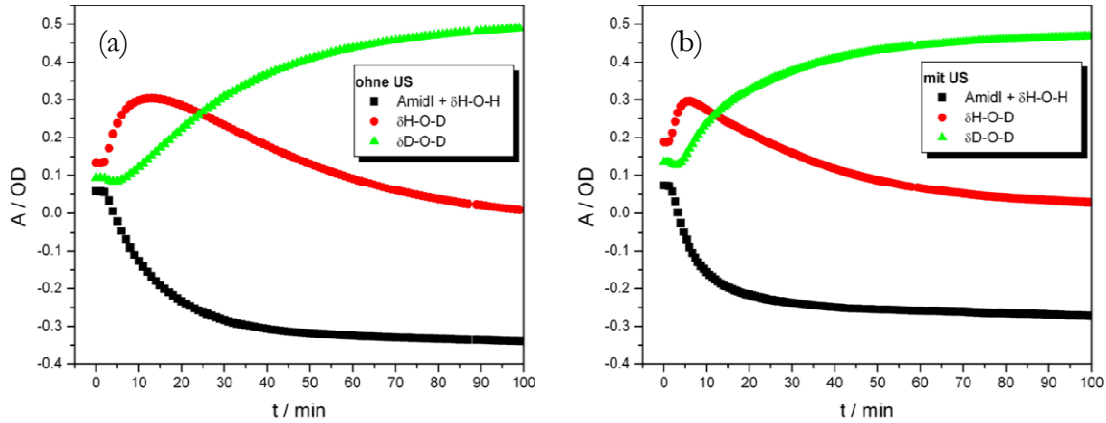


Abbildung 13: Detektion der Wirkstoffmoleküle ▲ (a) ohne Ultraschall und (b) mit dem eingebauten Ultraschall in der ATR-Perfusionszelle mit einer Perfusionsrate von ca. 100 µl/min.

In Abbildung 14 ist die zeitliche Änderung der Absorption zur Zeit t_n minus Absorption zur Zeit t_{n-1} für H-O-D (Abbildung 14a) und D-O-D (Abbildung 14b) Biegeschwingung ohne und mit US dargestellt. Hier wird nochmal deutlich, dass eine maximale Änderung der HOD Moleküle ohne US nach 6 Minuten, wobei diese mit US nach 4 Minuten erreicht ist.

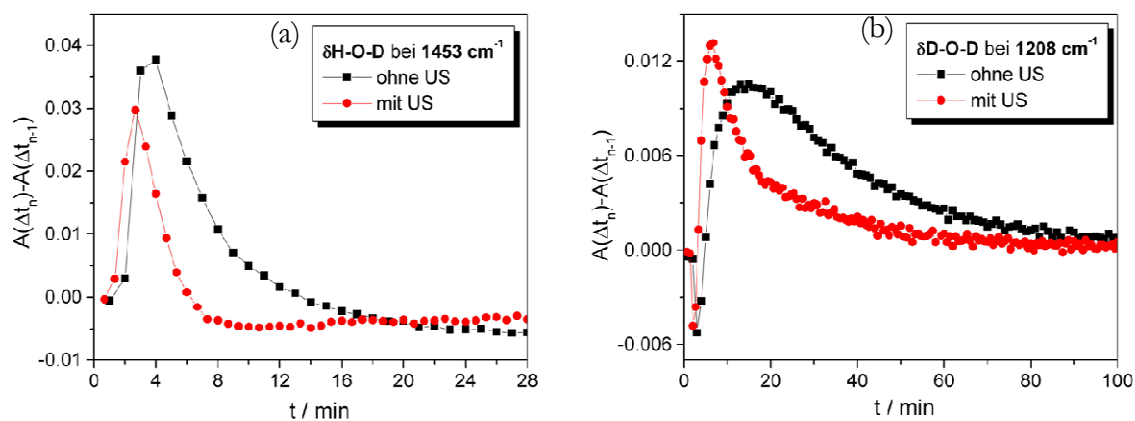


Abbildung 14: Zeitliche Änderung der Absorption (a) der HOD und (b) D2O Moleküle in der Perfusionszelle

Nach ca. 8 Minuten wird keine Absorptionsänderung in dem System mit dem US mehr beobachtet, womit ein konstanter Wert dieser Moleküle in dem Perfusionssystem erreicht ist. In dem US freien Perfusionssystem ist diese Konstanz erst nach ca. 20 Minuten erreicht.

Die zeitliche Differenz zwischen diesen zwei Perfusionssystemen wird an der Änderung der D_2O Wirkstoffmoleküle noch ausgeprägter. Die minimale Absorptionsänderung zwischen zwei zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen wird nach 40 Minuten mit dem US Perfusionssystem erreicht. Dagegen schafft der US freie Perfusionssystem diese minimale Absorptionsänderung erst eine halbe Stunde später.

Mit diesem Experiment wurde sowohl die Totzeit als auch das Gleichgewicht des Systems, d.h. die minimale Absorptionsänderung während des Perfusionsvorgangs, bestimmt. In beiden Fällen lieferte US Perfusionssystem wesentliche Zeitersparnisse. Mittels der HOD Bande konnte die Totzeit bestimmt werden. Da diese Bande nur dann beobachtet wird, wenn ein Gemisch von H_2O und D_2O Molekülen vorhanden ist, können mit Hilfe dieser Bande die ersten Wirkstoffmoleküle (D_2O) am Diamanten detektiert werden. In Abbildung 14a kann man beobachten, dass in beiden Perfusionssystemen die Totzeit nach weniger als einer Minute (0,8 Minuten in US freien und 0,5 Minuten im US Perfusionssystem) beendet ist. Die maximale Intensität der Wirkstoffmoleküle (Abbildung 14b) wird nach etwa 6 Minuten im US Perfusionssystem erreicht, das etwa doppelt so schnell ist wie im US freien System. Um Auch konstante Absorption der Wirkstoffmoleküle wird mit eingekoppeltem US schneller erzielt.

3.1.2 Einfluss des Ultraschalls auf das Gleichgewicht der Proteinprobe

Um eine Sekundärstrukturänderung des Proteins als Funktion z.B. des pH-Werts beobachten zu können, ist die Aufnahme von Differenzspektren notwendig. Das bedeutet, es wird die Differenz zwischen den Absorptionen, des Proteinzustands 1 verursacht durch die Wirkstoffmoleküle 1 und des Proteinzustands 2 verursacht durch die Wirkstoffmoleküle 2, gebildet (s. Kapitel 3.6). Die Aufnahme dieser Differenzspektren mit Hilfe der ATR-Perfusionszelle ist nur möglich, wenn vor Änderung des Systems eine hohe Stabilität der Absorption des Proteins im Zustand 1 erreicht ist. Wie schon im letzten Kapitel beschrieben, wurde eine konstante Absorption der D_2O -Lösung schneller im US Perfusionssystem erreicht. Hier soll geprüft werden, wie sich das US auf die Absorptions-Stabilität einer Proteinprobe auswirkt. Dabei werden zwei gleichen Proteinproben unter den gleichen Perfusionsbedingungen (Puffer, Perfusionsrate) ohne und mit US untersucht.

Die Absorptionsänderungen der Amid I Bande bei 1657 cm^{-1} werden als Funktion der Perfusionszeit in Abbildung 15 dargestellt. Die Differenz der Absorption nach der Zeit t_n und der Absorption nach der Zeit t_{n-1} des Perfusionsvorgangs zeigt, dass die Schwankung der Proteinkonzentration viel größer im US freien Perfusionssystem ist. Mit dem eingekoppelten US

ist kaum eine Änderung der Absorption des Proteins zu beobachten. Nach etwa 30 Minuten ist gar keine Absorptionsänderung mehr zu verzeichnen. Das bedeutet, dass das US-Perfusionssystem einen Wechsel von Wirkstoffmolekül 1 zu Wirkstoffmolekül 2 nach etwa 30 Minuten erlaubt. Dagegen tritt über das Zeitfenster der Messung keine Stabilität der Absorption des Proteins im US freien Perfusionssystem ein.

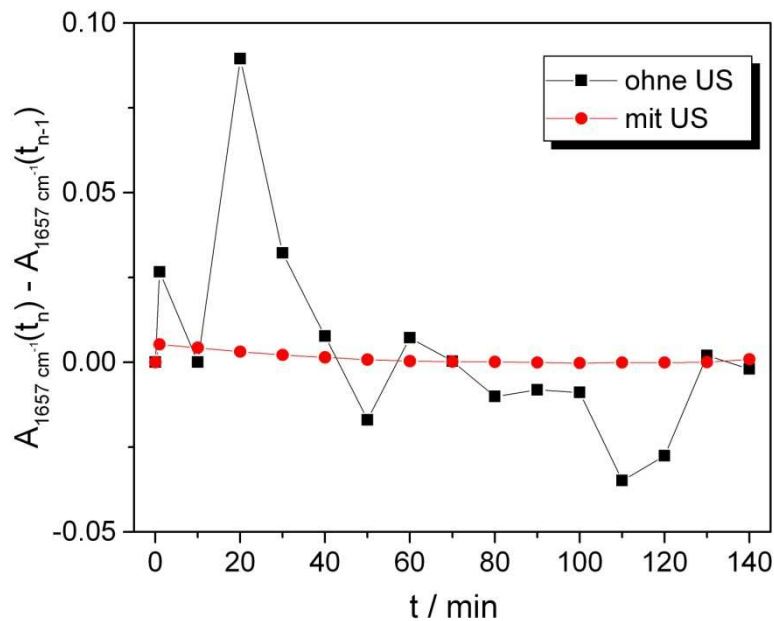


Abbildung 15: Vergleich der zeitlichen Absorptionsänderung von NhaA während des Perfusionsvorganges mit dem Puffer (pH 6,2 mit 100 mM NaCl und 0,03 % DDM) im US- und US-freien-Perfusionssystem.

Der Einbau des Ultraschalls zusammen mit der neuen Antipuls-peristaltischen Pumpe führen zusammen zu einer Wartezeitverkürzung von 60 Minuten bis zur Einstellung des Gleichgewichts im Vergleich zu dem alten Perfusionssystem [35].

3.1.3 Verschiedene Ultraschallintensitäten

Ob die verschiedenen Ultraschallintensitäten sich unterschiedlich stark auf die Absorptionsänderung auswirken, wird in diesem Kapitel untersucht. Dabei soll ermittelt werden, mit welcher US-Intensität bei gleichbleibenden Perfusionsbedingungen die minimalste Absorptionsänderung eintritt. Für dieses Experiment wird das Puffer mit 100 mM KCl und 0,03 % der DDM Detergenz als Probe benutzt. Die Absorption bzw. die Absorptionsänderung

der H-O-H Bande bei 1640 cm^{-1} wurde als Funktion des Perfusionsvorganges mit dem Puffer aufgenommen und ist in Abbildung 16 dargestellt.

Die Absorption der H-O-H Biegeschwingung ($\delta\text{H-O-H}$) bei 1640 cm^{-1} (■) nimmt innerhalb der 25 min der Perfusionszeit zu und erreicht dann einen Maximalwert. Mit einer Perfusionsrate von ca. 1 ml/min wird ein Verzug von 30 min nötig, um das Gleichgewicht der Probe in der ATR Perfusionszelle zu erreichen, bevor mit der tatsächlichen Messung begonnen werden kann.

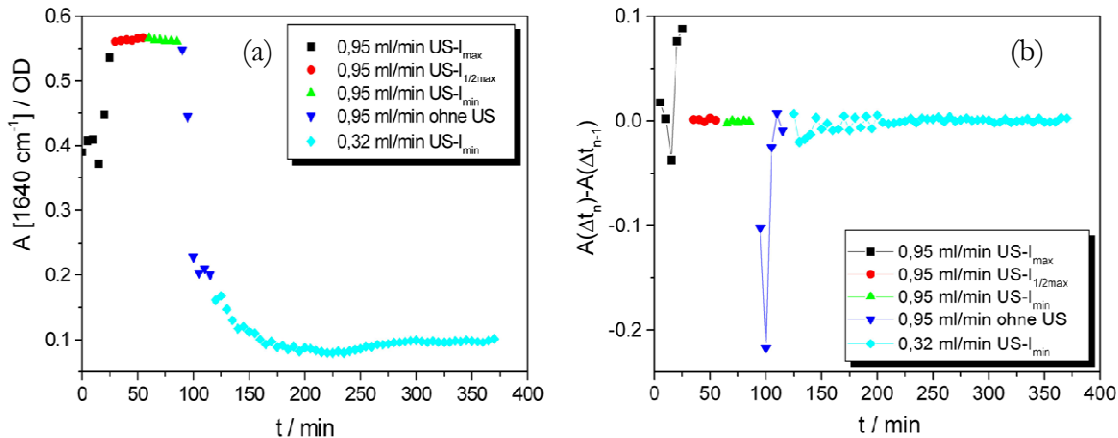


Abbildung 16: Die Absorption (a) und Absorptionsänderung (b) des Puffers in Abhängigkeit von den verschiedenen Ultraschallintensitäten während des Perfusionsvorgangs

Dieses Gleichgewicht wird nicht durch die Verringerung der US-Intensität (●, ▲) gestört, wie in Abbildung 16b gezeigt ist. Dagegen führt eine Ausschaltung von US (▼) zur Störung des Gleichgewichts, die mit einer Absorptionsabnahme verbunden ist. Eine Wiedereinschaltung des US's zusammen mit der Verringerung der Perfusionsrate (◆) führt zu der erneuten Gleichgewichtseinstellung, allerdings wird die vorherige maximale Absorption nicht mehr erreicht (Abbildung 16a). Diese Abbildungen zeigen, dass das Gleichgewicht der Probe nicht von den verschiedenen US-Intensitäten, sondern nur davon ob das US eingekoppelt oder nicht eingekoppelt im Perfusionssystem ist, abhängig ist.

3.1.4 Verschiedene Perfusionsraten

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass das Gleichgewicht einer Probe im Perfusionssystem nicht von den verschiedenen US-Intensitäten abhängig ist. Nun soll hier überprüft werden, ob das auch bei den verschiedenen Perfusionsraten der Fall ist. Für dieses Experiment wird die Proteinprobe benutzt. Diese wird mit dem Puffer einer Perfusionsgeschwindigkeit 25 Minuten

lang überspült (Abbildung 17). Die Absorptionsänderung (Abbildung 17b) zeigt, dass kein großer Einfluss der Perfusionsrate auf das Gleichgewicht der Proteinprobe in der ATR-Zelle besteht. Wie auch in den vorherigen Experimenten beobachtet, führt aber eine Ausschaltung des US's zu einer Absorptionsabnahme (◆) und damit zu der Störung des Gleichgewichts der Proteinprobe.

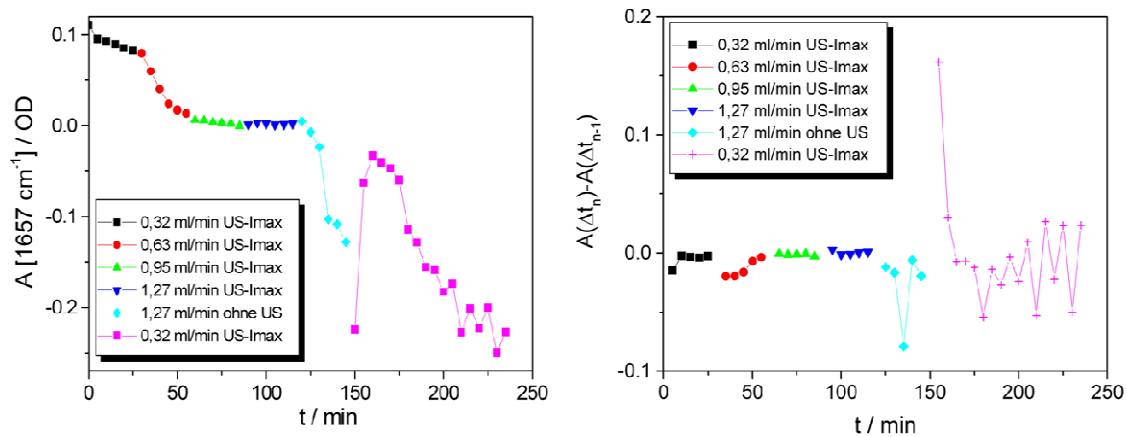


Abbildung 17: Die Absorption (a) und Absorptionsänderung (b) von NhaA in Abhängigkeit von der verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten des Puffers (pH 6,2 mit 100 mM NaCl und 0,03 % DDM).

In den vorherigen Beispielen wurde gezeigt, dass das US-Perfusionssystem im Gegensatz zum US-freien Perfusionssystem nicht nur einen schnellere Gleichgewichtseinstellung der Proteinprobe zu Folge hat, sondern auch einen schnelleren und effizienteren Austausch der Wirkstoffmolekülen garantiert, wobei diese nicht von unterschiedlichen US-Intensitäten und Perfusionsraten abhängig sind.

3.2 Sekundärstrukturanalyse mit FTIR-Spektroskopie

Die Sekundärstruktur von Na⁺/H⁺ Antiportern wurde mit der FTIR und der CD-Spektroskopie analysiert. In dem folgenden Kapitel werden die dafür benutzten Analyse-Methoden vorgestellt.

3.2.1 Die Amid I Bande im IR-Spektrum des Proteins

Das IR-Spektrum eines Proteins setzt sich aus den Schwingungen des Polypeptidrückgrats, der Aminosäureseitenketten, der möglichen Cofaktoren, sowie der Schwingungen, die durch die Umgebungshülle (Lipide, Detergenz, Puffersubstanz, Wasser) des Proteins verursacht werden, zusammen.

Wie im Kapitel 2.2.1 bereits erwähnt, wird die Amid I Bande, die sich von 1700 bis 1600 cm⁻¹ eines IR Proteinspektrums erstreckt, zur Sekundärstrukturanalyse der Proteine benutzt. Diese Bande wird hauptsächlich durch C=O Streckschwingungen des Polypeptidrückgrats induziert. In den Proteinen sind die Carbonylgruppen der Baustein der schwingenden Peptidgruppe und damit die Elemente bestimmter Sekundärstrukturen, wie α -Helix, β -Faltblatt, ungeordneter Struktur und Schleifen. Diese Oszillatoren können abhängig von ihrer Umgebung auf verschiedene Weise miteinander koppeln und damit unterschiedliche Schwingungsfrequenzen im IR-Spektrum des Proteins in der Amid I Region verursachen. Die Zuordnung bestimmter Schwingungsfrequenzen zu den verschiedenen Sekundärstrukturelementen (Tabelle 2) ist durch den Vergleich mit Referenzspektren von Proteinen und Polypeptiden mit bekannten 3D-Strukturen, sowie durch die Normalschwingungsanalyse, möglich.

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O/cm ⁻¹		Bandenposition in D ₂ O/cm ⁻¹	
	Mittel	Bereich	Mittel	Bereich
α -Helix	1654	1657-1648	1652	1660-1642
β -Faltblatt	1633	1641-1623	1630	1638-1615
	1684	1695-1674	1679	1694-1672
Schleifen	1672	1686-1662	1671	1691-1653
Ungeordnet	1654	1657-1642	1645	1654-1639

Tabelle 2: Bandenzuordnung der Amid I Bande zu den Sekundärstrukturen nach [22,23,37]

In Abbildung 18 sind zwei typische Profile der Amid I Bande dargestellt. In (a) ist NhaA als Vertreter der Proteine mit hohem α -helikalen Anteil und in (b) Porin (OmpF), das hauptsächlich aus β -Faltblatt besteht, gezeigt.

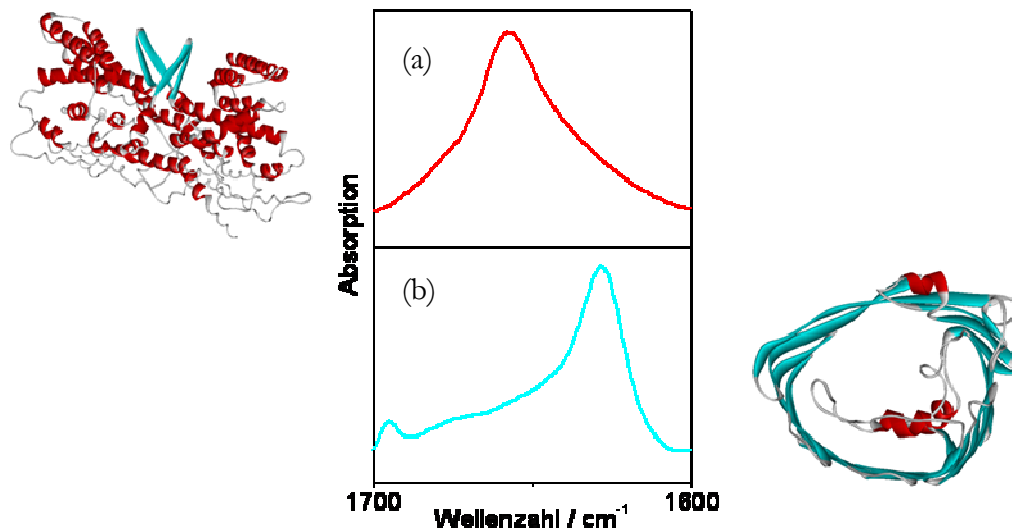


Abbildung 18: Die Amid I Bande (a) von NhaA und (b) von Porin (OmpF)

Die Halbwertsbreite und Frequenz der Amid I Bande steht im direkten Zusammenhang mit den intermolekularen Wechselwirkungen der Carbonylstreckschwingung. Dabei spielen die Effekte wie Wasserstoffbrückenbindung, Geometrie der Peptidgruppe, sowie die Übergangsdipolmomentkopplung zwischen der Carbonylschwingungen eine entscheidende Rolle [21-23,38,39].

Die **Wasserstoffbrückenbindungen** sind wichtig für die Stabilität der dreidimensionalen Proteinstruktur (siehe Kapitel 2.2.1). Die Länge und Geometrie (Abweichung von einer Geraden) dieser ist von der Sekundärstruktur des Proteins abhängig. Die Infrarotspektroskopie ist eine empfindliche Methode, um die Änderungen der Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen festzustellen. Sie hat damit einen Vorteil gegenüber der Röntgenstrukturanalyse, mit welcher die Wasserstoffatome nicht detektiert werden können.

Die Carbonylgruppe hat eine zweifache Möglichkeit zur Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung. Eine Änderung in der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung induziert eine Änderung der Elektronendichte der C=O-Bindung. Diese Veränderung der Elektronendichte wirkt sich auf die Kraftkonstante k der Carbonylstreckschwingung und damit auf die Schwingungsfrequenz aus. Je kleiner die Kraftkonstante der C=O Bindung, desto niedriger ist die Amid I Frequenz.

Eine kurze und damit starke Wasserstoffbrückenbindung ist bei β -Faltblatt Strukturen mit dem Absorptionsmaximum im Bereich von 1623 bis 1641 cm^{-1} zu finden. Aufgrund der längeren Wasserstoffbrückenbindungen und damit einer höheren Elektronendichte in den Carbonylgruppen der Peptidbindung innerhalb der α -Helix verschiebt sich das zugehörige Absorptionsmaximum der Amid I Bande im Vergleich zum β -Faltblatt zu größeren Wellenzahlen (1648 bis 1658 cm^{-1}).

Die hochfrequente β -Faltblatt-Seitenbande, die in Abbildung 18b bei Porin neben der Hauptbande bei ca. 1630 cm^{-1} bei ca. 1685 cm^{-1} zu beobachten ist, kann nicht durch diesen Effekt erklärt werden. Die Spaltung dieser Bande kommt durch die Wechselwirkung zwischen der Carbonylschwingungen zustande und wird im Folgenden detaillierter beschrieben.

Die Amid I Frequenz wird unter anderem auch durch die **Geometrie der Peptidgruppe** beeinflusst. Damit kann das Absorptionsmaximum oberhalb von 1670 cm^{-1} für die Schleifenstrukturen erklärt werden. Die Peptidgruppe der Schleifen sind planar und ihre Verzerrung verursacht eine höhere Elektronendichte in der C=O Bindung, dass in einer höheren Amid I Frequenz resultiert.

In einem Protein sind mehrere Peptidgruppen miteinander gekoppelt. Dadurch ist die Möglichkeit einer Resonanz-Wechselwirkung zwischen den schwingenden Dipolmomenten der benachbarten Carbonylgruppen gegeben. Die **Übergangsdipolmomentkopplung** (engl. transition dipole coupling, TDC) [22,40,41] wird durch die Coulombwechselwirkungen der oszillierenden Dipole der benachbarten Carbonylgruppen realisiert. Sie ist stark von der Frequenz der beiden Oszillatoren sowie von ihrer Position und ihrem Abstand zueinander abhängig. Ihre Wirkung manifestiert sich zum einen im sogenannten Excitonen-Transfer (Resonanzwechselwirkung) und zum anderen in der Excitonen-Spaltung (Bandenspaltung).

Der **Excitonen-Transfer** (Resonanzwechselwirkung) beschreibt die Delokalisierung des Anregungszustands. Das bedeutet, dass sich kein bestimmter Oszillator durch die Absorption der Energie im angeregten Zustand befindet, sondern vielmehr diese Anregungsenergie von einem zum anderen Oszillator übertragen wird. Dieses führt zu einem delokalisierten Anregungszustand, der sich über eine Länge von 8 Å erstrecken kann. Da die Schwingungen der benachbarten Carbonylgruppen mechanisch nur wenig miteinander koppeln, hat dieser Effekt keinen großen Einfluss auf die Frequenz der Amid I Bande.

Erst durch den Effekt der **Excitonen-Spaltung** (Bandenspaltung) (Abbildung 19) ist es möglich, die große Spaltung der Banden der β -Faltblatt Struktur zu erklären.

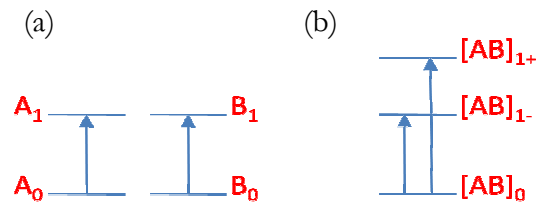


Abbildung 19: Die Energieniveaus von zwei schwingenden Oszillatoren ohne (a) und mit Wechselwirkung (b).

Die Übergangsdipolmomentkopplung verursacht eine Verschiebung der Amid I Frequenz in Abhängigkeit von der relativen Lage, dem Abstand und der relativen Phase der beiden miteinander gekoppelten schwingenden Carbonylgruppen. Je nachdem, ob die zu den koppelnden Carbonylgruppen zugehörigen Dipolmomente in der Phase oder der gegenphasig schwingen, werden zwei Anregungszustände beobachtet. Diese Aufspaltung der angeregten Energieniveaus führt zu einer Aufspaltung der Amid I Bande. Für β -Faltblatt Struktur beträgt die Differenz der aufgespaltenen Amid I Bande ca. 70 cm^{-1} . Dieser Effekt wird auch in dem CD-Spektrum der α -Helix beobachtet (s. Kapitel 2.2.6).

Damit wird die Position der Absorptionsbande einzelner Strukturelemente in der Amid I Region empfindlich gegenüber verschiedener Veränderungen, die den oben beschriebenen Effekten unterliegen. Zum Beispiel kann eine solche eine Positionsverschiebung durch die Variation der Länge der einzelnen Strukturelemente oder durch die Veränderung ihrer Umgebung induziert werden. So verschiebt sich die Hauptbande der α -Helix mit deren Längenzunahme zu kleineren Wellenzahlen. Ist diese Struktur für eine Lösung zugänglich, so wird der Wechsel von H_2O -, mit der Absorptionsmaximum im Bereich von $1650\text{-}1640 \text{ cm}^{-1}$, zur D_2O -Lösung eine Verschiebung des Maximums in den Bereich von $1640\text{-}1629 \text{ cm}^{-1}$ induzieren. Die Verwendung der D_2O - statt H_2O -Lösung ermöglicht eine Trennung zwischen ungeordneter und α -helikaler Struktur. Die ungeordnete Struktur, die in H_2O in der gleichen Region der Amid I Bande wie α -Helix absorbiert, kann durch den Wechsel zur D_2O -Lösung als separate Struktur identifiziert werden. Wie in Tabelle 4 erkennbar ist, verschiebt sich das Absorptionsmaximum der ungeordneten Struktur in D_2O -Lösung um ca. 10 cm^{-1} im Vergleich zu dem in H_2O -Lösung. Dadurch ist eine gute Unterscheidung zwischen ungeordneter und α -helikaler Struktur möglich. In Tabelle 4 sind die typischen IR Frequenzen für verschiedene Sekundärstrukturelemente für Proteinproben in H_2O und D_2O -Lösung zusammengefasst [22,23,37].

3.2.2 Analyse der Amid I Bande

Ein Protein hat aufgrund seiner Größe tausende von Schwingungsfreiheitsgraden. Dieses führt dazu, dass keine isolierte Schwingung im Spektrum beobachtet wird. Demzufolge wird die Untersuchung der Sekundärstruktur mit IR Spektroskopie auch von der Breite der Amid I Bande beeinflusst.

Die Bandenform⁴ stellt die Gesamtheit aller zu der Carbonylschwingungen beitragenden Moleküle dar und enthält außerdem die Information über die lokalen molekularen Wechselwirkungen [42]. Wie im letzten Kapitel gesehen, wird die Carbonylschwingung von der Sekundärstruktur beeinflusst. Da die Proteinstruktur nicht aus einem sondern meistens aus verschiedenen Sekundärstrukturelementen aufgebaut ist, werden sich dementsprechend die jeweiligen Bandenkomponenten in der Amid I Region überlagern. Die Trennung der im Spektrum nebeneinanderliegenden Maxima ist aufgrund der Breite der einzelnen Bandkomponenten ohne Anwendung von speziellen Auflösungsverfahren nicht möglich.

Die in dieser Arbeit benutzten Auflösungsverfahren sind die 2. und 4. Ableitungen, die Fourier Selbstentfaltung und die anschließende Kurvenanpassung, aus der sich Informationen über die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente von NhaA und MjNhaP1 bestimmen lassen, und sollen in diesem Kapitel vorgestellt werden.

Die Kurvenanpassung soll eine Zerlegung der Amid I Bande in ihre Komponenten und die Zuordnung dieser Komponenten zu den jeweiligen Sekundärstrukturelementen ermöglichen. Die Amid I Bande wurde mit der Opus Software von Bruker Optik GmbH angepasst. Um die Anpassung starten zu können, wird zuerst das Spektrum um eine Basislinie korrigiert. Die Basislinien Korrektur von dem Proteinspektrum wurde vorgenommen, indem eine grade Linie zwischen den Minima der Amid I Bande gelegt und von dieser abgezogen wurde. Zur Analyse wurden im nächsten Schritt die Anzahl und die Position der Banden in der Amid I Region benötigt. Um diese Informationen erhalten zu können, behilft man sich der Auflösungsverfahren, die unten beschrieben sind. Die weiteren gesuchten Parameter, sind die Intensität, die Breite und die Bandenform der jeweiligen Banden. Hier wird eine grobe Abschätzung eingegeben und das Programm variiert diese Parameter, bis die Differenz zwischen der originalen und angepassten Kurve minimal ist.

⁴In der Gasphase verursachen die IR-aktive Schwingungen der Moleküle eine Linienverbreiterung in Form einer Lorentz-Kurve. Im Gegensatz dazu rufen die Kollisionen der Moleküle in einer polaren, wechselwirkenden Lösung eine Linienverbreiterung, die aus einem Anteil des Lorentz- und einem Anteil des Gauß-Profiles aufgebaut sein kann, hervor. Dieses gemischte Profil wird Voigt-Profil genannt und entsteht durch die Faltung eines Lorentz-Profiles mit dem Gauß-Profil [42].

Für die Anpassung wurde ein Levenberg-Marquardt Algorithmus benutzt, der auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate basiert. Die Abweichung ist durch

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N [Y_G - y(x; S)]^2 \quad (2.1)$$

definiert, wobei χ^2 : die quadratische Abweichung; S: Parameterset; N: die Anzahl der Datenpunkte; Y_G : die gemessene Amid I Bande; y : das Anpassungsmodell ($Y_G = y(x; S)$) und x : die Frequenz darstellen.

Auch wenn die Differenz zwischen angepasster und gemessener Amid I Bande minimal ist, ist mit diesem Verfahren eine gewisse Subjektivität verbunden. Diese liegt zum einen in der Identifizierung der Komponentenanzahl mit den Auflösungsstechniken, die nicht der Anzahl der reellen Komponenten entsprechen muss, und zum anderen in der Breite der jeweiligen Komponenten. Die Begrenztheit der Auflösungsverfahren ist durch eine starke Überlappung zwischen zwei Banden gegeben. Ein direkter Vergleich mit 3D Proteinstrukturen, die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse erhalten wurden, ist manchmal erst dann möglich, wenn zusätzliche Banden in die Kurvenanpassung mit einbezogen werden.

Mit Hilfe der **2. Ableitung** ist es möglich überlappende Komponenten der Amid I Bande aufzulösen [39,43,44]. Dieses wird aufgrund der Linienbreite der 2. Ableitung einer Bande, die kleiner als die der Originalbande ist, realisierbar. Da Rauschen mit steigender Ordnung der Ableitung stärker hervortritt, können die Störsignale durch eine Glättung beseitigt werden. Zur

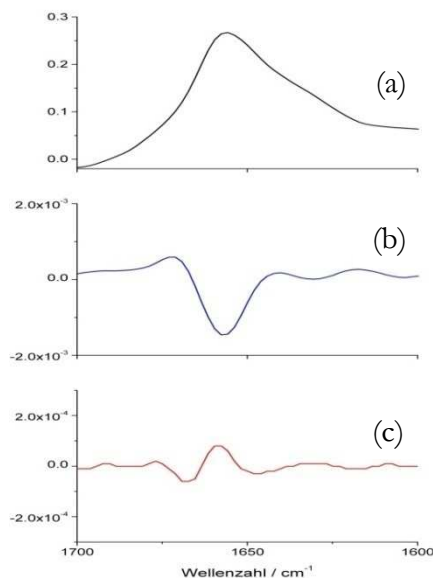


Abbildung 20: Die Amid I Bande (a) und dazugehörige 2. (b) und 4. (c) Ableitungen

Berechnung der Ableitung wurde die OPUS Software benutzt. Diese verwendet einen Savitzky-Golay Algorithmus. In diesem Fall wird das Spektrum zuerst mit einem Polynom geglättet. Die Anzahl der Punkte über die geglättet werden soll, ist frei wählbar. In dieser Arbeit wurden 9 Glättungspunkte benutzt. Anschließend wird die Ableitung des angepassten Polynoms berechnet. Die Komponenten der Amid I Bande haben in der zweiten Ableitung ein negatives, und in der 4. Ableitung ein positives Vorzeichen (Abbildung 20). Die 4. Ableitung wurde zusätzlich verwendet, da diese eine bessere Auflösung der Banden als die 2. Ableitung ermöglicht. Dadurch wurden eventuell zusätzlich vorkommende Banden in der Amid I Region detektiert [23].

Die **Fourier Selbstentfaltung** (engl. Fourier Self Deconvolution – FSD) ist eine weitere Methode, um die Auflösung der Amid I Bande zu verbessern [26,45]. Dabei soll die Breite aller Banden in einem ausgesuchten Teil des Spektrums, hier der Amid I Region, verringert werden. Um das zu erreichen, werden die Änderungen an dem zugehörigen Interferogramm vorgenommen (Abbildung 21).

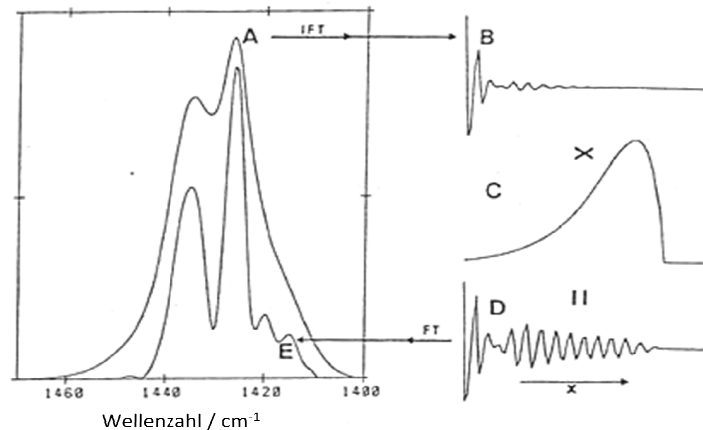


Abbildung 21: Die einzelnen Schritte der Dekonvolution, (a) Amid I Bereich der entfaltet werden soll; (b) die Anwendung der inversen FT auf das Spektrum in (a); (c) Das Produkt der monoton steigenden Exponentialfunktion mit der Dreiecksapodisationsfunktion; (d) das resultierende Interferogramm aus Multiplikation der Funktionen (b) und (c); (e) Das Ergebnis der Dekonvolution nach [46].

In dem benutzten Opus Programm der Firma Bruker Optik besteht die Möglichkeit zwischen der Gauss- oder Lorentz-Bandenform bei der FSD zu wählen. Die Bandenform der Amid I Bande kann angenähert durch die Lorentz Funktion dargestellt werden. Damit ergibt sich die Absorption $A(\nu)$ der Amid I Bande zu

$$A(\nu) = \frac{A_0 a^2}{[a^2 + (\nu - \nu_0)^2]} \quad (2.2)$$

mit A_0 als Absorptionsmaximum bei der Wellenzahl ν_0 und a als die halbe Breite auf halber Höhe (HWHH) dieser Bande. Nun wird das Spektrum in den Fourierraum zurücktransformiert. Das zugehörige Interferogramm ist definiert als

$$I(x) = F\{A(\nu)\} = \int_0^{\infty} A(\nu) \cos(2\pi\nu x) d\nu = 0,5 A_0 \cos(2\pi\nu_0 x) e^{(-2\pi a x)} \quad (2.3)$$

wobei x die Auslenkung des beweglichen Spiegels darstellt.

Eine endliche spektrale Linienbreite entspricht im Interferogramm einer gedämpften Schwingung (Abbildung 21a und b). Diese Dämpfung ist umso stärker, je breiter die Bande ist, und wird durch den exponentiellen Term in der Gleichung 2.3 beschrieben. Damit das Ziel der FSD, die

Verringerung der Breite der Amid I Bande, erreicht werden kann, muss also die Dämpfung des Interferogramms (Abbildung 21b) verringert werden. Dieses wird durch die Multiplikation des Interferogramms (Gl. 2.3) mit einer exponentiell ansteigenden Funktion ($e^{(2\pi ax)}$) (Abbildung 21c) umgesetzt. Dabei wird das Interferogramm mit einem Produkt aus der exponentiell ansteigenden Funktion mit der Blackman-Harris Apodisationsfunktion $D(x)$ (siehe auch Kapitel 2.2.2) multipliziert. Das Produkt der beiden Funktionen ist 1 bei $x = 0$ und 0 am Ende des Intervalls bei $x \geq x_T$. Durch den maximalen Wert dieses Intervalls wird die maximale Erweiterung des Interferogramms bestimmt. Damit ergibt sich das langsam abklingende Interferogramm $I'(x)$ (Abbildung 21d) zu

$$I'(x) = I(x) * e^{(2\pi ax)} * D(x) = 0,5 A_0 \cos(2\pi \nu_0 x) * D(x) \quad (2.4)$$

Die anschließende Fouriertransformation ergibt das aufgelöste Absorptionsspektrum (Abbildung 21e), in diesem Fall die Amid I Bande, das sich durch schmalere Komponenten auszeichnet. Dabei ist der Auflösungs-Verbesserungsfaktor $k = \frac{a}{a'}$ (engl.: resolution enhancement factor) als Verhältnis von HWHH des unbehandelten Absorptionsspektrums, a , zu HWHH des entfalteten Absorptionsspektrums, a' , definiert.

In dem benutzten Opus Programm besteht die Möglichkeit, entweder den Entfaltungsfaktor zusammen mit dem Faktor zur Reduzierung des Rauschens oder direkt die Breite der benutzten Lorentzfunktion zusammen mit dem Auflösungs-Verbesserungsfaktor in dem zu entfalteten Wellenzahlbereich anzugeben. Vor der Entfaltungsprozedur wurde an der Amid I Bande die Basislinien Korrektur vorgenommen, so dass die Minimalpunkte links und rechts von der Amid I Bande Null ergeben.

3.2.3 Probenpräparation

Mit diesen Methoden wurde die Sekundärstruktur sowohl für die Wildtypen als auch für die Mutanten von NhaA und NhaP in dem H_2O und in dem D_2O -Puffer analysiert. Mit Hilfe der ATR-Perfusionzelle war es möglich, eine und dieselbe Proteinprobe in H_2O und D_2O -Puffer zu untersuchen (ausführlicher in 3.5.1 beschrieben). Für die Analyse der Sekundärstruktur der Proteinprobe in D_2O wurde das Spektrum derjenigen Probe, die mehr als 20 Stunden in D_2O -Puffer war, gewählt. Damit wurde sichergestellt, dass der $^1H/^2H$ Austausch vollständig abgeschlossen war.

3.3 Sekundärstrukturanalyse mit CD-Spektroskopie

3.3.1 Das CD-Spektrum eines Proteins

Die Sekundärstrukturanalyse mit CD-Spektroskopie ist aufgrund von den elektronischen Übergängen in den Peptidbindungen des Polypeptidrückgrads möglich (Kapitel 2.2.6). Diese verursachen in verschiedenen Konformationen des Proteins unterschiedliche Absorptionen für links- und rechts-zirkular polarisiertes Licht in der Fern-UV Region. Damit repräsentiert das CD-Spektrum, genauso wie die Amid I Bande in dem IR-Spektrum, die Summe der charakteristischen Sekundärstrukturelemente in einem Protein. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 22 CD-Spektren für verschiedene ausgewählte Sekundärstrukturelemente gezeigt.

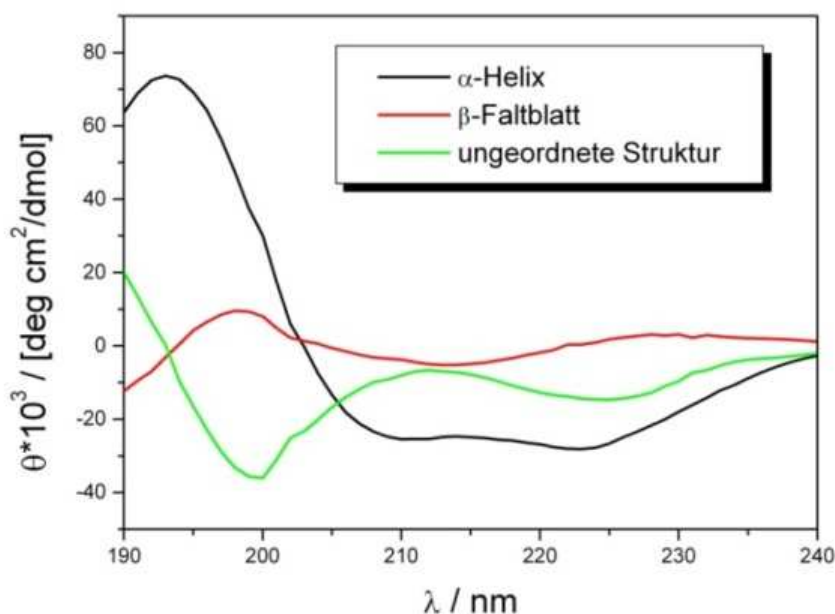


Abbildung 22: CD-Spektren von verschiedenen Sekundärstrukturelementen

Die CD Signale für β -Faltblatt und ungeordnete Struktur sind eher gering im Vergleich zu dem Signal, das durch die α -Helix verursacht wird. Die Struktur des β -Faltblattes zeigt aufgrund des $n \rightarrow \pi^*$ -Überganges ein Minimum bei ca. 215 nm, und ein Maximum bei 195 nm, das von dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang stammt. Das CD-Spektrum der ungeordneten Struktur ist genau umgekehrt zu dem des β -Faltblatts und durch ein Minimum bei 195 nm und ein Maximum bei ca. 215 nm gekennzeichnet. Im Gegensatz zu diesen beiden Proteinkonformationen beobachtet man im CD-Spektrum α -helikaler Strukturen drei charakteristische Banden. Genauso wie beim IR-Spektrum des β -Faltblatts wird im CD-Spektrum der α -Helix eine Aufspaltung der Bande

aufgrund von Excitonen-Spaltung beobachtet. Diese Aufspaltung bei 190 nm und 208 nm wird durch das Übergangsdipolmoment des $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergangs verursacht. Die negative Bande bei 222 nm entsteht durch den $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Peptidbindung zustande.

3.3.2 Analyse des CD-Spektrums

Im Gegensatz zur in dieser Arbeit benutzten Datenauswertung der Sekundärstrukturanalyse der IR-Daten beruht die Methode zur Analyse der CD-Daten auf einem Referenz-Datensatz der Proteine bekannter 3D Kristallstruktur. Die Daten wurden mit Hilfe des Online-Servers, DIHCROWEB⁵ [47], am Birkbeck Collage der Universität London, ausgewertet. Dieser Server stellt die Möglichkeit verschiedener Referenz-Datensätze sowie verschiedener Algorithmen zur Analyse der CD Proteinspektren bereit.

Die Referenz-Datensätze der Proteine unterscheiden sich zum einen im Wellenlängenbereich, in dem die Daten aufgenommen wurden, und zum anderen in der Gesamtzahl der vorhandenen Proteine in dem jeweiligen Datensatz. Die Datensätze mit den meisten Proteinen (43 Proteinproben + 5 denaturierte Proteinproben) liegen im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 240 nm. Im größten Wellenlängenbereich zwischen 178 nm und 260 nm werden in dieser Datenbank nur 29 Proteine referiert. Die Ursache für die begrenzte Datenaufnahme bei den Wellenlängen ≤ 180 nm liegt bei der in CD Spektrometer benutzten Xenon-Lichtquelle. Ihre Strahlungsintensität nimmt unterhalb dieser Wellenlänge stark ab. Der andere Störfaktor, der die Messung bei den Wellenlängen ≤ 190 nm beeinflusst, wird durch den benutzten H₂O-Puffer, indem das Protein gelöst ist, verursacht. Deswegen wurden die Proben in dieser Arbeit auch in D₂O-Lösung aufgenommen, wodurch eine Datenaufnahme bis 185 nm möglich ist.

Zur Initialisierung der Auswertung, sind einige Informationen, wie die Konzentration des Proteins, das MRW (engl. mean residue weight), das als das Verhältnis des Molekulargewichts in Da zur Gesamtanzahl der Aminosäuren des Proteins definiert ist, und die Schichtdicke der benutzten Zelle notwendig. Das MRW beträgt für NhaA 107 und für MjNhaP1 108. Die genaue Proteinkonzentration wurde mit dem kommerziell erhältlichen Lowry-Test bestimmt.

Die Auswertung der Spektren wurde für verschiedene Protein-Datensätze mit verschiedenen Auswertemethoden, wie CONTIN, SELCON3 und CDSSTR vorgenommen. Die beste Kurvenanpassung wurde mit der CDSSTR Methode erzielt [33,48]. Dieses Programm wählt aus

⁵<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>

dem Datensatz 8 Referenzproteine. Dabei werden diejenigen Proteindaten von dem Datensatz aussortiert, bei welchen die Charakteristiken nicht mit dem untersuchten Protein übereinstimmen. Das erlaubt eine große Anzahl an den Kombination und macht diese Methode außerordentlich anpassungsfähig. Die anschließende Sekundärstrukturanalyse basiert auf dem Algorithmus der Einzelwertzerlegung (engl.: singular value decomposition, SVD).

Das Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse, das man mit diesem Program erhält, entspricht dem Anteil an verschiedenen Sekundärstrukturelementen. Dabei wird zwischen weniger geordneter und geordneter α -Helix unterschieden. Der Unterschied liegt in der Länge, wobei die weniger geordnete kürzer als geordnete α -Helix ist.

Die Spektren wurden mit einem Jasco-720 CD Spektrometer aufgenommen. Für jedes aufgenommene CD-Spektrum wurden die folgenden Parameter gewählt:

- Auflösung: 0,1 nm
- Bandbreite: 1 nm
- Zeitkonstante: 0,5 s
- Geschwindigkeit: 50 nm/min
- Anzahl der Scans: 8
- Spülung mit N₂-Gas (etwa 5 l/min)

3.3.3 Probenpräparation

Genauso wie bei den IR-Messungen wurden auch mit CD-Spektroskopie die Spektren verschiedener Proteinproben aufgenommen. Es wurde sowohl in H₂O als auch in dem D₂O-Puffer vermessen. Im Gegensatz zur ATR-FTIR-Spektroskopie bestand hier keine Möglichkeit des ¹H/²H Austauschs. Damit war kein direkter Vergleich ein und derselben Proteinprobe in H₂O und D₂O-Puffer möglich.

Die Proben (s. Kapitel 3.7) wurden mit Hilfe der Microcon Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa umgepuffert.

Die Messungen wurden mit der in der CD-Spektroskopie üblichen Quarz-Zelle mit einer Schichtdicke von 0,01 cm durchgeführt. Es wurde aber auch mit der in der IR-Spektroskopie verwendeten CaF₂-Zelle mit einer 10-fach kleineren Schichtdicke gemessen. Damit war eine bessere Sauberkeit der Zelle gewährleistet, da die IR-Zelle aus zwei demontierbaren CaF₂-Fenstern (s. Kapitel 3.4.1) aufgebaut ist. Die Konzentration der Proben in der 0,01 cm Quarz-Zelle betrug ca. 1 mg/ml. Aufgrund der kleineren Schichtdicke der IR-Zelle war die

Konzentration der Proben in dieser Zelle um den Faktor 10 höher. Diese Zelle bietet den Vorteil, dass die Möglichkeit eines direkten Vergleichs der aufgenommenen CD-Daten mit IR-Daten besteht. Dieses ist aufgrund der gleichen Konzentration, die sich in einer gleichen Protein-Wasser- bzw. Protein-Protein-Wechselwirkung äußert, gegeben.

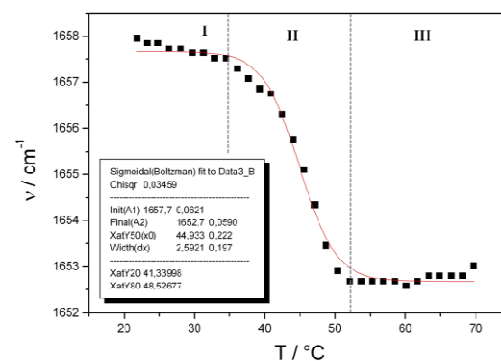
3.4 Untersuchungen der thermischen Stabilität

Die FTIR-Spektroskopie ist eine weitverbreitete Methode, um die temperaturinduzierte Faltung und Entfaltung eines Proteins zu untersuchen [49-52]. In dieser Arbeit wurde das ausgenutzt, um Konformationsänderungen in Abhängigkeit von der Temperatur zu verfolgen. Dabei wurden die Proteinspektren als Funktion der Temperatur aufgenommen. Somit war es möglich, die Stabilität des Proteins unter verschiedenen Bedingungen (s. Design des Experiments) zu analysieren. Diese Analyse gibt Informationen zur Stabilität verschiedener Sekundärstrukturelementen und erlaubt den Vergleich dieser zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins.

Für diese Studie wurde wieder die empfindlichste Bande für die Sekundärstruktur, die Amid I Bande (s. Kapitel 2.2.1), analysiert. Die Struktur der Proteine wird hauptsächlich durch die nicht-kovalenten Bindungen stabilisiert. Für die Stabilität der Sekundärstruktur sind Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich. Eine Erhöhung der Temperatur in der Proteinprobe führt zur Änderung der Bindungsstärken der Wasserstoffbrückenbindung und dadurch zur Änderung der Sekundärstruktur. Infolge dessen beobachtet man eine Änderung der Bandenpositionen und Amplituden der einzelnen Amid I Komponenten.

Dieser Effekt, der die Änderung der Schwingungsfrequenzen der Amid I Komponenten verursacht, wurde mit Hilfe der 2. Ableitung

verfolgt. Dabei wurde die Position der α -Helix bzw. β -Faltblatt Bande in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Ein Beispiel dieser Darstellung ist in Abbildung 23 gezeigt. Hier unterscheidet man zwischen drei Bereichen, dem nativen Zustand des Proteins (I), dem



Entfaltungsbereich (II) und dem Bereich des vollständig entfaltenen Proteins (III). Der

Abbildung 23: Die Verschiebung einer Amid I Komponente in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Darstellung wurde mit einer Sigmoidalkurve angepasst.

Mittelpunkt der Entfaltung, die Übergangstemperatur T_M , ist diejenige Temperatur, bei welcher die Hälfte der Proteine entfaltet ist. Die Übergangstemperatur wurde aus den temperaturabhängigen Daten mit der Boltzmann-Funktion ermittelt:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

wobei A_1 , den Wellenzahlanfangswert (links horizontale Asymptote); A_2 , den Wellenzahlendwert (rechts horizontale Asymptote); x_0 : den Mittelpunkt der Entfaltung bzw. die Übergangstemperatur und dx : die Breite des Entfaltungsübergangs darstellt.

3.4.1 Design des Temperatur-Exkursion Experiments

Um die Konformationsänderung des Proteins verfolgen zu können, wird die Proteinprobe in eine temperierbare IR-Zelle [23] gebracht. Diese Zelle besteht aus 2 für IR Strahlung durchlässigen CaF_2 -Fenstern (Abbildung 24) mit einer Schichtdicke von 10 μm .

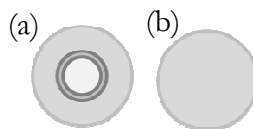


Abbildung 24: CaF_2 -Fenster. (a) vertieftes und (b) flaches CaF_2 -Fenster

Etwa 2 μl der Probe werden in den Probenraum, der durch eine Vertiefung mit einem Durchmesser von 8 mm gebildet wird, gegeben und mit Silikonöl am Rande abgedichtet. Der Probenraum war durch eine Rinne vom Rand getrennt, wodurch eine Kontamination der Probe mit Öl verhindert wird. Anschließend wird die Probe in eine, speziell an unserem Institut angefertigte, Messing-Halterung, positioniert. Die Halterung wird in ein automatisch angesteuerten Proben-Schlitten gebracht, der es erlaubt ohne die Probenkammer im Spektrometer zu öffnen, ein Referenzspektrum direkt vor der Probenmessung aufzunehmen. Somit wird die Probenkammer auch während der Messung permanent mit Trockenluft gespült. Die Messing-Halterung der Probe ist über eine Temperatursonde mit dem von dem Computer angesteuerten Wasserbad verbunden. Ein in unserem Institut entwickeltes, in dem Opus Programm geschriebenes, Makro erlaubte die Automatisierung der Messung. Dabei wurden nach Einstellung des Temperaturgleichgewichts das Referenzspektrum, das in diesem Fall Luft war, und das Probenspektrum bei einer Temperatur gemessen. Das Makro speichert sowohl den Anfangs- als auch den End-Temperaturwert, um damit die Temperaturstabilität während der Messung kontrollieren zu können.

Die Messung wurde in der Transmission mit einem Infrarotspektrometer Typs Bruker Vektor 22, ausgestattet mit einem pyroelektrischem DTGS (deuteriertes Triglycinsulfat) Detektor, durchgeführt. Für jede Messung wurden 128 Scans bei 4 cm^{-1} Auflösung aufgenommen. Die Temperaturrampe wurde in $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - bzw $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Schritten durchgeführt.

Genauso wie bei der Probenvorbereitung für die Messung mit dem CD Spektrometer wurden die Proben für die Stabilitätsmessung mit FTIR-Spektrometer in den Microcon Zentrifugen-Filtereinheiten in den gewünschten H_2O bzw. D_2O -Puffer umgepuffert. Die Konzentration der Proben betrug etwa 1 mM , was etwa 40 mg/ml entspricht. Das Volumen einer Probe liegt hier bei etwa $2\text{ }\mu\text{l}$.

3.5 Flexibilitätsuntersuchungen mit Hilfe des $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausches

Die Amid I Bande gibt Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben wurde, wieder. Dagegen erlaubt die Analyse der Amid II Bande Einblicke in die Tertiärstruktur des Proteins. Dieses wird mit Hilfe des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches an den Amid Protonen möglich.

In der Proteinstruktur sind die Wasserstoffatome weit verbreitet. Sie sind die Bauatome der Peptidgruppe (NH) und gehen an den polaren Gruppen der Seitenkette die Bindungen zu den Stickstoff und Sauerstoff Atomen (-OH, NH_2 ---) ein. Es findet ein ständiger Austausch dieser Protonen mit denen in der umgebenden Lösung statt. Deswegen kann eine Untersuchung der Eigenschaften der Wasserstoffatome an diesen Positionen, die Informationen über die Proteinstruktur, ihre Flexibilität und die strukturellen Änderungen liefern [53,54]. Die Austauschrate der Protonen (^1H) der Peptidgruppe und der Seitenkette ist abhängig von den Eigenschaften der umgebenden Lösung, dem pH-Wert⁶, der Temperatur sowie von der Struktur des Proteins. Der schnellste Austausch wird bei denjenigen Gruppen beobachtet, die direkt der Lösung ausgesetzt sind. Der Austausch der Protonen mit der umgebenden Lösung der ungeordneten Struktur wird schneller erfolgen als der Protonenaustausch der geordneter

⁶Die Austauschrate k der frei zugänglichen Protonen ist definiert durch $k = k_0 + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-] + k_{\text{H}}[\text{H}^+]$. Der schnellst mögliche Austausch ist durch die Diffusionskonstante ($\sim 10^{-10}\text{ 1/s}$) festgelegt. Die Geschwindigkeitskonstanten der Peptidgruppe liegen etwa für k_{OH} bei $10^7\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und für k_{H} bei $10^{-1}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Damit wird der Austausch bei pH 7 hauptsächlich durch die Katalyse der OH- Ionen bedingt [55].

Strukturen α -Helix und β -Faltblatt. Dabei spielen die Faktoren wie die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung, die Lösungszugänglichkeit und räumliche Anordnung des Proteins eine Rolle. In einem geschlossenen Zustand des Proteins sind die Amid Protonen vor einem Austausch geschützt. Wird ein Übergang des Proteins vom geschlossenen zum offenen Zustand durch die Änderung der Proteinumgebung induziert, so werden durch diesen offenen Zustand mehrere Amidprotonen der Lösung exponiert. Durch den somit interpretierten $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch können Rückschlüsse auf die Änderung der Tertiärstruktur gezogen werden.

Im IR-Spektrum des Proteins in H_2O -Lösung absorbiert die Amid II Bande in der Region von 1600 bis 1500 cm^{-1} mit dem Absorptionsmaximum bei ca. 1545 cm^{-1} . Diese Bande setzt sich zu etwa 60 % aus der N-H Biegeschwingungen und zu etwa 40 % aus der C-N-H Streckschwingung der Peptidgruppe zusammen. Auch die C-C Streckschwingung der Peptidgruppe ($\sim 10\%$) tragen zur Absorption der Amid II Bande bei. Wird ^1H in der Lösung, die das Protein umgibt, durch ^2H ausgetauscht, so verursacht die Deuterierung eine Änderung der Frequenzen der N-H- zur N-D-Biegeschwingung und der C-N-H- zur C-N-D-Streckschwingung. Diese Schwingungen absorbieren aber nicht mehr im Wellenzahlbereich der Amid II Bande ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), sondern werden aufgrund der größeren Masse zu kleineren Wellenzahlen verschoben und bilden die Amid II' Bande ($\sim 1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$) (Abbildung 25a). Die Aufnahme der IR-Spektren in Abhängigkeit von der Zeit der Deuterierung erlaubt es, die Austauschbarkeit der Amid ^1H zu beobachten. In Abbildung 25b sind die typischen IR Frequenzen, die eine Deuterierung in der Peptidgruppe des Proteins verursacht, schematisch dargestellt.

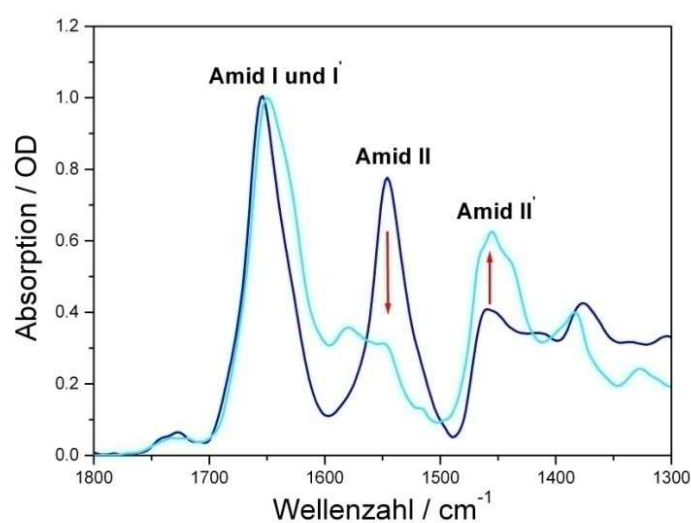


Abbildung 25a: IR-Spektren des Proteins vor (—) und nach (—) dem $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von NhaA bei pH/pD 8 mit 100 mM NaCl.

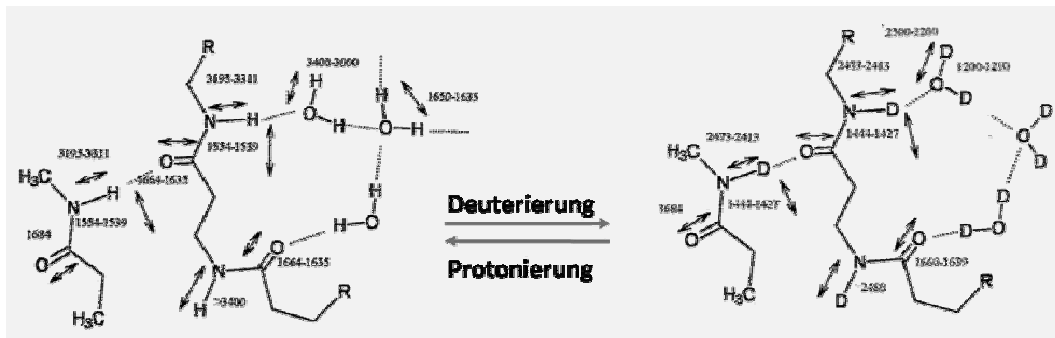


Abbildung 25b: Schematische Darstellung des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Prozesses in der Peptidgruppe nach [56].

Die Intensität der Amid I Bande der IR-Spektren in Abbildung 25a wurde auf eins normiert. Dabei ist zu erkennen, dass der Effekt des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches nicht nur eine Verschiebung der Amid II Bande zu Folge hat, sondern auch einen Einfluss auf die Frequenz der Amid I Bande. Die Verschiebung der Amid I Bande um 5 cm^{-1} bis 10 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen (Amid I') ist auf die Sekundärstrukturelemente, die für die Lösung zugänglich sind, zurückzuführen. Um zwischen den Sekundärstrukturelementen unterscheiden zu können, besonders zwischen ungeordneter Struktur und α -Helix, wird die zeitabhängige Verschiebung ihrer Banden bei der Deuterierung untersucht. Wie oben beschrieben wurde, hat die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung einen Einfluss auf die Flexibilität und damit auf die Austauschbarkeit des Proteins. Proteinregionen mit einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung werden langsamer austauschen als diejenigen mit einer schwächeren Wasserstoffbrückenbindung. Deswegen ermöglicht eine genaue Analyse der Amid I und Amid I' Bande eine Unterscheidung zwischen ungeordneter Struktur und α -Helix. Das kann jedoch nicht erreicht werden, wenn die Proteinproben nur in H_2O -Lösung untersucht werden (s. Kapitel 2.2.1).

3.5.1 Design des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Experiments

Die Experimente zum $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch wurden mit Hilfe der ATR-Perfusionszelle (s. Kapitel 3.1) durchgeführt.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben (s. Kapitel 3.7) befanden sich aufgrund der Probenpräparation in einem Natriumcitratpuffer pH 4. Für die hier durchgeführten Messungen wurde aber ein Kaliumphosphatpuffer benötigt, da dieser im Gegensatz zu Natriumcitratpuffer keine Absorptionsbanden im Amid I und Amid II Bereich aufweist. Aus diesem Grunde wurde in der Perfusionszelle zuerst der Natriumcitratpuffer mit pH 4 durch einen Kaliumphosphatpuffer mit dem gewünschtem pH Wert ausgetauscht.

Bevor das Experiment gestartet wurde, wurde das Referenz-Einkanalspektrum vom leeren ATR-Diamanten aufgenommen. Die Proteinprobe wurde dann auf den ATR-Diamanten pipettiert. Anschließend wurde die ATR-Perfusionseinheit auf den Diamanten, wie in dem Kapitel 3.7 beschrieben wurde, montiert. Das Gleichgewicht der Probe in der ATR-Perfusionszelle wurde durch den kontinuierlichen Perfusionsvorgang mit dem gewünschten Kaliumphosphatpuffer in H₂O erzielt. Die Gleichgewichtseinstellung im Perfusionsystem wurde durch die Aufnahme der Absorptionsspektren verfolgt. Um den D₂O-Kaliumphosphatpuffer über das Protein zirkulieren zu lassen, musste zuerst der H₂O-Kaliumphosphatpuffer vollständig durch D₂O-Kaliumphosphatpuffer mit übereinstimmendem pD Wert (pD=pH+0,41) [57] ausgetauscht werden. Bei diesem Vorgang von ca. 30 Minuten wurden 13 ml D₂O-Puffer durch die Perfusionszelle gespült. Danach wurden 2 ml von dem restlichen D₂O-Puffer über das Protein perfundieren lassen.

Die Spektren wurden in den ersten 120 Minuten des Perfusionsvorgangs alle 40 s mit 32 Scans aufgenommen. Danach erfolgte die Aufnahme der Spektren alle 10 min mit 256 Scans bei einer Auflösung von 2 cm⁻¹.

3.5.2 Die Korrektur der ¹H/²H Spektren

Um die Analyse der ¹H/²H Austauschpektren durchführen zu können, müssen diese zuerst mit dem Puffer korrigiert werden. Zum einen ist es die H-O-H Biegeschwingung des Wassers, die bei der Amid I/I' Bande überlappt und zum anderen die H-O-D Biegeschwingung der HOD Moleküle, die sich zum Teil über die Region der Amid II und vollständig über die der Amid II' Bande erstreckt (Abbildung 26) und damit die Analyse der Spektren erschwert.

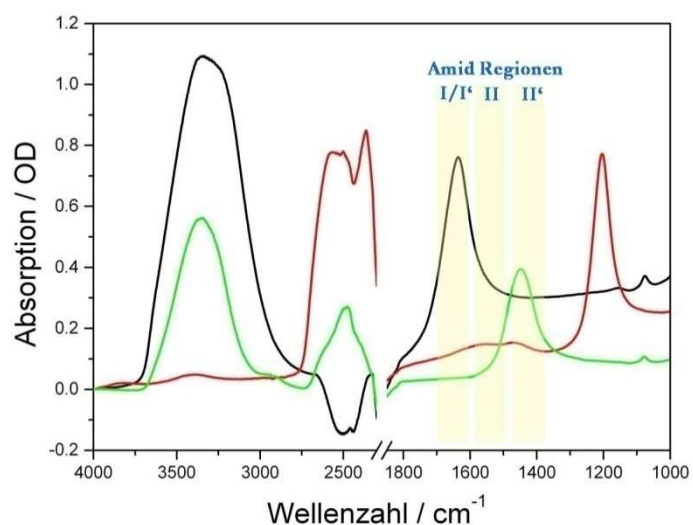


Abbildung 26: Die gemessenen ATR-IR-Spektren von H₂O (schwarz), D₂O (rot) und HOD (grün) Puffer und ihre Absorptionen in Amid Regionen (Bereich in dem ATR-Diamant Lichtundurchlässig ist, ist ausgelassen).

Als erstes werden alle Spektren bei 3999 cm^{-1} , wo keine Absorption der untersuchten Proben auftritt, normiert. Um den Gehalt an H_2O und D_2O Molekülen in der Proteinprobe berechnen zu können, wird das Proteinspektrum vor dem Deuterierungsprozess (die Proteinprobe ist zu 100 % von H_2O Molekülen umgeben) und das Proteinspektrum mit einer maximalen Deuterierung während des Experiments (die Proteinprobe ist nahe zu vollständig zu 100% von D_2O Molekülen umgeben) benutzt. Alle Proteinspektren wurden im Wellenzahlbereich von 3725 cm^{-1} bis 3625 cm^{-1} , um den Gehalt an H_2O Molekülen⁷ und im Bereich von 1225 bis 1175 cm^{-1} , um den Gehalt an D_2O Molekülen⁸ zu berechnen, integriert.

Die notwendigen Subtraktionskoeffizienten „a“ für das Wasser (H_2O), „b“ für das schweres Wasser (D_2O) und „c“ für HOD sind mit Hilfe der Gleichungen 2-5 und 2-6 berechnet worden:

$$a \cdot \text{H}_2\text{O} + b \cdot \text{D}_2\text{O} + c \cdot \text{HOD} = 1 \quad (2-5)$$

$$a = \frac{[S]_{3625}^{3725} - [D]_{3625}^{3725}}{[H]_{3625}^{3725} - [D]_{3625}^{3725}}; \quad b = \frac{[S]_{1175}^{1225} - [H]_{1175}^{1225}}{[D]_{1175}^{1225} - [H]_{1175}^{1225}}; \quad c = 1 - a - b \quad (2-6)$$

wobei S: das Spektrum des Protein ist, welches korrigiert werden soll; H: das Spektrum des Proteins ist, in dem sich die Proteine in 100%-igem H_2O -Puffer befinden und D: das entsprechende Spektrum in D_2O -Puffer ist. Die Gleichung 2-5 stellt die Zusammensetzung des Puffers in der Proteinprobe zu jeder gegebenen Zeit dar. Bei dem Beginn des Experiments zum Deuterierungszeitpunkt Null betragen die Koeffizienten „b“ und „c“ Null, da das Protein nur von den H_2O Molekülen des Puffers umgeben ist. Am Ende des Deuterierungsprozesses ist das Protein vollständig in dem D_2O -Puffer gelöst und dementsprechend sind die Koeffizienten „a“ und „c“ Null.

Zur Bestimmung der Koeffizienten wurde ein Makro im Opus Programm entwickelt, wodurch sich anschließend die Proteinspektren von ihren jeweiligen Pufferkomponenten trennen lassen.

⁷Spektraler Bereich der OH-Streckschwingung

⁸Spektraler Bereich der OD-Biegeschwingung

3.5.3 Analyse der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Spektren

Die zeitabhängige Aufnahme der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Spektren liefert Informationen über die austauschbaren Amid-Protonen. Durch deren Wechselwirkungen können die Eigenschaften von Struktur, Flexibilität und strukturellen Änderungen in einem Protein untersucht werden. Die Bereiche des Proteins, die für ein Lösungsmittel zugänglich sind, nämlich nach außen exponierte Seitenketten und unstabilen Proteinregionen werden schnell die Amid Protonen (^1H) austauschen. Dagegen werden die Bereiche in den hydrophoben Regionen, mit starken Wasserstoffbrückenbindungen nur sehr langsam Protonen austauschen. Die Proteinregionen können in vier verschiedene Klassen bezüglich der Austauschgeschwindigkeit unterteilt werden [58]. Diese vier Klassen repräsentieren verschiedene Sekundärstrukturelemente. Die Geschwindigkeit des Austausches nimmt in der folgenden Reihenfolge ab: ungeordnete Struktur, Schleifen, α -Helix und β -Faltblatt. Die durch den NH zu ND Austausch verursachte Intensitätsabnahme der Amid II Bande ist ein Maß für die Zugänglichkeit des Proteins für die Lösung. Damit kann die Information über die Anzahl der ausgetauschten Amid Protonen, direkt über die Integration der Amid II Bande gewonnen werden. Um eventuelle Konzentrationsschwankungen in der Probe zu berücksichtigen, wurde die Amid I Bande zur Normierung der Spektren benutzt. Die Basislinie für die Integration wurde nach der Methode der kleinsten Fehler Quadrate durch die vier Punkte, die außerhalb des Integrationsbereiches liegen, für eine Parabel angepasst. Die Integration erfolgte für die Amid I Bande im Bereich von 1700 bis 1600 cm^{-1} und für die Amid II Bande von 1600 bis 1500 cm^{-1} .

Die Daten werden als der Anteil der übriggebliebenen Amid Protonen (^1H) (Amid II/Amid I) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die dadurch erhaltene zeitabhängige Austauschkurve $H(t)$ kann durch die Summe der Exponentialkurven, die verschiedene Klassen A_j der Amid-Gruppen repräsentieren, angepasst werden:

$$H(t) = \sum_{j=1}^M A_j e^{-k_j t}$$

Das Ziel dieser Analyse ist die Anzahl der Exponentialkomponenten M , ihre Amplituden A_j und die dazugehörigen Abklingraten k_j zu bestimmen. Diese Annäherung lieferte jedoch keine Ergebnisse mit eindeutiger physikalischer Bedeutung [55,59]. Eine andere verwendete Annäherungsmethode ersetzt die Summe für $H(t)$ durch das Integral:

$$H(t) = \int_0^{\infty} f(k) e^{-kt} dk \equiv L\{f(k)\}$$

Der Vorteil dieser Annäherung ist, dass die Anwendung der inversen Laplace Transformation an die experimentellen Daten das Verteilungsprofil $f(k)$ der Abklingraten k liefert:

$$f(k) = L^{-1}\{H(t)\}$$

Die Laplace Transformation kann analytisch oder numerisch gelöst werden. In dieser Arbeit wurde das CONTIN Programm von Provencher [60] benutzt, mit dem sich das Problem numerisch lösen lässt.

3.6 Differenzspektren

Mit Hilfe von IR-Spektren können Eigenschaften wie die Bindung eines Wirkstoffmoleküls, die dadurch verursachten Konformationsänderungen und die Effekte der Bindung auf spezifische Aminosäuren untersucht werden. Auch Änderungen der Umgebung, wie z.B. eine Änderung des pH-Werts eines Puffers, verursachen Sekundärstrukturänderungen im Protein, die infrarotspektroskopisch verfolgt werden können.

Das IR Absorptionsspektrum ist durch mehrere sich überlappende Banden gekennzeichnet. Damit kann eine kleine, durch die Effektmoleküle induzierte Veränderung im Protein nicht im Absorptionsspektrum beobachtet werden. Um die eindeutigen molekularen Signaturen erhalten zu können, müssen reaktionsinduzierte Differenzspektren aufgenommen werden. Im Differenzspektrum des Proteins werden dann nur die Gruppen zu beobachten sein, die durch die Änderung des Zustands des Proteins beeinflusst worden sind. Im Prinzip kann so ein Differenzspektrum auch durch die Subtraktion des Absorptionsspektrums der Proteinprobe im Zustand A mit dem Absorptionsspektrum der Proteinprobe im Zustand B erhalten werden. Doch müssen diese Absorptionsspektren, da sie von zwei verschiedenen Proteinproben stammen, zuerst mit dem Puffer korrigiert und mit der Konzentration und der Schichtdicke normiert werden, um dann miteinander verrechnet werden zu können. Deshalb sind die Methoden gefragt, die es erlauben, eine Proteinreaktion mit ein und derselben Proteinprobe zu starten.

Die IR Spektroskopie bietet verschiedene Möglichkeiten eine Proteinreaktion auf einer Proteinprobe zu starten und damit die Differenzspektren aufzunehmen [21-23,61]. In dieser Arbeit wurde eine ATR-Perfusionszelle (s. Kapitel 3.1) benutzt, um die Proteinreaktion *in situ* zu induzieren durch Variation der das Protein umgebenden Lösung.

Dabei wurden die Differenzspektren von den untersuchten Na^+/H^+ Antiporter und ihren Mutanten bei verschiedenen pH-Werten, die entweder den inaktiven oder aktiven Zustand des Proteins repräsentieren (s. Kapitel 2.1.4), aufgenommen. Auch der Einfluss der verschiedenen Ionen (Na^+ , K^+ und Li^+) und Inhibitors (im Falle von NhaA) auf das Protein wurde untersucht. Die Differenzspektren wurden auch in D_2O -Puffer aufgenommen.

3.6.1 Design des Experiments zur Aufnahme von Differenzspektren

Wie schon im Kapitel 3.5.1 beschrieben, befanden sich alle in dieser Arbeit untersuchten Proben (Kapitel 3.7) aufgrund der Probenpräparation in einem Natriumcitratpuffer pH 4. Dieser wurde zuerst durch einen Kaliumphosphatpuffer ausgetauscht, da dieser im Gegensatz zu Natriumcitratpuffer keine Absorptionsbanden im Bereich der Amid I und Amid II Bande aufweist.

Nachdem der Natriumcitratpuffer vollständig durch Kaliumphosphatpuffer ausgetauscht wurde, ist eine Gleichgewichtseinstellung der Proteinprobe notwendig, bevor die Differenzspektren aufgenommen werden können. Das bedeutet, dass sich die Absorption der Proteinprobe bei gleichbleibenden Perfusionsbedingungen nicht ändern darf. Wenn diese Bedingung erfüllt ist, kann mit der Aufnahme der Differenzspektren begonnen werden. Dabei sieht das Schema zur Aufnahme der Differenzspektren mit der ATR-Perfusionszelle wie folgt aus:

1. Gleichgewichtseinstellung der Proteinprobe bei der Perfusion mit Puffer 1
2. Aufnahme der Referenz – Proteinprobe im Puffer 1 (Zustand A)
3. Beginn des Perfusionsvorgangs mit Puffer 2 (Zustand B)
4. Aufnahme der Differenzspektren – Protein im Zustand B minus Protein im Zustand A

Ein Beispiel einer solchen Messung ist die pH-induzierte Konformationsänderung von NhaA. Eine Erhöhung des pH-Werts (von pH 7 auf pH 8) führt zu der Aktivierung dieses Proteins. Bei pH 7 befindet er sich im inaktiven Zustand. Eines der Ziele dieser Arbeit war es die Konformationsänderungen, die die pH-induzierte Aktivierung des Proteins begleiten, zu untersuchen. Dabei wurden die Differenzspektren der Inaktivierung (inaktiv-minus-aktiv) und die Differenzspektren der Aktivierung (aktiv-minus-inaktiv) aufgenommen. Um die Differenzspektren der Inaktivierung zu erhalten, wurde nach obigem Schema als Puffer 1, der Phosphatpuffer bei pH 8, und als Puffer 2, das Phosphatpuffer bei pH 7 gewählt.

3.7 Proteinproben

Die integralen Membranproteine werden aus der Lipiddoppelschicht der Membran mit Hilfe von Detergenzien herausgelöst.

Detergenzien sind Tenside, amphiphile Moleküle, d.h., sie haben sowohl einen hydrophoben Teil als auch einen hydrophilen Teil. Sie sind so ausgebildet, dass sie eine Selbstorganisation erlauben. Oberhalb einer bestimmten Konzentration bilden sie in wässriger Umgebung Mizellen, kugelförmige Strukturen, um die hydrophoben Ketten vor Wasser zu schützen. Unterhalb dieser Konzentration, der sogenannten „Kritischen Mizellenkonzentration“ (CMC), liegen die Tensidmoleküle einzeln in der Lösung vor. Mit steigender Tensidkonzentration steigt zuerst die Monomerkonzentration. Wird die cmC erreicht, bilden sich Mizellen und die Monomerkonzentration bleibt konstant. Solange die monomeren Tensidmoleküle mit den Mizellen im Gleichgewicht stehen, werden die Mizellen nicht aufgelöst.

Bei der Solubilisierung eines Membranproteins wird die Lipiddoppelschicht der Membran mit Hilfe von Detergenzien zerstört. Dabei lagern sich die hydrophoben Seitenketten des Detergenz an die hydrophoben Bereiche des integralen Membranproteins. Es entstehen Mischmizellen, die sowohl das Zielprotein als auch andere, in der Membran vorhandene, Proteine enthalten. Durch eine auf das Zielprotein abgestimmte Reinigungsprozedur wird nur das gewünschte Protein gebunden und alle anderen Proteine werden weggespült.

Bei der Solubilisation mit Detergenz wird das wasserunlösliche integrale Membranprotein durch die hydrophilen Kopfgruppen des Detergenz löslich gemacht.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proteinproben befinden sich in Detergenzmizellen. Zusätzlich zu dem in der Detergenz solubilierten MjNhaP1 WT wurde dieses Protein auch in Form von 2D-Kristallen (Abbildung 27) untersucht.

Zur 2D-Proteinkristallisation wird das in Detergenz solubilierte Protein rekonstituiert, d.h. in eine Phospholipidmembran eingebaut. Die Rekonstitution bedeutet den Einbau des Proteins in eine Phospholipidmembran. Dabei werden nach und nach die Detergenzmoleküle aus der Detergenz-Phospholipid-Protein Lösung entfernt. Dieser Schritt ist für den Einbau des Proteins in die Lipidmembran und für die Entstehung des 2D Gitters entscheidend. Erst durch ein ausreichendes Lipid/Protein Verhältnis können sich in der Lipidmembran 2D-Kristalle bilden. Der Erfolg der 2D Kristallisation ist von vielen Faktoren, wie dem Lipid/Protein Verhältnis, der Wahl geeigneter Detergenzmoleküle, der Lipidmoleküle und des Puffers abhängig.

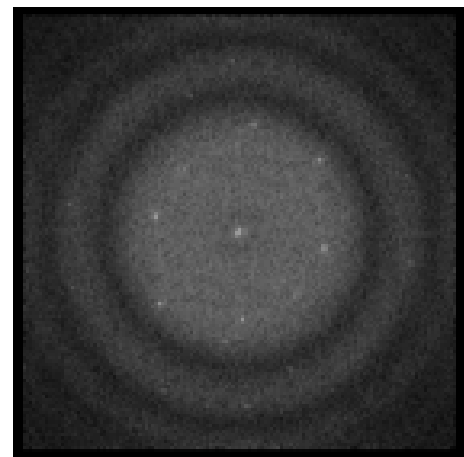
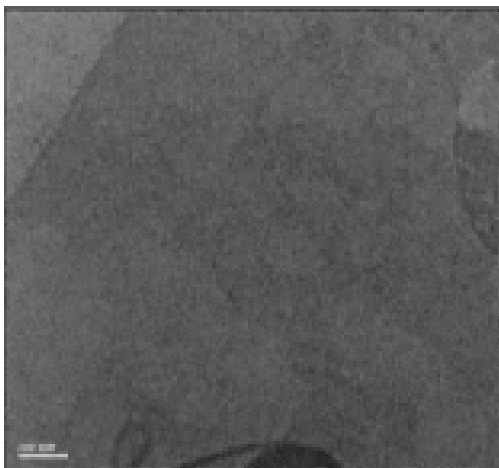
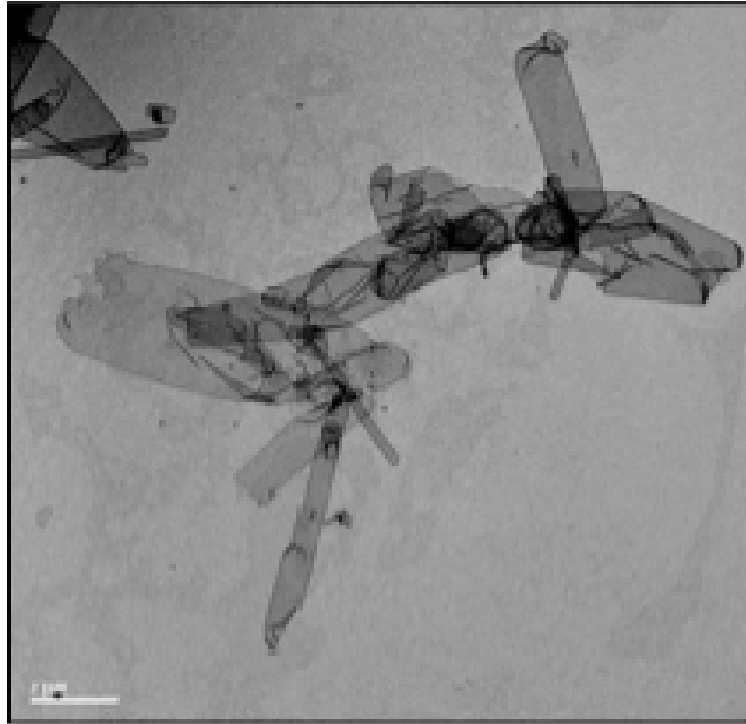


Abbildung 27: 2D-Kristalle von MjNhaP1 (oben); unten links ist das Bild von 2D-Kristallen vergrößert und rechts ist das Beugungsbild der 2D-Kristalle aufgenommen mit Transmissionen Elektronen-Mikroskopie dargestellt [Panchali Goswami, MPI für Biophysik in Frankfurt]

3.7.1 NhaA und Mutante G338S aus *E. coli*

Der in Detergenz solubilisierter Na^+/H^+ Antiporter (NhaA WT und die Mutante G338S) aus *Escherichia coli* wurde von der Arbeitsgruppe Hunte am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt präpariert.

Der verwendete Puffer für die Solubilisation (28 ml) setzt sich bei einer Membranmenge von 10 mg protein/ml aus folgenden Komponenten zusammen [62]:

- 28 % Glycerol
- 100 mM (3-Morpholinopropanesulfonische Säure) MOPS pH 7 (Molekulargewicht 209.3 g/mol)
- 1 % der (Lauryl- β -D-maltoside) β -DDM (Detergenz)

Nach der Reinigung befinden sich die Protein-Mizellen in einem Puffer, der sich wie folgt zusammensetzt:

- 25 mM Natrium-Citrat pH 4
- 100 mM KCl
- 5 mM MgCl₂
- 0,03 % α bzw. β -DDM (Detergenz)

3.7.2 MjNhaP1 und Mutante R347A aus *M. jannaschii*

Die Na⁺/H⁺ Antiporter (MjNhaP1 WT und die Mutante R347A) aus *Methanococcus jannaschii* wurde am Max Planck Institut für Biophysik in Frankfurt, in der Arbeitsgruppe Kühlbrandt hergestellt. Die folgenden Puffer wurden bei den verschiedenen Schritten benutzt:

- Solubilisation:
 - 25 mM Tris-Puffer pH 8
 - 10 % Glycerin
 - 2 mM β -Mercaptoethanol
 - 1,5 % DDM (Detergenz)
- Reinigung:
 - 25 mM Natrium-Acetate pH 4
 - 10 % Glycerin
 - 2 mM β -Mercaptoethanol
 - 300 mM NaCl
 - 0,05 % DDM

- 2D Kristallisation:

Das Protein wurde mit den polaren Lipiden von *E. coli* mit einem Lipid/Protein Verhältnis von 0,3 bis 0,6 kristallisiert. Die Kristalle werden für 5 bis 7 Tage in folgendem Puffer dialysiert:

- 25 mM Natrium-Acetate pH 4
- 2mM β -Mercaptoethanol

- 50 mM NaCl
- 5 % Glycerin und 5 % 2-Methyl-2,4 pentandiol (MPD)

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde der Natriumcitrat-Puffer bei pH 4, in dem sich das Protein befand, entweder in der ATR-Perfusionszelle oder in den Microcon Zentrifugen-Filtereinheiten durch den gewünschten Puffer ausgetauscht. Alle hier benutzten Variationen des Kaliumphosphatpuffers waren aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

- 66mM Kaliumphosphatpuffer: pH/pD 6,2; pH/pD 7,2; pH/pD 8,2
- Salz: 10 mM NaCl; 100 mM NaCl; 100 mM KCl; 100 mM LiCl
- Detergenz: 0,03 % n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM)

Für die Messung mit dem Inhibitor wurde zu dem oben angegebenen Komponenten zusätzlich 1mM 2-Amino-1H-permidin-hydrobromid (AP) hinzugefügt.

IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

TEIL I: Na^+/H^+ ANTIPORTER AUS *E. COLI*: NHAA

4.1 Sekundärstrukturanalyse

4.1.1 Analyse mittels FTIR-Spektroskopie

NhaA, der Na^+/H^+ Antiporter aus *E. coli*, transportiert entweder ein Natriumion in die Zelle und dafür zwei Protonen aus der Zelle oder umgekehrt. Seine Aktivität ist vom pH-Wert abhängig; er wird durch pH-Werte im alkalischen Bereich aktiviert. Dabei nimmt die Ionentransportrate von pH 7 bis pH 8 um drei Größenordnungen zu. Die Aktivierung geht dabei mit einer Konformationsänderung einher. In dieser Arbeit sollten die möglichen Konformationsänderungen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins mit Hilfe der FTIR- und CD-Spektroskopie detektiert werden.

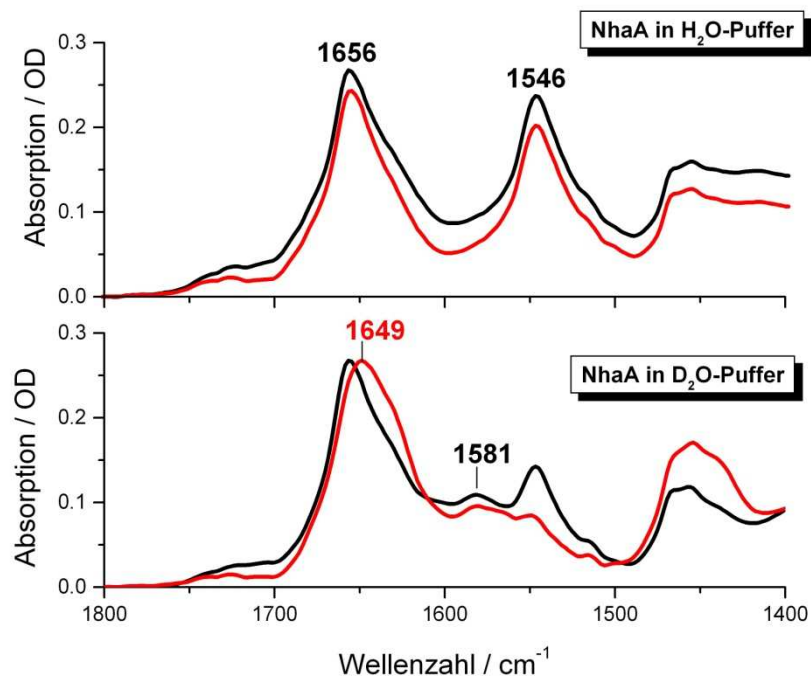


Abbildung 28: ATR-IR Absorptionsspektren von NhaA bei pH 7 bzw. pD 7 (—), und pH 8 bzw. pD 8 (—) (100 mM NaCl wurde nur im H_2O -Puffer hinzugefügt).

Eine erste Sekundärstrukturanalyse erfolgte auf der Basis von Absorptionsspektren, die mit Hilfe der ATR-Perfusionszelle (s. Kapitel 3.1) aufgenommen wurden. Die Verwendung dieser Zelle ermöglichte die Analyse ein und derselben Proteinprobe sowohl in H_2O - als auch in D_2O -Puffer. In Abbildung 28 sind die dazugehörigen Absorptionsspektren von NhaA in pH 7/pD 7 und pH 8/pD 8 mit 100 mM NaCl und in Abbildung 29 ihre 2. Ableitungen gezeigt. In den in H_2O -Puffer aufgenommenen Absorptionsspektren sind keine dramatischen Proteinänderungen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins festzustellen. Man beobachtet das Absorptionsmaximum der Amid I Bande bei 1656 cm^{-1} und das der Amid II Bande bei 1546 cm^{-1} . Aufgrund der unterschiedlichen Lösungsmittelzugänglichkeit des Proteins im inaktiven und aktiven Zustand unterscheiden sich die Absorptionsspektren dieser beiden Proteinzustände im D_2O -Puffer deutlich (s. Kapitel 3.5). Beide Spektren zeigen die NhaA Proben nach ca. 24 Stunden im D_2O -Puffer. Im Vergleich zu den Spektren in H_2O -Puffer ist eine Intensitätsabnahme der Amid II Bande zu beobachten, die durch die N-D-Biegeschwingung (ausführlicher in Ergebnissen des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches, Kapitel 4.3) verursacht wird. Im Falle vom NhaA bei pD 8 wird eine Verschiebung der Amid I Bande beobachtet. Die 2. Ableitung (Abbildung 29) zeigt die Auflösung der Amid I^o und II Bande in ihre Komponenten.

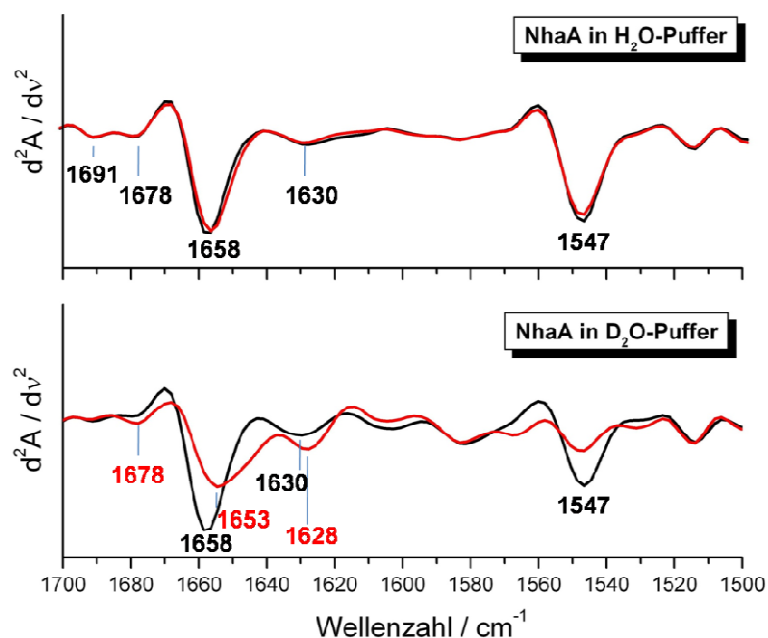


Abbildung 29: Zweite Ableitungen der ATR-IR Absorptionsspektren von NhaA bei pH 7 (—) und pH 8 (—) und von NhaA nach 24 Stunden bei pD 7 (—) und bei pD 8 (—) Kaliumphosphatpuffer mit 100 mM NaCl.

Nach Tabelle 4 (Kapitel 3.2.1) absorbiert die α -Helix im IR-Spektrum im Wellenzahlbereich von 1657 bis 1648 cm^{-1} in H_2O und 1660 bis 1642 cm^{-1} in D_2O . Die Absorptionsmaxima der Amid I Bande in den Spektren von NhaA liegen sowohl in H_2O - als auch in D_2O -Puffer in diesem Bereich. Dieses zeigt in guter Übereinstimmung mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse [6], dass das Protein hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut ist. Die Banden bei $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ und 1691 cm^{-1} (Abbildung 29) sind die Indikatoren für einen β -Faltblatt Anteil in der Sekundärstruktur vom NhaA. Auch dieses wird durch die Röntgenstrukturanalyse bestätigt (s. S. 64). Die Bande bei 1678 cm^{-1} kann als hochfrequente β -Faltblatt Bande oder als Absorption von Schleifenstrukturen interpretiert werden. Genauso wie bei den Absorptionsspektren in Abbildung 28 ist kein Unterschied zwischen NhaA im inaktiven (pH 7) und aktiven Zustand (pH 8) in H_2O -Puffer zu beobachten. Im D_2O -Puffer dagegen verschiebt sich die α -Helix Komponente bei 1658 cm^{-1} bei Erhöhung des pD-Werts von pD 7 auf pD 8 um 4 cm^{-1} und die β -Faltblatt Komponente bei 1630 cm^{-1} um 2 Wellenzahlen.

Eine Wellenzahlverschiebung der Amid I Bande bei NhaA bei pD 8 mit 100 mM NaCl kann auf die Lösungsmittelzugänglichkeit des Proteins in diesem Zustand zurückgeführt werden. Für die Verschiebung der α -Helix Komponente kann die Ursache in der Geometrieänderung der α -Helix oder in der ungeordneten Struktur liegen [63]. Es ist bekannt, dass die ungeordnete Struktur, die in der Amid I Region mit der Struktur der α -Helix überlappt, beim Wechsel zur D_2O -Lösung um ca. 10 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen verschoben wird. Die Verschiebung der ungeordneten Struktur zu kleineren Wellenzahlen sollte aber wegen ihrer Zugänglichkeit für die

Lösung innerhalb kurzer Zeit passieren. In Abbildung 30 sind die 2. Ableitungen der Absorptionsspektren von NhaA in pH/pD 8 mit 100 mM NaCl bei verschiedenen Stadien des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch-

Prozesses dargestellt.

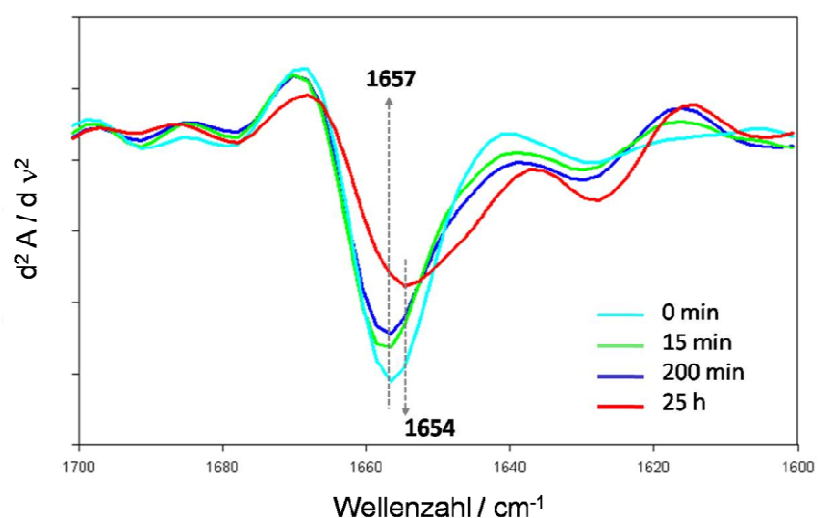


Abbildung 30: 2. Ableitungen der IR Absorptionsspektren bei verschiedenen Stadien des $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austauschs von NhaA bei pH/pD 8 mit 100 mM NaCl.

Nach 200 min in D₂O-Puffer ist keine weitere Verschiebung der Komponente bei 1657 cm⁻¹ zu beobachten. Das ist ein Indiz dafür, dass mit der Aktivierung nicht der gesamte Anteil an α -Helices durch die ungeordnete Struktur ersetzt wird. Die nach 24 Stunden bei pD 8 beobachtete Verschiebung kann durch einen langsamen Austausch der Amidprotonen (¹H) der α -Helices in der hydrophoben Region des Proteins erklärt werden. Die Verschiebung der β -Faltblatt Komponente zu kleineren Wellenzahlen mit dem D₂O-Aktivierungspuffer (pD 8) zeigt, dass die Aminosäureseitenketten in diesem Zustand für die Lösung zugänglich sind und ¹H durch ²H austauschen. Das bedeutet, dass auch die Struktur des β -Faltblattes nur im aktiven Zustand des Proteins für den Puffer gut zugänglich ist. Damit liegt die Vermutung nahe, dass auch die β -Faltblatt Struktur in der Konformationsänderung zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand von NhaA eine Rolle spielt.

Die FTIR-Sekundärstrukturanalyse des Proteins basiert hauptsächlich auf der Analyse der Amid I Bande (s. Kapitel 3.2).

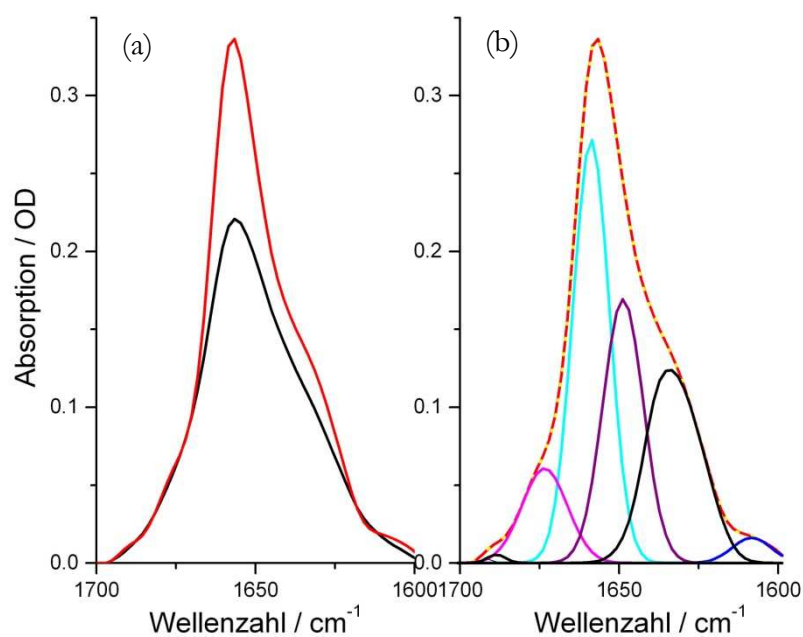


Abbildung 31: (a) NhaA Originalspektrum (—) und das Spektrum nach der FSD (—) bei pD 7 mit 100 mM NaCl, (b) FSD von NhaA bei pD7 mit 100 mM NaCl und die angepasste Kurve (.....) mit ihren Komponenten

Um die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente in dem Protein zu bestimmen, wurde die Amid I Bandenanpassung durchgeführt. Vor der Anpassung wird die Amid I Bande der Fourier Selbstentfaltung (FSD) (s. Kapitel 3.2.2) unterzogen (Abbildung 31a). Dadurch wird die Breite

der Amid I Bande verringert. Mit der festen Anzahl und Position der Komponenten, die mit Hilfe der 2. bzw. 4. Ableitung erhalten werden, wird anschließend die Anpassung durchgeführt. Dabei werden die Breite und die Intensität variiert bis eine minimale Abweichung zwischen der originalen und angepassten Kurve erreicht ist (Abbildung 31b). Um einen weiteren Kontrollfaktor für die erfolgreiche Anpassung zu haben, werden zusätzlich die 2. Ableitungen der angepassten und originalen Kurven überprüft. Dabei dürfen die Bandenkomponenten der 2. Ableitung der angepassten Kurve in ihrer Wellenzahlposition, Breite und Intensität nicht von denen der originalen Kurve abweichen.

In Tabelle 3a und b sind die Ergebnisse der Anpassung der Amid I/I' Bande für den inaktiven (pH 7/pD 7) und aktiven (pH 8/pD 8) Zustand des Proteins dargestellt.

WT pH 7		WT pH 8		WT pD 7		WT pD 8	
cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
1611	1	1613	2	1608	2	1611	2
1622	10	1622	5	1621	1	1621	5
1631	7	1631	12	1633	22	1629	18
1639	10	1639	6	1639	2	1641	19
1648	17	1649	18	1649	25	1650	12
1657	42	1657	48	1659	37	1658	41
1676	12	1678	8	1673	10	1678	3
1690	1	1690	1				

Tabelle 3a: Zusammenstellung der Frequenzkomponenten durch die Bandenanalyse an die Amid I Bande für inaktiven und aktiven Zustand in H₂O- und in D₂O-Puffer.

ν / cm ⁻¹	in H ₂ O-Puffer		ν / cm ⁻¹	22 h in D ₂ O-Puffer	
	pH 7 [inaktiv]	pH 8 [aktiv]		pD 7 [inaktiv]	pD 8 [aktiv]
1622-1641 (β-Faltblatt)	27 %	23 %	1613-1627 (β-Faltblatt)	23 %	23%
1642-1662 (α-Helix + ungeordnet)	59 %	66 %	1639-1645 (ungeordnet)	2 %	19 %
			1646-1663 (α-Helix)	62 %	53 %
1663-1686 (Schleifen)	12 %	8 %	1664-1682 (Schleifen)	10 %	3 %

Tabelle 3b: Zuordnung der Banden unter (a) zu den verschiedenen Sekundärstrukturelementen.

In der Literatur wird der Bereich zwischen 1623 cm^{-1} und 1641 cm^{-1} dem β -Faltblatt und den Polypeptidsegmenten (engl. extended chain) zugeordnet [22,23,37]. Bei der β -Faltblatt Struktur unterscheidet man in der IR Spektroskopie zwischen den Signalen, die durch die intramolekularen C=O Streckschwingungen der Peptidgruppe kommen, und denen, die durch die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen verursacht werden [64,65]. Das intramolekulare β -Faltblatt absorbiert bei ca. 1636 cm^{-1} und das intermolekulare β -Faltblatt bei ca. 1625 cm^{-1} . Nach der FTIR Sekundärstrukturanalyse hat dieser Bereich in NhaA einen Anteil von etwa 23 % an der Gesamtstruktur des Proteins. Die Daten der Röntgenstrukturanalyse von NhaA im inaktiven Zustand bei pH 4 zeigen aber einen sehr kleinen Anteil des β -Faltblattes in der längsten Schleife, zwischen TMS I und II (Abbildung 32a). NhaA liegt aber als Dimer vor und der Hauptkontakt zwischen den Monomeren ist durch ein β -Faltblatt gegeben. Das bedeutet, dass in dem Bereich zwischen 1623 cm^{-1} und 1641 cm^{-1} sowohl intramolekulares als auch intermolekulares β -Faltblatt absorbiert. Zusätzlich wird das Signal in diesem Bereich durch die Absorption der Peptide, die jeweils zwei kurze Helices des TMS IV und XI miteinander verbinden (Abbildung 32b), beeinflusst.

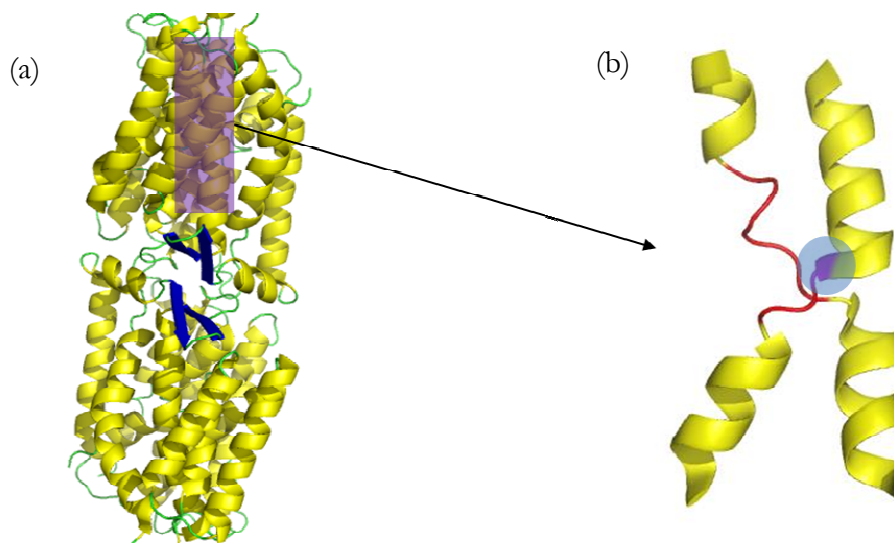


Abbildung 32: (a) NhaA ist als Dimer dargestellt. Das antiparallele β -Faltblatt (in blau) vom NhaA Monomer befindet sich in der längsten Schleife I bis II. (b) Ausschnittvergrößerung der kurzen Peptide (in rot), die die α -Helices (in gelb) IV_p und IV_c , sowie XI_p und XI_c miteinander verbinden. An der markierten Stelle wurde bei der Mutante G338S die Aminosäure Glycin durch Serin ausgetauscht.

Die größte Absorption wird aber im Wellenzahlbereich, der in der IR Spektroskopie der Struktur der α -Helix zugeordnet wird, beobachtet. Demnach macht die α -helikale Struktur etwa 60 % der Gesamtstruktur des Proteins aus. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse (Abbildung 32a) überein. Etwa 59 % der NhaA Struktur wird durch

α -Helices ausgebildet. Die Änderung zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins wird genau in diesem Bereich beobachtet. Im Gegensatz zum inaktiven Zustand (pH/pD 7) des Proteins ist im aktiven Zustand (pH/pD 8) eine Änderung zwischen der Proteinprobe in H₂O- und D₂O-Puffer zu beobachten. Wie schon erwähnt, kann die Wellenzahlverschiebung mit der Deuterierung verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann es die Folge ungeordneter Struktur sein, und zum anderen durch die unterschiedlichen Eigenschaften der α -Helices zustande kommen. Auf jeden Fall ist die beobachtete späte Verschiebung der Komponente bei 1658 cm⁻¹ (Abbildung 30) mit dem Aktivierungspuffer pD 8 ein Hinweis darauf, dass im Gegensatz zum inaktiven Zustand im aktiven Zustand auch die Amid-Gruppen in der hydrophoben Region des Proteins die Wasserstoffatome durch Deuterium austauschen. Es bleibt zu klären, ob die α -Helices in der hydrophoben Region des Proteins mit der Aktivierung ihre Konformation ändern und ob es strukturelle Unterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand in der hydrophilen Region des Proteins gibt.

4.1.2 Sekundärstrukturanalyse bei verschiedenen Deuterierungszeiten

Die Aktivität von NhaA wird durch den pH reguliert. Für die pH-Regulation sind wahrscheinlich die hydrophilen Bereiche des Proteins verantwortlich (Abbildung 33), der N-Terminus und die Peptidschleife zwischen Helix VIII und IX [10,11]. Der Abbau durch Proteasom Trypsin zeigt, dass die Konformationsänderung in diesem Bereich durch den pH-Wert im alkalischen Bereich induziert wird [1].

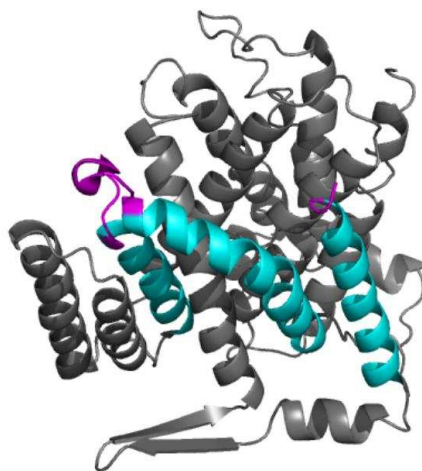


Abbildung 33: Für die pH-Regulation von NhaA sind der N-Terminus und die Schleife (in violett dargestellt), die Helix VIII mit Helix IX (türkis) verbindet, zuständig.

Um die möglichen Konformationsänderungen, die durch die Aktivierung des Proteins induziert werden, zu detektieren, wurde die Sekundärstruktur vom Protein in verschiedenen Phasen der Deuterierung analysiert. Die hydrophilen Bereiche des Proteins, die möglicherweise den pH-Sensor beinhalten, werden, da sie für die Lösung zugänglich sind, sehr schnell ^1H durch ^2H austauschen. Damit würde der Vergleich der Proben am Anfang der Deuterierung die strukturellen Unterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand in der Proteinregion, die für die pH-Regulation verantwortlich ist, liefern.

Für diese Untersuchung wurden die Proben des Wildtyps und der Mutante G338S verwendet. Im Gegensatz zum Wildtyp befindet sich die Mutante G338S immer im aktiven Zustand, unabhängig vom pH-Wert. Die Position, an der die Aminosäure Glycin (G oder Gly) durch Serin (S oder Ser) ausgetauscht worden ist, ist in Abbildung 32b markiert. Die Absorptionsspektren der Proteinproben, die für die Sekundärstrukturanalyse benutzt wurden, wurden wieder mit Hilfe der ATR-Perfusionszelle aufgenommen, so dass dieselbe Proteinprobe in H_2O - und D_2O -Puffer analysiert werden konnte. Die pH- bzw. pD-Werte der verwendeten Puffer waren pH/pD 6,2 für den inaktiven und pH/pD 8,2 für den aktiven Zustand des Wildtyps mit jeweils 10 mM NaCl.

In Abbildung 34 sind die IR Absorptionsspektren der Mutante G338S und NhaA WT für pH 6,2 bzw. pH 8,2 gezeigt. Die IR-Absorptionsspektren des Wildtyps und der Mutante sehen, bis auf eine Verschiebung des Maximums der Amid I Bande, gleich aus.

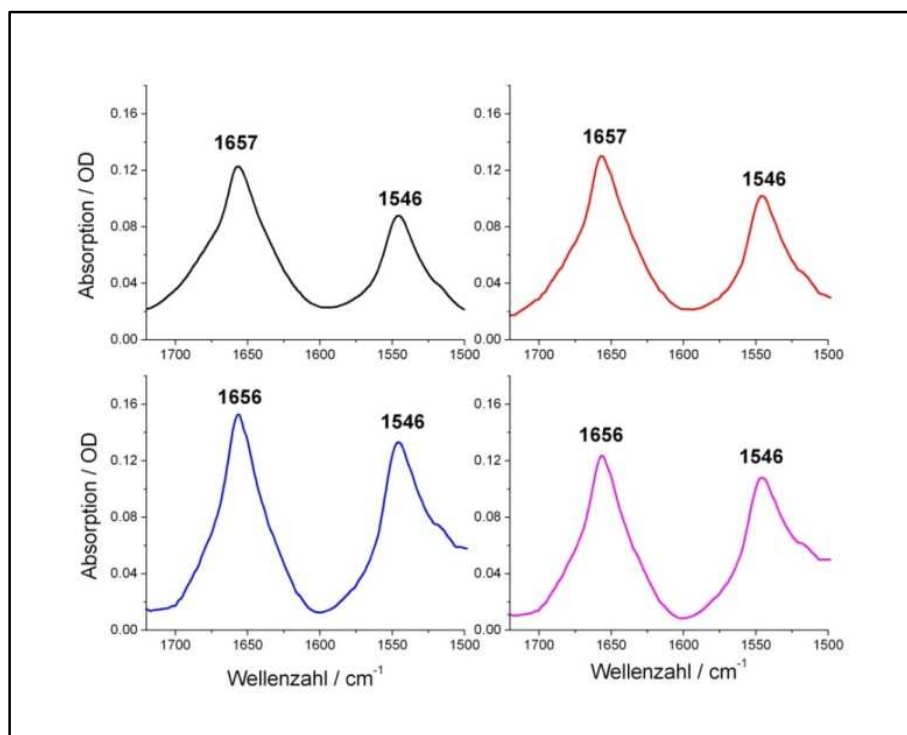


Abbildung 34: Amid I und II Bereich im IR Absorptionsspektrum von NhaA bei pH 6,2 (—), NhaA bei pH 8,2 (—), G338S bei pH 6,2 (—) und G338S bei pH 8,2 (—). Alle Puffer enthalten 10 mM NaCl.

Die Analyse der Amid I/I' Bande zeigt allerdings, dass deren Zusammensetzung zwischen dem WT und der Mutante und zwischen verschiedenen pH/pD-Werten variiert. In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassung dargestellt. Die Anpassung wurde für die Proben in H₂O-Puffer und für die Probe, die für 10, 40 und 200 Minuten einem ¹H/²H Austausch unterzogen wurde, durchgeführt. Für die in Abbildung 35 gezeigten Darstellungen wurde die Amid I/I' Bande in 6 verschiedene Bereiche mit jeweils 10 cm⁻¹ unterteilt. Dieses sollte es besser ermöglichen, die Verschiebung der einzelnen Amid I Komponenten mit der Deuterierung zu verfolgen.

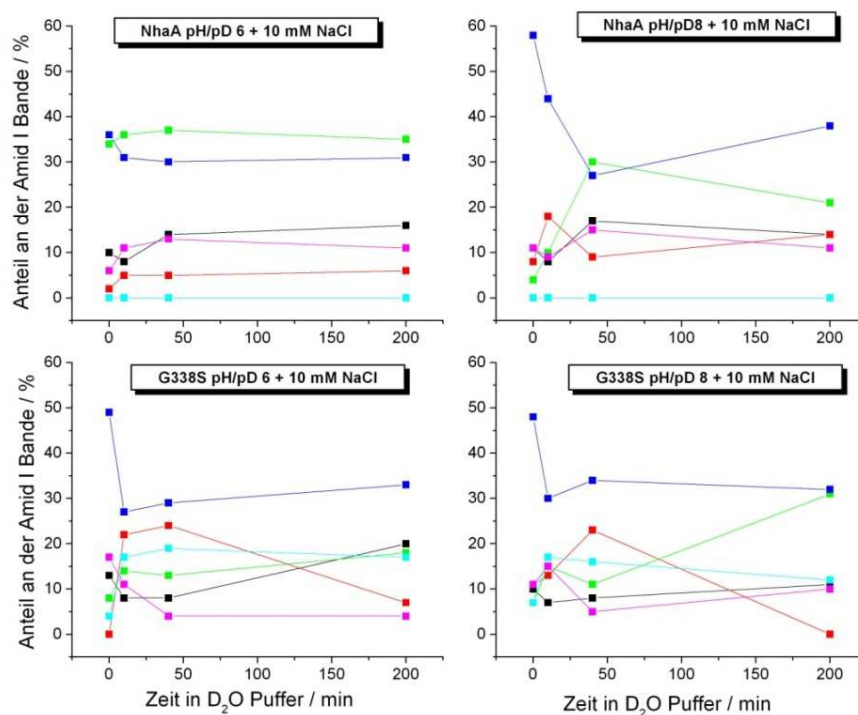


Abbildung 35: Ergebnisse der Anpassung der Amid I/I' Bande von NhaA WT und G338S für verschiedene Zeiten der Deuterierung. Die verschiedenen Farben stehen für die Summe der Anteile der Amid I Bande in einem Bereich von 10 cm⁻¹. Die Bereiche sind wie folgt gekennzeichnet: intermolekulares β -Faltblatt 1620-1630 cm⁻¹ (—); intramolekulares β -Faltblatt 1631-1640 cm⁻¹ (—); α -Helix bzw. ungeordnete Struktur 1641-1650 cm⁻¹ (—); α -Helix bzw. ungeordnete Struktur 1651-1660 cm⁻¹ (—); Schleifen 1661-1670 cm⁻¹ (—); Schleifen und β -Faltblatt 1671-1680 cm⁻¹ (—).

Im H₂O-Puffer, d.h. zum Zeitpunkt t=0 in Abbildung 35, ist ein großer Unterschied zwischen dem inaktiven (pH 6) und aktiven (pH 8) Zustand des Wildtyps im Bereich von 1641 cm⁻¹ bis 1660 cm⁻¹ (in grün und blau dargestellt) zu beobachten. Während im aktiven Zustand der Hauptanteil im Bereich von 1651 cm⁻¹ bis 1660 cm⁻¹ (blau) zu verzeichnen ist, entspricht dieser

im inaktiven Zustand etwa gleich dem Anteil in dem Bereich von 1641 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} (grün). Nach Tabelle 4 (s. S. 34) absorbiert in diesen beiden Bereichen die α -Helix. Die unterschiedlichen Absorptionen in diesen Bereichen zwischen pH 6 und 8 könnten ein Hinweis auf die Existenz von zwei verschiedenen Arten von α -Helices in dem Protein sein. Genauso wie beim WT im aktiven Zustand ist bei der Mutante, unabhängig vom pH Wert, nur ein kleiner Anteil der Amid I Bande im Bereich von $1641\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ zu beobachten.

Während im inaktiven Zustand des Proteins (pD 6) keine großen Änderungen in der Amid I Zusammensetzung im D_2O -Puffer zu beobachten sind, ist der Unterschied zwischen den Komponenten der Amid I und I' Bande im aktiven Zustand (pD 8) und bei der Mutante (pD 6 und 8) deutlich. Nach 10 Minuten im D_2O -Puffer ist beim WT (pD 8) und der Mutante (pD 6 und 8) eine Intensitätsabnahme der Hauptkomponente im Bereich von 1651 cm^{-1} bis 1660 cm^{-1} und die Intensitätszunahme im Bereich von 1641 cm^{-1} bis 1650 cm^{-1} zu beobachten. In allen Fällen beträgt diese Intensitätsabnahme etwa 20 %. Dieses Ergebnis stimmt mit der Sekundärstrukturanalyse des aktiven Zustands mit 100 mM NaCl in Tabelle 3b überein. Das Ergebnis der Kurvenanpassung zeigt, dass schon nach 15 Minuten im D_2O -Puffer etwa 10 % der Hauptkomponente ($1651\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) ausgetauscht haben, was in einer Intensitätsabnahme resultiert. Das bedeutet, dass sich etwa 10 % der Sekundärstruktur mit der Aktivierung verändert. Da diese Änderung früh erfolgt, kann sie dem Bereich des Proteins, der für die pH-Regulation verantwortlich ist, zugeschrieben werden. Allerdings ist die Intensitätsabnahme der Hauptkomponente im Bereich von $1660\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ und die damit verbundene Bandenverschiebung zu kleineren Wellenzahlen schon nach 40 Minuten abgeschlossen.

Das lässt darauf schließen, dass die Aktivierung des Proteins eine offene, für die Lösung zugängliche, Konformation induziert, so dass auch die Seitenketten in den hydrophoben Bereichen des Proteins mit der umgebenden Lösung schnell ^1H durch ^2H austauschen können.

Während der Bereich zwischen $1620\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand ungefähr den gleichen Anteil an der Gesamtstruktur des Proteins hat, gibt es eine Bandenzunahme im Bereich $1631\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ im aktiven Zustand (pH/pD 8). Wie vorher schon erwähnt, ist die Absorption des intermolekularen β -Faltblattes, die wahrscheinlich die Monomer-Monomer Wechselwirkung widerspiegelt, bei 1625 cm^{-1} zu finden. Das bedeutet, dass keine Konformationsänderung des intermolekularen β -Faltblattes zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand zu erwarten ist. Dagegen ist aufgrund des höheren Anteils im Bereich $1631\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ mit pH/pD 8 eine Zunahme von intramolekularem β -Faltblatt mit der Aktivierung zu erwarten. Das würde bedeuten, dass in der Konformationsänderung zwischen inaktiven und aktiven Zustand auch Beiträge einer β -Faltblatt-Region enthalten sind.

4.1.3 Analyse mittels CD-Spektroskopie

Als ergänzende Methode zur Sekundärstrukturbestimmung im Protein wurde die CD-Spektroskopie benutzt. Dabei wurden NhaA Proben unter verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Die CD-Spektren der Proteinproben wurden sowohl mit der CD-(Quarz)-Zelle, als auch mit einer Ca₂F-Zelle, die in IR-Spektroskopie benutzt wird (s. Kapitel 3.3.3), aufgenommen. Die IR-Zelle hat eine um den Faktor 10 kleinere Schichtdicke als die CD-Zelle (ca. 10 µm) und dementsprechend wurde für diese Messung eine 10-fach höhere Proteinkonzentration benutzt⁹. In Abbildung 36a sind die entsprechenden CD-Spektren für die NhaA Probe, in der CD und in der IR Zelle, dargestellt.

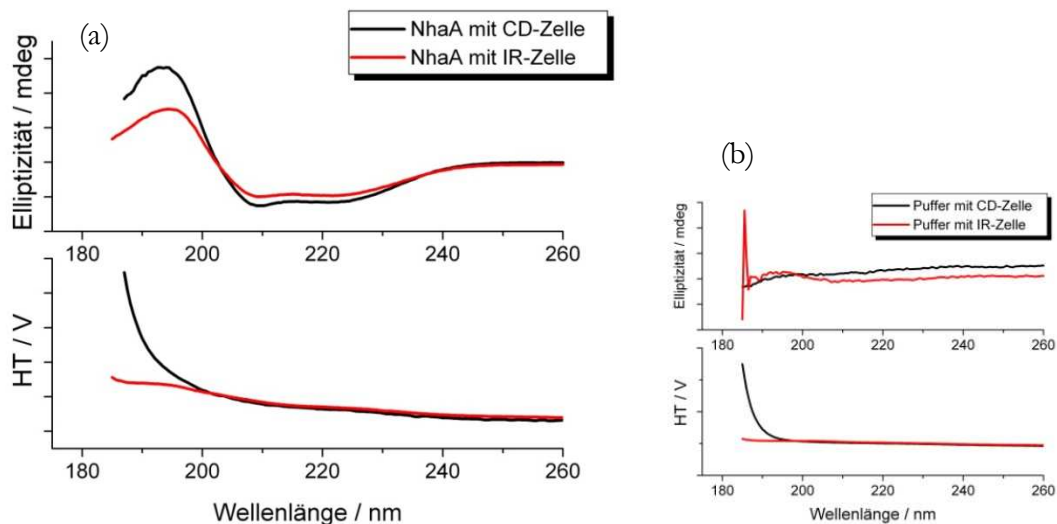


Abbildung 36: (a) Vergleich der CD-Spektren von NhaA bei pH 6 mit 100 mM KCl aufgenommen in der CD-(Quarz)- und mit der IR-(Ca₂F)-Zelle. Die Spektren wurden mit Puffer korrigiert. (b) Die dazugehörigen Puffer CD-Spektren.

Beide Proteinspektren zeigen drei charakteristische Banden bei 193 nm, 209 nm und 222 nm. Diese Banden sind typisch für die α -Helix und bestätigen erneut den hohen α -helikalen Anteil in der Sekundärstruktur des Proteins. Sowohl bei den Proteinspektren als auch bei den

⁹Der Vorteil bei der Aufnahme von CD-Spektren mit IR Zelle besteht in der Möglichkeit, aufgrund der ähnlichen Proteinkonzentrationen die Ergebnisse der CD- und FTIR-Sekundärstrukturanalyse miteinander vergleichen zu können. Die Konzentration der Proteinproben hat einen Einfluss auf die intermolekularen Bindungen im Protein. Diese nehmen mit zunehmender Konzentration zu. Das bedeutet, dass ein direkter Vergleich zwischen der CD- und FTIR-Sekundärstrukturanalyse nur möglich ist, wenn die Konzentrationen der für diese Analyse benutzten Proteinproben ähnlich sind.

Pufferspektren (Abbildung 36 rechts) ist eine drastische Intensitätsabnahme der Strahlung bei 190 nm bei der Spektrenaufnahme mit Hilfe der Quarz-Zelle zu beobachten. Da die IR-Zelle Messungen von 10 μm bis 185 nm erlaubt, wurden nur diese Spektren für die Sekundärstrukturanalyse benutzt.

Die Sekundärstruktur wurde für die Proben in H_2O und in D_2O -Puffer mit der CDSSTR Methode (s. Kapitel 3.3.2) analysiert. Dabei bestand nicht die Möglichkeit, wie mit der FTIR-Spektroskopie, dieselbe Proteinprobe in beiden Puffer zu untersuchen. Abbildung 37 zeigt das CD-Spektrum von NhaA bei pD 8 mit 100 mM NaCl (schwarz) und die angepasste Kurve (grün). Die Qualität der Anpassung ist durch den NRMSD Faktor¹⁰ gegeben, der die Differenz zwischen experimentell gemessenen Elliptizität und der Elliptizität der berechneten Kurve angibt. Bei allen hier durchgeführten Anpassungen betrug der NRMSD Faktor $< 0,014$. Das bestätigt eine gute Anpassung des berechneten Spektrums an das experimentelle Spektrum.

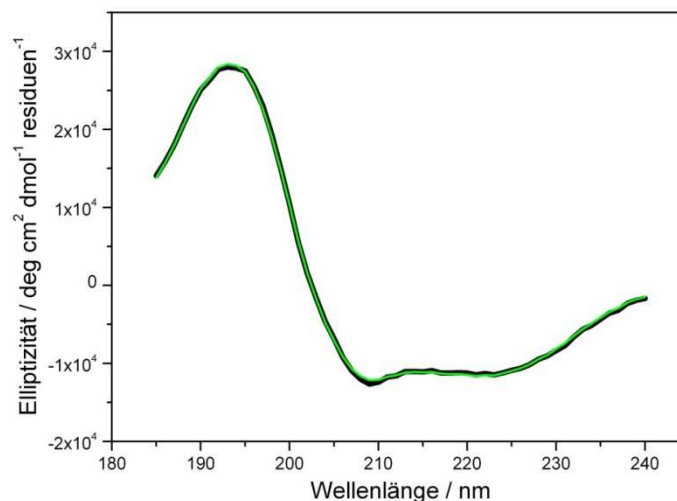


Abbildung 37: NhaA pD 8 + 100 mM NaCl Original-Spektrum (—) und die mit der CDSSTR-Methode an das Original-Spektrum angepasste Kurve (—) (s. Kapitel 3.3.2).

Da die Messung des CD-Spektrums bis 185 nm möglich war, standen für die Analyse der Daten vier verschiedene Datensätze von den Referenzproteinen zur Verfügung. Diese unterschieden sich zum einen in dem Wellenlängenbereich, in dem die Proteine gemessen wurden, und zum

¹⁰Der NRMSD Faktor (engl. normalized root mean square deviation) ist durch $\sqrt{\frac{\sum(\Theta_{exp} - \Theta_{cat})^2}{\sum(\Theta_{exp})^2}}$, (Θ_{exp} : die experimentell gemessene Elliptizität; Θ_{cat} : die Elliptizität der angepassten Kurve), definiert. Dabei wird die Summe über alle Wellenlängen gebildet. Je kleiner der NRMSD-Faktor, desto besser ist die Kurvenanpassung. Ist NRMSD-Faktor hoch ($>0,1$) bedeutet das, dass die angepasste Kurve die experimentell erhaltene Kurve nicht richtig wiedergibt [47].

anderen in der Anzahl und der Zusammensetzung der Referenzproteine. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von NhaA in H₂O-Puffer für verschiedene Datensätze sind in Abbildung 38 dargestellt.

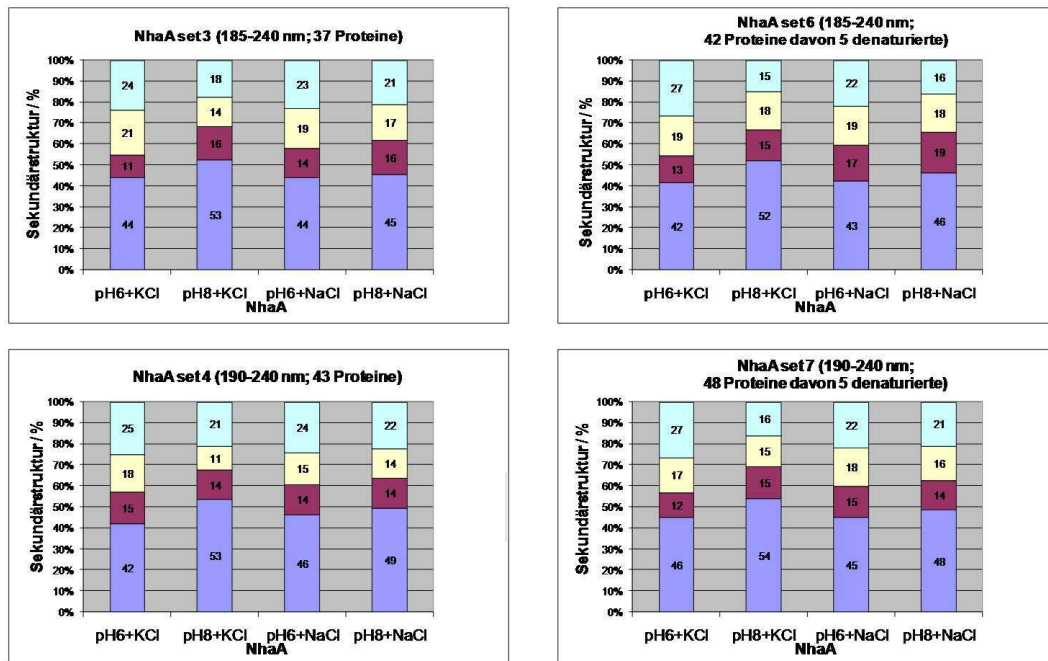


Abbildung 38: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse für NhaA Proben in verschiedenen H₂O-Puffern. Die Puffer enthielten 100 mM Salz. Dabei wurden für die Analyse verschiedene Protein Referenz-Datensätze benutzt. α -Helix (■); β -Faltblatt (■); Schleifen (■) und ungeordnete Struktur (■)

Die Auswertungen mit verschiedenen Datensätzen zeigen vergleichbare Resultate für die Sekundärstrukturanteile von NhaA. Die Sekundärstruktur besteht zu etwa 50 % aus α -Helix, zu ca. 15 % aus β -Faltblatt, zu ca. 15 % aus Schleifen und zu ca. 20 % aus ungeordneten Strukturen. Die Sekundärstrukturanalyse mittels FTIR-Spektroskopie (s. Tabelle 3b) ergibt einen um ca. 10 % höheren Anteil an β -Faltblatt. Bei der Analyse der IR-Spektren im H₂O-Puffer bestand aufgrund der Überlappung entsprechender Banden nicht die Möglichkeit, zwischen α -Helix und ungeordneter Struktur zu unterscheiden. Dagegen erlaubt die Analyse der CD-Spektren diese Unterscheidung. Die Ergebnisse zeigen im inaktiven Zustand des Proteins einen höheren Gehalt an ungeordneter Struktur und einen kleineren Gehalt an α -Helix als im aktiven Zustand. Während im inaktiven Zustand (pH 6) nur sehr geringe Unterschiede in den Sekundärstrukturanteilen zwischen den Proben mit KCl und NaCl festzustellen ist, hat das Salz einen Einfluss auf die Proteinprobe im aktiven Zustand (pH 8). Nach diesen Ergebnissen induziert die Aktivierung einen höheren Anteil an α -helikaler Struktur. Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zur Sekundärstrukturanalyse in D₂O-Puffer mit FTIR-Spektroskopie.

Deswegen wurden die CD-Spektren der Proteinproben auch in D₂O-Puffer aufgenommen und die entsprechende Sekundärstrukturanalyse durchgeführt.

Die Proteinproben wurden 24 Stunden in einem D₂O-Puffer equilibriert, bevor die CD-Spektren aufgenommen wurden. Damit war der weitestgehende mögliche Austausch von ¹H durch ²H gewährleistet. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse der untersuchten Proben in D₂O-Puffer sind in Abbildung 39 DARGESTELLT.

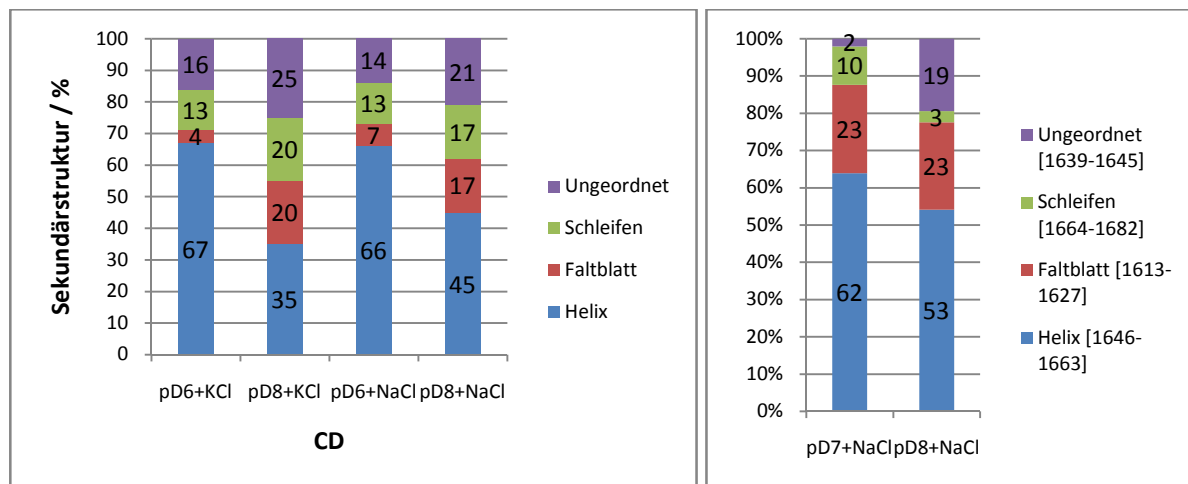


Abbildung 39: Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von NhaA. Links: Resultate aus den CD-Spektren. Rechts: zum Vergleich die Ergebnisse der IR Sekundärstrukturanalyse (s. Tabelle 3b). Als Referenz-Datensatz wurde der Set 3, d.h. 37 Proteine, die in einem Wellenlängenbereich von 185-240 nm gemessen wurden, benutzt.

Da die verschiedenen Referenzprotein-Datensätze keine großen Unterschiede in den Sekundärstrukturanteilen zeigten, ist hier das Resultat nur für 3 Datensatz gezeigt. Im Gegensatz zu H₂O-Puffer ist im D₂O-Puffer ein noch größerer Unterschied zwischen dem inaktiven (pD 6 mit NaCl) und aktiven (pD 8 mit NaCl) Zustand des Proteins zu beobachten. Damit hat der aktive Zustand des Proteins einen um etwa 20 % niedrigeren Anteil an α -helikaler Struktur und dafür die höhere Anteile an β -Faltblatt (um 10 %), an Schleifen (um 4 %) und an ungeordneter Struktur (um 7 %). Die Abnahme der α -Helix mit dem D₂O Aktivierungspuffer stimmt mit dem Ergebnis der FTIR Sekundärstrukturanalyse (Abbildung 39 rechts, Tabelle 3b) überein. Die Schleifen und ungeordneten Strukturen sind schnell für eine Lösung zugänglich und wahrscheinlich spiegeln sie die pH induzierte Konformationsänderung des Proteins wider. Dieses stimmt mit dem Ergebnis der FTIR Sekundärstrukturanalyse der Proteinprobe zu verschiedenen Zeiten der Deuterierung überein (s. Abbildung 35). Hier wurde eine Abnahme der α -Helix Anteile von ca. 10 % in den ersten 15 Minuten der Probe im D₂O Aktivierungspuffer (pD 8) beobachtet. Nach ca. 40 Minuten war der Austausch abgeschlossen; damit war wahrscheinlich der Austausch der Seitenketten in den hydrophoben Bereichen des Proteins abgeschlossen.

Gemäß den Daten der CD-Sekundärstrukturanalyse würde das bedeuten, dass mit der Aktivierung in der hydrophoben Region des Proteins 10 % von α -helikalen zu β -Faltblatt Strukturen übergeht.

4.2 Untersuchungen zur thermischen Stabilität

Die thermisch induzierte Denaturierung von Proteinen erlaubt Rückschlüsse auf deren Stabilität. Die Untersuchung der temperaturinduzierten Entfaltung von NhaA und G338S war mit Hilfe einer temperierbaren CaF_2 Zelle, wie sie in Kapitel 3.4.1 beschrieben wurde, möglich. Dabei wurde die Stabilität des Proteins im inaktiven und aktiven Zustand, in H_2O und D_2O -Puffer, untersucht. Ein Beispiel ist in Abbildung 40a für den inaktiven Zustand (pD 6 mit 10 mM NaCl) für NhaA WT gezeigt.

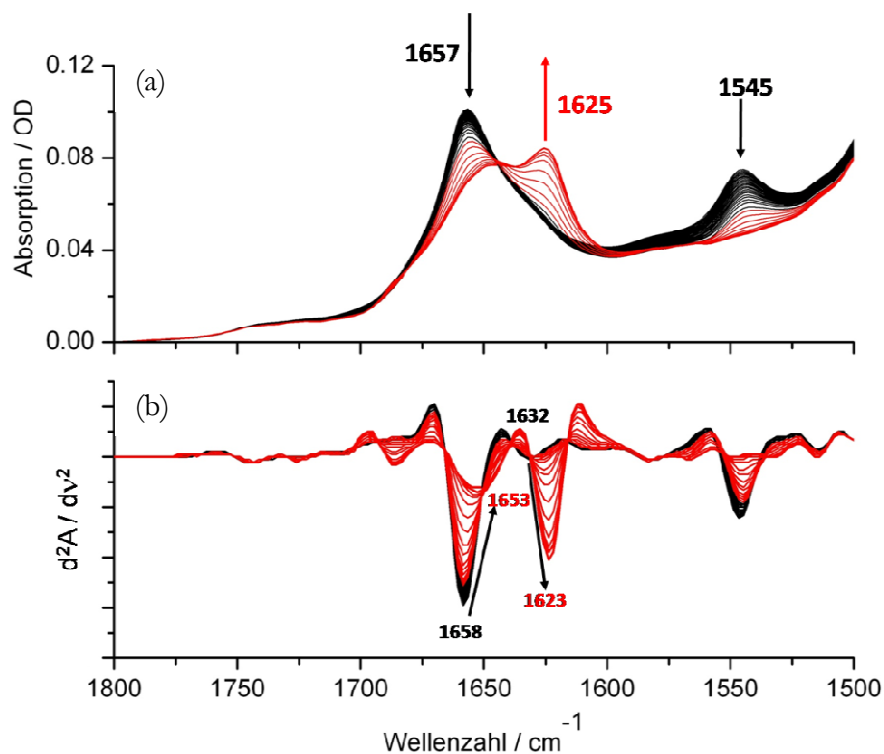


Abbildung 40: (a) IR Absorptionsspektren von NhaA bei pD 6 mit 10 mM NaCl [(—) 20 °C bis 44 °C; (—) 46 °C bis 70 °C]. (b) 2. Ableitung der in (a) dargestellten Absorptionsspektren

In dieser Abbildung sind die Absorptionsspektren in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 70 °C dargestellt. Mit steigender Temperatur ist eine Intensitätsabnahme des Amid I Maximums

bei 1657 cm^{-1} und das Entstehen einer neuen Komponente bei 1625 cm^{-1} zu beobachten. Der Amid II Bereich mit dem Absorptionsmaximum 1545 cm^{-1} spiegelt die Zugänglichkeit des Proteins mit der Erhöhung der Temperatur wider. Da mit steigender Temperatur der Entfaltungsprozess der Proteinstruktur beginnt, tauschen die Amid-Gruppen der bis dahin für die umgebende Lösung nicht erreichbaren Aminosäureseitenketten mit Deuterium aus. Als Folge dieser Zunahme in der Austauschbarkeit nimmt die Intensität der Amid II Bande, die hauptsächlich durch die N-H Biegeschwingungen verursacht wird, ab.

Um die Amid I Bande in ihre Komponenten zu zerlegen, wurde die 2. Ableitung der Absorptionsspektren gebildet. Das Ergebnis ist in Abbildung 40b gezeigt. Dabei wird die Amid I Bande in drei Komponenten aufgelöst. Bei 20 °C deutet die Bande bei 1632 cm^{-1} auf die Präsenz des β -Faltblattes hin, während die Bande bei 1658 cm^{-1} die α -helikale Struktur im Protein repräsentiert. Die Temperaturzunahme in der Proteinprobe induziert die Verschiebung dieser repräsentativen Banden zu kleineren Wellenzahlen. Im Spektrum bei 70 °C ist die Bande der α -Helix verschwunden, stattdessen beobachtet man eine Bande bei 1653 cm^{-1} , die auf die ungeordnete Struktur im Protein hindeutet. Auch beim β -Faltblatt verursacht die steigende Temperatur eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen 1623 cm^{-1} . Zusätzlich zur Wellenzahlverschiebung zeigt die β -Faltblatt Bande eine Intensitätszunahme. Das Spektrum bei 70 °C ist, mit den charakteristischen Banden bei 1623 und 1686 cm^{-1} , die die Bildung des intermolekularen β -Faltblattes widerspiegeln, typisch für denaturierte Proteine. Die temperaturinduzierte Denaturierung von NhaA ist irreversibel, was einen Aktivitätsverlust zur Folge hat.

4.2.1 Vergleich des inaktiven und des aktiven Zustands

Die strukturelle Änderung und die Reorganisation des Proteins während des Entfaltungsprozesses wurden im inaktiven und aktiven Zustand von NhaA untersucht. Die thermisch induzierte Verschiebung der Amid I Bande wurde für die α -Helix und β -Faltblatt Komponente mit Hilfe der 2. Ableitung verfolgt. Die Wellenzahlposition in Abhängigkeit von der Temperatur für den inaktiven (pD 6) und aktiven (pD 8) Zustand in D_2O -Puffer ist in Abbildung 41 dargestellt. Die thermisch induzierten strukturellen Änderungen dieser Komponenten sind in drei Bereiche unterteilt. Im Bereich I beobachtet man keine temperaturabhängigen Änderungen des Proteins. Es spiegelt somit den nativen Zustand des Proteins wider. Der Bereich II beginnt mit der Verschiebung der Amid I Komponenten zu kleineren Wellenzahlen und repräsentiert die Entfaltung des Proteins. Die strukturellen

Änderungen enden mit dem Beginn des Bereichs III. Dieser stellt den denaturierten Zustand des Proteins dar.

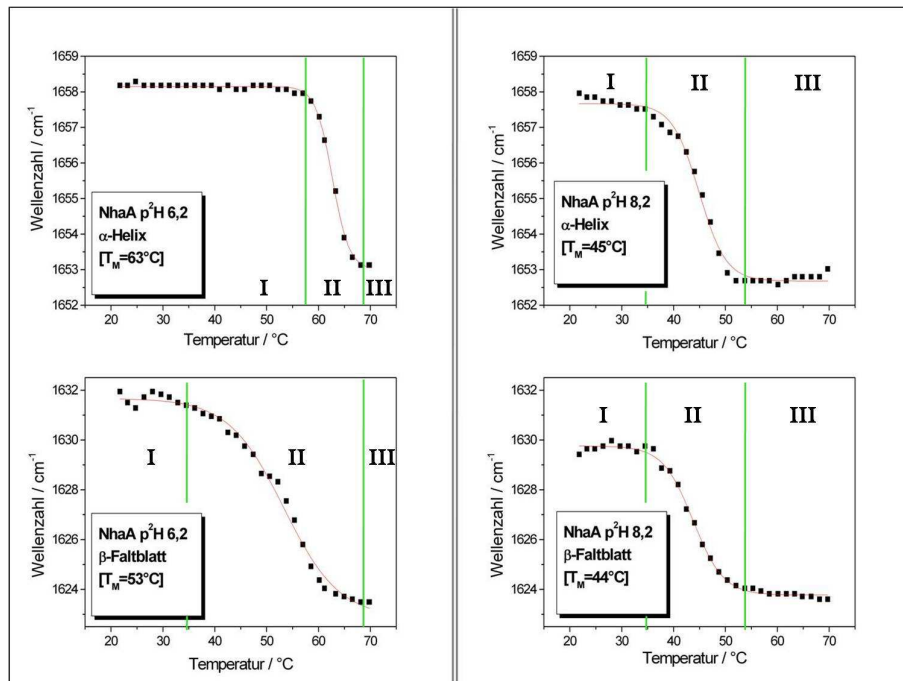


Abbildung 41: Untersuchung der temperaturinduzierten Strukturveränderung von NhaA mittels der Verschiebung der α -Helix und β -Faltblatt Komponente jeweils im inaktiven (pD 6 linke Spalte) und im aktiven Zustand (pD 8 rechte Spalte). Unterteilung der beobachtbaren spektralen Veränderungen in Temperaturbereiche: der nativer Zustand (I), der Entfaltungsprozess (II) und der entfaltete Zustand (III).

Im nativen Zustand (Bereich I) beobachtet man für die α -Helix Komponente bei ca. 1658 cm^{-1} nur einen kleinen Unterschied von etwa 0,5 Wellenzahlen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins. Im Gegensatz dazu verschiebt sich die β -Faltblatt Komponente bei 1632 cm^{-1} mit der Aktivierung auf 1629 cm^{-1} .

Im inaktiven Zustand beginnt die Entfaltung, Bereich II, der α -Helix bei $57 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und ist bei etwa $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Absorption bei 1653 cm^{-1} abgeschlossen. Die Aktivierung des Proteins induziert die Destabilisierung der α -Helix. Der Entfaltungsprozess startet bei etwa $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und endet bei etwa $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mit dem denaturierten Zustand des Proteins, der durch die ungeordnete Struktur bei 1653 cm^{-1} charakterisiert ist. Der aktive Zustand weist damit für die α -Helix Komponente eine um $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kleinere Übergangstemperatur (s. Kapitel 3.4) als der inaktive Zustand auf.

Während bei pD 8 der Denaturierungsprozess des β -Faltblatts dem der α -Helix Komponente gleicht, unterscheiden sich die Profile dieser beiden Komponenten bei pD 6. Im inaktiven Zustand beginnt der Bereich II für das β -Faltblatt bei etwa $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ an und ist mit $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ beendet.

In Folge dessen ist dieser Übergang am breitesten. Das bedeutet, dass im β -Faltblatt Bereich kein einheitliches thermisches Verhalten vorliegt.

Um die strukturellen Änderungen mit der Erhöhung der Temperatur verfolgen zu können, wurde die Amid I Bande bei sechs verschiedenen Temperaturen angepasst. Das Ergebnis für den inaktiven (pD 6) und aktiven (pD 8) Zustand des Proteins ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Amid I Bande wurde mit Hilfe der 4. Ableitung in sieben Banden aufgelöst. Der α -Helix Anteil wird durch die Komponenten bei 1647 cm^{-1} und 1658 cm^{-1} charakterisiert. Die ungeordnete Struktur absorbiert bei 1642 cm^{-1} , wobei dieser auch die Komponente bei 1647 cm^{-1} dieser zugeordnet werden kann. Die Komponente bei 1634 cm^{-1} und bei 1686 cm^{-1} repräsentieren das intramolekulare, die bei 1625 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} das intermolekulare β -Faltblatt. Ein Teil der Komponente bei 1675 cm^{-1} kommt auch durch die Absorption der Schleifen in diesem Bereich zustande.

NhaA pD 6	1625 cm^{-1}	1634 cm^{-1}	1642 cm^{-1}	1647 cm^{-1}	1658 cm^{-1}	1675 cm^{-1}	1686 cm^{-1}
	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %
20 °C	7	8	0	26	46	7	3
30 °C	7	8	0	26	45	8	3
40 °C	8	9	0	25	45	6	5
50 °C	6	8	0	32	40	10	1
60 °C	11	9	9	25	33	10	1
70 °C	21	0	41	4	20	10	3

NhaA pD 8	1623 cm^{-1}	1632 cm^{-1}	1641 cm^{-1}	1647 cm^{-1}	1658 cm^{-1}	1675 cm^{-1}	1686 cm^{-1}
	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %
20 °C	5	11	0	33	33	16	1
30 °C	10	7	0	34	35	10	3
40 °C	10	9	12	15	42	10	2
50 °C	11	16	8	13	38	13	1
60 °C	18	13	18	7	27	13	2
70 °C	18	8	26	11	22	11	3

Tabelle 4: Ergebnisse der Anpassung der Amid I Bande für inaktiven und aktiven Zustand in D_2O -Puffer bei verschiedenen Temperaturen.

Im inaktiven Zustand (pD 6) beobachtet man eine wesentliche Zunahme der ungeordneten Struktur (1642 cm^{-1}) zwischen 60 °C und 70 °C . Das ist mit der Abnahme der α -Helix (1658 cm^{-1} und 1647 cm^{-1}) verbunden. Damit stellt die Zunahme in der ungeordneten Struktur die Entfaltung der α -helikalen Struktur des Proteins dar. Die thermische Entfaltung der Banden

bei 1658 cm^{-1} und 1647 cm^{-1} passiert gleichzeitig, was auch durch den scharfen Übergang der α -Helix im Bereich II (Abbildung 41) bestätigt wird. Zusammen mit der hohen Übergangstemperatur liegt die Vermutung nahe, dass der inaktive Zustand in einer kompakten Form vorliegt. Dagegen ist im aktiven Zustand eine Abweichung im thermischen Verhalten für die Banden bei 1658 cm^{-1} und 1647 cm^{-1} zu verzeichnen. Während die Abnahme der Bande bei 1647 cm^{-1} zusammen mit der Zunahme in der ungeordneten Struktur (1642 cm^{-1}) zwischen 30 °C und 40 °C beginnt, ist das thermische Profil der Bande bei 1658 cm^{-1} ähnlich dem Verhalten im inaktiven Zustand. Dass diese zwei Banden ein unterschiedliches thermisches Profil zeigen, wird auch durch einen relativ breiten Übergang von 20 °C (Abbildung 41) bestätigt. Das würde bedeuten, dass die Aktivierung eine strukturelle Änderung induziert, bei welcher die Bande bei 1647 cm^{-1} nicht in der thermisch stabilen Region des Proteins zu finden ist.

Für die Komponente des intermolekularen β -Faltblattes bei $\sim 1625\text{ cm}^{-1}$ beobachtet man zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand ein ähnliches Verhalten für den Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C . Während keine Änderungen im aktiven Zustand zwischen 60 °C und 70 °C beobachtet werden, steigt im inaktiven Zustand der Anteil dieser Komponente in diesem Temperaturbereich um 10% . Gleichzeitig ist eine Abnahme der intramolekularen β -Faltblatt Komponente bei 1634 cm^{-1} zu beobachten. Da im inaktiven Zustand ein sehr breiter Übergang (s. Kapitel 3.4) für die β -Faltblatt Struktur zu beobachten war, deutet dieses Ergebnis zusammen mit dem ähnlichen Verhalten der Komponente bei 1625 cm^{-1} des inaktiven und des aktiven Zustands (Tabelle 4) darauf hin, dass zwei Effekte die Denaturierung des Proteins begleiten. Zum einen ist dies die Änderung der Monomer-Monomer Wechselwirkung und zum anderen die Enthüllung der hydrophoben Region des Proteins mit der anschließenden Entfaltung. Während im inaktiven Zustand diese zwei Schritte bei verschiedenen Temperaturen stattfinden, passieren diese im aktiven Zustand gleichzeitig. Das lässt darauf schließen, dass die Aktivität nur dann gewährleistet ist, wenn NhaA als Dimer vorliegt.

Das thermische Verhalten der repräsentativen Amid I Banden wurde auch in H_2O -Puffer untersucht (Abbildung 42). Da die Amid I Bande durch die H-O-H Biegeschwingung des Puffers überlappt wird, wurde das Proteinspektrum mit dem bei der entsprechenden Temperatur gemessenen Pufferspektrum korrigiert. Die Schwankung der Datenpunkte ist auf diese Korrektur zurückzuführen. Die Erhöhung der Temperatur induziert die Verschiebung der Komponente bei $1658,4\text{ cm}^{-1}$ nach $1657,6\text{ cm}^{-1}$ mit der Inaktivierung, und der Komponente bei $1658,4\text{ cm}^{-1}$ nach 1657 cm^{-1} mit der Aktivierung. Die Ursache dieser Verschiebung, die kleiner ist als im D_2O -Puffer, deutet auf die Zunahme der Deuterierung mit steigender Temperatur hin. Das

thermische Verhalten für die Bande bei 1658 cm^{-1} zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand ist ähnlich dem im D_2O -Puffer. Die mittlere Übergangstemperatur beträgt 59 °C für die Komponente bei 1658 cm^{-1} im inaktiven Zustand und 43 °C im aktiven Zustand des Proteins. Das bestätigt, dass die Aktivierung eine thermische Instabilität der α -Helix induziert. Genau wie in D_2O beobachtet, startet die Denaturierung der β -Faltblatt Komponente im inaktiven Zustand bei kleineren Temperaturen als die Denaturierung der α -Helix Komponente. Das kann auf die mögliche Monomerisierung des Proteins bei einer Temperatur von ca. 45 °C zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu D_2O beginnt in H_2O die Denaturierung dieser Komponente schon bei ca. 30 °C . Das würde bedeuten, dass D_2O -Puffer zur Stabilisierung dieser Struktur beiträgt. Die mittleren Übergangstemperaturen für die Bande bei 1658 cm^{-1} und 1632 cm^{-1} stimmen in etwa überein, was darauf hinweist, dass diese beiden Strukturen in dem Aktivierungsprozess gekoppelt sind.

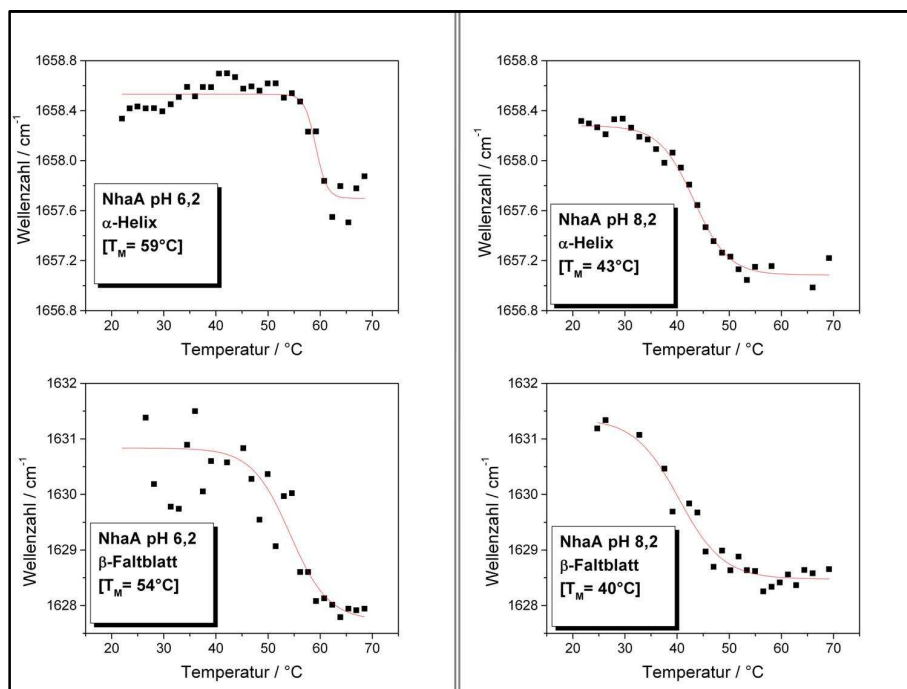


Abbildung 42: Untersuchung der temperaturinduzierten Strukturveränderung von NhaA mittels der Verschiebung der α -Helix und β -Faltblatt Komponente jeweils im inaktiven (pH 6 linke Spalte) und im aktiven Zustand (pH 8 rechte Spalte) im H_2O -Puffer. Vor der Auswertung wurden die temperaturabhängigen Absorptionsspektren mit den Pufferspektren bei der entsprechenden Temperatur korrigiert.

4.2.2 Vergleich Wildtyp / Mutante G338S

Die Mutante G338S wurde unter denselben Bedingungen wie der Wildtyp untersucht. Da die Mutante unabhängig vom pH-Wert immer aktiv ist, müsste das thermische Verhalten mit dem aktiven Zustand (pD 8) des Wildtyps übereinstimmen. Allerdings beobachtet man wieder einen Unterschied im Entfaltungsprozess der α -Helix zwischen pD 6 und pD 8 (Abbildung 43). Während die mittlere Übergangstemperatur für die Mutante bei pD 6 bei 46 °C liegt, ist diese bei pD 8 um 17 °C niedriger. Dieser große Unterschied in der Übergangstemperatur deutet erneut auf strukturelle Änderungen in der Mutante zwischen pD 6 und pD 8 im α -helikalen Bereich des Proteins hin. Die Übergangstemperatur der Mutante bei pD 6 stimmt aber mit der für den Wildtyp bei pD 8 überein und bestätigt, dass die Aktivität der Mutante vom pH-Wert unabhängig ist. Für das β -Faltblatt wird kein Unterschied der Mutante zwischen diesen beiden pD-Werten beobachtet. Das thermische Verhalten für diese Struktur stimmt mit dem beobachteten Verhalten für den Wildtyp bei pD 8 überein. Dieses zeigt, dass die Denaturierung der β -Faltblatt Komponente nicht von der Entfaltung der α -Helix beeinflusst wird, was darauf hindeutet, dass diese zwei Strukturen in unterschiedlichen Regionen des Proteins zu finden sind.

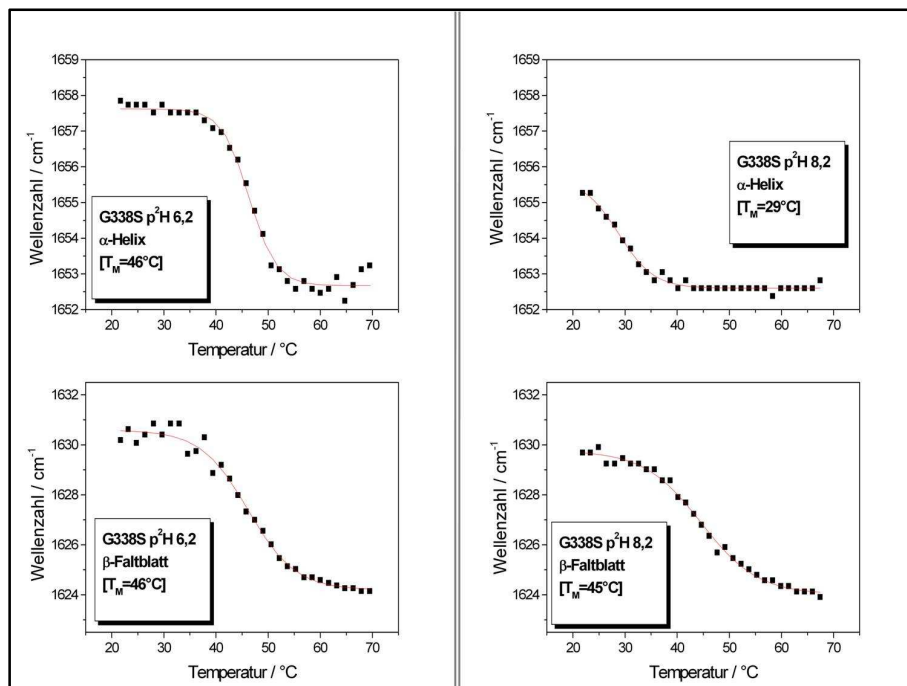


Abbildung 43: Untersuchung der temperaturinduzierten Strukturveränderung von Mutante G338S mittels der Verschiebung der α -Helix und β -Faltblatt Komponente jeweils bei pD 6 (linke Spalte) und bei pD 8 (rechte Spalte) im D₂O-Puffer.

4.3 Untersuchungen zur Dynamik und Flexibilität des Proteins

Die Untersuchung der Proteindynamik und Flexibilität wird ebenfalls mit Hilfe des Austauschs von Wasserstoff gegen Deuterium möglich. Dabei betrachtet man vor allem den Austausch der Protonen in der N-H Biegeschwingung der Peptidgruppen im Proteinrückgrat. Als Folge dieses Austauschs beobachtet man im IR-Spektrum des Proteins eine Intensitätsabnahme der Amid II Bande (s. Kapitel 3.5). Diese Intensitätsabnahme wird ausgenutzt, um Informationen über die Zugänglichkeit des Proteins für die Lösung zu bekommen.

Ein Beispiel für den dieser Arbeit mit der ATR-Perfusionszelle durchgeführten $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch ist in Abbildung 44 dargestellt. Es zeigt die zeitabhängige Aufnahme der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschpektren von NhaA bei pH/pD 6,2. Dabei wurde als Referenzmessung der H_2O -Puffer aufgenommen. Mit der fortschreitenden Deuterierung beobachtet man eine Abnahme der H_2O Bande in der Amid I Region (1700 bis 1600 cm^{-1}) und eine Zunahme der D_2O Bande (1208 cm^{-1}). Gleichzeitig nimmt die Absorption der HOD Bande bei 1457 cm^{-1} zu, bis ihre maximale Intensität in der Perfusionszelle nach wenigen Minuten erreicht ist (s. Kapitel 3.5). Diese Bande überlagert vollständig die Amid II' Bande, die durch die N-D Biegeschwingung zustande kommt, und zum Teil auch die restliche Amid II Bande, die für die Analyse der Flexibilität des Proteins benötigt wird.

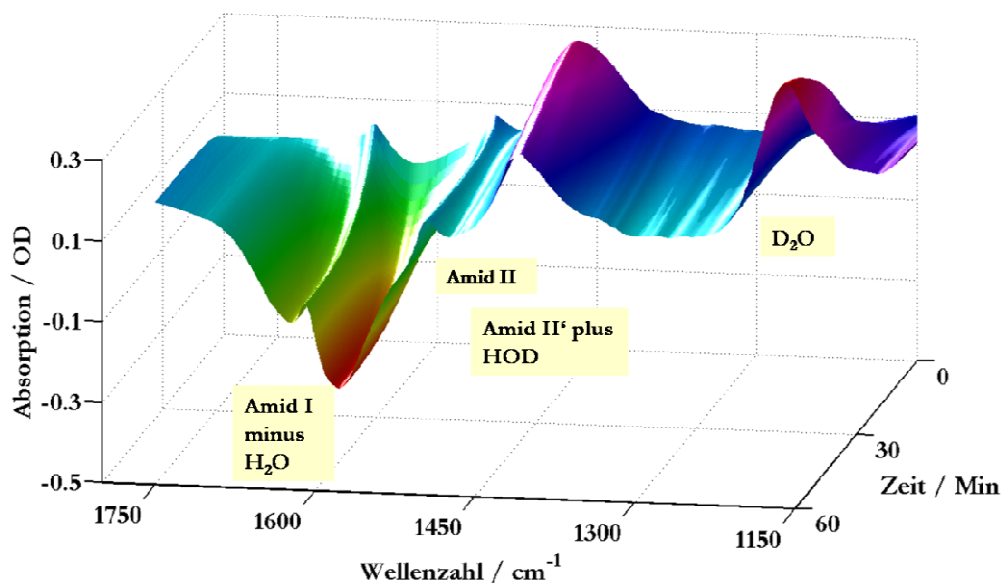


Abbildung 44: $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Spektren von NhaA bei pH/pD 6,2 mit 10 mM NaCl zwischen 0 und 60 Minuten aufgenommen mit Hilfe der ATR-Perfusionszelle. (Referenz: Kaliumphosphatpuffer pH 6 mit 10 mM NaCl)

Um keine störenden Puffersignale im analysierten Proteinbereich zu haben, wurden die Spektren, wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, korrigiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 gezeigt. Die Amid I/I' Bande absorbiert bei 1657 cm^{-1} und spiegelt den hohen Gehalt an α -helikaler Struktur im Protein wider. Auch die Amid II Absorption bei 1546 cm^{-1} ist für Proteine mit hohem α -Helix Anteil charakteristisch. Infolge der zunehmenden Deuterierung der NH Gruppen nimmt die Amid II Bande ab und verschiebt sich aufgrund der größeren Masse des Deuteriums zu kleineren Wellenzahlen bei ca. 1457 cm^{-1} (Amid II'). Die für das Deuterium zugänglichen Seitenketten des Proteins werden mit Hilfe der Amid II Bande berechnet¹¹. Die in Abbildung 45 gezeigten Spektren, werden alle mit der Fläche unter der Amid I/I' Bande ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) als Referenzgröße normiert, so dass sich keine Konzentrationsschwankungen im Spektrum abbilden. Die Amid I/I' Bande zeigt eine geringe Abnahme in den ersten Minuten des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches. Die Ursache dieser Abnahme liegt wahrscheinlich in der Seitenkettenabsorption, die sich mit dem Austausch zu kleineren Wellenzahlen verschiebt.

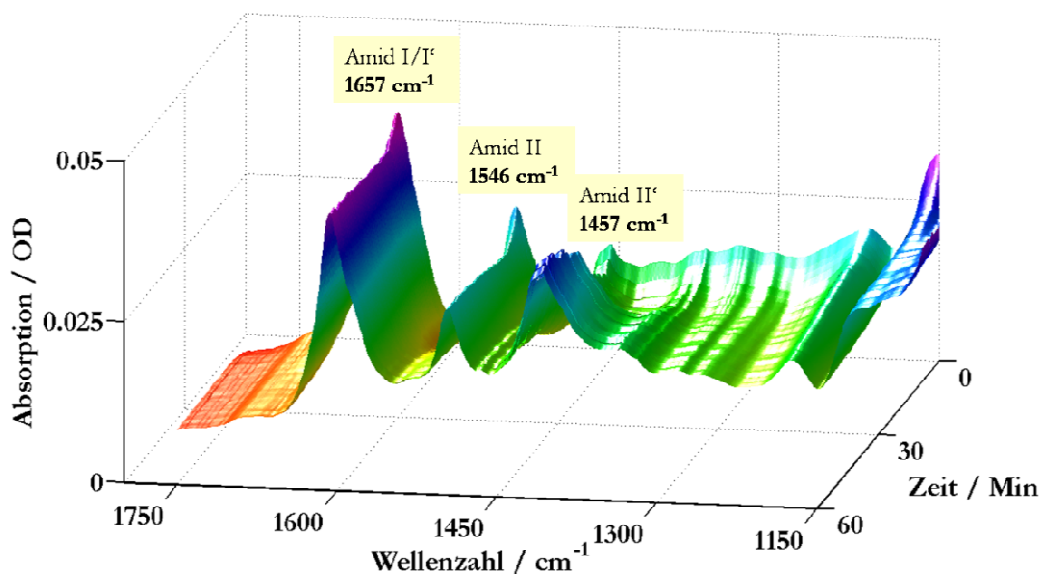


Abbildung 45: Absorptionsspektren (Abbildung 44) von NhaA pH/pD 6,2 mit 10 mM NaCl zu verschiedenen Zeiten der Deuterierung nach der Korrektur mit den Pufferspektren (s. Kapitel 3.5.2)

¹¹Dabei wird über den Bereich von 1600 cm^{-1} bis 1500 cm^{-1} integriert. Um die möglichen Schwankungen in der Proteinkonzentration zu berücksichtigen, wird das Amid II/Amid I Verhältnis gebildet. Hier wird Gebrauch von dem geringen Einfluss des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauscheffektes auf die Amid I/I' Bande (die Komponenten verschieben sich nur um wenige Wellenzahlen, bleiben aber in der integralen Absorption im Wesentlichen erhalten) gemacht.

4.3.1 $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von NhaA im inaktiven und aktiven Zustand

Der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch wurde sowohl im inaktiven (pH 6,2) als auch im aktiven Zustand (pH 8,2) von NhaA betrachtet. Es wurden zwei voneinander getrennte Experimente durchgeführt. Dabei wurde der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch mit der ATR-Perfusionszelle an zwei verschiedenen Proteinproben jeweils im inaktiven und aktiven Zustand gemessen. In Abbildung 46 sind die prozentualen Anteile der für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen für diese beiden Zustände des Proteins gezeigt.

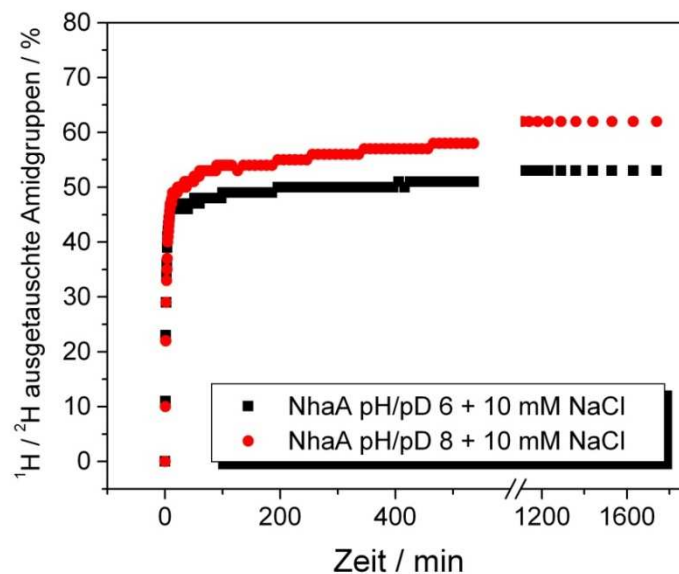


Abbildung 46: Prozentuale Anteil der bei $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch aktiven Amid-Gruppen im inaktiven (pH 6,2 mit 10 mM NaCl) und aktiven (pH 8,2 mit 10 mM NaCl) Zustand von NhaA.

In den ersten Minuten ist der Austausch für beide Zustände (aktiv bzw. inaktiv) ungefähr gleich groß. Nach ca. 5 Minuten sind unabhängig vom Proteinzustand etwa 40 % der Amid-Gruppen für die Lösung zugänglich. Während im inaktiven Zustand nur eine geringe Zunahme in der Zugänglichkeit über die Zeit zu beobachten ist, steigt diese im aktiven Zustand kontinuierlich an. Schon nach 15 Minuten im D_2O -Puffer zeigt der aktive Zustand eine Zunahme in der Austauschrate im Vergleich zum inaktiven Zustand. Nach dieser Analyse tauschen in der ersten halben Stunde etwa 5 % der Amid-Gruppen mehr im aktiven (pH/pD 8,2) als im inaktiven Zustand (pH/pD 6,2) mit Deuterium aus. Nach 300 Minuten vergrößert sich der Austausch um weitere 2 % mit der Aktivierung. Am Ende des Experiments (nach 29 Stunden) waren 52 % bei pD 6,2 und 63 % bei pD 8,2 der Protonen des Proteinrückgrates für die Lösung ausgetauscht.

Das bedeutet, dass mit der Aktivierung etwa 10 % mehr Amidprotonen der Lösung exponiert sind. Damit würde die Aktivierung eine offene, für die Lösung zugängliche Konformation des Proteins induzieren. Dieses bestätigt die Ergebnisse der thermischen Stabilität. NhaA war im inaktiven Zustand thermisch deutlich stabiler als im aktiven Zustand, was auf die geschlossene kompakte Konformation des inaktiven Zustands zurückzuführen ist.

4.3.2 Vergleich Wildtyp / Mutante G338S

Das gleiche Experiment wurde auch für die Mutante G338S durchgeführt (Abbildung 47). Der Austausch ist in drei Zeitbereiche unterteilt. Bei der Mutante erwartet man die gleiche Austauschrate wie beim Wildtyp im aktiven Zustand, da sie unabhängig vom pH-Wert immer im aktiven Zustand vorliegt. Das ist auch am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch zu sehen, es werden keine Unterschiede in der Zugänglichkeit der Mutante zwischen pD 6,2 und pD 8,2 im Zeitbereich I und II beobachtet. Merkwürdigerweise zeigt G338S im ersten Zeitbereich nicht die gleiche Austauschrate wie NhaA im aktiven Zustand.

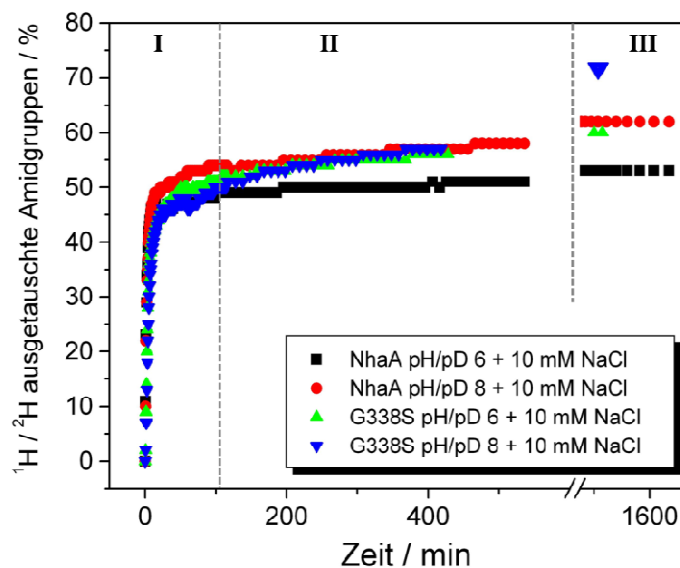


Abbildung 47: NhaA WT und Mutante G338S Vergleich der prozentualen Anteile der für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen für pH/pD 6,2 und pH/pD 8,2. Unterteilung des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches mit Bereich I (0 bis 110 Minuten), Bereich II (110 bis 500 Minuten) und Bereich III (nach 20 Stunden).

Im zweiten Zeitbereich nimmt die Zugänglichkeit der Mutante zu und erreicht den Wert der ausgetauschten Amid-Gruppen für den aktiven Zustand des Wildtyps. Die Unterschiede in der

Zugänglichkeit der Mutante können im Bereich III beobachtet werden. Während nach ca. 20 Stunden bei pH/pD 6,2 der gleiche Anteil der Protonen mit Deuterium ausgetauscht war wie beim Wildtyp pH/pD 8,2, hat sich der Anteil bei der Mutante mit pH/pD 8,2 auf 72 % erhöht. Da diese Erhöhung der Zugänglichkeit erst nach 20 Stunden eingetreten ist, kann das auf die Unstabilität der Mutante bei diesem pD-Wert zurückgeführt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem thermischen Verhalten der Mutante (Kapitel 3.2.2) überein. Bei pD 8,2 zeigt die Mutante eine um 17 °C geringere thermische Stabilität für die α -Helix als bei pD 6,2. Bei pD 6,2 hatte die Mutante die gleiche thermische Stabilität wie der Wildtyp im aktiven Zustand.

4.3.3 $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von WT NhaA mit 100 mM NaCl

Da NhaA ein Na^+/H^+ Antiporter ist, liegt es nahe, dass eine höhere Natriumkonzentration eine höhere Aktivität und damit eine Zunahme in der Zugänglichkeit des Proteins verursacht. Es wurden die gleichen Experimente wie vorher beschrieben durchgeführt, aber mit einer 10-fach höheren Salzkonzentration im Puffer. Dabei wurde der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von NhaA bei drei verschiedenen pH/pD-Werten (pH/pD 6,2, pH/pD 7,2 und pH/pD 8,2) gemessen, um die pH-abhängige Aktivitätszunahme verfolgen zu können. In Abbildung 48 sind die entsprechenden $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschergebnisse dargestellt.

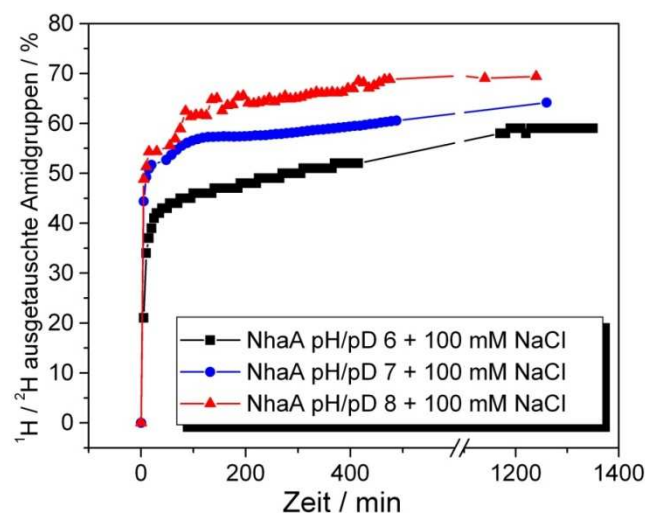


Abbildung 48: $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von NhaA bei drei verschiedenen pH-Werten und einer 100 mM Salzkonzentration. Um die für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen berechnen zu können, wurde das Verhältnis der integrierten Bereiche zwischen der Amid II und Amid I Bande gebildet, s. Kapitel 4.3.

Dabei sind unterschiedliche Austauschraten bei verschiedenen pH/pD-Werten zu beobachten. Wie erwartet und beim $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch mit 10 mM NaCl gesehen (Abbildung 46) nimmt mit steigendem pH/pD-Wert die Menge der ausgetauschten Amidprotonen zu. Nach 5 Minuten in D_2O -Puffer waren bei pD 6,2 21 %, bei pD 7,2 44 % und bei pD 8,2 48 % ausgetauscht. Die Zugänglichkeit des Proteins im inaktiven Zustand pH/pD 6 erhöhte sich nach 400 Minuten auf 52 %. Im pD 7,2 nahm die Austauschrate um 7 % und im aktiven Zustand pH/pD 8,2 um 15 % im Vergleich zum inaktiven Zustand bei pH/pD 6,2 zu. Am Ende des Experiments, nach ca. 21 Stunden, betrug die Differenz in den ausgetauschten Amid-Gruppen zwischen inaktiven pH/pD 6,2 und aktiven Zustand pH/pD 8,2 ca. 11 %, was mit den beobachteten Ergebnissen mit 10 mM NaCl (Kapitel 4.3.1) übereinstimmt.

Am Anfang des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches, nach 5 Minuten, beobachtet man zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand eine Zunahme in der Austauschrate mit der Aktivierung. Diese Zunahme war im gleichen Experiment mit 10 mM NaCl nicht zu sehen. Auch wenn am Ende der beiden Experimente mit 10 mM NaCl bzw. 100 mM NaCl der gleiche Unterschied in den ausgetauschten Amidprotonen zwischen inaktiven und aktiven Zustand beobachtet wurde, wurde die Differenz am Anfang des Austausches zwischen diesen beiden Zuständen nur bei der Probe mit 100 mM NaCl beobachtet. In Abbildung 49 ist der Vergleich zwischen den ausgetauschten Amid-Gruppen für den aktiven und inaktiven Zustand für 10 mM bzw. 100 mM NaCl dargestellt.

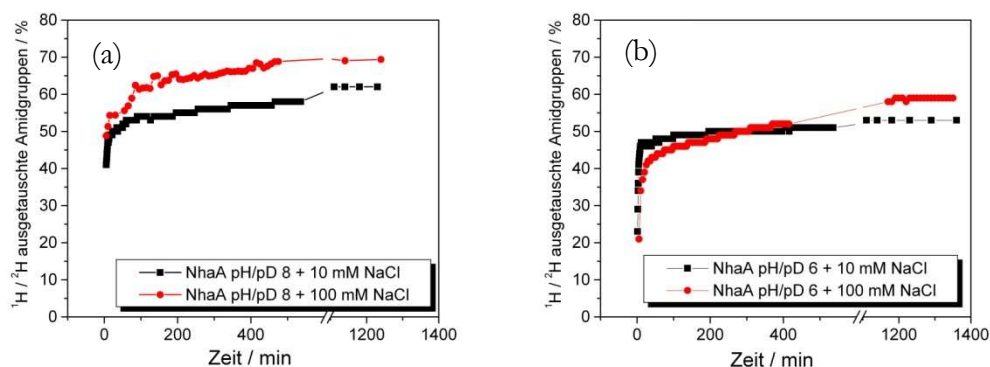


Abbildung 49: Vergleich des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschs a) im aktiven und b) im inaktiven Zustand mit 10 und 100 mM NaCl.

Die Darstellung zeigt, dass im aktiven Zustand eine Erhöhung der Salzkonzentration eine Zunahme in der Austauschrate zur Folge hat. Dagegen bestätigen die Daten des inaktiven Zustands, dass dieser nicht wie im aktiven Zustand vorliegendes Protein für die Lösung zugänglich ist. Hier ist nur eine geringe Zunahme in der Austauschbarkeit mit 100 mM NaCl

nach 23 Stunden zu verzeichnen. Die Differenz der ausgetauschten Amid-Gruppen zwischen 10 und 100 mM Salzkonzentration im aktiven Zustand ist in Abbildung 50 dargestellt. In den ersten 5 Minuten des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches verursacht die höhere Salzkonzentration eine Zunahme von 8 % in der Austauschrate. In der nächsten Zeitdomäne, zwischen 10 und 65 Minuten, nimmt die Differenz zwischen diesen beiden Salzkonzentrationen um 4 % ab. Ab 65 Minuten erhöht sich die Anzahl der ausgetauschten Amidprotonen mit 100 mM NaCl auf ca. 10 %, um dann wieder nach 20 Stunden gering abzunehmen. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Zustand der Aktivierung in Verbindung mit höherer Natriumkonzentration die für die Lösung zugänglichste Konformation darstellt.

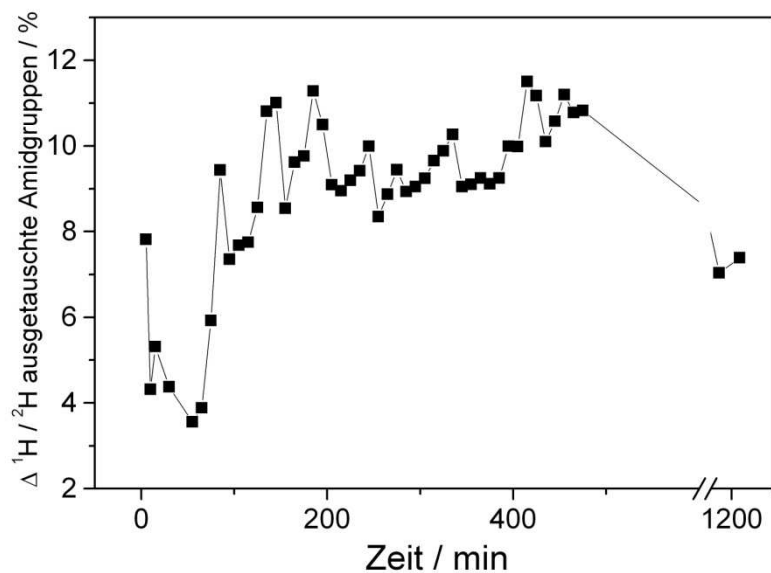


Abbildung 50: Differenz der für die Lösung zugänglichen Amidprotonen im aktiven Zustand zwischen 10 und 100 mM NaCl.

4.3.4 Verteilung der Geschwindigkeitskonstanten im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch

Viele physikalische Phänomene können durch die Differentialgleichungen erster Ordnung beschrieben werden, deren Lösung eine exponentiell abklingende Funktion ist. Die Amplitude des exponentiellen Abfalls und die dazugehörige Abklingrate beinhalten wichtige Informationen des zu untersuchenden Phänomens. Die Daten des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches beschreiben solch einen multiexponentiellen Abfall, der durch die Summe von Exponentialfunktionen (Zwei- oder Mehrphasigkeit) definiert ist (s. Kapitel 3.5.3) [58,59,66-68]. In Abbildung 51 ist die Entwicklung der nicht-ausgetauschten Amidprotonen (^1H) in Abhängigkeit von der Zeit für den Wildtyp und die Mutante dargestellt.

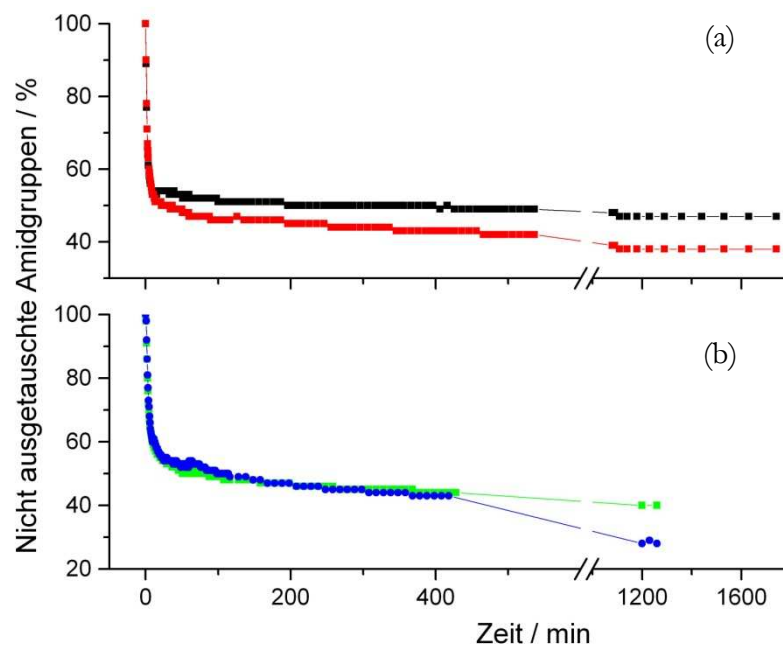


Abbildung 51: $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch der Amid-Gruppen (Amid II / Amid I) in Abhängigkeit von der Zeit von (a) NhaA und (b) G338S: (—) bzw. (—) für pH/pD 6,2 mit 10 mM NaCl und (—) bzw. (—) für pH/pD 8,2 mit 10 mM NaCl.

An dem hier gezeigten $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch sind viele individuelle Amid-Gruppen beteiligt. Doch die zeitliche Auflösung der Daten erlaubt es nicht, für jede am Austausch beteiligte Amidgruppe die Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen. Mit der Anwendung der inversen Laplace-Transformation (ILT) auf die experimentellen Daten (Abbildung 51) wird es aber möglich, eine Verteilung der Geschwindigkeitskonstanten, der für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen zu erhalten. Dabei wurde das CONTIN-Programm von Provencher [60] benutzt.

Das Ergebnis solch einer Anpassung ist am Beispiel von NhaA in pH/pD 6,2 in Abbildung 52 gezeigt. Die Laplace-Transformierte der Verteilungsfunktion (b) ist durch die grüne Linie unter (a) gekennzeichnet. Die Güte der Anpassungsprozedur ist durch eine minimale Abweichung (c) und (d) zwischen der angepassten und der experimentell erhaltenen Kurve gegeben.

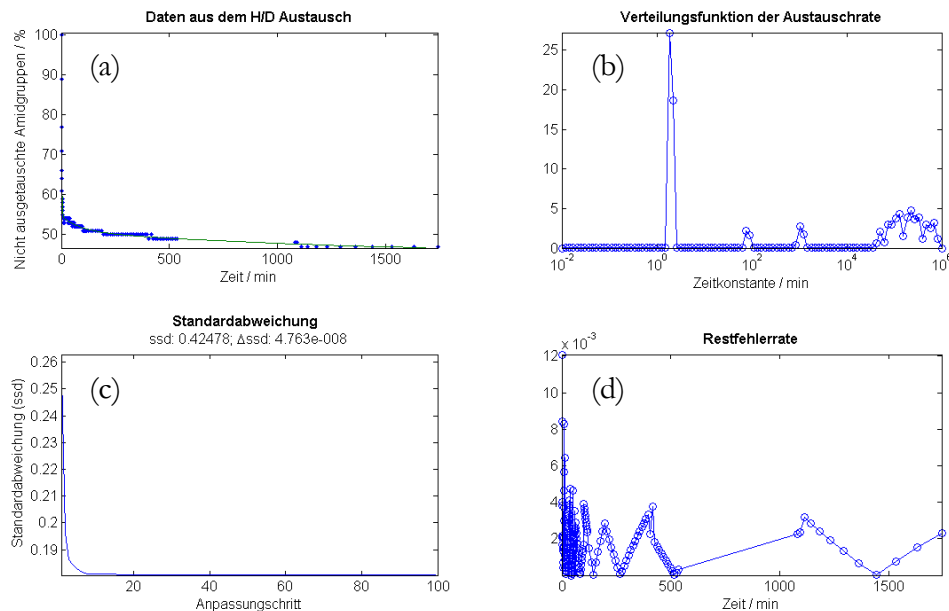


Abbildung 52: Anpassung an die exponentiell abklingende $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschkurve durch Inverse Laplace-Transformation (ILP) am Beispiel von NhaA in pH/pD 6,2. (a) An die Datenpunkte angepasste Kurve (grün). (b) Verteilungsfunktion der Austauschgeschwindigkeiten erhalten durch die ILT von der abklingenden Austauschkurve in (a). (c) Standardabweichung in Abhängigkeit von dem Anpassungsschritt. (d) Differenz zwischen der experimentell erhaltenen $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschkurve und der mathematisch angepassten Kurve.

In Abbildung 53 sind die Laplace-Transformierten der Daten, die in Abbildung 51 gezeigt sind, dargestellt. Dabei ist die Entwicklung der Verteilung der Geschwindigkeitskonstanten gezeigt. Diese Verteilung ist in vier bzw. fünf verschiedene Gruppen unterteilt. Man kann klar zwischen den schnell, mittelschnell, langsam und sehr langsam austauschbaren Amidprotonen unterscheiden.

Sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der Mutante ist ein unterschiedliches zeitliches Verhalten im Austauschprozess zwischen pH/pD 6,2 und pH/pD 8,2 zu beobachten. Im Gegensatz zum WT, wo die Geschwindigkeitskonstanten aller Gruppen zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand verschieden sind, zeigt die Mutante für die schnell ausgetauschten Amid-Gruppen, mit einer Zeitkonstanten von ca. 4 Minuten, keinen Unterschied zwischen pH/pD 6 und pH/pD 8. Die Amid-Gruppen, die mit diesen Geschwindigkeitskonstanten mit der Lösung Protonen austauschen, sind auch beim WT im aktiven Zustand zu finden. Zusätzlich zu diesen Gruppen

weist der WT eine noch schnellere Komponente im aktiven Zustand auf, bei der mit einer Zeitkonstante von ca. 1 Minute die Wasserstoffatome mit Deuterium austauschen. Diese Komponente wird weder im inaktiven Zustand noch bei der Mutante beobachtet.

Die mittelschnelle Gruppe beinhaltet die Amidprotonen, die mit einer Zeitkonstante zwischen 10 und ca. 200 Minuten austauschen, und die langsame Gruppe diejenigen, die mit einer Zeitkonstanten zwischen 200 und 1800 Minuten austauschen. Die sehr langsam austauschbaren Amidprotonen waren im Zeitfenster des Experiments (0-1800 Minuten) nicht für die Lösung zugänglich.

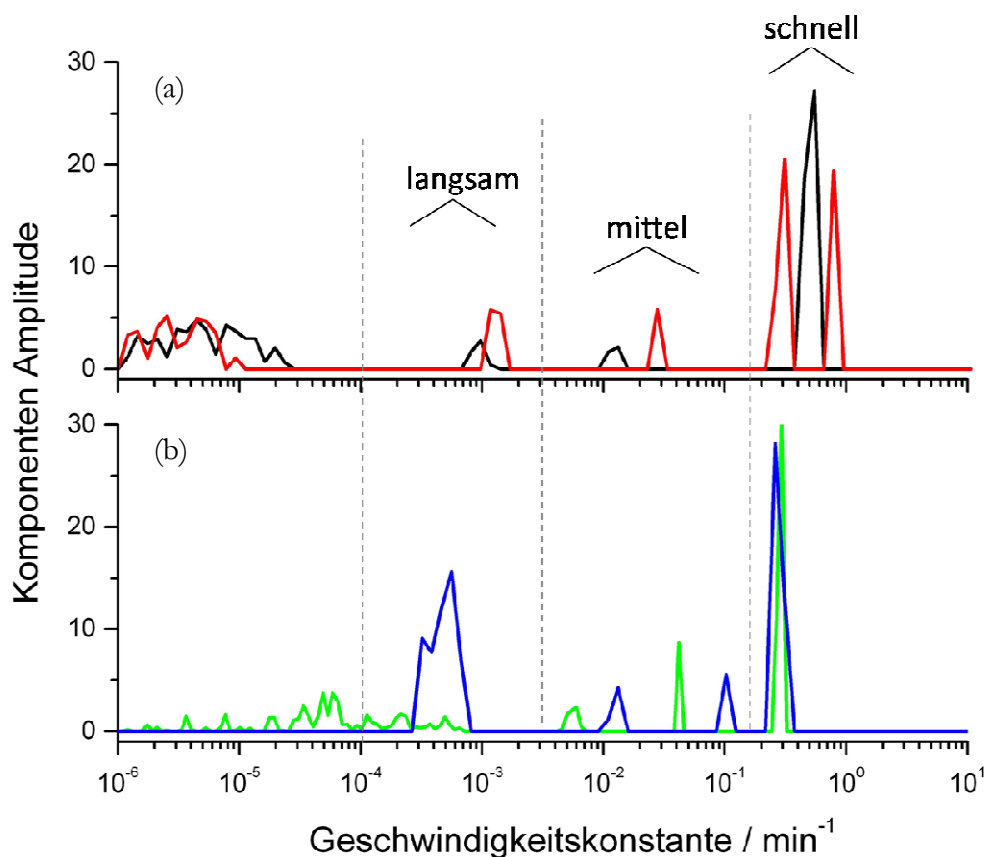


Abbildung 53: Ergebnis der ILT: Verteilungsfunktionen der Amid II Austauschgeschwindigkeiten, erhalten durch die ILT der abklingenden Austauschkurven in Abbildung 51 für (a) NhaA und (b) G338S: (—) bzw. (—) für pH/pD 6,2 mit 10 mM NaCl und (—) bzw. (—) für pH/pD 8,2 mit 10 mM NaCl

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der ILT für NhaA und G338S zusammengefasst. Dabei beobachtet man, dass bei den meisten Amid-Gruppen sehr schnell, mit einer Zeitkonstante von ca. 4 Minuten, Protonen ausgetauscht werden. Im inaktiven Zustand tauschen 46 % der Amidprotonen innerhalb von 2 Minuten aus. Der schnellste Austausch wird im aktiven Zustand beobachtet. Dieser zeigt einen Proteinbereich, in welchem etwa 20 % der Amidprotonen mit

einer Zeitkonstanten von ca. 1 Minute austauschen. Die restlichen 28 % der schnell ausgetauschten Amidprotonen haben eine Zeitkonstante von etwa 4 Minuten. Bei der Mutante findet man nur die zweite Zeitkonstante, wobei hier ca. 42 % der Amidprotonen austauschen. Für den schnellen $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch ist die hydrophile Region des Proteins verantwortlich, in welcher die Amid-Gruppen, die Wasserstoff nur schwach gebunden haben, austauschen. Das bedeutet für den aktiven Zustand des Proteins mit dem schnellsten Austausch von etwa. 20 %, dass im Vergleich zum inaktiven im aktiven Zustand die Wasserstoffbrückenbindungen bei etwa 20 % der Aminosäuren schwächer sind.

Amid II		NhaA	NhaA	G338S	G338S
Komponenten		pH/pD 6	pH/pD 8	pH/pD 6	pH/pD 8
schnell	Zeitkonstante / min	2,02	1,26 und 3,53	3,74	3,53
	Fläche / %	45,85	19,4 und 28	42,7	41
mittel	Zeitkonstante / min		35,94	23,82	9,7
	Fläche / %		5,9	8,6	5,6
	Zeitkonstante / min	83,38		184	83,38
	Fläche / %	3,8		6,7	7,75
langsam	Zeitkonstante / min	1200	777		1400
	Fläche / %	4,9	11,3		16,8
nicht					
ausgetauscht	Zeitkonstante / min	>1800	>1800	>1800	>1800
	Fläche / %	46,1	36,3	48,2	34,4

Tabelle 5: Ausgetauschte Amidkomponenten erhalten durch die Intensitätsänderungen der Amid II Bande in Abhängigkeit von der Deuterierungszeit

In der mittelschnellen Gruppe werden sowohl im aktiven Zustand des WT als auch bei der „pH-unempfindlichen“ Mutante ca. 6 % der Amidprotonen ausgetauscht. Dabei ist der schnellste Austausch bei der Mutante zuerst bei pH/pD 8 mit etwa 10 Minuten, dann bei pH/pD 6 mit etwa 20 Minuten und schließlich beim WT im aktiven Zustand mit etwa 40 Minuten zu beobachten. In diesem Bereich tauschen wahrscheinlich die Amidprotonen der transmembranen α -Helices aus, die erst mit der Aktivierung für die Lösung zugänglich sind. Das wird auch durch den inaktiven Zustand des WT bestätigt, da die entsprechende Komponente mit dieser Zeitkonstante fehlt. Erst nach etwa 80 Minuten im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Experiment findet man im inaktiven Zustand weitere ca. 4 % der Amid-Gruppen, die Protonen mit der Lösung austauschen. Auch bei der Mutante gibt es Gruppen (ca. 7 %), die mit ähnlicher Zeitkonstante austauschen.

Die langsam ausgetauschten Amidprotonen sind in den Regionen des β -Faltblattes oder mehr geordneten, für die Lösung zugänglichen, transmembranen α -Helices lokalisiert. Dabei zeigt der WT im aktiven Zustand mit einer Zeitkonstante von 800 Minuten den schnellsten Austausch der Amidprotonen in dieser Proteinregion. Bei der Mutante beobachtet man nur bei pH/pD 8,2 einen Austausch in dieser Region, wobei dieser mit ca. 17 % am größten von den hier gezeigten Proben ist. Dies spiegelt eine geringere Stabilität der Probe unter diesen Konditionen wider, was auch bei der Untersuchung zur thermischen Stabilität gesehen wurde.

Im Allgemeinen zeigen die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschs, dass die Aktivität mit steigendem pH-Wert zunimmt. Dieses Resultat deckt sich mit den Ergebnissen der tryptischen Spaltung des Proteins [1]. Das Verdauungsenzym Trypsin spaltet die Aminosäurekette an bestimmten Stellen. Zwischen pH 6,5 und pH 7 ist es für Trypsin unmöglich, diese Spaltung durchzuführen, da das Protein bei diesem pH-Wert für die Lösung nicht zugänglich ist (Abbildung 54). Eine Erhöhung des pH-Werts induziert die Änderung der Struktur des Proteins, so dass eine tryptische Spaltung möglich wird. Bei pH 7,2 sind ca. 40 % des Proteins durch Trypsin gespalten, wobei eine Erhöhung auf ca. 80 % mit pH 8,2 zu beobachten ist. Diese Daten stimmen sehr gut mit Daten des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches mit 100 mM NaCl (s. S. 84) überein, wo die Differenz der ausgetauschten Amidprotonen zwischen pH/pD 7,2 und pH/pD 8,2 genau die Hälfte der Differenz zwischen pH/pD 6,2 und pH/pD 8,2 betrug.

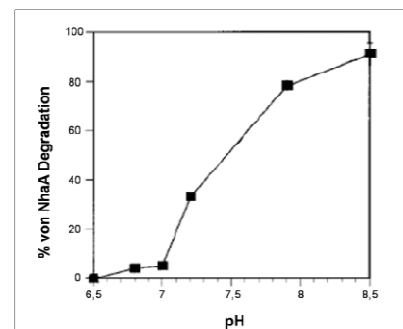


Abbildung 54: Die pH-Abhängigkeit der tryptischen Spaltung von NhaA nach [1]

NhaA ist aus 388 Aminosäuren aufgebaut. Der Vergleich des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches bei verschiedenen pH-Werten zeigt, dass der Unterschied in der Zugänglichkeit zwischen inaktivem (pH/pD 6,2) und aktivem (pH/pD 8,2) Zustand ca. 10 % beträgt. Das bedeutet, dass im Vergleich zum inaktiven Zustand, die Aktivierung eine Konformationsänderung des Proteins induziert, bei welcher zusätzlich ca. 40 Aminosäuren der Lösung exponiert sind. Durch die Anwendung der ILT war es möglich, Informationen über die Austauschrate zu bekommen und aufgrund dieser zwischen den hydrophilen und hydrophoben Regionen des Proteins zu unterscheiden.

Für den hydrophilen Bereich des Proteins erwartet man, dass unabhängig vom Zustand des Proteins alle ^1H durch ^2H austauschen, da diese Region des Proteins im Gegensatz zur hydrophoben Region für eine Lösung zugänglich ist. Bei NhaA befinden sich etwa 42 % des

Gesamtproteins in der hydrophilen Region [6]. Dies stimmt sehr gut mit dem hier beobachteten Ergebnis überein. Innerhalb kürzester Zeit haben etwa 45 % der Amidprotonen unabhängig vom pH/pD-Wert ausgetauscht. Dieses Ergebnis bestätigt, dass alle Amidprotonen im hydrophilen Bereich für die Lösung zugänglich sind und mit dieser austauschen. Das bedeutet, dass der beobachtete Unterschied in der Austauschrate der schnell ausgetauschten Amid-Gruppen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand die Amid-Gruppen der hydrophilen Region des Proteins betrifft.

In der Konformation des aktiven Zustandes waren 20 % der Aminosäureseitenketten schneller am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch beteiligt als im inaktiven Zustand. Das lässt vermuten, dass auch im hydrophilen Bereich des Proteins ein Konformationsunterschied zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand vorliegen muss, der einen schnelleren Austausch im aktiven Zustand erlaubt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in Verbindung mit der höheren Natrium-Konzentration beobachtet. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Bindung monoklonaler Antikörper [11] und zur tryptischen Spaltung [1]. Sie prognostizierten die Konformationsänderungen mit Aktivierung in der hydrophilen Region des Proteins, in welcher die Schleife VIII-IX und der NH_2 -Terminus (s. Abbildung 4b, S. 10) involviert sind. Dieses wird auch durch die MD-Simulation [69] gestützt, wo große Konformationsänderungen in den Schleifenstrukturen mit der Aktivierung passieren. Diese hydrophilen Regionen könnten für die Abtastung des pH-Werts verantwortlich sein, wo das pH-Signal zur Änderung der Aktivität des Proteins führt.

Im Zeitfenster des Experiments waren in allen Experimenten 10 % mehr Amid-Gruppen im aktiven Zustand für die Lösung zugänglich, was auf unterschiedliche Konformation zwischen diesen beiden Zuständen in der im inaktiven Zustand hydrophoben Region des Proteins hindeutet. Damit befinden sich die 40 zusätzlichen Aminosäuren (s. S. 84), die mit der Aktivierung der Lösung exponiert sind, in der im inaktiven Zustand hydrophoben Region des Proteins. Aufgrund der Kristallstruktur wurde ein Aktivitätsmechanismus vorgeschlagen, in welchem es als Reaktion auf das Signal vom pH-Sensor zu einer Konformationsänderung der Helix IX (s. Abbildung 4b, S. 10) kommt, die dann zu einer Reorientierung des TMS IV und XI führt [6].

Die Helix IX beinhaltet 24 Aminosäuren und Helices XI_p und IV_c zusammen mit kurzen Peptiden 21 Aminosäuren. Damit liefert das $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Ergebnis mit 40 Aminosäuren, die im aktiven Zustand zugänglich sind, eine gute Übereinstimmung mit der Anzahl der Aminosäuren, die anhand der biochemischen Daten in die Aktivierung involviert sein sollen. Das stimmt sehr gut mit dem $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Ergebnis von etwa 40 Aminosäuren, die mit der Aktivierung zusätzlich der Lösung exponiert sind, überein.

4.4 Differenzspektren

4.4.1 pH-induzierte Sekundärstrukturänderungen von NhaA

Alle bis jetzt in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Übergang von NhaA vom inaktiven zum aktiven Zustand und umgekehrt mit einer Strukturänderung verbunden sein muss. Die Flexibilitätsuntersuchung mit Hilfe des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches zeigte, dass zusätzlich etwa 10 % des Proteins mit der Aktivierung für eine Lösung zugänglich sind. Damit erwartet man strukturelle Unterschiede zwischen den beiden Zuständen in etwa dieser Größenordnung. Um den Reaktionsmechanismus im Detail verfolgen zu können, sind Differenzspektren nötig. In einem Differenzspektrum werden nur die Gruppen, die sich mit der Aktivierung/Inaktivierung ändern, beobachtet. Mit der Aufnahme reaktions-induzierter Differenzspektren besteht die Möglichkeit, eindeutige molekulare Signaturen für die Zustände „aktiv“ und „inaktiv“ zu erhalten.

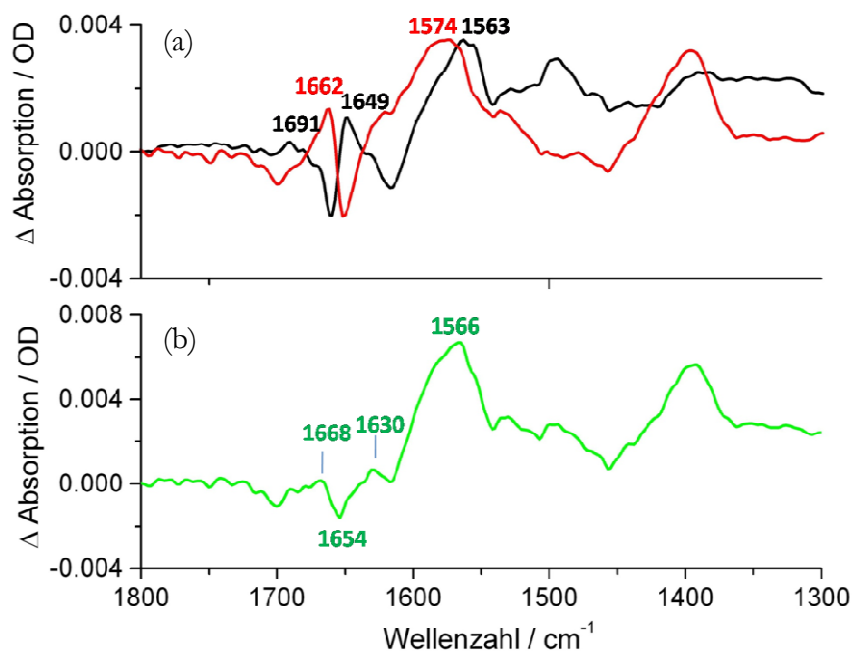


Abbildung 55: NhaA Differenzspektren des inaktiven und aktiven Zustands mit 100mM NaCl. (a) (—) Inaktivierung (NhaA perfundiert mit pH 6,2 minus NhaA perfundiert mit pH 8,2) und (—) Aktivierung des Proteins (NhaA perfundiert mit pH 8,2 minus MjNhaP1 perfundiert mit pH 6,2). (b) Baseline, durch die Addition der Differenzspektren von (a) gebildet.

Abbildung 55a zeigt die NhaA Differenzspektren, die zwischen pH 7,2 und pH 8,2 und umgekehrt aufgenommen wurden. Dabei wurde die Proteinprobe in der ATR-Perfusionszelle zuerst mit dem Puffer 1 (pH 7,2 bzw. 8,2) und dann mit dem Puffer 2 (pH 8,2 bzw. pH 7,2)

perfundiert (s. Kapitel 3.6.1). Das letzte aufgenommene Spektrum im Puffer 1 lieferte das Referenzspektrum für die Probe im Puffer 2. Damit ergaben sich die Differenzspektren der Inaktivierung (—) (inaktiv-minus-aktiv) und der Aktivierung (—) (aktiv-minus-inaktiv) von NhaA.

Im Amid I Bereich der Differenzspektren beobachtet man zwei Banden bei 1649 cm^{-1} und 1662 cm^{-1} , die mit der Zustandsänderung einhergehen. Bei der Inaktivierung des Proteins ist die Bande bei 1649 cm^{-1} positiv, die Bande bei 1662 cm^{-1} negativ. Bei der Aktivierung beobachtet man das spiegelbildliche Spektrum. Im Amid II Bereich dagegen sind keine eindeutigen Differenzsignale zu verzeichnen. Hier zeigt der aktive Zustand eine breite Bande mit dem Absorptionsmaximum bei 1574 cm^{-1} und der inaktive Zustand bei 1563 cm^{-1} . Da uns hier nur die Signale der Gruppen, die durch die Änderung des Zustands beeinflusst werden, interessieren, wurden die Differenzspektren mit der Basislinie¹² (Abbildung 55b) korrigiert. Das Ergebnis dieser Korrektur ist in Abbildung 57a dargestellt. Es können deutlich die Komponenten des inaktiven von denen des aktiven Zustands unterschieden werden. Die Differenzspektren zwischen zwei pH-Werten des Puffers¹³ sind ebenfalls in der Abbildung gezeigt.

Die Region von $1800\text{ bis }1700\text{ cm}^{-1}$

In dieser Region werden die Signale durch die C=O Streckschwingung der protonierten Carboxylgruppen der Seitenketten von Asp (Asparaginsäure) und Glu (Glutaminsäure) verursacht (R in Abbildung 56). Die Frequenz dieser Schwingung ist empfindlich gegenüber der Ausbildung einer H-Brückenbindung zu einer polaren Seitenkette (X in Abbildung 56). Je stärker die H-Brückenbindung desto niedrigerfrequenter die Schwingung.

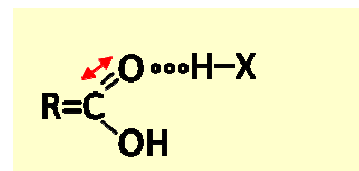


Abbildung 56: H-Brücke zwischen der C=O Gruppe von Asp/Glu (R) und einer polaren Seitenkette

Die Aktivierung des Proteins induziert die Komponenten bei etwa (-) 1748 cm^{-1} , (+) 1741 cm^{-1} , (-) 1734 cm^{-1} , (+) 1728 cm^{-1} , (-) 1717 cm^{-1} , (+) 1707 cm^{-1} und (-) 1697 cm^{-1} , welche Änderungen

¹²Die Basislinie wurde erzeugt, indem die beiden Differenzspektren addiert wurden. Das heißt, die Banden die genau spiegelverkehrt waren, verschwinden im Basislinienspektrum. Das Basislinienspektrum wurde mit einem Faktor der kleiner 1 multipliziert und von den Differenzspektren abgezogen.

¹³Da in dieser Arbeit Phosphatpuffer benutzt wurde, beobachtet man im IR-Spektrum die antisymmetrische und symmetrische Streckschwingung von PO_2^- -Gruppe bei etwa 1230 cm^{-1} und bei etwa 1095 cm^{-1} [70]. Bei pH 7,2 ist die Absorption der Phosphatgruppen im Bereich von 1250 cm^{-1} bis 1050 cm^{-1} kleiner als beim pH 8,2, was sich im Differenzspektrum durch die negative Bande äußert. Im Amid I und II Bereich sind keine Störsignale des Pufferdifferenzspektrums zu beobachten.

in den Eigenschaften der Aminosäureseitenkette von Asp und/oder Glu widerspiegeln. Da mit der Aktivierung die Absorptionen dieser Schwingungen zu größeren Wellenzahlen verschoben sind, bewirkt die Aktivierung wahrscheinlich eine Schwächung der H-Brückenbindung zu der C=O Gruppe der Asp und/oder Glu Seitenketten.

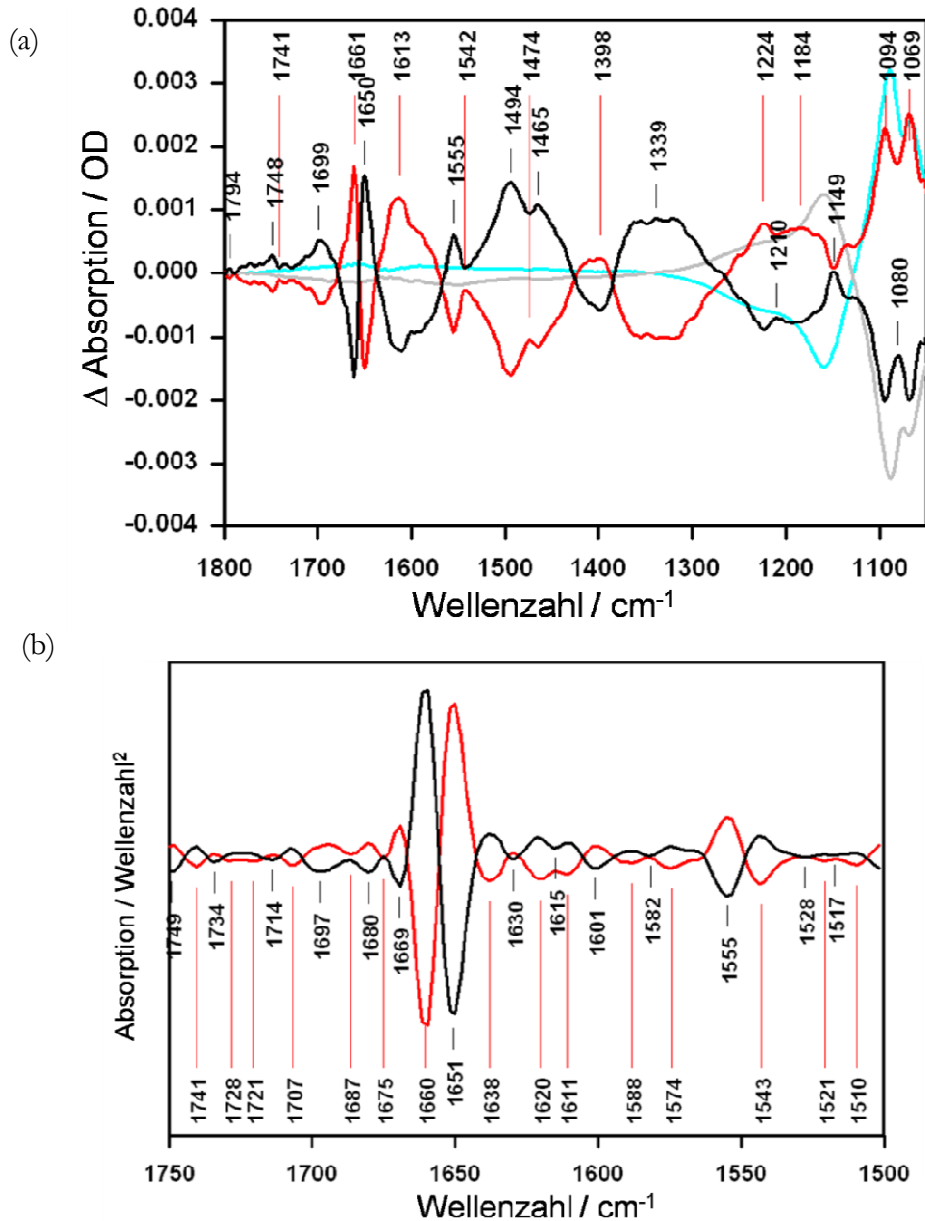


Abbildung 57: (a) Mit der Basislinie korrigierten Differenzspektren von NHaA in pH 7,2 minus NHaA in pH 8,2 (—) und von NHaA in pH 8,2 minus NHaA in pH 7,2 (—). Differenzspektren der Puffer pH 7,2 minus pH 8,2 (—) und pH 8,2 minus pH 7,2 (—). (b) 2. Ableitung der unter a. gezeigten NHaA Differenzspektren.

Die Amid I Region (1700-1600 cm^{-1})

Die Aktivierung des Proteins wird durch die Banden bei 1661 cm^{-1} und 1613 cm^{-1} im Amid I Bereich begleitet. Um die breite Bande bei 1613 cm^{-1} mit der Aktivierung aufzulösen, wurde die

2. Ableitung der Differenzspektren gebildet. In Abbildung 57b sind diese dargestellt. Die zwei größten Signale bei 1660 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} variieren in entgegengesetzter Richtung. Diese Differenzsignale geben wahrscheinlich die Umwandlung der transmembranen α -helikalen Struktur bezüglich Länge, Ordnungsgrad oder Anordnung wieder [71-73]. Die Komponente bei 1660 cm^{-1} kann außer der Änderung der α -Helix, auch die Änderung der Schleifen und/oder der ungeordneten Struktur mit der Aktivierung darstellen, wobei die Bande bei 1650 cm^{-1} in der Literatur meistens der α -Helix im Protein zugeordnet wird [23,37]. Die Maxima bei 1687 cm^{-1} , 1675 cm^{-1} , 1638 cm^{-1} , 1620 cm^{-1} im aktiven Zustand und die bei 1680 cm^{-1} , 1669 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} im inaktiven Zustand können ein Hinweis auf die Änderung der β -Faltblatt Komponente im Protein sein. Die Komponenten bei den Wellenzahlen kleiner als 1630 cm^{-1} können auch durch die Änderungen der Eigenschaften der Aminosäureseitenketten wie Asparagin, Arginin, Glutamin, Lysin, Tyrosin und des β -Faltblatts zustande kommen [74,75]. Die möglichen Signale der β -Faltblatt Komponente werden auch in der Region von 1660 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} beobachtet, die aber auch durch die Änderungen der Schleifen und Aminosäureseitenketten verursacht werden können.

Die Amid II Region ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$)

Die Änderungen der beiden Komponenten in Amid I Region (1661 cm^{-1} und 1650 cm^{-1}) werden durch die Komponenten bei 1555 cm^{-1} mit der Inaktivierung und bei 1543 cm^{-1} mit der Aktivierung begleitet.

In der 2. Ableitung der Differenzspektren (Abbildung 57b) beobachtet man weitere Banden im Absorptionsbereich von 1600 bis 1560 cm^{-1} . Die Differenzsignale in diesem Bereich entstehen durch Änderungen in den Eigenschaften der antisymmetrischen Streckschwingung der COO^- -Gruppe der Seitenkette von Glu und/oder Asp bei Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins. Dabei beobachtet man im aktiven Zustand die Komponenten bei (+) 1588 cm^{-1} , (-) 1582 cm^{-1} , (+) 1574 cm^{-1} und (-) $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$. In der Literatur ist beschrieben, dass eine monodentate oder einzähnige Wechselwirkung der COO^- -Gruppe mit einem Liganden, die Streckschwingung dieser Gruppe zu größeren Frequenzen verschiebt [42,72]. Dass die Positionen dieser Schwingungen in den hier beobachteten Differenzspektren mit der Aktivierung zu größeren Frequenzen verschoben werden, deutet auf eine Wechselwirkung zwischen den COO^- -Gruppen und den Seitenketten von Arg und Lys oder zwischen diesen Gruppen und dem gebundenem Natrium hin.

Die beobachteten Differenzsignale in der Region zwischen 1520 und 1513 cm^{-1} werden durch eine Änderung der Eigenschaften der Tyrosin-Seitenkette verursacht. Mögliche Gründe für diese Änderung bei Aktivierung des Proteins werden ausführlicher in Kapitel 4.4.4 diskutiert.

4.4.2 pH-Titration

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Sekundärstruktur von NhaA genau verfolgen zu können, wurde eine pH-Titration durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, zwischen welchen pH-Werten die größte Änderung in der Sekundärstruktur zu beobachten ist. Der Ausgangspuffer (Puffer 1) war ein Puffer mit dem pH-Wert des aktiven Zustands des Proteins (pH 8,3). Dieser pH-Wert wurde mit Hilfe eines HCl und KCl Gemischs auf pH 7,9, pH 7,5, pH 7,0 und pH 6,0, gesetzt. Dabei wurden die folgenden Differenzspektren gebildet: pH 7,9-minus-pH 8,3 (—); pH 7,5-minus-pH 7,9 (—); pH 7,0-minus-pH 7,5 (—) und pH 6,0-minus-pH 7,0 (—). Diese sind in Abbildung 58a dargestellt. Bei allen Spektren ist eine Sekundärstrukturänderung zu beobachten. Dabei ist die die größte Änderung zwischen pH 7,5 und pH 7,9 und die kleinste zwischen pH 6,0 und 7,0 zu verzeichnen. Dieser Verlauf der Signale mit dem pH-Wert stimmt mit der Studie zu der pH-abhängigen tryptischen Spaltung (Abbildung 54) gut überein. Wie schon beim Differenzspektrum der Inaktivierung (inaktiv-minus-aktiv) in Abbildung 57a gesehen, beobachtet man auch hier bei der Inaktivierung als Folge der Erniedrigung des pH-Werts eine positive Bande bei 1649 cm^{-1} und eine negative Bande bei 1661 cm^{-1} , die den aktiven Zustand des Proteins widerspiegelt.

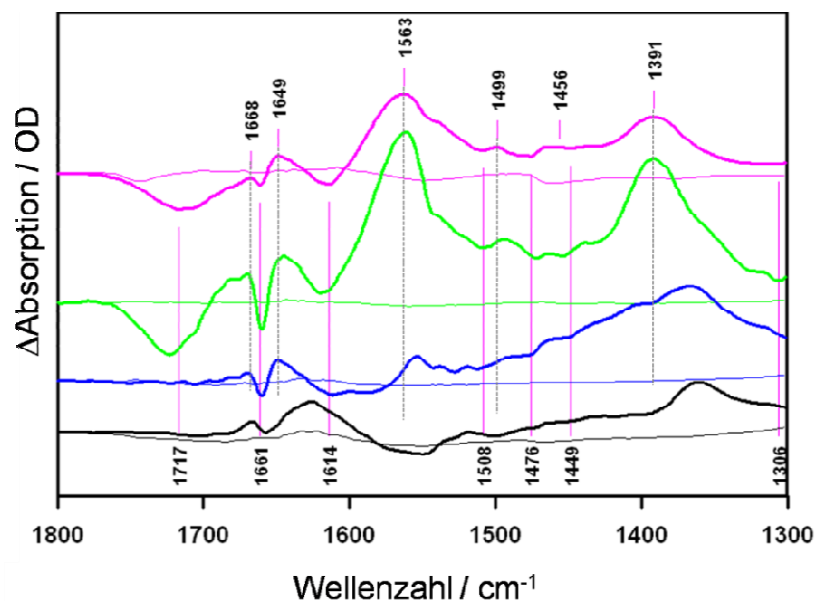


Abbildung 58a: NhaA Differenzspektren bei verschiedenen pH-Werten (dicke Linie) und die dazugehörigen Puffer Differenzspektren (dünne Linie). pH 7,9-minus-pH 8,3 (—); pH 7,5-minus-pH 7,9 (—); pH 7,0-minus-pH 7,5 (—) und pH 6,0-minus-pH 7,0 (—);

Auch die positive Bande bei 1668 cm^{-1} wurde bei den Differenzspektren (pH 7,2-minus-pH 8,2) (Abbildung 57a) beobachtet. Im Gegensatz dazu ist bei den Differenzspektren (pH 7,9-minus-pH 8,3) und (pH 7,5-minus-pH 7,9) eine breite negative Bande bei 1717 cm^{-1} und eine breite positive Bande bei 1563 cm^{-1} bei Inaktivierung des Proteins zu sehen. Die Komponente bei 1563 cm^{-1} wurde schon im unkorrigierten Differenzspektrum (Abbildung 55) beobachtet, allerdings ohne die negative Bande bei 1717 cm^{-1} . Andererseits zeigen die Differenzspektren (pH 7,0 minus pH 7,5) und (pH 6,0 minus pH 7,0) keine Änderungen an diesen Positionen. Diese pH-Werte kennzeichnen aber die inaktive Konformation des Proteins. Das bedeutet, dass die Änderungen dieser Banden mit der Zustandsänderung des Proteins, verursacht durch hohe pH-Werte, zusammenhängen. Diese Änderungen könnten durch Änderungen des pH-Sensors oder durch Änderungen verursacht durch Na^+/H^+ Transport stammen. Bei diesen Wellenzahlen absorbieren die Aminosäureseitenketten von Glu und Asp. Bei diesen ist die Absorption der protonierten Seitenketten (COOH) bei ca. 1716 cm^{-1} und die der deprotonierten Seitenketten (COO^-) bei ca. 1560 cm^{-1} zu finden.

Diese Aminosäuren haben einen pK_s -Wert von 4, d.h. normalerweise liegen sie in einer deprotonierten Form vor. Doch es ist bekannt, dass diese Seitenketten unter bestimmten Bedingungen einen erhöhten pK_s -Wert haben können [76]. Dies wird durch positiv geladene Aminosäuren wie Lys (pK_s -Wert 9,5) in der Umgebung von Glu und Asp erreicht. Das führt dazu, dass in der makroskopischen Umgebung zwar ein hoher pH-Wert vorliegt, aber durch die positiv geladenen Seitenketten eine mikroskopische Umgebung geschaffen wird, in der die Aminosäure in der protonierten Form vorliegen kann.

Durch Simulationen wurden die pK_s -Werte von allen ionisierbaren Seitenketten von NhaA berechnet [77]. Dabei fand man sechs Seitenketten mit Carboxyl-Gruppen (Asp78, Glu82, Glu124, Asp133, Asp163 und Asp164), die einen ungewöhnlich hohen pK_s -Wert haben, von denen Asp133 den höchsten pK_s -Wert hat. Andere Simulationen ergaben, dass die Aminosäure Asp163 und Asp164 an dem Na^+/H^+ Transport beteiligt sind und Asp133 wahrscheinlich eine wesentliche Komponente des pH-Sensors darstellt [78]. In dem dort vorgeschlagenen Zyklus sind Asp163 für die Zugänglichkeitskontrolle und Asp164 für Bindung von Na^+ verantwortlich. Dabei besteht dieser Zyklus des Na^+/H^+ Transports von NhaA aus vier Schritten, bei denen Asp163 bzw. Asp164 jeweils protoniert bzw. deprotoniert werden.

In den durch die pH-Titration erhaltenen Differenzspektren (Abbildung 58a) beobachtet man eine Deprotonierung von Asp bzw. Glu Seitenketten bei Erniedrigung des pH-Werts. Das bedeutet, dass diese Seitenketten nur bei einem pH-Wert $> \text{pH } 8$ der Lösung exponiert sind und somit protoniert werden können. Da diese Protonierungsänderungen bei hohen pH-Werten (pH 8,3 - pH 7,5) passieren, könnten sie Änderungen wiedergeben, die innerhalb des aktiven

Zustands beim Transport von Na^+ und H^+ von NhaA stattfinden. Andererseits könnten diese Änderungen auch durch die Deprotonierung eines Asp oder Glu des pH-Sensors erklärt werden. Damit würde die Erniedrigung des pH-Werts zu einer mit der Konformationsänderung verbundenen Inaktivierung des Proteins, die durch eine Deprotonierung des pH-Sensors ausgelöst wird, führen.

Die 2. Ableitung der Differenzspektren ist in Abbildung 58b gezeigt. Dabei ist zu beobachten, dass die Banden bei 1693 cm^{-1} und 1636 cm^{-1} und bei 1683 cm^{-1} und 1617 cm^{-1} im Differenzspektrum pH 6,0 minus pH 7,0 nicht zu sehen sind. Das bedeutet, dass im inaktiven Zustand keine Änderungen des β -Faltblattes mit Erniedrigung des pH-Werts zu erwarten sind.

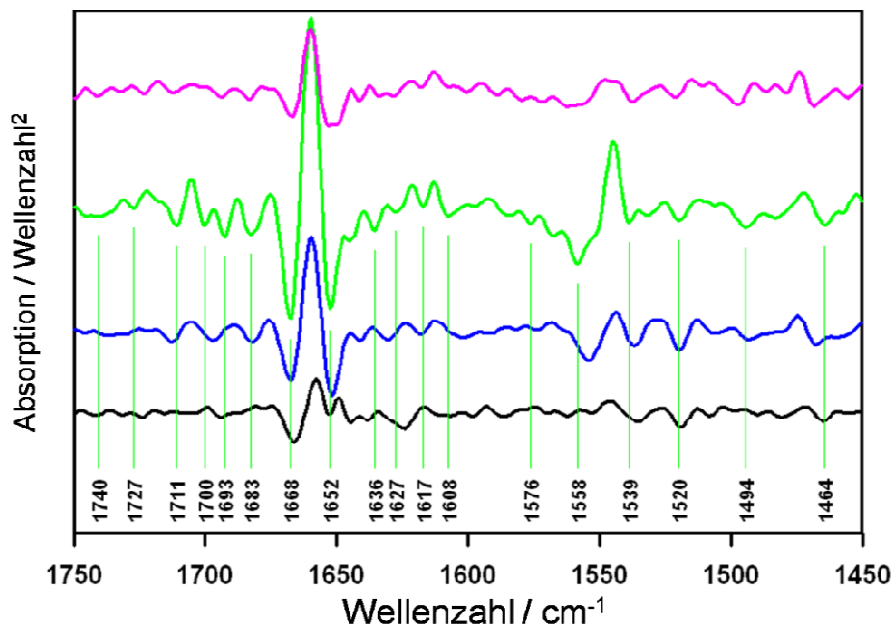


Abbildung 58b: 2. Ableitung der NhaA Differenzspektren gezeigt unter a. pH 7,9 minus pH 8,3 (—); pH 7,5 minus pH 7,9 (—); pH 7,0 minus pH 7,5 (—) und pH 6,0 minus pH 7,0 (—);

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der pH-Titration, dass schon kleine pH-Änderungen einen dramatischen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Antiporters haben. Das bedeutet, dass die Funktion des Antiporters, die pH-Regulation in der Zelle, mit einer Konformationsänderung und einer Protonierungsänderung der Seitenketten von Glu und/oder Asp verbunden ist.

4.4.3 Aktiver /inaktiver Zustand von NhaA – Differenzspektren im D₂O-Puffer

Die Aufnahme der Differenzspektren in D₂O-Puffer sollte eine Fehlinterpretation der Banden im Differenzspektrum in H₂O-Puffer vermeiden. Besonders im Absorptionsbereich der α -Helix und der ungeordneter Struktur kann die Bandenzuordnung nicht eindeutig sein, wenn nur die Differenzspektren im H₂O-Puffer betrachtet werden (s. Kapitel 3.5). Es wurden daher zwei Experimente in D₂O-Puffer durchgeführt.

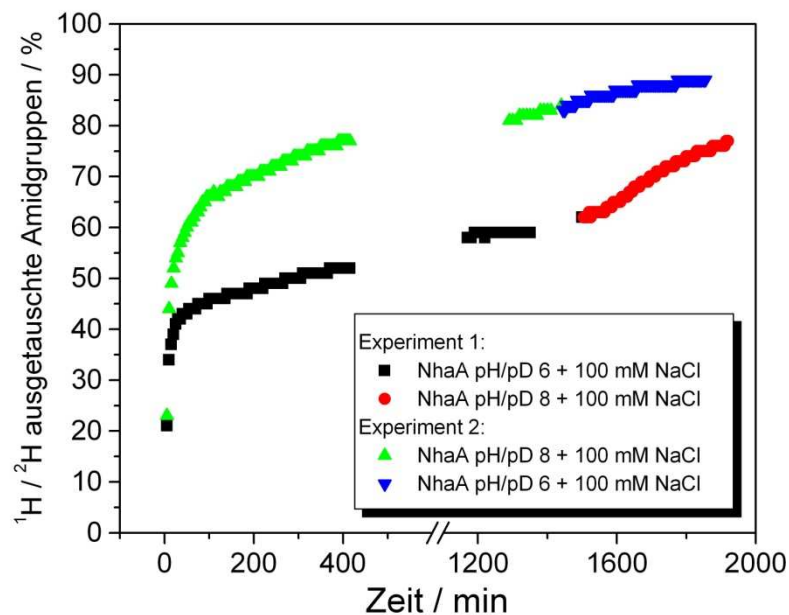


Abbildung 59: Prozentualer Anteil beim ¹H/²H Austausch zugänglichen Amid-Gruppen. Im Experiment 1 wurde die Proteinprobe zuerst mit pD 6 und dann mit pD 8 perfundiert. Im Experiment 2 wurde der umgekehrte Vorgang durchgeführt. Beide Puffer hatten eine 100 mM NaCl Konzentration.

Der Ausgangszustand der Proteinprobe im Experiment 1 war der inaktive Zustand bei pH 6. Zuerst wurde das Protein mit dem D₂O-Puffer pD 6 ca. 24 Stunden lang und danach mit Puffer pD 8 perfundiert. Im Experiment 2 wurde der umgekehrte Vorgang durchgeführt. Dabei war am Anfang des Experiments das Protein im aktiven Zustand bei pH 8. Wie schon bei dem ¹H/²H Austausch mit 100 mM NaCl im Kapitel 4.3.3 gesehen, ist das Protein im aktiven Zustand für die Lösung zugänglicher als im inaktiven Zustand. Der Unterschied bei der hier gezeigten Austauschrate ist, dass bei diesen Experimenten an einer Proteinprobe der pD-Wert erhöht bzw. erniedrigt wurde. Dabei kann man beobachten, dass im Experiment 2 beim Wechsel vom aktiven zum inaktiven Zustand die Austauschrate nicht zunimmt. Dagegen ist im Experiment 1 mit

Erhöhung des pD-Werts eine deutliche Zunahme der zugänglichen Amid-Gruppen zu verzeichnen. Das bestätigt nochmal, dass die Aktivierung des Proteins eine für die Lösung zugänglichere Konformation induziert.

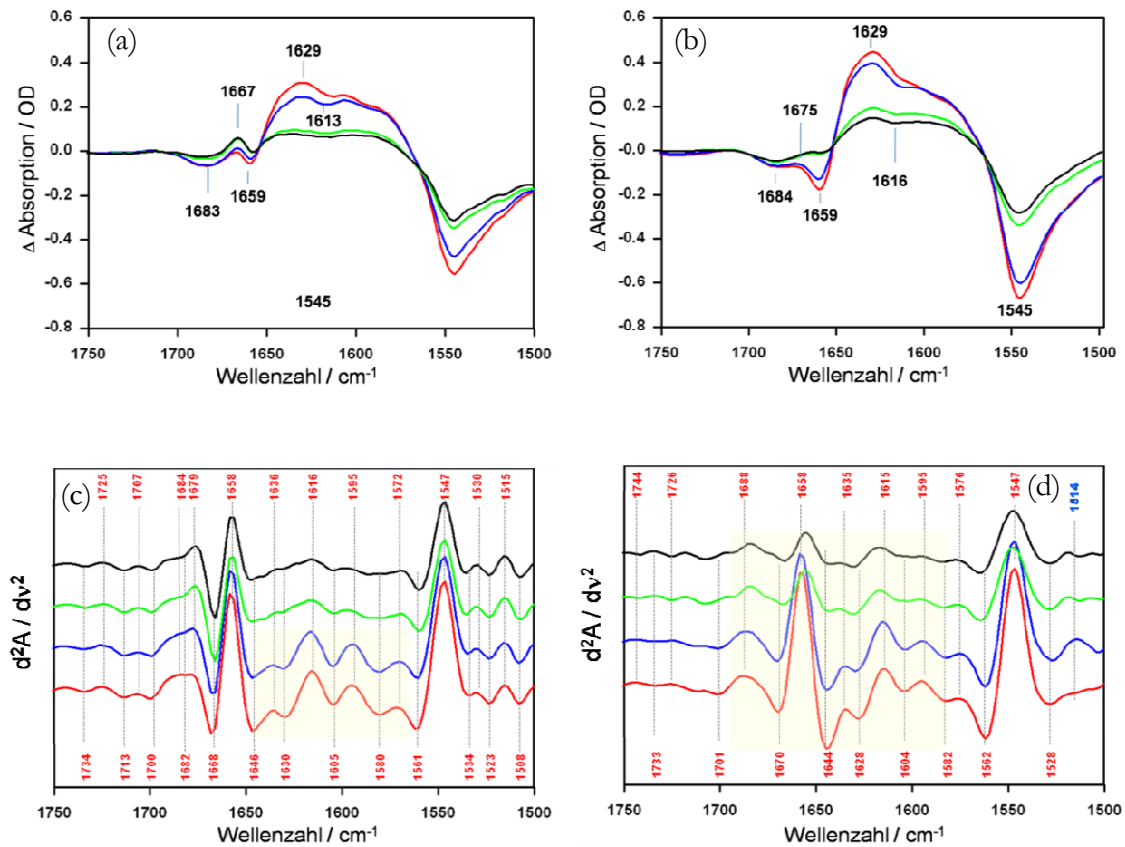


Abbildung 60: (a) Differenzspektren aus Experiment 1 von pD 6 zu verschiedenen Deuterierungszeiten minus pH 6. (b) Die Differenzspektren aus Experiment 2 von pD 8 zu verschiedenen Deuterierungszeiten minus pH 8. (c) die 2. Ableitungen der Differenzspektren unter (a) und (d) die 2. Ableitungen der Differenzspektren unter (b). In allen Abbildungen sind die Farbkodierungen wie folgt: (—) NhaA 5 Minuten in D₂O-Puffer minus NhaA in H₂O-Puffer; (—) NhaA 10 Minuten in D₂O-Puffer minus NhaA in H₂O-Puffer; (—) NhaA 415 Minuten in D₂O-Puffer minus NhaA in H₂O-Puffer; (—) NhaA 20 Stunden in D₂O-Puffer minus NhaA in H₂O-Puffer

Die Frequenz der Amid I Position ist stark von der Art und der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung abhängig. So werden durch den ¹H/²H Austausch die Proteinregionen, die für eine Lösung zugänglich sind und nur schwach Wasserstoff gebunden haben, schon in den ersten 10 Minuten mit dem Deuterium austauschen und dementsprechend wird sich ihre Schwingungsfrequenz zu kleineren Wellenzahlen verschieben. Dagegen werden die Amidprotonen, die starke H-Brückenbindung ausbilden und sich in dem hydrophoben Bereich des Proteins befinden, nur sehr langsam austauschen. So wird es möglich, zwischen verschiedenen Konformationen und zugänglichen Aminosäureseitenketten im Protein zu unterscheiden. Um diese Austauschprozedur bei NhaA in den zwei verschiedenen Zuständen

genau verfolgen zu können, wurden die Differenzspektren aufgenommen. Differenzsignale werden nur Amid-Gruppen geben, die durch den $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch beeinflusst werden.

In Abbildung 60 ist von den NhaA Absorptionsspektren zu den verschiedenen Deuterierungszeiten bei pD 6 (a) oder pD 8 (b) das zugehörige Absorptionsspektrum, vor dem Wechsel zum D_2O -Puffer, in H_2O -Puffer pH 6 oder pH 8 abgezogen worden. Dabei geben die ersten beiden Differenzspektren nach 5 bzw. nach 10 Minuten (in D_2O -minus-in H_2O -Puffer) die Amid-Gruppen, die schnell ihr Wasserstoff durch Deuterium austauschen, wieder.

Im inaktiven Zustand (pH/pD 6) sind negative Banden bei 1683 cm^{-1} und 1659 cm^{-1} und eine positive Bande bei 1667 cm^{-1} zu beobachten. Im aktiven Zustand ist eine Intensitätsabnahme der Banden bei 1684 cm^{-1} und bei 1658 cm^{-1} und eine Intensitätszunahme der Banden bei 1675 cm^{-1} und 1629 cm^{-1} zu finden. Mit der voranschreitenden Deuterierung ist sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand eine Zunahme der Bande bei 1629 cm^{-1} zu beobachten. Um die Wellenzahlverschiebung genau beobachten zu können, wurde die 2. Ableitung der Differenzspektren, (c) pD 6-minus-pH 6 und (d) pD 8-minus-pH 8 gebildet.

Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den 2. Ableitungen der Differenzspektren des inaktiven Zustands zu denen des aktiven Zustands festzustellen. Im inaktiven Zustand ist die Intensitätsänderung im Bereich der Schleifen, der α -Helix und der ungeordneten Struktur zwischen 1668 cm^{-1} und 1646 cm^{-1} schon nach wenigen Minuten abgeschlossen, dagegen passiert die Änderung im β -Faltblatt und Aminosäureseitenketten Bereich, 1630 cm^{-1} und 1610 cm^{-1} , zwischen 10 und 415 Minuten. Im Vergleich dazu beobachtet man im aktiven Zustand bei allen Komponenten eine Wellenzahlverschiebung, was auf die größere Zugänglichkeit in diesem Zustand zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum inaktiven Zustand ist bei dem aktiven Zustand in den ersten Minuten nur eine geringe Änderung im Bereich der Schleifen, der α -Helix und der ungeordneten Struktur zwischen 1670 cm^{-1} und 1644 cm^{-1} zu beobachten.

Um den inaktiven und aktiven Zustand in verschiedenen Proteinregionen besser miteinander vergleichen zu können wurden diese in drei Klassen unterteilt. Für die erste Klasse wurden die Differenzspektren (nach 10 min bei pD 6-minus-pH 6) bzw. für den aktiven Zustand (nach 10 min bei pD 8-minus-pH 8) gebildet. In der zweiten Klasse sind die Differenzspektren der Proteinprobe zwischen 10 und 415 Minuten in D_2O -Puffer. D.h. für den aktiven Zustand sind die Differenzspektren (nach 415 min bei pD 8-minus-nach 10 min bei pD 8) und für den inaktiven Zustand die Differenzspektren (nach 415 min bei pD 6-minus-nach 10 min bei pD 6) gebildet worden. Für die dritte Klasse sind die Differenzspektren zwischen 415 Minuten und 20 Stunden (nach 20 h bei pD 6 (oder pD 8)-minus-nach 415 min bei pD 6 (oder pD 8)) gezeigt. In

Abbildung 61a sind die entsprechenden Differenzspektren und in Abbildung 61b ihre 2. Ableitungen gezeigt.

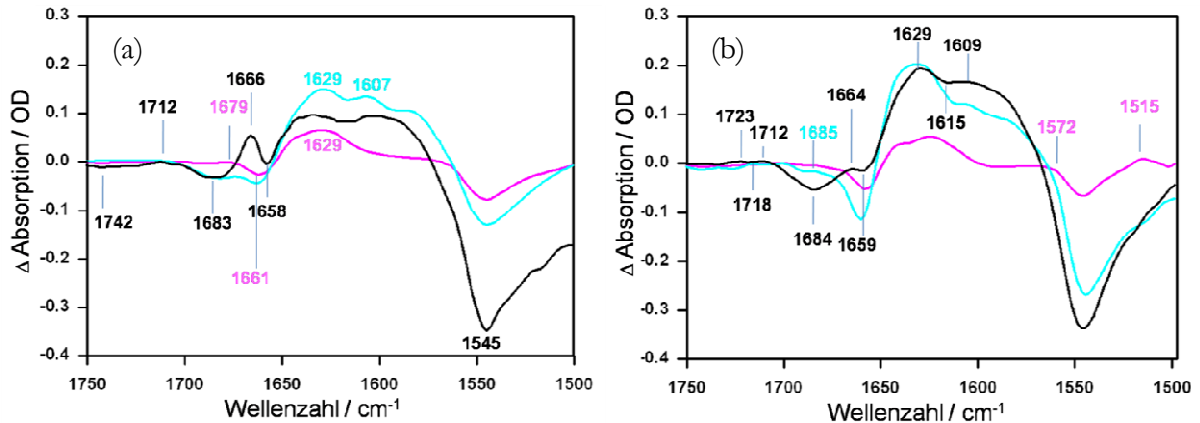


Abbildung 61a: (a) Differenzspektren des inaktiven Zustands, pH/pD 6. (b) Differenzspektren des aktiven Zustands, pH/pD 8. (—) NhaA 10 Minuten in D2O-Puffer minus NhaA in H2O-Puffer; (—) NhaA 415 Minuten in D2O-Puffer minus NhaA 10 Minuten in D2O-Puffer; (—) NhaA 20 Stunden in D2O-Puffer minus NhaA 415 Minuten in D2O-Puffer;

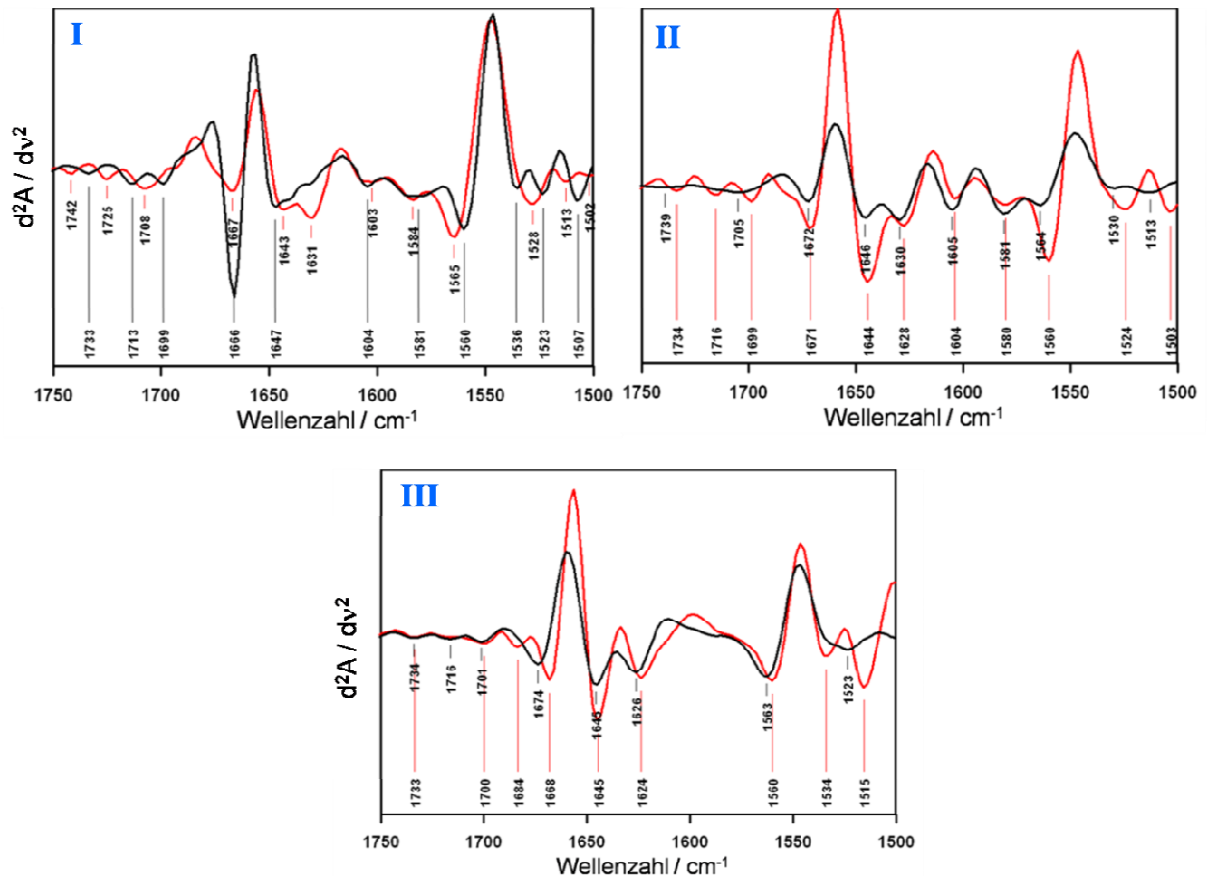


Abbildung 61b: Vergleich der 2. Ableitungen der Differenzspektren in Abbildung 61a für den inaktiven (—) und aktiven (—) Zustand. Klasse I: NhaA 10 Minuten in D2O-Puffer minus NhaA in H2O-Puffer; Klasse II: NhaA 415 Minuten in D2O-Puffer minus NhaA 10 Minuten in D2O-Puffer; Klasse III: NhaA 20 Stunden in D2O-Puffer minus NhaA 415 Minuten in D2O-Puffer.

Klasse I (NhaA nach 10 min in D₂O-Puffer minus NhaA in H₂O-Puffer):

In der Klasse I ist im inaktiven Zustand eine Abnahme der Komponenten bei 1683 cm⁻¹, 1658 cm⁻¹ und 1545 cm⁻¹ und eine Zunahme der Komponenten bei 1629 cm⁻¹ und 1607 cm⁻¹ zu beobachten. Im Gegensatz zum inaktiven Zustand ist beim aktiven Zustand eine Wellenzahlverschiebung und eine geringere Intensität der Komponenten bei 1664 cm⁻¹ und bei 1659 cm⁻¹ und eine größere Intensität der Komponenten bei 1684 cm⁻¹, 1629 cm⁻¹ und 1609 cm⁻¹ erkennbar. Die Elemente, die in dieser Klasse deuteriert werden, sind die Schleifen, ungeordnete Struktur und die Aminosäureseitenketten, die schnell ihre Amidprotonen mit Deuterium austauschen können. Da die Intensitäten der Banden bei (-) 1684 cm⁻¹, (+) 1629 cm⁻¹ und (+) 1609 cm⁻¹ miteinander korrelieren, kommen diese wahrscheinlich durch die C=O Streckschwingung von Glutamin und/oder durch die CN₃H₅⁺ antisymmetrische Streckschwingung von Arginin (Abbildung 62) zustande [23].

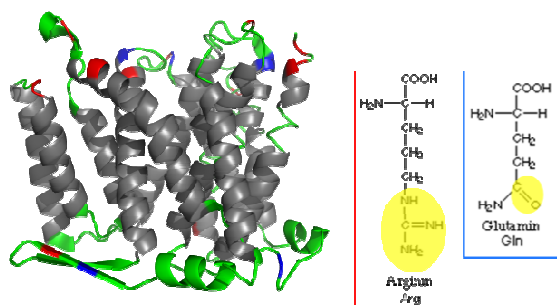


Abbildung 62: Struktur von NhaA Monomer (Positionen von Arg und Gln sind in rot bzw. blau markiert). Rechts im Bild Aminosäuren Arginin und Glutamin mit den markierten Gruppen, die Schwingungen im IR-Spektrum verursachen (s. Text).

Das bedeutet, dass im aktiven Zustand deutlich mehr Glu und/oder Arg für die Lösung zugänglich ist. In der Struktur von NhaA sind 14 Arginine und 6 Glutamine, hauptsächlich im hydrophilen Bereich des Proteins, zu finden. Dieses bestätigt die Ergebnisse des Kapitels 4.3.4, die eine Konformationsänderung zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand im hydrophilen Bereich des Proteins vorhergesagt haben. Weiterhin beobachtet man in den Differenzspektren die Korrelation der Intensitäten der Komponenten bei ca. 1666 cm⁻¹ und der Komponente bei 1658 cm⁻¹. Diese könnten die Änderungen der Schleifen Strukturen widerspiegeln.

In der 2. Ableitung (Abbildung 61b) beobachtet man gleichzeitig mit der Abnahme der Bande bei 1658 cm⁻¹ eine Zunahme der Bande bei 1647 cm⁻¹ im inaktiven und der Bande bei 1643 cm⁻¹ im aktiven Zustand. Diese Verschiebung der Banden kann auf die Deuterierung der ungeordneten Struktur oder der α -Helices, die sich im hydrophilen Bereich des Proteins befinden, zurückgeführt werden. Die Komponente bei 1631 cm⁻¹ wird nur im aktiven Zustand beobachtet. Diese Absorption kann von der C=O Streckschwingung des Glutamins, dass zwischen 1687 cm⁻¹

und 1668 cm^{-1} in H_2O absorbiert [75], oder von den geöffneten Schleifen, die in H_2O bei ca. 1645 cm^{-1} absorbieren [23], stammen.

Klasse II (NhaA nach 415 min in D_2O -Puffer minus NhaA nach 10 min in D_2O -Puffer):

In der zweiten Klasse kann auch eine Änderung zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand beobachtet werden. Dabei nimmt die Intensität der Komponente bei 1658 cm^{-1} im aktiven Zustand mehr ab, während diese im inaktiven Zustand mit Intensitätsabnahme in der Klasse I zu vergleichen ist. Eine weitere Intensitätsabnahme bzw. Zunahme der Banden bei 1683 cm^{-1} und 1609 cm^{-1} wird sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand nicht beobachtet, während die Bande bei 1629 cm^{-1} weiter zunimmt. In der zweiten Ableitung wird ersichtlich, dass auch die Position der Bande bei 1630 cm^{-1} mit der Aktivierung um zwei Wellenzahlen verschoben wird. Diese kann zu Deuterierung des intramolekularen β -Faltblatts zugeordnet werden. Auch bei der Komponente bei 1646 cm^{-1} beobachtet man den gleichen Effekt der Wellenzahlverschiebung und außerdem eine Intensitätszunahme. Dafür nimmt die Intensität der Bande bei 1658 cm^{-1} ab.

Klasse III (NhaA nach 20 Stunden in D_2O -Puffer minus NhaA nach 415 Minuten in D_2O -Puffer):

In der Klasse III beobachtet man eine Deuterierung des intramolekularen β -Faltblatts im inaktiven Zustand anhand der Banden bei 1626 cm^{-1} und bei 1674 cm^{-1} und im aktiven Zustand der Banden bei 1624 cm^{-1} und bei 1684 cm^{-1} . Da die Absorption dieser Struktur mit der Aktivierung zu kleineren Wellenzahlen verschoben wird, kann die Ursache dieser Verschiebung entweder in einer höheren Deuterierung oder aber in der Ausbildung stärkerer H-Brücken mit der Aktivierung liegen.

Für die Komponenten bei 1658 cm^{-1} und 1646 cm^{-1} wird ein ähnlicher Effekt wie in der Klasse II beobachtet. In der Klasse I, wo der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch der ungeordneter Struktur zu erwarten ist, waren keine Unterschiede in der Intensitäten der Bande bei 1648 cm^{-1} zwischen inaktivem und aktivem Zustand zu beobachten. Es liegt nahe, dass die Anteile an ungeordneter Struktur zwischen den beiden Zuständen sich nicht oder nur geringfügig unterscheiden. Das bedeutet, dass die Intensitätsänderungen der Banden bei 1658 cm^{-1} und bei ca. 1646 cm^{-1} zwischen inaktivem und aktivem Zustand (Klasse II und III) auf die Zugänglichkeit der α -Helix zurückgeführt werden können. Die Aktivierung induziert eine Konformationsänderung, an der mehr flexible und für die Lösung zugängliche α -Helices beteiligt sind. Mit der Aktivierung wird auch ein größerer Austausch der Amidprotonen des β -Faltblatts beobachtet. Das bedeutet, dass sowohl α -Helices als auch β -Faltblatt-Strukturen im Aktivierungsprozess von NhaA involviert sind.

4.4.4 pD-induzierte Sekundärstrukturänderung

Im vorherigen Kapitel wurde nur der erste Teil der beiden $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Experimente (Abbildung 59) beschrieben. Hier sollen nun die Differenzspektren zwischen dem aktiven und inaktiven (Experiment 1) und dem inaktiven und aktiven Zustand (Experiment 2) in D_2O -Puffer vorgestellt werden.

In Abbildung 63a sind die Differenzspektren aus Experiment 1 (aktiv-minus-inaktiv) und unter (b) die Differenzspektren aus Experiment 2 (inaktiv-minus-aktiv) gezeigt. Dabei beobachtet man, dass mit der Aktivierung viel größere Änderungen als mit der Inaktivierung (Abbildung 63b) passieren. Dies spiegelt die offene, für die Lösung zugängliche Konformation im aktiven Zustand wider.

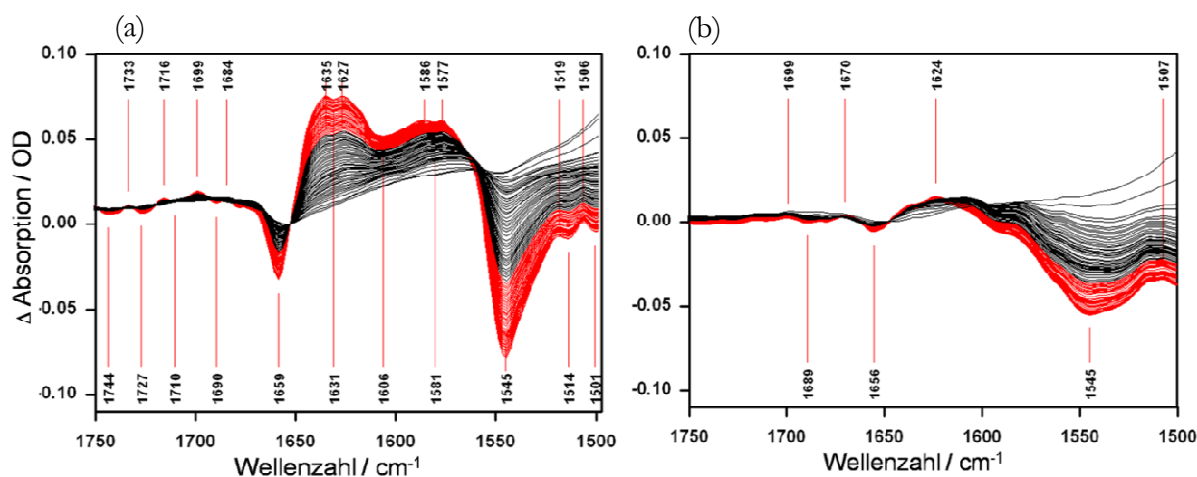


Abbildung 63: (a) NhaA Differenzspektren der Aktivierung (pD 8-minus-25 Stunden bei pD 6); (b) NhaA Differenzspektren der Inaktivierung (pD 6-minus-24 Stunden bei pD 8). In (a) und (b) sind die Farbkodierungen wie folgt: (—) 3 bis 210 Minuten und (—) 215 bis 420 Minuten in dem Aktivierungs- bzw. Inaktivierungspuffer.

Die Differenzspektren der Aktivierung (aktiv-minus-inaktiv) zeichnen sich durch eine Zunahme der Banden im Bereich zwischen 1650 cm^{-1} und 1610 cm^{-1} , sowie durch eine Abnahme der Bande bei 1659 cm^{-1} und der Amid II Bande bei 1545 cm^{-1} aus. Weil das Profil dieser Differenzspektren auch zwischen der Proteinprobe in H_2O - und der Proteinprobe in D_2O -Puffer ohne pH/pD-Änderung gesehen wurde, sind diese Differenzspektren zum Vergleich in Abbildung 64 gezeigt. Besonders in Abbildung 64a wird deutlich, dass ein ähnliches Differenzprofil zwischen dem aktiven und dem inaktiven Zustand, sowie zwischen zwei verschiedenen Deuterierungszeiten des gleichen pD-Werts zu finden ist.

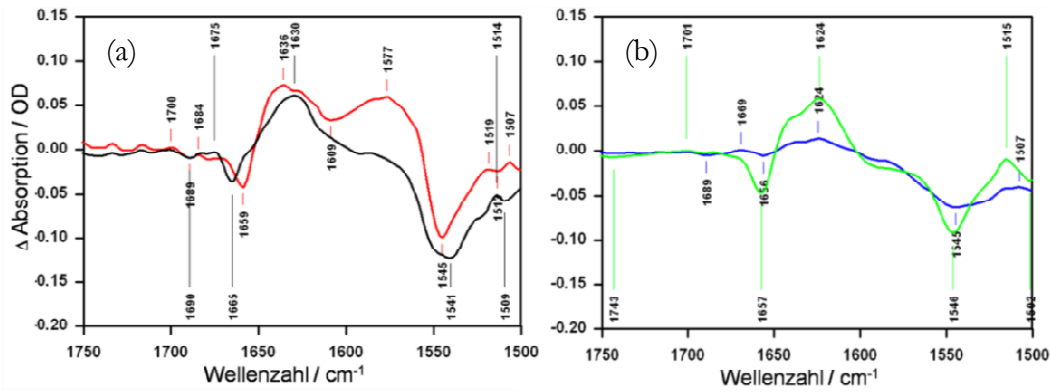


Abbildung 64: Differenzspektren von NhaA: (a) (—) 24 Stunden bei pD 6 minus 415 Minuten bei pD 6 und (—) 420 Minuten bei pD 8 minus 24 Stunden bei pD 6; (b) (—) 24 Stunden bei pD 8 minus 415 Minuten bei pD 8 und (—) 420 Minuten bei pD 6 minus 24 Stunden bei pD 8

Die kleinen Änderungen, die zwischen den beiden Zuständen passieren, können nur schwer aus diesem Differenzspektrum erhalten werden, da sie durch die relativ breiten Banden überlagert werden. Um diese herauszufiltern, wurde von dem Differenzspektrum der Aktivierung (aktiv minus inaktiv) und umgekehrt, das Differenzspektrum bei dem gleichen pD-Wert, aber bei verschiedenen Deuterierungszeiten abgezogen. Das bedeutet, in dem doppelten Differenzspektrum (rot) darstellt. a zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand, kommen nur die Banden, die spezifisch für den jeweiligen Zustand sind, zum Vorschein. Die positiven Banden im roten Differenzspektrum kennzeichnen den aktiven Zustand und die des blauen Differenzspektrums den inaktiven Zustand, von NhaA. Es ist erkennbar, dass das Differenzspektrum der Inaktivierung (blau) nicht das Spiegelbild des Differenzspektrums der Aktivierung (rot) darstellt.

Die Bande bei 1644 cm^{-1} kommt wahrscheinlich durch die Absorption der für die Lösung zugänglichen α -Helices zustande. Man beobachtet aber auch mit der Aktivierung eine positive Bande bei 1666 cm^{-1} , die auch durch die Absorption der α -Helices verursacht werden kann. Das lässt vermuten, dass in die Aktivierung zwei verschiedene Typen von α -Helices involviert sind: a) die Aktivierung des Proteins führt zu einer Zunahme der Flexibilität einer oder mehrerer α -Helices, die aber nicht für die Lösung zugänglich sind und aufgrund der schwächeren H-Brückenbindung statt bei 1658 cm^{-1} , bei 1666 cm^{-1} absorbieren; b) die α -Helices, die sich im inaktiven Zustand in der transmembranen Region des Proteins befinden, werden mit der Aktivierung der Lösung exponiert. Diese α -Helices sind für eine Lösung zugänglich und absorbieren aufgrund des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschs bei kleineren Wellenzahlen, statt bei 1658 cm^{-1} im inaktiven Zustand bei 1644 cm^{-1} im aktiven Zustand des Proteins.

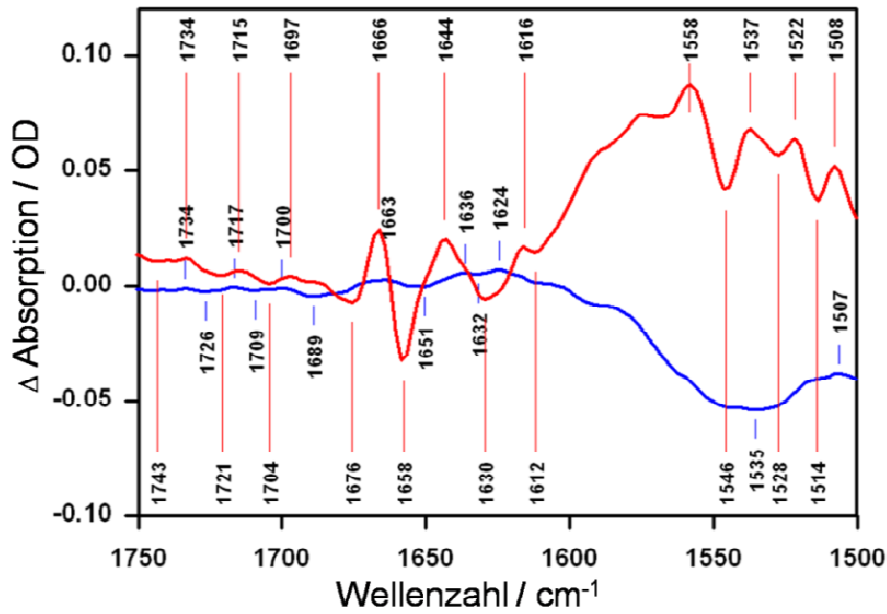


Abbildung 65a: Doppeltes NhaA Differenzspektrum: (—) 420 min bei pD 8-minus-24 h bei pD 6 (korrigiert mit dem NhaA Differenzspektrum 24 h bei pD 6-minus 415 min bei pD 6) und (—) 420 Min bei pD 6-minus-24 h bei pD 8 (korrigiert mit dem NhaA Differenzspektrum 24 h bei pD 8-minus 415 min bei pD 8)

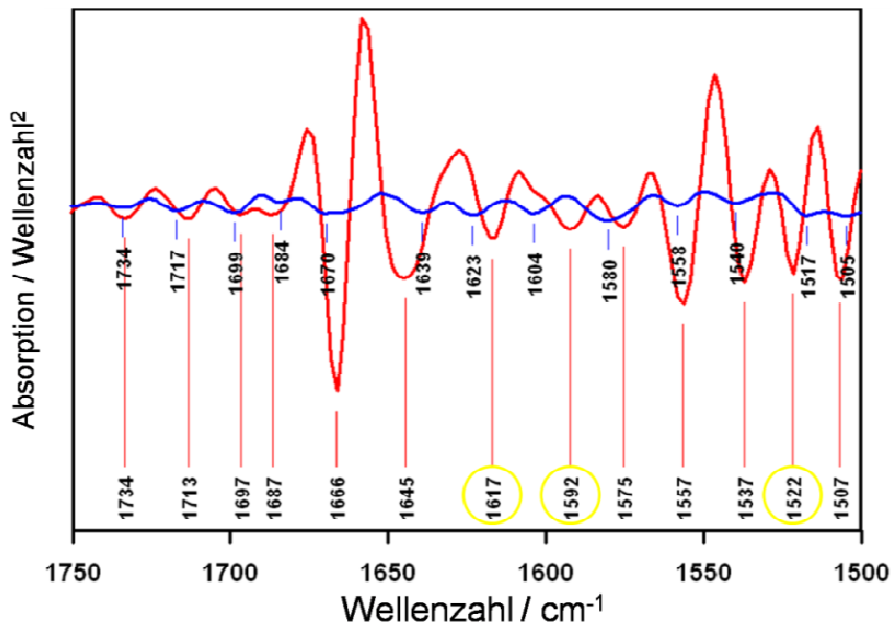


Abbildung 65b: 2. Ableitungen der Differenzspektrale in Abbildung 65a

Die Differenzspektrale zeigen auch eine Änderung der Aminosäureseitenketten des Tyrosins (Tyr) mit der Aktivierung. Da diese Seitenkette auch im Amid II Bereich absorbiert, wurden die 2. Ableitungen der Differenzspektrale (Abbildung 65b) gebildet, um die überlappenden Banden in diesem Bereich aufzulösen. Dabei beobachtet man bei einigen Banden genau das umgekehrte Vorzeichen mit der Inaktivierung bzw. der Aktivierung des Proteins. Diese Banden sind bei

1617 cm^{-1} , 1592 cm^{-1} und 1522 cm^{-1} und entstehen mit der Aktivierung. Die Absorption bei diesen Wellenzahlen werden durch die Schwingungen $\nu(\text{CC})$ und $\delta(\text{CH})$ der protonierten Seitenkette von Tyr verursacht. Das bedeutet, dass die Aktivierung eine Protonierungsänderung oder die Änderung in der Umgebung der Seitenkette von Tyr induziert.

Im NhaA ist Tyrosin an 8 verschiedenen Positionen im Protein zu finden (Abbildung 66). Dabei spielen einige dieser Tyrosinenthaltenden Bereiche, eine wichtige Rolle im Aktivierungsprozess des Proteins. Tyrosin ist an folgenden Positionen im Protein zu finden: a) in der Schleife I, die β -Faltblatt enthält. β -Faltblatt bildet den Hauptkontakt zwischen den zwei Monomeren [14,15]; b) in der Schleife zwischen Helix III und IV_p. Die Helix IV_p ist ein Teil des zytoplasmatischen Trichters, der wahrscheinlich für den Ionentransport verantwortlich ist [6]; c) in Helix V, welche vermutlich zusammen mit dem Trichter die Natriumbindungstasche formt [69]; d) in der Helix IX, welche aufgrund ihrer Konformation in der Lage wäre, das pH-Signal vom pH-Sensor zu übertragen [6]; e) in der Schleife X-XI_c und in der Helix XI_c, die ein Teil des periplasmatischen Trichters bildet. Mit Hilfe der Ergebnisse der Mutante im nächsten Kapitel kann die Position des Tyrosins, die mit der Aktivierung eine Rolle spielt, eingegrenzt werden.

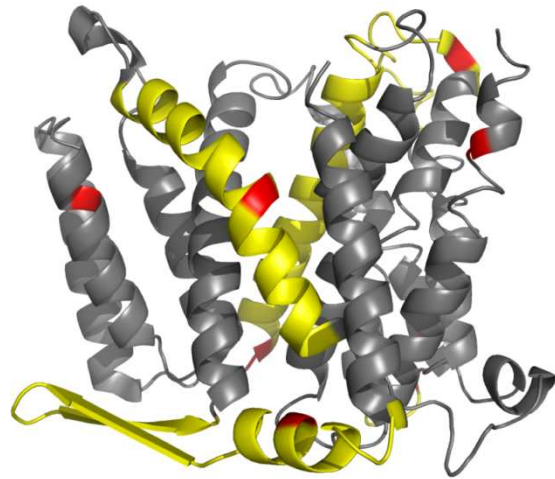


Abbildung 66: NhaA Monomer. Die Regionen, welche eine Rolle bei der Aktivierung spielen und Tyrosin enthalten, sind gelb eingefärbt. Dabei sind alle Tyrosine im Protein rot markiert.

4.4.5 Mutante G338S – Differenzspektren in D₂O-Puffer

Im Kapitel 4.3.2 wurde der ¹H/²H Austausch für die immer aktive Mutante von NhaA, G338S, diskutiert. Hier sind nochmal die für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen für pH/pD 6,2 und pH/pD 8,2 für den Zeitbereich zwischen 0 und 428 Minuten des ¹H/²H Austauschs gezeigt (Abbildung 67). Dabei werden keine Unterschiede in der Zugänglichkeit zwischen diesen zwei pH/pD-Werten beobachtet. Das lässt darauf schließen, dass für die Mutante keine großen strukturellen Änderungen zwischen pD 6,2 und pD 8,2 in diesem Zeitbereich zu erwarten sind. Um das zu prüfen, wurden die Differenzspektren zwischen diesen zwei pD-Werten gebildet. In Abbildung 68 ist dieses Differenzspektrum zusammen mit dem Differenzspektrum bei gleichem pD-Wert, aber unterschiedlichen Zeitpunkten im D₂O-Puffer (G338S nach 418 min bei pD 6,2-minus-G338S nach 10 min bei pD 6) gezeigt.

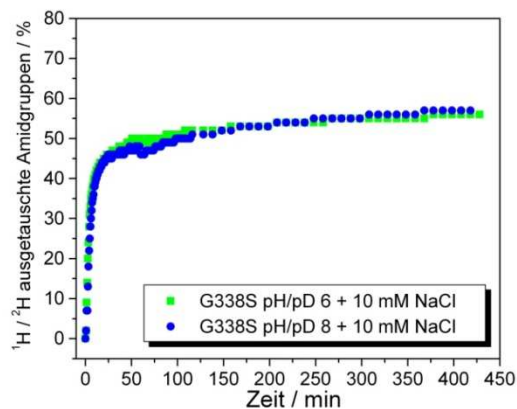


Abbildung 67: Prozentuale Anteile der für die Lösung zugänglichen Amid-Gruppen für G338S pH/pD 6,2 mit 10 mM NaCl und pH/pD 8,2 mit 10 mM NaCl zwischen 0 und 428

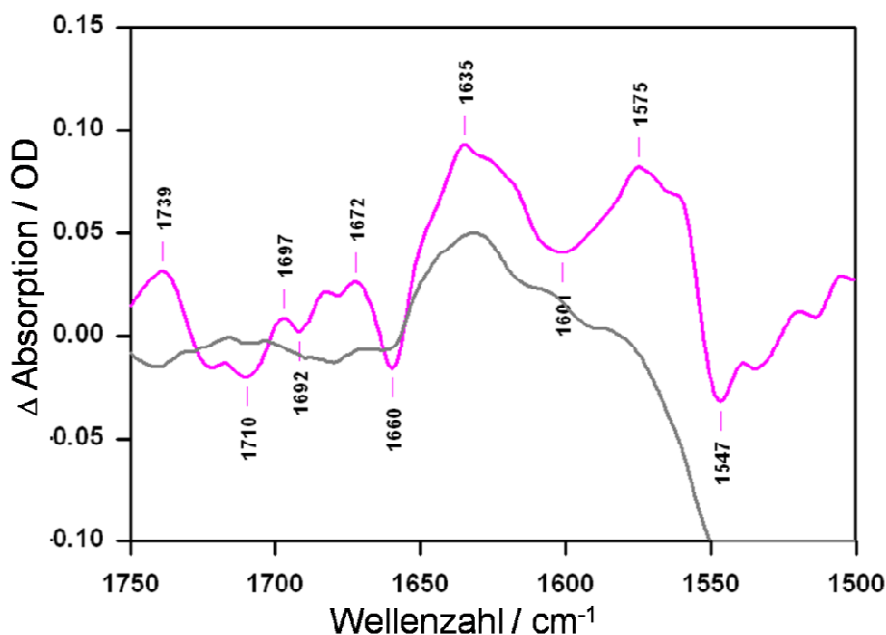


Abbildung 68: Differenzspektren von G338S. (—) (G338S nach 418 min bei pD 8,2-minus-G338S nach 418 min bei pD 6,2). (—) G338S nach 418 min bei pD 6,2-minus-G338S nach 10 min bei pD 6,2.

Wie bereits vorher bei den entsprechenden NhaA Differenzspektren gezeigt wurde, sind die Profile dieser unterschiedlichen Differenzspektren ähnlich. Das bedeutet, dass allen diesen Differenzspektren eine breite Bande im Bereich zwischen 1650 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} gemeinsam ist. Um diese breite Bande herauszufiltern wurde, wie auch bei NhaA, bei der Mutante von dem Differenzspektrum zwischen zwei verschiedenen pD-Werten das entsprechende Differenzspektrum bei gleichem pD-Wert abgezogen. Das Ergebnis, das sich durch schmalere Differenzsignale auszeichnet, ist in Abbildung 69 dargestellt.

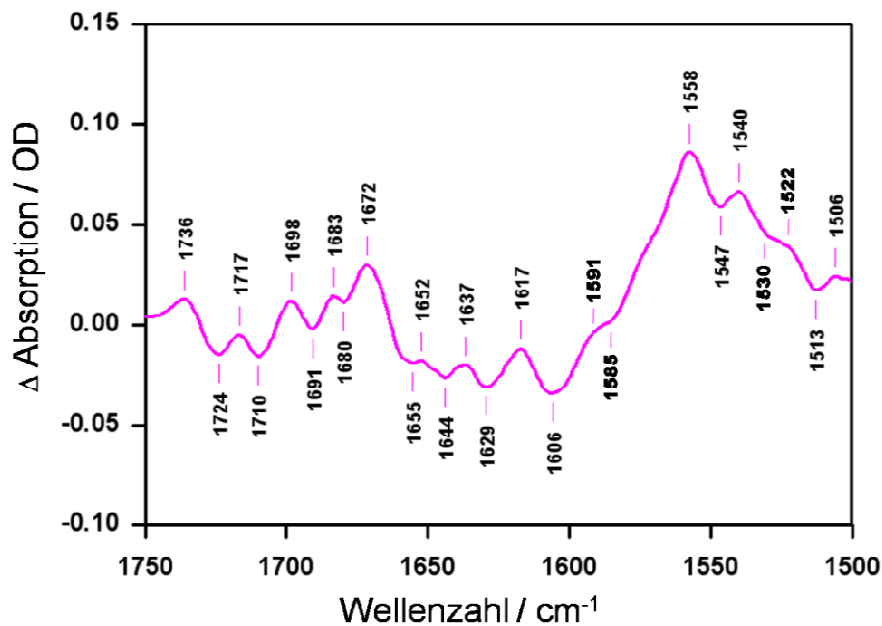


Abbildung 69: Differenzspektren von G338S: nach 418 Minuten bei pD 8,2 minus nach 418 Minuten bei pD 6,2 nach der Korrektur mit dem Differenzspektrum (nach 418 Minuten bei pD 6,2 minus nach 10 Minuten bei pD 6,2) in Abbildung 68 .

Dabei stammen die positiven Banden bei 1698 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} , 1637 cm^{-1} und 1617 cm^{-1} von der Proteinkonformation bei pD 8,2 und die negativen Banden bei 1691 cm^{-1} , 1680 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} und 1606 cm^{-1} von der Konformation bei pD 6,2.

Dieses Differenzspektrum zeigt bei allen Komponenten eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen mit pD 8,2. Die Ursache dieser Verschiebung kann durch die erhöhte Zugänglichkeit (zu diesem Zeitpunkt) und, als Folge dieser, durch die Ausbildung der zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen der C=O Gruppen zum Wasser erklärt werden. Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung kann aber auch direkt eine Folge der Erhöhung des pD-Werts sein, so dass die Aminosäureseitenketten eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen.

Die Verschiebungen der Absorptionen der Schleifen mit pD 8,2 werden von 1691 cm^{-1} zu 1683 cm^{-1} und von 1680 cm^{-1} zu 1672 cm^{-1} beobachtet. Weitere Differenzsignale findet man bei

(-) 1655 cm^{-1} , (+) 1652 cm^{-1} , (-) 1644 cm^{-1} , (+) 1637 cm^{-1} . Aufgrund der kleinen Verschiebung von 3 Wellenzahlen kann die Komponente bei 1652 cm^{-1} zur Absorption der α -Helix zugeordnet werden. Die Komponenten bei (-) 1644 cm^{-1} und (+) 1637 cm^{-1} könnten auch von der mit der Erhöhung des pD-Werts exponierten α -Helix stammen oder von der Absorption des β -Faltblattes, das bei pD 6,2 nicht für die Lösung zugänglich ist. Die Differenzsignale bei (-) 1629 cm^{-1} und (+) 1617 cm^{-1} mit pD 8,2 könnten die Änderungen des intermolekularen β -Faltblattes wiedergeben. Die Absorption bei 1617 cm^{-1} kann aber auch von den C-C Streckschwingung des Tyr-OH stammen.

Vergleicht man dieses Differenzspektrum mit dem entsprechenden Differenzspektrum des Wildtyps, so beobachtet man, dass im Bereich zwischen 1660 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} im Gegensatz zum Wildtyp keine großen Änderungen zwischen den beiden pD-Werten bei der Mutante beobachtet werden. Wie bereits erwähnt (s. Kapitel 4.1.2), ist diese Mutation im transmembranen Segment (TMS) XI (Abbildung 70) zu finden. Dies führt dazu, dass sich die Mutante immer im aktiven Zustand befindet, unabhängig vom pH-Wert. Es wird vermutet, dass TMS IV und XI, welche die Trichter jeweils zu der zytoplasmatischen und periplasmatischen Seite der Membran bilden (Abbildung 70), für die Aktivität des Antiporters essentiell sind [6]. Durch die G338S Mutation können wahrscheinlich diese Segmente ihre Konformation nicht mit der Aktivierung ändern. Das Verfahren zur Simulation der molekularen Dynamik (MD) [69] erklärt den Verlust der pH-Kontrolle bei der Mutante, durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser338 von TMS XI und Lys300 von Helix X. Durch diese Wasserstoffbrückenbindung verliert die Helix X ihre Flexibilität, was eine Konformationsänderung mit dem pH-Wert verhindert. Alternativ kann der Verlust der pH-Kontrolle durch den Verlust des pH-Sensors in der Mutante erklärt werden.

Da in dem Absorptionsbereich der α -Helix und/oder ungeordneter Struktur zwischen 1660 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} die Konformationsänderungen nicht in vergleichbaren Größenordnung bei der Mutante wie bei dem Wildtyp beobachtet wurden, ist dieser Bereich von großem Interesse für die Interpretation der Daten. Aufgrund der Mutation in TMS XI (Abbildung 70) liegt die Vermutung nahe, dass die Änderungen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand, die im Bereich zwischen 1660 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} beobachtet werden, entweder direkt von der Konformationsänderung der TMS IV/XI-Anordnung stammen oder von der Konformationsänderungen jener TMS Regionen, die die Funktionalität der TMS IV/XI-Anordnung mit Änderung des pH-Werts beeinflussen.

Die Mutante zeigte gleiche Zugänglichkeit im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Experiment für pH/pD 6,2 und für pH/pD 8,2. Aufgrund der kleinen Differenzsignale im Bereich von 1660 cm^{-1} bis 1640 cm^{-1} bei der Mutante im Vgl. zum Wildtyp bedeutet das, dass die Strukturelemente, die in diesem Bereich bei der Mutante nicht absorbieren, für einen gleichen Austausch der Mutante zwischen pD 6 und pD 8 verantwortlich sein müssen. Für den Wildtyp heißt das, dass im Gegensatz zum inaktiven Zustand, mit der Aktivierung diese Proteinregion der Lösung exponiert ist und für eine offene Konformation des Proteins im aktiven Zustand sorgt. Damit verursacht diese Region (1660 cm^{-1} bis 1640 cm^{-1}) den Unterschied in der Zugänglichkeit zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Wildtyps. Unter der Annahme, dass TMS IV/XI bei der Mutante mit der Erhöhung des pD-Werts seine Konformation nicht ändert, beruhen die in Abbildung 69 entstandenen Differenzsignale wahrscheinlich u.a. auch auf der Konformationsänderungen des pH-Sensors.

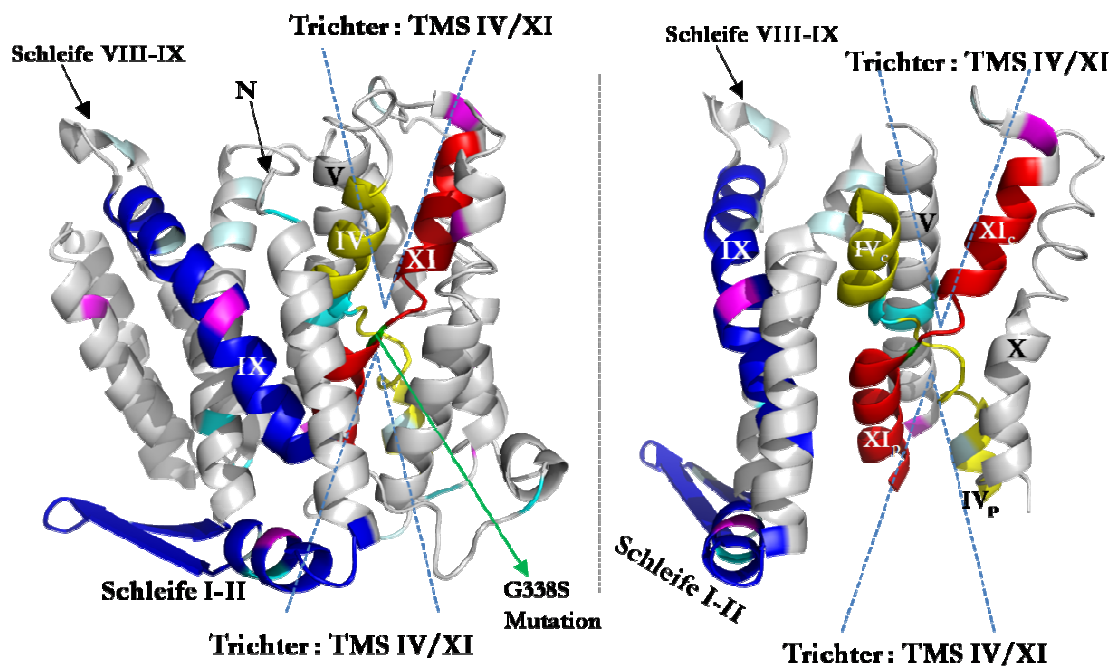


Abbildung 70: NhaA als Monomer. Dabei sind die Aminosäuren Asp - türkis, Glu - hell türkis und Tyr - pink markiert. G338S Mutation ist grün markiert. Rechts im Bild auserwählte TMS und Schleifen, die bei der Aktivität von NhaA wahrscheinlich eine Rolle spielen.

Der Bereich zwischen 1750 cm^{-1} und 1695 cm^{-1} spiegelt die Änderungen der $\text{C}=\text{O}$ Streckschwingung der Aminosäureseitenketten Asp und/oder Glu wider (s. Abbildung 56, S. 94). Beim Wildtyp beobachtet man unterschiedliche Positionen dieser Schwingungen und damit eine veränderte H-Brückenbindung zu der $\text{C}=\text{O}$ Gruppe dieser Aminosäuren. In der Helix IV_c , sowie in Helix V befinden sich die Aminosäuren Asp 133, 163 und 164, die vermutlich an der Bildung der Natrium Bindungstasche beteiligt sind [6]. Eine durch die Mutation verursachte

Änderung in der Stärke der H-Brückenbindung zu der C=O Gruppe von diesen Aminosäuren könnte die Ursache für die vom pH-Wert unabhängige Aktivität der G338S Mutante sein.

Eine weitere Aminosäure, dessen Umgebung sich wahrscheinlich mit der Aktivierung ändert, ist Tyrosin. Sowohl bei der Mutante bei pD 8,2 als auch beim Wildtyp bei pD 8,2 werden die gleichen positiven Komponenten bei 1617 cm^{-1} , 1592 cm^{-1} , 1522 cm^{-1} und 1506 cm^{-1} , was auf die Absorption des Tyrosins hindeutet, beobachtet. Da die Mutante wahrscheinlich keine Differenzsignale des Trichters mit Änderung des pD-Werts wiedergibt, können die Proteinregionen, die Tyr enthalten und bei der Aktivierung eine Rolle spielen (Abbildung 70), eingegrenzt werden. Das bedeutet, dass die beobachteten Änderungen des Tyrosins wahrscheinlich von den Schleifen I-II, III-IV_p, oder X-XI_c oder aber von der Helix IX oder V stammen. Da zusätzlich zu den Änderungen des Tyrosins, die Änderungen in der α -Helix und β -Faltblatt beobachtet wurden, liegt es nahe, dieses Tyrosins wahrscheinlich in einer α -Helix oder im β -Faltblatt zu finden. Darüber hinaus wurden auch die Änderungen in den Eigenschaften von Asp beobachtet.

Die Kandidaten für diese Änderungen sind die Helix IX, die Schleife I-II und Helix V. Für die Helix IX spricht, dass sie wahrscheinlich ihre Konformation als Folge des Signals vom pH-Sensor ändert. Für die Schleife I-II spricht die Tatsache, dass sie sowohl das β -Faltblatt als auch eine kurze Helix, in welcher sich Tyr und Asp befinden, enthält. Das bedeutet, dass die beobachteten Differenzsignale der Mutante von den folgenden Bereichen stammen könnten: a) einer oder mehrerer Schleifen und Helix IX, b) nur von der Schleife I-II c) von der Helix IX und Schleife I-II.

Falls das beobachtete Signal von der Helix IX und den Schleifen stammt, bedeutet das, dass die Mutante G338S zwar immer aktiv ist, aber dennoch einen pH-Sensor hat, welcher aber zur keiner Konformationsänderungen des Trichters führt. Dagegen sprechen die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches, da im Gegensatz zum Wildtyp die Mutante keine erhöhte Zugänglichkeit für das Lösungsmittel $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ mit der Erhöhung des pD-Werts vorweist. Erst nach ca. 20 Stunden im D_2O -Puffer nahm die Austauschrate bei pD 8,2 zu. Das heißt, falls der pH-Sensor eine Konformationsänderung der Schleifen und/oder der Helix IX beinhaltet, dann müsste am Anfang des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches ein Unterschied in der Austauschrate zwischen pD 6,2 und pD 8,2 zu beobachten sein. In der Tat zeigen die Ergebnisse der Verteilung der Geschwindigkeitskonstanten (s. Kapitel 3.4.3), dass im Mittelbereich, wo der Austausch der Amid-Gruppen der zugänglichen α -Helix wahrscheinlich ist, zwischen pD 6 und pD 8 der Unterschied in den Zeitkonstanten etwa 10 Minuten beträgt. Da beim Wildtyp bei pD 6 in diesem Zeitbereich

keine Zugänglichkeit zu beobachten ist, liegt die Vermutung nahe, dass der Effekt bei der Mutante von den geringen Konformationsänderungen der Helix IX stammen könnte.

Eine andere Erklärung ist, dass der pH-Sensor keine Konformationsänderung, aber eine Protonierung/Deprotonierung der Seitenketten, die sowohl im pD 6,2 als auch im pD 8,2 für die Lösung gleichermaßen zugänglich sind, verursacht. Das würde die gleiche Austauschrate für die Mutante zwischen den zwei verschiedenen pD-Werten erklären. Zusätzlich zu den Protonierungen/Deprotonierungen der Aminosäureseitenketten könnten die Änderungen von der Schleife I-II kommen. Diese würde nämlich die Änderungen zwischen dem β -Faltblatt und der kurzen Helix in der Schleife und/oder der Monomer-Monomer Wechselwirkung des Proteins widerspiegeln. Damit würde mit Erhöhung des pD-Werts, das intermolekulare β -Faltblatt zu der kurzen α -Helix stärkere und kürzere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Damit würde sich die Umgebung des Tyrosins ändern (Abbildung 70), dass aber keine erhöhte Lösungsmittel Zugänglichkeit induzieren würde. Als letzte Möglichkeit bleibt die geringe Konformationsänderung der Helix IX, die eine Veränderung des β -Faltblatts verursacht, da sich dieses in ihrer unmittelbaren Nähe befindet.

4.4.6 Ionen induzierte Konformationsänderungen

Die Hauptrolle des NhaA in der Zelle ist die Regulation des pH-Werts sowie des Gehalts an Natrium und Lithium Ionen. Im Gegensatz zu Na^+ und Li^+ hat K^+ keinen Einfluss auf die Transportaktivität des Antiporters. Das bedeutet, dass eine Konformationsänderung die notwendig ist um die Ionenbindungsstelle entweder zur inneren oder äußeren Seite der Membran zu öffnen, nur mit gebundenem Substrat (Na^+ , Li^+ oder zwei H^+) möglich ist. Mit gebundenem Kalium wird diese Konformationsänderung nicht passieren [6]. Im Gegensatz zum inaktiven Zustand von NhaA würde sich aber mit der Aktivierung bei pH 8 und KCl nur die Konformation des Proteinbereichs, der wahrscheinlich für den pH-Sensor verantwortlich ist, ändern. Um die durch die Bindung der K^+ -, Na^+ - und Li^+ -Ionen verursachte Sekundärstrukturänderungen von NhaA zu untersuchen, wurden über die Proteinprobe verschiedene D_2O -Puffer in der folgenden Reihenfolge perfundiert: pD 6 mit 100 mM KCl (240 Minuten); pD 8 mit 100 mM KCl (240 Minuten); nach ca. 10 Stunden bei pD 8 mit 100 mM KCl wurde das Puffer zu pD 8 mit 100 mM NaCl gewechselt und 240 Minuten lang mit diesem Puffer perfundiert und als letzter Perfusionspuffer war pD 8 mit 100 mM LiCl.

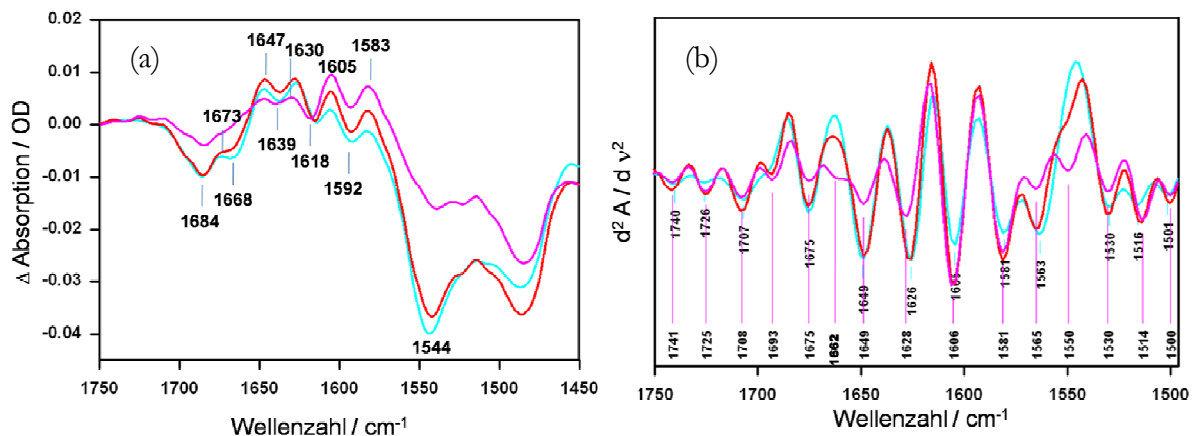


Abbildung 71: (a) NhaA Differenzspektren von allen Spektren wurde die Probe bei pD 6 mit 100mM KCl abgezogen: (—) 240 min bei pD 8 mit KCl-minus-240 min bei pD 6 mit KCl; (—) 240 min bei pD 8 mit NaCl-minus-240 min bei pD 6 mit KCl; (—) 240 min bei pD 8 mit LiCl-minus-240 min lang bei pD 6 mit KCl. (b) 2. Ableitung der in (a) gezeigten Differenzspektren.

In Abbildung 71a sind die Differenzspektren der pD-Aktivierung (pD 8 mit KCl-minus-pD 6 mit KCl), der pD- und Na^+ -Aktivierung (pD 8 mit NaCl-minus-pD 6 mit KCl) sowie pD- und Li^+ -Aktivierung (pD 8 mit LiCl-minus-pD6 mit KCl) gezeigt. Die Änderungen des β -Faltblatts und/oder der Schleifen sind durch die negativen Banden bei 1684 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} und die positiven Banden bei 1673 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} gekennzeichnet. Ein Teil der negativen Komponente bei 1639 cm^{-1} kann auch durch die Absorption von ungeordneter Struktur oder von C=O Streckschwingung der Aminosäureseitenkette des Glutamins (Gln) zustande kommen. Die positive Bande bei 1647 cm^{-1} könnte sowohl von der Absorption der α -Helix als auch von der Absorption der Asparagin-(Asn)-Seitenkette herrühren. Die Differenzsignale bei (-) 1618 cm^{-1} und (+) 1605 cm^{-1} geben wahrscheinlich die Änderungen in der Umgebung des Tyrosins und/oder Arginins (Arg) und die Signale bei (-) 1592 cm^{-1} und (+) 1583 cm^{-1} die Änderungen in den Eigenschaften der Asp Seitenkette mit der Aktivierung des Proteins wieder.

Um zwischen den Konformationsänderungen, die durch die Erhöhung des pD-Werts durch die Natrium-Bindung oder durch die Lithium-Bindung resultieren, unterscheiden zu können, wurden die entsprechenden Differenzspektren gebildet. Dabei ist eine pD-Aktivierung des Proteins durch das NhaA Differenzspektrum (pD 8 mit KCl-minus-pD 6 mit KCl) gekennzeichnet. Die Konformationsänderungen, die durch die Bindung des Natriums verursacht werden, liefern das Differenzspektrum (pD 8 mit NaCl-minus-pD 8 mit KCl) und die Li^+ -induzierten Konformationsänderungen sind durch die positiven Banden des Differenzspektrums (pD 8 mit LiCl-minus-pD 8 mit NaCl) gegeben.

Wie schon in Kapitel 4.4.4 und 4.4.5 gezeigt, ist allen Differenzspektren im D₂O-Puffer eine breite Bande im Bereich zwischen 1650 cm⁻¹ und 1600 cm⁻¹ gemeinsam. Auch bei den hier gezeigten Differenzspektren ist es nicht anders. Demzufolge wurde die Korrektur dieser Differenzspektren mit dem Differenzspektrum bei gleichem pD-Wert, wie vorher beschrieben, vorgenommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 72 dargestellt.

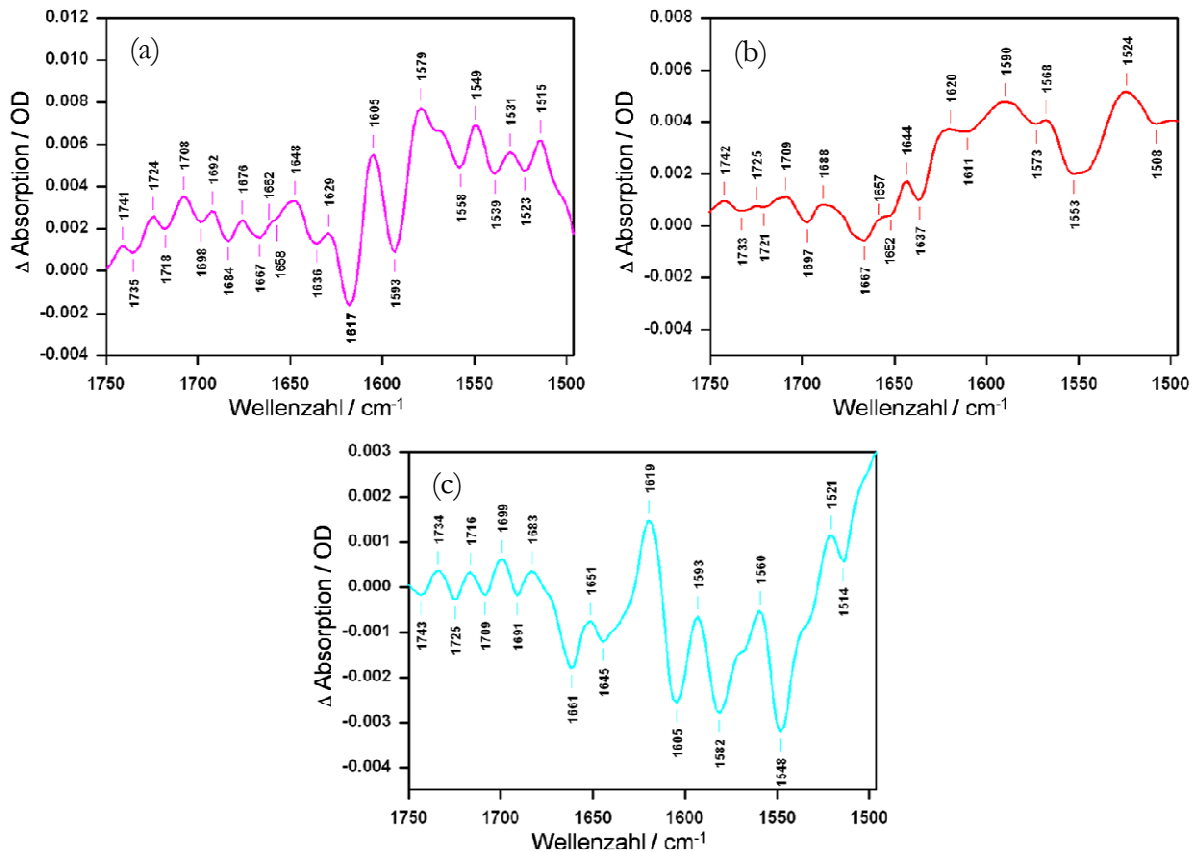


Abbildung 72: Doppeltes NhaA Differenzspektrum:

- (a) pD-Aktivierung: 240 min bei pD 8 mit KCl-minus-240 min bei pD 6 mit KCl
(korrigiert mit dem NhaA Differenzspektrum: 240 min bei pD 6 mit KCl-minus-60 min bei pD 6 mit KCl);
- (b) Na⁺-Bindung: 240 min bei pD 8 mit NaCl-minus-240 min bei pD 8 mit KCl
(korrigiert mit dem NhaA Differenzspektrum: 240 min bei pD 8 mit KCl-minus-60 min bei pD 8 mit KCl);
- (c) Li⁺-Bindung: 240 min bei pD 8 mit LiCl-minus-240 min bei pD 8 mit NaCl
(korrigiert mit dem NhaA Differenzspektrum 240 min bei pD 8 mit NaCl-minus-60 min bei pD 8 mit NaCl);

pD-Aktivierung: Da die Bindung des Kaliums keinen Einfluss auf die Transportfunktion des Antiporters hat, erwartet man zwischen pD 6 und pD 8 nur die strukturellen Unterschiede, die durch die Erhöhung des pD-Werts verursacht werden. Diese stammen wahrscheinlich von der Konformationsänderungen oder Änderung in dem Protonierungszustand des pH-Sensors. In Abbildung 72a ist das zugehörige Differenzspektrum gezeigt. Die größten Differenzsignale beobachtet man in der Region von ca. 1620 cm⁻¹ bis ca. 1560 cm⁻¹, wo die

Aminosäureseitenketten Asp, Glu, Arg und Tyr [23,75] absorbieren. Mit der Erhöhung des pD-Werts von pD 6 auf pD 8 verschwinden die Komponenten bei 1617 cm^{-1} und 1593 cm^{-1} und dafür entstehen die Komponenten bei 1605 cm^{-1} und 1579 cm^{-1} . Bei der Mutante wo auch erwartet wurde, dass die Hauptänderungen zwischen pD 6 und pD 8 von den Konformationsänderungen des pH-Sensors stammen könnten, sind die Änderungen der meisten Banden mit umgekehrtem Vorzeichen zu diesem Differenzspektrum mit Erhöhung des pD-Werts zu beobachten. Im Absorptionsbereich der α -Helix sind auch Änderungen zu beobachten, wobei sowohl die Mutante als auch der Wildtyp eine kleine positive Komponente bei 1652 cm^{-1} bzw. bei 1648 cm^{-1} zeigen. Eine Erklärung wäre, dass der Austausch bei beiden pD-Werten nicht vollständig war (nur 240 Minuten in dem jeweiligen Puffer). Die zweite Möglichkeit ist, dass die beobachteten Änderungen bei der Mutante sich nicht mit den Konformationsänderungen des pH-Sensors erklären lassen.

Na⁺-Bindung: Mit der Bindung des Na⁺ (Abbildung 72b) werden einige Komponenten, die im Differenzspektrum der pD-Aktivierung (Abbildung 72a) beobachtet wurden, zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Dieses sind die Komponenten des β -Faltblattes, die sich von 1692 cm^{-1} nach 1688 cm^{-1} und von 1629 cm^{-1} nach 1620 cm^{-1} verschieben. Weiterhin zeigen die Komponenten im Absorptionsbereich der α -Helix eine Verschiebung, von 1662 cm^{-1} zu 1657 cm^{-1} und von 1648 cm^{-1} zu 1644 cm^{-1} . Dies ist auf die höhere Zugänglichkeit dieser Bereiche mit der höheren Natriumkonzentration zurückzuführen (vgl. Kapitel 4.3.3). Das bedeutet, dass sowohl α -Helix als auch β -Faltblatt in der Na⁺-induzierten Konformationsänderung eine Rolle spielen. Um eine genaue Bandenzuordnung der Aminosäureseitenketten machen zu können, wird das gleiche Differenzspektrum im H₂O-Puffer benötigt. Dieses ist in Abbildung 73 dargestellt. Dabei können zwei breite Hauptsignale mit umgekehrtem Vorzeichen, bei (+) 1644 cm^{-1} und bei 1658 cm^{-1} beobachtet werden. Diese Komponenten werden auch bei dem dazugehörigen Differenzspektrum in D₂O-Puffer beobachtet, allerdings sind diese Komponenten schmaler. Die Tatsache, dass die Komponente bei 1644 cm^{-1} sowohl in H₂O als auch in D₂O-Puffer kommt, zeigt, dass die Bindung des Na⁺ eine Änderung der Eigenschaften der α -Helices verursachen muss.

Die Komponente bei 1677 cm^{-1} wird nicht im D₂O-Puffer sondern nur im H₂O-Puffer beobachtet. Diese kann von der C=O Streckschwingung der Asn (sie absorbiert im D₂O bei ca. 1648 cm^{-1}) und/oder vom Gln (in D₂O bei $1654\text{--}1635\text{ cm}^{-1}$) stammen. Die Differenzsignale bei (-) 1743 cm^{-1} und bei (+) 1715 cm^{-1} werden durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Asp und/oder Glu mit der Bindung des Natriums verursacht. Wie schon im letzten Kapitel diskutiert,

induziert die Aktivierung eine Ausbildung von einer stärkeren H-Brücke zur C=O Gruppe von Asp als das im inaktiven Zustand der Fall ist. Die Bande bei 1598 cm^{-1} verschiebt sich in D_2O zu 1590 cm^{-1} , was auf eine Tyr-O-H Schwingung hindeutet. Dagegen verschiebt sich die Bande bei 1563 cm^{-1} in D_2O -Puffer zu größeren Wellenzahlen (1568 cm^{-1}). Diese Absorption kann der antisymmetrischen Streckschwingung der COO^- Gruppe von Glu zugeordnet werden.

Die Differenzspektren in H_2O und in D_2O -Puffer zeigen, dass die Bindung des Natriums sowohl eine Änderung der Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt) als auch eine Änderung der Eigenschaften der Aminosäureseitenketten (Asp, Glu, Asn, Gln, Tyr) induziert.

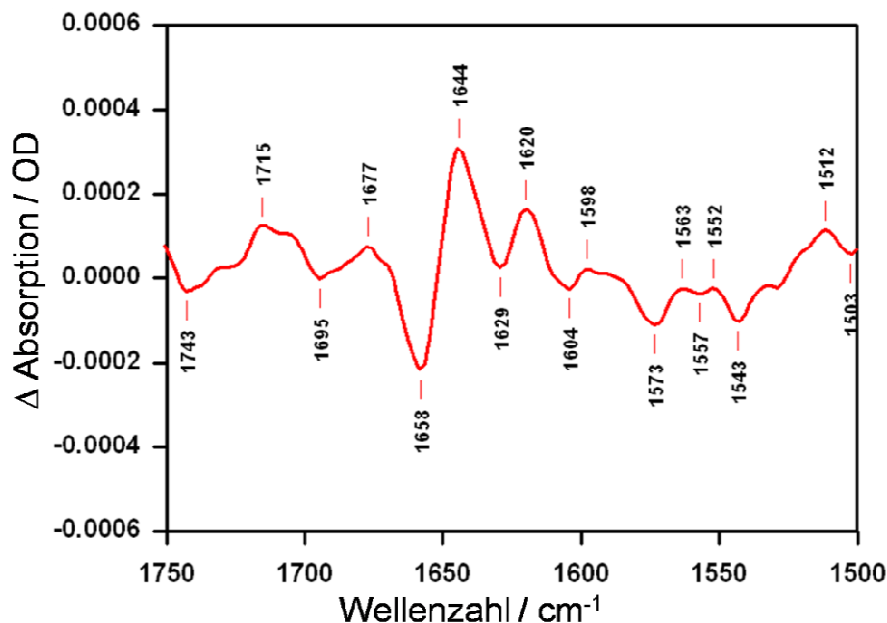


Abbildung 73: Na^+ -induzierte Konformationsänderungen von NhaA in H_2O -Puffer. Differenz zwischen des Proteinspektrums in pH 8 mit 100 mM NaCl und des Proteinspektrums in pH 8 mit 100 mM KCl.

Li^+ -Bindung: Das Differenzspektrum in Abbildung 72c, das die durch die Lithium Bindung verursachten Konformationsänderungen widerspiegelt, ist durch viele Banden, besonders im Bereich zwischen 1620 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} , mit genau umgekehrtem Vorzeichen zu dem Differenzspektrum der pD-Aktivierung (Abbildung 72c) gekennzeichnet. Damit stimmen diese Differenzsignale mit den Differenzsignalen der Mutante überein. Die Lithium Bindung induziert das Verschwinden der Komponenten bei 1645 cm^{-1} und bei 1661 cm^{-1} und das Entstehen der Komponente bei 1651 cm^{-1} . Ähnliches wird auch bei der Mutante in diesem Bereich beobachtet. Dies zeigt, dass mit gebundenem Lithium eine andere Organisation der α -Helices als mit Natrium herrscht. Im Gegensatz zu Zuständen mit K^+ und Na^+ werden zwischen den Zuständen mit Na^+ und Li^+ keine Änderungen der Banden im Bereich des β -Faltblatts beobachtet.

Diese Differenzspektren zeigen, dass die Erhöhung des pD-Werts und die Bindung von Na⁺ und Li⁺ einen unterschiedlichen Einfluss auf die Konformationsänderung des Proteins haben. In Tabelle 6 sind die Bandenpositionen und deren Sekundärstruktur- bzw. Aminosäureseitenketten-Zuordnung von den drei Differenzspektren in Abbildung 72 zusammengefasst.

Banden-zuordnung	pD8KCl -pD6KCl pD-Aktivierung [ν / cm ⁻¹]	pD8NaCl -pD8KCl Na ⁺ -Aktivierung [ν / cm ⁻¹]	pD8LiCl -pD8NaCl Li ⁺ Aktivierung [ν / cm ⁻¹]
Asp, Glu $\nu(\text{C=O})$	1741	1742	1743
	1735	1733	1734
	1724	1725	1725
	1718	1721	1716
	1708	1709	1709
β	1698	1697	1699
	1692	1688	1691
t, β	1684		1683
	1676		
t	1667	1667	
α	1662		1661
	1658	1657	
		1652	1651
α , u, Asn, Gln $\nu(\text{C=O})$	1648	1644	1645
	1636	1637	
β	1629		
β , Tyr-OH (Ring)		1620	1619
	1617	1611	
Tyr-O (Ring); Arg $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$	1605		1605
Arg $\nu_{\text{as}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$; Asp $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$;	1593	1590	1593
	1579	1573	1582
Glu $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$; HisH $\nu(\text{C=C})$;	1558	1568	1560
	1549	1553	1548
	1539		
	1531		
Tyr-OH (Ring)	1523	1524	1521
	1515	1508	1514

Tabelle 6: Bandenposition und -zuordnung der Differenzsignale, die in Abbildung 72 gezeigt wurden. Dabei sind die fett markierten Bandenpositionen, die positiven Signale in den jeweiligen Differenzspektren

4.4.7 Inhibitor-induzierte Sekundärstrukturänderung

Die Aktivität eines Enzyms kann mit Hilfe von Inhibitoren vollständig herabgesetzt oder gehemmt werden. Die Studie der Bindung eines Inhibitors kann somit helfen, die Funktionsweise des Proteins zu verstehen. Die humanen Natrium/Protonen Antiporter werden durch Amilorid (Abbildung 74) und seine Derivate [79] gehemmt. Die Hemmung geschieht wahrscheinlich aufgrund der Strukturanalogie der Guanidino-Gruppe zum hydratisierten Natriumion als Folge der Bindung der Guanidino-Gruppe (Abbildung 74) an die Natrium-Bindungsstelle. Amilorid hat aber keinen Einfluss auf die Aktivität von NhaA. Die Funktion von NhaA wird durch eine dem Amilorid ähnliche Substanz, die auch eine Guanidino-Gruppe besitzt, das 2-Aminoperimidin (AP), (Abbildung 74) gehemmt [79].

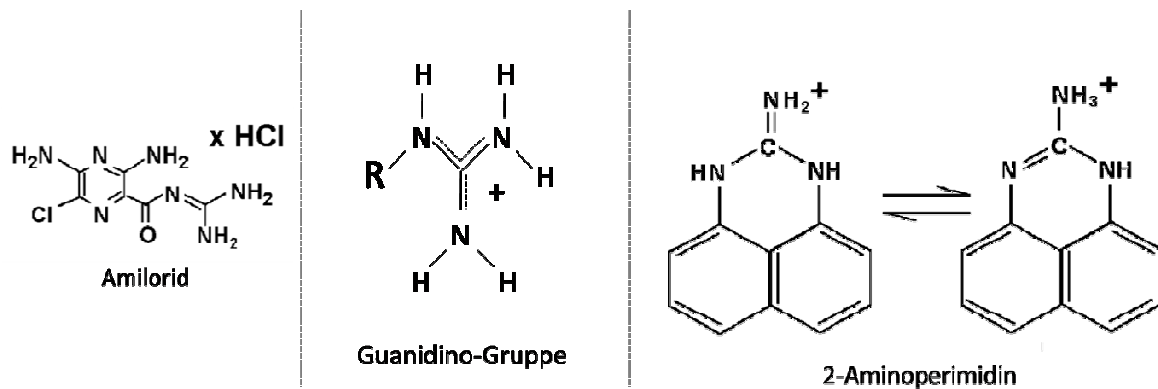


Abbildung 74: Strukturformel von Amilorid, Guanidino-Gruppe und 2-Aminoperimidin nach [79]

Für die Untersuchung der Inhibitor-induzierten Konformationsänderungen wurden zuerst die Differenzspektren in D₂O-Puffer (Abbildung 75) aufgenommen. Dabei war die Reihenfolge der perfundierten Puffer folgende:

1. pD 6 mit 10 mM NaCl (90 Minuten);
2. pD 8 mit 10 mM NaCl (90 Minuten);
3. pD 8 mit 100 mM NaCl (120 Minuten) und
4. pD 8 mit 100 mM NaCl und 2 mM AP (120 Minuten).

Für die Bildung der Differenzspektren wurde jeweils das letzte aufgenommene Proteinspektrum in einem der Puffer benutzt (2.-minus-1., 3.-minus-2. und 4.-minus-3.).

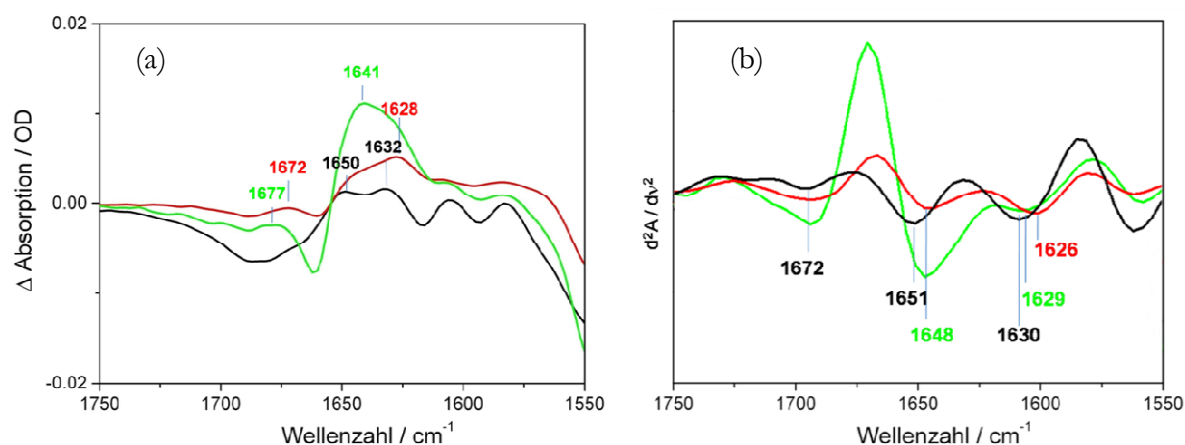


Abbildung 75: (a) NhaA Differenzspektren in D₂O-Puffer:

(—) pD 8 minus pD 6 (mit 10 mM NaCl); (—) pD 8 mit 100 mM NaCl minus pD 8 mit 10 mM NaCl;

(—) pD 8 mit 100 mM NaCl und 2 mM AP minus pD 8 mit 100 mM NaCl.

(b) 2. Ableitung der in (a) gezeigten Differenzspektren

Das Inhibitor-induzierte Differenzspektrum (grün) zeigt eine Zunahme der breiten Bande bei 1641 cm⁻¹ und eine Abnahme der Bande bei 1658 cm⁻¹. Dieses Profil wurde auch schon bei den anderen Differenzspektren in D₂O gesehen. Um eventuelle strukturelle Änderungen, die durch die Bindung des Inhibitors verursacht werden, zu beobachten, wurde von den Differenzspektren die 2. Ableitung (Abbildung 75b) gebildet, die die breiten Banden der Differenzspektren in ihre Komponenten auflöst. Die Zunahme der Komponente bei 1648 cm⁻¹ und die Abnahme bei 1658 cm⁻¹ kann auf einem nicht vollständigen ¹H/²H Austausch der Amid-Gruppen bei pD 8 zurückgeführt werden, da die Proben relativ kurz dem jeweiligen D₂O-Puffer ausgesetzt waren. Das bedeutet, dass die beobachteten Änderungen in diesen Differenzspektren sowohl vom Effekt des ¹H/²H Austausches als auch vom Effekt der Eigenschaften der jeweiligen Puffer auf die Proteinprobe stammen könnten.

Interessanterweise beobachtet man, im Gegensatz zu der Wellenzahlposition der α -Helix bei 1648 cm⁻¹, eine durch Inhibitor induzierte Änderung im Bereich des β -Faltblattes. Mit der Aktivierung des Proteins beobachtet man die β -Faltblatt Komponente bei 1630 cm⁻¹. Eine Erhöhung der Natriumkonzentration verursacht bei pD 8 eine Verschiebung dieser Komponente zu kleineren Wellenzahlen bei 1626 cm⁻¹. Diese Bande geht aber zurück zu 1629 cm⁻¹ mit der Bindung des Inhibitors. Dieses zeigt, dass die Bindung des Inhibitors einen ähnlichen Effekt auf die Struktur des β -Faltblatts haben muss, wie die Änderungen, die durch die pD-Aktivierung in diesem Bereich verursacht werden. Um auszuschließen, dass die beobachteten Änderungen im

β -Faltblatt Bereich, nicht als Folge der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch Effektes auftreten, wurden die Differenzspektren im H_2O -Puffer aufgenommen.

In Abbildung 76 sind die NhaA Differenzspektren (pH 8 mit AP-minus- pH 8 ohne AP) gezeigt. Unter (a) ist das Differenzspektrum vor und unter (b) nach der Korrektur mit dem Differenzspektrum des Puffers dargestellt. Dabei beobachtet man genauso, wie bei dem Differenzspektrum im D_2O -Puffer das intensivste Differenzsignal im β -Faltblatt Bereich, (+) 1626 cm^{-1} und (-) 1618 cm^{-1} . Weiterhin werden die Differenzsignale der α -Helix Komponenten bei (-) 1660 cm^{-1} , (+) 1658 cm^{-1} , (+) 1640 cm^{-1} und (+) 1637 cm^{-1} beobachtet. Die beiden letzten Signale könnten aber auch vom β -Faltblatt oder durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Arg Seitenkette nach der Bindung des Inhibitors stammen. Ein Anteil an der breiten Bande mit dem Minimum bei 1652 cm^{-1} ist wahrscheinlich auf den Restbeitrag des Pufferdifferenzspektrums zurückzuführen.

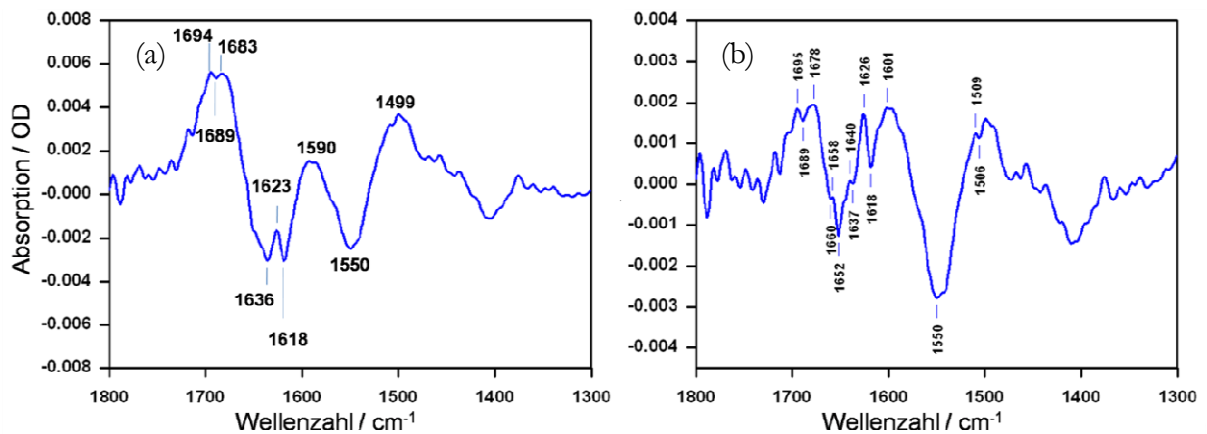


Abbildung 76: (a) NhaA Differenzspektrum in H_2O : pH 8 (10 mM NaCl u. $10\ \mu\text{M}$ AP)-minus-pH 8 (10 mM NaCl); (b) Das Differenzspektrum in (a) nach der Korrektur mit dem Puffer-Differenzspektrum

Da die Natrium-Bindungsstelle im Bereich des Trichters, der durch die α -Helices der TMS IV und XI gebildet werden, erwartet wird, sollte die Bindung des Inhibitors genau an dieser Stelle erfolgen. Die Na^+ induzierten Differenzspektren zeigen eine Komponente sowohl im H_2O als auch im D_2O -Puffer bei 1644 cm^{-1} . Doch bei den Inhibitor induzierten Differenzspektren sind keine korrespondierenden Änderungen in diesem Bereich zu beobachten. Dieses Ergebnis deutet darauf

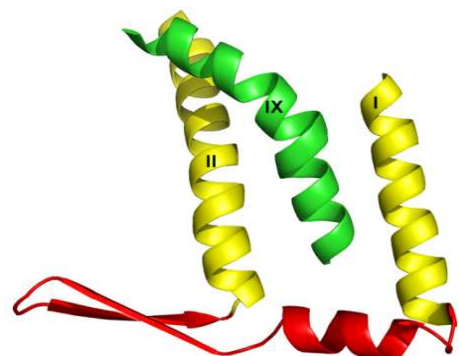


Abbildung 77: α -Helix I und II (gelb), die Schleife I-II (rot) und α -Helix IX (grün) von NhaA.

hin, dass die Proteinregionen, die an der Bindung des Natriums beteiligt sind, sich von der Region, in welcher die Bindung des Inhibitors erfolgt, unterscheiden. Dieses stimmt mit den

Daten der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie überein [80,81]. Dort wurde beobachtet, dass mit der Bindung von AP andere Wechselwirkungen als mit der Bindung des nativen Liganden erfolgen. Zusätzlich induziert der Inhibitor eine Änderung der α -Helix IX, welche wahrscheinlich eine Konformationsänderung als Folge des Signals vom pH-Sensor erfährt. In den IR-Differenzspektren wurde die größte Änderung im Bereich des β -Faltblatts und nicht der α -Helix beobachtet. Das bedeutet, dass die Änderung der Helix IX mit der Bindung des Inhibitors aus den IR Daten nicht ausgeschlossen ist, aber diese Änderung muss mit der Änderung des β -Faltblatts gekoppelt sein. Die Kristallstruktur des Proteins zeigt, dass das β -Faltblatt in der Schleife I-II sich in der unmittelbaren Nähe der Helix IX befindet (Abbildung 77), und durchaus durch die Konformationsänderung dieser direkt oder indirekt beeinflusst werden kann.

TEIL II. Na^+/H^+ ANTIPORTER AUS *M. JANNASCHII*: MjNHAP1

4.5 Sekundärstrukturanalyse

4.5.1 Analyse des Wildtyps in Detergenz mit FTIR-Spektroskopie

Das Protein MjNhaP1 ist der Na^+/H^+ Antiporter aus *M. jannaschii*. In gleicher Weise wie NhaA, der Na^+/H^+ Antiporter in *E. coli*, ist dieser Antiporter für die Regulation des pH-Werts und der Salzkonzentration in der Zelle verantwortlich. Im Gegensatz zu NhaA nimmt jedoch die Aktivität von MjNhaP1 mit steigendem pH-Wert ab [18]. Das Protein ist bei pH-Werten ≥ 8 inaktiv und aktiv bei einem pH-Wert von 6, bei dem NhaA sich im inaktiven Zustand befindet. Das unterschiedliche pH-Profil im Vergleich zu NhaA macht dieses Protein interessant für eine Untersuchung der Konformationsänderungen, die mit der Aktivierung einhergehen. Durch den Vergleich der Proteine besteht die Möglichkeit, Analogien zwischen Aktivierung und Konformationsänderungen aufzuzeigen. Um einen ersten Einblick über die Zusammensetzung der Sekundärstruktur zu bekommen, wurde die Analyse in Analogie zu der Auswertung der spektralen FTIR- und CD-Daten von NhaA durchgeführt.

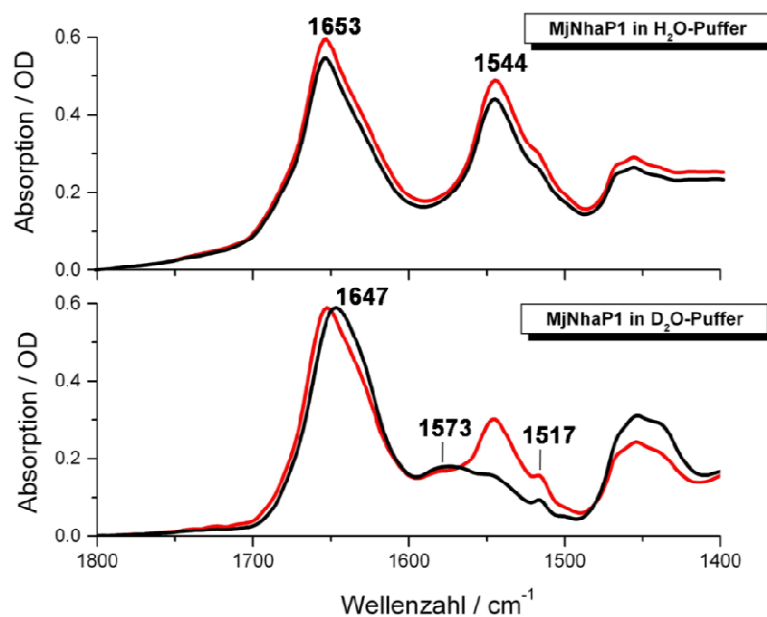


Abbildung 78a: ATR-IR Absorptionsspektren von MjNhaP1 bei pH 6 bzw. pD 6 (—) und pH 8 bzw. pD 8 (---) mit jeweils 100 mM NaCl in den Puffern. (Für die D_2O Spektren waren die Proteine ca. 22 Stunden lang in D_2O)

In Abbildung 78a sind die ATR-IR Absorptionsspektren von MjNhaP1 in H₂O- und in D₂O-Puffer gezeigt. Die dazugehörigen zweiten Ableitungen sind in Abbildung 78b dargestellt. Wie auch bei NhaA beobachtet man bei MjNhaP1 keine erheblichen Änderungen zwischen dem inaktiven (pH 8) und dem aktiven (pH 6) Zustand des Proteins. Die Hauptkomponente der Amid I Bande bei 1655 cm⁻¹ zeigt zusammen mit der Amid II Bande bei 1546 cm⁻¹, dass das Protein hauptsächlich aus α -Helix besteht. Die Banden bei 1628 cm⁻¹, 1683 cm⁻¹ und 1692 cm⁻¹ deuten auf die Präsenz eines kleinen β -Faltblattanteils in der Struktur von MjNhaP1 hin.

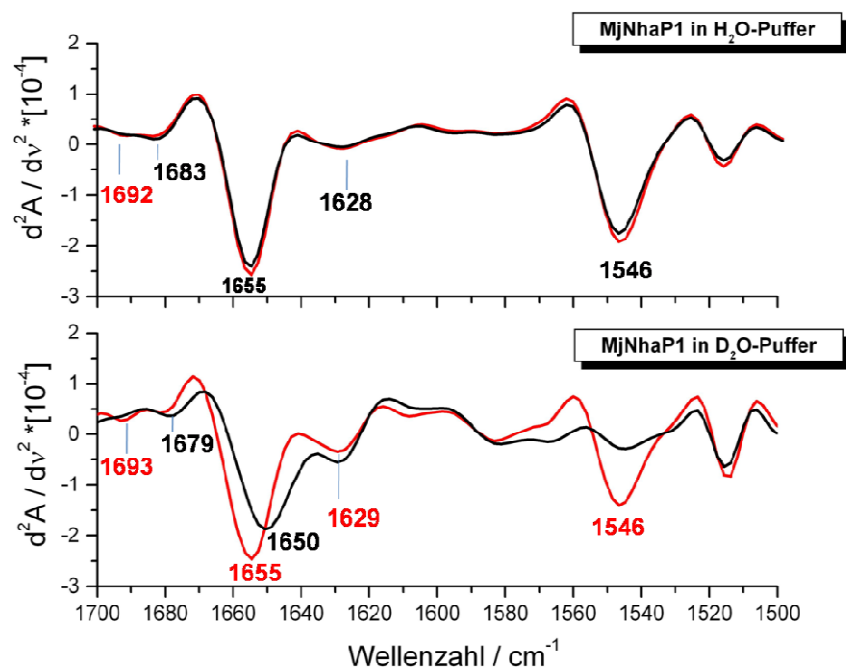


Abbildung 78b: Zweite Ableitung der IR Absorptionsspektren von MjNhaP1 aus Abbildung 78a bei pH 6 bzw. pD 6 (—) und pH 8 bzw. pD 8 (—).

Der Vergleich der Absorptionsspektren in D₂O-Puffer weist auf einen Unterschied in der Austauschrate zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand des Proteins hin. Nach ca. 22 Stunden sind mehr Amid-Gruppen bei pD 8 für die Lösung zugänglich als bei pD 6. Dadurch wird die Intensitätsabnahme der Amid II Bande bei pD 8 verursacht. Die Austauschrate ist sowohl von der Sekundärstruktur als auch von der Tertiärstruktur abhängig. Beim aktiven Zustand (pD 6) würde man, analog zu NhaA, eine offene, für die Lösung zugängliche Konformation erwarten. Die Absorptionsspektren zeigen jedoch, dass in diesem Zeitfenster (24 Stunden) sowohl bei NhaA als auch bei MjNhaP1 mehr Amid-Gruppen mit pD 8 als mit pD 6 mit der Lösung austauschen. Genauso wie bei NhaA beobachtet man eine Verschiebung der α -Helix Komponente um 5 Wellenzahlen bei pD 8. Für die β -Faltblatt Komponente wird keine Bandenverschiebung ermittelt. Diese beträgt bei NhaA 2 Wellenzahlen (von 1630 cm⁻¹ nach

1628 cm^{-1}). Im Vergleich zu NhaA sind alle Amid I Komponenten von MjNhaP1 zu kleineren Wellenzahlen verschoben, sowohl in H_2O - als auch im D_2O -Puffer. Das deutet auf die unterschiedliche Anordnung und/oder Art der α -Helices in den beiden Proteinen hin.

Gemäß der durchgeführten FTIR-Sekundärstrukturanalyse bei NhaA (s. Kapitel 4.1.1) wurde diese Prozedur auch bei MjNhaP1 angewandt. Die Anpassung der entfalteten (FSD) Amid I Bande (s. Kapitel 3.2.2) des inaktiven und aktiven Zustandes von MjNhaP1, in H_2O - und D_2O -Puffer, ist in Abbildung 79 gezeigt. In der Tabelle 7a sind die dazugehörigen prozentuellen Anteile der einzelnen Komponenten zusammengestellt.

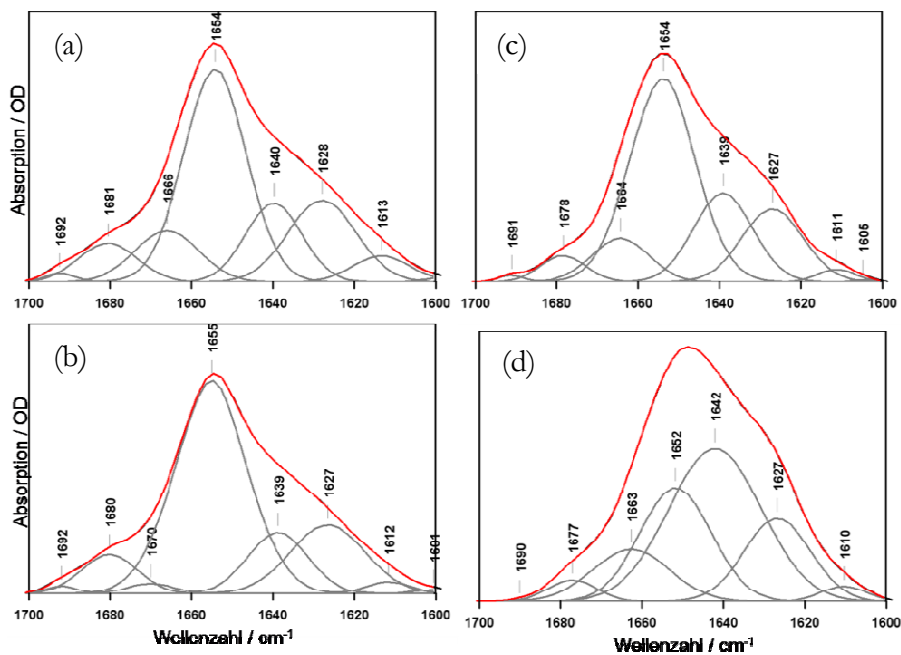


Abbildung 79: FTIR-Sekundärstrukturanalyse von MjNhaP1 in detergent-solubilierten Proben in H_2O und D_2O -Puffer. Vor der Anpassung wurde FSD an die Originalspektren angewandt. (a) pH 6; (b) pH 8; (c) pD 6; (d) pD 8. Alle Puffer enthalten 100 mM NaCl.

Die Sekundärstrukturanalyse der Proteinproben in H_2O (D_2O) Puffer ergibt Amid I/I Komponenten bei $\sim 1613 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1611 \text{ cm}^{-1}$), $\sim 1628 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1627 \text{ cm}^{-1}$), $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1639 \text{ cm}^{-1}$), $\sim 1655 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1652 \text{ cm}^{-1}$), $\sim 1666 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1663 \text{ cm}^{-1}$), $\sim 1681 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1677 \text{ cm}^{-1}$) und $\sim 1692 \text{ cm}^{-1}$ ($\sim 1690 \text{ cm}^{-1}$). Sowohl in H_2O als auch in D_2O beobachtet man strukturelle Unterschiede zwischen dem inaktiven (pH/pD 8) und aktiven (pH/pD 6) Zustand des Proteins.

In H_2O werden die Absorptionsänderungen bei 1655 cm^{-1} und 1666 cm^{-1} ermittelt. Dabei ist der Anteil der Komponente bei 1666 cm^{-1} , die zur Absorption der Schleifen im Protein zugeordnet werden kann, im aktiven (pH 6) um ca. 10 % größer als im inaktiven (pH 8) Zustand. Im Gegensatz dazu nimmt die Absorption der Bande bei 1655 cm^{-1} mit Inaktivierung des Proteins

bei pH 8 um ca. 10 % zu. Dieses Signal wird durch die Schwingungsmoden der Amid Struktur bei α -Helix und/oder ungeordneter Struktur verursacht.

WT pH 6		WT pH 8		WT pD 6		WT pD 8	
(a)		(b)		(c)		(d)	
cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
1613	5	1612	2	1611	2	1610	2
1628	18	1627	19	1627	16	1627	16
1640	14	1639	13	1639	19	1642	42
1655	43	1655	56	1654	49	1652	24
1666	11	1670	2	1664	9	1663	12
1681	7	1680	8	1678	4	1677	3
1692	1	1692	1	1691	1	1690	0

Tabelle 7a: Zusammenstellung der Amidkomponenten durch die Bandenanalyse der Amid I Bande für den inaktiven und aktiven Zustand in H₂O und in D₂O-Puffer.

Im D₂O-Puffer verschieben sich die Komponenten der α -Helix von 1655 cm⁻¹ zu 1654 cm⁻¹ bei pD 6 und zu 1652 cm⁻¹ bei pD 8. Die beobachtete größere Wellenzahlverschiebung bei pD 8 deutet darauf hin, dass die Amid-Gruppen der α -Helix in diesem Zustand für die Lösung zugänglicher sind. Die Absorptionsabnahme der Bande bei 1652 cm⁻¹ und die Zunahme bei 1642 cm⁻¹, die der ungeordneten Struktur zugeordnet werden kann, bestätigen beide, dass im inaktiven Zustand bei pD 8 eine für die Lösung zugänglichere Konformation vorliegt. Das zeigt auch die Intensitätsabnahme der Amid II Bande bei pH/pD 8 in Abbildung 78a.

Die Anteile der einzelnen Komponenten in dem für die jeweilige Sekundärstruktur spezifischen Wellenzahlbereich sind in der Tabelle 7 zusammengefasst. Dabei wurde der Bereich < 1620 cm⁻¹, indem zusätzlich Schwingungen von Aminosäureseitenketten (Tyr-OH, Asn und/oder Trp) erwartet werden, nicht berücksichtigt. Aus dieser Sekundärstrukturanalyse kann geschlossen werden, dass aus der ungeordneten Struktur mit der Aktivierung des Proteins eine höher geordnete Struktur (α -Helix und Schleifen) gebildet wird.

v / cm ⁻¹	in H ₂ O-Puffer		v / cm ⁻¹	22 h in D ₂ O-Puffer	
	pH 6 [aktiv]	pH8 [inaktiv]		pD 6 [aktiv]	pD 8 [inaktiv]
1623-1641 (β -Faltblatt)	32 %	32 %	1613-1627 (β -Faltblatt)	16 %	16 %
1642-1662 (α -Helix + ungeordnet)	43 %	56 %	1639-1645 (ungeordnet)*	19 %	42 %
1663-1686 (Schleifen)	18 %	10 %	1646-1663 (α -Helix)	49 %	34 %
			1664-1682 (Schleifen)	13 %	3 %

Tabelle 7b: Zuordnung der Banden unter Tabelle 7a zu den verschiedenen Sekundärstrukturelementen.

*Ein Anteil in diesem Bereich kann auch durch die Absorption der β -Faltblatt Struktur zustande kommen.

4.5.2 Analyse des Wildtyps in Detergenz mit CD-Spektroskopie

Genauso wie bei der Sekundärstrukturanalyse von NhaA (s. Kapitel 4.1.3) wurde auch hier als Ergänzung zur FTIR-Spektroskopie die CD-Spektroskopie benutzt. Mit diesen beiden Methoden wird dann die Konformation von MjNhaP1 im D₂O-Puffer analysiert. Dafür wurden CD-Spektren des Proteins im inaktiven (pD 8) und aktiven Zustand (pD 6), mit KCl bzw. NaCl aufgenommen. Das Ziel war es dabei, zum einen die pH-induzierten und zum anderen die möglichen Strukturänderungen, die durch die Bindung des Natriums verursacht werden, zu detektieren.

In Abbildung 80 sind die CD-Spektren von MjNhaP1 bei verschiedenen pH-Werten und für verschiedene Salze dargestellt. Die positive Bande bei 194 nm mit den zwei negativen Banden bei 209 und 222 nm deuten darauf hin, dass die Sekundärstruktur von MjNhaP1 zum größten Teil durch die α -Helix ausgebildet wird. Um die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente aus den CD-Spektren zu bestimmen, wurden die Spektren mittels der CDSSTR-Methode unter Benutzung des Protein Referenz-Datensatzes 3 (s. Kapitel 3.3.2) analysiert.

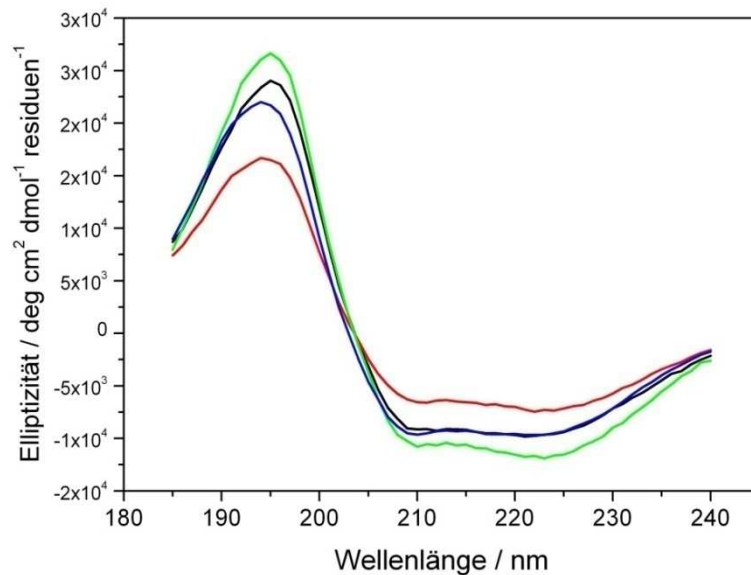


Abbildung 80: CD-Spektren von MjNhaP1 in verschiedenen D₂O-Puffern: (—) pD 6 mit KCl; (—) pD 8 mit KCl; (—) pD 6 mit NaCl und (—) pD 8 mit NaCl. Die Proteinproben waren vor der Aufnahme der CD-Spektren 24 Stunden in D₂O-Puffer equilibriert. Die Konzentration der Salze betrug jeweils 100 mM.

Die Ergebnisse dieser Anpassung (Tabelle 8) zeigen, dass die Konformation des Proteins sowohl vom pH-Wert als auch von der Art des Kations abhängig ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Sekundärstrukturanalyse der FTIR-Daten (Tabelle 8 rechts) zeigt auch die

Analyse der CD-Daten, dass der aktive Zustand (pD 6) einen höheren Anteil an α -helikaler Struktur als der inaktive Zustand (pD 8) aufweist. Die Bindung des Natriums verursacht im aktiven und inaktiven Zustand eine um ca. 10 % höheren Anteil dieser Struktur. In dem Na^+ -freien Zustand beobachtet man dagegen eine Zunahme des β -Faltblatts. Im Bereich der Schleifen und ungeordneter Strukturen werden nur kleine Änderungen zwischen den Na^+ -freien und Na^+ -gebundenen Zustand beobachtet.

Vergleicht man die Ergebnisse der CD- mit denen der FTIR-Sekundärstrukturanalyse, so wird eine sehr gute Übereinstimmung der Strukturanteile der α -Helix und der Struktur des β -Faltblatts bei diesen beiden Methoden festgestellt. Dagegen beobachtet man Abweichungen der Anteile für die Schleifen und der ungeordneten Struktur. Die Abweichung in diesen Strukturen kann durch die Schwingungen der Aminosäureseitenketten (Asn und Gln), die im Amid I Bereich des IR-Spektrums eines Proteins absorbieren, erklärt werden. Die Seitenketten dieser Aminosäuren geben die Signale in H_2O -Puffer im IR-Absorptionsbereich der Schleifen ($\sim 1672\text{ cm}^{-1}$ - 1678 cm^{-1}) [75]. In D_2O -Puffer werden diese Absorptionen bei kleineren Wellenzahlen, im Absorptionsbereich der ungeordneten Struktur ($\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ - 1648 cm^{-1}) beobachtet.

Aus den IR- und CD-Daten kann man aber schließen, dass die Aktivierung des Proteins mit einer Ausbildung der α -helikaler Struktur verbunden ist. Dabei wird ein Anteil der ungeordneten Struktur und/oder β -Faltblatt aufgelöst.

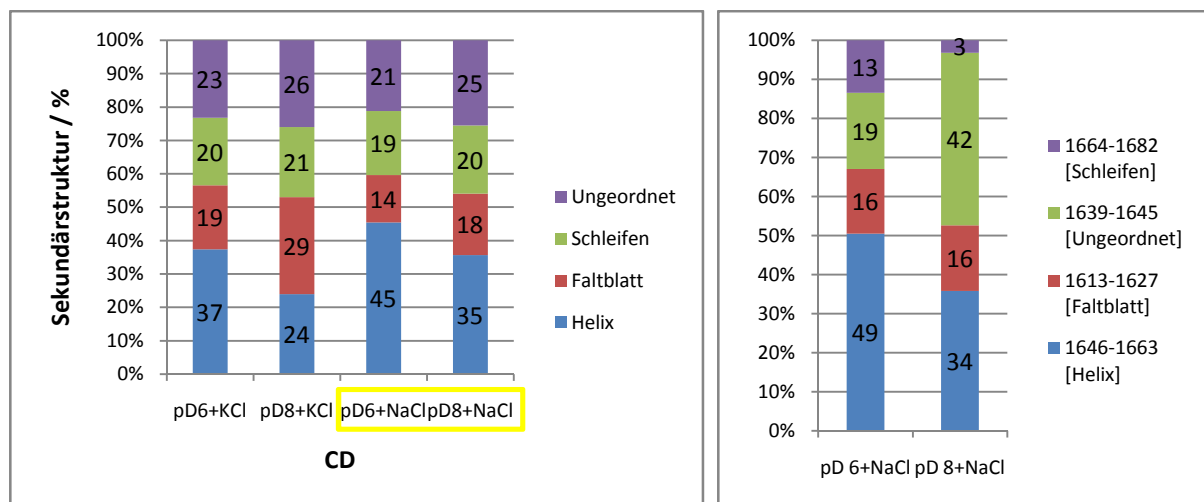


Tabelle 8: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von MjNhaP1. Links: Resultate aus den CD-Spektren (Abbildung 80). Rechts: zum Vergleich die Ergebnisse der IR Sekundärstrukturanalyse (s. Tabelle 7b).

4.5.3 FTIR-Sekundärstrukturanalyse von verschiedenen MjNhaP1 Proben

Bei MjNhaP1 bestand im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit, nicht nur in Detergenz solubilisierte Proben, sondern zusätzlich das Protein in Form von 2D-Kristallen (s. auch Kapitel 3.7) zu

untersuchen. Die zwei Probenpräparationen sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

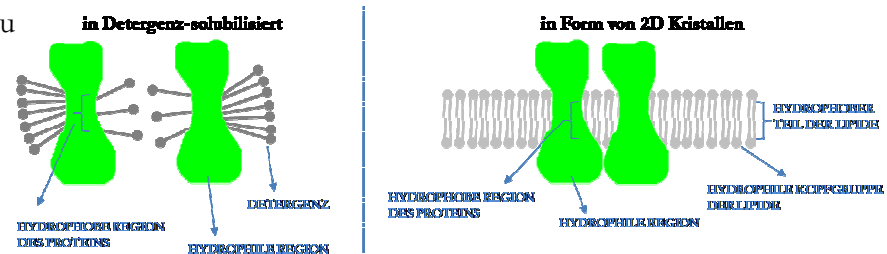


Abbildung 81: Membranprotein in zwei verschiedenen Probenformen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von beiden Probenformen verglichen. Zusätzlich wird auch die Sekundärstruktur der in Detergenz solubilisierten R347A Mutante analysiert und mit dem Wildtyp verglichen.

In Abbildung 82 sind die mit der FSD-Methode entfalteten Amid I^c Banden mit ihren einzelnen Komponenten für den Wildtyp ((a) und (b)), die R347A Mutante ((c) und (d)) und den Wildtyp in Form der 2D-Kristalle ((e) und (f)) dargestellt. Darin wird explizit zwischen dem aktiven (linke Spalte) und dem inaktiven (rechte Spalte) Zustand unterschieden.

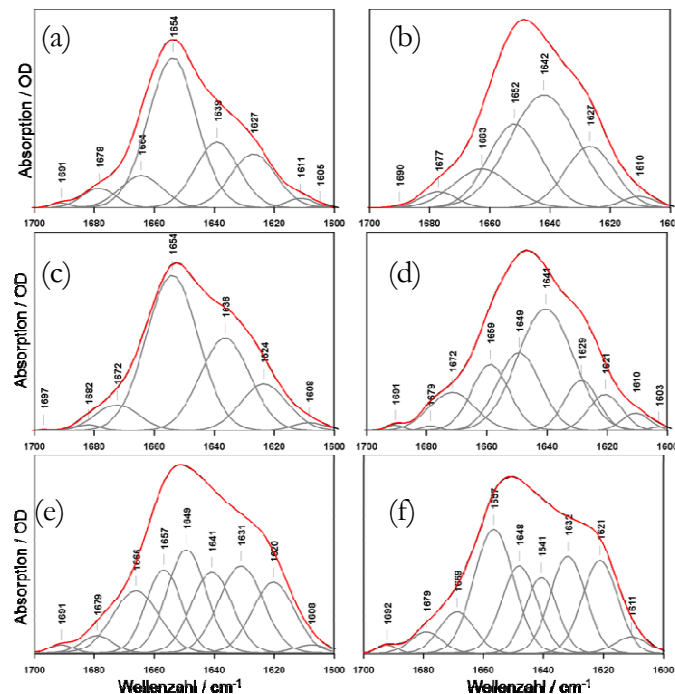


Abbildung 82: FTIR-Sekundärstrukturanalyse von MjNhaP1 Proben im D₂O-Puffer. Vor der Anpassung wurde FSD an Originalspektren angewandt. (a) WT bei pD 6; (b) WT bei pD 8; (c) R347A bei pD 6; (d) R347A bei pD 8; (e) WT 2D-Kristalle bei pD 6 (d) WT 2D-Kristalle bei pD 8. Alle Puffer enthalten 100 mM NaCl.

Wie im letzten Kapitel am Wildtyp des Proteins festgestellt wurde, verursacht die Änderung des pH-Werts eine Änderung der Sekundärstruktur. Ein ähnlicher Effekt wird auch bei der Mutante und den 2D-Kristallen beobachtet.

Bei der Mutante induziert die Erhöhung des pD-Werts eine Abnahme der Amid I Hauptkomponente der α -Helix bei 1654 cm^{-1} und eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen bei 1649 cm^{-1} . Dafür nimmt die Bandenintensität bei 1641 cm^{-1} zu, die der Bande der ungeordneten Struktur zugeordnet werden kann. Die Mutante weist auch bei der pD-Variation die Änderungen im Bereich des β -Faltblattes auf. Bei pD 8 beobachtet man die Komponenten bei 1629 cm^{-1} und 1621 cm^{-1} und bei pD 6 die Komponenten bei 1636 cm^{-1} und 1624 cm^{-1} . Die Komponente bei 1636 cm^{-1} wird möglicherweise durch die Absorption der ungeordneten Struktur verursacht. Die Wellenzahlpositionen der einzelnen Komponenten weichen von denen, die bei dem Wildtyp in diesem Absorptionsbereich zu finden sind, ab. Dass es sich um die Änderungen der Absorption des β -Faltblatts handeln kann, belegen die hochfrequenten β -Faltblatt Komponenten bei ca. 1679 cm^{-1} . Auch deren Positionen stimmen nicht mit denen des Wildtyps überein.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Bandenzerlegung der in Detergenz solubilisierten Proben, absorbieren die Komponenten der 2D-Kristalle bei pD 6 und pD 8 an den gleichen Wellenzahlpositionen. Die Anteile der ungeordneten Struktur unterscheiden sich in diesen beiden Probenformen zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand des Proteins. Weiterhin fällt bei der Analyse der 2D-Kristalle eine hohe Absorption bei 1621 cm^{-1} auf. In Analogie zu den Ergebnissen der Bandenanalyse von NhaA (s. Kapitel 4.1.1), können Absorptionsbanden im IR-Spektrum des Proteins, die vom inter- und intramolekularen β -Faltblatt verursacht werden, unterschieden werden. Das intermolekulare β -Faltblatt absorbiert bei 1621 cm^{-1} und wird durch die Protein-Protein Wechselwirkung, die durch die Proteinmoleküle, die in einem Kristall dicht nebeneinander angeordnet sind (s. Abbildung 81), induziert. In Kristallproben mit hohem pD-Wert beobachtet man eine größere Absorption der Komponente bei 1657 cm^{-1} als bei pD 6. Im Gegensatz dazu ist die Absorption der Komponente bei 1641 cm^{-1} größer bei pD 6 als bei pD 8. Diese Beobachtung deutet auf eine im aktiven Zustand (pD 6) für die Lösung zugänglichere Konformation als im inaktiven Zustand (pD 8) hin. Dieses Ergebnis wird ausführlicher im Kapitel 4.7.2 diskutiert.

Eine Übersicht über die einzelnen Komponenten mit ihren Wellenzahlpositionen und dem Anteil an der Sekundärstruktur ist in der Tabelle 9a dargestellt. Ein Vergleich ihrer jeweiligen Sekundärstruktur-Zuordnung veranschaulicht Tabelle 9b.

(a)	WT		WT		Mutante		Mutante		WT 2D-		WT 2D-	
	pD6	pD8	pD6	pD8	pD6	pD8	pD6	pD8	Kristalle	Kristalle	pD6	pD8
	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
					1624	13	1621	7	1620	14	1621	16
1627	16	1627	16				1629	9	1631	18	1632	17
1639	19	1642	42	1636	28	1640	38	1641	16	1641	12	
1654	49	1652	24	1654	48	1649	19	1649	19	1648	16	
1664	9	1663	12	1659	1	1659	14	1657	14	1657	24	
1678	4	1677	3	1672	7	1672	10	1666	14	1669	7	
1691	1	1690	0	1682	1			1679	3	1679	3	

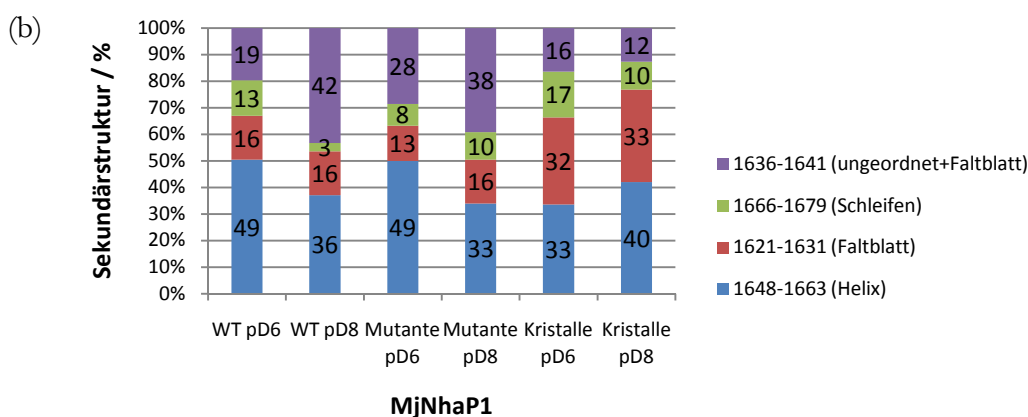


Tabelle 9: (a) Ergebnisse der Zerlegung der Amid I Bande in ihre spektralen Komponenten für den inaktiven und aktiven Zustand der verschiedenen MjNhaP1 Proben im D₂O-Puffer; (b) Prozentualer Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturelementen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konformationen der zwei verschiedenen Probenpräparationen im D₂O-Puffer verschieden sind und dass die Änderung des pD-Werts sich unterschiedlich stark auf die Konformation der in Detergenz solubilisierten Probe bzw. der 2D-Kristalle auswirkt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse des Wildtyps und der Mutante, so beobachtet man, dass die Erhöhung des pD-Werts in einer Abnahme der α -Helix Komponente und einer Zunahme der ungeordneten Struktur resultiert. Während beim Wildtyp mit pD 8 der Anteil an ungeordneter Struktur (~ 1642 cm⁻¹) um 23 % zunimmt, beträgt dieser bei der Mutante nur 10 %. Im Bereich der Schleifen und des β -Faltblatts verursacht die Änderung des pD-Werts bei der Mutante ein anderes Verhalten bezüglich der Konformationsänderung als beim Wildtyp. Eine geringe Zunahme des β -Faltblatt- und der Schleifen-Anteils wird bei der Mutante mit pD 8 beobachtet. Im Gegensatz dazu nimmt der Gesamtbeitrag der Schleifenstruktur bei Änderung des pD-Wertes auf 8 beim Wildtyp ab. Die R347A Mutante zeigt nur eine geringe Aktivität bei pH 6 [18]. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse zeigen, dass die Konformationen der

Mutante bei pD 6 und pD 8 sich von den Konformationen des Wildtyps bei diesen beiden pD-Werten unterscheiden. Die Erhöhung des pD-Werts führt auch bei der Mutante zu einer Zunahme in der ungeordneten Struktur, aber nicht in der Größenordnung wie beim Wildtyp. Bei dem β -Faltblattanteil und dem Anteil an den Schleifenstrukturen werden die Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante bei pD 6 und bei pD 8 beobachtet. Diese Ergebnisse deuten aufgrund der unterschiedlichen Konformationen der Mutante und Wildtyps auf einen pH-abhängigen Aktivitätsverlust der Mutante hin.

Die aktivierungsinduzierte Konformationsänderung von MjNhaP1 2D-Kristallen ist im Bereich der α -Helix und der ungeordneten Struktur entgegengesetzt zu der Änderung der in Detergenz solubilisierten Proteine. Bei einem pD-Wert von 8 beobachtet man bei der Sekundärstrukturanalyse einen größeren Anteil an α -helikaler Struktur und einen geringeren Anteil an der ungeordneten Struktur im Vergleich zu dem aktiven Zustand des Proteins bei pD 6. Die Komponente bei 1657 cm^{-1} ist im inaktiven Zustand des Proteins um ca. 10 % größer. Ein ähnliches Verhalten zeigte auch NhaA beim Vergleich zwischen dem aktiven (pD 8) und inaktiven Zustand (pD 6) (s. Kapitel 4.1.1). Die NhaA Daten wurden dahingehend interpretiert, dass die α -Helix Komponente bei 1657 cm^{-1} mit der Aktivierung für die Lösung zugänglich ist. Dadurch verschiebt sich die α -Helix Komponente in Anwesenheit eines D_2O -Puffers zu kleineren Wellenzahlen (1642 cm^{-1}). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die Komponente bei 1642 cm^{-1} nicht unbedingt die ungeordnete Struktur, sondern flexiblere, für die Lösung zugängliche Helices darstellt. Die Absorption einer der Lösung exponierten α -Helix verschiebt sich in D_2O zu kleineren Wellenzahlen [82]. Damit könnte die Komponente bei 1642 cm^{-1} der Lösung exponierte α -Helix, dessen Absorption sich von ca. 1658 cm^{-1} zu 1642 cm^{-1} verschiebt, darstellen. Im Absorptionsbereich der Schleifen wirkt sich die Änderung des pD-Werts ähnlich auf die in Detergenz solubilisierten Proteine und 2D-Kristalle aus. Mit der Aktivierung (pD-Erniedrigung) beobachtet man bei beiden Probenpräparationen eine Zunahme des Strukturanteils der Schleifen von ca. 10 %. Im Gegensatz dazu weist die R347A Mutante in dem Bereich fast keine Änderungen auf. Die Sekundärstrukturanalyse zeigt, dass aktivierungsabhängige Konformationsänderungen sowohl die Änderungen in der Schleifenregion, als auch die Änderungen in der α -Helix und/oder der ungeordneten Struktur beinhalten. Die R437A Mutante, die eine sehr geringe Aktivität bei pD 6 besitzt, verhält sich im Absorptionsbereich der Schleifen ($1666\text{-}1679\text{ cm}^{-1}$) nicht dem Wildtyp entsprechend. Dieses könnte ein Zeichen für den Aktivitätsverlust der Mutante sein.

4.6 Untersuchung zur thermischen Stabilität

4.6.1 Vergleich des inaktiven und aktiven Zustands

Die FTIR-Sekundärstrukturanalyse des in Detergenz solubilisierten Wildtyps zeigte, dass das Protein im inaktiven Zustand bei pH 8 einen um ca. 20 % höheren Anteil an ungeordneter Struktur hat als das Protein im aktiven Zustand. Demnach induziert die Aktivierung des Proteins eine geordnetere Struktur, das sich in einer höheren thermischen Stabilität äußern sollte. Um die temperaturinduzierten strukturellen Änderungen des inaktiven und aktiven Zustands verfolgen zu können, wurden die Spektren der Proteinproben bei pD 6 bzw. bei pD 8 mit 10 mM NaCl in der temperierbaren CaF₂-Zelle in einem Temperaturintervall von 10 °C bis 90 °C in 2 °C-Schritten aufgenommen (s. Kapitel 3.4.1). Für die Auswertung wurde, genauso wie bei NhaA (Kapitel 4.2), die 2. Ableitung der temperaturabhängigen Absorptionsspektren gebildet. Damit wird die Wellenzahlverschiebung der α -Helix (bei ca. 1657 cm⁻¹) und β -Faltblatt Komponente (bei ca. 1630 cm⁻¹) in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht (Abbildung 83).

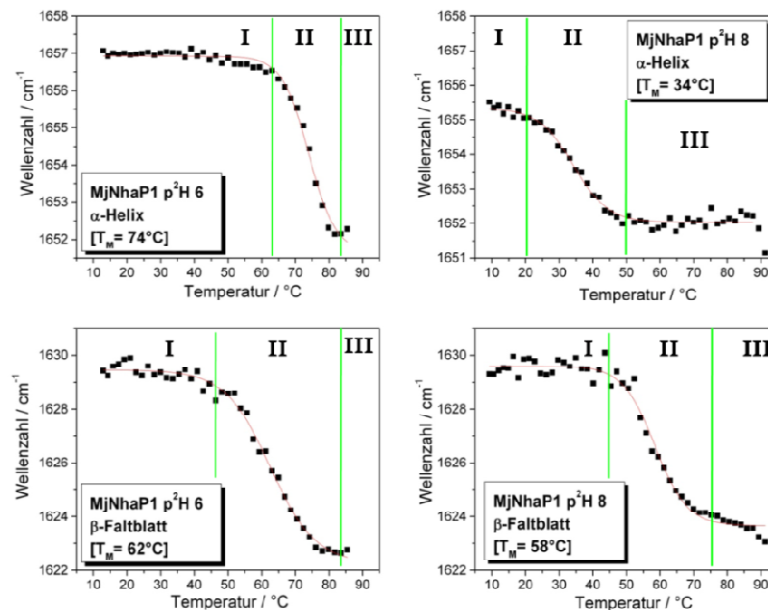


Abbildung 83: Untersuchung der temperaturinduzierten Strukturveränderung von MjNhaP1 mittels der Verschiebung der α -Helix und β -Faltblatt Komponente jeweils im aktiven (pD 6 linke Spalte) und im inaktiven Zustand (pD 8 rechte Spalte). Unterteilung der beobachtbaren spektralen Veränderungen in Temperaturbereiche mit nativen Zustand (I), Entfaltungprozess (II) und entfaltetem Zustand (III).

Generell kann in dieser Darstellung zwischen Bereichen I und III, in denen keine temperaturinduzierten strukturellen Änderungen auftreten, und einem Mittelbereich II, der den Entfaltungsübergang des Proteins charakterisiert, unterschieden werden.

Vor der Beginn der Messung verweilten die Proteinproben sowohl bei pD 6 als auch bei pD 8 die gleiche Zeit im D₂O-Puffer, so dass keine zeitlichen Unterschiede im ¹H/²H Austauschprozess zwischen diesen beiden Proteinzuständen gegeben waren. Dennoch zeigt die Probe im inaktiven Zustand bei pD 8 bei 10 °C eine um 1,5 cm⁻¹ zu kleineren Wellenzahlen verschobene α -Helix Komponente (1655,5 cm⁻¹). Dieses stützt die These der ungeordneten Struktur in diesem Zustand, da die Amid-Gruppen dieser Struktur viel schneller als die Gruppen einer geordneten Struktur austauschen. Die Inaktivierung (pD 8) des Proteins führt im Vergleich zum aktiven Zustand zu einer stark verringerten thermischen Stabilität. Während der Entfaltungsprozess des Proteins im inaktiven Zustand schon bei etwa 20 °C beginnt, ist im aktiven Zustand erst bei ca. 65 °C eine Entfaltung erkennbar. Dieser Prozess ist bei pD 8 bei 50 °C mit einer mittleren Übergangstemperatur von 34 °C und bei pD 6 bei etwa 85 °C mit einer mittleren Übergangstemperatur von 74 °C abgeschlossen. Der enorme Unterschied in der thermischen Stabilität von 40 °C zwischen inaktivem und aktivem Zustand kann nicht durch geringe strukturelle Differenzen erklärt werden, sondern bestätigt die in Tabelle 9b dargestellten erheblichen Konformationsunterschiede zwischen diesen beiden Zuständen im Protein.

Bei 10 °C absorbiert die Komponente der α -Helix bei verschiedenen Wellenzahlen bei pD 6 und pD 8. Im Gegensatz dazu befindet sich die Komponente des β -Faltblatts bei etwa 1629 cm⁻¹ im inaktiven und aktiven Zustand. Die Entfaltung (Bereich II) dieser Struktur beginnt in den beiden Zuständen bei ca. 45 °C. Die Übergangstemperatur beträgt etwa 60 °C mit einer Differenz von 4 °C zwischen pD 6 und pD 8. Der Bereich III wird durch die Ausbildung des intermolekularen β -Faltblatts bei etwa 1622 cm⁻¹ charakterisiert.

Für die α -Helices wird ein großer Unterschied zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand beobachtet. Während im aktiven Zustand die Übergangstemperatur für diese Struktur bei 72 °C liegt, wird diese im inaktiven Zustand schon bei 34 °C beobachtet. Dabei beginnt der Entfaltungsprozesses dieser Struktur im inaktiven Zustand bei einer um etwa 25 °C niedrigeren Temperatur als der Entfaltungsbeginn der Struktur des β -Faltblatts in diesem Zustand.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stabilität der β -Faltblattstruktur nicht vom Aktivierungsprozess des Proteins beeinflusst wird. Im inaktiven Zustand bewirkt die Instabilität der α -Helix keine Änderung des β -Faltblatts. Aus dem Unterschied der thermischen Stabilität der einzelnen Strukturelemente kann geschlussfolgert werden, dass in die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins nur ein begrenzter Bereich des Proteins, der die α -Helices beinhaltet, involviert ist. Aus

diesen Ergebnissen können sogar Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung des β -Faltblatts gezogen werden. Da die Konformation des β -Faltblatts im Gegensatz zu der Konformationen der α -Helices nicht durch die pH-Änderung beeinflusst wird, befindet sich das β -Faltblatt nicht in der Region, die für die Aktivierung des Proteins zuständig ist.

Da die thermische Stabilität dieser Komponente um 25 °C höher als die Stabilität der Aktivierungsregion liegt, kann dieses β -Faltblatt von fundamentaler Bedeutung für die Gesamtstabilität des Proteins sein. Aufgrund der Strukturanalogie zu NhaA, liegt die Vermutung nahe, dass das antiparallele β -Faltblatt den Hauptkontakt zwischen den Monomeren bildet. Damit würde im inaktiven Zustand die Erhöhung der Temperatur zuerst eine Entfaltung der instabilen Aktivierungsregion induzieren. Erst bei einer um 25 °C höheren Temperatur würde die Monomerisierung des Proteins eintreten. Da im aktiven Zustand die Übergangstemperatur der Entfaltung der α -Helix um 10 °C höher liegt als die für das β -Faltblatt, führt die Monomerisierung wahrscheinlich zu keinem Funktionsverlust des Antiporters.

4.6.2 Vergleich Wildtyp / R347A Mutante

Im Gegensatz zum Wildtyp zeigt die R347A Mutante nur eine geringe Aktivität bei pH 6 [18]. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse ergaben, dass der Unterschied in der ungeordneten Struktur zwischen pD 6 und pD 8 nicht in der Größenordnung wie bei dem Wildtyp liegt. Daraus lässt sich schließen, dass die Mutante unabhängig vom pH-Wert ein dem inaktiven Zustand des Wildtyps ähnliches thermisches Verhalten zeigt.

In Abbildung 84 sind die Absorptionsspektren bei 20 °C und 90 °C für den Wildtyp und die Mutante für pD 6 (linke Spalte) bzw. pD 8 (rechte Spalte) dargestellt. Die Absorptionsspektren bei 20 °C zeigen, dass die Struktur der Mutante bei pD 8 mit dem Absorptionsmaximum bei 1650 cm^{-1} für die Lösung am leichtesten zugänglichsten ist, was anhand der Amid II Bande ($\sim 1544 \text{ cm}^{-1}$) beobachtet wird. Eine Erhöhung der Temperatur verursacht die Entfaltung der α -Helices mit der Absorptionsbande bei ca. 1648 cm^{-1} und die Bildung des intermolekularen β -Faltblattes mit dem Absorptionsmaximum bei etwa 1627 cm^{-1} .

In Abbildung 85 sind die Ergebnisse der temperaturinduzierten Wellenzahlverschiebung der α -Helix Komponente (oben im Bild) und der β -Faltblatt Komponente (unten im Bild) für pD 6 und pD 8 dargestellt. Dabei sind die Änderungen dieser Strukturen für die Mutante (grün) und zum Vergleich die für den Wildtyp (schwarz) gezeigt.

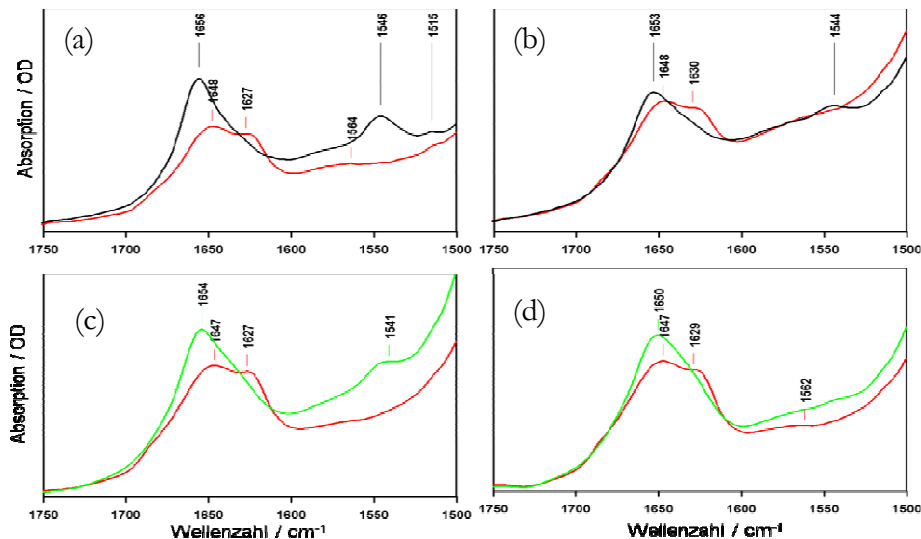


Abbildung 84: IR Absorptionsspektren von MjNhaP1 bei 20 °C (—) und 90 °C (—):
 (a) WT bei pD 6; (b) WT bei pD 8; (c) R347A Mutante bei pD 6; (d) R347A Mutante bei pD 8.

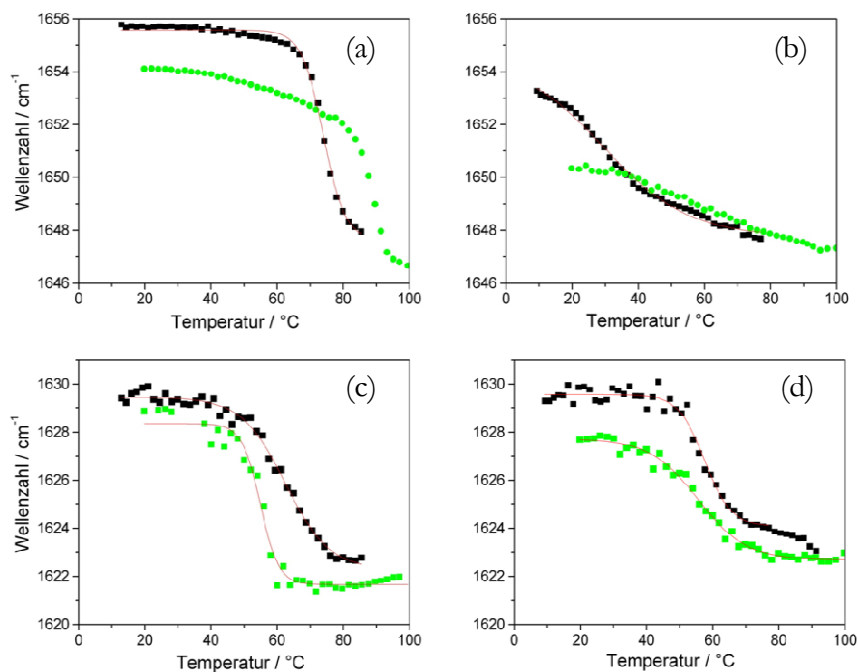


Abbildung 85: Verschiebung der α -Helix ((a) und (b)) und β -Faltblatt ((c) und (d)) Bande in Abhängigkeit von der Temperatur für MjNhaP1 WT (—) und Mutante (—) bei pD 6 ((a) und (c)) und bei pD 8 mit 10mM NaCl ((b) und (d))

Die größten Unterschiede in der thermischen Stabilität werden zwischen der Mutante und dem Wildtyp für die Komponente der α -Helix sowohl bei pD 6 als auch bei pD 8 beobachtet. Ein Absorptionsmaximum (1654 cm^{-1}) bei 20 °C zeigt die Mutante bei pD 6 als auch der Wildtyp bei

pD 8. Das ist ein Zeichen für eine ähnliche Lösungsmittelzugänglichkeit der Amid-Gruppen für diese beiden Proben. Eine Erhöhung des pD-Werts auf pD 8 verursacht bei der Mutante eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 1654 cm^{-1} auf 1650 cm^{-1} . Die Mutante bei pD 8 besitzt die höchste Zugänglichkeit und auch die größte Instabilität. Dass eine höhere Zugänglichkeit nicht gleich mit einer thermischen Instabilität der Probe einhergeht, zeigt die Mutante bei pD 6. Verglichen mit dem Wildtyp bei gleichem pD-Wert, hat die Mutante bei pD 6 eine höhere Zugänglichkeit, aber der Beginn der Entfaltung der α -helikalen Struktur beginnt erst bei höheren Temperaturen. Der interessante Bereich der Mutante bei pD 6 ist der Bereich vor dem tatsächlichen Entfaltungsbeginn. Mit der Erhöhung der Temperatur verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 1654 cm^{-1} zu 1652 cm^{-1} , was eine Zunahme in den austauschbaren Amid-Gruppen bedeutet. Der Wildtyp bei pD 6 zeigt kein solches Verhalten. Diese Ergebnisse deuten auf eine ähnliche Zugänglichkeit des Wildtyps im inaktiven Zustand (pD 8) und der Mutante. Dieses wird im nächsten Kapitel ausführlicher diskutiert.

Die Ergebnisse zu der thermischen Stabilität zeigen, dass die R347A Mutante ein unterschiedliches thermisches Verhalten bei pD 6 und bei pD 8 aufweist. Sowohl bei der Mutante als auch bei dem Wildtyp führt die Erhöhung des pD-Werts zu einer Erhöhung der Instabilität des Proteins. Dass das in der Tat sein kann, wurde auch bei der Herstellung der 2D-Kristalle beobachtet. Der Versuch, diese bei pD 8 zu züchten, scheiterte in der Erhaltung der weniger geordneten 2D-Kristalle, die schwer zu reproduzieren waren [19]. Weiterhin zeigen die Ergebnisse der Mutante, dass die Aktivierung des Proteins wahrscheinlich in einem begrenzten Bereich passiert, welcher keinen großen Einfluss auf die Gesamtstabilität des Proteins ausübt.

4.7 Untersuchungen zur Dynamik und Flexibilität des Proteins

4.7.1 $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von MjNhaP1 WT im inaktiven und aktiven Zustand

Wie schon an den NhaA Ergebnissen (Kapitel 4.3) gezeigt wurde, kann die Messung vom $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch wertvolle Informationen über die am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch aktiv beteiligten Amid-Gruppen liefern. Der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch gewährt einen Einblick in die Tertiärstruktur eines Proteins. Eine offene, für die Lösung zugängliche Konformation, induziert einen Zustand, bei dem die Protonen der Amid-Gruppen des Proteinrückgrats schnell mit dem Deuteriumion austauschen werden. Eine Unterscheidung zwischen der ungeordneten Struktur und α -Helix wird durch die Analyse des Austauschverhaltens möglich. Im Gegensatz zur geordneten Struktur werden die Amid-Gruppen einer ungeordneten Struktur schon nach wenigen Minuten mit der umgebenden D_2O -Lösung austauschen.

Die in Detergenz solubilisierete MjNhaP1 Probe in pH 8 mit 100 mM NaCl wurde im Experiment 1 zuerst ca. 24 Stunden lang mit dem D_2O -Puffer bei pD 8 und danach bei pD 6 perfundiert. Im Experiment 2 wurde der umgekehrte Perfusionsvorgang durchgeführt, wobei der Ausgangszustand der Probe der aktive Zustand bei pH 6 war.

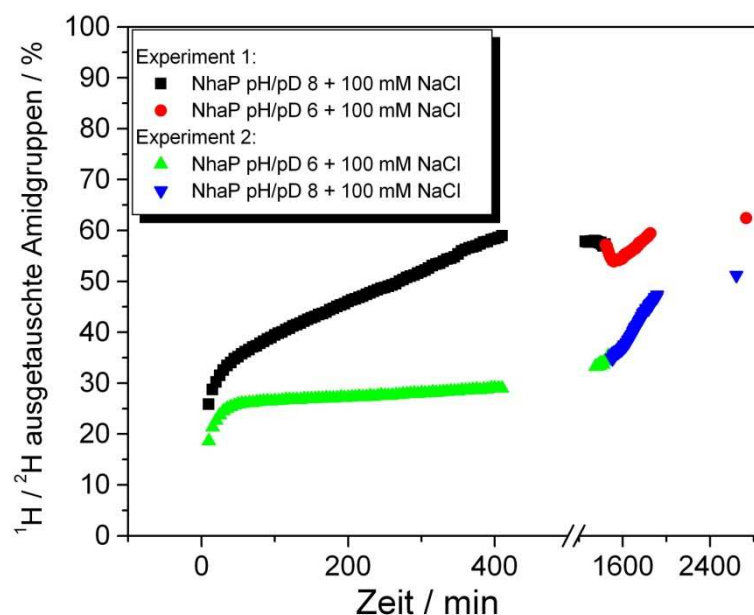


Abbildung 86: Prozentualer Anteil der beim $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch aktiven Amid-Gruppen. Im Experiment 1 wurde die Proteinprobe zuerst mit pD 8 und dann mit pD 6 perfundiert. Im Experiment 2 wurde der umgekehrte Vorgang durchgeführt. Beide Puffer enthielten 100 mM NaCl.

Die Auswertung wurde wie im Material und Methoden-Teil (Kapitel 3.5.3) beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 86 gezeigt. Dabei beobachtet man, dass mit der Erhöhung des pD-Werts eine Zunahme des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches einhergeht. Während nach 10 Minuten etwa 19 % der Amid-Gruppen im aktiven Zustand bei pD 6 zugänglich waren, erhöht sich der Anteil der zugänglichen Amid-Gruppen bei pD 8 auf 26 %. Am Ende des ersten Teils des Experiments nach etwa 24 Stunden waren bei pD 6 35 % der Amid-Gruppen ausgetauscht. Bei pD 8 betrug der Anteil der am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch beteiligten Gruppen 57 %. Das bedeutet, dass bei pD 8 am Austausch rund 90-100 zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zu pD 6 beteiligt waren. Wird am Ende der beiden Experimente der pD-Wert auf pD 6 erniedrigt bzw. auf pD 8 erhöht, so führt eine Erniedrigung des pD-Werts zu keiner weiteren Änderung im Austausch, während wie erwartet, die Erhöhung des pD-Werts zu einer Zunahme im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch führt.

Der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch des Proteins bei pD 8 hat nicht nur am Anfang der Messung einen höheren Austausch als im aktiven Zustand bei pD 6, sondern diese nimmt mit der voranschreitenden Deuterierungszeit weiter zu. Das deutet auf eine Instabilität der Probe bei pD 8 hin und wurde bei der Untersuchung zur thermischen Stabilität (s. Kapitel 4.6.1) beobachtet. Die thermische Stabilität der α -helikale Struktur war um 40 °C geringer im inaktiven Zustand (pD 8) als im aktiven Zustand (pD 6) des Proteins.

4.7.2 Vergleich Wildtyp / R347A Mutante / Wildtyp 2D-Kristalle

Um die Beteiligung der Amid-Gruppen am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschprozess zwischen den verschiedenen Proben vergleichen zu können, wurden die Absorptionsspektren dieser Proben nach 24 Stunden im D_2O -Puffer analysiert (Abbildung 87). Dafür wurde nicht wie bisher für die Auswertung das Verhältnis der Amid II Bande des Spektrums im D_2O -Puffer zur Amid II Bande im H_2O -Puffer genommen, sondern es werden die Amid II Banden zwischen pD 6 und pD 8 einer Probenpräparation verglichen. Dabei dient das Spektrum mit einem größeren Amid II Bande bei diesen beiden pD-Werten als Referenzspektrum. Die integrierte Amid I Bande dient wie bisher als Normierungsfaktor. Die grünen, gestrichelten Linien in Abbildung 87 deuten die Integrationsgrenzen der Amid I und II Bande an. Schon bei der Betrachtung der Spektren sieht man, dass je nach der Probenart und -präparation unterschiedliche Änderungen zwischen pD 6 und pD 8 beobachtet werden. In Abbildung 87a sind die Absorptionsspektren des in Detergenz solubilisierten Wildtyps dargestellt. Wie schon im letzten Kapitel gesehen, zeigt der inaktive Zustand bei pD 8 eine höhere Austauschrate als der aktive Zustand bei pD 6, was anhand der

größeren Amid II Bande (1545 cm^{-1}) bei pD 6 zu sehen ist. Dagegen beobachtet man keinen großen Unterschied im Austausch zwischen den beiden pD-Werten bei der Mutante (Abbildung 87b).

Der Wildtyp in Form von 2D-Kristallen (Abbildung 87c) zeigt im Gegensatz zu der in Detergenz solubilisierten Probe ein größerer Austausch im aktiven als im inaktiven Zustand. Bei dieser Probe sind mehr Amid-Gruppen bei pD 6 als bei pD 8 für die Lösung zugänglich. Außerdem beobachtet man hier eine deutlich größere Amid II Bande als bei den Proben in Detergenz. Dieses hängt mit der Orientierung der Probe zusammen. Mit zunehmender Zeit des Perfusionsvorganges sedimentieren die 2D-Kristalle auf dem Diamanten. Das führt zur einer Orientierung der C=O Gruppen senkrecht zur Strahlrichtung, sowie zur einer Orientierung der N-H Gruppen parallel zur Strahlrichtung. Damit erhöht sich die Absorption der Amid II Bande, die hauptsächlich durch die N-H Biegeschwingung verursacht wird, was bei den nicht orientierten Proben, wie bei den in Detergenz solubilisierten, nicht beobachtet wird.

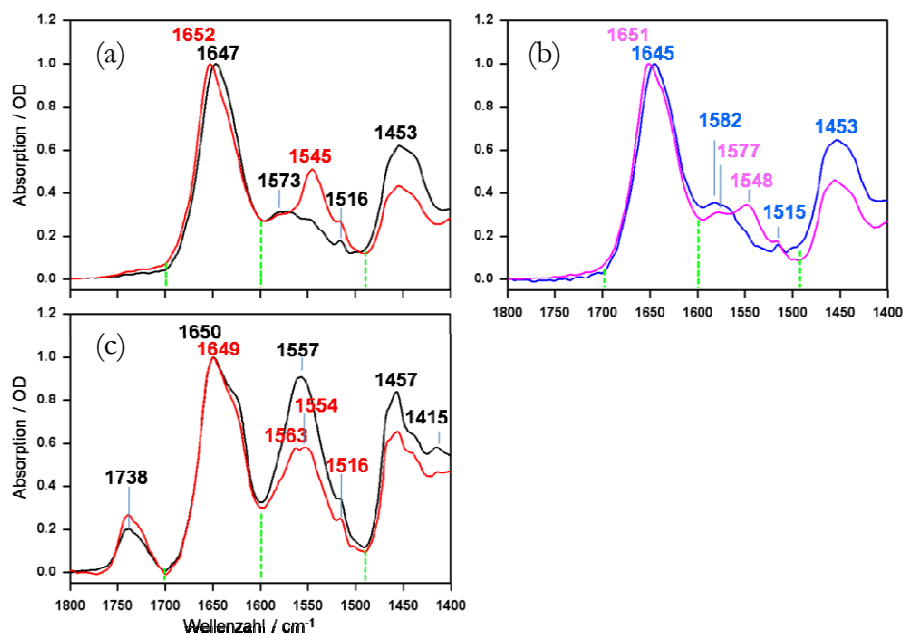


Abbildung 87: IR Absorptionsspektren der verschiedenen MjNhaP1 Proben nach 24 Stunden im D_2O -Puffer bei pD 6 und pD 8 mit 100 mM NaCl: (a) MjNhaP1 WT in Detergenz solubilisiert bei pD 6 (—) und bei pD 8 (—); (b) R347A in Detergenz solubilisiert bei pD 6 (—) und bei pD 8 (—); (c) MjNhaP1 WT 2D-Kristalle bei pD 6 (—) und bei pD 8 (—).

In Tabelle 10 ist das Verhältnis der Amid II zur Amid I Bande und der Anteil der ausgetauschten Amid-Gruppen für die in Abbildung 87 gezeigten Proben dargestellt. Der Vergleich zwischen den in Detergenz solubilisierten Wildtyp und der Mutante zeigt, dass ein größerer $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch beim Wildtyp zwischen pD 6 und pD 8 beobachtet wird. Während bei dem Wildtyp etwa 23 % der Amid-Gruppen mehr im inaktiven als im aktiven Zustand für die Lösung

zugänglich sind, sind es bei der Mutante nur 5 %. Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen [17], bei denen gezeigt wurde, dass sich die R347A Mutante fast unabhängig vom pH-Wert stets im inaktiven Zustand befindet. Dass auch bei dieser Mutante wie bei dem Wildtyp ein größerer $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch bei pD 8 zu verzeichnen ist, zeigt, dass die Struktur der in Detergenz solubilisierten Proteinproben im inaktiven Zustand für die Lösung zugänglicher ist.

	WT pD6	WT pD8
Amid II/Amid I	0.61	0.47
ausgetauscht/%		23
	M pD6	M pD8
Amid II/Amid I	0.47	0.45
ausgetauscht/%		5
	2D pD6	2D pD8
Amid II/Amid I	0.74	1
ausgetauscht/%	26	

Tabelle 10: Übersicht des prozentualen Anteils der beim $^1\text{H}/^2\text{H}$ -Austausch aktiven Amid-Gruppen. Dabei wurde für die Berechnung der Bezug auf den Zustand mit einem höheren Amid II / Amid I Verhältnis genommen. (WT: Wildtyp in Detergenz solubilisiert; M: R347A Mutante; 2D: Wildtyp in Form der 2D-Kristalle)

Es ist schwierig, einen direkten Vergleich des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches zwischen der Detergenz solubilisierten Probe und den 2D-Kristallen vorzunehmen, da es sich zum einen um unterschiedliche Arten der Probenpräparation handelt und zum anderen bei den 2D-Kristallen eine Orientierung der Probe vorliegt. Doch eine mögliche Erklärung der beobachteten Unterschiede zwischen diesen beiden Probenpräparationen könnte in einer höheren Stabilität der 2D-Kristalle im inaktiven Zustand liegen. In 2D-Kristallen sind die Proteinmoleküle dicht nebeneinander angeordnet, was zu Protein-Protein Wechselwirkungen führt, welche sich in der großen Komponente des intermolekularen β -Faltblatts (s. Abbildung 88) äußert. Diese Wechselwirkungen könnten die Ursache für den beobachteten kleineren $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch bei den 2D-Kristallen im inaktiven Zustand sein. Die Struktur, die im inaktiven Zustand einer Detergenz solubilisierten Probe für die Lösung zugänglich ist, wird durch die Protein-Protein Wechselwirkung stabilisiert. Das würde bedeuten, dass die zugänglichen Amid-Gruppen dieser Struktur sich an der Außenseite des Proteinmoleküls befinden, wo es durch die Protein-Protein und Protein-Lipid Wechselwirkung in 2D-Kristallen (s. Abbildung 81) für die Lösung unmöglich wird, mit diesen Gruppen die Protonen auszutauschen.

4.8 Differenzspektren

4.8.1 pH-induzierte Sekundärstrukturänderung von MjNhaP1 WT 2D-Kristallen

Im letzten Kapitel wurde gezeigt, dass die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches des inaktiven und aktiven Zustands zwischen der in Detergenz solubilisierten Proteinprobe und dem Protein in 2D-Kristallen abweichen. Eine eindeutige Sekundärstrukturänderung, die durch die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins induziert wird, kann nur mit der Hilfe von Differenzspektren untersucht werden.

In diesem Kapitel werden zuerst die Differenzspektren, die mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung vom Protein in Form von 2D-Kristallen erhalten wurden, vorgestellt. In Abbildung 89 sind die Differenzspektren der Inaktivierung (inaktiv-minus-aktiv) (schwarz) und der Aktivierung (aktiv-minus-inaktiv) (rot) in Abhängigkeit von der Perfusionszeit mit Phosphatpuffer pH 8 (schwarz) bzw. pH 6 (rot) dargestellt.

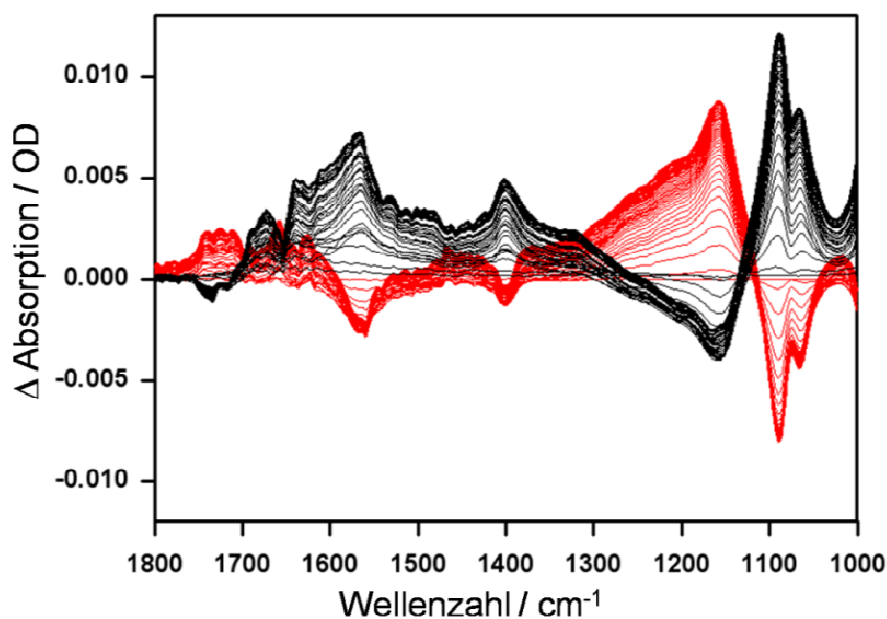


Abbildung 89: Differenzspektren von MjNhaP1 WT (2D-Kristalle) im H_2O -Puffer für den inaktiven Zustand (pH 8 minus pH 6) (—) und den aktiven Zustand (pH 6 minus pH 8) (—) zwischen 3 und 120 Minuten im zweiten Perfusionspuffer (— pH 6 bzw. — pH 8).

Die Zeitdifferenz zwischen der Aufnahme der einzelnen Differenzspektren beträgt jeweils 3 Minuten. Anhand von den Differenzbanden des Phosphatpuffers (1200 cm^{-1} bis 1000 cm^{-1}) (s. S. 94) kann man beobachten, dass nach ca. 30 Minuten der Puffer 1 (pH 6 in den schwarzen Differenzspektren) vollständig durch Puffer 2 (pH 8 in den schwarzen Differenzspektren)

ausgetauscht wurde. Im Absorptionsbereich des Proteins (1750 cm^{-1} bis 1300 cm^{-1}) sind mehrere Banden in Abhängigkeit von der Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins zu beobachten.

In Abbildung 90a oben sind die letzten (nach 120 Minuten im Puffer 2) aufgenommenen Differenzspektren für die Inaktivierung (schwarz) bzw. Aktivierung (rot) aus Abbildung 89 gezeigt. Man beobachtet mehrere nahezu spiegelsymmetrische Banden, wie im Amid I Bereich die Komponente bei 1658 cm^{-1} oder im Amid II Bereich die Komponente bei 1566 cm^{-1} . Da einige Komponenten in der Symmetrie und der Größe in den beiden Differenzspektren abweichen, wurden die Differenzspektren mit der Basislinie¹⁴ (Abbildung 90a unten) korrigiert.

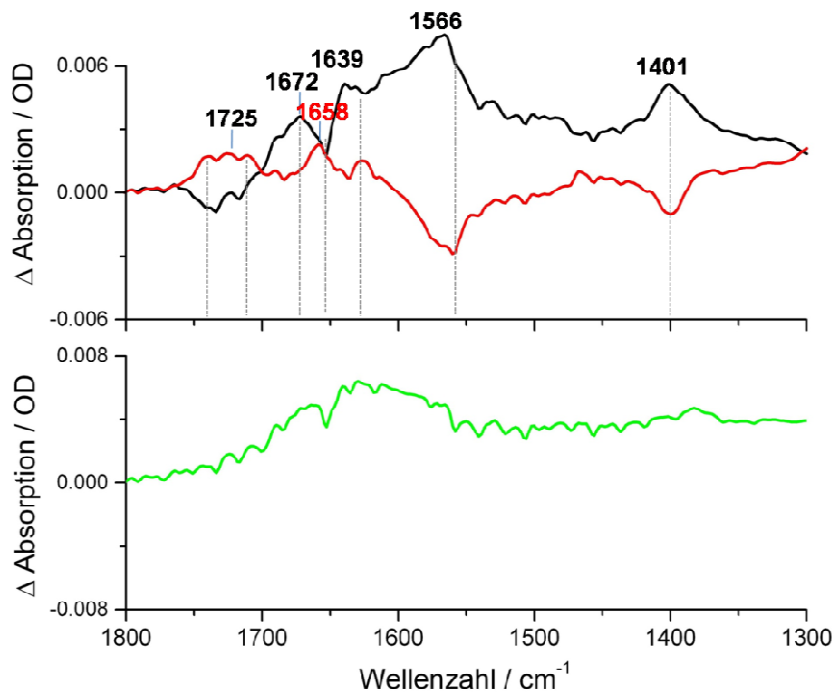


Abbildung 90a: MjNhaP1 WT (2D-Kristalle) Differenzspektren des inaktiven und aktiven Zustands (die nach 120 Minuten in dem jeweiligen Puffer 2 aufgenommenen Spektren in Abbildung 89). Oben: Inaktivierung (—), MjNhaP1 perfundiert mit pH 8 minus MjNhaP1 perfundiert mit pH 6, und Aktivierung des Proteins (—), MjNhaP1 perfundiert mit pH 6 minus MjNhaP1 perfundiert mit pH 8. Unten: Basislinie, durch die Addition der oberen Differenzspektren gebildet.

Die um die Basislinie (Abbildung 90a unten) korrigierten Differenzspektren (Abbildung 90a oben) sind in Abbildung 90b dargestellt. Diese Differenzspektren erscheinen durch die Basislinien-Korrektur geglättet. Im Folgenden werden die wichtigsten Differenzsignale in den verschiedenen Regionen beschrieben und diskutiert.

¹⁴Die Basislinie wurde durch die Addition der beiden gezeigten Differenzspektren, so dass die entgegengesetzten Phosphatbanden im Bereich zwischen 1200 cm^{-1} und 1000 cm^{-1} (Abbildung 89) verschwinden, erhalten.

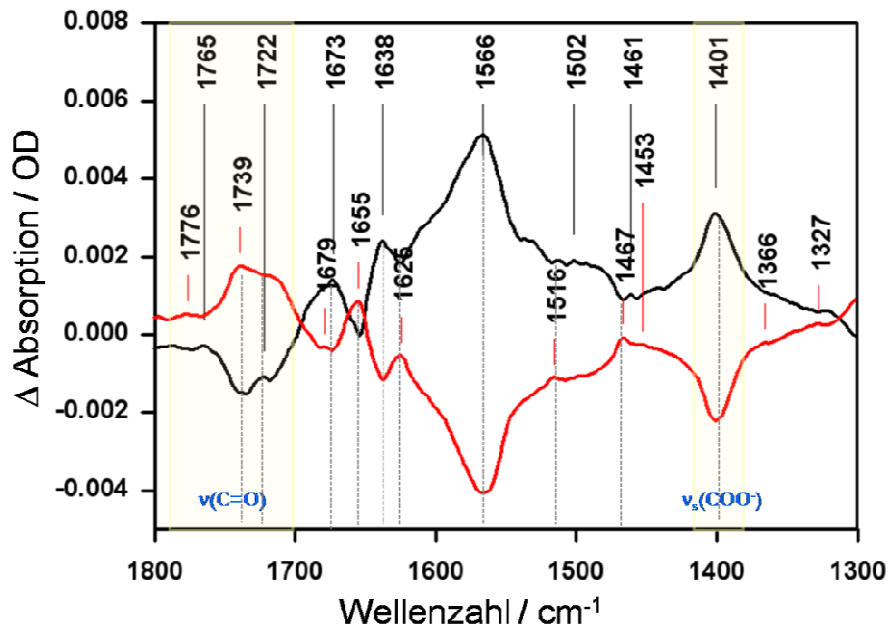


Abbildung 90b: Mit der Basislinie korrigierten Differenzspektren von 2D-Kristallen MjNhaP1 WT bei pH 8 minus MjNhaP1 bei pH 6 (—) und MjNhaP1 bei pH 6 minus MjNhaP1 bei pH 8 (—).

Die Region von 1800 bis 1700 cm^{-1}

In diesem Absorptionsbereich werden die Signale durch die C=O Streckschwingung der Aminosäureseitenketten von Asp und Glu verursacht (s. Abbildung 56, s. S. 94).

Die Aktivierung des Proteins verursacht die Differenzsignale bei (+) 1776 cm^{-1} , (-) 1765 cm^{-1} , (+) 1739 cm^{-1} und (-) 1722 cm^{-1} . Dieses spiegelt die Änderung in den Eigenschaften der Aminosäureseitenketten Asp und/oder Glu mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins wider. Aufgrund der höheren Position dieser Schwingungen im aktiven Zustand induziert die Aktivierung wahrscheinlich eine Schwächung der H-Brückenbindung zu der C=O Gruppe von Asp und/oder Glu Seitenketten.

Ein Anteil der Differenzsignale in diesem Bereich kann aber auch durch die C=O Streckschwingung der Protein umgebenden Lipide, die durch die Konformationsänderung des Proteins gestört werden, verursacht werden. Dieses wird durch den Vergleich der Differenzspektren der in Detergenz solubilisierten Proteinprobe im nächsten Kapitel bestätigt.

Die Amid I Region (1700-1600 cm^{-1})

Im Amid I Bereich beobachtet man, die Differenzsignale bei 1673 cm^{-1} und 1638 cm^{-1} und bei 1655 cm^{-1} und 1626 cm^{-1} . Die Aktivierung induziert das Entstehen der Komponenten bei 1655 cm^{-1} , die der α -Helix zugeordnet werden kann, und das Entstehen der Komponente bei 1626 cm^{-1} . Letztere wird entweder durch die Änderungen in den Eigenschaften der

Aminosäureseitenketten (Lysin, Tyrosin, Asparagin oder Glutamin) oder durch die Änderungen der Protein-Protein Wechselwirkung verursacht.

Bei Inaktivierung entstehen dagegen die Komponenten bei 1673 cm^{-1} und 1638 cm^{-1} . Diese Signale können durch das Entstehen des β -Faltblatts verursacht werden, wobei die hochfrequente Komponente auch die Schleifenstrukturen darstellen kann. Ein Anteil der Komponenten bei 1673 cm^{-1} und 1638 cm^{-1} kann aber auch durch die asymmetrische bzw. symmetrische Streckschwingung der CN_3H^{5+} -Gruppe der Aminosäureseitenkette Arginin (Arg) hervorgerufen worden sein [23]. Dass Arg eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Proteins spielt, wurde durch den Austausch dieser Aminosäure bewiesen. Bei diesen Mutationen wurde Arg an den Positionen 347 bzw. 320, durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht [18]. Dieses führte zu einer vollständigen bzw. teilweisen Inaktivität des Proteins. Die im letzten Kapitel vorgestellten Ergebnisse zum $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch der Mutante R347A bestätigten, dass die Mutante sich unabhängig vom pH-Wert im inaktiven Zustand des Wildtyps befindet.

Die Amid II Region ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$)

Außer im Bereich der Amid I Bande beobachtet man auch im Bereich der Amid II Bande bei 1566 cm^{-1} die Änderungen, die mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins induziert werden. Dass das Signal der Amid II Bande viel größer als die Signale der Amid I Bande sind, liegt an der Orientierung der 2D-Kristalle (s. Kapitel 4.7.2).

Die Region von 1500 bis 1400 cm^{-1}

Die symmetrische Streckschwingung der deprotonierten Carboxylgruppe $\nu_s(\text{COO}^-)$ von Asp und Glu Aminosäureseitenkette absorbiert bei etwa 1400 cm^{-1} [75]. In dem Differenzspektrum der Inaktivierung (inaktiv-minus-aktiv) beobachtet man die positive Bande bei 1401 cm^{-1} , die wahrscheinlich durch die deprotonierte Seitenkette von Asp und/oder Glu verursacht wird. Das bedeutet, dass diese Bande, zusammen mit den vorher besprochenen Banden in der Absorptionsregion der $\text{C}=\text{O}$ Streckschwingung, auf die Änderung der Protonierung und/oder der Umgebungsänderung von einer oder mehreren Seitenketten von Asp oder Glu mit der Aktivierung hindeuten.

4.8.2 pH-induzierte Sekundärstrukturänderung von in Detergenz solubilisierten MjNhaP1 WT

Um die Differenzspektren von der in Detergenz solubilisierten Proteinprobe zu erhalten, wurde die im Kapitel 4.8.1 beschriebene Prozedur angewandt. Die Differenzspektren nach der Basislinienkorrektur sind für die Aktivierung (aktiv-minus-inaktiv) (rot) und für die Inaktivierung (inaktiv-minus-aktiv) (schwarz) des Wildtyps in Abbildung 91 dargestellt.

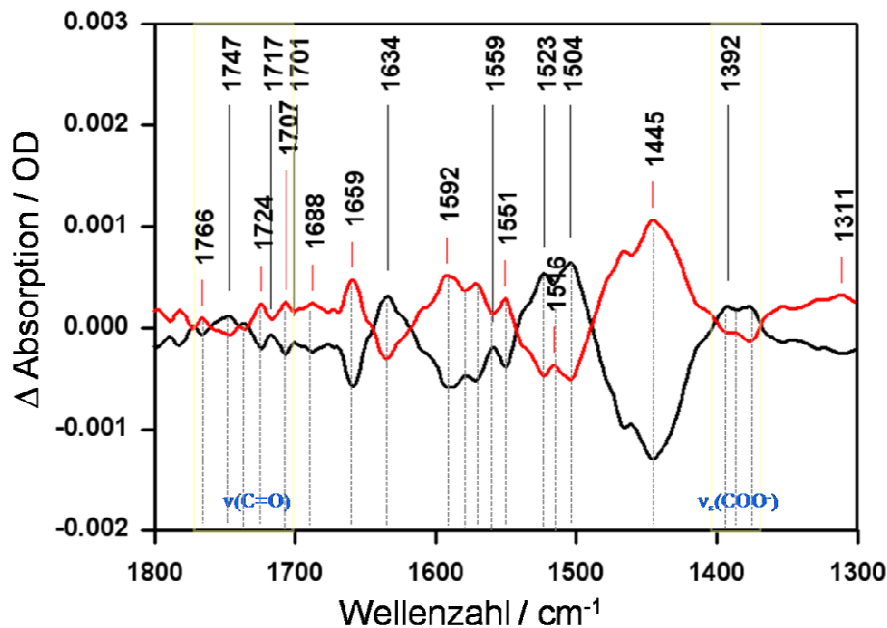


Abbildung 91: Differenzspektren von der Detergenz solubilisierten Probe von MjNhaP1 WT nach der Basislinienkorrektur. MjNhaP1 bei pH 8 minus MjNhaP1 bei pH 6 (—) und MjNhaP1 bei pH 6 minus MjNhaP1 bei pH 8 (—).

Die Region von 1800 bis 1700 cm^{-1}

Wie bei der Beschreibung der Differenzspektren der 2D-Kristalle bereits erwähnt, werden die Signale in dieser Region durch die C=O Streckschwingung der Seitenketten von Asp und Glu verursacht. Im Gegensatz zu den Differenzspektren der 2D-Kristalle werden die Differenzsignale der in Detergenz solubilisierten Probe nicht durch eine breite Bande in dieser Region überlagert. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass die beobachtete breite Bande in dieser Region bei den Differenzspektren der 2D-Kristalle durch die Änderung der Umgebung der Lipide verursacht wird.

Mit der Aktivierung des Proteins beobachtet man das Entstehen bzw. das Verschwinden der Komponenten bei (+) 1766 cm^{-1} , (-) 1747 cm^{-1} , (+) 1724 cm^{-1} , (-) 1717 cm^{-1} , (+) 1707 cm^{-1} und (-) 1701 cm^{-1} . In Analogie zu den Differenzspektren der 2D-Kristalle sind die Komponenten der

C=O Streckschwingung im aktiven Zustand im Vergleich zum inaktiven Zustand zu größeren Wellenzahlen verschoben. Das deutet darauf hin, dass mit der Aktivierung die Stärke der H-Brücke zur C=O Gruppe von Glu und/oder Asp abnimmt.

Die Amid I Region (1700-1600 cm^{-1})

Die Aktivierung verursacht im Amid I Absorptionsbereich zwei Hauptkomponenten, die positive Komponente bei 1659 cm^{-1} und die negative Komponente bei 1634 cm^{-1} . Im Gegensatz zu den Differenzspektren der 2D-Kristalle beobachtet man hier keine breiten Komponenten bei 1673 cm^{-1} und 1626 cm^{-1} . Das lässt vermuten, dass diese Komponenten auf die Eigenschaften der Probenformen, d.h. den 2D-Kristallen, zurückgeführt werden können, und wahrscheinlich durch die Änderung des intermolekularen β -Faltblatts verursacht wurden. Beiden Proben weisen aber Signale bei etwa 1659 cm^{-1} , (bei 1655 cm^{-1} bei 2D-Kristallen), und 1634 cm^{-1} (bei 1638 cm^{-1} bei 2D-Kristallen) auf. Das bedeutet, dass diese zwei Komponenten unabhängig von der Probenpräparation mit der Zustandsänderung des Proteins einhergehen. Die Zuordnung dieser Banden wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

Die Amid II Region (1600-1500 cm^{-1})

Die zwei Signale, die wahrscheinlich die Komponenten der Amid II Bande darstellen, werden bei $\sim 1559 \text{ cm}^{-1}$ und bei $\sim 1551 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet. Diese korrelieren mit den Komponenten bei 1636 cm^{-1} und 1659 cm^{-1} im Amid I-Bereich. Die Komponenten bei 1659 cm^{-1} und bei 1549 cm^{-1} deuten auf die Änderung der α -Helix zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand hin. Die Zuordnung der Komponenten bei 1636 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} , die mit der Inaktivierung des Proteins kommen, ist dabei etwas schwieriger. Die Absorption bei 1636 cm^{-1} kann durch die α -Helix, ungeordnete Struktur, das β -Faltblatt und die Aminosäureseitenkette verursacht werden. Da diese Bande auch bei den 2D-Kristallen beobachtet wurde, können die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches helfen, diese Bande zuzuordnen. Falls der beobachtete $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch der 2D-Kristalle, wo ein größerer Austausch im aktiven Zustand (pD 6) beobachtet wurde, nur die Änderungen in der Austauschrate zwischen den Bereichen, die für die Aktivierung des Proteins verantwortlich sind, widerspiegelt, dann müsste die Komponente bei 1636 cm^{-1} entweder von α -helikaler Struktur oder von der β -Faltblatt Struktur stammen. Für das Entstehen von β -Faltblatt sprechen die Ergebnisse der CD-Sekundärstrukturanalyse (siehe Kapitel 4.5.2). Dort konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung die Auflösung von α -Helices und die Ausbildung von β -Faltblatt und ungeordneten Strukturen auslöst. Auch die Thermostabilität und die Zugänglichkeit der in der Detergenz solubilisierten Probe im inaktiven Zustand des Proteins würde eine Interpretation der Komponente bei 1636 cm^{-1} als ungeordnete Struktur zulassen. Bei

diesen Experimenten hatte die Inaktivierung des Proteins eine geringere thermische Stabilität und eine höhere Zugänglichkeit zur Folge.

$\nu_{as}(\text{COO}^-)$ in der Region von 1600 bis 1550 cm^{-1}

Die Änderung des Aktivierungszustands verursacht das Entstehen bzw. das Verschwinden von mehreren Komponenten in einem Teil der Amid II Region von 1600 cm^{-1} bis 1550 cm^{-1} . Dabei beobachtet man im aktiven Zustand des Proteins die Komponenten bei (+) $\sim 1592 \text{ cm}^{-1}$, (-) $\sim 1579 \text{ cm}^{-1}$, (+) $\sim 1570 \text{ cm}^{-1}$ und (-) $\sim 1560 \text{ cm}^{-1}$. Diese Differenzsignale entstehen durch die Änderung in den Eigenschaften der antisymmetrischen Streckschwingung der COO^- -Gruppe der Seitenkette von Glu und/oder Asp mit der Aktivierung des Proteins. Dass man mit der Aktivierung des Proteins die Zunahme in der Frequenz der COO^- Streckschwingung beobachtet, könnte an der Wechselwirkung von Natrium mit den negativ geladenen Seitenketten von Asp oder Glu liegen [72,75]. Aber auch eine Wechselwirkung zwischen der COO^- -Gruppen und den Seitenketten von Arg und Lys könnte eine Verschiebung der antisymmetrischen Streckschwingung zu höheren Wellenzahlen verursachen [72].

$\nu_s(\text{COO}^-) \sim 1400 \text{ cm}^{-1}$

Auch für die symmetrische Streckschwingung der COO^- -Gruppe von Glu/Asp – Seitenketten beobachtet man die Differenzsignale mit Änderung des pH-Werts. Die pH-abhängige Bande absorbiert bei etwa 1392 cm^{-1} und wurde auch bei den Differenzspektren von 2D-Kristallen bei 1401 cm^{-1} beobachtet. Mit der Inaktivierung nimmt die Absorption in diesem Bereich zu, was als eine Änderung des Protonierungszustands und/oder einer Umgebungsänderung der Aminosäureseitenketten (Glu oder/ Asp) interpretiert werden kann.

4.8.3 Vergleich Wildtyp / R347A Mutante

Die Untersuchung zur thermischen Stabilität (Kapitel 4.6) des Proteins, aber auch die FTIR-Sekundärstrukturanalyse (Kapitel 4.5.3) zeigten, dass die R347A Mutante zwischen pD 6 und pD 8 ähnlich wie der Wildtyp verhält. Doch die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausches zwischen diesen beiden pD-Werten bestätigten die Fluoreszenz-Experimente [18], wonach sich die Mutante unabhängig vom pH-Wert im inaktiven Zustand befindet. Um zu prüfen, welche Konformationsänderungen durch die Änderung des pH-Werts verursacht werden und ob diese dem Wildtyp ähnlich sind, wurden die Differenzspektren aufgenommen.

In Abbildung 92 ist das Differenzspektrum (pH8-minus-pH6) (grün) der R347A Mutante und zum Vergleich die Differenzspektren der Inaktivierung (pH8-minus-pH6) und der Aktivierung (pD6-minus-pD8) für den Wildtyp dargestellt. Dabei beobachtet man, dass einige der

Komponenten, welche durch die Änderung des pH-Werts bei dem Wildtyp verursacht werden, auch die Mutante zwischen pH 6 und pH 8 zeigt. Ähnlich dem Wildtyp induziert die Erhöhung des pH-Werts eine positive Komponente bei 1641 cm^{-1} und eine negative bei 1663 cm^{-1} . Diese Wellenzahlen sind aber bei der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu größeren Wellenzahlen verschoben, was durch die Änderung der Stärke der Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden kann. Das bedeutet, dass die Mutante bei Änderung des pH-Werts zwar die gleichen Konformationsänderungen wie der Wildtyp erfährt, aber bei der Mutante die Wasserstoffbrückenbindungen schwächer sind. Beim Differenzspektrum der Mutante fällt das Fehlen der Änderungen in der Absorptionsregion ($\sim 1750 - 1700\text{ cm}^{-1}$) der C=O Streckschwingung der protonierten Aminosäureseitenketten zwischen pH 6 und pH 8 auf. Im Absorptionsbereich der symmetrischen Streckschwingung der COO^- Gruppen beobachtet man ein Differenzsignal zwischen pH 6 und pH 8. Dass bei der Mutante unabhängig vom pH-Wert nur die Differenzsignale im Bereich der deprotonierten Aminosäureseitenkette zu beobachten sind, bestätigt die Annahme, dass mit der Aktivierung des Proteins eine Protonierung der Seitenketten Asp und/oder Glu verbunden ist. Alternativ kann das Fehlen der Differenzsignale in der Region von 1800 bis 1700 cm^{-1} bei der Mutante durch eine unveränderte H-Brücke zur C=O Gruppe der Seitenkette von Asp und/oder Glu mit der Änderung des pH-Wertes erklärt werden. Demnach würde die Mutation mit der Erniedrigung des pH-Werts die Änderung in der Stärke der H-Brückenbindung zur C=O Gruppe, die für die Aktivierung des Proteins notwendig ist, verhindern.

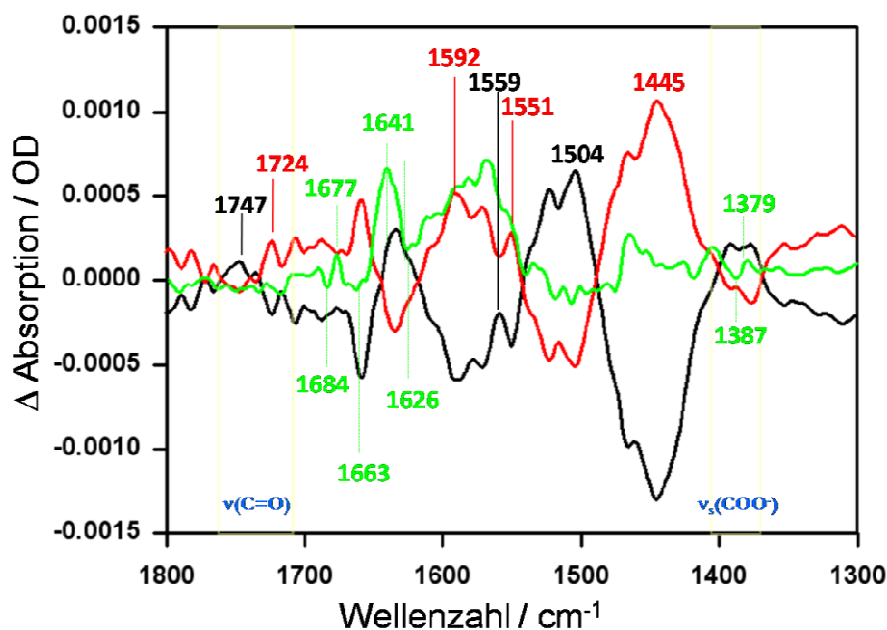


Abbildung 92: Differenzspektrum pH 8 minus pH 6 von der R347A Mutante (—) und zum Vergleich die Differenzspektren des Wildtyps von Abbildung 91a (Proteinproben in der Detergenz solubilisiert)

TEIL III. NHAA UND MjNHAP1

4.9 Zusammenfassender Vergleich zwischen NhaA und MjNhaP1

Die Na^+/H^+ Antiporter NhaA aus *E. coli* und MjNhaP1 aus *M. jannaschii* unterscheiden sich in der pH-Abhängigkeit des Transports von Natriumionen und Protonen. Eine Änderung des pH-Werts induziert wahrscheinlich eine Konformationsänderung, die die Aktivierung oder Inaktivierung des Proteins verursacht [83]. NhaA wird durch pH-Werte im alkalischen Bereich ($\sim\text{pH } 8$) aktiviert, während MjNhaP1 bei pH 6 aktiv und bei pH 8 inaktiv ist.

Der Vergleich der in Abbildung 93 gezeigten 2D-Modelle der Sekundärstruktur von NhaA [84] und MjNhaP1 [18] deutet auf unterschiedliche Konformationen dieser beiden Antiporter hin. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, die in dieser Arbeit für NhaA und MjNhaP1 vorgestellt wurden, verglichen. Dabei soll geklärt werden, in wieweit sich die Konformationen der beiden Antiporter unterscheiden. Weiterhin wird geprüft, ob es Analogien zwischen den beiden aktivierungsabhängigen Konformationsänderungen gibt.

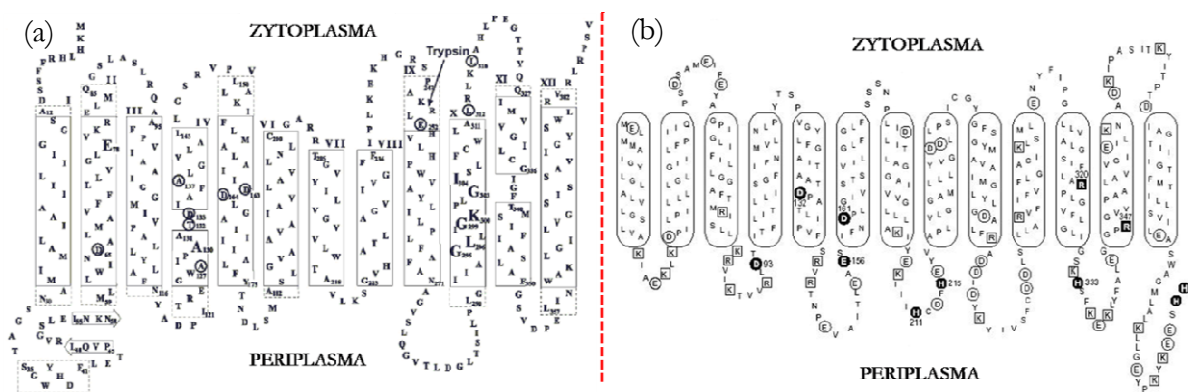


Abbildung 93: 2D-Modell der Sekundärstruktur von (a) NhaA aus *E. coli* [84] und (b) MjNhaP1 aus *M. jannaschii* [18]. Die transmembranen Segmente (TMS) sind mit einer durchgezogenen Linie umrandet. Bei NhaA sind die TMS-Regionen, die zum Zytoplasma bzw. Periplasma exponiert sind, mit der gestrichelten Linie markiert.

4.9.1 FTIR- und CD-Sekundärstrukturanalyse (s. Kapitel 4.1.1; 4.1.3; 4.5.1; 4.5.2)

Schon die IR-Absorptionsspektren in H_2O oder D_2O -Puffer zeigen globale strukturelle Unterschiede zwischen NhaA und MjNhaP1. Im Vergleich zu NhaA sind die Absorptionsmaxima der Amid I und Amid II Banden von MjNhaP1 zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Die Auflösung der Amid I Bande in ihre Komponenten mit Hilfe der 2. Ableitung

zeigt, dass die Wellenzahlverschiebung alle Komponenten betrifft. Die größte Absorption hat in beiden Proteinen die α -helikale Komponente, die bei NhaA bei 1658 cm^{-1} und bei MjNhaP1 bei 1655 cm^{-1} liegt. Im Übrigen zeigt sich in beiden Proteinen ein Anteil an β -Faltblatt Struktur. Die Präsenz von β -Faltblatt wird bei NhaA durch die Bande bei 1630 cm^{-1} mit den hochfrequenten Banden bei 1678 cm^{-1} und 1691 cm^{-1} und für MjNhaP1 durch die Bande bei 1628 cm^{-1} mit den Banden bei 1683 cm^{-1} und 1692 cm^{-1} gekennzeichnet. Die Wellenzahlverschiebung aller Banden bei MjNhaP1 im Vergleich zu NhaA deutet auf eine unterschiedliche intermolekulare Wechselwirkung oder Unterschiede in der Anordnung der einzelnen Sekundärstrukturelementen in den beiden Proteinen hin. Für die FTIR-Sekundärstrukturanalyse wurden die Banden aus der 4. Ableitung benutzt (Tabelle 11).

ZUORDNUNG	NhaA pH 7 [inaktiv]		NhaA pH 8 [aktiv]		MjNhaP1 pH 6 [aktiv]		MjNhaP1 pH 8 [inaktiv]	
	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
β -Faltblatt	1622	10	1622	5				
β -Faltblatt	1631	7	1631	12	1628	18	1627	19
β -Faltblatt/ β -Schleife/ α -Helix/ ungeordnet	1639	10	1639	6	1640	14	1639	13
α -Helix	1648	17	1649	18				
α -Helix+ungeordnet	1657	42	1657	48	1655	43	1655	56
Schleifen/ α -Helix					1666	11	1670	2
Schleifen	1676	12	1678	8	1681	7	1680	8

ZUORDNUNG	NhaA pD 7 [inaktiv]		NhaA pD 8 [aktiv]		MjNhaP1 pD 6 [aktiv]		MjNhaP1 pD 8 [inaktiv]	
	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%	cm ⁻¹	%
β -Faltblatt	1621	1	1621	5				
β -Faltblatt	1633	22	1629	18	1627	16	1627	16
ungeordnet	1639	2	1641	19	1639	19	1642	42
α -Helix	1649	25	1650	12				
α -Helix	1659	37	1658	41	1654	49	1652	24
α -Helix					1664	9	1663	12
Schleifen	1673	10	1678	3	1678	4	1677	3

Tabelle 11: Zusammenstellung der Frequenzkomponenten durch die Bandenanalyse an die Amid I Bande für NhaA und MjNhaP1 für den inaktiven und den aktiven Zustand in H₂O und in D₂O-Puffer und die Zuordnung zu verschiedenen Sekundärstrukturelementen

Dabei fällt auf, dass NhaA und MjNhaP1 zwei verschiedene Banden im Absorptionsbereich der α -Helix (1648 cm^{-1} bis 1664 cm^{-1}) zeigen. Das bestätigt die Annahme, dass die Anordnung

und/oder Art der α -Helices in diesen beiden Proteinen unterschiedlich ist. Auch im Absorptionsbereich des β -Faltblatts (1621 cm^{-1} bis 1631 cm^{-1}) beobachtet man ein unterschiedliches Absorptionsverhalten bei NhaA und MjNhaP1. MjNhaP1 zeigt keine Bande bei 1621 cm^{-1} . Bei NhaA stellt diese Bande entweder das intermolekulare β -Faltblatt, oder die Polypeptidkette, die die zwei kurzen α -Helices der TMS IV und XI miteinander verbindet dar. Weiterhin beobachtet man bei NhaA, dass sich die Komponente des β -Faltblatts bei 1631 cm^{-1} in H_2O -Puffer bei Aktivierung in D_2O -Puffer (pD 8) zu kleineren Wellenzahlen verschiebt. Diesen Effekt zeigt MjNhaP1 nicht. Das lässt darauf schließen, dass bei MjNhaP1 das β -Faltblatt nicht wie bei NhaA im Aktivierungsmechanismus beteiligt ist. Dass das β -Faltblatt bei NhaA eine Rolle im aktiven Zustand spielt, wurde mittels Inhibitor erprobt (s. Kapitel 4.4.7). Die Differenzspektren zeigten, dass die Bindung des Inhibitors hauptsächlich die Änderungen in der Region des β -Faltblatts von NhaA verursacht.

Sowohl die FTIR- als auch die CD-Sekundärstrukturanalyse (Abbildung 94) zeigen, dass die Sekundärstruktur von NhaA und MjNhaP1 hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut ist. Bei NhaA macht die α -helikale Struktur etwa 60 % der Gesamtstruktur des Proteins aus, was sehr gut mit dem Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse (59 %) übereinstimmt. Die FTIR-Sekundärstrukturanalyse zeigt auch für MjNhaP1 bei pD 6 einen Anteil an α -helikaler Struktur von 58 %, während sich aus den CD-Daten nur ein Anteil von 45 % für diese Struktur ergibt. Das MjNhaP1 Sekundärstrukturmodell (Abbildung 93) zeigt 13 TMS, die wahrscheinlich durch α -Helices ausgebildet werden. In diesem Modell sind 273 Aminosäuren (64 %) an der Ausbildung der transmembranen Segmente beteiligt. Nach den Ergebnissen der FTIR-Sekundärstrukturanalyse (58 %) bilden 249 Aminosäuren wahrscheinlich die transmembranen α -Helices aus. Das sind etwa 24 Aminosäuren (entspricht etwa einem TMS) weniger, als mit dem Strukturmodell vorhergesagt. Damit liegt die Vermutung nahe, dass MjNhaP1 nicht aus 13, sondern wie NhaA aus 12 transmembranen Segmenten besteht.

Für MjNhaP1 bei pD 8 stimmen die Vorhersagen der FTIR- und CD-Sekundärstrukturanalyse für den α -helikalen Anteil ($\sim 35\%$) sehr gut überein. Damit hat dieses Protein bei diesen Bedingungen, verglichen mit anderen Proteinproben, den geringsten Anteil an α -Helix und den größten Anteil an ungeordneter Struktur, was sich auch bei der thermischen Stabilität, wie im nächsten Absatz beschrieben wird, äußert. Damit unterscheiden sich die inaktiven Zustände von NhaA bei pD 6 ($\sim 60\%$) und MjNhaP bei pD 8 ($\sim 35\%$) in den Anteilen der α -helikalen Struktur deutlich.

Die aktiven Zustände von NhaA (pD 8) und von MjNhaP1 (pD6) zeigten ähnliche Ergebnisse für die Anteile an α -helikaler und ungeordneter Struktur. Der geringe Unterschied zwischen dem aktiven Zustand dieser beiden Antiporter ist durch den Anteil an β -Faltblatt bedingt, der bei NhaA höher ist. Das bedeutet, dass die Konformation, die die Aktivierung des Proteins induziert, in beiden Antiportern ähnlich ist. Dies wird auch bei den Differenzspektren beobachtet und wird ausführlich im Abschnitt über die pH-induzierten Sekundärstrukturänderungen diskutiert.

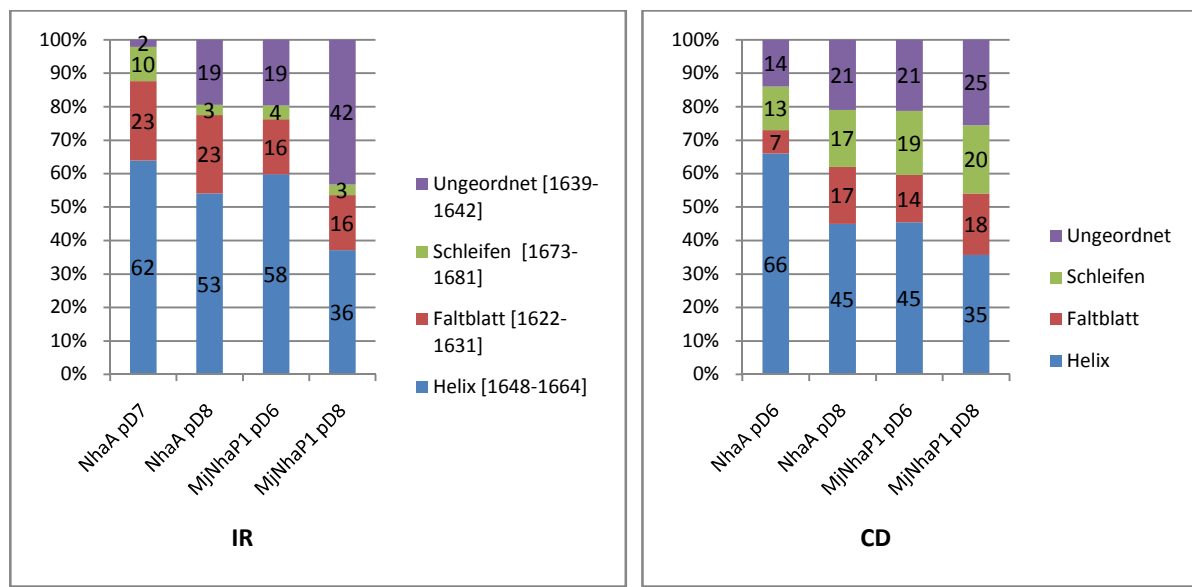


Abbildung 94: Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse von NhaA und MjNhaP1 im D₂O-Puffer. Resultate aus den IR-Spektren (links) bzw. aus den CD-Spektren (rechts)

4.9.2 Thermische Stabilität (s. Kapitel 4.2.1 und 4.6.1)

Die strukturellen Unterschiede der Na⁺/H⁺ Antiporter NhaA und MjNhaP1 spiegeln sich auch in der thermischen Stabilität der Proteine wider. Im Entfaltungsprozess der α -Helix zeigt MjNhaP1 bei pD 6 die höchste Übergangstemperatur von 74 °C. *Methanococcus jannaschii* ist ein hyperthermophiles Archaeon und seine natürliche Umgebung ist das Meer mit einem pH-Wert von 4 bis 6. Angesichts der natürlichen Umgebung von MjNhaP1 war die hohe thermische Stabilität bei pD 6 zu erwarten. Dass mit der Erhöhung des pD-Werts bei pD 8 die Übergangstemperatur um 40 °C abnimmt, bestätigt die großen strukturellen Unterschiede (Abbildung 94) im Bereich der α -Helices zwischen dem inaktiven (pD 8) und dem aktiven Zustand (pD 6) von MjNhaP1.

Die thermische Stabilität von NhaA aus *E. coli* nimmt auch mit der Erhöhung des pD-Werts ab, allerdings beträgt der Unterschied bei den Übergangstemperaturen nur etwa 18 °C. Die Untersuchung der Mutante G338S (s. Kapitel 4.2.2) von NhaA, die sich unabhängig vom pH-

Wert immer im aktiven Zustand befindet, bestätigte, dass der beobachtete Unterschied in der thermischen Stabilität bei NhaA zwischen pD 6 und pD 8 auf die aktivierungsinduzierten Konformationsänderungen zurückgeführt werden kann. Dagegen induzierte die Erhöhung des pD-Werts bei der R347A Mutante von MjNhaP1, die sich unabhängig vom pH-Wert im inaktiven Zustand befindet, ein ähnliches thermisches Verhalten wie bei dem Wildtyp. Daraus lässt sich folgern, dass bei MjNhaP1 die Erhöhung des pH-Werts zu einer höheren Instabilität des Proteins führt.

KOMPONENTE	NhaA pD 6	NhaA pD 8	MjNhaP1 pD 6	MjNhaP1 pD 8
	[inaktiv]	[aktiv]	[aktiv]	[inaktiv]
α -Helix	63 °C	45 °C	74 °C	34 °C
β -Faltblatt	53 °C	44 °C	62 °C	58 °C

Tabelle 12: Die mittleren Übergangstemperaturen des Entfaltungsprozesses bei der α -Helix und β -Faltblatt Komponente für NhaA und MjNhaP1 im D₂O-Puffer.

Im Gegensatz zur α -Helix zeigt die β -Faltblatt Komponente von MjNhaP1 fast keinen Unterschied in der thermischen Stabilität zwischen dem inaktiven und dem aktiven Zustand. Damit ist die Stabilität der β -Faltblatt Struktur nicht vom Aktivierungsprozess von MjNhaP1 abhängig. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei der Aktivierung von MjNhaP1 nur ein begrenzter Bereich des Proteins, der nicht die Struktur des β -Faltblatts beinhaltet, involviert ist. Doch aufgrund einer um 25 °C höheren Entfaltungstemperatur des β -Faltblatts im Vergleich zur α -Helix im inaktiven Zustand von MjNhaP1 ist das β -Faltblatt wahrscheinlich für die Gesamtstabilität des Proteins von fundamentaler Bedeutung. Aufgrund der Strukturanalogie zu NhaA liegt die Vermutung nahe, dass das antiparallele β -Faltblatt den Hauptkontakt zwischen den Monomeren bildet. Das bedeutet, dass die Erhöhung der Temperatur zuerst die Entfaltung der instabilen α -Helix Region und dann die Monomerisierung des Proteins zu Folge hat. Da im aktiven Zustand von MjNhaP1 bei pD 6 der Entfaltungsprozess der α -Helix bei einer um 10 °C höheren Temperatur stattfindet als der des β -Faltblatts, führt die Monomerisierung des Proteins wahrscheinlich nicht zum Funktionsverlust des Antiporters.

Im Gegensatz zu MjNhaP1 beobachtet man bei NhaA auch eine Änderung in der thermischen Stabilität des β -Faltblatts zwischen inaktivem und aktivem Zustand. Auch bei NhaA bildet das β -Faltblatt den Hauptkontakt zwischen den Monomeren. Im aktiven Zustand bei pD 8 finden die Änderungen der Monomer-Monomer Wechselwirkungen und die Entfaltung der α -Helices bei der gleichen Temperatur statt. Das lässt darauf schließen, dass im Gegensatz zu MjNhaP1 die Aktivität von NhaA nur dann gewährleistet ist, wenn dieser als Dimer vorliegt. Das zeigt, dass bei

NhaA auch das β -Faltblatt an der Aktivierung des Proteins beteiligt ist und bestätigt auch die beobachteten Unterschiede in der Sekundärstrukturanalyse im Bereich der β -Faltblatt Struktur zwischen den aktiven Zuständen von NhaA und MjNhaP1.

4.9.3 Dynamik und Flexibilität (s. Kapitel 4.3.1 und 4.7.1)

NhaA und MjNhaP1 zeigten ein unterschiedliches Verhalten im $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch, welches die Dynamik und Flexibilität der jeweiligen Proteine widerspiegelt. Die offenste, für die Lösung zugänglichste Konformation besitzt der aktive Zustand des Na^+/H^+ Antiporters NhaA aus *E. coli*. Ca. 69 % der Amid-Gruppen waren am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch aktiv beteiligt, was einer Anzahl von etwa 268 Aminosäuren entspricht. Im inaktiven Zustand von NhaA waren nur 57 % der Amid-Gruppen für die Lösung zugänglich. Das bedeutet, dass die Aktivierung von NhaA eine Konformationsänderung induziert, bei welcher zusätzlich ca. 40 Aminosäuren der Lösung exponiert sind. Dass es sich um aktivitätsbedingte Lösungsmittelzugänglichkeit handelt, bestätigte die Mutante G338S, bei der unabhängig vom pH/pD-Wert der gleiche Austausch wie bei dem aktiven WT beobachtet wurde.

	NhaA pH/pD 6 [inaktiv]	NhaA pH/pD 8 [aktiv]	MjNhaP1 pH/pD 6 [aktiv]	MjNhaP1 pH/pD 8 [inaktiv]
$^1\text{H}/^2\text{H}$ ausgetauschte Amid-Gruppen	59 % (229 AS)	69 % (268 AS)	35 % (149 AS)	57 % (243 AS)

Tabelle 13: Übersicht über den Anteil der nach etwa 24 Stunden am $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch aktiv beteiligten Amid-Gruppen für NhaA und MjNhaP1 [AS - Aminosäuren].

MjNhaP1 zeigt im Vergleich zu NhaA ein unterschiedliches Verhalten in der Zugänglichkeit der Amid-Gruppen zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand. Im inaktiven Zustand bei pD 8 sind 23 % mehr Amid-Gruppen für die Lösung zugänglich als im aktiven Zustand bei pD 6. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem Ergebnis der FTIR-Sekundärstrukturanalyse überein, bei der ein um 23 % höherer Anteil der ungeordneten Struktur ($\sim 1642\text{ cm}^{-1}$) bei pD 8 beobachtet wurde. Eine ungeordnete Struktur hat für die Lösung eine höhere Zugänglichkeit als geordnete Strukturen, wie z.B. α -Helices. Wie bei NhaA bestätigte auch hier die Mutante R347A, dass der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch von der Konformation des inaktiven bzw. des aktiven Zustandes abhängig ist. Bei der Mutante, die keine die pH-abhängige Aktivität zeigt, wurde etwa der gleiche Anteil der Amid-Gruppen wie beim inaktiven Zustand unabhängig vom pH/pD-Wert ausgetauscht.

Im aktiven Zustand von MjNhaP1 beobachtet man einen Austausch von 35 %. Nach dem 2D-Strukturmodell (Abbildung 93) befinden sich 154 Aminosäuren (36 %) in der hydrophilen Region des Proteins. Da der $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austausch im aktiven Zustand nach wenigen Minuten abgeschlossen ist, spiegelt er wahrscheinlich nur den Austausch der Amid-Gruppen in der hydrophilen Region des Proteins wider. Im Gegensatz zu den Vorhersagen der FTIR-Sekundärstrukturanalyse (s. S. 84) bestätigt dieses Ergebnis, die 13 transmembranen Segmente von MjNhaP1.

4.9.4 pH-induzierte Sekundärstrukturänderung (s. Kapitel 4.4.1 und 4.8.2)

Die Aufnahme von reaktions-induzierten Differenzspektren ermöglichte es, eindeutige molekulare Signaturen für den inaktiven und aktiven Zustand von NhaA und MjNhaP1 zu charakterisieren.

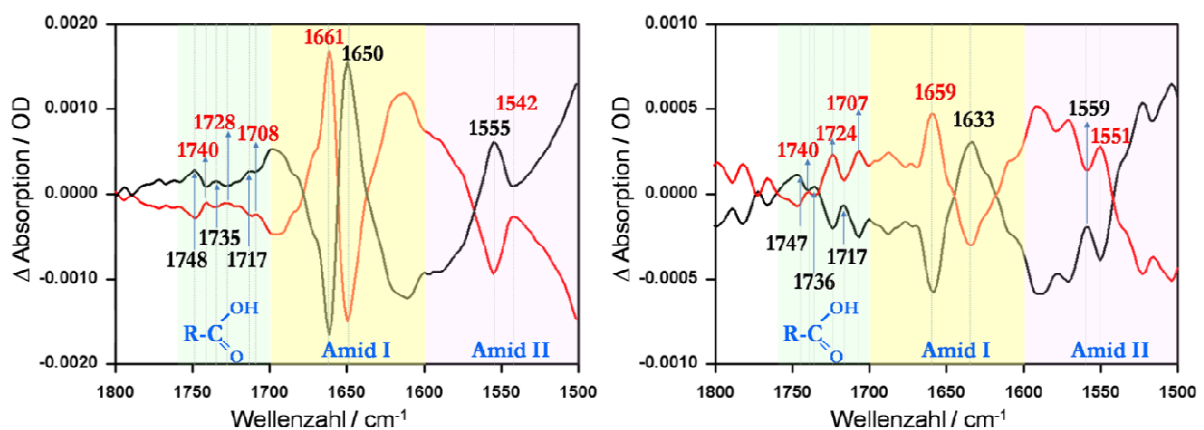


Abbildung 95: Differenzspektren von NhaA (links) und MjNhaP1 (rechts) für den inaktiven Zustand (inaktiv-minus-aktiv) (—) und den aktiven Zustand (aktiv-minus-inaktiv) (—).

Im Amid I Bereich beobachtet man für beide Antiporter zwei Hauptkomponenten, die mit der Zustandsänderung einhergehen (Abbildung 95). Die Aktivierung von NhaA induziert die Komponenten bei (+) 1661 cm^{-1} und (-) 1650 cm^{-1} , die jeweils durch die unterschiedlichen Arten (Länge oder Ordnungsgrad) oder Anordnungen der α -Helices verursacht wurden. Während die positive Komponente des Aktivierungsprozesses von MjNhaP1 bei etwa der gleichen Wellenzahlposition wie bei NhaA liegt, bei (+) 1659 cm^{-1} , beobachtet man das negative Differenzsignal bei (-) 1633 cm^{-1} , das wahrscheinlich durch ungeordnete Strukturen verursacht wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die inaktiven Zustände von NhaA und MjNhaP1 deutlich unterscheiden und bestätigen die Ergebnisse der vorherigen Messungen. Im Gegensatz

dazu erfahren NhaA und MjNhaP1 eine ähnliche Konformationsänderung mit der Aktivierung. Das wurde auch schon bei den Ergebnissen der FTIR- und CD-Sekundärstrukturanalyse vorhergesagt.

Die aktivierungsinduzierten Änderungen der zwei Hauptkomponenten im Amid I Bereich korrelieren mit den Komponenten bei (-) 1555 cm^{-1} und (+) 1542 cm^{-1} für NhaA und (-) 1559 cm^{-1} und (+) 1551 cm^{-1} für MjNhaP1.

Sowohl bei NhaA als auch bei MjNhaP1 verursacht die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Proteins mehrere Differenzsignale in der Absorptionsregion der C=O Streckschwingung der Aminosäureseitenketten von Glutaminsäure und Asparaginsäure. Dabei werden die Differenzsignale in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand an gleicher bzw. ähnlicher Wellenzahlposition bei den beiden Antiportern beobachtet. In den beiden Fällen induziert die Aktivierung die Komponenten bei etwa (-) 1748 cm^{-1} , (+) 1740 cm^{-1} , (-) 1735 cm^{-1} , (+) 1728 cm^{-1} , (-) 1717 cm^{-1} und (+) 1707 cm^{-1} , welche die Änderungen in den Eigenschaften der Aminosäureseitenketten von Glu und/oder Asp widerspiegeln.

Bei dem Experiment der pH-Titration von NhaA (s. Kapitel 4.4.2) wurde beobachtet, dass die Inaktivierung mit der Deprotonierung der Aminosäureseitenketten Asp und/oder Glu verbunden ist. Auch bei den Differenzspektren der 2D-Kristalle (s. Kapitel 4.8.1) und bei den hier gezeigten Differenzspektren der in Detergenz solubilisierten Proteinprobe (Abbildung 95) induzierte die Inaktivierung die Komponenten bei etwa (-) 1720 cm^{-1} ($\nu(\text{C=O})$), (+) 1563 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$) und 1400 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$), die jeweils zu dem deprotonierten Zustand der Aminosäureseitenkette Asp oder Glu zugeordnet werden könnte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivierung in beiden Antiportern mit einer Konformationsänderung und Änderung der Protonierung und/oder der Umgebungsänderung von einer oder mehreren Seitenketten von Asp oder Glu verbunden ist. Dabei sind die Strukturänderungen der beiden Proteine während der Aktivierung ähnlich, bei Inaktivierung jedoch deutlich unterscheidbar. MjNhaP1 zeigt im inaktiven Zustand einen höheren Anteil an ungeordneter Struktur, der bei Aktivierung in α -helikale Struktur übergeht, während NhaA bei der Aktivierung lediglich eine Umwandlung innerhalb der α -helikalen Struktur (Länge oder Orientierungsgrad) zeigt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Funktion von Membranproteinen ist von entscheidender Bedeutung für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Um diese verstehen zu können, ist das Verständnis der Beziehungen zwischen der Struktur, der Dynamik und der Wechselwirkung mit der Umgebung der Membranproteine notwendig. Spektroskopische Methoden, wie beispielsweise FTIR- und CD-Spektroskopie sind in der Lage, diese Informationen zu geben. In der vorliegenden Dissertation haben sie bedeutende Beiträge zum Verständnis der durch die Aktivierung induzierten Konformationsänderungen der Na^+/H^+ Antiporter geleistet. Die hohe Empfindlichkeit einer selbstkonstruierten FTIR-ATR-Perfusionszelle ermöglichte es, über eine Proteinprobe verschiedene Wirkstoffmoleküle perfundieren zu lassen und die dadurch verursachten strukturellen Änderungen spektroskopisch zu charakterisieren. Die Konformationsänderungen, die den Aktivierungsprozess begleiten, wurden bei zwei verschiedenen Na^+/H^+ Antiportern, NhaA und MjNhaP1, untersucht. Sie werden bei unterschiedlichen pH-Bereichen aktiviert bzw. deaktiviert.

Der Na^+/H^+ Antiporter NhaA aus *E. coli* hat seine maximale Transportaktivität bei pH 8,5 und ist bei $\text{pH} < 6,5$ vollständig inaktiv. Trotz bekannter 3D-Struktur dieses Proteins für die inaktive Konformation bei pH 4 bleiben die Konformationsänderungen, die mit der Aktivierung des Proteins einhergehen, immer noch ungeklärt. Die Analyse der FTIR- und CD-Spektren von NhaA ergab in beiden Zuständen Anteile an β -Faltblatt, an Schleifen und ungeordneten Strukturen, wobei die α -helikale Struktur dominiert. Die FTIR-Spektren des inaktiven und aktiven Zustands zeigen zwei Komponenten, die auf die Präsenz zweier α -Helices mit unterschiedlichen Eigenschaften abhängig vom Aktivitätszustand hindeuteten.

Die temperaturinduzierten strukturellen Änderungen und die Reorganisation des Proteins während des Entfaltungsprozesses bestätigten, dass die Aktivierung des Proteins eine Änderung in den Eigenschaften der α -Helices zur Folge hat. Aktivierung führt zu einer thermischen Destabilisierung dieser Struktur. Auch für die β -Faltblattstruktur, welche den Hauptkontakt zwischen den Monomeren bildet, wurde ein unterschiedliches thermisches Verhalten zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand beobachtet. Daraus konnte gefolgert werden, dass Aktivität nur dann möglich ist, wenn NhaA als Dimer vorliegt.

Die Ergebnisse des $^1\text{H}/^2\text{H}$ Austauschs zeigen, dass die Lösungsmittelzugänglichkeit des Proteins sich mit der Aktivierung ändert. Die Aktivierung des Proteins induziert eine offene, für die Lösung zugänglichere Konformation, in welcher die Aminosäureseitenketten in der hydrophilen Region des Proteins schneller ^1H durch ^2H austauschen, und in welcher zusätzliche

Aminosäureseitenketten, die sich im inaktiven Zustand in der hydrophoben Region des Proteins befinden, mit der Aktivierung der Lösung exponiert werden.

Die Aufnahme reaktionsinduzierter Differenzspektren ergab eindeutige spektroskopische Signaturen für die Zustände „inaktiv“ und „aktiv“. Die Differenzspektren der pH-Titration zeigten, dass der pH-Wert einen dramatischen Effekt sowohl auf die Sekundärstruktur als auch auf den Protonierungszustand der Aminosäureseitenketten hat. Die pH- und Na⁺-induzierte Aktivierung des Proteins führt zur Umwandlung der transmembranen α -helikalen Struktur bezüglich Länge, Ordnungsgrad und/oder Anordnung und zur einer Protonierungsänderung der Aminosäureseitenketten von Glutaminsäure oder Asparaginsäure. Die pD-induzierten Sekundärstrukturänderungen lieferten zusätzlich Informationen über die Umgebungsänderung der Aminosäureseitenkette des Tyrosins mit der Aktivierung. Der Vergleich der durch die Bindung des Natriums und des Inhibitors induzierten Differenzspektren zeigte, dass die Bindungsstellen des Natriums und des Inhibitors unterschiedlich sind.

Die FTIR- und CD-Ergebnisse für den Na⁺/H⁺ Antiporter MjNhaP1 aus *M. jannaschii*, der im Gegensatz zu NhaA bei pH 6 aktiv und bei pH-Werten > 8 inaktiv ist, zeigten, dass ähnlich wie NhaA das Protein im aktiven Zustand bei pH 6 hauptsächlich aus α -Helices aufgebaut ist. Es bestand die Möglichkeit, zwei verschiedene Probenpräparationen (Protein in Detergenz bzw. in 2D-Kristallen) zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Die Erhöhung des pH-Werts bei der in Detergenz-solubilisierten Probe führte zu einer Abnahme der α -helikalen und einer Zunahme der ungeordneten Strukturen. Das äußerte sich auch in den Untersuchungen zur thermischen Stabilität und im ¹H/²H Austauschexperiment.

Die thermische Stabilität der α -Helices nahm mit der Inaktivierung dramatisch ab. Diese Ergebnisse zeigten auch, dass bei der Aktivierung von MjNhaP1 die β -Faltblattstruktur nicht involviert ist, aber diese von fundamentaler Bedeutung für die Gesamtstabilität des Proteins und wahrscheinlich für den Hauptkontakt zwischen den Monomeren verantwortlich ist. Im Gegensatz zu NhaA ist die Monomer-Monomer Wechselwirkung nicht für die Aktivität von MjNhaP1 notwendig. Aufgrund des höheren Anteils von ungeordneter Struktur im inaktiven Zustand der in Detergenz solubilisierten Probe beobachtet man in diesem Zustand einen höheren ¹H/²H Austausch. Der Vergleich mit den Ergebnissen des ¹H/²H Austausches von 2D-Kristallen ermöglichte die Lokalisation der ungeordneten Struktur an der Außenseite des Proteinmoleküls im inaktiven Zustand. Die pH-induzierten Differenzspektren zeigten, dass die Aktivierung zu einer Helikalisierung des Proteins und einer Protonierungsänderung der Aminosäureseitenketten von Asparaginsäure und/oder Glutaminsäure unabhängig von der Probenpräparation führt.

Der Vergleich von NhaA und MjNhaP1 zeigt, dass die Aktivierung in beiden Fällen mit einer Konformationsänderung und Änderung der Protonierung oder der Umgebung von einer oder mehreren Seitenketten von Asparaginsäure oder Glutaminsäure verbunden ist. Dabei sind die Strukturänderungen der beiden Proteine während der Aktivierung ähnlich, bei Inaktivierung jedoch deutlich unterscheidbar. Die pH-induzierten Strukturänderungen wurden bei NhaA und MjNhaP1 durch die Mutanten G338S und R347A, die keine pH-Abhängigkeit der Aktivität zeigen, bestätigt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Rothman A., Gerchman Y., Padan E., and Schuldiner S., Probing the Conformation of NhaA, a Na^+/H^+ Antiporter from *Escherichia coli*, with Trypsin, *Biochemistry* 36 (1997) 14572.
2. Nelson D.L. and Cox M.M., *Lehninger Biochemie*, Springer Verlag Gmbh 3 (2005).
3. Gerold A., Luger P., and Stark G., *Physikalische Chemie und Biophysik*, Springer Verlag Gmbh 4 (2003).
4. Padan E., Bibi E., Ito M., and Krulwich TA, Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1717 (2005) 67.
5. Padan E. and Schuldiner S., Molecular Physiology of the Na^+/H^+ Antiporter in *Escherichia coli*, *J. Exp. Biol.* 196 (1994) 443.
6. Hunte C., Screpanti E., Venturi M., Rimon A., Padan E., and Michel H., Structure of Na^+/H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH, *Nature* 435 (2005) 1197.
7. Rothman A., Padan E., and Schuldiner S., Topological Analysis of NhaA, a Na^+/H^+ antiporter from *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 32288.
8. Williams K.A., Geldmacher-Kaufer U., Padan E., Schuldiner S., and Kuhlbrandt W., Projection structure of NhaA, a secondary transporter from *Escherichia coli*, at 4.0  resolution, *The EMBO Journal* 18 (1999) 3558.
9. Williams K.A., Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA, *Nature* 403 (2000) 112.
10. Gerchman Y., Rimon A., and Padan E., A pH-dependent Conformational Change of NhaA Na^+/H^+ Antiporter of *Escherichia coli* Involves Loop VIII-IX, Plays a Role in the pH Response of the Protein, and Is Maintained by the Pure Protein in Dodecyl Maltoside, *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 24617.
11. Venturi M., Rimon A., Gerchman Y., Hunte C., Padan E., and Michel H., The Monoclonal Antibody 1F6 Identifies a pH-dependent Conformational Change in the Hydrophilic NH_2 Terminus of NhaA Na^+/H^+ Antiporter of *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000) 4734.
12. Veenhoff L.M., Heuberger E.H.M.L., and Poolman B., Quaternary structure and function of transport proteins, *TRENDS in Biochemical Sciences* 27 (2002) 242.
13. Gerchman Y., Rimon A., Venturi M., and Padan E., Oligomerization of NhaA, the Na^+/H^+ Antiporter of *Escherichia coli* in the Membrane and Its Functional and Structural Consequences, *Biochemistry* 40 (2001) 3403.

14. Hilger D., Jung H., Padan E., Wegener C., Vogel KP, Steinhoff HJ, and Jeschke G, Assessing oligomerization of membrane proteins by four-pulse DEER: pH-dependent dimerization of NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *E. coli*, *Biophysical Journal* 89 (2005) 1328.
15. Hilger D., Polyhach Y., Padan E., Jung H., and Jeschke G., High-resolution structure of a Na⁺/H⁺ antiporter dimer obtained by pulsed electron paramagnetic resonance distance measurements, *Biophysical Journal* 93 (2007) 3675.
16. Rimon A., Tzuberly T., and Padan E., Monomers of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* are fully functional yet dimers are beneficial under extreme stress conditions at alkaline pH in the presence of Na⁺ or Li⁺, *J Biol Chem* 282 (2007) 26810.
17. Hellmer J., Pätzold R., and Zeilinger C., Identification of a pH regulated Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter of *Methanococcus jannaschii*, *FEBS Letters* 527 (2002) 245.
18. Hellmer J., Teubner A., and Zeilinger C., Conserved arginine and aspartate residues are critical for function of MjNhaP1, a Na⁺/H⁺ antiporter of *M. jannaschii*, *FEBS Letters* 542 (2003) 32.
19. Vinothkumar KR, Smits S.HJ, and Kühlbrandt W., pH-induced structural change in a sodium/proton antiporter from *Methanococcus jannaschii*, *EMBO J.* 24 (2005) 2720.
20. Mäntele W., *Spektroskopie*, in *Bioanalytik* Von H. Zorbas Und F. Lottspeich, Spektrum Verlag (1998).
21. Barth A. and Zscherp C., What vibrations tell us about proteins, *Quarterly Reviews of Biophysics* 35 (2002) 369.
22. Barth A., *Infrared spectroscopy of proteins*, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1767 (2007) 1073.
23. Fabian H. and Mäntele W., *Infrared Spectroscopy of Proteins*, *Handbook of Vibrational Spectroscopy* 5 (2002) 3426.
24. Fringeli U.P. and Günthard Hs.H., *Infrared Membrane Spectroscopy*, *Journal of Biochemistry, Molecular Biology & Biophysics* 31 (1981) 270.
25. Zuber G., Prestrelski S.J., and Benedek K., Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to Studies of Aqueous Protein Solutions, *Analytical Biochemistry* 207 (1992) 150.
26. Mantsch H.H., Moffatt D.J., and Casal H.L., Fourier Transform Methods for Spectral Resolution Enhancement, *Journal of Molecular Structure* 173 (1988) 285.
27. Goormaghtigh E., Raussens V., and Ruyschaert J.M., Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1422 (1999) 105.
28. Vigano C., Manciu L., Buyse F., Goormaghtigh E., and Ruyschaert J.M., Attenuated Total Reflection IR Spectroscopy as a Tool to Investigate the Structure,

- Orientation and Tertiary Structure Changes in Peptides and Membrane Proteins, *Biopolymers* 55 (2000) 373.
29. Oberg K.O. and Fink A.L., A New Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy Method for the Study of Proteins in Solution, *Analytical Biochemistry* 256 (1998) 92.
 30. Marsh D., Quantitation of Secondary Structure in ATR Infrared Spectroscopy, *Biophysical Journal* 77 (1999) 2630.
 31. Kelly S.M., Jess T.J., and Rice N.C., How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1751 (2005) 119.
 32. Johnson W.C., Secondary Structure of Proteins through Circular Dichroism Spectroscopy, *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 (1988) 145.
 33. Johnson W.C., Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 35 (1999) 307.
 34. Wallace B.A., Lees J.G., Orry A.J.W., Lobley A., and Janes R.W., Analysis of circular dichroism spectra of membrane proteins, *Protein Science* 12 (2002) 875.
 35. Agic E., Untersuchung von Ligandenbindung und Proteinkonformation mit Hilfe einer Perfusions-ATR-Zelle, Diplomarbeit Am Institut Für Biophysik, J. W. Goethe Universität (2004).
 36. Mäntele W., Klein O., and Agic E., Infrarot-Bioanalytik - Probenformen von Proteinen, *Laborpraxis* 5 (2004) 34.
 37. Goormaghtigh E., Cabiaux V., and Ruyschaert J.M., Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy III: Secondary Structures, *Subcell Biochemistry* 23 (1994) 405.
 38. Goormaghtigh E., Cabiaux V., and Ruyschaert J.M., Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy I. Assignments and Model Compounds, *Subcell Biochemistry* 23 (1994) 329.
 39. Byler D.M. and Susi H., Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra, *Biopolymers* 25 (1986) 469.
 40. Miyazawa T., Perturbation Treatment of the Characteristic Vibrations of Polypeptide Chains in Various Configurations, *The Journal of Chemical Physics* 32 (1960) 1647.
 41. Susi H., Timasheff S.N., and Stevens L., Infrared Spectra and Protein Conformations in Aqueous Solutions I. The Amide I Band in H₂O and D₂O Solutions, *The Journal of Biological Chemistry* 242 (1967) 5460.
 42. Arrondo J.-L., Muga A., Castresana J., and Goñi F.M., Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, *Biophysics & Molecular Biology* 59 (1993) 23.

43. Susi H. and Byler D.M., Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: second derivative spectra, *Biochem Biophys Res Commun.* 115 (1983) 391.
44. Jung C., Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Molecular Recognition* 13 (2000) 325.
45. Kauppinen J.K., Moffatt D.J., Cameron D.G., and Mantsch H.H., Noise in Fourier self-deconvolution, *Applied Optics* 20 (1981) 1866.
46. Gronholz J. and Herres W., J. Gronholz und W. Herres: Understanding FT-IR Data Processing, I & C Reprint 1(84), 3(85), Dr. Alfred Huething Publishers (2008).
47. Whitmore L. and Wallace B.A., DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data, *Nucleic Acids Research* 32 (2004) 668.
48. Sreerama N. and Woody R.W., Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, *Analytical Biochemistry* 287 (2000) 252.
49. Chehín R., Iloro I., Marcos M.J., Villar E., Shnyrov V.L., and Arrondo J.-L., Thermal and pH-Induced Conformational Changes of a β -Sheet Protein Monitored by Infrared Spectroscopy, *Biochemistry* 38 (1999) 1525.
50. Heyes C.D. and El-Sayed M.A., Effect of temperature, pH, and metal ion binding on the secondary structure of bacteriorhodopsin: FT-IR study of the melting and premelting transition temperatures, *Biochemistry* 40 (2001) 11819.
51. Heimburg T. and Marsh D., Investigation of Secondary and Tertiary Structural Changes of Cytochrome *c* in Complexes with Anionic Lipids Using Amide Hydrogen Exchange Measurements: An FTIR Study, *Biophysical Journal* 65 (1993) 2408.
52. Torrecillas A., Corbalán-García S., and Gómez-Fernández C., An Infrared Spectroscopic Study of the Secondary Structure of Protein Kinase C α and Its Thermal Denaturation, *Biochemistry* 43 (2004) 2332.
53. Englander S.W., Sosnick T.R., Englander J.J., and Mayne L., Mechanisms and uses of hydrogen exchange, *Curr Opin Chem Biol.* 6 (1996) 18.
54. Englander S.W. and Krishna M.M.G., Hydrogen exchange, *Nat Struct Biol.* 8 (2001) 741.
55. Goormaghtigh E., Cabiaux V., and Ruysschaert J.M., Determination of Soluble and Membrane Protein Structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy II. Experimental Aspects, Side Chain Structure, and H/D Exchange, *Subcell Biochemistry* 23 (1994) 363.
56. Grdadolnik J. and Maréchal Y., Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by fourier transform infrared spectroscopy, part I: structural studies, *Applied Spectroscopy* 59 (2005) 1347.
57. Covington A.K., Paabo M., Robinson R.A., and Bates R.G., Use of the glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (paD) scale and the operational pH in heavy water, *Analytical Chemistry* 40 (1968) 700.

58. de Jongh H.H.J., Goormaghtigh E., and Ruyschaert J.M., Amide-proton exchange of water-soluble proteins of different structural classes studied at the submolecular level by infrared spectroscopy, *Biochemistry* 36 (1997) 13603.
59. Grdadolnik J. and Maréchal Y., Hydrogen-deuterium exchange in bovine serum albumin protein monitored by Fourier transform infrared spectroscopy, part II: kinetic studies, *Applied Spectroscopy* 59 (2005) 1357.
60. Provencher S.W., A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations, *Computer Physics Communications* 27 (1982) 227.
61. Mäntele W., Infrared and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, *Biophysical Techniques in Photosynthesis* 9 (1996) 137.
62. Screpanti E., Padan E., Rimón A., Michel H., and Hunte C., Crucial steps in the structure determination of the Na⁺/H⁺ antiporter NhaA in its native conformation, *J Mol Biol.* 362 (2006) 192.
63. Arrondo J.-L. and Goñi F.M., Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy, *Biophysics & Molecular Biology* 72 (1999) 367.
64. Arrondo J.L.R., Castresana J., Valpuesta J.M., and Goñi F.M., Structure and thermal denaturation of crystalline and noncrystalline cytochrome oxidase as studied by infrared spectroscopy, *Biochemistry* 33 (1994) 11650.
65. Arrondo J.L.R., Young N.M., and Mantsch H.H., The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy, *Biochimica Et Biophysica Acta* 952 (1988) 261.
66. de Jongh H.H.J., Goormaghtigh E., and Ruyschaert J.M., Monitoring structural stability of trypsin inhibitor at the submolecular level by amide-proton exchange using Fourier transform infrared spectroscopy: a test case for more general application, *Biochemistry* 36 (1997) 13593.
67. Raussens V., Narayanaswami V., Goormaghtigh E., Ryan R.O., and Ruyschaert J.M., Hydrogen/deuterium exchange kinetics of apolipoprotein III in lipid-free and phospholipid-bound states. An analysis by Fourier transform infrared spectroscopy, *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 23089.
68. Sturgis J.N., Robert B., and Goormaghtigh E., Transmembrane Helix Stability: The Effect of Helix-Helix Interactions Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biophysical Journal* 74 (1998) 988.
69. Olkhova E., Padan E., and Michel H., The influence of protonation states on the dynamics of the NhaA antiporter from *Escherichia coli*, *Biophysical Journal* 92 (2008) 3784.
70. Fringeli U.P. and Günthard Hs.H., Hydration sites of egg phosphatidylcholine determined by means of modulated excitation infrared spectroscopy, *Biochimica Et Biophysica Acta* 450 (1976) 101.

71. León X., Lórenz-Fonf V.A., Lemonnier R., Leblanc G., and Padrós E., Substrate-Induced Conformational Changes of Meliobiose Permease from *Escherichia coli* Studied by Infrared Difference Spectroscopy, *Biochemistry* 44 (2005) 3506.
72. León X., Lemonnier R., Leblanc G., and Padrós E., Changes in Secondary Structures and Acidic Side Chains of Melibiose Permease upon Cosubstrates Binding, *Biophysical Journal* 91 (2006) 4440.
73. Troullier A., Gerwert K., and Dupont Y., A time-resolved Fourier transformed infrared difference spectroscopy study of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: kinetics of the high-affinity calcium binding at low temperature., *Biophysical Journal* 71 (1996) 2970.
74. Venyaminov S.Yu. and Kalnin N.N., Quantitative IR Spectrophotometry of Peptide Compounds in Water (H₂O) Solutions. I. Spectral parameters of Amino Acid Residue Absorption Bands, *Biopolymers* 30 (1990) 1243.
75. Barth A., The infrared absorption of amino acid side chains, *Biophysics & Molecular Biology* 74 (2000) 141.
76. Gutman N., Steiner-Mordoch S., and Schuldiner S., An amino acid cluster around the essential Glu-14 is part of the substrate- and proton-binding domain of EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, *J Biol Chem* 278 (2003) 16082.
77. Olkhova E., Hunte C., Screpanti E., Padan E., and Michel H., Multiconformation continuum electrostatics analysis of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* with functional implications, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (2006) 2629.
78. Arkin IT, Xu H, Jensen MO, Arbely E, Bennett ER, Bowers KJ, Chow E, Dror RO, Eastwood MP, Flitman-Tene R., Gregersen BA, Klepeis JL, Kolossvary I, Shan Y, and Shaw DE, Mechanism of Na⁺/H⁺ antiporting, *Science* 317 (2007) 799.
79. Dibrov P., Rimon A., Dzioba J., Winogrodzki A., Shalitin Y., and Padan E., 2-Aminoperimidine, a specific inhibitor of bacterial NhaA Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporters, *FEBS Letters* 579 (2005) 373.
80. Kedrov A., Janovjak H., Ziegler C., Kühlbrandt W., and Müller D.J., Observing Folding Pathways and Kinetics of a Single Sodium-proton Antiporter from *Escherichia Coli*, *J. Mol. Biol.* 355 (2006) 2.
81. Kedrov A., Appel M., Baumann H., Ziegler C., and Muller D.J., Examining the dynamic energy landscape of an antiporter upon inhibitor binding, *J Mol Biol.* 375 (2008) 1258.
82. Mukherjee S., Chowdhury P., and Gai F., Infrared Study of the Effect of Hydration on the Amide I Band and Aggregation Properties of Helical Peptides, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 4596.
83. Padan E., Tzuberly T., Herz K., Kozachkov L., Rimon A., and Galili L., NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH regulated Na⁺/H⁺ antiporter, *Biochimica Et Biophysica Acta* 1658 (2004) 2.

84. Kozachkov L., Herz K., and Padan E., Functional and structural interactions of the transmembrane domain X of NhaA, Na⁺/H⁺ antiporter of Escherichia coli, at physiological pH, Biochemistry 46 (2007) 2419.

Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt.....

..... meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Werner Mäntele für die Vergabe eines sehr interessanten Themas und stete und engagierte Unterstützung und Betreuung. Besonders möchte ich mich für seine Hilfe bei der Bewerbung für das Stipendium und die Aufnahme in das Doktoranden-Programm der „International Max-Planck-Research School“ bedanken. Die Teilnahme an allen Konferenzen wäre ohne seine Unterstützung nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich ihm danken, dass er immer ein Weg gefunden hat, mir das zu ermöglichen.

..... Herrn Dr. Oliver Klein für die Betreuung, die zahlreichen und hilfreichen Diskussionen. Zusätzlich möchte ich mich bei ihm für seine Hilfe bei den grammatischen und fachlichen Korrekturen dieser Arbeit bedanken.

..... Herrn Ernst Winter für die hervorragende Umsetzung der Ideen zur Entwicklung und Verbesserung der Perfusionzelle und deren Herstellung.

..... Frau Dr. Emanuela Screpanti und Frau Dr. Carola Hunte vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt für die Bereitstellung des Na⁺/H⁺ Antiporters NhaA.

..... Frau Dr. Panchali Goswami und Herrn Prof. Dr. W. Kühlbrandt vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt für die Bereitstellung des Na⁺/H⁺ Antiporters MjNhaP1.

..... der „International Max-Planck-Research School“ für die Vergabe des Stipendiums und für die Aufnahme in das Doktoranden-Programm. Besonders danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Organisation der Tagung für alle Studenten der „IMPreS“ in Frankfurt.

..... Frau Filiz Korkmaz für ihre Freundschaft und gemeinsamen Pausen. Besonders danke ich ihr für die anregenden Diskussionen und die Korrekturen von Postern und Veröffentlichungen in englischer Sprache.

..... Herrn Dr. Carsten Krejtschi für seine zahlreichen Diskussionen und seine Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich ihm für die Automatisierung der temperaturinduzierten Messung.

..... Frau Gabriela Schäfer für die zahlreichen Diskussionen und ihre Hilfe bei vielen chemischen und biochemischen Fragestellungen (und natürlich für die verschiedensten Eissorten).

Ich möchte mich aber auch bei Dr. Georg Wille, der so manches Problem beim Umgang mit Proteinen löste, und auch bei Annette Kopitz, die u.a. immer für eine gute Atmosphäre im Institut gesorgt hat, bedanken.

Diese Arbeit wäre mit den Grammatikfehlern übersät (gerade mache ich wahrscheinlich einen), ohne die Menschen, die diese Arbeit gelesen und korrigiert haben. Deshalb gilt mein herzlichster Dank an Prof. Dr. Werner Mäntele, Dr. Oliver Klein, Dr. Carsten Krejtschi, Gabriela Schäfer, Jürgen Maurer, Christian Weidemüller.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Azra und Enver Agić, sowie meinem Ehemann, Denis Džafić, für ihre Liebe, ihre großen Interesse für diese Arbeit und den bedingungslosen Rückhalt, den ich immer bei ihnen finde. Meinem Ehemann möchte ich zusätzlich für sein Verständnis und die zahlreichen Diskussionen über meine Arbeit danken. Mein Dank gilt auch meiner Schwester, Amra, und ihrer Tochter, Amila, für die Bescherung mit den schönen Momenten.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Enela Džafić (geb. Agić)
Anschrift: Robert-Mayer Str. 49
60486 Frankfurt am Main
Geburtsdatum: 15. 01. 1978
Geburtsort: Prijedor, Bosnien und Herzegowina
Staatsangehörigkeit: bosnisch

STUDIUM

Seit 2005 Promotionsstudium am Institut für Biophysik
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Thema: „*Struktur, Funktion und Dynamik von Na⁺/H⁺ Antiporter: Eine infrarotspektroskopische Studie*“

Seit 2005 Stipendium der „International Max-Planck-Research School“ in
Frankfurt am Main

04/2004 Abschluss: Diplom Physik
Abschlussnote: sehr gut

02/2003 – 01/2004 Diplomarbeit am Institut für Biophysik
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Thema: „*Untersuchung von Ligandenbindung und Proteinkonformation mit Hilfe einer Perfusions-ATR-Zelle*“

09/1998 - 04/2004 Studium der Physik,
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

SCHULAUSSBILDUNG

1995 – 1998 Max Beckmann-Schule, Oberstufengymnasium,
Frankfurt am Main

1993-1995 Brüder Grimm-Schule, Realschule,
Frankfurt am Main

1992-1993 Gymnasium Pula,
Pula, Kroatien

1988-1992 Gesamtschule Kozarac,
Prijedor, Bosnien und Herzegowina

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

- Seit 05/2004 Praktikumsbetreuung „Physik für Mediziner“ und „Biophysikalisches
Praktikum für Fortgeschrittene“ am Institut für Biophysik
- 09/2002-04/2004 Junior-Mentorin der Schülerinnen von Goethe-Gymnasium,
Mentorinnen-Netzwerk, Frankfurt am Main

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die aus benutzten Werken im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, mit Quellen- bzw. Herkunftsangaben kenntlich gemacht habe.

Frankfurt am Main, den _____
